บทที่ 2

การทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

รากของต้นคนทา ซื้อจากร้านขายสมุนไพร และบางส่วนเก็บตัวอย่างจาก ต.แสลง จังหวัด จันทบุรี ในเดือนเมษายน และเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2531

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

2.2.1 UV Spectra บันทึกด้วยใช้เครื่อง UV Spectrophotometer Model 240 ซึ่งเป็นแบบ double beam spectrophotometer

2.2.2 IR Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Perkin-Elmer Model IR 718 สารที่เป็นของแข็งเตรียมโดย ผสมโปตัสเซียมโบรไมด์(KBr) แล้วอัดให้เป็นแผ่น สำหรับสารที่เป็นของเหลว วัดโดยใช้แผ่นโซเดียมคลอไรด์(NaCl)

2.2.3 NMR Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Jeol Fourier Transform NMR Model FX 90Q โดยใช้เตตระเมธิลไซเลน(TMS)เป็นสารอ้างอิง(references) วัดค่าเคมิคัลชิพเป็น พี พี เอ็ม(p p m)

2.2.4 MS Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Jeol Mass Spectrometer Model JMS-DX-300/JMA 2000 ที่ 70 อิเล็กตรอนโวลต์

2.2.5 Elemental analysis บันทึกด้วยใช้เครื่อง Perkin Elmer CHNO Analyzer Model 240 C

2.2.6 GLC Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Shimadzu Gas-Liquid Chromatograph Mode GC-7 AG

2.2.7 การวิเคราะห์น้ำตาล บันทึกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph ของบริษัท Shimadzu

2.2.8 การวิเคราะห์ ธาตุอินทรีย์ บันทึกด้วยเครื่อง Atomic

017177

Absorption Flame Emission Spectrophotometer Model AA-650 ของบริษัท Shimadzu

2.2.9 Melting Point บันทึกโดยใช้เครื่อง Fisher-John

2.3 สารเคมี

2.3.1 ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน, อีเทอร์, เอทิลแอซีเตต, คลอโรฟอร์ม, แอซีโตน, เอทานอล และเมทานอล สารเคมีที่ใช้ถ้าเป็นชนิดคอมเมอร์เชียลเกรด ต้องนำมากลั่นก่อนใช้ทุกครั้ง

2.3.2 สารเคมีอื่นๆที่ใช้ ได้แก่ ซิลิกาเจล Art.7730, Art.7734 อลูมินา Art.1092 สำหรับทำ คอลัมน์โครมาโทกราฟีและทินแลร์โครมาโทกราฟี

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดสม่ำเสมอ เส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของคอลัมน์แก้วขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่ต้องการจะแยกต่อตัวดูดซับ (adsorbent) 1:20 ส่วน ตอนล่างของคอลัมน์แก้ว เป็นปลายตีบมีที่บิดเบิด(stop cock) คอยปรับอัตราการไหลของสารละลาย การเตรียมคอลัมน์ทำโดยใส่สำลีไว้ตอนปลายของคอลัมน์ บิดที่ควบคุมการไหลของสารละลาย เทสารละลายซึ่งโดยทั่วไปใช้เฮกเซน ลงไปประมาณ 1 ใน 3 ของคอลัมน์แก้ว ปล่อยให้สารละลายไหลลงไปเพื่อไล่ฟองอากาศจากสำลี จนกระทั่งหมดฟองอากาศ เติมสารละลายลงไปประมาณ 2 ใน 3 ของคอลัมน์แก้ว ผสมซิลิกาเจล Art.7730 กับสารละลาย เทของผสมลงในคอลัมน์แก้ว ค่อยๆปล่อยให้สารละลายไหลช้าๆ เคาะข้างคอลัมน์แก้วเบาๆให้ซิลิกาเจล ตกลงไปในคอลัมน์แก้วอย่างสม่ำเสมอจนกระทั่งได้ปริมาณตัวดูดซับในคอลัมน์แก้วตามต้องการ ทิ้งไว้สักครู่ให้ตัวดูดซับไม่ลดตัวลงอีกต่อไป ปรับผิวหน้าของตัวดูดซับให้เรียบเสมอกัน ปล่อยสารละลายออกจนเหลือปริมาณสารละลาย เหนือตัวดูดซับเล็กน้อย ค่อยๆเทสารที่ต้องการแยกที่คลุกเคล้ากับซิลิกาเจล ไว้เรียบร้อยแล้ว ลงในคอลัมน์ ปรับผิวให้เรียบสม่ำเสมอโรย ซิลิกาเจลลงไปเคลือบปิดผิวหน้าเล็กน้อย ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายตามอัตราส่วนต่างๆกัน เพื่อใช้ในการแยกสารต่อไป

2.4.2 คิดคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ใช้คอลัมน์แก้ว เบอร์ 3 เส้นผ่าศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร ตัวดูดซับที่ใช้คือ ซิลิกาเจล 60 Art.7730 และ อลูมินา 60 Art.1092 (เป็นตัวดูดซับที่ใช้ในการทำ ทินแลร์โครมาโทกราฟี) ใส่คอลัมน์แก้วลงในขาดดูด ที่มีจุกยางรองรับ ต่อขาดดูดเข้ากับเครื่องสูบน้ำ เพื่อให้ภายในขาดดูดเป็นสูญญากาศวางกระดาษกรองของ Whatman เบอร์ 1 ที่ก้นคอลัมน์ ผสมตัวดูดซับเข้ากับสารละลาย เทลงในคอลัมน์ การเทแต่ละครั้งไม่ควรเกิน 1 เซนติเมตร ปรับผิวและกดตัวดูดซับให้แน่นเพื่อให้ตัวดูดซับมีความแน่นมากยิ่งขึ้น จึงควรชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายในแต่ละครั้ง ทำซ้ำแบบเดิม จนกระทั่งได้ปริมาณตัวดูดซับตามต้องการ แต่ไม่ควรสูงเกินกว่า 4 เซนติเมตร ปรับผิวให้เรียบ นำตัวดูดซับคลุกกับสารที่ต้องการแยก มาเกลี่ยให้เรียบบนผิวของตัวดูดซับจนหมด ปิดทับด้วยกระดาษกรอง เพื่อให้ผิวหน้าของตัวดูดซับเรียบตลอดเวลา แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกต่อไป

2.4.3 ทินแลร์โครมาโทกราฟี

การเตรียมโครมาโทเพลท (chromatoplate) โดยใช้ซิลิกาเจล 60 Art.7730 ของบริษัท E.Merk, Darmstat เป็นตัวดูดซับผสมซิลิกาเจลกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:2 เขย่าให้เข้ากันในขวดที่มีฝาปิด เทลงใน Desaga Spreader ที่ปรับให้หนา 0.25 มม. บนกระจกขนาด 20×5 ซม. หรือขนาด 20×20 ซม. ที่ล้างสะอาดด้วยน้ำและเช็ดคราบมันบนกระจกด้วยแอซีโตน จะได้โครมาโทเพลท นำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 120 °C ประมาณ 2 ชั่วโมง

การเตรียมภาชนะสำหรับการชะ (develop)

ใช้ถังแก้วทรงสูงที่มีฝาปิดเรียบร้อย เทสารละลายที่จะใช้ในการชะลงไป ใส่กระดาษกรองขนาด 20×5 ซม. ลงไปให้แนบกับผิวด้านในของถังแก้ว ปิดฝารอจนกระทั่งกระดาษกรองเปียกทั่วทั้งแผ่น แสดงว่าภายในถังแก้วอิ่มตัวด้วยไอของสารละลายนั้น

การชะละลายสารตัวอย่าง

ละลายสารที่ต้องการศึกษา ด้วยตัวทำละลายที่ดีที่สุด ใช้หลอดแคปปิลลารีดูดสารละลาย แต้มสารลงบนโครมาโทเพลทห่างจากขอบด้านล่าง 1.5 ซม. แต้มแต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 ซม. ด้านบนขีดเส้นระดับตัวทำละลายไว้ ปล่อยให้สาร

ที่แต้มไว้แห้งสนิท นำไปจุ่มในถังแก้วที่เตรียมไว้ ปล่อยให้สารละลายในถังแก้วซึมขึ้นไปจนถึงเส้นระดับตัวทำละลาย นำโครมาโทเพลทออกจากถังแก้ว ทิ้งไว้ให้แห้ง

การหาตำแหน่งของสารที่ทำการชะละลาย

1. ส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต(UV) ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้โครมาโทเพลทจะต้องเคลือบด้วยซิลิกาเจล แบบดูดกลืนคลื่นแสงได้ เมื่อส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลต บริเวณตำแหน่งของสารจะเห็นเป็นจุดสีม่วงปรากฏ แต่ในการหาตำแหน่งของสารด้วยวิธีนี้ สารจะต้องสามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ สารที่มีพันธะคู่น้อยหรือไม่มีเลย จะมองไม่เห็นจุดสีม่วง

2. ใช้ไอโอดีนในการทำให้เกิด สารประกอบเชิงซ้อน โดยการนำเกล็ดไอโอดีน จำนวนพอประมาณใส่ในถังแก้วที่มีฝาปิดสนิท ปล่อยให้ไอโอดีนระเหยขึ้นมาเป็นไอในถังแก้ว นำโครมาโทเพลทที่ผ่านการชะแล้วไปใส่ในถังแก้วปิดฝาให้สนิท ไอโอดีนจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารเป็นสีน้ำตาล ทำให้เห็นตำแหน่งของสารได้

3. พ่นด้วยสารละลายซัลฟิวริก 50% นำโครมาโทเพลท ที่ชะแล้วมาพ่นด้วยสารละลายซัลฟิวริก 50% อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 150 °C ประมาณ 15 นาที บริเวณที่เกิดตำแหน่งของสาร จะเกิดเป็นจุดสีต่างๆ

2.5 <u>การสกัด</u>

นำรากคนทา ที่แห้งและบดละเอียด หนัก 19 กิโลกรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้

2.5.1 นำรากคนทามาสกัดด้วยเมทานอล โดยใช้เครื่องมือ soxhlet extraction สกัดจนกระทั่งสารละลายเมทานอลที่ใช้สกัดไม่มีสี นำสารละลายเมทานอลที่ได้มากรอง แล้วทำการกลั่นโดยวิธีลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน จนเหลือสารละลายประมาณ 300 ซม.$^3$ นำไประเหยให้แห้งบนอ่างน้ำเดือด จะได้สิ่งสกัดในเมทานอลเป็นสารสีแดงปนดำหนัก 430.36 กรัม ซึ่งจะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นต่อไป

2.5.2 นำสิ่งที่สกัดได้จากเมทานอลมาคนด้วยเฮกเซน กวนเข้าด้วยกันบนอ่างน้ำเดือดทิ้งไว้สักครู่ นำมากรอง จะได้สารที่ละลายในเฮกเซน ทำซ้ำหลายๆครั้ง จนเฮกเซนที่ใช้สกัด ใสไม่มีสี นำเอาสารละลายในเฮกเซนทั้งหมด มาทำการกลั่น

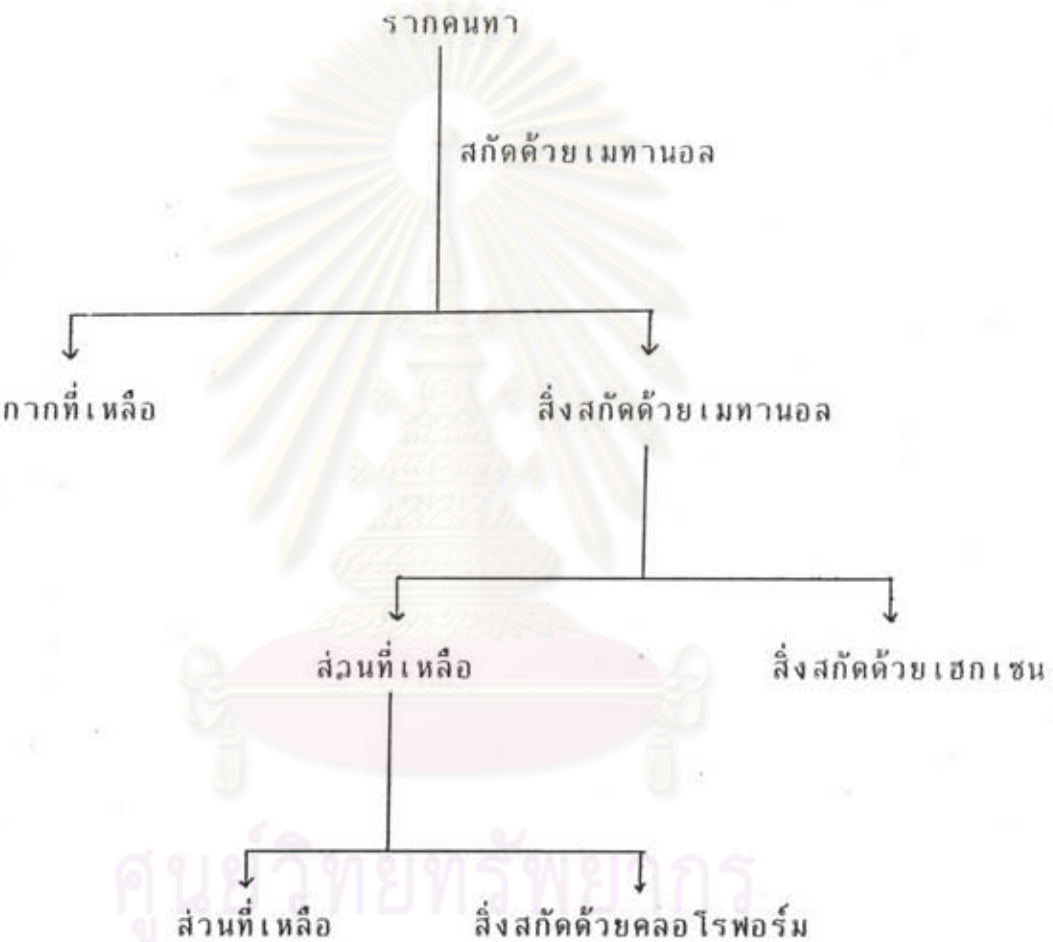
แบบธรรมดา จนเหลือสารละลายในขวดก้นกลม 300 ซม.$^3$ เทใส่บีกเกอร์น้ำไประเหย แห้งบนอ่างน้ำเดือด จากการสกัดด้วยเฮกเซน จะได้สิ่งสกัดเป็น สีเขียวปนดำหนัก 44 กรัม

2.5.3 นำสิ่งสกัดจากเมทานอล ที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซนไปสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์ม โดยใช้วิธีกวนคลอโรฟอร์มกับสิ่งสกัด กรองแล้วนำไปกลั่น นำคลอโรฟอร์มที่ได้จากการกลั่นไปสกัดซ้ำหลายๆครั้ง จนใสไม่มีสี ได้สิ่งสกัดจากคลอโรฟอร์ม เป็นสีแดงปนดำหนัก 56 กรัม

ผลการสกัดทั้งหมดสรุปได้ตามแผนภาพที่ 1 หน้า 20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 1 แสดงการสกัดรากคนทาที่แห้งและบดละเอียด




ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6 การแยกสารของรากคนทาที่ซื้อจากร้านขายสมุนไพร

2.6.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน

สิ่งสกัดในเฮกเซน หนัก 44 กรัม มาทำวิธีแยกโดย ใช้วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ หนัก 600 กรัม ใช้สารละลายชะคอลัมน์ตามอัตราส่วนต่างๆกันโดยเริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม, คลอโรฟอร์ม, คลอโรฟอร์ม-เมทานอล และ เมทานอล ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 500 ซม.$^3$. นำไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อแยกตัวทำละลายออก จนเหลือสารละลายประมาณ 50 ซม.$^3$. เทใส่ขวดรูปชมพู่ตรวจสอบด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟี รวมขวดที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน นำไประเหยบนอ่างน้ำเดือดจนแห้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก

ตารางที่ 2 ผลของการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซน(ตัวอย่างได้จากร้านขายสมุนไพร )

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| เฮกเซน | | 1-3 | น้ำมันสีขาว |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 9:1 | 4-6 | น้ำมันสีขาว |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 4:1 | 7-10 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 1:1 | 11-14 | ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 3:7 | 15-16 | น้ำมันสีเหลืองปนเขียว |
| | | 17-8 | ผลึกรูปเข็มสีเหลืองในน้ำมันสีเหลืองชา |
| | | 19-21 | ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง |
| | | 22-24 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 1:9 | 25-26 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม | | 27-28 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 9:1 | 29-30 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| | | 31-33 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 7:3 | 34-36 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 1:1 | 37-39 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 3:7 | 40-41 | น้ำมันสีขาวปนเหลือง |
| เมทานอล | | 42-44 | น้ำมันสีขาวปนเหลือง |

2.6.2 การแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม

นำสิ่งสกัดจากคลอโรฟอร์ม 30 กรัม มาแยกโดย วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล 600 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่างๆกัน และเก็บแต่ละส่วนเหมือนหัวข้อ 2.6.1

ตารางที่ 3 ผลของการแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม(ตัวอย่างได้จากร้านขายสมุนไพร)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน | 1:1 | 1-5 | น้ำมันสีขาว |
| | | 6-7 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน | 7:3 | 10-11 | น้ำมันสีเหลืองปนเขียวอ่อน |

ตารางที่ 3 (ต่อ)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขาดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| | | 12-18 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม | | 19-23 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 9:1 | 24-25 | น้ำมันสีเหลืองชา |
| | | 26-27 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 28-29 | น้ำมันสีเหลืองชา |
| | | 30-34 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| | | 35-40 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 4:1 | 41-44 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม |
| | | 45-47 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 48-53 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| | | 54-57 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 7:3 | 58-61 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 62-70 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 1:1 | 71-75 | น้ำมันสีส้ม |
| | | 76-84 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 3;7 | 85-89 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| | | 90-99 | น้ำมันสีเหลือง |
| เมทานอล | | 100-110 | น้ำมันสีส้มอ่อน |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม ปรากฏว่าได้แต่ส่วนที่เป็นน้ำมัน จึงนำสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มมาทำการแยกอีกครั้ง โดยใช้อลูมินาเป็นตัวดูดซับ ใช้สิ่งสกัด 60 กรัม ต่อตัวดูดซับ 120 กรัม การแยกใช้วิธีคาิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี วิธีการเตรียมคอลัมน์ดูได้จากหัวข้อ 2.4.2 การใช้ตัวทำละลายและการเก็บแต่ละส่วนเหมือนหัวข้อ 2.6.1

ตารางที่ 4 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มโดยใช้อลูมินาเป็นตัวดูดซับ (ตัวอย่างได้จากร้านขายสมุนไพร)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน | 1:1 | 1-4 | ของแข็งเป็นแผ่นสีขาว จำนวนเล็กน้อยบนในน้ำมันสีเหลือง |
| | | 5-10 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม | | 11-14 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 19:1 | 15-16 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 17-20 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม |
| | | 21-26 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 27-29 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 9:1 | 30-35 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 36-40 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 4:1 | 41-50 | น้ำมันสีชา |
| | | 51-60 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 7:3 | 61-62 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม |
| | | 63-66 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 (ต่อ)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 1:1 | 67-69 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม |
| | | 70-71 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 7:3 | 72-75 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 76-77 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| | | 78-81 | น้ำมันสีเหลือง |
| เมทานอล | | 82-83 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| | | 84-85 | ของแข็งอสัณฐานสีเหลืองอ่อนปนในน้ำมันสีเหลือง |
| | | 86-90 | น้ำมันสีเหลือง |

2.6.3 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอล

นำสิ่งสกัดในเมทานอล 30 กรัม มาแยกโดยใช้วิธีควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล 350 กรัม ตัวทำละลายและการเก็บแต่ละส่วนทำเหมือนหัวข้อ 2.6.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลของการแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอล (ตัวอย่างได้จากร้านขายสมุนไพร)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม | | 1-2 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 3-4 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม : เมทานอล | 19:1 | 5-6 | น้ำมันสีน้ำตาลดำ |
| | | 7-10 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม |
| | | 11-14 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 15-19 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม : เมทานอล | 9:1 | 20-22 | ของแข็งอสัณฐาน สีเหลืองปนในน้ำมันสีเหลือง |
| | | 23-24 | น้ำมันสีเหลืองจาง |
| คลอโรฟอร์ม : เมทานอล | 4:1 | 25-27 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 28-32 | น้ำมันสีส้ม |
| | | 33-34 | น้ำมันสีส้มอ่อน |
| | | 35-36 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม : เมทานอล | 7:3 | 37-38 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 39-40 | น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน |
| | | 41-42 | น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม |
| | | 43-46 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม : เมทานอล | 1:1 | 47-49 | น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม |
| | | 50-54 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 55-59 | น้ำมันสีชา |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 (ต่อ)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 3:7 | 60-61 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 62-63 | น้ำมันสีชา |
| | | 64-67 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 3:17 | 68-69 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 70-73 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 74-75 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| เมทานอล | | 76-78 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 79-85 | น้ำมันสีเหลือง |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำสิ่งสกัดจากเมทานอล 30 กรัม ใช้อลูมินา เป็นตัวดูดซับ 350 กรัม แยกโดยวิธี คัดคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายและเก็บแต่ละส่วน เหมือนหัวข้อ 2.6.1

ตารางที่ 6 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดจากเมทานอลโดยใช้อลูมินาเป็นตัวดูดซับ (ตัวอย่างได้จากร้านขายสมุนไพร)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม | | 1-2 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 19:1 | 3-4 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 5-8 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 9:1 | 9-10 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 11-12 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 4:1 | 13-16 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 7:3 | 17-20 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม |
| | | 21-22 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 1:1 | 23-24 | ของแข็งอสัณฐานสีขาว จำนวนเล็กน้อยในน้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 25-27 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 28-29 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| | | 30-38 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 3:7 | 39-40 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 41-44 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| เมทานอล | | 45-55 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 การแยกสารจากรากคนทา ที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัด จันทบุรี

2.7.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน

สิ่งสกัดในเฮกเซนหนัก 35 กรัม นำมาแยกโดยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ ซิลิกาเจล 600 กรัม เป็นตัวดูดซับ การใช้ตัวทำละลายและการเก็บแต่ละส่วน เหมือนหัวข้อ 2.6.1

ตารางที่ 7 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน(ตัวอย่างได้จากจังหวัดจันทบุรี)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| เฮกเซน | | 1-5 | น้ำมันสีขาว |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 19:1 | 6-7 | น้ำมันสีขาว |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 9:1 | 8-11 | น้ำมันสีขาว |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 7:3 | 12-15 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 1:1 | 16-19 | น้ำมันสีเหลืองปนเขียว |
| | | 20-21 | ผลึกรูปเข็มสีขาวใน น้ำมันสีเหลือง |
| | | 22-23 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม |
| | | 24-26 | ผลึกรูปเข็มสีเหลืองใน น้ำมันสีเหลือง |
| | | 27-28 | ของแข็งอสัณฐานสีขาว ในน้ำมันสีเหลือง |
| | | 29-33 | น้ำมันสีเหลือง |
| | | 34-38 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 3:7 | 39-44 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม | | 45-53 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 19:1 | 54-56 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| | | 57-61 | น้ำมันสีน้ำตาลดำ |
| | | 62-64 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 9:1 | 65-67 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 7:3 | 68-69 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| | | 70-71 | ของแข็งอสัณฐานสีขาว ในน้ำมันสีส้ม |
| | | 72-73 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 1:1 | 74-75 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 76-77 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม |
| | | 78-79 | น้ำมันสีเหลือง ปนน้ำตาล |
| | | 80-81 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 3:7 | 82-85 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| เมทานอล | | 86-88 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7.2 การแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม

นำสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม 20 กรัม มาทำการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ ซิลิกาเจล 400 กรัม เป็นตัวดูดซับ การใช้ตัวทำละลาย และการเก็บแต่ละส่วนของการชะคอลัมน์ทำเหมือนหัวข้อ 2.6.1

ตารางที่ 8 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม (ตัวอย่างได้จากจังหวัดจันทบุรี)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 1:1 | 1-2 | น้ำมันสีขาว |
| | | 3-4 | น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน |
| เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม | 7:3 | 5-7 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| คลอโรฟอร์ม | | 8-9 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 19:1 | 10-11 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม |
| | | 12-14 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 15-17 | น้ำมันสีส้ม |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 9:1 | 18-20 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 4:2 | 21-23 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 24-25 | น้ำมันสีเหลือง |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 7:3 | 26-27 | ของแข็งอสัณฐาน สีเหลืองในน้ำมันสีเหลือง |
| | | 28-30 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน |
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 1:1 | 31-33 | น้ำมันสีน้ำตาล |
| | | 34-37 | น้ำมันสีเหลือง |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 (ต่อ)

| ตัวชะ | อัตราส่วนโดยปริมาตร | ขวดลำดับที่ | ลักษณะของสาร |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม:เมทานอล | 3:7 | 35-45 | น้ำมันสีส้ม |
| | | 46-50 | น้ำมันสีส้มอ่อน |
| เมทานอล | | 51-60 | น้ำมันสีส้มอ่อน |

2.8 การวิเคราะห์สิ่งสกัดในชั้นน้ำ

นำสิ่งสกัดในชั้นน้ำหนัก 20.38 กรัม มาทำการวิเคราะห์หาธาตุอนินทรีย์, น้ำตาล และ กรดแอมิโน ดังต่อไปนี้

2.8.1 นำสิ่งสกัดในชั้นน้ำ มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometer พบธาตุ K, Cl, S เป็นส่วนใหญ่ พบ Al, Mg, Na, P, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Br เป็นส่วนน้อย

2.8.2 นำสิ่งสกัดในชั้นน้ำ ไปฟอกจางสีด้วยผงถ่าน ได้สารละลายใสไม่มีสี นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph (คอลัมน์ LC-$NH_2$-Supelco, อัตราการไหล 2 ml/min, เฟสเคลื่อนที่ 75% $CH_3$ ในน้ำ, detector refractive index ) พบน้ำตาล xylose, glucose และ sucrose ดังแสดงในตารางที่ 9 หน้า 33

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบสารละลายมาตรฐานน้ำตาลและสิ่งสกัดในชั้นน้ำ

| สารละลายมาตรฐานน้ำตาล | retention time (นาที) |
|---|---|
| xylose | 2.85 |
| arabinose | 3.19 |
| fructose | 3.42 |
| glucose | 3.61 |
| sucrose | 4.9 |
| maltose | 5.58 |
| lactose | 6.18 |
| สิ่งสกัดในชั้นน้ำ | 2.15 |
| | 2.57 |
| | 2.87 |
| | 3.65 |
| | 4.83 |
| | 5.72 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8.3 นำสิ่งสกัดในชั้นน้ำ ที่ผ่านการพอกจางสีแล้ว ไปวิเคราะห์หากรดแอมิโน ด้วยเครื่อง Amino acid Analyzer (คอลัมน์ Hitachi, Custom Ion-Exchange Resin, เฟสเคลื่อนที่ citrate buffer, อัตราการไหล 0.25 ml/min, อุณหภูมิ injection 34-68 °C) พบกรดแอมิโนพวก aspartic, threonine, serine, glycine, alanine, valine และ proline ผลการเปรียบเทียบดังแสดงไว้ในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์กรดแอมิโนของสิ่งสกัดในชั้นน้ำ

| กรดแอมิโน | ความเข้มข้น (ไมโครโมล/กรัม) |
|---|---|
| aspartic | 10.40 |
| threonine | 14.14 |
| serine | 15.29 |
| proline | 27.45 |
| glycine | 29.30 |
| alanine | 31.66 |
| valine | 38.45 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร

2.9.1 การทำสาร $\underset{\sim}{1}$ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร

สาร $\underset{\sim}{1}$ เป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน ในน้ำมันสีเหลือง ได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (2.5.2, 2.6.1) การชะซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วยเฮกเซน-คลอโรฟอร์ม (3-7) แยกน้ำมันออกจากผลึก ด้วยการคนกับเฮกเซน กรองผลึกแยกออกมา นำมาตกผลึกให้บริสุทธิ์ ในเมทานอลร้อนหลายๆครั้ง จนกระทั่งบริสุทธิ์ ซึ่งตรวจสอบโดยการใช้ ทินแลร์โครมาโทกราฟี จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน หนัก 3 กรัม (6.82 % ของสิ่งสกัดในเฮกเซน) มีจุดหลอมเหลว 102-105 °C มีค่า Rf 0.23 (เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม=1-1) สาร $\underset{\sim}{1}$ ละลายได้เล็กน้อยใน เฮกเซน ละลายได้ดีในเอทิลแอซีเตต, คลอโรฟอร์ม, แอซีโตน ไม่ละลายในเอทานอลและ เมทานอล นำผลึกมาทดสอบปฏิริยา Liebermann-Burchard ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแต่ฟอกจางสีของ $Br_2$ ใน $CCl_4$ และเกิดฟองแก๊สเมื่อทดสอบกับ 5 % $NaHCO_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) (รูปที่ 3) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3080 (C-H), 2980 (C-H), 2800 ($CH_3$-O-aryl), 1670 (-C=O), 1600 และ 1500 (C=C), 1270 และ 1078 (C-O-C)

โปรตอน-1 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 4) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 1.66 (s,3H,-$CH_3$), 1.79 (s,3H,-$CH_3$), 2.36 (s,3H,$C_2$-$CH_3$), 3.33 (d,2H,-$CH_2$-), 3.87 (s,3H,-$OCH_3$), 5.15 (t,1H,-$CH_2$-CH=), 5.99 (s,1H,=CH-C=O), 6.36 (s,1H,CH-aryl) และ 12.76 (-OH)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 5) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 182.89 (C=O), 166.69 ($C_2$), 162.69 ($C_{10}$), 154.67 ($C_6$), 108.24 ($C_9$), 94.67 ($C_7$), และ 55.96 (-$OCH_3$)

อัลตราไวโอเล็ต (นาโนเมตร) (รูปที่ 6) ให้การดูดกลืนที่ $\lambda_{max}$ 297 ($\log \varepsilon = 3.63$) และที่ 330 ($\log \varepsilon = 3.64$)

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 7) พบ $M^+$ ที่ m/e 274 จากการใช้ข้อมูลของแมสสเปกตรัมร่วมกับข้อมูลทาง Elemental analysis(C 69.85%,H 6.68%) ทำให้ทราบว่าสูตรโมเลกุลของสารนี้เป็น $C_{16}H_{18}O_4$ จากสเปกตรัมปรากฏพีคสำคัญที่ 259 (274-$CH_3$), 219 (274-$C_4H_7$), 206 (274-$C_5H_8$), 205 (274-$C_5H_9$), 189

(274-$CH_2O$) และ 177 ( C=O)

2.9.2 การทำสาร 2 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 2 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว ในน้ำมันสีเหลืองปนเขียวได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (2.5.1, 2.6.1) โดยการชะซิลิกาเจลคอลัมน์ด้วย เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม (3-7) คนแยกเอาน้ำมันออกด้วยสารละลายเฮกเซน กรองแยกเอาผลึกออกจากน้ำมันนำผลึกมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกผลึกกับเฮกเซนร้อนหลายๆครั้ง ตรวจสอบโดยใช้ทินแลร์โครมาโทกราฟี มีค่า Rf 0.15 (เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม=3-1) ได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาวหนัก 30 มิลลิกรัม (0.07 % ของสิ่งสกัดในเฮกเซน) จุดหลอมเหลว 128-130 °C ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ละลายได้ดีใน คลอโรฟอร์ม, อีเทอร์, แอซีโตน, เอทิลแอซีเตต, เอทานอล และ เมทานอล ทดสอบกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ ได้สารละลายสีม่วงปนเขียว และฟอกจางสีของ $Br_2$ ใน $CCl_4$

อินฟราเรดสเปกตรัม $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) (รูปที่ 8) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-3200 (O-H), 2950 และ 2880 (C-H), 1650 (C=C), 1470 และ 1390 (C-H), 1065,1030 (C-O), 980 และ 960 (disubstitued vinyl), 840, 805 (trisubstitued vinyl)

โปรตอน-1 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 9) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 0.68-1.06 (m), 1.66-2.30 (m), 3.54 (m,-OH), 5.11 (dd, disubstitued vinyl), และ 5.35 (trisubstitued vinyl)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 10) แสดงสัญญานของคาร์บอนที่ 72.3 ($C_3$-OH), 117.63 ($C_6$), 57.98 ($C_{17}$), 135, 124.6 ($C_{24}$=$C_{25}$)

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 11) พบ $M^+$ ที่ m/e 414, 412 และ 400 (คำนวณสูตรโมเลกุลได้ $C_{29}H_{50}O$, $C_{29}H_{48}O$ และ $C_{28}H_{48}O$) ปรากฏพีคสำคัญที่ 396, 394, 382, 381, 329, 301, 273 และ 255

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี และจากผลการทดสอบ Liebermann-Burchard พอสรุปได้ว่า สาร 2 น่าจะเป็นสารพวกสเตอรอยด์ เพื่อยืนยันให้แน่นอนนำสารไปวิเคราะห์ ด้วยวิธีแกสโครมาโทกราฟี(คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 255 °C, อุณหภูมิ injection 290 °C, FID) โดยทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของสเตอรอยด์ 4 ชนิด คือ chloresterol, campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol (รูปที่ 10)
ผลของการเปรียบเทียบดังแสดงไว้ในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบ retention time ของสาร 2 กับสารมาตรฐานสเตอรอยด์

| สาร | retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค |
|---|---|---|
| chloresterol | 13.4 | |
| campesterol | 17.13 | |
| stigmasterol | 18.2 | |
| β-sitosterol | 20.86 | |
| สาร 2 | 17.14 | 93476 |
| | 18.17 | 612560 |
| | 20.86 | 822393 |

จากผลการเปรียบเทียบ แสดงว่า สาร 2 เป็นของผสมของ campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol

2.9.3 การทำสาร 3 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร

สาร 3 เป็นผลึกรูปอสัณฐานสีเหลืองเข้มในน้ำมันสีเหลือง ได้จากการชะคอลัมน์ของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม (2.6.2) ในอลูมินาคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยเมทานอล นำสาร 3 มาคนแยกเอาน้ำมันออกด้วยคลอโรฟอร์ม ผลึกที่ได้นำมาตกผลึกใหม่หลายๆครั้งให้บริสุทธิ์ ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและแอซีโตน ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟี ได้ผลึกรูปอสัณฐานสีเหลืองอ่อน สลายตัวที่ 230 °C (decompose) ค่า Rf 0.58 (คลอโรฟอร์ม-เอทานอล=3-1) หนัก 80 มิลลิกรัม (0.14 % ของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม) สาร 3 ไม่ละลายในเฮกเซน, เอทิลแอซีเตต, คลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยในเอทานอล ละลายได้ดีในเมทานอล ทดสอบให้ผลบวกกับ $Br_2$ ใน $CCl_4$ ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenyl-hydrazine และทดสอบให้ฟองแก๊สกับ 5% $NaHCO_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 13 ) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3050(C-H), 2960 (C-H), 1660 (C=O), 1620 (C=C), 1385,1370 (gem-dimethyl), และ 820,810,770 ซม. (C-H ของแอโรแมติค)

โปรตอน-1 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 14.) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 1.44 (s,6H,$-CH_3$), 3.83 (s,3H,$-OCH_3$), 5.67 (d,1H,-CH=CH-), 6.37 (s,1H), 6.62 (s,1H), 6.86 (d,1H,-CH=CH-) พีพีเอ็ม

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 15,16 ) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่สำคัญที่ 177.69 (C=O), 165.77 (COOH), 162.47 และ 112.52 (C=C), 160.08, 157.37, 154.62, 112.52, 108.84, 102.44, 96.37 ( คาร์บอนของวงแอโรแมติค), 127.25 และ 115.33 (C=C), 77.84 (C-O), 56.44 ($-OCH_3$), 28.27 (gem-dimethyl)

อัลตราไวโอเล็ต (รูปที่ 17 ) แสดงการดูดกลืนที่ $\lambda_{max}$ 228 265 และ shoulder ที่ 274 นาโนเมตร

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 18.) พบโมเลกุลาร์พีค ($M^+$) ที่ 302 (คำนวณสูตรโมเลกุลได้ $C_{16}H_{14}O_6$) พบพีคการแตกตัวที่สำคัญที่ 287, 258, 243, 217 และ 213

2.8.4 การทำสาร $\underset{\sim}{4}$ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร

สาร $\underset{\sim}{4}$ เป็นผลึกรูปอสัณฐานสีเหลืองในน้ำมันสีเหลือง ได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม(2.6.3) ในซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี จากการชะคอลัมน์ด้วย คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (19:1) คนแยกเอาน้ำมันออกด้วยคลอโรฟอร์ม นำผลึกที่ได้มาตกผลึกใหม่หลายๆครั้ง ให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและแอซีโตน ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนหนัก 45 มิลลิกรัม(0.08 % ของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม) จุดสลายตัว 220 °C(decompose) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟีมีค่า $R_f$ 0.45 (คลอโรฟอร์ม:เมทานอล = 7:3) สาร $\underset{\sim}{4}$ ไม่ละลายใน เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทิลแอซีเตต แอซีโตน ละลายได้เล็กน้อยในเอทานอล ละลายได้ดีในเมทานอล ทำการทดสอบให้ผลบวกกับ $Br_2$ ใน $CCl_4$ ให้ฟองแก๊สกับ 5 % $NaHCO_3$ ให้ผลลบกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine

อินฟราเรดสเปกตรัม $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) (รูปที่ 19) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3400 (O-H), 2980,2920 (C-H), 1620,1590 (C=C), 1480,1465 (C-H), 1390,1380 (gem-dimethyl), 1200,1060 (C-O-C), 810,755 (C-H)

โปรตอน-1 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 20) แสดงสัญญาณของโปรตอนที่ 1.48 (s,-$CH_3$), 3.92 (s,$OCH_3$), 5.65, 6.35 และ 6.88

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 21) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่160.47, 158.98, 154.52, 109.32, 103.32 97.07 (คาร์บอนของวงแอโรแมติค), 127.58 และ 115.42 (C=C), 78.65 (C-$OCH_3$), 56.19 (-$OCH_3$), 28.30 (gem-dimethyl)

อัลตราไวโอเลต $\lambda_{max}$ (นาโนเมตร) (รูปที่ 22) ให้การดูดกลืนที่ 228, 265 และ shoulder ที่ 274

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 23) ไม่สามารถบอก $M^+$ และการแตกตัวของสารในบางส่วนได้ เนื่องจากข้อมูลไม่เพียงพอ

2.9.5 การทำสาร $\underset{\sim}{5}$ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร

สาร $\underset{\sim}{5}$ เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลือง ได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (2.7.1) โดยชะซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยเฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (1:1) นำผลึกมาแยกออกจากน้ำมัน โดยการคนกับเมทานอล กรองแยกผลึกออกมานำผลึกที่ได้ มาตกผลึกใหม่ให้บริสุทธิ์ด้วย แอซีโตนร้อนหลายๆครั้ง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟี มีค่า $R_f$ 0.22 (เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม=4:1) ผลึกที่ได้เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี จุดหลอมเหลว 66-68 $^{\circ}$C หนัก 28 มิลลิกรัม (0.063 % ของสิ่งสกัดในเฮกเซน) สาร $\underset{\sim}{5}$ ละลายได้ดีใน เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอทิลแอซีเตด ไม่ละลายใน แอซีโตน เอทานอล และ เมทานอล ทดสอบให้ผลบวกกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ และสามารถฟอกจางสีของ $Br_2$ ใน $CCl_4$

อินฟราเรดสเปกตรัม $\nu_{max}$ (รูปที่ 24) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3080 (C=C-H), 2920,2850 (C-H), 1730 (-C=O), 1640 (C=C), 1470,1375 (C-H), 720 (C-H)

โปรตอน-1 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม(พีพีเอ็ม) (รูปที่ 25) แสดงสัญญาณของโปรตอนแบบ singlet ที่ 0.90, 0.99, 1.06 และ 1.25 สัญญาณที่ 2.30 (t) ที่ 4.55 (t) และสัญญาณแบบ doublet ที่ 4.67 และ 4.71

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 26) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่สำคัญที่ 173.64 (C=O ของพวกเอสเทอร์) 156.84 และ 105.95 (คาร์บอนของพันธะคู่) 78.42 (คาร์บอนที่ติดกับออกซิเจน) และสัญญาณที่ 52.2 จนถึง 14.12 โดยสัญญาณที่ 29.67 แสดงถึงหมู่เมทิลที่ต่อกันหลายๆหมู่

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 27) ปรากฏไอออนเชิงโมเลกุล ($M^+$) ที่ 664 แสดงการแตกตัวของพีคที่สำคัญที่ m/e 649 , m/e 408 (664-256) และ m/e 256 (664-408)

2.9.6 การทำสาร 6 ให้บริสุทธิ์และตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 6 เป็นผลึกรูปอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองส้ม จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (2.6.1,2.7.1) ได้จากการชะคอลัมน์ด้วย คลอโรฟอร์ม:เมทานอล(3:7) แยกเอาน้ำมันออกโดยกวนกับคลอโรฟอร์ม กรองแยกผลึกออกมา นำผลึกที่ได้มาตกผลึกใหม่ให้บริสุทธิ์ด้วยเอทานอลร้อนหลายๆครั้ง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟี มีค่า Rf 0.06 (คลอโรฟอร์ม:เมทานอล=9:1) ได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาวหนัก 25 มิลลิกรัม (0.057 % ของสิ่งสกัดในเฮกเซน) สลายตัวที่ 250 °C สาร 6 ละลายได้เล็กน้อยใน เอทานอลและเมทานอลร้อน ไม่ละลายในเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, อีเทอร์, เอทิลแอซีเตต ทดสอบกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ให้สารละลายสีม่วงปนเขียว และสามารถฟอกจางสีของ $Br_2$ ใน $CCl_4$

อินฟราเรดสเปกตรัม $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) (รูปที่ 28) ปรากฏพีคสำคัญที่ 3600-3400 (-OH), 2970 และ 2940 (C-H), 1470 และ 1370(C-H), 1080-1030 (C-O), และ 800 (C-H)

โปรตอน-1 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 29) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 0.68-1.2 (m), 1.18-2.83 (m), ปรากฏสัญญาณโปรตอนของน้ำตาลที่ 3.38-3.76, 4.43(1H, d, anomeric proton), 5.36 (โอเลฟินิกโปรตอน)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 30) ปรากฏสัญญาณที่ 140.63 และ 121.68 แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่ติดกันในพันธะคู่ และแสดงสัญญาณคาร์บอนที่ติดกับออกซิเจนอีก 6 ตัวที่ 101.3, 76.3, 75.9, 73.8, 721.2 และ 62.5

การไฮโดรไลส์ สาร 6

นำสาร 6 มา 20 มิลลิกรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายสาร 6 ด้วยเอทานอลร้อน เติม 10 % HCl 1.5 มล. ทำการ reflux บนอ่างน้ำเดือดประมาณ 10 ชั่วโมง นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟีเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ นำมากลั่นไล่ตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน แล้วนำส่วนที่เหลือ มาเติมน้ำกลั่นเทลงในกรวยแยกไล่อีเทอร์ลงไปเพื่อสกัดให้ชั้น aglycone มาอยู่ในชั้นอีเทอร์ จะได้ผลิตภัณฑ์แยกออกเป็น 2 ส่วน คือ ได้ส่วนที่เป็นน้ำตาลในชั้นน้ำ และ ส่วน aglycone ในชั้นอีเทอร์

การวิเคราะห์ ส่วน aglycone

นำส่วน aglycone ในชั้นอีเทอร์มาล้างความเป็นกรดออกด้วย 5 % $NaHCO_3$ และน้ำ ใส่แอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต เพื่อดูดน้ำออกแล้วนำมากลั่นไล่ตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน นำส่วนที่เหลือมาตกผลึกด้วยเฮกเซนร้อนหลายๆครั้ง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟี ได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาวหนัก 10 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 135-137 °C ทดสอบกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ ได้สารละลายสีม่วงปนเขียว แสดงว่าสาร 6 น่าจะเป็นพวกสเตอรอยด์

เพื่อเป็นการยืนยันให้แน่นอน นำส่วน aglycone ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีแกสโครมาโทกราฟี(คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 260 °C อุณหภูมิ injection 290 °C, $N_2$ flow 50 ml/min, FID) โดยทำการเปรียบเทียบสารมาตรฐานของสเตอรอยด์ 4 ชนิด คือ chloresterol, campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol (รูปที่ 29) ผลการเปรียบเทียบดังแสดงไว้ในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบ retention time ของสาร 6 กับสารมาตรฐานสเตอรอยด์

| สาร | retention time (นาที) | พื้นที่ใต้พีค |
|---|---|---|
| chloresterol | 12.36 | |
| campesterol | 15.69 | |
| stigmasterol | 16.83 | |
| β-sitosterol | 19.29 | |
| สาร 6 | 12.16 | 5920 |
| | 17.24 | 19091 |
| | 19.22 | 63405 |

จากผลของการเปรียบเทียบ แสดงให้เห็นว่าสาร 6 เป็นของผสมของสเตอรอยด์พวก chloresterol, stigmasterol, และ β-sitosterol

การวิเคราะห์ส่วนที่เป็นน้ำตาล

ตัดกระดาษกรองกว้าง 2.5 นิ้ว ยาว 18 นิ้ว ขีดเส้นห่างจากขอบด้านบน 2.5 ซม. เป็นเส้นกำหนด แต้มสารละลายน้ำตาลที่ได้ จากการไฮโดรไลส์สาร 6 ห่างจากขอบด้านล่างประมาณ 2 ซม. เปรียบเทียบกับ สารละลายมาตรฐานน้ำตาล ( แรมโนส, กลูโคส, กาแลกโตส, ไซโลส, อะราบิโนส ) ใช้สารละลายที่เตรียมไว้ (n-butanol:benzene:pyridine:$H_2O$=5:1:3:3) เป็นตัวชะนำกระดาษกรองที่แต้มสารเรียบร้อยแล้ว ใส่ลงในกระบอกแก้วทรงสูง ที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาล เทสารละลายที่ใช้เป็นตัวชะลงไป เมื่อสารละลายที่ใช้ในการชะขึ้นถึงขีดเส้นกำหนด นำกระดาษกรองออกมาผึ่งให้แห้ง ใช้สารละลาย Aniline hydrogen phthalate เป็นตัวตรวจวัด พบว่าสารละลายน้ำตาล ที่ได้จากการไฮโดรไลส์สาร 6 มีค่า $R_f$ = 0.58 เท่ากับสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย