

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง



จากการเข้ร่ากั้วพู่ควยบีโตร์เลียมอีเทอร์ไว้หลาย ๆ วัน แล้วกรองเอา
มากลั่นไล้ตัวทำละลายออกไปจนเกือบหมด จะโคตะกอนสีเหลืองอ่อนแยกออกมา กรอง
เอาตะกอนออกจากสารละลายซึ่งมีสีเหลือง นำเอาตะกอนไปแยกเอาพวก Wax ออก
โดยการละลายในบีโตร์เลียมอีเทอร์จนไม่ละลายอีกต่อไป แล้วนำตะกอนที่เหลือไปละลาย
ในส่วนผสมของบีโตร์เลียมอีเทอร์และเบนซีน ในอัตราส่วน 4 : 1 , 3 : 1 , และ
2 : 1 ตามลำดับ ส่วนแรก ๆ จะได้เป็น Wax ปนอยู่ควยกับผลึกซึ่งเป็นมันวาว ส่วน
ต่อๆ มาจะได้ผลึกเป็นมันวาว กรองเอาผลึกไปตกผลึกซ้ำควยเมทานอลหลาย ๆ ครั้ง
จนโคจุกหลอมเหลวคงที่ที่ 276-7° ให้เป็นสาร B

ส่วนสารละลายสีเหลืองนำมาระเหยไล้ตัวทำละลายให้แห้งแล้วนำไปแยกโดย
ใช้ Column Chromatography โดยใช้ Aluminium Oxide เป็น Adsorbent
Elute Column ควย บีโตร์เลียมอีเทอร์ และส่วนผสมของบีโตร์เลียมอีเทอร์กับ
อีเทอร์ ส่วนแรก ๆ ออกมาเป็น Wax ต่อมาก็คือน้ำมัน, สาร C (mp. 136-7°),
สาร A (mp. 167-8°) ตามลำดับ

3.1 สาร A mp. 167-8°

สาร A โคจากการ Elute Column Chromatography ควย
10 % อีเทอร์-บีโตร์เลียมอีเทอร์ ใน Fraction แรก ๆ จะมีสาร C ปนออกมา
ควย จึงนำมาตกผลึกควย บีโตร์เลียมอีเทอร์, 5 % อีเทอร์-บีโตร์เลียมอีเทอร์, เอทานอล
และบีโตร์เลียมอีเทอร์ จนโคจุกหลอมเหลวคงที่ที่ 167-8° สาร A นี้ฟอกสีโบร
มีนในคาร์บอนเตตราคลอไรด์โคได้ และไม่มีไฮโตร์เจนโบรไมด์เกิดขึ้น ไม่มีปฏิกิริยาควย
carbonyl reagents ต่าง ๆ ให้สีควย Liebermann - Burchard reagent
เปลี่ยนสีจากม่วงแดงเป็นม่วงน้ำเงินและเป็นสีน้ำเงิน หา Rf value (ตามวิธี 2.1.1)
เมื่อใช้ solvent ผสมระหว่างบีโตร์เลียมอีเทอร์ : อีเทอร์ (1 : 3) โคควย Rf เท่าควย
0.67 และเมื่อใช้ solvent ผสมระหว่าง ethylacetate : H₂O (1:1) โคควย
Rf = 0.90

3.2 สาร C mp. 136-7

สาร C ได้จากการ Elute Column Chromatography ด้วย 5% อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ และจะมีปนออกมาใน Fraction แรก ๆ ของ 10% อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอาผลึกมาแยกเอา Wax ออกโดยการละลายด้วย 5% อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเอาที่เหลือมาตกผลึกด้วยเอทานอล และตกผลึกซ้ำด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์จนได้ mp. คงที่ ที่ 136-137° C = 82.58%

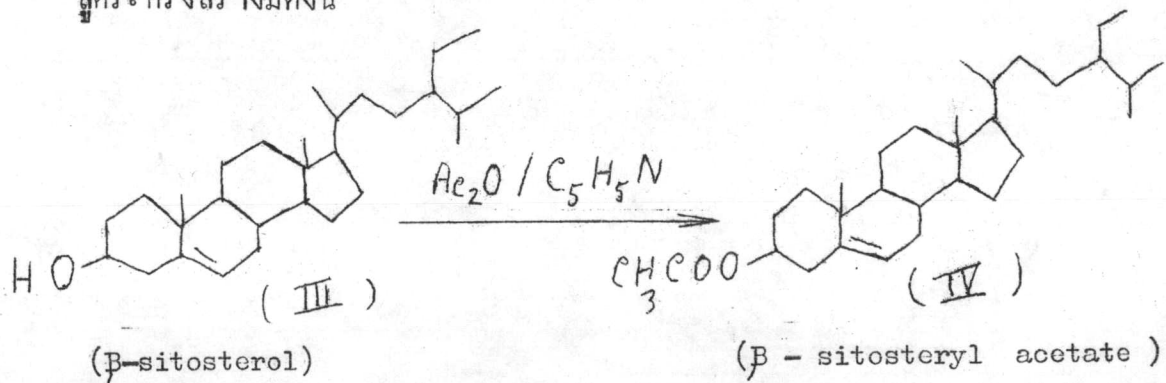
H = 12.06 %

จากการคำนวณจากสูตร $C_{29}H_{50}O$ ได้ C = 84.05 %

H = 12.07 %

สาร C ฟอกสี ไขมันในคาร์บอนเตตราคลอไรด์ไม่มีกาซไฮโดรเจนโบรไมด์ฟอกสีไป แต่สเติมเปอร์เมงกาเนท ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2,4-dinitrophenyl hydrazine ให้สีกับ Leibermann-Burchard reagent (9) โดยโคสีแดง แล้วเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง นำเงิน และเขียวตามลำดับ สาร C แสดงคุณสมบัติต่าง ๆ เหมือนกับ

β -sitosterol ซึ่งมีสูตร $C_{29}H_{50}O$ Infra-red spectrum แสดง characteristic ของ 3 β -hydroxy group ($3350, 1050\text{ cm}^{-1}$) Trisubstituted ethylene ($1630, 800\text{ cm}^{-1}$) เมื่อเปรียบเทียบ Infra-red spectrum ของสาร C กับ β -sitosterol ปรากฏว่า Identical กันทุก peaks (1) และ Mixed melting point ก็มีค่าคงที่ และค่า Rf value โดยใช้ solvent ต่าง ๆ ก็เท่ากัน confirm ให้แน่นอน โดยการเตรียม Acetyl derivative ซึ่งมี mp. คงที่ที่ 130-131° เมื่อทำ Mixed melting point กับ acetate ของ β -sitosterol ก็ไม่เปลี่ยนแปลง (1) จึงเชื่อว่าสาร C เป็น β -sitosterol (11) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O$ และสูตรโครงสร้างมีดังนี้



3.3 สาร B mp. 276-7°

สาร B ได้จากตะกอนที่ได้จากการแรกรากแก้วพวยบีโตร์เดียวเมื่อเทอรแล้วกลั่นได้ solvent ออกจนเกือบหมด นำตะกอนมาละลายในบีโตร์เดียวเมื่อเทอรจนไม่ละลายอีกต่อไป จึงเปลี่ยน solvent เป็น solvent ผสมระหว่างบีโตร์เดียวเมื่อเทอรกับ เบนซีนในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน เมื่อใช้บีโตร์เดียวเมื่อเทอร : เบนซีนในอัตราส่วน 2 : 1 จะได้สาร B ออกมาเป็นเกล็ดมันวาว กรองเอาผลึกไปตกผลึกในเมทานอลหลาย ๆ ครั้งจน mp. คงที่ที่ 276-7° สาร B ให้สีม่วงแดงแล้วเปลี่ยนเป็นม่วงน้ำเงินกับ Lieberman - Burchard Reagent (9) ฟอกสี โบรมีนในการบอเนตตราคลอไรด์ ไม่ให้กาชได้ ครเจนโบรมไมด์ หากค่า Rf โดยใช้ solvent ผสมระหว่าง n-butanol : acetic : H₂O = 4 : 1 : 5 (ตามวิธี 2.1.1) ได้ค่า Rf เท่ากับ 0.88 จากผลการวิเคราะห์หาธาตุต่าง ๆ มี C = 76.92 % , H = 10.92 % M.W. = 456 จาก mass spectrum เมื่อคำนวณจากสูตร C₃₀H₄₈O₃ C = 78.90 % H = 10.59 % M.W. = 456

NMR spectrum ของสารตัวนี้ แสดงว่าเป็น Betulinic acid ส่วน Infra-red spectrum แสดง characteristic -OH (3,440Cm⁻¹) carboxylic acid dimer (3,000- 2,800 Cm⁻¹) C = O vibration (1,680 Cm⁻¹) C-H bonding vibration of -CH₂- and -CH₃(1,450, 1465 Cm⁻¹) C-CH₃bending vibration gem-dimethyl group (1,370 Cm⁻¹) C-O symmetric Stretching of secondary alcohol (1 110, 1.040 Cm⁻¹, 1.030 Cm⁻¹) C-H out of plane bending of CR₁R₂ = CH₂ and to the terminal methylene group (1,640 885 Cm⁻¹) absorption peaks Identical กับ standard spectrum ของ Betulinic acid (2)(10)(11)(12)913(14) ทุกประการและเมื่อนำสาร B มา ผสมกับ Betulinic acid แล้วหา melting point ปรากฏว่าไม่เปลี่ยนแปลง (2)

เพื่อ confirm ว่ามี -OH 1 group จึงนำสาร B ไปทำ acetylation ปรากฏว่าจากการคำนวณหา M.W. ของ acetyl derivative ของสาร B ได้เป็น $C_{32}H_{50}O_4$ จะเห็นว่าเป็นการเพิ่ม $CH_3-C(=O)$ 1 group และ absorption band ของ -OH ที่ $3,440\text{cm}^{-1}$ ก็หายไป แต่ absorption band ของ C-O ที่ $1,680\text{cm}^{-1}$ และ $3,000-2,800\text{cm}^{-1}$ ยังคงอยู่และจะมี absorption band ของ C=O ที่ $1,720-1,600\text{cm}^{-1}$ ส่วน absorption band ของ C-O stretching ของ secondary alcohol หายไปด้วย เมื่อทดลองโดยนำ acetyl derivative ของสาร B ไปทำ Mixed melting point กับ acetate ของ Betulinic acid ปรากฏว่าไม่เปลี่ยนแปลง (2)

จากการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์คาร์บอนไฮโดรเจนของ acetyl derivative ของ B ได้ดังนี้

$$C = 76.79 \% \quad H = 10.14 \%$$

จากการคำนวณจากสูตร $C_{32}H_{50}O_4$ ได้ดังนี้

$$C = 77.10 \% \quad H = 10.04 \%$$

เพื่อ confirm ว่ามี -COOH group ท่ออยู่กับ tertiary carbon atom in an angular position (10)(13)(14) จึงทดลองใช้ methylating agents ธรรมดา คือ Methyl iodide และ Dimethyl sulfate (23) ปรากฏว่า -COOH จะไม่ถูก methylate จึงลองใช้ diazomethane (23) ปรากฏว่าได้ผล ได้ methyl ester m.p. 223-4

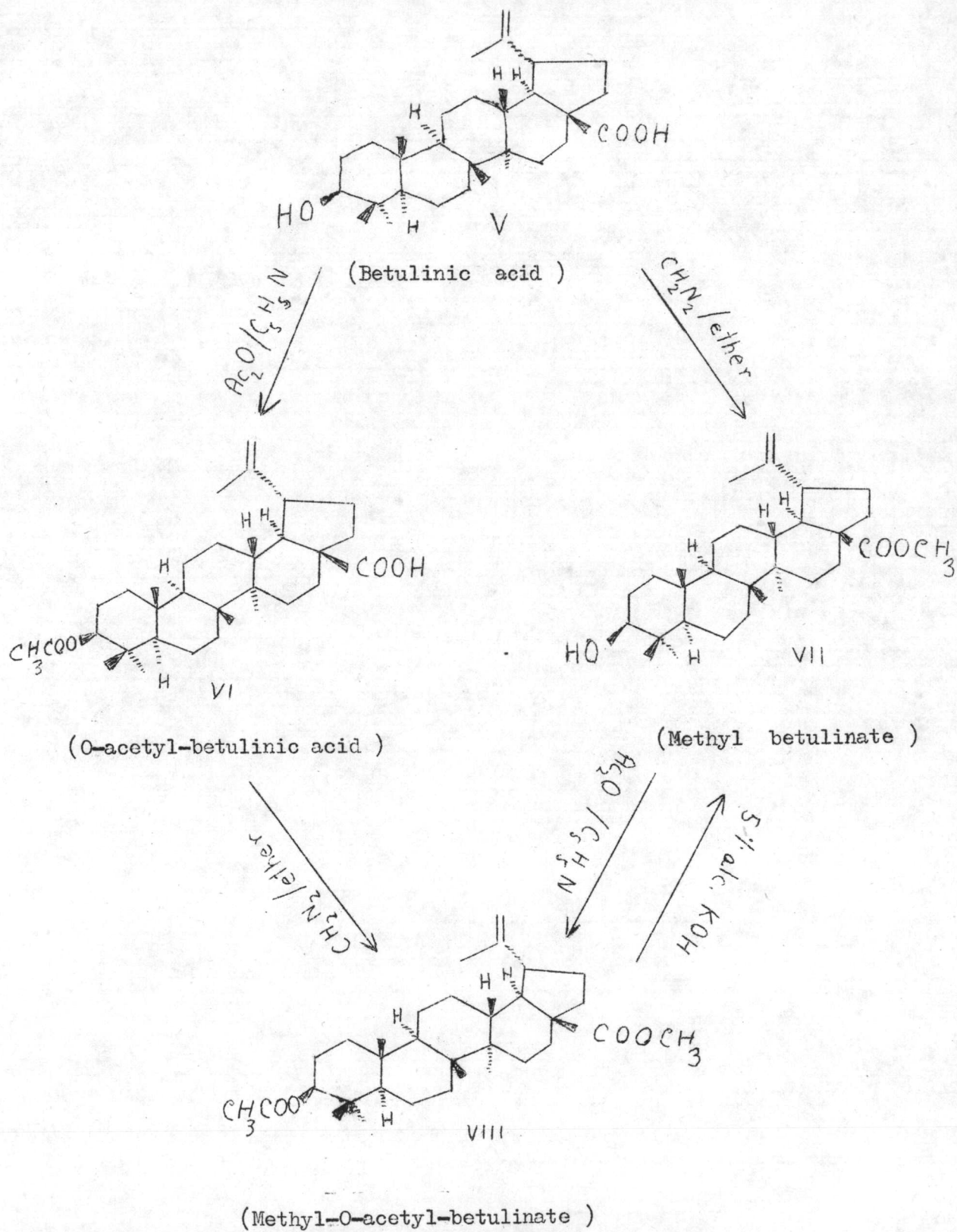
$$C = 80.02 \% \quad H = 10.27 \%$$

ซึ่งถ้าคำนวณจากสูตร $C_{31}H_{50}O_3$ จะได้ดังนี้

$$C = 79.15 \% \quad H = 10.64 \%$$

ปรากฏว่า methyl ester ของ B absorption band ของ
 -OH ที่ $3,540 \text{ cm}^{-1}$ ยังคงอยู่ เกิด absorption band ของ R-COOCH_3 ที่
 $1,180-1,160 \text{ cm}^{-1}$ แต่ absorption band ของ C-O symmetric stretching
 ของ secondary alcohol คงเหมือนเดิม และ C = O stretching vibration ของ
 ketone ที่ $1,700 \text{ cm}^{-1}$ ก็คงเดิม Infra-red spectrum ของ methyl ester ของสาร
 B Identical กับ methyl ester ของ Betulinic acid ทุก band⁽²⁾ และเมื่อทำ
 Mixed melting point ก็ไม่เปลี่ยนแปลง

จากการทดลอง ได้เตรียม Methyl-O-acetyl derivative ไม้
 จะ Methylation ก่อนหรือหลัง Acetylation ผลจะ identical กันทั้งสองการทดลอง
 และ Methyl - O -acetyl derivative สามารถจะนำมา deacetylation
 ได้โดย Reflux กับ 5 % alcoholic KOH จะได้ Methyl ester กลับคืนมาอย่าง
 เดิม จากข้อสันนิษฐานทั้งหมด จึงสรุปว่าสาร B คือ betulinic acid มีสูตรและ
 ปฏิกริยา ดังนี้



ผู้วิจัยใครคนควาเพื่อศึกษาว่าสารที่สกัดจากถั่วพุ่มนั้นมีในพืชอะไรบ้าง และ
พืชนั้น ๆ มีประโยชน์ทางคานยาอย่างไร เทาที่คนพบมีดังนี้ :-

Betulinic acid

พบในเปลือกของต้นมะพลับ (Diospyros Siamensis) ตามสรรพคุณ
ยาโบราณกล่าวว่าเป็นยาบำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้อท้องร่วง ขับผายลม แก้โรคคานตาย
คาน (3)

นอกจากนี้ยังพบในพืชอีก 3 ชนิด ซึ่งไม่มีหลักฐานทางคานสรรพคุณยา คือ
Lemaireocereus stellatus (10) ซึ่งเป็น Cactus มีมากใน Mexico, Costa Rica
และ Peru

เปลือกของ Arbutus menziesii (Ericaceae) (13) เปลือกของ
Cornus florida, L. (4)

B-Sitosterol

พบในต้นสารพัดพิษ (Clinacanthus Burmanii) ตามสรรพคุณยาโบราณ
กล่าววว่า ถ้าถูกงูพิษกัดให้เอาใบสารพัดพิษนี้ตำผสมกับเหล้าโรง แล้วคั้นเอาน้ำเหล้ามา
คั้น ส่วนกากก็เอาไปพอกที่แผลจะหายไคภายใน 1-2 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังใช้แกพิษตะขาบ
แมงป่องขบคอตย ใช้ใบเคี้ยวกับน้ำมันพืช เช่น น้ำมันมะพร้าว ใช้รักษาแผลคนไข้ที่ถูกน้ำร้อน
ลวก ไฟลวกและถูกกรดต่าง ๆ ไคดีไคยจะถอนพิษจากบริเวณบาดแผลภายใน $\frac{1}{2}$ - 1 ชั่วโมง (3)

หัวกวาว (Pueraria Mirifica) ตามสรรพคุณยาโบราณกล่าววว่าหัวกวาว
นำมาบดให้เป็นผงตากให้แห้งแล้วผสมกับน้ำผึ้งทำเป็นยารับประทาน ยาที่ทำจากหัวกวาวนี้
เมื่อรับประทานแล้วทำให้ร่างกายมีสภาพเหมือนคนหนุ่มคนสาว บำรุงกำลังและเนื้อหนังให้
เต่งตึงขึ้น และพบว่าผู้หญิงแก่ที่ประจำเดือนหมดมานานแล้ว เมื่อรับประทานยานี้แล้วจะกลับ
มีประจำเดือนขึ้นอีก ส่วนชายแก่ก็สามารถมีลูกได้อีก นอกจากนี้บางคนยังกล่าววว่าเป็นยา
อายุวัฒนะ แต่ปรากฏวว่าบางคนที่รับประทานยานี้แล้ว เป็นพิษรู้สึกเจ็บและบวมตามหน้าอก
บางรายถึงตาย (3)

ประยงคบกาน (AGlaia Odorata) ตามสรรพคุณยาโบราณกล่าววว่า นำ
ใบไปคั้นใช้รับประทานเป็นยาบำรุงหัวใจ บำรุงโลหิต และเป็นยาลดไข้ไคดีว (3)

ถอบแถบน้ำ (*Derris Trifoliata*) ตามตำนานเล่าว่าเด็ก
เลี้ยงวัวมักจะนำใบของถอบแถบน้ำไปให้วัวกิน เมื่อกินแล้วมีผลทำให้วัวมีน้ำนมมาก
ขึ้นและไม่มีลูกน่าน

การะเกด (*Pandanus sp.*) ตามสรรพคุณยาโบราณกล่าวว่า ดอกหอม
รับประทานมีรสขมเล็กน้อย แก้โรคในอก เช่น เจ็บอก แก้เสมหะ บำรุงธาตุ ใช้
ปรุงเป็นยาหอม ทำให้ชุ่มชื้นหัวใจ (3)

สะเดา (*Meliaceai*) ไม่มีหลักฐานในตำแน่งสรรพคุณยาโบราณ

กุ่มบก (*Crataeva erythrocarpa*) ตามสรรพคุณยาโบราณกล่าว
ว่า ใบขับลมและฆ่าพยาธิ เช่น พอกตะมอย และทาแก้เกลื้อนกลากเป็นต้น เปลือก
รอน ขับลม แก้ไข้ กระทบทำให้ไข้เหือดออกมา แก่นแก้โรคผิวหนังผอมเหลือง รากแก้
มานกษัยอันเกิดแตกองลม ในแพทย์ตำบลดกล่าวว่าเป็นเปลือกรอน แกลม ปวดท้อง ลงท้อง
คุมธาตุ แพทย์ตามชนบทใช้เปลือกปรุงเป็นยาสัคคิมตัดลม ขับผายลม บางชนบทใช้
แกบวม บำรุงไฟธาตุ กระตุ้นเตือนลำไส้ให้บีบย่อยอาหารและบำรุงหัวใจ ใช้ทา
ภายนอกแก้โรคผิวหนังมีคุณสมบัติเสมอกันกับเปลือกมะรุ้ม และเปลือกกุ่มน้ำ

กาหลง (*Bauhinia acumina*) ตามสรรพคุณยาโบราณกล่าวว่า
ดอกใช้รับประทานแก้ปวดศีรษะ ลดความดันของโลหิตที่ขึ้นสูง แก้เลือดออกตามไรฟัน
แก้เสมหะพิการ

เปลือกและใบของกล้วยน้ำว้า (*Musa Acuminata*) ไม่พบหลักฐาน
ทางคานยา

Stigmasterol

พบในต้นสารพัดพิษ (*Clinacanthus Burmanii*) (1)

ถอบแถบน้ำ (*Derris Trifoliata*)

การะเกด (*Pandanus sp.*)