หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

พืชตัวอย่าง

หัวกวาวแดง ได้จากอำเภอเมือง จังหวัดลำปาง เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับหัวกวาวแดง *Butea superba* Roxb. ซึ่งเก็บที่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน โดย Tetsuo Koyama และคณะ เมื่อวันที่ 20 กุมภาพันธ์ 2522 มีหมายเลขกำกับ BKF 71063 ที่หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ บางเขน กรุงเทพมหานคร พบว่า มีลักษณะเหมือนกับหัวกวาวแดงหมายเลขกำกับ BKF 71603 จากนั้นนำหัวกวาวแดงที่ได้มาทุบให้เป็นชิ้นเล็กๆ ตากให้แห้ง แล้วนำไปบดให้ละเอียด สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ นำสิ่งที่สกัดได้ไปหาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สาร

1. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น

2. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Fisher-Johns Melting Point Apparatus) ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT-IR) model IR-400 FT1760X ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (FT-NMR) model AC-F200 ของบริษัท Bruker ประเทศสวิทเซอร์แลนด์ และ model JNM-A500 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น

5. Gas Chromatograph (GC) model GC-7AG ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น

6. High Performance Liquid Chromatograph(HPLC) model LC-3A ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น

7. Gas Chromatograph-Mass spectrometer(GC-MS) GC model 8000-MS model Trio 2000 ของบริษัท Fisons ประเทศอังกฤษ

<u>สารเคมี</u>

1. ตัวทำละลาย ใช้ตัวทำละลายคุณภาพชั้นอุตสาหกรรม ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมทานอล เอทานอล แอซีโตน เอทิลแอซีเตด และอีเทอร์

2. ตัวดูดซับ ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60G Art.7734 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี และซิลิกาเจลชนิด 7749 สำหรับโครมาโททรอน ของบริษัท E.Merck Damstadt

3. TLC Plastic Sheets Silica Gel 60 F_{254} และ TLC Aluminium Sheets Silica gel 60 F_{254} สำหรับทำทินแลร์โครมาโทกราฟีของบริษัท E.Merck Damstadt

<u>เทคนิคต่างๆที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. คอลัมน์โครมาโทกราฟี(Column Chromatography) (30)

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความยาวขนาดต่างๆที่เหมาะสมกับปริมาณสิ่งสกัดที่ต้องการแยก โดยให้อัตราส่วนของสิ่งสกัดที่ต้องการแยกต่อตัวดูดซับ ประมาณ 1:20-30 โดยน้ำหนัก ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วเหมาะสม

2. ทินแลร์โครมาโทกราฟี(Thin-Layer Chromatography) (31)

ใช้โครมาโทเพลท(Chromatoplate)สำเร็จรูป คือ TLC Plastic Sheets Silicagel 60 F_{254} และ TLC Aluminium Sheets 60 F_{254} โดยแต้มสารด้วยหลอดรูเล็ก(Capillary tube) แล้ว develop ในขวดแก้วที่มีตัวทำละลายอยู่ ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึงระดับสูงสุด นำโครมาโทเพลทไปตรวจหาตำแหน่งของสารโดยใช้ไอโอดีนหรือส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต(Ultraviolet)

3. การกลั่น

การกลั่นมี 2 แบบ คือการกลั่นธรรมดา ใช้กลั่นแยกตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และการกลั่นลดความดัน ใช้กลั่นแยกตัวทำละลายที่มีขั้วและจุดเดือดสูง เช่น เมทานอล เพื่อให้ตัวทำละลายเดือดที่อุณหภูมิต่ำลง และป้องกันการสลายตัวของสารที่ถูกแยกมากับตัวทำละลายนั้น

4. โครมาโททรอน(Chromatotron) (32,33)

เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกของผสม โดยอาศัยหลักทางโครมาโทกราฟี(Chromatography) ร่วมกับแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง(Centrifugally force acceleration) โดยมี rotor ซึ่งเป็นแผ่นแก้วทรงกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 24 เซนติเมตร ซึ่งจะเคลือบด้วยตัวดูดซับซึ่งจะมีความหนาต่างๆกันขึ้นกับตัวอย่างที่จะแยก คือ 1 มิลลิเมตร แยกตัวอย่างได้ประมาณ 250 มิลลิกรัม, 2 มิลลิเมตร แยกได้ประมาณ 750 มิลลิกรัม และ 4 มิลลิเมตร แยกได้ประมาณ 1.5 กรัม มีมอเตอร์ไฟฟ้า ทำให้ rotor หมุนด้วยความเร็วคงที่ (800 รอบต่อนาที) ตัวอย่างที่จะใส่เข้าไป 1-2 มิลลิลิตรต่อมิลลิเมตร ของความหนาของตัวดูดซับ การใช้ตัวทำละลายเพื่อชะ (elute) เริ่มจากไม่มีขั้วไปจนถึงมีขั้ว เช่น เฮกเซน เอทิลแอซีเตต เมทานอล กรดแอซีติก โดยอัตราการไหลของตัวชะ (eluent) ขึ้นกับความหนาของตัวดูดซับ เช่น 2-4 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับความหนา 1 มิลลิเมตร , 6-8 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับความหนา 2 มิลลิเมตร และ 8-10 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับความหนา 4 มิลลิเมตร สารที่จะใช้กับโครมาโททรอนได้ต้องดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV) จะใช้ UV lamp เป็นตัวตรวจสอบแถบของสาร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบปฏิกิริยาทางเคมี

1. การทดสอบสเตอรอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์

(ทดสอบด้วยปฏิกิริยา Liebermann-Burchard) **(35)**

ละลายสารประมาณ 1 มิลลิกรัม ในคลอโรฟอร์มจำนวนเล็กน้อย หยดแอซีติกแอนไฮไดร์ด (acetic anhydride)2-3 หยดเขย่า หยด กรด H_2SO_4 เข้มข้น 1 หยด โดยภายใน 1 ชั่วโมง ถ้าสีเปลี่ยนจาก ชมพู เป็นม่วง,น้ำเงิน,เขียว แสดงว่าเป็นสเตอรอยด์ แต่ถ้าเป็นไตรเทอร์พีนอยด์ สีจะเปลี่ยนจากชมพูเป็นม่วง

2. การทดสอบหาฟลาโวนอยด์(Flavonoid) (35)

ละลายสารประมาณ 2 มิลลิกรัม ในเมทานอล จำนวน 5 มิลลิลิตร แบ่งออกเป็น 2 หลอด แล้วนำมาทดสอบ ดังนี้

Cyanidin test นำหลอดที่ 1 มาเติม กรด HCl เข้มข้น จำนวน 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแมกนีเซียม 1-2 แผ่น สังเกตสีที่เปลี่ยนไป โดย ฟลาโวน (flavone) จะให้สีส้มถึงแดง , ฟลาวานอล (flavonol) ให้สีแดงถึงแดงเลือดนก และ ฟลาวาโนน (flavanone) ให้สีแดงเลือดนกถึงม่วงแดง แต่ถ้าเป็น ชาลโคน (chalcone) และ ออโรน (aurone) ไม่ให้สีกับวิธีทดสอบนี้ ขั้นต่อมา เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร และ1-บิวทานอล 1 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆ ทิ้งไว้ให้แยกชั้น โดยสังเกตสีในชั้นน้ำ(ชั้นล่าง)และชั้น1-บิวทานอล(ชั้นบน) ถ้ามีไกลโคไซด์ของฟลาโวนอยด์ จะให้สีในชั้นน้ำซึ่งอยู่ชั้นล่าง แต่ถ้าเป็นฟลาโวนอยด์อิสระ จะให้สีในชั้น1-บิวทานอล ซึ่งอยู่ชั้นบน

Leucoanthocyanin test นำหลอดที่ 2 มาเติม กรด HCl เข้มข้น จำนวน 0.5 มิลลิลิตร อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที สังเกตสี ถ้ามีฟลาโวนอยด์จะให้สีม่วงแดง

<u>การเตรียมอนุพันธ์ของสารที่สกัดได้</u>

1. การเตรียมอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ โดยการทำ Methyation ด้วย diazomethane (36)

ละลาย N-nitrosomethylurea 1.0 กรัม ในสารละลาย 40 % KOH ในเอทานอล 10 มิลลิลิตร และไดเอทิลอีเทอร์ 15 มิลลิลิตร ที่เย็น เมื่อละลายหมดแล้ว นำไปกลั่นบนเครื่องอังน้ำให้ diazomethane ผ่านลงไปในสารตัวอย่างที่ละลายในคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร จนสารละลายมีสีเหลืองอย่างถาวร ปิดฝา เขย่าให้เข้ากัน สารละลายที่ได้คือ เมทิลเอสเทอร์ ของกรดอินทรีย์

2. การไฮโดรไลส์ไกลโคไซด์ด้วยกรด (acid hydrolysis of glycoside) (35)

นำสารประกอบไกลโคไซด์ หนัก 100 มิลลิกรัม มาเติม 10% HCl ในเอทานอล จำนวน 15 มิลลิลิตร นำไปรีฟลักซ์ (reflux) เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยการทำทินแลร์โครมาโทกราฟี เพื่อดูว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์หรือไม่) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็น ดังนี้

$$\text{glycoside} \xrightarrow[\text{รีฟลักซ์}]{\text{10\%HCl ในเอทานอล}} \text{aglycone} + \text{น้ำตาล}$$

แยกส่วน aglycone และน้ำตาลออกจากกัน โดยการกลั่นระเหยเอทานอลแบบลดความดัน โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ให้เหลือเอทานอลเพียงเล็กน้อย เติมน้ำแล้วสกัดด้วยอีเทอร์ จะแยกได้ aglycone อยู่ในชั้นอีเทอร์ และน้ำตาลอยู่ในชั้นน้ำ

การศึกษาส่วน aglycone

นำชั้นอีเทอร์มาเติม anh.Na_2SO_4 กรองแยกสารละลายมาระเหยไล่อีเทอร์ ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล

การศึกษาส่วนน้ำตาล

นำชั้นน้ำไประเหยตัวทำละลายออก จะได้ผลึกของน้ำตาล วิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลด้วยเครื่องมือ HPLC เทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน

3. การเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตของสารประกอบประเภทไกลโคไซด์ (35)

นำสารหนัก 100 มิลลิกรัม มาละลายใน pyridine จำนวน 5 มิลลิลิตร เติม acetic anhydride 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยการทำทินแลร์โครมาโทกราฟี เพื่อดูว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์หรือไม่) ทิ้งไว้ให้เย็น เทของผสมลงในน้ำผสมน้ำแข็ง 30 มิลลิลิตร กรองแยกของแข็ง ล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกลิ่น pyridine นำของแข็งมาตกผลึกซ้ำด้วยคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล

<u>การสกัด</u>

นำหัวกวาวแดงแห้งบดละเอียดมา 6 กิโลกรัม สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ 2 วิธี ดังนี้

1. การสกัดวิธีที่ 1

นำหัวกวาวแดงแห้งบดละเอียดมา 6 กิโลกรัม มาแช่ในเมทานอล 17.5 ลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองสารละลายที่ได้ แล้วนำไปกลั่นแยกเมทานอลออกจนเกือบหมด โดยกลั่นแบบลดความดันแล้วระเหยแห้งบนอ่างน้ำเดือด ทำซ้ำอีกหลายๆครั้ง โดยใช้เมทานอลครั้งละ 15 ลิตร จนกระทั่งสารละลายมีสีจาง จะได้สิ่งสกัดในเมทานอลมีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลปนดำ
หนัก 516 กรัม

นำสิ่งสกัดในเมทานอลมา 410 กรัม มาสกัดด้วยวิธี Partition extraction โดยละลายในคลอโรฟอร์ม 500 มิลลิลิตร ใส่ลงใน liquid-liquid extractor ซึ่งมีคลอโรฟอร์ม 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำลงไป 1000 มิลลิลิตร สกัดด้วยคลอโรฟอร์มหลายๆครั้ง ครั้งละ 500 มิลลิลิตร จนกระทั่งสารละลายในชั้นคลอโรฟอร์มไม่มีสี แยกสารละลาย 2 ชั้นออกจากกัน

นำสารละลายในชั้นคลอโรฟอร์มมากำจัดน้ำที่ปนออกมาด้วย anh. Na_2SO_4 กลั่นแยกคลอโรฟอร์มออก จะได้สิ่งสกัดข้นสีน้ำตาลดำหนัก 45 กรัม นำไปสกัดแยกต่อด้วย 80% เมทานอล: เฮกเซน จะได้สาร 2 ส่วนที่ละลายในเมทานอลและเฮกเซน กลั่นแยกตัวทำละลายออก จะได้สิ่งสกัดในเมทานอล 20 กรัม และสิ่งสกัดในเฮกเซน 25 กรัม นำไปแยกสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

ส่วนสารละลายในชั้นน้ำ เมื่อกลั่นแยกน้ำออก จะได้สิ่งสกัดในชั้นน้ำ 318 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีน้ำตาลปนดำ และมีสิ่งที่เหลือจากการสกัด 47 กรัม วิธีการสกัดแสดงดังแผนภาพที่ 1

แผนภาพที่ 1 แสดงการสกัดวิธีที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การสกัดวิธีที่ 2

นำหัวกวาวแดงแห้งบดละเอียด 6 กิโลกรัมมาแช่สกัดด้วยเมทานอล แบ่งสิ่งสกัดในเมทานอลซึ่งมีลักษณะเหนียวข้นสีน้ำตาลปนดำมา 106 กรัม สกัดด้วยคลอโรฟอร์มครั้งละ 200 มิลลิลิตร โดยการกวนบนอ่างน้ำเดือด กรองแยกสารละลายที่ได้ กลั่นแยกคลอโรฟอร์มออก โดยวิธีกลั่นแบบธรรมดา ทำซ้ำจนสารละลายไม่มีสี จะได้สิ่งสกัดในชั้นคลอโรฟอร์ม มีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลปนดำ หนัก 12.47 กรัม

นำสิ่งสกัดในเมทานอลที่เหลือจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มาละลายในเฮกเซน โดยใช้วิธีการเดียวกับการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จะได้สิ่งสกัดในชั้นเฮกเซนหนัก 21.53 กรัม และสิ่งสกัดในเมทานอลที่เหลือหนัก 72 กรัม วิธีการสกัดแสดงดังแผนภาพที่ 2

แผนภาพที่ 2 แสดงการสกัดวิธีที่ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การแยกสาร

1. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน(วิธีที่ 1)

นำสิ่งสกัดในเฮกเซนหนัก 25 กรัม ละลายด้วยเฮกเซนจำนวนเล็กน้อย ผสมกับซิลิกาเจลจนร่วน บรรจุอยู่ในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ที่มีซิลิกาเจลอยู่แล้ว376 กรัม ชะด้วยตัวทำละลาย ดังนี้ เฮกเซน เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 600 มิลลิลิตร นำไปกลั่นแยกตัวทำละลายออก จนเหลือปริมาตรประมาณ 20 มิลลิลิตร เทลงในขวดรูปกรวย ขนาด 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นตรวจสอบองค์ประกอบในสารละลาย ด้วยวิธีทินแลร์โครมาโทกราฟี รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (วิธีที่ 1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร
100% เฮกเซน	1-2	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	3-4	คราบน้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
20%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	5-6	คราบน้ำมันสีน้ำตาลปนผลึกขาว
30%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	7-8	คราบน้ำมันสีน้ำตาล
50%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	9-11	ผลึกเล็กๆสีขาว
60%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	12-13	ผลึกเล็กๆใส
75%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	14-17	ผลึกเล็กๆสีขาวปนเหลือง
80%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	18-19	ผลึกเล็กๆสีขาวปนเหลือง
90%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	20-21	คราบสีน้ำตาลปนเหลือง
100%คลอโรฟอร์ม	22-23	ผลึกเล็กๆละเอียดในคราบสีเหลือง
	24-25	ผลึกสีขาวปนดำมีน้อย
	26-29	ผลึกในคราบสีเหลือง
2%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	30-31	ผลึกเล็กๆในน้ำมันสีม่วง
5%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	32	ผลึกเล็กๆในน้ำมันสีม่วง
	33	ผลึกเล็กๆในน้ำมันสีม่วง
	34	ผลึกสีขาวปนน้ำตาล
	35-36	น้ำมันเหนียวหนืดสีน้ำตาลเข้มปนผลึก
	37-39	คราบสีน้ำตาล
10%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	40	คราบสีน้ำตาล
25%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	41-45	ผลึกสีน้ำตาล
50%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	46	น้ำมันสีน้ำตาล
75-100%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	47-50	น้ำมันสีน้ำตาล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การแยกสารลำดับส่วนที่ 35-36 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน (วิธีที่ 1)

นำสารลำดับส่วนที่ 35-36 ซึ่งเป็นน้ำมันเหนียวหนืดสีน้ำตาลเข้มปนผลึก หนัก 7.45 กรัมมาทำโครมาโทกราฟีซ้ำโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง3.0เซนติเมตรบรรจุซิลิกาเจลหนัก150 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายแต่ละส่วนเช่นเดียวกับวิธีการหน้า 22 ได้ผลดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 3 แสดงผลการแยกสารลำดับส่วนที่35-36 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน(วิธีที่ 1) ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร
100%คลอโรฟอร์ม	1	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
	2	ผลึกละเอียดสีขาว
3%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	3	ผลึกละเอียดสีขาวปนเหลือง
	4	คราบน้ำมันสีเหลืองปนผลึก
	5	น้ำมันเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
5%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	6	น้ำมันเหนียวสีน้ำตาลเข้ม
	7	น้ำมันเหนียวสีน้ำตาล
	8	น้ำมันเหนียวข้นสีน้ำตาล
10%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	9	น้ำมันสีน้ำตาล
	10	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
20%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	11	น้ำมันสีน้ำตาล
	12	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
30%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	13	น้ำมันสีน้ำตาลปนเหลือง
	14	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
40%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	15	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
60%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	16-17	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
75%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	18-19	คราบน้ำมันสีน้ำตาลปนเหลือง
100%เมทานอล	20-21	น้ำมันสีน้ำตาลปนเหลือง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอล(วิธีที่ 1)

นำสิ่งสกัดในเมทานอล หนัก 10.52 กรัม มาแยกโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลหนัก 157.5 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 300 มิลลิลิตร เก็บสารละลายแต่ละส่วนเช่นเดียวกับวิธีการหน้า 22 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอล (วิธีที่ 1) ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร
100%คลอโรฟอร์ม	1	คราบน้ำมันสีเหลือง
3%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	2	น้ำมันสีม่วง
	3	น้ำมันสีม่วงปนชมพู
5%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	4	น้ำมันสีเหลือง
	5	น้ำมันสีน้ำตาลปนผลึก
7%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	6	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
	7	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
10%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	8	น้ำมันสีน้ำตาลปนผลึกเล็กน้อย
20%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	9	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
30%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	10	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
	11	น้ำมันสีน้ำตาลเข้มปนผลึก
	12	คราบน้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
45%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	13-14	น้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้มปนผลึก
60%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	15-16	น้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้มปนผลึก
80%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	17	ตะกอนในน้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้ม
100%เมทานอล	18-19	ตะกอนในน้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอล (วิธีที่ 2) 26

นำสิ่งสกัดในเมทานอลที่เหลือจากการสกัดแยกด้วยคลอโรฟอร์มและเฮกเซนหนัก 72 กรัม มาแยกโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลหนัก 500 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 800 มิลลิลิตร เก็บสารละลายแต่ละส่วนเช่นเดียวกับวิธีการหน้า 22 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอล (วิธีที่ 2)ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร
80%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	1-4	น้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้ม
90%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	5-8	คราบน้ำมันสีน้ำตาล
100%คลอโรฟอร์ม	9-10	คราบน้ำมันสีน้ำตาล
5%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	11-17	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อนปนผลึก
	18-19	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อนปนผลึก
	20-21	น้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้ม
	22-23	น้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้มปนผลึก
	24-50	น้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้ม
7%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	51-70	น้ำมันหนืดสีน้ำตาล
	71-73	น้ำมันสีน้ำตาลเข้มปนผลึก
	74-76	น้ำมันสีน้ำตาลเข้มปนผลึก
10%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	77-80	คราบน้ำมันสีน้ำตาลปนผลึก
	81	ผลึกสีน้ำตาล
	82-88	น้ำมันสีน้ำตาลดำปนผลึก
15%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	89-98	น้ำมันหนืดสีน้ำตาลดำปนผลึกเล็กๆ
25%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	99-103	น้ำมันสีน้ำตาลปนผลึก
50%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	104-107	น้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้ม
75%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	108-110	น้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้ม
100%เมทานอล	111-118	น้ำมันหนืดสีน้ำตาลเข้มปนผลึก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม (วิธีที่ 2)

นำสิ่งสกัดจากคลอโรฟอร์มที่ได้จากการสกัดแยกวิธีที่ 2 หนัก 12.47 กรัม มาแยกโดยใช้คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลหนัก 150 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 400 มิลลิลิตร เก็บสารละลายแต่ละส่วนเช่นเดียวกับวิธีการหน้า 22 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม(วิธีที่ 2) ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร
100%เฮกเซน	1-4	ผลึกเล็กๆสีขาว
50%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	5	น้ำมันสีเหลือง
	6-7	น้ำมันสีน้ำตาลแดง
	8-15	น้ำมันสีน้ำตาล
80%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	16	ผลึกสีเหลืองอ่อน
	17-18	น้ำมันสีน้ำตาลปนเหลือง
	19	ผลึกเหลืองในน้ำมันสีน้ำตาล
	20-21	น้ำมันสีน้ำตาลปนเหลืองมีผลึกปน
	22-24	น้ำมันสีน้ำตาล
	25-31	ผลึกเหลืองในน้ำมันสีน้ำตาลปน เหลือง
100%คลอโรฟอร์ม	32-33	ผลึกสีเหลือง
	34-41	ผลึกเหลืองในน้ำมันสีน้ำตาล
5%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	42-46	น้ำมันสีน้ำตาลปนผลึก
	47-49	น้ำมันสีน้ำตาล
10%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	50-55	น้ำมันสีน้ำตาล
20%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	56-60	น้ำมันสีน้ำตาล
30%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	61-72	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
	73	น้ำมันสีน้ำตาลปนผลึก
	74-76	คราบน้ำมันสีน้ำตาล
50%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	77-85	คราบน้ำมันสีน้ำตาล
70%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	86-93	คราบน้ำมันสีน้ำตาล
100%เมทานอล	94-98	คราบน้ำมันสีน้ำตาล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน(วิธีที่ 2)

นำสิ่งสกัดในเฮกเซนที่ได้จากการแยกวิธีที่ 2 หนัก 10.25 กรัม มาแยกโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลหนัก 200 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายแต่ละส่วนเช่นเดียวกับวิธีการหน้า 22 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน(วิธีที่ 2)ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร
100%เฮกเซน	1	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
10%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	2	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
30%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	3-4	น้ำมันสีน้ำตาล
50%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	5	น้ำมันสีน้ำตาลปนเหลือง
60%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	6	น้ำมันสีน้ำตาลปนผลึก
70%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	7-8	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อนปนผลึก
80%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	9-10	ผลึกเล็กๆสีขาว
100%คลอโรฟอร์ม	11	ผลึกเล็กๆสีขาวในสารละลายไม่มีสี
3%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	12-13	ผลึกเล็กๆสีน้ำตาลมีน้อย
5%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	14-15	น้ำมันสีน้ำตาลปนผลึก
10%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	16	คราบน้ำมันสีน้ำตาล
20%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	17	น้ำมันสีน้ำตาลปนผลึก
30%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	18-20	คราบน้ำมันสีน้ำตาลปนผลึก
50%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	21-23	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
70%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	24-26	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
100%เมทานอล	27-28	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การแยกสารลำดับส่วนที่ 32-33 จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม(วิธีที่ 2) ด้วยวิธีโครมาโททรอน

นำสารที่แยกได้จากลำดับส่วนที่ 32-33 จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม(วิธีที่ 2)มาแยกซ้ำด้วยวิธีโครมาโททรอน ตามวิธีการหน้า 16 ใช้ตัวทำละลายชะโครมาโทเพลท เริ่มจากเฮกเซน เอทิลแอซีเตต และเมทานอล จะได้ผลึกสารที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นถูกชะออกมา ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 32-33 จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม(วิธีที่ 2) ด้วยวิธีโครมาโททรอน

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร
100%เฮกเซน	1	คราบสีขาว
40%เอทิลแอซีเตตในเฮกเซน	2-3	คราบผลึกสีขาวเล็กน้อย
50%เอทิลแอซีเตตในเฮกเซน	4	คราบผลึกสีขาวเล็กน้อย
60%เอทิลแอซีเตตในเฮกเซน	5-7	ผลึกเล็กๆสีเหลือง
80%เอทิลแอซีเตตในเฮกเซน	8-9	คราบสีขาวเล็กน้อย
100%เอทิลแอซีเตต	10	คราบสีขาว
10%เมทานอลในเอทิลแอซีเตต	11	คราบสีขาว
100%เมทานอล	12-13	คราบสีน้ำตาล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำสารให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

การทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 1 มีลักษณะเป็นผลึกอสัณฐานสีขาว ได้จากลำดับส่วนที่ 12-13 (60%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน), 30-31 (2%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม), 32-34 (5%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) จากสิ่งสกัดในเฮกเซนวิธีที่ 1 (ตารางที่ 2) และจากลำดับส่วนที่ 5 (50%คลอโรฟอร์มในเฮกเซน) จากสิ่งสกัดในเฮกเซนวิธีที่ 2 (ตารางที่ 7) ตกผลึกด้วยเมทานอล ได้สารหนัก 828 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 77-78 $^{\circ}$C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตด เฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล TLC ให้ค่า R_f 0.68 (ซิลิกาเจล : 10%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม(KBr) (รูปที่ 7) แสดงแถบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่ 3500-3200 cm^{-1} และหมู่คาร์บอนิล (-C=O) ที่ 1705 cm^{-1} นอกจากนี้ยังพบแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ $-CH_3$ และ $-CH_2$ ที่ต่อกันเป็นโซ่ตรงยาว ซึ่งข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า สาร 1 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทกรดอินทรีย์โซ่ตรง

เพื่อความสะดวกในการหาสูตรโครงสร้างของสาร 1 จึงต้องเปลี่ยนกรดอินทรีย์โซ่ตรงเป็นอนุพันธ์ เมทิลเอสเทอร์ โดยวิธีการตามหัวข้อ 2.6.1 ซึ่งอนุพันธ์ เมทิลเอสเทอร์ ของกรดอินทรีย์โซ่ตรง จะง่ายต่อการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี เทียบกับอนุพันธ์ เมทิลเอสเทอร์ของกรดอินทรีย์โซ่ตรงมาตรฐาน ส่วนสาร 1 ซึ่งเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ของ เมทิลเอสเทอร์ ของกรดอินทรีย์โซ่ตรง จะให้ชื่อเป็น สาร 1A

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิคอลัมน์ 240-260 $^{\circ}$C, อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 2 $^{\circ}$C ต่อนาที , อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 $^{\circ}$C , อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารที่ฉีด 1 ไมโครลิตร , ใช้ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด)

โดยการเปรียบเทียบ สาร 1A กับอนุพันธ์ เมทิลเอสเทอร์ ของกรดอินทรีย์โซ่ตรงมาตรฐาน ที่มีจำนวนคาร์บอน 18,20,22,24,26,27,29 และ 31 คาร์บอน ซึ่งอนุพันธ์ เมทิลเอสเทอร์ของกรดอินทรีย์โซ่ตรงมาตรฐาน มีค่า retention time(นาที)เป็น2.0,3.11,4.98,7.71,11.33,13.46, 19.51 และ 29.23 ส่วนสาร 1A มีค่า retention time (นาที) เป็น 6.62,8.14,9.56,11.64 และ 13.58 (รูปที่ 8)

การทำสาร 2 ให้บริสุทธิ์ และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 2 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 35-36 ซึ่งชะด้วย 5%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 2) จากสิ่งสกัดในเฮกเซนวิธีที่ 1 ลำดับส่วนที่ 2,3,4 (ตารางที่ 3) จากการทำโครมาโทกราฟีซ้ำลำดับส่วนที่ 35-36 ของสิ่งสกัดในเฮกเซน วิธีที่ 1 และลำดับส่วนที่ 6,7-8 ซึ่งชะด้วย 60-70% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน (ตารางที่ 7) จากสิ่งสกัดในเฮกเซน วิธีที่ 2 ตกผลึกด้วยเมทานอล ได้ผลึกอสัณฐานสีขาว หนัก 180 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 139-140°C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เอทิลแอซีเตด ละลายได้บ้างในเฮกเซน TLC ให้ค่า R_f เป็น 0.640 (ซิลิกาเจล : 10%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) (รูปที่ 10) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3400 (m) , 2950,2867 (s) ,1650 (w) ,1450,1375 (m) ,1050 (m) ,970 (m) และ 840,800 (w)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) (รูปที่ 11) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ ,ppm) ดังนี้ 0.68-2.28 (m) ,3.50 (1H,m) ,5.10 (1H,m) และ 5.35 (2H,d)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) (รูปที่ 12) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 11.83 - 56.84 , 71.80 , 121.69 , 129.24 , 138.27 และ 140.71

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 13) พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่สำคัญ ที่ m/e (%relative intensity) ดังนี้ 414.0 (17.0) ,412.0 (10.0) และ 400 (7.0) คำนวณสูตรโมเลกุลได้เป็น $C_{29}H_{50}O$,$C_{29}H_{48}O$ และ $C_{28}H_{48}O$ ตามลำดับ พีคอื่นๆที่สำคัญคือ 396.0 ,382.0 , 329.0 , 303.0 , 273.0 , 255.0 และ 213.0

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1 , อุณหภูมิคอลัมน์ 265°C , อุณหภูมิเครื่องฉีด 290°C , อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 55 มิลลิลิตรต่อนาที) โดยเปรียบเทียบสาร 2 กับสเตอรอยด์มาตรฐาน ได้แก่ cholesterol ,campesterol ,stigmasterol และ β-sitosterol พบว่าสเตอรอยด์มาตรฐาน มีค่า retention time (นาที) เป็น 16.13 , 21.8 , 23.2 และ 26.0 ส่วน retention time (นาที)ของสาร 2 เป็น 21.63 , 22.83 และ 25.77 (รูปที่ 14)

การทำสาร 3 ให้บริสุทธิ์ และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 3 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 42-46 ซึ่งชะด้วย 5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 6) จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม วิธีที่ 2 ตกผลึกด้วยเมทานอล ได้ผลึกอสัณฐานสีขาวหม่น หนัก 102 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 240-245°C (สลายตัว) ละลายได้บ้างในเมทานอลร้อน ไม่ละลายในเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเอทิลแอซีเตต TLC ให้ค่า R_f 0.25
(ซิลิกาเจล : 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม(KBr)พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3600-3100(s) ,2934, 2867 (s), 1640(m),1466(s), 1367(m), 1250,1066-1020(m,s), 890(w) และ 820(w) รูปที่ 15)

จากลักษณะการดูดกลืนแสงของสาร 3 ทำให้คาดว่าสาร 3 น่าจะเป็นไกลโคไซด์ จึงนำสาร 3 มาทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส ดังวิธีการในหัวข้อ 2.6.2 ได้ส่วน aglycone (สาร 3A) และน้ำตาล (สาร 3B)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr)ของสาร 3A พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3600-3100 (m),2934,2867(s),1640(w),1466(m),1367(w),1060-1040(w),970(w) และ 820(w) (รูปที่ 16)

จากผลการทดสอบปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ตามวิธีการในหัวข้อ 2.5.1 ให้ผลการทดสอบเป็นบวก และจากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม แสดงว่าสาร 3A น่าจะเป็นสเตอรอยด์ จึงนำสาร 3A มาวิเคราะห์ต่อโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1 ,อุณหภูมิคอลัมน์ 265°C ,อุณหภูมิเครื่องฉีด 290°C , อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 55 มิลลิลิตรต่อนาที , ใช้ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด , ปริมาณสารที่ฉีด 1 ไมโครลิตร) โดยเปรียบเทียบสาร 3A กับสเตอรอยด์มาตรฐาน ได้แก่ campesterol,stigmasterol และ β-sitosterol พบว่าสเตอรอยด์มาตรฐาน มีค่า retention time (นาที) เป็น 19.21 , 20.38 และ 22.71 ส่วน retention time (นาที) ของสาร 3A เป็น 20.28 และ 22.98 ตามลำดับ (รูปที่ 17)

การศึกษาส่วนของน้ำตาล (สาร 3B) หาชนิดของน้ำตาล โดยใช้เทคนิค HPLC ใช้คอลัมน์Spherisorb NH_2 ขนาด 250x4.6 มิลลิเมตร ,mobile phase (วัฏภาคเคลื่อนที่) ใช้ 75% CH_3CN ในน้ำ โดยปริมาตร/ปริมาตร, flow rate (อัตราการไหล) 2.0 มิลลิลิตร/นาที , ความดัน 100 kg/cm^2 ,ใช้ RID (refractive index detector) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด ฉีดสาร 3B เข้าไปในเครื่อง HPLC พบว่ามีค่า retention time (นาที) เป็น 3.53 เทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ภายใต้สภาวะเดียวกัน ตรงกับ กลูโคส ซึ่งมี retention time (นาที) เป็น 3.53 (รูปที่ 18)

การยืนยันสูตรโครงสร้าง โดยเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตของสาร 3 ตามวิธีการในหัวข้อ 2.6.3 ได้สาร 3C เป็นผลึกอสัณฐานสีขาว ตกผลึกในเมทานอล หนัก 5 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 166 - 168 °C ค่า R_f เป็น 0.55 (ซิลิกาเจล : คลอโรฟอร์ม 100 %)

อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3C (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 2850 , 2700(s) , 1750(s) ,1460,1450(m) ,1380(m) ,1230 ,1060 ,1020(m) และ 820(w) (รูปที่ 19)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำสาร 4 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 4 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 5 ซึ่งชะด้วย 5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 4) จากสิ่งสกัดในเมทานอล วิธีที่ 1 ลำดับส่วนที่ 32 -33 ซึ่งชะด้วย 100% คลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 6) จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม วิธีที่ 2 และลำดับส่วนที่ 5 - 7 ซึ่งชะด้วย 60% เอทิลแอซีเตตในเฮกเซน (ตารางที่ 8) จากการทำโครมาโททรอน ของลำดับส่วนที่ 32-33 ของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม วิธีที่ 2 ตกผลึกด้วย เมทานอล-คลอโรฟอร์ม หลายๆครั้ง ได้ผลึกอสัณฐานสีขาวปนน้ำตาล หนัก 135 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 258-260 °C (สลายตัว) ละลายได้บ้างในเมทานอลร้อน คลอโรฟอร์มร้อน ไม่ละลายในเฮกเซน เอทิลแอซีเตต แอซีโตน TLC ให้ค่า R_f เป็น 0.69 (ซิลิกาเจล : 20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3340-3000 (s,br) แสดงลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซี ,2940 (s) ,1650 (s) แสดงลักษณะเฉพาะของหมู่คาร์บอนิลของสารประกอบประเภท conjugated ketone (40) ,1594 ,1575 ,1500 (s0 ,1450 ,1380 (s,m) , 1260 (s) ,1090 ,1020 (m) และ 790 (m) (รูปที่ 20)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO -d_6) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 3.79 (3H,s) ,6.02 (1H,s) ,6.85(1H, s) ,6.94 (1H,d,J = 8.85 Hz) , 6.98 (1H,d,J = 8.85 Hz) 7.50 (1H,d,J = 8.85 Hz) ,7.96 (1H,d,J = 8.85 Hz), 8.35 (1H , s) และ 10.75 (1H,br) (รูปที่ 21,22)

จากการทำ deuterium exchange (รูปที่ 23) พบสัญญาณที่ chemical shift (δ,ppm) หายไป2 สัญญาณ คือ 6.02 และ 10.75

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO -d_6) 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 (รูปที่ 24,25 และ 28)

I16702223.

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่สำคัญ ที่ m/e ดังนี้ 300 ,282 ,269 ,268 ,253 ,136 ,133 และ 132 (รูปที่ 26)

DEPT-135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบเฉพาะสัญญาณ -CH= (เมไทน์คาร์บอน) และ $-CH_3$ (เมทิลคาร์บอน) ที่ด้านบน (up phase) เท่านั้น ที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 55.11 ,102.08 ,113.58 ,115.17 ,127.25 , 130.03 และ 153.08 (รูปที่ 27 ,29)

DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบสัญญาณ -CH= (เมไทน์คาร์บอน) ที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 102.08 ,113.58 ,115.17 ,127.25 , 130.03 และ 153.08 (รูปที่ 28,29)

H-H COSY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO -d_6) แสดงให้เห็นโปรตอนที่อยู่ติดกันที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 7.96 กับ 6.94 และ 7.50 กับ 6.98 (รูปที่ 30,31)

H-H NOESY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO -d_6) แสดงให้เห็นโปรตอนที่อยู่ติดกันและใกล้กัน ที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 3.79 กับ 6.98 ,7.96 กับ 6.94 และ 7.50 กับ 6.98 (รูปที่ 32,33)

C-H COSY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO -d_6) แสดงให้เห็นถึง C-H ที่สัมพันธ์กัน ที่ค่าchemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 55.11 กับ 3.79 , 102.08 กับ 6.85 , 115.17 กับ 6.94 , 113.58 กับ 6.98 ,130.03 กับ 7.50 , 127.25 กับ 7.96 และ 153.08 กับ 8.35 (รูปที่ 34,35)

HMQC Inverseprobe Spectrum (DMSO -d_6) แสดงให้เห็นถึง C-H ที่สัมพันธ์กัน ที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 55.11 กับ 3.79 , 102.08 กับ 6.85 , 115.17 กับ 6.94 , 113.58 กับ 6.98 , 130.03 กับ 7.50 , 127.25 กับ 7.96 และ 153.08 กับ 8.35 (รูปที่ 36,37,38)

HMBC Inverseprobe Spectrum (DMSO -d_6) (รูปที่ 39,40,41)
แสดงให้เห็นถึงโปรตอนที่เกิดการ coupling กับ คาร์บอน ที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้

โปรตอนที่ 3.79 กับ คาร์บอนที่ 55.11 (s)

โปรตอนที่ 6.85 กับ คาร์บอนที่ 102.08 (s) , 162.59 (s) , 115.17 (s) , 157.37 (s)

โปรตอนที่ 6.94 กับ คาร์บอนที่ 115.17 (s) , 102.08 (s) , 116.56 (s) , 162.59 (w) , 157.37 (w)

โปรตอนที่ 6.98 กับ คาร์บอนที่ 113.58 (s) , 158.94 (s) , 123.12 (s) , 157.42 (w)

โปรตอนที่ 7.50 กับ คาร์บอนที่ 130.03 (s) , 158.94 (s) , 123.12 (s) , 113.58 (s)

โปรตอนที่ 7.96 กับ คาร์บอนที่ 127.25 (s) , 115.17 (w) , 157.37 (s) , 162.59 (s) , 174.56 (s)

โปรตอนที่ 8.35 กับ คาร์บอนที่ 153.08 (s) , 123.12 (s) , 157.42 (s) , 174.56 (s)

N.O.E. Difference Spectra (รูปที่ 42,43,44,45,46,47) เมื่อ irradiate ที่ตำแหน่งต่างๆ ของโปรตอน ทำให้มีพีคสูงขึ้น ดังนี้

irradiate โปรตอน ที่ค่า chemical shift (δ,ppm) 5 ตำแหน่ง ดังนี้

6.94 มีพีคที่สูงขึ้น คือ 7.96

7.96 มีพีคที่สูงขึ้น คือ 6.94

7.50 มีพีคที่สูงขึ้น คือ 6.98

6.98 มีพีคที่สูงขึ้น คือ 7.50 และ 3.79

6.85 ไม่มีพีคใดสูงขึ้น

การทำสาร 5 ให้บริสุทธิ์ และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 5 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 11 ซึ่งชะด้วย 30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 4) จากสิ่งสกัดในเมทานอล วิธีที่ 1 และจากลำดับส่วนที่ 22 - 23 ซึ่งชะด้วย 5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 5) จากสิ่งสกัดในเมทานอล วิธีที่ 2 นำมาตกผลึกด้วย เมทานอล - คลอโรฟอร์ม หลายๆครั้ง ได้ผลึกอสัณฐาน สีขาวปนน้ำตาล หนัก 24 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 208 - 212 ° C ละลายได้บ้างในเมทานอลร้อน และคลอโรฟอร์มร้อน ไม่ละลายในเฮกเซน เอทิลแอซีเตต แอซีโตน TLC ให้ค่า R_f เป็น 0.22 (ซิลิกาเจล : 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) รูปที่ 48 พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้

3600 - 3100 (s ,br) , 2900 (s) , 1650 (s) ,1550 (s) ,1450 ,1380 (s ,m) , 1260 (s) , 1060 - 1030 (s) , 891 (w) และ 800 (w)

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

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

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

55.23 ,60.77 ,69.77 ,73.21 ,76.52 ,77.24 ,100.14 ,103.53 ,113.74 ,115.74 ,118.55 , 123.50 ,127.05 ,130.15 ,147.04 ,153.95 ,157.13 ,161.54 และ 174.84

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 53) ปรากฏพีคไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ m/e (% relative intensity) ดังนี้

282 (20.0) ,268 (100.00) ,253 (23.0) ,133 (12.0) และ 132 (90.0)

DEPT-135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO-d_6) รูปที่ 54 ,56 ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้

สัญญาณด้านบน (up phase) ของเมไทน์คาร์บอน และเมทิลคาร์บอนที่ 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

สัญญาณด้านล่าง (down phase) ของเมทิลีนคาร์บอนที่ 60.77

DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO-d_6) รูปที่ 55 ,56 ปรากฏสัญญาณของเมไทน์คาร์บอนที่ chemicalshift (δ,ppm) ดังนี้

69.77 ,73.21 ,76.52 ,77.24 ,100.14 ,103.53 ,113.74 ,115.74 ,127.05 ,130.15 และ 153.95

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

3.18 กับ 3.35 , 3.18 กับ 3.45 , 3.45 กับ 3.70 , 3.30 กับ 5.10 , 6.98 กับ 7.52 และ 7.15 กับ 8.05

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

3.18 coupling กับ 3.35 และ 5.10

5.10 coupling กับ 7.22

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 แสดงให้เห็นถึงคาร์บอน-13 กับโปรตอน ที่คู่กันที่ chemical shift (δ,ppm) ดังนี้

55.23 กับ 3.78 , 60.77 กับ 3.45 และ 3.70 , 69.77 กับ 3.18 ,73.21 กับ 3.30 , 76.52 กับ 3.35 , 77.24 กับ 3.45 ,100.14 กับ 5.10 , 113.74 กับ 6.98 , 115.74 กับ 7.15 , 103.53 กับ 7.22 ,130.15 กับ 7.52 , 127.05 กับ 8.05 , 153.95 กับ 8.40

HMQC Inverse Probe spectrum ($DMSO-d_6$) รูปที่ 66 ,67 ,68
แสดงความสัมพันธ์ของ C-H ที่ chemical shift (δ,ppm) ดังนี้

55.23 กับ 3.78 , 60.77 กับ 3.45 และ 3.70 , 69.77 กับ 3.18 ,73.21 กับ 3.30 , 76.52 กับ 3.35 , 77.24 กับ 3.45 ,100.14 กับ 5.10 , 113.74 กับ 6.98 , 115.74 กับ 7.15 , 103.53 กับ 7.22 ,130.15 กับ 7.52 , 127.05 กับ 8.05 , 153.95 กับ 8.40

HMBC Inverse Probe spectrum ($DMSO-d_6$) รูปที่ 69 ,70 ,71
แสดงให้เห็นถึงการ coupling ของโปรตอน กับคาร์บอน-13 ที่ chemical shift (δ,ppm) ดังนี้

โปรตอนที่ 3.78 coupling กับคาร์บอน-13ที่ 55.23 (s)
โปรตอนที่ 6.98 coupling กับคาร์บอน-13ที่ 113.74 (s) ,123.50 (s) ,159.13 (w)
โปรตอนที่ 7.15 coupling กับคาร์บอน-13ที่ 115.74 (s) ,118.55 (s) ,157.13 (s)
โปรตอนที่ 7.22 coupling กับคาร์บอน-13ที่ 103.53 (s) ,115.74 (s) ,118.55 (s) , 161.54 (w) ,157.13 (w)
โปรตอนที่ 7.52 coupling กับคาร์บอน-13ที่ 130.15 (s) ,123.50 (w) ,159.13 (s)
โปรตอนที่ 8.05 coupling กับคาร์บอน-13ที่ 127.05 (s) ,157.13 (s) ,161.54 (w)
โปรตอนที่ 8.40 coupling กับคาร์บอน-13ที่ 153.95 (s) ,123.50 (s) ,157.13 (s) ,174.83 (s)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย