# บทที่ 2

## การทดลองและผลการทดลอง

### 2.1 พืชตัวอย่าง

กิ่งมะกา ได้จากป่าในจังหวัดกาญจนบุรี เก็บประมาณเดือนมิถุนายน ปี พ.ศ.2528

### 2.2 เครื่องอุปกรณ์

2.2.1 Fisher Johns Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.2 Infrared Spectrophotometer รุ่น 440 ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น

2.2.3 UV - VIS Spectrophotometer รุ่น 240 ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น

2.2.4 CHNO Analyzer รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.5 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer รุ่น JNM FX-90Q ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น

2.2.6 Double Focusing GC/Mass Spectrometer รุ่น JMS-DX 300/JMA 2000 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น

2.2.7 Computerized Gas Chromatograph รุ่น GC-R1 ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น

2.2.8 High Performance Liquid Chromatograph รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น

2.2.9 Amino Acid Analyzer รุ่น 835-50 ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น

2.2.10 Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometer with Si (Li) Detector Link System รุ่น EDX-200 ของ Link Co.Ltd ประเทศอังกฤษ

2.2.11 เครื่องอบสารในสุญญากาศ ของบริษัท Gallenkamp ประเทศอังกฤษ

2.2.12 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น

## 2.3 สารเคมี

2.3.1 ตัวทำละลาย (Solvent) ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน (hexane), คลอโรฟอร์ม (chloroform), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane), เมทานอล (methanol), เอทิลแอซีเตต (ethyl acetate), แอซีโตน (acetone) ตัวทำละลายที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) นำมากลั่นก่อนใช้ทุกครั้ง สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ทำทีแอลซี (thin-layer chromatography) และตกผลึกใช้เกรดคุณภาพวิเคราะห์ (A.R. Grade)

2.3.2 สารเคมีอื่น ๆ

- ซิลิกาเจล 60 Art 7734 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt ใช้สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

- ซิลิกาเจล 7024-5 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 40 $\mu$m ของบริษัท J.T. Baker สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟีช้า

- ซิลิกาเจล 60G Art 7731 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt ใช้สำหรับทำทีแอลซี (Thin-Layer Chromatography, TLC) และพีทีแอลซี (preparative thin-layer chromatography, PTLC) Art 7730 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt

- ซิลิกาเจล 60 $GF_{254}$ Art 7730 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt สำหรับทำทีแอลซี

## 2.4 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

### 2.4.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 cm ยาว 150 cm อัตราส่วนของตัวดูดซับ (adsorbent) ต่อสารที่ต้องการแยกประมาณ 10: 1 โดยน้ำหนัก

วิธีเตรียมอุดปลายด้านล่างของคอลัมน์ด้วยสำลีหรือใยแก้วที่สะอาดโดยใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ที่ปลายด้านล่าง แล้วบรรจุตัวทำละลายลงไปประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ปล่อยให้ตัวทำละลายไหลออกช้า ๆ ชั่งซิลิกาเจล (หรืออะลูมินา) จำนวนเท่าที่ต้องการใช้ แบ่งมาทีละน้อยผสมกับตัวทำละลายจำนวนหนึ่ง กวนให้เข้ากันจนเป็น slurry แล้วเทลงในคอลัมน์ ดึงแท่งแก้วออกช้า ๆ เคาะคอลัมน์เบา ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลเรียงตัวกันแน่นสม่ำเสมอและไม่มีฟองอากาศ เทซิลิกาเจลผสมตัวทำละลายลงในคอลัมน์เรื่อย ๆจนหมด ปล่อยให้ตัวทำละลายไหลออกไปจนเหลือประมาณ 5 cm เหนือผิวหน้าของซิลิกาเจล ทำผิวหน้าให้เรียบโดยใช้แท่งแก้วเกลี่ยผิวหน้าของซิลิกาเจล รอให้อยู่ตัวนำผลสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วนใส่ลงในคอลัมน์ช้า ๆ โดยไม่ให้มีฟองอากาศเกลี่ยผิวหน้าให้เรียบ ล้างผิวในของคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกับปล่อยให้ระดับของตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจล ทำเช่นนี้จนสารละลายเหนือผิวหน้าของซิลิกาเจลไม่มีสี แล้วจึงใส่ซิลิกาเจลทับลงไปอีกสูงประมาณ 2 cm ตัดกระดาษกรองเป็นวงกลมปกคลุมไว้ เพื่อไม่ให้เกิดการกระทบกระเทือน แล้วจึงชะ(elute) คอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่จะใช้แยกสารต่อไป

### 2.4.2 ทินแลร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography,TLC)

#### 2.4.2.1 วิธีเตรียมภาชนะสำหรับ develop (developing tank)

ใช้ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่นกระจกเคลือบตัวดูดซับได้อย่างสะดวก วางกระดาษกรองให้ทาบผิวด้านในของขวดแก้ว เติมตัวทำละลายในขวดให้สูงประมาณ 1 cm ปิดฝาขวดให้ตัวทำละลายชื้นเปียกกระดาษกรองทั่วทั้งแผ่นเพื่อให้ภายในขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

2.4.2.2 วิธีเตรียมแผ่นกระจกเคลือบตัวดูดซับ ได้ทดลองทำ 2 วิธี คือ

วิธีที่ 1 เตรียมสารละลายที่ใช้เคลือบโดยผสมซิลิกาเจล 60G Art 7731 หรือซิลิกาเจล 60 $GF_{254}$ Art 7730 เป็นตัวดูดซับกับคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:3 ( g /$cm^3$) ลงในขวดปากกว้างที่เตรียมไว้ คนให้เข้ากันเป็นอย่างดี จุ่มแผ่นกระจกที่สะอาดขนาด 5 x 20 $cm^2$ สองแผ่นประกบกันลงในสารละลายที่เตรียมไว้ ยกขึ้นช้าๆ ค่อยๆแยกแผ่นกระจกออกจากกัน ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง เช็ดซิลิกาเจลที่ไม่ต้องการออก แผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลแล้วนี้ จะเรียกว่า แผ่นทีแอลซี (TLC plate)

วิธีที่ 2 ผสมซิลิกาเจล 25 กรัม กับน้ำกลั่น 50 $cm^3$ เขย่าให้เข้ากันจนเป็นslurryเทลงใน desaga spreader ซึ่งปรับให้มีความหนา 0.25 mm ที่วางอยู่บนแผ่นกระจกขนาด 20 x 20 $cm^2$ ที่เช็ดด้วยแอซีโตนจนสะอาดดีแล้วจำนวน 5 แผ่น ลาก spreader จากกระจกแผ่นแรกจนถึงแผ่นสุดท้าย ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที แล้วจึงอบที่อุณหภูมิ 100 – 110°C อีกประมาณ 30-60 นาที

2.4.2.3 การแต้มสาร นำแผ่นทีแอลซีมาขีดระดับสูงสุดที่ต้องการให้ตัวทำละลายขึ้นไปได้ ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน0.5 mm จุ่มลงในสารละลายที่ต้องการทดสอบ แต้มสารนั้นบนแผ่นทีแอลซีที่ระดับเริ่มต้นเป็นจุดกลมเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 2 mm แต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 1 cm ในการแต้มสารต้องพยายามให้หลอดรูเล็ก สัมผัสกับผิวของซิลิกาเจลให้น้อยที่สุด เพราะการสัมผัสมากจะทำให้ผิวแตกเป็นร่องทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ผ่านไม่สม่ำเสมอ หลังจากจุดที่แต้มแห้งสนิทจึงนำไป develop ต่อไป

2.4.2.4 การ Develop นำแผ่นทีแอลซีที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วจุ่มในขวดแก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม และภายในขวดอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายให้จุดของสารอยู่เหนือระดับตัวทำละลาย ปิดฝาขวดแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึงระดับสูงสุดที่ขีดไว้ แล้วจึงนำแผ่นทีแอลซีออกจากขวด ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแผ่นทีแอลซีแห้ง

2.4.2.5 การตรวจหาตำแหน่งของสาร นำแผ่นทีแอลซีที่ผ่านการ develop แล้ว ใส่ลงในขวดแก้วที่บรรจุเกล็ดไอโอดีนไว้ ปิดฝาขวดให้สนิท ทิ้งไว้ให้ไอโอดีนเกิดปฏิกิริยา reversible weak complex กับสารจนปรากฏจุดที่มีสีน้ำตาล ส้มหรือเหลือง บันทึกตำแหน่งของจุดนั้น ๆ เทียบค่า $R_f$ และลักษณะของโครมาโทแกรมที่ได้

2.4.3 ทินแลร์โครมาโทกราฟีแบบเตรียมการ (Preparative thin-layer Chromatography, PTLC)

2.4.3.1 เตรียมแผ่นกระจกเคลือบตัวดูดซับ ผสมซิลิกาเจล 75 กรัมกับน้ำกลั่น 150 $cm^3$ เขย่าให้เข้ากันจนเป็น slurry เทลงใน desaga spreader ที่ปรับความหนาเป็น 0.75 mm ซึ่งวางอยู่บนแผ่นกระจกขนาด 20 x 20 $cm^2$ ที่เช็ดด้วยแอซีโตนจนสะอาดดีแล้ว จำนวน 5 แผ่น ลาก spreader จากกระจกแผ่นแรกจนถึงแผ่นสุดท้าย ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที แล้วจึงอบที่อุณหภูมิ 100 - 110°C อีกประมาณ 60 - 90 นาที แผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลหนา 0.75 mm แล้วนี้จะเรียกว่า แผ่นพีทีแอลซี (PTLC plate)

2.4.3.2 การแต้มสาร นำแผ่นพีทีแอลซีมาขีดระดับสูงสุดที่ต้องการให้ตัวทำละลายขึ้นไปได้ ใช้หลอดรูเล็กขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 mm จุ่มลงในสารละลายที่ต้องการแยก แต้มสารละลายบนแผ่นพีทีแอลซีที่ระดับเริ่มต้น เป็นแนวยาวขนานกับขอบล่างของกระจกให้ความหนาของเส้นไม่เกิน 0.5 cm ในการแต้มสารต้องระวังไม่ให้ผิวของแผ่นพีทีแอลซีแตกเป็นร่อง หลังจากแต้มที่แต้มไว้แห้งสนิทนำไป develop ในขั้นต่อไป

2.4.3.3 การ develop นำแผ่นพีทีแอลซีที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วไป develop ตามวิธีในหัวข้อ2.4.2.4 ในภาชนะที่เตรียมสำหรับdevelop ตามวิธีในหัวข้อ2.4.2.1

2.4.3.4 การตรวจหาตำแหน่งของสาร การตรวจมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับสมบัติของสารนั้นๆ ถ้าสารสามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตได้ ก็ตรวจโดยฉายรังสีอัตราไวโอเลตแล้วลากเส้นเพื่อแยกสารออกจากกันตามแนวดูดกลืน ถ้าสารไม่ดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตก็อาจตรวจโดยพ่น 25% $H_2SO_4$ บนแผ่นพีทีแอลซีเป็นแนวแถบๆบริเวณด้านข้างทั้งสองด้านโดยปิดตรงกลางไว้ ทิ้งไว้ให้แห้ง อบที่ 105°C เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงจะปรากฏแถบของสารอย่างเห็นได้ชัดลากเส้นระหว่างแถบทั้งสองด้านเพื่อแยกสารออกจากกัน ขูดส่วนที่พ่นด้วย 25% $H_2SO_4$ ออกให้หมดให้เหลือเฉพาะบริเวณที่ไม่ถูกกรดซึ่งปรากฏเป็นแถบแสดงการแยกตัวของสาร

2.4.3.5 การสกัดสาร ขูดซิลิกาเจลแต่ละแถบไว้ในขวดรูปกรวยแต่ละขวด นำแต่ละขวดไปสกัดสารออกด้วยเครื่องสกัดซอกซ์เลต (Soxhlet extractor) โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมจนกระทั่งสกัดสารออกได้หมด นำสารละลายที่ได้ไประเหยให้แห้งแล้วตกผลึกด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ถ้าผลึกที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ก็ต้องนำไปแยกวิธีนี้ซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้งจนได้สารบริสุทธิ์

2.4.4 เปเปอร์โครมาโทกราฟี (19) (Paper Chromatography)

ตัดกระดาษกรองสำหรับทำเปเปอร์โครมาโทกราฟี (Whatman No1)ให้ได้ขนาด 6.5 x 30 $cm^2$ ใช้ดินสอทำเครื่องหมายสำหรับแต้มสาร 2 จุด โดยให้ห่างจากขอบบนของกระดาษประมาณ 5 cm และห่างจากขอบด้านข้าง 2 cm ใช้หลอดรูเล็กแต้มสารละลายที่ต้องการทดสอบลงบนจุดหนึ่ง อีกจุดหนึ่งแต้มสารละลายมาตรฐานของน้ำตาล (ซึ่งเป็นของผสมระหว่างกลูโคส, กาแลกโทส, อะราบิโนส, ไซโลสและแรมโนสอย่างละ 0.5% ใน 10% 2-โพรพานอลในน้ำ) เมื่อจุดที่แต้มสารแห้งสนิทแล้ว จึงนำกระดาษกรองไป develop ในภาชนะที่เป็นแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 cmยาว 44 cm ให้สารและตัวทำละลายเคลื่อนที่ลง (descending method) ตัวทำละลายที่ใช้ develop คือตัวทำละลายผสมระหว่าง 1-บิวทานอล, เบนซีน, พิริดีน และ น้ำในอัตราส่วน 5:1:3:3 โดยปริมาตร (ใช้ชั้นบนของตัวทำละลาย)เป็นเวลา 20 ชั่วโมง แล้วจึงนำกระดาษกรองมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จุ่มกระดาษกรองนี้ ลงในสารละลายที่มีแอนิลีน 9.2 $cm^3$ กรดพทาลิก 16.0 กรัม ละลายใน 1-บิวทานอล 490 $cm^3$ อีเทอร์490 $cm^3$ และน้ำ 20 $cm^3$

ปล่อยให้กระดาษกรองแห้งอบที่อุณหภูมิประมาณ 105°C เป็นเวลา 5นาที จุดที่มีกาแลกโทส และกลูโคส จะเป็นสีน้ำตาล อะราบิโนสและไซโลสเป็นสีแดงแรมโนสเป็นสีเหลือง-น้ำตาล

2.4.5 การกลั่น

การกลั่น ใช้ในการแยกตัวทำละลายที่มากเกินพอออกจากสารละลายที่ได้จากการชะคอลัมน์ และเพื่อทำให้ตัวทำละลายต่างๆที่นำมาใช้ในการทดลองบริสุทธิ์การกลั่นมี 2 แบบคือ

2.4.5.1 การกลั่นแบบธรรมดา ใช้กับตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม

2.4.5.2 การกลั่นแบบลดความดัน ใช้กับตัวทำละลายที่มีขั้วและที่มีจุดเดือดสูงเช่น เมทานอล น้ำ เป็นต้น เพื่อให้ตัวทำละลายเดือดก่อนถึงจุดเดือดที่แท้จริงและช่วยป้องกันการสลายตัวของสารที่สกัดได้ เครื่องมือที่ใช้เรียกว่า เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015976

2.5 <u>การสกัด</u> (Extraction)

การสกัดได้ทดลองทำ 2 วิธี ดังนี้

2.5.1 <u>การสกัดด้วยเอทานอล</u> (ดังแสดงในแผนภาพที่1)

นำกิ่งมะกาตากแห้งบดละเอียดหนัก 60 กิโลกรัม แช่ในเอทานอลประมาณ 3 วัน กรอง นำสารละลายที่ได้มากลั่นแยกเอาเอทานอลออกโดยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน นำเอทานอลที่กลั่นได้นี้กลับไปแช่ครั้งต่อๆไปอีก ทำซ้ำเช่นนี้ 4-5 ครั้ง จนสารละลายไม่มีสี จะได้ผลสกัดของเอทานอลเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำหนักประมาณ 1.5 กิโลกรัม

2.5.1.1 การสกัดด้วยเฮกเซน นำผลสกัดของเอทานอล 1.5 กิโลกรัม มาสกัดด้วยเฮกเซนประมาณ 1 ลิตรโดยการกวน แล้วตั้งทิ้งไว้เพื่อให้แยกชั้น รินสารละลายชั้นบนออก กรอง นำสารละลายที่ได้มากลั่นแยกเฮกเซนออก นำเฮกเซนที่กลั่นได้ไปสกัดซ้ำอีก จนสารละลายที่สกัดได้ไม่มีสี จะได้ผลสกัดของเฮกเซนเป็นของเหลวข้นสีเขียวอมดำหนักประมาณ 270 กรัม คิดเป็น 0.45% ของกิ่งมะกาแห้ง

2.5.1.2 การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม นำผลสกัดของเอทานอลที่เหลือหลังจากสกัดด้วยเฮกเซนแล้วหนัก 1.1 กิโลกรัม มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มประมาณ 1 ลิตรโดยการกวน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ใช้กรวยแยกเพื่อแยกสารละลายชั้นล่าง ซึ่งเป็นชั้นคลอโรฟอร์มออก กรอง นำสารละลายที่ได้มากลั่นแยกคลอโรฟอร์มออก นำคลอโรฟอร์มที่กลั่นได้ไปสกัดซ้ำอีก จะได้ผลสกัดของคลอโรฟอร์มเป็นของเหลวหนืดสีเขียวอมดำ หนักประมาณ 50 กรัม คิดเป็น 0.08% ของกิ่งมะกาแห้ง

2.5.1.3 การสกัดด้วย1-บิวทานอล นำผลสกัดของเอทานอลที่เหลือหลังจากสกัดด้วยคลอโรฟอร์มแล้วหนัก 1 กิโลกรัมมาสกัดด้วย 1-บิวทานอลโดยการกวนตั้งทิ้งไว้เพื่อให้แยกชั้น รินสารละลายชั้นบนออก กรอง นำสารละลายที่ได้มากลั่นแยก 1-บิวทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน นำ 1-บิวทานอลที่กลั่นได้ไปสกัดซ้ำอีกจนสารละลายไม่มีสี จะได้ผลสกัดของ1-บิวทานอลเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาล-ดำ หนักประมาณ 50 กรัม คิดเป็น 0.08% ของกิ่งมะกาแห้ง เหลือผลสกัดของเอทานอลประมาณ900 กรัม คิดเป็น 1.5% ของกิ่งมะกาแห้ง แล้วนำผลสกัดของเอทานอลมาสกัดต่อด้วยน้ำได้ผลสกัดของน้ำเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำหนักประมาณ 50 กรัม คิดเป็น 0.08% ของกิ่งมะกาแห้ง

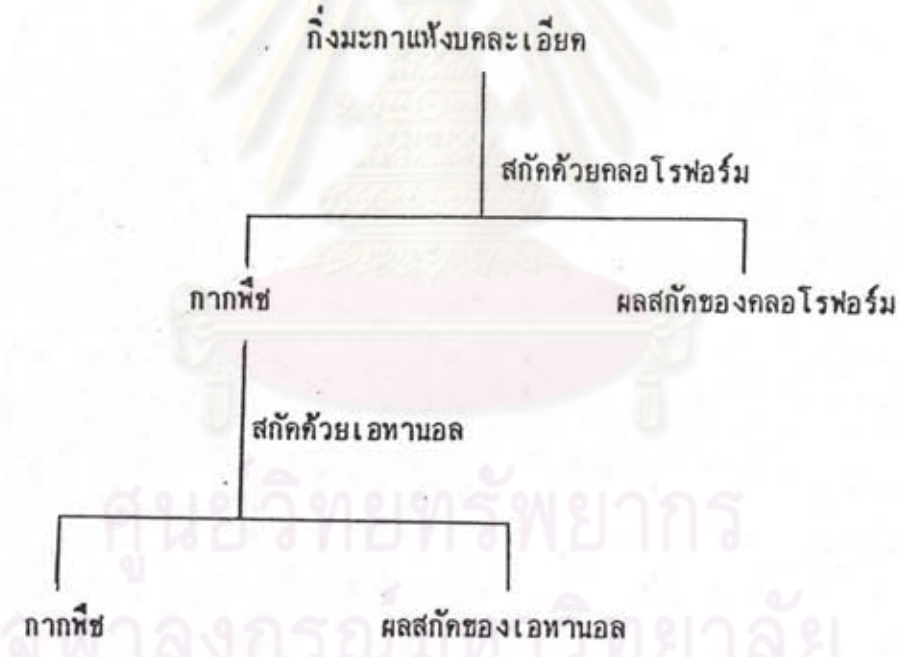
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 1 แสดงการสกัดกิ่งมะกาด้วยเอทานอล

2.5.2 <u>การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม</u> (ดังแสดงในแผนภาพที่ 2)

เนื่องจากผลสกัดของเฮกเซนและผลสกัดของคลอโรฟอร์มจากการสกัดในหัวข้อ 2.5.1 เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยทีแอลซีแล้วพบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกัน ดังนั้นจึงสกัดกิ่งมะกาด้วยคลอโรฟอร์มโดยตรง ไม่ต้องสกัดตามขั้นตอนดังในหัวข้อ2.5.1

นำกิ่งมะกาแห้งบดละเอียดหนัก 40 กิโลกรัม มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยแช่กิ่งมะกาในคลอโรฟอร์มนาน 3 วัน กรอง นำสารละลายที่ได้มากลั่นแยกคลอโรฟอร์มออก นำคลอโรฟอร์มที่กลั่นได้ไปใช้สกัดครั้งต่อ ๆ ไป ทำเช่นนี้ 4 – 5 ครั้ง จนสารละลายไม่มีสีจะได้ผลสกัดของคลอโรฟอร์ม เป็นของเหลวหนืดสีเขียวอมดำหนักประมาณ240 กรัม คิดเป็น 0.6% ของกิ่งมะกาแห้ง




<u>แผนภาพที่ 2</u> แสดงการสกัดกิ่งมะกาด้วยคลอโรฟอร์ม

2.6 <u>การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทของสารเคมี</u> (20,21) (ดูรายละเอียดการเตรียมรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบในภาคผนวก ก. หน้า 210 )

นำกิ่งมะกาแห้งบดละเอียด 100 กรัมใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 500 $cm^3$ เติม80% เมทานอลลงไปในขวดรูปกรวยให้ท่วมกิ่งมะกา นำมารีฟลักซ์บนเครื่องอังน้ำเป็นเวลา1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น กรอง นำสารละลายที่กรองได้ไปกลั่นลดความดันโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน จนได้สารข้นเหนียวสีน้ำตาลดำจำนวน 50 $cm^3$ เรียกสารที่สกัดได้นี้ว่า ผลสกัดของเมทานอล (methanolic extract) ซึ่งจะใช้สำหรับการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์ 5 ประเภท คือ แอลคาลอยด์ คาร์ดินอกไกลโคไซด์ เฟลโวนอยด์ ซาโปนิน และคูมาริน ซึ่งจะทดสอบตามลำดับดังนี้

2.6.1 <u>การทดสอบหาแอลคาลอยด์</u> (Alkaloid)

<u>ขั้นที่ 1</u> การทดสอบแอลคาลอยด์เบื้องต้น (Preliminary alkaloid test)

นำผลสกัดของเมทานอลมา 25 $cm^3$ (เทียบเท่าพืชแห้ง 50 กรัม)ใส่ในชามกระเบื้องแล้วระเหยบนเครื่องอังน้ำจนข้นเหนียว เติม 2 M.HCl ประมาณ 15$cm^3$ ต้มและกวนเป็นเวลา 10 นาที กรอง แบ่งสารละลายรินลงในหลอดทดลอง 6 หลอด ๆ ละ 1 $cm^3$ (สารละลายที่เหลืออีก 10 $cm^3$ เก็บไว้ทดสอบขั้นที่ 2) นำไปทดสอบกับรีเอเจนต์ต่อไปนี้ คือ Mayer's, Valser's, Wagner's, Dragendorff's, Kraut's and Marme's reagent สังเกตสีและปริมาณของตะกอน

<u>ขั้นที่ 2</u> การทดสอบแอลคาลอยด์เพื่อยืนยัน (Confirmed alkaloid test)

นำสารละลายที่เหลือจากขั้นที่ 1 มาทำให้เป็นเบสด้วย $NH_4OH$ รินสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยก สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง ครั้งละ 10 $cm^3$ นำชั้นคลอโรฟอร์มทั้ง 2 ครั้ง มารวมกันแล้วระเหยให้งวดบนเครื่องอังน้ำ เติม 2M.HCl 3$cm^3$ ต้มและกวนเป็นเวลา 5 นาที กรองแบ่งสารละลายเป็น 6 หลอด ๆ ละเท่า ๆ กันเพื่อทดสอบกับรีเอเจนต์ 6 ชนิดเช่นเดียวกับขั้นที่ 1 ส่วนชั้นน้ำแยกไว้ทดสอบขั้นที่ 3 ต่อไป

ขั้นที่ 3 การทดสอบแอลคาลอยด์ประเภท Quaternary และ/หรือ Amine Oxide Base

นำสารละลายที่เป็นชั้นน้ำในขั้นที่ 2 มาทำให้เป็นกรดด้วย 2 M.HCl กรอง แบ่งสารละลายเป็น 6 หลอด หลอดละเท่า ๆ กัน เพื่อทดสอบกับรีเอเจนต์ทั้ง 6 ชนิด เช่นเดียวกับขั้นที่ 1 และขั้นที่ 2

ผลการทดสอบแอลคาลอยด์ในกิ่งมะกาแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแอลคาลอยด์

| Reagent | Preliminary Test | Confirmed Test | Quaternary Test |
|---|---|---|---|
| Mayer's | + | + | – |
| Valser's | + + | + + | – |
| Wagner's | – | – | – |
| Dragendorff's | + | + | – |
| Kraut's | + + | + + | + + |
| Marme's | – | + | – |

หมายเหตุ + + + ตะกอนมาก
+ + ตะกอนน้อย
+ ขุ่น
– ไม่มีตะกอนเลย

2.6.2 การทดสอบหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycoside)

นำผลสกัดของเมทานอล 5 $cm^3$ เติม 10% เลดแอซีเตต 40 $cm^3$ ต้มให้เดือดเบา ๆ 15 นาที ทำให้เย็นแล้วกรอง สกัดสารละลายที่กรองได้ด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ครั้งละ 20 $cm^3$ รวมชั้นคลอโรฟอร์มทั้ง 3 ครั้ง ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anh. $Na_2SO_4$ กรอง

นำสารละลายที่ได้ไประเหยจนเหลือประมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรเดิม ทำให้เย็น แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด เพื่อนำไปทดสอบหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ดังนี้

2.6.2.1 การทดสอบส่วนที่เป็นสเตอรอยด์นิวเคลียส(Liebermann-Burchard reaction) นำสารละลายคลอโรฟอร์มในหลอดที่ 1 มาระเหยจนเกือบแห้ง ทำให้เย็น หยดแอซีติกแอนไฮไดรด์ลงไป 3 หยด เขย่าแล้วค่อยๆหยด conc. $H_2SO_4$ ให้ไหลไปตามข้างหลอด 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นทันทีและภายใน 1 ชั่วโมง สีจะเปลี่ยนจาก ชมพู —> ม่วง —> น้ำเงิน —> เขียว

2.6.2.2 การทดสอบส่วนที่เป็น $\alpha,\beta$ - unsaturated lactone (Kedde's reaction) ระเหยสารละลายคลอโรฟอร์มในหลอดที่ 2 จนเกือบแห้ง หยด Kedde's reagent ลงไป 10 $cm^3$ และ 1 M. NaOH 2-3 หยด จะได้สีน้ำเงินหรือม่วงอมชมพู

2.6.2.3 การทดสอบส่วนที่เป็นน้ำตาลดีออกซี (Keller-Kiliani reaction) เติม 5% $FeCl_3$ 3 $cm^3$ ลงในสารละลายหลอดที่ 3 เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลองแล้วค่อย ๆ ริน conc. $H_2SO_4$ ให้ไหลไปตามข้างหลอดจะเกิดวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นและสารละลายชั้นบนเป็นสีเขียวอ่อน

การทดสอบต้องได้ผลบวก (positive test) ทั้งสามปฏิกิริยาจึงจะถือว่ามีคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ผลการทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์แสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

| ปฏิกิริยา | ผลที่สังเกตเห็น |
|---|---|
| การทดสอบสเตอรอยด์ | สารละลายสีเขียวอมน้ำตาล |
| การทดสอบแลกโทนไม่อิ่มตัวที่แอลฟา - บีตา | สารละลายสีเหลือง |
| การทดสอบน้ำตาลดีออกซี | สารละลายชั้นบนสีเขียวอ่อน เกิดวงแหวนสีน้ำตาลตำตรงรอยต่อระหว่างชั้น |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6.3 การทดสอบหาเฟลโวนอยด์ (Flavonoid)

นำผลสกัดของเมทานอล 2.5 $cm^3$ สกัดด้วยเฮกเซนหลาย ๆ ครั้งจนสารละลายใสไม่มีสี นำของแข็งที่เหลือมาละลายในเมทานอล 10 $cm^3$ แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดที่ 1 เป็นหลอดควบคุม (blank control) นำหลอดที่ 2 และ 3 มาทดสอบ ดังนี้

Cyanidin Test นำหลอดที่ 2 มาเติม conc.HCl 0.5 $cm^3$ เติมแมกนีเซียม 1 – 2 แผ่น สังเกตการเปลี่ยนสี ถ้ามี flavone จะให้สีส้มถึงแดง flavonol ให้สีแดงถึงแดงเลือดนก flavonone ให้สีแดงเลือดนกถึงม่วงแดง แต่ chalcone และ aurone ไม่ให้สีกับวิธีทดสอบนี้ เติมน้ำ 2 $cm^3$ และ 1-ออกทานอล 1 $cm^3$ เขย่าแรง ๆ ทิ้งไว้ให้แยกชั้น สังเกตสีในชั้น 1-ออกทานอลและชั้นน้ำ ถ้ามีเฟลโวนอยด์อิสระจะให้สีในชั้น 1-ออกทานอลซึ่งอยู่ชั้นบน แต่ถ้าเป็นไกลโคไซด์ของเฟลโวนอยด์จะให้สีในชั้นน้ำซึ่งอยู่ชั้นล่าง

Leucoanthocyanin Test นำหลอดที่ 3 มาเติม conc.HCl 0.5 $cm^3$ อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที สังเกตสี ถ้ามีเฟลโวนอยด์จะให้สีม่วงแดง

ผลการทดสอบหาเฟลโวนอยด์ แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาเฟลโวนอยด์

| ปฏิกิริยา | ผลที่สังเกตเห็น |
|---|---|
| Cyanidin Test | ชั้น 1-ออกทานอล สีน้ำตาลอ่อน<br>ชั้นน้ำ สีน้ำตาลอ่อนเช่นกัน |
| Leucoanthocyanin Test | สารละลายสีส้มแดง |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.6.4 การทดสอบหาซาโปนิน (Saponin)

2.6.4.1 การทดสอบฟอง นำกิ่งมะกาแห้งที่บดละเอียด 0.1 กรัมใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5 $cm^3$ แล้วต้มบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรอง ขณะร้อนปล่อยให้เย็น เขย่าสารละลายที่ใสอย่างแรงนาน 1 นาที สังเกตผลนาน 20 นาที เติม dil.$H_2SO_4$ 1 $cm^3$ ต้ม 5 นาที ปล่อยให้เย็น เขย่าแรง ๆ 1 นาที บันทึกผล

2.6.4.2 การทดสอบสี นำผลสกัดของเมทานอลมา 5 $cm^3$ เติม dil.$H_2SO_4$ 10 $cm^3$ เขย่า ต้มประมาณ 15 นาที ปล่อยให้เย็น สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 15 $cm^3$ แยกชั้นคลอโรฟอร์ม มาเติม anh. $Na_2SO_4$ เล็กน้อย กรอง ระเหยให้งวดปล่อยให้เย็นแล้วเติมแอซีติกแอนไฮไดรด์ 3 หยด เขย่า ค่อย ๆ หยด conc. $H_2SO_4$ 1หยด ให้ไหลไปตามข้าง ๆ หลอด สังเกตสีที่เปลี่ยนทันที และสังเกตจนครบ 1 ชั่วโมง ถ้ามีสเตอรอยด์ซาโปเจนินจะให้สีน้ำเงินหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน ถ้ามีไตรเทอร์พีนอยด์ซาโปเจนินจะให้สีแดง ชมพูหรือม่วง ผลการทดสอบซาโปนิน แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาซาโปนิน

| ปฏิกิริยา | ผลที่สังเกตเห็น |
|---|---|
| การทดสอบฟอง | ไม่มีฟองเกิดขึ้น |
| การทดสอบสี | สารละลายสีม่วงแดง |

2.6.5 การทดสอบหาสารจำพวกคูมาริน (Coumarin)

นำกิ่งมะกาแห้งที่บดละเอียด 3 กรัม ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 50 $cm^3$ ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่นคลุมปากขวดรูปกรวยด้วยกระดาษกรองวงกลม ซึ่งทำให้ชื้นด้วย 1 M. NaOH คลุมปากขวดให้มั่นคงอีกชั้นหนึ่ง ด้วยอลูมิเนียมแผ่นบาง นำขวดรูปกรวยไปตั้งบนเครื่องอังน้ำเป็นเวลา 20 นาที

นำกระดาษกรองไปวางใต้รังสีอัลตราไวโอเลต สังเกตการเรืองแสงเป็นวงกลมที่เกิดขึ้น เมื่อฉายรังสีอัลตราไวโอเลตนานประมาณ 10 นาที

ผลการทดสอบคูมาริน พบว่ากระดาษกรองไม่เรืองแสง

2.6.6 <u>การทดสอบหาสารจำพวกแทนนิน</u> (Tannin)

นำกิ่งมะกาแห้งที่บดละเอียด 5 กรัมมาเติม 5% เมทานอล 50 $cm^3$ รีฟลักซ์บนเครื่องอังน้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรอง นำสารละลายที่ได้มาระเหยให้แห้งสนิท ละลายผลสกัดแห้งด้วยน้ำกลั่น 50 $cm^3$ ใช้ความร้อนช่วยด้วย กรองผ่านกรวยบุคเนอร์ด้วยวิธีกรองดูด ถ้าต้องการให้ผลสกัดใสควรเติม 10% NaCl 4 – 5 หยด เพื่อ salting out สารประกอบอื่นที่ไม่ใช่แทนนิน กรองถ้าขุ่น แบ่งใส่หลอดทดลอง 8 หลอด เพื่อตรวจหาแทนนินและพอลีฟีนอล

หลอดที่ 1 : เป็นหลอดควบคุม สำหรับเปรียบเทียบสีและตะกอน

หลอดที่ 2 : เติมสารละลายเจลาติน 2–3 หยด สังเกตตะกอนขุ่นขาวที่เกิดขึ้น

หลอดที่ 3 : เติมสารละลายผสมเจลาตินกับเกลือ 2–3 หยด สังเกตตะกอนขุ่นขาวที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับหลอดที่ 2

หลอดที่ 4 : เติม 1% $FeCl_3$ 2–3 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีและตะกอนที่เกิดขึ้น

หลอดที่ 5 : เติมน้ำโบรมีน 5–6 หยด สังเกตตะกอนสีเนื้อที่เกิดขึ้น

หลอดที่ 6 : ทดสอบ formalin-HCl โดยการเติม 40% formalin 3 หยด และ 10% HCl 6 หยด ต้มบนเครื่องอังน้ำ 1–2 นาที สังเกตตะกอนสีแดงของ phlobaphene ที่เกิดขึ้น ตะกอนนี้ไม่ละลายในน้ำร้อน แอลกอฮอล์หรือ 5% KOH

หลอดที่ 7 : ทดสอบ vanillin-HCl โดยรินสารละลายจากหลอดที่ 7 ลงในชามกระเบื้องระเหยให้แห้งบนเครื่องอังน้ำ เติม vanillin reagent 1 $cm^3$ และ conc.HCl 1 หยด สังเกตผล ถ้าได้สีแดงเลือดนกแสดงว่ามี phloroglucinol nucleus

หลอดที่ 8 : เติมน้ำปูนใส 5 $cm^3$ สังเกตตะกอน ถ้ามีสีเหลืองน้ำเงินเทา (blue – grey color) แสดงว่ามี gallonucleus

ผลการทดสอบแทนนิน แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแทนนิน

| รีเอเจนต์ | ผลที่สังเกตเห็น |
|---|---|
| หลอดควบคุม | สารละลายสีน้ำตาลอ่อน |
| เจลาติน | ตะกอนเบา สีน้ำตาลอ่อน |
| เจลาตินกับเกลือ | ตะกอนเบา สีน้ำตาลอ่อน |
| 1% $FeCl_3$ | ตะกอนสีน้ำเงินดำ |
| น้ำโบรมีน | ตะกอนสีน้ำตาลอ่อน |
| formalin - HCl | ตะกอนสีน้ำตาล |
| vanillin - HCl | สารละลายสีแดงสด |
| น้ำปูนใส | ตะกอนสีน้ำตาล |

2.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioassay Experiment) (ดูรายละเอียดวิธีการทดสอบในภาคผนวก ข.หน้า 213 )

2.7.1 การศึกษาความสามารถในการต่อต้านการกินของด้วงงวงฝ้าย (Boll Weevil Antifeedant Studies)

ผลการทดสอบความสามารถในการต่อต้านการกินของด้วงงวงฝ้าย แสดงในตารางที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ต่อต้านการกินของด้วงงวงฝ้าย ของผลสกัดของตัวทำละลายต่าง ๆ

| ตัวทำละลายที่ใช้สกัด | น้ำหนัก (มิลลิกรัม) | ฤทธิ์ต่อต้านการกินของด้วงงวงฝ้าย % T/C | Boll Weevil % การยับยั้ง |
|---|---|---|---|
| เฮกเซน | 10 | 81 | 19 |
| | 20 | 76 | 24 |
| | 30 | 66 | 34 |
| คลอโรฟอร์ม | 10 | 71 | 29 |
| | 20 | 65 | 35 |
| | 30 | 60 | 40 |
| เอทานอล | 10 | 20 | 80 |
| | 20 | 19 | 81 |
| | 30 | 0 | 100 |
| น้ำ | 10 | 41 | 59 |
| | 20 | 29 | 71 |
| | 30 | 22 | 78 |

หมายเหตุ % T/C = $\frac{\text{จำนวนรูบนกระดาษที่มีสารทดสอบ}}{\text{จำนวนรูบนกระดาษควบคุม}} \times 100$

ถ้า % T/C เท่ากับ 0 แสดงว่ามีความสามารถในการต่อต้านทั้งหมด

ถ้า % T/C มากกว่า 0 แสดงว่ามีความสามารถในการเลี้ยงด้วงงวงฝ้าย

% การยับยั้ง ( % inhibition ) = 100 - % T/C

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 2.7.2 การศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย

(Antifungal and Antibacterial Studies)

ผลการทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบฤทธิ์การต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรียของผลสกัดของตัวทำละลายต่าง ๆ

| ตัวทำละลายที่ใช้สกัด | ฤทธิ์ต่อต้านเชื้อรา | | | ฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย Xc |
|---|---|---|---|---|
| | P | R | H | |
| น้ำ | - | - | - | 45 % |
| เอทานอล | - | - | - | 37 % |
| คลอโรฟอร์ม | - | - | - | 91 % |
| เฮกเซน | - | - | - | - |

เชื้อรา P = Pythium ultimum

R = Rhizoctonia solani

H = Helminthosporium teres

เชื้อแบคทีเรีย Xc = Xanthramonas campestrous

หมายเหตุ ความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียจะรายงานในรูป % T/C

$$\% \text{ T/C} = \frac{\text{รัศมีของโซนที่มีการยับยั้งเนื่องจากสารทดสอบ (mm)}}{\text{รัศมีของโซนที่มีการยับยั้งเนื่องจากตัวควบคุม (mm)}} \times 100$$

ถ้า % T/C เท่ากับ 100 แสดงว่า สามารถต่อต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียได้ดี

ถ้า % T/C เท่ากับ 0 แสดงว่า ไม่สามารถต่อต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย

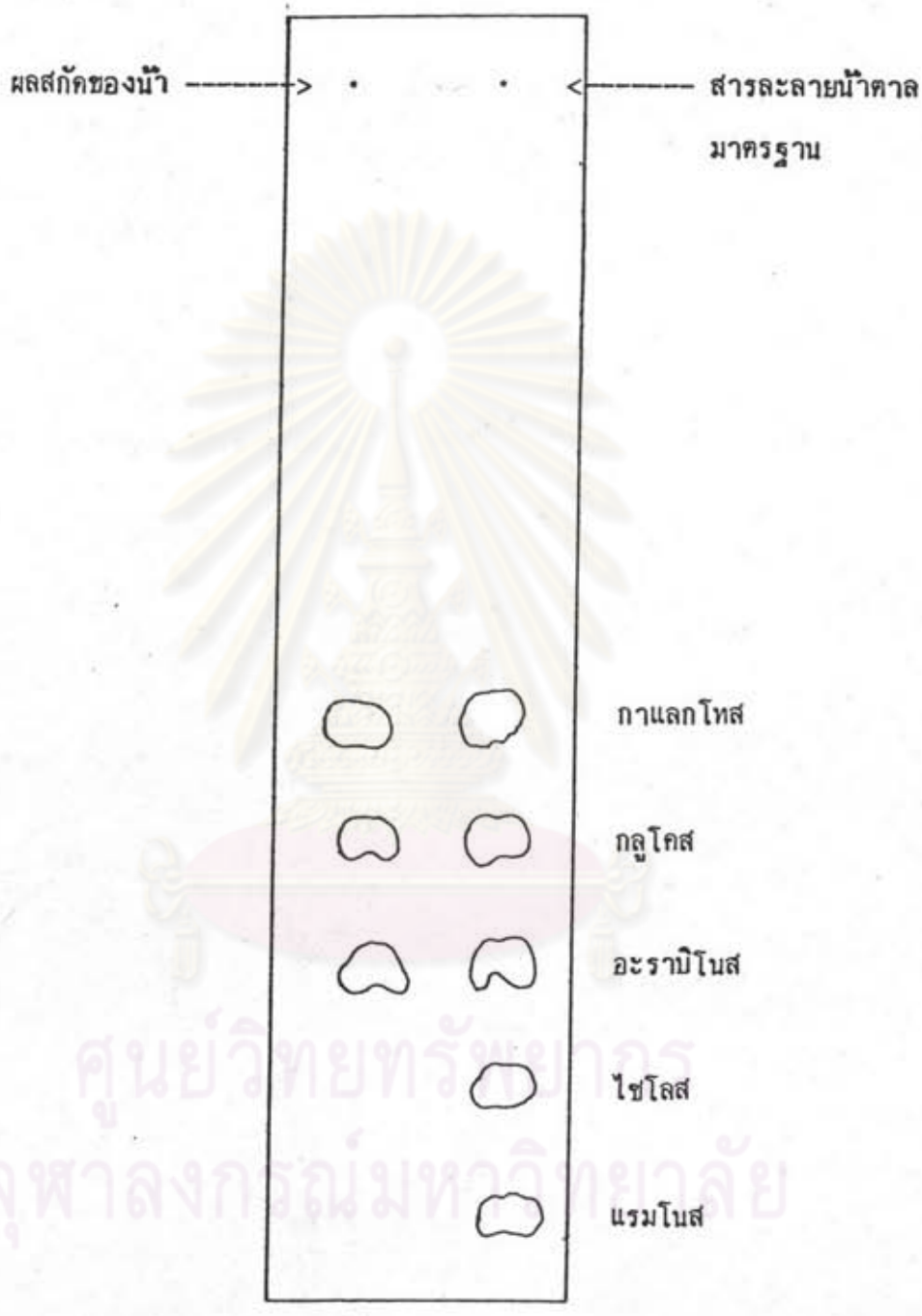
2.8 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาชนิดของน้ำตาล (22) (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค. หน้า 215 )

ผลการทดสอบเพื่อหาชนิดของน้ำตาลแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลในผลสกัดของน้ำ

| ปฏิกิริยา | ผลที่สังเกตเห็น | สรุป |
|---|---|---|
| Molisch's Test | สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนสีน้ำตาล ชั้นล่างสีม่วงอมเขียว รอยต่อเป็นวงแหวนมีสีม่วง | เป็นน้ำตาล หรือคาร์โบไฮเดรต |
| Selivanoff's Test | สารละลายสีแดง | เป็นน้ำตาล ketose |
| Aniline Acetate Test | สารละลายสีน้ำตาลอมส้ม | ไม่เป็นน้ำตาลเพน - โทส |
| Tollens' Test | ได้แผ่นเงินฉาบข้างหลอด (silver mirror) | เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ หรือไดแซ็กคาไรด์ ประเภทรีดิวซ์ |
| Benedict's Test | ตะกอนสีแดงอิฐ | เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ หรือไดแซ็กคาไรด์ |
| Barfoed's Test | ตะกอนสีแดงอิฐ เกิดในเวลาใกล้เคียงกับกลูโคส | เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ |
| Osazone Formation | ผลึกสีเหลือง สลายตัวที่ 205-208 °C ตรงกับ Glucosazone เมื่อหาจุดหลอมเหลวผสมพบว่าคงเดิม และเมื่อทำทีแอลซีเปรียบเทียบกัน พบว่ามี $R_f$ เท่ากันคือ 0.46 (ซิลิกาเจล / เมทานอล) | อาจเป็นกลูโคส |

เมื่อนำผลสกัดของน้ำไปทำเปเปอร์โครมาโทกราฟี ตามวิธีในหัวข้อ 2.4.3 ผลที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1 ดังนี้




รูปที่ 1 เปเปอร์โครมาโทแกรมของผลสกัดของน้ำเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

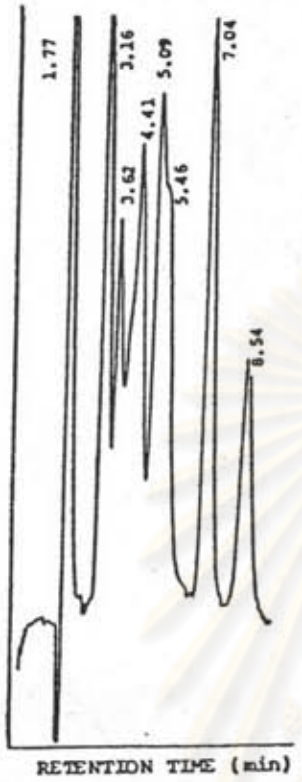
นำผลสกัดของน้ำไปบันทึก retention time ด้วยเครื่องเอชพีแอลซี (high performance liquid chromatography , HPLC) เทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 2, 3 และตารางที่ 12, 13 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 Retention time ของน้ำตาลมาตรฐาน

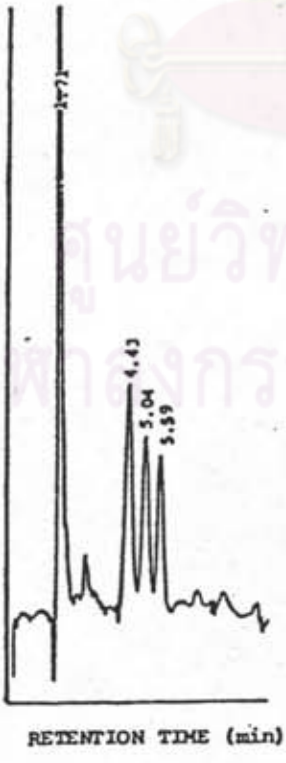
| Retention time | น้ำตาลมาตรฐาน |
|---|---|
| 3.16 | แรมโนส |
| 3.62 | ไซโลส |
| 4.41 | อะราบิโนส |
| 5.09 | กลูโคส |
| 5.46 | กาแลกโทส |
| 7.04 | ซูโครส |
| 8.54 | มอลโทส |

ตารางที่ 13 Retention time ของผลสกัดของน้ำ

| Retention time | น้ำตาล | ปริมาณ % |
|---|---|---|
| 4.43 | อะราบิโนส | 43.43 |
| 5.04 | กลูโคส | 32.96 |
| 5.59 | กาแลกโทส | 23.61 |




รูปที่ 2 เอชพีแอลซีโครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาล มาตรฐาน




รูปที่ 3 เอชพีแอลซีโครมาโทแกรมของผลสกัดของน้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9 การวิเคราะห์หาธาตุในผลสกัดของน้ำ

นำผลสกัดของน้ำมาวิเคราะห์หาธาตุด้วยเครื่อง X - ray fluorescent spectrometer ผลการวิเคราะห์พบธาตุ โพแทสเซียม และคลอรีน

2.10 การวิเคราะห์หากรดแอมิโนในผลสกัดของน้ำ

นำผลสกัดของน้ำ 0.02 กรัม มาวิเคราะห์หากรดแอมิโนด้วยเครื่อง amino acid analyzer ผลการวิเคราะห์ แสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์หากรดแอมิโนในผลสกัดของน้ำ

| กรดแอมิโน | ความเข้มข้น (ไมโครโมล/กรัม) |
|---|---|
| Alanine | 6.30 |
| ɣ - Aminobutyric | 5.37 |
| Ammonia | 78.95 |
| Arginine | 2.23 |
| Glycine | 0.28 |
| Isoleucine | 1.57 |
| Leucine | 1.26 |
| Phenylalanine | 0.60 |
| Proline (440) | 56.87 |
| Threonine | 1.76 |
| Tyrosine | 0.95 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.11 การแยกสารโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำผลสกัดของเฮกเซน จากหัวข้อ 2.5.1.1 และผลสกัดของคลอโรฟอร์มจากหัวข้อ 2.5.1.2 และ 2.5.2 มารวมกัน ได้ผลสกัด 560 กรัม แบ่งมาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี 7 คอลัมน์ ๆ ละ 80 กรัม

นำผลสกัดของกิ่งมะกา 80 กรัม มาคนกับคลอโรฟอร์ม 10 $cm^3$ และคลุกกับซิลิกาเจล 60 Art 7734 ประมาณ 50 กรัม ให้เข้ากันจนร่วน แล้วนำไปแยกสารต่าง ๆ ด้วยคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล 800 กรัมไว้แล้วตามวิธีในหัวข้อ 2.6.1 ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับดังนี้คือ เฮกเซน ตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซน : คลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน (โดยปริมาตร) 19:1, 9:1, 17:3, 3:1, 3:2, 2:3, 1:4, คลอโรฟอร์ม, ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน (โดยปริมาตร) 19:1, 3:1, 1:1, 1:3, เมทานอล เก็บสารละลายที่ได้จากการชะไว้ในขวดก้นกลมครั้งละประมาณ 750 $cm^3$ นำแต่ละขวดไปกลั่นแยกตัวทำละลายออกจนเหลือประมาณ 20 $cm^3$ เทใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 50 $cm^3$ ระเหยไล่ตัวทำละลายบนเครื่องอังน้ำจนเกือบแห้ง และตรวจสอบสิ่งที่แยกได้ในแต่ละขวดว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้ทีแอลซี ขวดที่ให้ทินแลร์โครมาโทแกรมเหมือนกันนำมารวมกัน

ผลสกัดที่เหลืออีก 480 กรัม นำมาทำการแยกเช่นเดียวกันกับที่กล่าวแล้วข้างต้นและทำทีแอลซีเปรียบเทียบสารที่แยกได้ที่เหมือนกัน นำมารวมกัน

ผลการแยกสาร แสดงไว้ในตารางที่ 15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 การแยกผลสกัดของเฮกเซนและคลอโรฟอร์มโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

| ตัวชะ | ขวดลำดับที่ | ลักษณะสาร | น้ำหนักสาร (กรัม) |
|---|---|---|---|
| เฮกเซน | 1 - 3 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม และของแข็งแผ่นวาวสีขาว | 6.36 |
| | 4 - 9 | น้ำมันสีเหลือง | 1.86 |
| | 10 - 15 | น้ำมันสีเหลือง และของแข็งคล้ายเทียนไข | 0.71 |
| | 16 - 18 | น้ำมันสีเหลือง และของแข็งคล้ายเทียนไข | 0.78 |
| | 19 - 25 | น้ำมันสีเหลือง และของแข็งแผ่นวาวรวมเป็นกระจุก | 5.65 |
| คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน 1:19 (โดยปริมาตร) | 26 - 30 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน และของแข็งผงละเอียดวาว สีขาว | 5.7 |
| | 31 - 39 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม | 6.45 |
| คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน | 40 - 41 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม และของแข็งรูปเข็ม | 6.21 |
| 1:9 (โดยปริมาตร) | 42 - 46 | น้ำมันสีเหลืองเข้ม และของแข็งรูปเข็มวาว สีขาว | 7.40 |
| | 47 | น้ำมันสีส้ม และของแข็งรูปเข็มวาว สีขาว | 5.67 |
| | 48 - 49 | น้ำมันสีส้มแดง และของแข็งรูปเข็มวาว สีขาว | 5.42 |
| | 50 - 52 | น้ำมันสีส้มอ่อน และของแข็งผงวาว สีขาว | 7.48 |

ตารางที่ 15 (ต่อ)

| ตัวชะ | ขวดลำดับที่ | ลักษณะสาร | น้ำหนักสาร (กรัม) |
|---|---|---|---|
| | 53 - 67 | น้ำมันสีส้มอ่อน และของแข็งผงวาว สีขาว | 7.26 |
| คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน | 68 - 73 | น้ำมันสีส้มอ่อน | 9.75 |
| 3:17 (โดยปริมาตร) | 74 - 79 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน และของแข็งผง ละเอียดสีขาว | 18.71 |
| คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน | 80 - 81 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน และของแข็งผง | 2.81 |
| 1:3 (โดยปริมาตร) | | ละเอียดสีขาว | |
| | 82 - 85 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน และของแข็งรูป เข็มวาว สีขาว | 14.13 |
| | 86 - 91 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน และของแข็งรูป เข็มวาว สีขาว | 21.13 |
| | 92 - 95 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน และของแข็งรูป เข็มวาว สีขาว | 7.41 |
| คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน | 96 -108 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน และของแข็งรูป | 15.21 |
| 2:3 (โดยปริมาตร) | | เข็มวาว สีขาว | |
| คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน | 109-115 | น้ำมันสีเขียวอมดำ และของแข็งแผ่น | 14.45 |
| 3:2 (โดยปริมาตร) | | สีขาว เบา | |
| คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน | 116-119 | น้ำมันสีเหลืองอ่อน | 2.88 |
| 4:1 (โดยปริมาตร) | 120-125 | น้ำมันสีน้ำตาล | 15.23 |
| คลอโรฟอร์ม | 126-138 | น้ำมันสีเขียวใบไม้ | 7.10 |
| เมทานอล:คลอโรฟอร์ม | 139 | น้ำมันสีดำ และของแข็งผลละเอียด | 42.92 |
| 1:19 (โดยปริมาตร) | | วาว สีเหลืองอ่อน และรูปเข็มสี-เหลืองเข้ม | |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 (ต่อ)

| ตัวชะ | ชวดลำดับที่ | ลักษณะสาร | น้ำหนักสาร (กรัม) |
|---|---|---|---|
| | 140–150 | น้ำมันสีดำ และของแข็งเป็นคราบสี-ขาว ลอยอยู่ | 60.01 |
| เมทานอล:คลอโรฟอร์ม 1:3 (โดยปริมาตร) | 151–160 | น้ำมันสีดำ | 21.06 |
| เมทานอล:คลอโรฟอร์ม 1:1 (โดยปริมาตร) | 161–170 | น้ำมันสีน้ำตาลดำ | 10.3 |
| เมทานอล:คลอโรฟอร์ม 3:1 (โดยปริมาตร) | 170–180 | น้ำมันสีน้ำตาลดำ | 8.97 |
| เมทานอล | 181–183 | น้ำมันสีน้ำตาลดำ | 8.89 |

2.12 <u>การแยกสารที่ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีในชวดลำดับที่ 42–46</u>

นำสารในชวดลำดับที่ 42–46 ซึ่งมีของแข็งรูปเข็มปนกับรูปแห่งในน้ำมัน สีเหลืองมาแยกน้ำมันออกด้วยเอทิลแอซีเตต นำของเข็งที่ได้มาตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลหลาย ๆ ครั้ง ได้สารทั้งหมด 4.45 กรัม คิดเป็นร้อยละ0.79 ของผลสกัดของคลอโรฟอร์ม เมื่อทดสอบด้วยทีแอลซีพบว่าให้ 2 จุด มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.82 และ 0.68 (ซิลิกาเจล / คลอโรฟอร์ม)

นำสารที่ได้จากการตกผลึกแล้วจำนวน 0.60 กรัม มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีข้าตามวิธีในหัวข้อ 2.11 โดยใช้ซิลิกาเจล 7024-5 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 $\mu$m หนัก 18 กรัม (อัตราส่วน 1:30) โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 cm ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเฮกเซนในอัตราส่วน (โดยปริมาตร) 1:19, 1:9, 3:7, 1:4, 1:1 เก็บสารละลายที่ได้จากการชะไว้ในชวดรูปกรวยครั้งละประมาณ 50 $cm^3$ นำแต่ละ

ขวดไประเหยเอาตัวทำละลายออกจนเกือบแห้งบนเครื่องอังน้ำ ตรวจสอบสารที่แยกได้ในแต่ละขวดว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่โดยใช้ทีแอลซี ขวดที่ให้ทินแลร์โครมาโทแกรมเหมือนกันนำมารวมกัน ผลจากการแยกสารแสดงไว้ในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 การแยกสารประกอบในขวดลำดับที่ 42-46 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีช้า

| ตัวชะ | ขวดลำดับที่ | ลักษณะสาร | น้ำหนักสาร (กรัม) |
|---|---|---|---|
| คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน 1:19 (โดยปริมาตร) | 1-8 | คราบสีขาว | 0.002 |
| คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน 1 : 19 | 9-15 | คราบสีขาว | 0.003 |
| คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน 1 : 7 | 16.26 | คราบสีขาว | 0.006 |
| คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน 3 : 7 | 27-35 | คราบสีขาว | 0.005 |
| คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน 1 : 4 | 36-38 | ของแข็งรูปเข็มสีขาว วาว | 0.01 |
| | 39-45 | ของแข็งรูปเข็มสีขาว วาว | 0.25 |
| | 46-48 | คราบสีขาว | 0.002 |
| คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน 1 : 1 | 49-55 | คราบสีขาว | 0.004 |

จากการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีช้าปรากฏว่า ได้สารในขวดลำดับที่ 36-38 มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.82 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) แต่สารในขวดลำดับที่ 39-45มีค่า $R_f$ 0.82 และ 0.68

นำสารที่แยกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำในขวดลำดับที่ 39-45 มาตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลหลายๆครั้ง เมื่อทดสอบด้วยทีแอลซีพบว่ายังคงมีสารปนกัน 2 ชนิด ซึ่งให้ค่า $R_f$ คงเดิมคือ เท่ากับ 0.82 และ 0.68 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) ได้สารทั้งหมด 0.23 กรัม จึงนำมาแยกสารให้บริสุทธิ์โดยพีทีแอลซี ดังนี้

นำผลึกที่ได้หนัก 0.23 กรัมมาละลายในคลอโรฟอร์ม 5 $cm^3$ แล้วแยกออกจากกันให้บริสุทธิ์ด้วยพีทีแอลซีตามวิธีในหัวข้อ 2.4.3 ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม และเฮกเซนในอัตราส่วน 1:1 ตรวจหาตำแหน่งของสารด้วย 20% $H_2SO_4$ ก่อนแล้วจึงนำซิลิกาเจลในแต่ละแถบมาสกัดสารออกด้วยคลอโรฟอร์ม นำสารละลายที่สกัดได้มาระเหยให้งวด แล้วทำพีทีแอลซีซ้ำ ทำเช่นนี้ 5 ครั้ง จนแยกได้สารบริสุทธิ์ คือ สารประกอบที่มีค่า $R_f$ 0.82 หนัก 0.04 กรัม สารประกอบที่มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.68 หนัก 0.13 กรัม

## 2.13 องค์ประกอบทางเคมีในกิ่งมะกา

### 2.13.1 สาร 1

จากตารางที่ 15 ขวดลำดับที่ 1-3 มีสารลักษณะเป็นแผ่นวาว สีขาวปนอยู่ในน้ำมันสีเหลืองเข้ม แยกน้ำมันออกโดยล้างด้วยเอทิลแอซีเตต แล้วนำของแข็งมาตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลหลายๆครั้ง ได้สารเป็นผลึกรูปเข็มเล็กๆสีขาว ถ้าตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและเอทิลแอซีเตตจะได้ผลึกแผ่นวาว สีขาว หนัก 2.28 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.41 ของผลสกัดของคลอโรฟอร์ม มีจุดหลอมเหลว 61.5-64.5 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตต เฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.65 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน เท่ากับ 1:19) กำหนดให้เป็น สาร 1

IR (KBr), $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 2920, 2850(st), 1465, 1475, 1380(wk), 730,720 (wk)

MS m/e 464($M^+$), 436, 422, 408, 394, 380, 57 (base peak)

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 0.88 (t), 1.25 (s)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 14.14, 22.70, 29.36, 29.74, 31.96

การวิเคราะห์สาร 1 โดยเทคนิคจีแอลซี ( gas - liquid chromatography, GLC) ทำได้โดยการปรับภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ดังนี้ คือ ใช้คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ยาว 2 m บรรจุด้วย 5% Apizalon-L บน SW 60/80 mesh อุณหภูมิเครื่องฉีด (injector temerature) 320°C อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature) 315°C อุณหภูมิอุปกรณ์ตรวจวัด (detector temperature) 320°C ใช้ $N_2$ เป็นแก๊สพาหะ (carrier gas) อัตราการไหลของ $N_2$ ($N_2$-flow rate) 50 ml/min อัตราการไหลของ $H_2$ ($H_2$-flow rate) 50 ml/min อัตราการไหลของอากาศ (air -flow rate) 500 ml/min ใช้ FID (flame ionization detector) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด

ละลายสาร 1 ในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายของสาร 1 เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 2.87, 3.56, 4.50, 5.61, 7.09, 8.89 และ 11.23 นาที

นำแอลเคนโซ่ตรงยาว คือ tetracosane ($C_{24}H_{50}$), octacosane ($C_{28}H_{58}$), triacontane ($C_{30}H_{62}$) และ dotriacontane ($C_{32}H_{66}$) มาละลายในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ภายใต้ภาวะเดียวกับสาร 1 พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 1.54, 3.60, 5.65, 9.00 นาที ตามลำดับ

2.13.2 สาร 2

จากตารางที่ 15 ขวดลำดับที่ 10-15 มีสารของแข็งลักษณะคล้ายเทียนไขปนอยู่ในน้ำมันสีเหลืองอ่อน เมื่อแยกน้ำมันออกด้วยเอทิลแอซีเตตแล้วนำของแข็งมาตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและแอซีโตนหลายๆครั้ง ได้ของแข็งคล้ายเทียนไข หนัก 0.29 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.05 ของผลสกัดของคลอโรฟอร์ม จุดหลอมเหลว 84.0-87.0°C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตตและเฮกเซน ไม่ละลายในแอซีโตนและเมทานอล กำหนดให้เป็นสาร 2

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 2900, 2830 (st), 1730 (st), 1470, 1460 (st), 1180 (st), 730, 720 (st)

2.13.3 สาร 3

จากตารางที่ 15 ขวดลำดับที่ 19-25 มีสารลักษณะเป็นแผ่นวาว สีขาว รวมกันเป็นกระจุก ปนอยู่ในน้ำมันสีเหลือง แยกน้ำมันออกด้วยเอทิลแอซีเตต แล้วนำของแข็งมาตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและแอซีโตนหลายๆครั้ง ได้ผลึกเป็นแผ่นวาว สีขาว หนัก 0.169 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.03 ของผลสกัดของคลอโรฟอร์ม จุดหลอมเหลว 93.0-95.0 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตต เฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เมื่อทำทีแอลซี พบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.65 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม: เฮกเซน เท่ากับ 1:4) กำหนดให้เป็น สาร 3

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3070, 3020, 2920 (st), 2850 (st), 1735 (st), 1650 (wk), 1475, 1465 (st), 1380, 1375 (md), 1180 (md), 730, 720 (wk)

MS m/e 652 ($M^+$), 638, 396 (base peak), 394, 382, 256, 255, 213, 85, 71, 57, 43

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 0.68, 0.87, 1.02, 1.25, 1.55 (s), 1.26 (t), 4.60 (b), 5.08 (t), 5.38 (d)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 11.86-56.72, 73.67, 122.54, 129.37, 138.31, 139.77, 173.25

2.13.4 สาร 4

จากตารางที่ 15 ขวดลำดับที่ 40-41 มีสารลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มวาว สีขาว ปนอยู่ในน้ำมันสีเหลืองเข้ม แยกน้ำมันออกโดยล้างด้วยเอทิลแอซีเตตที่เย็น ตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลหลายๆครั้ง ได้สารเป็นผลึกรูปเข็มวาว สีขาว หนัก 1.72 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.31 ของผลสกัดของคลอโรฟอร์ม มีจุดหลอมเหลว 155.0-157.0 °C เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ 0.7 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) กำหนดให้เป็นสาร 4

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3060, 3040 (wk), 2950 (st), 2860 (st), 1710 (st), 1645 (wk), 1450 (md), 1370, 1360 (st), 885 (md)

MS m/e 452 ($M^+$), 311 (base peak), 271, 257, 245

$^{1}$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 0.66-2.01, 4.67, 5.30

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 14.41-53.42, 109.43, 116.37, 147.08, 150.17, 152.33, 217.18

การวิเคราะห์ด้วยจีแอลซีภายใต้ภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ คือ คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ยาว 2 m บรรจุด้วย 2% OV-1 บน CW 80/100 mesh อุณหภูมิเครื่องฉีด 300 °C อุณหภูมิคอลัมน์ 270 °C อุณหภูมิอุปกรณ์ตรวจวัด 300 °C ใช้ $N_2$ เป็นแก๊สหาหะ อัตราการไหลของ $N_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของ $H_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของอากาศ 500ml/min ใช้ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด

ละลายสาร 4 ในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายของสาร 4 เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ภายใต้ภาวะดังกล่าว พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 14.29 และ 17.62 นาที

การวิเคราะห์ด้วยเอชพีแอลซีภายใต้ภาวะของเครื่องโครมาโทกราฟ คือ คอลัมน์ชนิด Lichrosorb 5 Si 100 ความยาว 25 cm เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 mm ใช้เอทานอล:เฮกเซน (0.15:99.85) เป็นตัวชะ อัตราการไหล 1.6 ml/min ความดัน 2000 psi อุปกรณ์ตรวจวัด UV 232 nm

ละลายสาร 4 ด้วยเฮกเซน ฉีดสารละลายเข้าไปในเครื่องโครมาโทกราฟ ภายใต้ภาวะดังกล่าว พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 4.06 และ 6.97 นาที

2.13.5 <u>สาร 5</u>

จากตารางที่ 16 ขวดลำดับที่ 36-38 มีสารลักษณะเป็นเข็มวาว สีขาว ตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลหลายๆครั้ง ได้สารเป็นผลึกรูปเข็มวาว สีขาว หนัก 0.20 กรัม คิดเป็นร้อยละ 33.3 ของสารตั้งต้นที่นำมาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีข้าว จุดหลอมเหลว 258.0- 260.0 °C เมื่อทำทีแอลซีพบว่า มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.82 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตท เฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล กำหนดให้เป็นสาร 5

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 2900, 2850 (st), 1710 (st), 1460 (md), 1380 (st)

MS m/e 426 ($M^+$), 411, 341, 302, 274, 273, 247, 218, 205, 191, 163

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 0.72, 0.84, 0.87, 0.92, 0.95, 1.01, 1.05, 1.18 (s,21H), 0.84 (d,3H), 1.2-1.62 (m,23H), 2.37 (m,3H)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 6.83-59.54, 213.12

ผลการวิเคราะห์ธาตุ พบ C 84.68 %, H 12.04 %

การคำนวณสำหรับ $C_{30}H_{50}O$ ได้ C 84.51 %, H 11.74 %

2.13.6 สาร 6

จากการทำพีทีแอลซี ตามหัวข้อ 2.12 แยกได้สารที่มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.68 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) นำมาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลหลายๆครั้ง ได้สารเป็นผลึกสี่เหลี่ยมแบนวาว สีขาว หนัก 0.13 กรัม คิดเป็นร้อยละ 21.6 ของสารตั้งต้นที่นำมาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ จุดหลอมเหลว 278.0-280.0 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตต เฮกเซน เมทานอล กำหนดให้เป็น สาร 6

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3495 (md), 2950, 2850 (st), 1450, 1385 (md)

MS m/e 428 ($M^+$), 413, 304, 275, 273, 249, 233, 218, 207, 205, 195, 193, 165

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 0.86, 0.97, 0.99, 1.17 (s,24H), 1.26-1.65 (m,27H), 3.72 (s,1H)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 11.59-61.38, 72.76

ผลการวิเคราะห์ธาตุ พบ C 84.30 %, H 12.57 %

การคำนวณสำหรับ $C_{30}H_{52}O$ ได้ C 84.11 %, H 12.15 %

2.13.7 สาร 7

จากตารางที่ 15 ขวดลำดับที่ 50-52 มีสารลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวในน้ำมันสีส้มอ่อน แยกน้ำมันออกด้วยเอทิลแอซีเตต นำของแข็งมาตกผลึกด้วยเฮกเซนหลายๆครั้ง ได้สารเป็นผงละเอียดวาว สีขาวเบา หนัก 3.5 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.63 ของผลสกัดของ

คลอโรฟอร์ม จุดหลอมเหลว 81.0-84.0°C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างใน เฮกเซน เอทิลแอซีเตต ไม่ละลายในเมทานอล เมื่อทำทีแอลซี พบว่า มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.5 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) กำหนดให้เป็น สาร 7

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3600-3200 (wk), 2910, 2850(st), 1475, 1460 (wk), 1060 (wk), 730, 720 (wk)

MS m/e 448, 434, 420, 406, 392, 378, 364, 99, 85, 71, 57 (base peak), 43

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 0.93 (m), 1.25 (s), 1.57 (s), 3.67 (m)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 14.09, 22.64, 25.73, 29.42, 29.69, 31.91, 32.83, 63.11

การวิเคราะห์สาร 7 ด้วยเทคนิคจีแอลซีทำโดยปรับภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ดังนี้คือ คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ยาว 2 m บรรจุด้วย 2% OV-1 บน CW 80/100 mesh อุณหภูมิเครื่องฉีด 320°C อุณหภูมิคอลัมน์ 250°C อุณหภูมิอุปกรณ์ตรวจวัด 320°C ใช้ $N_2$ เป็นแก๊สพาหะ อัตราการไหลของ $N_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของ $H_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของอากาศ 500 ml/min ใช้ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด

ละลายสาร 7 ในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายนี้เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ภายใต้ภาวะดังกล่าวพบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 20.39, 26.72 และ 34.35 นาที

เมื่อนำแอลกอฮอล์อิ่มตัวโซ่ตรงยาว คือ tetradecanol ($C_{14}H_{29}OH$), hexadecanol ($C_{16}H_{33}OH$), octadecanol ($C_{18}H_{38}OH$), eicosanol ($C_{20}H_{41}OH$) และ docosanol ($C_{22}H_{45}OH$) มาผสมกัน ละลายในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ภายใต้ภาวะเดียวกับสาร 7 พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 0.88, 1.20, 1.77, 2.74 และ 4.43 นาที

2.13.8 สาร 8

จากตารางที่ 15 ขวดลำดับที่ 74-79 มีสารลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวในน้ำมันสีเหลือง แยกน้ำมันออกด้วยแอซีโตน แล้วนำของแข็งมาตกผลึกด้วยเฮกเซนหลายๆครั้ง ได้สารที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว หนัก 2.1 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.38 ของผลสกัดของคลอโรฟอร์ม จุดหลอมเหลว 72.0-75.0 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตต เฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล กำหนดให้เป็นสาร 8

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3500-2500, 2900, 2850(st), 1700 (md), 1465 (md), 1430, 1300 (wk), 920 (wk), 730, 720 (md)

MS m/e 522 ($M^+$), 508, 494, 480, 466, 452, 438, 424, 410, 396, 368, 354, 185, 129, 71

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 0.87 (t), 1.25 (s), 2.35 (t)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 14.09, 22.69, 24.70, 29.25, 29.36, 29.69, 31.96, 33.91, 179.21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.13.9 สาร 9

จากตารางที่ 15 ชวดลำดับที่ 80-81 มีสารลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาว ในน้ำมันสีเหลืองอ่อน แยกน้ำมันออกด้วยแอซีโตน แล้วนำของแข็งมาตกผลึกด้วยเฮกเซน หลายๆ ครั้ง ได้สารเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.19 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.03 ของผลสกัดของคลอโรฟอร์ม จุดหลอมเหลว 73.0-74.0 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตต เฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.65 (ซิลิกาเจล/เมทานอล:คลอโรฟอร์ม เท่ากับ 1:49) กำหนดให้เป็น สาร 9

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3500 (md), 2900, 2850 (st), 1725(st), 1640(md), 1600, 1520, 1440(md), 1460, 1385, 1365(md), 1260, 1120(md), 1210(st), 1020(md), 1170(md), 980(md), 850, 820(md), 720(md)

MS m/e 614($M^+$), 194, 85, 71, 57, 43

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$ (ppm) 0.89(t,3H), 1.26(s,54H), 1.60 (br.s, 2H), 3.93(s,3H), 4.19(t,2H), 5.84(s,1H), 6.29(d,1H), 6.90 (d, 1H), 7.04(s,1H), 7.08(d,1H), 7.61(d,1H)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$ (ppm) 14.12-64.59, 109.35, 114.65, 115.72, 122.99, 127.11, 144.62, 146.71, 147.74, 167.39

UV ($CHCl_3$) $\lambda_{max}$ (nm) 242, 296, 320

ผลการวิเคราะห์ธาตุพบ C 77.94% , H 11.49%

การคำนวณสำหรับ $C_{40}H_{70}O$ ได้ C 78.18% , H 11.40%

2.13.10 สาร 10

จากตารางที่ 15 สารที่แยกได้ในชวดลำดับที่ 82-85 มีของแข็งลักษณะเป็นรูปเข็มวาว สีขาว ในน้ำมันสีเหลืองอ่อน แยกน้ำมันออกด้วยเอทิลแอซีเตตแล้วนำของแข็งมาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลหลายๆครั้ง ได้สารเป็นผลึกรูปเข็มวาว สีขาวหนัก 7.57 กรัม คิดเป็น 1.35% ของผลสกัดของคลอโรฟอร์ม จุดหลอมเหลว 138.0-141.0 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน เอทิลแอซีเตต

เมทานอล เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.46 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) กำหนดให้เป็นสาร 10

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3500-3200(md), 2950,2850(st), 1640(wk), 1645, 1380(md), 1370, 1060(md), 970, 960(wk), 800(wk)

MS m/e 414 ($M^+$,base peak), 412, 400, 396, 394, 382, 329, 327, 273, 255, 213

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 0.68-2.32(m), 3.52(b), 5.09 (t), 5.35(d)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 11.86-56.83, 71.73, 121.68, 129.26, 138.31, 140.75

การวิเคราะห์สาร 10 โดยเทคนิคจีแอลซีทำโดยการปรับภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟดังนี้ คือ ใช้คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ยาว 2 m บรรจุด้วย 2% OV-1 บน CW 80/100 mesh อุณหภูมิเครื่องฉีด 300 °C อุณหภูมิคอลัมน์ 270 °C อุณหภูมิของอุปกรณ์ตรวจวัด 300 °C ใช้ $N_2$ เป็นแก๊สพาหะ อัตราการไหลของ $N_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของ $H_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของอากาศ 500 ml/minใช้ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด

ละลายสาร 10 ในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายของสาร 10 เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟภายใต้ภาวะดังกล่าวข้างต้น พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 10.03, 10.70, 12.05 นาที ละลายสเตอรอยด์ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน คือ campesterol, stigmasterol, β-sitosterol และ cholesterol ด้วยคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายแต่ละชนิดเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ภายใต้ภาวะเดียว กับสาร 10 พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 7.99, 10.01, 10.57, 12.06 นาที

2.13.11 สาร 11

จากตารางที่ 15 ขวดลำดับที่ 140-150 มีสารเป็นผงละเอียดสีขาวในน้ำมันสีดำ แยกน้ำมันออกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลหลายๆ ครั้ง ได้ผงละเอียดสีขาว หนัก 3.20 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.5% ของผลสกัดของคลอโรฟอร์ม สลาย

ตัวที่ 250.0 °C ละลายได้บ้างในคลอโรฟอร์ม เมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน เอทิลแอซีเตต แอซีโตน เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.22 (ซิลิกาเจล/เมทานอล:คลอโรฟอร์ม เท่ากับ 1:9) กำหนดให้เป็นสาร 11

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3500-3200(st), 2950, 2880(st), 1640(wk), 1460, 1380, 1365(md), 1250, 1160(md), 1070(st), 1020(st), 890(wk)

MS m/e 414, 412, 400, 396, 394, 382, 329, 327, 273, 255, 213

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$ (ppm) 0.7-2.4(m), 3.4-3.8(m), 4-4.7 (m), 5.14(m), 5.38(m)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$ (ppm) 12.03-42.69, 50.6, 56.4, 57.1, 62.14, 70.64, 73.95, 76.87, 101.32, 122.38, 129.64, 138,69, 140.74

## 2.14 การเตรียมอนุพันธ์

### 2.14.1 การแยกสลายด้วยน้ำของสาร 2

นำสาร 2 หนัก 0.09 กรัม เติม 5% NaOH ในเอทานอล 10 $cm^3$ แล้วรีฟลักซ์บนเครื่องอังน้ำเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์หรือไม่โดยทำทีแอลซี (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน เท่ากับ 1:1) เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วนำสารละลายมากำจัดตัวทำละลายออกโดยการกลั่นลดความดัน นำสารที่ได้ไปแขวนลอยในน้ำแล้วสกัดส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ส่วนที่เป็นเกลือของกรดยังคงละลายอยู่ในชั้นน้ำ

#### 2.14.1.1 การศึกษาส่วนของแอลกอฮอล์

นำสารละลายแอลกอฮอล์ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์มากำจัดน้ำด้วย anh.$Na_2SO_4$ นำไประเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยเฮกเซน ได้ผงละเอียดสีขาวหนัก 0.03 กรัม คิดเป็นร้อยละ 33.3 ของสารที่นำมาแยกสลายด้วยน้ำ จุดหลอมเหลว 78.0-81.0 °C ไม่ให้สีกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ไม่ฟอกจางสีสารละลาย 0.1% $KMnO_4$

และสารละลาย 3% $Br_2$ ใน $CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1% $FeCl_3$ ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.5 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3500-3200(md), 2920, 2850(st), 1470, 1465(st), 1060(st), 730, 720(st)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคจีแอลซี ทำโดยการปรับภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟดังนี้ คือ ใช้คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ยาว 2 m บรรจุด้วย 2% OV-1 บน CW 80/100 mesh อุณหภูมิเครื่องฉีด 280 °C อุณหภูมิคอลัมน์ 250 °C อุณหภูมิของอุปกรณ์ตรวจวัด 280 °C ใช้ $N_2$ เป็นแก๊สพาหะ อัตราการไหลของ $N_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของ $H_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของอากาศ 500 ml/min ใช้ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด

นำแอลกอฮอล์ที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำมาละลายในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายนี้เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟภายใต้ภาวะดังกล่าวพบว่ามีค่าretention time เท่ากับ 23.72, 31.39, 39.99 นาที

นำแอลกอฮอล์อิ่มตัวโซ่ตรงยาวมาตรฐาน คือ tetradecanol($C_{14}H_{30}O$), hexadecanol($C_{16}H_{30}O$), octadecanol($C_{18}H_{38}O$), eicosanol ($C_{20}H_{42}O$), docosanol ($C_{22}H_{46}O$) มาผสมกันละลายในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟภายใต้ภาวะเดียวกับแอลกอฮอล์ ที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำ พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 1.01, 1.38, 2.01, 3.13, 5.07 นาที

2.14.1.2 <u>การศึกษาส่วนของกรด</u>

นำชั้นน้ำมาทำให้เป็นกรดด้วย dil. HCl แล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์หลายๆครั้ง นำชั้นอีเทอร์มากำจัดน้ำออกด้วย anh. $Na_2SO_4$ กรอง นำไประเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยเฮกเซน ได้ผงละเอียดสีขาว หนัก 0.04 กรัม คิดเป็นร้อยละ 44.4 ของสารที่นำมาแยกสลายด้วยน้ำ มีจุดหลอมเหลว 80.0-83.0 °C ไม่ให้สีกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ไม่ฟอกจางสีสารละลาย 0.1% $KMnO_4$ และ 3% $Br_2$ ใน

$CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1% $FeCl_3$ ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenyl-hydrazine

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3300-2500, 2920, 2860 (st), 1740(st), 1465(st), 1435, 1300(md), 940(wk), 730, 720(md)

เตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำของสาร 2 และของกรดคาร์บอกซิลิกโซ่ตรงยาวมาตรฐาน โดยละลาย N-nitroso-methylurea หนัก 1 กรัมในสารละลาย 40% KOH 10 $cm^3$ ในไดเอทิลอีเทอร์ 15 $cm^3$ ที่เย็นจนละลายหมด นำไปกลั่นบนเครื่องอังน้ำ ได้ diazomethane ออกมาผ่าน diazomethane นี้ลงไปในกรดที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำ 0.01 กรัมที่ละลายในคลอโรฟอร์ม 1 $cm^3$ จนสารละลายมีสีเหลืองอย่างถาวร ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน ทดสอบว่า เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์หรือไม่ด้วยทีแอลซี (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน เท่ากับ 1:1) เช่นเดียวกันผ่าน diazomethane ลงไปในสารละลายของกรดคาร์บอกซิลิกโซ่ตรงยาว มาตรฐานจนมีสีเหลืองอย่างถาวร

นำอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำของสาร 2 มาวิเคราะห์ด้วยจีแอลซีภายใต้ภาวะเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.14.1.1 ได้ retention time เท่ากับ 4.53, 5.85, 7.3, 9.52, 11.88, 15.78, 19.75, 26.02, 33.02, 44.02 และ 57.75 นาที และเมื่อวิเคราะห์อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดคาร์บอกซิลิกโซ่ตรงยาวมาตรฐาน ได้แก่ methyl dodecanoate ($C_{13}H_{26}O_2$), methyl tetradecanoate($C_{15}H_{30}O_2$), methyl hexadecanoate ($C_{17}H_{34}O_2$) และ methyl octadecanoate ($C_{19}H_{38}O_2$) ได้ retention time เท่ากับ 0.73, 0.93, 1.26 และ 1.86 นาทีตามลำดับ

2.14.2 <u>การแยกสลายด้วยน้ำของสาร 3</u>

นำสาร 3 หนัก 0.07 กรัม มาแยกสลายด้วยน้ำตามวิธีในหัวข้อ 2.14.1

2.14.2.1 การศึกษาส่วนของแอลกอฮอล์

นำสารละลายแอลกอฮอล์ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์มากำจัดน้ำด้วย anh. $Na_2SO_4$ นำไประเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเฮกเซน ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว 0.03 กรัม คิดเป็นร้อยละ 42.6 ของสารที่นำมาแยกสลายด้วยน้ำ จุดหลอมเหลว 142.0-146.0 °C ให้สีเขียวกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ฟอกจางสีสารละลาย 0.1% $KMnO_4$ และสารละลาย 3% $Br_2$ ใน $CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1% $FeCl_3$ ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.46 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคจีแอลซี ทำโดยการปรับภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟดังนี้ คือ ใช้คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ยาว 2 mm บรรจุด้วย 2% OV-1 บน CW 80/100 mesh อุณหภูมิเครื่องฉีด 280 °C อุณหภูมิคอลัมน์ 220 °C อุณหภูมิของอุปกรณ์ตรวจวัด 280 °C ใช้ $N_2$ เป็นแก๊สหาหะ อัตราการไหลของ $N_2$ 45 ml/min อัตราการไหลของ $H_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของอากาศ 500 ml/min ใช้ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด

นำแอลกอฮอล์ที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำของสาร 3 มาละลายในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายนี้เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟภายใต้ภาวะดังกล่าว พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 17.06, 18.53, 20.96 นาที

นำสเตอรอยด์ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน คือ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol มาผสมกันแล้วละลายในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟภายใต้ภาวะเดียวกับแอลกอฮอล์ที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำของสาร 3 พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 13.32, 16.92, 18.26, 20.72 นาที

2.14.2.2 การศึกษาส่วนของกรด

นำชั้นน้ำมาทำให้เป็นกรดด้วย dil. HCl แล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์หลายๆครั้ง นำชั้นอีเทอร์มากำจัดน้ำออกด้วย anh. $Na_2SO_4$ กรอง นำไประเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยเฮกเซน ได้ผงละเอียดสีขาว หนัก 0.01 กรัม คิดเป็นร้อยละ

14.29 ของสารที่นำมาแยกสลายด้วยน้ำ มีจุดหลอมเหลว58.0-60.0°Cไม่ให้สีกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ไม่ฟอกจางสีสารละลาย 0.1% $KMnO_4$ และ 3% $Br_2$ ใน $CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1%$FeCl_3$ ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3300-2500, 2900, 2850(st), 1700(md), 1460(wk), 1420, 1290(wk), 930(wk), 720(wk)

MS m/e 256($M^+$,base peak), 239, 227, 213, 199, 185, 71, 60, 57, 43

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคจีแอลซี ปรับภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟให้เหมือนกับที่ใช้วิเคราะห์แอลกอฮอล์ที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำของสาร 3 ละลายกรดที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 3.29 นาที เมื่อนำกรดคาร์บอกซิลิกโซ่ตรงยาวมาตรฐาน คือ undecanoic acid ($C_{11}H_{22}O_2$), tetradecanoic acid ($C_{14}H_{28}O_2$), hexadecanoic acid ($C_{16}H_{36}O_2$), octadecanoic acid ($C_{18}H_{38}O_2$) ละลายในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายผสมเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ภายใต้ภาวะเดียวกับกรดที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำ พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 1.04, 2.04, 3.3 และ 5.05 นาที ตามลำดับ

2.14.3 การรีดิวซ์สาร 4

นำสาร 4 หนัก 0.1 กรัมมาผสมกับ $NaBH_4$ 0.125 กรัม ใน tetrahydrofuran (THF) 4 $cm^3$ 5% NaOH 0.35 $cm^3$ และน้ำ 0.35 $cm^3$ รีฟลักซ์ 20 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์หรือไม่ด้วยทีแอลซี (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วเติมน้ำลงไป 2 $cm^3$ รีฟลักซ์ต่ออีกครึ่งชั่วโมงนำสารละลายมากำจัด THF ออกด้วยการกลั่นลดความดัน สกัดสารที่ได้ด้วยคลอโรฟอร์มแล้วระเหยเอาคลอโรฟอร์มออก ตกผลึกสารที่ได้ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลได้ผลึกรูปขนนกเบาวาว สีขาว หนัก 0.08 กรัม คิดเป็นร้อยละ 80 ของสารที่นำมารีดิวซ์ จุดหลอมเหลว196.0-198.0°Cให้สีเขียวกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ฟอกจางสีสารละลาย 0.1% $KMnO_4$ และ 3% $Br_2$ ใน $CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1%$FeCl_3$ ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenyl-

hydrazine เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.48 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3600-3200(wk), 3090(wk), 2950, 2850(st), 1640(wk), 1460(md), 1385(md), 1040, 1020(md), 890(md), 815

MS m/e 454($M^+$),313(base peak), 273, 259, 247

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$ (ppm) 0.64-1.99, 3.23, 4.66, 5.27

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$ (ppm) 14.52-52.82, 79.04, 109.27, 115.17, 148.65, 150.28

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคจีแอลซี ภายใต้ภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ คือ ใช้คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ยาว 2 m บรรจุด้วย 2% OV-1 บน CW 80/100 mesh อุณหภูมิเครื่องฉีด 300 °C อุณหภูมิคอลัมน์ 270 °C อุณหภูมิของอุปกรณ์ตรวจวัด 300 °C ใช้ $N_2$ เป็นแก๊สพาหะ อัตราการไหลของ $N_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของ $H_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของอากาศ 500 ml/min ใช้ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด

ละลายสารที่ได้จากการรีคิวซ์สาร 4 ด้วยคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายนี้เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟภายใต้ภาวะดังกล่าว พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 14.87 และ 18.22 นาที

2.14.4 <u>การรีคิวซ์สาร 5</u>

นำสาร 5 หนัก 0.12 กรัม มารีคิวซ์ตามวิธีในหัวข้อ 2.14.3 ตกผลึกสารที่ได้ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลได้สารเป็นผงวาวสีขาวปนกับผลึกสี่เหลี่ยมแบนวาว สีขาว หนัก 0.1 กรัม เมื่อทดสอบด้วยทีแอลซี (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) พบว่ามี 2 จุด คือจุดที่มีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.68 และ 0.52

นำของผสมที่ได้มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตามวิธีในหัวข้อ 2.12 โดยใช้สารผสม 0.1 กรัม ต่อซิลิกาเจล 3 กรัม ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเฮกเซนในอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร เป็นตัวชะ แยกได้สารดังในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 การแยกสารที่ได้จากการรีดิวซ์สาร 5 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

| ขวดลำดับที่ | ลักษณะสาร | น้ำหนักสาร (กรัม) |
|---|---|---|
| 1- 8 | คราบสีขาว | 0.002 |
| 9-13 | ของแข็งผงละเอียด สีขาว (สาร 5 ก) | 0.055 |
| 14-16 | ของแข็งผงละเอียด สีขาว (สาร 5 ก และสาร 5 ข) | 0.015 |
| 17-18 | ของแข็งผงละเอียด สีขาว (สาร 5 ข) | 0.008 |
| 19-25 | คราบสีขาว | 0.005 |

2.14.4.1 สาร 5 ก

จากตารางที่ 17 ขวดลำดับที่ 9-13 มีสารลักษณะเป็นผงละเอียดวาว สีขาว ตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลหลายๆครั้ง ได้สารเป็นผลึกรูปสี่เหลี่ยมแบนวาว สีขาว หนัก 0.05 กรัม คิดเป็นร้อยละ 41.7 ของสารที่นำมารีดิวซ์ จุดหลอมเหลว278.0-280.0°Cละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน เอทิลแอซีเตตและเมทานอล เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.68 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) กำหนดให้เป็นสาร 5 ก

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีมีลักษณะเหมือนสาร 6 ทุกประการ

2.14.4.2 สาร 5 ข

จากตารางที่ 17 ขวดลำดับที่ 17-18 มีสารลักษณะเป็นผงละเอียดวาวสีขาว ตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอลหลายๆครั้ง ได้สารเป็นผลึกรูปสี่เหลี่ยมแบนวาว สีขาว หนัก 0.005 กรัม คิดเป็นร้อยละ 4.16 ของสารที่นำมารีดิวซ์ จุดหลอมเหลว288.0-290.0°Cละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน เอทิลแอซีเตตและเมทานอล ให้สีม่วงกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ไม่ฟอกจางสีสารละลาย 0.1%$KMnO_4$ และ 3%$Br_2$ ใน $CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1% $FeCl_3$ ไม่ให้

ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.52 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) กำหนดให้เป็นสาร 5 ข

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3500(md), 2950, 2850 (st), 1450(st), 1380, 1360(md), 1030, 1000(st),

MS m/e 428($M^+$), 413, 304, 275, 233, 205, 193, 165

2.14.5 การเตรียมอนุพันธ์แอซีเลตของสาร 5 ก

นำสาร 5 ก หนัก 0.1 กรัม มาละลายในพิริดีน 5 $cm^3$ เติมแอซีติก-แอนไฮไดรด์ 2.5$cm^3$ เขย่าให้เข้ากัน นำไปรีฟลักซ์บนเครื่องอังน้ำเป็นเวลานาน 10 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์หรือไม่ด้วยทีแอลซี (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม) เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้ว เทสารที่ได้ลงในน้ำผสมน้ำแข็ง 30 $cm^3$ ได้ตะกอนสีขาว กรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดกลิ่นพิริดีน ทำตะกอนให้แห้ง แล้วนำมาตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิล-แอซีเลตและคลอโรฟอร์มหลายๆครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มวาวสีขาว หนัก 0.06 กรัม คิดเป็นร้อยละ 60 ของสารที่นำมาเตรียมอนุพันธ์แอซีเลต จุดหลอมเหลว 293.0-294.0°C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน เอทิลแอซีเลต ไม่ละลายในเมทานอล ให้สีม่วงกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ไม่ฟอกจางสีสารละลาย 0.1 % $KMnO_4$ และสารละลาย 3% $Br_2$ ใน $CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1% $FeCl_3$ ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.82 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 2900, 2850(st), 1740(st), 1450, 1390(st), 1240, 1025(st)

MS m/e 470($M^+$), 410, 395, 286, 258, 231, 218, 189, 177, 175, 147

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$ (ppm) 0.77, 0.85, 0.93, 0.99, 1.17 (s, 24H), 1.27-1.83 (m, 26H), 2.04 (S, 3H), 4.88 (d,1H)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$ (ppm) 11.32-61.16, 74.65, 170.76

ผลการวิเคราะห์ธาตุ พบ C 81.95 %, H 11.77 %

การคำนวณสำหรับ $C_{32}H_{54}O_2$ ได้ C 81.70 %, H 11.49 %

2.14.6 การเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตของสาร 7

นำสารประกอบ 7 หนัก 0.05 กรัม มาเตรียมอนุพันธ์แอซีเตต ตามวิธีในหัวข้อ 2.14.5 ได้ของแข็งลักษณะเป็นผง สีขาว ตกผลึกด้วยเฮกเซน หลายๆ ครั้งได้สารผงละเอียดสีขาว หนัก 0.03 กรัม คิดเป็นร้อยละ 60 ของสารที่นำเตรียมอนุพันธ์แอซีเตต จุดหลอมเหลว65.0-68.0°Cละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เฮกเซน เอทิลแอซีเตต ละลายได้บ้างในแอซีโตน ไม่ละลายในเมทานอล ไม่ให้สีกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ไม่ฟอกจางสีสารละลาย 0.1% $KMnO_4$ และ 3% $Br_2$ ใน $CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1% $FeCl_3$ ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine เมื่อทำทีแอลซี พบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.57

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 2950,2850(st), 1745(st), 1480, 1465, 1370(md), 1240, 1040(st), 730, 720(md)

MS m/e 508($M^+$), 494, 480, 448, 434, 420, 406, 392, 378, 364, 99, 85, 71, 57, 43

2.14.7 การเตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของสาร 8

เตรียม diazomethane ตามวิธีในหัวข้อ 2.14.1.2 ผ่าน diazomethane นี้ลงในสาร 8 หนัก 10 mg ที่ละลายในคลอโรฟอร์ม 2 $cm^3$ จนสารละลายมีสีเหลืองถาวร ปิดฝาขวดเขย่าให้เข้ากัน ทดสอบว่าเกิดปฏิกริยาสมบูรณ์หรือไม่ด้วยทีแอลซี นำเมทิลเอสเทอร์ที่ได้ไประเหยบนเครื่องอังน้ำจนเหลือประมาณ 1 $cm^3$ นำไปวิเคราะห์ด้วยจีแอลซี ปรับภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ดังนี้ คือ ใช้คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ยาว 2 m อุณหภูมิเครื่องฉีด 320 °Cอุณหภูมิคอลัมน์ 250 °C อุณหภูมิอุปกรณ์ตรวจวัด 320 °C ใช้ $N_2$ เป็นแก๊สพาหะ อัตราการไหลของ $N_2$ 45 ml/min อัตราการไหลของ $H_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของอากาศ 500 ml/min ใช้ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด

ฉีดเมทิลเอสเทอร์ของสาร 8 เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ภายใต้ภาวะดังกล่าวข้างต้นพบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 5.24, 6.7, 8.64, 11.2, 13.24, 14.5, 18.77, 24.5, 28.9, 31.57, 41.1, 48.1, 53.04 นาที เมื่อนำกรดคาร์บอกซิลิกโซ่ตรงยาวซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานคือ dodecanoic acid ($C_{12}H_{24}O_2$), tetradecanoic acid ($C_{14}H_{28}O_2$), hexadecanoic acid ($C_{16}H_{32}O_2$) และ octadecanoic acid ($C_{18}H_{36}O_2$) ผสมกันละลายในคลอโรฟอร์ม มาเตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ตามวิธีเดียวกับสาร 8 ฉีดสารละลายนี้เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟภายใต้ภาวะเดียวกัน พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 0.78, 1.01, 1.42, 2.1 นาที

2.14.8 <u>การแยกสลายด้วยน้ำของสาร 9</u>

นำสาร 9 หนัก 0.01 กรัมมาแยกสลายด้วยน้ำตามวิธีในหัวข้อ 2.14.1

2.14.8.1 <u>การศึกษาส่วนของแอลกอฮอล์</u>

นำสารละลายแอลกอฮอล์ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์มากำจัดน้ำด้วย anh.$Na_2SO_4$ กรอง ระเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยเฮกเซนหลายๆครั้งได้ผงละเอียดขาว สีขาว หนัก 0.05 กรัม คิดเป็นร้อยละ 50 ของสารที่นำมาแยกสลายด้วยน้ำ จุดหลอมเหลว 83.0 -84.0°C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตต เฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.5 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3500-3200(wk), 2900, 2850(st), 1475, 1460(wk), 1050(wk), 730, 720(wk)

MS m/e 420, 392, 364, 336, 99, 85, 71, 57 (base peak), 43

การวิเคราะห์ด้วยจีแอลซี ปรับภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟดังนี้ คือ ใช้คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm ยาว 2 m บรรจุด้วย 2% OV-1 บน CW 80/100 mesh อุณหภูมิเครื่องฉีด 300 °C อุณหภูมิคอลัมน์ 260 °C อุณหภูมิของอุปกรณ์ตรวจวัด 300 °C ใช้ $N_2$ เป็นแก๊สหาหะ อัตราการไหลของ $N_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของ $H_2$ 50 ml/min อัตราการไหลของอากาศ 500 ml/min ใช้ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด

ละลายแอลกอฮอล์ที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำของสาร 9 ด้วยคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายนี้เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟภายใต้ภาวะดังกล่าว พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 16.05 นาที เมื่อนำแอลกอฮอล์อิ่มตัวโซ่ตรงยาวคือ tetradecanol ($C_{14}H_{30}O$), hexadecanol ($C_{16}H_{34}O$), octadecanol ($C_{18}H_{38}O$), eicosanol ($C_{20}H_{42}O$), docosanol ($C_{22}H_{46}O$) มาผสมกันละลายในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟภายใต้ภาวะเดียวกัน พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 0.88, 1.15, 1.59, 2.36, 3.66 นาที ตามลำดับ

2.14.8.2 การศึกษาส่วนของกรด

นำชั้นน้ำมาทำให้เป็นกรดด้วย dil.HCl แล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์หลายๆครั้ง นำชั้นอีเทอร์มากำจัดน้ำด้วย anh.$Na_2SO_4$ กรอง ระเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเฮกเซน ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน หนัก 0.02 กรัม คิดเป็นร้อยละ 20 ของสารที่นำมาแยกสลายด้วยน้ำ จุดหลอมเหลว 169.0-171.0°C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เมทานอล ละลายได้บ้างในเฮกเซน

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 3450(st), 3020(wk), 3200-2500, 2950(st), 1690, 1665(st), 1620(st), 1600, 1515, 1470(st), 1465, 1435, 1380, 1280(st), 1200(st), 1030(md), 1160(st), 940 (md), 850, 820 (md)

MS m/e 194 ($M^+$,base peak), 179, 177, 149, 146

UV ($CHCl_3$) $\lambda_{max}$ (nm) 242, 296, 320

2.14.9 การเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตของสาร 10

นำสาร 10 หนัก 0.08 กรัม มาเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตตามวิธีในหัวข้อ 2.14.5 ได้ของแข็งสีขาว ตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล ได้ผลึกแผ่นวาว สีขาว หนัก 0.05 กรัม คิดเป็นร้อยละ 62.5 ของสารที่นำมาเตรียมอนุพันธ์แอซีเตต จุดหลอมเหลว 135-136°C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เฮกเซน และ เอทิลแอซีเตต ละลายได้บ้างในเมทานอล ให้สีเขียวกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ฟอกจางสี

สารละลาย 0.1 % $KMnO_4$ และ 3% $Br_2$ ใน $CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1% $FeCl_3$ ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.72 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 2950, 2850(st), 1730(st), 1460, 1380, 1370(md), 1250, 1040(st), 970, 960(wk), 800(wk)

2.14.10 การแยกสลายด้วยน้ำของสาร 11

นำสาร 11 หนัก 0.2 กรัม มาเติม 10% HCl ในเอทานอลจำนวน 15 $cm^3$ แล้วรีฟลักซ์บนเครื่องอังน้ำเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์หรือไม่ โดยการทำทีแอลซี (ซิลิกาเจล/เมทานอล:คลอโรฟอร์ม เท่ากับ 1:9) เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วนำสารละลายมากำจัดตัวทำละลายออกโดยการกลั่นลดความดัน นำสารที่ได้ไปแขวนลอยในน้ำ แล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ได้ aglycone ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์ และ น้ำตาลในชั้นน้ำ

2.14.10.1 การศึกษาส่วน aglycone

นำสารละลาย aglycone ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์มากำจัดน้ำด้วย anh. $Na_2SO_4$ กรอง ระเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยเฮกเซน ได้ผลึกรูปเข็มวาว สีขาว หนัก 0.10 กรัม คิดเป็นร้อยละ 50 ของสารที่นำมาแยกสลายด้วยน้ำ จุดหลอมเหลว 140-142 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เฮกเซน เอทิลแอซีเตต ละลายได้น้อยในเมทานอล ให้สีเขียวกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ฟอกจางสีสารละลาย 0.1% $KMnO_4$ และ 3% $Br_2$ ใน $CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1% $FeCl_3$ ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.46 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

นำส่วน aglycone ส่วนที่ตกผลึกแล้วมาวิเคราะห์ด้วยจีแอลซีตามวิธีและภาวะเดียวกับหัวข้อ 2.14.10 พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 10.07, 10.71, 12.06 นาที

2.14.10.2 การศึกษาชั้นน้ำตาล

นำชั้นน้ำไปกลั่นลดความดันจนเกือบแห้ง นำสารละลายของน้ำตาลนี้ไปทำเปเปอร์โครมาโทกราฟี ตามวิธีในหัวข้อ 2.4.4 พบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับน้ำตาลกลูโคส

2.14.11 การเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตของสาร 11

นำสาร 11 หนัก 0.2 กรัม มาเตรียมอนุพันธ์แอซีเตต ตามวิธีในหัวข้อ 2.14.5 ได้ของแข็งรูปเข็มสีขาว เมื่อนำมาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอซีเตตและ เมทานอล หลายๆครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มวาว สีขาว หนัก 0.13 กรัม คิดเป็นร้อยละ 65 ของสารที่นำมาเตรียมอนุพันธ์แอซีเตต จุดหลอมเหลว 166.0–168.0 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เอทิลแอซีเตต ละลายได้บ้างในเฮกเซน เมทานอล ให้สีเขียวกับปฏิกิริยาของ Liebermann-Burchard ฟอกจางสีสารละลาย 0.1% $KMnO_4$ และ 3% $Br_2$ ใน $CCl_4$ ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย 1% $FeCl_3$ ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-dinitrophenylhydrazine เมื่อทำทีแอลซีพบว่ามีค่า $R_f$ เท่ากับ 0.55 (ซิลิกาเจล/เมทานอล:คลอโรฟอร์ม เท่ากับ 1:49)

IR (KBr) $\nu_{max}$ ($cm^{-1}$) 2950, 2850(st), 1750(st), 1460, 1430(md), 1380, 1360(st), 1200–1260(st), 1020–1060(st), 910(wk), 900(md)

MS m/e 624, 414, 412, 396 (base peak), 382, 255, 213

$^1$H-NMR ($CDCl_3$) $\delta$(ppm) 0.68–1.55 (m), 1.99, 2.013, 2.04, 2.07 (s), 3.62 (m), 4.59 (d), 5.09 (m), 5.33(m)

$^{13}$C-NMR ($CDCl_3$) $\delta$ (ppm) 12.03–56.83, 62.18, 68.69, 71.78, 73.03, 80.07, 99.68, 122.16, 129.48, 138.31, 140.42, 169.35, 170.27, 170.59, 172.27

2.15 การทดสอบสีและการทดสอบทางเคมีของสารที่แยกได้

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี มาทดสอบดังต่อไปนี้

2.15.1 การทดสอบสเตอรอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์ (23)

นำสารประมาณ 1 มิลลิกรัม มาละลายในคลอโรฟอร์มจำนวนเล็กน้อยหยด แอซีติกแอนไฮไดรด์ 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน หยด conc. $H_2SO_4$ 1 หยดให้ไหลไปตามข้างหลอดทดลองสังเกตสีของสารละลายภายใน 1 ชั่วโมง ถ้าเป็นสารประเภทสเตอรอยด์สีจะเปลี่ยนจาก ชมพู —> ม่วง —> น้ำเงิน —> เขียว ถ้าเป็นสารประเภทไตรเทอร์พีนอยด์สีจะเปลี่ยนจาก ชมพู —> ม่วง สารบางชนิดอาจให้สีโดยใช้เวลานานกว่า 1 ชั่วโมง

2.15.2 การทดสอบหมู่คาร์บอนิลของแอลดีไฮด์และคีโทน

นำสารประมาณ 1 มิลลิกรัม มาละลายในเอทานอล 0.5 $cm^3$ เติม 2,4 - dinitrophenylhydrazine 0.5 $cm^3$ เขย่าแรง ๆ ถ้าได้ตะกอนสีเหลือง เมื่อตั้งทิ้งไว้หรือเมื่ออุ่นบนเครื่องอังน้ำ แสดงว่าเป็นสารประเภทแอลดีไฮด์ หรือคีโทน

2.15.3 การทดสอบสมบัติการรีดิวซ์

นำสารประมาณ 1 มิลลิกรัม มาแขวนลอยในน้ำหยดสารละลาย 0.1 % $KMnO_4$ ทีละหยด เขย่า สังเกตการฟอกสีโดยเปรียบเทียบกับการทดสอบไร้สิ่งตัวอย่าง (blank test) ถ้าสีอ่อนลงหรือจางหายไป หรือได้ตะกอนสีน้ำตาลของแมงกานีสไดออกไซด์ แสดงว่ามีสมบัติในการรีดิวซ์

2.15.4 การทดสอบความไม่อิ่มตัว

นำสารประมาณ 1 มิลลิกรัม มาละลายในคาร์บอนเตตระคลอไรด์ 0.5 $cm^3$ เติมสารละลาย 3% โบรมีนในคาร์บอนเตตระคลอไรด์ทีละหยดพร้อมทั้งเขย่าถ้าสีของโบรมีนจางหายไปทุกครั้งที่หยด และไม่มีแก๊สไฮโดรเจนโบรไมด์เกิดขึ้น (ตรวจสอบโดยใช้กระดาษลิตมัสสีน้ำเงินชื้น รอรับที่ปากหลอด) แสดงว่ามีความไม่อิ่มตัว

2.15.5 การทดสอบหาหมู่ฟีนอล

นำสารประมาณ 1 มิลลิกรัม มาละลายในน้ำหรือเอทานอลหรือคลอโรฟอร์ม แล้วหยดสารละลาย 1% $FeCl_3$ (ในน้ำหรือคลอโรฟอร์ม) ทีละหยด เขย่าถ้าสีเปลี่ยนไปเป็นสีชมพูแดง ม่วงหรือเขียว แสดงว่าเป็นสารประเภทฟีนอล การทดสอบนี้ต้องเปรียบเทียบกับการทดลองไร้สิ่งตัวอย่าง

ผลการทดสอบสีและการทดสอบทางเคมีของสารที่แยกได้แสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลการทดสอบสีและการทดสอบทางเคมีของสารที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟี

| การทดลอง / ขวดลำดับที่ | สเตอรอยด์ | ไตรเทอร์พีนอยด์ | หมู่คาร์บอนิล | การรีดิวซ์ | ความไม่อิ่มตัว | หมู่ฟีนอล |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 - 3 | - | - | - | - | - | - |
| 10 - 15 | - | - | - | - | - | - |
| 19 - 25 | + | - | - | + | + | - |
| 40 - 41 | - | - | + | + | + | - |
| 42 - 46 ($R_f$ 0.82) | - | + | + | - | - | - |
| 42 - 46 ($R_f$ 0.68) | - | + | - | - | - | - |
| 50 - 52 | - | - | - | - | - | - |
| 74 - 79 | - | - | - | - | - | - |
| 80 - 81 | - | - | - | + | +เร็ว | - |
| 82 - 85 | + | - | - | + | + | - |
| 140 -150 | + | - | - | +เร็ว | + | - |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย