



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากดอกสุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*)
Study of chemical composition from *Cochlospermum regium* flowers.

โดย

- | | | |
|-----------------|-----------|----------|
| 1. นสภ.จิตรลดา | เศษจันทร์ | 59210147 |
| 2. นสภ.เจนจิรา | กวางเฮง | 59210150 |
| 3. นสภ.มณฑาเลย์ | เลี้ยวกุล | 59210189 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากดอกสุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*)
Study of chemical composition from *Cochlospermum regium* flowers.

โดย

- | | | |
|-----------------|-----------|----------|
| 1. นสภ.จิตรลดา | เศษจันทร์ | 59210147 |
| 2. นสภ.เจนจิรา | กวางเฮง | 59210150 |
| 3. นสภ.มณฑาเลย์ | เลี้ยวกุล | 59210189 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

สุพรรณิการ์เป็นพืชที่พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราได้ และมีรายงานการใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศบราซิล เพื่อบรรเทาอาการปวด อักเสบ รักษาโรคติดเชื้อ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โดยในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดของดอกสุพรรณิการ์มาก่อน ดังนั้นจึงเป็นการเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะทำการวิจัยเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญจากดอกของสุพรรณิการ์ ซึ่งเป็นการศึกษาสารสำคัญที่อยู่ในดอกสุพรรณิการ์ โดยการสกัดและแยกสารสำคัญจากดอกสุพรรณิการ์ที่เก็บตัวอย่างจากมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว จังหวัดสระแก้ว

คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า โครงการวิจัยนี้ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของวิชา 791591 โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจศึกษา เพื่อสามารถนำไปพัฒนาให้เกิดประโยชน์ได้ต่อไป

คณะผู้วิจัย

- | | | |
|-----------------|-----------|----------|
| 1. นสภ.จิตรลดา | เศษจันทร์ | 59210147 |
| 2. นสภ.เจนจิรา | กวางเฮง | 59210150 |
| 3. นสภ.มณฑาเลย์ | เสียวกุล | 59210189 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2563

เรื่อง การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากดอกสุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*)

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

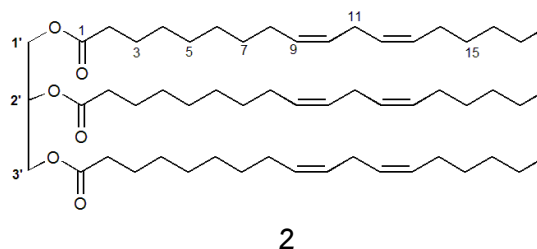
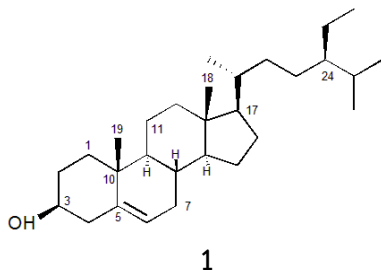
1. นสภ.จิตรลดา เศษจันทร์ 59210147
2. นสภ.เจนจิรา กวางเฮง 59210150
3. นสภ.มันดาเลย์ เลี้ยวกุล 59210189

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

ภก.อ.ดร.สุนันต์ ใจสมุทร

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแยกสารจากดอกสุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*) ให้บริสุทธิ์ ซึ่งกระบวนการวิจัยเป็นการศึกษาการเก็บตัวอย่างในจังหวัดสระแก้ว แล้วนำดอกมาหมักด้วยตัวทำละลายเมทานอล เมื่อนำมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 2 สาร เมื่อนำมาพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปี พบว่า สารตัวที่ 1 เป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ มีชื่อว่า β -sitosterol และสารตัวที่ 2 เป็นสารกลุ่มไตรกลีเซอไรด์ มีชื่อว่า trilinolein



อาจารย์ที่ปรึกษา

Senior project academic year 2020

: Study of chemical composition from *Cochlospermum regium* flowers.

By

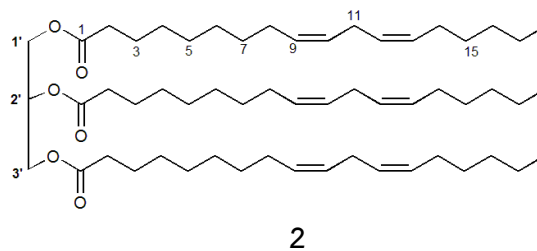
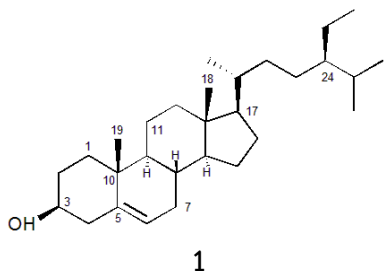
1. Miss Jitlada	Setjan	ID	59210147
2. Miss Janejira	Kwangheng	ID	59210150
3. Miss Mondalay	Leawkhun	ID	59210189

Advisor:

Dr. Sunan Jaisamut

ABSTRACT

The objective of this research is to study the chemical composition from flowers of *C. regium*. By collecting samples of *C. regium* flowers from Sa Kaeo Province. Fermented with methanol solvent. The extraction and purification of the substance were performed using Chromatography, two pure substances can be separated. The identity was proven by Spectroscopy technique. It was found that the first substance was a steroid group, β -sitosterol (1), and the second substance was a triglyceride group, trilinolein (2)



Advisor

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาช่วยเหลือ แนะนำ ให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่งจาก อ.ดร. สุนันต์ ใจสมุทร อาจารย์ที่ปรึกษาและ อาจารย์ผู้สอนวิชา 791591 โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ 2 คณะผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ อ.ดร. นิรมัย ฝางกระโทก อาจารย์คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว สำหรับข้อมูลการทดสอบพิษเคมีเบื้องต้น ขอขอบคุณ อ.ดร.จักรพงษ์ รัตตะมณี จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการ ตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของตัวอย่างพืช ขอขอบคุณอ.ดร.อรพรรณ ยอดสะอี เป็นที่ปรึกษาในการสกัดแยก ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนสถานที่และ อุปกรณ์ในการวิจัย

คณะผู้วิจัย

- | | | |
|-----------------|-----------|----------|
| 1. นสภ.จิตรลดา | เศษจันทร์ | 59210147 |
| 2. นสภ.เจนจิรา | กวางเฮง | 59210150 |
| 3. นสภ.มณฑาเลย์ | เลี้ยวกุล | 59210189 |

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ก
บทคัดย่อ (ไทย)	ข
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 กรอบแนวคิด	4
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ลักษณะพืชวงศ์คำแสด	5
2.2 ประโยชน์ของสุพรรณิการ์	6
2.3 สารสำคัญจากพืชสกุล Cochlospermum	6
2.4 การสกัดแยกสาร	10
2.4.1 การหมัก (maceration)	10
2.4.2 การสกัดของเหลวด้วยของเหลว(liquid-liquid extraction)	10
2.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์	11
2.5.1 เครื่องนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์	11
2.5.2 เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์	12

2.5.3 เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์	12
2.5.4 เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	14
3.1 ขอบเขตการวิจัย	14
3.2 เครื่องมือ วัสดุ และสารเคมี	14
3.2.1 พืชที่ใช้ในการวิจัย	14
3.2.2 เครื่องมือ	14
3.2.3 วัสดุ	14
3.2.4 สารเคมี	15
3.3 การเก็บตัวอย่างดอกสุพรรณิการ์	16
3.4 การสกัดและการแยกให้บริสุทธิ์	16
3.4.1 การสกัด	16
3.4.2 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี	17
3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย	19
4.1 การเก็บตัวอย่างสมุนไพร	19
4.2 การสกัดและการแยกให้บริสุทธิ์	19
4.3 การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$	22
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	27
บรรณานุกรม	29
ภาคผนวก ก	32
รายงานสรุปการเงิน	33

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	น้ำหนักสารสกัดจากดอกสุพรรณิการ์ (<i>C. regium</i>) ที่สกัดแยกด้วยตัวทำละลาย <i>n</i> -hexane, ethyl acetate และ methanol	20
2	ข้อมูล ^1H -NMR ของสาร 1 (400 MHz, CDCl_3)	23
3	ข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR ของสาร 2 (400 MHz สำหรับ ^1H และ 100 MHz สำหรับ ^{13}C , CDCl_3)	26

สารบัญรูปภาพ

รูป		หน้า
1	ลักษณะของดอก ผล ต้นและใบสุพรรณนิการ์	6
2	การใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศบราซิล รากสด	6
3	โครงสร้างของ 3, 4, 5 และ 6 ที่สกัดจากใบ Yellow rose	7
4	โครงสร้างของ 9, 10, 11, 12, 13, 14, 1 และ 5 ที่สกัดจากราก Yellow rose (<i>C.vitifolium</i>)	7
5	โครงสร้างของ 16, 17 และ 18 ที่สกัดจากใบ Borotutu (<i>C. angolense</i>)	8
6	โครงสร้างของ 3 และ 19 ที่สกัดจากราก Borotutu (<i>C. angolense</i>)	8
7	โครงสร้างของ 20 และ 21 ที่สกัดจากใบของสุพรรณนิการ์ (<i>C. regium</i>)	8
8	โครงสร้างของ 22, 23, 24 และ 25 ที่แยกจากรากสุพรรณนิการ์ (<i>C. regium</i>)	9
9	ดอกสุพรรณนิการ์ (<i>C. regium</i>)	19
10	การหมักด้วย methanol	20
11	spot ของสารสกัดหยาบ methanol	21
12	spot ของสารจากการแยกสารด้วย QCC บน TLC	21
13	ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 1 (400 MHz, CDCl_3)	22
14	ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 2 (400 MHz, CDCl_3)	24
15	ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย $^{13}\text{C-NMR}$ ของสาร 2 (100 MHz, CDCl_3)	25

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่บนพื้นที่เขตร้อนชื้น มีความหลากหลายทางธรรมชาติของพืชพรรณค่อนข้างสูง สามารถเพาะปลูกพืชได้หลากหลายชนิด โดยการนำสมุนไพรมาใช้ มีทั้งการใช้สมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ทั่วไป และสมุนไพรต่างถิ่นที่มีการนำเข้ามาปลูก เพื่อความสวยงามและใช้ประโยชน์ทางยา รวมไปถึงการดูแลสุขภาพ โดยยังมีความเชื่อว่าผลผลิตจากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่อันตรายและช่วยให้มีชีวิตที่ยืนยาวได้ อีกทั้งการใช้สมุนไพรในการดูแลสุขภาพตนเองเป็นการช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในครัวเรือน ทำให้ในปัจจุบันความต้องการใช้สมุนไพรในประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากความสนใจดูแลสุขภาพด้วยผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ซึ่งสมุนไพรสามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลาย เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค และการเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุของประเทศไทยในอนาคตอันใกล้ ทำให้มีแนวคิดในการใช้สมุนไพรเป็นทางเลือกในการดูแลสุขภาพและรักษาโรค ร่วมกับภาครัฐที่มีนโยบายสนับสนุนเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ที่มาจากสมุนไพร โดยรัฐบาลต้องการให้สมุนไพรไทยเป็นพลังขับเคลื่อนเศรษฐกิจของประเทศให้เพิ่มมากขึ้น ในปี 2560 รัฐบาลได้ให้ความสนใจในพืชสมุนไพรโดยวางแผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพร ฉบับที่ 1 พ.ศ.2560-2564 กระทรวงสาธารณสุขร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องประกอบด้วย วิทยาศาสตร์ ยุทธศาสตร์ มาตรการ และแผนงานต่าง ๆ ที่ครอบคลุมการพัฒนาสมุนไพรไทยตั้งแต่ต้นทาง กลางทาง และปลายทาง เพื่อให้ภายใน 5 ปี ข้างหน้าประเทศไทยจะเป็นประเทศส่งออกวัตถุดิบสมุนไพรคุณภาพและผลิตภัณฑ์สมุนไพรชั้นนำของภูมิภาคอาเซียน รวมทั้งเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของสมุนไพรไทยในตลาดทั้งในและต่างประเทศอย่างต่อเนื่องและเป็นระบบ อันจะนำมาสู่ความมั่นคงทางสุขภาพและความยั่งยืนของเศรษฐกิจไทยต่อไป⁽¹⁾

สถานการณ์สมุนไพรในต่างประเทศ จากการคาดการณ์ขององค์การอนามัยโลกต่อปริมาณความนิยมสมุนไพรในตลาดโลกที่มีมูลค่าถึง 3,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ในปี 2549 จะเพิ่มขึ้นเป็น 5,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ในปี 2593 โดยประเทศที่ส่งออกสมุนไพรเป็นอันดับต้นของโลกคือ จีน อินเดีย และเยอรมัน ตามลำดับ มีมูลค่าการส่งออกประมาณ 1.59 (1.42%) 1.30 (11.6%) 0.76 (6.9%) พันล้านเหรียญสหรัฐ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าทั่วโลกให้ความสนใจผลิตภัณฑ์สมุนไพรเป็น

อย่างมาก จากความคิดที่ต้องการฟื้นฟูธรรมชาติทำให้มีการใช้สมุนไพรในคนเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับการหันมาดูแลสุขภาพด้วยวิถีธรรมชาติ จึงพบว่ามีการใช้สมุนไพรรักษาโรคและอาการต่างๆด้วยตนเองอย่างแพร่หลายทั่วโลก⁽²⁾

สมุนไพรในประเทศไทยที่รัฐบาลไทยให้ความสนใจในการพัฒนาเพื่อยกระดับเศรษฐกิจของประเทศมีหลายชนิด ตัวอย่างเช่น กระชายดำ (*Kaempferiapar viflora*) เหง้าของกระชายดำประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย มี borneol เป็นองค์ประกอบหลัก และยังพบสารกลุ่ม flavonoids chalcone และ anthocyanin เป็นต้น มีสาร 5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF) มีฤทธิ์ต้านอักเสบ สาร 5,7,4'-trimethoxyflavone และ 5,7,3',4'-tetramethoxyflavone แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ในตำรายาไทย ใช้บำรุงกำลัง แก้ปวดเมื่อยและอาการเหนื่อยล้าและเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ แก้อาการท้องผูก มดลูกหย่อน ใช้กวาดคอเด็ก แก้อาการชักในเด็ก⁽³⁾ เป็นต้น ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) สารที่พบในขมิ้นชันคือ สารกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) ประกอบด้วย curcumin demethoxycurcumin bisdemethoxycurcumin มีสีเหลืองอ่อน ขมิ้นชันเป็นยารักษาอาการทางระบบทางเดินอาหาร ตำรับยาเหลืองปิดสมุทรมีส่วนประกอบของขมิ้นชันเป็นองค์ประกอบหลัก มีสรรพคุณบรรเทาอาการท้องเสียชนิดที่ไม่เกิดจากการติดเชื้อ มีการศึกษาทางเภสัชวิทยาเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนัง รวมทั้งมีการศึกษาทางคลินิก ฤทธิ์ลดอาการแน่น จุกเสียด ฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร และฤทธิ์ลดการอักเสบ⁽⁴⁾ เป็นต้น

นอกจากพืชในวงศ์ Zingiberaceae ที่กล่าวมาแล้วข้างต้นยังมีพืชในวงศ์อื่น ๆ หลายชนิดที่น่าสนใจ เช่นพืชที่อยู่ในวงศ์ Bixaceae มีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอุตสาหกรรมทั้งยังมีการบันทึกอยู่ในตำรายาไทย คือต้นคำชะหรือคำไทย (*Bixa orellana*) สมุนไพรชนิดนี้ในตำรายาไทยใช้เมล็ดเป็นยาหอม แก้ลม เป็นยาฟาดสมาน สมานบาดแผล แก้ไข้ ถ่ายเสมหะ แก้อาการผื่นคัน ขับระดู แก้ปวดบวม แก้ปวดมดลูกหลังคลอด รักษาโรคหนองใน ใช้มาลาเรีย เป็นยาระบายท้อง ขับพยาธิ รักษาโรคผื่นคัน น้ำมันจากเมล็ด แก้อัมพฤกษ์อัมพาต แก้ขัดตามข้อ สารที่ให้สีคือ ไบซิน (bixin) นอร์ไบซิน (norbixin) มีสารขม และสารอื่นๆ เช่น orellin⁽⁵⁾ สารแอนแนตโต (annatto) เป็นสารสีธรรมชาติที่มีสีเหลืองส้มถึงสีแดง ได้จากเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสารสีที่ละลายได้ในน้ำมันประกอบด้วย ไบซิน ซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่ละลายได้ในน้ำมันชนิดหนึ่ง ส่วนแอนแนตโตที่ละลายได้ในน้ำที่ค่าพีเอชเป็นด่างคือ นอร์ไบซิน ใช้เป็นสีผสมอาหาร เช่น เติมน้ำในเนยเทียม เนยขาว และเนยแข็ง⁽⁶⁾ เป็นต้น และพืชในวงศ์เดียวกันที่พบว่ามีปลูกในประเทศไทยอีกชนิดคือสุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดมาจากอเมริกากลางและอเมริกาใต้⁽⁷⁾ มีการนำเข้ามาปลูกเป็นไม้ประดับ

ในประเทศไทยเนื่องจากให้กลีบดอกซ้อนที่สวยงาม ปลุกง่าย ทนต่อสภาวะความแห้งแล้งได้ดี โดยในประเทศบราซิลได้มีการนำรากของต้นสุพรรณิการ์มาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน⁽⁸⁾ เพื่อบรรเทาอาการปวด อักเสบ โรคติดเชื้อ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์⁽⁹⁾ และรักษาโรคติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ของผู้หญิง^(8, 10, 11) นอกจากนี้สารสกัดจาก *C. regium* ยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา^(9,12,13) ดังนั้นสุพรรณิการ์จึงเป็นต้นไม้ที่น่าสนใจที่จะศึกษาองค์ประกอบ ทางเคมีและศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพิ่มเติม ทั้งนี้ในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานการแยกสารจาก พืชชนิดนี้มาก่อน มีเพียงการศึกษาสารสกัดหยาบเบื้องต้นเท่านั้น⁽¹⁴⁾ และมีการนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้าน ให้สรรพคุณทางยามาอย่างยาวนาน และอีกประเด็นหนึ่งคือการนำต้นสุพรรณิการ์เข้ามาปลูกในสภาพ แวดล้อมที่ต่างไปจากสภาพแวดล้อมท้องถิ่นเดิมที่เคยมีการศึกษา จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบสารชนิดใหม่เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้ทางการแพทย์และเป็นการส่งเสริมให้เกิดมูลค่า การอนุรักษ์และการพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์สุขภาพได้อีกด้วย

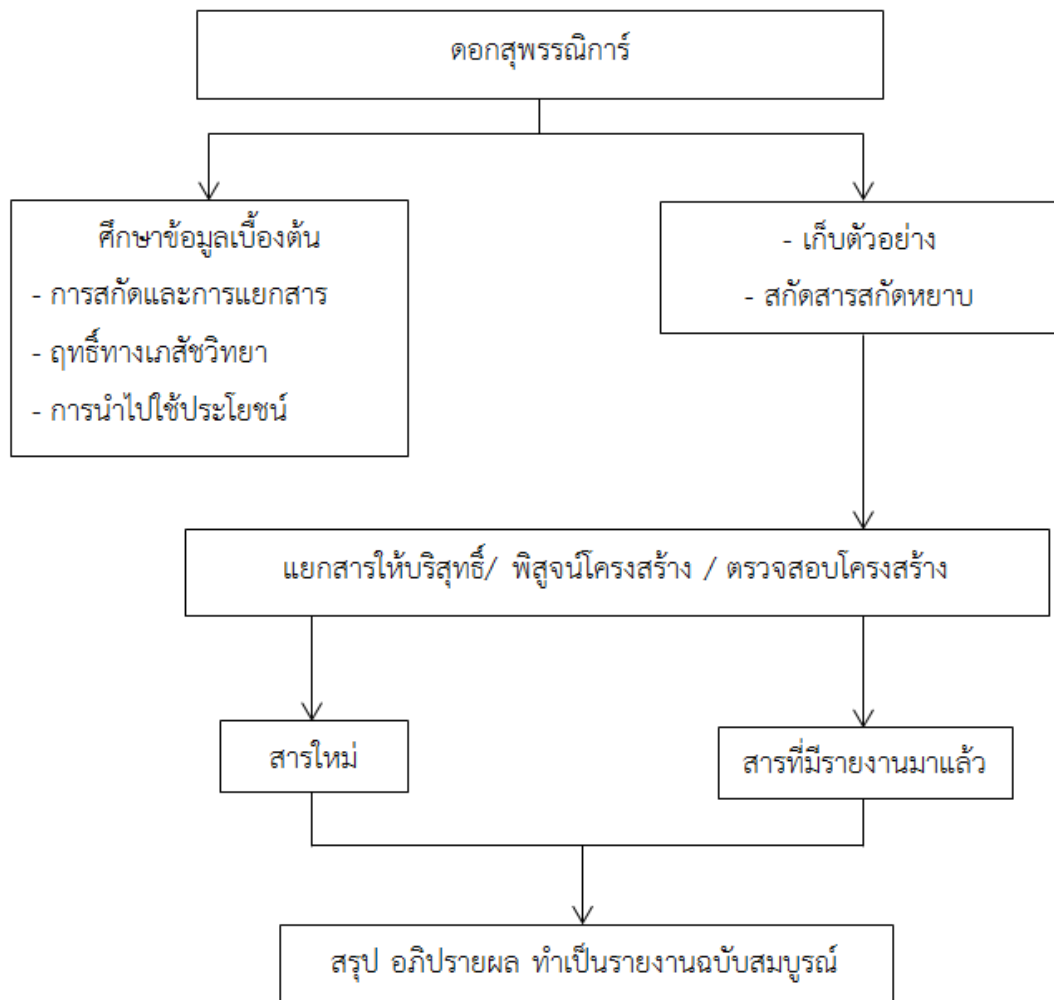
1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมี จากสารสกัดของดอกสุพรรณิการ์
2. เพื่อวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่ได้จากสารสกัดของดอกสุพรรณิการ์ โดยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกลุ่มสารและชนิดสารสำคัญที่พบจากดอกสุพรรณิการ์ที่ได้มาจากแหล่งการปลูกในประเทศไทย
2. ได้ข้อมูลพื้นฐานของสารบริสุทธิ์และแนวทางในการแยกสารจากดอกสุพรรณิการ์
3. สามารถถ่ายทอดความรู้ เทคนิคการวิเคราะห์ต่าง ๆ
4. ส่งเสริมการอนุรักษ์ และขยายพันธุ์ในท้องถิ่น เพื่อประโยชน์ทางยาและผลิตภัณฑ์เสริมความงาม

1.4 กรอบแนวคิด



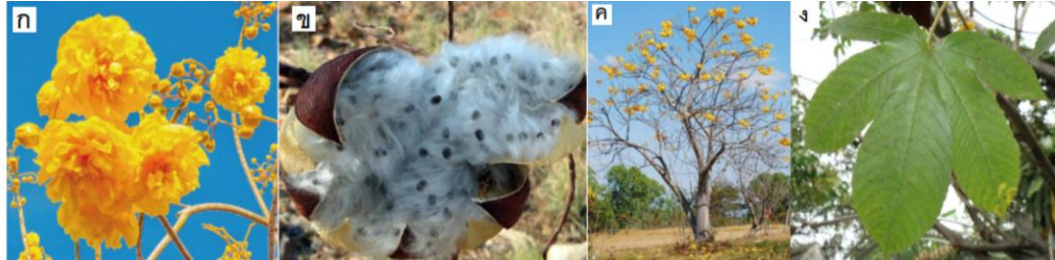
บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะพืชวงศ์คำแสด

วงศ์คำแสด (Bixaceae) ลักษณะประจำวงศ์ เป็นไม้ใบเดี่ยว เรียงสลับเส้นใบออกจากจุดเดียวกัน ที่โคนใบมีจุดสีแดง ดอกมีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกอย่างละ 5 กลีบ กลีบดอกแยกจากกัน เกสรตัวผู้มีจำนวนมาก รังไข่ติดกันเหนือวงกลีบ ไข่อ่อนมีจำนวนมาก ลักษณะเด่น คือ ไม้ต้นใบเดี่ยว เส้นใบออกจากจุดเดียวกันที่โคนใบ ใบมีจุดสีแดง เกสรตัวผู้มีจำนวนมาก ผลเป็นแบบผลแห้งแตก มีหนาม⁽¹⁵⁾ โดยพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศพบ 1 ชนิดคือ คำแสด (*Bixa orellana*) สำหรับสกุลอื่นเป็นพันธุ์ไม้ต่างถิ่นที่ได้มีการนำเข้ามาปลูกเป็นไม้ดอกเพื่อความสวยงาม เนื่องจากดอกมีขนาดใหญ่ มองเห็นเด่นชัด กลีบดอกสดใส สวยงามเพราะมีไขมันเคลือบ มีทั้งดอกซ้อน และดอกเดี่ยว ปลูกง่าย ด้วยการปักชำกิ่งหรือเพาะเมล็ด ทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี ประโยชน์สีแดงจากเมล็ดของต้นคำแสดใช้ในอุตสาหกรรมการย้อมสีผ้า

สุพรรณิการ์หรือฝ้ายคำซ้อน มีชื่อวิทยาศาสตร์ *C. regium* จัดอยู่ในอันดับ Malvales วงศ์ Bixaceae (วงศ์คำแสด) และสกุล *Cochlospermum* มีลักษณะเป็นไม้ต้น ใบเดี่ยวจักเป็นแฉกรูปนิ้วมือ ดอกสีเหลือง สมบูรณ์เพศ เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก ผลแห้งแตก เมล็ดจำนวนมาก มีขนคล้ายไหม ล้อมรอบ แสดงดังรูปที่ 1 การกระจายพันธุ์ในประเทศไทยพบ 2 ชนิด คือ ฝ้ายคำ (*C. religiosum*) และสุพรรณิการ์หรือฝ้ายคำซ้อน (*C. regium*) นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ⁽¹⁶⁾ พืชสกุลนี้พบ ประมาณ 13 สายพันธุ์ โดยแต่ละสายพันธุ์ มีความแตกต่างกันที่ลักษณะของดอกและใบ เช่น ฝ้ายคำจะออกดอกเพียงชั้นเดียว มี 5 กลีบ และบานทีละดอก ในขณะที่สุพรรณิการ์จะมีทั้งชนิดที่ออกดอกชั้นเดียวและชนิดที่ออกดอกซ้อนกันเป็นกระจุกแน่น โดยบานพร้อม ๆ กัน⁽¹⁷⁾



รูปที่ 1 แสดงลักษณะของดอก (ก) ผล (ข) ต้น (ค) และใบ (ง) สุพรรณิการ์
ที่มาของภาพ: ก. สุนันต์ ใจสมุทร ข. สารสนเทศท้องถิ่น ณ อุบลราชธานี สวนสาธารณะภูหล่น
[อินเทอร์เน็ต]. 2017.

2.2 ประโยชน์ของสุพรรณิการ์

ข้อมูลการใช้ประโยชน์จากสุพรรณิการ์ ในประเทศบราซิลได้มีการนำรากของต้นมาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน⁽⁸⁾ ดังรูปที่ 2 เพื่อบรรเทาอาการปวด อักเสบ โรคติดเชื้อ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์⁽⁹⁾ และรักษาโรคติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ของผู้หญิง^(8, 10, 11) นอกจากนี้สารสกัดจาก *C. regium* ยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา^(9,12,13)

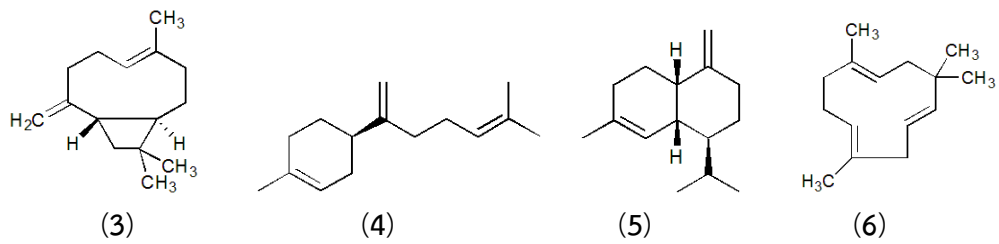


รูปที่ 2 การใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศบราซิล รากสด (ก) ยาสมุนไพรแห้ง (ข)
ยาที่วางขายในตลาด (ค)

