โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ประจำปี 2564

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากใบของต้นสุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*)

Study of chemical constituents from *Cochlospermum regium* leaf

โดย

ผู้ดำเนินการวิจัย

นสภ.ไชยวัฒน์ สงคราม รหัสนิสิต 60210239

อาจารย์ที่ปรึกษา

ดร.สุนันต์ ใจสมุทร

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต ปีการศึกษา 2564

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

สุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดมาจากทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ bixaceae (วงศ์คำแสด) โดยในต่างประเทศมีรายงานการพบสารสำคัญในพืชชนิดนี้ ซึ่งประกอบด้วยสารกลุ่มเทอร์พีน (ส่วนใหญ่พบเป็น Sesquiterpenes และ Triterpenes) ฟลาโวนอยด์ และ สเตอรอยด์ เป็นต้น จากศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่ามีการศึกษาฤทธิ์ของ Antioxidant และ Antityrosinase โดยในประเทศไทยนั้นยังไม่เคยมีการรายงานการแยกสารจากพืชชนิดนี้มาก่อน มีเพียงแค่การศึกษาสารสกัดหยาบและการนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านเท่านั้น ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการศึกษางานวิจัยนี้ และอีกประเด็นคือการนำต้นสุพรรณิการ์เข้ามาปลูกในสภาพแวดล้อมที่ต่างไปจากสภาพแวดล้อมท้องถิ่นเดิม จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบสารชนิดใหม่เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนา เพื่อนำไปสู่ในการใช้ทางการแพทย์ เป็นการส่งเสริมให้เกิดมูลค่า การอนุรักษ์และการพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์สุขภาพ

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงงานวิจัยนี้ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวิชา 791591 โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจศึกษาในทางด้านสมุนไพร เพื่อใช้การรักษาและการส่งเสริมสุขภาพในอนาคตต่อไป

ผู้ทำการวิจัย

นสภ.ไชยวัฒน์ สงคราม 60210239

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2564

เรื่อง การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากใบของต้นสุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*)

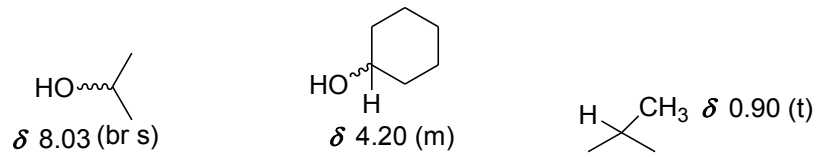
ผู้จัดทำโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ นสภ. ไชยวัฒน์ สงคราม รหัสนิสิต 60210239

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ดร.สุนันต์ ใจสมุทร

บทคัดย่อ

การศึกษาสารประกอบที่แยกได้จากใบสุพรรณิการ์สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 1 สาร (**Unknown 1**) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักทางเคมีในพืชชนิดนี้ โดยตัวอย่างใบสุพรรณิการ์เก็บมหาวิทยาลัยบูรพาวิทยาเขตสระแก้วโดยได้ใบสดมา 10 กิโลกรัม จากนั้นนำมาหมักด้วย ตัวทำละลาย 50% เอทานอล และนำสารสกัดที่ได้มาแยกด้วยเทคนิคคอลลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ระบบ Silica gel เป็นวัฏภาคอยู่กับที่ และ ใช้ตัวทำละลาย ethyl acetate:n-hexane อัตราส่วน 2:3

เมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR พบสัญญาณที่สำคัญที่ค่า Chemical shifts ที่ δ 8.03 (s) เป็น exchangeable proton ที่ δ 4.20 (m) นอกจากนี้เรายังพบสัญญาณ Methyl (triplet) 1 สัญญาณ (J = 6.0 Hz) ซึ่งจากค่า integration ของ proton ทำให้เราทราบจำนวน proton ทั้งหมดเท่ากับ 18 protons โดย **Unknown 1** ยังไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างของสารชนิดนี้ได้ กระบวนการพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีอยู่ในกระบวนการส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพิ่มเติม ซึ่งจากข้อมูลที่พอจะสรุปได้ พบโครงสร้างของสารบางส่วนแสดงในข้างล่าง และจากการศึกษาข้อมูลที่ผ่านมา รวมทั้งข้อมูลของ ^{1}H-NMR และ ผลของโครมาโตกราฟีของ **Unknown 1** มีความเป็นไปได้ว่าน่าจะเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีน



อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร.สุนันต์ ใจสมุทร

Senior Project Academic Year 2021

Study of chemical constituents from *Cochlospermum regium* leaf

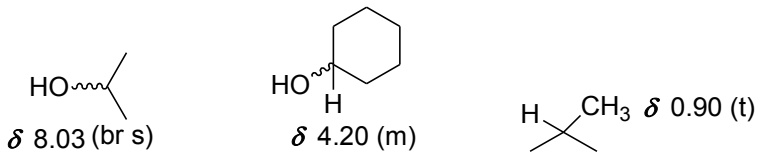
By: Mr. Chaiwat Songkram ID 60210239

Advisor: Dr. Sunan Jaisamut

ABSTRACT

Chemical investigation of *Cochlospermum regium* resulted in the isolation and characterization a pure compound (Unknown 1), which is the main chemical constituent of this plant. The samples of Supanniga leaves were collected from Burapha University, Sa Kaeo Campus by obtaining 10 kg of fresh leaves, then fermented with 50% ethanol solvent and extracted by Colunm chromatography was performed using stationary cycle silica gel and ethyl acetate:n-hexane at a 2:3 ratio.

When identity-identified by ^{1}H-NMR technique, significant signals were found at chemical shifts of δ 8.03 (s) to exchangeable protons of δ 4.20 (m). We also found one Methyl (triplet) signal (J = 6.0 Hz) from the integration of the protons, we know that the total number of protons is 18 protons. **Unknown 1** has not been able to prove the structure of this substance. The process of identifying the chemical structure is in the process of Submission of additional analysis samples which from the information that can be summarized Some of the structure of the substance can be found below. and from the study of past data including the ^{1}H-NMR data and the chromatographic effects of **Unknown 1**, possibly is terpenes group.



Major Advisor Dr. Sunan Jaisamut

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาช่วยเหลือ แนะนำ ให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งจาก อ.ดร.สุนันต์ ใจสมุทร อาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ผู้สอนวิชา 791591 โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 และต้องขอขอบคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับทำงานวิจัย และ หน่วยบริการนวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำหรับสถานที่วิเคราะห์ข้อมูลของสาร ทางผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้ทำการวิจัย

นสภ. ไชยวัฒน์ สงคราม 60210239

สารบัญ

หน้า

คำนำ ..... ก

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ข

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... ง

สารบัญ ..... จ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูปภาพ ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

1.4 กรอบแนวคิด 2

บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ลักษณะพืชวงศ์คำแสด 3

2.2 ประโยชน์ของสุพรรณิการ์ 6

2.3 สารสำคัญจากพืชสกุล Cochlospermum 6

2.4 การสกัดแยกสาร 10

2.4.1 การหมัก 11

2.4.2 การสกัดของเหลวด้วยของเหลว 11

2.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ 12

2.5.1 เครื่องนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์ 12

2.5.2 เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปคโทรโฟโตมิเตอร์ 13

2.5.3 เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟาเรดสเปกโทรมิเตอร์ 13

2.5.4 เครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์ 14

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 15
3.1 ขอบเขตการวิจัย 15
3.2 เครื่องมือ วัสดุ และสารเคมี 15
3.3 การเก็บตัวอย่างใบต้นสุพรรณิการ์ (*C. regium*) 16
3.4 การสกัดและการแยกสารให้บริสุทธิ์ 16
3.4.1 การสกัดสารจากใบสุพรรณิการ์ 16
3.4.2 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี 17
3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี 18
บทที่ 4 ผลการวิจัย 19
4.1 การเก็บตัวอย่างสมุนไพร 19
4.2 การสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์ 19
4.3 การพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์ด้วย ^{1}H-NMR spectroscopy 22
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 25
ข้อเสนอแนะ 26
บรรณานุกรม 27
ภาคผนวก ก 30
รายงานสรุปการเงิน 31

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	แสดงน้ำหนักของสารสกัดจากใบต้นสุพรรณิการ์ (*C. regium*) ที่สกัดแยกด้วยตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol	20
2	ข้อมูล ^{1}H-NMR ของสาร Unknown (400 MHz, $CDCl_3$)	23

สารบัญรูปภาพ

รูป		หน้า
1	โครงสร้างของ bixin (A) และ norbixin (B)	3
2	ลักษณะของพืชในวงศ์คำแสด	4
3	ลำต้นของสุพรรณิการ์	5
4	ใบของต้นสุพรรณิการ์	5
5	ดอกของต้นสุพรรณิการ์	5
6	ผลของต้นสุพรรณิการ์	5
7	ผลของต้นสุพรรณิการ์เมื่อแก่จะแตกเป็นพลูมีปุยฝ้ายหุ้ม	5
8	แสดงลักษณะของดอก (ก) ผล (ข) ต้น (ค) และใบ (ง) สุพรรณิการ์	6
9	การใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศบราซิล รากสด (ก) ยาสมุนไพรแห้ง (ข) ยาที่วางขายในตลาด (ค)	6
10	โครงสร้างของ β-caryophyllene (1), β-bisabolene (2), γ-muurolene (3)	7
11	โครงสร้างของ excelsin (5) pinoresinol (6) narigenin (7) aromadendrin (8) gallic acid (9) β-sitosterol (10) และ stigmasterol (11)	7
12	โครงสร้างของ germacrene D (12), α-cadinol (13) และ 10-epi-cubenol (14) ที่สกัดจากใบ Borotutu (C. angolense)	8
13	โครงสร้างของ β-caryophyllene (3) และ isoborneol (15)	8
14	โครงสร้างของ β-copaen-4-α-ol (16) และ viridiflorol (17)	8
15	โครงสร้างของ ellagic acid (18) dihydrokaempferol (19) dihydrokaempferol-3-O-β-glucopyranoside (20), dihydrokaempferol-3-O- β-(6''-galloyl)-glucopyranoside (21) ที่แยกจากรากสุพรรณิการ์ (C. regium)	9
16	การหมักด้วย 50% ethanol	19
17	แสดง spot ของสารสกัดหยาบ 50% ethanol สังเกตด้วยตาเปล่า (ก) และ spray ด้วย Anisaldehyde (ข)	20
18	แสดงการแยกสารด้วย Column chromatography	21
19	แสดงหลอดทดลองที่รองรับสารสกัด	21
20	แสดงผล spot ของสารจากการแยกสารด้วย Column chromatography บน TLC จากการส่องที่ UV 366 nm	22
21	แสดงถึงโครงสร้างของสารบางส่วนที่เป็นไปได้ในการแปลผลจาก ^{1}H NMR	23
22	ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย ^{1}H-NMR	23

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เป็นที่ทราบกันดีว่าผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นแหล่งที่สำคัญสำหรับนำมาใช้เพื่อเป็นอาหารและเพื่อการรักษาโรคทั้งในรูปแบบยาพื้นบ้านและยาแผนโบราณ ทั้งในประเทศไทยและประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ดังนั้นการค้นหาองค์ประกอบทางเคมีจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยการศึกษาในส่วนขององค์ประกอบทางเคมีและสารสำคัญ ซึ่งจะนำไปสู่การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือนำไปสู่การค้นพบตัวยาใหม่ ๆ ในอนาคต[1]

ปัจจุบันพืชสมุนไพรหลายชนิดถูกนำมาพัฒนาเป็นยาสมุนไพรในการรักษาโรค ซึ่งบางชนิดก็มีผลข้างเคียงหรือมีพิษหากรับประทานในปริมาณมาก จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาอย่างเป็นระบบ เพื่อแยกและหาองค์ประกอบทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพขององค์ประกอบนั้นอย่างเฉพาะเจาะจง เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารที่ออกฤทธิ์ และนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้อง เหมาะสมจึงจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งอาจนำไปสู่การนำสมุนไพรเหล่านั้นมาใช้เป็นยา ทั้งแผนไทยและแผนปัจจุบันในอนาคตต่อไป ทั้งนี้ยาจากสมุนไพรเป็นพืชพื้นเมืองของไทยและยังมีพืชสมุนไพรต่างถิ่นที่สามารถนำมาศึกษาและพัฒนาต่อไปได้

มนุษย์ในปัจจุบันต้องเผชิญกับภาวะต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำลายสุขภาพ ทั้งโรคระบาดและโรคภัยมากมาย เช่น สถานการณ์การแพร่ระบาดของไวรัสโควิด-19 โรคไขมัน โรคความดัน โรคเบาหวาน โรคหัวใจ เป็นต้น การใช้ยาแผนปัจจุบันแม้จะได้ผลดีแต่ก็มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย อาจนำไปสู่การรักษาที่ล้มเหลว ปัจจุบันจึงมีการนำสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษา เพื่อลดผลข้างเคียงและเพื่อการรักษาร่วมกับยาแผนปัจจุบัน[2]

ต้นสุพรรณิการ์เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Bixaceae มีลักษณะสำคัญคือ ให้ยางสีส้มซึ่งนำมาใช้เป็นยาเซ็ตผม ทาบำรุงผิว เป็นยาระบาย[3] และปัจจุบันสารสำคัญจากพืชวงศ์นี้มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในรูปแบบต่าง ๆ มากมาย ทำให้เพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสร้างรายได้มากมายอีกด้วย

ในพื้นที่มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว การนำต้นสุพรรณิการ์มาปลูกเป็นไม้ประดับ ทางคณะผู้ร่วมวิจัยได้ทำการสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเบื้องต้นพบว่าในส่วนของใบ มีฤทธิ์ antioxidant และฤทธิ์ antityrosinase จากการนำมาศึกษาสารสำคัญ ซึ่งอยู่ในระดับดี (IC_{50} = 11.34 ± 4.52 μg/ml และ 0.42 ± 0.07 μg/ml ตามลำดับ)[4] นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้าข้อมูล

การแยกสกัดสารพบว่าประเทศไทยนั้นยังไม่มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารบริสุทธิ์ในพืชชนิดนี้ มีเพียงการนำมาใช้ตามภูมิปัญญาของหมอชาวบ้าน

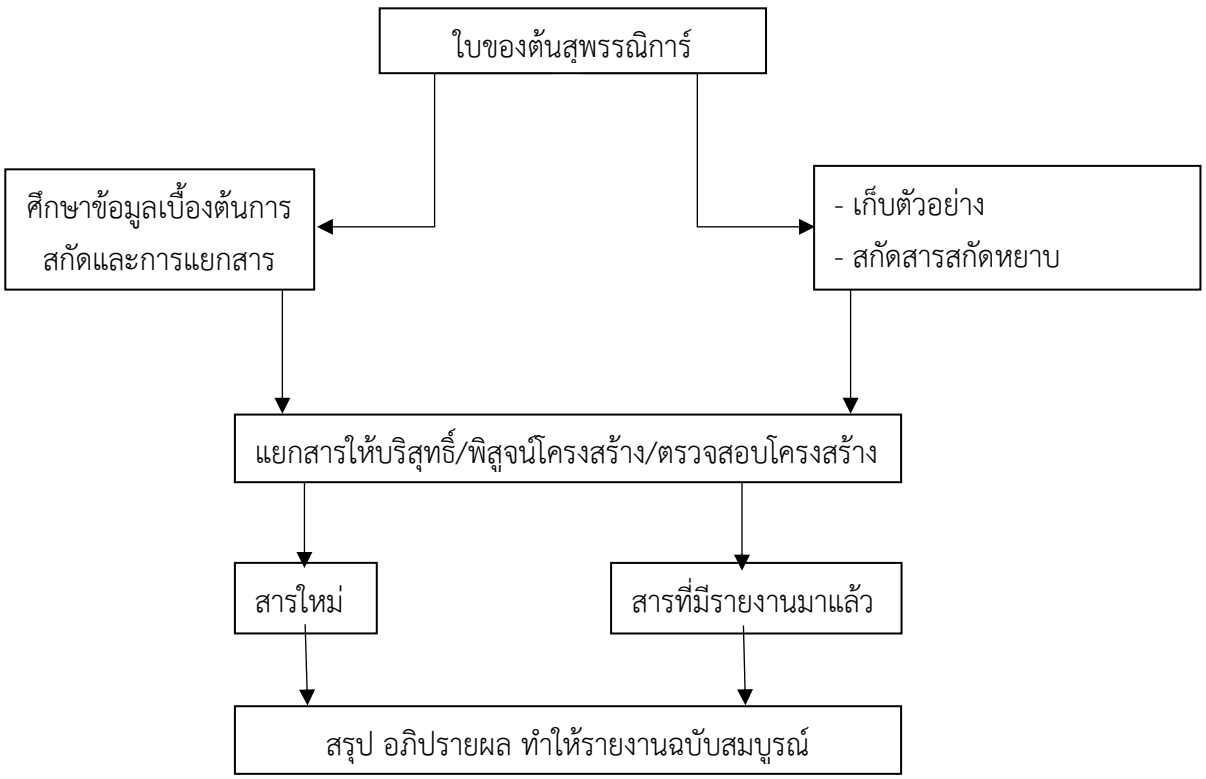
1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดของใบต้นสุพรรณิการ์
2. เพื่อวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากสารสกัดของใบต้นสุพรรณิการ์โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกลุ่มสารและชนิดสารสำคัญที่พบจากใบสุพรรณิการ์ที่ได้มาจากแหล่งการปลูกในประเทศไทย
2. ได้ข้อมูลพื้นฐานของสารบริสุทธิ์และแนวทางในการแยกสารจากใบสุพรรณิการ์
3. สามารถถ่ายทอดความรู้ เทคนิคการวิเคราะห์ต่าง ๆ
4. ส่งเสริมการอนุรักษ์ และขยายพันธุ์ในท้องถิ่น เพื่อประโยชน์ทางยาและผลิตภัณฑ์เสริมความงาม

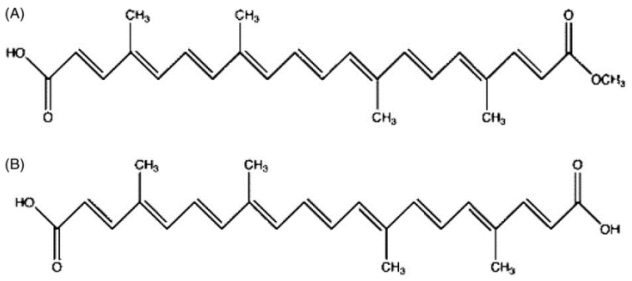
1.4 กรอบแนวคิด



บทที่ 2
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะพืชวงศ์คำแสด

พืชในวงศ์คำแสด (Bixaceae) มีทั้งหมด 25 สปีชีร์ ซึ่งเป็นวงศ์ที่พบในแถบเทือกเขาหิมาลัย ศรีลังกา พม่าและจีนตอนใต้ โดยพืชที่นำไปใช้ในประเทศไทยที่มีการบันทึกไว้ในตำรายาไทยคือ ต้นคำเงาะหรือคำไทย (*Bixa orellana*) โดยสมุนไพรชนิดนี้ในตำราไทยใช้เมล็ดเป็นยาหอม ขับลม เป็นยาฝาดสมาน รักษาบาดแผล แก้ไข้ ขับเสมหะ แก้โรคผิวหนัง ขับระดู[5] โดยสารที่พบเป็นสารกลุ่ม triterpenoids สีคือ ไบซิน (bixin) และ นอร์บิซิน (norbixin) แสดงดัง**รูปที่ 10** โดยสารทั้งสองมีรสขม และสารอื่นๆ เช่น orellin[6] สารแอนแนตโท (annatto) เป็นสารสีธรรมชาติที่มีสีเหลืองส้มถึงส้มแดง ได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสารสีที่ละลายได้ในน้ำมันประกอบด้วย ไบซิน ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่ละลายได้ในน้ำมันชนิดหนึ่ง ส่วนแอนแนตโทที่ละลายได้ในน้ำที่ค่าพีเอชเป็นด่างคือ นอร์บิซิน ใช้เป็นสีผสมอาหาร เช่น เติมลงในเนยเทียม เนยขาว และเนยแข็ง[7] เป็นต้น และพืชในวงศ์เดียวกันที่พบว่ามีการปลูกในประเทศไทยอีกชนิดคือสุพรรณิการ์ (*C. regium*) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดมาจากอเมริกากลางและอเมริกาใต้[8] มีการนำเข้ามาปลูกเป็นไม้ประดับในประเทศไทยเนื่องจากให้กลีบดอกซ้อนที่สวยงาม ปลูกง่าย ทนต่อสภาวะความแห้งแล้งได้ดี โดยใน ประเทศบราซิลได้มีการนำรากของต้นสุพรรณิการ์มาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน[9] เพื่อบรรเทาอาการปวด อักเสบ โรคติดเชื้อ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์[10] และรักษาโรคติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ของผู้หญิง นอกจากนี้สารสกัดจาก *C. regium* ยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา[11]



รูปที่ 1 โครงสร้างของ bixin (A) และ norbixin (B)

ที่มาของภาพ: Hubert De Brabander. Chemical structure of bixin (MW 395) (A) and norbixin (MW 378) (B). [อินเตอร์เน็ต]. 2009. [เข้าถึงเมื่อ 31 กรกฎาคม 2564]. เข้าถึงได้จาก: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-bixin-MW-395-A-and-norbixin-MW-378-B_fig1_26742143

รูปที่ 2 ลักษณะของพืชในวงศ์คำแสด
ที่มาของภาพ: สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. คำแสด [อินเตอร์เน็ต]. 2020. [เข้าถึงเมื่อ 31 กรกฎาคม 2564]. เข้าถึงได้จาก: เข้าถึงได้จาก: www.dnp.go.th/botany/.

วงศ์คำแสด (Bixaceae) มีลักษณะประจำวงศ์ เป็นไม้ใบเดี่ยว เรียงสลับเส้นใบออกจากจุดเดียวกัน ที่โคนใบมีจุดสีแดง ดอกมีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกอย่างละ 5 กลีบ กลีบดอกแยกจากกัน เกสรตัวผู้มีจำนวนมาก รังไข่ติดกันเหนือวงกลีบ ไข่อ่อนมีจำนวนมาก ลักษณะเด่น คือ ไม้ต้นใบเดี่ยว เส้นใบออกจากจุดเดียวกันที่โคนใบ ใบมีจุดสีแดง เกสรตัวผู้จำนวนมาก ผลเป็นแบบผลแห้งแตก มีหนาม [(12)]โดยพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศพบ 1 ชนิดคือ คำแสด (*Bixa orellana*) สำหรับสกุลอื่นเป็นพันธุ์ไม้ต่างถิ่นที่ได้มีการนำเข้ามาปลูกเป็นไม้ดอกเพื่อความสวยงาม เนื่องจากดอกมีขนาดที่ใหญ่ มองเห็นเด่นชัด กลีบดอกสดใส สวยงามเพราะมีไขมันเคลือบ มีทั้งดอกซ้อน และดอกเดี่ยว ปลูกง่ายด้วยการปักชำกิ่งหรือเพาะเมล็ด ทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี ประโยชน์สีแดงจากเมล็ดของต้นคำแสดใช้ในอุตสาหกรรมการย้อมสีผ้า[(13)]

ดังนั้นสุพรรณิการ์จึงเป็นต้นไม้ที่น่าสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบ ทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพิ่มเติม ทั้งนี้ในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานการแยกสารจาก พืชชนิดนี้มาก่อน มีเพียงการศึกษาสารสกัดหยาบเบื้องต้นเท่านั้น[(14)] และมีการนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน โดยให้สรรพคุณทางยามาอย่างยาวนาน และอีกประเด็นหนึ่งคือการนำต้นสุพรรณิการ์เข้ามาปลูกในสภาพแวดล้อมที่ต่างไปจากสภาพแวดล้อมท้องถิ่นเดิมที่เคยมีการศึกษา จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบสารชนิดใหม่เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้ทางการแพทย์และเป็นการส่งเสริมให้เกิดมูลค่า การอนุรักษ์และการพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์สุขภาพได้อีกด้วย

สุพรรณิการ์หรือฝ้ายคำซ้อน มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cochlospermum regium* จัดอยู่ในอันดับ malvales วงศ์ bixaceae (วงศ์คำแสด) และสกุล cochlospermum มีลักษณะเป็นไม้ต้น ใบเดี่ยวจักเป็นแฉกรูปนิ้วมือ ดอกสีเหลือง สมบูรณ์เพศ เกสรเพศผู้จำนวนมาก ผลแห้งแตก เมล็ดจำนวนมาก มีขนคล้ายไหมล้อมรอบ[(15)] การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยพบ 2 ชนิด คือ ฝ้ายคำ (*C. religiosum)* และสุพรรณิการ์หรือฝ้ายคำซ้อน (*C. regium*) นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ[(16)] พืชสกุลนี้พบ ประมาณ 13 สายพันธุ์ โดยแต่ละสายพันธุ์ มีความแตกต่างกันที่ลักษณะของดอกและใบ เช่น ฝ้ายคำจะออกดอก

เพียงชั้นเดียว มี 5 กลีบ และบานทีละดอก ในขณะที่สุพรรณิการ์จะมีทั้งชนิดที่ออกดอกชั้นเดียวและชนิดที่ออกดอกซ้อนกันเป็นกระจุกแน่น โดยบานพร้อม ๆ กัน[17]

รูปที่ 3 ลำต้นของสุพรรณิการ์
ลักษณะ : เป็นต้นไม้ผลัดใบสูง 7-15 เมตร กิ่งก้านคดงอ

รูปที่ 4 ใบของต้นสุพรรณิการ์
ลักษณะ : ใบเดี่ยวรูปหัวใจ แผ่นใบแยกเป็น 5 แฉก ขอบใบเป็นคลื่น

รูปที่ 5 ดอกของต้นสุพรรณิการ์
ลักษณะ : ดอกเป็นช่อสีเหลืองออกกระจายที่ปลายกิ่ง บานทีละดอก มีกลิ่นหอม สมบูรณ์เพศ เกสรเพศผู้จำนวนมาก

รูปที่ 6 ผลของต้นสุพรรณิการ์
ลักษณะ : ผลรูปไข่กลับ กว้าง 2.5-3 ซม. ยาว 5-7 ซม. เมื่อแก่แตกเป็น 3-5 พู เมล็ดสีน้ำตาล รูปถั่ว มีปุยคล้ายปุยฝ้ายหุ้ม

รูปที่ 7 ผลของต้นสุพรรณิการ์เมื่อแก่จะแตกเป็นพลูมีปุยฝ้ายหุ้ม

รูปที่ 8 แสดงลักษณะของดอก (ก) ผล (ข) ต้น (ค) และใบ (ง) สุพรรณิการ์

ที่มาของภาพ: ก. สุนันต์ ใจสมุทร ข. สารสนเทศท้องถิ่น ณ อุบลราชธานี สวนสาธารณะภูหล่น [อินเตอร์เน็ต]. 2017.

2.2 ประโยชน์ของสุพรรณิการ์

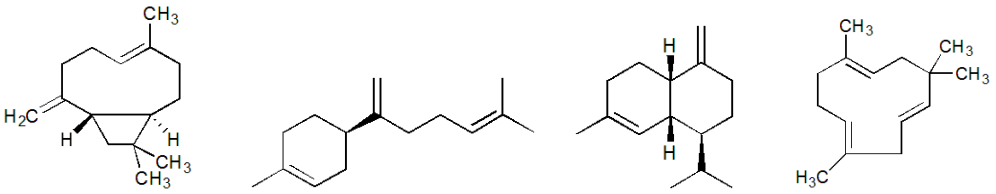
ข้อมูลการใช้ประโยชน์จากสุพรรณิการ์ ในประเทศบราซิลได้มีการนำรากมาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน[8] ดัง**รูปที่ 9** เพื่อบรรเทาอาการปวด อักเสบ โรคติดเชื้อ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์[9] และรักษาโรคติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ของผู้หญิง[8, 10, 11] นอกจากนี้สารสกัดจาก *C. regium* ยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา[9,12,13]

รูปที่ 9 การใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศบราซิล รากสด (ก) ยาสมุนไพรแห้ง (ข) ยาที่วางขายในตลาด (ค)

ที่มาของภาพ: Solon S. et al. Revista Eletrônica de Farmácia. 2009;6(3), 1-22.

2.3 สารสำคัญจากพืชสกุล Cochlospermum

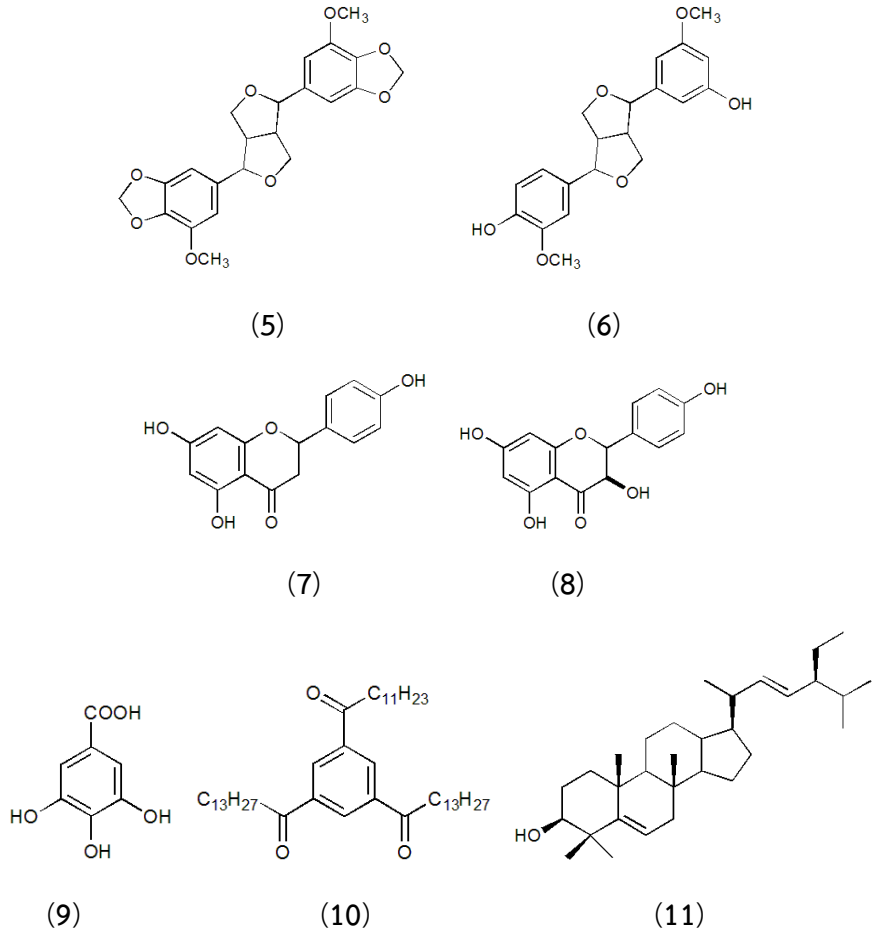
จากการศึกษาวรรณกรรมที่ผ่านมาพบว่าพืชในสกุล cochlospermum มีรายงานการแยกสารหลายชนิด ในปี 2005 Almeida และคณะได้ทำการแยกสารจากใบ yellow rose (*C. vitifolium*) พบสารกลุ่มเทอร์พีนคือ β-caryophyllene (1) β-bisabolene (2) γ-muurolene (3) α-humulene (4) 1-hydroxy-3-hexadecanone (5) และ β-pinene (6) แสดงดัง**รูปที่ 10**



(1) (2) (3) (4)

รูปที่ 10 โครงสร้างของ β-caryophyllene (**1**), β-bisabolene (**2**), γ-muurolene (**3**) และ α-humulene (**4**) ที่สกัดจากใบ Yellow rose (*C. vitifolium*)

ในส่วนรากพบสารกลุ่มฟีนอลคือ excelsin (**5**) pinoresinol (**6**) narigenin (**7**) aromadendrin (**8**) gallic acid (**9**) และพบสารกลุ่มสเตียรอยด์ คือ β-sitosterol (**10**) และ stigmasterol (**11**)[18]



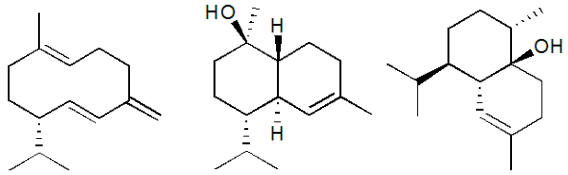
(5) (6)

(7) (8)

(9) (10) (11)

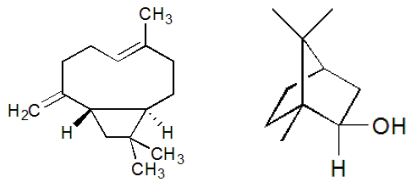
รูปที่ 11 โครงสร้างของ excelsin (**5**) pinoresinol (**6**) narigenin (**7**) aromadendrin (**8**) gallic acid (**9**) β-sitosterol (**10**) และ stigmasterol (**11**) ที่สกัดจากราก yellow rose (*C. vitifolium*)

ปี 2012 Leonardi และคณะได้ทำการแยกสารจากใบ borotutu (*C. angolense*) ได้สารกลุ่มเทอร์พีน ได้แก่ germacrene D (**12**) α-cadinol (**13**) และ 10-epi-cubenol (**14**) แสดงดัง**รูปที่ 10** ในส่วนรากพบสารกลุ่มเทอร์พีนคือ β-caryophyllene (**1**) และ isoborneol (**15**)[19] แสดงดัง**รูปที่ 12**



(**12**) (**13**) (**14**)

รูปที่ 12 โครงสร้างของ germacrene D (**12**), α-cadinol (**13**) และ 10-*epi*-cubenol (**14**) ที่สกัดจากใบ Borotutu (*C. angolense*)

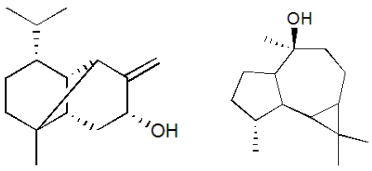


(**3**) (**15**)

รูปที่ 13 โครงสร้างของ β-caryophyllene (**3**) และ isoborneol (**15**)

ที่สกัดจากราก Borotutu (*C. angolense*)

ปี 2014 Inácio และคณะสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบสุพรรณิการ์พบสารกลุ่ม sesquiterpenes ซึ่งมีสาร β-copaen-4-α-ol (**16**) และ viridiflorol (**17**) เป็นส่วนประกอบ[20] แสดงดัง**รูปที่ 14**



(**16**) (**17**)

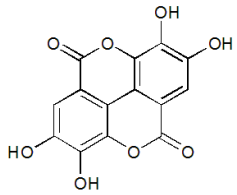
รูปที่ 14 โครงสร้างของ β-copaen-4-α-ol (**16**) และ viridiflorol (**17**)

ที่สกัดจากใบของสุพรรณิการ์ (*C. regium*)

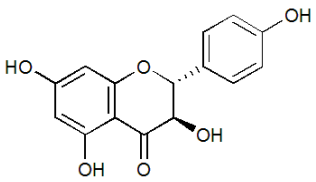
ปี 2017 อ.นิรมัยและคณะศึกษาฤทธิ์ antioxidant และฤทธิ์ antityrosinase จากสารสกัดของส่วน กิ่ง ดอก และใบของต้นสุพรรณิการ์ *C. regium* (มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว) นอกจากนี้ยังศึกษาการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (phytochemical screening) จากสารสกัดหยาบ พบว่ามีสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ[21]

ปี 2018 Carvalho และคณะได้ทำการแยกสารจากรากของต้นสุพรรณิการ์ได้สารกลุ่มฟีนอลิก คือ ellagic acid (**18**) gallic acid (**19**) dihydrokaempferol (**20**) dihydrokaempferol-3-O- β-glucopyranoside (**21**) dihydrokaempferol-3-O- β-(6''-galloyl)-glucopyranoside (**25**) pinoresinol (**6**) และ excelsin (**5**) [22] แสดงดัง**รูปที่ 14**

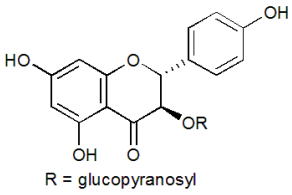
ปี 2019 Silva และคณะสุพรรณิการ์ (*C. regium*) พบสารกลุ่มแทนนิน ฟีนอลิก มิวสิเลจ ซาโปนิน สเตียรอยด์ ไตรเทอร์พีนและฟลาโวนอยด์ เป็นต้น[23]



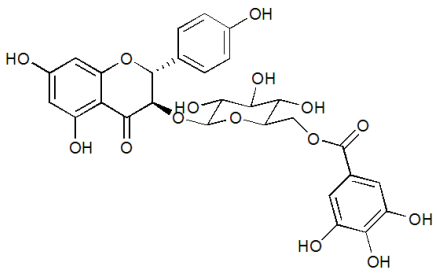
(**18**)



(**19**)



(**20**)



(**21**)

รูปที่ 15 โครงสร้างของ ellagic acid (**18**) dihydrokaempferol (**19**) dihydrokaempferol-3-O-β-glucopyranoside (**20**), dihydrokaempferol-3-O- β-(6''-galloyl)-glucopyranoside (**21**) ที่แยกจากรากสุพรรณิการ์ (*C. regium*)

จากข้อมูลข้างต้นเนื่องด้วยการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสุพรรณิการ์ยังมีข้อมูลไม่มากพอและมีความไม่ต่อเนื่อง อีกทั้งสภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิศาสตร์ของประเทศไทยมีความแตกต่างกับประเทศถิ่นกำเนิดของสุพรรณิการ์หรือการศึกษางานวิจัยต่าง ๆ ที่ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้า รวมถึงความสำคัญของสมุนไพรซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นแหล่งสำคัญในการนำมาใช้เป็นอาหารและใช้เป็นยารักษาโรค ที่มีทั้งรูปแบบยาสมุนไพรพื้นบ้าน ยาแผนโบราณ และยังนำมาใช้เป็นยาแผนปัจจุบันชนิดใหม่ ๆ ทั้งในและต่างประเทศ ดังนั้นการค้นหาองค์ประกอบทางเคมี และศึกษาต่อยอดฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบอย่างเฉพาะเจาะจง จึงมีความสำคัญอย่างมากในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือสารประกอบชนิดใหม่ต่อไป

งานวิจัยนี้จึงมีจุดม่งหมายในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดในใบของต้นสุพรรณิการ์ เพื่อนำข้อมูลพืชสมุนไพรชนิดนี้เป็นฐานข้อมูลนำร่องในการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆหรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสร้างมูลค่าในอนาคตต่อไป

2.4 การสกัดแยกสาร

การแยกสารด้วยการสกัด (extraction)[23] เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารที่ผสมกันออกจากกัน โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม สารผสมอาจเป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีหรือเป็นสารต่าง ๆ จากพืชหรือสัตว์ การสกัดแบ่งออกได้ 2 ประเภท คือการสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction) และการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid–liquid extraction)

การสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction) เป็นการสกัดตัวถูกละลายจากของผสมที่อยู่ในสถานะของแข็ง โดยใช้ตัวทำลายที่เหมาะสมที่เป็นของเหลว โดยการสกัดของแข็งด้วยของเหลวที่ได้ปฏิบัติในการวิจัยนี้ ได้แก่ การหมัก (maceration)

การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid–liquid extraction) เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกตัวหนึ่ง ซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก โดยจะแยกสารอินทรีย์ออกจากสารอินทรีย์ซึ่งนิยมให้ของผสมละลายหรือแขวนลอยในน้ำเรียกว่า ชั้นน้ำ (aqueous layer) และสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ที่ไม่ละลายน้ำแยกชั้นอยู่เรียกว่า ชั้นสารอินทรีย์ (organic layer)

การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ตัวทำละลายจะต้องสามารถละลายสารสำคัญที่ต้องการสกัดได้ ไม่ระเหยง่ายหรือยากจนเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด ไม่เป็นพิษ และราคาไม่แพงมาก นอกจากการเลือกใช้ตัวทำละลายให้เหมาะสมแล้วยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสกัด คือ ขนาดอนุภาคของสมุนไพรที่จะนำมาสกัด สัดส่วนของสมุนไพรกับปริมาณตัวทำละลายที่ใช้ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการสกัด

2.4.1 การหมัก (maceration)

เป็นกระบวนการสกัดองค์ประกอบสำคัญจากพืชสมุนไพรโดยการแช่ผงสมุนไพรในตัวทำละลายจนกระทั่งตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้ วิธีการหมักคือ นำสมุนไพรแช่กับตัวทำละลายที่เหมาะสมในภาชนะที่ปิดสนิท ทิ้งไว้ 3-7 วัน เขย่าหรือคนบ่อย ๆ หากต้องการสกัดสารจนหมดอาจต้องสกัดซ้ำหลายครั้ง แล้วกรอง หลังจากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ (filtrate) มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) จะได้สารประกอบอินทรีย์หลายชนิดปนกันอยู่และไม่บริสุทธิ์ในสารสกัด เรียกว่า สารสกัดหยาบ (crude extract)

2.4.2 การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction)

หลักการคือ ทำให้ตัวถูกละลายที่ละลายในตัวทำละลายที่ 1 (ปกติคือตัวทำละลายของน้ำ) กระจายไปสู่ตัวทำละลายที่ 2 (ปกติคือตัวทำละลายอินทรีย์) โดยที่ตัวทำละลายทั้งสองชนิดนี้มีความเข้ากัน แต่ไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วิธีการสกัด คือ นำสารละลายของน้ำที่มีตัวถูกละลายที่ต้องการแยกใส่ในกรวยแยก (separatory funnel) แล้วเติมตัวทำละลายอินทรีย์ตามลงไปในกรวยแยกจากนั้นเขย่ากรวยแยก 2-3 นาที ให้คว่ำกรวยแยก แล้วเปิดจุก เพื่อระบายความดันแล้วหงายกรวย เพื่อทำการเขย่าต่อ ทำแบบนี้ 2-3 ครั้ง จนกระทั่งการกระจายของตัวถูกละลายระหว่างตัวทำละลายทั้งสองถึงสมดุล ตั้งกรวยแยกทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายทั้งสองแยกชั้น

ถ้าตัวถูกละลาย A ถูกนำมาทำการสกัดด้วยวิธีดังกล่าวนี้ เมื่อการสกัดถึงสมดุล อัตราส่วนของการกระจายของตัวถูกละลาย A ระหว่างตัวทำละลายที่ 1 และที่ 2 จะมีค่าคงที่ เรียกว่า สัมประสิทธิ์ของการกระจาย (Distribution Coefficient, K_d) หรือสัมประสิทธิ์ของการแบ่งส่วน (Partition Coefficient)

$$Kd = \frac{[A]_1}{[A]_2}$$

K_d คือ ค่าคงที่ที่เรียกว่า สัมประสิทธิ์ของการกระจาย

$[A]_1$ คือ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายของน้ำ

$[A]_2$ คือ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

2.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์

2.5.1 เครื่องนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์

เครื่องนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์[24] (Nuclear magnetic resonance spectrometer; NMR) สามารถแบ่งตามความถี่ เช่น 60 100 300 หรือ 600 เมกกะเฮิรตซ์ เป็นต้น โดยความถี่มากขึ้นจะเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและความเข้มสัญญาณ การเกิดเรโซแนนซ์ของโปรตอนจะขึ้นอยู่กับสนามแม่เหล็กภายนอก (B_0) และความถี่คลื่นวิทยุ (v) ดังนั้น การพัฒนาเครื่อง NMR จึงสามารถทำได้ 2 แบบ ได้แก่ คงที่ B_0 และเปลี่ยน v หรือคงที่ v และเปลี่ยน B_0

เครื่อง NMR สามารถจำแนกออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ เครื่องเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรมิเตอร์แบบคลื่นต่อเนื่อง (Continuous-Wave NMR spectrometer, CW NMR) และเครื่องเอ็นเอ็มอาร์แบบฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์ม (FT-NMR spectrometer, FT-NMR)

หลักการทำงานของเครื่อง CW NMR คือ คงที่ v และเปลี่ยน B_0 ซึ่งเครื่องกำเนิดสัญญาณกวาดจะค่อย ๆ เพิ่มความเข้มสนามแม่เหล็ก (B_0) ซึ่งในขณะที่ B_0 เพิ่มขึ้นนั้น ความถี่เชิงมุมของโปรตอนจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเท่ากับความถี่คลื่นวิทยุ ระหว่างแท่งแม่เหล็กจะมีขวดลวดพันรอบหลอดบรรจุตัวอย่างต่อไปยังเครื่องรับและส่งความถี่คลื่นวิทยุ ส่งผลให้โปรตอนเกิดเรโซแนนซ์ จากนั้นตรวจหาและบันทึกสัญญาณ ได้เป็นสเปกตรัม

ข้อเสียของเครื่อง CW NMR คือ โมเลกุลที่มีโปรตอนชนิดต่าง ๆ จะถูกกระตุ้นให้เกิดเรโซแนนซ์ไม่พร้อมกัน โดยสัญญาณเรโซแนนซ์จะบันทึกเป็นของแต่ละโปรตอนจนกระทั่งครบทุกโปรตอน จากนั้น จึงเกิดการประมวลผลเป็นสเปกตรัมของโมเลกุล ทำให้ใช้เวลานานในการวิเคราะห์

หลักการของเครื่อง FT-NMR จะคล้ายกับเครื่อง CW NMR แต่จะเปิด-ปิดเครื่องกำเนิดความถี่คลื่นวิทยุช่วงระยะเวลาสั้นประมาณ 10^{-5} วินาที เกิดพัลส์ (pulse) ซึ่งพัลส์จะเกิดไม่ต่อเนื่อง เพื่อทำให้โปรตอนชนิดต่าง ๆ ภายในโมเลกุลถูกกระตุ้นและเหนี่ยวนำให้เกิดเรโซแนนซ์พร้อมกัน

หลังจากโปรตอนถูกกระตุ้นไปที่สถานะบีตาแล้วจะคายรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าออกมาพร้อมกัน เพื่อกลับลงมาสู่สถานะเดิม (สถานะแอลฟา) ทั้งนี้โปรตอนชนิดต่าง ๆ จะคายพลังงานออกมาไม่เท่ากัน เรียกว่า สลายแบบการเหนี่ยวนำอิสระ (Free-Induction Decay, FID) เมื่อเวลาผ่านไปแต่ละนิวเคลียส โปรตอนความเข้ม FID จะลดลงจนกระทั่งเป็นศูนย์เมื่อกลับสู่สถานะแอลฟา แต่ถ้าความเข้ม FID ไม่ลดลง ลักษณะจะเป็นคลื่นไซน์ (sine wave) หรือคลื่นโคไซน์ (cosine wave)

สัญญาณเรโซแนนซ์ในสเปกตรัมเกิดจากการแปลงฟูเรียร์จากโดเมนเวลา (time domain) เป็นโดเมนความถี่ (frequency domain)

2.5.2 เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปคโทรโฟโตมิเตอร์

เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปคโทรโฟโตมิเตอร์[25] (UV-VIS Spectrophotometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่างซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงในช่วงรังสียูวีหรือแสงขาวที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงเปลี่ยนสถานะ ไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้

2.5.3 เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟาเรดสเปกโทรมิเตอร์

เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟาเรดสเปกโทรมิเตอร์[26] (FT-IR spectrometer; Fourier Transform Infrared Spectrometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ตรวจสอบ โครงสร้างของสาร โดยการวัดการดูดกลืนรังสีที่อยู่ในช่วงอินฟราเรด ที่อยู่ในช่วงเลขคลื่น (Wave number) ประมาณ 12,800 - 10 cm^{-1} ซึ่งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทั้ง ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ รังสีอินฟราเรด (Infrared radiation) เป็นรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าแต่ให้ความร้อนที่สัมผัสได้ รังสีอินฟราเรดอยู่ระหว่างช่วง Visible radiation กับ Microwave radiation โดยช่วงของรังสีอินฟราเรดแบ่งออกเป็น 3 ช่วง ได้แก่ Near Infrared (12,800-4,000 cm^{-1}) Middle Infrared (4,000-200 cm^{-1}) Far Infrared (200-10 cm^{-1}) ช่วงของรังสีอินฟราเรดที่ใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ทางเคมีได้แก่ช่วง Middle IR เนื่องจากรังสีอินฟราเรดมีพลังงานค่อนข้างต่ำ เมื่อโมเลกุลของสารดูดกลืนรังสีอินฟราเรดเข้าไปจะทำให้พันธะในโมเลกุลเกิดการสั่นและการหมุน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ของโมเลกุล การที่โมเลกุลจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดได้นั้นความถี่ของรังสีอินฟราเรดต้องเท่ากับความถี่การสั่นของโมเลกุลของสารนั้นๆ ซึ่งสารอินทรีย์แต่ละชนิดจะมีค่าความถี่ของการสั่นที่จำเพาะและแตกต่างกันไปทำให้สามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างและชนิดของสารอินทรีย์ได้ การแสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้แสดงเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง wave-number กับ transmittance ซึ่งเรียกว่า Infrared spectrum

2.5.4 เครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์

เครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์[24] (Mass spectrometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสาร โดยอาศัยหลักการ การใช้ลำอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงวิ่งชนโมเลกุล ทำให้เกิดเป็นไอออนหรือเป็นอะตอมที่มีประจุ ถ้าไอออนที่เกิดขึ้นมีมวลต่างกัน เมื่อเข้าสู่สนามแม่เหล็กจะวิ่งชนรัศมีความโค้งที่ต่างกัน สนามแม่เหล็กจึงแยกไอออนที่มีมวลต่างกันออกจากและแสดงผลเป็นกราฟเรียกว่า แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ทั้งมวลและประจุของไอออน วัดได้จากตำแหน่งที่ปรากฏในสเปกตรัม จึงสามารถวิเคราะห์ชนิดของธาตุและไอโซโทปที่มีอยู่ในสารต่าง ๆ

งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดของดอกสุพรรณิการ์เพื่อนำข้อมูลพืชสมุนไพรชนิดนี้เป็นฐานข้อมูลนำร่องในการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆหรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่สร้างมูลค่าในอนาคตต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ขอบเขตการวิจัย

เก็บตัวอย่างพืช ใบต้นสุพรรณิการ์ (*C. regium*) จากมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว จังหวัดสระแก้ว โดยเก็บตัวอย่างช่วงเดือนพฤศจิกายน 2564 โดยเก็บใบทุกระยะ ทั้งใบอ่อนและใบแก่ รวมกันทั้งหมดประมาณ 10 กิโลกรัม จากนั้นนำมาสกัดด้วย 50% เอทานอล แล้วระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยด้วยการลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาแยกสารให้บริสุทธิ์ และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และ มีการส่งพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) และ Mass spectrometry (MS) ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3.2 เครื่องมือ วัสดุ และสารเคมี

3.2.1 ใบของต้นสุพรรณิการ์

3.2.2 เครื่องมือ

3.2.2.1 เครื่องชั่ง

3.2.2.2 Hammer mill

3.2.2.3 Rotary evaporator

3.2.2.4 Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-VIS spectroscopy)

3.2.2.5 Infrared spectroscopy (IR)

3.2.2.6 Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

3.2.2.7 Mass spectrometry (MS)

3.2.3 เครื่องแก้ว

3.2.3.1 บีกเกอร์

3.2.3.2 แท่งแก้วคน

3.2.3.3 กรวยกรอง

3.2.3.4 ขวดรูปชมพู่

3.2.3.5 กระบอกตวง

3.2.3.6 กระจกนาฬิกา

3.2.3.7 กรวยแยก

3.2.3.8 หลอดแคปิลารี

3.2.3.9 TLC tank

3.2.4 สารเคมี

3.2.4.1 น้ำกลั่น

3.2.4.2 แอทานอล

3.2.4.3 เอทิลอะซิเตด

3.2.4.4 ไดไฮโดรมีเทน

3.2.4.5 เฮกเซน

3.2.4.6 อะซิโทน

3.2.4.7 Vanillin's reagent

3.2.4.8 Anisaldehyde's regent

3.3 การเก็บตัวอย่างใบต้นสุพรรณิการ์ (*C. regium*)

การเก็บตัวอย่างใบของต้นสุพรรณิการ์ (*C. regium*) โดยเก็บตัวอย่างจากมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว เก็บช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2564 โดยเก็บใบทุกระยะ ทั้งใบอ่อนถึงใบแก่ หลังจากนั้นชั่งตัวอย่างพืชประมาณ 10 กิโลกรัม ทำเป็นตัวอย่างแห้งและจัดทำเป็น herbarium โดยกิ่งก้านจะถูกตัดและตากแห้งเป็นเวลา 3 วัน ในขณะที่ใบแห้งจะนำไปอบด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C จนแห้ง หลังจากนั้นนำใบที่อบแห้งแล้วไปชั่งน้ำหนักตัวอย่างแห้ง และนำไปบดด้วยเครื่อง hammer mill แล้วนำไปหมักในขั้นตอนต่อไป

3.4 การสกัดและการแยกสารให้บริสุทธิ์

3.4.1 การสกัดสารจากใบสุพรรณิการ์

นำส่วนของใบของต้นสุพรรณิการ์มาบดให้ละเอียดแล้วนำไปหมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองออก ทำซ้ำเช่นเดิม 2 – 3 ครั้ง หรือ จนกว่าจะสกัดได้หมด จากนั้นระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้บันทึกผล และคำนวณปริมาณร้อยละของสารสกัด (% yield w/w)

นำสารสกัด 50% เอทานอล มาสกัดแยกด้วยตัวทำละลายจากขั้วต่ำไปหาขั้วสูง ได้แก่ hexane, ethyl acetate และ methanol แต่ละตัวทำละลายสกัดซ้ำ ๆ 2 – 3 จนได้สารละลายใส นำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยให้แห้ง และชั่งน้ำหนักสารในแต่ละส่วนแล้วจึงหาระบบเพื่อเตรียมแยกด้วยวิธี chromatography ต่อไป

นำสารสกัดหยาบ 50% เอทานอล มาสกัดแยกต่อด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ *n*-hexane, ethyl acetate และ methanol สกัดครั้งละ 30 ml ใช้วิธีการดัดแปลงมาจาก Solon S. และคณะ[12] โดยแต่ละตัวทำละลาย ทำการสกัดจนได้สารละลายใส แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง

rotary evaporator และชั่งน้ำหนักสารในแต่ละส่วน และคำนวณปริมาณร้อยละของสารสกัดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบ 50% เอทานอล แล้วจึงหาระบบเพื่อเตรียมแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีต่อไป

หาระบบโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC) เพื่อดูองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ ใช้ stationary phase คือ SiO_2 60 F_{254} และ mobile phases คือ ethyl acetate:*n*-hexane อัตราส่วน 2:3 โดยนำสารสกัดหยาบมาละลายด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate จากนั้นทำการ spot ตัวอย่างบนแผ่น TLC แล้วนำไปวางในโถวางแผ่น TLC ที่มี mobile phase จากนั้นปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นไปจนถึงระดับก่อนปลายด้านบนประมาณ 1 cm

แล้วยกแผ่น TLC ออกจากภาชนะ รอให้สารละลายระเหยแล้วจึงสังเกต spot บน โครมาโตแกรม TLC ด้วยวิธีต่อไปนี้ สังเกตสีด้วยตาเปล่า สังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และ 366 nm และใช้ spraying reagent ได้แก่ vanillin-sulfuric acid spray reagent แล้วให้ความร้อนที่ 120 $^{\circ}C$ สังเกตสีของ spot ที่พบ จากนั้นนำข้อมูลเปรียบเทียบงานวิจัยที่มีการรายงานก่อนหน้า

3.4.2 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

เตรียมตัวอย่างในการทำ TLC เพื่อดูองค์ประกอบจากสารสกัดด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane โดยนำสารสกัด *n*-hexane ละลายด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate เพื่อใช้ตรวจสอบลักษณะโครมา โตแกรม TLC ใช้ stationary phase คือ SiO_2 60 F_{254} และ mobile phases คือ ethyl acetate:*n*-hexane อัตราส่วน 2:3 จากนั้น spot ตัวอย่างบนแผ่น TLC แล้วทำการสังเกต spot บนโครมาโตแกรม TLC

ทำการเตรียมคอลัมน์สำหรับการทำ quick column chromatography (QCC) นำ SiO_2 ผสมกับ *n*-hexane คนให้ SiO_2 อิ่มตัว *n*-hexane แล้วเทลงใน Glass Buchner funnels ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 cm สูงประมาณ 3/4 ของคอลัมน์ซึ่งต่อกับชุดเครื่องสุญญากาศ ทำการเกลี่ยให้ผิวหน้าเรียบ ทำการดูด n-hexane ออกทิ้งแล้วทิ้งคอลัมน์ไว้ 24 ชั่วโมง นำสารสกัดในชั้น *n*-hexane น้ำหนัก 3.4522 g ผสม SiO_2 เทลงบนผิวหน้าของ SiO_2 ในคอลัมน์ ชะด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane และ dichloromethane ในอัตราส่วนเท่ากันตลอดวิธีการวิเคราะห์ (Isocratic elution) โดยชะอัตราส่วนละ 300 ml และเก็บ fraction ละ 60 ml ทั้งหมด 38 fraction เมื่อได้ครบแล้ว ระเหยสารสกัดด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วติดตามสารในแต่ละ fraction ด้วยการทำ TLC โดยใช้ mobile phase คือ ethyl acetate : *n*-hexane อัตราส่วน 40 : 60 แล้วรวม fraction ที่ spot เหมือน กันเข้าด้วยกัน ได้ 12 fraction จากนั้นนำ fraction ที่รวมกันไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแล้วชั่งน้ำหนักสารที่ได้ ติดตามสารสำคัญโดยการสังเกต spot บนโครมาโตแกรม TLC และนำ fraction ที่ 4 มาทำการแยกในขั้นตอนต่อไป

นำสารสกัด fraction ที่ 4 ที่ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธี QCC มาสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography; CC) โดยใช้ stationary phase คือ SiO_2 และใช้ mobile

phase คือ ethyl acetate : *n*-hexane อัตราส่วน 40 : 60 โดยเตรียมคอลัมน์ขนาด 3 x 90 cm แล้วนำ SiO_2 ผสม mobile phase บรรจุลงในคอลัมน์ ชะด้วยตัวทำละลายจนคอลัมน์อิ่มตัว จากนั้นใช้หลอดหยด (dropper) หยดสารสกัด fraction ที่ 4 ผ่านคอลัมน์ลงบนซิลิกาเจล แล้วชะด้วย mobile phase จากนั้นเก็บสารที่ชะได้จากคอลัมน์ครั้งละ 60 ml เก็บจนกว่าสารในคอลัมน์จะถูกชะออกมาจนหมดหรือซิลิกาเจลกลายเป็นสีขาว จากนั้นติดตามสารในแต่ละ fraction ด้วยการทำ TLC โดยใช้ mobile phase คือ ethyl acetate : *n*-hexane อัตราส่วน 40 : 60 แล้วรวม fraction ที่มี spot ใกล้เคียงกัน จากนั้นนำ fraction ที่รวมกันแล้วนำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วชั่งน้ำหนักสารที่ได้ จากนั้นติดตามสาระสำคัญโดยการสังเกตสี spot บนโครมาโตแกรม TLC ได้สารตัวอย่าง Unknown แล้วนำสารที่แยกได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกนีทิกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี

ในการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากใบสุพรรณิการ์จะใช้หลายเทคนิคประกอบเข้าด้วยกันได้แก่ การสังเกตการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm การตรวจสีของ spot บนโครมาโตแกรม TLC ด้วย vanillin-sulfuric acid spray reagent และเทคนิค NMR เปรียบเทียบกับสารที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้า เพื่อให้การพิสูจน์โครงสร้างเกิดความน่าเชื่อถือมากที่สุด

นำสารตัวอย่าง ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี NMR โดยส่งวิเคราะห์ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H และ ^{13}C-NMR (400 MHz สำหรับ ^{1}H และ 100 MHz สำหรับ ^{13}C) ใช้ตัวทำละลายคือ Chloroform-d ($CDCl_3$)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างสมุนไพร

งานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างจากใบต้นสุพรรณิการ์ (*C. regium*) มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว จังหวัดสระแก้ว ในวันที่ 25 พฤศจิกายน 2564 มีปริมาณใบสดรวมกันแล้วนำไปชั่งน้ำหนักได้ 10.61 kg แล้วนำไปทำให้แห้งด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C เมื่อทำให้แห้งนำไปชั่งน้ำหนักได้น้ำหนัก 1.56 kg และเมื่อตากจนแห้งสนิทแล้วทำการบดตัวอย่างใบต้นสุพรรณิการ์ด้วยเครื่อง hammer mill

4.2 การสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์

การสกัดใบสุพรรณิการ์นำใบแห้งที่ลดขนาดแล้ว ปริมาณ 331.28 g หมักด้วย 50% เอทานอล 1.5 L (3 ครั้ง) แสดงกระบวนการหมักดัง**รูปที่ 16** เมื่อหมักเสร็จแล้วได้สารสกัดหยาบ 50% เอทานอล 13.97 g ร้อยละของสารสกัดที่ได้เท่ากับ 4.22 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักใบแห้ง 331.28 g นำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดแยกต่อด้วยตัวทำละลายได้แก่ n-hexane, ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ จากนั้นชั่งน้ำหนักสารในแต่ละส่วนได้น้ำหนักสารสกัด 3.49, 1.86 และ 2.67 g ตามลำดับ

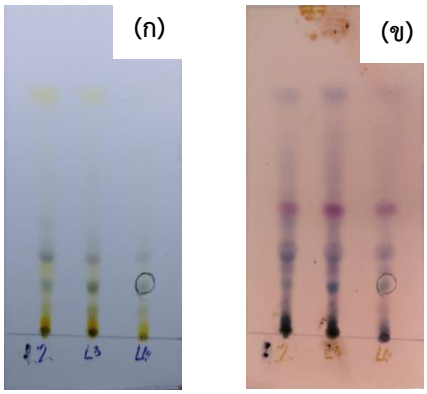
เปรียบเทียบน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายกับน้ำหนักสารสกัดหยาบ ได้ร้อยละของสารสกัดดัง**ตารางที่ 1** พบว่าปริมาณน้ำหนักในชั้น n-hexane มีมากที่สุด แสดงว่ามีสารสำคัญที่ได้เป็นสารที่มีขั้วต่ำ

รูปที่ 16 การหมักด้วย 50% ethanol

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักของสารสกัดจากใบต้นสุพรรณิการ์ (*C. regium*) ที่สกัดแยกด้วยตัวทำละลาย hexane, ethyl acetate และ methanol

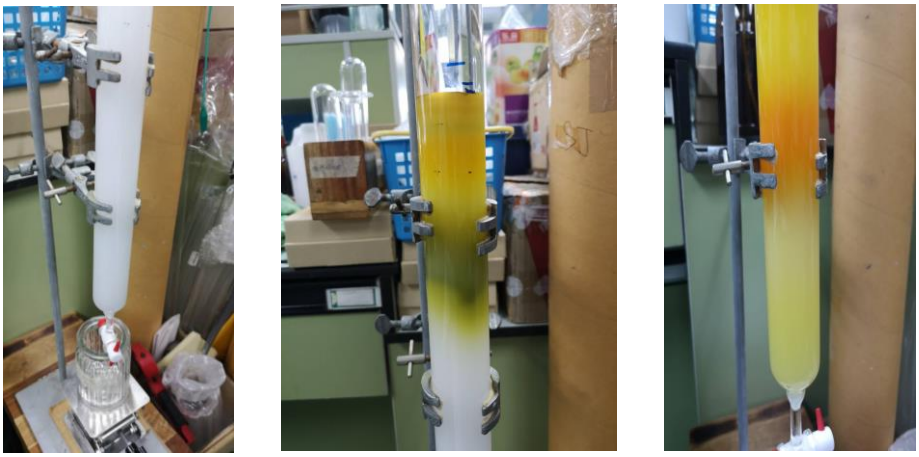
การสกัดด้วยตัวทำละลาย	ปริมาณสารสกัด (g)	ร้อยละของสารสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบ
n-hexane	3.49	25.14
ethyl acetate	1.86	13.40
methanol	2.67	19.24

เมื่อนำสารสกัดหยาบมาวิเคราะห์หาด้วยระบบด้วยเทคนิค TLC โดยใช้ระบบคือ ethyl acetate :n-hexane ในอัตราส่วน 2:3 และเมื่อสังเกตโครมาโตแกรม TLC ที่ UV 366 nm พบ spot สีเหลืองเรืองแสงคาดว่าเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และเมื่อสเปรย์ด้วย vanillin-sulfuric acid spray reagent พบ spot สีม่วง คาดว่าเป็นสารกลุ่มสเตอรอยด์ และพบ spot สีน้ำเงินคาดว่าเป็นสารกลุ่มฟีนอลลิก แสดงดัง**รูปที่ 17** เมื่อนำข้อมูลเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่มีการรายงานก่อนหน้า[14] พบว่าแสดงผลตรงกันโดยพบสารกลุ่มคลอโรฟิลล์ ฟีนอลลิก และ สเตียรอยด์



รูปที่ 17 แสดง spot ของสารสกัดหยาบ 50% ethanol สังเกตด้วยตาเปล่า (ก) และ spray ด้วย Anisaldehyde (ข)

จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย *n*-hexane มาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ระบบเดียวกับ TLC คือ ระบบ 2:3 ethyl acetate ใน n-hexane แสดงดัง**รูปที่ 18**



รูปที่ 18 แสดงการแยกสารด้วย Column chromatography

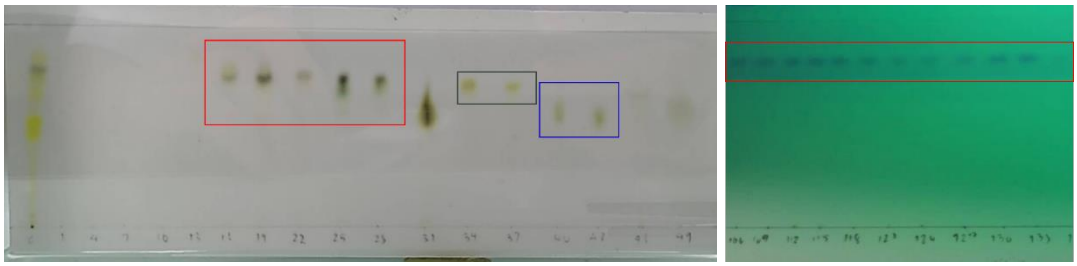
โดยก่อนที่จะมีการแยกสารนั้นจะมีการเตรียม Silica gel โดยนำไปชั่งมีน้ำหนัก 10 g แล้วหลังจากนั้นมีการเติม ethyl acetate :n-hexane ในอัตราส่วน 2:3 ลงไปแล้วคนให้เข้ากัน และนำไปเทใส่คอลัมน์เพื่อทำการแพ็คคอลัมน์เตรียมพร้อมสำหรับการโหลดสารลงไปในคอลัมน์ โดยการบวนการแพ็คคอลัมน์ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมงเพื่อนั่งเคาะให้คอลลัมน์แน่น เพื่อให้เกิดการแยกสารที่มีความบริสุทธิ์ แล้วปล่อยทิ้งไว้ 1 วันโดยมีการปิดที่ปลายคอลัมน์เพื่อไม่ให้สารละลายระเหยออกไป แล้ววันรุ่งขึ้นมาทำการโหลดสารลงไปในคอลัมน์แล้วรอรับสารสกัดตั้งแต่เวลา 8.00 น. จนถึง 24.00 น. จนกว่าสารสกัดจะมีสีใสแสดงว่าสารถูกแยกออกมาหมดแล้ว

หลังจากที่แยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้วนั้น มีการรองรับสารสกัดทั้งหมดโดยใช้หลอดทดลองประมาณ 300 หลอด หลังจากนั้นนำเข้าตู้ควันเพื่อทำการระเหยสารสกัดให้มีความเข้มข้น แสดงดัง**รูปที่ 19**

รูปที่ 19 แสดงหลอดทดลองที่รองรับสารสกัด

หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ระเหยจนมีความเข้มข้นแล้วนำไปทดสอบด้วย TLC โดยการทดสอบนั้นจะมีการทดสอบโดยใช้หลอดเว้น 2 หลอด ตัวอย่างเช่น การทดสอบ Spot TLC จะใช้หลอดลำดับที่ 1, 4, 7, 10, 13, ... เพื่อให้ง่ายและเป็นการประหยัดเวลาต่อการทดสอบ TLC และถ้าเจอ Spot ที่มีค่า Rf ที่ตรงกันจะนำสารสกัดจากหลอดทดลองนั้นรวมเป็นหลอดเดียวกันและนำไปทำ TLC อีกครั้ง

หลังจากที่ทำการทดสอบ TLC เสร็จสิ้นแล้ว นำไปส่อง ที่ UV 366 nm พบว่าหลอดที่ประมาณ 103 – 157 พบสารบริสุทธิ์ และ ทดสอบด้วย Vanillin-sulfuric acid spray reagent พบ spot ดังภาพ**รูปที่ 20**



รูปที่ 20 แสดงผล spot ของสารจากการแยกสารด้วย Column chromatography บน TLC จากการส่องที่ UV 366 nm

โดยส่วนสีแดงที่วงไว้ เป็นสารสกัดหยาบในตำแหน่งแรก และตำแหน่งถัดมาเป็นสารสกัดที่ถูกแยกออกมาก่อน ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสีและยังไม่บริสุทธิ์ และสารที่สนใจจะอยู่ในส่วนของสีน้ำเงิน ตำแหน่งที่ 15 เป็นต้นไป ซึ่งสารที่ได้นั้นจะเป็นสารมีมีขั้วที่ต่ำ เนื่องจากใช้ Mobile phase ที่ต่ำ สารที่มีขั้วต่ำจึงแยกออกมาก่อน

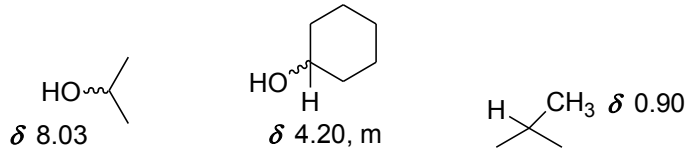
หลังจากนั้นมีการเก็บสารจากหลอดทดสอบและมีการชั่งน้ำหนักของสารบริสุทธิ์ ซึ่งมีน้ำหนัก 9.4 mg หลังจากนั้นนำไปพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์ด้วย Spectroscopy ต่อไป โดยส่งวิเคราะห์ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

4.3 การพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์ด้วย 400 MHz ^{1}H-Nuclear magnetic resonance spectroscopy

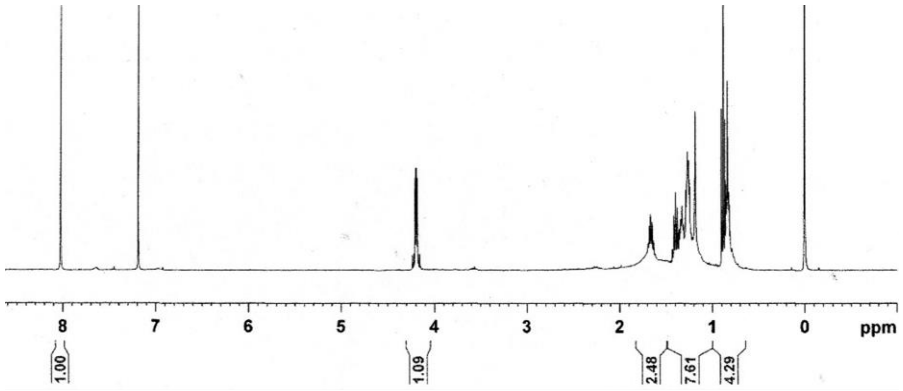
นำสารที่แยกได้มาพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR ที่ 400 MHz โดยใช้ตัวทำละลายใช้ตัวทำละลายคือ chloroform-d ($CDCl_3$) จากนั้นมีการจำลองโครงสร้างของสารออกมา

จากการพิสูจน์โครงสร้างจากลักษณะสเปกตรัม สาร Unknown ที่พบ มีค่า integration ของ proton รวม = 18 และพบสัญญาณ exchangeable proton = 1 แสดงว่า มี proton อยู่ในโครงสร้าง ขั้นต่ำ 18 proton มีการพบสัญญาณที่สำคัญที่ค่า Chemical shifts ที่ δ 8.03 (s) เป็น exchangeable proton ที่ δ 4.20 (m) นอกจากนี้เรายังพบสัญญาณ Methyl (triplet) 1 สัญญาณ

(J = 6.0 Hz) ซึ่งจากค่า integration ของ proton ทำให้เราทราบจำนวน proton ทั้งหมดเท่ากับ 18 protons โดย **Unknown 1** ยังไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างของสารชนิดนี้ได้ กระบวนการพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีอยู่ในกระบวน การส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพิ่มเติม ซึ่งจากข้อมูลที่สรุปได้พบโครงสร้างของสารบางส่วนแสดงดัง**รูปที่ 21** และจากการศึกษาข้อมูลที่ผ่านมา[15] รวมทั้งข้อมูลของ ^{1}H-NMR และ ผลของโครมาโตกราฟีของ **Unknown 1** มีความเป็นไปได้ว่าน่าจะเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีน



รูปที่ 21 แสดงถึงโครงสร้างของสารบางส่วนที่เป็นไปได้ในการแปลผลจาก ^{1}H NMR



รูปที่ 22 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย ^{1}H-NMR spectroscopy ของสารบริสุทธิ์ (400 MHz, $CDCl_3$)

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูล ^{1}H-NMR ของสาร **Unknown 1** (400 MHz, $CDCl_3$)

δ_H (J in Hz)	Integration of proton	Group
8.03 br s	1	OH
4.20 m	1	CH
1.67 m	3	CH_2
1.19 – 1.42 m	8	CH + CH_2
0.80 – 0.90 t + m	5	CH_3 + CH_2 or 2CH
Total	18	-

จากข้อมูลในตาราง เราสามารถแบ่งชนิดของ proton ได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่

1. OH อย่างน้อย 1 หมู่
2. CH_3 (triplet) 1 หมู่
3. CH (chemical shift = 4.20) 1 หมู่
4. CH_2 + CH ประมาณ 10 หมู่

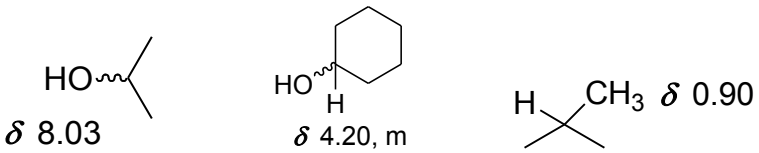
นอกจากนี้อาจพบ exchangeable proton ที่อาจไม่เกิดสัญญาณเพิ่มขึ้นได้อีก ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูล ^{1}H NMR spectrum พบว่า สัญญาณ proton ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง low field ทำให้ระบุได้ว่าไม่มี proton ที่เป็นพันธะคู่อยู่ในโครงสร้างนี้ และ ลักษณะของ ^{1}H NMR spectroscopy สามารถทำนายได้ว่าเป็นสารกลุ่ม Terpenes

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

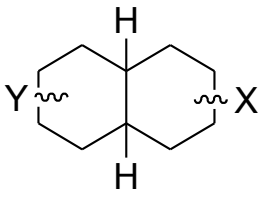
การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากการแยกสกัดสารจากใบต้นสุพรรณิการ์ (*C. regium*) โดยการหมักด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล หลังจากนั้นมีการสกัดแยกต่อด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดคือ *n*-hexane, ethyl acetate และ methanol หลังจากนั้นนำสารที่ได้มาทดสอบเบื้องต้นด้วย TLC และมีการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟี และมีการพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy

โดยการแยกสารบริสุทธิ์นั้นโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Silica gel และ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ ethyl acetate :n-hexane ในอัตราส่วน 2:3 ซึ่งสารบริสุทธิ์ที่แยกออกมาได้นั้นมีน้ำหนัก 9.4 mg โดยมีลักษณะเป็นของแข็งที่มีสีขาว ซึ่งมีคุณสมบัติคือ มีขั้วที่ต่ำ สามารถเรืองแสง UV ที่ 366 nm

สารบริสุทธิ์ที่พบนั้นเป็นสารที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อนเมื่อเทียบกับการศึกษาวรรณกรรมที่ผ่านมา โดยคาดว่าน่าจะเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีน ที่อาจจะเป็นหนึ่งในน้ำมันหอมระเหยที่พบในใบสุพรรณิการ์ แต่ด้วยข้อจำกัดด้านงบประมาณและเวลา ทำให้ยังไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างของสารชนิดนี้ได้ กระบวนการพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสร้างทางเคมีอยู่ในกระบวน การส่งตัวอย่างวิเคราะห์เพิ่มเติม ซึ่งจากข้อมูลที่สรุปได้ พบโครงสร้างของสารบางส่วนเท่านั้น



โดยเมื่อมีการจำลองการเขียนโครงสร้างของสารจากข้อมูลของสเปกตรัมจากการพิสูจน์โครงสร้างด้วย ^{1}H NMR และคุณสมบัติของสารบริสุทธิ์ที่แยกออกมาได้ สามารถจำลองโครงสร้างออกมาได้ดังนี้



X: CH_3 = 1
Y: OH = 1++

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

1.1 ได้ข้อมูลพื้นฐานของสารบริสุทธิ์จากสุพรรณิการ์ เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ต่อไป

1.2 นำไปพิสูจน์ของสารเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิค 13C-NMR/2D-NMR เพื่อให้ทราบโครงสร้างที่แน่นอนของสารบริสุทธิ์ที่แยกออกมาได้

2. ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

2.1 นำสารบริสุทธิ์ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ

2.2 นำส่วนอื่น ๆ ของต้นสุพรรณิการ์ไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีต่อ เช่น ลำต้น กิ่ง ราก ใบ

บรรณานุกรม

1. กระทรวงสาธารณสุขและองค์กรภาครัฐ-เอกชน. แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ.2560-2564. นนทบุรี: กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข; 2559.

2. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. เส้นทางพัฒนาสมุนไพรไทยสู่ความยั่งยืน. Med & herb 2558;2(5):6.

3. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. คำเงาะ [อินเตอร์เน็ต]. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 11 มีนาคม 2565]; ที่มา: http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=4

4. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. สุพรรณิการ์ [อินเตอร์เน็ต]. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 11 มีนาคม 2565]; ที่มา: http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=34

5. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ขมิ้นชัน [อินเตอร์เน็ต]. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 11 มีนาคม 2565]; ที่มา: http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=41

6. Smith J. ANNATTO EXTRACTS. CTA. 2006;4.

7. Kewscience. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg [online]. n.d. [cited 2020 Jul 10]; Available from: https://wcsp.science.kew.org/namedetail.do?name_id=44548

8. Nunes G, Silva M, Resende Ud, Siqueira J. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande. Revista Brasileira de Farmacognosia 2003;13(2):83-92.

9. Correa de Oliveira C, de Siqueira J, BORGES DE SOUZA K, Rezende U. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. Fitoterapia (Milano) 1996;67(2):176-7.

10. Souza CDd, Felfili JM. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás. GO. Brasil: 2006.

11. Moreira DL, Guarim-Neto G. Los usos múltiples de las plantas de Sabana: un estudio de la comunidad" Sitio Pindura", Rosário Oeste, Mato Grosso, Brasil. Polibotánica 2009;(27):159-90.

12. Solon S, Carollo CA, Brandão LFG, Macedo CdSd, Klein A, Dias-Junior CA, et al. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. Química Nova 2012;35(6):1169-72.

13. Paula Bicudo B, Rodrigues AB, Mendonça MM, Borges RR, Almeida AA, Oliveira KMP, editors. Evaluation of antibacterial and antifungal activity of ethanolic extract of *Cochlospermum regium* (Cochlospermaceae) leaf, a medicinal plant from the Cerrado of Brazil. BMC Proc 2014;8(Suppl 4):72.

14. Fangkrathok N, Deeharing S, Petshri W, Yahauyai J, Nontakham J, Siripong P, et al. Antioxidant and Antityrosinase Activities of *Cochlospermum regium* Twig, Petal and Leaf Extracts. TJPS 2017;41(5):13.

15. ก่องกานดา ชยามฤต. ลักษณะประจำวงศ์พรรณไม้. กรุงเทพฯ: กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพรรณพืช; 2548.

16. คณะกรรมการฝ่ายหาทุนมูลนิธิสวนหลวงร.9. พรรณไม้ในสวนหลวง ร.9. กรุงเทพฯ: ด่านสุทธาการพิมพ์; 2531.

17. สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยรามคำแหง. ดอกไม้ประจำมหาวิทยาลัยรามคำแหง [อินเตอร์เน็ต]. 2558 [เข้าถึงเมื่อ 11 มีนาคม 2565]; ที่มา: https://www.lib.ru.ac.th/about/supannikar.php

18. Leonardi M, Giovanelli S, Cioni PL, Flamini G, L. P. Evaluation of volatile constituents of *Cochlospermum angolense*. Nat Prod Commun 2012;7(5):629-32.

19. Almeida S, C. X., Lemos T, L. G., Silveira ER, Pessoa ODL. Volatile and non-volatile chemical constituents of *Cochlospermum vitifolium* (Willdenow) Sprengel. Quı́m Nova 2005;28:57-60.

20. Miranda TF, Bonamigo TR, Silva JD, Vasconcelos P, Félix JM, Caedoso CAL, et al. Chemical constituents of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. root and its antioxidant, antidiabetic, antiglycation and anticholinesterase effects in Wistar rats. Biomedicine & Pharmacotherapy 2019;111:1383-92.

21. Carvalho RS, Carollo CA, de Magallhaes JC, Palumbo JMC, Boaretto AG, Nunes e Sa IC, et al. Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart.Et. Schr.) Pilger roots:

Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. South African Journal of Botany 2018;114:181-7.

22. Inácio MC, Paz TA, Bertoni BW, Vieira MAR, Marques MOM, Pereira AMS, et al. Histochemical investigation of *Cochlospermum regium* leaves and chemical composition of its essential oil. Natural product research 2014;28(10):727-31.

23. ธวัชชัย ศรีวิบูลย์. เทคนิคการแยก. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง; 2554.

24. รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. สเปคโตรสโคปีในเคมีอินทรีย์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง; 2548.

25. ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ. UV/VIS Spectroscopy [อินเตอร์เน็ต]. *n.d*. [11 มีนาคม 2563]; ที่มา: https://www.nanotec.or.th/th/งานบริการ/ห้องปฏิบัติการวิเคราะห/uvvis-spectroscopy

26. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. เครื่อง FTIR-Raman Spectrometer [อินเตอร์เน็ต]. *n.d*. [11 มีนาคม2563]; ที่มา: http://stdb.most.go.th/equipment_detail.aspx?id=13624.

27. Aguilar Guadarrama. Flavonoids, Sterols and Lignans from *Cochlospermum vitifolium* and their relationship with its liver activity. Molecules 2018;23(8):1952.

28. Rakel D. Benign prostatic hyperplasia. Integrative Medicine 2018;601–607.e1.

29. Arya R., Saldanha S. N. Dietary phytochemicals, epigenetics, and colon cancer chemoprevention. Epigenetics of Cancer Prevention 2019;205–229.

30. Ronald J. Jandacek. Linoleic Acid: A Nutritional Quandary. Healthcare (Basel) 2017;5(2):25.

31. Marangoni F., Agostoni C., Borghi C., Catapano AL., Cena H., Ghiselli A. Dietary linoleic acid and human health: Focus on cardiovascular and cardiometabolic effects, Atherosclerosis 2019;292:90-98.

32. Prabhakara Rao P., Narsing Rao G., Jyothirmayi T., Satyanarayana A., Karuna M. S. L., Prasad R. B. N. Characterisation of seed lipids from *Bixa orellana* and Trachyspermum copticum. J Am Oil Chem Soc 2015; 92(10)

ภาคผนวก ก

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 25564 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากใบต้นสุพรรณิการ์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ดร.สุนันต์ ใจสมุทร

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 18 พฤศจิกายน 2564 ถึง 12 เมษายน 2565

ระยะเวลาดำเนินการ 5 เดือน ตั้งแต่วันที่ 18 พฤศจิกายน 2564 ถึง 12 เมษายน 2565

<u>รายรับ</u>

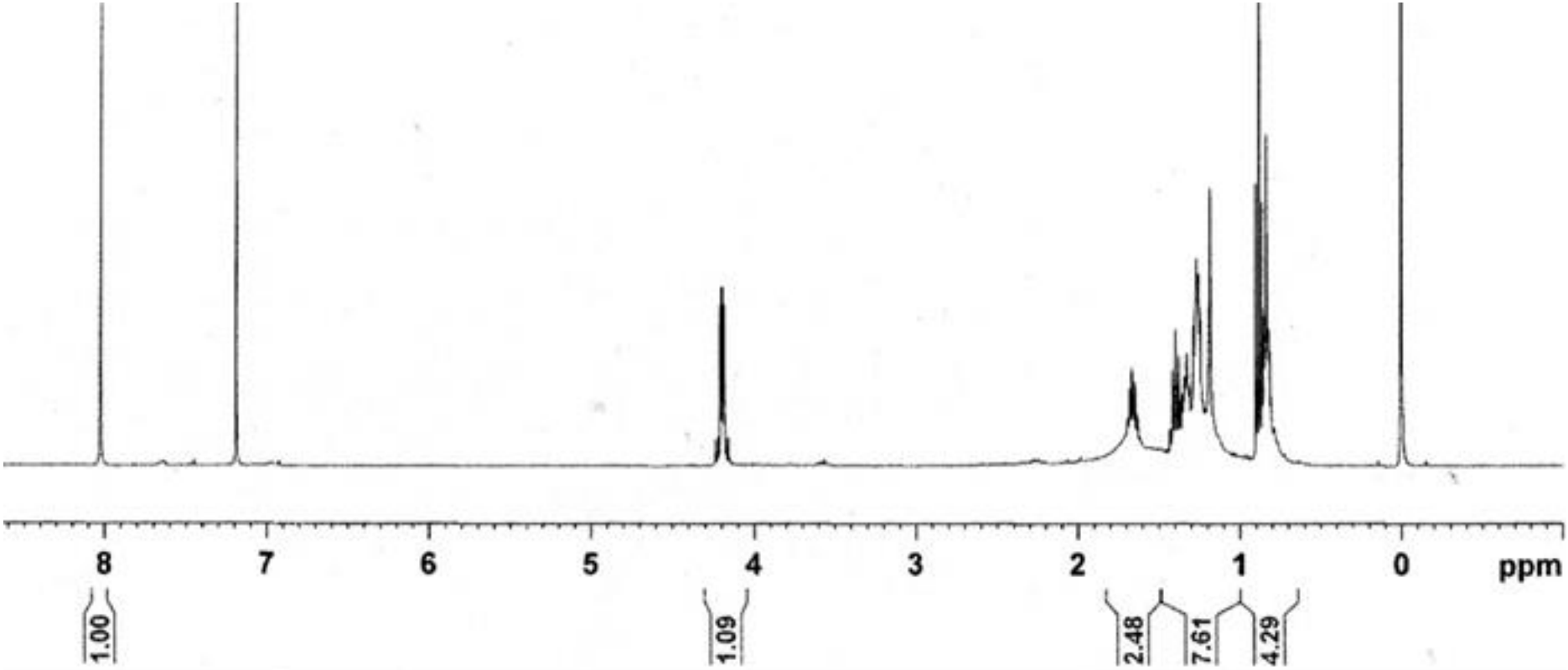
จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 5000 บาท เมื่อวันที่ 15 มกราคม 2565

<u>รายจ่าย</u>

รายงาน	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตัวทำละลาย	3,000	9,630	-3,630
2. ค่าพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี	2,000	2,625	-375
3. ค่าโปสเตอร์	-	250	-250
4. ค่าอุปกรณ์วิทยาศาสตร์	-	-	-
รวม	5,000	12,255	4,255

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัย



รูปแสดงสเปกตรัมของผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย ^{1}H-NMR spectroscopy ของสารบริสุทธิ์ (400 MHz, $CDCl_3$)