

องค์ประกอบทางเคมีของสารกลิ่นในน้ำกระทอน
สมบัติ โนพิชัย วิภารัตน์ เชื้อชาวด และ สุรัตน์ บุญผ่อง*

Chemical Constituents of Odor Substances in

Kra Thon (*Millettia pendula*) Sauce

Sombat Nopichai, Wipharat Chuachud, and Surat Boonphong*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

*Corresponding author. E-mail: suratb@nu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อทำการแยกและวิเคราะห์หาชนิดสารที่เป็นองค์ประกอบของกลิ่นในน้ำกระทอน โดยนำน้ำกระทอนมาทำการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท และทำการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 9 ชนิด จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี พบว่าเป็นสารประกอบดังต่อไปนี้ 4-hydroxybenzaldehyde (1), 4-hydroxyphenylacetonitrile (2), 3-(4-hydroxyphenyl)propionitrile (3), phenylacetic acid (4), 3-phenylpropionic acid (5), 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (6), 4-(4-hydroxyphenyl)butyric acid (7), 4-hydroxyphenylacetic acid (8) และ 4-hydroxybenzoic acid (9) โดยที่สาร phenylacetic acid เป็นองค์ประกอบหลักของสารที่ให้กลิ่นในน้ำกระทอน

คำสำคัญ: น้ำกระทอน สารกลิ่น

Abstract

The aim of this work was to separate and characterize odor substances in Kra Thon sauce. First, Kra Thon sauce samples were extracted with ethyl acetate and subsequently purified by chromatographic techniques. Pure nine compounds were obtained and then characterized by spectroscopic techniques. These compounds could be identified as 4-hydroxybenzaldehyde (1), 4-hydroxyphenylacetonitrile (2), 3-(4-hydroxyphenyl)propionitrile (3), phenylacetic acid (4), 3-phenylpropionic acid (5), 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (6), 4-(4-hydroxyphenyl)butyric acid

(7), 4-hydroxyphenylacetic acid (8) and 4-hydroxybenzoic acid (9); phenylacetic acid was the major substance responsible for the odor in Kra Thon sauce.

Keywords: Kra Thon (*Millettia pendula*) sauce, odor substances

บทนำ

กระทอน (*Millettia pendula*) เป็นไม้ในวงศ์ Leguminosae-Papilionoideae ชาวชนบทแถบภาคเหนือตอนล่างในเขตรอยต่อของจังหวัดพิจิตร โลก จังหวัดเพชรบูรณ์ และจังหวัดเลย ของประเทศไทย มีการนำใบกระทอนมาหมักแล้วคั้นเอาแต่น้ำ มาต้มเคี่ยวให้งวดลงจะได้น้ำกระทอน ใช้เป็นเครื่องแต่งกลิ่นและปรุงรสแทนน้ำปลา (เต็ม สมิตินันท์, 2544 และ สุรชัย มัจฉาชีพ, 2541) ในส่วนงานวิจัยมีข้อมูลของกระทอน ดังนี้ ส่วนของเนื้อไม้ มีรายงานฤทธิ์ฆ่าเชื้อโปรโตซัวที่เกิดจากริ้นฝอยทรายกัด (Leishmaniasis) และองค์ประกอบทางเคมี (Takahashi *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2006) ส่วนของใบกระทอน มีรายงานในด้านสารอาหารและแร่ธาตุ จากใบและน้ำกระทอน รวมทั้งการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำกระทอน (Mopoung *et al.*, 2007; Mopoung *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานสารหลักที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำกระทอน โดยพบสาร 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่คาดว่ามาจากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ได้แก่ lactic anhydride และ phloretic acid ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งเป็นสารที่มาจากพืช ได้แก่ kaempferol-7-O-rhamnoside, luteolin, kaempferol และ quercetin (Boonphong and Nopichai, 2009) โดยสารทั้งหมดที่เคยมีรายงานมาแล้วนั้นไม่พบข้อมูลในส่วนของกลิ่น จึงได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำกระทอนในส่วนแยกย่อยที่มีกลิ่น เพื่อเป็นข้อมูลของสารกลิ่นในน้ำกระทอน สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำกระทอนต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง รุ่น 1100 บริษัท Agilent Technologies, เครื่อง ยูวี-วิสิเบิล ดับเบิลบีม สเปกโตรมิเตอร์ รุ่น lamda 20 บริษัท Perkin Elmer, อินฟราเรดสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น SPECTRUM GX บริษัท Perkin Elmer, นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ รุ่น AV400 บริษัท Bruker และ แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ รุ่น 5890/5973 บริษัท Agilent Technologies
2. ตัวดูดซับ เซฟาเด็กซ์ LH-20 บริษัท Amersham Pharmacia Biotech AB และ ซิลิกาเจล บริษัท Merck

3. ตัวทำละลาย ไคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) เอทิลอะซิเตท (EtOAc) อะซิโตน (Acetone) และ เมทานอล (MeOH) ชนิด AR เกรด บริษัท Mallinckrodt
4. ตัวทำละลาย อะซิโตนไนไตรล์ (CH_3CN) และ เมทานอล (MeOH) ชนิด HPLC เกรด บริษัท Lab-Scan Asia Co, Ltd.
5. ตัวทำละลาย อะซิโตน ($\text{Acetone-}d_6$) และ น้ำ (D_2O) สำหรับเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติก เรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ บริษัท Sigma-Aldrich Inc.

ตัวอย่างน้ำกระทอน

นำมาจากบ้านแก่งทุ่ง ตำบลบ่อโพธิ์ อำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลก

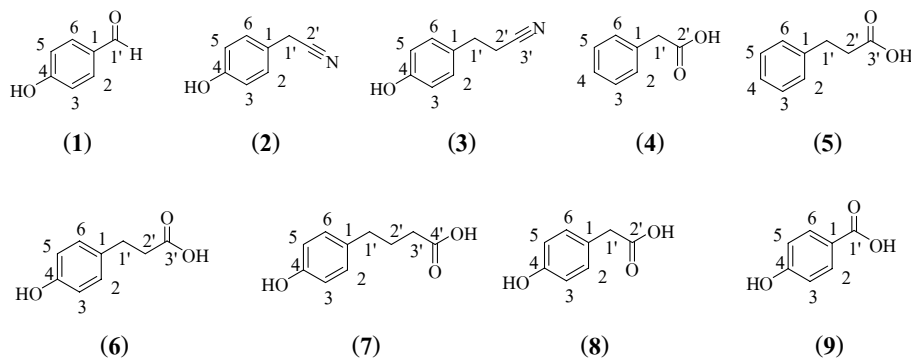
วิธีการสกัดสารจากน้ำกระทอน และการแยกสารให้บริสุทธิ์

นำน้ำกระทอนปริมาตร 1 ลิตร มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ได้สารสกัดหยาบ ส่วนเอทิลอะซิเตทปริมาณ 3.22 กรัม นำสารสกัดหยาบน้ำกระทอนที่ได้ มาแยกด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ LH-20 ขนาด 3.5 x 65.0 เซนติเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะ เก็บสารที่ผ่านคอลัมน์ด้วยหลอดทดลอง หลอดละ 50 มิลลิลิตร จำนวน 12 หลอด นำสารของแต่ละหลอดไประเหยแห้งแล้วชั่งน้ำหนัก โดยสารหลอดที่ 5 และสารหลอดที่ 6 มีปริมาณของสารมากที่สุด และมีกลิ่นคล้ายน้ำกระทอน จึงนำสารหลอดที่ 5 ไปทำการแยกด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจล ชะด้วยอะซิโตน/ไคลอโรมีเทน ได้ส่วนแยกย่อย 8 ส่วน คือ KE5-1 – KE5-8 โดยนำ KE5-1 – KE5-3 มารวมกันแล้วแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค semi preparative โครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้สภาวะในการแยก คือ คอลัมน์ชนิด รีเวอร์สเฟส (Alltech, Platinum C18-EPS, USA) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ความยาว 15 เซนติเมตร ขนาดของอนุภาคที่บรรจุด้านใน 5 ไมโครเมตร ชนิดของตัวชะที่ใช้ คือ อะซิโตนไนไตรล์ 35 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ อัตราการไหลของตัวชะ 2.5 มิลลิลิตร/นาที ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด 254 นาโนเมตร สามารถแยกสารได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ สาร (1) น้ำหนัก 5.2 มิลลิกรัม สาร (2) น้ำหนัก 3.5 มิลลิกรัม และสาร (3) น้ำหนัก 3.5 มิลลิกรัม นำ KE5-4 และ KE5-5 มารวมกัน แล้วแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ชนิดและขนาดของคอลัมน์เหมือนวิธีที่กล่าวข้างต้น ตัวชะที่ใช้ คือ เมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ อัตราการไหลของตัวชะใช้ 3 มิลลิลิตร/นาที ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ สาร (4) น้ำหนัก 6.6 มิลลิกรัม และสาร (5) น้ำหนัก 5.3 มิลลิกรัม และนำ KE5-6 – KE5-8 มารวมกัน แล้วแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ชนิดและขนาดของคอลัมน์เหมือนวิธีที่กล่าวข้างต้น ตัวชะที่ใช้ คือ เมทานอล 25 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ อัตราการไหลของตัวชะใช้ 2.5 มิลลิลิตร/นาที ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ สาร (6) น้ำหนัก 20.5 มิลลิกรัม และสาร (7) น้ำหนัก 10.3 มิลลิกรัม จากนั้นนำสารหลอดที่ 6 ไปทำการแยกด้วยคอลัมน์

ซิติกาเจล โดยชะด้วย อะซิโตน/ไดคลอโรมีเทน ได้ส่วนแยกย่อย 11 ส่วน คือ KE6-1 – KE6-11 นำ KE6-8 – KE6-11 มารวมกัน แล้วแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้ ชนิดและขนาดของคอลัมน์เหมือนวิธีที่กล่าวข้างต้น ตัวชะที่ใช้ คือ เมทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ อัตราการไหลของตัวชะใช้ 3.5 มิลลิลิตร/นาที ได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ สาร (8) น้ำหนัก 7.3 มิลลิกรัม และสาร (9) น้ำหนัก 3.8 มิลลิกรัม

จากนั้นนำสารบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้ มาทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ และเปรียบเทียบผลการแตกตัวของแมสไอออนของสารกับฐานข้อมูลการแตกตัวของแมสไอออน ของบริษัท Wiley version 7 ในการวิเคราะห์ข้อมูลนั้นจะดูที่มีความเชื่อมั่นไม่น้อยกว่า 90%

ผลการทดลอง



4-hydroxybenzaldehyde (1) ของแข็งสีขาว; UV (MeOH, 1.27 x 10⁻⁴ M): λ_{max} (log ε) = 203 nm (3.93), 220 nm (3.76), 281 nm (3.64); IR (KBr-disc): V_{max} = 3200, 1676, 1611, 1458, 1294, 832 cm⁻¹; ¹H-NMR (ตาราง 1) และ ¹³C-NMR (ตาราง 3); GC-MS (ตาราง 4)

4-hydroxyphenylacetonitrile (2) ของแข็งสีขาว; UV (MeOH, 1.27 x 10⁻⁴ M): λ_{max} (log ε) = 203 nm (3.92), 220 nm (3.61), 282 nm (3.16); IR (KBr-disc): V_{max} = 3392, 2256, 1615, 1515, 1445, 1227, 820 cm⁻¹; ¹H-NMR (ตาราง 1) และ ¹³C-NMR (ตาราง 3); GC-MS (ตาราง 4)

3-(4-hydroxyphenyl)propionitrile (3) ของแข็งสีขาว; UV (MeOH, 1.32×10^{-4} M): λ_{\max} (log \mathcal{E}) = 203 nm (3.91), 224 nm (3.78), 276 nm (3.22); IR (KBr-disc): V_{\max} = 3377, 2252, 1614, 1515, 1448, 1229, 833 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (ตาราง 1) และ $^{13}\text{C-NMR}$ (ตาราง 3); GC-MS (ตาราง 4)

phenylacetic acid หรือ α -toluic acid (4) ของแข็งสีขาว; UV (MeOH, 1.02×10^{-4} M): λ_{\max} (log \mathcal{E}) = 206 nm (3.99); IR (KBr-disc): V_{\max} = 3033, 1698, 1454, 1407, 1230, 699 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (ตาราง 1) และ $^{13}\text{C-NMR}$ (ตาราง 3); GC-MS (ตาราง 4)

3-phenylpropionic acid หรือ dihydrocinnamic acid (5) ของแข็งสีขาว; UV (MeOH, 1.04×10^{-4} M): λ_{\max} (log \mathcal{E}) = 207 nm (3.99); IR (KBr-disc): V_{\max} = 2934, 1697, 1407, 1302, 1219, 701 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (ตาราง 1) และ $^{13}\text{C-NMR}$ (ตาราง 3); GC-MS (ตาราง 4)

3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (6) หรือ phloretic acid ของแข็งสีขาว; UV (MeOH, 1.0×10^{-4} M): λ_{\max} (log \mathcal{E}) = 202 nm (3.98), 224 nm (3.98), 278 nm (3.32); IR (KBr-disc): V_{\max} = 3394, 2927, 1707, 1614, 1515, 1448, 1229, 828 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (ตาราง 2) และ $^{13}\text{C-NMR}$ (ตาราง 3); GC-MS (ตาราง 4)

4-(4-hydroxyphenyl)butyric acid (7) ของแข็งสีขาว; UV (MeOH, 1.11×10^{-4} M): λ_{\max} (log \mathcal{E}) = 204 nm (3.97), 222 nm (3.77), 277 nm (3.20); IR (KBr-disc): V_{\max} = 3424, 2926, 1707, 1513, 1448, 1231, 827 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (ตาราง 2) และ $^{13}\text{C-NMR}$ (ตาราง 3); GC-MS (ตาราง 4)

4-hydroxyphenylacetic acid (8) ของแข็งสีขาว; UV (MeOH, 1.06×10^{-4} M): λ_{\max} (log \mathcal{E}) = 202 nm (3.95), 224 nm (3.85), 275 nm (3.52); IR (KBr-disc): V_{\max} = 3261, 1708, 1612, 1600, 1518, 1446, 1214, 822 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (ตาราง 2) และ $^{13}\text{C-NMR}$ (ตาราง 3); GC-MS (ตาราง 4)

4-hydroxybenzoic acid (9) ของแข็งสีขาว; UV (MeOH, 6.08×10^{-5} M): λ_{\max} (log \mathcal{E}) = 204 nm (4.23), 258 nm (4.23); IR (KBr-disc): V_{\max} = 3379, 1673, 1607, 1594, 1419, 1290, 1242, 854 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (ตาราง 2) และ $^{13}\text{C-NMR}$ (ตาราง 3); GC-MS (ตาราง 4)

ตาราง 1 ค่า Chemical shift (δ , ppm) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) ของ สาร (1) – สาร (5)

| ตำแหน่งคาร์บอน | สาร (1) ^a | สาร (2) ^a | สาร (3) ^a | สาร (4) ^a | สาร (5) ^a |
|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|
| 1 | - | - | - | - | - |
| 2 | 7.80(1H, <i>d</i> , 8.63) | 7.20(1H, <i>d</i> , 8.35) | 7.12(1H, <i>d</i> , 8.39) | 7.30(1H, <i>m</i>) | 7.38(1H, <i>m</i>) |
| 3 | 7.00(1H, <i>d</i> , 8.59) | 6.85(1H, <i>d</i> , 8.46) | 6.79(1H, <i>d</i> , 8.46) | 7.30(1H, <i>m</i>) | 7.38(1H, <i>m</i>) |
| 4 | - | - | - | 7.23(1H, <i>m</i>) | 7.30(1H, <i>m</i>) |
| 5 | 7.00(1H, <i>d</i> , 8.59) | 6.85(1H, <i>d</i> , 8.46) | 6.79(1H, <i>d</i> , 8.46) | 7.30(1H, <i>m</i>) | 7.38(1H, <i>m</i>) |
| 6 | 7.80(1H, <i>d</i> , 8.63) | 7.20(1H, <i>d</i> , 8.35) | 7.12(1H, <i>d</i> , 8.39) | 7.30(1H, <i>m</i>) | 7.38(1H, <i>m</i>) |
| 1' | 9.85(1H, <i>s</i>) | 3.81(2H, <i>s</i>) | 2.84(2H, <i>t</i> , 7.16) | 3.61(2H, <i>s</i>) | 3.03(2H, <i>t</i> , 7.35) |
| 2' | - | - | 2.68(2H, <i>t</i> , 7.22) | - | 2.74(2H, <i>t</i> , 6.95) |
| 3' | - | - | - | - | - |

^aละลายในตัวทำละลาย Acetone-*d*₆ (Multiplicity, *J* in Hz)

ตาราง 2 ค่า Chemical shift (δ , ppm) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) ของ สาร (6) – สาร (9)

| ตำแหน่งคาร์บอน | สาร (6) ^a | สาร (7) ^a | สาร (8) ^a | สาร (9) ^b |
|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | - | - | - | - |
| 2 | 7.07(1H, <i>d</i> , 8.44) | 7.03(1H, <i>d</i> , 8.38) | 7.11(1H, <i>d</i> , 7.82) | 7.80(1H, <i>d</i> , 7.21) |
| 3 | 6.77(1H, <i>d</i> , 8.41) | 6.75(1H, <i>d</i> , 8.43) | 6.76(1H, <i>d</i> , 7.81) | 6.82(1H, <i>d</i> , 7.30) |
| 4 | - | - | - | - |
| 5 | 6.77(1H, <i>d</i> , 8.41) | 6.75(1H, <i>d</i> , 8.43) | 6.76(1H, <i>d</i> , 7.81) | 6.82(1H, <i>d</i> , 7.30) |
| 6 | 7.07(1H, <i>d</i> , 8.44) | 7.03(1H, <i>d</i> , 8.38) | 7.11(1H, <i>d</i> , 7.82) | 7.80(1H, <i>d</i> , 7.21) |
| 1' | 2.81(2H, <i>t</i> , 7.67) | 2.56(2H, <i>t</i> , 7.55) | 3.49(2H, <i>s</i>) | - |
| 2' | 2.56(2H, <i>t</i> , 7.68) | 1.84(2H, <i>p</i> , 7.37) | - | - |
| 3' | - | 2.28(2H, <i>t</i> , 6.97) | - | - |
| 4' | - | - | - | - |

^aละลายในตัวทำละลาย Acetone-*d*₆ (Multiplicity, *J* in Hz)

^bละลายในตัวทำละลาย Acetone-*d*₆ + D₂O (Multiplicity, *J* in Hz)

ตาราง 3 ค่า Chemical shift (δ , ppm) สำหรับ ^{13}C -NMR (100 MHz) ของ สาร (1) – สาร (9)

| ตำแหน่งคาร์บอน | สาร (1) ^a | สาร (2) ^a | สาร (3) ^a | สาร (4) ^a | สาร (5) ^a | สาร (6) ^a | สาร (7) ^a | สาร (8) ^a | สาร (9) ^b |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 129.2 | 122.8 | 129.7 | 136.2 | 141.2 | 132.6 | 132.4 | 125.9 | 122.4 |
| 2 | 131.8 | 130.1 | 129.4 | 129.1 | 128.2 | 130.0 | 129.2 | 130.2 | 132.3 |
| 3 | 115.7 | 116.6 | 115.3 | 130.2 | 128.3 | 116.0 | 115.0 | 114.8 | 115.4 |
| 4 | 163.0 | 158.0 | 156.3 | 127.5 | 125.9 | 156.5 | 155.5 | 156.2 | 162.0 |
| 5 | 115.7 | 116.6 | 115.3 | 130.2 | 128.3 | 116.0 | 115.0 | 114.8 | 115.4 |
| 6 | 131.8 | 130.1 | 129.4 | 129.1 | 128.2 | 130.0 | 129.2 | 130.2 | 132.3 |
| 1' | 190.0 | 22.6 | 30.5 | 41.6 | 30.7 | 30.7 | 33.9 | 39.9 | 169.1 |
| 2' | - | 119.6 | 18.8 | 173.4 | 40.7 | 36.4 | 26.9 | 172.8 | - |
| 3' | - | - | 119.4 | - | 173.5 | 174.5 | 32.7 | - | - |
| 4' | - | - | - | - | - | - | 175.5 | - | - |

^a ละลายในตัวทำละลาย Acetone- d_6 (Multiplicity, J in Hz)^b ละลายในตัวทำละลาย Acetone- d_6 + D_2O (Multiplicity, J in Hz)**ตาราง 4** ข้อมูลเมสจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี

| สาร | M+ (calc.) | M+ (obs.) | การแตกตัวของไอออน (Fragmentations) (m/z) |
|-----|------------|-----------|--|
| (1) | 122.12 | 122(84) | 122(84), 121(100), 93(36), 65(35) |
| (2) | 133.15 | 133(100) | 133(100), 132(53), 106(42), 78(78), 51(31) |
| (3) | 147.18 | 147(21) | 147(21), 108(7), 107(100), 77(13) |
| (4) | 136.05 | 136(27) | 136(27), 92(17), 91(100), 65(15), 39(10) |
| (5) | 150.07 | 150(38) | 150(38), 105(16), 104(41), 91(100), 77(11) |
| (6) | 166.06 | 166(44) | 166(44), 120(12), 108(16), 107(100), 77(20), 39(14) |
| (7) | 180.08 | 180(41) | 180(41), 121(24), 120(69), 108(15), 107(100), 77(14) |
| (8) | 152.05 | 152(26) | 152(26), 107(100), 77(15) |
| (9) | 138.03 | 138(68) | 138(68), 121(100), 93(27), 65(38), 63(15), 39(39) |

การวิเคราะห์หาโครงสร้างและวิจารณ์

จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ พบว่าสารทั้งหมดมีโครงสร้างหลักเป็นวงเบนซีน เนื่องจากมีพีคปรากฏ ช่วงอะโรมาติก ($^1\text{H-NMR}$ 6.5-8 ppm; และ $^{13}\text{C-NMR}$ 80-140 ppm) โดยมีโครงสร้างหลัก 2 แบบ คือ แบบที่ 1 มีหมู่แทนที่หมู่เดียว พีคของ $^1\text{H-NMR}$ ที่ปรากฏในช่วงอะโรมาติก จะมีลักษณะเป็น multiplet ได้แก่ phenylacetic acid (4) และ 3-phenylpropionic acid (5) แบบที่ 2 มีหมู่แทนที่ 2 หมู่ อยู่ในตำแหน่งพารา พีคของ $^1\text{H-NMR}$ ที่ปรากฏในช่วงอะโรมาติก จะมีลักษณะเป็นคู่ของ doublet มีค่า coupling constant อยู่ระหว่าง 8-9 Hz โดยหมู่แทนที่หมู่หนึ่งเป็นสายโซ่คาร์บอน อีกหมู่หนึ่งเป็นหมู่ไฮดรอกซิล ดังนั้นพีคของ $^{13}\text{C-NMR}$ จะปรากฏตำแหน่งของ C-O บนวงอะโรมาติก ในช่วง 150-160 ppm ซึ่งสารในกลุ่มนี้ได้แก่ 4-hydroxybenzaldehyde (1), 4-hydroxyphenylacetonitrile (2), 3-(4-hydroxyphenyl)propionitrile (3), 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (6), 4-(4-hydroxyphenyl)butyric acid (7), 4-hydroxyphenylacetic acid (8) และ 4-hydroxybenzoic acid (9)

การวิเคราะห์โครงสร้าง สาร (1) จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่ามีพีคปรากฏที่ตำแหน่ง 9.85 ppm และ 190.0 ppm ตามลำดับ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารกลุ่มอัลดีไฮด์ และเมื่อทำการยืนยันด้วยแมสและเปรียบเทียบการแตกแมสของสาร (1) กับฐานข้อมูลของ 4-hydroxybenzaldehyde พบว่ามีแมสที่ตรงกันได้เท่ากับ 122 ซึ่งจากการคำนวณแมสของสาร (1) ได้ 122.12 และมีร้อยละความเหมือนของการแตกแมส (fragmentations) มากกว่า 90 ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าสาร (1) คือ 4-hydroxybenzaldehyde

การวิเคราะห์โครงสร้าง สาร (2) และ สาร (3) ด้วย $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ รวมทั้ง ข้อมูลอินฟราเรด ยืนยันว่าสารทั้งสองเป็นสารกลุ่มไนไตรล์ เนื่องจากพบว่ามีพีคปรากฏขึ้นที่บริเวณ 2200-2300 cm^{-1} ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงของหมู่ฟังก์ชันไนไตรล์ รวมทั้งข้อมูลของแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี สามารถยืนยันได้ว่าสาร (2) และ สาร (3) คือ 4-hydroxyphenylacetonitrile และ 3-(4-hydroxyphenyl)propionitrile ตามลำดับ

การวิเคราะห์โครงสร้าง สาร (4) - สาร (9) สารชุดนี้เป็นสารกลุ่มกรดคาร์บอกซิลิก จาก $^{13}\text{C-NMR}$ จะมีพีคของคาร์บอนที่เป็นหมู่คาร์บอกซิล เกิดขึ้นตำแหน่งประมาณ 170 ppm และเมื่อนำสาร (4) - สาร (9) มายืนยันผลด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี พบว่า สาร (4) คือ phenylacetic acid สาร (5) คือ 3-phenylpropionic acid สาร (6) คือ 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid สาร (7) คือ 4-(4-hydroxyphenyl)butyric acid สาร (8) คือ 4-hydroxyphenylacetic acid และสาร (9) คือ 4-hydroxybenzoic acid

สำหรับข้อมูลของสารดังกล่าวมีดังนี้ 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (6) ได้มีการรายงานการพบในน้ำกระทอน (Boonphong and Nopichai, 2009) และในมะกอกโอลิฟที่ดองเกลือ (Owen *et al.*, 2003) ซึ่งสารนี้เป็นสารหลักในน้ำกระทอน โดยที่สารอีก 8 ชนิด ยังไม่มีการรายงานว่าพบในน้ำกระทอน ดังนั้นจึงเป็นการรายงานครั้งแรก ของการพบสารกลุ่มนี้ในน้ำกระทอน และจากการสืบค้นข้อมูล มีการแยกสารเหล่านี้จากแหล่งต่างๆ เช่น 4-hydroxybenzaldehyde (1) มีรายงานการพบในกล้วยไม้ชนิด *Gastrodia elata* (Ha *et al.*, 2000) และในฟองน้ำชนิด *Lubomirskia baicalensis* (Shubina *et al.*, 2005) 4-hydroxyphenylacetonitrile (2) มีรายงานการพบใน unifloral thyme honey (Alissandrakis *et al.*, 2009) phenylacetic acid (4) มีกลิ่นเฉพาะตัว และเป็นกลิ่นในน้ำผึ้ง กลิ่นในของหมักคอง หรือกลิ่นในชะมด โดยมีกลิ่นค่อนข้างแรง (phenylacetic acid, 2009) และมีความคล้ายกับกลิ่นของน้ำกระทอน มีรายงานพบสารชนิดนี้จากการผลิตของ *Bacillus licheniformis* ที่แยกได้จากถั่วเหลืองหมัก (Kim *et al.*, 2004) 3-phenylpropionic acid (5) มีรายงานการพบสารนี้จากการผลิตของเชื้อ *Streptomyces* (Kolla *et al.*, 2007) และ *Bacillus licheniformis* SAB1 ที่อยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Halichondria* sp. (Devi *et al.*, 2010) 4-(4-hydroxyphenyl)butyric acid (7) มีรายงานการเตรียมสารนี้จาก 4-methoxyphenylbutyric acid (Schmid *et al.*, 2004) และใช้ในการสังเคราะห์ PPAR α agonist LY518674 (Braden *et al.*, 2007; Argentine *et al.*, 2009) 4-hydroxyphenylacetic acid (8) มีรายงานการพบในเบียร์ (Nardini *et al.*, 2006) และในน้ำผลไม้ชนิด Kei-Apple (Loots *et al.*, 2006) และ 4-hydroxybenzoic acid (9) มีรายงานการแยกและการวิเคราะห์สารชนิดนี้จากรำข้าว (Cho *et al.*, 1998) สำหรับ 3-(4-hydroxyphenyl)propionitrile (3) ไม่มีรายงาน จึงเป็นการพบในธรรมชาติเป็นครั้งแรก

จากการวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของสารกลิ่นในกระทอน ทำให้ทราบถึงชนิดสารที่ให้กลิ่นหลักของน้ำกระทอนคือ phenylacetic acid

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสารสกัดหยาบส่วนแยกย่อยที่มีกลิ่นของน้ำกระทอน โดยการแยกองค์ประกอบทางเคมีและทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และวิเคราะห์โครงสร้างด้วยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี ได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 9 ชนิด คือ 4-hydroxybenzaldehyde (1), 4-hydroxyphenyl acetonitrile (2), 3-(4-hydroxyphenyl)propionitrile (3), phenylacetic acid (4), 3-phenylpropionic acid (5), 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (6), 4-(4-hydroxyphenyl)butyric acid (7), 4-hydroxyphenyl acetic acid (8) และ 4-hydroxybenzoic acid (9) ซึ่งสารบริสุทธิ์ที่แยกได้พบว่า สาร phenylacetic acid (4) เป็นสารที่มีกลิ่นคล้ายน้ำกระทอน

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนการวิจัย โดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สนับสนุนการใช้เครื่องมือในการวิจัย จนสำเร็จลุล่วงได้ตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- เต็ม สมิตินันท์. (2544). *ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย*. พิมพ์ครั้งที่ 2 (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม), กรุงเทพมหานคร: บริษัทประชาชนจำกัด.
- สุรชัย มัจฉาชีพ. (2541). *ทรัพยากรพันธุ์พืชเพื่อการอนุรักษ์*. พิมพ์ครั้งที่ 1, พิษณุโลก: โรงพิมพ์ตระกูลไทย.
- Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Pappas, C., Harizanis, P. C. and Polissiou, M. (2009). Ultrasound-assisted extraction gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile compounds in unifloral thyme honey from Greece. *European Food Research and Technology*, 229(3), 365-373.
- Argentine, M. D., Braden, T. M., Czarnik, J., Conder, E. W., Dunlap, S. E., Fennell, J. W., et al. (2009). The role of new technologies in defining a manufacturing process for PPAR α agonist LY518674. *Organic Process Research & Development*, 13(2), 131-143.
- Braden, T. M., Coffey, D. S., Doecke, C. W., LeTourneau, M. E., Martinelli, M.J., Meyer, C. L., et al. (2007). A convergent kilogram-scale synthesis of the PPAR α agonist LY518674: Discovery of a novel acid-mediated triazolone synthesis. *Organic Process Research & Development*, 11(3), 431-440.
- Boonphong, S. and Nopichai, S. (2009). Lactic anhydride, phloretic acid and flavonoids from Kra Thon (*Millettia pendula*) sauce. *Naresuan University Science Journal*, 6(1), 126-134.
- Cho, J-Y., Moon, J-H., Seong, K-Y. and Park, K-H. (1998). Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and *trans* 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(11), 2273-2276.
- Devi, P., Wahidullah, S., Rodrigues, C. and Souza, L. D. (2010). The Sponge-associated bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: A source of antimicrobial compounds. *Marine Drugs*, 8(4), 1203-1212.

- Ha, J-H., Lee, D-U., Lee, J-T., Kim, J-S., Yong, C-S., Kim, J-A. et al., (2000), 4-Hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* Bl. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 329-333.
- Kim, Y., Cho, J-Y., Kuk, J-H., Moon, J-H., Cho, J., Kim, Y-C., et al. (2004). Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, Chungkook-Jang. *Current Microbiology*, 48(4), 312-317.
- Kolla, N. J. P., Peddikotla, P., Muvva, V., Yenamandra, V. and Palakodety, K. S. J. (2007). Biological activity of phenylpropionic acid isolated from a terrestrial *Streptomyces*. *Polish journal of microbiology*, 56(3), 191-197.
- Loots, D. T., Westhuizen F. H. V. D. and Jerling, J. (2006). Polyphenol composition and antioxidant activity of Kei-Apple (*Dovyalis caffra*) juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1271-1276.
- Mopoung, R., Singkong, W., Thongfak, K., Onkeaw, M. and Boonphong, S. (2007). Nutrient and mineral composition in Krathon leaves and unseasoned Krathon sauce. *Naresuan University Science Journal*, 4(2), 188-194.
- Mopoung, R., Thongfak, K., Somran, S., Boonphong, S. and Singkong, W. (2009). Factor affecting the storage of Krathon sauce. *Naresuan University Science Journal*, 6(S1), 56-63.
- Nardini, M., Natella, F., Scaccini, C. and Ghiselli, A. (2006). Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(1), 14-22.
- Owen, R. W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B. et al. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*, 41(5), 703-717.
- phenylacetic acid* (2009). Retrieved June 24, 2009, from <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1009911.html>
- Schmid, C. R., Beck, C. A., Cronin, J. S. and Staszak, M. A. (2004). Demethylation of 4-methoxyphenylbutyric acid using molten pyridinium hydrochloride on multikilogram scale. *Organic Process Research & Development*, 8(4), 670-673.

- Shubina, L. K., Makar'eva, T. N., Denisenko, V. A. and Stonik, V. A. (2005). 4-Hydroxybenzaldehyde from the Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(1), 93-94.
- Takahashi, M., Fuchino, H., Satake, M., Agatsuma, Y. and Sekita, S. (2004). *In vitro* screening of leishmanicidal activity in myanmar timber extracts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(6), 921-925.
- Takahashi, M., Fuchino, H., Sekita, S., Satake, M. and Kiuchi, F. (2006). *In vitro* leishmanicidal constituents of *Millettia pendula*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(6), 915-917.