

การแยกสารพิโนสโตรบินจากกระชายเพื่อการควบคุมคุณภาพ

ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก *, อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

* ผู้รับผิดชอบบทความ: duangpen.p@dmasc.mail.go.th

บทคัดย่อ

พิโนสโตรบิน เป็นองค์ประกอบทางเคมีชนิดหลักที่พบในกระชาย [*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.] การศึกษาเบื้องต้นพบว่า สามารถแยกสารพิโนสโตรบินความบริสุทธิ์สูงเพื่อนำไปใช้เป็นสารเทียบในการพัฒนาวิธีควบคุมคุณภาพกระชายซึ่งยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้ในประเทศไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีแยกพิโนสโตรบินจากกระชายและศึกษาวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของกระชายด้วยรังสีเอกซ์ฟลูออเรสเซนซ์ การแยกสารทำได้โดยใช้สกัดผงกระชายในเอทานอล กรอง ระเหยสารสกัดให้เข้มข้น นำส่วนที่ตกตะกอนสีเหลืองมากรองผ่าน sephadex LH20 จะได้ผงสีเหลืองอ่อนนำมาละลายและตกผลึกซ้ำจนได้ผงสีขาวนวล แล้วนำไปพิสูจน์ชนิดสารด้วยวิธีทาง spectroscopy ส่วนการพัฒนาวิธีรังสีเอกซ์ฟลูออเรสเซนซ์ ใช้ silica gel 60 เป็นวัสดุภาคคงที่ ส่วนผสมของไดคลอโรมีเทน-เมทานอล (70:1) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ พ่นด้วยน้ำยา NP/PEG และใช้สารพิโนสโตรบินเป็นสารเทียบ ผลการศึกษาพบว่า สามารถแยกสารพิโนสโตรบินที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 97.06 และร้อยละของผลผลิต 0.86 ด้วยวิธีที่ไม่ซับซ้อน ได้สารความบริสุทธิ์สูงและในปริมาณมาก การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรังสีเอกซ์ฟลูออเรสเซนซ์พบสารพิโนสโตรบินที่ค่า R_f เท่ากับ 0.95 ซึ่งสามารถนำวิธีรังสีเอกซ์ฟลูออเรสเซนซ์ไปใช้ควบคุมคุณภาพของกระชายต่อไป

คำสำคัญ: กระชาย, *Boesenbergia rotunda*, pinostrobin, การควบคุมคุณภาพ

Isolation of Pinostrobin, a Chemical Marker from Fingerroots for Quality Control Purposes

Duangpen Pattamadilok*, Apirak Sakpetch

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Talat-kwan Sub-District, Mueang District, Nonthaburi 11000, Thailand

*Corresponding author: duangpen.p@dmsc.mail.go.th

Abstract

Pinostrobin is a major constituent of fingerroot or *krachai* in Thai [*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.]. From preliminary study, isolation of high-purity pinostrobin could be possible. This compound will be used as a chemical marker in method development for quality control of fingerroot for which no standard method had been established for this medicinal plant in Thailand. The aims of this study were to study the isolation method of pinostrobin from fingerroot and to develop a chemical identification method of fingerroot using the thin layer chromatography (TLC) technique. Isolation of pinostrobin was performed by maceration of fingerroot with 95% ethanol and evaporation of the filtrate to gain yellow precipitate. Sephadex LH20 gel filtration was performed and pale yellow powder was obtained. Recrystallization was carried on to obtain off-white powder. Structural identification of the isolated compound was undertaken using spectroscopic analysis. A TLC method using pinostrobin as a chemical marker was developed. Sample was prepared by extracting fingerroot powder with methanol, using silica gel 60 as stationary phase and a mixture of dichloromethane and methanol (70:1) as mobile phase, and then sprayed with NP/PEG. Results showed that 97.06% pure pinostrobin could be isolated with 0.86% yield. Using this uncomplicated method, the high-purity and high-yield compound could be obtained. In the TLC analysis, a spot of pinostrobin at the R_f value of 0.95 was observed. This method could be further used for quality control of fingerroot.

Key words: fingerroot, *Boesenbergia rotunda*, pinostrobin, quality control

บทนำและวัตถุประสงค์

กระชาย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. วงศ์ Zingiberaceae^[1, 2] ชื่อพ้อง ได้แก่ *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr, *Curcuma rotunda* L., *Gastrochilus panduratus* (Roxb.) Ridl., *Kaempferia pandurata* Roxb^[2] ชื่ออื่น ๆ ได้แก่ ขิงทราย หัวกะแอน หัวไชย หัวละแอน^[2] เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าสั้น รากอวรูปทรงแท่งหรือรูปไข่ค่อนข้างยาวปลายเรียวกว้าง 1-2 เซนติเมตร ยาว 4-10 เซนติเมตร ออกเป็น

กระจุก ผิวสีน้ำตาลอ่อน เนื้อในสีเหลือง ลำต้นเทียมมีใบ 2-7 ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปไข่กลับแกมรูปขอบขนาน หรือรูปรีแกมรูปใบหอก กว้าง 5-12 เซนติเมตร ยาว 12-50 เซนติเมตร ปลายเรียวแหลม โคนมนหรือแหลม ขอบเรียบ เส้นกลางใบ ก้านใบและกาบใบด้านบนเป็นร่อง ด้านล่างนูนเป็นสัน ก้านใบเรียบ ยาว 7-25 เซนติเมตร กาบใบสีชมพู ยาว 7-25 เซนติเมตร เส้นใบยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร ปลายว่าน ดอกออกเป็นช่อเชิงลดออกที่ยอดระหว่างกาบใบคู่ในสุด ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ดอกสีขาวอมสีชมพู

อ่อน ใบประดับรูปหอก ยาว 4-5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงสีขาวหรือสีขาวอมสีชมพูอ่อน โคนติดกันเป็นหลอด ยาว 1.5-2 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 3 แฉก โคนกลีบดอกติดกันเป็นหลอด ยาว 4.5-5.5 เซนติเมตร ปลายแยก 3 แฉก รูปขอบขนาน แฉกใหญ่ 1 กลีบ กว้างประมาณ 7 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1.8 มิลลิเมตร อีก 2 แฉก ขนาดเท่ากัน กว้าง 5 มิลลิเมตร ยาว 1.5 เซนติเมตร กลีบข้างมี 2 กลีบ สีชมพูอ่อน รูปไข่ กลีบ ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร กลีบปากอยู่ตรงกลางมีสีขาวหรือสีชมพู รูปไข่กลีบหรือรูปขอบขนาน กว้าง 2.5-3.5 เซนติเมตร โคนเว้าเข้าใน ขอบหยิกอเล็กน้อยปลายผาย มีสีชมพูหรือสีม่วงแดงเป็นเส้น ๆ เกือบทั้งกลีบ เกสรเพศผู้สมบูรณ์มี 1 อัน ก้านชูอับเรณูสั้น หุ้มก้านชูยอดเกสรเพศเมีย สันอับเรณูพับกลับ ปลายเว้าตื้น รังไข่ใต้วงกลีบรูปขอบขนาน มี 3 ช่อง แต่ละช่องมีออวุลจำนวนมาก ผลแบบผลแตกแห้ง เมล็ดสีดำ เยื่อหุ้มเมล็ดจักเป็นครุย^[2] ตำราสรรพคุณยาไทยว่า กระจายมีรสเผ็ดร้อนขม แก้ปวดมวนในท้อง แก้อักเสบ แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ บำรุงกำลัง บำรุงกำหนด เป็นต้น^[2]

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของกระชายพบว่า ส่วนใหญ่เป็นสารฟลูโวนอยด์ (flavonoids) เช่น pinostrobin (5-hydroxy 7-methoxy flavanone), pinocembrin (5,7-dihydroxy flavanone), boesenbergin A, boesenbergin B, panduratin A, 4-hydroxypanduratin A, panduratin B-1, panduratin B-2, rubranine, rotundaflovene, silybin, alpinetin, cardamonin นอกจากนี้กระชายยังมีน้ำมันระเหยง่าย ซึ่งมีองค์ประกอบ ได้แก่ nerol, camphor, cineole, fenchene, limonene, hemanthidine และสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenol) เช่น caffeic acid, coumaric acid, chlorogenic acid

เป็นต้น^[3-8]

พินอสโตรบิน (pinostrobin) เป็นองค์ประกอบทางเคมีชนิดหลักที่พบในกระชายซึ่งเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ต้านเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ ต้านเชื้อไวรัส ต้านออกซิเดชัน ต้านอักเสบ ต้านลิวคิเมีย ต้านเอนไซม์อโรมาเทส (anti-aromatase) ต้านเซลล์มะเร็งเต้านม ปกป้องเซลล์ประสาท เป็นต้น^[9-11]

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สามารถแยกสารพินอสโตรบินจากกระชายเพื่อนำมาใช้เป็นสารเทียบ (chemical marker) สำหรับการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้รวมถึงการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดอื่นที่มีพินอสโตรบินเป็นองค์ประกอบ เป็นการลดการสั่งซื้อสารมาตรฐานจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงกว่า ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีแยกพินอสโตรบินจากกระชายและศึกษาวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของสมุนไพรชนิดนี้โดยใช้พินอสโตรบินเป็นสารเทียบ

ระเบียบวิธีศึกษา

1. วัสดุ

1.1 สมุนไพร

กระชายสด น้ำหนัก 10 กิโลกรัม นำมาคัดเลือกส่วนที่ไม่ต้องการออกแล้วล้างให้สะอาด ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ แล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตากให้แห้ง จากนั้นนำมาอบในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาวันละ 8 ชั่วโมง ติดต่อกัน 2 วัน แล้วนำไปบดเป็นผงหยาบ ได้ผงกระชาย น้ำหนัก 1.5 กิโลกรัม บรรจุในถุงเก็บตัวอย่างปิดปากถุงให้สนิท

1.2 มาตรฐาน

pinostrobin (Sigma, Switzerland) ความ

บริสุทธิ์ 95% สำหรับการศึกษาร่วมกับคุณสมบัติของฟีนอลที่แยกจากกระชาย

1.3 ตัวทำละลายอินทรีย์และสารเคมี

Dichloromethane AR (RCI Labscan Limited, Thailand), methanol AR (Merck, Germany), methanol HPLC (Merck, Germany), acetonitrile HPLC (Merck, Germany), ethanol 95%, diphenylboric acid β -ethylamino ester (Sigma-Aldrich, Germany), polyethylene glycol 4000 (Ajax Chemicals, Australia)

1.4 วัสดุวิทยาศาสตร์

Sephadex LH20 (Sigma, Switzerland), TLC plate Silica gel 60 ความหนา 0.25 มิลลิเมตร (Merck, Germany), Acquity™ BEH C18 column 1.7 ไมโครเมตร, 2.1 × 50 มิลลิเมตร (Waters, USA), glass column, chromatographic chamber, Buchner funnel และเครื่องแก้ววิทยาศาสตร์

1.5 เครื่องมือ

เครื่องบดสมุนไพร, ตู้อบร้อน (Mammert, Germany), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.1-0.01 มิลลิกรัม (Mettler-Toledo, Switzerland), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.01 กรัม (Sartorius, Germany), ชุดเครื่องระเหยสุญญากาศ (Eyela, USA), High Performance Liquid Chromatograph-Quadrupole-Time of Flight (HPLC-QTOF) (Agilent Technology, USA), Ultra Performance Liquid Chromatograph-Photo Diode Array (UPLC-PDA) (Waters, USA), ตู้ดูดความชื้น, TLC plate heater (CAMAG, Switzerland), เครื่องถ่ายภาพ TLC (TLC scanner) (CAMAG, Switzerland), ชุดสกัดสารประกอบด้วย เตาบ่มไฟฟ้า ส่วนควบแน่น และเครื่องทำน้ำเย็นหมุนเวียน

2. วิธีการศึกษา

2.1 การแยกสารฟีนอลจากกระชาย

ก. การสกัดสาร โดยวิธีการแช่สกัด (maceration) นำผงกระชาย น้ำหนัก 1 กิโลกรัม บรรจุลงในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท เติมน้ำเอทานอล 95% ให้ท่วมผงกระชาย แช่สกัดนาน 3 วัน โดยคนส่วนผสมเป็นระยะ ๆ กรองสารสกัดที่ได้ แล้วเติมน้ำเอทานอล 95% ลงในภาชนะเดิมเพื่อแช่สกัดซ้ำ โดยการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ๆ ละ 3 วัน กรอง รวบรวมสารสกัดที่ได้ไประเหยด้วย เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศจนได้สารสกัดเข้มข้นมีลักษณะเหนียวสีน้ำตาลแดง จากนั้นตั้งไว้จะเกิดตะกอนสีเหลืองในสารสกัดชั้นเหนียว

ข. การแยกสาร โดยวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography) นำตะกอนสีเหลืองที่ได้มาละลายด้วยเมทานอล แล้วกรองผ่าน Sephadex LH20 ที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์แก้ว ทำการชะด้วยเมทานอล และรองรับของเหลวที่ชะออกมาจากคอลัมน์โดยเก็บแฟรคชัน (fraction) ละ 50 มิลลิเมตร ระเหยแต่ละแฟรคชันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศเพื่อลดปริมาตรลงเหลือหนึ่งในสี่ส่วน ตั้งสารละลายสารสกัดเข้มข้นไว้จะเกิดผงสีเหลืองอ่อนตกออกมา รวมแฟรคชันที่มีผงสีเหลืองอ่อนเข้าด้วยกัน กรองเก็บรวบรวมผงสีเหลือง

ค. การทำสารที่แยกได้ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีตกผลึกซ้ำ (recrystallization) นำผงสีเหลืองอ่อนมาละลายในเมทานอล กรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรองบน Buchner funnel โดยใช้ปั๊มสุญญากาศช่วยในการกรอง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาตั้งทิ้งไว้จะได้ผงสีขาวนวล (หากยังไม่ได้ผงที่มีลักษณะสีขาวนวลให้ทำขั้นตอนนี้อีก) นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณสารที่แยกได้ เก็บสารที่แยกได้ไว้ในโถดูดความชื้น

ง. การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากข้อมูลสเปกตรัม 1D-NMR และ 2D-NMR (ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย HPLC-OTOF เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้าง และเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัม NMR ของสารที่เคยมีรายงานมาก่อน

จ. ศึกษาความบริสุทธิ์ (purity) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารด้วยวิธี UPLC ซึ่งระบบโครมาโทกราฟี ประกอบด้วย วัฏภาคคงที่ คือ Acquity™ BEH C18 column ขนาด 1.7 ไมโครเมตร, 2.1 × 50 มิลลิเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ ได้แก่ A. เมทานอล-อะซิโตนไตรล์ (1:1) และ B. น้ำ กำจัดไอออน สะแบบเกรเดียนต์ (gradient elution) อัตราการไหล 0.65 มิลลิเมตรต่อนาที ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้พิจารณาจากร้อยละของพื้นที่ใต้พีค (%peak area) ของสารนั้น และสังเกต 3D-spectrum ว่าต้องไม่มีการปนของสารอื่น (co-elute) ในพีคของสารที่แยกได้

ฉ. ศึกษาความคงตัว (stability) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยเปรียบเทียบความคงตัวของสารละลายสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายโดยละลายในเมทานอล กับสารละลายฟิโนสโตรบินจากบริษัทผู้ผลิตซึ่งละลายในเมทานอลเช่นเดียวกัน และฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟีของ UPLC ดังข้อ จ. ดูลักษณะของ 3D-spectrum

2.2 การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของกระชาย ด้วยวิธีเรียงคละผิวบาง (Thin Layer Chromatography: TLC) โดยใช้สารฟิโนสโตรบินที่แยกได้จาก

กระชายเป็นสารเทียบ (chemical marker)

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยสกัดผงกระชายน้ำหนัก 1 กรัม ในเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 5 นาที กรอง ได้สารละลายตัวอย่าง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยละลายสารฟิโนสโตรบิน น้ำหนัก 1 มิลลิกรัม ในเมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิตร

ระบบโครมาโทกราฟี

วัฏภาคคงที่	silica gel 60, ความหนา 0.25 มิลลิเมตร
วัฏภาคเคลื่อนที่	ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล 70:1
ระยะทางการเคลื่อนที่ของวัฏภาคเคลื่อนที่	15 เซนติเมตร
ปริมาตรวิเคราะห์	15 ไมโครลิตร สำหรับสารละลายตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร สำหรับสารละลายมาตรฐาน
การตรวจวัด	พ่นน้ำยา NP/PEG แล้วสังเกตผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

ผลการศึกษา

1. การแยกสารฟิโนสโตรบินจากกระชาย

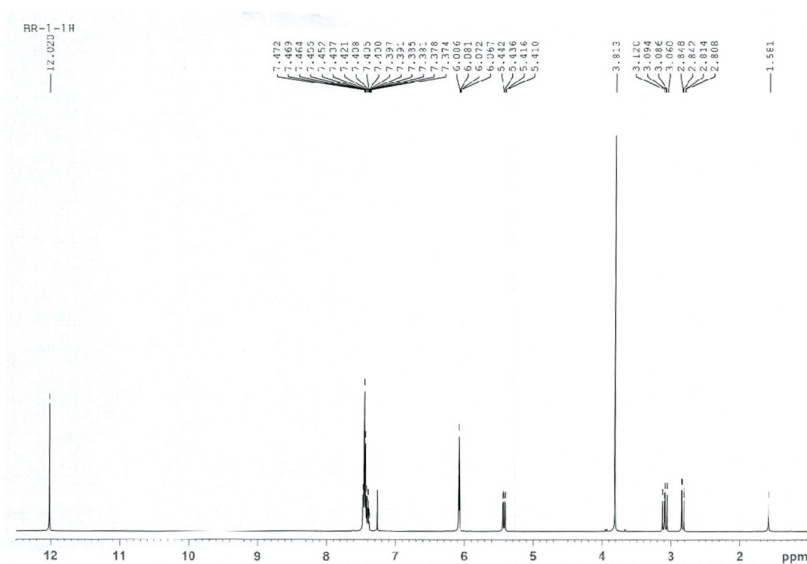
ผงกระชายแห้ง น้ำหนัก 1 กิโลกรัม นำมาแยกได้สารฟิโนสโตรบินบริสุทธิ์ น้ำหนักผลผลิต 8.6 กรัม คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (%yield) เท่ากับ 0.86 เมื่อเทียบกับน้ำหนักผงกระชายแห้ง

การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

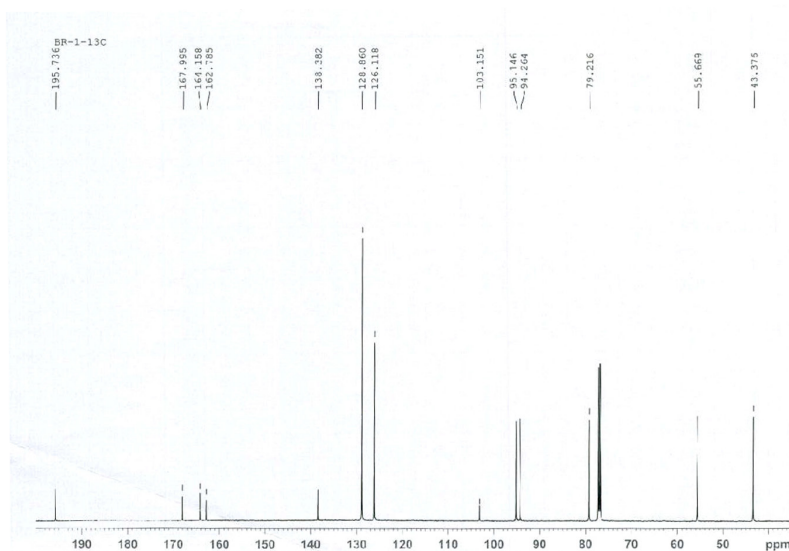
เมื่อนำไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วย NMR spectrometer (500 MHz) ได้สเปกตรัม 1D-NMR ชนิด ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR (ภาพที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ 2D-NMR ด้วย

เทคนิค ^1H - ^1H COSY, HMQC และ HMBC อีกด้วย จากการแปลผลสเปกตรัม NMR สามารถสรุปโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชาย (ภาพที่ 3)

สูตรโมเลกุล (molecular formula) ของสารดังกล่าว คือ $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย



ภาพที่ 1 ^1H -NMR spectrum (500 MHz) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชาย



ภาพที่ 2 ^{13}C -NMR spectrum (125 MHz) ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชาย

เครื่อง HPLC-QTOF พบว่า มีค่า $(M+Na)^+$ เท่ากับ 293.0847 และ $(M+H)^+$ เท่ากับ 271.1003 สารดังกล่าวจึงมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 270 เป็นการยืนยันสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชาย (ภาพที่ 4)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัม NMR ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้กับสารที่เคยมีรายงานมาก่อน^[12] จึงสรุปได้ว่า สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชายมีชื่อว่า ฟิโนสโตรบิน (ตารางที่ 1)

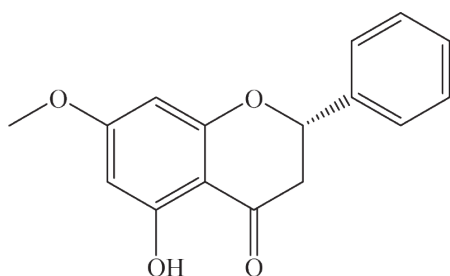
ความบริสุทธิ์ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

เมื่อศึกษาความบริสุทธิ์ของฟิโนสโตรบินที่แยกจากกระชาย โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี UPLC และพิจารณาจากค่าร้อยละของพื้นที่ใต้พีคของ

โครมาโทแกรมที่ได้ พบว่า มีค่าเท่ากับร้อยละ 97.06 แสดงว่า มีเนื้อของสารฟิโนสโตรบินอยู่ร้อยละ 97.06 และจาก 3D-spectrum ไม่พบการปนของสารอื่นในระบบโครมาโทกราฟีดังกล่าว

ความคงตัวของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

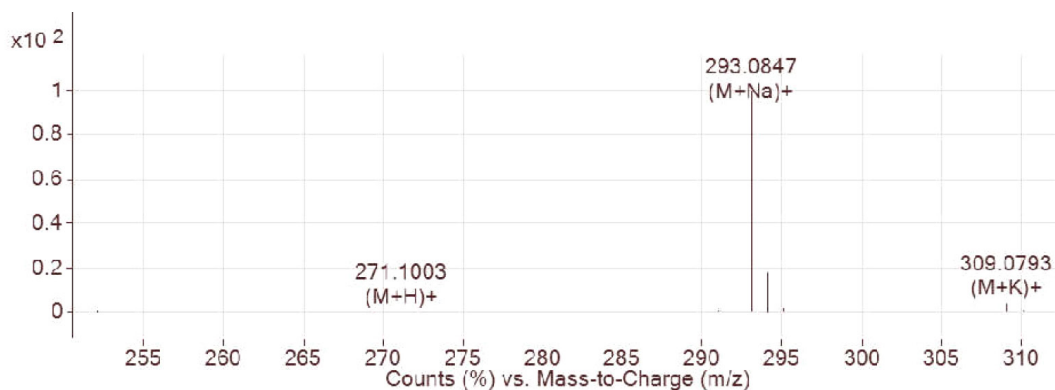
เมื่อศึกษาความคงตัวของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยระบบโครมาโทกราฟีของ UPLC โดยเปรียบเทียบความคงตัวของสารละลายฟิโนสโตรบินในเมทานอลระหว่างฟิโนสโตรบินที่แยกได้จากกระชายและฟิโนสโตรบินจากบริษัท Sigma พบว่า สารจากทั้ง 2 แหล่ง ไม่มีความแตกต่างกัน โดยพบว่าสารละลายฟิโนสโตรบินในเมทานอลมีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสารฟิโนสโตรบิน ($C_{16}H_{14}O_4$) ที่แยกได้จากกระชาย

2. การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของกระชาย

สกัดผงตัวอย่างกระชาย น้ำหนัก 1 กรัม ในเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์เป็นเวลา 5 นาที กรอง นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีรังสีเอกซ์ผิวบางและฟิโนสโตรบินเป็นสารเทียบ โดยใช้ silica gel 60 เป็นวัสดุภาคคงที่ ส่วนผสมของไดคลอโรมีเทนและเมทานอล (อัตราส่วน 70:1) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ฟันด้วยน้ำยา NP/PEG แล้วสังเกต



ภาพที่ 4 Mass spectrum ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระชาย

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัม NMR ของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้กับสารพินอสโตรบิน^[12]

ตำแหน่ง	สารบริสุทธิ์ที่แยกได้ δ_H (multiplicity, J)	δ_C	พินอสโตรบิน δ_H (multiplicity, J)	δ_C
2	5.43 (1H, dd, J = 13, 3)	79.22	5.39 (1H, dd, J = 12.84, 2.76)	79.0
3	trans 3.09 (1H, dd, J = 13, 17) cis 2.83 (1H, dd, J = 17, 3)	43.37	3.06 (1H, dd, J = 15.14, 12.84) 2.79 (1H, dd, J = 14.68, 2.76)	43.2
4	-	195.76	-	195.7
5	-	162.78	-	162.7
6	6.08 (1H, d, J = 2.5)	95.14	6.05 (1H, d, J = 2.72)	95.0
7	-	167.99	-	167.8
8	6.07 (1H, d, J = 2.5)	94.26	6.05 (1H, d, J = 2.72)	94.1
9	-	164.14	-	164.0
10	-	103.14	-	103.0
1'	-	138.36	-	138.3
2', 3', 5', 6', 4'	7.46-7.37 (5H, m)	126.12	7.41 (5H, m)	126.0
7-OMe	3.81 (3H, s)	128.86	3.79 (3H, s)	128.8
5-OH	12.02 (1H, s)	-	12 (1H, s)	-

หมายเหตุ δ_H และ δ_C แสดงค่า chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอน ตามลำดับ มีหน่วยเป็น ppm และ J แสดงค่า coupling constant มีหน่วยเป็น Hertz (Hz)

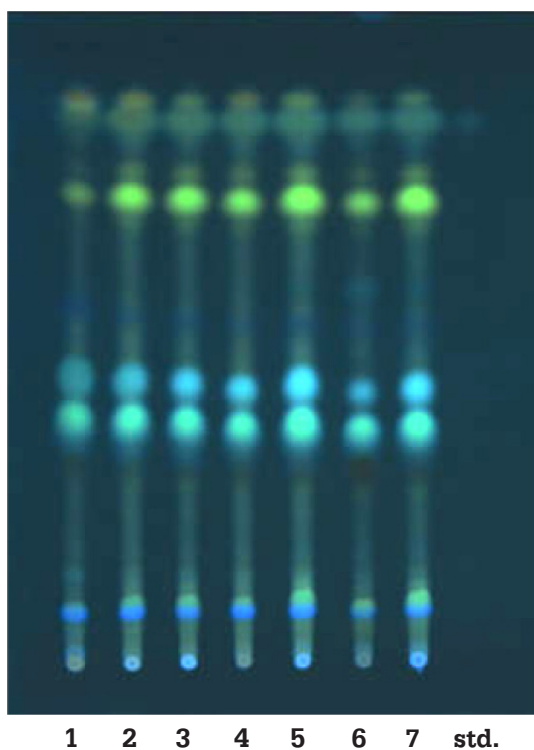
ผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

ผลการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรังสีเลขฉิวบางของตัวอย่างกระชาย จำนวน 7 ตัวอย่าง พบจุด (spot) ของพินอสโตรบิน ที่ค่า R_f เท่ากับ 0.95 ในตัวอย่างกระชายทุกตัวอย่าง ซึ่งโครมาโทแกรมรังสีเลขฉิวบางของสารสกัดเมทานอลจากกระชาย (ภาพที่ 5 และตารางที่ 2)

อภิปรายผล

การศึกษานี้มุ่งหวังที่จะพัฒนาวิธีการแยกสารจากกระชายให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์สูงและได้

ร้อยละของผลผลิตสูง เพื่อที่จะนำสารดังกล่าวไปใช้เป็นสารเทียบสำหรับการควบคุมคุณภาพสมุนไพรกระชาย ขั้นตอนการแยกสารจากกระชายประกอบด้วย 1) การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมซึ่งได้เลือกใช้เอทานอล 95% 2) การแยกสารด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันซึ่งจะแยกสารที่ต้องการออกจากสารอื่นๆ ด้วยขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน สามารถแยกสิ่งปนเปื้อน/สารอื่นที่ไม่ต้องการออกจากพินอสโตรบินได้ดี 3) การตกผลึกซ้ำเพื่อให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น เมื่อได้สารบริสุทธิ์แล้วต้องนำมา พิสูจน์ชนิดสารโดย 4) การวิเคราะห์ทาง spectroscopy จากนั้นต้องทำการวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสาร (structure



ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมแรงคเลขวางของสารสกัด
เมทานอลจากกระชาย
1-7 สารสกัดเมทานอลจากกระชาย ตัวอย่าง
ที่ 1-7
std. สารละลายฟิโนสโตรบินในเมทานอล

ตารางที่ 2 โครมาโทแกรมแรงคเลขวางของสารสกัด
เมทานอลจากกระชาย

จุด	hR _f	NP/PEG, 366 นาโนเมตร
1	7-9	Blue
2	38-44	Green
3	48-52	Bright blue green
4	58-62	Blue
5	78-82	Greenish yellow
6	84-86	Yellow
7*	92-96	Yellow
8	96-98	Yellow

หมายเหตุ * ฟิโนสโตรบิน

elucidation) โดยแปลผลจากสเปกตรัม NMR ได้
เป็นโครงสร้างทางเคมีของสาร ซึ่งจากสเปกตรัม ^1H
NMR ในภาพที่ 1 พบโปรตอนที่มีค่า chemical shift
(δ) เท่ากับ 12.02 ppm มีลักษณะพีกเป็น singlet (s)
เป็นโปรตอนของหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซีที่ตำแหน่งที่ 5
ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่งที่
4 และพบโปรตอน 2 อะตอม ที่มีลักษณะพีกเป็น
doublet (d) ที่ค่า δ เท่ากับ 6.08 ppm ($J = 2.5$ Hz)
และ 6.07 ppm ($J = 2.5$ Hz) แสดงว่าโปรตอนทั้ง 2
อะตอมอยู่ในตำแหน่ง meta ซึ่งกันและกัน ซึ่งก็คือ
ตำแหน่งที่ 6 และ 8 ของโครงสร้างเคมี ตามลำดับ
ส่วนตำแหน่งที่ 7 ไม่ปรากฏสัญญาณโปรตอนใน
สเปกตรัม NMR เนื่องจากถูกแทนที่ด้วยหมู่เมทอกซี
(OMe) ส่วนพีกของโปรตอน 5 อะตอม ที่ค่า δ อยู่ใน
ช่วง 7.37-7.46 ppm มีลักษณะพีกเป็น multiplet (m)
เป็นการยืนยันว่าไม่มีหมู่แทนที่ใน aromatic ring B
ส่วนโปรตอนในตำแหน่งที่ 2 และ 3 มีลักษณะเป็น
ABX system โดยส่วน X ปรากฏเป็นพีกที่มีลักษณะ
เป็น doublet-doublet (dd) ที่ค่า δ เท่ากับ 5.43 ppm
($J = 13, 3$ Hz) คือ โปรตอนตำแหน่งที่ 2 และส่วน
โปรตอน AB ทั้ง 2 อะตอมปรากฏเป็นพีกที่มีลักษณะ
doublet-doublet ที่ค่า δ เท่ากับ 2.83 ppm ($J = 17, 3$
Hz) และ 3.09 ppm ($J = 17, 13$ Hz) ซึ่งก็คือโปรตอน
ตำแหน่งที่ 3-*cis* และ 3-*trans* ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ
โปรตอนในตำแหน่งที่ 2 จากสเปกตรัม ^{13}C NMR ใน
ภาพที่ 2 แสดงให้เห็นว่า สารที่แยกได้นี้มีคาร์บอน 16
อะตอม เป็นคาร์บอนของหมู่เมทอกซี 1 อะตอม สาร
ที่แยกได้นี้เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอน (flavanone) ที่
มีหมู่เมทอกซี 1 หมู่ สูตรโมเลกุลคือ $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$ และ
ยืนยันความถูกต้องของโครงสร้างดังกล่าวด้วยการ
วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล จาก mass spectrum ใน
ภาพที่ 4 แสดงค่า $(\text{M}+\text{Na})^+$ เท่ากับ 293.0847 เมื่อหัก

กระทรวงสาธารณสุข ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัยนี้

References

- Office of the Royal Society. Royal Institute Dictionary 2011. Bangkok: Siri Wattana Interprint Co. Ltd.; 2013. p. 28. (in Thai)
- Department of Thai Traditional and Alternative Medicine. Monographs of Selected Thai Materia Medica Volume 2. Bangkok: Amarin Printing and Publishing Co., Ltd.; 2015. p. 21-5. (in Thai)
- Nurrachma MY, Fadliyah H, Meiyanti E. Fingerroot (*Boesenbergia pandurata*): a prospective anticancer therapy. Indones. J. Cancer Chemoprevent. 2018;9(2):102-9.
- Ongwisetpaiboon O, Jiraungkoorskul W. Fingerroot, *Boesenbergia rotunda* and its aphrodisiac activity. Pharmacogn Rev. 2017;11(21):27-30.
- Tan BC, Tan SK, Wong SM, Ata N, Abd. Rahman N, Khalid N. Distribution of flavonoids and cyclohexenyl chalcone derivatives in conventional propagated and *in vitro*-derived field-grown *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:451870.
- Tuntiwachwuttikul P, Pancharoen O, Reutrakul V, Byrne LT. (1'RS, 2'SR, 6'RS)-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-[3'-methyl-2'-(3''-methylbut-2''-enyl)-6'-phenylcyclohex-3'-enyl]methanone (panduratin A)-A constituent of the red rhizomes of a variety of *Boesenbergia pandurata*. Aust J Chem. 1984;37(2):449-53.
- Mahidol C, Tuntiwachwuttikul P, Reutrakul V, Taylor WC. Constituents of *Boesenbergia pandurata* (syn. *Kaempferia pandurata*). III. isolation and synthesis of (†)-boesenbergin B. Aust J Chem. 1984;37(8):1739-45.
- Mahidol C, Tuntiwachwuttikul P, Reutrakul V. Chemical investigation of Zingiberaceae plants. NRCT-JSPS Rat-tanakosin Bicentennial Joint Seminar on Chemistry of Natural Products; 2-6 August 1982; Bangkok, Thailand: 1982. 15.
- Kanchanapiboon J, Kongsu U, Pattamadilok D, Kamponchaidet S, Wachisunthon D, Poonsatha S, Tuntoaw S. *Boesenbergia rotunda* extract inhibits *Candida albicans* biofilm formation by pinostrobin and pinocembrin. J Ethnopharmacol. 2020;261:113193.
- Patel NK, Jaiswal G, Bhutani KK. A review on biological sources, chemistry and pharmacological activities of pinostrobin. Nat Prod Res. 2016;30(18):2017-27.
- Wiyono L, Rahmawanti RA, Edina BC, Azizah NN, Fadilah F, Paramita RI, Purwaningsih EH, Fadilah F. Isolation, synthesis nanoparticle, and *in-vitro* test of pinostrobin from *Kaempferia pandurata* on MCF-7 and MDAMB-231 breast cancer cell. Research J. Pharm. and Tech. 2020;13(6).
- Ching AYL, Wah TS, Sukari MA, Lian GEC, Rahmani M, Khalid K. Characterization of flavonoid derivatives from *Boesenbergia rotunda* (L.). Malaysian J Anal Sci. 2007;11(1):154-9.