

บทที่ 3

วิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การสกัดและการแยกสิ่งสกัด

การวิจัยนี้เป็นการหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทำการสกัดและแยกสิ่งสกัดโดยมีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพควบคู่ไปด้วย ในการสกัดวิธีแรกเป็นการสกัดผักบอคนาแห้งด้วยเอทานอล จากนั้นนำสิ่งสกัดที่ได้ไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์มกับน้ำด้วยเครื่อง liquid-liquid extractor ได้สิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและสิ่งสกัดด้วยน้ำ นำสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของต้นข้าวและเป็นสิ่งสกัดที่มีสารอินทรีย์มากที่สุด มาแยกด้วยควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ SZ₁-SZ₉ พบว่า SZ₇ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของต้นข้าวและแสดงความเป็นพิษกับปลามากที่สุดจึงได้นำมาทำการแยกซ้ำโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้ S₁-S₆ พบว่าทุกส่วนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของต้นข้าวแต่ว่าสาร S₄ มีความบริสุทธิ์มากที่สุด จึงนำไปแยกด้วย HPLC แต่อย่างไรก็ตามในขั้นตอนการหาสารให้บริสุทธิ์จะมีปัญหาในการกำจัดคลอโรฟิลล์และเม็ดสีอื่น ๆ จึงทำการสกัดอีกวิธีหนึ่งและทำการแยกสิ่งสกัดโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแทนการใช้ควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นการสกัดวิธีที่ 2 โดยทำการสกัดผักบอคนาแห้งด้วยเอทานอล นำสิ่งสกัดเอทานอลมาสกัดด้วยเฮกเซน ได้สิ่งสกัดเฮกเซนส่วนกลางที่เหลือนำไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ได้สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนและกลางที่เหลือ นำสิ่งสกัดเฮกเซนและสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้ไปเปรียบเทียบกับผลฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนที่แยกได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยดูจากตัวทาละลายที่ใช้ในการชะและดูจากที่แอลซีของสาร เพื่อติดตามหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นเดียวกับการสกัดวิธีที่ 1 แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีคลอโรฟิลล์และเม็ดสีอื่น ๆ มารบกวนในการหาสารให้บริสุทธิ์ ต่อมาจึงได้ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้ถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าสามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้เป็นอย่างดี

3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัด

3.2.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดวิธีที่ 1

3.2.1.1 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรีย

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อรา *Pythium ultimum*, *Rhizotocnia solani*, *Pyrenophora teres* และแบคทีเรีย *Xanthromonas campestris* ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอล คลอโรฟอร์ม และน้ำ จากการทดสอบพบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอล และคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต่อต้าน (ยับยั้งการเจริญเติบโต) เชื้อรา *Pythium ultimum* สิ่งสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา *Pythium ultimum*, *Rhizotocnia solani*, *Pyrenophora teres*

3.2.1.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจากผักบอณา โดยการศึกษาจากความยาวของรากและกาบใบข้าวเทียบกับความยาวมาตรฐานเท่ากับ 100% ถ้าความยาวของรากและกาบใบใกล้เคียงกับความยาวมาตรฐาน แสดงว่าสิ่งสกัดนั้นไม่มีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว แต่ถ้าแตกต่างกันแสดงว่าสิ่งสกัดนั้นมีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว

การทดสอบสิ่งสกัดด้วยเอทานอล คลอโรฟอร์ม และน้ำ จากผลในตารางที่ 8 และรูปที่ 10 พบว่าสิ่งสกัดจากผักบอณา มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวเรียงตามลำดับดังนี้ สิ่งสกัดด้วยเอทานอล > คลอโรฟอร์ม > น้ำ

การทดสอบส่วนย่อยที่ได้จากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มดังตารางที่ 9 และรูปที่ 11 พบว่าส่วนย่อยที่ได้จากการชะด้วย 75% ใดคลอโรมีเทน: เฮกเซน (SZ₇) แสดงความเป็นพิษกับการเจริญเติบโตของต้นข้าวอย่างรุนแรง และสิ่งสกัดย่อย SZ₈, SZ₆, SZ₅ และ SZ₄ แสดงความเป็นพิษกับการเจริญเติบโตของต้นข้าวรุนแรงรองลงมาส่วน SZ₃, SZ₁ และ SZ₂ มีความเป็นพิษกับการเจริญเติบโตของต้นข้าว้น้อยมาก ดังนั้นจึงนำ SZ₇ มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำได้ S₁-S₆

การทดสอบส่วนย่อย S₁-S₆ ที่ได้จากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของส่วน SZ₇ ได้ผลดังตารางที่ 15 และรูปที่ 13 ซึ่งพบว่าทุกส่วนแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว แต่ว่า

S₄ มีความบริสุทธิ์มากที่สุด จึงนำใบแยกด้วยเครื่อง HPLC ได้ S_{4.1}-S_{4.3}

การทดสอบสาร S_{4.1}-S_{4.3} ที่ได้จากการแยก S₄ ด้วย HPLC ได้ผลดังตารางที่ 17 และรูปที่ 15 พบว่าข้าวที่ได้รับสารจาก S_{4.1} ที่อัตราความเข้มข้น 0.0005, 0.001, 0.005 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม มีความยาวของราก 4.85, 2.14, 8.16 % และความยาวของกาบใบ 77.85, 73.41, 71.60 % ตามลำดับ ส่วนข้าวที่ได้รับสารจาก S_{4.2} ที่อัตราความเข้มข้นเดียวกันมีความยาวราก 13.79, 7.18, 13.39 % และความยาวของกาบใบ 73.72, 70.69, 77.95 % และข้าวที่ได้รับสารจาก S_{4.3} ที่อัตราความเข้มข้นเดียวกันมีความยาวของราก 23.11, 9.71, 22.91% และความยาวของกาบใบ 74.62, 80.66, 76.44 % เมื่อเปรียบเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของมาตรฐาน จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารที่แยกได้จาก HPLC มีความเป็นพิษกับรากมากกว่ากาบใบข้าวโดยที่ S_{4.1} > S_{4.2} > S_{4.3} ตามลำดับ

3.2.1.3 การทดสอบความเป็นพิษกับปลา

การทดสอบความเป็นพิษกับปลาของส่วนย่อยที่ได้จากการทำคลอริฟอร์มโรมาโทกราฟีของสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม ดังตารางที่ 10 พบว่า

ผักปอดนา (SZ₁) ในเฮกเซน ที่อัตราความเข้มข้น 0.01 และ 0.03 กรัม** ไม่ทำให้ปลาตาย

ผักปอดนา (SZ₂) ในเฮกเซน และ 10% ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ที่อัตราความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.5 กรัม** พบว่าที่ 0.5 กรัม** เท่านั้นที่ทำให้ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์

ผักปอดนา (SZ₃) ใน 20% ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ที่อัตราความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 กรัม** ไม่ทำให้ปลาตาย

ผักปอดนา (SZ₄) ใน 20% ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ที่อัตราความเข้มข้น 0.005 และ 0.01 กรัม** พบว่าที่ 0.01 กรัม** เท่านั้นที่ทำให้ปลาตาย 15 เปอร์เซ็นต์

ผักปอดนา (SZ₅) ใน 30% ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ที่อัตราความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 1.0 กรัม** พบว่าที่ 1.0 กรัม** ทำให้ปลาตาย 15 เปอร์เซ็นต์

ผักปอดนา (SZ₆) ใน 40-75% ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ที่อัตราความเข้มข้น 0.005 และ 0.01 กรัม** ไม่ทำให้ปลาตาย

ผักบอดนา (SZ₇) ใน 75% ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ที่อัตราความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 กรัม** ทำให้ปลาตาย 5, 100 และ 100 เบอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ผักบอดนา (SZ₈) ใน 85% ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ที่อัตราความเข้มข้น 0.01, 0.05 และ 0.1 กรัม** พบว่าที่ 0.1 กรัม** ทำให้ปลาตาย 7 เบอร์เซ็นต์

จากผลดังกล่าวแสดงว่าสิ่งสกัดย่อย SZ₇ มีความเป็นพิษกับปลามาก SZ₂ มีความเป็นพิษกับปลาเล็กน้อย ส่วน SZ₁ SZ₃ SZ₄ SZ₅ SZ₆ SZ₈ ไม่แสดงความเป็นพิษกับปลา

หมายเหตุ **กรัม ในน้ำ 200 ซม.³

3.2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดวิธีที่ 2

การทดสอบเบื้องต้นของสิ่งสกัดวิธีที่ 2 เป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของต้นข้าว จากผลในตารางที่ 12 และรูปที่ 12 พบว่าสิ่งสกัดจากผักบอดนามีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวเรียงตามลำดับดังนี้ เอทานอล>ไดคลอโรมีเทน>เฮกเซน ส่วนผลการทดสอบของส่วนย่อยที่ได้จากสิ่งสกัดวิธีที่ 2 ใช้การเปรียบเทียบกับผลการทดสอบส่วนย่อยของสิ่งสกัดวิธีที่ 1 โดยดูจากตัวทำลายที่ใช้ในการชะและที่แอลซีของสาร

3.3 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากผักบอดนา

3.3.1 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร ก

สาร ก เป็นแผ่นผลึกสีขาวแวววาว จุดหลอมเหลว 64-65 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.86 (80% คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน) จากการทดสอบทางเคมีให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, Br₂ ใน CCl₄, 5% FeCl₃ และ 2,4-DNP แสดงว่าสาร ก ไม่ใช่สารประกอบสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นสารอิมิตัว ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล และไม่มีหมู่คาร์บอนิลอยู่ในโมเลกุลตามลำดับ

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 16) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 23 ซึ่งปรากฏเฉพาะแถบการดูดกลืนของหมู่ CH₃ และ CH₂ เท่านั้น ไม่แสดงการดูดกลืนของหมู่ทำหน้าที่อื่น ๆ เลย ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบทางเคมี จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า สาร ก

น่าจะเป็นสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงพบว่าเหมือนกัน (72)

ตารางที่ 23 แถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ก

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	การแปลความหมาย
2930, 2850	สูง	C-H สั้นแบบยึดของ CH ₂ , CH ₃
1480, 1470	ปานกลาง	C-H สั้นแบบยึดของ CH ₂ , CH ₃
730, 720	ปานกลาง	C-H สั้นแบบงอแบบโคงของ $-(CH_2)_n-$ $n > 4$

เมื่อนำสาร ก ไปวิเคราะห์ด้วย จีแอลซีก็พบว่าให้ 7 พีค (รูปที่ 17) แสดงว่าสาร ก เป็นของผสมของไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง 7 ชนิด มีค่า retention time แตกต่างกันในการหาว่าไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงทั้ง 7 ชนิด เป็นสารใดนั้นทำได้โดยสร้างกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบ (calibration curve) จากการบันทึกค่า retention time ของไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงมาตรฐาน 4 สาร ดังรูปที่ 18 ดังนั้นจากค่า retention time ของสาร ก ซึ่งมี 7 ค่า ทำให้สามารถหาได้ว่าสาร ก เป็นของผสมไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงยาวที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 27-33 คาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 24

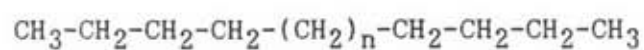
ตารางที่ 24 retention time ของสาร ก

retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน
7.48	0.873	27
9.68	0.985	28
12.68	1.103	29
16.28	1.211	30
21.31	1.328	31
27.45	1.438	32
38.58	1.586	33

จากจีแอลซีแสดงว่าสาร ก เป็นของผสมไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงยาว ดังนั้นโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ก ควรจะมีสัญญาณของหมู่ CH_3 และ CH_2 โดยสัญญาณของหมู่ CH_2 มีความเข้มสูง เพราะมีหมู่ CH_2 จำนวนมาก (73) จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ก (รูปที่ 19) แสดงสัญญาณที่ 0.88 ppm ของหมู่ CH_3 และที่ 1.25 ppm ของหมู่ CH_2 ซึ่งมีความเข้มสูงมากตามที่คาดไว้

จากคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ก รูปที่ 20 พบว่าสัญญาณของหมู่ CH_3 และ CH_2 อยู่ในช่วง 14.12-31.96 ppm เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 25 ซึ่งสอดคล้องกับคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงยาว ซึ่งให้สัญญาณของหมู่ CH_3 และ CH_2 อยู่ในช่วง 14-32 ppm เช่นเดียวกับ (74)

ตารางที่ 25 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ก



a b c d e d c b a

$$n = 19-24$$

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลชิฟท์ของสาร ก (ppm)
C _a	14.12
C _b	22.70
C _c	31.96
C _d	29.36
C _e	29.74

จากข้อมูลสเปกโทรสโกปีและจีแอลซีจึงเชื่อแน่ว่า สาร ก เป็นของผสมไฮดรคาร์บอน-
ระเหยง่าย 7 ชนิด ดังตารางที่ 26

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 26 ไซโตรคาร์บอนโซ่ตรงชนิดต่าง ๆ ในสาร ก

มวลโมเลกุล	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	ชื่อสารประกอบ	%
380	C ₂₇ H ₅₆	CH ₃ -(CH ₂) ₂₅ -CH ₃	heptacosane	13.27
394	C ₂₈ H ₅₈	CH ₃ -(CH ₂) ₂₆ -CH ₃	octacosane	1.35
408	C ₂₉ H ₆₀	CH ₃ -(CH ₂) ₂₇ -CH ₃	nonacosane	49.20
422	C ₃₀ H ₆₂	CH ₃ -(CH ₂) ₂₈ -CH ₃	triacontane	3.74
436	C ₃₁ H ₆₄	CH ₃ -(CH ₂) ₂₉ -CH ₃	hentriacontane	36.52
450	C ₃₂ H ₆₆	CH ₃ -(CH ₂) ₃₀ -CH ₃	dotriacontane	1.49
464	C ₃₃ H ₆₈	CH ₃ -(CH ₂) ₃₁ -CH ₃	tritriacontane	4.41

3.3.2 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร ข

สาร ข เป็นผงละเอียดสีขาว จุดหลอมเหลว 85-86 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.73 (80% คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน) จากการทดสอบทางเคมีให้ผลลบบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, Br₂ ใน CCl₄, 5% FeCl₃ และ 2,4-DNP แสดงว่าสาร ข ไม่ใช่สารประกอบสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นสารอิมิตัว ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล และไม่มีหมู่คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์หรือคีโตนอยู่ในโมเลกุลตามลำดับ

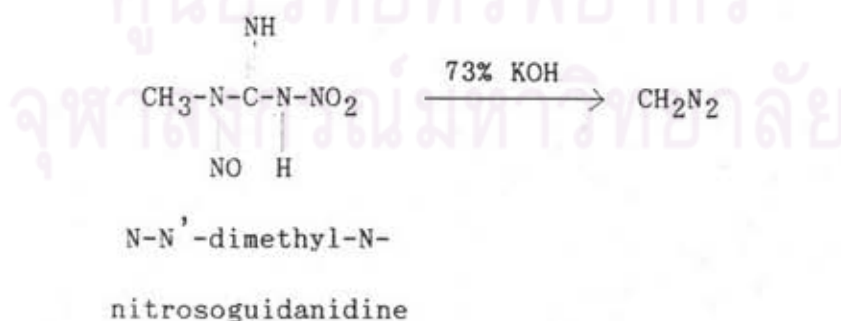
จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 21) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 27 ซึ่งปรากฏเฉพาะแถบการดูดกลืนของหมู่คาร์บอกซิลิกที่ 3600-2500, 1710, 1410, 1300 920 ซม.⁻¹ นอกจากนี้พบเพียงแถบการดูดกลืนของหมู่ CH₃ และ CH₂ เท่านั้น โดยเฉพาะที่ 730, 720 ซม.⁻¹ ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบทางเคมี จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า สาร ข น่าจะเป็นสารจากพวกกรดคาร์บอกซิลิกโซ่ตรง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมกับสารประกอบคาร์บอกซิลิกโซ่ตรงพบว่าเหมือนกัน(72)

ตารางที่ 27 แถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ข

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3600-2500	สูง, กว้าง	O-H สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอกซิลิก
2920, 2850	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1710	สูง	C=O สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอกซิลิก
1470, 1465	ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1410	ปานกลาง	C-O-H สั่นแบบงอในระนาบ
940	ต่ำ	C-O สั่นแบบยืด
730, 720	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอแบบโคลงของ -(CH ₂) _n - n > 4

จึงทำการพิสูจน์โครงสร้างของสาร ข โดยการทาแก๊สโครมาโทกราฟีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน แต่เนื่องจากสารประกอบกรดไขมันตรง ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีได้โดยตรงจึงทำ methylation สาร ข ด้วย diazomethane ให้อยู่ในรูป methyl ester (สาร ข1) แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยจีแอลซีต่อไป

การเตรียม diazomethane แสดงดังสมการ



การทำ methylation ของสาร ข



เมื่อสาร ข1 วิเคราะห์ด้วย จีแอลซีก็พบว่าให้ 5 พีค (รูปที่ 22) แสดงว่า สาร ข เป็นของผสมของกรดคาร์บอกซิลิก 5 ชนิด มีค่า retention time แตกต่างกันใน การหาว่าชนิดกรดคาร์บอกซิลิกว่าเป็นสารใดนั้น ทำได้โดยสร้างกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบ (calibration curve) จากการบันทึกค่า retention time ของอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ กรดคาร์บอกซิลิก 3 สาร ดังรูปที่ 23 ดังนั้นจากค่า retention time ของสาร ข1 ซึ่งมี 5 ค่า ทำให้สามารถหาได้ว่าสาร ข เป็นของผสมกรดคาร์บอกซิลิก 5 ชนิด ยาว ที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 29-33 คาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 28

ตารางที่ 28 retention time ของสาร ข1

retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน
11.28	1.052	29
15.82	1.199	30
20.55	1.312	31
26.08	1.416	32
34.22	1.534	33

จากข้อมูลสเปกโทรสโกปีและจีแอลซีจึงเชื่อแน่ว่า สาร ข เป็นของผสมกรดคาร์บอกซิลิก 5 ชนิด ดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 กรดคาร์บอกซิลิกโซ่ตรงชนิดต่าง ๆ ในสาร ข

มวลโมเลกุล	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	ชื่อสารประกอบ
438	$C_{29}H_{58}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{27}-COOH$	nonacosanoic acid
452	$C_{30}H_{60}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{28}-COOH$	triacontanoic acid
466	$C_{31}H_{62}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{29}-COOH$	hentriacontanoic acid
480	$C_{32}H_{64}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{30}-COOH$	dotriacontanoic acid
494	$C_{33}H_{66}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{31}-COOH$	trtriacontanoic acid

3.3.3 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร ค

สาร ค เป็นผงละเอียดสีขาวมันวาวมีจุดหลอมเหลว 78-79 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.5 (คลอโรฟอร์ม) จากการทดสอบทางเคมีให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, Br_2 ใน CCl_4 , 5% $FeCl_3$ และ 2,4-DNP แสดงว่าสาร ค ไม่ใช่สารประกอบสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นสารอิ่มตัว ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล และไม่มีหมู่คาร์บอนิลที่เป็นคีโตนหรือแอลดีไฮด์อยู่ในโมเลกุลตามลำดับ

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 24) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 30 ซึ่งพบว่าเป็นลักษณะของแอลกอฮอล์ปฐมภูมิโดยมีแถบการดูดกลืนที่ 3600-3100 และ 1060 cm^{-1} นอกจากนี้พบเพียงแถบการดูดกลืนของหมู่ CH_3 และ CH_2 โดยเฉพาะที่ 730, 720 cm^{-1} ซึ่งเป็นแถบการดูดกลืนของ CH_2 ที่ต่อกันเป็นโซ่ตรง จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่า สาร ค ควรเป็นสารจากพวกแอลกอฮอล์อิ่มตัวโซ่ตรง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบแอลกอฮอล์โซ่ตรงพบว่าเหมือนกัน (72)

ตารางที่ 30 แถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ค

แถบการดูดกลืน (cm^{-1})	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3600-3100	สูง, กว้าง	O-H สั่นแบบยืด
2930, 2850	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2 , CH_3
1480, 1470	ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2 , CH_3
1050	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืดของแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ
730, 720	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอแบบโค้งของ $-(\text{CH}_2)_n-$ $n > 4$

เมื่อนำสาร ค มาวิเคราะห์ด้วยจีแอลซีเพื่อยืนยันโครงสร้างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอลกอฮอล์สี่ชนิดตรงมาตรฐาน 4 สาร พบว่าสาร ค ให้แก๊สโครมาโทแกรมดังรูปที่ 25 ซึ่งมีค่า retention time เท่ากับ 10.08, 12.67, 17.10, 21.57, 28.70, 36.7 นาที จากค่า retention time ที่ได้เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานดังรูปที่ 26 ซึ่งเท่ากับแอลกอฮอล์อิ่มตัวสี่ชนิดตรงที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 27-32 คาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 31

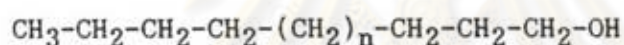
ตารางที่ 31 retention time ของสาร ค

retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน
10.08	1.003	27
12.67	1.103	28
17.10	1.232	29
21.57	1.333	30
28.70	1.457	31
36.70	1.564	32

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ค (รูปที่ 27) พบสัญญาณที่ 0.96 ppm แสดง CH_3 ที่ 1.25 แสดง $-(\text{CH}_2)_n-$ ที่ 1.57 ppm แสดง $-\text{CH}_2-\text{OH}$ และที่ 3.67 ppm แสดง $-\text{CH}_2-\text{OH}$ เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของแอลกอฮอล์โซ่ตรง(73)พบว่าเหมือนกัน

จากคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ค (รูปที่ 28) แสดงสัญญาณในช่วง 14.31-32.81 เป็นสัญญาณของ CH_3 , CH_2 และที่ 63.10 ppm แสดง $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ซึ่งเหมือนกับสเปกตรัมของแอลกอฮอล์โซ่ตรงทั่วไป(74) ดังแสดงในตารางที่ 32

ตารางที่ 32 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ค

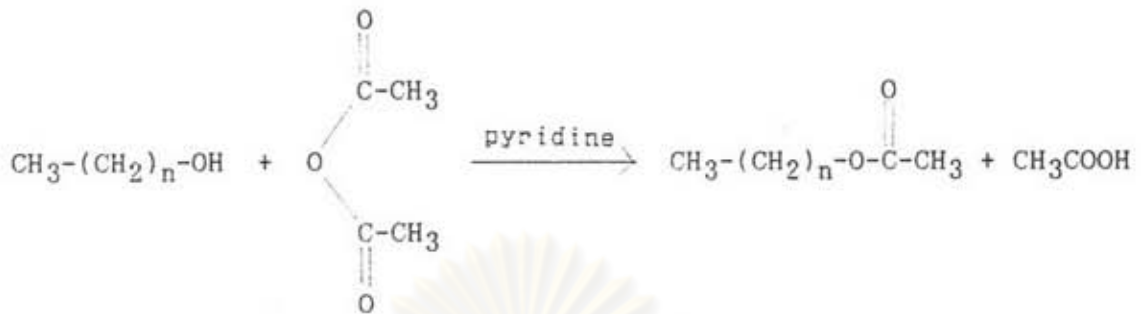


h g f e d c b a

$$n = 19-24$$

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลชิฟท์ของสาร ค (ppm)
C _a	63.10
C _b	32.80
C _c	25.72
C _d	29.69
C _e	29.42
C _f	31.92
C _g	22.69
C _h	14.12

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมดทำให้เชื่อว่าสาร ค เป็นแอลกอฮอล์อิ่มตัวโซ่ตรงยาว จึงพิสูจน์โครงสร้างด้วยการเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตดังสมการ



อนุพันธ์แอซีเตตของสาร ค (กำหนดค่าให้เป็นสาร ค1) เป็นผงละเอียดสีขาว มีจุดหลอมเหลว 58-59 องศาเซลเซียส หนัก 0.04 กรัม อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 29) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 33

ตารางที่ 33 แถบการดูดกลืนจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ค1

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	การแปลความหมาย
2930, 2850	สูง	C-H สันแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1735	สูง	C=O สันแบบยืดของ $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{O}-\text{R} \end{array}$
1465	ปานกลาง	C-H สันแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1360	ปานกลาง	C-H สันแบบงออย่างมีสมมาตร
1240, 1050	ปานกลาง	C-O สันแบบยืด และ O-C-C สันแบบยืด ของ $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{O}-\text{R} \end{array}$
730, 720	ต่ำ	C-H สันแบบงอแบบโค้งลงของ $-(\text{CH}_2)_n-$ n > 4

จากอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีของอนุพันธ์แอสีเตตของสาร ค พบแถบการดูดกลืนที่ 1745, 1240 และ 1040 cm^{-1} ซึ่งแสดงลักษณะสำคัญของหมู่แอสีเตต แถบการดูดกลืนที่แสดงหมู่ไฮดรอกซี บริเวณ 3500-3200 cm^{-1} หายไป ดังนั้นสารที่เตรียมได้เชื่อว่าเป็นอนุพันธ์แอสีเตตของสาร ค จริง

จากข้อมูลทางปฏิกิริยาเคมี จีแอลซี สเปกโทรสโกปีทั้งหมดและการเตรียมอนุพันธ์ จึงเชื่อแน่ว่า สาร ค เป็นของผสมแอลกอฮอล์รั้งตรง 6 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 34 ตารางที่ 34 แอลกอฮอล์รั้งตรงชนิดต่าง ๆ ในสาร ค

มวลโมเลกุล	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	ชื่อสารประกอบ	%
396	$\text{C}_{27}\text{H}_{56}\text{O}$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{26}-\text{OH}$	heptacosanol	0.10
410	$\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{O}$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{27}-\text{OH}$	octacosanol	21.82
424	$\text{C}_{29}\text{H}_{60}\text{O}$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{28}-\text{OH}$	nonacosanol	0.52
438	$\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{29}-\text{OH}$	triacontanol	72.74
452	$\text{C}_{31}\text{H}_{64}\text{O}$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{30}-\text{OH}$	hentriacontanol	0.06
466	$\text{C}_{32}\text{H}_{66}\text{O}$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{31}-\text{OH}$	dotriacontanol	4.18

3.3.4 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร ง

สาร ง เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวจุดหลอมเหลว 141-145 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.41 (คลอโรฟอร์ม) จากการทดสอบทางเคมีให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard คือให้สารละลายสีเขียวและ ฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลลบกับ 5% FeCl_3 และ 2,4-DNP แสดงว่าสาร ง เป็นสารประกอบสเตอรอยด์ เป็นสารไม่อิ่มตัว ไม่มีสารประกอบฟีนอล และไม่มีหมู่คาร์บอนิลอยู่ในโมเลกุลตามลำดับ

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 30) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 35 ซึ่งพบว่าเป็นลักษณะของหมู่ OH ที่ 3600-3100 cm^{-1} (O-H) และ 1040 cm^{-1} (C-O) แถบการดูดกลืนของ disubstituted vinyl ($\text{R}_1\text{CH}=\text{CHR}_2$) ที่ 970, 960 cm^{-1} trisubstituted vinyl ที่ 840-800 cm^{-1}

ตารางที่ 35 แถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ง

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3600-3100	ปานกลาง, กว้าง	O-H สั่นแบบยืดของ R-OH
2940, 2860	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1640	ต่ำ	C=C สั่นแบบยืดของแอลคีน
1465	ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1380, 1370	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH ₃
1060-1040	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืดและ O-H สั่นแบบงอ
970, 960	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอนอกระนาบของ R ₁ CH=CHR ₂
840, 800	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอนอกระนาบของ R ₁ R ₂ C=CHR ₃

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ง (รูปที่ 31) พบสัญญาณในช่วง 0.68-2.32 ppm แสดง CH₃, CH₂, CH ของสเตอรอยด์ ที่ 3.52 ppm แสดงโปรตอนบนคาร์บอนที่ติดกับหมู่ไฮดรอกซี ที่ 5.09 ppm แสดง -CH=CH- ที่ 5.35 ppm แสดง >C=CH- ซึ่งเป็นลักษณะของสเปกตรัมเหมือนกับ stigmasterol ได้พบว่า β-sitosterol ก็ให้สเปกตรัมที่คล้ายกันต่างกันเพียงไม่มีสัญญาณที่ 5.09 ppm เท่านั้น

จากคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ง (รูปที่ 32) พบสัญญาณในช่วง 11.87-56.83 ppm ซึ่งแสดง CH₃, CH₂, CH, C ของสเตอรอยด์ ที่ 71.73 ppm แสดงคาร์บอนที่ติดกับหมู่ไฮดรอกซี ที่ 140.75 ppm แสดง -CH=C< ที่ 121.68 ppm แสดง -CH=C< ที่ 129.29, 138.31 ppm แสดง -CH=CH- ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ stigmasterol และ β-sitosterol(75-77) แสดงในตารางที่ 36

ตารางที่ 36 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ง

ตำแหน่งคาร์บอน	สาร ง		stigmasterol (75-77)	β-sitosterol (75-77)
	stigmasterol	β-sitosterol		
1	37.23	37.23	37.4	37.3
2	31.61	31.86	31.7	31.8
3	71.75	71.75	71.8	71.9
4	42.30	42.30	42.4	42.4
5	140.72	140.72	140.9	140.9
6	121.61	121.67	121.7	121.8
7	31.87	31.87	31.9	32.0
8	31.87	31.87	31.9	32.0
9	50.13	50.13	50.3	50.3
10	36.48	36.48	36.6	36.6
11	21.06	21.06	21.1	21.1
12	39.66	39.75	39.8	39.9
13	42.30	42.30	42.4	42.4
14	56.83	56.73	57.0	56.8
15	24.33	24.26	24.4	24.3
16	28.89	28.21	28.9	28.2
17	56.03	56.73	56.0	56.2
18	12.22	11.94	12.2	11.9
19	19.36	19.36	19.4	19.4

ตารางที่ 36 (ต่อ)

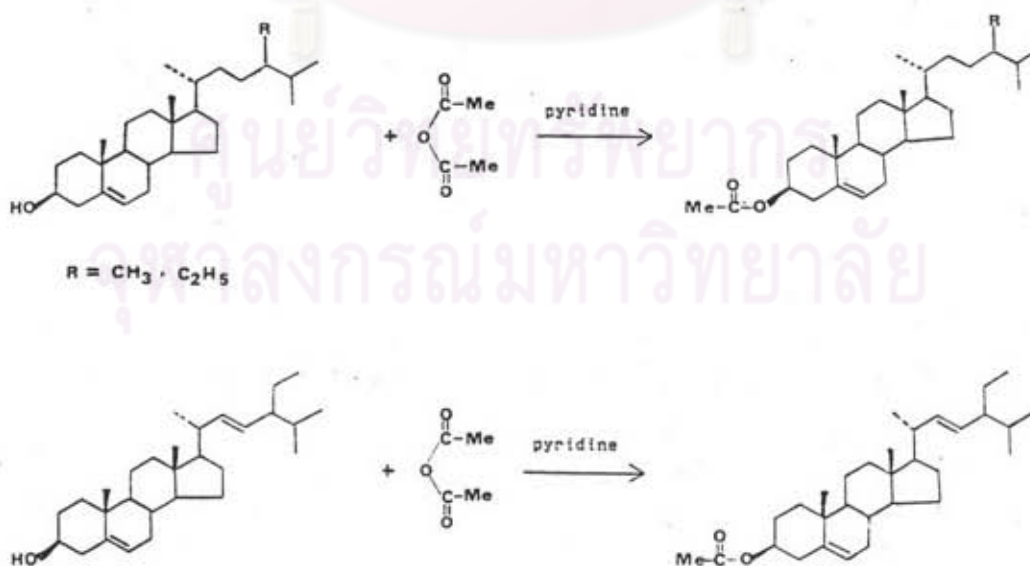
ตำแหน่งคาร์บอน	สาร ๖		stigmasterol (75-77)	β -sitosterol (75-77)
	stigmasterol	β -sitosterol		
20	40.47	40.47	40.5	36.2
21	21.06	19.01	21.1	19.1
22	138.29	33.91	138.4	34.0
23	129.24	29.12	129.4	29.3
24	51.21	50.13	51.19	50.3
25	31.87	26.05	31.9	26.2
26	19.01	18.76	19.0	18.8
27	21.06	18.76	21.1	18.8
28	25.37	23.04	25.4	23.1
29	12.02	11.82	12.0	11.9

จากข้อมูลที่ได้สาร ๖ มีลักษณะใกล้เคียงกับสารประเภทสเตอรอยด์ คือ stigmasterol และ β -sitosterol ตามลำดับ จึงทำการยืนยันโครงสร้างของสารด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของสเตอรอยด์ 4 ชนิด คือ cholesterol campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol (รูปที่ 33) พบว่าสาร ๖ ให้แก๊สโครมาโทแกรม ที่มีค่า retention time เท่ากับ 19.69, 20.71, 23.61 ซึ่งตรงกับ campesterol stigmasterol และ β -sitosterol ตามลำดับดังตารางที่ 37

ตารางที่ 37 retention time ของสาร ๖ เมื่อเปรียบเทียบกับสเตอรอยด์มาตรฐาน

retention time (นาที)		สเตอรอยด์
สเตอรอยด์มาตรฐาน	สาร ๖	
15.46	-	cholesterol
19.36	19.96	campesterol
20.72	20.71	stigmasterol
23.59	23.61	β -sitosterol

จากข้อมูลทั้งหมดทำให้เชื่อว่าสาร ๖ เป็นสเตอรอยด์ และเนื่องจากสเตอรอยด์มีหมู่ OH ดังนั้นจึงยืนยันสูตรโครงสร้างโดยการเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตของสาร ๖ กำหนดค่าอนุพันธ์ที่ได้เป็นสาร ๖1 ปฏิบัติการเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตเป็นดังนี้



สาร ง1 ลักษณะเป็นแผ่นสีขาวมันวาว มีจุดหลอมเหลว 136-140 องศาเซลเซียสหนัก 0.010 กรัม อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 34) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 38

ตารางที่ 38 แถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร ง1

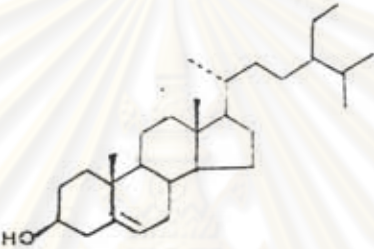
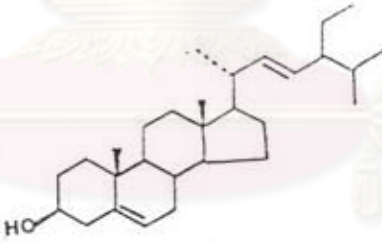
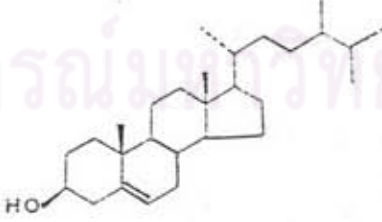
แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	การแปลความหมาย
2940, 2860	สูง	C-H สั้นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃ O
1730	สูง	C=O สั้นแบบยืดของ CH ₃ -C-O-R
1640	ต่ำ	C=C สั้นแบบยืดของแอลคีน
1465	ปานกลาง	C-H สั้นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1380, 1370	ปานกลาง	C-H สั้นแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH ₃
1250, 1040	ปานกลาง	C-O สั้นแบบยืดและ O-H สั้นแบบงอ
970, 960	ต่ำ	C-H สั้นแบบงอนอกระนาบของ R ₁ CH=CHR ₂
800	ต่ำ	C-H สั้นแบบงอนอกระนาบของ R ₁ R ₂ C=CHR ₃

จากสเปกตรัมพบการดูดกลืนของหมู่แอซีเตตที่ 1730, 1240, 1040 ซม.⁻¹ แถบการดูดกลืนที่ 3500-3200 ซม.⁻¹ ของหมู่ไฮดรอกซีหายไพบ แสดงว่าโครงสร้างแอลกอฮอล์ในรูปโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นแอซีเตต

จาก ปรอทตอน เอ็นเอ็มอาร์ของ สาร ง1 (รูปที่ 35) ปรากฏสัญญาณของสเตอรอยด์ไม่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของอนุพันธ์อย่างเด่นชัด แต่ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ของ สาร ง1 (รูปที่ 36) ปรากฏสัญญาณที่ 170.52 ppm ซึ่งแสดง C=O ของอนุพันธ์แอซีเตตของ สาร ง ส่วนสัญญาณอื่น ๆ ทั่วไปเป็นสัญญาณของสเตอรอยด์ จึงสามารถยืนยันได้ว่า สาร ง1 เป็นอนุพันธ์แอซีเตตของ สาร ง

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมดรวมทั้งเมื่อพิจารณาจุดหลอมเหลวของสาร ง พบว่ามีค่า 141-145 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่างจุดหลอมเหลว campesterol (157-158) β -sitosterol (136-137 องศาเซลเซียส) stigmasterol (170 องศาเซลเซียส) จึงสรุปสาร ง เป็นของผสมสเตอรอยด์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 39

ตารางที่ 39 สเตอรอยด์ชนิดต่าง ๆ ของสาร ง

มวลโมเลกุล	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	ชื่อสารประกอบ	%
414	$C_{29}H_{50}O$		β -sitosterol	42.22
412	$C_{29}H_{48}O$		stigmasterol	52.38
400	$C_{28}H_{50}O$		campesterol	5.40

3.3.5 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร จ

สาร จ เป็นผงละเอียดสีขาวจุดสลายตัว 247-250 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.22 (10%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน) จากการทดสอบทางเคมีให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard คือให้สารละลายสีเขียวและ พอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลลบกับ 5% $FeCl_3$ และ 2,4-DNP แสดงว่าสารนี้มีโครงสร้างของสารประกอบสเตอรอยด์อยู่ เป็นสารไม่อิ่มตัว ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล และไม่มีหมู่คาร์บอนิลอยู่ในบริเวณเลขตามลำดับ

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 37) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 40 ซึ่งพบว่าเป็นลักษณะของหมู่ OH ที่ $3410-3100\text{ cm}^{-1}$ (O-H) และ $1065-1020\text{ cm}^{-1}$ (C-O) แถบการดูดกลืนของ trisubstituted vinyl ที่ 800 cm^{-1}

ตารางที่ 40 แถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร จ

แถบการดูดกลืน (cm^{-1})	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3410-3100	สูง, กว้าง	O-H สันแบบยึดของ R-OH
2940, 2850	สูง	C-H สันแบบยึดของ CH_2, CH_3
1620	ต่ำ	C=C สันแบบยึดของแอลคีน
1475	ปานกลาง	C-H สันแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH_2 และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH_3
1370	ปานกลาง	C-H สันแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH_3
1160, 1065-1020	สูง	C-O สันแบบยึด
800	ต่ำ	C-H สันแบบงอนอกกระนาบของ trisubstituted vinyl

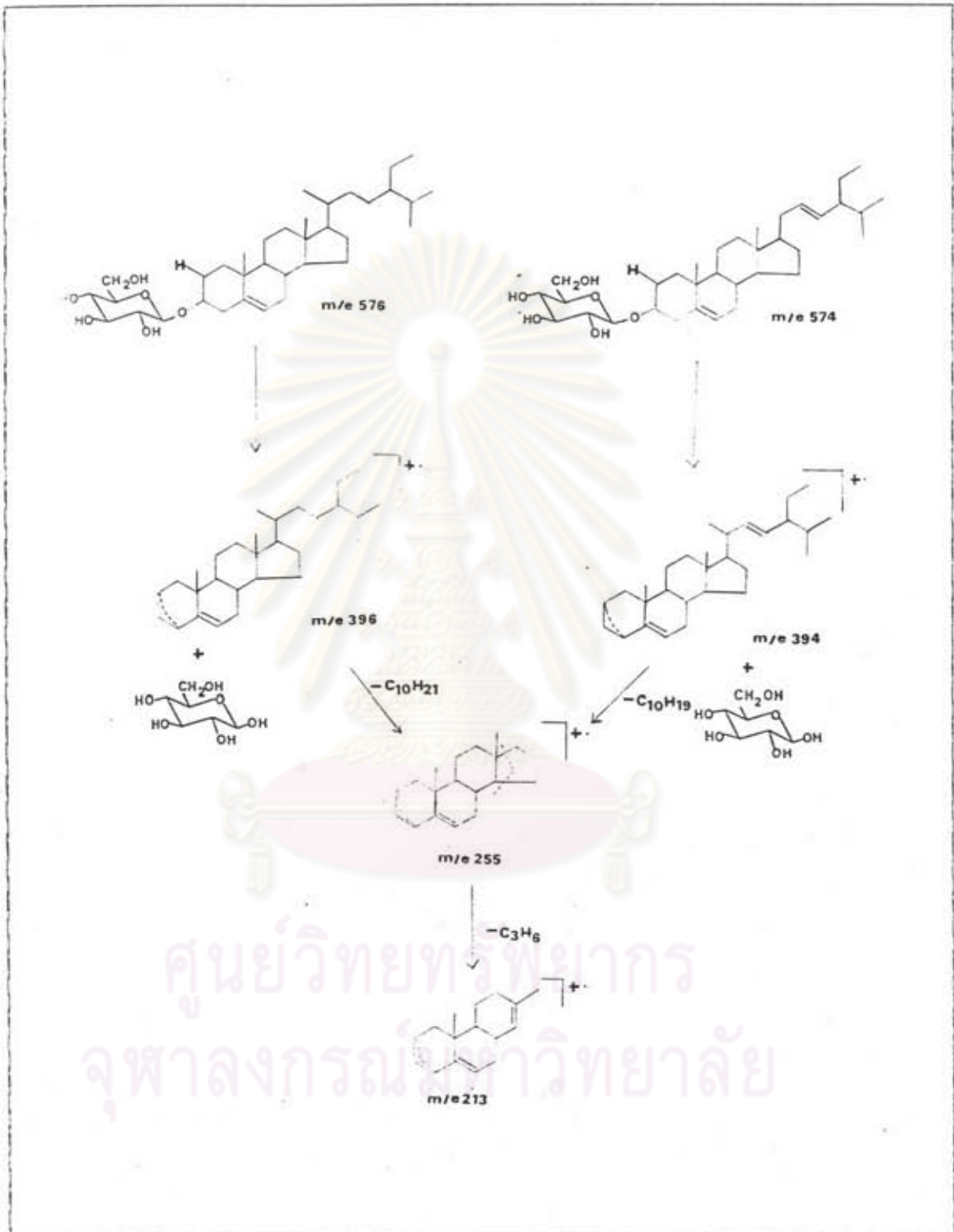
จากสเปกตรัมแสดงลักษณะสำคัญของไกลโคไซด์ (78) คือมีแถบการดูดกลืนของ OH กว้างที่ 3410-3100 cm^{-1} และที่ 1250, 1160, 1065-1020 cm^{-1} แสดง C-O สันแบบยึดของหมู่ไฮดรอกซี และของน้ำตาลซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไกลโคไซด์ และที่ 890 cm^{-1} แสดงแอนนเมอริกริโปรตอนที่มิทิศทางตามแนวแกนของน้ำตาลที่เป็นบีต้าไอโซเมอร์ (anomeric axial proton of β -sugar) จากการทดสอบกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard พบว่าให้สีเขียวแสดงว่าสาร จ มีสเตอรอยด์นิวเคลียสในรูปโมเลกุล สาร จ สามารถพอกสี 3% Br_2 ใน CCl_4 แสดงว่ามีพันธะคู่ในโมเลกุล ซึ่งสอดคล้องกับการมีแถบการดูดกลืนที่ 1640 cm^{-1}

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 38) บราควิสต์สัญญาณที่ 2.43-0.66 ppm ซึ่งเป็นลักษณะของสเตอรอยด์ที่พบใน สาร ง (รูปที่ 31) ที่ 5.32 ppm แสดงถึงโปรตอนที่ติดกับที่เกาะกับพันธะคู่ สัญญาณที่ 4.79-3.73 ppm แสดงโปรตอนของน้ำตาล ที่ 4.18 ppm แสดงแอนนเมอริกริโปรตอน

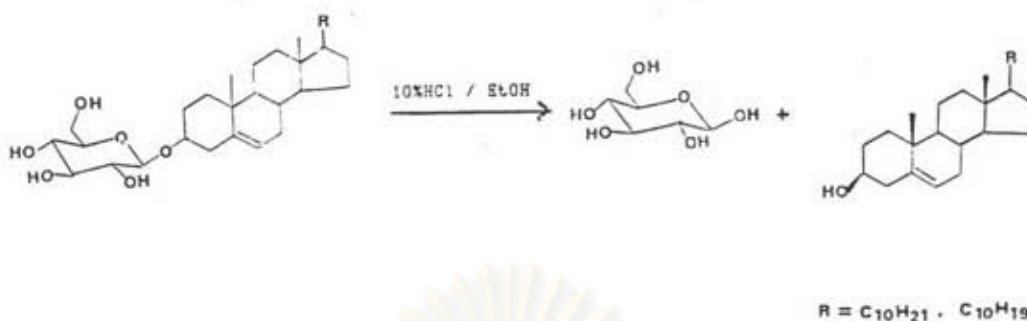
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 39) บราควิสต์สัญญาณของคาร์บอนที่ 101.32 ppm ซึ่งแสดงคาร์บอนที่ต่อกับออกซิเจน 2 อะตอม ($\text{C} \begin{matrix} \text{O} \\ \diagup \diagdown \\ \text{O} \end{matrix}$) และพบสัญญาณที่ 76.87, 70.60, 73.90, 62.14 ppm ซึ่งแสดงลักษณะคาร์บอนที่ต่อกับออกซิเจนหนึ่งอะตอม ($\text{C}-\text{O}$, $\text{CH}-\text{O}$) อันเป็นลักษณะของน้ำตาล (74) นอกจากนี้ยังพบสัญญาณที่ 140.75 ppm ของ $-\text{CH}=\text{C}$ ที่ 122.38 ppm แสดง $\text{C}=\text{CH}$ และที่ 138.69, 129.64 ppm แสดง $-\text{CH}=\text{CH}-$ และที่ 12.03-57.1 ppm มีลักษณะเหมือนกับของสเตอรอยด์ที่พบใน สาร ง

เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัมของ สาร จ (รูปที่ 40) ไม่พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) เนื่องจากการสูญเสียโมเลกุลของน้ำตาลก่อน จึงพบแต่ส่วนของสเตอรอยด์และการแตกเป็นชิ้นส่วนของสเตอรอยด์ จากแมสสเปกตรัมพบไอออนชิ้นส่วนที่ m/e 414, 412, 400, 396, 382, 329, 327, 273, 255, 213 โดยมีกลไกการแตกเป็นชิ้นส่วนดังแสดงในแผนภาพที่ 3

แผนภาพที่ 3 การแตกเป็นชิ้นส่วนของสาร จ



เพื่อหาโครงสร้างที่แน่นอนของสาร จึงนำสาร จ มาทำการแยกสลายด้วยน้ำของสาร จ โดยใช้ 10% HCl ในเอทานอล ได้ส่วน aglycone กำหนดให้เป็น สาร จ1 และส่วนของน้ำตาลในชั้นน้ำกำหนดให้เป็นสาร จ2 ปฏิบัติการแยกสลายด้วยน้ำแสดงไว้ดังสมการต่อไปนี้



ส่วน aglycone (สาร จ1) เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 144-145 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.35 (คลอโรฟอร์ม) จากการทดสอบทางเคมีให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard พอกสี Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลลบกับ 5% $FeCl_3$ และ 2,4-DNP แสดงว่า สาร จ1 เป็นสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นสารไม่อิ่มตัว ไม่มีสารประกอบฟีนอล และไม่มีหมู่คาร์บอนิล

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 41) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 41 ซึ่งพบว่าเป็นลักษณะของหมู่ OH ที่ $3500-3100\text{ cm}^{-1}$ (O-H) และ 1040 cm^{-1} (C-O) แถบการดูดกลืนของ disubstituted vinyl ($R_1CH=CHR_2$) ที่ $970, 960\text{ cm}^{-1}$ trisubstituted vinyl ที่ $840-800\text{ cm}^{-1}$

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 41 แสดงแถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร จ1

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3600-3100	ปานกลาง, กว้าง	O-H สันแบบยืดของ R-OH
2940, 2860	สูง	C-H สันแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1640	ต่ำ	C=C สันแบบยืดของแอลคีน
1465	ปานกลาง	C-H สันแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1380, 1370	ต่ำ	C-H สันแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH ₃
1060-1040	ปานกลาง	C-O สันแบบยืดและ O-H สันแบบงอ
970, 960	ต่ำ	C-H สันแบบงอนอกระนาบของ R ₁ CH=CHR ₂
840, 800	ต่ำ	C-H สันแบบงอนอกระนาบของ R ₁ R ₂ C=CHR ₃

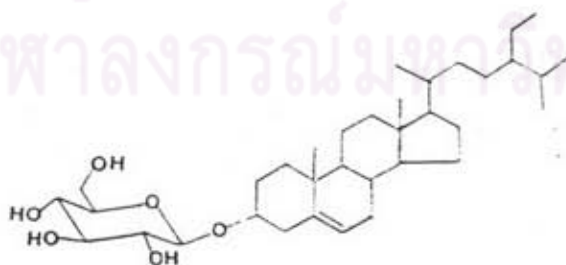
ดังนั้น สาร จ1 น่าจะเป็นสารประกอบสเตอรอยด์ จึงนำปวิเคราะห์หาชนิดของ สเตอรอยด์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี เปรียบเทียบกับสเตอรอยด์มาตรฐาน 4 ชนิด cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol (รูปที่ 42) พบว่าสาร จ1 ให้อัตราการไหลที่มีค่า retention time เท่ากับ 17.98, 20.47 นาที ซึ่งตรงกับ stigmasterol และ β -sitosterol ตามลำดับดังตารางที่ 42

ตารางที่ 42 retention time ของสาร จ1 เมื่อเปรียบเทียบกับสเตอรอยด์มาตรฐาน

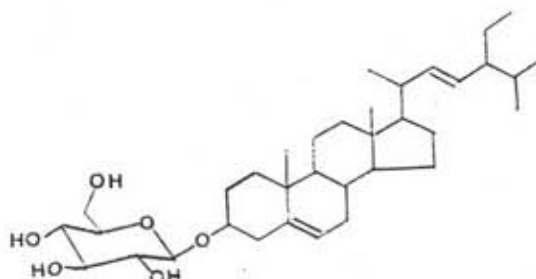
retention time (นาที)		สเตอรอยด์
สเตอรอยด์มาตรฐาน	สาร จ1	
13.79	-	cholesterol
16.96	-	campesterol
18.06	17.98	stigmasterol
20.62	20.47	β -sitosterol

จากข้อมูลทั้งหมดจึงเชื่อแน่ว่าสาร จ1 คือ stigmasterol และ β -sitosterol การศึกษาน้ำตาลในชั้นน้ำ (สาร จ2) ใช้เทคนิค HPLC ในการหาชนิดของน้ำตาล เทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน พบว่า retention time ของสาร จ2 เท่ากับ 4.89 นาที น้ำตาลมาตรฐาน rhamnose และ glucose ให้ค่า retention time เท่ากับ 3.01, 4.8 แสดงว่า สาร จ2 คือ glucose ดังรูปที่ 43

จากข้อมูลทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าสาร จ คือ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside และ stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside



stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside

3.3.6 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร จ

สาร จ เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 250 องศาเซลเซียส (จุดสลายตัว) มีค่า R_f เท่ากับ 0.81 (20%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน) จากการทดสอบทางเคมีพบว่า ให้สารละลายสีแดงกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard พอกสี Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลลบกับ $5\%FeCl_3$ และ 2,4-DNP แสดงว่า สาร จ เป็นสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นสารไม่อิ่มตัว ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล และไม่มีหมู่คาร์บอนิลที่เป็นแอลดีไฮด์หรือคีโตนในปริมาณเล็กน้อยตามลำดับ

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 44) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 43 พบว่าที่ $3520-2500$ cm^{-1} เป็นลักษณะของหมู่ OH ที่ $2940, 2840$ cm^{-1} เป็นลักษณะของหมู่ CH_2, CH_3 ที่ 1690 cm^{-1} เป็นลักษณะของหมู่ $C=O$ ซึ่งอาจจะเป็นหมู่คาร์บอนิลของกรดคาร์บอกซิลิก ที่ 1640 cm^{-1} แสดงลักษณะของหมู่ $>C=C<$ ที่ $1050-1030$ cm^{-1} แสดงลักษณะของ $C-O$

ตารางที่ 43 แถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร จ

แถบการดูดกลืน (cm^{-1})	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3550-2500	สูง, กว้าง	O-H สันแบบยืดของ R-OH
2940, 2840	สูง	C-H สันแบบยืดของ CH_2, CH_3
1690	สูง	C=O สันแบบยืดของหมู่คาร์บอนิล
1640	ต่ำ	C=C สันแบบยืดของแอลคีน
1450	ปานกลาง	C-H สันแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH_2 และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH_3
1380	ปานกลาง	C-H สันแบบงอของ $(CH_3)_2-C$
1050-1030	ต่ำ	C-O สันแบบยืด
890	ปานกลาง	C-H สันแบบงอนอกกระนาบของ $=CH_2$

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ฉ (รูปที่ 45) พบสัญญาณ δ ที่เป็น singlet ของเมทิลโปรตอน 4 ชนิดที่ 0.929(3H), 0.867(6H), 0.762(3H), 0.649(3H) และสัญญาณ ที่เป็นเมทิลโปรตอนที่ติดกับพันธะคู่ที่ 1.680(3H) ppm ที่ 2.95 ppm แสดงโปรตอนที่ติดกับหมู่ไฮดรอกซี CH-OH (1H) ที่ 4.69, 4.55 (2H) แสดงโปรตอนที่ติดกับพันธะคู่ $\text{CH}_2=$,

จากคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ฉ (รูปที่ 46) พบสัญญาณ δ ในช่วง 177.28 แสดง C=O ซึ่งคาดว่าเป็นของกรดคาร์บอกซิลิกหรือเอสเทอร์ ที่ 150.36, 109.67 แสดง $>\text{C}=\text{C}<$ ที่ 76.85, 55.46 แสดง C-OH ที่ 54.94-14.43 แสดง CH_3 , CH_2 , CH , C ซึ่งเป็นรูปแบบหลักของสารไตรเทอร์พีนอยด์

จาก DEPT 90 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 47) และ DEPT 135 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 48) ทาหาทราบสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น C , CH , CH_2 , CH_3 ได้ดังนี้

C มี 6 สัญญาณคือ 177.28, 150.35, 55.46, 42.05, 40.38, 36.77 ppm

CH มี 6 สัญญาณคือ 76.85, 54.95, 49.99, 48.59, 46.66, 37.77 ppm

CH_2 มี 11 สัญญาณคือ 109.67, 38.54, 36.36, 33.97, 31.77, 30.16, 29.25, 27.16, 25.14, 20.51, 18.02 ppm

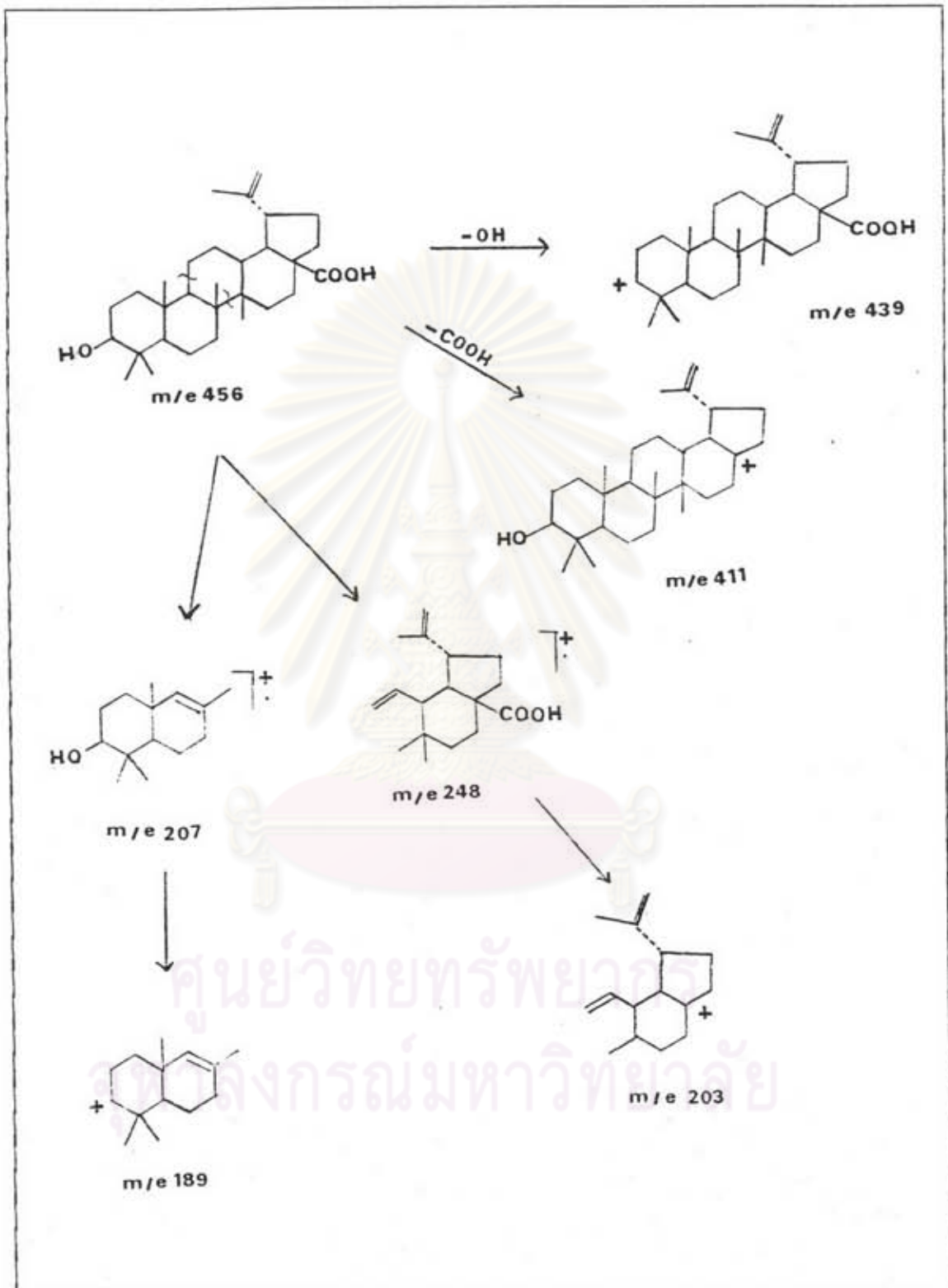
CH_3 มี 6 สัญญาณคือ 28.16, 18.99, 15.99, 15.83, 15.78, 14.43

ppm

จากข้อมูลเหล่านี้พบว่าสาร ฉ มีโครงสร้างหลักที่มีลักษณะคล้าย lupeol แต่มีหมู่ COOH ซึ่งพบว่าสาร ฉ น่าจะเป็น Betulinic acid เมื่อเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัม(72)และโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม(73)ของ Betulinic acid กับ สาร ฉ พบว่าเหมือนกัน

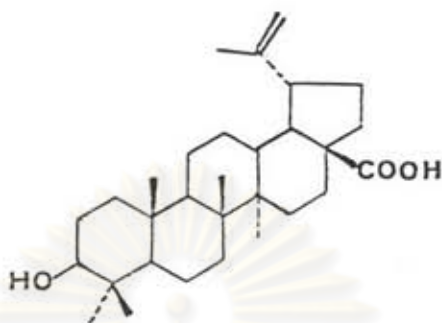
เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัมของสาร ฉ (รูปที่ 49)พบไอออนเชิงโรมเลกุล (M^+) ที่ 456 พบ m/e สูงสุดเป็น 439 (456-17) และมี m/e ที่สำคัญคือ 248, 207, 203 (248-45), 189 (207-18) โดยมีกลไกการแตกเป็นชิ้นส่วนดังแสดงในแผนภาพที่ 4

แผนภาพที่ 4 การแตกเป็นชิ้นส่วนของสาร จ



จากผลการวิเคราะห์ธาตุพบว่า $\%C = 75.42$, $\%H = 10.64$, $\%O = 13.64$
 และ M^+ ของสารนี้คือ 456 เมื่อนำไปคำนวณหาสูตรโมเลกุลจะเท่ากับ $C_{30}H_{48}O_3$

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสาร จ คือ Betulinic acid (lup-20(29)-en-28-oic acid, 3-hydroxy-, (3 β)-) [472-15-1] ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



Betulinic acid

3.3.7 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร ข

สาร ข เป็นผงละเอียดสีขาวหนักเบา ได้จาก SZ₈ จุดหลอมเหลว 200-202 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.49 (20% เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน) จากการทดสอบทางเคมีพบว่าให้สารละลายสีแดงกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard พอกสี Br₂ ใน CCl₄ ให้ผลลบกับ 5%FeCl₃ และ 2,4-DNP แสดงว่า สาร ข เป็นสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นสารไม่อิ่มตัว ไม่ใช่สารประกอบฟีนอลและไม่มีหมู่คาร์บอนิลที่เป็นแอลดีไฮด์หรือคีโตนานรมเลกุลตามลำดับ

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 50) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 44 พบว่าที่ 3700-3100 ซม.⁻¹ เป็นลักษณะของหมู่ OH ที่ 2940, 2840 ซม.⁻¹ เป็นลักษณะของหมู่ CH₂, CH₃ ที่ 1740 ซม.⁻¹ เป็นลักษณะของหมู่ C=O ที่ 1640 ซม.⁻¹ แสดงลักษณะของหมู่ >C=C< ที่ 1460-1365 ซม.⁻¹ แสดงการสั่นแบบงอของ C-H ที่ 1100-950 ซม.⁻¹ แสดงลักษณะของ C-O ซึ่งคาดว่าจะ เป็นสารประเภทโกลโคไซด์เพราะมีความเข้มข้นสูง

ตารางที่ 44 แถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ข

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3700-3100	สูง, กว้าง	O-H สั่นแบบยืดของ R-OH
2940, 2840	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1740	ปานกลาง	C=O สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอนิล
1640	ต่ำ	C=C สั่นแบบยืดของแอลคีน
1475	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH ₂ และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH ₃
1370	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH ₃
1100-950	สูง, กว้าง	C-O สั่นแบบยืด

จากอินฟราเรดสเปกตรัมแสดงลักษณะของไกลโคไซด์ เมื่อพิจารณาถึงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 51) พบสัญญาณที่ 3.68, 3.32, 3.14 ppm แสดงโปรตอนบนคาร์บอนที่ติดกับหมู่ไฮดรอกซี CH-OH ส่วนที่ 5.21, 5.06, 4.97, 4.83 ppm แสดงโปรตอนที่ติดกับพันธะคู่ นอกจากนี้พบสัญญาณในช่วง 2.21-0.72 ppm แสดง C-H ของ CH₃, CH₂, CH ที่ต่อกับ ring หรือ side chain ซึ่งจากผลของ Liebermann-Burchard ยืนยันว่า ring หรือ side chain น่าจะเป็นลักษณะของสารไตรเทอร์พีนอยด์

จากคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ข (รูปที่ 52) พบว่าให้สัญญาณทั้งหมดอย่างน้อย 37 คาร์บอน สัญญาณที่ 175.24 ppm แสดง C=O ซึ่งคาดว่าจะ เป็นของเอสเทอร์เพราะจากอินฟราเรดสเปกตรัมแสดงการดูดกลืนที่ 1740 ซม.⁻¹ ส่วนที่ 143.46, 137.65, 124.99, 105.89 ppm แสดง $>\text{C}=\text{C}<$ ที่ 77.76-60.70 ppm แสดง C-O ซึ่งเป็นลักษณะของพวกไกลโคไซด์ ที่ 55.02-15.22 ppm แสดง C, CH, CH₂, CH₃ ที่ต่อกันเป็น ring หรือ side chain

จากแมสสเปกตรัมของสาร ซ (รูปที่ 53) พบว่ามี m/e สูงสุดเป็น 154 และ m/e ที่สำคัญอื่น ๆ คือ 248, 307, 391, 439, 543

ผลการวิเคราะห์ธาตุพบว่า $\%C = 57.53$, $\%H = 7.72$, $\%O = 34.79$ จะเห็นการที่มี $\%O$ สูงแสดงว่าสาร ซ เป็นสารประกอบไกลโคไซด์หรือมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบจริง

เพื่อยืนยันว่า สาร ซ เป็นสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์จริงหรือไม่จึงทำการแยกสลายด้วยน้ำของสาร ซ ได้ aglycone และ น้ำตาล

ส่วน aglycone (สาร ซ1) เป็นผงละเอียดสีขาว จุดหลอมเหลว 219-220 องศาเซลเซียส จากการทดสอบทางเคมีให้สารละลายสีแดงกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard พอกสี Br_2/CCl_4 ให้ผลลบกับ 5% $FeCl_3$ และ 2,4- DNP แสดงว่า สาร ซ1 เป็นสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นสารไม่อิ่มตัวไม่ใช่ว่าสารประกอบฟีนอล และไม่มีหมู่คาร์บอนิลที่เป็นแอลดีไฮด์หรือคีโตนในโมเลกุลตามลำดับผลการวิเคราะห์ธาตุพบว่า $\%C = 77.47$, $\%H = 10.51$, $\%O = 11.98$ จะเห็นได้ว่า $\%O$ แสดงว่ามีการหลุดของน้ำตาลออกไป

อินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร ซ1 (รูปที่ 54) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 45 พบว่า $3600-2500 \text{ cm}^{-1}$ เป็นลักษณะของหมู่ OH ที่ $2940, 2840 \text{ cm}^{-1}$ เป็นลักษณะของหมู่ CH_2, CH_3 ที่ 1690 cm^{-1} เป็นลักษณะของหมู่ $C=O$ ซึ่งอาจจะเป็นหมู่คาร์บอนิลของกรดคาร์บอกซิลิก ซึ่งเกิดจากการแยกสลายด้วยน้ำของเอสเทอร์เพราะว่ามีการเปลี่ยนตำแหน่งการดูดกลืนจาก 1730 cm^{-1} เป็น 1680 cm^{-1} ที่ $1050-1030 \text{ cm}^{-1}$ แสดงลักษณะของ $C-O$ ซึ่งมีความเข้มลดลงเพราะว่ามีการหลุดของน้ำตาลออกไปแล้ว

ตารางที่ 45 แถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ข1

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3600-2500	สูง, กว้าง	O-H สั่นแบบยืดของ R-OH
2930, 2850	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1690	สูง	C=O สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอนิล
1450	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH ₂ และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH ₃
1380	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ (CH ₃) ₂ -C
1050-1030	ต่ำ	C-O สั่นแบบยืด
990	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอ

เนื่องจากสาร ข1 มีไม่เพียงพอที่จะวิเคราะห์อย่างอื่นได้อีกจึงไม่สามารถหาสูตรโครงสร้างของ aglycone ได้

การวิเคราะห์ชั้นน้ำตาล (สาร ข2) โดยใช้เทคนิค HPLC เมื่อฉีด สาร ข2 เข้าไปในเครื่อง HPLC พบว่าให้โครมาโทแกรม 2 พีค (รูปที่ 55) มีค่า retention time เท่ากับ 5.02, 6.12 นาที เมื่อฉีดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานคือ rhamnose และ xylose เข้าไปในเครื่อง HPLC ภายใต้อุปกรณ์เดียวกัน พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 5.51, 6.14 นาที แสดงว่าสาร ข2 คือ xylose ส่วนอีกพีคหนึ่งยังบอกไม่ได้ว่าเป็นอะไร

เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนไฮดรอกซีที่มีอยู่ในโครงสร้าง จึงนำสาร ข มาเตรียมอนุพันธ์แอซีเตต 1 ได้ของแข็งเป็นผงละเอียดสีขาว (สาร ข3) จุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียส

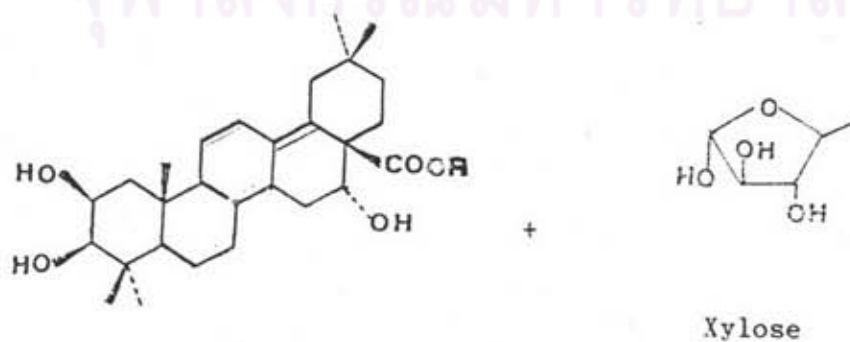
อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) (รูปที่ 56) แสดงการดูดกลืนที่สำคัญดังตารางที่ 46 พบว่า ที่ 2940, 2840 ซม.⁻¹ เป็นลักษณะของหมู่ CH₂, CH₃ ที่ 1750 ซม.⁻¹ เป็นลักษณะของหมู่ C=O ของ CH₃-CO-O- มีความเข้มขั้นสูงขึ้น ที่ 1220 ซม.⁻¹ แสดงลักษณะของ -CO-O- ที่ 1050-1030 ซม.⁻¹ แสดงลักษณะของ C-O

ตารางที่ 46 แถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ข3

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	การแปลความหมาย
2930, 2850	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1750	สูง	C=O สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอนิล
1450	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH ₂ และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH ₃
1380	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ (CH ₃) ₂ -C
1220	สูง	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{-C-O} \end{array}$ สั่นแบบยืด
1100-1030	ต่ำ	C-O สั่นแบบยืด
990	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอ

จาก คาร์บอน 13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ข3 (รูปที่ 57) พบสัญญาณ δ ของ C=O เพิ่มขึ้นมา 6 ตำแหน่ง คือที่ 170.56, 170.42, 170.20, 170.03, 169.40, 168.91 แสดงว่าสาร ขมีหมู่ -OH ในโครงสร้าง 6 ตำแหน่งเช่นกัน

จากข้อมูลทั้งหมดพอที่จะสรุปได้ว่าโครงสร้างที่เป็นไปได้ของสาร ข คือ



3.4 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

3.4.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของต้นข้าวดังตารางที่ 22 พบว่า สาร ก คือของผสมไฮโดรคาร์บอนไร้ตรง ทดสอบในอัตราความเข้มข้น 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม พบว่า สาร ก แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก 7.93, 0, 0, 0 % ตามลำดับ และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของกาบใบ 3.01, 0, 0, 0 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร ก ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว

สาร ข คือของผสมกรดคาร์บอกซิลิกไร้ตรง ทดสอบในอัตราความเข้มข้น 0.0005, 0.001, 0.005 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม พบว่า สาร ข แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก 0, 0, 0 % ตามลำดับ และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของกาบใบ 2.09, 0, 0 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร ข ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว

สาร ค คือของผสมแอลกอฮอล์ไร้ตรง ทดสอบในอัตราความเข้มข้น 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม พบว่า สาร ค แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก 0, 0, 0, 0 % ตามลำดับ และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของกาบใบ 1.32, 17.55, 3.31, 41.06 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร ค มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของกาบใบ แต่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของราก

สาร ง คือของผสมสเตอรอยด์ 3 ชนิดคือ campesterol, stigmasterol, β -sitosterol นำมาทดสอบในอัตราความเข้มข้น 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม พบว่า สาร ง แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก 0, 0, 0, 0, 6.55 % ตามลำดับ และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของกาบใบ 6.62, 0, 0, 0, 41.01 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร ง มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวเล็กน้อย

สาร จ คือของผสมสเตอรอยด์ไกลโคไซด์ 2 ชนิด stigmasterol-O- β -D-glucopyranoside, β -sitosterol-O- β -glucopyranoside ทดสอบในอัตราความเข้มข้น 0.0005, 0.001, 0.005 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม พบว่า สาร จ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการ

เจริญเติบโตของราก 0, 0, 31.49 % ตามลำดับ และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของกาบใบ 2.05, 10.42, 10.71 % ตามลำดับ แสดงว่าสาร จ มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวเล็กน้อย

สาร ฉ คือ Betulinic acid ทดสอบในอัตราความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม พบว่าสาร ฉ แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก 0 % และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของกาบใบ 5.06 % แสดงว่าสาร ฉ ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

สาร ช คือ สารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ไกลโคไซด์ ทดสอบในอัตราความเข้มข้น 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม พบว่าสาร ช แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของราก 0, 0, 0, 0 % ตามลำดับ และแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของกาบใบ 0, 0.04, 0, 2.61 % ตามลำดับ แสดงว่าสาร ช ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

3.4.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้จากเอกสารอ้างอิง

สาร ก คือของผสมโพรคาลาร์บอนไรซ์ตรง (C₂₇-C₃₃) ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสามารถรักษาอาการอักเสบของผิวหนัง (skin inflammatory disorder) (79) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงกินฝ้ายในปริมาณสารที่ใช้ 5 มิลลิกรัม และแสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium ultimum* และ *Helminthosporium teres* (%T/C 120 และ 12 ตามลำดับ) (80)

สาร ข คือของผสมกรดคาร์บอกซิลิกไรซ์ตรง (C₂₉-C₃₃) มีรายงานพบว่ากรดคาร์บอกซิลิกไรซ์ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอน 21, 22, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 33, 34 และ 36 คาร์บอน มีผลยับยั้งการกินของแมลงกินฝ้ายในอัตราที่สูง(80)

สาร ค คือของผสมแอลกอฮอล์ไรซ์ตรง (C₂₇-C₃₂) จากเอกสารอ้างอิงพบว่า triacontanol (C₃₀H₆₁OH) ใช้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator, PGR) (81,82) นอกจากนี้มีรายงานว่าของผสมแอลกอฮอล์ไรซ์ตรงที่มีจำนวนคาร์บอน 28-32 และ 30-36 คาร์บอน มีผลยับยั้งการกินของแมลงกินฝ้ายในระดับสูง(80)

สาร ง คือของผสมของสเตอรอยด์ 3 ชนิดคือ campesterol, stigmasterol, β -sitosterol จากเอกสารอ้างอิงพบว่า ได้มีการนำสเตอรอยด์ของพืชมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางในการใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียม steroid hormones เช่น stigmasterol

ได้มีรายงานถึงการใช้เป็นสารตั้งต้นในการเตรียม progesterone (83) นอกจากนี้พบว่า สเตอรอยด์ทั้ง 3 ชนิดนี้ใช้เป็นยาระบายสำหรับมนุษย์และสัตว์ (laxative) (84) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงกินฝ้ายในระดับสูง (80) β -sitosterol มีผลในการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดของไก่ กระจ่าง และมนุษย์ เมื่อได้รับคอเลสเตอรอลโดยการกิน เนื่องจากยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอล (85) β -sitosterol ยังใช้เป็นสารป้องกันการอักเสบและลดไข้ (antipyretic) (86) ป้องกันการแข็งตัวของเลือด (antirhombotic) (87) ส่วน stigmasterol ใช้เป็นส่วนผสมในยาสระผมเพื่อป้องกันศีรษะล้าน (88) ใช้ป้องกันผิวแห้ง (89)

สาร จ คือ ของผสมสเตอรอยด์ไกลโคไซด์ 2 ชนิด คือ β -sitosteryl-3-O-D-glucopyranoside และ stigmasteryl-3-O-D-glucopyranoside จากเอกสารอ้างอิงพบว่า มีคุณสมบัติช่วยการดูดซึมของเส้นเลือด มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็ง P-388 Leukemia (90,91)

สาร ฉ คือ Betulinic acid (Lup-20(29)-en-28-oic acid,3-hydroxy-, (3 β -) จากเอกสารอ้างอิงยังไม่พบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารนี้โดยตรงแต่พบว่า 3-O-acetyl-Betulinic acid ที่สกัดได้จาก Euptela polyandra มีคุณสมบัติยับยั้ง skin tumor promotor(92)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย