

การแยกสารอะพอร์พีนแอลคาลอยด์ออกฤทธิ์ต่อหัวใจ
จากสารสกัดไดคลอโรมีเทนของลำต้นบอระเพ็ด
Isolation of aporphine alkaloids exhibiting cardiotoxic activity
from dichloromethane extract of *Tinospora crispa* stems

ศศิกานต์ บานไม่รู้โรย สุคนธา รักดี และ อรุณรัตน์ สันธิติกวินสกุล*

โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

*arunrat28@npru.ac.th

บทคัดย่อ

แยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดไดคลอโรมีเทนของบอระเพ็ด (วงศ์เมนิสเปอร์มาซีอี) จังหวัดสุพรรณบุรี โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี ได้แก่ Vacuum Liquid Column Chromatography (VLC) และ Column Chromatography (CC) ได้ อะพอร์พีนแอลคาลอยด์ 2 ชนิด คือ Z ต่อ E ฟอร์ม อัตราส่วนเท่ากับ 2 ต่อ 1 ของ N-formylnornuciferine (1) เป็นของแข็งสีขาวและ N-formylannonaine (2) เป็นผลึกรูปเข็มใสไม่มีสี คิดเป็นร้อยละ 0.000025 และ 0.00027 เทียบกับน้ำหนักพืช ตามลำดับ รวมทั้ง stigmasterol (3) ซึ่งโครงสร้างของสารทั้งหมดพิสูจน์โดยเทคนิคสเปกโทรสโกปี ได้แก่ ¹H-NMR, IR และ MS และจุดหลอมเหลว

คำสำคัญ: บอระเพ็ด วงศ์เมนิสเปอร์มาซีอี อะพอร์พีนแอลคาลอยด์ น้ำยาตราเจนดรอฟฟ์ ออกฤทธิ์ต่อหัวใจ

Abstract

The dichloromethane extract of *Tinospora crispa* (Menispermaceae), collected from Suphan Buri Province, was isolated for pure compounds using chromatography techniques, Vacuum Liquid Column Chromatography (VLC) and Column Chromatography (CC). Two aporphine alkaloids, Z:E forms in a ratio of 2:1 of N-formylnornuciferine (1) as a white solid and N-formylannonaine (2) as a colorless needle of 0.000025 and 0.00027% yield wt of plant, respectively, were isolated together with stigmasterol (3). The structures of these compounds were elucidated by spectroscopic techniques, ¹H-NMR, IR and MS, including melting point.

Keywords: *Tinospora crispa*, Menispermaceae, aporphine alkaloid, Dragendorff's reagent, Cardiotoxic activity

1. บทนำ

บอระเพ็ด (boraped) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tinospora crispa* อยู่ในวงศ์เมนิสเปอร์มาซีอี (Menispermaceae) ชื่ออื่นๆ ได้แก่ จุ่งจริงตัวแม่ เจ็ดมูลหนาม จุ่งจิง (ภาคเหนือ) เครือเขาย้อ (จังหวัดหนองคาย) เกาหัวด้าน (จังหวัดสระบุรี) และเจ็ดหมื่นปลูก (ภาคใต้) [1] บอระเพ็ดเป็นไม้เถา สีเทาแกมเหลือง ขรุขระเป็นปุ่มปม เปลือกของเถาลอกออกได้ ลักษณะใบเป็นรูปไข่ ค่อนข้างยาว ฐานใบเป็นรูปหัวใจ ดอกมีขนาดเล็กสีเหลืองอมเขียว ดอกตัวผู้และตัวเมียแยกกันอยู่ต่างดอก ผลกลมสีเหลืองหรือแดง [2, 3]

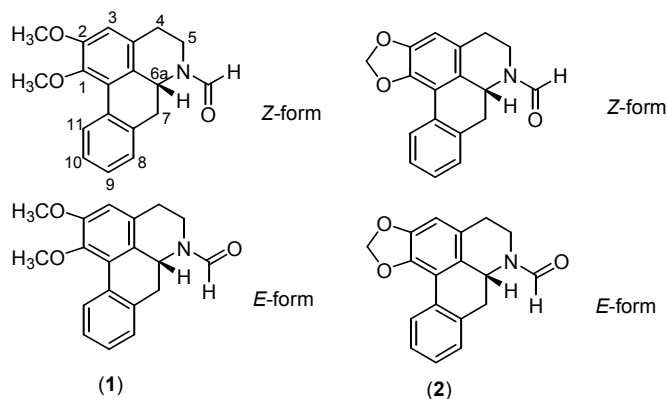
ตามตำราแพทย์แผนโบราณ บอระเพ็ดมีสรรพคุณแก้โรคฝีดาษ แก้อ่อนใน รักษาอาการร้อนใน ทำให้เจริญอาหาร ช่วยขับน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและช่วยระงับอาการระสออีก ฆ่าพยาธิในท้อง แก้อาการผื่นคัน รักษาไข้มาลาเรีย โรคผิวหนัง อหิวาตกโรค ช่วยลดความดันโลหิตสูง อาการปวดข้อและระดับน้ำตาลในเลือด [3-8] สำหรับภูมิปัญญาท้องถิ่นในประเทศไทย ชาวบ้านนำส่วนรากและเถามาตำผสมกับมะขามเปียกและเกลือ หรือนำส่วนเถามาบดเป็นผงผสมกับน้ำผึ้ง แล้วปั้นเป็น ยาลูกกลอนรับประทานก่อนนอน เป็นยาอายุวัฒนะและรักษาอาการไข้ได้ หรือทำเป็นยาดองเหล้า ดื่มครั้งละ 1 ช้อนชา เพื่อ ลดไข้และเจริญอาหาร [9]

องค์ประกอบทางเคมีในบอระเพ็ดพบสารกลุ่มแอลคาลอยด์ เช่น *N*-formylornuciferine, *N*-formylannonaine, *N*-*p*-trans-feruloyltyramine, *N*-*p*-feruloyltyramine, dehydrodoscretamine และ columbamine เป็นต้น กลุ่ม เทอร์ปีนอยด์ เช่น cycloeucalenol, cycloucalenone, baenzingeride A-B, borapetoside A-G, tinotufolin A-F และ borapetol A-B เป็นต้น กลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น 5-allyloxy-6,7,4'-trimethoxyflavone, astragalin, tinosporinone และ kaempferol เป็นต้น และกลุ่มสเตอรอยด์ เช่น 2-deoxycrustecdysone, 2-deoxy-3-epicrustecdysone, stigmasterol และ β -sitosterol เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่มลิคินิน เช่น secoisolariciresinol และ di-*O*-methylsyringaresinol เป็นต้น [3-5, 9, 10]

ตามรายงานวิจัยการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าสารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มออกฤทธิ์เพิ่มต่อหัวใจ และแยก แอลคาลอยด์ได้ 2 ชนิด (ภาพที่ 1) ได้แก่ *N*-formylornuciferine (1) ออกฤทธิ์เพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจทั้งห้อง บนขวาและซ้าย ส่วน *N*-formylannonaine (2) เพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจเฉพาะห้องบนซ้าย โดยแอลคาลอยด์ ทั้งสองไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ [3, 11] อีกทั้งยังมีรายงานว่าสามารถแยกสารทั้งสองจากสารสกัดเอทานอลจากลำต้น บอระเพ็ดอีกด้วย [12] นอกจากนี้มีรายงานว่า สารสกัดนอร์มอล-บิวทานอลมีผลต่อความดันและอัตราการเต้นของหัวใจ [13, 14] สาร cycloeucalenol และ cycloucalenone ออกฤทธิ์ต่อหัวใจ [15] สาร borapetoside A และ C ช่วยปรับระดับ น้ำตาลในเลือดให้สูงขึ้น [16-18]

ปัจจุบัน ทำบอระเพ็ดในรูปแบบซูลสำหรับลดไข้ ยาบำรุงกำลัง และแก้อาการร้อนใน [19] ยารักษาโรคกระดูก [20] อีกด้วย อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพมากขึ้น ควรจะต้องควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ เนื่องจากบอระเพ็ดจากแหล่ง ต่างๆ จะมีคุณภาพแตกต่างกัน และมีปริมาณสารสำคัญต่างๆ ไม่เท่ากัน ปัจจุบันมีวิธีการควบคุมคุณภาพของบอระเพ็ดอย่างหนึ่ง กล่าวคือ การใช้สารเอกลักษณ์สำคัญ (a marker compound) ได้แก่ 20- β -hydroxyecdysone, tinosporaside, cordioside และ columbin วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC [21]

ดังนั้นงานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกสารแอลคาลอยด์จากสารสกัดไคคลอโรมีเทนจากลำต้นบอระเพ็ด ซึ่งไคคลอโร-โรมีเทนเป็นตัวทำละลายที่มีสภาพขี้ไคลเดียวกับคลอโรฟอร์ม แต่หาซื้อง่ายและราคาถูกกว่า เพื่อจะได้นำสารแอลคาลอยด์ ที่แยกได้นั้นมาเป็นสารเอกลักษณ์สำคัญอีกชนิดหนึ่ง สำหรับการควบคุมคุณภาพของบอระเพ็ดได้ต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ *N*-formylornuciferine (1) และ *N*-formylannonaine (2)

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 วิธีการทั่วไป

จุดหลอมเหลววัดด้วยเครื่องวัดจุดหลอมเหลว ยี่ห้อ BUCHI B-540 สเปกตรัม ¹H-NMR วิเคราะห์ด้วยเครื่องโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (¹H-NMR) ยี่ห้อ Bruker Avance ความถี่ 300 MHz ค่า chemical shift (δ) วัดในหน่วยของ ppm โดยใช้ตัวทำละลายโรคลอโรฟอร์ม (CDCl₃) เป็นตัวทำละลาย การแยกสัญญาณของพีคมีสัญลักษณ์ย่อ ดังนี้ s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublet, ddd = doublet of doublet of doublet, br s = broad singlet และ m = multiplet ค่า coupling constant (J) วัดในหน่วยเฮิร์ตซ์ (Hertz, Hz) สเปกตรัม IR วัดด้วยเครื่อง FTIR ยี่ห้อ Perkin Elmer system2000 โดยวิธี KBr disc แมสสเปกตรัม (mass spectrum, MS) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Mass spectrometer 5989B ยี่ห้อ Hewlet Packard การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบและส่วนสารสกัด (fraction, fr) เฉพาะที่เกิดผลบวก (positive (+v) test) หลังจากฉีดพ่นด้วยน้ำยาตราเจนดรอพฟ์เท่านั้น ด้วยซิลิกาเจล ชนิด Kiesel gel 60 HF₂₅₄₊₃₆₆ No. 7748 (ยี่ห้อ Merck) สำหรับเทคนิค Vacuum Liquid Column Chromatography (VLC) ซิลิกาเจล ชนิด Kiesel HF₂₅₄₊₃₆₆ No. 7734 (ยี่ห้อ Merck) สำหรับเทคนิค Column Chromatography (CC) การรวม frs ต่างๆ จากคอลัมน์ด้วยแผ่น Thin-Layer Chromatography (TLC) ซิลิกาเจล 60H, F₂₅₄ (230-400 mesh) แบบแผ่นอะลูมิเนียม ยี่ห้อ Merck และใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ 50% EtOAc:CH₂Cl₂ โดยการส่องโครมาโทแกรมที่แสง UV ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แล้วค่อยฉีดพ่นด้วยน้ำยาวานิลลิน (vanillin reagent) ค่า R_f วิเคราะห์บนแผ่น TLC ซิลิกาเจล 60H, F₂₅₄ (230-400 mesh) แบบแผ่นอะลูมิเนียม ยี่ห้อ Merck การทดสอบแอลคาลอยด์โดยน้ำยาตราเจนดรอพฟ์ (Dragendroff's reagent) [22] ซึ่งเตรียมโดยละลายบิสมีซซึบไนเตรต 8 กรัม ด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร และเติมโพแทสเซียมไฮโอไดด์ 27 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร ฉีดพ่นน้ำยาบนแผ่น TLC ผล +ve test จะเกิดจุดสีส้มแดง น้ำยาวานิลลิน เตรียมโดยละลายวานิลลิน 6 กรัม ในเอทานอล 200 มิลลิลิตร และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ ลงในอ่างน้ำแข็ง ขณะกวน เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ตัวทำละลายต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (CH₂Cl₂) เอทิลอะซิเตต (EtOAc) เอทานอล (EtOH) และเมทานอล (MeOH) นำมาถนอมแบบธรรมดาให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาใช้

2.2 การสกัดและการแยกสารให้บริสุทธิ์

ตอนที่ 1 การสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดไดคลอโรมีเทน (T-SB(D)) บอระเพ็ดเก็บครั้งที่ 1

นำลำต้นบอระเพ็ดแห้ง (T-SB) จังหวัดสุพรรณบุรี น้ำหนัก 5.2 กิโลกรัม แช่ด้วยเฮกเซนที่อุณหภูมิห้อง สกัดขี้จันสารละลายใสไม่มีสี กรองเอากากบอระเพ็ดมาทิ้งให้แห้ง แล้วนำกากมาสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทน จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน จะได้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (T-SB(D)) น้ำหนัก 102.2848 กรัม (ร้อยละ 1.97)

นำสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (T-SB(D)) หนัก 49.89 กรัม มาแยกสารอย่างหยาบตามสภาพขี้ของสารโดยเทคนิค VLC ซิลิกาเจลน้ำหนัก 29.52 กรัม คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ละเอียดด้วยระบบเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขี้ระบบละ 400 มิลลิลิตร ดังนี้ 100%, hexane, 1%, 2%, 5%, 7.5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% CH₂Cl₂:hexane, 100% CH₂Cl₂, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% EtOAc:CH₂Cl₂, 100% EtOAc, 2%, 5%, 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% EtOH:EtOAc, 100% EtOH และ 100% MeOH แยกได้ทั้งหมด 65 frs จากนั้นรวม frs ที่มีรูปแบบของจุดสารบนแผ่น TLC เหมือนกันเข้าด้วยกัน ปรากฏว่าได้ 13 frs (T-SB(D)-F1 ถึง T-SB(D)-F13) หลังจากนั้นนำ T-SB(D)-F6 น้ำหนัก 2.1229 กรัม มาแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อโดยเทคนิค CC ในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลน้ำหนัก 82.67 กรัม ละเอียดด้วยระบบเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขี้ดังนี้ 20% EtOAc:hexane (2200 มิลลิลิตร), 25% EtOAc:hexane (1800 มิลลิลิตร), 30% EtOAc:hexane (2400 มิลลิลิตร), 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% EtOAc:hexane (400 มิลลิลิตร), 100% EtOH (400 มิลลิลิตร) และ 100% MeOH (400 มิลลิลิตร) แยกได้ทั้งหมด 321 frs และรวมได้ 9 frs (T-SB(D)-F6(a₁) ถึง T-SB(D)-F6(a₉)) นำ T-SB(D)-F6(a₅) น้ำหนัก 0.2381 กรัม บรรจุซิลิกาเจลน้ำหนัก 7.59 กรัม ในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ละเอียดด้วยระบบเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขี้ดังนี้ 20% EtOAc:hexane (1000 มิลลิลิตร), 25%, 30% EtOAc:hexane (200 มิลลิลิตร), 100% EtOH (100 มิลลิลิตร) และ 100% MeOH (100 มิลลิลิตร) แยกได้ทั้งหมด 405 frs แล้ว สามารถรวมได้ 7 frs (T-SB(D)-F6(a₅)-b₁

ถึง T-SB(D)-F6(a₅)-b₇) หลังจากนั้นนำ T-SB(D)-F6(a₅)-b₄ น้ำหนัก 0.0583 กรัม มาแยกสารให้บริสุทธิ์ในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลน้ำหนัก 7.997 กรัม แล้วชะคอลัมน์ด้วยระบบเฟสเคลื่อนที่ เพิ่มช่วงนี้ 50% CH₂Cl₂:hexane (400 มิลลิลิตร), 52% CH₂Cl₂:hexane (600 มิลลิลิตร), 55% CH₂Cl₂:hexane (400 มิลลิลิตร), 60%, 65%, 70%, 80%, 90% CH₂Cl₂:hexane (200 มิลลิลิตร), 100% CH₂Cl₂ (200 มิลลิลิตร), 100% EtOH (100 มิลลิลิตร) และ 100% MeOH (100 มิลลิลิตร) ได้ 699 frs สามารถรวมได้ 6 frs (T-SB(D)-F6(a₅)-b₄-c₁ ถึง T-SB(D)-F6(a₅)-b₄-c₆) โดย fr T-SB(D)-F6(a₅)-b₄-c₂ ได้ของแข็งสีขาว (1) น้ำหนัก 1.3 มิลลิกรัม (ร้อยละ 0.00025 เทียบกับน้ำหนักพืช) ค่า R_f เท่ากับ 0.42 (เฟสเคลื่อนที่ คือ 50% EtOAc:CH₂Cl₂) จุดหลอมเหลวเท่ากับ 148-149 องศาเซลเซียส มองเห็นที่ UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ +ve test กับน้ำยาตราเงินดรอพฟ์

ตอนที่ 2 การสกัดและแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดไดคลอโรมีเทน (T-SP(D)) บอระเพ็ดเก็บครั้งที่ 2

นำลำต้นบอระเพ็ดแห้ง (T-SP) จากจังหวัดสุพรรณบุรี น้ำหนัก 1.4 กิโลกรัม แช่ด้วยไดคลอโรมีเทนที่อุณหภูมิห้อง สกัดข้างสารละลายใสไม่มีสี จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศแบบหมุน ได้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (T-SP(D)) น้ำหนัก 150.0 กรัม (ร้อยละ 10.71)

นำสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (T-SP(D)) น้ำหนัก 50.56 กรัม มาแยกสารอย่างหยาบตามสภาพขั้วของสารโดยเทคนิค VLC ซิลิกาเจลน้ำหนัก 35 กรัม คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยระบบเฟสเคลื่อนที่เพิ่มช่วงระบบละ 200 มิลลิลิตร ดังนี้ 100% hexane, 1%, 5%, 7.5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% CH₂Cl₂:hexane, 100% CH₂Cl₂, 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 90% EtOAc:CH₂Cl₂, 100% EtOAc, 2% EtOH:EtOAc และ 100% MeOH แยกได้ทั้งหมด 44 frs และรวมได้ 13 frs (T-SP-F1 ถึง T-SP-F13) หลังจากนั้นนำ T-SP-F7 น้ำหนัก 1.2823 กรัม มาแยกในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลน้ำหนัก 71.5148 กรัม ด้วยระบบเฟสเคลื่อนที่เพิ่มช่วงนี้ 50% CH₂Cl₂:hexane (700 มิลลิลิตร), 55% CH₂Cl₂:hexane (1100 มิลลิลิตร), 57% CH₂Cl₂:hexane (1600 มิลลิลิตร), 60% CH₂Cl₂:hexane (800 มิลลิลิตร), 70%, 80%, 90% CH₂Cl₂:hexane (200 มิลลิลิตร), 100% CH₂Cl₂ (200 มิลลิลิตร), 10% EtOAc:CH₂Cl₂ (400 มิลลิลิตร), 20% EtOAc:CH₂Cl₂ (800 มิลลิลิตร), 30% EtOAc:CH₂Cl₂ (200 มิลลิลิตร), 100% EtOH (200 มิลลิลิตร) และ 100% MeOH (800 มิลลิลิตร) ได้ 304 frs และรวมได้ 12 frs (T-SP-F7(a₁) ถึง T-SP-F7(a₁₂)) ซึ่ง T-SP-F7(a₄) ได้ของแข็งสีขาว (3) จากนั้นนำมาตกผลึกด้วยเมทานอล ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว น้ำหนัก 101.4 มิลลิกรัม (ร้อยละ 0.00724 เทียบกับน้ำหนักพืช) ค่า R_f เท่ากับ 0.34 (เฟสเคลื่อนที่ คือ 10% EtOAc:CH₂Cl₂) จุดหลอมเหลวเท่ากับ 136-139 องศาเซลเซียส มองไม่เห็นที่ UV ทั้งความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และ negative test (-ve test) กับน้ำยาตราเงินดรอพฟ์ และ T-SP-F7(a₇) ได้ของแข็งสีขาว (2) ตกผลึกด้วยเอทานอล ได้ผลึกรูปเข็มใสไม่มีสี น้ำหนัก 3.8 มิลลิกรัม (ร้อยละ 0.00027 เทียบกับน้ำหนักพืช) ค่า R_f เท่ากับ 0.46 (เฟสเคลื่อนที่ คือ 50% EtOAc:CH₂Cl₂) จุดหลอมเหลวเท่ากับ 250-252 องศาเซลเซียส มองเห็นที่ UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ +ve test กับน้ำยาตราเงินดรอพฟ์

N-formylornuciferine (Z:E forms = 2:1) (1): ของแข็งสีขาว น้ำหนัก 1.3 มิลลิกรัม (ร้อยละ 0.00025 เทียบกับน้ำหนักพืช) คุณสมบัติละลายในไดคลอโรมีเทน จุดหลอมเหลวเท่ากับ 148-149 องศาเซลเซียส ค่า R_f เท่ากับ 0.42 (เฟสเคลื่อนที่ คือ 50% EtOAc:CH₂Cl₂) เห็นที่ UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ +ve test กับน้ำยาตราเงินดรอพฟ์ กับน้ำยาตราเงินดรอพฟ์ IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 2930, 1660, 1590, 1525, 1400, 1320, 1260, 1240, 1150, 1110, 1040, 905, 795, 765, 650 EI-MS *m/z* (%); 309 ([M⁺], 63), 264 (8), 252 (19), 251 (100), 237 (6), 235 (4), 208 (3), 207 (3), 194 (2), 178 (3), 165 (4)

¹H-NMR (Z-form, CDCl₃, 300 MHz) ให้สัญญาณที่ δ (ppm) 2.70-3.00 (m, 1H, H-4eq), 2.95 (ddd, 1H, *J*=13.56, 12.9, 4.41 Hz, H-4ax), 3.14 (dd, 1H, *J*=12.9, 4.23 Hz, H-7eq), 3.10-3.24 (m, 1H, H-7ax), 3.44 (ddd, 1H, *J*=12.62, 12.9, 2.82 Hz, H-5ax), 3.69 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.92 (s, 3H, 2-OCH₃), 3.86 (ddd, 1H, *J*=12.62, 4.41, 1.8 Hz, H-5eq), 4.94 (dd, 1H, *J*=13.71, 4.23 Hz, H-6a), 6.68 (s, 1H, H-3), 7.24-7.40 (m, 3H, H-8, H-9, H-10), 8.28 (s, 1H, -CHO), 8.44 (d, 1H, *J*=6.57 Hz, H-11)

¹H-NMR (E-form, CDCl₃, 300 MHz) ให้สัญญาณที่ δ (ppm) 2.70-3.00 (m, 3H, H-4ax, H-4eq, H-7ax), 2.83 (dd, 1H, *J*=13.9, 3.97 Hz, H-7eq), 3.16 (ddd, 1H, *J*=12.02, 11.08, 4.13 Hz, H-5ax), 3.69 (s, 3H, 1-OCH₃), 3.92 (s, 3H, 2-OCH₃), 4.45 (ddd, 1H, *J*=12.02, 4.1, 4.3 Hz, H-5eq), 4.52 (dd, 1H, *J*=14.01, 3.97 Hz, H-6a), 6.71 (s, 1H, H-3), 7.24-7.40 (m, 3H, H-8, H-9, H-10), 8.41 (s, 1H, -CHO), 8.46 (d, 1H, *J*=7.35 Hz, H-11)

N-formylannonaine (*Z:E* forms = 2:1) (2): ผลึกรูปเข็มใสไม่มีสี 3.8 มิลลิกรัม (ร้อยละ 0.00027 เทียบกับน้ำหนักพืช) ตกผลึกด้วยเอทานอล คุณสมบัติละลายในไดคลอโรโรมีเทน จุดหลอมเหลวเท่ากับ 250-252 องศาเซลเซียส ค่า R_f เท่ากับ 0.46 (เฟสเคลื่อนที่ คือ 50% EtOAc:CH₂Cl₂) เห็นที่ UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ +ve test กับ น้ำยาดราเจนดรอพฟ์ IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 2870, 1655, 1565, 1590, 1425, 1395, 1280, 1255, 1220, 1200, 1180, 1145, 1040, 935, 910, 850, 780, 740, 730, 640 EI-MS m/z (%): 293 ([M⁺], 46), 263 (1), 262 (1), 249 (1), 248 (6), 237 (2), 236 (19), 235 (100), 206 (1), 205 (1), 204 (2), 190 (1), 189 (1), 179 (4), 178 (6), 177 (4), 176 (6), 167 (1), 165 (2), 152 (2), 151 (3), 149 (4)

¹H-NMR (*Z*-form, CDCl₃, 300 MHz) ให้สัญญาณที่ δ (ppm) 2.67-2.87 (m, 3H, H-4ax, H-4eq, H-7ax), 3.17 (dd, 1H, $J=14.1, 4.35$ Hz, H-7eq), 3.34 (ddd, 1H, $J=12.6, 12.4, 2.9$ Hz, H-5ax), 3.75 (ddd, 1H, $J=12.6, 4.4, 1.9$ Hz, H-5eq), 4.98 (dd, 1H, $J=14.1, 4.35$ Hz, H-6a), 5.91 (d, 1H, $J=1.35$ Hz, O-CH₂-O), 6.03 (d, 1H, $J=1.35$ Hz, O-CH₂-O), 6.52 (s, 1H, H-3), 7.15-7.31 (m, 3H, H-8, H-9, H-10), 8.02 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-11), 8.19 (s, 1H, -CHO)

¹H-NMR (*E*-form, CDCl₃, 300 MHz) ให้สัญญาณที่ δ (ppm) 2.67-2.87 (m, 2H, H-4ax, H-4eq), 2.79 (dd, 1H, $J=12.45, 4.55$ Hz, H-7eq), 2.90-3.10 (m, 2H, H-5ax, H-7ax), 4.40 (ddd, 1H, $J=12.6, 3.7, 3.7$ Hz, H-5eq), 4.56 (dd, 1H, $J=12.45, 4.55$ Hz, H-6a), 5.91 (d, 1H, $J=1.35$ Hz, O-CH₂-O), 6.04 (d, 1H, $J=1.35$ Hz, O-CH₂-O), 6.54 (s, 1H, H-3), 7.15-7.31 (m, 3H, H-8, H-9, H-10), 8.04 (d, 1H, $J=7.5$ Hz, H-11), 8.29 (s, 1H, -CHO)

stigmasterol (3) ผลึกรูปเข็มสีขาว 101.4 มิลลิกรัม ตกผลึกด้วยเมทานอล (ร้อยละ 0.00724 เทียบกับน้ำหนักพืช) ละลายในไดคลอโรโรมีเทน จุดหลอมเหลวเท่ากับ 136-139 องศาเซลเซียส ค่า R_f เท่ากับ 0.34 (เฟสเคลื่อนที่ คือ 10% EtOAc:CH₂Cl₂) ไม่เห็น UV ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ -ve test กับน้ำยาดราเจนดรอพฟ์ IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3433, 2936, 1461, 1376, 1057 ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) ให้สัญญาณที่ δ (ppm) 0.65-2.3 (m, 28H, H-1, H-2, H-4, H-7, H-8, H-9, H-11 ถึง H-12, H-14 ถึง H-17, H-20, H-24, H-25, H-28 ถึง H-29), 0.67 (s, 3H, CH₃-18), 0.81 (d, 3H, $J=7.4$ Hz, CH₃-26), 0.85 (d, 3H, $J=7.4$ Hz, CH₃-27), 0.91 (d, 3H, $J=6.4$ Hz, CH₃-21), 1.0 (s, 3H, CH₃-19), 3.51 (m, 1H, H-3), 5.03 (dd, 1H, $J=14.4, 8.4$ Hz, H-23), 5.13 (dd, 1H, $J=14.4, 8.4$ Hz, H-22), 5.35 (br s, 1H, H-6)

3. ผลการดำเนินงานและวิจารณ์

สารบริสุทธิ์ 1 แยกจากส่วนสารสกัด T-SB(D)-F6(a₅)-b₂-c₂ เป็นของแข็งสีขาว จุดหลอมเหลวเท่ากับ 148-149 องศาเซลเซียส มองเห็นที่แสงในช่วงความยาวคลื่น UV และติดสีส้มแดงหลังจากทดสอบกับน้ำยาดราเจนดรอพฟ์ แสดงว่าเป็นแอลคาลอยด์ พิสูจน์โครงสร้างของแอลคาลอยด์ 1 ดังนี้

วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยสเปกตรัม IR พบว่า ที่ความถี่ (ν_{\max}) 1622 cm⁻¹ แสดงแถบการดูดกลืนของหมู่คาร์บอนิล (C=O) ของหมู่แอลดีไฮด์ (-CHO) ที่อยู่ถัดจากไนโตรเจนอะตอม และ ν_{\max} 1170, 1146 และ 1033 cm⁻¹ เป็นแถบการยืด (stretching) ของ C-O

สเปกตรัม ¹H-NMR ใน CDCl₃ พบว่า จำนวนโปรตอน (integral) ของหมู่ฟอร์มิล (N-CHO) เกิดแรงแซนแนซที่ δ 8.28 (s) และ 8.41 (s) แสดงว่าสาร 1 เป็นสารผสมระหว่าง *Z* ต่อ *E* ฟอร์มในอัตราส่วน เท่ากับ 2 ต่อ 1 โดยหมู่เมธอกซิล (-OCH₃) 2 หมู่ ของทั้งสองฟอร์มเกิดสัญญาณ singlet ที่ δ 3.69 (6H) และ 3.92 (6H) สัญญาณโปรตอนบนวงอะโรมาติกที่ δ 8.44 (d, 1H, $J=6.57$ Hz) และ 8.46 (d, 1H, $J=7.35$ Hz) เป็นของ H-11 ของ *Z* ต่อ *E* ฟอร์ม ตามลำดับ โดยเกิดการคัปปลิง (coupling) กับ H-10 สัญญาณ singlet ที่ δ 6.68 (1H) และ 6.71 (1H) เป็นของ H-3 ของ *Z* ต่อ *E* ฟอร์ม ตามลำดับ ส่วนโปรตอนอะโรมาติกที่เหลือ ได้แก่ H-8, H-9 และ H-10 ของทั้งสองฟอร์มจะเกิดแรงแซนแนซในช่วง δ 7.24-7.40 (m, 6H) โปรตอนที่ตำแหน่ง 6a (H_{6a}) จะ coupling กับ H-7 ทั้งตำแหน่งแอกเซียล (axial, ax) และอีควอทอเรียล (equatorial, eq) ที่ δ 4.94 (dd, 1H, $J_{6a-7ax}=13.71$ Hz, $J_{6a-7eq}=4.23$ Hz) และ 4.52 (dd, 1H, $J_{6a-7ax}=14.10$ Hz, $J_{6a-7eq}=3.97$ Hz) ของ *Z* ต่อ *E* ฟอร์ม ตามลำดับ ซึ่ง H-7eq จะเกิดการ coupling กับโปรตอน H-6a และ H-7ax เกิดสัญญาณ doublet of doublet ที่ δ 3.14 ($J_{7eq-7ax}=12.9$ Hz, $J_{7eq-6a}=4.23$ Hz) และ δ 2.83 ($J_{7eq-7ax}=13.9$ Hz, $J_{7eq-6a}=3.97$ Hz) ของ *Z* ต่อ *E* ฟอร์ม ตามลำดับ ส่วนสัญญาณโปรตอนเมทิลีน (methylene, -CH₂-) ที่เหลือ ดังตารางที่ 1

ดังนั้น จากข้อมูลข้างต้น และยืนยันจากข้อมูลแมสสเปกตรัมที่แสดงมวลโมเลกุล $[M^+]$ เท่ากับ 309 กับเอกสารอ้างอิง [12] จึงสรุปว่าสาร 1 เป็นอะพอร์พินแอลคาลอยด์ชื่อ *N*-formylornuciferine *Z* ต่อ *E* พอร์ม อัตราส่วนเท่ากับ 2 ต่อ 1

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 1 จาก ¹H-NMR spectrum 300 MHz ใน CDCl₃

Proton	<i>N</i> -Formylornuciferine [12] (400 MHz)		สารบริสุทธิ์ 1 (300 MHz)	
	<i>Z</i> -from δ (ppm), Spin coupling <i>J</i> (Hz)	<i>E</i> -from δ (ppm), Spin coupling <i>J</i> (Hz)	<i>Z</i> -from δ (ppm), Spin coupling <i>J</i> (Hz)	<i>E</i> -from δ (ppm), Spin coupling <i>J</i> (Hz)
H-3	6.47, s	6.68, s	6.68, s	6.71, s
H-4ax	2.91, ddd <i>J</i> _{4ax-4eq} 15.2 <i>J</i> _{4ax-5ax} 12.4 <i>J</i> _{4ax-5eq} 4.4	2.95-2.70, m	2.95, ddd <i>J</i> _{4ax-4eq} 13.56 <i>J</i> _{4ax-5ax} 12.9 <i>J</i> _{4ax-5eq} 4.41	2.70-3.00, m
H-4eq	2.75, dd <i>J</i> _{4eq-4ax} 15.2 <i>J</i> _{4eq-5ax} 2.8 (<i>J</i> _{4eq-5eq} 1.6)	2.95-2.70, m	2.70-3.00, m	2.70-3.00, m
H-5ax	3.40, ddd <i>J</i> _{5ax-5eq} 12.4 <i>J</i> _{5ax-4ax} 12.4 <i>J</i> _{5ax-4eq} 2.8	3.16, ddd <i>J</i> _{5ax-5eq} 12.4 <i>J</i> _{5ax-4ax} 10.4 <i>J</i> _{5ax-4eq} 4.0	3.44, ddd <i>J</i> _{5ax-5eq} 12.62 <i>J</i> _{5ax-4ax} 12.9 <i>J</i> _{5ax-4eq} 2.82	3.16, ddd <i>J</i> _{5ax-5eq} 12.04 <i>J</i> _{5ax-4ax} 11.08 <i>J</i> _{5ax-4eq} 4.13
H-5eq	3.79, ddd <i>J</i> _{5eq-5ax} 12.4 <i>J</i> _{5eq-4ax} 4.4 <i>J</i> _{5eq-4eq} 1.6	4.41, ddd <i>J</i> _{5eq-5ax} 12.4 <i>J</i> _{5eq-4ax} 4.4 <i>J</i> _{5eq-4eq} 3.6	3.86, ddd <i>J</i> _{5eq-5ax} 12.62 <i>J</i> _{5eq-4ax} 4.41 <i>J</i> _{5eq-4eq} 1.8	4.45, ddd <i>J</i> _{5eq-5ax} 12.02 <i>J</i> _{5eq-4ax} 4.1 <i>J</i> _{5eq-4eq} 4.3
H-6a	4.92, dd <i>J</i> _{6a-7ax} 13.6 <i>J</i> _{6a-7eq} 4.2	4.48, dd <i>J</i> _{6a-7ax} 14.0 <i>J</i> _{6a-7eq} 4.0	4.94, dd <i>J</i> _{6a-7ax} 13.71 <i>J</i> _{6a-7eq} 4.23	4.52, dd <i>J</i> _{6a-7ax} 14.01 <i>J</i> _{6a-7eq} 3.97
H-7ax	2.78, dd <i>J</i> _{7ax-7eq} 13.7 <i>J</i> _{7ax-6a} 13.6	3.11, dd <i>J</i> _{7ax-7eq} 14.0 <i>J</i> _{7ax-6a} 14.0	3.10-3.24, m	2.70-3.00, m
H-7eq	3.11, dd <i>J</i> _{7eq-7ax} 13.6 <i>J</i> _{7eq-6a} 4.2	2.79, dd <i>J</i> _{7eq-7ax} 14.0 <i>J</i> _{7eq-6a} 4.0	3.14, dd <i>J</i> _{7eq-7ax} 12.9 <i>J</i> _{7eq-6a} 4.23	2.83, dd <i>J</i> _{7eq-7ax} 13.9 <i>J</i> _{7eq-6a} 3.97
H-8	7.26, m	7.36-7.23, m	7.24-7.40, m	7.24-7.40, m
H-9	7.23, ddd <i>J</i> ₉₋₈ 7.8 <i>J</i> ₉₋₁₀ 6.8 <i>J</i> ₉₋₁₁ 1.2	7.36-7.23, m	7.24-7.40, m	7.24-7.40, m
H-10	7.30, m <i>J</i> ₁₀₋₁₁ 6.8 <i>J</i> ₁₀₋₉ 8.0 <i>J</i> ₁₀₋₈ 2.0 <i>J</i> 0.8	7.36-7.23, m	7.24-7.40, m	7.24-7.40, m
H-11	8.40, dd <i>J</i> ₁₁₋₁₀ 8.0, <i>J</i> ₁₁₋₉ 1.2	8.42, dd <i>J</i> ₁₁₋₁₀ 8.0, <i>J</i> ₁₁₋₉ 0.8	8.44, d <i>J</i> ₁₁₋₁₀ 6.57	8.46, d <i>J</i> ₁₁₋₁₀ 7.35
1-OCH ₃	3.67, s	3.67, s	3.69, s	3.69, s
2-OCH ₃	3.88, s	3.89, s	3.92, s	3.92, s
-CHO	8.25, d, <i>J</i> 0.8	8.37, s	8.28, s	8.41, s

สารบริสุทธิ์ 2 จาก T-SP-F7(a₇) เป็นผลึกรูปเข็มใสไม่มีสี ตกผลึกด้วยเอทานอล จุดหลอมเหลวเท่ากับ 250-252 องศาเซลเซียส และเกิดผลบวกกับน้ำยาตรวจตรวจสีฟ แสดงว่าเป็นแอลคาลอยด์ พิสูจน์โครงสร้าง ดังนี้

สเปกตรัม IR ที่ความถี่ (ν_{\max}) 1655 cm⁻¹ แสดงแถบการดูดกลืนของหมู่คาร์บอนิลของหมู่ -CHO ที่อยู่ถัดจากไนโตรเจนอะตอม และ ν_{\max} 1180, 1145 และ 1075 cm⁻¹ เป็นแถบของ C-O stretching สำหรับสเปกตรัม ¹H-NMR ใน CDCl₃ ของสาร 2 คล้ายกับ *N*-formylornuciferine (1) แสดงว่าเป็นอนุพันธ์อะพอร์พินแอลคาลอยด์ กล่าวคือ เกิดเรโซแนนซ์ที่ δ 8.19 (s) และ 8.29 (s) แสดงว่าเป็นสารผสมระหว่าง *Z* ต่อ *E* พอร์ม อัตราส่วนเท่ากับ 2 ต่อ 1 เรโซแนนซ์ของโปรตอน methylene (-O-CH₂-O-)

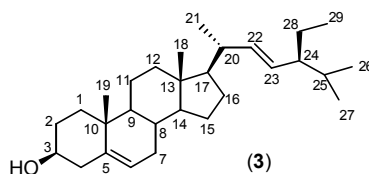
2 ตัว เกิด coupling ซึ่งกันและกัน เรียกว่า เจมินัลคัปปลิง (geminal coupling) มีค่า J_{gem} เท่ากับ 1.35 Hz เกิดสัญญาณเป็น doublet ที่ δ 6.03 (1H) และ 5.91 (1H) ของ Z พอร์ม และที่ δ 6.04 (1H) และ 5.91 (1H) ของ E พอร์ม

ดังนั้น จะเห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบจุดหลอมเหลว สเปกตรัม IR และ ¹H-NMR รวมทั้งข้อมูล MS ที่ [M⁺] เท่ากับ 293 กับเอกสารอ้างอิง [12] จึงสรุปว่าสาร 2 คือ อะพอร์พินแอลคาลอยด์ชื่อ N-formylannonaine (2) Z ต่อ E พอร์ม อัตราส่วน เท่ากับ 2 ต่อ 1 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 2 จาก ¹H-NMR spectrum 300 MHz ใน CDCl₃

Proton	N-Formylannonaine [12] (400 MHz)		สารบริสุทธิ์ 2 (300 MHz)	
	Z-from δ (ppm), Spin coupling J (Hz)	E-from δ (ppm), Spin coupling J (Hz)	Z-from δ (ppm), Spin coupling J (Hz)	E-from δ (ppm), Spin coupling J (Hz)
H-3	6.55, d, $J_{0.6}$	6.59, s	6.52, s	6.54, s
H-4ax	2.84, ddd $J_{4ax-4eq}$ 15.5 $J_{4ax-5ax}$ 12.6 $J_{4ax-5eq}$ 4.5 J 1.7	2.8-2.7, m	2.67-2.87, m	2.67-2.87, m
H-4eq	2.69, dd $J_{4eq-4ax}$ 15.5 $J_{4eq-5ax}$ 3.0 ($J_{4eq-5eq}$ 1.9)	2.8-2.7, m	2.67-2.87, m	2.67-2.87, m
H-5ax	3.37, ddd $J_{5ax-5eq}$ 12.6 $J_{5ax-4ax}$ 12.6 $J_{5ax-4eq}$ 3.0	3.07, ddd $J_{5ax-5eq}$ 12.9 $J_{5ax-4ax}$ 11.1 $J_{5ax-4eq}$ 3.6	3.34, ddd $J_{5ax-5eq}$ 12.6 $J_{5ax-4ax}$ 12.4 $J_{5ax-4eq}$ 2.9	2.90-3.10, m
H-5eq	3.79, ddd $J_{5eq-5ax}$ 12.6 $J_{5eq-4ax}$ 4.5 $J_{5eq-4eq}$ 1.9	4.55, ddd $J_{5eq-5ax}$ 12.9 $J_{5eq-4ax}$ 4.5 $J_{5eq-4eq}$ 3.3	3.75, ddd $J_{5eq-5ax}$ 12.6 $J_{5eq-4ax}$ 4.4 $J_{5eq-4eq}$ 1.9	4.40, ddd $J_{5eq-5ax}$ 12.6 $J_{5eq-4ax}$ 3.7 $J_{5eq-4eq}$ 3.7
H-6a	5.02, dd J_{6a-7ax} 14.0 J_{6a-7eq} 4.5	4.58, dd J_{6a-7ax} 14.5 J_{6a-7eq} 4.2	4.98, dd J_{6a-7ax} 14.1 J_{6a-7eq} 4.35	4.56, dd J_{6a-7ax} 12.45 J_{6a-7eq} 4.55
H-7ax	2.79, dd $J_{7ax-7eq}$ 14.0 J_{7ax-6a} 14.0	3.14, dd $J_{7ax-7eq}$ 14.5 J_{7ax-6a} 14.5	2.67-2.87, m	2.90-3.10, m
H-7eq	3.21, dd $J_{7eq-7ax}$ 14.0 J_{7eq-6a} 4.5	2.83, dd $J_{7eq-7ax}$ 14.5 J_{7eq-6a} 4.2	3.17, dd $J_{7eq-7ax}$ 14.1 J_{7eq-6a} 4.35	2.79, dd $J_{7eq-7ax}$ 12.45 J_{7eq-6a} 4.55
H-8	7.25, m	7.3-7.2, m	7.15-7.31, m	7.15-7.31, m
H-9	7.20, ddd J_{9-8} 7.5 J_{9-10} 6.9 J_{9-11} 1.2	7.3-7.2, m	7.15-7.31, m	7.15-7.31, m
H-10	7.30, ddd J_{10-11} 7.8 J_{10-9} 6.9 J_{10-8} 1.8 J 0.9	7.3-7.2, m	7.15-7.31, m	7.15-7.31, m
H-11	8.08, ddd J_{11-10} 7.8 J_{11-9} 0.9 J_{11-8} 0.75	8.09, ddd J_{11-10} 7.8 J_{11-9} 0.9 J_{11-8} 0.75	8.02, d J_{11-10} 7.8	8.04, dd J_{11-10} 7.5
O-CH ₂ -O	6.07, d J_{gem} 0.6	6.09, d J_{gem} 1.5	6.03, d J_{gem} 1.35	6.04, d J_{gem} 1.35
O-CH ₂ -O	5.95, d J_{gem} 0.6	5.96, d J_{gem} 1.5	5.91, d J_{gem} 1.35	5.91, d J_{gem} 1.35
-CHO	8.24, d J 1.2	8.37, s	8.19, s	8.29, s

สารบริสุทธิ์ 3 จาก T-SP-F7(a₄) และ T-SP-F8(a₂) เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว หลังจากตกผลึกด้วยเมทานอล ค่า R_f เท่ากับ 0.34 (เฟสเคลื่อนที่ คือ 10% EtOAc:CH₂Cl₂) จุดหลอมเหลวเท่ากับ 136-139 องศาเซลเซียส บนแผ่น TLC มองไม่เห็นจุดสารภายใต้แสง UV ทั้งความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร แสดงว่าไม่มีนิวเคลียสของวงอะโรมาติก และ/หรือหมู่คาร์บอนิล และ/หรือระบบคอนจูเกตในโครงสร้าง และไม่ติดสีส้มแดงหลังฉีดพ่นน้ำยาตราเงินครอพอฟ แสดงว่าสาร **3** ไม่เป็นแอลคาลอยด์ สำหรับสเปกตรัม ¹H-NMR พบว่าเกิดเรโซแนนซ์ที่ δ 5.03 (dd, 1H, $J=14.4, 8.4$ Hz) และ 5.13 (dd, 1H, $J=14.4, 8.4$ Hz) ของโปรตอนตำแหน่งที่ 23 และ 22 ตามลำดับ ที่ δ 3.51 (m, 1H, H-3) และ 5.35 (br s, 1H, H-6) ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวและเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง [23, 24] จึงคาดว่าสาร **3** เป็นสเตอรอยด์ ชื่อว่า stigmasterol ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ stigmasterol (3)

4. สรุป

สารแอลคาลอยด์ *N*-formylornuciferine ($Z:E = 2:1$) ร้อยละ 0.000025 เทียบกับน้ำหนักพืช และ *N*-formylannonaine ($Z:E = 2:1$) ร้อยละ 0.00027 เทียบกับน้ำหนักพืช แยกได้จากสารสกัดหยาดโคคลอโรมีเทนจากบอระเพ็ด ซึ่งสารแอลคาลอยด์ทั้งสองออกฤทธิ์เพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ แต่ไม่เพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ [3, 11] โดยจะได้นำมาเป็นสารเอกลักษณ์สำคัญสำหรับการตรวจสอบคุณภาพทั้งจากแหล่งวัตถุดิบและแคปซูลบอระเพ็ดหรือผลิตภัณฑ์อื่นที่มีบอระเพ็ดเป็นส่วนประกอบต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณอาจารย์ ดร.พัลลภ คັນธิยงค์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความอนุเคราะห์สเปกตรัม ¹H-NMR

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Smitinand T., "Thai Plant Names (Botanical Name – Vernacular Names)", 3rd ed., Bangkok, Funny Publishing, 1980.
- [2] จิตระ บัวผัน, "เรียนรู้เรื่องสมุนไพร", กรุงเทพฯ, เซเว่น พรินติ้ง กรุ๊ป, 2548.
- [3] Sunthitikawinsakul A., "Part I: Isolation of Active Constituents with Antimycobacterial, Antifungal and Anti-HIV-1 Activities from *Clausena excavata* Burm.f (Rutaceae). Part II: Isolation of Active Constituents with Cardiotonic and Anti-HIV-1 Activities from *Tinospora crispa* Miers. (Menispermaceae)", Doctor of Philosophy (Chemistry), Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, 2005.
- [4] Bertani S, *et al.*, "Evaluation of French Guiana Traditional Antimalarial Remedies", *Journal of Ethnopharmacology*, 98 (1-2), 2005, pp. 45-54.
- [5] Hussin M.H., Kassim M.J., Razali N.N., Dahon N.H. and Nasshorudin D.D., "The Effect of *Tinospora crispa* Extracts as a Natural Mild Steel Corrosion Inhibitor in 1 M HCl Solution", *Aranbian Journal of Chemistry*, 2011, doi: 10.1016/j.arabjc.2011.07.002. (paper in press)

- [6] งามผ่อง คงคาทิพย์และคณะ, “การสกัด การทดสอบการออกฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดและการทดสอบพิษเฉียบพลัน”, วารสารการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ครั้งที่ 42, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 3-6 กุมภาพันธ์ 2547, หน้า 279-288.
- [7] Sangsuwan C., *et al.*, “Randomized Controlled Trial of *Tinospora crispa* for Additional Therapy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus”, *Journal of the Medical Association of Thailand*, 87 (5), 2004, pp. 543-546.
- [8] สดุดี รัตนจรัสโรจน์ และคณะ, “ผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดและความปลอดภัยของบอระเพ็ดในอาสาสมัครคนไทยปกติ”, วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, เมษายน-มิถุนายน 2547, หน้า 72-88.
- [9] จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก, “สมุนไพรบำบัดเบาหวาน” (พิมพ์ครั้งที่ 2), กรุงเทพฯ, เซเวน พรินต์ติ้ง กรุ๊ป, 2552.
- [10] Choudhary M.I., *et al.*, “Cis-Clerodane-Type Furanoditerpenoids from *Tinospora crispa*”, *Journal of Natural Products*, 73, 2010, pp. 541-547.
- [11] งามผ่อง คงคาทิพย์และคณะ, “การสกัดและการแยกสารออกฤทธิ์เพิ่มแรงบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ Feruloyl Tyramine จากบอระเพ็ด”, วารสารการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ครั้งที่ 39, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 5-7 กุมภาพันธ์ 2544, หน้า 168-173.
- [12] Pachaly P., Adman A.Z. and Will G., “NMR-Assignment of *N*-Acetyl Aporphine Alkaloid of *Tinospora crispa*”, *Planta Medica*, 58, 1992, pp. 184-187.
- [13] Praman S., *et al.*, “Effects of an n-Butanol Extract from the Stem of *Tinospora crispa* on Blood Pressure and Heart Rate in Anesthetized Rats”, *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 2011, pp. 675-686.
- [14] _____, “Hypotensive and Cardio-Chronotropic Constituents of *Tinospora crispa* and Mechanism of Action on the Cardiovascular system in Anesthetized Rats”, *Journal of Ethnopharmacology*, 140, 2012, pp. 166-178.
- [15] Kongkathip N., Dhumma-upakorn P., Kongkathip B., Chawanorasest K., Sangchomkao P. and Hatthakitpanichakul S., “Study on Cardiac Contractility of Cycloeucalenol and Cycloeucalenone Isolated from *Tinospora crispa*”, *Journal of Ethnopharmacology*, 83, 2002, pp. 95-99.
- [16] Ruan C.-T., *et al.*, “Borapetoside C from *Tinospora crispa* Improves Insulin Sensitivity in Diabetic Mice”, *Phytomedicine*, 19, 2012, pp. 719-724.
- [17] Lam S.-H., *et al.*, “Hypoglycemic Diterpenoids from *Tinospora crispa*”, *Journal of Natural Products*, 75, 2012, pp. 153-159.
- [18] Ruan C.-T., Lam S.-H., Lee S.-S. and Su M.-J., “Hypoglycemic Action of Borapetoside A from the Plant *Tinospora crispa* in Mice”, *Phytomedicine*, 2013, doi: 10.1016/j.phymed.2013.02.009 (in press).
- [19] Chintalwar G.J., *et al.*, “A Process for Preparation of an Immunomodulator from the Ayurvedic Medicinal Plant Gulvel (*Tinospora*)”, Indian Patent, IN 1998-B056, 2000.
- [20] Xuan H., “Chinese Medicinal Paste for Treating Fracture”, China Patent, CN 2005-10011051, 2006.
- [21] Ahmed S.M., Manhas L.R., Verma V. and Khajuria R.K., “Quantitative Determination of Four Constituents of *Tinospora* spp. by a Reversed Phase HPLC-UV-DAD Method Broad-Based Studies Revealing Variation Content of Four Secondary Metabolites in the Plant from Different Eco-Geographical Regions of India”, *Journal of Chromatographic Science*, 44, 2006, pp. 504-509.
- [22] Wagner H. and Bladt S., “Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas” (2nd ed.), New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.
- [23] Swift L. J., “Isolation of β -sitosterol-D-glucoside from the Juice of Florida Valencia Oranges (*Citrus sinensis* L.)”, *Journal of the American Chemical Society*, 74, 1952, pp. 1099-1100.
- [24] Chawanorasest K., “Extraction and Isolation of Cardiotonic Substances from *Tinospora crispa* Miers”, Master of Science (Chemistry), Kasetsart University, Bangkok, 1999.