

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 สิ่งสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่

สิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดเปลือกต้นเปล้าใหญ่ได้แก่ สิ่งสกัดในเฮกเซน สิ่งสกัดในเอธิลเอซีเตต และสิ่งสกัดเมธานอล แสดงรายละเอียดไว้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สิ่งสกัดเปลือกต้นเปล้าใหญ่ในตัวทำละลายต่างๆ

ตัวทำละลาย	ลักษณะ	น้ำหนัก(กรัม)	% wt / wt
เฮกเซน	สารขุ่นเหนียว สีน้ำตาล	30.5	0.50
เอธิลเอซีเตต	สารขุ่นเหนียว สีน้ำตาลแดง	102.3	1.70
เมธานอล	สารขุ่นเหนียว สีน้ำตาลดำ	151.1	2.51

4.2 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี

4.2.1 การทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี

สาร 1 ถูกชะด้วย 5% เอธิลเอซีเตตในเฮกเซน เมื่อทำให้ตัวทำละลายระเหยแห้งจึงได้ผลึกรูปเข็มสีขาว หลังจากทำการล้างผลึกด้วยเฮกเซนเย็นจะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 0.1 กรัม (0.0017 % wt by wt) จุดหลอมเหลว 146-148°C ค่า R_f เป็น 0.45 (20% เอธิลเอซีเตตในเฮกเซน) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม, เอธิลเอซีเตต, เมธานอล และละลายได้บ้างในเฮกเซนร้อน

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) (รูปที่ 10, ตารางที่ 4) พบการดูดกลืนแสงที่ความถี่(cm^{-1}) ดังนี้ 3422(br), 2946(s), 2865(s), 1642(w), 1462(m), 1382(m), 1062(m), 968(w), 838(w), 799(w)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 11) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 0.56-2.31(m), 3.50(2H,m), 5.10(2H,m), 5.35(2H,d)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 12, ตารางที่ 5) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 11.8-56.8, 71.8, 121.7, 129.2, 138.3, 140.7

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 13) พบไอออนเชิงโมเลกุล(M^+) ที่ 414(71) นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของ การแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญ m/z (% relative intensity) ดังนี้ 412(56), 400 (31), 396(24), 394(8), 383(14), 381(13), 351(11), 329(23), 303(29), 300(27), 273(25), 271 (37), 255(63), 231(23), 213(47)

แก๊สโครมาโตแกรม (รูปที่ 14, ตารางที่ 6) (คอลัมน์ DB1, อุณหภูมิคอลัมน์ 290°C, เครื่องตรวจวัดมวลสาร, อัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม 50 cm^3/sec): ปรากฏว่ามีค่า retention time ที่ 20.12, 20.99, 23.96 นาที ตามลำดับ ส่วนผลของมาตรฐาน สเตอรอยด์ที่ใช้เทียบคือ Campesterol, Stigmasterol และ β -sitosterol ปรากฏว่ามีค่า retention time ที่ 19.77, 20.91 และ 24.15 นาที ตามลำดับ

4.2.2 การทำสาร 2 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี

สาร 2 ถูกชะด้วย 30% เอธิลเอซีเตตในเฮกเซน เมื่อทำให้ตัวทำละลายระเหยแห้งจึงได้ สารชั้นเหนียวโปร่งแสงสีเหลืองอ่อนหนัก 1.2 กรัม (0.02% wt by wt) ค่า R_f เป็น 0.30 (5% เอธิลเอซีเตตในเฮกเซน) ละลายได้ในเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอธิลเอซีเตต และ เมทานอล $[\alpha]_D^{20} -106.9^\circ$ ($\text{CHCl}_3, c=1.0$), UV (CHCl_3) λ_{max} 242sh (log ϵ 3.46)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) (รูปที่ 15, ตารางที่ 7) พบการดูดกลืนแสงที่ความถี่(cm^{-1}) ดังนี้ 3600-3400(br), 2973(s), 2941(s), 2890(s), 1680(s), 1629(m), 1438(m), 1367(m), 863(m)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 16, ตารางที่ 8) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 0.76(3H,s), 0.85(3H,d), 1.25(3H,s), 1.41-1.75(8H,m), 2.12-2.48(6H,m), 6.26(1H,s), 6.83(1H,s), 7.18(1H,s), 7.33(1H,s)

คาร์บอน-13 เค็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 17, ตารางที่ 9) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 15.9(q), 17.4(t), 18.1(t), 18.2(q), 20.5(q), 27.2(t), 27.4(t), 35.7 (t), 36.2(d), 37.5(s), 38.6(t), 38.7(s), 46.6(d), 110.9(d), 125.5(s), 138.3(d), 140.1(d), 141.5 (s), 142.7(d), 172.5(s)

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 19) พบไอออนเชิงโมเลกุล(M^+) ที่ 316(5) นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของ การแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญ m/z (% relative intensity) ดังนี้ 283(5), 221 (18), 203(17), 137(32), 125(100), 105(21), 96(55), 95(48), 81(38)

4.2.3 การทำสาร 3 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี

สาร 3 ถูกชะด้วย 30% เอธิลเอซีเตตในเฮกเซน เมื่อทำให้ตัวทำละลายระเหยแห้งแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีซึ่งชะด้วย 20%เอธิลเอซีเตตในเฮกเซน จึงได้สาร เหนียวโปร่งแสงสีเหลืองอ่อนหนัก 0.4 กรัม (0.007% wt by wt) ค่า R_f เป็น 0.38 (20% เอธิลเอซี

เตตในเฮกเซน) ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม, เอธิลเอซิเตต และเมทานอล $[\alpha]_D^{20} -75.4^\circ$ (CHCl_3 , $c=1.0$), UV (CHCl_3) λ_{max} 242sh (log ϵ 4.07)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) (รูปที่ 20, ตารางที่ 10) พบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3500-3100(br), 2933(s), 1715(s), 1683(s), 1634(s), 1454(m), 1245(m)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 21, ตารางที่ 11) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 1.05(3H,d), 1.25(1H,m), 1.32(3H,s), 1.54(1H,m), 1.56(1H,d), 1.67(1H,m), 1.75(1H,m), 1.79(1H,m), 1.95(1H,m), 1.96(1H,m), 2.10(1H,m), 2.21(1H,m), 2.25(1H,m), 2.35(1H,m), 2.40(1H,m), 2.54(1H,ddd), 4.33(1H,d), 4.51(1H,d), 6.26(1H,d), 6.89(1H,d), 7.23(1H,s), 7.34(1H,d), 7.46(2H,dd), 7.54(1H,dd), 8.00(2H,d)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 22, ตารางที่ 12) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 17.0(q), 17.8(t), 19.1(t), 20.1(q), 27.2(t), 28.1(t), 32.4(t), 36.0(t), 36.3(d), 37.3(s), 42.2(s), 47.4(d), 67.7(t), 110.9(d), 125.1(s), 128.4(d), 128.4(d), 129.4(d), 129.4(d), 130.3(s), 132.9(d), 138.4(d), 140.5(d), 140.9(s), 142.8(d), 166.8(s), 172.2(s)

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 24) พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 436(3) นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของ การแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญ m/z (% relative intensity) ดังนี้ 341(8), 314 (13), 219(13), 125(18), 105(100)

4.2.4 การทำสาร 4 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 4 ถูกชะด้วย 40% เอธิลเอซิเตตในเฮกเซน เมื่อทำให้ตัวทำละลายระเหยแห้งแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีซึ่งถูกชะด้วย 30% เอธิลเอซิเตตในเฮกเซน จึงได้สารชั้นเหนียวโปร่งแสงสีเหลืองอ่อนหนัก 0.2 กรัม (0.003 % wt by wt) ค่า R_f เป็น 0.36 (30% เอธิลเอซิเตตในเฮกเซน) ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม, เอธิลเอซิเตต และเมทานอล $[\alpha]_D^{20} -24.3^\circ$ (CHCl_3 , $c=1.0$), UV (CHCl_3) λ_{max} 244sh (log ϵ 3.59)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) (รูปที่ 25, ตารางที่ 13) พบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3400(br), 2945(s), 2925(s), 1707(m), 1643(m), 1456(m), 1383(m), 1054(m), 990(w), 947(w), 886(w)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 26, ตารางที่ 14) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 0.80(1H,s), 0.85(1H,s), 0.89(2H,dd), 1.14(1H,s), 1.4-1.7 (3H,m), 1.77(1H,s), 1.87(3H,ddd), 2.21(3H,ddd), 2.42(3H,ddd), 3.54(1H,dd), 4.86(1H,d), 5.02(2H,d), 5.52(1H,t), 6.30(2H,dd)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) (รูปที่ 27, ตารางที่ 15) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 11.9(q), 15.5(q), 17.8(q), 18.4(t), 21.5(q), 23.4(t), 27.6(t), 33.2(s), 33.4(q), 39.2(s), 39.7(t), 41.6(t), 53.5(d), 60.1(d), 78.1(s), 80.2(d), 110.5(t), 132.8(s), 135.6(t), 141.4(d)

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 29) พบไอออนเชิงโมเลกุล(M^+) ที่ 306(4) นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของ การแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญ m/z (% relative intensity) ดังนี้ 288(49), 270(21), 207(20), 189(21), 150(99)

4.3 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง

4.3.1 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 1

สาร 1 ลักษณะผลึกสีขาว มีจุดหลอมเหลว $146-148^\circ C$ จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 10) พบแถบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ที่สำคัญ แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3500-3200	สูง	O-H สั่นแบบยืดของ R-OH
2946-2865	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2 , CH_3
1642	ต่ำ	C=C สั่นแบบยืดของแอลคีน
1462	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ CH_2 , CH_3
1382	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH_3
1062	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืดและ O-H สั่นแบบงอ (คู่ควบ) ของ R-OH
968	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอนอกระนาบของ $R_1CH=CHR_2$
799	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอนอกระนาบของ $R_1R_2C=CHR_3$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) (รูปที่ 11) พบสัญญาณที่ 0.56-2.31 ppm แสดงลักษณะของกลุ่มเมทิล, เมทิลีนและเมไธน์ ($-CH_3$, $-CH_2$, $-CH$) ของสเตอรอยด์ สัญญาณที่ 3.50 ppm แสดงสัญญาณใกล้เคียงกลุ่มไฮดรอกซี ($-CH-OH$) สัญญาณที่ 5.10 ppm แสดงวินิลิกที่มีหมู่แทนที่ 2 หมู่ ($-CH=CH-$) และ สัญญาณที่ 5.35 ppm แสดงวินิลิกที่มีหมู่แทนที่ 3 หมู่ ($-CH=C-$)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 12, ตารางที่ 5) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 11.8-56.8 ppm แสดง $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$ ของสเตอรอยด์ ส่วนโอเลฟินิกคาร์บอนพบสัญญาณที่ 121.7, 129.2, 138.3, 140.7 ppm ส่วนสัญญาณที่ 71.8 ppm แสดงสัญญาณใกล้เคียงกลุ่มไฮดรอกซี ค่า chemical shift ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 1 และของผสมสเตอรอยด์ 3 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า chemical shift (ppm) ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ β -sitosterol, Stigmasterol และ สาร 1

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (ppm)		
	β -sitosterol	Stigmasterol	สาร 1
1	37.1	37.4	37.2
2	31.8	31.7	31.6
3	71.9	71.8	71.8
4	42.4	42.4	42.2
5	140.9	140.0	140.7
6	121.8	121.7	121.7
7	32.0	31.9	31.8
8	32.0	31.9	33.0
9	50.3	50.3	50.1
10	36.6	36.6	36.5
11	21.1	21.1	21.0
12	39.9	39.8	39.7
13	42.4	42.4	42.2
14	56.8	57.0	56.8
15	24.3	24.4	24.3
16	28.2	28.9	28.2, 28.9
17	56.2	56.0	56.0
18	11.9	12.2	11.9, 12.2
19	19.4	19.4	19.3
20	36.2	40.5	36.1, 40.4
21	19.1	21.1	19.0, 21.2
22	34.0	138.4	33.9, 138.3
23	29.3	129.4	29.1, 129.2
24	50.3	51.3	51.2
25	26.2	31.9	26.0, 31.8
26	18.8	19.0	18.9, 19.0
27	19.8	21.1	19.8, 21.2
28	23.1	25.4	23.0, 25.3
29	11.9	12.0	11.9, 12.0

ค่า chemical shift ของ Campersterol ใกล้เคียงกับของ β -sitosterol

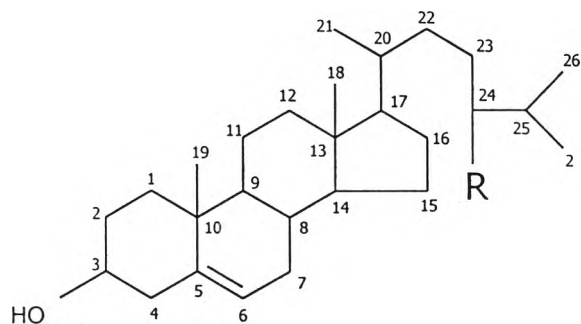
แมสสเปกตรัม (รูปที่ 13) พบไอออนเชิงโมเลกุล(M^+) ที่ 414, 412, 400 ซึ่งเป็นมวลโมเลกุลของ β -sitosterol, Stigmasterol และ Campesterol ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบส่วนของ การแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญ m/z (% relative intensity) ดังนี้ 396, 394, 383, 329, 303, 273, 255 และ 213

จากการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีของสาร 1 กับของผสมสเตอรอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ β -sitosterol, Stigmasterol และ Campesterol พบว่าอินฟราเรดสเปกตรัม, แมสสเปกตรัม, โปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมใกล้เคียงกัน และเมื่อนำสาร 1 มาวิเคราะห์ด้วย แก๊สโครมาโตแกรม เปรียบเทียบกับสเตอรอยด์มาตรฐาน 4 ชนิด ภายใต้สภาวะเดียวกัน (รูปที่ 14) พบว่า retention time ของสาร 1 เท่ากับ 20.12, 21.00 และ 23.96 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับ Campesterol, Stigmasterol และ β -sitosterol ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 Retention time ของสเตอรอยด์มาตรฐานและสาร 1

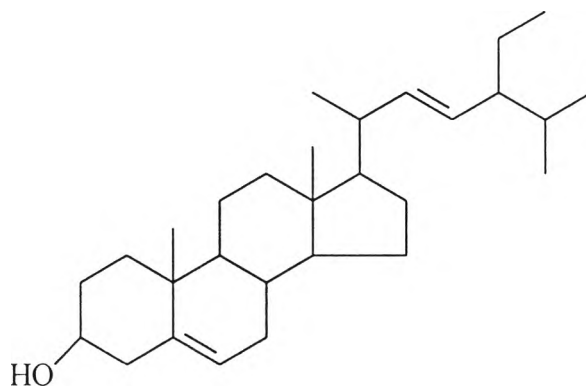
สเตอรอยด์มาตรฐาน	retention time (นาที)	
	สเตอรอยด์มาตรฐาน	สาร 1
Campesterol	19.77	20.12
Stigmasterol	20.91	21.00
β -sitosterol	24.15	23.96

จากข้อมูลทางสเปกโตรสโกปีเปรียบเทียบกับของผสมของสเตอรอยด์ 3 ชนิด และจาก แก๊สโครมาโตแกรม พอจะสรุปได้ว่าสาร 1 น่าจะเป็นของผสมสเตอรอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ Campesterol, Stigmasterol และ β -sitosterol ซึ่งมีโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 5



R=Et, β -sitosterol MW=414

R=Me, Campesterol MW=400



Stigmasterol MW=412

รูปที่ 5 สูตรโครงสร้างของสาร 1 (สเตอรอยด์ 3 ชนิด)

4.3.2 การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสาร 2

สาร 2 ลักษณะชั้นเหนียวโปร่งแสงสีเหลืองอ่อน จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 15) พบแถบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ที่สำคัญ แสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 2

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3600-3400	สูง	O-H สั่นแบบยืดของ R-OH
2973, 2941, 2868	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2 , CH_3
1680	สูง	C=O สั่นแบบยืดของ $\text{CH}_3\text{-COOR}$
1629	ปานกลาง	C=C สั่นแบบยืดของ แอลคีน

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 16, ตารางที่ 8) พบสัญญาณที่ 0.76, 0.85, 1.25 ppm แสดงลักษณะของกลุ่มเมทิล 3 กลุ่ม ($-\text{CH}_3$) และสัญญาณที่ 6.26, 7.18, 7.33 ppm แสดงโอเลฟินิกโปรตอนของกลุ่มฟิวแรนอยด์ ส่วนสัญญาณที่ 6.83 ppm แสดงวินิลลิกโปรตอน

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 17, ตารางที่ 9) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 142.7, 141.5, 140.1, 138.3, 125.5, 110.9 ppm แสดงโอเลฟินิกคาร์บอน ส่วนสัญญาณที่ 172.5 ppm แสดงสัญญาณคาร์บอนิลของกรดคาร์บอกซิลิก ส่วน sp^3 คาร์บอน พบสัญญาณที่ 46.6, 38.7, 38.6, 37.5, 36.2, 35.7, 27.4, 20.5, 18.2, 18.1, 17.4, 15.9 ppm

สูตรโมเลกุลของสาร 2 น่าจะเป็น $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ เนื่องจากมีค่ามวลโมเลกุล (m/z) 316 สูตรโมเลกุล $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$ ของสาร 2 มีค่า DBE= 7 ซึ่งประกอบด้วย ฟิวแรน 1 วง (DBE=3), พันธะคู่ 1 พันธะ, วง 2 วง และคาร์บอนิลของกรดคาร์บอกซิลิก 1 กลุ่ม จากสมบัติทางกายภาพและข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสาร 2 ตรงกับข้อมูลของ (-)-hardwickiic acid [37,38] ทุกประการ ดังนั้นสาร 2 คือ (-)-hardwickiic acid ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงไว้ในรูปที่ 6

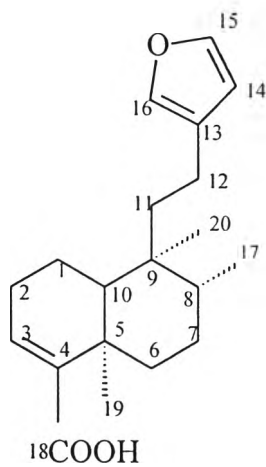
ค่า chemical shift ของโปรตอน และ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2 และ (-)-hardwickiic acid ได้แสดงในตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ค่า chemical shift (ppm) ของโปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-hardwickii acid และสาร 2

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (ppm)	
	(-)-hardwickii acid	สาร 2
1	1.40-1.73(m)	1.41-1.75(m)
2	2.16-2.50(m)	2.12-2.48(m)
3	6.85(s)	6.83(s)
4	-	-
5	-	-
6	2.16-2.50(m)	2.12-2.48(m)
7	1.40-1.73(m)	1.41-1.75(m)
8	1.40-1.73(m)	1.41-1.75(m)
9	-	-
10	1.40-1.73(m)	1.41-1.75(m)
11	1.40-1.73(m)	1.41-1.75(m)
12	2.16-2.50(m)	2.12-2.48(m)
13	-	-
14	6.26(s)	6.26(s)
15	7.33(s)	7.33(s)
16	7.19(s)	7.18(s)
17	0.84(d)	0.85(d)
18	-	-
19	1.26(s)	1.25(s)
20	0.76(s)	0.76(s)

ตารางที่ 9 ค่า chemical shift (ppm) ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-hardwickiiic acid และสาร 2

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (ppm)	
	(-)-hardwickiiic acid	สาร 2
1	35.8(t)	35.7(t)
2	18.2(t)	18.1(t)
3	140.3(d)	140.1(d)
4	141.5(s)	141.5(s)
5	37.6(s)	37.5(s)
6	38.7(t)	38.6(t)
7	27.3(t)	27.4(t)
8	36.3(d)	36.2(d)
9	38.8(s)	38.7(s)
10	46.7(d)	46.6(d)
11	17.5(t)	17.4(t)
12	27.5(t)	27.4(t)
13	125.6(s)	125.5(s)
14	110.0(d)	110.9(d)
15	142.7(d)	142.7(d)
16	138.4(d)	138.3(d)
17	15.9(q)	15.9(q)
18	172.6(s)	172.5(s)
19	20.5(q)	20.5(q)
20	18.3(q)	18.2(q)



รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างของสาร 2

4.3.3 การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสาร 3

สาร 3 ลักษณะสารเหนียวโปร่งแสงสีเหลืองอ่อน จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 20) พบแถบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ที่สำคัญ แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3500-3100	สูง	O-H สั่นแบบยืดของ R-OH
2933	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2 , CH_3
1715, 1683	สูง	C=O สั่นแบบยืดของ $\text{CH}_3\text{-COOR}$
1634	ปานกลาง	C=C สั่นแบบยืด
1245	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืด

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 21, ตารางที่ 11) และคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 22, ตารางที่ 12) ของสาร 3 คล้ายสาร 2 ยกเว้นคาร์บอนตำแหน่งที่ 20 ของสาร 3 มีค่า chemical shift ที่ 67.7 ppm ในขณะที่สาร 2 อยู่ที่ 18.2 ppm ส่วนโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมพบ 2 doublet ที่ 4.33, 4.51 ppm ที่ตำแหน่ง 2H-20

สูตรโมเลกุลของสาร 3 น่าจะเป็น $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_5$ เนื่องจากมีค่ามวลโมเลกุล (m/z) 436 สูตรโครงสร้าง $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_5$ ของสาร 3 มีค่า DBE= 12 ซึ่งประกอบด้วย พิวเรน 1 วง (DBE=3), พันธะคู่ 1 พันธะ, วง 2 วง, คาร์บอนิลของกรดคาร์บอกซิลิก 1 กลุ่มและเบนโซอิล 1 กลุ่ม (DBE=5)

ความแตกต่างของสเปกตรัมระหว่างสาร 3 และสาร 2 คือ สาร 3 มีกลุ่มเบนโซอิลเอสเทอร์ที่คาร์บอนตำแหน่ง 20 จากข้อมูลต่างๆ จึงสรุปได้ว่า สาร 3 น่าจะเป็น (-)-20-benzyloxyhardwickii acid [5] ค่า chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 3 ดังแสดงในตารางที่ 11 และ 12 ตามลำดับ

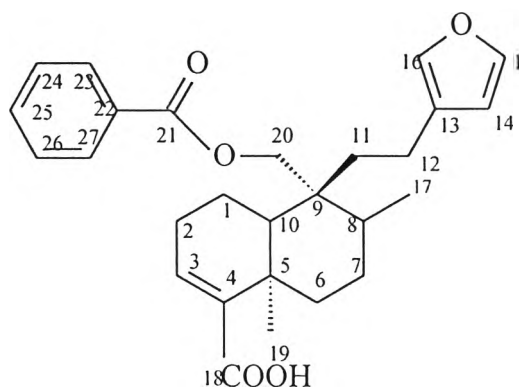
ส่วนโครงสร้างของสาร 3 ดังแสดงในรูปที่ 7

ตารางที่ 11 ค่า chemical shift (ppm) ของโปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-20-benzyloxyhardwickii acid และสาร 3

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (ppm)	
	(-)-20-benzyloxyhardwickii acid	สาร 3
1	1.72(m), 1.95(m)	1.75(m), 1.96(m)
2	2.20(m), 2.35(m)	2.21(m), 2.35(m)
3	6.92(dd)(J=2.45,4.58)	6.89(dd)(J=2.46,4.59)
4	-	-
5	-	-
6	1.24(m), 2.53(ddd)(J=3.05,3.05,12.82)	1.25(m), 2.54(ddd)(J=3.06,3.06,12.81)
7	1.53(m), 1.65(m)	1.54(m), 1.67(m)
8	1.78(m)	1.79(m)
9	-	-
10	1.58(d)(J=12.51)	1.56(d)(J=12.54)
11	1.93(m), 2.08(m)	1.95(m), 2.10(m)
12	2.25(m), 2.40(m)	2.25(m), 2.40(m)
13	-	-
14	6.28(d)(J=1.53)	6.26(d)(J=1.55)
15	7.35(d)(J=1.53)	7.34(d)(J=1.55)
16	7.24(s)	7.23(s)
17	1.02(d)(J=6.71)	1.05(d)(J=6.73)
18	-	-
19	1.32(s)	1.32(s)
20	4.30(d)(J=11.9), 4.50(d)(J=11.9)	4.33(d)(J=11.7), 4.51(d)(J=11.7)
21	-	-
22	-	-
23	8.01(d)(J=1.22)	8.00(d)(J=1.22)
24	7.45(dd)(J=7.63,7.63)	7.46(dd)(J=7.64,7.64)
25	7.55(dd)(J=7.63,7.63)	7.54(dd)(J=7.64,7.64)
26	7.45(dd)(J=7.63,7.63)	7.46(dd)(J=7.64,7.64)
27	8.01(d)(J=1.22)	8.00(d)(J=1.22)

ตารางที่ 12 ค่า chemical shift (ppm) ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-20-benzyloxyhardwickiic acid และสาร 3

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (ppm)	
	(-)-20-benzyloxyhardwickiic acid	สาร 3
1	19.2(t)	19.1(t)
2	28.1(t)	28.1(t)
3	140.5(d)	140.5(d)
4	140.9(s)	140.9(s)
5	37.7(s)	37.3(s)
6	36.0(t)	36.0(t)
7	27.2(t)	27.2(t)
8	36.3(d)	36.3(d)
9	42.3(s)	42.2(s)
10	47.4(d)	47.4(d)
11	32.4(t)	32.4(t)
12	17.9(t)	17.8(t)
13	125.1(s)	125.1(s)
14	110.9(d)	110.9(d)
15	142.9(d)	142.8(d)
16	138.5(d)	138.4(d)
17	16.9(q)	17.0(q)
18	172.0(s)	172.2(s)
19	20.2(q)	20.1(q)
20	67.7(t)	67.7(t)
21	166.8(s)	166.8(s)
22	130.4(s)	130.3(s)
23	129.5(d)	129.4(d)
24	128.5(d)	128.4(d)
25	132.9(d)	132.9(d)
26	128.5(d)	128.4(d)
27	129.5(d)	129.4(d)



รูปที่ 7 สูตรโครงสร้างของสาร 3

4.3.4 การวิเคราะห์หาโครงสร้างของสาร 4

สาร 4 ลักษณะเหนียวโปร่งแสงสีเหลืองอ่อน จากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 25) พบแถบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ที่สำคัญ แสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 4

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3400	สูง	O-H สั่นแบบยืดของ R-OH
2945, 2925	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2 , CH_3
1054	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืดของ R-OH

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 26, ตารางที่ 14) พบสัญญาณที่ 0.80, 0.85, 0.89, 1.14 ppm แสดงลักษณะของกลุ่มเมทิล ($-\text{CH}_3$) และสัญญาณที่ 4.86, 5.02, 5.52, 6.30 ppm แสดง 4 โอลิฟินิกโปรตอน ส่วนสัญญาณที่ 3.54 ppm แสดงเมโรไนโปรตอนของกลุ่มไฮดรอกซิล

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 27, ตารางที่ 15) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 80.2, 78.1 ppm แสดงตำแหน่งคาร์บอนที่จับกับกลุ่มไฮดรอกซิลของแอลกอฮอล์ สัญญาณที่ 135.6, 132.8, 141.4, 110.5 ppm แสดงโอลิฟินิกคาร์บอน ส่วนสัญญาณที่ 80.2, 60.1 และ 53.5 ppm แสดงสัญญาณเมโรไนคาร์บอนที่อิ่มตัว ส่วนคาร์บอนแบบ quaternary พบสัญญาณที่ 132.8, 78.1, 39.2, 33.2 ppm

DEPT-90 (รูปที่ 28) แสดงสัญญาณของเมโรไนคาร์บอนที่อิ่มตัวที่ 80.2, 60.1, 53.5 ppm และสัญญาณที่ 141.4 และ 135.6 ppm แสดง sp^2 คาร์บอน

DEPT-135 (รูปที่ 28) สัญญาณที่ 41.6, 39.7, 27.6, 33.4, 18.4 ppm แสดงเมทิลีนคาร์บอน สัญญาณที่ 33.4, 21.5, 17.8, 15.5 และ 11.9 แสดงเมทิลคาร์บอน ส่วนสัญญาณที่ 132.8, 78.1, 39.2 และ 33.4 แสดงคาร์บอนแบบ quaternary

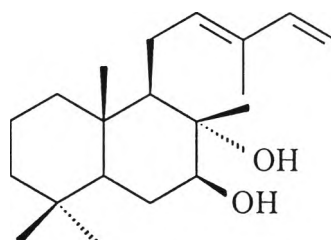
สูตรโครงสร้างของสาร 4 น่าจะเป็น $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ เนื่องจากมีค่ามวลโมเลกุล (m/z) 306 สูตรโครงสร้าง $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ของสาร 4 มีค่า DBE = 4 ซึ่งประกอบด้วย พันธะคู่ 2 พันธะ, วง 2 วง จากข้อมูลทางกายภาพและข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี จึงสรุปได้ว่าสาร 4 น่าจะเป็นสารประกอบพวก labdane diterpene และเมื่อดูจากอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 25) และแมสสเปกตรัม (รูปที่ 29) พบว่าสาร 4 มีกลุ่มไฮดรอกซิล 2 กลุ่ม ซึ่งน่าจะเป็น Nidorellol [39,40] ค่า chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 ได้แสดงในตารางที่ 14 และ 15 ตามลำดับ

ตารางที่ 14 ค่า chemical shift (ppm) ของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-Nidorellol และสาร 4

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (ppm)	
	(-)-Nidorellol	สาร 4
1	1.3-1.6(m)	1.4-1.7(m)
2	1.3-1.6(m)	1.4-1.7(m)
3	1.3-1.6(m)	1.4-1.7(m)
4	-	-
5	-	-
6	1.86(ddd)(J=2.2,12.1,13.5), 3.52(dd)(J=4.5,13)	1.87(ddd)(J=2.1,12.2,13.6), 3.54(dd)(J=4.5,13)
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	2.40(ddd)(J=7.6,12.1,16.3), 2.22(ddd)(J=7.6,12.1,16.3)	2.42(ddd)(J=7.4,12.3,16.2), 2.21(ddd)(J=7.4,12.3,16.2)
12	5.55(t)(J=12)	5.52(t)(J=12)
13	-	-
14	6.34(dd)(J=14,17)	6.30(dd)(J=14,16)
15	5.06(d)(J=14), 4.89(d)(J=15)	5.02(d)(J=14), 4.86(d)(J=15)
16	1.77(d)(J=14)	1.77(d)(J=14)
17	1.14(s)	1.14(s)
18	0.80(s)	0.80(s)
19	0.84(s), 0.88(s)	0.85(s), 0.89(s)
20	-	-

ตารางที่ 15 ค่า chemical shift (ppm) ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ (-)-Nidorellol และสาร 4

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (ppm)	
	Nidorellol	สาร 4
1	39.9(t)	39.4(t)
2	18.5(t)	18.4(t)
3	41.7(t)	41.6(t)
4	33.2(s)	33.2(s)
5	53.6(d)	53.5(d)
6	27.8(t)	27.6(t)
7	80.2(d)	80.2(d)
8	78.2(s)	78.1(s)
9	60.3(d)	60.1(d)
10	39.3(s)	39.2(s)
11	22.6(t)	22.4(t)
12	135.7(t)	135.6(t)
13	132.8(s)	132.8(s)
14	141.3(d)	141.4(d)
15	110.4(t)	110.5(t)
16	11.8(q)	11.9(q)
17	17.9(q)	17.8(q)
18	33.5(q)	33.4(q)
19	21.5(q)	21.5(q)
20	15.9(q)	15.9(q)



รูปที่ 8 สูตรโครงสร้างของสาร 4

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซีเดสของสารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่

ทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแซนทีนออกซีเดสของ สารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่ 4 ชนิด ผลดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งแซนทีนออกซีเดสของสารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่ ทดสอบการยับยั้งแซนทีนออกซีเดส 2 ครั้ง (I และ II)

สาร	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร		
	I	II	เฉลี่ย
1	51.49	52.38	51.94
2	37.92	39.00	38.46
3	48.31	47.75	48.03
4	39.74	40.21	39.98

Positive control: Allopurinol (100 $\mu\text{g/ml}$) %Inhibition = 76.27%

จากตารางที่ 16 พบว่า เมื่อทำการทดสอบสารที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สาร 1 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแซนทีนออกซีเดสสูงที่สุด คือ 51.94% สารที่มีฤทธิ์รองลงมาคือสาร 3 ที่ 48.03% สาร 4 ที่ 39.98% และสาร 2 ที่ 38.46% ตามลำดับ

4.5 ผลการหา IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่และAllopurinol

นำสารทั้ง 4 ชนิดและ Allopurinol มาแปรความเข้มข้น เพื่อหาค่า IC_{50} (Inhibition concentration 50%) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแซนทีนออกซีเดสที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่ ดังแสดงใน ตารางที่ 17 พร้อมกันนี้ได้ทำการหาค่า IC_{50} ของ Allopurinol ซึ่งเป็น positive control ที่ความเข้มข้นต่างๆดังแสดงในตารางที่ 18

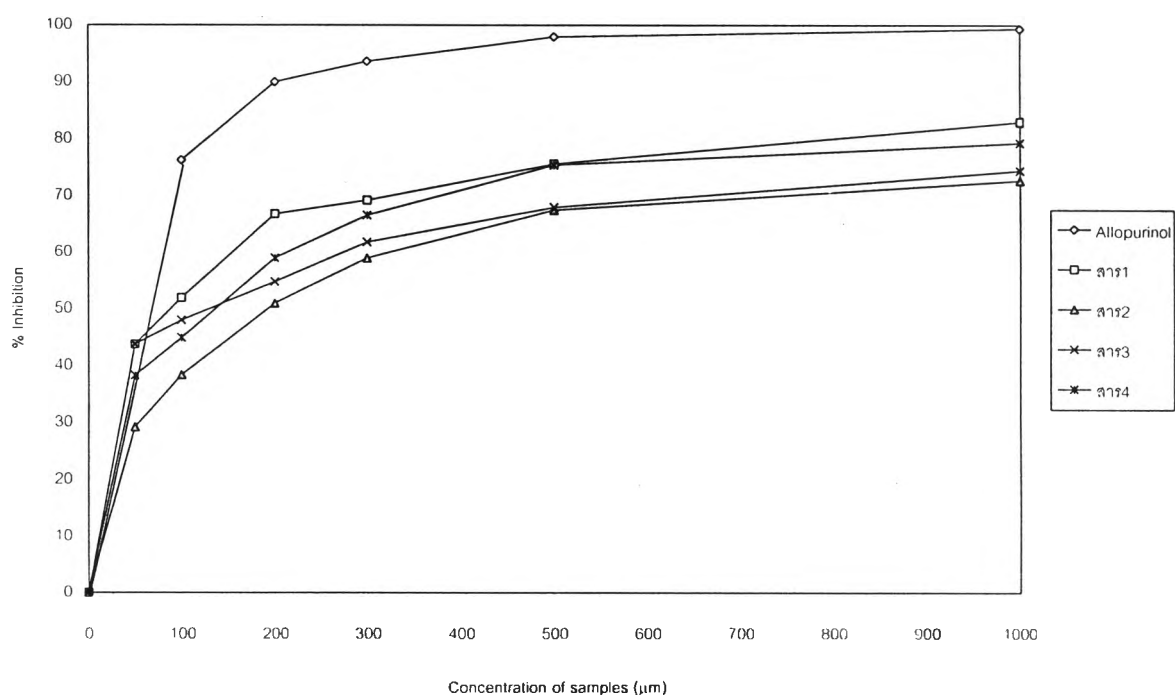
ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งแซนทินออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่

สาร	ความเข้มข้น($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
		I	II	เฉลี่ย
1	50	44.24	43.30	43.77
	100	51.49	52.38	51.94
	200	66.25	67.38	66.82
	300	69.47	68.96	69.22
	500	75.28	76.04	75.66
	1000	82.46	83.43	82.95
2	50	29.40	29.03	29.22
	100	37.92	39.00	38.46
	200	50.87	51.21	51.04
	300	59.23	58.78	59.01
	500	67.84	67.13	67.49
	1000	73.01	72.46	72.74
3	50	43.30	44.21	43.76
	100	48.31	47.75	48.03
	200	53.92	55.72	54.82
	300	61.52	62.10	61.81
	500	68.14	67.89	68.02
	1000	74.81	74.12	74.47
4	50	36.72	39.85	38.29
	100	44.67	45.23	44.95
	200	59.38	58.62	59.00
	300	67.05	66.19	66.62
	500	74.58	76.24	75.41
	1000	79.71	78.91	79.31

ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งแซนทีนออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่างๆของ Allopurinol

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง		
	I	II	เฉลี่ย
100	76.80	75.74	76.27
200	89.56	90.35	89.96
300	93.48	93.64	93.56
500	98.12	97.83	97.98
1000	99.59	99.08	99.34

นำค่าที่ได้จากตารางที่ 17 และ 18 มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งและความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 กราฟแสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่และAllopurinol

จากกราฟรูปที่ 9 อ่านค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งแซนทีนออกซีเดส 50% จะ
ได้ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่ และ Allopurinol ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ค่า IC_{50} ของสารสกัดจากเปลือกต้นเป้ง้าใหญ่ และ Allopurinol

สาร	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Allopurinol	70
1	90
2	190
3	140
4	155

จากตารางที่ 19 Allopurinol มีค่า IC_{50} 70 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งหมายความว่า
Allopurinol ความเข้มข้น 70 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งแซนทีนออกซีเดสได้ 50% สารสกัดจากเปลือก
ต้นเป้ง้าใหญ่ที่ยับยั้งแซนทีนออกซีเดสได้ดีที่สุดคือ สาร 1 มีค่า IC_{50} 90 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารที่
มีฤทธิ์ยับยั้งรองลงมาคือ สาร 3 สาร 4 และสาร 2 โดยมีค่า IC_{50} 140, 155 และ 190 ไมโครกรัม/
มิลลิลิตร ตามลำดับ