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

2.3 สารสำคัญจากพืชสกุล Cochlospermum

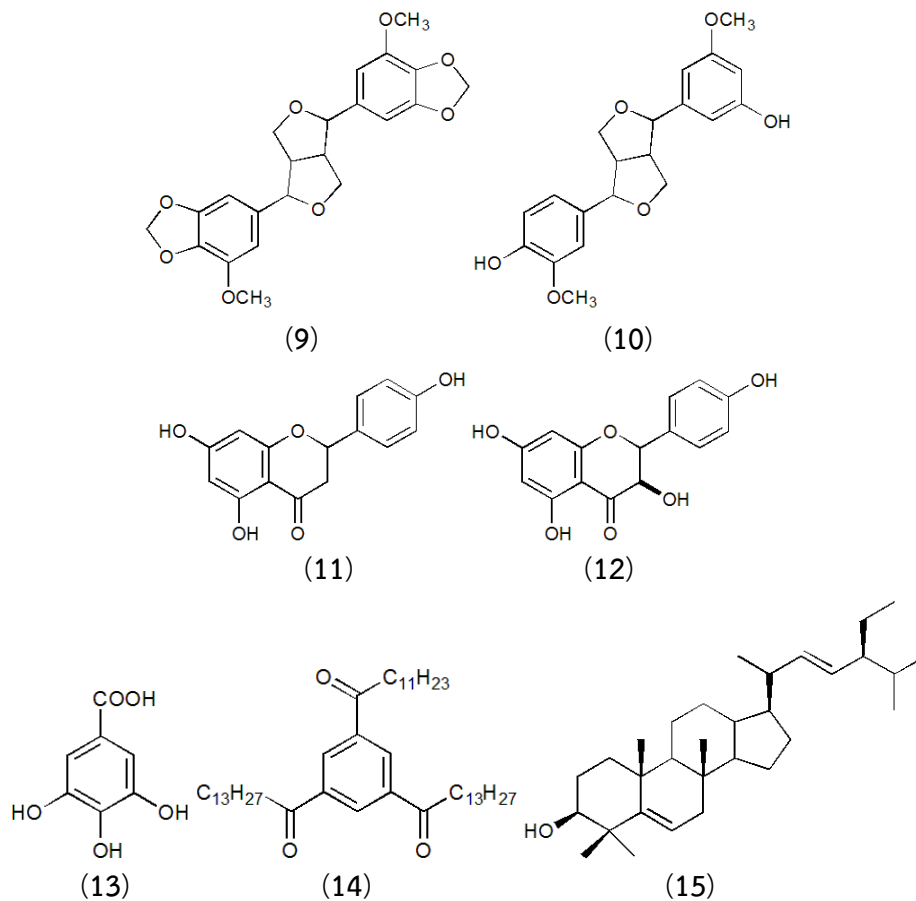
จากการศึกษาวรรณกรรมที่ผ่านมาพบว่าพืชในสกุล Cochlospermum มีรายงานการแยกสารหลายชนิด ในปี 2005 Almeida และคณะแยกสารจากใบ Yellow rose (*C. vitifolium*) พบสารกลุ่มเทอร์พีนคือ β -caryophyllene (3) β -bisabolene (4) γ -muurolene (5) α -humulene (6) 1-hydroxy-3-hexadecanone (7) และ β -pinene (8) แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 โครงสร้างของ β -caryophyllene (3), β -bisabolene (4), γ -muurolene (5)

และ α -humulene (6) ที่สกัดจากใบ Yellow rose (*C. vitifolium*)

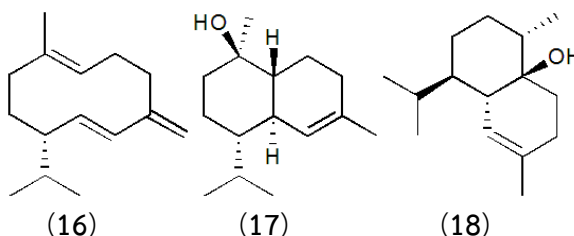
ในส่วนรากพบสารกลุ่มฟีนอลคือ excelsin (9) pinoresinol (10) narigenin (11) aromadendrin (12) gallic acid (13) triacylbenzene (14) และพบสารกลุ่มสเตียรอยด์ คือ β -sitosterol (1) และ stigmasterol (15)⁽¹⁹⁾ แสดงดังรูปที่ 4



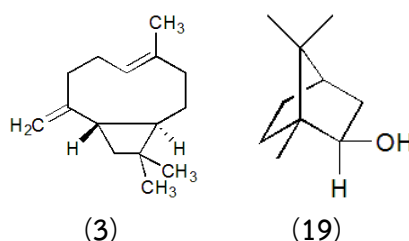
รูปที่ 4 โครงสร้างของ excelsin (9) pinoresinol (10) narigenin (11) aromadendrin (12)

gallic acid (13) triacylbenzene (14) β -sitosterol (1) และ stigmasterol (15) ที่สกัดจากราก Yellow rose (*C. vitifolium*)

ปี 2012 Leonardi และคณะแยกสารจากใบ Borotutu (*C. angolense*) ได้สารกลุ่มเทอร์พีน ได้แก่ germacrene D (16) α -cadinol (17) และ 10-*epi*-cubenol (18) แสดงดังรูปที่ 5 ในส่วนรากพบสารกลุ่มเทอร์พีนคือ β -caryophyllene (3) และ isoborneol (19)⁽¹⁸⁾ แสดงดังรูปที่ 6

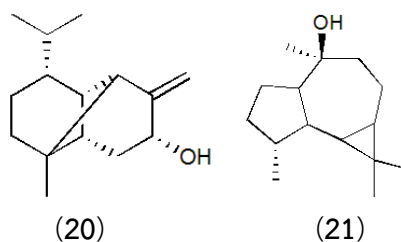


รูปที่ 5 โครงสร้างของ germacrene D (16), α -cadinol (17) และ 10-*epi*-cubenol (18) ที่สกัดจากใบ Borotutu (*C. angolense*)



รูปที่ 6 โครงสร้างของ β -caryophyllene (3) และ isoborneol (19) ที่สกัดจากราก Borotutu (*C. angolense*)

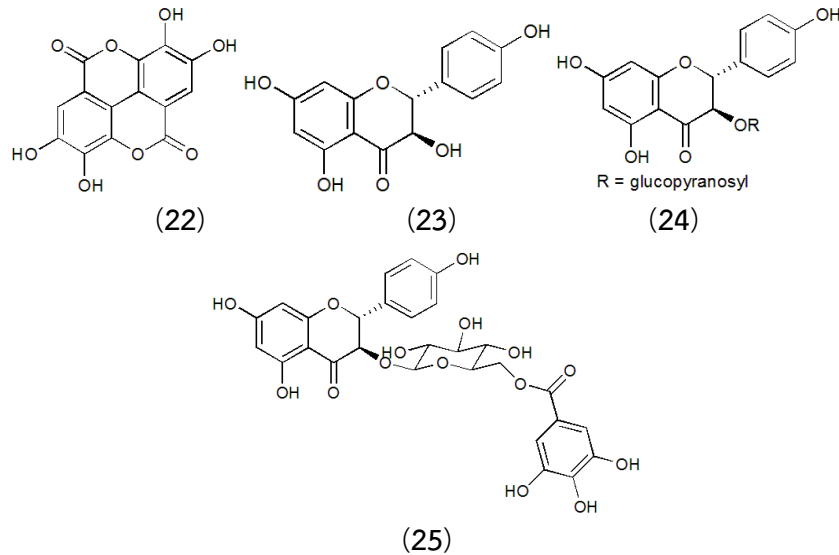
ปี 2014 Inácio และคณะสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบสุพรรณิการ์พบสารกลุ่ม sesquiterpenes ซึ่งมีสาร β -copaen-4- α -ol (20) และ viridiflorol (21) เป็นส่วนประกอบ⁽²²⁾ แสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 โครงสร้างของ β -copaen-4- α -ol (20) และ viridiflorol (21) ที่สกัดจากใบของสุพรรณิการ์ (*C. regium*)

ปี 2018 Carvalho และคณะแยกสารจากรากได้สารกลุ่มฟีนอลิกคือ ellagic acid (22) gallic acid (13) dihydrokaempferol (23) dihydrokaempferol-3-O- β -glucopyranoside (24) dihydrokaempferol-3-O- β -(6''-galloyl)-glucopyranoside (25) pinoresinol (10) และ excelsin (9)⁽²¹⁾ แสดงดังรูปที่ 8

ปี 2019 Silva และคณะสุพรรณิการ์ (*C. regium*) พบสารกลุ่มแทนนิน ฟีนอลิก มีวสีเลจ ซาโปนิน สเตียรอยด์ ไตรเทอร์พีนและฟลาโวนอยด์ เป็นต้น⁽²⁰⁾



รูปที่ 8 โครงสร้างของ ellagic acid (22) dihydrokaempferol (23) dihydrokaempferol-3-O- β -glucopyranoside (24), dihydrokaempferol-3-O- β -(6''-galloyl)-glucopyranoside (25) ที่แยกจากรากสุพรรณิการ์ (*C. regium*)

จากข้อมูลข้างต้นเนื่องด้วยการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสุพรรณิการ์ยังมีข้อมูลไม่มากพอและมีความไม่ต่อเนื่อง อีกทั้งสภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิศาสตร์ของประเทศไทยมีความแตกต่างกับประเทศถิ่นกำเนิดของสุพรรณิการ์หรือการศึกษางานวิจัยต่างๆที่ได้ทำการศึกษามาก่อนหน้า รวมถึงความสำคัญของสมุนไพรซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นแหล่งสำคัญในการนำมาใช้เป็นอาหารและใช้เป็นยารักษาโรค ที่มีทั้งรูปแบบยาสมุนไพรพื้นบ้าน ยาแผนโบราณ และยังสามารถนำมาใช้เป็นยาแผนปัจจุบันชนิดใหม่ ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ดังนั้นการค้นหาลักษณะประกอบทางเคมี และศึกษาต่อยอดฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบอย่างเฉพาะเจาะจง จึงมีความสำคัญอย่างมากในการพัฒนาเพื่อให้เกิดการค้นพบตัวยาหรือสารประกอบชนิดใหม่ต่อไป

ปี 2017 นิรมัยและคณะศึกษาฤทธิ์ Antioxidant และฤทธิ์ Antityrosinase จากสารสกัดของส่วน กิ่ง ดอก และใบของต้นสุพรรณิการ์ *C. regium* (มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว) นอกจากนี้ยังศึกษาการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) จากสารสกัดหยาบ พบว่ามีสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ⁽¹⁴⁾

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 โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่เป็นของเหลว 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 นำสารละลายของน้ำที่มีตัวถูกละลายที่ต้องการ

แยกใส่ในกรวยแยก (separatory funnel) แล้วเติมตัวทำละลายอินทรีย์ตามลงไปในการแยก จากนั้นเขย่ากรวยแยก 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)

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

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 เมกะเฮิร์ตซ์ เป็นต้น โดยความถี่มากขึ้นจะเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและความเข้มสัญญาณ การเกิดเรโซแนนซ์ของโปรตอนจะขึ้นอยู่กับสนามแม่เหล็กภายนอก (B_0) และความถี่คลื่นวิทยุ (ν) ดังนั้น การพัฒนาเครื่อง NMR จึงสามารถทำได้ 2 แบบ ได้แก่ คงที่ B_0 และเปลี่ยน ν หรือคงที่ ν และเปลี่ยน B_0

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

หลักการทำงานของเครื่อง CW NMR คือ คงที่ ν และเปลี่ยน B_0 ซึ่งเครื่องกำเนิดสัญญาณกวาดจะค่อย ๆ เพิ่มความเข้มสนามแม่เหล็ก (B_0) ซึ่งในขณะที่ B_0 เพิ่มขึ้นนั้น ความถี่เชิงมุมของโปรตอนจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเท่ากับความถี่คลื่นวิทยุ ระหว่างช่วงแม่เหล็กจะมีขดลวดพันรอบหลอดบรรจุตัวอย่างต่อไปยังเครื่องรับและส่งความถี่คลื่นวิทยุ 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 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์

เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์⁽²⁵⁾ (UV-VIS Spectrophotometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแสงและค่า intensity ในช่วงรังสียูวีและช่วงแสงขาวที่ทะลุผ่านหรือถูกดูดกลืนโดยตัวอย่างที่วางอยู่ในเครื่องมือ โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่างซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อนและสารอนินทรีย์ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นเหล่านี้ได้

คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงของสารเมื่อโมเลกุลของตัวอย่างถูกฉายด้วยแสงในช่วงรังสียูวีหรือแสงขาวที่มีพลังงานเหมาะสมจะทำให้อิเล็กตรอนภายในอะตอมเกิดการดูดกลืนแสงเปลี่ยนสถานะ ไปอยู่ในชั้นที่มีระดับพลังงานสูงกว่า เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่าง เทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่างๆตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่างๆที่มีอยู่ในตัวอย่างได้

2.5.3 เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์

เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์⁽²⁶⁾ (FT-IR spectrometer; Fourier Transform Infrared Spectrometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ตรวจสอบ โครงสร้างของสาร โดยการวัดการดูดกลืนรังสีที่อยู่ในช่วงอินฟราเรด ที่อยู่ในช่วงเลขคลื่น (Wave number) ประมาณ $12,800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ทั้ง ของแข็ง ของเหลว และก๊าซ รังสี

อินฟราเรด (Infrared radiation) เป็นรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าแต่ให้ความร้อนที่สัมผัสได้ รังสีอินฟราเรดอยู่ระหว่างช่วง Visible radiation กับ Microwave radiation โดยช่วงของรังสีอินฟราเรดแบ่งออกเป็น 3 ช่วง ได้แก่ Near Infrared ($12,800\text{--}4,000\text{ cm}^{-1}$) Middle Infrared ($4,000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$) Far Infrared ($200\text{--}10\text{ cm}^{-1}$) ช่วงของรังสีอินฟราเรดที่ใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ทางเคมีได้แก่ช่วง Middle IR เนื่องจากรังสีอินฟราเรดมีพลังงานค่อนข้างต่ำ เมื่อโมเลกุลของสารดูดกลืนรังสีอินฟราเรดเข้าไปจะทำให้พันธะในโมเลกุลเกิดการสั่นและการหมุน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ของโมเลกุล การที่โมเลกุลจะดูดกลืนรังสีอินฟราเรดได้นั้นความถี่ของรังสีอินฟราเรดต้องเท่ากับค่าความถี่การสั่นของโมเลกุลของสารนั้นๆ ซึ่งสารอินทรีย์แต่ละชนิดจะมีค่าความถี่ของการสั่นที่จำเพาะและแตกต่างกันไปทำให้สามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างและชนิดของสารอินทรีย์ได้ การแสดงผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้แสดงเป็นความสัมพันธ์ระหว่าง wave-number กับ transmittance ซึ่งเรียกว่า Infrared spectrum

2.5.4 เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์

เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์⁽²⁴⁾ (Mass spectrometer) เป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสาร โดยอาศัยหลักการ การใช้ลำอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงวิ่งชนโมเลกุล ทำให้เกิดเป็นไอออนหรือเป็นอะตอมที่มีประจุ ถ้าไอออนที่เกิดขึ้นมีมวลต่างกัน เมื่อเข้าสู่สนามแม่เหล็กจะวิ่งชนรัศมีมีความโค้งที่ต่างกัน สนามแม่เหล็กจึงแยกไอออนที่มีมวลต่างกันออกจากกันและแสดงผลเป็นกราฟเรียกว่า แมสสเปกตรัม (mass spectrum) ทั้งมวลและประจุของไอออน วัดได้จากตำแหน่งที่ปรากฏในสเปกตรัม จึงสามารถวิเคราะห์ชนิดของธาตุและไอโซโทปที่มีอยู่ในสารต่าง ๆ

งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากสารสกัดของดอกสุพรรณิการ์ เพื่อนำข้อมูลพิษสมุนไพรชนิดนี้เป็นฐานข้อมูลนำร่องในการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆหรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่สร้างมูลค่าในอนาคตต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ขอบเขตการวิจัย

เก็บตัวอย่างพืช ดอกต้นสุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*) จากมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว จังหวัดสระแก้ว (ตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของตัวอย่างพืช โดย ดร.จักรพงษ์ รัตตะมณี คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว) จากนั้นนำมาสกัดด้วย methanol แล้วระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยด้วยการลดความดันแบบหมุน (rotary evaporator) จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาแยกสารให้บริสุทธิ์ และพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารด้วยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (NMR)

3.2 เครื่องมือ วัสดุ และสารเคมี

3.2.1 พืชที่ใช้ในการวิจัย

- 1) ดอกจากต้นสุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*)

3.2.2 เครื่องมือ

- 1) เครื่องชั่ง (Balance) 2 ตำแหน่ง รุ่น MS3002S และ 4 ตำแหน่ง รุ่น MS204 (METTLER TOLEDO, Switzerland)
- 2) เครื่องบดแบบค้อนเหวี่ยง (Hammer mill) ช่องรูแรง 2.0 mm
- 3) เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) รุ่น v-750 (Buchi, Switzerland)
- 4) Ultraviolet-Visible cabinet รุ่น CAMAG UV Cabinet4 (CAMAG, Switzerland)
- 5) เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) รุ่น Avance III HD 400 (Bruker, Czech Republic)

3.2.3 วัสดุ

- 1) ช้อนตักสาร (Spoon)
- 2) ปีกเกอร์ (Beaker) 50 100 150 250 500 และ 1,000 mL
- 3) แท่งกวนคนสาร (Stirring rod) ขนาด 8 นิ้ว

- 4) สำลี (Cotton)
- 5) กระดาษกรอง (Filter paper) no.1 Whatman
- 6) อะลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil)
- 7) หลอดหยด (Dropper) และจุกยางซิลิโคน 2 mL
- 8) กรวยกรอง (Funnel) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 cm
- 9) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) 250 และ 500 mL
- 10) กระบอกตวง (Cylinder) 10 25 50 และ 100 mL
- 11) กระจกนาฬิกา (Watch glass) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm
- 12) หลอดแคปิลลารี (Capillary tube)
- 13) โถวางแผ่น TLC (TLC tank)
- 14) แผ่นเพลต TLC SiO_2 GF₂₅₄
- 15) คอลัมน์สำหรับ Classic column chromatography (CC Column) เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 นิ้ว ยาว 70 cm Sephadex LH-20
- 16) หลอดเซนตริฟิวก์ (eppendorf)
- 17) กระดาษทรายละเอียด
- 18) คีม (Forcep)
- 19) ขวดแก้วรับ fraction ขนาด 60 ml
- 20) หลอดทดลอง (Test tube) 80 ml
- 21) ขวดก้นกลม (Round bottom flask) 250 และ 1000 ml
- 22) Glass Buchner funnels

3.2.4 สารเคมี

- 1) Distilled water
- 2) Methanol (commercial grade)
- 3) Ethyl acetate (AR grade)
- 4) Dichloromethane (AR grade)
- 5) Hexane (AR grade)
- 6) Vanillin-sulfuric acid spray reagent
- 7) Silica gel
- 8) TLC silica gel 60 F₂₅₄ ยี่ห้อ silicycle ultrapure silica gel

3.3 การเก็บตัวอย่างดอกสุพรรณิการ์ (*C. regium*)

เก็บตัวอย่างสุพรรณิการ์ (*C. regium*) โดยเก็บส่วนดอกสดปริมาณ 15.61 kg ซึ่งเก็บตัวอย่างจากมหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว ช่วงเดือนมีนาคม 2563 ตัวอย่างพรรณไม้ (*C. Rattamane M274*) ถูกเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium) คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้วและหอพรรณไม้กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ซึ่งการตรวจสอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธานของตัวอย่างพืชโดยได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ ดร. จักรพงษ์ รัตตะมณี จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

นำตัวอย่างที่ได้ไปล้างทำความสะอาดและตากให้แห้ง (air drying) เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปอบด้วย hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนแห้งสนิท หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างได้ปริมาณ 1.56 kg แล้วนำส่วนดอกสับให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และนำไปบดด้วยเครื่อง hammer mill ให้ได้ขนาดผงพืชเท่ากับ 2 mm (ใช้ตะแกรงที่มีรูพรุนเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2.0 mm) จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ลดขนาดแล้ว บันทึกผล และนำไปหมักในขั้นตอนถัดไป

3.4 การสกัดและการแยกสารให้บริสุทธิ์

3.4.1 การสกัด

นำส่วนของดอกสุพรรณิการ์แห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง hammer mill ขนาดรูพรุน 2.0 mm แล้วนำไปหมักโดยใช้วิธีการดัดแปลงมาจาก Solon S. และคณะ⁽¹²⁾ หมักด้วยตัวทำละลาย methanol 1.5 L ต่ออัตราส่วนของปริมาณผงของดอกแห้ง 1:3 จากนั้นกรองตะกอนออก สกัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำสารสกัดหยาบมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้ บันทึกผล และคำนวณปริมาณร้อยละของสารสกัด (% yield w/w) เมื่อเทียบกับน้ำหนักแห้งของดอก

นำสารสกัดหยาบ methanol มาสกัดแยกต่อด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ *n*-hexane, ethyl acetate และ methanol สกัดครั้งละ 30 ml ใช้วิธีการดัดแปลงมาจาก Solon S. และคณะ⁽¹²⁾ โดยแต่ละตัวทำละลาย ทำการสกัดจนได้สารละลายใส แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และชั่งน้ำหนักสารในแต่ละส่วน และคำนวณปริมาณร้อยละของสารสกัดเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบ methanol แล้วจึงหาระบบเพื่อเตรียมแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีต่อไป

หาระบบโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Thin-Layer Chromatography, TLC) เพื่อหาค่าคงที่การกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบ ใช้ stationary phase คือ SiO₂ 60 F₂₅₄ 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 °C สังเกตสีของ spot ที่พบ จากนั้นนำข้อมูลเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่มีการรายงานก่อนหน้านี้

3.4.2 การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

เตรียมตัวอย่างในการทำ TLC เพื่อองค์ประกอบจากสารสกัดด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane โดยนำสารสกัด *n*-hexane ละลายด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate เพื่อใช้ตรวจสอบลักษณะโครมาโตแกรม TLC ใช้ stationary phase คือ SiO₂ 60 F₂₅₄ และ mobile phases คือ ethyl acetate : *n*-hexane อัตราส่วน 1:3 จากนั้น spot ตัวอย่างบนแผ่น TLC แล้วทำการสังเกต spot บนโครมาโตแกรม TLC

ทำการเตรียมคอลัมน์สำหรับการทำ quick column chromatography (QCC) นำ SiO₂ ผสมกับ *n*-hexane คนให้ SiO₂ 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 SiO₂ เทลงบนผิวหน้าของ SiO₂ ในคอลัมน์ ชะด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane และ dichloromethane ในอัตราส่วนเท่ากันตลอดวิธีการวิเคราะห์ (Isocratic elution) โดยชะอัตราส่วนละ 300 ml และเก็บ fraction ละ 60 ml ทั้งหมด 38 fraction เมื่อได้ครบแล้ว ระบายสารสกัดด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วติดตามสารในแต่ละ fraction ด้วยการทำให้ TLC โดยใช้ mobile phase คือ ethyl acetate : *n*-hexane อัตราส่วน 1:4 แล้วรวม fraction ที่ spot เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ 12 fraction จากนั้นนำ fraction ที่รวมกันไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ แล้วชั่งน้ำหนักสารที่ได้ ติดตามสารสำคัญโดยการสังเกต spot บนโครมาโตแกรม TLC และนำ fraction ที่ 4 มาทำการแยกในขั้นตอนต่อไป

นำสารสกัด fraction ที่ 4 ที่ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธี QCC มาสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography; CC) โดยใช้ stationary phase คือ SiO₂ และใช้ mobile phase คือ ethyl acetate : *n*-hexane อัตราส่วน 1:19 โดยเตรียมคอลัมน์ขนาด 3 x 90 cm แล้วนำ SiO₂ ผสม mobile phase บรรจุลงในคอลัมน์ ชะด้วยตัวทำละลายจนคอลัมน์อิ่มตัว จากนั้นใช้หลอดหยด (dropper) หยดสารสกัด fraction ที่ 4 ผ่านคอลัมน์ลงบนซิลิกาเจล แล้วชะด้วย mobile phase จากนั้นเก็บสารที่ชะได้จากคอลัมน์ครั้งละ 60 ml เก็บจนกว่าสารในคอลัมน์จะถูกชะออกมาจนหมดหรือซิลิกาเจลกลายเป็นสีขาว จากนั้นติดตามสารในแต่ละ fraction ด้วยการทำให้ TLC โดยใช้

mobile phase คือ ethyl acetate : *n*-hexane อัตราส่วน 1:19 แล้วรวม fraction ที่มี spot ใกล้เคียงกัน จากนั้นนำ fraction ที่รวมกันแล้วนำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator แล้วชั่งน้ำหนักสารที่ได้ จากนั้นติดตามสารสำคัญโดยการสังเกตสี spot บนโครมาโตแกรม TLC ได้สารตัวที่ 1 และ 2 แล้วนำสารที่แยกได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกนีติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

3.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี

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

นำสารตัวที่ 1 และ 2 ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธี NMR โดยส่งวิเคราะห์ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^1H และ ^{13}C -NMR (400 MHz สำหรับ ^1H และ 100 MHz สำหรับ ^{13}C) ใช้ตัวทำละลายคือ Chloroform-d (CDCl_3)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเก็บตัวอย่างสมุนไพร

งานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างจากดอกสุพรรณิการ์ (*Cochlospermum regium*) มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว จังหวัดสระแก้ว ในเดือนมีนาคม รหัสตัวอย่าง C. Rattamane M274 (โดยได้รับความอนุเคราะห์จากอ.ดร.จักรพงษ์ รัตตะมณีจากคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว) มีปริมาณดอกสด 15.61 kg และเมื่อทำให้แห้งได้น้ำหนัก 1.56 kg เมื่อตากจนแห้งสนิทแล้วทำการบดตัวอย่างดอกสุพรรณิการ์ด้วยเครื่อง hammer mill โดยลักษณะดอกสดและดอกเมื่อทำให้แห้งแสดงดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ดอกสุพรรณิการ์ (*C. regium*) ดอกสด (ก) ดอกแห้ง (ข)

4.2 การสกัดและแยกสารให้บริสุทธิ์

การสกัดดอกสุพรรณิการ์นำดอกแห้งที่ลดขนาดแล้ว ปริมาณ 331.28 g หมักด้วย methanol 1.5 L (3 ครั้ง) แสดงกระบวนการหมักดังรูปที่ 10 เมื่อหมักเสร็จแล้วได้สารสกัดหยาบ methanol 13.97 g ร้อยละของสารสกัดที่ได้เท่ากับ 4.22 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักดอกแห้ง 331.28 g นำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดแยกต่อยด้วยตัวทำละลายได้แก่ *n*-hexane, ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ จากนั้นชั่งน้ำหนักสารในแต่ละส่วนได้น้ำหนักสารสกัด 3.49, 1.86 และ 2.67 g ตามลำดับ

เปรียบเทียบน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวทำละลายกับน้ำหนักสารสกัดหยาบ ได้ร้อยละของสารสกัดดังตารางที่ 1 พบว่าปริมาณน้ำหนักในชั้น *n*-hexane มีมากที่สุด แสดงว่ามีสารประกอบเป็นสารขี้ตัว



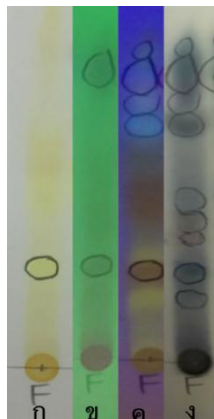
รูปที่ 10 การหมักด้วย methanol

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักสารสกัดจากดอกสุพรรณิการ์ (*C. regium*) ที่สกัดแยกด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane, ethyl acetate และ methanol

การสกัดด้วย ตัวทำละลาย	ปริมาณสารสกัด (g)	ร้อยละของสารสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับ กับสารสกัดหยาบ
<i>n</i> -hexane	3.49	25.14
ethyl acetate	1.86	13.40
methanol	2.67	19.24

เมื่อนำสารสกัดหยาบมาหาระบบด้วยเทคนิค TLC พบว่าระบบที่ใช้คือ 2:3 ethyl acetate in hexane และเมื่อสังเกตโครมาโตแกรม TLC ที่ UV 366 nm พบ spot สีเหลืองเรืองแสงคาดว่าเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และเมื่อสเปรย์ด้วย vanillin-sulfuric acid spray reagent พบ spot สีม่วงคาดว่าเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ และพบ spot สีน้ำเงินคาดว่าเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก แสดงดังรูปที่ 11

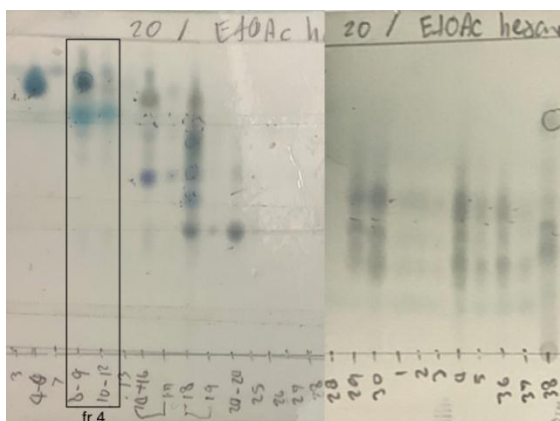
เมื่อนำข้อมูลเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่มีการรายงานก่อนหน้านี้⁽¹⁴⁾ พบว่าแสดงผลตรงกันโดยพบสารกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์



รูปที่ 11 แสดง spot ของสารสกัดหยาบ methanol สังเกตด้วยตาเปล่า (ก)

UV 254 nm (ข) UV 366 nm (ค) และสเปรย์ด้วย vanillin-sulfuric acid spray reagent (ง)

นำสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย *n*-hexane มาแยกสารด้วย QCC ได้ 12 fractions (น้ำหนักสาร 616.1, 105.5, 351.0, 128.4, 84.9, 393.4, 159.4, 52.7, 50.8, 159.1, 66.5 และ 1061.7 mg ตามลำดับ) แสดงผล spot ดังรูปที่ 12 จากโครมาโตแกรม TLC พบว่า fraction ที่ 4 แสดง spot ของสารประกอบหลักที่ชัดเจน และมีน้ำหนักเท่ากับ 128.4 mg ซึ่งมากเพียงพอสำหรับการนำไปแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีอื่น ๆ ต่อไป



รูปที่ 12 แสดงผล spot ของสารจากการแยกสารด้วย QCC บน TLC โดยระบบ 2:8 ethyl acetate ใน *n*-hexane

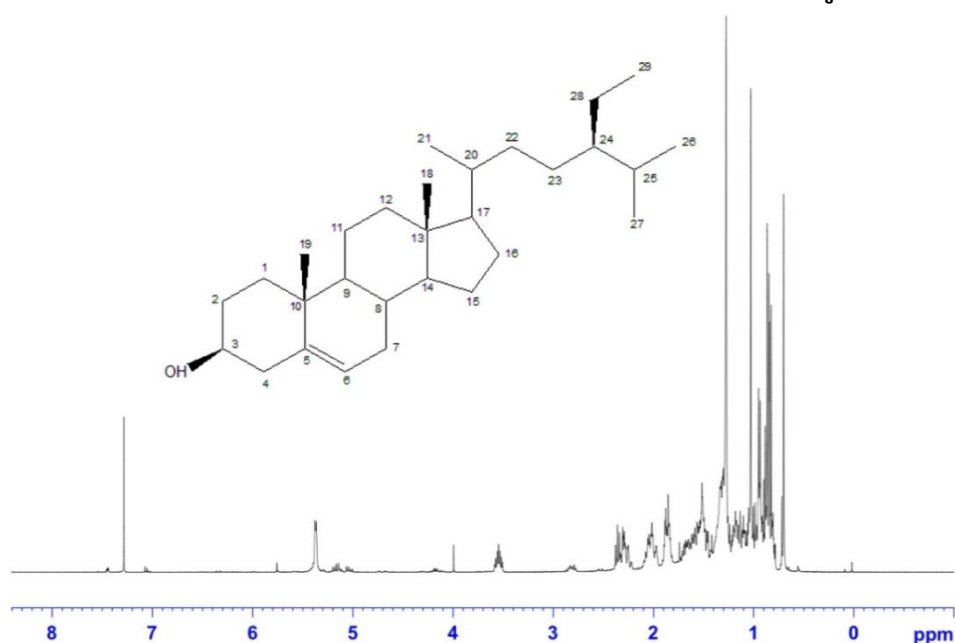
นำ fraction ที่ 4 ปริมาณ 128.4 mg มาแยกต่อด้วย CC โดยใช้ mobile phase คือ ethyl acetate : *n*-hexane อัตราส่วน 1:19 ได้สารบริสุทธิ์มา 2 สาร เป็นสารที่ 1 ปริมาณ 86.2 mg และสารที่ 2 ปริมาณ 28.5 mg จากนั้นนำสารทั้งสองไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR

4.3 การพิสูจน์โครงสร้างสารบริสุทธิ์ด้วย ^1H และ ^{13}C -NMR spectroscopy

(Nuclear magnetic resonance spectroscopy)

นำสารที่แยกได้มาพิสูจน์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR (400 MHz สำหรับ ^1H -NMR และ 100 MHz สำหรับ ^{13}C -NMR) ใช้ตัวทำละลายคือ Chloroform-d (CDCl_3) จากนั้นทำการเทียบสัญญาณกับสารที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้า พบว่าได้สาร 2 สาร คือ β -sitosterol (1) และ trilinolein (2)

สารที่ 1 เมื่อพิจารณาจากสเปกตรัมของ ^1H -NMR พบจำนวนโปรตอนจากค่า integration ของสเปกตรัมทำให้ประมาณจำนวนของโปรตอนได้ 50 โปรตอน และเนื่องจากพบสัญญาณสเปกตรัมที่ δ_{H} 5.37 ppm สัญญาณมีลักษณะเป็น triplet (t, $J=5.6$ Hz) ซึ่งแสดงโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของโครงสร้าง ที่ δ_{H} 3.55 ppm สัญญาณมีลักษณะเป็น multiplet ซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของโครงสร้างซึ่ง coupling กับโปรตอนข้างเคียง 6 โปรตอน ที่ δ_{H} 0.83 ppm สัญญาณมีลักษณะ triplet (t, $J=6.4$ Hz) ที่ δ_{H} 0.86 และ 0.84 ppm เป็นสัญญาณ doublet ของ methylene protons และที่ δ_{H} 0.7, 1.27 และ 1.03 ppm เป็นสัญญาณ singlet ของ methylene protons ซึ่งมีจำนวนมากในโครงสร้าง จากที่กล่าวมาเป็นลักษณะเฉพาะของสารกลุ่มสเตียรอยด์ และเมื่อเทียบกับสารที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Ododo et al. SpringerPlus, 2016) พบว่าสารที่ 1 เป็น β -sitosterol ดังตารางที่ 2 และลักษณะสเปกตรัมดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย ^1H -NMR ของสาร 1 (400 MHz, CDCl_3)

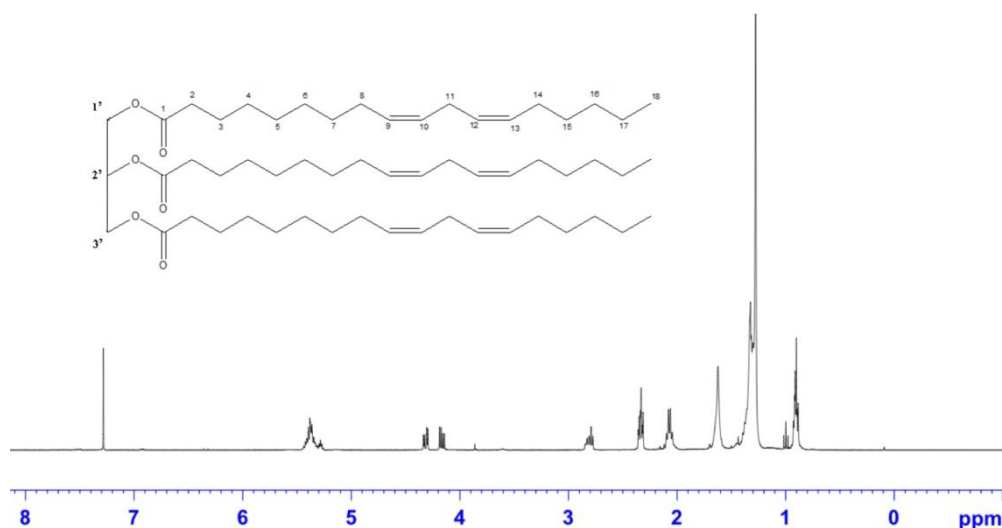
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ ของสาร 1 (400 MHz, CDCl_3)

position	δ_{H} (J in Hz)	Group	$\delta_{\text{H}}^{*,**}$
1	1.50 m	CH_2	1.82 m
2	1.56 m	CH_2	1.94 m
3	3.55 m	CH(OH)	3.52 m
4	2.36 m	CH_2	2.23 m
5	-	C	-
6	5.37 t (5.6)	C=CH	5.36 d (5.4)
7	1.89 m	CH_2	1.82 m
	2.02 m		1.90 m
8	1.84 m	CH	1.50 m
9	1.54 m	CH	1.55 m
10	-	C	-
11	1.52 m	CH_2	1.46 m
12	1.51 m	CH_2	1.96 m
13	-	C	-
14	1.53 m	CH	0.96 m
15	1.58 m	CH_2	1.54 m
16	1.86 m	CH_2	1.83 m
17	1.52 m	CH	1.08 m
18	0.71 s	CH_3	0.70 s
19	1.27 s	CH_3	1.03 s
20	1.57 m	CH	1.33 s
21	1.03 s	CH_3	0.90 d (6.6)
22	0.93 m	CH_2	1.31 m
23	1.15 m	CH_3	1.12 m
24	1.37 m	CH	0.91 m
25	1.55 m	CH	1.62 m
26	0.86 d (7.2)	CH_3	0.81 d (6.8)
27	0.84 d (7.2)	CH_3	0.79 d (6.8)
28	1.10 m	CH_2	1.21 m
29	0.83 t (6.4)	CH_3	0.81 t (6.6)
3-OH	-	OH	2.00 brs

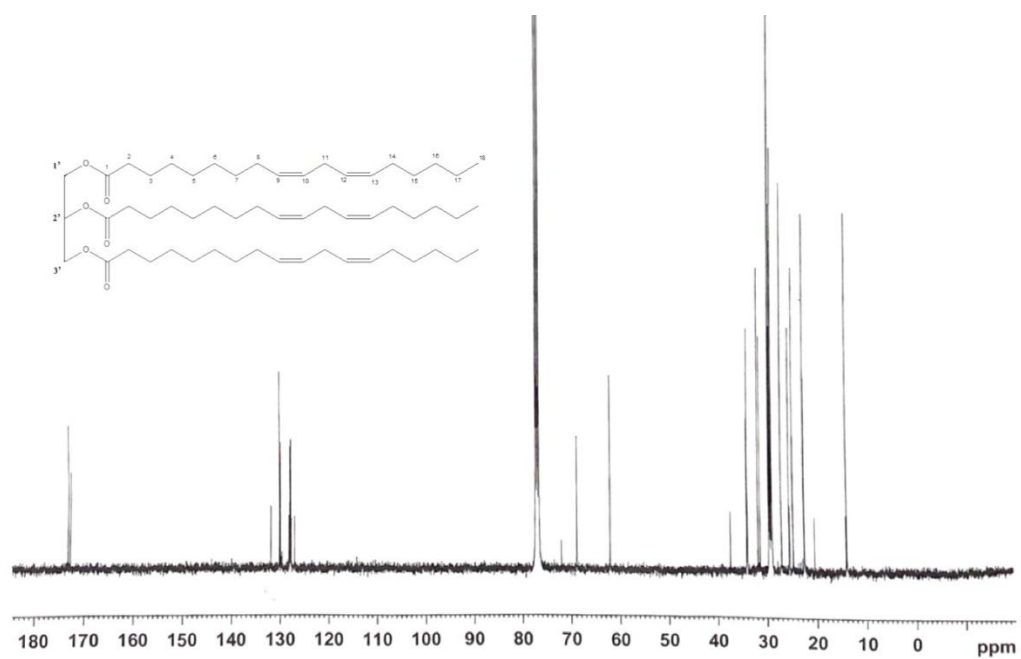
*Ododo et al. SpringerPlus 2016;5:12.

**จุโรทัย หวังสินทวีกุล และ วันชัย ตีเอกนามกุล. [วิทยานิพนธ์]:มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2547.

สารตัวที่ 2 พบสัญญาณสเปกตรัม δ_C ที่ 172.85 และ 173.26 ppm แสดงสัญญาณที่เป็นลักษณะเฉพาะของเอสเทอร์ 3 กลุ่ม δ_C ที่ 129.99, 130.02 ppm เป็นสัญญาณที่แสดง linoleic acid δ_C ที่ 62.10 และ 68.90 ppm เป็นสัญญาณที่แสดง glycerol δ_H 0.92 มีลักษณะเป็น multiplet เนื่องจากไม่พบ singlet methyl แสดงว่าส่วนปลายเป็น methyl ที่ต่อกับ ethyl group เมื่อรวมจากข้อมูล integration chemical shift ของสเปกตรัมและใช้สูตรคำนวณ double bond equivalent (DBE) เท่ากับ 6 ทำให้ได้สูตรโมเลกุล $C_{57}H_{98}O_6$ และเมื่อนำข้อมูลที่มีเทียบกับงานวิจัยที่เคยมีรายงานมา (Magn. Reson. Chem, 1997) พบว่าสารตัวที่ 2 คือ Trilinolein แสดงข้อมูล chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอน ในตารางที่ 3 และลักษณะสเปกตรัมดังรูปที่ 14 และ 15



รูปที่ 14 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย 1H -NMR ของสาร 2 (400 MHz, $CDCl_3$)



รูปที่ 15 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดด้วย ^{13}C -NMR ของสาร 2 (100 MHz, CDCl_3)

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล ^1H และ ^{13}C -NMR ของสาร 2 (400 MHz สำหรับ ^1H และ 100 MHz สำหรับ ^{13}C , CDCl_3)

Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}^{*,**}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}^{*,**}$
1'	4.24 dd (4.4)	62.1	4.19	62.14 (CH_2OCOR)
2'	5.29 t (4.4)	68.9	5.15	69.00 (CHOCOR)
3'	4.24 dd (4.4)	62.1	4.19	62.14 (CH_2OCOR)
1	-	173.3	-	173.17 (C1, sn-1,3)
		172.9		172.85 (C1, sn-2)
2	2.33 m	34.1	2.2	34.05 (OCO-CH_2)
3	1.62 s	24.9	1.6	24.87 ($\text{OCO-CH}_2\text{-CH}_2$)
4	1.30 m	29.2	1.2	29.21-29.8 ($(\text{CH}_2)_n$)
5	1.30 m	29.7	1.2	29.21-29.8 ($(\text{CH}_2)_n$)
6	1.30 m	29.4	1.2	29.21-29.8 ($(\text{CH}_2)_n$)
7	1.30 m	29.6	1.2	29.21-29.8 ($(\text{CH}_2)_n$)
8	2.07 m	27.2	2.02	27.22 ($\text{CH}_2\text{-CH=CH}$)
9	5.38 m	129.9	5.29	129.99 (CH=CH-)
10	5.38 m	130.0	5.29	128.12 (CH=CH-)
11	2.78 m	25.6	2.76	25.68 ($=\text{HC-CH}_2\text{-CH=}$)
12	5.38 m	128.2	5.29	127.95 (CH=CH-)
13	5.38 m	130.2	5.29	130.21 (CH=CH-)
14	2.07 m	27.2	2.02	27.16 ($\text{CH}_2\text{-CH=CH}$)
15	1.30 m	29.1	1.2	29.36 ($(\text{CH}_2)_n$)
16	1.30 m	31.9	1.2	31.54 ($(\text{CH}_2)_n$)
17	1.30 m	22.6	1.2	22.58 ($(\text{CH}_2)_n$)
18	0.92 m	14.2	0.85	14.04 (CH_3)

* Magn. Reson. Chem 1997;35:S133–S145.

** TRILINOLEIN(537-40-6) ^{13}C NMR[Online]. 2017.d. [cited 2020 Mar 23]; Available

from:URL:https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_537-40-6_13CNMR.htm

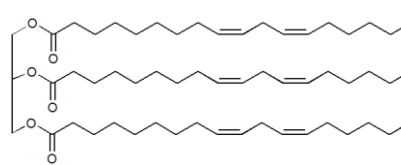
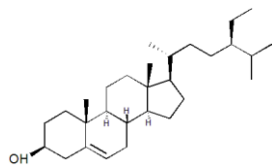
บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากการแยกสกัดสารจากดอกสุพรรณิการ์ (*C. regium*) สกัดด้วยตัวทำละลาย methanol สกัดต่อด้วย *n*-hexane, ethyl acetate และ methanol แยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีคือ quick column chromatography และ classic column chromatography พิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค nuclear magnetic resonance spectroscopy

ผลการสกัดดอกสุพรรณิการ์ด้วย methanol ของงานวิจัยนี้ได้สารสกัดร้อยละ 4.22 ซึ่งน้อยกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้⁽¹⁴⁾ อาจเกิดจากการใช้ส่วนของพืชที่แตกต่างกัน โดยในงานวิจัยนี้ใช้ส่วนของดอกทั้งหมด ส่วนในงานวิจัยก่อนหน้านี้ใช้กลีบดอกมาสกัดทำให้ร้อยละของสารสกัดต่างกัน การสกัดต่อด้วย *n*-hexane, ethyl acetate และ methanol พบร้อยละของสารสกัดด้วย *n*-hexane มากที่สุด แสดงว่าสารที่สกัดได้เป็นสารขั้วต่ำ

ผลการแยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟี พบว่าแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 2 สาร จากการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิค NMR พบว่าสารที่ 1 เป็นกลุ่มสเตียรอยด์ คือ β -sitosterol และสารที่ 2 เป็นกลุ่มไตรกลีเซอไรด์ คือ trilinolein ซึ่งเป็นสารที่มีการรายงานแล้ว จากรายงานที่ผ่านมาในพืชวงศ์ Bixaceae เคยมีรายงานการพบสาร β -sitosterol ในงานวิจัยซึ่งทำการศึกษาในเปลือกแห้ง⁽²⁷⁾ และในราก⁽¹⁹⁾ และสำหรับสาร trilinolein มีการพบรายงานของสารกลุ่ม fatty acid ในพืชวงศ์ Bixaceae ซึ่งเป็นสารกลุ่มเดียวกับ trilinolein เช่น palmitic, stearic และ linolenic acid โดยทำการศึกษาในส่วนของเมล็ด⁽³²⁾



β -Sitosterol เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและลดระดับคอเลสเตอรอล ช่วยให้อาการของทางเดินระบบปัสสาวะของผู้ป่วยต่อมลูกหมากดีขึ้น⁽²⁸⁾ ป้องกันอาการข้างเคียงจากการรักษาโดยใช้วิธีการเคมีบำบัด⁽²⁹⁾ และ trilinolein เป็นสารกลุ่ม triglyceride ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล⁽³⁰⁾ ใน

การรับประทานระยะยาวสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและความต้านทานต่ออินซูลิน นอกจากนี้ยังลดอุบัติการณ์การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ลดการเกิดเบาหวานแรกเริ่มชนิดที่ 2⁽³¹⁾

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้
 - 1.1 ได้ข้อมูลพื้นฐานของสารบริสุทธิ์จากสุพรรณิการ์ เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ต่อไป
2. ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป
 - 2.1 นำสารบริสุทธิ์ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ
 - 2.2 นำส่วนอื่น ๆ ของต้นสุพรรณิการ์ไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมีต่อ เช่น ลำต้น กิ่ง ราก ใบ

บรรณานุกรม

1. กระทรวงสาธารณสุขและองค์การภาครัฐ-เอกชน. แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ.2560-2564. นนทบุรี: กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข; 2559.
2. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. เส้นทางพัฒนาสมุนไพรไทยสู่ความยั่งยืน. Med & herb 2558;2(5):6.
3. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. กระจายดำ [อินเทอร์เน็ต]. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 11 มีนาคม 2563]; ที่มา: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=4>
4. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ขมิ้นชัน [อินเทอร์เน็ต]. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 11 มีนาคม 2563]; ที่มา: <http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=34>
5. ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. คำเงาะ [อินเทอร์เน็ต]. 2553 [เข้าถึงเมื่อ 10 กรกฎาคม 2563]; 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. คณะกรรมการฝ่ายหาทุนมูลนิธิสวนหลวง ร.9. พรรณไม้ในสวนหลวง ร.9. กรุงเทพฯ: ด้านสุทธาการพิมพ์; 2531.
17. สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยรามคำแหง. ดอกไม้ประจำมหาวิทยาลัยรามคำแหง [อินเทอร์เน็ต]. 2558 [เข้าถึงเมื่อ 11 กรกฎาคม 2563]; 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. Quím 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 Magalhães 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. รัชณี ตันตะพานิชกุล. สเปกโตรสโกปีในเคมีอินทรีย์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง; 2548.
25. ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ. UV/VIS Spectroscopy [อินเทอร์เน็ต]. n.d. [11 มีนาคม 2563]; ที่มา: <https://www.nanotec.or.th/th/งานบริการ/ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์/uvvis-spectroscopy>
26. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. เครื่อง FTIR-Raman Spectrometer [อินเทอร์เน็ต]. n.d. [11 มีนาคม 2563]; 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):1483–149.

ภาคผนวก ก

รายงานสรุปการเงิน
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2563 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากดอกสุพรรณิการ์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ดร.สุนันต์ ใจสมุทร

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 2 มิถุนายน 2563 ถึง 2 เมษายน 2564

ระยะเวลาดำเนินการ 11 เดือน ตั้งแต่วันที่ 2 มิถุนายน 2563 ถึง 2 เมษายน 2564

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100 %) 9000 บาท เมื่อ 17 กุมภาพันธ์ 2564

รายจ่าย

รายงาน	งบประมาณ ที่ตั้งไว้	งบประมาณ ที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1.ค่าตัวทำละลาย	5,200	6,200	-1,000
2.ค่าพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี	3,000	4,535	-1,535
3.ค่าปัสเตอร์	200	120	+80
4.ค่าอุปกรณ์วิทยาศาสตร์	600	481	+119
รวม	9,000	11,336	-2,336

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย