

บทที่ 4 ภาคผนวก

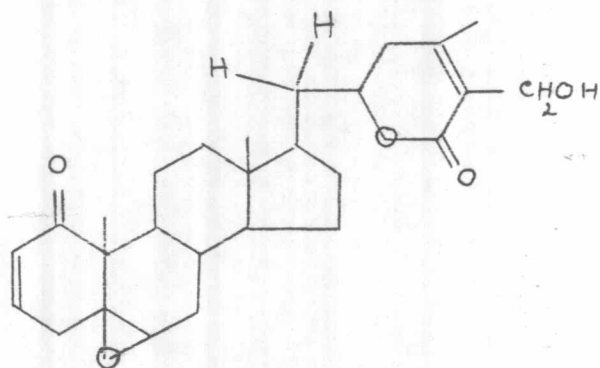
4.1 บทนำ

โทงเทงเป็นพืชล้มลุกมีชื่อเรียกหลายชื่อ² เช่น ป่าตอมตอก (เชียงใหม่) หน้ำถงเถง (อ่างทอง) ทุงทิง สูงประมาณ 30 - 50 cm. ใบเป็นใบเดี่ยวออกสลับกันลักษณะกลมยาว ขอบใบรอยเว้าตื้น ๆ เหมือนคลื่น หลังใบสีเขียวแทบจะไม่มีขน ท้องใบมีขนมากกว่า ก้านใบยาว 1 - 4 cm. ดอกเป็นดอกเดี่ยวออกจากซอกใบ ก้านดอกยาวประมาณ 5 mm. กลีบดอกมี 5 กลีบ สีเหลืองอ่อนออกเขียวเล็กน้อยยาวประมาณ 8 mm. ที่ฐานมีสีม่วงเข้ม เกสรตัวผู้มี 5 อันติดกับโคนกลีบดอก ก้านเกสรตัวเมียเป็นเส้นตรงบาง ๆ ปลายเป็นตุ่มมีรอยแยก 2 รอย ผลมีลักษณะกลมผิวเรียบเป็นมันแก่แล้วเป็นสีเหลืองมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 cm. มีเมล็ดมาก เมล็ดกลม เป็นพืชที่ชอบขึ้นในที่ชื้นแฉะ

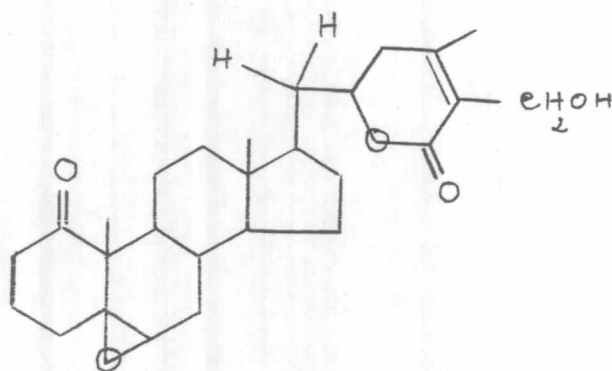
แพทย์แผนโบราณเชื่อว่าพืชชนิดนี้มีสรรพคุณทางยารักษาโรคได้หลายอย่าง เช่น ทั้งต้นใช้เป็นยาแก้บวชละลายขัด ไอหืดเรื้อรัง ฝี หลอดลมอักเสบ ต้ข่าน แผลมีหนอง เป็นต้น รากใช้แก้บิดมีตัว คนในอินเดียเชื่อว่าเป็น diuretic และ laxative ด้วย

โทงเทงเป็นพืชในตระกูล Solanaceae ซึ่งมีหลาย species ด้วยกัน เช่น Physalis alkekengi, Physalis ixocarpa, Physalis minima, Physalis peruviana, Withania somnifera เป็นต้น พืชตระกูลนี้เป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์ก็เพราะมีการนำเอา crude extract ของแต่ละส่วนไปหาฤทธิ์ทางยา ปรากฏว่า crude extract ในรากและใบมีฤทธิ์ทางยาหลายอย่าง เช่น sedative, hypnotic และ antiseptic จึงมีผู้นำพืชเหล่านี้หลายชนิดมาทำการวิจัยเพื่อหาล้วนประกอบทางเคมีต่าง ๆ

ในปี 1968 I. Kirson และคณะได้ทำการวิจัยใบของ Withania somnifera¹² withaferin (I) และ 2,3-dihydro withaferin (II)

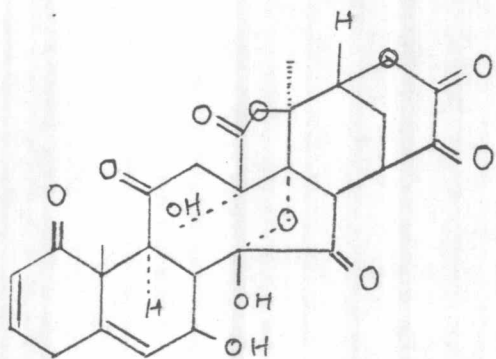


withaferin (I)

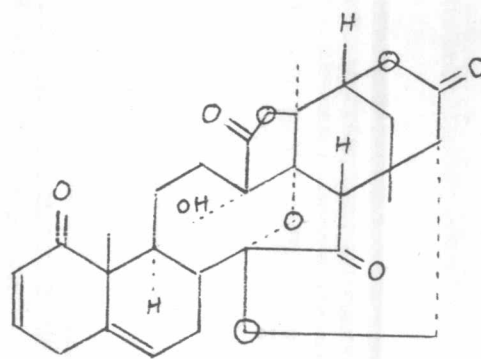


2,3-dihydrowithaferin (II)

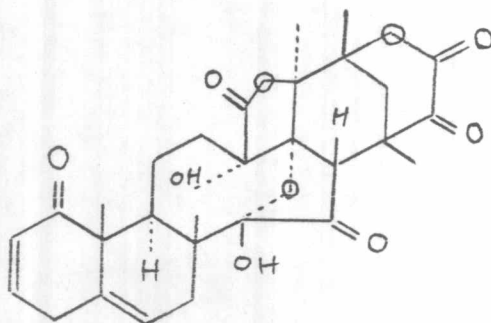
ในปี 1969 Kawai Mitsuru และคณะได้ทำการวิจัย Physalis alkekengi¹³ พบ
 physalin A (III), physalin B (IV) และ physalin C (V)



physalin A (III)

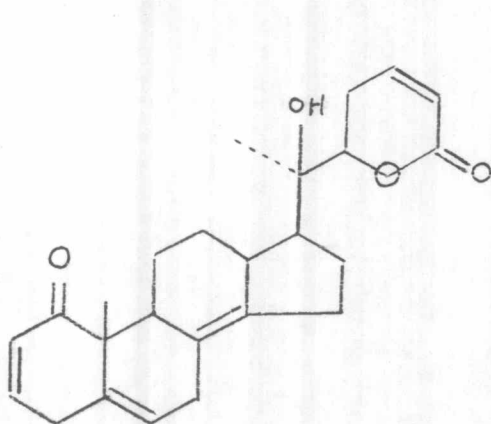


physalin B (IV)

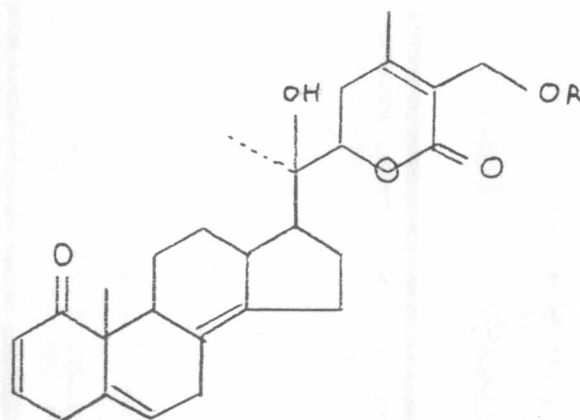


physalin C (V)

ในปี 1973 I. Kirson และคณะได้ทำการวิจัยของ Withania somnifera¹⁴
 อีกแต่เป็น chemotype ที่ต่างออกไป พบสารพวก withanolide 9 ตัว เช่น withanolide G
 (VI), withanolide H (VII)



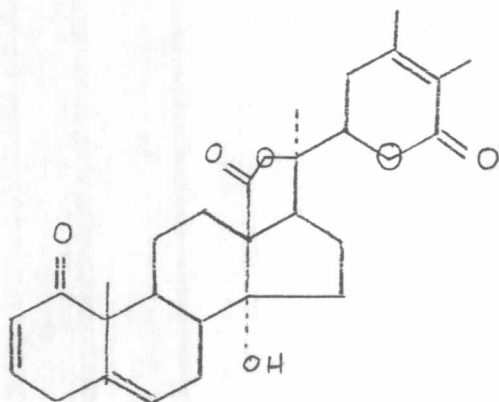
withanolide G (VI)



withanolide H (VII)

ในปีเดียวกันนี้เอง S. Sankuru และคณะได้สกัดสารจากใบของ Physalis
¹⁵
ixocarpa พบ physalin B

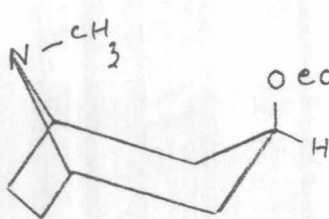
ในปี 1975 Erwin Glotter และคณะได้ศึกษาสารประกอบเคมีในใบของ Physalis
¹⁶
minima ปรากฏว่าแยกได้สาร 5 ตัว คือ physalin B ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่และสารใหม่
 พวก steroids 4 ตัว คือ 5 β ,6 β -epoxy physalin B, withaphysalin A (VIII),
 withaphysalin B และ withaphysalin C



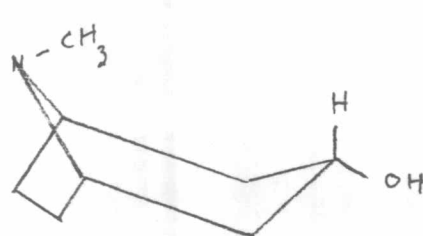
withaphysalin A (VIII)

ในปี 1976 Sakurai, Kensuke และคณะได้สกัดสารจากใบของ Physalis
peruviana¹⁷ พบ withanolide E และ 4 β - hydroxywithanolide

ในปี 1974 Yamaguchi, Hideo ได้สกัด alkaloids จากรากของ Physalis
alkekengi¹⁸ พบ tigloidine (IX), tropine (X) และ pseudotropine



tigloidine (IX)



tropine (X)

จะเห็นได้ว่าสารที่พบในพืชตระกูลนี้แบ่งออกได้เป็น 2 พวกคือ steroids และ
 alkaloids

ในการวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะศึกษาลำรเคมีในล่วนลำตันโทองเทง เพราะในล่วนใบและรากได้มีผู้ทำวิจัยไว้แล้ว แต่ในล่วนลำตันยังไม่มีผู้ทำวิจัยมาก่อน ดังนั้นจึงทำวิจัยเพื่อจะได้เปรียบเทียบลำรที่สกัดได้ว่าเป็นลำรประเภทเดียวกับที่พบในใบและรากหรือไม่ โดยทำการทดลองแยกลำรในล่วนลำตันทำนองเดียวกับที่นิยมทำในใบและราก คือสกัดด้วย trichloromethane หลังจากนั้นจึงทำลำรให้บริสุทธิ์ ศึกษาคุณสมบัติทางเคมี สูตรโครงสร้าง . ซึ่งจะช่วยให้รู้ล่วนประกอบทางเคมีในพืชมากยิ่งขึ้น

4.2 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

4.2.1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้

ใช้ aluminium oxide for column chromatography ของบริษัท E. Merck, Darmstadt เป็น adsorbent ส่วน column ที่ใช้เป็น column แก้ว ขนาดกว้างลุ่ม้าเสมอกัน pack column โดยใช้ dry packing process ทั้งไว้ค้ำคั้นเพื่อให้ stable แล้วเทสารที่ต้องการแยกลงไป ใช้ eluents ต่าง ๆ ตามลำดับคือ hexane , ส่วนผสมของ hexane กับ trichloromethane (1:1 โดยปริมาตร), hexane กับ trichloromethane (1:3 โดยปริมาตร), trichloromethane , trichloromethane กับ methanol (19:1 โดยปริมาตร)

4.2.2 Thin layer chromatography (T.L.C)

ใช้ silica gel (Type 60) for thin layer chromatography ของบริษัท E. Merck, Darmstadt เป็น adsorbent การทำ chromatoplate ใช้ Desaga spreader เตรียมโดยใช้ silica gel 40 g ผสมกับน้ำกลั่น 78 cm³ เขย่าให้เข้ากัน 1 - 2 นาที เทใส่ spreader ที่ปรับให้ adsorbent มีความหนา 0.25 mm. จะได้ chromatoplates ขนาด 20 × 20 cm. จำนวน 5 แผ่น ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วจึง activate โดยอบที่อุณหภูมิ 100 - 110^o อีก 30 นาที เก็บไว้ใน dessicator เพื่อเตรียมไว้สำหรับทำ T.L.C

4.2.3 Nuclear magnetic resonance spectrometer และ mass spectrometer ได้
ส่งไปที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

4.2.4 Infrared spectrophotometer และการหาจุดหลอมเหลว

เครื่องมือนี้ใช้เหมือนกับในหัวข้อ 2.4.2 และ 2.4.4

4.2.5 Solvents

solventsที่ใช้ในการวิจัยนี้ ได้แก่ hexane, benzene, trichloromethane, diethyl ether, 2 - propanone, methanol ซึ่งทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นก่อนที่จะนำมาใช้ นอกจาก methanolที่ใช้สกัดสารจากพืช ไม่จำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อน

4.3 การสกัด (Extraction)

การสกัดเอาสารจากต้นโทงเทง ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้ นำเอาต้นโทงเทงสดที่ตัดใบ และรากกิ่งแล้วตากแดดให้แห้ง บดละเอียด แล้วนำไปสกัดโดยวิธีแช่สารในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง แช่ทิ้งไว้หลาย ๆ วัน และเขย่าขวดที่แช่สารเป็นครั้งคราวแช่ใน trichloromethane ครั้งละ 10 วัน กรองเอาสารละลายของ trichloromethane ไปกลั่นจนเหลือปริมาตร 200 - 300 cm³ และทำให้แห้งต่อไปโดยถ่ายจากขวดกลั่นใส่ในปีกเกอร์ แล้วนำมาตั้งบน water bath ผลที่ลู่ได้สารมีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลอมเหลือง การสกัดสารจากต้นโทงเทงได้กระทำ 2 ครั้ง ดังตารางที่ 1

4.4 การแยกสาร (Separation)

นำสารที่ได้จากการสกัดด้วย trichloromethane มาละลายใน trichloromethane 50 cm³ ตั้งบน water bath ให้ crude ละลายแล้วนำมาแบ่งครึ่ง ใสลงใน column ซึ่งบรรจุ alumina (360 g) เป็น adsorbent ทำ 2 columns เหมือนกันแล้ว elute ด้วย solvent systems ตามที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 4.2.1

เก็บ eluent ครั้งละ 500 cm³ นำแต่ละ fraction ที่ได้ไปกลั่นไล่ตัวทำละลาย ออกจนเหลือสารในขวดกลั่นประมาณ 15 - 20 cm³ ถ่ายใส่ขวดรูปกรวยขนาด 50 cm³ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก แยกสารออกเป็นพวก ๆ โดยการทดสอบด้วย T.L.C ตามตารางที่ 2

4.5 การทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)

จากการทำ column chromatography ใน fraction ที่ 1 และ 2 จะได้ semisolid สีเหลืองออกมาปนกับน้ำมัน เมื่อทดสอบด้วย T.L.C

ใช้สารละลายผสม hexane : trichloromethane (3:1 โดยปริมาตร) เป็น eluent
 ปรากฏว่าได้ spot เพียง spot เดียว กับมีน้ำมันอยู่ข้างบน plate ดังนั้นจึงนำ semisolid
 มาล้างด้วย hexane และตกผลึกสารที่ได้ด้วย methanol ได้ของแข็งสีขาวไม่มีรูปผลึก
 (amorphous) ตกผลึกซ้ำด้วย methanol จนได้สารบริสุทธิ์ (ทดสอบด้วย T.L.C มี spot
 เดียว) m.p. 68 - 70° (0.2831 g, 0.82 % ของ crude extract) กำหนดให้เป็นสาร C
 ส่วนใน fraction 6 - 8 เมื่อใช้สารละลายผสมระหว่าง hexane : trichloro-
 methane (1:1 โดยปริมาตร) เป็น eluent ได้สารตกผลึกออกมาเป็นรูปเข็มปนกับน้ำมัน
 สีเหลือง จากการทดสอบด้วย T.L.C. พบว่าน้ำมันปนอยู่กับสารเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงใช้
 methanol ล้างเอาน้ำมันออก 2 ครั้ง แล้วตกผลึกด้วย methanol จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวออกมา
 ทดสอบด้วย T.L.C. จนไม่มีสารอื่นเจือปน สารนี้มี m.p. 138 - 139° (0.451 g, 1.32 %
 ของ crude extract) กำหนดให้เป็นสาร D

ใน fraction 9 - 11 เมื่อใช้สารละลายผสมระหว่าง hexane : trichloro-
 methane เป็น eluent ได้สารตกผลึกออกมาติดกันขวด 2 - 3 ผลึก มีลักษณะเป็นสีขาวขุ่น
 ทดสอบด้วย T.L.C ปรากฏว่าไม่มีสารอื่นเจือปน เอามาตกผลึกใหม่ใน benzene ได้ผลึกสีขาว
 m.p. 97 - 99° แต่มีปริมาณน้อยมากจึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างได้ กำหนด
 ให้เป็นสาร E

ใน fraction 26-27 เมื่อใช้สารละลายผสมระหว่าง trichloromethane :
 methanol (19:1 โดยปริมาตร) เมื่อทำให้เกือบแห้งจะได้สารตกผลึกเป็นรูปเข็มปนกับน้ำมันสีเหลือง
 ใช้ hexane ละลายน้ำมันออก 2 ครั้ง โดยใช้ hexane ครั้งละ 30 cm³ ตั้งบน water bath
 คนสักครู่หนึ่งแล้วจึงเทเอา hexane ออกและล้างด้วย diethyl ether อีก 2 ครั้ง และตกผลึก
 จาก benzene กับ methanol จะได้ผลึกรูปเข็ม m.p. 233 - 234° ทดสอบด้วย T.L.C.
 ปรากฏว่าไม่มีสารอื่นเจือปน (0.027 g, 0.079 % ของ crude extract) กำหนดให้เป็นสาร F

ตารางที่ 7

ปริมาณของ crude extract ที่ได้จากการสกัดด้วย trichloromethane

ครั้งที่	น้ำหนักต้นโทงเทงสด (kg)	น้ำหนักต้นโทงเทงแห้ง (kg)	ปริมาตร solvents (dm ³)	น้ำหนักของสารที่สกัด ออกมา (g)	เปอร์เซ็นต์
1	5	0.5	4	4.13	0.82
2	5	0.5	4	1.52	0.3
3	14	1.54	10	22.07	1.4
4	14	1.54	10	7.32	0.4
5	-	3.5	18	34.12	0.97
6	-	3.5	18	13.55	0.38

ตารางที่ 8

ผลการแยก crude extract โดย column chromatography

eluents	จำนวน fractions	ลักษณะของสารและจุดหลอมเหลว	หมายเหตุ
hexane	1 - 2	semisolid ปนน้ำมันสีเหลือง	
	3 - 5	น้ำมันสีเหลืองอ่อน	
hexane :	6 - 8	ผลึกรูปเข็มสีขาว m.p. 130-133 ^o	
trichloromethane		ปนน้ำมันสีเหลือง	
(1;1 โดยปริมาตร)	9 - 11	ผลึกสีขาว m.p. 97 - 99 ^o	มีเฉพาะในพืช
	12 - 14	น้ำมันสีเหลืองอ่อน	ที่เก็บจากยูรยา
hexane :	15 - 16	น้ำมันสีดำ แยกเป็นจุด ๆ	ส่วนพืชที่เก็บจาก
trichloromethane	17 - 19	น้ำมันสีเหลือง	สมุทรปราการไม่มี
(1:3 โดยปริมาตร)			
trichloromethane	20 - 25	น้ำมันสีดำ	
trichloromethane :	26 - 27	น้ำมันสีเหลืองปนผลึกรูปเข็ม	
methanol		m.p. 228 - 232 ^o	
(19:1 โดยปริมาตร)	28 - 30	น้ำมันสีเหลือง	



4.6 การตรวจสอบลักษณะของสารที่แยกออกได้

4.6.1 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ และ colour reactions ของสาร C

สาร C (m.p. 68 - 70°) ละลายได้ใน hexane ร้อน และ benzene ละลายได้เล็กน้อยใน 2 - propanone และ diethyl ether, ethyl acetate, ethanol และ methanol

$R_f = 0.69$ [ใช้ alumina เป็น adsorbent แล้ว develop ด้วย benzene : methanol (3:1 โดยปริมาตร)]

น้ำหนักโมเลกุล 450 (mass spectrum)

IR spectrum ให้ $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}, \text{cm}^{-1}$ ตามรูปที่ 11 หน้า 39

ตารางที่ 9 หน้า 40

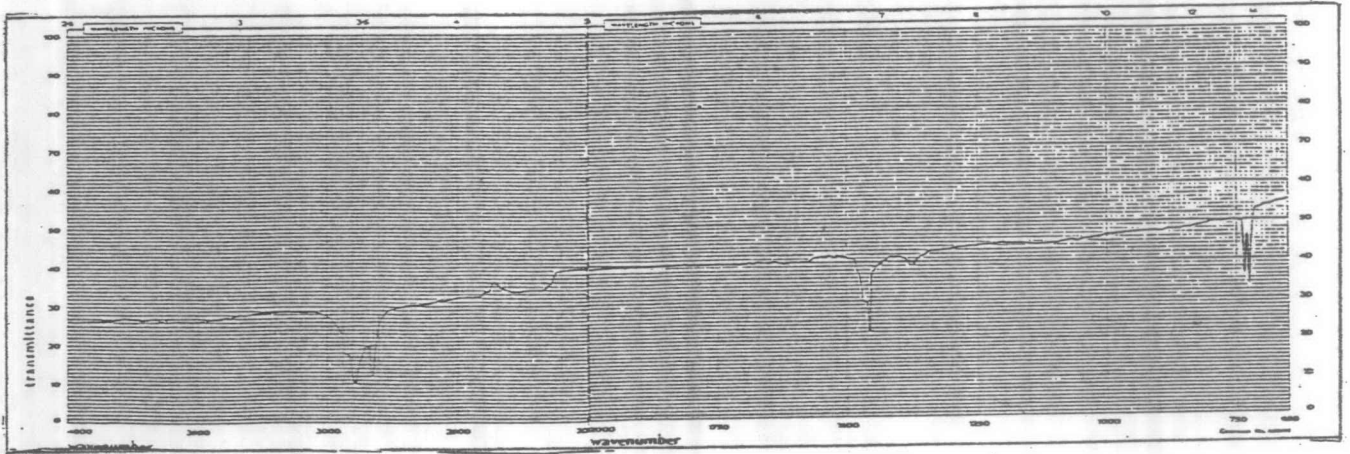
^1H NMR spectrum (ใน CDCl_3) ตามรูปที่ 12 หน้า 39

ตารางที่ 10 หน้า 41

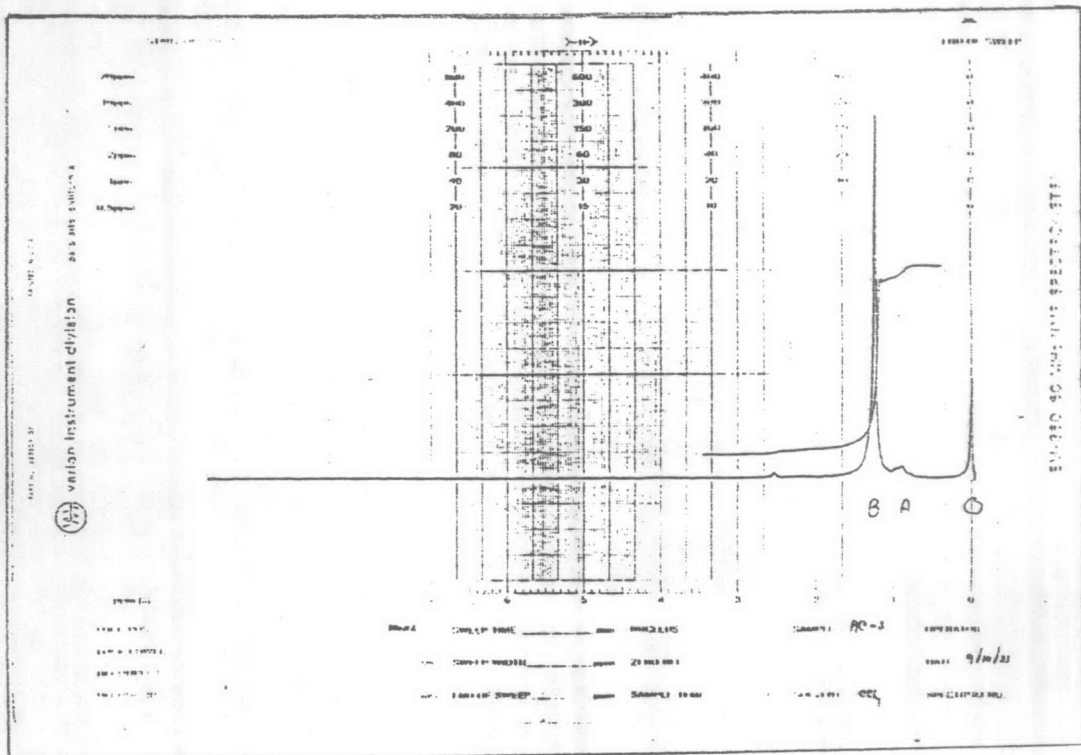
4.6.2 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ และ colour reactions ของสาร F

สาร F ละลายได้ดีใน 2 - propanone, methanol, ethanol, ethyl acetate ละลายได้น้อยใน tetrachloromethane และ benzene ไม่ละลายใน hexane, H_2 , dilute hydrochloric acid

$R_f = 0.47$ [ใช้ alumina เป็น adsorbent แล้ว develop ด้วย trichloromethane : methanol (5:1 โดยปริมาตร)]



รูปที่ 11 IR spectrum ของสาร m.p. 68 - 70°



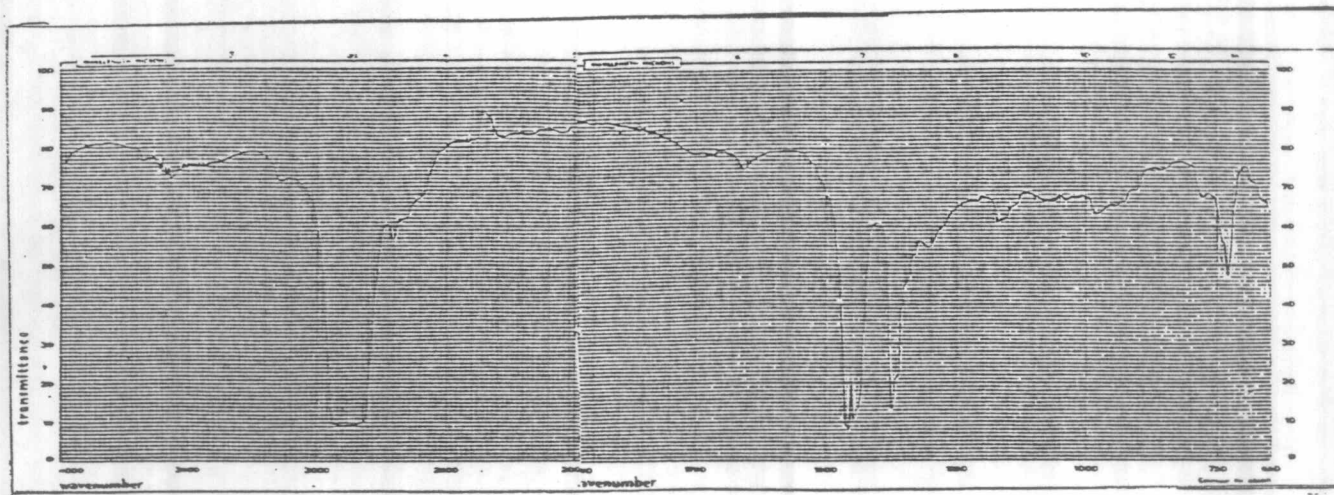
รูปที่ 12 ¹H NMR spectrum ของสาร m.p. 68 - 70°

ตารางที่ 9 IR absorption peaks ของสารประกอบ C m.p. 68 - 70⁰

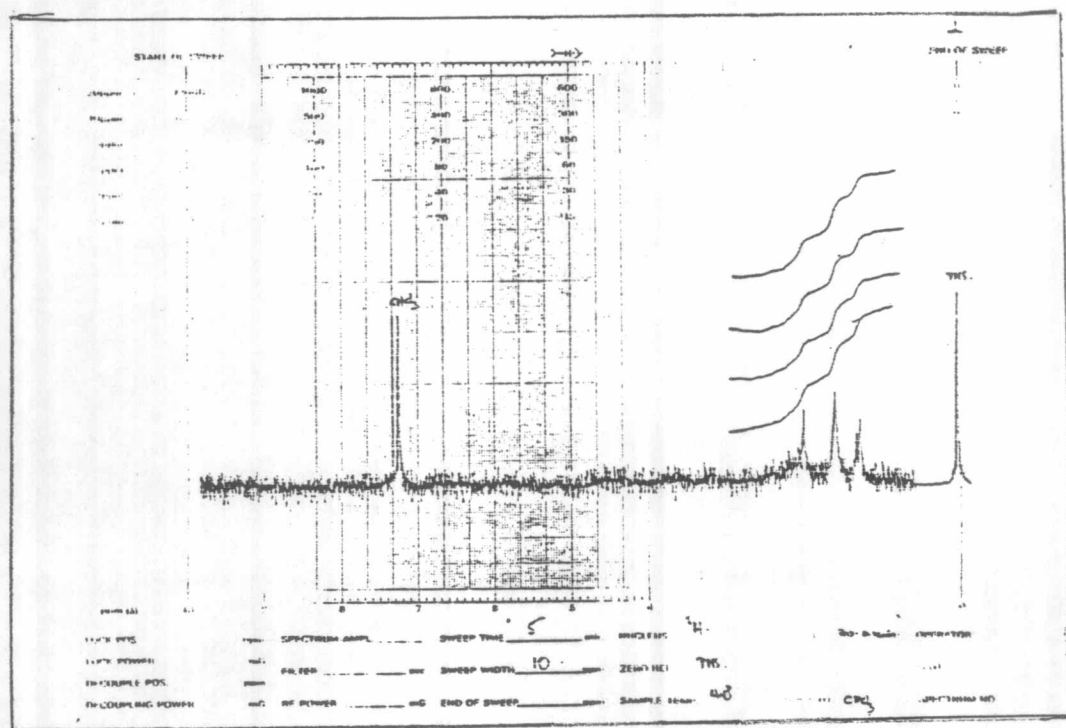
Frequency (cm ⁻¹)	Intensity	Assignments
2810 - 2900	s	C - H stretching , ของ CH ₂ & CH ₃
1460	s	CH ₃ asymmetric bending
1380	w	CH ₃ symmetric bending
725	s(doublet)	CH ₂ rocking

ตารางที่ 10 ^1H NMR absorption peaks ของสารประกอบ C m.p. 68 - 70

Peak labeled	Chemical shift	Proton assignments	Approximate integrated area (P.U.)	No. of Protons
0	0	CH_3 Protons ของ $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	-	-
A	0.85	CH_3 Protons ของ alkane	6	6
B	1.27	CH_2 Protons ของ alkane	61	60



รูปที่ 13 IR spectrum ของสาร m.p. 233 - 234°



รูปที่ 14 1H NMR spectrum ของสาร m.p. 233 - 234°

4.7 วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

จากต้นโทงเทงแยกสารได้ 4 ชนิด ซึ่งกำหนดให้เป็นสาร C, D, E และ F ตามลำดับ สาร C เป็น amorphous สีขาว m.p. 68 - 70° แยกออกมาจาก column (alumina) เมื่อใช้ hexane เป็น solvent แล้วตกผลึกใน methanol สาร D เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว m.p. 138 - 139° แยกออกมาจาก column เมื่อใช้ hexane : trichloromethane (1:1 โดยปริมาตร) เป็น solvent แล้วตกผลึกใน hexane ร้อน สาร E เป็นผลึกสีขาว m.p. 97 - 99° แยกออกมาจาก column เมื่อใช้ hexane : trichloromethane (1:1 โดยปริมาตร) เป็น solvent แล้วตกผลึกใน benzene สาร F เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว m.p. 233 - 234° แยกออกมาจาก column เมื่อใช้ trichloromethane : methanol (19:1 โดยปริมาตร) เป็น solvent แล้วตกผลึกในสารละลายผสมระหว่าง benzene กับ methanol

สาร C m.p. 68 - 70° มีน้ำหนักโมเลกุล 450 จาก IR - spectrum characteristic peak ($\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}, \text{cm}^{-1}$) ที่บ่งว่ามี C-H stretching ของ CH₃ & CH₂ (2810 - 2900), CH₃ asymmetric (1460) CH₃ symmetric (1380) และ CH₂ rocking (725) ¹H NMR spectrum (CDCl₃) ให้ signals ที่ δ 0.85 เป็น triplet มี approximate integrated area 6 ช่อง เป็นค่า chemical shift ของ CH₃ ที่ติดกับ ที่ δ 1.27 เป็น singlet มี approximate integrated area 61 ช่อง เป็นค่า chemical shift ของ CH₂ ที่ติดกับ CH₃

จากการเปรียบเทียบ spectral data ของสาร C กับ standard spectral data เชื่อได้ว่าสาร C คือ C₃₂H₆₆ dotriacontane นอกจากนี้ mass spectrum ยังสนับสนุนโครงสร้างดังกล่าวโดยมี peaks ที่แตกทีละ 14 ตลอด

สาร D มี IR, mixed m.p., T.L.C., ¹H NMR และปฏิกิริยาเคมีของสารตรงกับสาร B ที่ได้กล่าวมาแล้ว จึงเป็นสารชนิดเดียวกันคือ β -sitosterol

E มี m.p. 97 - 99° เนื่องจากมีปริมาณน้อยมาก จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ว่ามีสูตรและองค์ประกอบอย่างไร

สาร F มี m.p. 233 - 234^o จากการทดสอบด้วย 2,4-dinitrophenyl - hydrazine ผลปรากฏว่าให้ positive แสดงว่ามีหมู่ carbonyl อยู่ และยืนยันด้วย IR spectrum ปรากฏว่าให้ peak ที่ 1660 cm⁻¹ แต่เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยมากจึง ทำให้ peak อื่น ๆ ที่ได้จาก IR spectrum เห็นได้ไม่ชัด นอกจากนี้ใน ¹H NMR ยังบ่งชี้ว่าน่าจะมี carbonyl group อยู่โดยมี proton ที่ติดกับ carbonyl group ซึ่งมีค่า chemical shift 1.4 - 2 ppm. ด้วย จากการทดสอบกับ reagents ต่าง ๆ พบว่าให้ negative test ต่อ Liebermann - Burchard และ alkaloid reagents แต่เนื่องจากสารมี ปริมาณน้อยมากจึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อไป