

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง

การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 1

สาร 1 เป็นผลึกอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว $77-78^{\circ}\text{C}$ TLC ให้ค่า R_f 0.68 (ซิลิกาเจล : 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 7) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญ ดังตารางที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1

แถบการดูดกลืนแสง(cm^{-1})	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3500-3200	ต่ำ, กว้าง	O-H สันแบบยืดของหมู่คาร์บอกซิลิก
2900-2850	สูง	C-H สันแบบยืดของ $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$
1705	สูง	C=O สันแบบยืดของหมู่คาร์บอกซิลิก
1465	ปานกลาง	C-H สันแบบงอของ $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$
1420	ปานกลาง	C-H-O สันแบบงอในระนาบ
1380	ปานกลาง	C-O สันแบบยืด
1020	ต่ำ	O-H สันแบบงอนอกระนาบ
740	ปานกลาง	C-H สันแบบโคลงของ $(-\text{CH}_2-)_n$, $n > 4$

จากข้อมูลของอินฟราเรดสเปกตรัม แสดงว่า สาร 1 เป็นสารประกอบประเภทกรดอินทรีย์โซ่ตรง จึงต้องเตรียมอนุพันธ์ เมทิลเอสเทอร์ ของสาร 1 ด้วย diazomethane ตามวิธีการหัวข้อ 2.6.1 ได้เป็นสาร 1A จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีต่อไป

เมื่อนำสาร 1A ไปวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ได้แก๊สโครมาโทแกรมให้ 5 พีค (รูปที่ 8) แสดงว่า สาร 1 เป็นของผสมกรดอินทรีย์โซ่ตรง 5 ชนิด มีค่า retention time แตกต่างกัน

ในการหาว่า กรดอินทรีย์โซ่ตรงเป็นชนิดใดนั้น ทำได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ดังรูปที่ 9 เปรียบเทียบ โดยใช้อนุพันธ์ เมทิลเอสเทอร์ ของกรดอินทรีย์โซ่ตรงมาตรฐาน 8 สาร ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดง อนุพันธ์ เมทิลเอสเทอร์ ของกรดอินทรีย์โซ่ตรงมาตรฐาน

ชื่อสารประกอบ	สูตร โมเลกุล	สูตร โครงสร้าง	มวลโมเลกุล
Heptadecanoic acid methyl ester	$C_{18}H_{36}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{14}-CH_2-COOCH_3$	284
Nonadecanoic acid methyl ester	$C_{20}H_{40}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{16}-CH_2-COOCH_3$	312
Heneicosanoic acid methyl ester	$C_{22}H_{44}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{18}-CH_2-COOCH_3$	340
Tricosanoic acid methyl ester	$C_{24}H_{48}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{20}-CH_2-COOCH_3$	368
Pentacosanoic acid methyl ester	$C_{26}H_{52}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{22}-CH_2-COOCH_3$	396
Hexacosanoic acid methyl ester	$C_{27}H_{54}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{23}-CH_2-COOCH_3$	410
Octacosanoic acid methyl ester	$C_{29}H_{58}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{25}-CH_2-COOCH_3$	438
Triacontanoic acid methyl ester	$C_{31}H_{62}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{27}-CH_2-COOCH_3$	466

จากค่า retention time ของสาร 1A ซึ่งมี 5 ค่า ทำให้สามารถหาได้ว่า สาร 1 ซึ่งเป็นของผสมของกรดอินทรีย์โซ่ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 22-26 คาร์บอน ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงค่า retention time และจำนวนคาร์บอนของสาร 1

retention time (นาที)	log retention time	พื้นที่ใต้พีค	จำนวนคาร์บอน	%ที่พบ
6.62	0.82	15493	22	4.39
8.14	0.91	13690	23	3.88
9.56	0.98	107989	24	30.59
11.64	1.06	42021	25	11.90
13.58	1.13	173788	26	49.23

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี และแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าสาร 1 เป็นของผสมของกรดอินทรีย์โซ่ตรง 5 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงกรดอินทรีย์โซ่ตรงชนิดต่างๆ ในสาร 1

ชื่อสารประกอบ	สูตร โมเลกุล	สูตร โครงสร้าง	มวลโมเลกุล	%ที่พบ
Dodecosanoic acid	$C_{22}H_{44}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{19}-CH_2-COOH$	340	4.39
Tricosanoic acid	$C_{23}H_{46}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{20}-CH_2-COOH$	354	3.88
Tetracosanoic acid	$C_{24}H_{48}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{21}-CH_2-COOH$	368	30.59
Pentacosanoic acid	$C_{25}H_{50}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{22}-CH_2-COOH$	382	11.90
Hexacosanoic acid	$C_{26}H_{52}O_2$	$CH_3-(CH_2)_{23}-CH_2-COOH$	396	49.23

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 2

สาร 2 เป็นผลึกอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 139-140°C TLC ให้ค่า R_f เป็น 0.640 (ซิลิกาเจล : 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) จากการทดสอบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ให้ผลบวกเป็นสารละลายสีเขียว แสดงว่าสาร 2 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 10) แสดงแถบการดูดกลืนแสง ซึ่งข้อมูลการดูดกลืนแสงแสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญ จากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 2

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3400	ปานกลาง(กว้าง)	O-H สันแบบยืดของ ROH
2950,2867	สูง	C-H สันแบบยืดของ $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$
1650	ต่ำ	C=C สันแบบยืด
1450	ปานกลาง	C-H สันแบบงอของ $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$
1375	ปานกลาง	C-H สันแบบงอในระนาบของ trisubstituted olefin
1050	ปานกลาง	C-O สันแบบยืดของ secondary alcohol
970	ปานกลาง	C-H สันแบบงอนอกระนาบของ trans-configuration
840,800	ต่ำ	C-H สันแบบงอนอกระนาบของ trisubstituted olefin

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 11 ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 0.68-2.28 (m, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$ และ $-\text{CH}-$), 3.50 (m, $-\text{C}-\text{OH}$), 5.10 (m, $-\text{CH}=\text{CH}-$) และ 5.35 (d, $-\text{CH}=\text{C}$)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 12 ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 11.83-56.84 (CH_3 , CH_2 , CH , C), 71.80 ($-\text{C}-\text{OH}$), 121.69 ($-\text{CH}=\text{C}$), 129.24, 138.27 ($-\text{CH}=\text{CH}-$) และ 140.71 ($-\text{CH}=\text{C}$)

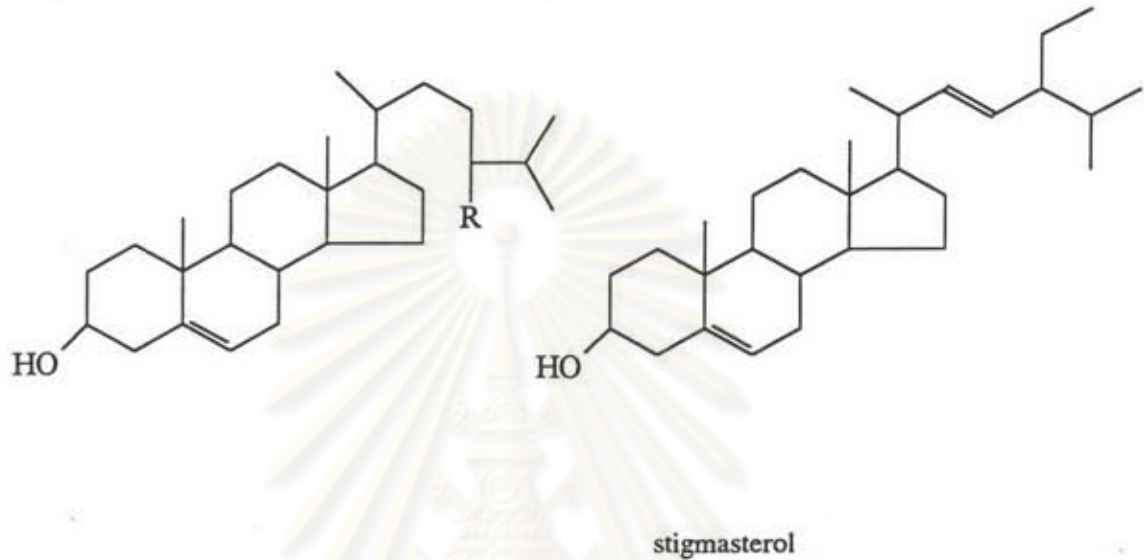
แก๊สโครมาโทแกรม เปรียบเทียบ สาร 2 กับสเตอรอยด์มาตรฐาน คือ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol มีค่า retention time (นาที) แสดงดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดง retention time ของสเตอรอยด์มาตรฐาน และสาร 2

สาร	retention time (นาที)	พื้นที่ใต้พีค	%ที่พบ
cholesterol	16.13	-	-
campesterol	21.8	-	-
stigmasterol	23.2	-	-
β -sitosterol	26.0	-	-
สาร 2	21.63	92547	15.60
	22.83	247536	41.73
	25.77	253171	42.67



จากตารางที่ 14 จะเห็นว่า สาร 2 มีค่า retention time ใกล้เคียงกับ campesterol , stigmasterol และ β -sitosterol ดังนั้น สาร 2 น่าจะเป็นของผสมสเตอรอยด์ ได้แก่ campesterol ,stigmasterol และ β -sitosterol มีสูตรโครงสร้าง ดังนี้



R = C_2H_5 , β -sitosterol

R = CH_3 , campesterol

เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของสาร 2 ได้ทำการเปรียบเทียบ คาร์บอน -13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2 กับ β -sitosterol และ stigmasterol (35-36) ดังแสดงในตารางที่ 15

ข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า สาร 2 เป็นของผสมสเตอรอยด์จริง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 คาร์บอน -13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ของ β -sitosterol , stigmasterol
เปรียบเทียบกับสาร 2

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (δ ppm)		
	β -sitosterol	stigmasterol	สาร 2
1	37.1	37.4	37.23
2	31.8	31.7	31.62
3	71.9	71.8	71.80
4	42.4	42.4	42.30
5	140.9	140.0	140.72
6	121.8	121.7	121.70
7	32.0	31.9	31.90
8	32.0	31.9	31.90
9	50.3	50.3	50.12
10	36.6	36.6	36.49
11	21.1	21.1	21.06
12	39.9	39.8	39.75
13	42.4	42.4	42.26
14	56.8	57.0	56.84
15	24.3	24.4	24.34
16	28.2	28.9	28.22,28.89
17	56.2	56.0	56.03
18	11.9	12.2	11.95,12.22
19	19.4	19.4	19.37
20	36.2	40.5	36.49,40.46

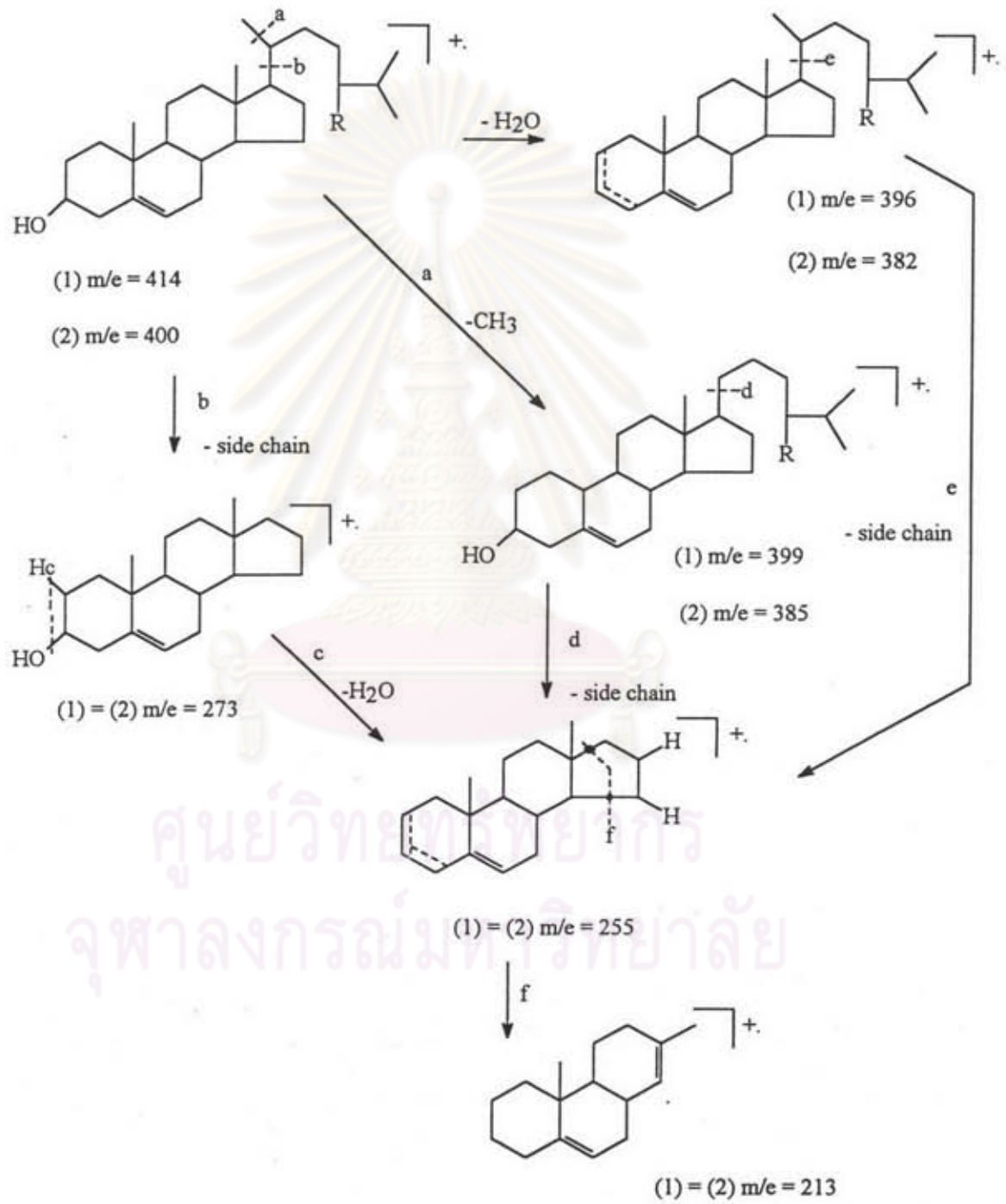
ตารางที่ 15 (ต่อ)

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (δ , ppm)		
	β -sitosterol	stigmasterol	สาร 2
21	19.1	21.1	19.01,21.18
22	34.0	138.4	36.49,138.28
23	29.3	129.4	29.13,129.25
24	50.3	51.3	51.21
25	26.2	31.9	25.37,31.90
26	18.8	19.0	19.01
27	19.8	21.1	19.79,21.18
28	23.1	25.4	23.04,25.37
29	11.9	12.0	11.83,12.02

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 13) แสดงให้เห็นว่าพีคที่ขึ้นสูงสุด ที่ m/e 414.0 เป็นของ β -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$) ส่วนที่ m/e 412.0 stigmasterol ($C_{29}H_{48}O$) และ 400.0 campesterol ($C_{28}H_{48}O$) แทบจะสังเกตไม่เห็น แต่ทราบว่าเป็นของผสมสเตอรอยด์โดยดูจาก แก๊สโครมาโทแกรม ซึ่งรูปแบบการแตกมวลของสาร 2 ที่เป็นไปได้ แสดงให้เห็น ดังแผนภาพที่ 3

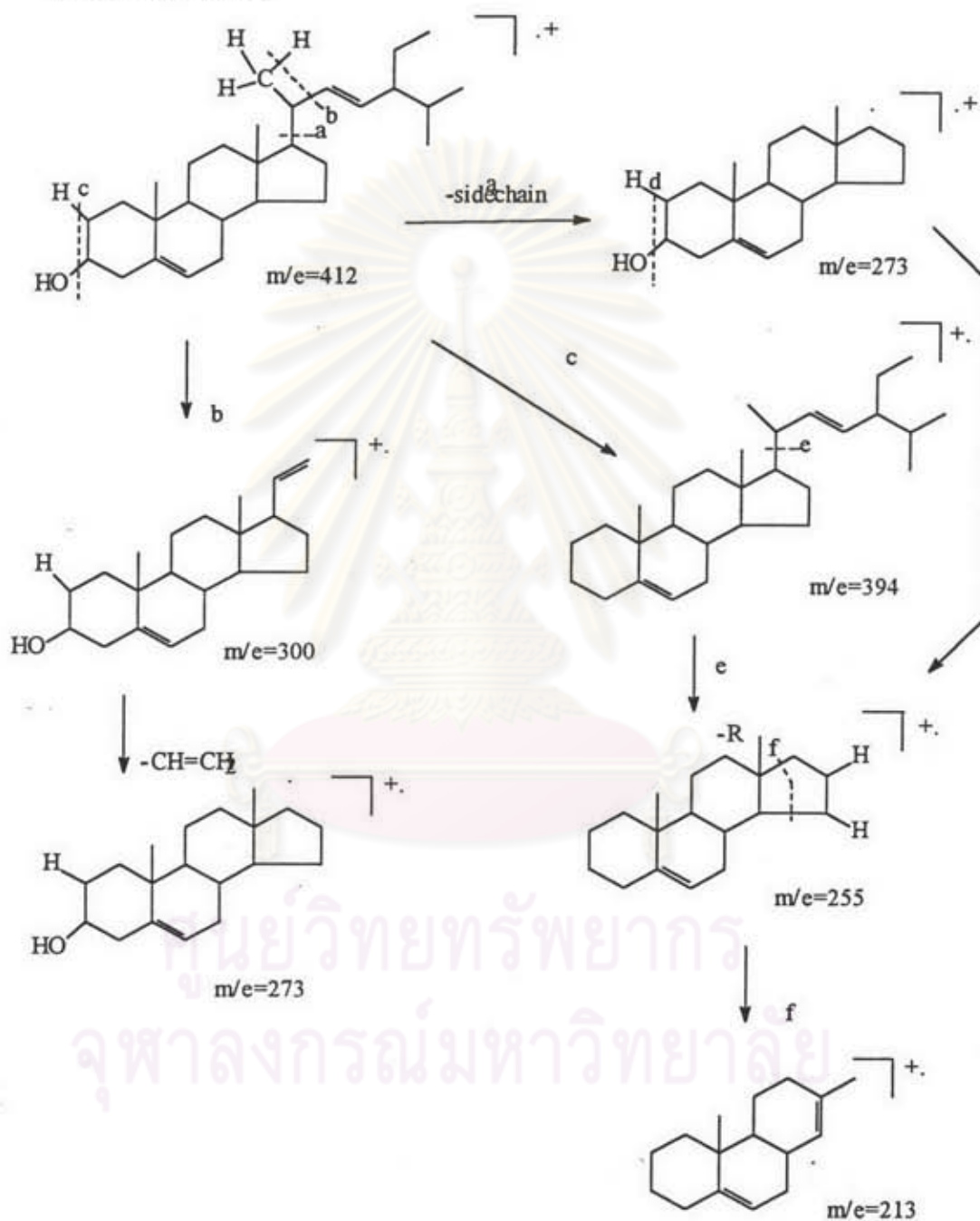
แผนภาพที่ 8 แสดงรูปแบบการแตกมวลที่เป็นไปได้ของสาร 2

สำหรับ β -sitosterol ($R = C_2H_5$) และ campesterol ($R = CH_3$)



แผนภาพที่ 3 (ต่อ)

สำหรับ stigmasterol



การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 3

สาร 3 เป็นผลึกอสัณฐานสีขาวหม่น จุดหลอมเหลว 240-245°C (สลายตัว) TLC ให้ค่า R_f 0.25 (ซิลิกาเจล : 10%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard คือให้สารละลายสีเขียว แสดงว่ามีโครงสร้างของสารประกอบสเตอรอยด์อยู่ในโมเลกุล

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 15) แสดงแถบการดูดกลืนแสง ซึ่งข้อมูลการดูดกลืนแสง แสดง ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญ จากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3600 - 3100	สูง , กว้าง	O-H สันแบบขี้ดของ R-OH
2934 , 2867	สูง	C-H สันแบบขี้ดของ $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$
1640	ปานกลาง	C=C สันแบบขี้ดของอัลคีน
1466	สูง	C-H สันแบบงออย่างมีสมมาตรของ $-\text{CH}_2-$, และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH_3
1367	ปานกลาง	C-H สันแบบงออย่างมีสมมาตรของ $-\text{CH}_3$
1250 , 1066 - 1020	ปานกลาง , สูง	C-O สันแบบขี้ด
890	ต่ำ	แอน โนเมอร์ริก โปรตอนที่เป็นบีต้า ไอโซเมอร์
820	ต่ำ	C-H สันแบบงอนอกระนาบของ trisubstituted vinyl

จากสเปกตรัมแสดงลักษณะของแถบการดูดกลืนแสง ของหมู่ไฮดรอกซี กว้างที่ $3600 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ และที่ $1250, 1066 - 1020 \text{ cm}^{-1}$ แสดง C-O สันแบบยึดของน้ำตาล ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไกลโคไซด์ และที่ 890 cm^{-1} แสดงแอนโนเมอร์ริกโปรตอน ที่มีทิศทางตามแนวแกนของน้ำตาลที่เป็นบีต้าไอโซเมอร์ (anomeric axial proton of β -sugar) (39) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสาร 3 พบว่าสาร 3 น่าจะเป็นไกลโคไซด์

นำสาร 3 มาทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ตามวิธีการในหัวข้อ 2.6.2 จะได้ส่วน aglycone (สาร 3A) และน้ำตาล (สาร 3B)

aglycone (สาร 3A) เป็นผลึกอสัณฐานสีขาว ตกผลึกด้วยเมทานอล จุดหลอมเหลว $133 - 135 ^\circ \text{C}$ มีค่า R_f เป็น 0.65 (ซิลิกาเจล : 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

จากการทดสอบทางเคมีด้วยปฏิกิริยา Liebermann - Burchard ให้ผลบวกเป็นสารละลายสีเขียว แสดงว่าสาร 3A เป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์

อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3A (รูปที่ 16) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญ ดังตารางที่ 17

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3A

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3600 - 3100	ปานกลาง , กว้าง	O-H สันแบบยืดของ R-OH
2934 , 2867	สูง	C-H สันแบบยืดของ $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$
1640	ต่ำ	C=C สันแบบยืดของอัลคีน
1466	ปานกลาง	C-H สันแบบยืดของ $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$
1367	ต่ำ	C-H สันแบบงออย่างมีสมมาตรของ $-\text{CH}_3$
1060 - 1040	ต่ำ	C-O สันแบบยืด และ O-H สันแบบงอ
970	ต่ำ	C-H สันแบบงอนอกระนาบของ $\text{R}_1\text{CH}=\text{CHR}_2$
820	ต่ำ	C-H สันแบบงอนอกระนาบของ $\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}_3$

อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3A จะคล้ายคลึงกับสาร 2 แสดงว่าสาร 3A น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ จึงทำการยืนยันสูตร โครงสร้างของสาร 3A ด้วยการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี เทียบกับสเตอรอยด์มาตรฐาน คือ campesterol , β -sitosterol และ stigmasterol มีค่า retention time (นาที) แสดงดังตารางที่ 18



ตารางที่ 18 แสดง retention time ของสเตอรอยด์มาตรฐาน และสาร 3A

สาร	retention time (นาที)	พื้นที่ใต้พีค	%ที่พบ
campesterol	19.21	-	-
stigmasterol	20.38	-	-
β -sitosterol	22.71	-	-
สาร 3A	20.28	225965	46.13
	22.98	263834	53.87

จากตารางที่ 18 จะเห็นว่าสาร 3A มีค่า retention time ใกล้เคียงกับ stigmasterol และ β -sitosterol ดังนั้น สาร 3A เป็นของผสมสเตอรอยด์ของ stigmasterol และ β -sitosterol

ชันน้ำตาล (สาร 3B) วิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาล โดยใช้เทคนิค HPLC เทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ภายใต้สภาวะเดียวกัน พบว่าสาร 3B และน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน มีค่า retention time (นาที) เป็น 3.53 ซึ่งเท่ากัน แสดงว่าสาร 3B คือ กลูโคส (รูปที่ 18)

เนื่องจากสาร 3 เป็นไกลโคไซด์ จึงยืนยันสูตรโครงสร้างด้วยการเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตได้เป็นสาร 3C

อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3C (รูปที่ 19) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญ
ดังตารางที่ 19

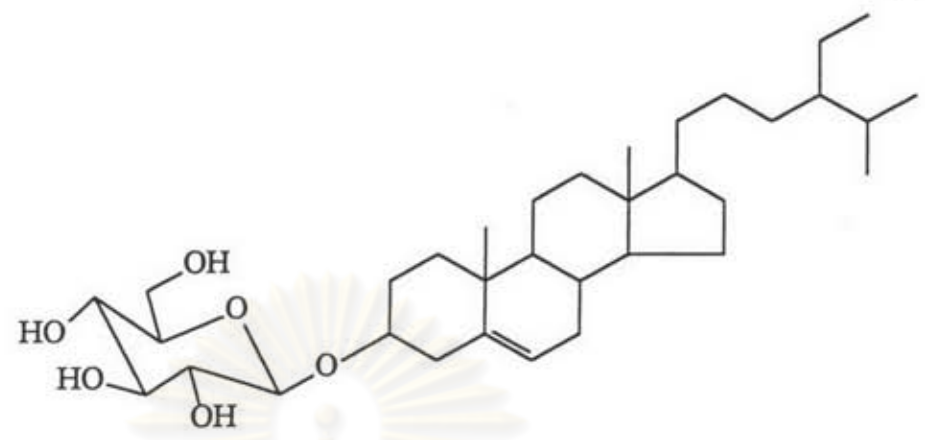
ตารางที่ 19 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัม ของสาร 3C

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	การแปลความหมาย
2850 , 2700	สูง	C-H สัมพันธของ $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$
1750	สูง	C=O สัมพันธของ CH_3COOR
1460 , 1450	ปานกลาง	C-H สัมพันธของ $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$
1380	ปานกลาง	C-H สัมพันธของ $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
1230 , 1060 , 1020	ปานกลาง	C-O สัมพันธของ CH_3COOR
820	ต่ำ	C-H สัมพันธของอนุกรมของ $\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}_3$

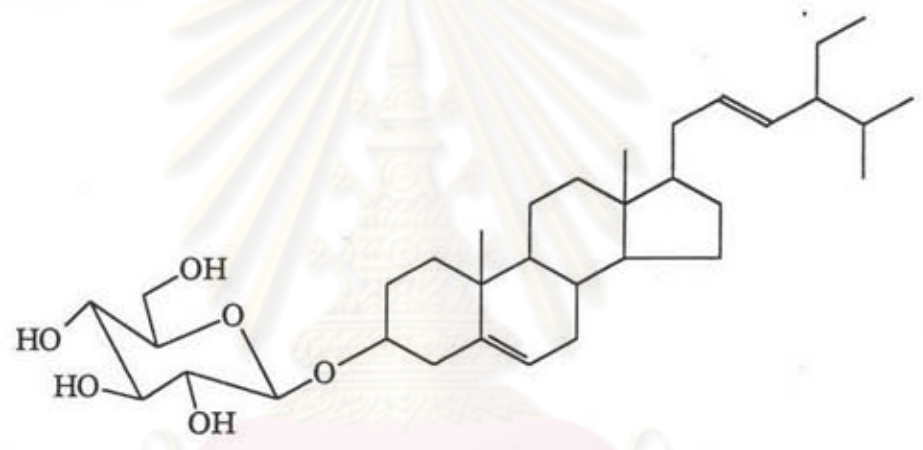
จากอินฟราเรดสเปกตรัม จะพบว่าแถบการดูดกลืนแสง แสดงลักษณะสำคัญของหมู่เอซิติลที่ 1750 , 1230 , 1060 และ 1020 cm^{-1} ในขณะที่แถบการดูดกลืนแสงที่ $3600 - 3100 \text{ cm}^{-1}$ ซึ่งแสดงหมู่ไฮดรอกซิล หายไป แสดงว่าสาร 3 สามารถเตรียมอนุพันธ์เอซิติลได้

จากข้อมูลทั้งหมดจึงสรุปว่า สาร 3 คือ β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside และ stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง ดังนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



β -sitosteryl-3-O- β -D-glucopyranoside



stigmasteryl-3-O- β -D-glucopyranoside

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 4

สาร 4 เป็นผลึกอสัณฐานสีขาวปนน้ำตาล จุดหลอมเหลว 258-260 °C (สลายตัว) TLC ให้ค่า R_f เป็น 0.69 (ซิลิกาเจล : 20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) เมื่อทดสอบหาฟลาโวนอยด์ตามวิธีการในหน้า 17 วิธี Cyanidin test ให้ผลการทดสอบเป็นบวก ให้สีแดง แสดงว่าสาร 4 น่าจะเป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์ ชนิดฟลาโวน หรือฟลาโวนอล [35]

อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 4 (รูปที่ 20) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญ ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 4

แถบการดูดกลืนแสง(cm^{-1})	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3340-3000	สูง(กว้าง)	O-H สันแบบยืด
2940	สูง	C-H สันแบบยืดของ- CH_3 ,- CH_2 -
1650	สูง	C=O สันแบบยืดของคาร์บอนิล ของ conjugated ketone
1594,1575,1500	สูง	C=C สันแบบยืดของแอโรมาติก
1450,1380	สูง,ปานกลาง	C-H สันแบบยืดของ- CH_3 ,- CH_2 -
1260	สูง	C-O สันแบบยืดไม่สมมาตรของ C-O-C
1090,1020	ปานกลาง	C-O สันแบบยืดแบบสมมาตรของ C-O-C
790	ปานกลาง	=C-H สันแบบงอนอกระนาบของ แอโรมาติก

โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 21,22 ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ ,ppm) ดังนี้

3.79 (3H,s, $-OCH_3$) , 6.02 (1H,s, $-OH$) , 6.85 (1H,s, $-CH=$) ,
6.94 (1H,d, $J=8.85$ Hz , $-CH=CH-$), 6.98 (1H,d, $J=8.85$ Hz , $-CH=CH-$),
7.50 (1H,d, $J=8.85$ Hz , $-CH=CH-$), 7.96 (1H,d, $J=8.85$ Hz , $-CH=CH-$),
8.35 (1H,s, $-CH=$) และ 10.75 (1H,br, $-OH$)

จากโปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม จะปรากฏสัญญาณของโปรตอนหมู่เมทอกซีที่ (δ ,ppm) 3.79 , สัญญาณโปรตอนของวงแหวนโรมาติกที่ (δ ,ppm) 6.85 ,6.94 ,6.98 ,7.50 ,7.96 และ 8.35ตามลำดับ สัญญาณของหมู่ไฮดรอกซีที่ (δ ,ppm) 6.02 และ 10.75

จากการทำ deuterium exchange โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 23) ปรากฏว่า สัญญาณที่ (δ ,ppm) 6.02 และ 10.75 หายไป แสดงว่าสัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 6.02 และ 10.75 คือหมู่ไฮดรอกซี

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 24,25 และ 29 ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ ,ppm) ดังนี้ 55.11 ,102.08 ,113.58 ,115.17 ,116.56 ,123.12 ,127.25 ,130.03 , 146.86 ,146.96 ,153.08 ,157.37 ,157.42 ,158.94 ,162.59 และ 174.56 มีทั้งหมด 16 สัญญาณ

จากคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ (δ ,ppm) 55.11 ซึ่งเป็นสัญญาณเฉพาะของ sp^3 คาร์บอนอะตอมที่ติดอยู่กับอะตอมที่สามารถดึงอิเล็กตรอน (electronegative atom) ซึ่งในที่นี้น่าจะเป็นคาร์บอนของหมู่เมทอกซี ($-OCH_3$) ที่ (δ ,ppm) 102.08 ,113.58 ,115.17 ,116.56 ,123.12 ,127.25 ,130.03 ,146.86 ,146.96 ,153.08 ,157.37 , 157.42 ,158.94 , และ 162.59 เป็นสัญญาณเฉพาะของ sp^2 คาร์บอนอะตอมในวงแหวนโรมาติก ที่ (δ ,ppm) 174.56 เป็นสัญญาณเฉพาะของคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิล ชนิด conjugated ketone และลักษณะเช่นนี้ เป็นลักษณะเฉพาะของคาร์บอนิล ที่ตำแหน่ง C-4 ของสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ ชนิดฟลาโวน หรือฟลาโวนอล [41]

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 26) ปรากฏพีคไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ m/e (% relative intensity) ดังนี้ 300 (22.0) ,282 (32.0) ,269 (18.0) ,268 (100.0) ,253 (15.0) ,136 (3.0) ,133 (5.0) และ 132 (53.0) ตามลำดับ

DEPT-135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 27,29 ปรากฏสัญญาณ -CH= (เมไทม์คาร์บอน) และ -CH₃ (เมทิลคาร์บอน) ด้านบน (up phase) 7 สัญญาณ คือที่ (δ ,ppm) 55.11 ,102.08 ,113.58 ,115.17 ,127.25 ,130.03 และ 153.08 แต่ไม่พบสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ -CH₂- (เมทิลีนคาร์บอน)

DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 28,29 ปรากฏสัญญาณของ-CH= (เมไทม์คาร์บอน) 6 สัญญาณ คือที่ (δ ,ppm) 102.08 ,113.58 ,115.17 ,127.25 ,130.03 และ 153.08 เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ DEPT-135 และ DEPT-90 แล้ว จะทำให้ทราบว่า มีหมู่ -CH₃ 1 หมู่คือที่ 55.11 ซึ่งน่าจะเป็น -CH₃ ที่เกาะอยู่กับหมู่เมทอกซี

เมื่อนำข้อมูลของ DEPT-135 ,DEPT-90 ไปเปรียบเทียบกับ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ทำให้สามารถหาได้ว่า ควอเตอร์นารีคาร์บอน มี 9 อะตอม ปรากฏสัญญาณที่ (δ ,ppm) ดังนี้ 116.56 ,123.12 ,146.86 ,146.96 ,157.37 ,157.42 ,158.94 ,162.59 และ 174.56 ตามลำดับ

H-H COSY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 30,31 แสดงให้เห็นโปรตอนที่อยู่ติดกัน 2 คู่ ที่ (δ ,ppm) ดังนี้ 6.94 กับ 7.96 และ 6.98 กับ 7.50

H-H NOESY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 32,33 แสดงให้เห็นถึงการ coupling กันของโปรตอนที่อยู่ใกล้กัน ที่ (δ ,ppm) ดังนี้ 3.79 coupling กับ 6.98 , 6.98 coupling กับ 7.50 ,และ 6.94 coupling กับ 7.96

C-H COSY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 34,35 พบลักษณะที่สำคัญ แสดงดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดง C-H COSY ของสาร 4

ค่า chemical shift ของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)	จำนวนโปรตอน	ค่า chemical shift ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)
3.79	3	55.11
6.85	1	102.08
6.94	1	115.17
6.98	1	113.58
7.50	1	130.03
7.96	1	127.25
8.35	1	153.08

จากตารางที่ 21 สรุปได้ดังนี้

1. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 55.11 กับ 3.79 เป็นเมทิลคาร์บอนของหมู่เมทอกซี
2. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 102.08 กับ 6.85 เป็นเมทไธนคาร์บอนในวงแอโรมาติก
3. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 115.17 กับ 6.94 และ 127.25 กับ 7.96 เป็น C-H คู่ที่อยู่ติดกัน และมีค่า J (coupling constant) เท่ากัน คือ เท่ากับ 8.85 Hz และเป็นเมทไธนคาร์บอนในวงแอโรมาติก
4. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 113.58 กับ 6.98 และ 130.03 กับ 7.50 เป็น C-H คู่ที่อยู่ติดกันและมีค่า J (coupling constant) เท่ากัน คือ เท่ากับ 8.85 Hz และเป็นเมทไธนคาร์บอนในวงแอโรมาติก
5. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 153.08 กับ 8.35 เป็นเมทไธนคาร์บอนในวงแอโรมาติก

HMQC Inverse Probe spectrum (DMSO- d_6) ของสาร 4 รูปที่ 36,37 และ 38 แสดงความสัมพันธ์ของ C-H เหมือนกับ C-H COSY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ดังตารางที่ 22



ตารางที่ 22 แสดงความสัมพันธ์ของค่า chemical shift ของ HMQC Inverse Probe spectrum ของสาร 4

ค่า chemical shift ของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)	ค่า chemical shift ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)
3.79	55.11
6.85	102.08
6.94	115.17
6.98	113.58
7.50	130.03
7.96	127.25
8.35	153.08

จากตารางที่ 22 สรุปได้ดังนี้

- 1.สัญญาณโปรตอน (δ ,ppm) 3.79 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 55.11 เป็นเมทิลคาร์บอนที่เกาะกับหมู่เมทอกซี
- 2.สัญญาณโปรตอน (δ ,ppm) 6.85 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 102.08 เป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก
- 3.สัญญาณโปรตอน (δ ,ppm) 6.94 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 115.17 เป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก
- 4.สัญญาณโปรตอน (δ ,ppm) 6.98 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 113.58 เป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก
- 5.สัญญาณโปรตอน (δ ,ppm) 7.50 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 130.03 เป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก

6. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 7.96 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 127.25
เป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก

7. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 8.35 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 153.08
เป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก

HMBC Inverse Probe spectrum (DMSO- d_6) ของสาร 4 รูปที่ 39,40 และ 41
แสดงความสัมพันธ์ของ C-H ดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ของค่า chemical shift ของ HMBC Inverse Probe
spectrum ของสาร 4

ค่า chemical shift ของ โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)	ค่า chemical shift ของ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)
3.79	55.11(s)
6.85	102.08(s),162.59(s),115.17(s),157.37(s)
6.94	115.17(s),102.08(s),116.56(s),162.59(w), 157.37(w)
6.98	113.58(s),158.94(s),123.12(s),157.42(w)
7.50	130.03(s),158.94(s),123.12(s),113.58(s)
7.96	127.25(s),115.17(s),157.37(s),162.59(s), 174.56(s)
8.35	153.08(s),123.12(s),157.42(s),174.56(s)

จากตารางที่ 23 สรุปได้ดังนี้

1. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 3.79 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 55.11 เป็นเมทิลคาร์บอนที่เกาะกับหมู่เมทอกซี

2. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 6.85 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 102.08 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 162.59 ,115.17 และ 157.37

3. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 6.94 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 115.17 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 102.08 ,116.56 ,162.59 และ 157.37

4. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 6.98 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 113.58 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 158.94 ,123.12 และ 157.42

5. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 7.50 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 130.03 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 158.94 ,123.12 และ 113.58

6. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 7.96 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 127.25 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 115.17 ,157.37 ,162.59 และ 174.56

7. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 8.35 คู่กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 153.08 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 123.12 ,157.42 และ 174.56

จากการทำ N.O.E. Difference spectra ที่มีการ irradiate ที่ตำแหน่ง เมทิลคาร์บอน 5 ตำแหน่ง คือที่โปรตอน chemical shift (δ ,ppm) 6.94 ,7.96 ,7.50 ,6.98 และ 6.85 จะพบลักษณะต่างๆ ดังนี้

1. ที่ตำแหน่ง โปรตอน chemical shift (δ ,ppm) 6.94 เมื่อ irradiate ที่ตำแหน่งนี้ มีพีค 7.96 สูงขึ้น (รูปที่ 42,47) แสดงว่าโปรตอนที่ 7.96 อยู่ในระนาบเดียวกันกับโปรตอนที่ 6.94 และอยู่ติดกัน

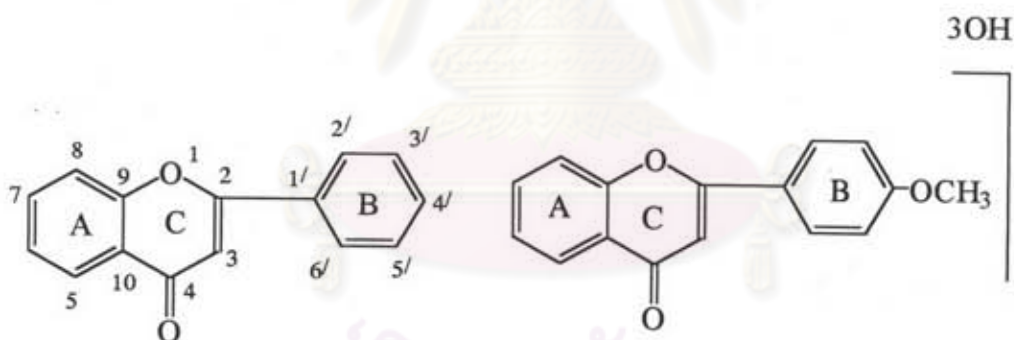
2. ที่ตำแหน่ง โปรตอน chemical shift (δ ,ppm) 7.96 เมื่อ irradiate ที่ตำแหน่งนี้ มีพีค 6.94 สูงขึ้น (รูปที่ 43,47) แสดงว่าโปรตอนที่ 6.94 อยู่ในระนาบเดียวกันกับโปรตอนที่ 7.96 และอยู่ติดกัน

3. ที่ตำแหน่ง โปรตอน chemical shift (δ ,ppm) 7.50 เมื่อ irradiate ที่ตำแหน่งนี้ มีพีค 6.98 สูงขึ้น (รูปที่ 44,47) แสดงว่ามีโปรตอนที่ 6.98 อยู่ในระนาบเดียวกันกับโปรตอนที่ 7.50 และอยู่ติดกัน

4. ที่ตำแหน่ง โปรตอน chemical shift (δ ,ppm) 6.98 เมื่อ irradiate ที่ตำแหน่งนี้ มีพีค 7.50 และ 3.79 สูงขึ้น (รูปที่ 45,47) แสดงว่ามีโปรตอนที่ 7.50 อยู่ในระนาบเดียวกันกับโปรตอนที่ 6.98 และอยู่ติดกัน ส่วนโปรตอนที่ 3.79 ของหมู่เมทิล อยู่ในระนาบเดียวกับโปรตอนที่ 6.98

5. ที่ตำแหน่ง โปรตอน chemical shift (δ ,ppm) 6.85 เมื่อ irradiate ที่ตำแหน่งนี้ ไม่มีพีคใดสูงขึ้นเลย (รูปที่ 46,47) แสดงว่าไม่มีโปรตอนใดอยู่ในระนาบ และอยู่ติดกับโปรตอนที่ 6.85

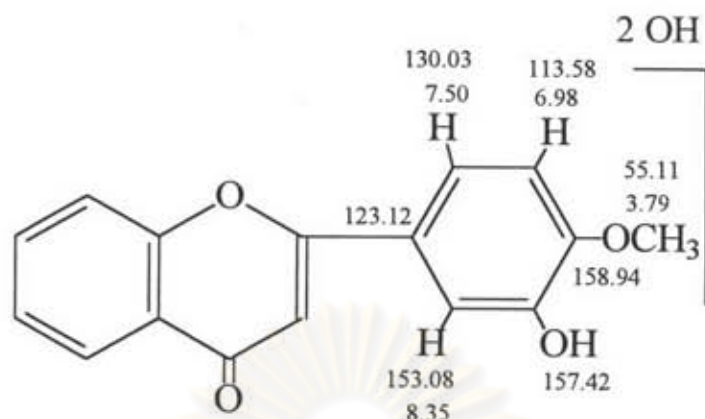
จากผลการทดสอบปฏิกิริยาเคมีด้วย Cyanidin test และจากค่า chemical shift ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ สเปกตรัม จะพบค่า chemical shift ที่ 174.56 ppm เป็นคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิล ชนิด conjugated ketone ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ชนิด ฟลาโวนอล ซึ่งมีสูตรโครงสร้างโดยทั่วไป แสดงดังข้างล่าง



ข้อมูลจาก C-H COSY spectrum และ HMQC Inverse Probe spectrum ทำให้ทราบว่า มีเมทิลคาร์บอน 6 ตำแหน่ง จากคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ สเปกตรัม มีเมทอกซี 1 ตำแหน่ง และข้อมูลจาก HMBC Inverse Probe spectrum การทำ N.O.E. Difference irradiate ที่ 6.98 ppm จะเห็นโปรตอนของหมู่เมทอกซีขึ้นให้เห็นอย่างชัดเจน แสดงว่าที่ตำแหน่ง 4' มีหมู่เมทอกซีเกาะอยู่ และตำแหน่งที่เหลือ จะเป็นหมู่ไฮดรอกซี 3 หมู่ ซึ่งสูตรโมเลกุลของสาร 4 คือ $C_{16}H_{12}O_6$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 300

จากข้อมูลของ H-H COSY ทำให้ทราบว่าโปรตอนที่ (δ ,ppm) 6.98 อยู่ติดกับโปรตอน
 ที่ (δ ,ppm) 7.50 ข้อมูลของ C-H COSY ,HMQC Inverse Probe spectrum ทำให้ทราบว่า ค่า
 โปรตอน (δ ,ppm) 6.98 คู่กับคาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 113.58 และโปรตอน (δ ,ppm) 7.50
 คู่กับคาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 130.03 ข้อมูลจากการทำ N.O.E. Difference irradiate ที่โปรตอน
 6.98 ppm มีพีคที่สูงขึ้นคือ 7.50 และ 3.79 ซึ่งเป็นโปรตอนที่อยู่ติดกัน และเป็นโปรตอนของหมู่
 เมทอกซี ทำให้กำหนดค่า chemical shift ของโปรตอนและคาร์บอน-13 ที่ตำแหน่ง 2', 3' ได้
 คือมีค่า C-H (δ ,ppm) เป็น 130.03 , 7.50 และ 113.58 , 6.98 ตามลำดับ เมื่อทำ N.O.E.
 Difference irradiate ที่ 7.50 ppm พบว่าพีค 6.98 และ 8.35 ppm สูงขึ้น แสดงว่าโปรตอน 6.98
 ppm อยู่ติดกับโปรตอนที่ 7.50 ppm และโปรตอนที่ 8.35 ppm อยู่ในระนาบเดียวกับโปรตอนที่
 7.50 ppm ซึ่งควรจะอยู่ตำแหน่งที่ 6' ข้อมูลจาก HMBC Inverse Probe spectrum จากค่าของ
 โปรตอน (δ ,ppm) ที่ 2', 3', 6' ที่ coupling กับคาร์บอน-13 ที่ค่า chemical shift ต่างๆ ทำให้
 ทราบว่าตำแหน่งที่ 5' ควรจะมีหมู่ไฮดรอกซีเกาะอยู่ และมีค่า chemical shift ของคาร์บอน-13 เป็น
 157.42 ppm เป็นควอเตอร์นารีคาร์บอน ส่วนที่ตำแหน่ง 1' และ 4' ซึ่งเป็นควอเตอร์นารีคาร์บอน
 มีค่า chemical shift (δ ,ppm) เป็น 123.12 และ 158.94 ดังนั้น วง B สามารถกำหนดตำแหน่ง
 chemical shift ของ C-H ได้ดังรูป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

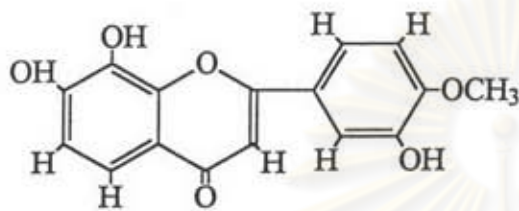


พิจารณาวง A และ C ที่เหลือ ตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 ของวง A ไม่ควรมีหมู่ไฮดรอกซีเกาะ เพราะถ้ามีหมู่ไฮดรอกซีเกาะ จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิล ซึ่งจะให้ค่าโปรตอน chemical shift (δ ,ppm) ที่ประมาณ 12-14 [41] แต่จากข้อมูลของสาร 4 ไม่มีค่า chemical shift ที่ตำแหน่งนี้ ดังนั้นตำแหน่งที่ 5 ควรมีไฮโดรเจนเกาะ เป็นเมทิลคาร์บอน

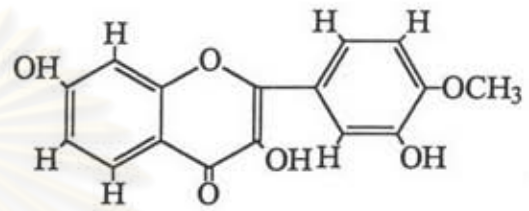
จากการค้นเอกสารอ้างอิงเทียบดูสารประกอบฟลาโวนอยด์ ชนิดฟลาโวน ที่มีวง A ใกล้เคียงกับวง A ของสาร 4 คือ Flavone [42] ตำแหน่ง C-5 ของ Flavone มีค่า chemical shift ของคาร์บอน-13 เป็น 125.7 ppm ซึ่งสาร 4 มีค่า chemical shift ของ C-H เป็น 125.25 ,7.96 ppm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ Flavone แสดงว่า ตำแหน่ง C-5 ของสาร 4 ในวง A มีค่า chemical shift ของ C-H เป็น 125.25 ,7.96 ppm และจากข้อมูลของ H-H COSY พบว่าโปรตอนที่ 7.96 ppm อยู่ติดกับโปรตอนที่ 6.94 ppm แสดงว่า ตำแหน่งที่ 6 ของวง A มีค่า chemical shift ของ C-H เป็น 115.17 ,6.94 ppm ตามลำดับ

จากการค้นเอกสารอ้างอิง ของ 7,8 -Dihydroxy flavone [43] ค่าโปรตอน chemical shift (δ ,ppm) ของ C-5 เท่ากับ 7.90 (1H ,d,J=9 Hz) และ C-6 เท่ากับ 7.08 (1H ,d,J=9 Hz) ส่วนสาร 4 มีค่าโปรตอน chemical shift (δ ,ppm) ของ C-5 เท่ากับ 7.96 (1H ,d,J=8.85 Hz) และ C-6 เท่ากับ 6.94 (1H ,d,J=8.85 Hz) ซึ่งมีค่าสอดคล้องกัน

ส่วนวง A ตำแหน่งที่ 7 ควรมีหมู่ไฮดรอกซีเกาะแน่นอน เพราะค่าต่างๆสอดคล้องกัน
 ยังเหลือไฮโดรเจนของเมโทน์คาร์บอน และหมู่ไฮดรอกซีซึ่งอาจจะเกาะอยู่ที่ตำแหน่ง 3 หรือ 8 ก็ได้
 ดังนั้นสูตรโครงสร้างของสาร 4 ที่เป็นไปได้จะมี 2 สูตร ดังรูปด้านล่าง

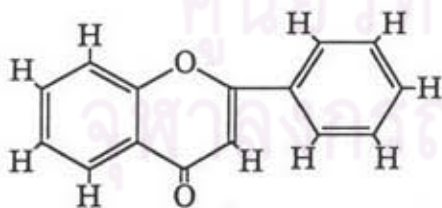


สูตร I

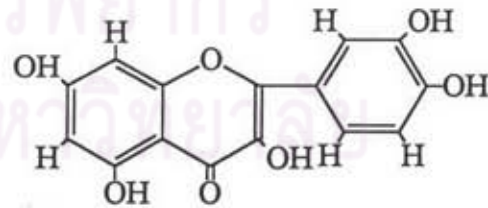


สูตร II

ข้อมูลจาก HMBC Inverse Probe spectrum ทำให้ทราบความสัมพันธ์ของการเกิด
 coupling ของโปรตอนกับคาร์บอนที่ค่า chemical shift ต่างๆ ทำให้ทราบว่าสาร 4 ควรมีสูตรโครง
 สร้างดังสูตรที่ II และสามารถกำหนดค่า chemical shift ของ C-H ที่ตำแหน่งต่างๆ โดยเปรียบ
 เทียบกับสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร 4 คือ Flavone และ Quercetin [42] จะกำหนดค่า
 chemical shift ของ C-H ได้ดังตารางที่ 24



Flavone

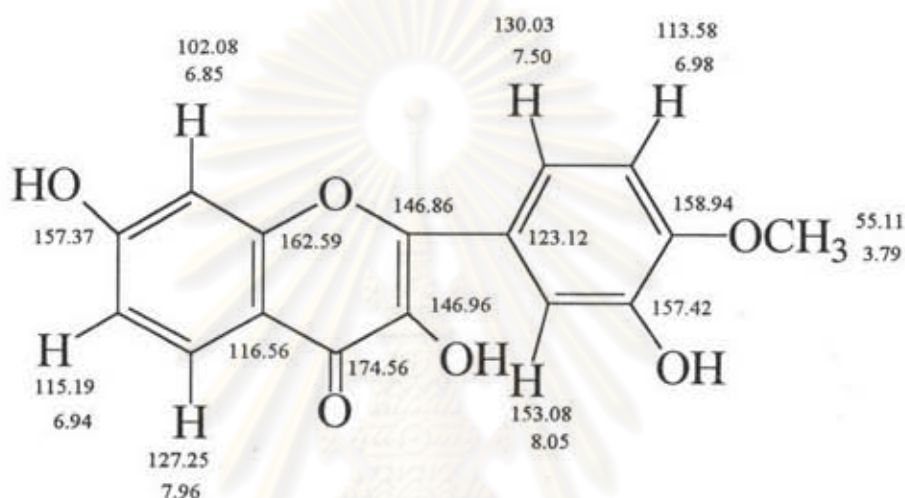


Quercetin

ตารางที่ 24 แสดงค่า chemical shift ของสาร 4 เปรียบเทียบกับ Flavone และ Quercetin

ตำแหน่ง คาร์บอน	chemical shift (δ ,ppm)			
	Flavone	Quercetin	สาร 4	
	คาร์บอน-13	คาร์บอน-13	คาร์บอน-13	โปรตอน
2	163.2	146.9	146.86	-
3	107.6	135.8	146.96	-
4	178.4	175.9	174.56	-
5	125.7	156.2	127.25	7.96
6	125.2	98.3	115.19	6.94
7	133.7	164.0	157.37	-
8	118.1	93.5	102.08	6.85
9	156.3	160.8	162.59	-
10	124.0	103.1	116.56	-
1'	131.8 ✓	122.1	123.12	-
2'	✓126.3	115.2	130.03	7.50
3'	✓129.0 ✓	145.1	113.58	6.98
4'	131.6 ✓	147.7	158.94	-
5'	✓129.0 ✓	115.7	157.42	-
6'	✓126.3	120.1	153.08	8.35
-OCH ₃	-	-	55.11	3.79

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี จึงเสนอ สูตรโครงสร้างของสาร 4 ค่า chemical shift และแสดงความสัมพันธ์ของการ coupling ของโปรตอน กับคาร์บอนที่ตำแหน่งต่างๆที่เป็นไปได้ ดังรูปข้างล่าง

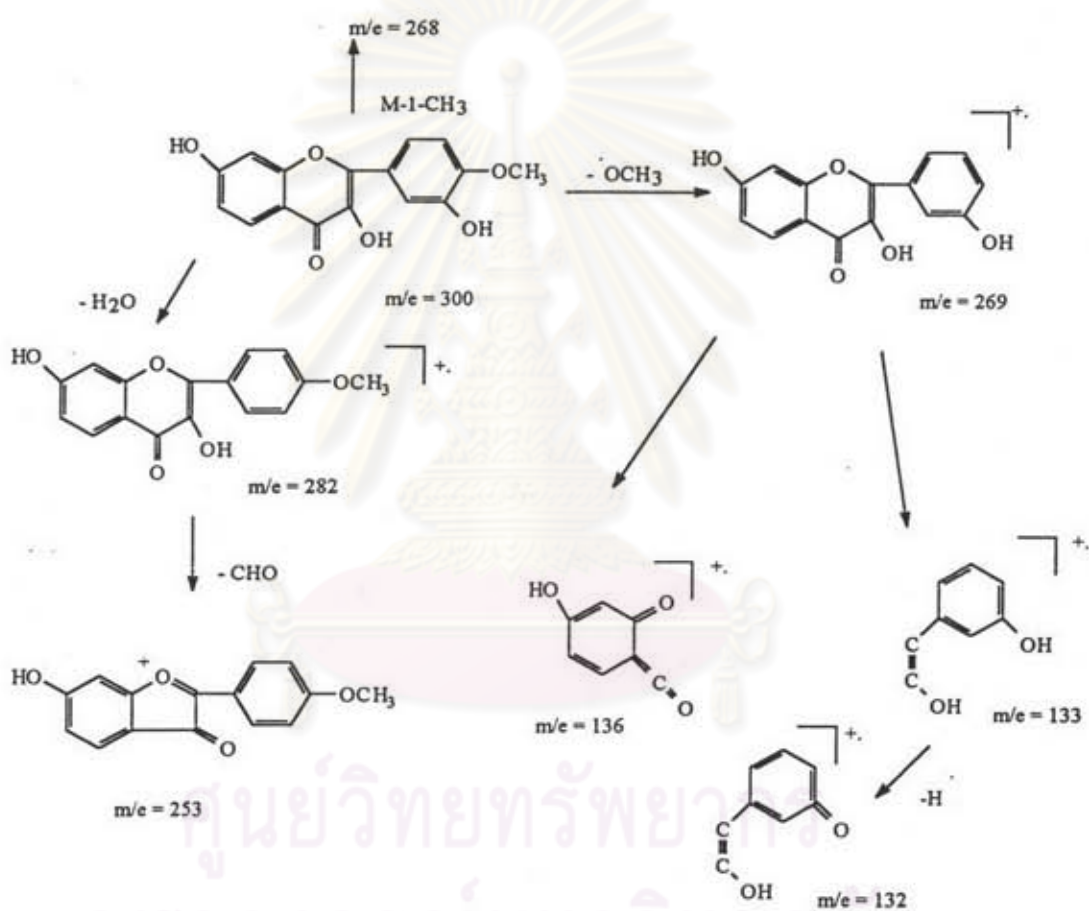


สาร 4 มีชื่อสามัญว่า 3,7,5'-trihydroxy-4'-methoxyflavone (4'-methoxyfisetin) หรือ 2-(5-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one

จากการค้นเอกสารอ้างอิง [44,45] พบว่าสาร 4 พบในส่วนสกัดของ Quebracho tannin แต่ยังไม่มียข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่สมบูรณ์ งานวิจัยนี้จึงเป็นการเพิ่มเติมข้อมูลให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 26) มีรูปแบบการแตกโมเลกุลของสาร 4 ที่เป็นไปได้ แสดงดังแผนภาพที่ 4

แผนภาพที่ 4 แสดงรูปแบบการแตกมวลที่เป็นไปได้ของสาร 4



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 5

สาร 5 เป็นผลึกอสัณฐานสีขาวปนน้ำตาล จุดหลอมเหลว 208 - 212 °C TLC ให้ค่า R_f เป็น 0.22 (ซิลิกาเจล : 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) เมื่อทดสอบหาฟลาโวนอยด์ ตามวิธีการ ในหน้า 17 วิธี Cyanidin test พบว่าให้ผลทดสอบบวก เป็นไกลโคไซด์ของฟลาโวนอยด์ [85]

อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 5 (รูปที่ 48) แสดงการดูดกลืนแสงที่สำคัญ ดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 5

แถบการดูดกลืนแสง (cm^{-1})	ความเข้ม	การแปลความหมาย
3600 - 3100	สูง (กว้าง)	O-H สั่นแบบยืด
2900	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$
1650	สูง	C=O สั่นแบบยืดของคาร์บอนิลของ conjugated ketone
1550	สูง	C=C สั่นแบบยืดของแอโรมาติก
1450 ,1380	สูง ,ปานกลาง	C-H สั่นแบบยืดของ $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$
1260	สูง	C-O สั่นแบบยืดไม่สมมาตรของ C-O-C
1060 -1030	สูง	C-O สั่นแบบยืดแบบสมมาตรของ C-O-C
891	ต่ำ	แอนโนเมอร์ริก โปรตอนที่เป็น บีต้าไอโซเมอร์
800	ต่ำ	=C-H สั่นแบบงอนอกระนาบของ แอโรมาติก

โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 49 ,50 ,51 ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ ,ppm) ดังนี้

3.1 - 3.5 (m ,โปรตอนของน้ำตาลที่เกาะ) , 3.78 (3H ,s , -OCH₃) ,5.1 (1H , ของน้ำตาล) ,6.0 (1H ,s , -OH) ,6.98 (1H ,d,J =8.85 Hz , -CH=CH-) ,7.15 (1H ,d,J =8.85 Hz , -CH=CH-) , 7.22 (1H ,s , -CH=) ,7.52 (1H ,d,J =6.72 Hz, -CH=CH-) ,8.05 (1H,d,J =8.85 Hz , -CH=CH-), 8.40 (1H,s,-CH=)

จากโปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม จะปรากฏสัญญาณโปรตอนของน้ำตาลที่ (δ ,ppm) 3.1 - 3.5 และ 5.1 สัญญาณโปรตอนของหมู่เมทอกซีที่ (δ ,ppm) 3.78 สัญญาณโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซีที่ (δ ,ppm) 6.0 สัญญาณโปรตอนของวงเอโรมาติกที่ (δ ,ppm) 6.98 ,7.15 ,7.22 ,7.52 , 8.05 และ 8.40 ตามลำดับ

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 52 ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ ,ppm) ดังนี้

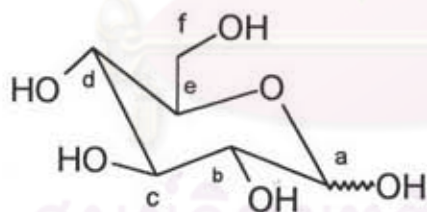
55.23 ,60.77 ,69.77 ,73.21 ,76.52 ,77.24 ,100.24 ,103.53 ,113.74 ,115.74 ,118.55 ,123.50 ,127.05 ,130.15 ,147.04 ,153.95 ,157.13 ,159.13 ,161.54 และ 174.83

จากคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่าค่า chemical shift ของคาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 60.77 ,69.77 ,73.21 ,76.52 ,77.24 และ 100.14 เป็นคาร์บอน-13 ของส่วนน้ำตาล ซึ่งใกล้เคียงกับของกลูโคส ซึ่งอยู่ในรูป β -anomer [46] แสดงว่าส่วนน้ำตาลของสาร 5 คือ กลูโคส ซึ่งเปรียบเทียบค่าคาร์บอน-13 chemical shift (δ ,ppm) ที่ตำแหน่งต่างๆ แสดงดังตารางที่ 26

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบค่าคาร์บอน-13 chemical shift ของ β -D-glucopyranose กับ ส่วนน้ำตาลของสาร 5

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (δ ,ppm)	
	β -D-glucopyranose	ส่วนน้ำตาลของสาร 5
a	97.1	100.14
b	75.6	73.21
c	77.3	76.52
d	71.2	69.77
e	77.3	77.24
f	62.4	60.77



รูปแสดง โครงสร้างของ D-glucopyranose

จากค่า chemical shift ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม จะพบว่า สัญญาณคาร์บอนที่ chemical shift (δ ,ppm) 55.23 เป็นสัญญาณเฉพาะของ sp^3 คาร์บอนอะตอม เป็นคาร์บอนของหมู่เมทอกซี สัญญาณคาร์บอนที่ chemical shift (δ ,ppm) 103.53 ,113.74 ,115.74 ,118.55 ,123.50 ,127.05 ,130.15 ,147.04 ,153.95 ,157.13 ,159.13 และ 161.54 เป็นสัญญาณเฉพาะของ sp^2 คาร์บอนอะตอมในวงแอโรมาติก และมีสัญญาณที่ซ้อนทับกัน 2 ตำแหน่งคือที่ chemical shift (δ ,ppm) 147.04 และ 157.13 เป็นควอเตอร์นารีคาร์บอน ส่วนสัญญาณที่ chemical shift (δ ,ppm) 174.83 เป็นคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิล ชนิด conjugated ketone ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของคาร์บอนิลที่ C-4 ของสารประกอบฟลาโวนอยด์ ชนิดฟลาโวนหรือฟลาโวนอล [41]

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 53) ปรากฏพีคไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ m/e (%relative intensity) ดังนี้ 282 (20.0) เป็นของ aglycone ที่น้ำตาลหลุดออกไป 268 (100.00) ,253 (23.00) , 133 (12.0) และ 132 (90.0) ซึ่งรูปแบบการแตกโมเลกุลจะเหมือนกับสาร 4

DEPT-135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 54 ,56 ปรากฏสัญญาณ-CH= (เมไธน์คาร์บอน) และ -CH₃ (เมทิลคาร์บอน) ด้านบน (up phase) 12 สัญญาณคือที่ chemical shift (δ ,ppm) 55.23 ,69.77 ,73.21 ,76.52 ,77.24 ,100.14 ,103.53 ,113.74 ,115.74 , 127.05 ,130.15 และ 153.95 ตามลำดับ และสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ -CH₂- (เมทิลีนคาร์บอน) 1 สัญญาณที่ chemical shift (δ ,ppm) 60.77

DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 55 ,56 ปรากฏสัญญาณเมไธน์คาร์บอน 11 สัญญาณคือที่ chemical shift (δ ,ppm) 69.77 ,73.21 ,76.52 ,77.24 ,100.14 ,103.53 ,113.74 ,115.74 ,127.05 ,130.15 และ 153.95 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ DEPT-135 แล้วทำให้ทราบว่า มี -CH₂- 1 หมู่ที่ (δ ,ppm) 60.77 เป็นของส่วนน้ำตาล มี -CH₃ 1 หมู่ ที่ (δ ,ppm) 55.23 ของหมู่เมทอกซี ที่เหลือจะเป็นเมไธน์คาร์บอน 11 สัญญาณ

เมื่อนำข้อมูลของ DEPT-135,DEPT-90 ไปเปรียบเทียบกับคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ทำให้หาได้ว่า ควอเตอร์นารีคาร์บอนมี 9 อะตอม ปรากฏสัญญาณที่ (δ ,ppm) ดังนี้ 118.55 ,123.50 ,147.04 ,147.04 ,157.13 ,157.13 ,159.13 ,161.54 และ 174.83 ตามลำดับ

H-H COSY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 57 ,58 ,59 แสดงให้เห็นถึงโปรตอนที่อยู่ติดกันที่ (δ ,ppm) ดังนี้

3.18 กับ 3.35 , 3.18 กับ 3.45 , 3.45 กับ 3.70 และ 3.30 กับ 5.10 เป็นโปรตอนที่อยู่ติดกันของส่วนน้ำตาล ส่วนโปรตอนที่มี (δ ,ppm) 6.98 กับ 7.52 และ 7.15 กับ 8.05 เป็นโปรตอนที่อยู่ติดกันของ aglycone

H-H NOESY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 60 ,61 ,62 แสดงให้เห็นถึงการ coupling กันของโปรตอนที่อยู่ใกล้กันที่ (δ ,ppm) ดังนี้

โปรตอนของส่วนน้ำตาล 3.18 coupling กับ 3.35 และ 5.10

5.10 coupling กับ 7.22

โปรตอนของ aglycone 6.98 coupling กับ 7.52

7.15 coupling กับ 8.05

7.52 coupling กับ 8.40

C-H COSY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO- d_6) รูปที่ 63 ,64 ,65 แสดงลักษณะสำคัญของ C-H ที่คู่กัน ดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 แสดง C-H COSY ของสาร 5

ค่า chemical shift ของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)	จำนวนโปรตอน	ค่า chemical shift ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)
3.78	3	55.23
3.45, 3.70	2	60.77
3.18	1	69.77
3.30	1	73.21
3.35	1	76.52
3.45	1	77.24

ตารางที่ 27 (ต่อ)

ค่า chemical shift ของ โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)	จำนวนโปรตอน	ค่า chemical shift ของ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)
5.10	1	100.14
6.98	1	113.74
7.15	1	115.74
7.22	1	103.53
7.52	1	130.15
8.05	1	127.05
8.40	1	153.95

จากตารางที่ 27 สรุปได้ดังนี้

1. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 5.23 กับ 3.78 เป็นของหมู่เมทอกซีของเมทิลคาร์บอน
2. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 6.77 คู่กับ 3.45 ,3.70 เป็นเมทิลีนคาร์บอนของน้ำตาลที่เกาะ โดยมีคาร์บอนคู่กับโปรตอน 2 โปรตอน
3. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 6.77 กับ 3.18 , 7.21 กับ 3.30 , 7.52 กับ 3.35 ,7.24 กับ 3.45 และ 100.14 กับ 5.10 เป็น C-H ของหมู่น้ำตาลกลูโคสที่เกาะกับ aglycone
4. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 113.74 กับ 6.98 เป็น C-H คู่ที่อยู่ติดกันกับ C-H ที่ (δ ,ppm) 130.15 กับ 7.52 และเป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก
5. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 115.74 กับ 7.15 เป็น C-H คู่ที่อยู่ติดกันกับ C-H ที่ (δ ,ppm) 127.05 กับ 8.05 และเป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก
6. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 103.53 กับ 7.22 และ 153.95 กับ 8.40 เป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก

HMQC Inverse Probe spectrum (DMSO-d₆) ของสาร 5 รูปที่ 66 ,67 ,68
แสดงความสัมพันธ์ของ C-H ดังตารางที่ 28

ตารางที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ของค่า chemical shift ของ
HMQC Inverse Probe spectrum ของสาร 5

ค่า chemical shift ของ โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (δ,ppm)	จำนวนโปรตอน	ค่า chemical shift ของ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ (δ,ppm)
3.78	3	55.23
3.45, 3.70	2	60.77
3.18	1	69.77
3.30	1	73.21
3.35	1	76.52
3.45	1	77.24
5.10	1	100.14
6.98	1	113.74
7.15	1	115.74
7.22	1	103.53
7.52	1	130.15
8.05	1	127.05
8.40	1	153.95

จากตารางที่ 28 สรุปได้ดังนี้

1. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 55.23 กับ 3.78 เป็นของหมู่เมทอกซีของเมทิลคาร์บอน
2. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 60.77 คู่กับ 3.45 ,3.70 เป็นเมทิลีนคาร์บอนของน้ำตาลที่เกาะโดยมีคาร์บอนคู่กับโปรตอน 2 โปรตอน
3. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 69.77 กับ 3.18 , 73.21 กับ 3.30 , 76.52 กับ 3.35 ,77.24 กับ 3.45 และ 100.14 กับ 5.10 เป็น C-H ของหมู่น้ำตาลกลูโคสที่เกาะกับ aglycone
4. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 113.74 กับ 6.98 เป็น C-H คู่ที่อยู่ติดกันกับ C-H ที่ (δ ,ppm) 130.15 กับ 7.52 และเป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก
5. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 115.74 กับ 7.15 เป็น C-H คู่ที่อยู่ติดกันกับ C-H ที่ (δ ,ppm) 127.05 กับ 8.05 และเป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก
6. สัญญาณ C-H (δ ,ppm) ที่ 103.53 กับ 7.22 และ 153.95 กับ 8.40 เป็นเมทิลคาร์บอนในวงแอโรมาติก

HMBC Inverse Probe spectrum (DMSO- d_6) รูปที่ 69 ,70 ,71 แสดงความสัมพันธ์ของ C-H ดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ของค่า chemical shift ของ HMBC Inverse Probe spectrum ของสาร 5

ค่า chemical shift ของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)	ค่า chemical shift ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ (δ ,ppm)
3.78	55.23(s)
6.98	113.74(s),123.50(s),159.13(w)
7.15	115.74(s),118.55(s),157.13(s)
7.22	103.53(s),115.74(s),118.55(s),161.54(w),157.13(w)
7.52	130.15(s),123.50(w),159.13(s)
8.05	127.05(s),157.13(s),161.54(w)
8.40	153.95(s),123.50(s),157.13(s),174.83(s)

จากตารางที่ 29 สรุปได้ดังนี้

1. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 3.78 คู่กับคาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 55.23 เป็นเมทิลคาร์บอนที่เกาะกับหมู่เมทอกซี
2. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 6.98 คู่กับคาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 113.74 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 123.50 และ 159.13
3. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 7.15 คู่กับคาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 115.74 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 118.55 และ 157.13
4. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 7.22 คู่กับคาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 103.53 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 115.74 ,118.55 ,161.54 และ 157.13
5. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 7.52 คู่กับคาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 130.15 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 123.50 และ 159.13
6. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 8.05 คู่กับคาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 127.05 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 157.13 และ 161.54
7. สัญญาณโปรตอนที่ (δ ,ppm) 8.40 คู่กับคาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 153.95 เกิดการ coupling กับ คาร์บอน-13 ที่ (δ ,ppm) 123.50 ,157.13 และ 174.83 ตามลำดับ

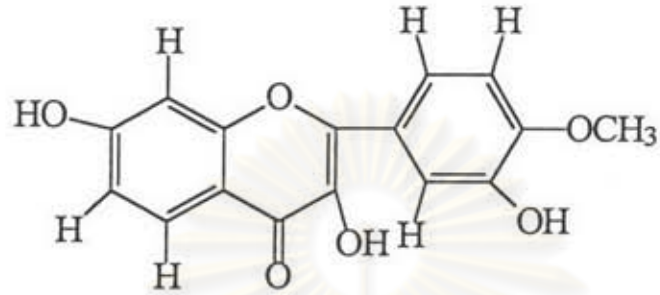
จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของ aglycone สาร 5 จะพบว่าใกล้เคียงกับสาร 4 มาก จึงคาดว่าน่าจะเป็นสารชนิดเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของโปรตอน และคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ สเปกตรัม ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 30

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

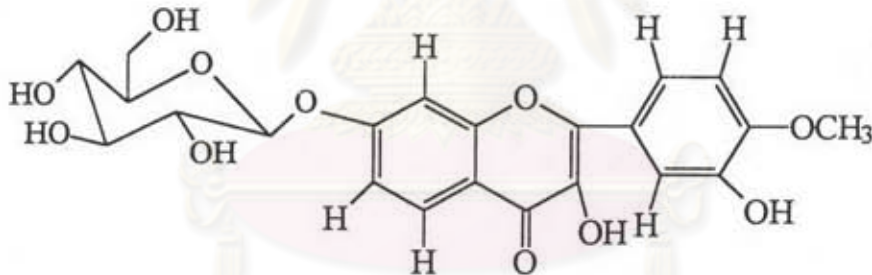
ตารางที่ 30 เปรียบเทียบค่า chemical shift ของโปรตอน ,คาร์บอน-13 ของสาร 4 และ aglycone สาร 5

ตำแหน่งคาร์บอน	chemical shift (δ ,ppm)			
	สาร 4		aglycone สาร 5	
	คาร์บอน-13	โปรตอน	คาร์บอน-13	โปรตอน
2	146.86	-	147.04	-
3	146.96	-	147.04	-
4	174.56	-	174.83	-
5	127.25	7.96	127.05	8.05
6	115.19	6.94	115.74	7.15
7	157.37	-	157.13	-
8	102.08	6.85	103.53	7.22
9	162.59	-	161.54	-
10	116.56	-	118.55	-
1'	123.12	-	123.50	-
2'	130.03	7.50	130.15	7.52
3'	113.58	6.98	113.74	6.98
4'	158.94	-	159.13	-
5'	157.42	-	157.13	-
6'	153.08	8.35	153.95	8.40
-OCH ₃	55.11	3.79	55.23	3.78

จากการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ทำให้ทราบว่า aglycone สาร 5 เป็นสารชนิดเดียวกับสาร 4 ซึ่งสูตรโครงสร้าง aglycone สาร 5 แสดงดังรูปข้างล่าง

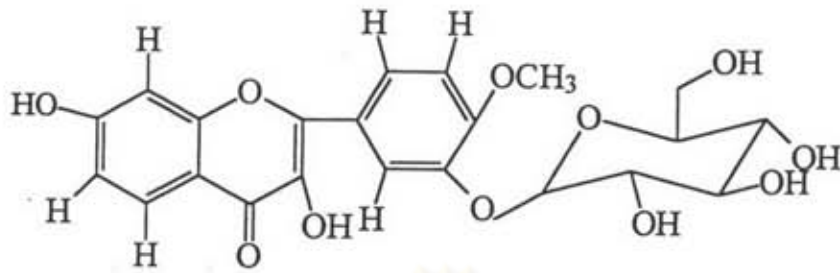


จากสูตรโครงสร้างของ aglycone สาร 5 มีหมู่ไฮดรอกซี 3 หมู่ ซึ่งหมู่น้ำตาลที่เป็นกลูโคสจะเข้าแทนที่หมู่ไฮดรอกซีได้ 3 ตำแหน่ง คือตำแหน่ง 3, 7 หรือ 5' ซึ่งสูตรโครงสร้างของสาร 5 ที่เป็นไปได้ มี 3 แบบ แสดงดังรูปด้านล่าง

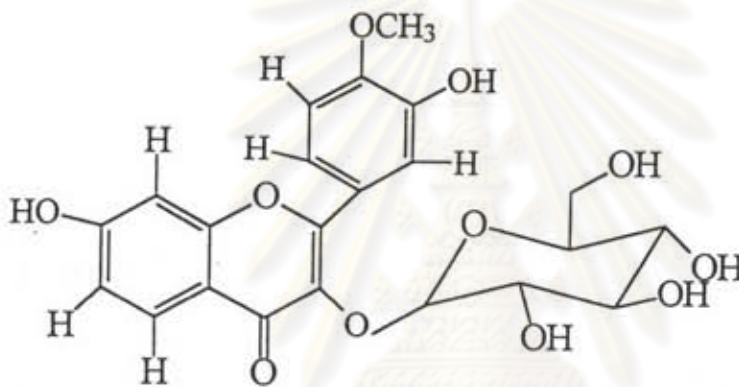


สูตร I (เข้าที่ตำแหน่ง 7)

ศูนย์วิจัยเภสัชวิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



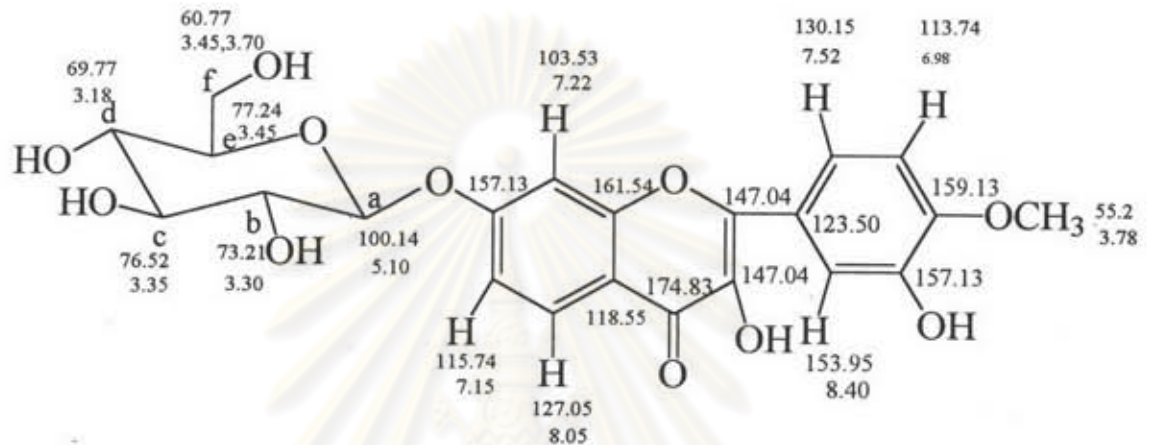
สูตร II (เข้าที่ตำแหน่ง 5')



สูตร III (เข้าที่ตำแหน่ง 8)

สาร 5 ที่แยกได้มีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถนำไปทำการไฮโครลิซิสแยกส่วนของน้ำตาล และ aglycone เพื่อหาดำแหน่งเกาะที่แน่นอนของน้ำตาลได้ จึงพิจารณาจากข้อมูลของสเปกโทรสโกปีที่ได้ ซึ่งส่วนของน้ำตาลกลูโคสน่าจะเข้าตำแหน่งที่ 7 ของวง A เพราะค่า chemical shift ของโปรตอน และคาร์บอน-13 ของวง A มีการเปลี่ยนแปลง และมีผลของความเกะกะ (steric effect) ของหมู่เกาะน้อยกว่าตำแหน่งอื่นๆ ดังนั้นส่วนของน้ำตาลกลูโคสจึงควรเข้าตำแหน่งที่ 7

ข้อมูลจากสเปกโทรสโกปี และ HMBC Inverse Probe spectrum จึงเสนอสูตรโครงสร้าง กำหนดตำแหน่ง ค่า chemical shift ของโปรตอน , คาร์บอน-13 และแสดงความสัมพันธ์ของการ coupling ของสาร 5 ได้ดังรูปข้างล่าง

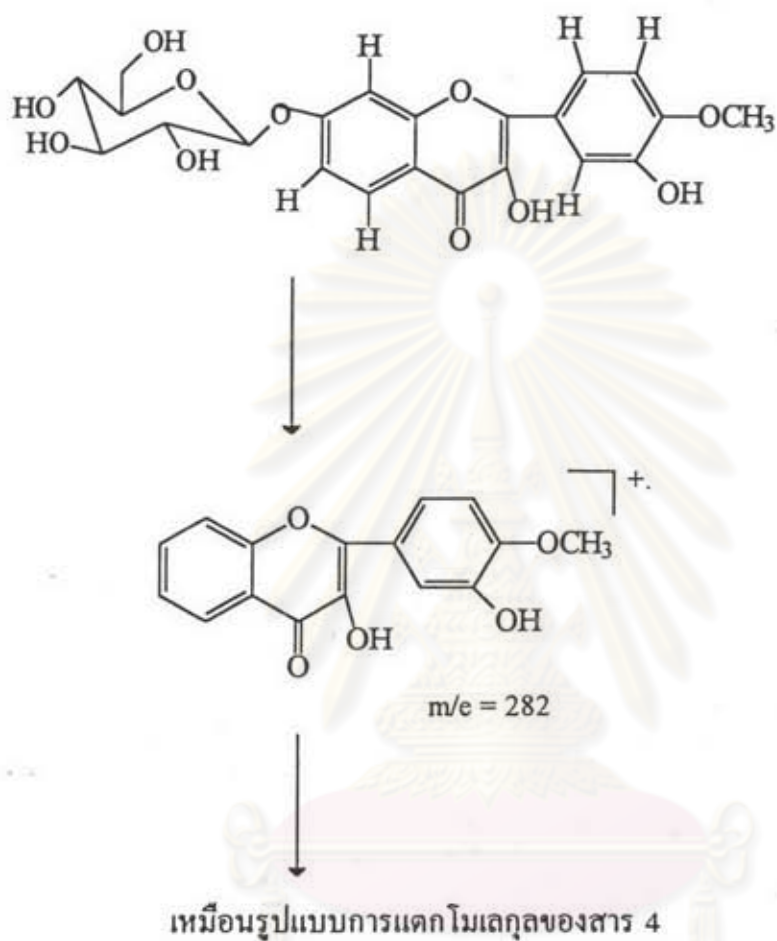


สาร 5 มีชื่อสามัญว่า 4'-methoxyfisetin-7-O-β-D-glucopyranoside หรือ 3,5'-dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside หรือ 2-(5-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3-hydroxy-4H-1-benzopyran-4-one-7-O-β-D-glucopyranoside

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 53) มีรูปแบบการแตกโมเลกุลของสาร 5 ที่เป็นไปได้ แสดงดังแผนภาพที่ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 5 แสดงรูปแบบการแตกมวลที่เป็นไปได้ของสาร 5



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย