บทที่ 3

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการสกัดใบพังพวยฝรั่งแห้งและบดละเอียดด้วยวิธีต่าง ๆ ปรากฏว่า ได้สาร 2 ประเภท คือ พวกที่ละลายได้ในกรดเกลือ 0.5% เป็นสารประกอบพวก Alkaloid ให้ตะกอนกับ Alkaloid Precipitating Reagents การวิเคราะห์ธาตุโดยวิธี Lassaigne sodium decomposition test (23) พบว่ามีธาตุ nitrogen แต่ไม่ได้แยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์

สารที่ไม่ละลายในกรดเกลือ แยกได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ละลายได้ใน petroleum ether, benzene หรือ ethanol และส่วนที่ไม่ละลายในตัวทำละลายดังกล่าว กำหนดให้เป็นตะกอน S

สารส่วนที่ละลายได้ใน petroleum ether หรือ benzene นำไปแยกด้วย Column Chromatography ใช้ Alumina S เป็น Adsorbent Elute ด้วย petroleum ether และ solvent ผสมของ ether และ petroleum ether ได้สาร 4 ชนิด มีจุดหลอมเหลว 88° (สาร A), 138-9° (สาร B), 212-4° และ 147-9°

ตะกอน S นำมาล้างด้วย petroleum ether, chloroform แล้วตกผลึกใน chloroform, methanol ผสม ethanol และสุดท้ายตกผลึกใน Absolute ethanol ได้สารมีจุดหลอมเหลว 279-80° (สาร C)

3.1. สาร A m.p. 88°

สาร A แยกออกจาก crude extract ส่วนที่ elute ด้วย benzene หรือ 5% ether in petroleum ether ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกหลาย ๆ ครั้งใน petroleum ether จนได้จุดหลอมเหลวคงที่ 88° สาร A ไม่ฟอกสี Br_2 in CCl_4 และไม่ให้ Colour test กับ Liebermann-Burchard Reaction หา Rf value

ใน benzene : petroleum ether = 1 : 9 ได้ 0.74 ซึ่งเท่ากับของ Myricyl alcohol

การวิเคราะห์ธาตุต่าง ๆ มี C = 82.31%, H = 14.19%

และจากการคำนวณสำหรับ Myricyl alcohol ($C_{30}H_{62}O$) พบว่า มี

C = 82.11% H = 14.24%

IR spectrum แสดง Absorption peaks ที่ 3600 - 3200 cm^{-1} และ 1050 cm^{-1} คือ primary alcoholic hydroxyl group, 2910, 2850, 1465 และ 720 cm^{-1} (methyl and methylene vibration) ไม่มี Absorption peaks ของ Olefinic linkage, branched chain skeleton หรือ Carbonyl group อยู่เลย แสดงว่า สาร A นี้เป็น Saturated long chain alcohol

IR spectrum identical กับของ Myricyl alcohol (2) เมื่อทำ mixed melting point กับ myricyl alcohol แล้ว ไม่เปลี่ยนแปลง เพื่อ confirm ว่า สารนี้มี alcoholic -OH groupจึงเตรียม Acetyl derivative มีจุดหลอมเหลว 73-4°

IR spectrum ไม่มี character ของ -OH เหลืออยู่ แต่แสดง C = O (1730 cm^{-1}) เด่นชัด และ -OAc (1240, 1030 cm^{-1}) ซึ่ง identical กับ IR spectrum ของ Myricyl acetate (2) นอกจากนั้น Rf value ของ acetate ของสาร A เท่ากับของ Myricyl acetate (2)

จากเหตุผลดังกล่าวจึงสรุปว่า สาร A คือ Myricyl alcohol มีสูตรโครงสร้าง ดังนี้

$$CH_3-(CH_2)_{29}-OH$$

ปฏิกิริยา

$$CH_3-(CH_2)_{29}-OH \xrightarrow{Ac_2O/C_5H_5N} CH_3-(CH_2)_{29}-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$$

Myricyl alcohol Myricyl acetate

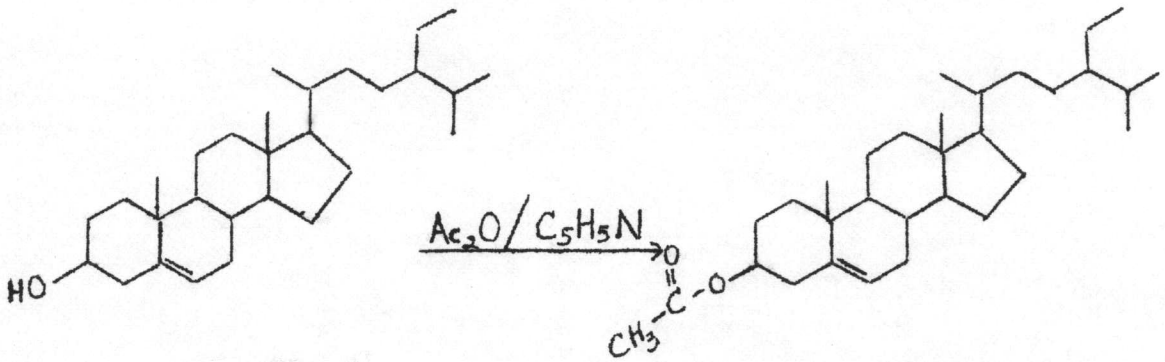
3.2. สาร B m.p. 138-9°

สาร B แยกออกจาก crude extract ส่วนที่ elute ด้วย benzene หรือ 10% ether in petroleum ether ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกหลาย ๆ ครั้ง ใน petroleum ether จนได้จุดหลอมเหลวคงที่ 138-9° Rf value ใน benzene : petroleum ether 1 : 9 ได้ 0.23 ซึ่งเท่ากับของ β-sitosterol (1) สาร B ฟอกสี Br_2 in CCl_4 ได้ ไม่ให้ฟองกาซ HBr , ฟอกสี $KMnO_4$, ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย $FeCl_3$ กับ Liebermann-Burchard reagent (6) ได้สีแดง ซึ่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินและเขียวตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ธาตุต่าง ๆ มี C = 83.89%, H = 12.05% คำนวณเปรียบเทียบกับ β-sitosterol ($C_{29}H_{50}O$) พบว่ามี C = 84.05%, H = 12.07%

IR spectrum แสดง characteristic ของ 3β-hydroxyl group (3600 - 3200 cm^{-1}), Trisubstituted ethylene (1650 cm^{-1}) แสดงว่าสาร B เป็นสารประกอบพวก Unsaturated Steroid compound IR spectrum ของ B identical กับของ β-sitosterol (1) ทำ Mixed melting point กับ β - sitosterol แล้วไม่เปลี่ยนแปลง เพื่อ confirm ให้แน่นอน จึงเตรียม Acetate ของสาร B มีจุดหลอมเหลว 129-30° ซึ่งมี IR spectrum ของ C = O (1730 cm^{-1}) และ OAc (1240, 1030 cm^{-1}) เพิ่มขึ้น ไม่มี characteristic peak ของ -OH เหลืออยู่ และ identical กับของ β-sitosteryl acetate (1) ทำ Mixed melting point กับ β-sitosteryl acetate แล้วไม่เปลี่ยนแปลง และ Rf value ของ Acetate ของสาร B เท่ากับของ β-sitosteryl acetate ด้วย

จากเหตุผลต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น จึงสรุปว่า สาร B คือ β-sitosterol มีสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O$ และสูตรโครงสร้าง ดังนี้



β-sitosterol

β-sitosteryl acetate

3.3. สาร C m.p. 279-80°

สาร C แยกได้จากตะกอน S ทำให้บริสุทธิ์โดยการล้างด้วย petroleum ether เย็น จนไม่มีสีเหลือง ล้างต่อด้วย chloroform เย็น ตกผลึกใน chloroform ร้อน ได้ตะกอนสีขาวเป็น amorphous รวมตะกอนทั้งหมดตกผลึกซ้ำในตัวทำละลายผสมของ methanol-ethanol หลาย ๆ ครั้ง จนได้ผลึกรูปเข็ม มีวุ้นปนเล็กน้อย สุดท้ายตกผลึกด้วย Absolute ethanol อีกหลาย ๆ ครั้ง จนได้ผลึกรูปเข็ม มีจุดหลอมเหลวคงที่ 279-80°

สารนี้ฟอกสี Br_2 in CCl_4 ได้ และไม่ให้ HBr gas, ฟอกสี $KMnO_4$ ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2, 4-DNP กับ Liebermann-Burchard reagent ได้สีม่วงแดงซึ่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินและเขียวตามลำดับ (10)

หา Rf value ใน n-butanol : acetic acid : water = 7 : 1 : 1 ได้ 0.76

ผลการวิเคราะห์ธาตุต่าง ๆ มี C = 78.39% H = 10.59%

เปรียบเทียบกับสารที่ Roll และ Chatterjee (22) สกัดได้จากต้นพังพวยฝรั่ง ด้วย ethanol คือ Ursolic acid (0.12% โดยน้ำหนักของต้น

พังพวยฝรั่งแห้ง) มีสูตรโมเลกุล $C_{30}H_{48}O_3$ จุดหลอมเหลว 280° และคำนวณเปอร์เซ็นต์ของธาตุเปรียบเทียบได้ C = 78.95%, H = 10.53% จึงคิดว่า สาร C ควรเป็น Ursolic acid

IR spectrum ของสาร C แสดง characteristic Absorption peaks ของ 3β-hydroxyl group of Triterpene (3540, 1040 cm^{-1}) -COOH (2950, 2890 cm^{-1}) และ Trisubstituted ethylene (1680, 835 cm^{-1}) แสดงว่าสาร C เป็น hydroxytriterpenic acid เช่นเดียวกับ Ursolic acid (16)

เพื่อยืนยันว่ามี -OH 1 group จึงเตรียม Acetate ของสาร C มีจุดหลอมเหลว 278-9° ซึ่งใกล้เคียงกับของสาร C แต่เมื่อทำ Mixed melting point กับสาร C พบว่าจุดหลอมเหลวต่ำลงมากเหลือเพียง 246-53° แสดงว่าไม่ใช่สาร C เดิม

วิเคราะห์หา C = 77.15% H = 9.93%

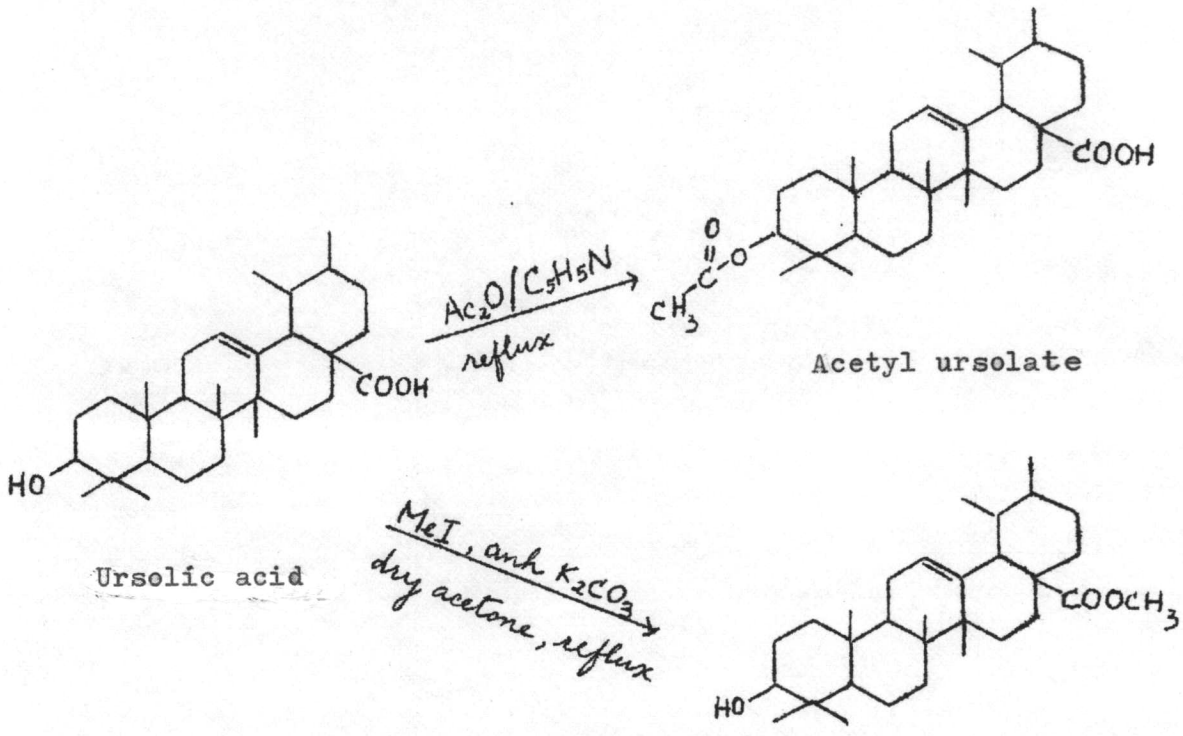
คำนวณเปรียบเทียบกับ Acetyl-ursolate (16)(22) มีสูตร $C_{32}H_{50}O_4$ (เป็นการเพิ่ม $CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$ 1 group) มี C = 77.11% H = 10.04% และมีจุดหลอมเหลว 283°

IR spectrum ของ Acetate ของสาร C ไม่มี peak ของ 3β-OH (3540, 1040 cm^{-1}) เหลืออยู่ แต่มี -OAc (1250 cm^{-1}) เพิ่มขึ้น

ยืนยัน -COOH group โดยเตรียม Methyl ester ของสาร C มีจุดหลอมเหลว 171° วิเคราะห์หาธาตุ C = 79.57%, H = 10.82% คำนวณเปรียบเทียบกับ Methyl ursolate (16)(22) มีสูตร $C_{31}H_{50}O_3$ (เป็นการเพิ่ม - CH_3 1 group) มี C = 79.15%, H = 10.64% และมีจุดหลอมเหลว 171-2°

IR spectrum ของ Methyl ester ของสาร C แสดง characteristic peaks ของ $R.COOCH_3$ ที่ 1150 cm^{-1}, 3β-OH (3540, 1040 cm^{-1}) และ C = O (1700 cm^{-1}) ยังคงอยู่ แสดงว่า สาร C มี -COOH 1 group และถูก methylate ได้

จากเหตุผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า สาร C คือ Ursolic acid (16) (22) มีสูตรโมเลกุล และปฏิกิริยาดังนี้



Ursolic acid

Acetyl ursolate

Methyl ursolate

ได้เคยมีการศึกษา double bond ของ Ursolic acid แล้วว่า inert มาก และไม่เกิดปฏิกิริยากับ perbenzoic acid (19) และแม้แต่การ reduce ด้วย Na-Hg catalytic reduction ก็ไม่ได้เช่นเดียวกัน (9) จึงศึกษาปฏิกิริยาเพิ่มเติม คือ การ Hydrogenation ของ Ursolic acid พบว่า trisubstituted ethylenic linkage ซึ่งมี Absorption peaks ที่ 1680 และ 835 cm^{-1} แต่ very weak นั้นไม่สามารถ Hydrogenate ได้โดย Pd-C Catalytic Hydrogenation ไม่ว่าที่ condition ปกติ หรือ under pressure ก็ตาม (2.4.3.3. Hydrogenation) และ Methyl ursolate ก็ไม่ถูก Hydrogenate เช่นกัน

นอกจากนี้ได้ศึกษาทาง X-ray ของ Ursolic acid โดยใช้ผลึกเดี่ยว ได้ผลว่า Ursolic acid มี plane of symmetry ตั้งฉากกับแกนหมุน และผลึกเป็น orthorhombic มีความยาวด้าน $a \neq b \neq c$ ความยาว a = 32.0 ^{o}A, b = 12.5 ^{o}A, c = 7.16 ^{o}A density ของ Ursolic acid = 1.175 gm/c.c. และ 1 unit cell ประกอบด้วย 4 molecule (25)

Application of Ursolic acid and its derivative

Ursolic acid ใช้เป็น additive ในน้ำมันชักเงาและ lacquers เพื่อทำให้เวลาการแห้งตัวของมันช้าลง (7) และทำให้ผิวหน้าเรียบ ส่วนทางด้าน cosmetics และทางยา ใช้ methyl ursolate เป็น emulsifying agent ในการเตรียมเครื่องสำอางและยาบางชนิด (13) เนื่องจาก methyl ursolate มี water-binding activity เช่นเดียวกับขนสัตว์ และ cholesterol แต่ราคาถูกกว่ามาก สำหรับพวกยาขี้ผึ้ง (petroleum ointment) ถ้าเติม methyl ursolate เล็กน้อย จะทำให้ยาไม่หลอมเหลวง่าย ถึงแม้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิของอากาศแบบศูนย์สูตรก็ตาม นอกจากนี้อาจใช้กับยาที่ใช้ภายในร่างกายได้ เพราะเป็น pharmaceutical inert ไม่เกิดปฏิกิริยากับ pharmaceutical ingredients อื่น ๆ

Biological effect of Ursolic acid

ในด้านการแพทย์ Doner และ Kuschke (11) พบว่า Crataegic acid คือ สารผสมของ ursolic acid, oleanolic acid และ crataegolic acid หรือแม้แต่ ursolic acid บริสุทธิ์ เมื่อละลายใน ethanol แล้วฉีดเข้าเส้นเลือดจะไม่ทำให้เกิด coronary-dilating effect ในสุนัข ตามที่ Schimert และ Blomer ได้เสนอไว้ (10) คือไม่ทำให้เส้นเลือดขยายใหญ่ และอัตราการไหล

ของโลหิตก็ไม่เร็วขึ้นด้วย แต่ Doner พบว่า เมื่อฉีดสารละลายดังกล่าวข้างต้นเข้าเส้นเลือดของสัตว์ทดลองต่าง ๆ เช่น สุนัข กระต่าย และหนู จะทำให้เกิด lung damage เนื่องจาก acid เหล่านี้ไม่ละลายน้ำ จึงตกตะกอนในเลือด

นอกจากนี้ยังมีผู้พบว่า Crataegic acid ช่วยลดปริมาณน้ำตาลในเลือดได้ ซึ่งจะทำให้ glycogen metabolism ของหัวใจดีขึ้น (12) จึงใช้ในยาที่ใช้รักษาโรคเกี่ยวกับหัวใจได้

ส่วน Biological effect ที่เกี่ยวกับ structure นั้น Brown และผู้ร่วมงานของเขา (14) พบว่า สารประกอบพวก pentacyclic triterpenic acids ที่เกิดในธรรมชาติ หรือที่สังเคราะห์ขึ้นก็ตาม ที่มีผลทำให้เกิด Icterogemic effect ในหนู คือ มีแนวโน้มทำให้เกิดโรคดีซ่านได้นั้น เนื่องมาจาก 3β หรือ 24β-equatorial hydroxyl group และ 28β-angeloyl side chain และ effect ดังกล่าวจะหมดไป ถ้าเป็น 3α-axial group หรือ ถ้าเอา angelic acid side chain ออก หรือเปลี่ยน hydroxyl group ให้เป็น ketone แล้วก็จะไม่มี Icterogenic effect เช่นเดียวกัน