



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การใช้เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้าและ MS/MS  
สำหรับการสกัดและวิเคราะห์  
สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากหนอนตายหยาก

โดย ดร.พิชญา มังกรอัสวกุล และคณะ

พฤษภาคม 2557

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

# โครงการ การใช้เทคนิคการจับก่อนด้วยไฟฟ้าและ MS/MS สำหรับการสกัดและวิเคราะห์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากหนอนตายหยาก

### ผู้วิจัย

1. ดร.พิชญา มังกรอัสกุล
2. รองศาสตราจารย์ ดร. อารยา จาติเสถียร
3. รองศาสตราจารย์ ดร. ด้วง พุฒศุภกร
4. Prof. Stephen G. Pyne

### สังกัด

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาควิชาชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

School of Chemistry  
University of Wollongong, Australia

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา  
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380037

ชื่อโครงการ: การใช้เทคนิคการจับก่อนด้วยไฟฟ้าและ MS/MS สำหรับการสกัดและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากหนอนตายหยาก

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน ดร. พิชญา มังกรอัสกุล  
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อีเมล: pitchaya16@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

### บทคัดย่อ:

การแยกสารอัลคาลอยด์จากรากหนอนตายหยากที่สกัดด้วยวิธีทั่วไปและวิธีการจับก่อนด้วยไฟฟ้า (EC) พบสารอัลคาลอยด์ได้แก่ stemocurtisinol oxyprotostemonine และ stemocurtisine ในขณะที่พบสารอัลคาลอยด์ stemocurtisine และสารอัลคาลอยด์ชนิดใหม่คือ 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine จากส่วนเหนือดินของหนอนตายหยากที่สกัดด้วยวิธีทั่วไป และพบ stemocurtisine จากวิธีการจับก่อนด้วยไฟฟ้า สำหรับสารอัลคาลอยด์ทุกชนิดที่แยกได้จากการสกัดด้วยวิธีการจับก่อนด้วยไฟฟ้าจะพบว่ามีความเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารอัลคาลอยด์ที่แยกได้จากวิธีทั่วไป นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC/MS และ MS/MS พบไอออนของสารอัลคาลอยด์ที่เด่นชัด คือ pseudomolecular ion  $[M+H]^+$  และ sodium adduct ion  $[M+Na]^+$  ของ oxyprotostemonine (M.W. = 431) ที่ m/z เท่ากับ 432 และ 454, stemocurtisine (M.W. = 347) ที่ m/z 348 และ 370 และ stemocurtisinol (M.W. = 405) ที่ m/z 406 และ 428 ตามลำดับ สำหรับรูปแบบการแตกตัวของน้ำหนักโมเลกุลที่เป็นเอกลักษณ์ของสารอัลคาลอยด์เหล่านี้จากเทคนิค MS/MS สามารถใช้แปลผลฟิสิกซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสารอัลคาลอยด์ไม่ทราบชนิดที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้

คำหลัก: สารอัลคาลอยด์จากหนอนตายหยาก การจับก่อนด้วยไฟฟ้า  
การสกัดสารอัลคาลอยด์

## Abstract

---

**Project Code :** MRG5380037

**Project Title :** Utilization of Electrocoagulation and MS/MS Techniques for Isolation and Analysis of Bioactive Compounds from *Stemona* plants.

**Investigator :** Dr. Pitchaya Mungkornasawakul

**E-mail Address :** pitchaya16@gmail.com

**Project Period :** 2 years

### Abstract:

---

Isolation of *Stemona* alkaloids from *Stemona curtisii* root extract using conventional and electrocoagulation (EC) methods gave the *Stemona* alkaloids; stemocurtisinol, oxyprotostemonine and stemocurtisine. Whereas, stemocurtisine and a new alkaloid, 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine were obtained from the aerial extract using conventional method and stemocurtisine was only obtained by EC method. Isolation using EC method results in an increased yield of all alkaloids compared with conventional method. In addition, analysis of stemocurtisinol, oxyprotostemonine and stemocurtisine using LC/MS and MS/MS under optimal condition showed intense pseudomolecular ion  $[M+H]^+$  along with sodium adduct ion  $[M+Na]^+$  of stemocurtisinol at  $m/z$  406 and 428, oxyprotostemonine at  $m/z$  432 and 454 and stemocurtisine at  $m/z$  348 and 370. The characteristic of MS/MS fragmentation patterns were utilized for peak assignment of unknown alkaloid congeners.

---

**Keywords :** *Stemona* alkaloids, Electrocoagulation, Alkaloids Extraction

## สรุปย่อ (Executive summary)

ปัจจุบันเกษตรกรมีการใช้สารเคมีหรือยาฆ่าแมลงในการกำจัดศัตรูพืชเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่แล้วจัดเป็นสารที่อันตรายทั้งสิ้น และเมื่อมีการใช้สารเคมีเหล่านี้เป็นเวลานานก็จะเกิดการสะสมของสารพิษ อันเนื่องมาจากการสูดดม หรือการดูดซึมผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งส่งผลกระทบต่อระบบสุขภาพเป็นอย่างมาก และระบบของร่างกายที่ได้รับผลกระทบโดยตรง ได้แก่ ตับ ไต และระบบประสาท นอกจากนี้ยังเกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ และอากาศ เป็นต้น ซึ่งมีผลเสียต่อระบบนิเวศตามมา การใช้พืชสมุนไพรในการกำจัดแมลงศัตรูพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่สามารถนำมาทดแทนการใช้สารเคมีได้อย่างมีประสิทธิภาพ พืชส่วนใหญ่จะเป็นพืชในท้องถิ่นสามารถปลูกและหาได้ง่าย รวมทั้งมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมน้อยกว่าสารเคมี เนื่องจากมีการสลายตัวได้รวดเร็ว และมีคุณสมบัติในการเป็นสารขับไล่แมลงเป็นส่วนใหญ่ หนอนตายหยาก (*Stemona*) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีการใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย ในประเทศไทยพบว่า มีหนอนตายหยากหลากหลายสายพันธุ์ เช่น *Stemona aphylla* Craib, *Stemona burkillii* Prain, *Stemona collinsae* Craib และ *Stemona curtisii* Hk.f. เป็นต้น โดยเฉพาะส่วนของรากจะมีสรรพคุณทางยา และมีคุณสมบัติในการกำจัดแมลงศัตรูพืชที่เด่นชัด จากการศึกษาพบว่า สารที่ออกฤทธิ์ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบพวกอัลคาลอยด์ และอัลคาลอยด์ที่แยกได้จากหนอนตายหยากเรียกว่า *Stemona alkaloids* ในปัจจุบันการแยกสารสกัดจากธรรมชาติจะต้องใช้ตัวทำละลายในปริมาณที่มาก และตัวทำละลายส่วนใหญ่ค่อนข้างอันตราย มีความเป็นพิษต่อผู้ทดลองรวมถึงเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ต่อมาได้มีการประยุกต์เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้าในการแยกสารสกัดจากพืช และพบว่าเทคนิคนี้สามารถแยกสารสกัดจากพืชได้ เช่น สารกลุ่มกลัยโคไซด์ (glycoside) เช่น stevioside glycyrrhizic acid และ D-pinitol เป็นต้น สารฟีนอลิก (phenolic compound) เช่น แทนนิน ฟลาโวนอยด์ รวมถึงสามารถแยกสารพวกอัลคาลอยด์ได้ โดยใช้ตัวทำละลายในปริมาณที่น้อยกว่า ซึ่งเทคนิคนี้อาจเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยลดการใช้สารเคมี โดยเฉพาะตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษา และแยกสารพวกอัลคาลอยด์จากหนอนตายหยากชนิด *Stemona curtisii* โดยใช้การสกัดแบบดั้งเดิม (การสกัดด้วยตัวทำละลาย) เปรียบเทียบกับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า เพื่อเป็นแนวทางในการแยกสารสกัดจากธรรมชาติที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมต่อไป การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์โดยเทคนิค Mass spectrometry เพื่อใช้เป็นโครมาโทแกรมมาตรฐานในการเปรียบเทียบชนิดของสารสกัดจากหนอนตายหยากพันธุ์ต่างๆ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ และจัดรวมอยู่ในการวิจัยครั้งนี้ และเนื่องด้วยงานวิจัยนี้ต้องการศึกษารูปแบบการแตกตัวของน้ำหนักโมเลกุลของสารที่สนใจ เทคนิค MS/MS จึงเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ เนื่องจากใช้ปริมาณตัวทำละลายและเวลาในการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของสารน้อย สำหรับประโยชน์ในการศึกษาสารอัลคาลอยด์โดยเทคนิค MS/MS นี้เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสารออกฤทธิ์ให้ได้มาตรฐานในการนำหนอนตายหยากไปใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืชของเกษตรกร และช่วยทำให้การตรวจสอบชนิดพันธุ์ของ

หนอนตายหยากและการวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ในกลุ่มอัลคาลอยด์ใช้เวลารวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่ายในการสกัดแยกสารบริสุทธิ์เพื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารอีกด้วย

ในการแยกสารอัลคาลอยด์จากรากและส่วนเหนือดินของ *Stemona surtisia* โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีพบว่าสารอัลคาลอยด์ที่แยกได้คือ stemocurtisine oxypotostemonine stemocurtisinol ซึ่งพบในราก สำหรับส่วนเหนือดินพบสาร stemocurtisine และ สารใหม่คือ 6-Hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS และ MS-MS พบไอออนของสารอัลคาลอยด์ที่เด่นชัด คือ pseudomolecular ion  $[M+H]^+$  และ sodium adduct ion  $[M+Na]^+$  ของ oxypotostemonine (M.W. = 431) ที่ m/z เท่ากับ 432 และ 454, stemocurtisine (M.W. = 347) ที่ m/z 348 และ 370 และ stemocurtisinol (M.W. = 405) ที่ m/z 406 และ 428 ตามลำดับ และได้รูปแบบการแตกตัวของน้ำหนักโมเลกุลซึ่งสามารถใช้ระบุตำแหน่งของฟังก์ชันที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสารนั้นๆ จากการทดลองประยุกต์ใช้เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้าเพื่อสกัดอัลคาลอยด์จาก *Stemona curtisia* พบว่าในส่วนรากพบอัลคาลอยด์ทั้งสามชนิดคือ stemocurtisine oxypotostemonine และ stemocurtisinol สำหรับส่วนเหนือดินพบเพียงสารหลักคือ stemocurtisine อย่างไรก็ตามเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้าสามารถสกัดอัลคาลอยด์หลักจาก *Stemona curtisia* ได้ปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย และการสกัดอัลคาลอยด์ด้วยเทคนิคนี้ยังช่วยลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์และสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์อัลคาลอยด์จากหนอนตายหยากด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้าเปรียบเทียบกับวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย
2. เพื่อวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์อัลคาลอยด์จากหนอนตายหยากด้วยเทคนิค MS/MS

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
สรุปย่อ (Executive summary)	ค
สารบัญ	จ
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ฅ
คำย่อและสัญลักษณ์	ฎ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	
1.1 หนองตายหยาก	1
1.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	1
1.1.2 การใช้ประโยชน์จากหนองตายหยาก	2
1.1.3 อัลคาลอยด์จากหนองตายหยาก (Stemona alkaloids)	2
1.2 เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า (Electrocoagulation)	5
1.2.1 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	6
1.2.2 ข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	11
1.3 การวิเคราะห์โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี	11
<b>บทที่ 2 ตัวอย่างงานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้อง</b>	15
<b>บทที่ 3 วิธีการทดลอง</b>	
3.1 การสกัดอัลคาลอยด์จากส่วนของรากหนองตายหยากชนิด <i>S. curtisii</i>	17
3.1.1 เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	17
3.1.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	17
3.1.1.2 การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	17
3.1.1.3 การแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	17
3.1.2 เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย	18
3.1.2.1 การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยตัวทำละลาย	18
3.1.2.2 การแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย	18
3.2 การสกัดอัลคาลอยด์จากส่วนเหนือดินของหนองตายหยากชนิด <i>S. curtisii</i>	18
3.2.1 เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	18

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	18
3.2.1.2 การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	19
3.2.1.3 การแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	19
3.2.2 เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย	20
3.2.2.1 การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยตัวทำละลาย	20
3.2.2.2 การแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย	20
3.3 การวิเคราะห์สารอัลคาลอยด์จาก <i>S. curtisii</i> ด้วยเทคนิค LC-MS	20
3.4 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Multistage tandem mass spectrometry (MS <sup>n</sup> )	21

## บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การสกัดอัลคาลอยด์จากส่วนรากของหนอนตายหยากชนิด <i>S. curtisii</i>	22
4.1.1 เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	22
4.1.1.1 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	22
4.1.1.2 การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	24
4.1.1.3 ผลการแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	24
4.1.1.4 การคำนวณหา % yield เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอธานอล	25
4.1.1.5 การพิสูจน์โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์	25
4.1.2 เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย	30
4.1.2.1 ผลการสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยตัวทำละลาย	30
4.1.2.2 การแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย	30
4.1.2.3 การคำนวณหา % yield เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอธานอล	30
4.1.2.4 การพิสูจน์โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์	31

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 การสกัดอัลคาลอยด์จากส่วนเหนือดินของหนอนตายหยากชนิด <i>S. curtisii</i>	34
4.2.1 เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	34
4.2.1.1 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	34
4.2.1.2 ผลการสกัดสารอัลคาลอยด์โดยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	36
4.2.1.3 ผลการแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	37
4.2.1.4 % yield ของสารที่ได้จากเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	37
4.2.1.5 การพิสูจน์โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์	37
4.2.2 เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย	39
4.2.2.1 ผลการสกัดสารอัลคาลอยด์โดยใช้ตัวทำละลาย	39
4.2.2.2 ผลการแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย	39
4.2.2.3 การพิสูจน์โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์	39
4.3 ปริมาณของตัวทำละลายและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดอัลคาลอยด์	42
4.4 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS	42
4.5 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MS/MS <sup>n</sup>	49
<b>บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง</b>	
5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	50
5.2 การสกัดและการแยกสารอัลคาลอยด์ด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	50
5.3 การสกัดและการแยกสารอัลคาลอยด์ด้วยตัวทำละลาย	52
5.4 ผลการเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้ากับการสกัดด้วยตัวทำละลาย	53
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	55
<b>ภาคผนวก</b>	58

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 ต้นหนอนตายหยาก ( <i>Stemona curtisii</i> )	1
รูปที่ 1.2 โครงสร้าง pyrrolo[1,2- <i>a</i> ]azepine nucleus (1) และ pyrido[1,2- <i>a</i> ]azepine nucleus (2)	3
รูปที่ 1.3 โครงสร้างหลักของอัลคาลอยด์จากหนอนตายหยาก ( <i>Stemona alkaloids</i> )	3
รูปที่ 1.4 โครงสร้างของอัลคาลอยด์จากหนอนตายหยาก ( <i>Stemona alkaloids</i> ) บางชนิด	5
รูปที่ 1.5 อุปกรณ์การจับก้อนด้วยไฟฟ้า	6
รูปที่ 1.6 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของอลูมิเนียมไอออนกับโมเลกุลที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ใกล้กัน	8
รูปที่ 1.7 โครงสร้าง dimeric และ polymeric Al <sup>3+</sup> hydroxo complexes (1) และ (2) ตามลำดับ	9
รูปที่ 1.8 โครมาโทแกรมและแมสสเปกตรัมที่ได้จาก LC-MS	12
รูปที่ 1.9 ส่วนประกอบของ ESI แบบต่างๆ (ที่มา: Courtesy of Agilent Technologies)	13
รูปที่ 1.10 กระบวนการเกิดไอออนในเซชันของระบบ ESI	14
รูปที่ 1.11 แมสสเปกตรัมของสารประกอบ Bilobalide	14
รูปที่ 2.1 โครงสร้างอัลคาลอยด์บางชนิดที่พบในรากหนอนตายหยากชนิด <i>Stemona curtisii</i>	16
รูปที่ 4.1 สีของสารละลายรากหนอนตายหยากหลังจากให้กระแสไฟฟ้า 0 - 120 นาที	22
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและelectrolysis time	23
รูปที่ 4.3 โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์ที่แยกได้จากการทดลอง stemocurtisine (A) oxyprotostemonine (B) และ stemocurtisinol (C)	29
รูปที่ 4.4 สารละลายส่วนเหนือดินของหนอนตายหยากหลังจากให้กระแสไฟฟ้า 0-120 นาที	35
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเวลาที่ใช้ในการให้กระแสไฟฟ้า	36
รูปที่ 4.6 แมสสเปกตรัมของ stemocurtisine ที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก วิเคราะห์ด้วย เทคนิค FIA-LC-MS ณ fragmentor 90-150 V	43
รูปที่ 4.7 แมสสเปกตรัมของ stemocurtisine ที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก วิเคราะห์ด้วย เทคนิค FIA-LC-MS ณ capillary voltage 3000-4500 V	45
รูปที่ 4.8 แมสสเปกตรัมของ stemocurtisine ที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก วิเคราะห์ด้วย เทคนิค FIA-LC-MS ณ drying gas flow 9-11 L/min	46
รูปที่ 4.9 แมสสเปกตรัมของ stemocurtisine ที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก วิเคราะห์ด้วย เทคนิค FIA-LC-MS ณ gas nebulizer pressure 40-50 psi	47
รูปที่ 4.10 แมสสเปกตรัมของสารอัลคาลอยด์ทั้งสามชนิดที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ณ สภาวะที่เหมาะสม	48
รูปที่ 5.1 โครงสร้างสาร D	53
รูปที่ 5.2 โครงสร้างสาร stemocurtisine (A)	53

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 ตัวอย่าง <i>Stemona alkaloids</i> ที่แยกได้จากหนอนตายหยาก ( <i>Stemonaceae</i> )	4
ตารางที่ 4.1 กระแสและศักย์ไฟฟ้าที่วัด ณ เวลาต่างๆ (0 – 120 นาที)	22
ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ณ เวลาต่างๆ (0 – 120 นาที)	23
ตารางที่ 4.3 ชื่อและน้ำหนักสารที่ใช้ในการทดลอง	24
ตารางที่ 4.4 กระแสและศักย์ไฟฟ้าที่วัด ณ เวลาต่างๆ (0 – 45 นาที)	24
ตารางที่ 4.5 น้ำหนักสารและ % yield เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอทานอลของสารที่ได้จากการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	25
ตารางที่ 4.6 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) ของ stemocurtisine (A) ในสารละลาย $\text{CDCl}_3$ จากการทดลองเปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง	26
ตารางที่ 4.7 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) ของ oxyprotostemonine (B) ในสารละลาย $\text{CDCl}_3$ จากการทดลองเปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง	27
ตารางที่ 4.8 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) ของ stemocurtisinol (C) ในสารละลาย $\text{CDCl}_3$ จากการทดลองเปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง	28
ตารางที่ 4.9 น้ำหนักสาร และ % yield เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอทานอลของสารที่ได้จากการ สกัดด้วยตัวทำละลาย	30
ตารางที่ 4.10 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) ของ stemocurtisine (A) ในสารละลาย $\text{CDCl}_3$ จากการทดลองเปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง	31
ตารางที่ 4.11 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) ของ oxyprotostemonine (B) ในสารละลาย $\text{CDCl}_3$ จากการทดลองเปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง	32
ตารางที่ 4.12 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) ของ stemocurtisinol (C) ในสารละลาย $\text{CDCl}_3$ จากการทดลองเปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง	33
ตารางที่ 4.13 ค่าศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ ณ เวลาต่างๆ	34
ตารางที่ 4.14 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ผ่านการให้ไฟฟ้า ณ เวลาต่างๆ	35
ตารางที่ 4.15 ค่าศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ เมื่อให้กระแสไฟฟ้าเป็นเวลา 15 นาที	36
ตารางที่ 4.16 น้ำหนักสารและ % yield ของสารที่ได้จากการสกัดโดยการจับก้อนด้วยไฟฟ้า เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอทานอล	37
ตารางที่ 4.17 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) ของ stemocurtisine ( $\text{EC}_1$ ) ในสารละลาย $\text{CDCl}_3$ จากการ ทดลองเปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง	38

## สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.18 ข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) ของ stemocurtisine (A) ในสารละลาย $\text{CDCl}_3$ จากการทดลองเปรียบเทียบกับ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง	40
ตารางที่ 4.19 ข้อมูล $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ , HMBC และ NOESY NMR ของสาร D ในสารละลาย $\text{CDCl}_3$ (chemical shifts in ppm, $J$ in Hz, compound numbering based on that of stemocurtisine)	41
ตารางที่ 4.20 ปริมาณตัวทำละลายและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดอัลคาลอยด์	42
ตารางที่ 4.21 การแตกตัวของน้ำหนักโมเลกุลของสารอัลคาลอยด์ที่แยกได้	49
ตารางที่ 5.1 ผลการเปรียบเทียบ % yield ของสารจากส่วนรากที่แยกได้จาก 2 เทคนิค	53
ตารางที่ 5.2 ผลการเปรียบเทียบ % yield ของสารจากส่วนเหนือดินที่แยกได้จาก 2 เทคนิค	54

## คำย่อและสัญลักษณ์

cm	centrimeter ( $10^{-2}$ m)
CDCL <sub>3</sub>	Deuterated chloroform
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichloromethane
g	gram
HCl	Hydrochloric acid
MeOH	Methanol
mg	milligram ( $10^{-3}$ g)
ml	milliliter ( $10^{-6}$ m)
OMe	methoxy group
nm	nanometer ( $10^{-9}$ m)
ppm	parts per million
%	percentage
pH	Power of Hydronium ion
PTLC	Preparative Thin-Layer Chromatography
TLC	Thin-Layer Chromatography
UV	Ultraviolet
<i>J</i>	Coupling constant (Hz)
<i>s</i>	singlet
<i>d</i>	doublet
<i>t</i>	triplet
quin	quintet
<i>m</i>	multiplet
<i>dd</i>	doublet of doublet
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<sup>1</sup> H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
MS	Mass Spectroscopy

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 หอนตายหยาก

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Stemona curtisii*

ชื่อวงศ์ : Stemonaceae

ชื่อไทย : หอนตายหยาก

ชื่ออื่นๆ : โป่งมดง่าม ปงช้าง รากลิง กะเพียด



รูปที่ 1.1 ต้นหอนตายหยาก (*Stemona curtisii*)

##### 1.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

หอนตายหยาก (รูปที่ 1.1) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ประเภทไม้เลื้อย พบได้ตามสภาพป่าทั่วไปในประเทศจีน ญี่ปุ่น อินโดจีน มาเลเซีย ลาว และไทย หอนตายหยากมีลำต้นตั้งตรงสูง และจะเจริญเลื้อยพันสิ่งอื่นๆ ยาวได้ถึง 2 เมตร ลำต้นกลมมีสีเขียว มีข้อและปล้องเห็นได้ชัดเจน รากมีลักษณะเป็นรูปกระสวยอยู่ใต้ดินออกเป็นกระจุกคล้ายกับกระชาย ใบเดี่ยวติดอยู่กับลำต้นแบบตรงข้ามหรือสลับกัน ก้านใบยาว ฐานใบกลมมน ปลายใบเรียวแหลมคล้ายใบพลู เส้นใบมีหลายเส้นเรียงในแนวขนานกับขอบใบ<sup>[1]</sup> ช่วงฤดูแล้งลำต้นบนดินของหอนตายหยากจะโถมเหลือแต่เหง้าและรากไว้ใต้ดิน แต่จะงอกใหม่พร้อมทั้งออกดอกในฤดูฝน ดอกของหอนตายหยากจะเป็นดอกเดี่ยวออกที่ซอกใบ กลีบดอกด้านนอกมีสีเขียว ส่วนด้านในจะมีสีแดง

ในประเทศไทยพบหนอนตายหยากประมาณ 10 ชนิด ได้แก่ *Stemona aphylla* Craib, *Stemona asperula* J.J.Sm., *Stemona burkillii* Prain, *Stemona collinsae* Craib, *Stemona curtisii* Hk.f., *Stemona griffithiana* Kurz, *Stemona hutanguriana* W. sp. Nov., *Stemona kerrii* Craib, *Stemona phyllantha* Gagnep., *Stemona tuberosa* Lour.<sup>[2]</sup>

### 1.1.2 การใช้ประโยชน์จากหนอนตายหยาก<sup>[1]</sup>

รากหนอนตายหยาก มีสรรพคุณทางยา ใช้เป็นสารกำจัดแมลงอย่างได้ผล โดยสารที่ออกฤทธิ์ส่วนใหญ่ที่พบ คือ stenine stemonine และ protostemonine จากการศึกษา มีรายงานการใช้ประโยชน์จากรากหนอนตายหยากในหลายประเทศ เช่น ประเทศในแถบอินโดจีนใช้เป็นยารักษาวัณโรคปอด และโรคเจ็บหน้าอก แก้วผิวน้ำเป็นตุ่มหนอง มีการนำมาต้มเป็นน้ำสมุนไพรเพื่อบำรุงกำลังและรักษาโรค นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าประเทศจีนใช้รากแช่เหล้าเป็นยาแก้ไอและขับเสมหะ ยาขับให้ผายลม ยาขับพยาธิ และใช้เป็นสารกำจัดแมลง ในประเทศลาวมีการใช้หนอนตายหยากในการกำจัดปรสิตภายนอกร่างกาย เช่น หมัด และเหา และในประเทศพม่าใช้เป็นสารฆ่าแมลง เหา หนอน และทำลายหิด เป็นต้น

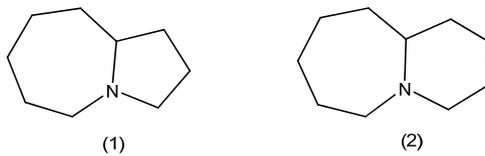
สำหรับในประเทศไทย

- ที่จังหวัดจันทบุรี ชาวสวนพริกไทยใช้หนอนตายหยากไล่แมลงในสวนพริกไทย โดยนำรากหนอนตายหยากมาตำให้ละเอียดแล้วแช่ในน้ำมันมะพร้าวใช้ฉีดไล่แมลง
- ที่จังหวัดพัทลุง ชาวเกาะสี่ เกาะห้า ใช้หนอนตายหยาก *S. curtisii* Hook.f. ฆ่าหนอนใน วั้ว โคน กระบือ เป็นต้น โดยนำรากหนอนตายหยากมาตำแล้วใส่ปูนขาว จากนั้นยัดเข้าไปในรูแผลเน่าเปื่อยที่มีหนอนในวั้ว กระบือ จะทำให้หนอนตายและแผลหาย
- ชาวบ้านตำรากหนอนตายหยากผสมน้ำมันพืช ใส่ผมเพื่อฆ่าเหาและทาหิด และทุบรากหนอนตายหยากวางบนปากไหปลาร้าป้องกันหนอนขึ้น
- ทางด้านปศุสัตว์เกษตรกรจะใช้รากหนอนตายหยากตำละลายน้ำหยอดใส่แผลโคและกระบือที่มีหนอนแมลงวันไชอยู่จะสามารถฆ่าหนอนได้

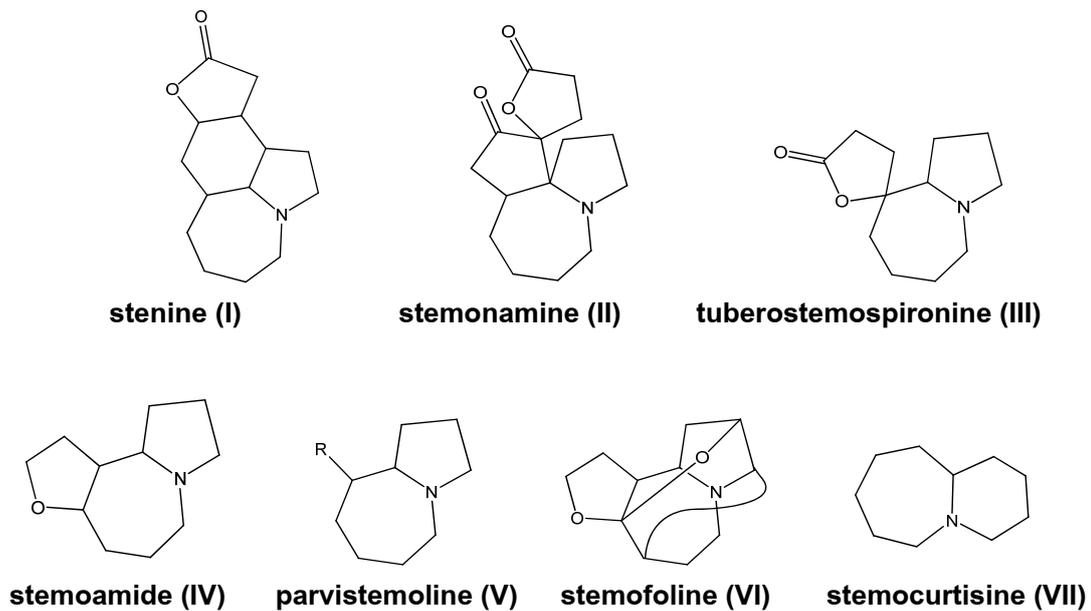
### 1.1.3 อัลคาลอยด์จากหนอนตายหยาก (*Stemona alkaloids*)<sup>[3, 4]</sup>

ปัจจุบันสามารถแยกอัลคาลอยด์จากหนอนตายหยาก (*Stemona alkaloids*) ได้มากกว่า 50 ชนิด ซึ่งหนอนตายหยากในแต่ละสายพันธุ์จะพบกลุ่มสารอัลคาลอยด์ที่แตกต่างกันไป จากการศึกษาของ Pilli<sup>[3]</sup> ได้ทำการแบ่งประเภทของ *Stemona alkaloids* ออกเป็น 8 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีโครงสร้างหลักเป็น pyrrolo[1,2-a]azepine nucleus (1) ซึ่งลักษณะโครงสร้างเป็นแบบ bicyclic ของวง 7 เหลี่ยมกับวง 5 เหลี่ยม มี 6 กลุ่ม ได้แก่ stenine (I) stemonamine (II) tuberostemospironine (III) stemoamide (IV) parvistemoline (V) และ stemofoline (VI) อัลคาลอยด์กลุ่มที่มีโครงสร้างหลักเป็น pyrido[1,2-a]azepine nucleus (2) ซึ่งลักษณะโครงสร้าง

เป็นแบบ bicyclic ของวง 7 เหลี่ยมกับวง 6 เหลี่ยม มี 1 กลุ่ม ได้แก่ stemocurtisine (VII) และกลุ่ม miscellaneous (VIII) แสดงดังรูปที่ 1.2 และ 1.3



รูปที่ 1.2 โครงสร้าง pyrrolo[1,2-*a*]azepine nucleus(1) และ pyrido[1,2-*a*]azepine nucleus(2)

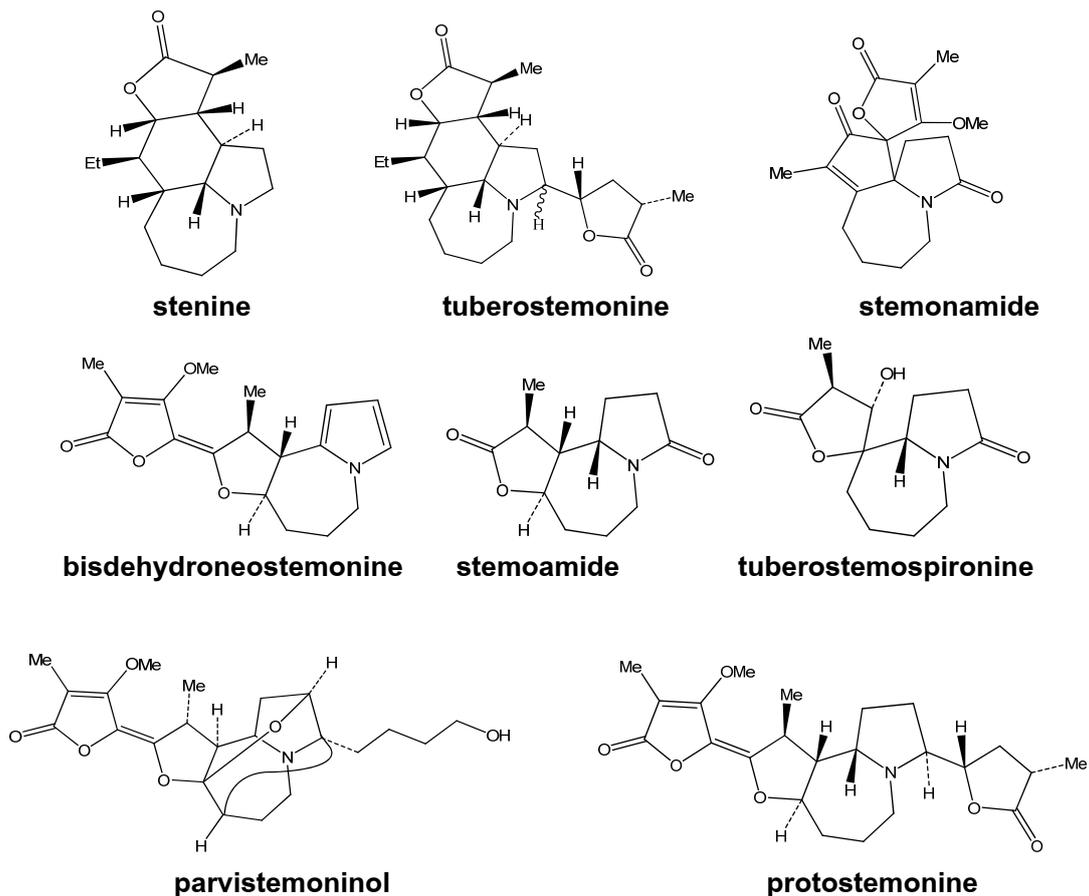


รูปที่ 1.3 โครงสร้างหลักของอัลคาลอยด์จากหนอนตายหยาก (Stemona alkaloids)

หนอนตายหยาก วงศ์ Stemonaceae ได้มีการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีกันอย่างแพร่หลายและสารที่พบส่วนใหญ่จะเป็น Stemona alkaloids แสดงดังตาราง 1.1 และรูป 1.4

ตารางที่ 1.1 ตัวอย่าง *Stemona* alkaloids ที่แยกได้จากหนอนตายหยาก (*Stemonaceae*)<sup>[3]</sup>

<b>Stemonaceae species</b>	<b>Stemona alkaloids</b>
<i>S. tuberosa</i>	Stenine
	Tuberostemonine
	Tuberostemonol
	Didehydrotuberostemonine
	Neotuberostemonine
	Stemoamide
	Tuberostemospironine
	Tuberostemoamide
<i>S. japonica</i>	Stemonine
	Bisdehydroneostemonine
	Stemospironine
	Stemonidine
	Protostemonine
	Stemonamide
	Stemofoline
<i>S. parviflora</i>	Parvistemoline
	Parvistemonine
	Didehydroparvistemonine
	Oxystemofoline
	Parvistemoninine
	Parvistemoninol
<i>S. sessilifolia</i>	Tuberostemonine
	Stemoninine
	Protostemotinine
<i>Stemona</i> sp.	Protostemonine
	Stemoninine



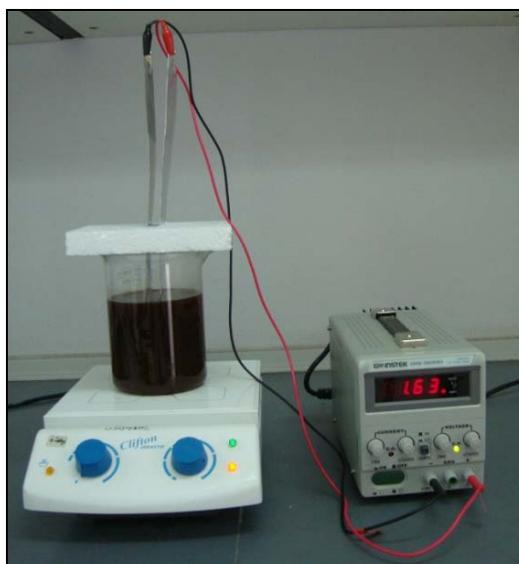
รูปที่ 1.4 โครงสร้างของอัลคาลอยด์จากหนอนตายหายาก (Stemona alkaloids) บางชนิด

## 1.2 เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า (Electrocoagulation)

การจับก้อนด้วยไฟฟ้า (electrocoagulation) เป็นเทคนิคไฟฟ้าเคมีชนิดอิเล็กโทรลิซิส (electrolysis) ซึ่งต้องอาศัยพลังงานไฟฟ้าจากภายนอกในกระบวนการเกิดปฏิกิริยาหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยส่วนประกอบที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยา คือ แหล่งให้พลังงานไฟฟ้า ขั้วไฟฟ้าหรืออิเล็กโทรดสองขั้ว ได้แก่ ขั้วแอโนด(anode) ขั้วแคโทด(cathode) และสารละลายอิเล็กโทรไลต์ เมื่อประกอบส่วนต่างๆ เข้าด้วยกันจะเรียกว่า เซลล์อิเล็กโทรลิติก (electrolytic cell) โดยที่ขั้วแอโนดจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และที่ขั้วแคโทดจะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน<sup>[5]</sup>

การจับก้อน (coagulation) เป็นการทำให้สารแขวนลอยที่มีประจุกลายเป็นสารที่ไม่มีประจุหรือมีประจุเป็นกลาง ซึ่งสารแขวนลอยในสารละลายจะชนกับประจุตรงกันข้าม (counter ions) แล้วจับตัวกันเป็นก้อนและตกตะกอนลงมา โดยใช้สารก่อการจับก้อน (coagulant) เช่น สารส้ม (alum)  $[Al_2(SO_4)_3 \cdot K_2SO_4 \cdot 24H_2O]$  ซึ่งเป็นสารเคมีที่นิยมใช้มานานแล้ว ส่วนกลไกการตกตะกอนจะเริ่มจากการลดลงของประจุที่ผิวอนุภาคคอลลอยด์ ทำให้อนุภาคต่างๆ เข้าใกล้กันได้มากขึ้น และมากพอที่จะเกิดแรงดึงดูดชนิดแวนเดอร์วาลส์ (van der Waal's force) จนสามารถรวมกันเป็นก้อนและตกตะกอนออกมาได้<sup>[6]</sup>

การจับก้อนด้วยไฟฟ้า (electrocoagulation) เป็นการผ่านไฟฟ้ากระแสตรงเข้าไปยังขั้วไฟฟ้าสองขั้วที่จัดไว้ขนานกัน คือ ขั้วแอโนด และขั้วแคโทด โดยที่ขั้วไฟฟ้าทั้งสองจุ่มอยู่ในสารละลาย ซึ่งการจัดอุปกรณ์การจับก้อนด้วยไฟฟ้าแสดงดังรูปที่ 1.5 ในการผ่านไฟฟ้ากระแสตรงไปยังขั้วไฟฟ้าจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และเกิดการปลดปล่อยอิเล็กตรอนที่ขั้วแอโนด การจับก้อนจะเกิดขึ้นที่ขั้วแอโนดโดยประจุที่เกิดขึ้นจะถูกแยกออกจากสารละลายโดยการเกิดปฏิกิริยากับไฮดรอกไซด์ที่มีประจุตรงกันข้าม และเกิดปฏิกิริยากับไฮดรอกไซด์ของโลหะที่เกิดขึ้น ซึ่งตะกอนของโลหะไฮดรอกไซด์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถกำจัดโมเลกุลของเม็ดสีได้ นอกจากนี้การผ่านกระแสไฟฟ้าในเฟสของเหลว ยังส่งเสริมให้อนุภาคแขวนลอยขนาดเล็กมีการเคลื่อนไหวมากยิ่งขึ้นเป็นการเพิ่มโอกาสการชนกันของอนุภาค ขั้วไฟฟ้าที่ใช้ส่วนมากจะทำจากเหล็กหรืออลูมิเนียม เนื่องจากเป็นวัสดุที่หาง่าย และมีราคาถูก



รูปที่ 1.5 อุปกรณ์การจับก้อนด้วยไฟฟ้า

### 1.2.1 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการจับก้อนด้วยไฟฟ้า<sup>[5, 6, 7]</sup>

กลไกของการจับก้อนด้วยไฟฟ้า โดยส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น pH ขนาดของอนุภาค หมู่ฟังก์ชัน (functional group) และขนาดของโมเลกุลของสาร เป็นต้น และประสิทธิภาพของการจับก้อนด้วยไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับชนิดของโลหะที่ใช้เป็นอิเล็กโทรด ส่วนใหญ่นิยมใช้อลูมิเนียมและเหล็ก นอกจากนี้ยังต้องใช้อิเล็กโทรไลต์เสริมเพื่อให้การจับก้อนมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในระหว่างการทำอิเล็กโทรลิซิสจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ขั้วแอโนด และจะเกิดปฏิกิริยารีดักชันที่ขั้วแคโทด ดังนั้นในที่นี้จึงขอกล่าวถึงปฏิกิริยาที่ใช้อลูมิเนียมและเหล็กเป็นอิเล็กโทรดเท่านั้น

### (1) ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้อลูมิเนียมเป็นอิเล็กโทรด

ขั้วแอโนด ที่ pH ต่ำๆ จะให้  $\text{Al}^{3+}$  หรือ  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  และที่ pH ที่เหมาะสมจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป  $\text{Al}(\text{OH})_3$  และสุดท้ายจะเกิดการ polymerize ได้เป็น  $\text{Al}_n(\text{OH})_{3n}$  แสดงปฏิกริยาได้ดังนี้

ปฏิกริยาออกซิเดชัน ที่ขั้วแอโนด



ปฏิกริยารีดักชัน ที่ขั้วแคโทด



ปฏิกริยารวม

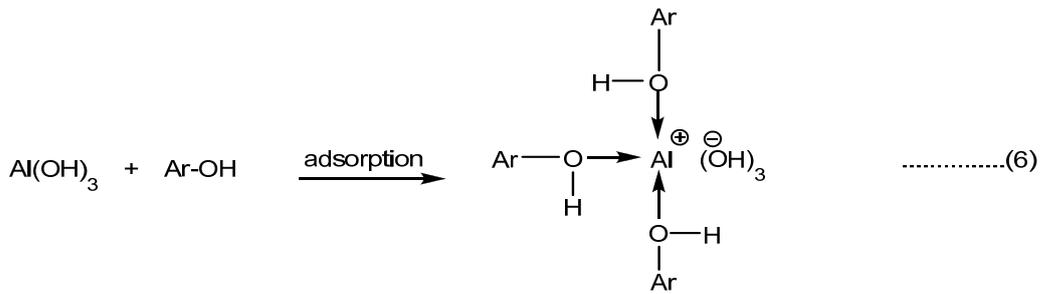


อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์  $[\text{Al}(\text{OH})_3]$  ที่เกิดขึ้น มีลักษณะเป็นเจล สามารถดูดซับโมเลกุลต่างๆ ให้แยกตัวออกมาจากสารละลายโดยการตกตะกอนออกมาพร้อมกัน บางครั้งอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Al}^{3+}$ ) ที่เกิดขึ้นจากขั้วแอโนดอาจเข้าจับกับไฮดรอกไซด์ของสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds, Ar-OH) ทำให้เกิดการตกตะกอนออกจากสารละลายในรูปของเกลือที่ไม่ละลายน้ำ เช่น อลูมิเนียมไตรฟีนอลเตต [aluminium triphenolate,  $\text{Al}(\text{OAr})_3$ ] ซึ่งมีกลไกการเกิดดังนี้

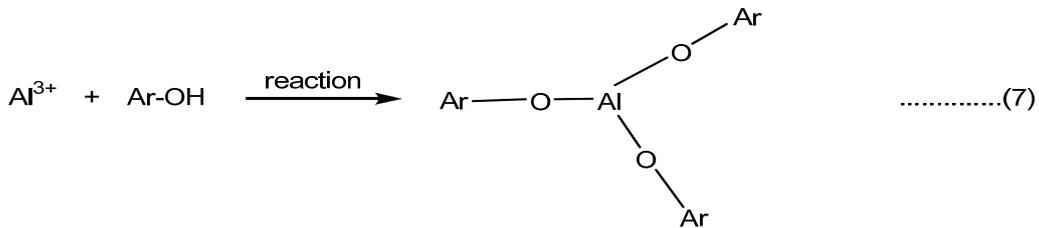
1. อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Al}^{3+}$ ) จากขั้วแอโนดจะทำปฏิกริยากับไฮดรอกไซด์ไอออน ( $\text{OH}^-$ ) ที่ได้จากขั้วแคโทดเกิดเป็นอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) ดังสมการ (5)



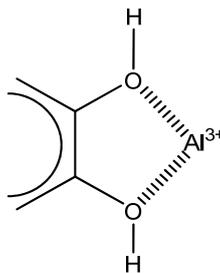
อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) มีลักษณะเป็นเจล (gelatin) ทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) หรือเป็นตัวช่วยในการตกตะกอน (co-precipitation) ที่สามารถดูดซับโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไฮโดรคาร์บอนสายยาว และสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ แทนนิน (tannin) แซนโธน (xanthone) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และแอนทราควิโนน (anthraquinone) เกิดเป็นก้อนตะกอน (coagulum) แสดงดังสมการ (6) แต่จะไม่ดูดซับโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น น้ำตาล และแอลกอฮอล์ เป็นต้น



2. อลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Al}^{3+}$ ) สามารถที่จะทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารประกอบฟีนอลิก จะเกิดเป็นอลูมิเนียมไตรฟีนอเลต เป็นเกลือที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble salt) ซึ่งสามารถเกิดได้เร็วและดีกว่าการดูดซับด้วยเจลของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ ดังสมการ (7)



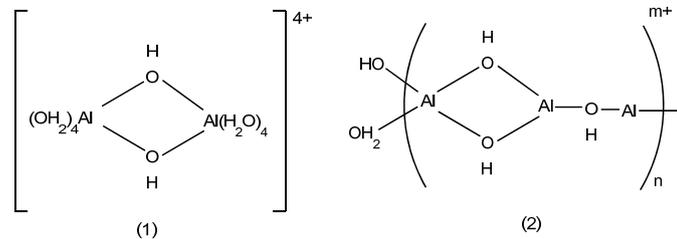
ในโมเลกุลที่มีหมู่ไฮดรอกซีที่ ตำแหน่ง 1,2- และ 1,2,3- เช่น โมเลกุลของแทนนิน ฟลาโวนอยด์บางชนิด และสารประกอบแอนทราควิโนน การตกตะกอนจะเกิดได้ดีเพราะมีหมู่ไฮดรอกซี (-OH) อยู่ใกล้กัน ทำให้เกิดปฏิกิริยากับอะลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ได้ดี แสดงดังรูปที่ 1.6 ส่วนโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 1- 1,3- 1,4 หรือ 1,3,5- เช่น ใน ฟีนอล และฟลาโวนอยด์ การตกตะกอนจะเกิดได้น้อยกว่า



รูปที่ 1.6 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์กับโมเลกุลที่มีหมู่ไฮดรอกซีอยู่ใกล้กัน

สารละลายที่ประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกโมเลกุลขนาดเล็ก จะเกิดการดูดซับ (adsorption) ได้น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ เพราะอาจลดร่างแหของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ได้ ส่วนสารโมเลกุลขนาดใหญ่จะเกิดการดูดซับได้เร็วขึ้น เนื่องจากโมเลกุลไปติดร่างแหของอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์ได้ดี

อย่างไรก็ตามไอออนอื่นๆ เช่น  $\text{Al(OH)}^{2+}$ ,  $\text{Al}_2(\text{OH})_2^{4+}$  และ  $\text{Al(OH)}^{4-}$  ก็อาจเกิดขึ้นในระบบได้ขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายตัวกลางนั้นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะที่เหมาะสม กระจุกจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูป multimeric hydroxo  $\text{Al}^{3+}$  species ตัวอย่างโครงสร้างของ dimeric และ polymeric  $\text{Al}^{3+}$  hydroxo complexes แสดงดังรูปที่ 1.7



รูปที่ 1.7 โครงสร้าง dimeric และ polymeric  $\text{Al}^{3+}$  hydroxo complexes (1) และ (2) ตามลำดับ

สารเชิงซ้อนเหล่านี้ (hydroxo cationic complexes) มีลักษณะเป็นเจล ที่สามารถกำจัดสิ่งสกปรก โดยการดูดซับสิ่งสกปรกนั้นๆ แล้วเปลี่ยนให้มีประจุเป็นกลางและจับยึดกันไว้ (enmeshment) จนเกิดการตกตะกอน

## (2) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้เหล็กเป็นอิเล็กโทรด<sup>[8]</sup>

เมื่อใช้เหล็กเป็นอิเล็กโทรด เหล็กจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ให้เหล็กไฮดรอกไซด์ และ  $\text{Fe(OH)}_n$  เมื่อ  $n=2$  หรือ 3 โดยมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยาได้ 2 แบบ คือ

### กลไกที่ 1

แอโนด :



แคโทด :

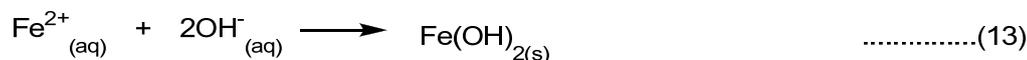


ปฏิกิริยารวม :

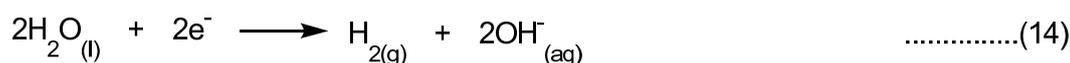


## กลไกที่ 2

แอโนด :



แคโทด :

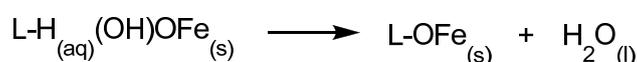


ปฏิกิริยารวม :

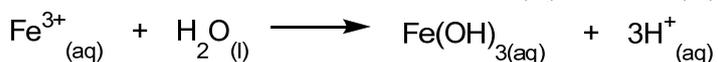


$\text{Fe(OH)}_n$  ที่ได้จะอยู่ในรูปสารแขวนลอยที่เป็นเจล สามารถกำจัดสิ่งสกปรกในน้ำเสีย โดยการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน หรืออาจเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าแล้วเกิดการตกตะกอน

บนพื้นผิวของสารประกอบเชิงซ้อน โดยที่สิ่งสกปรกจะเปรียบเสมือนลิแกนด์ (L) ที่จับกับ hydrous iron ในเชิงเคมี ดังสมการ



แก๊สไฮโดรเจน( $\text{H}_2$ ) ที่เกิดจากปฏิกิริยารีดอกซ์ อาจทำให้สารอินทรีย์หรือสารแขวนลอยต่างๆถูกแยกออกไป แต่ไอออนของ  $\text{Fe}^{3+}$  อาจเกิด hydration ได้และในสภาวะที่เป็นกรด อาจจะมี  $\text{Fe(OH)}^{2+}$   $\text{Fe(OH)}^+_2$  และ  $\text{Fe(OH)}_3$  เกิดขึ้นได้ ดังสมการ



ในสภาวะที่เป็นเบสอาจจะมี  $\text{Fe(OH)}^-_6$  และ  $\text{Fe(OH)}^-_4$  เกิดขึ้น จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้เหล็กเป็นขั้วไฟฟ้าอาจมีไอออนที่เป็นทั้งประจุบวกและประจุลบเกิดขึ้น

## 1.2.2 ข้อดีและข้อจำกัดของเทคนิคการจับกักด้วยไฟฟ้า<sup>[8]</sup>

### ข้อดีของเทคนิคการจับกักด้วยไฟฟ้า

1. เทคนิคการจับกักด้วยไฟฟ้า ใช้อุปกรณ์ที่ง่ายและมีวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน
2. ขยะที่ได้จากกระบวนการ EC จับกันเป็นก้อนและดึงออกจากชั้นน้ำได้ง่าย เพราะประกอบด้วยออกไซด์ และไฮดรอกไซด์ของโลหะ
3. ตะกอนที่ได้จากกระบวนการ EC มีขนาดค่อนข้างใหญ่ เสถียร สามารถแยกออกมาได้ง่ายด้วยวิธีการกรอง
4. กระบวนการ EC สามารถกำจัดอนุภาคคอลลอยด์ขนาดเล็กๆได้ เพราะมีการใช้สนามไฟฟ้าทำให้เกิดการตกตะกอนอย่างรวดเร็ว
5. กระบวนการ EC ไม่มีการใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย จึงไม่สร้างปัญหาการกำจัดสารเคมีส่วนเกินที่เหลือทิ้งและไม่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมา

### ข้อจำกัดของเทคนิคการจับกักด้วยไฟฟ้า

1. ขั้วอิเล็กโทรดสามารถละลายลงในน้ำได้ จึงต้องมีการเปลี่ยนอิเล็กโทรดใหม่
2. อาจเกิดฟิล์มของออกไซด์ที่ของเหลวไม่สามารถซึมผ่านได้ขึ้นบริเวณขั้วแคโทด ทำให้ประสิทธิภาพของระบบลดลง
3. การใช้ไฟฟ้า มีราคาค่อนข้างแพง สิ้นเปลืองพลังงาน
4. สารละลายที่ใช้ต้องนำไฟฟ้าได้
5. ไฮดรอกไซด์ที่เป็นเจลอาจจะละลายได้ในบางกรณี

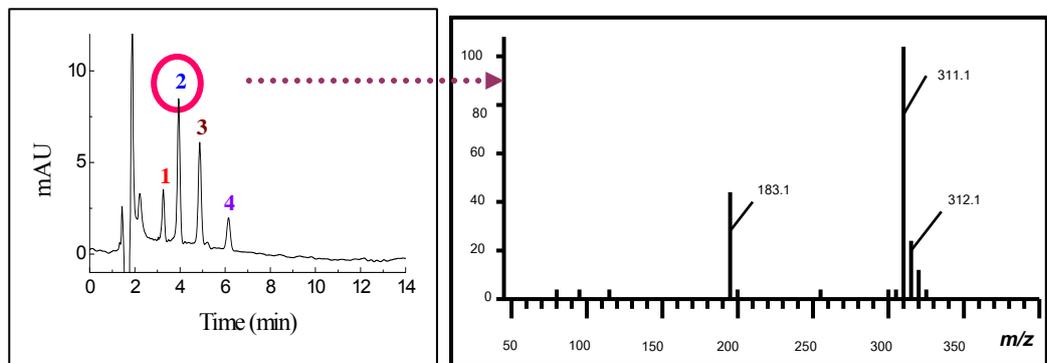
## 1.3 การวิเคราะห์โดยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี

โครมาโทกราฟีของเหลวควบคู่กับแมสสเปกโตรเมทรี (liquid chromatography-mass spectrometry; LC-MS) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้และมีประสิทธิภาพมากกว่าการวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ใช้หัววัดสัญญาณทั่วไป เนื่องจากได้ผลลัพธ์ทั้งไอออนโครมาโทแกรมทั้งหมด (total ion chromatogram; TIC) และแมสสเปกตรัม สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารที่สลายตัวด้วยความร้อน สารไม่ระเหย หรือ มีน้ำหนักโมเลกุลมาก และสารที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatography-mass spectrometry; GC-MS) ซึ่งสารบางชนิดจะต้องมีการเตรียมเป็นสารอนุพันธ์ก่อนการวิเคราะห์

การเชื่อมต่อโครมาโทกราฟีของเหลวกับแมสสเปกโตรมิเตอร์ จะมีความแตกต่างอย่างมากกับเทคนิค GC-MS เนื่องจากสถานะตัวอย่างที่แยกได้โดยเทคนิค LC ยังเป็นของเหลวที่ไม่ระเหยกลายเป็นไอได้ ในขณะที่ระบบแมสสเปกโตรเมทรีวัดสารที่อยู่ในสถานะแก๊ส (gas phase) ฉะนั้นจึงต้องมีการเปลี่ยนโมเลกุลของสารให้อยู่ในรูปของ gas phase ion แล้ววัดค่ามวลต่อประจุ ( $m/z$ ) ได้ นอกจากนี้เทคนิคการแยกสารโดย LC มีการใช้ตัวทำละลาย

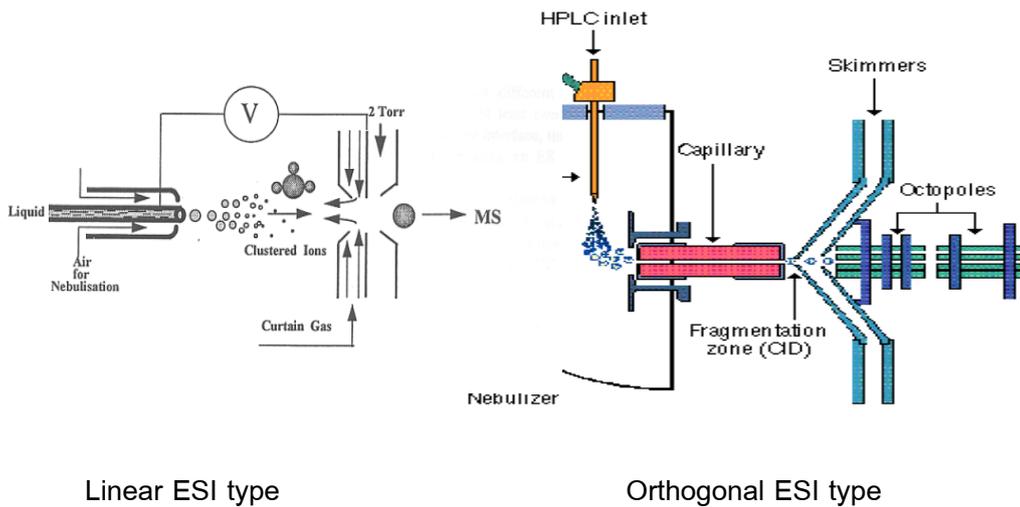
ค่อนข้างมาก ion source ชนิด EI และ CI ที่ใช้ในเทคนิค GC-MS ไม่สามารถใช้ได้ ดังนั้น อุปกรณ์ที่เป็นส่วนเชื่อมทั้งสองระบบเข้าด้วยกัน ซึ่งเรียกว่า interface นั้น ซึ่งมีหน้าที่ คือ ส่วนเชื่อม LC กับ MS และเป็นแหล่งกำเนิดไอออน (ionization source) ได้แก่ electrospray ionization (ESI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) เป็นต้น ผลลัพธ์ที่ได้จากเครื่อง LC-MS แสดงดังรูป 1.8

Electrospray ionization (ESI) เป็น ion source ที่ใช้ได้กับสารที่เกิดการแตกตัวได้ดี (ionizable species) หรือสารที่มีสภาพขั้ว (polar compound) เช่น สารประกอบที่มี heteroatom เป็นองค์ประกอบ สารที่จะวิเคราะห์ให้ได้นั้นจะต้องเกิดการเหนี่ยวนำให้มีประจุได้ ไอออนที่เกิดขึ้นอยู่ในสารละลาย โดยปัจจัยที่ทำให้เกิดการไอออไนเซชันนั้นพิจารณาจากสมบัติทางเคมีของสารละลายที่สำคัญ ได้แก่ ค่า  $pK_a$  หรือ  $pK_b$  ของสารที่สนใจและ pH ของสารละลาย เป็นต้น



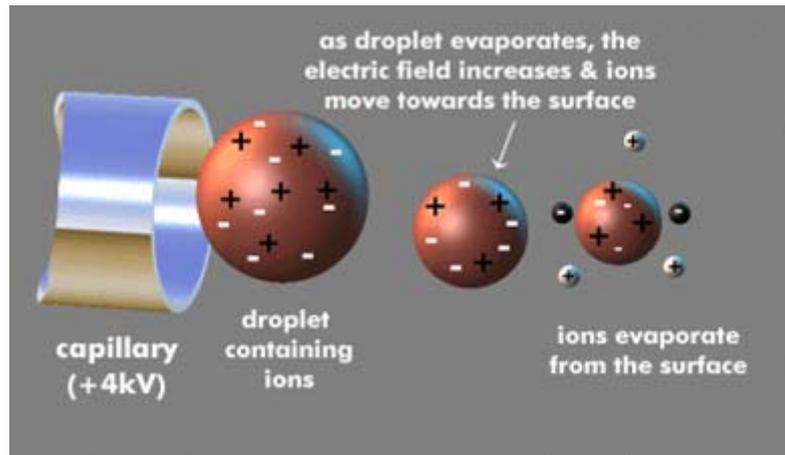
รูปที่ 1.8 โครมาโทแกรมและแมสสเปกตรัมที่ได้จาก LC-MS

ส่วนประกอบของระบบ ESI ซึ่งมีทั้งแบบ linear (sample inlet อยู่ในแนวเดียวกับทิศทางการเข้าของไอออนไปยัง MS) และ orthogonal (sample inlet อยู่ในแนวตั้งฉากกับทิศทางการเข้าของไอออนไปยัง MS) แสดงดังรูป 1.9 ซึ่งแบบ orthogonal มีข้อเด่น คือ ช่วยกำจัดสารปนเปื้อนที่หนักและมีขนาดใหญ่บางส่วนออกไปจากระบบ MS ได้ดีกว่าแบบ linear



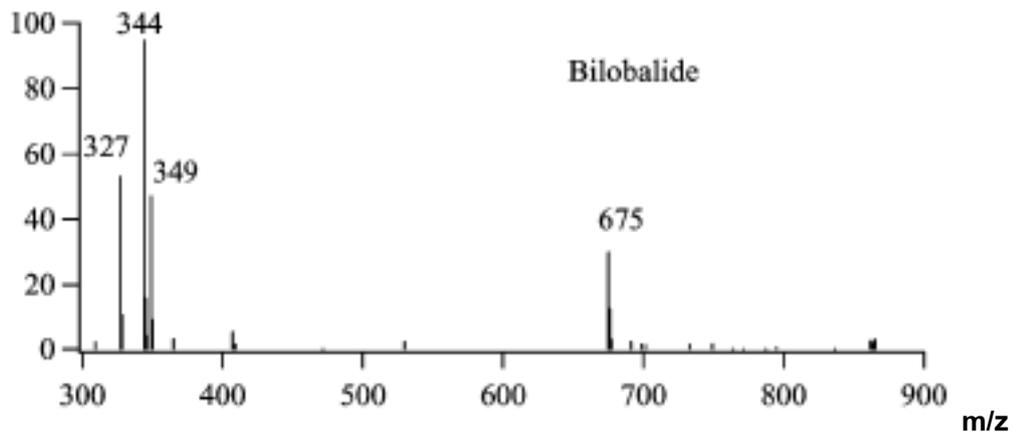
รูปที่ 1.9 ส่วนประกอบของ ESI แบบต่างๆ (ที่มา: Courtesy of Agilent Technologies)

กระบวนการเกิดไอออนในเซชันของทั้งสองแบบมีลักษณะเหมือนกัน กล่าวคือ เมื่อสารละลายตัวอย่างที่แยกมาจาก LC แล้วผ่านมายัง nebulizer ก็ถูกพ่นให้เป็นหยดละอองขนาดเล็ก เมื่อให้ศักย์ไฟฟ้าที่ capillary แล้วจะทำให้เกิดสนามไฟฟ้าซึ่งไปเหนี่ยวนำให้หยดละอองเกิดการประจุ (charged droplet) แล้วเกิดการไอออนในเซชันให้ไอออนที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ อยู่ภายใน ตอนเริ่มต้นหยดละอองที่มีไอออนที่มีประจุอยู่ภายในจะมีขนาดใหญ่เพราะยังมี ภูมิภาคเคลื่อนที่อยู่มาก หลังจากนั้นก็จะมียุคเล็กลงเรื่อยๆ เนื่องจากมีการระเหยของ ตัวทำละลายที่เป็นภูมิภาคเคลื่อนที่ออกไปโดยแก๊สร้อน ซึ่งมักนิยมใช้แก๊สไนโตรเจน ทำให้ ไอออนที่มีประจุที่อยู่ภายในหยดละอองยิ่งอัดกันแน่น โดยหยดละอองมีลักษณะที่เรียกว่า Taylor cone ดังรูป 1.10 ไอออนที่มีประจุเหมือนกันจะเข้ามาใกล้กันมากขึ้น ทำให้มีแรงผลักรันมาก เป็นผลให้หยดละอองขนาดเล็กแตกออกได้ไอออนเดี่ยวๆที่มีประจุ (singly charged ion) ทั้ง ประจุบวกและประจุลบเกิดขึ้นที่ความดันบรรยากาศ ซึ่งเป็นผลมาจากแรงผลักรันเนื่องจาก ประจุไฟฟ้าที่เหมือนกัน (coulombic force) มากกว่าแรงตึงผิวของตัวทำละลาย (surface tension force) ที่จะโอบอุ้มไอออนที่มีประจุไว้ได้ ไอออนที่มีประจุบวกหรือลบที่จะผ่านเข้าไปใน MS ได้นั้นก็ขึ้นกับศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับ capillary ว่าเป็นบวกหรือลบ ถ้าศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับ capillary เป็นบวกไอออนที่มีประจุลบก็จะเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปใน MS ซึ่งเรียกการวิเคราะห์แบบนี้ว่า negative ESI หากศักย์ไฟฟ้าที่ให้กับ capillary เป็นลบไอออนที่มีประจุบวกก็จะเคลื่อนที่ ผ่านเข้าไปใน MS ซึ่งเรียกการวิเคราะห์แบบนี้ว่า positive ESI



รูปที่ 1.10 กระบวนการเกิดไอออไนเซชันของระบบ ESI

แมสสเปกตรัมที่ได้จากการใช้ ES เป็น ion source มักพบ pseudomolecular ion เช่น  $[M-H]^-$ ,  $[M+H]^+$  เป็น base peak หรืออาจพบ adduct ions อื่นๆ เช่น  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  ในกรณี positive ESI-mode ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพของตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ตัวอย่างแมสสเปกตรัมของ Bilobalide (M.W. = 326) ดังรูป 1.11 ซึ่งพบ  $[M+H]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  และ  $[M+Na]^+$  ที่ m/z เท่ากับ 327, 344 และ 349 ตามลำดับ



รูปที่ 1.11 แมสสเปกตรัมของสารประกอบ Bilobalide

## บทที่ 2

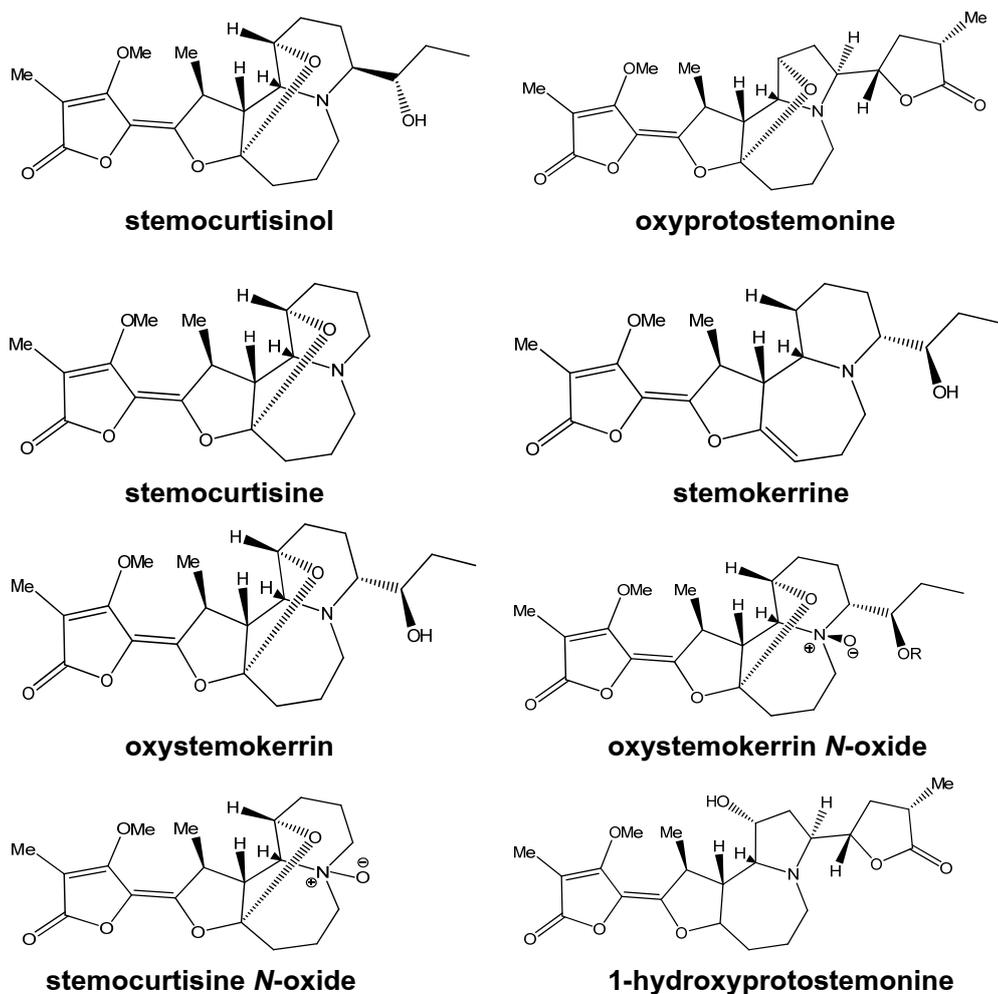
### ตัวอย่างงานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 2003 –2005 มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาหาสารอัลคาลอยด์จาก *S. curtisii* โดยใช้วิธีการสกัดด้วย 95%เอทานอล และนำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกจนได้เป็นสารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปละลายด้วยตัวทำละลายผสมน้ำและเมทานอล และนำไปสกัดแบบลำดับส่วนกับไดคลอโรมีเทนหรือคลอโรฟอร์ม และทำให้เป็นสารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ด้วยสารละลายเจือจางกรดไฮโดรคลอริกและเบส เช่น สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นจึงนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและศึกษาโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เช่น NMR, IR และ MS พบสารอัลคาลอยด์ชนิดใหม่ ซึ่งมีโครงสร้าง เป็นแบบ Pyrido [1,2-a] azepine และเป็นโครงสร้างแบบใหม่ของกลุ่ม *Stemona alkaloids* รวมทั้งสารอัลคาลอยด์ชนิดใหม่อื่นๆ ในกลุ่ม Pyrrolo [1,2-a]azepine และ Stemofoline จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของอัลคาลอยด์บางชนิดจาก *S. curtisii* พบว่ามีฤทธิ์กำจัดลูกน้ำยุงก้นปล่องและฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารของหนูกะตุ๊กอีกด้วย<sup>[9, 10, 11]</sup> ต่อมาในปี 2010 Chaiyong<sup>[12]</sup> และคณะ รายงานว่าสามารถแยก stemocurtisine N-oxide และ 1-hydroxyprotostemonine จากรากหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* ได้และสารอัลคาลอยด์ตัวหลัก คือ stemocurtisine, stemocurtisinol และ oxyprotostemonine ซึ่งโครงสร้างอัลคาลอยด์บางชนิดที่พบในรากหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* แสดงดังรูปที่ 2.1 จากการรายงานการศึกษาหาอัลคาลอยด์จากหนอนตายหยาก วิธีการสกัดดังกล่าวพบว่าต้องทำการสกัดหลายขั้นตอนและต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาณมากในการกำจัดแยกส่วนที่ไม่ต้องการด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ซึ่งทำให้สิ้นเปลืองและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้การสกัดหลายตอนเพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์มีผลทำให้ได้อัลคาลอยด์บางชนิดซึ่งมีปริมาณน้อยในธรรมชาติ ยังมีปริมาณน้อยลงไปจากการสูญเสียในการทำสารให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอน ดังนั้นการทดลองหาวิธีการสกัดรูปแบบใหม่เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ในปริมาณที่มากขึ้นและลดขั้นตอนในการทำสารให้บริสุทธิ์อีกทั้งช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ได้ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ

จากการค้นคว้างานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้าเป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้แยกสารอัลคาลอยด์จากหนอนตายหยาก เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถแยกเอาสิ่งเจือปน เช่น สี และคลอโรฟิลล์ออกไปได้ ทำให้ลดขั้นตอนในการแยกสารบริสุทธิ์และลดการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้าเริ่มแรกในปี ค.ศ. 1978 ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิคนี้กำจัดเอาสารคลอโรฟิลล์ออกจากสารสกัดจากหญ้าหวานเพื่อทำการสกัดแยกเอาสารให้ความหวานจำพวก Glycoside (stevioside) ในใบหญ้าหวานต่อไป หลังจากนั้น Adduci และ คณะ ได้นำเทคนิคนี้มาพัฒนาใช้ต่อการแยก steoside จากหญ้าหวานพบว่าได้ปริมาณ steoside 8-10% และมีความบริสุทธิ์ 70-80%<sup>[13]</sup> ต่อมาได้มีการพัฒนา

นำเทคนิคนี้มาใช้ในการสกัดสารธรรมชาติ สำหรับประเทศไทย ดังและคณะ [13-17] ได้ทำการศึกษาและพัฒนาเทคนิคนี้ในการแยกสารธรรมชาติหลายประเภท เช่น สารสีจากพืช สารประกอบฟีนอลิก และแทนนิน และ สารจำพวก quinone เช่น naphthoquinone (plumbagin) และ anthraquinones (alizarin, purpurin, chrysazin, emodin, and anthrarufin) นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังมีการนำมาประยุกต์ในการใช้แยกสารอัลคาลอยด์ทั้งชนิดที่ละลายน้ำได้ เช่น caffeine, nicotine, arecoline และละลายน้ำไม่ได้ เช่น capsaicin, dihydrocapsaicin, reserpine, ajmaline, และ solasodine เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่สารอัลคาลอยด์จากหนอนตายหยากซึ่งส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำจะสามารถทำการสกัดแยกได้ด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

นอกจากนี้ได้มีการประยุกต์ใช้เทคนิค HPLC/ESI-MS และ MS-MS และ เทคนิค HPLC-DAD-ELSD ในการวิเคราะห์หา *Stemona* alkaloids บางชนิด จาก *S. tuberosa*, *S. japonica* และ *S. sessilifolia* [18, 19] ซึ่งผลที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการช่วยจำแนก species ของหนอนตายหยาก



รูปที่ 2.1 โครงสร้างอัลคาลอยด์บางชนิดที่พบในรากหนอนตายหยากชนิด *Stemona curtisii*

### บทที่ 3 วิธีการทดลอง

#### 3.1 การสกัดอัลคาลอยด์จากส่วนของรากหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii*

##### 3.1.1 เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

###### 3.1.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

ชั่งสารสกัดหยาบเอธานอล จำนวน 10.00 g ละลายด้วยเอธานอล 85 % ปริมาตร 200 ml จากนั้นกรองเอากากของแข็งออก และเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.2% ลงไป เพื่อช่วยเพิ่มค่าการนำไฟฟ้า และทำการให้กระแสไฟฟ้านาน 2 ชั่วโมง (โดยให้กระแสไฟฟ้า 3 A, ศักย์ไฟฟ้า 31.6 V) ใช้แผ่นอลูมิเนียม ขนาดกว้าง 5.0 cm ยาว 15.0 cm เป็นอิเล็กโทรด เว้นช่องว่างระหว่างอิเล็กโทรด 1.5 cm และในระหว่างที่ทำการให้ไฟฟ้าทุกๆ 15 นาที บีบเอาสารละลายออกมา 5.00 ml ใส่ในหลอดทดลอง และระหว่างที่ทำการให้ไฟฟ้า ควรเฝ้าระวังไม่ให้สารละลายร้อนจนเกินไป เพราะอาจทำให้สารเกิดการสลายตัวได้ จากนั้นนำสารละลายที่เก็บไว้ไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 5500 rpm นาน 1 ชั่วโมง และดูสารละลายใสเก็บไว้ ห้ามไม่ให้มีสารแขวนลอยเจือปน นำสารละลายใสที่ได้ไปทำการเจือจาง 100 เท่า แล้วนำไปวัดค่าความยาวคลื่นสูงสุด ( $\lambda_{max}$ ) และวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้เครื่องอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

###### 3.1.1.2 การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

ชั่งสารสกัดหยาบเอธานอล จำนวน 40.13 g ละลายด้วยเอธานอล 85 % ปริมาตร 800 ml จากนั้นกรองเอากากของแข็งออก และเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.2% ลงไป เพื่อช่วยเพิ่มค่าการนำไฟฟ้า และทำการให้กระแสไฟฟ้าเป็นเวลา 45 นาที (จากผลการทดลอง 3.1.1.1) โดยใช้แผ่นอลูมิเนียม ขนาดกว้าง 8.0 cm ยาว 35.0 cm เป็นอิเล็กโทรด เว้นช่องว่างระหว่างอิเล็กโทรด 1.5 cm จากนั้นทำการกรอง และนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และละลายสารที่เหลือด้วยเอธานอล (absolute ethanol) ปริมาตร 500 ml เพื่อแยกเกลือโซเดียมคลอไรด์ออกจากสารละลาย เนื่องจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่ละลายในเอธานอล จากนั้นทำการกรองและนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกจะได้สารสกัดหยาบ 26.94 g จากนั้นนำมาทำการสกัดด้วย ไดคลอโรมีเทน ( $CH_2Cl_2$ ) ได้สารสกัดหยาบจากการจับก้อนด้วยไฟฟ้า 2.15 g

###### 3.1.1.3 การแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

นำสารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ที่ได้ มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลปริมาตร 200 ml และใช้สารละลายที่เป็นตัวชะ (mobile phase) ในอัตราส่วนจาก 100% ไดคลอโรมีเทน จนถึง 50% ไดคลอโรมีเทน : เมธานอล ได้สารจำนวน 7 fraction

จากนั้นทำการทดสอบหาสารอัลคาลอยด์โดยใช้น้ำยา dragendroff พบว่า fraction 3, 4, 5 และ 6 มีสารอัลคาลอยด์อยู่และนำแต่ละ fraction มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (PTLC) จากนั้นนำสารอัลคาลอยด์ที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR และ MS ได้สารดังนี้คือ stemocurtisine 162 mg stemocurtisinol 24 mg และoxyprotostemonine 15 mg

### 3.1.2 เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย

#### 3.1.2.1 การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยตัวทำละลาย

ซึ่งสารสกัดหยาบเอธานอล จำนวน 40.46 g ละลายด้วยเอธานอล 30 % ปริมาตร 200 ml สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 800 ml โดยใช้กรวยแยก (สกัดจนสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทนใส) จากนั้นนำสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทน มาทำการสกัดต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริก 5% ปริมาตร 600 ml และเติมสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 200 ml ลงในสารละลายชั้นกรด เพื่อให้สารละลายเป็นเบส pH~10 ตรวจสอบด้วยกระดาษวัดพีเอช แล้วนำสารละลายเบสมาทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนปริมาตร 800 ml และทำการกำจัดน้ำที่ปนอยู่ในสารละลายชั้นไดคลอโรมีเทนโดยเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส แล้วนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกจะได้สารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ (alkaloid crude extract) 277 mg

#### 3.1.2.2 การแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำสารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ที่ได้ มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลปริมาตร 50 ml และใช้สารละลายที่เป็นตัวชะ (mobile phase) ในอัตราส่วนจาก 100% ไดคลอโรมีเทน จนถึง 50% ไดคลอโรมีเทน : เมธานอล ได้สารจำนวน 5 fraction จากนั้นทำการทดสอบหาสารอัลคาลอยด์โดยใช้น้ำยา dragendroff พบว่า fraction 2, 3 และ 4 มีสารอัลคาลอยด์อยู่และนำแต่ละ fraction มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (PTLC) จากนั้นนำสารอัลคาลอยด์ที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR และ MS ได้สารดังนี้ คือ fraction 2 ได้ oxyprotostemonine 11 mg และ stemocurtisinol 8 mg fraction 3 ได้ stemocurtisine 36 mg

### 3.2 การสกัดอัลคาลอยด์จากส่วนเหนือดินของหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii*

#### 3.2.1 เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

##### 3.2.1.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

ซึ่งสารสกัดหยาบเอทานอล จำนวน 10.00 g ละลายในสารละลาย 95% v/v เอทานอล ปริมาตร 200 ml จากนั้นนำสารละลายไปกรองเอากากและตะกอนของแข็งออก เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.2% w/v ลงไป แล้วให้ไฟฟ้าด้วยเครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิให้ไม่เกิน 60°C ตลอดจนทดลอง ใช้ขั้วไฟฟ้าเป็นแผ่น

อลูมิเนียม ขนาดกว้าง 5.0 cm ยาว 15.0 cm ระยะห่างระหว่างแผ่นอลูมิเนียม 1.5 cm ในทุกๆ 15 นาที ให้บีบเปิดสารละลาย 5.00 ml เก็บไว้ในหลอดทดลอง พร้อมบันทึกค่าศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้า ก่อนนำสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่อัตราเร็ว 5,500 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายใสเก็บไว้ ทำการเจือจางสารละลายใสที่ได้ 100 เท่า แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง หาความยาวคลื่นสูงสุด ( $\lambda_{max}$ ) โดยใช้ UV-Visible spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเขียนกราฟเทียบกับเวลาเพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้กระแสไฟฟ้า

### 3.2.1.2 การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

ชั่งสารสกัดหยาบเอทานอล จำนวน 40.00 g ละลายด้วยสารละลายเอทานอล เข้มข้น 95% v/v ปริมาตร 800 ml จากนั้นนำสารละลายไปกรองเอากากและตะกอนของแข็งออก เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.2% w/v ลงไป แล้วให้ไฟฟ้าด้วยเครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง เป็นเวลา 15 นาที ใช้ขั้วไฟฟ้าเป็นแผ่นอลูมิเนียม ขนาดกว้าง 8.5 cm ยาว 35.0 cm ระยะห่างระหว่างแผ่นอลูมิเนียม 1.5 cm บันทึกค่าศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้า เมื่อให้ไฟฟ้าครบ 15 นาที จึงนำสารละลายไปกรอง และนำไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน แล้วละลายสารที่ได้ด้วยเอทานอลบริสุทธิ์ เพื่อแยกเกลือโซเดียมคลอไรด์ออกจากสารละลาย จากนั้นนำสารละลายไปกรอง และระเหยตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดหยาบหนัก 24.65 g นำสารสกัดหยาบที่ได้มาละลายในสารละลายเอทานอล เข้มข้น 30% v/v ปริมาตร 200 ml สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 600 ml ทำการกำจัดน้ำที่อาจปนอยู่โดยเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส แล้วนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดหยาบจากการจับก้อนด้วยไฟฟ้าหนัก 3.10 g เก็บไว้สำหรับทำการแยกสารอัลคาลอยด์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

### 3.2.1.3 การแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

แบ่งสารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ที่ได้จากวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้ามา 2.013 g เพื่อทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล ปริมาตร 200 ml ใช้สารละลายเมทานอลและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ (mobile phase) ตามลำดับ เมื่อทำการรวม fraction โดยการทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (PTLC) และจะได้สารจำนวน 9 fraction หลังจากนั้นทำการทดสอบสารอัลคาลอยด์โดยใช้ dragendroff's reagent แล้วจึงนำ fraction ที่ 7 และ 8 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง จากนั้นนำสารอัลคาลอยด์ที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR ต่อไป

### 3.2.2 เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย

#### 3.2.2.1 การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยตัวทำละลาย

ซึ่งสารสกัดหยาบจากเอทานอล จำนวน 40.00 g ละลายในสารละลายเอทานอล เข้มข้น 30% v/v ปริมาตร 200 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 800 ml โดยใช้กรวยแยกในการสกัด นำชั้นไดคลอโรมีเทน (ชั้นล่าง) มาสกัดต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5% v/v ปริมาตร 800 ml นำชั้นกรด (ชั้นบน) มาเติมสารละลายแอมโมเนียไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 150 ml เพื่อให้สารละลายเป็นเบส pH~10 ตรวจสอบด้วยกระดาษวัดพีเอช แล้วนำสารละลายเบสมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนปริมาตร 800 ml ทำการกำจัดน้ำที่อาจปนอยู่โดยเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส นำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ (alkaloid crude extract) หนัก 2.85 g

#### 3.2.2.2 การแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำสารสกัดหยาบที่ได้มาแยกด้วย Sephadex LH20 (100 g) โดยชะด้วยตัวทำละลายผสม เอทานอล และ ไดคลอโรมีเทน (v/v,1:1) จากนั้นนำ fraction ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC พบสารอัลคาลอยด์ 2 fraction คือ fraction 1 (923.2 mg) และ fraction 2 (453.0 mg) นำ fraction 1 ไปแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล ปริมาตร 100 ml ทำการชะด้วยตัวทำละลายตามลำดับขั้วจาก 100% EtOAc และ MeOH/EtOAc ที่มี 1% conc. aqueous NH<sub>3</sub> เป็นตัวชะ และ เทคนิค TLC ตามลำดับ พบอัลคาลอยด์ คือ stemocurtisine (11.2 mg). เมื่อทำการแยก Fraction 2 (453.0 mg) โดยเทคนิค คอลัมน์โครมาโทกราฟี และ TLC พบอัลคาลอยด์คือ stemocurtisine (20.0 mg) และ 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine (40.5 mg):

### 3.3 การวิเคราะห์สารอัลคาลอยด์จาก *S. curtisii* ด้วยเทคนิค LC-MS

นำสารสกัดที่ได้จากรากต้นหนอนตายหายากไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS (Agilent Technologies, USA) โดยวิเคราะห์แบบ Flow injection analysis (FIA) และใช้คอลัมน์ C-18 ยาว 15 ซม เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มม ภายใต้สภาวะของเครื่อง LC-MS ดังนี้

#### LC conditions

Mobile phase:	MeOH : Water 60:40 (v/v)
Flow rate:	0.4 ml/min
Wavelength:	290 nm
Injection volume:	10 µl

### MS conditions

MS mode:	ES-positive
Fragmentor:	120 V
Capillary voltage:	4000 V
Drying gas temperature:	320 °C
Drying gas flow:	10 L/min
Nebulizer pressure:	40 psi
Mass range:	100-500 amu

### **3.4 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Multistage tandem mass spectrometry (MS<sup>n</sup>)**

ทำการวิเคราะห์ MS<sup>n</sup> ด้วย positive ion mode โดยเครื่อง Thermo Finnigan LTQ quadrupole ion trap mass spectrometer (ThermoFinnigan) ต่อกับ electrospray ionisation source ทำการฉีดสารตัวอย่างด้วยอัตราเร็ว 5 µL/min. สภาวะที่เหมาะสมในส่วนหนึ่งของ mass spectrometer ได้แก่ capillary voltage 49 V, capillary temperature 200 °C, ESI spray voltage 4.0 kV, อัตราเร็วของ sheath gas และ auxiliary gas เท่ากับ 10 และ 5 arbitrary unit of nitrogen gas ตามลำดับ The isolation width for multistage tandem mass spectrometry เท่ากับ 1-2 Da. ระยะเวลาฉีดสารตัวอย่างเท่ากับ 30 ms.

**บทที่ 4**  
**ผลการทดลอง**

**4.1 การสกัดอัลคาลอยด์จากส่วนรากของหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii***

**4.1.1 เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า**

**4.1.1.1 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า**

ในขณะที่ทำการทดลองได้บันทึกกระแสและศักย์ไฟฟ้าทุก 15 นาที โดยเริ่มต้นให้กระแสไฟฟ้าสูงสุด 3 A และศักย์ไฟฟ้า 31.6 V แสดงในตารางที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 กระแสและศักย์ไฟฟ้าที่วัด ณ เวลาต่างๆ (0 – 120 นาที)

เวลา (นาที)	กระแสไฟฟ้า (A)	ศักย์ไฟฟ้า (V)
0	-	-
15	1.42	31.6
30	1.03	31.6
45	1.30	31.6
60	1.20	31.6
75	0.80	31.6
90	0.40	31.6
105	0.45	31.6
120	0.44	31.6

หลังจากให้กระแสไฟฟ้ากับสารละลายรากหนอนตายหยากชนิด *Stemona curtisii* เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำการเก็บสารละลายตัวอย่างทุก 15 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) จะได้สารละลายดังรูปที่ 4.1

เวลา (นาที)	0	15	30	45	60	75	90	105	120
-------------	---	----	----	----	----	----	----	-----	-----

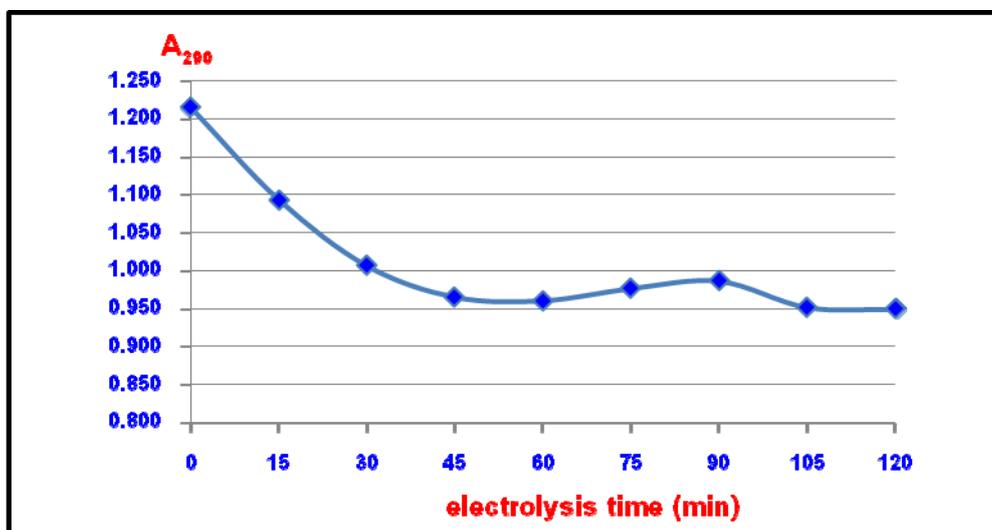


**รูปที่ 4.1** สีของสารละลายรากหนอนตายหยากหลังจากให้กระแสไฟฟ้า 0 - 120 นาที

เมื่อนำสารละลายที่ได้มาทำการเจือจางด้วย 85% เอทานอล และทำการวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 nm ได้แสดงค่าการดูดกลืนแสงดังตารางที่ 4.2 ตารางที่ 4.2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ณ เวลาต่างๆ (0 – 120 นาที)

เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	1.276
15	1.094
30	1.007
45	0.966
60	0.961
75	0.977
90	0.987
105	0.952
120	0.950

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มา สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาพบว่า เวลาที่เหมาะสม คือ 45 นาที แสดงผลดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และelectrolysis time (min)

#### 4.1.1.2 การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า โดยใช้สารสกัดหยาบเอธานอล 40.13 กรัม และ เกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.60 กรัม แสดงดังตาราง 4.3

ตารางที่ 4.3 ชื่อและน้ำหนักสารที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อสารที่ใช้	น้ำหนักสาร (g)
สารสกัดหยาบเอธานอล	40.13
เกลือโซเดียมคลอไรด์	1.60

จากการให้กระแสไฟฟ้ากับสารละลายรากหอนตายหยากชนิด *Stemona curtisii* เป็นเวลา 45 นาที แสดงกระแสและศักย์ไฟฟ้าขณะทำการทดลองดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 กระแสและศักย์ไฟฟ้าที่วัด ณ เวลาต่างๆ (0 – 45 นาที)

เวลา (นาที)	กระแสไฟฟ้า (A)	ศักย์ไฟฟ้า (V)
0	-	-
10	2.210	31.6
20	1.940	31.6
30	1.880	31.6
40	1.600	31.6
45	1.769	31.6

ในการสกัดเริ่มต้นจาก สารสกัดหยาบเอธานอล 40.13 g ได้สารสกัดหยาบจากการจับก้อนด้วยไฟฟ้า 26.94 g และ สารสกัดหยาบไคโคลอโรมีเทน 2.15 g

#### 4.1.1.3 ผลการแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

จากการนำสารสกัดหยาบจากการจับก้อนด้วยไฟฟ้าที่ได้ 2.15 g มาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวชะ ในอัตราส่วนจาก 100% ไคโคลอโรมีเทน ถึง 50% ไคโคลอโรมีเทน : เมธานอล และใช้น้ำยา dragendroff ในการตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยสารที่เป็นอัลคาลอยด์จะสังเกตเห็นจุดสีส้ม และสามารถแยก stemocurtisine ได้ 162 mg stemocurtisinol 24 mg และ oxyprotostemonine 15 mg

#### 4.1.1.4 การคำนวณหา % yield เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอธานอล

% yield ของสารที่ได้จากเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้าแสดงดังตาราง 4.5 พบว่า สาร stemocurtisine (A) สาร oxyprotostemonine (B) สาร stemocurtisinol (C) มี % yield เท่ากับ 0.40, 0.06 และ 0.04 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 น้ำหนักสาร และ % yield เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอธานอล ของสารที่ได้จากการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

ชื่อสาร	น้ำหนักสาร (g)	% yield
สารสกัดหยาบเอธานอล	40.13	-
สารสกัดหยาบจากการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	26.94	-
สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน	2.15	-
สาร stemocurtisine (A)	0.162	0.40
สาร oxyprotostemonine (B)	0.024	0.06
สาร stemocurtisinol (C)	0.015	0.04

#### 4.1.1.5 การพิสูจน์โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์

สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่ได้ (A) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากการเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  spectrum กับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่า สารอัลคาลอยด์ที่ได้น่าจะเป็น stemocurtisine ซึ่งได้แสดงในรูปที่ 4.3

ตาราง 4.6  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) ของ stemocurtisine (A) ในสารละลาย  $\text{CDCl}_3$  จากการทดลองเปรียบเทียบกับ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup>

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) จากการทดลอง	$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง
1	4.04 (s)	4.01 (s)
2a	1.66 (m)	1.62 (m)
b	2.25 (d, $J = 13.5$ )	2.21 (d, $J = 14.5$ )
3a	1.20 (d, $J = 13$ )	1.21 (d, $J = 13.5$ )
b	1.83 (m)	1.82 (m)
4a	2.86 (m)	2.87 (m)
b	3.04 (m)	3.02 (m)
6a	3.48 (t, $J = 12.5$ )	3.38 (t, $J = 13$ )
b	3.00 (m)	2.96 (m)
7a	2.07 (m)	2.03 (m)
b	1.68 (m)	1.66 (m)
8a	2.39 (dd, $J = 4.5, 13.5$ )	2.36 (dd, $J = 4.5, 13.5$ )
b	1.73 (m)	1.75 (m)
9	-	-
10	2.67 (d, $J = 4$ )	2.65 (d, $J = 4.5$ )
10a	3.51 (s)	3.44 (s)
11	3.07 (quin, $J = 6$ )	3.07 (quin, $J = 6.5$ )
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	2.10 (s)	2.08 (s)
18	1.42 (d, $J = 7.5$ )	1.37 (d, $J = 7$ )
OMe	4.17 (s)	4.15 (s)

สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่ได้ (B) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากการเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  spectrum กับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ซึ่งแสดงในตาราง 4.7 พบว่าสารอัลคาลอยด์ที่ได้น่าจะเป็น oxyprotostemonine ซึ่งได้แสดงในรูป 4.3

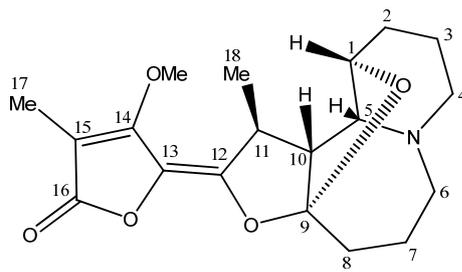
ตาราง 4.7  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) ของ oxyprotostemonine (B) ในสารละลาย  $\text{CDCl}_3$  จากการทดลองเปรียบเทียบกับ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup>

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) จากการทดลอง	$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง
1	4.67 (s)	4.67 (s)
2a	2.25 (m)	2.25 (m)
b	1.74 (m)	1.74 (m)
3	3.31 (s)	3.31 (s)
5a	3.07 (m)	3.08 (m)
b	2.98 (m)	2.97 (m)
6a	1.74 (m)	1.74 (m)
b	1.45 (m)	1.45 (m)
7a	2.25 (m)	2.25 (m)
b	1.74 (m)	1.74 (m)
8	-	-
9	2.56 (s)	2.56 (s)
9a	3.60 (s)	3.60 (s)
10	3.08 (m)	3.08 (m)
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	2.07 (s)	2.08 (s)
17	1.37 (d, $J = 6$ )	1.38 (d, $J = 6.5$ )
18	4.23 (t, $J = 4.5$ )	4.23 (t, $J = 4.5$ )
19a	2.28 (m)	2.27 (m)
b	1.79 (m)	1.80 (m)
20	2.67 (m)	2.68 (m)
21	-	-
22	1.30 (d, $J = 8$ )	1.30 (d, $J = 7$ )
OMe	4.15 (s)	4.15 (s)

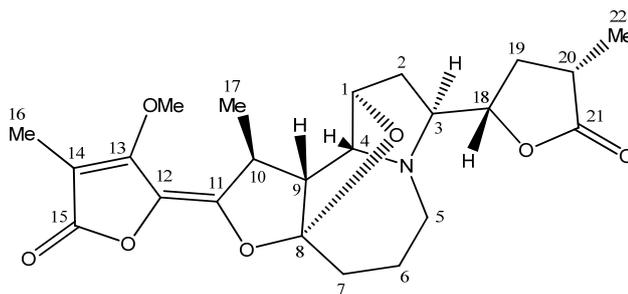
สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่ได้ (C) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากการเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  spectrum กับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ซึ่งแสดงในตาราง 4.8 พบว่าสารอัลคาลอยด์ที่ได้น่าจะเป็น stemocurtisinol (C) ซึ่งได้แสดงในรูป 4.3

ตาราง 4.8  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) ของ stemocurtisinol (C) ในสารละลาย  $\text{CDCl}_3$  จากการทดลองเปรียบเทียบกับ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup>

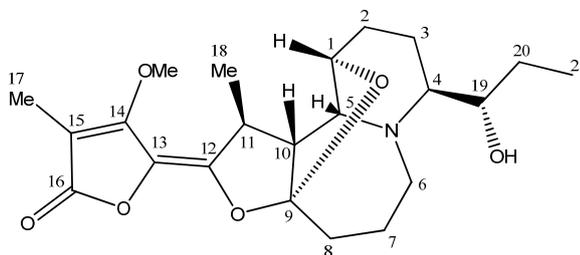
ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) จากการทดลอง	$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง
1	4.06 (s)	4.05 (s)
2a	1.73 (dd, $J = 6, 12$ )	1.73 (dd, $J = 5.8, 12.3$ )
b	1.94 (m)	1.95 (m)
3a	1.36 (m)	1.36 (m)
b	1.95 (m)	1.96 (m)
4a	2.56 (m)	2.53 (m)
6a	2.94 (dd, $J = 4, 16$ )	2.92 (dd, $J = 4.5, 15.5$ )
b	3.49 (m)	3.48 (m)
7a	1.64 (m)	1.65 (m)
b	2.01 (m)	1.99 (m)
8a	1.76 (dd, $J = 5.5, 12$ )	1.76 (dd, $J = 5.8, 13$ )
b	2.35 (dd, $J = 4, 12$ )	2.36 (dd, $J = 4.1, 13$ )
9	-	-
10	2.72 (d, $J = 4.8$ )	2.70 (d, $J = 4.7$ )
10a	3.42 (s)	3.40 (s)
11	3.04 (quin, $J = 5.8$ )	3.07 (quin, $J = 6.1$ )
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	2.07 (s)	2.07 (s)
18	1.38 (d, $J = 7$ )	1.38 (d, $J = 7$ )
19	3.51 (m)	3.50 (m)
20a	1.26 (m)	1.25 (m)
b	1.60 (m)	1.60 (m)
21	1.02 (t, $J = 7$ )	1.02 (t, $J = 7.3$ )
OMe	4.15 (s)	4.15 (s)



(A)



(B)



(C)

รูปที่ 4.3 โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์ที่แยกได้จากการทดลอง stemocurtisine (A)  
oxyprotostemonine (B) และ stemocurtisinol (C)

#### 4.1.2 เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย

##### 4.1.2.1 ผลการสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยตัวทำละลาย

จากการสกัดสารอัลคาลอยด์จากรากหนอนตายหยากชนิด *Stemona curtisii* ด้วยตัวทำละลาย โดยการละลายสารสกัดหยาบเอธานอล จำนวน 40.46 g ด้วย 30% เอธานอล แล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน จากนั้นทำการสกัดต่อด้วยกรดและเบส แล้วนำสารละลายมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนอีกครั้ง พบว่าได้สารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ 277 mg

##### 4.1.2.2 การแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย

จากการนำสารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ที่ได้ 277 mg มาทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้ตัวชะ ในอัตราส่วนจาก 100% ไดคลอโรมีเทน จนถึง 50% ไดคลอโรมีเทน : เมธานอล และใช้น้ำยา dragendroff ในการตรวจสอบอัลคาลอยด์ โดยสารที่เป็นอัลคาลอยด์จะสังเกตเห็นจุดสีส้ม และสามารถแยกสารได้ดังนี้ คือ fraction 2 ได้ oxyprotostemonine 11 mg และ stemocurtisinol 8 mg ส่วน fraction 3 ได้ stemocurtisine 36 mg

##### 4.1.2.3 การคำนวณหา % yield เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอธานอล

% yield ของสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายแสดงดังตาราง 4.9 พบว่า สาร stemocurtisine (A) สาร oxyprotostemonine (B) สาร stemocurtisinol (C) มี % yield เท่ากับ 0.09, 0.03 และ 0.02 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.9 น้ำหนักสาร และ % yield เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอธานอล ของสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย

ชื่อสาร	น้ำหนักสาร (g)	% yield
สารสกัดหยาบเอธานอล	40.46	-
สารสกัดหยาบอัลคาลอยด์	0.277	-
สาร stemocurtisine (A)	0.036	0.09
สาร oxyprotostemonine (B)	0.011	0.03
สาร stemocurtisinol (C)	0.008	0.02

#### 4.1.2.4 การพิสูจน์โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์

สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่ได้ (A) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากการเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  spectrum กับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ซึ่งแสดงในตาราง 4.10 พบว่า สาร อัลคาลอยด์ที่ได้น่าจะเป็น stemocurtisine (A) ซึ่งได้แสดงในรูป 4.3

ตาราง 4.10  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) ของ stemocurtisine (A) ในสารละลาย  $\text{CDCl}_3$  จากการทดลองเปรียบเทียบกับ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup>

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) จากการทดลอง	$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง
1	4.01(s)	4.01 (s)
2a	1.62 (m)	1.62 (m)
b	2.20 (d, $J = 14$ )	2.21 (d, $J = 14.5$ )
3a	1.18 (d, $J = 13.5$ )	1.21 (d, $J = 13.5$ )
b	1.81(m)	1.82 (m)
4a	2.89 (m)	2.87 (m)
b	3.01(m)	3.02 (m)
6a	3.39 (t, $J = 14$ )	3.38 (t, $J = 13$ )
b	2.96 (m)	2.96 (m)
7a	2.03 (m)	2.03 (m)
b	1.66 (m)	1.66 (m)
8a	2.35 (dd, $J = 4, 12.5$ )	2.36 (dd, $J = 4.5, 13.5$ )
b	1.75 (m)	1.75 (m)
9	-	-
10	2.67 (d, $J = 4$ )	2.65 (d, $J = 4.5$ )
10a	3.45 (s)	3.44 (s)
11	3.07 (quin, $J = 7$ )	3.07 (quin, $J = 6.5$ )
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	2.07 (s)	2.08 (s)
18	1.37 (d, $J = 8$ )	1.37 (d, $J = 7$ )
OMe	4.15 (s)	4.15 (s)

สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่ได้ (B) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากการเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  spectrum กับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ซึ่งแสดงในตาราง 4.11 พบว่าสารอัลคาลอยด์ที่ได้น่าจะเป็น oxyprotostemonine ซึ่งได้แสดงในรูป 4.3

ตาราง 4.11  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) ของ oxyprotostemonine (B) ในสารละลาย  $\text{CDCl}_3$  จากการทดลองเปรียบเทียบกับ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup>

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) จากการทดลอง	$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง
1	4.64 (s)	4.67 (s)
2a	2.23 (m)	2.25 (m)
b	1.74 (m)	1.74 (m)
3	3.31 (s)	3.31 (s)
5a	3.07 (m)	3.08 (m)
b	2.98 (m)	2.97 (m)
6a	1.73 (m)	1.74 (m)
b	1.44 (m)	1.45 (m)
7a	2.24 (m)	2.25 (m)
b	1.74 (m)	1.74 (m)
8	-	-
9	2.56 (s)	2.56 (s)
9a	3.58 (s)	3.60 (s)
10	3.08 (m)	3.08 (m)
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	2.07 (s)	2.08 (s)
17	1.36 (d, $J = 6$ )	1.38 (d, $J = 6.5$ )
18	4.23 (t, $J = 4.5$ )	4.23 (t, $J = 4.5$ )
19a	2.28 (m)	2.27 (m)
b	1.78 (m)	1.80 (m)
20	2.67 (m)	2.68 (m)
21	-	-
22	1.30 (d, $J = 8$ )	1.30 (d, $J = 7$ )
OMe	4.13 (s)	4.15 (s)

สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่ได้ (C) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน จากการเปรียบเทียบข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  spectrum กับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ซึ่งแสดงในตาราง 4.12 พบว่าสารอัลคาลอยด์ที่ได้น่าจะเป็น stemocurtisinol (C) ซึ่งได้แสดงในรูป 4.3

ตาราง 4.12  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) ของ stemocurtisinol (C) ในสารละลาย  $\text{CDCl}_3$  จากการทดลองเปรียบเทียบกับ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup>

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) จากการทดลอง	$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง
1	4.04 (s)	4.05 (s)
2a	1.73 (dd, $J = 6, 12$ )	1.73 (dd, $J = 5.8, 12.3$ )
b	1.94 (m)	1.95 (m)
3a	1.34 (m)	1.36 (m)
b	1.95 (m)	1.96 (m)
4a	2.56 (m)	2.53 (m)
6a	2.94 (dd, $J = 4, 16$ )	2.92 (dd, $J = 4.5, 15.5$ )
b	3.49 (m)	3.48 (m)
7a	1.64 (m)	1.65 (m)
b	2.01 (m)	1.99 (m)
8a	1.76 (dd, $J = 5.5, 12$ )	1.76 (dd, $J = 5.8, 13$ )
b	2.35 (dd, $J = 4, 12$ )	2.36 (dd, $J = 4.1, 13$ )
9	-	-
10	2.72 (d, $J = 4.8$ )	2.70 (d, $J = 4.7$ )
10a	3.42 (s)	3.40 (s)
11	3.04 (quin, $J = 5.8$ )	3.07 (quin, $J = 6.1$ )
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	2.07 (s)	2.07 (s)
18	1.38 (d, $J = 7$ )	1.38 (d, $J = 7$ )
19	3.51 (m)	3.50 (m)
20a	1.26 (m)	1.25 (m)
b	1.60 (m)	1.60 (m)
21	1.03 (t, $J = 7.5$ )	1.02 (t, $J = 7.3$ )
OMe	4.16 (s)	4.15 (s)

## 4.2 การสกัดอัลคาลอยด์จากส่วนเหนือดินของหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii*

### 4.2.1 เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

#### 4.2.1.1 ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า ใช้สารสกัดหยากจากส่วนเหนือดินของหนอนตายหยากหนัก 10.00 g นำมาให้กระแสไฟฟ้าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยมีกระแสไฟฟ้าเริ่มต้น 3 A และศักย์ไฟฟ้า 31.6 V ในการทดลองได้มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.2% w/v ก่อนให้กระแสไฟฟ้าเพื่อช่วยเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย และช่วยให้การจับก้อนด้วยไฟฟ้ามีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากการให้กระแสไฟฟ้ากับสารละลายของ *Stemona curtisii* เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ได้ค่าศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าที่บันทึกทุกๆ 15 นาที ดังแสดงในตารางที่ 4.13

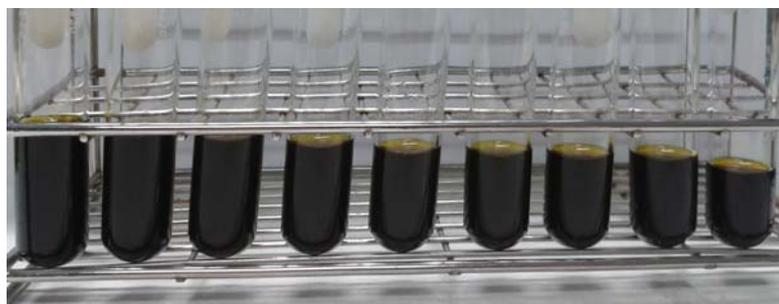
ตารางที่ 4.13 ค่าศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ ณ เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	ศักย์ไฟฟ้า (V)	กระแส (A)
0	-	-
15	31.6	1.98
30	31.6	1.64
45	31.6	1.35
60	31.6	1.53
75	31.6	1.60
90	31.6	1.15
105	31.6	1.05
120	31.6	0.94

จากผลการทดลองพบว่ากระแสไฟฟ้าที่บันทึกได้จะค่อยๆ ลดลงตามเวลาที่ผ่านไป อาจเนื่องมาจากการเก็บตัวอย่างสารละลาย 5.00 ml ทุกๆ 15 นาที ทำให้ปริมาตรของสารละลายที่สัมผัสกับขั้วไฟฟาลดลง กระแสไฟฟ้าจึงลดลงไปด้วย และอาจเกิดจากตะกอนที่มีมากขึ้น เมื่อเวลามากขึ้น ซึ่งตะกอนเหล่านี้จะไปบดบังการเกิดปฏิกิริยาระหว่างขั้วไฟฟ้า

เมื่อนำสารละลายที่เก็บได้ทุกๆ 15 นาที ไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) แล้วดูตสารละลายใสด้านบนเก็บไว้ จะได้สารละลายดังรูปที่ 4.4

เวลา (นาที)	0	15	30	45	60	75	90	105	120
-------------	---	----	----	----	----	----	----	-----	-----



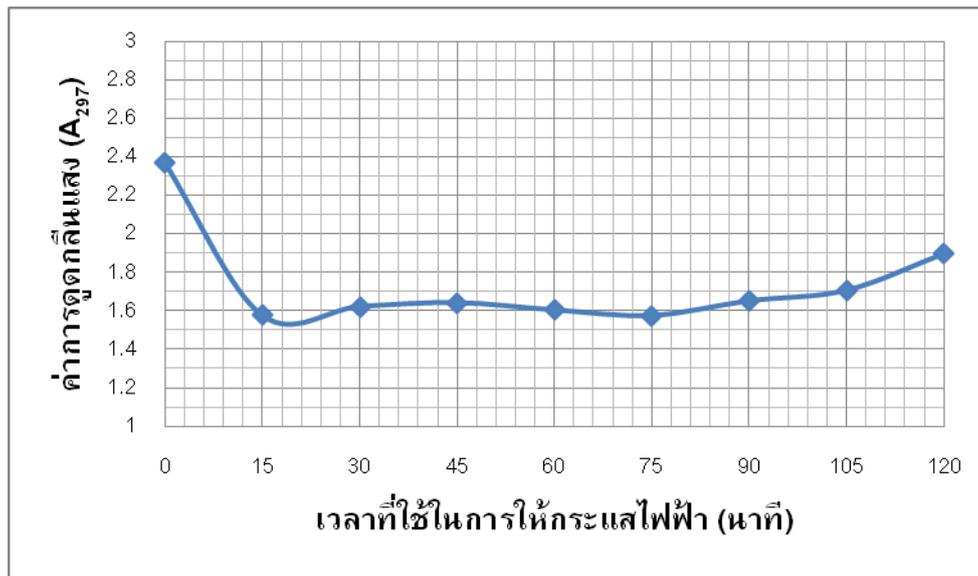
รูปที่ 4.4 สารละลายส่วนเหนือดินของหนอนตายหยากหลังจากให้กระแสไฟฟ้า 0-120 นาที

หลังจากทำการเจือจางสารละลายสีที่เก็บได้ 100 เท่า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นสูงสุด ( $\lambda_{max}$ ) 297 nm ได้ค่าการดูดกลืนแสง ณ เวลาต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ผ่านการให้ไฟฟ้า ณ เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	2.36785
15	1.57585
30	1.62140
45	1.64125
60	1.60400
75	1.57490
90	1.65085
105	1.70550
120	1.89525

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากตาราง 4.14 มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับเวลาที่ใช้ในการให้กระแสไฟฟ้า จะได้กราฟดังแสดงในรูปที่ 4.5



**รูปที่ 4.5** กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเวลาที่ใช้ในการให้กระแสไฟฟ้า

จากกราฟของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเวลาที่ใช้ในการให้กระแสไฟฟ้าพบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการให้กระแสไฟฟ้าคือ 15 นาที เนื่องจากที่เวลานี้สารละลายมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด หมายความว่าสารละลายมีการตกตะกอนสิ่งเจือปนต่างๆ ออกไปได้มากที่สุด โดยในปฏิกิริยาจะมีอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์;  $Al(OH)_3$  เกิดขึ้น ซึ่งอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์นี้จะสามารถดูดซับโมเลกุลต่างๆ ให้แยกตัวออกมาจากสารละลายโดยการตกตะกอนลงมาพร้อมกัน

#### 4.2.1.2 ผลการสกัดสารอัลคาลอยด์โดยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

การสกัดสารอัลคาลอยด์โดยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า ใช้สารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของหนอนตายหยาก (สารสกัดหยาบเอทานอล) หนัก 40.00 g เมื่อให้กระแสไฟฟ้าเป็นเวลา 15 นาที (ผลการทดลอง 4.2.1.1) ค่าศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.15

**ตารางที่ 4.15** ค่าศักย์ไฟฟ้าและกระแสไฟฟ้าที่วัดได้ เมื่อให้กระแสไฟฟ้าเป็นเวลา 15 นาที

ศักย์ไฟฟ้า (V)	กระแสไฟฟ้า (A)
31.6	1.87

จากการทดลองสกัดสารอัลคาลอยด์โดยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้าพบว่า เมื่อเริ่มต้นใช้สารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของหนอนตายหยากหนัก 40.00 g ได้สารสกัดหยาบจากวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้าหนัก 3.10 g

#### 4.2.1.3 ผลการแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

นำสารสกัดหยาบจากการจับก้อนด้วยไฟฟ้า 3.10 g มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี จะได้สารจำนวน 9 fraction เมื่อใช้ dragendroff's reagent ในการตรวจสอบสารจะพบว่าสารที่เป็นอัลคาลอยด์จะปรากฏเป็นจุดสีส้ม และพบว่าสามารถแยก stemocurtisine 35 mg ได้จาก fraction ที่ 7 และ 8

#### 4.2.1.4 % yield ของสารที่ได้จากเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

จากเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า ได้ % yield ของสารทั้งหมดดังสรุปได้ในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 น้ำหนักสารและ % yield ของสารที่ได้จากการสกัดโดยการจับก้อนด้วยไฟฟ้า เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอทานอล

ชื่อสาร	น้ำหนักสาร (g)	% yield
สารสกัดหยาบเอทานอล	40.00	-
สารสกัดหยาบจากการจับก้อนด้วยไฟฟ้า	24.60	-
สารสกัดหยาบไคคลอโรมีเทน	3.10	-
สาร stemocurtisine (A)	0.052	0.13

#### 4.2.1.5 การพิสูจน์โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์

สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ที่ได้ (A) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน เมื่อนำสารที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy พบว่า เมื่อนำค่า chemical shift จาก  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสาร A ที่แยกได้เปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ซึ่งแสดงในตาราง 4.17 สารอัลคาลอยด์ที่ได้น่าจะเป็น stemocurtisine ซึ่งแสดงโครงสร้างได้ดังรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.17 ข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) ของ stemocurtisine (A) ในสารละลาย  $\text{CDCl}_3$  จาก  
การทดลองเปรียบเทียบกับ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup>

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz)	$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz)
	จากการทดลอง	จากเอกสารอ้างอิง
1	4.07 (s)	4.01 (s)
2a	1.66 (m)	1.62 (m)
b	2.21 (d, $J = 16$ Hz)	2.21 (d, $J = 14.5$ Hz)
3a	1.27-1.32 (m)	1.21 (d, $J = 13.5$ Hz)
b	1.87 (m)	1.82 (m)
4a	2.92 (m)	2.87 (m)
b	3.02-3.03 (m)	3.02 (m)
6a	3.40-3.50 (m)	3.38 (t, $J = 13$ Hz)
b	2.98 (m)	2.96 (m)
7a	2.05 (m)	2.03 (m)
b	1.69 (m)	1.66 (m)
8a	2.36-2.42 (m)	2.36 (dd, $J = 4.5, 13.5$ Hz)
b	1.78 (m)	1.75 (m)
9	-	-
10	2.70 (d, $J = 4$ Hz)	2.65 (d, $J = 4.5$ Hz)
10a	3.53 (s)	3.44 (s)
11	3.08-3.11 (m)	3.07 (quin, $J = 6.5$ Hz)
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	2.09 (s)	2.08 (s)
18	1.39 (d, $J = 8$ Hz)	1.37 (d, $J = 7$ Hz)
OMe	4.17 (s)	4.15 (s)

## 4.2.2 เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย

### 4.2.2.1 ผลการสกัดสารอัลคาลอยด์โดยใช้ตัวทำละลาย

การสกัดสารอัลคาลอยด์โดยใช้ตัวทำละลาย ใช้สารสกัดหยาบเอทานอลหนัก 40.00 g นำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนก่อน เพื่อกำจัดเอาสารอินทรีย์อื่นๆ ออกไป เนื่องจากสารอัลคาลอยด์จะละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน เมื่อนำชั้นไดคลอโรมีเทนมาทำการสกัดต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริก สารอัลคาลอยด์จะอยู่ในชั้นกรด เนื่องจากสารอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นเบส สามารถทำปฏิกิริยากับกรดแล้วได้เกลือเกิดขึ้น หลังจากนั้นเมื่อนำสารละลายกรดมาทำให้เป็นเบส pH~10 โดยการเติมสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ลงไป แล้วนำมาสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทนอีกครั้ง พบว่าสารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ที่ได้หนัก 2.85 g

### 4.2.2.2 ผลการแยกสารอัลคาลอยด์จากสารสกัดหยาบจากวิธีสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย

จากการนำเอาสารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ที่ได้จากการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 2.85 g มาทำการแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุ Sephadex LH20 ได้สารจำนวน 5 fraction เมื่อใช้ dragendroff's reagent ในการตรวจสอบสาร จะพบว่าสารที่เป็นอัลคาลอยด์จะปรากฏจุดสีส้ม และพบว่า fraction ที่ 4 มีสารที่เป็นอัลคาลอยด์ซึ่งยังไม่บริสุทธิ์ จึงนำมาทำการแยกต่อโดยใช้คอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล ได้สารอัลคาลอยด์จำนวน 2 fraction เมื่อทำการทดสอบสารอัลคาลอยด์โดยใช้ dragendroff's reagent พบว่าสามารถแยก stemocurtisine (A) หนัก 11 mg จาก fraction ที่ 1 และสาร D หนัก 40.5 mg ได้จาก fraction ที่ 2

### 4.2.2.3 การพิสูจน์โครงสร้างของสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์

สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ A ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน เมื่อนำสารที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy และนำค่า chemical shift จาก  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารที่แยกได้เปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ดังแสดงในตารางที่ 4.18 พบว่าสารอัลคาลอยด์ที่ได้จึงน่าจะเป็น stemocurtisine ซึ่งแสดงโครงสร้างได้ดังรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.18 ข้อมูล  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) ของ stemocurtisine (A) ในสารละลาย  $\text{CDCl}_3$  จาก  
การทดลองเปรียบเทียบกับ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) จากเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup>

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz)	$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz)
	จากการทดลอง	จากเอกสารอ้างอิง
1	4.05 (s)	4.01 (s)
2a	1.63 (m)	1.62 (m)
b	2.21 (d, $J = 12$ Hz)	2.21 (d, $J = 14.5$ Hz)
3a	1.27 (m)	1.21 (d, $J = 13.5$ Hz)
b	1.85 (m)	1.82 (m)
4a	2.96 (m)	2.87 (m)
b	3.01-3.05 (m)	3.02 (m)
6a	3.41 (m)	3.38 (t, $J = 13$ Hz)
b	2.97 (m)	2.96 (m)
7a	2.04-2.06 (m)	2.03 (m)
b	1.65-1.75 (m)	1.66 (m)
8a	2.36-2.41 (m)	2.36 (dd, $J = 4.5, 13.5$ Hz)
b	1.75-1.82 (m)	1.75 (m)
9	-	-
10	2.68 (d, $J = 4$ Hz)	2.65 (d, $J = 4.5$ Hz)
10a	3.49 (s)	3.44 (s)
11	3.06-3.08 (m)	3.07 (quin, $J = 6.5$ Hz)
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	2.09 (s)	2.08 (s)
18	1.38 (d, $J = 7.5$ Hz)	1.37 (d, $J = 7$ Hz)
OMe	4.16 (s)	4.15 (s)

สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ D ที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี เมื่อนำสารที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy และ ยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค single crystal X-ray crystallographic analysis พบว่าสารที่ได้เป็นสารใหม่ คือ 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine แสดงดังตาราง 4.19

ตารางที่ 4.19 ข้อมูล  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , HMBC และ NOESY NMR ของสาร D ในสารละลาย  $\text{CDCl}_3$  (chemical shifts in ppm,  $J$  in Hz, compound numbering based on that of stemocurtisine)

ตำแหน่ง	$^{13}\text{C}$ (125 MHz)	$^1\text{H}$ (500 MHz)	HMBC Correlations (from C to H)	NOESY (significant correlations)
1	74.4 (CH)	3.91 (d, $J = 2$ )	H-10	H-10a
2	25.1 ( $\text{CH}_2$ )	2.18-2.09 (m)	-	-
3	20.7 ( $\text{CH}_2$ )	1.42-1.39 (m)	-	-
4	44.7 ( $\text{CH}_2$ )	2.96 (d, $J = 13$ , $\alpha$ ) 2.49 (dt, $J = 2.5$ , 12.5, $\beta$ )	-	H10-a
6	62.4 ( $\text{CH}_2$ )	3.76-3.70 (m)	H-7, H-8	-
7	27.5 ( $\text{CH}_2$ )	1.89-1.83 (p, $J = 7$ )	H-8	H-1, H-10
8	34.9 ( $\text{CH}_2$ )	2.18-2.15 (m, $\alpha$ ) 2.11-2.07 (m, $\beta$ )	H-6, H-7	- -
9	121.5 (C)	-	H-7, H-8, H-10a, H-11	-
10	60.7 (CH)	2.13 (br, s)	H-18	-
10a	63.4 (CH)	3.08 (d, $J = 2.5$ )	-	-
11	40.6 (CH)	3.25-3.23 (m)	H-18	H-1, H-10a
12	147.9 (C)	-	H-10, H-11, H- 18	-
13	121.6 (C)	-	-	-
14	163.4 (C)	-	H-17, OMe	-
15	96.5 (C)	-	H-17	-
16	170.1 (C)	-	H-17	-
17	9.1 ( $\text{CH}_3$ )	2.06 (s)	-	-
18	22.4 ( $\text{CH}_3$ )	1.29 (d, $J = 7$ )	-	H-10
OMe	58.9 ( $\text{CH}_3$ )	4.13 (s)	-	H-17

### 4.3 ปริมาณของตัวทำละลายและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดอัลคาลอยด์

การเปรียบเทียบปริมาณของตัวทำละลายและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดอัลคาลอยด์จาก 2 วิธี คือ สกัดด้วยตัวทำละลาย และสกัดโดยใช้วิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า ดังแสดงในตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.20 ปริมาณตัวทำละลายและสารเคมีที่ใช้ในการสกัดอัลคาลอยด์

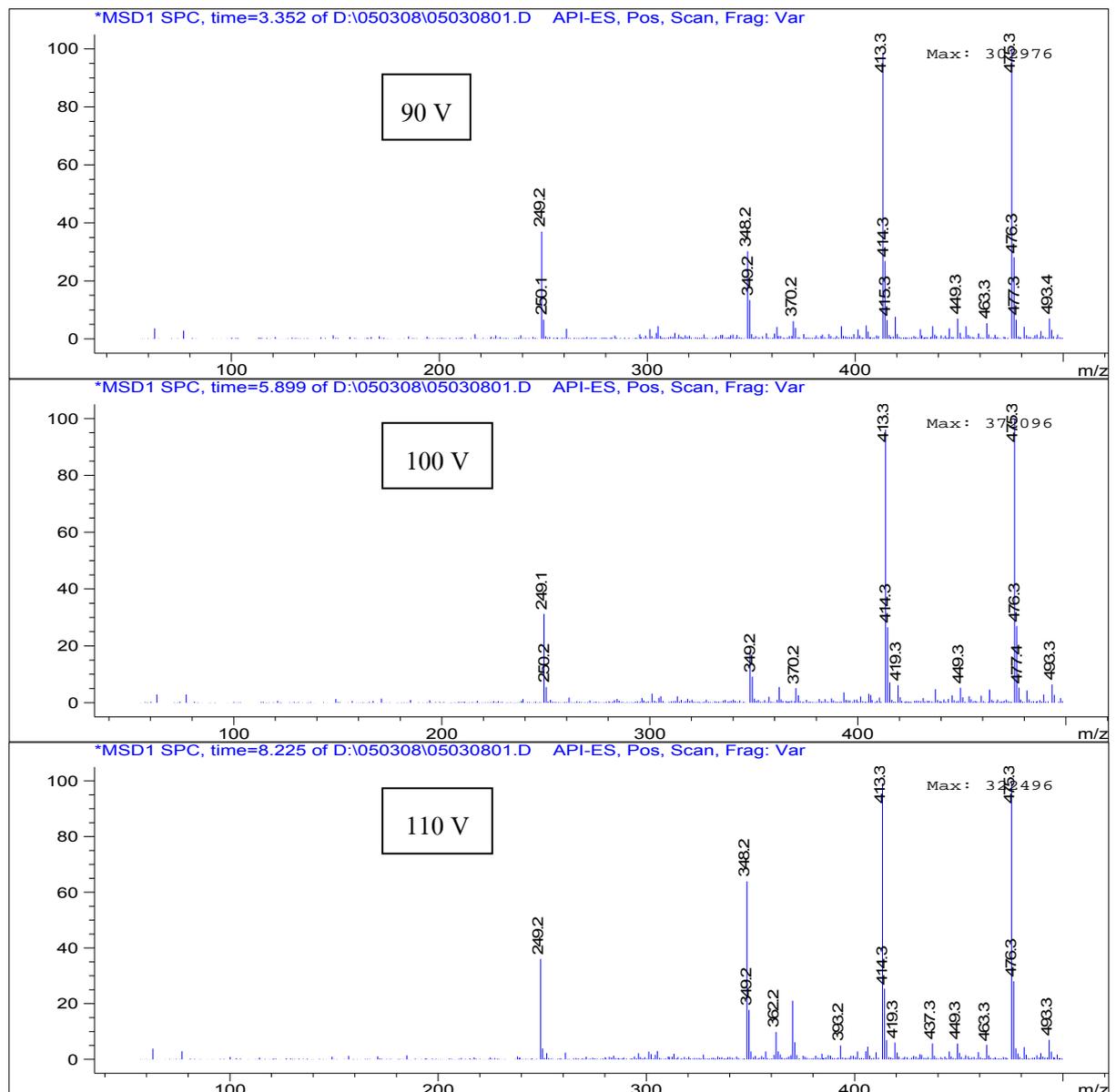
ตัวทำละลาย	ปริมาณที่ใช้ (ml)	
	วิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย	วิธีสกัดโดยวิธีจับก้อนด้วยไฟฟ้า
เอทานอล	60	760
ไคคลอโรมีเทน	1,600	600
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5% v/v	800	-
สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	150	-

จากตารางที่ 4.20 จะเห็นได้ว่าการสกัดอัลคาลอยด์โดยใช้วิธีจับก้อนด้วยไฟฟ้าใช้สารละลายน้อยชนิดกว่าการสกัดอัลคาลอยด์ด้วยตัวทำละลาย คือ ไม่ต้องใช้กรดไฮโดรคลอริกและสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการสกัด แม้ว่าจะต้องใช้เอทานอลในปริมาณที่มากกว่า แต่ก็ใช้ไคคลอโรมีเทนในปริมาณที่น้อยกว่ามาก ซึ่งไคคลอโรมีเทนเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อร่างกายและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการใช้เทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้าจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดอัลคาลอยด์เพื่อช่วยลดการใช้ตัวทำละลายและสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมได้

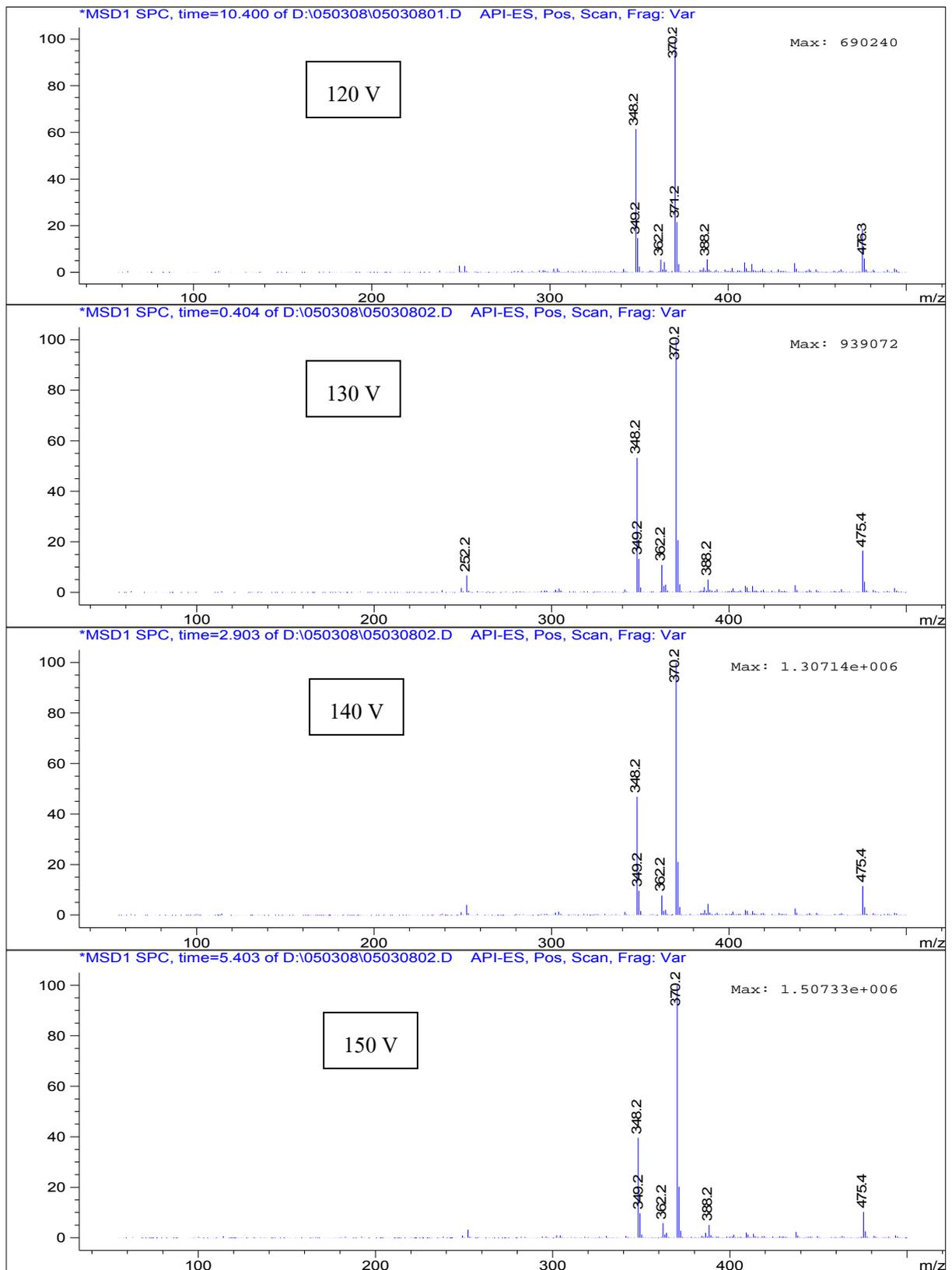
### 4.4 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS

เมื่อนำสารสกัดที่เข้มข้นที่สกัดได้จากรากต้นหนอนตายหยากมาเจือจางด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS แบบ FIA โดยการเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆ ดังนี้ fragmentor (90-150 V), capillary voltage (3000-4500 V), drying gas flow (9-11 L/min) และ nebulizer pressure (40-50 psi) โดยใช้ stemocurtisine เป็นสารทดสอบ ผลการศึกษาได้แมสสเปกตรัมของสารอัลคาลอยด์ชนิด stemocurtisine ดังรูป 4.6 -4.9 จากการพิจารณารูปแบบการแตกหักของโมเลกุลของสาร stemocurtisine (M.W. = 347) และจำนวนหนักของไอออนที่ปรากฏ พบว่าสภาวะของ LC-MS ที่เหมาะสม คือ fragmentor 120 V, capillary voltage 4000 V, drying gas flow 10 L/min, nebulizer pressure 40 psi และ drying gas temperature 320 °C

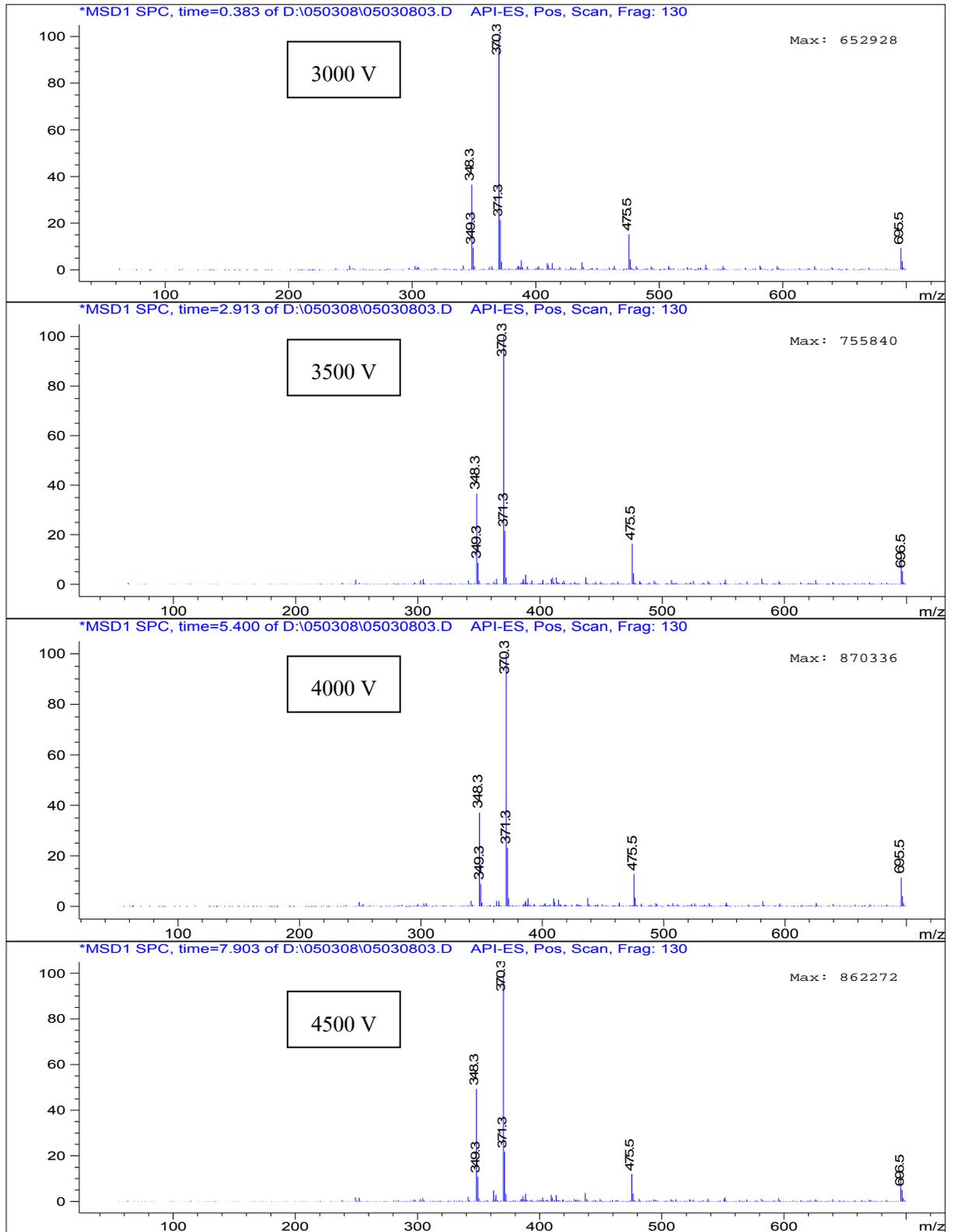
จากการนำสารสกัดได้จากรากต้นหนอนตายหยากมาเจือจางด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม มาทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS โดยใช้คอลัมน์ C-18 ยาว 15 ซม เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.6 มม ภายใต้สภาวะของเครื่อง LC-MS ที่เหมาะสมดังแสดงข้างต้น ผลการศึกษาได้แมสสเปกตรัมของสารอัลคาลอยด์ทั้งสามชนิดแสดง ดังรูป 4.10 เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัมแล้วพบ pseudomolecular ion  $[M+H]^+$  และ sodium adduct ion  $[M+Na]^+$  ของสารอัลคาลอยด์ทั้งสามชนิด คือ oxyprotostemonine (M.W. = 431) ที่ m/z เท่ากับ 432 และ 454, stemocurtisine (M.W. = 347) ที่ m/z 348 และ 370 และ stemocurtisinol (M.W. = 405) ที่ m/z 406 และ 428 ตามลำดับ



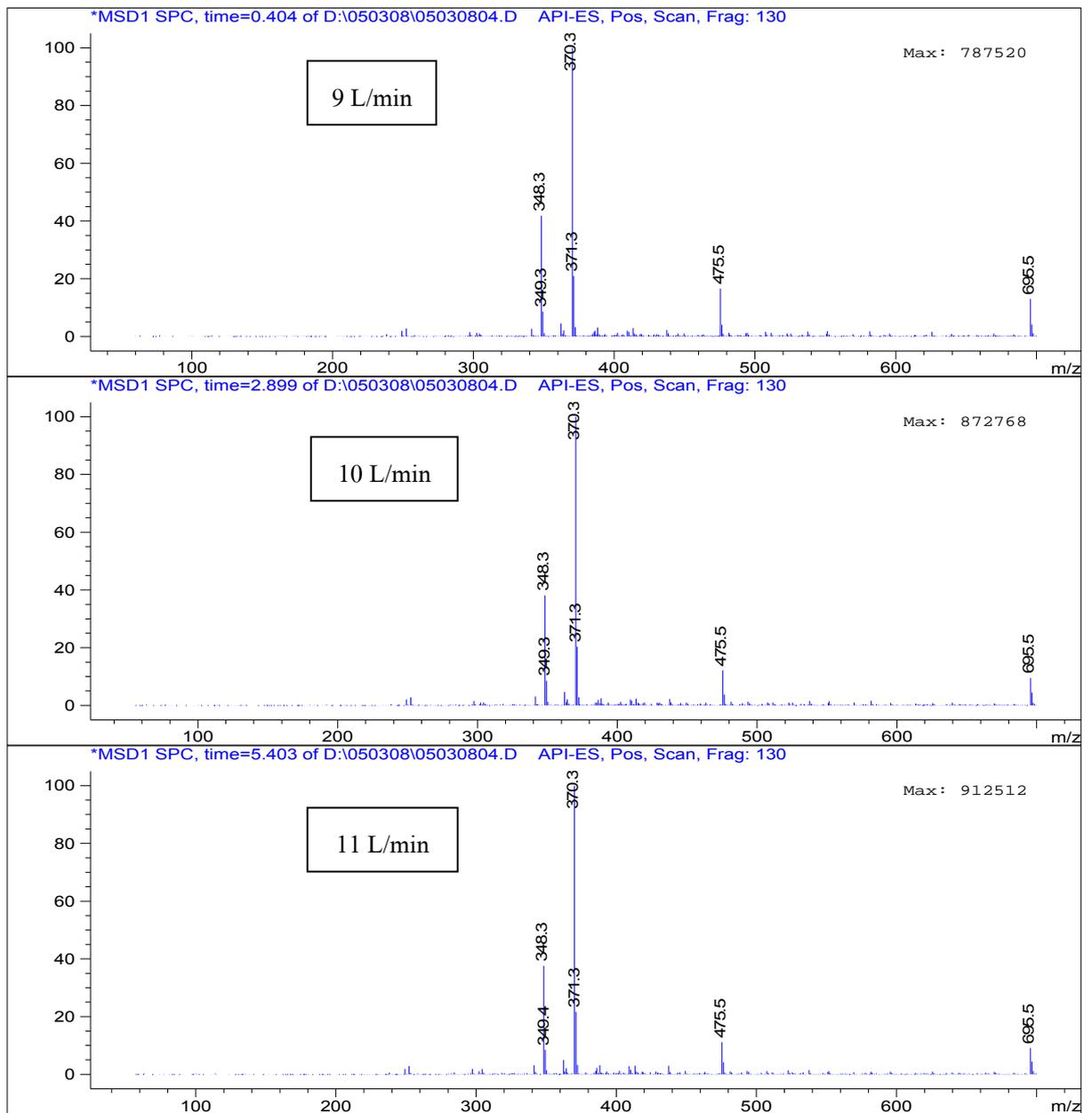
รูปที่ 4.6 แมสสเปกตรัมของ stemocurtisine ที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก วิเคราะห์ด้วยเทคนิค FIA-LC-MS ณ fragmentor 90-150 V



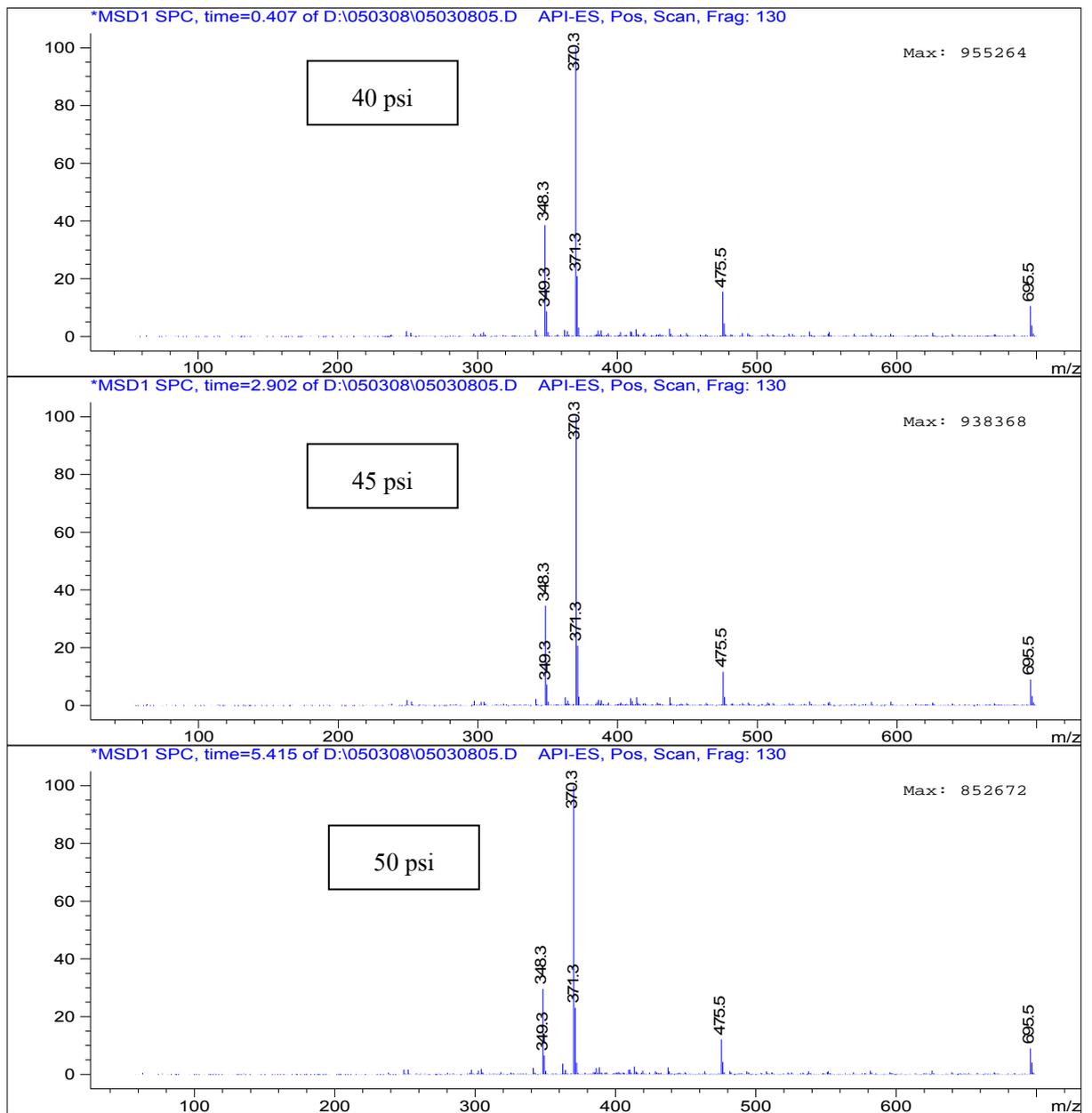
รูปที่ 4.6 (ต่อ) แมสสเปกตรัมของ stemocurtisine ที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก วิเคราะห์ด้วยเทคนิค FIA-LC-MS ณ fragmentor 90-150 V



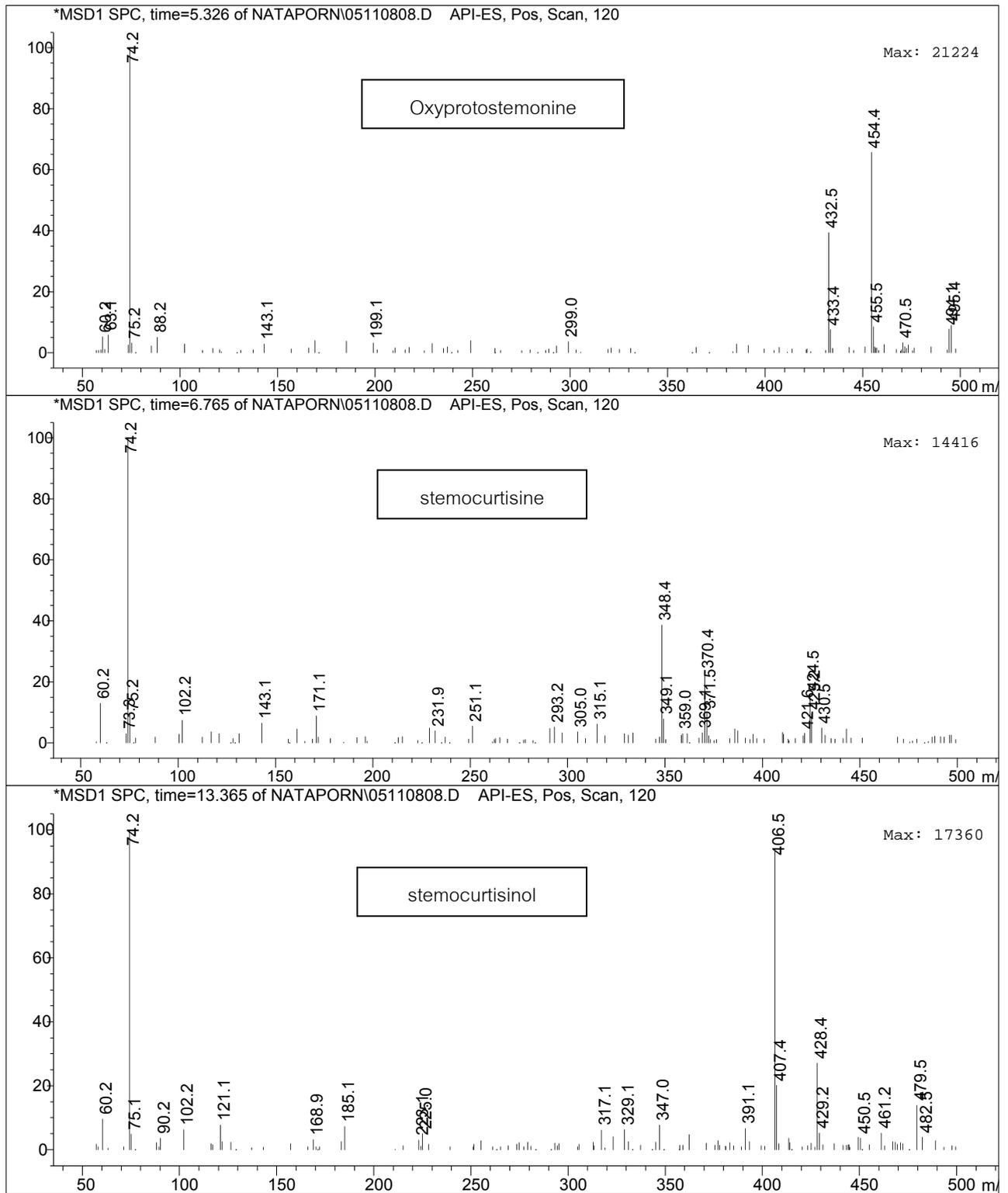
รูปที่ 4.7 แมสสเปกตรัมของ stemocurtisine ที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก วิเคราะห์ด้วยเทคนิค FIA-LC-MS ณ capillary voltage 3000-4500 V



รูปที่ 4.8 แมสสเปกตรัมของ stemocurtisine ที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก วิเคราะห์ด้วยเทคนิค FIA-LC-MS ณ drying gas flow 9-11 L/min



รูปที่ 4.9 แมสสเปกตรัมของ stemocurtisine ที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก วิเคราะห์ด้วยเทคนิค FIA-LC-MS ณ gas nebulizer pressure 40-50 psi



รูปที่ 4.10 แมสสเปกตรัมของสารอัลคาลอยด์ทั้งสามชนิดที่สกัดจากรากต้นหนอนตายหยาก  
วิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ณ สภาวะที่เหมาะสม

#### 4.5 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MS/MS<sup>n</sup>

การแตกตัวของน้ำหนักโมเลกุลของ oxyprotostemonine (M.W. = 431) ที่ m/z เท่ากับ 432 และ 454, stemocurtisine (M.W. = 347) ที่ m/z 348 และ 370 และ stemocurtisinol (M.W. = 405) ที่ m/z 406 และ 428 ตามลำดับ แสดงดังตาราง 4.21

ตารางที่ 4.21 การแตกตัวของน้ำหนักโมเลกุลของสารอัลคาลอยด์ที่แยกได้

Stemona alkaloid	ESIMS (m/z)	MS <sup>n</sup> m/z (%base peak)
stemocurtisine	348	MS <sup>2</sup> [348]: 330[100], 304[10] MS <sup>3</sup> [348] → 330: 312[50], 302[100], 254[40]
stemocurtisinol	406	MS <sup>2</sup> [406]: 388[100], 304[69], 244[19] MS <sup>3</sup> [406] → 388: 370[44], 360[47], 304[100], 260[38]
oxyprotostemonine	432	MS <sup>2</sup> [432]: 414[92], 404[100], 388[42], 386[75], 250[58] MS <sup>3</sup> [432] → 414: 396[33], 386[100], 370[33]

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะทำการให้กระแสไฟฟ้ากับสารละลายตัวอย่างในสารละลายได้มีการเติมเกลือ NaCl 0.2 % ลงไป เพื่อช่วยเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย และช่วยให้การจับก้อนด้วยไฟฟ้ามีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยการหาสภาวะที่เหมาะสมนี้จะใช้เวลาทั้งหมด 2 ชั่วโมง (กระแสไฟฟ้าเริ่มต้น 3 A, ศักย์ไฟฟ้า 31.6 V) จากผลการทดลองพบว่าเมื่อให้กระแสไฟฟ้าแก่สารละลายตัวอย่างเป็นเวลา 15 นาที สารละลายเริ่มมีตะกอนเกิดขึ้น และมีจำนวนมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป โดยในปฏิกิริยาจะมีอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์  $Al(OH)_3$  เกิดขึ้นซึ่งจะมีลักษณะเป็นเจล และสามารถดูดซับโมเลกุลต่างๆให้แยกตัวออกมาจากสารละลายโดยการตกตะกอนออกมาพร้อมกัน และในขณะที่เดียวกันค่ากระแสไฟฟ้าจะค่อยๆลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนของสารละลายมีน้อยลง และมีตะกอนเกิดขึ้นจำนวนมาก ตะกอนที่เกิดขึ้นเหล่านี้จะไปบดบังการเกิดปฏิกิริยาระหว่างขั้วไฟฟ้า และเมื่อนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปทำการหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 5500 rpm และดูดสารละลายใสที่ได้ไปวัดหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 290 nm เพื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับเวลาทำการให้กระแสไฟฟ้า แสดงไว้ดังรูปที่ 4.2 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายลดลงเรื่อยๆ และเริ่มคงที่ตั้งแต่เวลาที่ 45 นาที ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับสีของสารละลายที่จางลงจากตอนเริ่มต้น ดังแสดงในรูปที่ 4.1 จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า เวลาที่เหมาะสมสำหรับการให้กระแสไฟฟ้ากับสารละลายของรากหนอนตายหยากชนิด *Stemona curtisii* คือ เวลา 45 นาที

สำหรับส่วนเหนือดินของหนอนตายหยาก จากกราฟของความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเวลาที่ใช้ในการให้กระแสไฟฟ้าพบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการให้กระแสไฟฟ้าคือ 15 นาที เนื่องจากที่เวลานี้สารละลายมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด หมายความว่าสารละลายมีการตกตะกอนสิ่งเจือปนต่างๆ ออกไปได้มากที่สุด โดยในปฏิกิริยาจะมีอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์;  $Al(OH)_3$  เกิดขึ้น ซึ่งอลูมิเนียมไฮดรอกไซด์นี้จะสามารถดูดซับโมเลกุลต่างๆ ให้แยกตัวออกมาจากสารละลายโดยการตกตะกอนลงมาพร้อมกัน<sup>[7]</sup>

#### 5.2 การสกัดและการแยกสารอัลคาลอยด์ด้วยวิธีการจับก้อนด้วยไฟฟ้า

เมื่อทำการให้กระแสไฟฟ้าผ่านสารละลายสารสกัดหยากเอธานอลของรากหนอนตายหยากเป็นเวลา 45 นาที และในส่วนเหนือดินเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออก จากนั้นนำสารสกัดหยากที่ได้มาทำการสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทน และทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบว่า ในรากหนอนตายหยากสามารถแยก

สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ได้ 3 ชนิด คือ stemocurtisine (A), oxyprotostemonine (B) และ stemocurtisinol (C) สำหรับในส่วนเหนือดินแยกได้ 1 ชนิดคือ stemocurtisine (A)

สาร A ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน และเมื่อนำสารที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy และนำค่า chemical shift จาก  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารที่แยกได้เทียบกับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.3 โดยการสังเกตจากตำแหน่งหลักๆที่แสดงโครงสร้างของ Stemona alkaloids จากเอกสารอ้างอิง คือ ตำแหน่ง H1, H11, H17, H18 และ OMe ซึ่งมีค่า chemical shift เท่ากับ 4.01 ppm (s), 3.07 ppm (quin,  $J = 6.5$  Hz), 2.08 ppm (s), 1.37 ppm (d,  $J = 7$  Hz) และ 4.15 (s) ตามลำดับ ซึ่งค่า chemical shift ของสารที่ได้จากการทดลอง มีค่า chemical shift ใกล้เคียงกับ stemocurtisine และผลการทดลองที่ได้จาก mass spectroscopy (MS) พบว่าสาร A มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 347 g/mol เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างของ stemocurtisine ซึ่งเขียนเป็นสูตรโมเลกุลได้  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_5$  มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 347.40 g/mol ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารที่แยกได้ คือ stemocurtisine

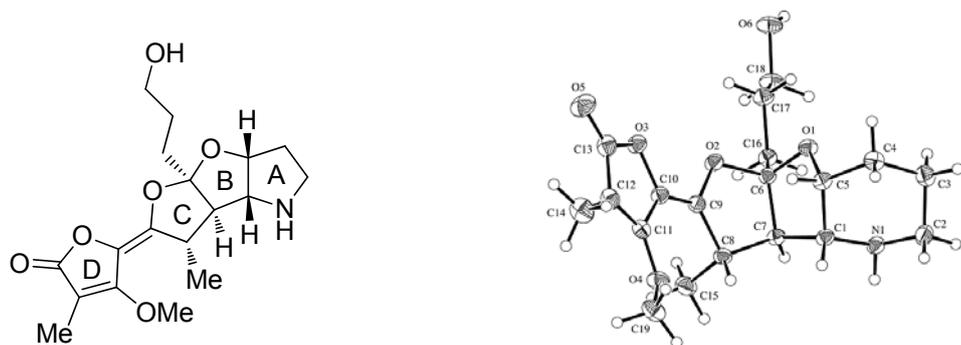
สาร B จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน และเมื่อนำสารที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy และนำค่า chemical shift จาก  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารที่แยกได้เทียบกับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.3 โดยการสังเกตจากตำแหน่งหลักๆที่แสดงโครงสร้างของ Stemona alkaloids จากเอกสารอ้างอิง คือ ตำแหน่ง H1, H11, H17, H18 และ OMe ซึ่งมีค่า chemical shift เท่ากับ 4.67 ppm(s), 2.08 ppm (s), 1.38 ppm (d,  $J = 6.5$  Hz), 4.23 ppm (t,  $J = 4.5$  Hz) และ 4.15 ppm (s) ตามลำดับ ซึ่งค่า chemical shift ของสารที่ได้จากการทดลอง มีค่า chemical shift ใกล้เคียงกับ oxyprotostemonine และผลการทดลองที่ได้จาก mass spectroscopy (MS) พบว่าสาร B มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 431 g/mol เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้าง oxyprotostemonine ซึ่งเขียนเป็นสูตรโมเลกุลได้  $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_7$  มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 431.19 g/mol ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารที่แยกได้ คือ oxyprotostemonine

สาร C จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน และเมื่อนำสารที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy และนำค่า chemical shift จาก  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารที่แยกได้เทียบกับเอกสารอ้างอิง<sup>[20]</sup> ดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.3 โดยการสังเกตจากตำแหน่งหลักๆที่แสดงโครงสร้างของ Stemona alkaloids จากเอกสารอ้างอิง คือ ตำแหน่ง H1, H11, H17, H18 และ OMe ซึ่งมีค่า chemical shift เท่ากับ 4.05 ppm (s), 3.07 ppm (quin,  $J = 6.1$  Hz), 2.07 ppm (s), 1.38 ppm (d,  $J = 7$  Hz) และ 4.15 ppm (s) ตามลำดับ ซึ่งค่า chemical shift ของสารที่ได้จากการทดลอง พบว่ามีค่า chemical shift ใกล้เคียงกับ stemocurtisinol และจากโครงสร้างของ stemocurtisinol ซึ่งเขียนเป็นสูตรโมเลกุลได้  $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_6$  มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 405.21 g/mol ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารที่แยกได้ คือ stemocurtisinol

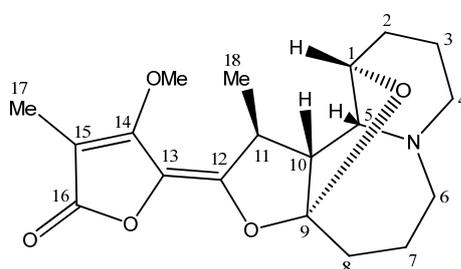
### 5.3 การสกัดและการแยกสารอัลคาลอยด์ด้วยตัวทำละลาย

การสกัดสารอัลคาลอยด์ด้วยตัวทำละลาย ทำโดยนำสารสกัดหยาบเอทานอล มาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน เพื่อเป็นการกำจัดสารอินทรีย์ชนิดอื่นออกไป สารพวกอัลคาลอยด์จะละลายได้ในไดคลอโรมีเทน จากนั้นทำการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5% และสารละลายที่ต้องการจะอยู่ในชั้นกรด เพราะอัลคาลอยด์ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติเป็นเบสจึงสามารถทำปฏิกิริยากับกรดได้เป็นเกลือเกิดขึ้น หลังจากทำสารละลายกรดให้เป็นเบส pH ประมาณ 10 ด้วยการเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ลงไปแล้วนำไปสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน และได้สารสกัดหยาบอัลคาลอยด์ จากนั้นนำมาทำการแยกให้ได้สารที่บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี พบว่าสามารถแยกสารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์จากหนอนตายหยากได้ 3 ชนิด คือ stemocurtisine (A) oxyprotostemonine (B) stemocurtisinol (C) และ เช่นเดียวกับวิธีการจับก่อนด้วยไฟฟ้า สำหรับส่วนเหนื่อดินแยกได้สารอัลคาลอยด์บริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ สาร stemocurtisine (A) และ 6-Hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine (D)

สาร D จะมีลักษณะเป็นผลึกของแข็งไม่มีสี จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 168-170 °C มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 366.1917 สูตรโมเลกุลที่ได้คือ  $C_{19}H_{27}NO_6$  และเมื่อนำสารที่ได้ไปพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy แสดงผลดังตารางที่ 4.19 และรูปที่ 5.1 พบว่าข้อมูลที่ได้อของสาร D แสดงส่วนโครงสร้าง C- และ D- ring เหมือนกับสาร stemocurtisine (A) (รูปที่ 5.2)<sup>91</sup> เมื่อนำข้อมูล  $^{13}C$  NMR ของสาร D และ stemocurtisine มาเปรียบเทียบกัน พบส่วนที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดคือ chemical shifts ที่ตำแหน่ง C-4 และ C-6. สำหรับค่า chemical shift ที่ตำแหน่ง C-6 ของสาร D พบที่ตำแหน่ง downfield (ca -10 ppm) มีค่า chemical shift เท่ากับ 62.4 ซึ่งระบุว่าที่ตำแหน่ง C-6 เป็น primary hydroxyl group. ขณะที่  $^{13}C$  NMR chemical shift ของ C-4 ของสาร D อยู่ที่บริเวณ upfield (ca -10 ppm) ที่ chemical shift 44.7 เนื่องจากขาดผลของ  $\alpha$ -effect จาก N-substituent (C-6). ในการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร D ด้วยวิธี single crystal X-ray crystallographic analysis (รูปที่ 5.1) ช่วยยืนยันว่าโครงสร้างสารที่ได้คือ 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine, ซึ่งเกิดจากการแตกพันธะระหว่าง C-6—N-5 ของ stemocurtisine ซึ่งโครงสร้างแบบ seco-pyrido[1,2-a]azepine นี้พบเป็นครั้งแรกสำหรับอัลคาลอยด์จากหนอนตายหยาก



รูปที่ 5.1 โครงสร้างสาร D



รูปที่ 5.2 โครงสร้างสาร stemocurtisine (A)

#### 5.4 ผลการเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคการจับก่อนด้วยไฟฟ้ากับการสกัดด้วยตัวทำละลาย

ผลการเปรียบเทียบ % yield ของสารจากส่วนรากและส่วนเหนือดิน ระหว่างเทคนิคการจับก่อนด้วยไฟฟ้ากับการสกัดด้วยตัวทำละลาย แสดงดังตาราง 5.1 และ 5.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 5.1 ผลการเปรียบเทียบ % yield ของสารจากส่วนรากที่แยกได้จาก 2 เทคนิค

ชื่อสาร	% yield (การจับก่อนด้วยไฟฟ้า)	% yield (การสกัดด้วยตัวทำละลาย)
stemocurtisine (A)	0.40	0.09
oxyprotostemonine (B)	0.06	0.03
stemocurtisinol (C)	0.04	0.02

ตารางที่ 5.2 ผลการเปรียบเทียบ % yield ของสารจากส่วนเหนือดินที่แยกได้จาก 2 เทคนิค

ชื่อสาร	% yield (การจับก้อนด้วยไฟฟ้า)	% yield (การสกัดด้วยตัวทำละลาย)
stemocurtisine (A)	0.13	0.05

จากผลการทดลองพบว่าเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้าสามารถใช้ในการสกัดสารอัลคาลอยด์บางชนิดจากรากและส่วนเหนือดินของหนอนตายหยากชนิด *Stemona curtisii* ได้ และเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง 2 เทคนิค ปรากฏว่าเทคนิคการจับก้อนด้วยไฟฟ้าสามารถสกัดสารอัลคาลอยด์ได้ % yield เทียบกับน้ำหนักสารสกัดหยาบเอธานอลสูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลาย ดังแสดงในตาราง 5.1 และ 5.2

ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS และ MS-MS พบไอออนของสารอัลคาลอยด์ที่เด่นชัด คือ pseudomolecular ion  $[M+H]^+$  และ sodium adduct ion  $[M+Na]^+$  ของ oxyprotostemonine (M.W. = 431) ที่ m/z เท่ากับ 432 และ 454, stemocurtisine (M.W. = 347) ที่ m/z 348 และ 370 และ stemocurtisinol (M.W. = 405) ที่ m/z 406 และ 428 ตามลำดับ และได้รูปแบบการแตกตัวของน้ำหนักโมเลกุลซึ่งสามารถใช้ระบุตำแหน่งของฟังก์ชันเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสารนั้นๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.21

## เอกสารอ้างอิง

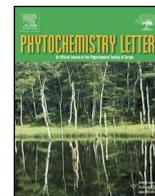
- [1] บุญยพรรณ สมแก้ว, รายงานปัญหาพิเศษ “การศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดจากผลมะแว้งต้น หัวมันฝรั่ง และรากหนอนตายหยากด้วยไรทะเล”, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2549.
- [2] เสี่ยม พงษ์บุญรอด, “ไม้เทศเมืองไทย”, ห้างหุ้นส่วนจำกัดเกษมบรรณกิจ กรุงเทพฯ, 2508.
- [3] Pilli, R. A. and de Oliveira, M. C. F. 2000. Recent progress in the chemistry of the *Stemona* alkaloids. *Natural Product Report*. 17, 117-127.
- [4] Pyne, S. G. Ung, A. T. Jatisatiernr, A. and Mungkornasawakul, P. 2007. The pyrido [1,2-a]azepine *Stemona* alkaloids. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 01(2), 157-165.
- [5] วาสนา ประภาเลิศ, รายงานปัญหาพิเศษ “การจับก้อนด้วยไฟฟ้าของส่วนประกอบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากต้นรอกฟ้า”, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2548.
- [6] ประไพ ประดับคำ, รายงานปัญหาพิเศษ “การเตรียมสารสีเลคโดยการจับก้อนด้วยไฟฟ้า”, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2550.
- [7] อนุรักษ์ พุทรวงศ์, รายงานปัญหาพิเศษ “การประยุกต์การจับก้อนด้วยไฟฟ้าในการตัดแยกแอลคาลอยด์”, ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2549.
- [8] Phutdhawong, W. and Buddhasukh, D. 2007. *Applications of Electrocoagulation* 1<sup>st</sup> Edition. Chotana Print co.ltd,.
- [9] Mungkornasawakul, P., Pyne, S. G., Jatistisienr, A., Supyen, D., Lie, W., Ung, A.T., Skelton, B.W. and White, A. H. 2003. Stemocurtisine, the First Pyridol [1,2-a]azaepine *Stemona* Alkaloid. *Journal of Natural Product*. 66, 980-982.
- [10] Mungkornasawakul, P., Pyne, S. G., Jatistisienr, A., Supyen, D., Jatistisienr, C., Lie, W., Ung, A.T., Skelton, B.W. and White, A. H. 2004. Phytochemical and Larvicidal Studies on *Stemona curtisii* Hook. F: Structure of a new Pyridol [1,2-a]azaepine *Stemona* Alkaloid. *Journal of Natural Product*. 67, 675-677.
- [11] Kaltenegger, E., Brem, B., Mereiter, K., Kalchhauser, H., Kahlig, H., Hofer, O., Vajrodara, S. and Grager, H. 2003. Insecticidal pyrido[1,2-a]azepine alkaloids and related derivatives from *Stemona* species. *Phytochemistry*. 63, 803-816.

## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- [12] Chaiyong, S. Jatisatienr, A. Mungkornasawakul, P. Sastraruji, T. Pyne, S. G. Ung, A. T. Urathamakul T. and Lie, W. 2010. Phytochemical investigations of *Stemona curtisii* and synthetic studies on stemocurtisine alkaloids. *Journal of Natural Product*. 73, 1833-1838.
- [13] Jumpatong, K., Phutdhawong, W., and Buddhasukh, D. 2006. Dechlorophyllation by Electrocoagulation. *Molecules*, 11, 156-162.
- [14] Chairungsi, N. , Jumpatong, K., Phutdhawong, W., and Buddhasukh, D. 2006. Solvent effects in electrocoagulation of selected plant pigments and tannin. *Molecules*.11, 309- 317.
- [15] Jumpatong, K., Phutdhawong, W., Chowwanapoonpohn, S., Garson, M. J., Pyne, S. G., and Buddhasukh, D. 2007. Electrocoagulation in aqueous alcoholic solutions. *Trends in Electrochemistry Research*, Nova Publishers, New York. Chapter 5, 143-160.
- [16] Chairungsi, N. , Jumpatong, K., Suebsakwong, P., Sengpracha, W., Phutdhawong, W., and Buddhasukh, D. 2006. Electrocoagulation of quinone pigments. *Molecules*.11, 514- 522.
- [17] Phutthawong, N., Jampatong, K., Chairungsri, N., Wangkarn, S. and Buddhasukh, D. 2007. Application of electrocoagulation to the isolation of alkaloids, *Chiang Mai Journal of Science*. 34, 127-133.
- [18] Yan, Z., Ren, W., Po, M., Yan, T., Yui, M., Tak, W., Hong, X., Li, S., Paul Pui, H. and Pang, C. 2006. Analyse of *Stemona* alkaloids in *Stemona tuberosa* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass spectrometry*. 20. 1030-1038.
- [19] Song, L., Ren, W., Po, M., Ling, C., Hong, X., Grager, H., Paul pui, H. and Pang, C. 2007. Quality evaluation of *Radix Stemona* through simultaneous quantification of bioactive alkaloids by high-performance liquid chromatography coupled with diodes array and evaporative light scattering detectors. *Biomedical Chromatography*. 21, 1088-1094.
- [20] Mungkornasawakul, P. 2004. Ph.D. Thesis "Pesticidal plant extract for reducing the agricultural use of harmful pesticides", Chiang Mai University, Thailand.

ภาคผนวก ค Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ  
Pitchaya Mungkornasawakul, Stephen G. Pyne, Anthony C. Willis, Arayar Jatisatienr, Duang Phuthsuk, Wilford Lie, 2013. 6-Hydroxy-5,6-stemocurtisine: A novel seco-stemocurtisine-type alkaloid. *Phytochemistry Letters*. 6. 602-605.
2. เสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง "Analysis of *Stemona* alkaloids from *Stemona curtisii* via LC-MS" ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ "The 14th Asian Chemical Congress 2011 (14 ACC)" ระหว่างวันที่ 5-8 กันยายน พ.ศ. 2554. Bangkok.



## 6-Hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine: A novel seco-stemocurtisine-type alkaloid

Pitchaya Mungkornasawakul<sup>a,b,c,\*</sup>, Stephen G. Pyne<sup>d</sup>, Anthony C. Willis<sup>e</sup>,  
Arayar Jatisatien<sup>f</sup>, Duang Phuthsuk<sup>g</sup>, Wilford Lie<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50202, Thailand

<sup>b</sup> Environmental Science Program, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50202, Thailand

<sup>c</sup> Department of Chemistry and Materials Science Research Center, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

<sup>d</sup> School of Chemistry, University of Wollongong, Wollongong, New South Wales 2522, Australia

<sup>e</sup> Research School of Chemistry, The Australian National University, Canberra A.C.T. 0200, Australia

<sup>f</sup> Department of Biology, Chiang Mai University, Chiang Mai 50202, Thailand

<sup>g</sup> Faculty of Science, Mae Jo University, Chiang Mai 50290, Thailand

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 March 2013

Received in revised form 10 July 2013

Accepted 19 July 2013

Available online 1 August 2013

#### Keywords:

*Stemona* alkaloid

*Stemona curtisii*

Pyrido[1,2-*a*]azepine

Seco-alkaloid

### ABSTRACT

A novel seco-stemocurtisine-type alkaloid, 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine was isolated from the aerial parts of *Stemona curtisii* (Stemonaceae) collected from Trang Province in Thailand. The unprecedented 5,6-seco-pyrido[1,2-*a*]azepine structure was elucidated by 2D NMR analysis and a single crystal X-ray crystallographic analysis.

© 2013 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The roots of the *Stemona* species of plants have been used as insecticides on agricultural pests and as anthelmintic agents for domestic animals. The root extracts have also been used in the treatment of various respiratory diseases and have been used as anticough agents in China and Japan (Greger, 2006; Pilli and Oliveira, 2000; Pilli et al., 2005, 2010). To date over 130 different *Stemona* alkaloids have been isolated with the majority of alkaloids having the pyrrolo[1,2-*a*]azepine base structure (Pilli et al., 2010). In 2003, we reported the first pyrido[1,2-*a*]azepine based *Stemona* alkaloid, stemocurtisine **1** (Scheme 1), which was isolated from the roots of *Stemona curtisii* found in Trang Province, Thailand (Mungkornasawakul et al., 2003). Other *Stemona* alkaloids with a pyrido[1,2-*a*]azepine structure were later reported by us (Mungkornasawakul et al., 2004; Pyne et al., 2007), Greger (Kaltenegger et al., 2003) and Ye (Wang et al., 2007). Pilli et al. (2010) has classified these natural products as stemocurtisine-type

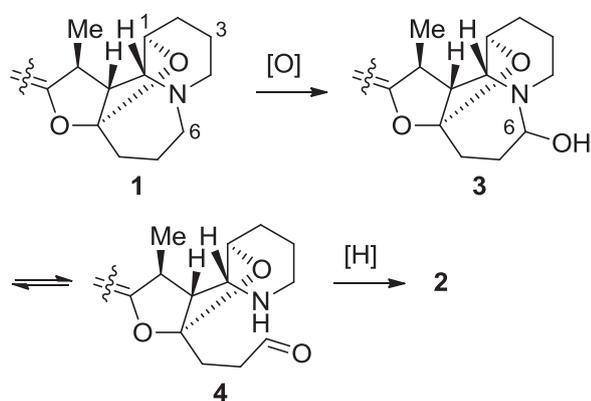
alkaloids. Here we reported the isolation and structure determination of the first seco-stemocurtisine alkaloid, 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine **2** (Fig. 1), from the aerial parts of *S. curtisii* (Stemonaceae) collected from Trang Province in Thailand.

## 2. Results and discussion

6-Hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine **2** was obtained as colorless plates (mp 168–170 °C) by slow evaporation of a solution of **2** in MeOH. The HRMS (ESI +ve, *m/z* [M+H]<sup>+</sup>), 366.1917, calcd 366.1914) indicated that **2** has the molecular formula C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub>. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of **2** (Table 1) were similar to those of **1** (Mungkornasawakul et al., 2003) and indicated the presence of the intact C- and D-ring systems of stemocurtisine. The <sup>13</sup>C NMR spectrum of **2**, like that of **1**, indicated six quaternary, four methine, six methylene, and three methyl carbons. When a comparison was made between the <sup>13</sup>C NMR spectra of **1** and **2**, significant differences were only noted in the chemical shifts for C-4 and C-6. The <sup>13</sup>C NMR chemical shift of C-6 in **2** was significantly (*ca* 10 ppm) downfield at δ 62.4 indicative of a C-6 primary hydroxyl group. A similar downfield shift was seen for the H-6 protons in the <sup>1</sup>H NMR spectrum of **2** when compared with that of **1**. While the <sup>13</sup>C NMR chemical shift of C-4 in **2**, was significantly upfield (*ca* –10 ppm) at δ 44.7, due to loss of the α-effect from the

\* Corresponding author at: Department of Chemistry and Materials Science Research Center, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand. Tel.: +66 53943336x103; fax: +66 53892277.

E-mail address: [pitchaya16@gmail.com](mailto:pitchaya16@gmail.com) (P. Mungkornasawakul).



**Scheme 1.** Proposed biosynthesis of **2** by oxidative cleavage of the 5–6 bond of stemocurtisine **1** and then reduction.

*N*-substituent (C-6). The full  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral assignments for **2** based on extensive 2D NMR experiments (HMBC and NOESY) are provided in Table 1. These data were fully consistent with the structure **2** shown in Fig. 1. The structure of **2** was unequivocally confirmed by a single crystal X-ray crystallographic analysis (Fig. 2) which established it as 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine, formed by formal cleavage of the C-6–N-5 bond of stemocurtisine **1**. This is the first *Stemona* alkaloid with a seco-pyrrolo[1,2-*a*]azepine structure. A relatively small number of *Stemona* alkaloids with a 1,9*a*- or 9,9*a*-seco-pyrrolo[1,2-*a*]azepine structure are known (Pilli et al., 2010) and only tubercrooline has a seco-3,4-pyrrolo[1,2-*a*]azepine structure (Lin et al., 2008). None of these alkaloids however, have the equivalent seco-4,5-pyrrolo[1,2-*a*]azepine structure to **2**.

A proposed biosynthesis of **2** is provided in Scheme 1. Oxidation at C-6 of **1**, which would be assisted by N-5, would provide the aminal **3**, which could ring open to aldehyde **4**. A related chemical oxidation of a pyrrolo[1,2-*a*]azepine has been reported (Lindsay and Pyne, 2004). Reduction of the aldehyde group would then give 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine **2**.

### 3. Experimental

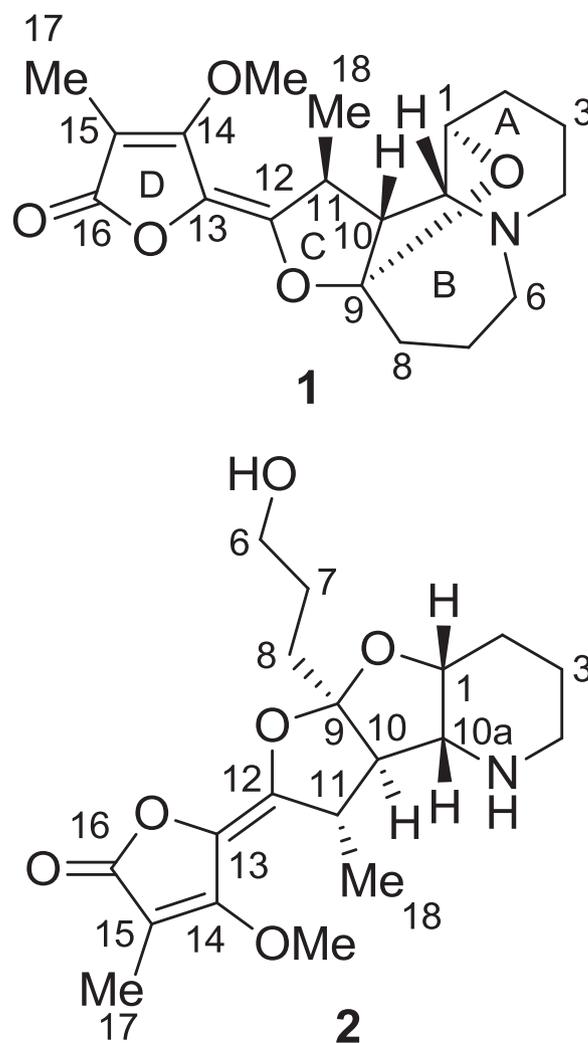
#### 3.1. General experimental procedure

The IR spectrum was recorded on a MIRacle 10 Shimadzu Spectrometer and optical rotations on a Jasco P-2000 polarimeter.

**Table 1**

$^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR data of **2** in  $\text{CDCl}_3$  (chemical shifts in ppm, *J* in Hz, compound numbering based on that of stemocurtisine).

Position	$^{13}\text{C}$ (125 MHz)	$^1\text{H}$ (500 MHz)	HMBC Correlations (from C to H)	NOESY (significant correlations)
1	74.4 (CH)	3.91 (d, <i>J</i> =2)	H-10	H-10a
2	25.1 (CH <sub>2</sub> )	2.18–2.09 (m)	–	–
3	20.7 (CH <sub>2</sub> )	1.42–1.39 (m)	–	–
4	44.7 (CH <sub>2</sub> )	2.96 (d, <i>J</i> =13, $\alpha$ ) 2.49 (dt, <i>J</i> =2.5, 12.5, $\beta$ )	–	H10-a
6	62.4 (CH <sub>2</sub> )	3.76–3.70 (m)	H-7, H-8	–
7	27.5 (CH <sub>2</sub> )	1.89–1.83 (p, <i>J</i> =7)	H-8	H-1, H-10
8	34.9 (CH <sub>2</sub> )	2.18–2.15 (m, $\alpha$ ) 2.11–2.07 (m, $\beta$ )	H-6, H-7	–
9	121.5 (C)	–	H-7, H-8, H-10a, H-11	–
10	60.7 (CH)	2.13 (br, s)	H-18	–
10a	63.4 (CH)	3.08 (d, <i>J</i> =2.5)	–	–
11	40.6 (CH)	3.25–3.23 (m)	H-18	H-1, H-10a
12	147.9 (C)	–	H-10, H-11, H-18	–
13	121.6 (C)	–	–	–
14	163.4 (C)	–	H-17, OMe	–
15	96.5 (C)	–	H-17	–
16	170.1 (C)	–	H-17	–
17	9.1 (CH <sub>3</sub> )	2.06 (s)	–	–
18	22.4 (CH <sub>3</sub> )	1.29 (d, <i>J</i> =7)	–	H-10
OMe	58.9 (CH <sub>3</sub> )	4.13 (s)	–	H-17



**Fig. 1.** The structures of stemocurtisine **1** and 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine **2** (compound numbering based on that of stemocurtisine).

The ESIMS and HRESIMS were recorded on Micromass Platform LCZ and factory modified Waters QToF Ultima Mass Spectrometer (Wynteshawe, UK). NMR spectra were recorded on Varian-500 MHz NMR spectrometer. Silica gel was used for column

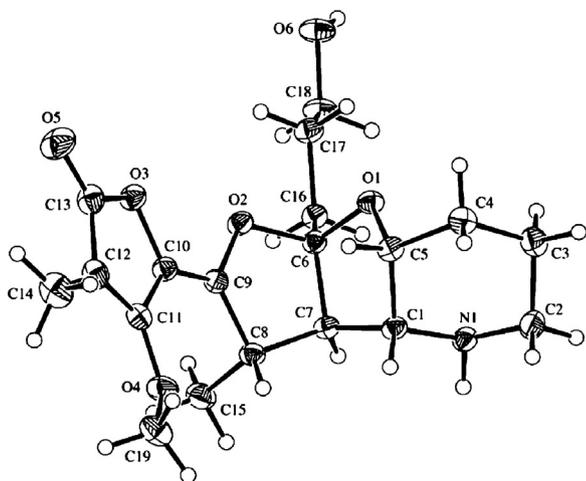


Fig. 2. ORTEP plot of 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine **2** (compound numbering different to that used in Fig. 1).

chromatography and TLC was carried out on silica gel 60 GF254 plates Merck HX1 15287. The TLC spots were viewed at 254 nm and visualized by Dragendorff's reagent.

### 3.2. Plant material

The aerial parts of *S. curtisii* were collected at Tambol Kaunmao, Amphor Rasda, in the North of Trang Province, Thailand, in May 2010. The plant material was identified by Mr. James Maxwell from the herbarium of the Department of Biology, Chiang Mai University, where a voucher specimen is deposited (number 17581).

### 3.3. Extraction and isolation

The dry aerial parts of *S. curtisii* (2 kg) were extracted with 95% EtOH (3 × 1500 mL) over 3 days at room temperature. Evaporation of the EtOH solution under reduced pressure gave a green viscous oil (250 g). A portion of this oil (40 g) was partitioned between water and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction was extracted with 5% HCl solution and the aqueous solution was made basic (pH 9) with conc. aqueous NH<sub>3</sub> and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to give 2.8 g of crude alkaloid material. This material was chromatographed on Sephadex LH20 (100 g) using isocratic elution with a mixture of MeOH and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v, 1:1) as eluent. On the basis of TLC analysis, two alkaloid fractions, fraction 1 (923.2 mg) and fraction 2 (453.0 mg), were obtained. These fractions were further purified by column chromatography. Fraction 1 was chromatographed on silica gel (100 mL) using gradient elution from 100% EtOAc to MeOH/EtOAc containing 1% conc. aqueous NH<sub>3</sub> as eluent. On the basis of TLC analysis, two alkaloid fractions, fraction 1-A (94.5 mg) and fraction 1-B (138 mg) were obtained. Fraction 1-A was re-chromatographed on silica gel (15 mL) using gradient elution from 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to 1:1 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> containing 1% conc. aqueous NH<sub>3</sub> as eluent. Three fractions were collected. Fraction 1-A2 (57.1 mg) was re-chromatographed by preparative TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH–aqueous NH<sub>3</sub>, 94:5:1) to give stemocurtisine **1** (11.2 mg). Fraction 1-B was re-chromatographed on silica gel (20 mL) using gradient elution from 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to 1:1 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> containing 1% conc. aqueous NH<sub>3</sub> as eluent. Four fractions were collected. Fraction 1-B3 (138.0 mg) was re-chromatographed by preparative TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH–aqueous NH<sub>3</sub>, 94:5:1) to give 40.5 mg of alkaloid **2**. Fraction 2 (453.0 mg) was rechromatographed on silica gel (60 mL) using gradient elution from 100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to 1:1 MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> containing

1% conc. aqueous NH<sub>3</sub> as eluent. The alkaloid fraction (54.2 mg) was re-chromatographed by preparative TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH–aqueous NH<sub>3</sub>, 94:5:1) to give stemocurtisine **1** (20.0 mg) and 6-hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine **2** (40.5 mg):

### 3.4. 6-Hydroxy-5,6-seco-stemocurtisine **2**

Colorless plates (MeOH), mp: 168–170 °C; R<sub>f</sub> 0.3 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–MeOH–NH<sub>4</sub>OH, 95:5:1); [α]<sup>23</sup><sub>D</sub>: +247.2 (c 0.84, MeOH); IR (film) 3256, 3105, 2945, 2822, 2163, 2026, 1737, 1689, 1610, 1451, 1395, 1268, 1143, 1058, 1005, 916, 797 cm<sup>-1</sup>. HRMS-ESI: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>6</sub>: 366.1917; found: 366.1914.

## 4. X-ray crystallographic study

### 4.1. Crystal data

Compound **2**. C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub>, *M* = 365.43, *T* = 200 K, trigonal, space group P3<sub>2</sub>21, *Z* = 6, *a* = 8.6115(2), *c* = 43.6534(12) Å, *V* = 2803.54(12) Å<sup>3</sup>, *D*<sub>x</sub> = 1.299 g/cm<sup>3</sup>, 30,191 reflections measured (2θ = 5–55°) merged to 2551 unique data, *R* = 0.031 [for 2285 data with *I* > 2σ(*I*)], *R*<sub>w</sub> = 0.080 [all data], *S* = 0.99.

### 4.2. Structure determination

Images were measured on a Nonius Kappa CCD diffractometer (Mo Kα radiation, graphite monochromator, λ = 0.71073 Å) and data extracted using the DENZO package (Otwinowski and Minor, 1997). Structure solution was by direct methods (SUPERFLIP) (Palatinus and Chapuis, 2007). The structure was refined using the CRYSTALS program package (Betteridge et al., 2003). Atomic coordinates, bond lengths and angles and displacement parameters have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC no. CCDC 924878). These data can be obtained free-of-charge via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif), by emailing [data\\_request@ccdc.cam.ac.uk](mailto:data_request@ccdc.cam.ac.uk), or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033.

## Acknowledgements

We are grateful to the Thai Research Fund for a supporting grant (MRG 5380037). We also thank the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), the National Research University Project under Thailand's Office of the Higher Education Commission Faculty of Science Chiang Mai University and the University of Wollongong for supporting this project.

## References

- Betteridge, P.W., Carruthers, J.R., Cooper, R.I., Prout, K., Watkin, D.J., 2003. CRYSTALS version 12: software for guided crystal structure analysis. *J. Appl. Crystallogr.* 36, 1487.
- Greger, H., 2006. Structural relationships, distribution and biological activities of *Stemona* alkaloids. *Planta Med.* 72, 99–113.
- Kaltenegger, E., Brem, B., Mereiter, K., Kalchhauser, H., Kahlig, H., Hofer, O., Vajrodaya, S., Greger, H., 2003. Insecticidal pyrido[1,2-*a*]zajepine alkaloids and related derivatives from *Stemona* species. *Phytochemistry* 63, 803–816.
- Lin, L.-G., Leung, H.P.-H., Zhu, J.-Y., Tang, C.-P., Ke, C.-Q., Rudd, J.A., Lin, G., Ye, Y., 2008. Croomine- and tuberostemonine-type alkaloids from roots of *Stemona tuberosa* and their antitussive activity. *Tetrahedron* 64, 10155–10161.
- Lindsay, K.B., Pyne, S.G., 2004. Studies on the synthesis of croomine: synthesis of the tricyclic B,C,D-ring core structure. *Synlett* 779–782.
- Mungkornasawakul, P., Pyne, S.G., Jatisatienr, A., Supyen, D., Lie, W., Ung, A.T., Skelton, B.W., White, A.H., 2003. Stemocurtisine, the first pyrido[1,2-*a*]zajepine *Stemona* alkaloid. *J. Nat. Prod.* 66, 980–982.
- Mungkornasawakul, P., Pyne, S.G., Jatisatienr, A., Supyen, D., Jatisatienr, C., Lie, W., Ung, A.T., Skelton, B.W., White, A.H., 2004. Phytochemical and larvicidal studies on *Stemona curtisii*: structure of a new pyrido[1,2-*a*]zajepine *Stemona* alkaloid. *J. Nat. Prod.* 67, 675–677.

- Otwinowski, Z., Minor, W., 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: Methods in enzymology. In: Carter, Jr., C.W., Sweet, R.M. (Eds.), Macromolecular Crystallography, Part A, vol. 276. Academic, New York, NY, pp. 307–326.
- Palatinus, L., Chapuis, G., 2007. SUPERFLIP – a computer program for the solution of crystal structures by charge flipping in arbitrary dimensions. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 786–790.
- Pilli, R.A., Oliveira, M.C.F., 2000. Recent progress in the chemistry of the *Stemona* alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 17, 117–127.
- Pilli, R.A., Rosso, G.B., de Oliveira, M.C.F., 2005. The Alkaloids, vol. 62. In: Cordell, G.A. (Ed.), Chapter 2. Elsevier, San Diego, pp. 77–173.
- Pilli, R.A., Rosso, G.B., Oliveira, M.C.F., 2010. The chemistry of *Stemona* alkaloids: an update. *Nat. Prod. Rep.* 27, 1908–1937.
- Pyne, S.G., Ung, A.T., Jatisatienr, A., Mungkornasawakul, P., 2007. The pyrido [1,2-*a*]azepine *Stemona* alkaloids. *Maejo Intern. J. Sci. Technol.* 1, 157–165.
- Wang, Y.Z., Tang, C.P., Dien, P.H., Ye, Y., 2007. Alkaloids from the roots of *Stemona saxorum*. *J. Nat. Prod.* 70, 1356–1359.