



บทที่ 2

## 2.1 การทดลอง

### 2.1.1 Column chromatography

ใช้ silica gel 60 ART 7734 for column chromatography, standardised for chromatographic adsorption ของบริษัท E. Merck, Darmstadt เป็น adsorbent

### 2.1.2 Thin layer chromatography

ใช้ silica gel type 60 for thin layer chromatography ของบริษัท E. Merck, Darmstadt เป็น adsorbent

### 2.1.3 Solvent systems

ใช้สารละลายตามลำดับต่อไปนี้ เป็น eluents ซึ่งมี hexane, hexane : trichloromethane (1:1 โดยปริมาตร), trichloromethane, trichloromethane : methanol (19:1 โดยปริมาตร, 4:1 โดยปริมาตร, 1:1 โดยปริมาตร, 1:3 โดยปริมาตร), methanol

## 2.2 การเตรียม reagents ที่ใช้ในการทดลอง<sup>6</sup>

### 2.2.1 Dragendorff's reagent

ละลาย bismuth nitrate (8 g) ใน concentrated nitric acid (12 cm<sup>3</sup>)  
เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลาย potassium iodide (27.2 g) ในน้ำกลั่น (50 cm<sup>3</sup>)  
แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 cm<sup>3</sup>

### 2.2.2 Kraut's reagent

ละลาย bismuth nitrate (8 g) ใน concentrated nitric acid (20 cm<sup>3</sup>)

ละลายละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลายของ potassium iodide (27.2 g) ในน้ำกลั่น (50 cm<sup>3</sup>) แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 cm<sup>3</sup>

#### 2.2.3 Marme's reagent

ละลาย calcium iodide (10 g) ในน้ำกลั่น (50 cm<sup>3</sup>) เติมน้ำกลั่นที่เตรียมได้ลงในสารละลายของ potassium iodide (5 g) ในน้ำกลั่น (20 cm<sup>3</sup>) แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 cm<sup>3</sup>

#### 2.2.4 Mayer's reagent

ละลาย mercuric chloride (1.3 g) ในน้ำกลั่น (60 cm<sup>3</sup>) เติมน้ำกลั่นที่เตรียมได้ลงในสารละลายของ potassium iodide (5 g) ในน้ำกลั่น (10 cm<sup>3</sup>) แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 cm<sup>3</sup>

#### 2.2.5 Valser's reagent

ละลาย red mercuric iodide (14 g) ในสารละลายของ potassium iodide (10 g) ในน้ำกลั่น (80 cm<sup>3</sup>) แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 cm<sup>3</sup>

#### 2.2.6 Wagner's reagent

ละลาย potassium iodide (2 g) ในน้ำกลั่น (50 cm<sup>3</sup>) เติมน้ำกลั่น (1.27 g) ลงในสารละลายที่เตรียมได้ คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 cm<sup>3</sup>

### 2.3 Solvents

ได้แก่ hexane, trichloromethane, methanol และอื่น ๆ ถ้าหากไม่ใช่ชนิด reagent grade ต้องนำมากั่นก่อนใช้ ส่วน solvent ที่ใช้กับ spectrophotometer ต้องเป็น analar grade ทั้งสิ้น



## 2.4 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 2.4.1 Ultraviolet spectrophotometer ใช้เครื่อง Varian - Techtron  
UV - Vis spectrophotometer model 1635 ของบริษัท Varian - Techtron Pty.  
Ltd., Melbourne, Australia
- 2.4.2 Infrared spectrophotometer ใช้เครื่อง microspec ของ Perkin - Elmer  
283 grating spectrophotometer ของบริษัท Perkin - Elmer
- 2.4.3 Nuclear magnetic resonance และ Mass spectrometer ส่งไปที่  
Liverpool University, Liverpool, England
- 2.4.4 การหาจุดหลอมเหลว (Melting points) ใช้เครื่อง Fisher - Johns melting  
point apparatus
- 2.4.5 การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของธาตุ ส่งไปทำการวิเคราะห์ที่ Liverpool University,  
England

## 2.5 การสกัด (Extraction)

นำต้นพญามือเหล็กที่บดละเอียด 3.5 kgs มาสกัดด้วย methanol โดยแช่ไว้ครั้งละ  
10 วัน ทำซ้ำกัน 2 ครั้ง กรองสารละลายที่สกัดได้แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกจนเหลือปริมาตร  
150 - 200 cm<sup>3</sup> เติลสารละลายที่เหลือลงใน beaker ใช้พัดลมเป่าให้แห้งแล้วเท 10 % กรด  
ไฮโดรคลอริก 800 cm<sup>3</sup> ลงใน beaker คนให้ทั่วแล้วกรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำส่วนที่ละลาย  
ได้ในกรดไปทดสอบกับ alkaloid reagents ต่อไปนี้ คือ Dragendorff's reagent, Kraut's  
reagent, Marme's reagent, Mayer's reagent, Valser's reagent และ Wagner's  
reagent จะให้ positive test กับ reagents ดังกล่าวทุกชนิด นำสารละลายดังกล่าวมาทำ  
ให้เป็นด่างด้วยสารละลายแอมโมเนียเข้มข้นปรับ pH ให้ได้ 7-8 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง นำ  
ไปสกัดด้วย trichloromethane 3-4 ครั้ง จนกระทั่ง trichloromethane ที่ใช้สกัดครั้งสุดท้ายให้

negative test กับ Dragendorff's reagent นำ trichloromethane ที่สกัดได้มารวมกัน ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate โดยเขย่าเป็นครั้งคราว กรอง ระเหย เอาตัวทำละลายออกและทำให้แห้งบน water bath ได้ crude สนิ้ตาลอมตาซึ่งนำมาแยกด้วย column ต่อไป

### 2.6 การแยกสาร (Separation)

ละลายสารที่ได้จากข้อ 2.5 (12.57 g) ใน trichloromethane 50 cm<sup>3</sup> แล้ว เทสารละลายนี้ลงใน column ที่บรรจุ silica gel อยู่ 260 g เป็น adsorbent แล้ว elute column ด้วย solvent ตามหัวข้อ 2.1.3 เก็บ eluents ครั้งละ 500 cm<sup>3</sup> และนำ แต่ละ fraction ที่ได้ไปกลั่นไล้ตัวทำละลายออกจนเหลือปริมาณในขวดกลั่น 15-20 cm<sup>3</sup> เทลงในขวดรูปกรวยขนาด 50 cm<sup>3</sup> แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก แยกสารออกเป็นพวก ๆ โดยการทดสอบด้วย T.L.C. ซึ่งแยกสารออกได้ตั้งที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

ส่วนสารที่ไม่ละลายใน 10 % กรดไฮโดรคลอริกในข้อ 2.5 (27.5 g) นำมาละลายใน trichloromethane 70 cm<sup>3</sup> เทสารละลายนี้ลงใน column 2 columns ที่บรรจุ silica gel column ละ 280 g (ทำ 2 column พร้อมกัน) elute columns ด้วย solvents เช่นเดียวกับข้อความข้างบน

### 2.7 การทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)

จากการแยกสารโดยใช้ column chromatography ปรากฏว่า fraction ที่ 16 - 18 ซึ่งใช้ trichloromethane : methanol (19:1 โดยปริมาตร) เป็น eluent ได้สารตกผลึกออกมาเป็นรูปเข็มปนอยู่กับน้ำมันสนี้ตาล จากการทดสอบด้วย T.L.C. พบว่าสารใน fractions ที่ 16 - 18 เป็นสารชนิดเดียวกัน ใช้ hexane ล้างน้ำมันออกแล้วตกผลึกใหม่ด้วย hexane กับ trichloromethane ได้สารตกผลึกออกมาเป็นรูปเข็ม นำผลึกที่ได้มาทดสอบด้วย T.L.C ปรากฏว่ามีเพียง spot เดียวมี m.p. 176 - 178<sup>o</sup> (0.82 g, 0.27 % ของ crude product) กำหนดให้เป็นสาร A

part ที่ไม่เป็น alkaloids มีสารตกผลึกออกมาในลํ้าที่เป็นลํ้าละลายผลัระหว่าง  
hexane : trichloromethane (1:1 โดยปริมาตร) นำผลึกที่ได้มาตกผลึกซ้ำใน methanol  
ได้ลํ้า m.p. 138 - 139<sup>o</sup> (0.18 %) กำหนดให้เป็นลํ้า B



## ตารางที่ 1

การแยกสารออกจาก crude product โดยวิธี column chromatography

fractions	solvents	สิ่งที่แยกได้
1 - 5	hexane	น้ำมันสีเหลือง
6 - 10	hexane : trichloromethane (1:1 โดยปริมาตร)	น้ำมันสีเหลือง
11 - 15	trichloromethane	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ
16 - 23	trichloromethane : methanol (19:1 โดยปริมาตร)	ของแข็งเป็นผลึกรูปเข็ม m.p. 170 - 175 <sup>o</sup>
24 - 27	trichloromethane : methanol (4:1 โดยปริมาตร)	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ
28 - 32	trichloromethane : methanol (1:1 โดยปริมาตร)	ของแข็งสีน้ำตาลปนดำ
33 - 40	trichloromethane : methanol (1:3 โดยปริมาตร)	น้ำมันสีน้ำตาล
41 - 49	methanol	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ

## 2.8 การตรวจสอบลักษณะของสารที่แยกได้

### 2.8.1 การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพและ colour reaction ของสาร A

สาร A (m.p. 176 - 178<sup>o</sup>) ละลายได้ดีใน trichloromethane, methanol, ethanol และ 10 % กรดไฮโดรคลอริก ละลายได้ดีเล็กน้อยใน hexane และ diethyl ether  
 พอกสีสารละลายของ  $KMnO_4$  และให้ตะกอนกับ Dragendorff's reagent มี

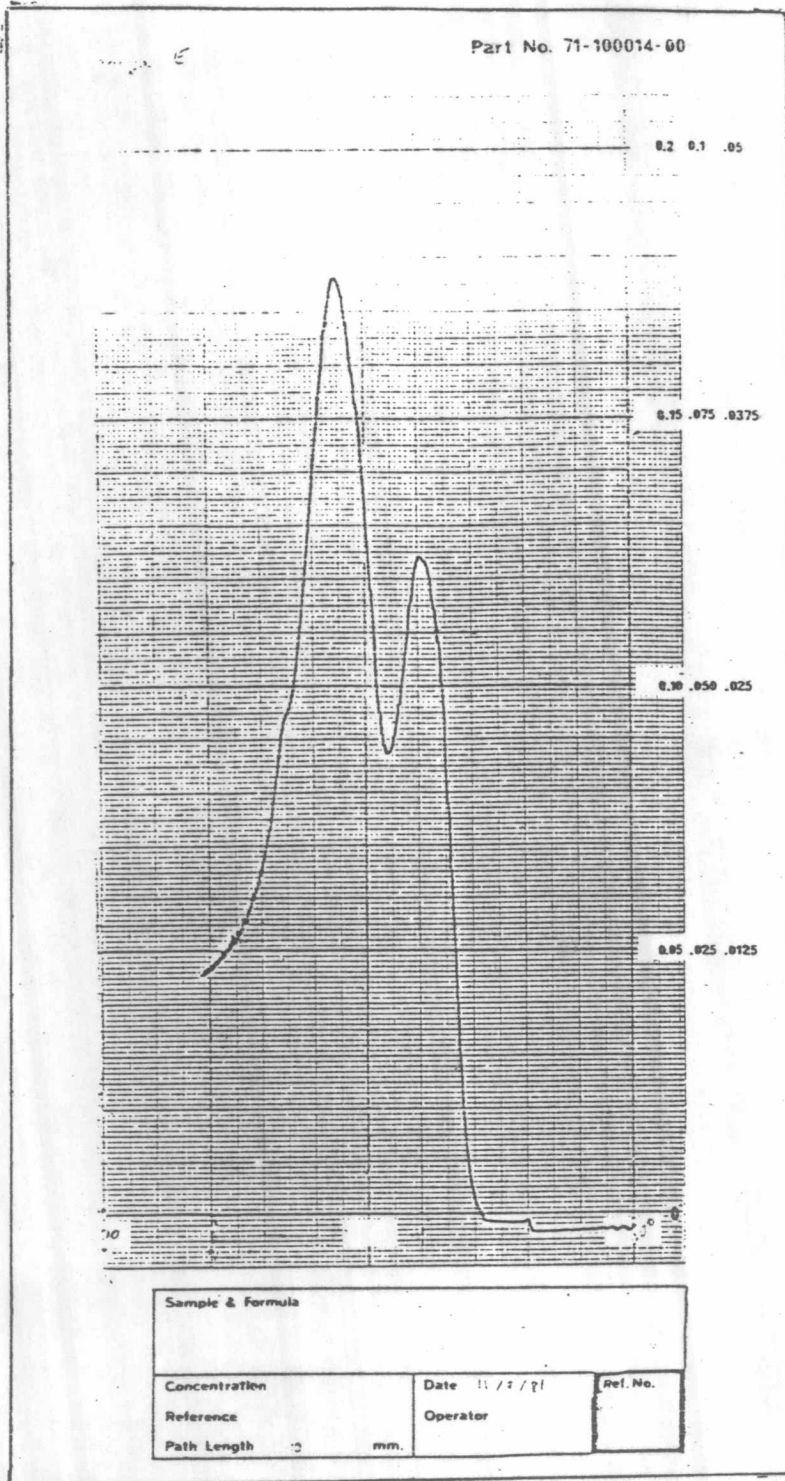
$R_f = 0.33$  [ใช้ silica gel เป็น adsorbent develop ด้วย methanol : trichloromethane (1:1 โดยปริมาตร)]

น้ำหนักโมเลกุล 394 (mass spectrum)

ผลการวิเคราะห์ธาตุ : วิเคราะห์ได้ C = 70.39 % H = 6.54 % N = 7.30 %

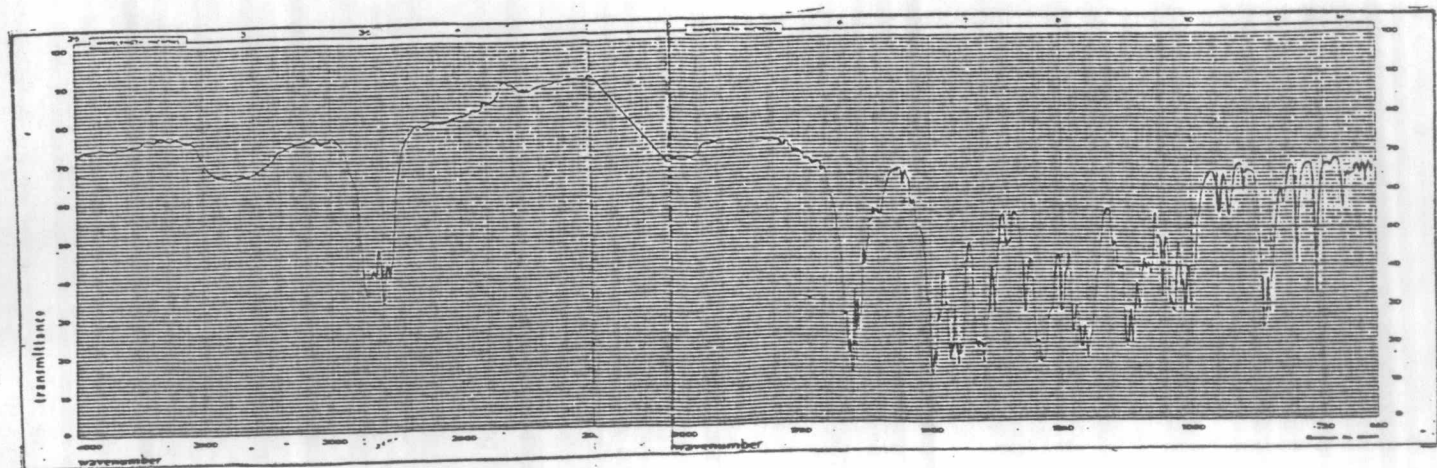
คำนวณจากสูตร  $C_{23}H_{26}N_2O_4$  C = 70.05 % H = 6.60 % N = 7.11 %

IR spectrum	ให้	ν	KBr max, $cm^{-1}$	ตามรูปที่	2	หน้า	10
				ตารางที่	2	หน้า	11
<sup>1</sup> H NMR spectrum (ใน $CDCl_3$ )				ตามรูปที่	3	หน้า	10
				ตารางที่	3	หน้า	12

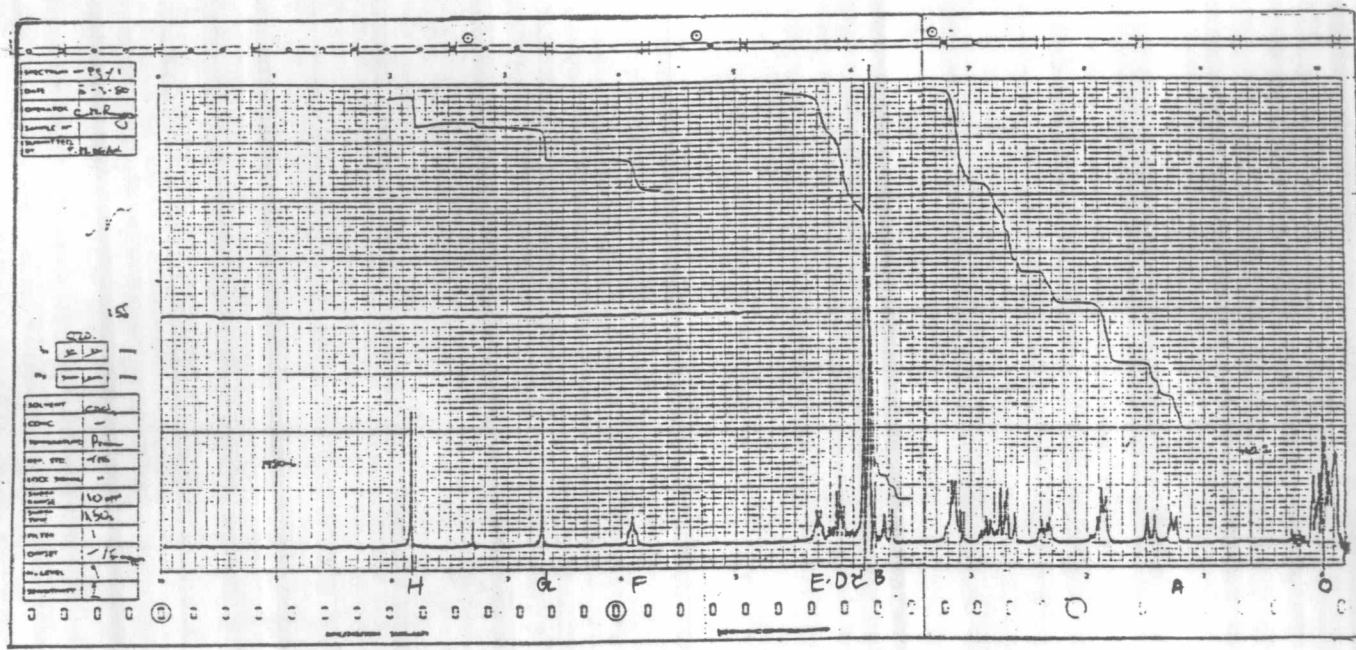


รูปที่ 1 UV spectrum ของสาร m.p. 176 - 178°





รูปที่ 2 --- IR spectrum ของสาร m.p. 176 - 178°



รูปที่ 3 <sup>1</sup>H NMR spectrum ของสาร m.p. 176 - 178°



ตารางที่ 2

IR absorption peaks ของสาร A m.p. 176 - 178°

Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Intensity	Assignments
3400	w(broad)	O-H stretching ของน้ำ
3010	w	C-H stretching ของ aromatic
2860	s	C-H stretching ของ CH <sub>2</sub> & CH <sub>3</sub>
2800	s	
1655	s	C = O stretching ของ amide
1645	m	C = C stretching
1500	s	C = C stretching ของ aromatic
1400	s	C-N stretching ของ amide
1280 - 90	s	C-O-C aryl - alkyl asymmetric vibration
1200	s	C-N stretching ของ tertiary amine
1125	s	C-O-C asymmetric aliphatic vibration
1040	m	C-O-C aryl - alkyl symmetric vibration
860	s	C-H olefinic bending
800	s	C=C-H aromatic out of plane bending
765	s	
710	w	CH <sub>2</sub> rocking

## ตารางที่ 3

<sup>1</sup>H NMR absorption peaks ของสาร m.p. 176 - 178°

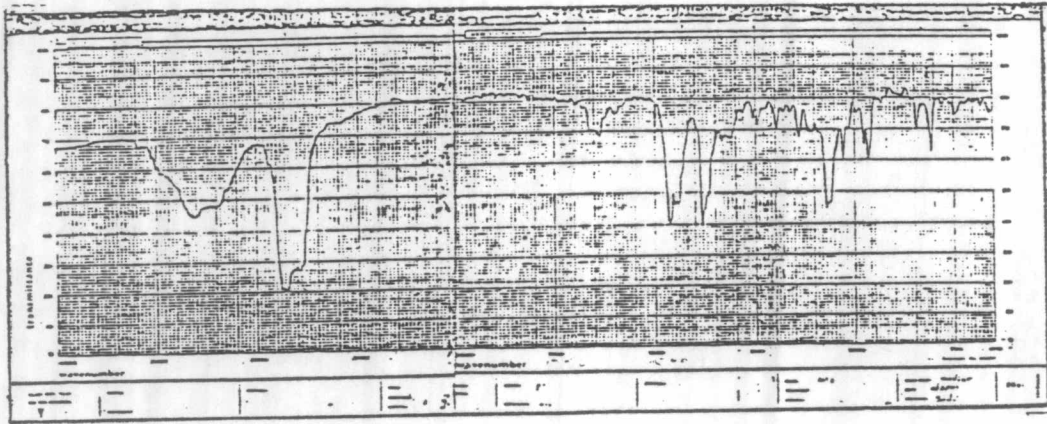
Peak labeled	Chemical shift	Proton assignments	Approximate integrated area (P.U)	No. of proton
0	0	CH <sub>3</sub> protons (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Si	-	-
A	1.28	proton ที่ตำแหน่ง 16	5.2	1
B	3.85	protons ของ methoxy group และ protons ที่ตำแหน่งที่ 20		
C	3.9	proton ของ methoxy group	17	3
D	4.12	protons ที่ตำแหน่งที่ 23	11	2
E	4.3	proton ที่ตำแหน่งที่ 12	6	1
F	5.9	proton ของ olefinic	5.5	1
G	6.9	proton ของ aromatic ที่ตำแหน่งที่ 1	5	1
H	7.84	proton ของ aromatic ที่ตำแหน่งที่ 4	5	1

2.8.2 การตรวจคุณสมบัติทางกายภาพ และ colour reaction ของสาร B

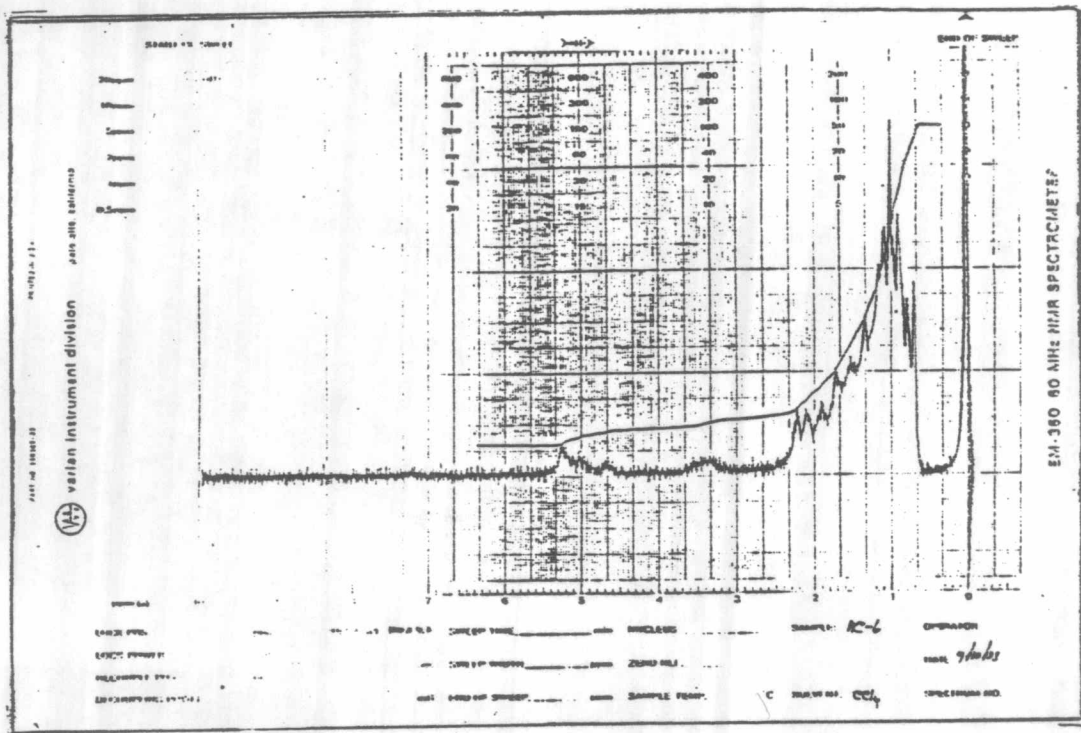
สาร B (m.p. 138 - 139<sup>o</sup>) ละลายได้ดีใน trichloromethane, benzene, diethyl ether, 2 - propanone, ethanol และ methanol

$R_f = 0.24$  [ ใช้ alumina เป็น adsorbent แล้ว develop ด้วย benzene : petroleum ether (1:9 โดยปริมาตร) ]

IR spectrum ให้ $\nu_{\text{max}}$ KBr, $\text{cm}^{-1}$	ตามรูปที่	4	หน้า	14
	ตารางที่	4	หน้า	15
<sup>1</sup> H NMR spectrum (ใน CDCl <sub>3</sub> )	ตามรูปที่	5	หน้า	15



รูปที่ 4 IR spectrum ของสาร m.p. 138 - 139°



รูปที่ 5 <sup>1</sup>H NMR spectrum ของสาร 138 - 139°

ตารางที่ 4

004198

IR absorption peaks ของสาร B m.p. 138 - 139°

Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Intensity	Assignments
3320	broad	stretching vibration of -OH
2800 - 2900	s	CH stretching vibration of CH <sub>3</sub> and CH <sub>2</sub>
1630 - 1660	broad (w)	C = C stretching vibration of R <sub>2</sub> C = CHR
1455	s	CH <sub>2</sub> bending vibration
1380	s	C - CH <sub>3</sub> bending vibration (symmetrical)
1060	s	C - O stretching vibration of 3C - OH equatorial steroid
960	w	CH out of plane bending vibration of trans RCH = CHR
810	w	CH out of plane bending vibration of R <sub>2</sub> C = CHR

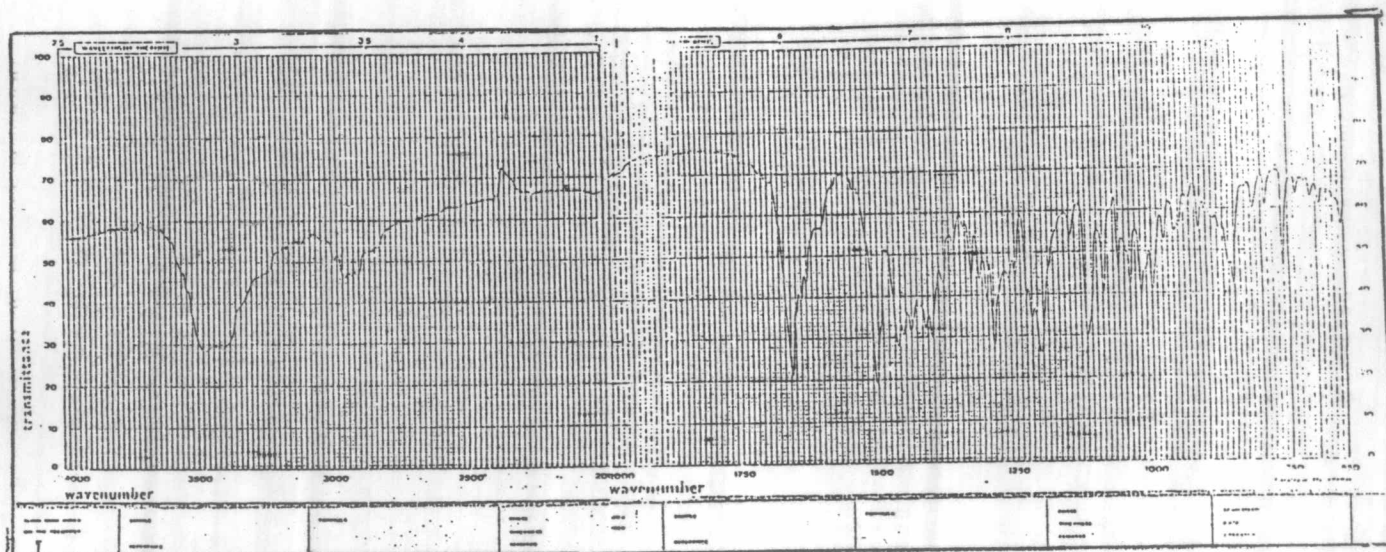
### 2.8.1.1 การเตรียมอนุพันธ์ของสาร

#### 2.8.1.1 A การเตรียม hydrochloride derivative ของสาร A

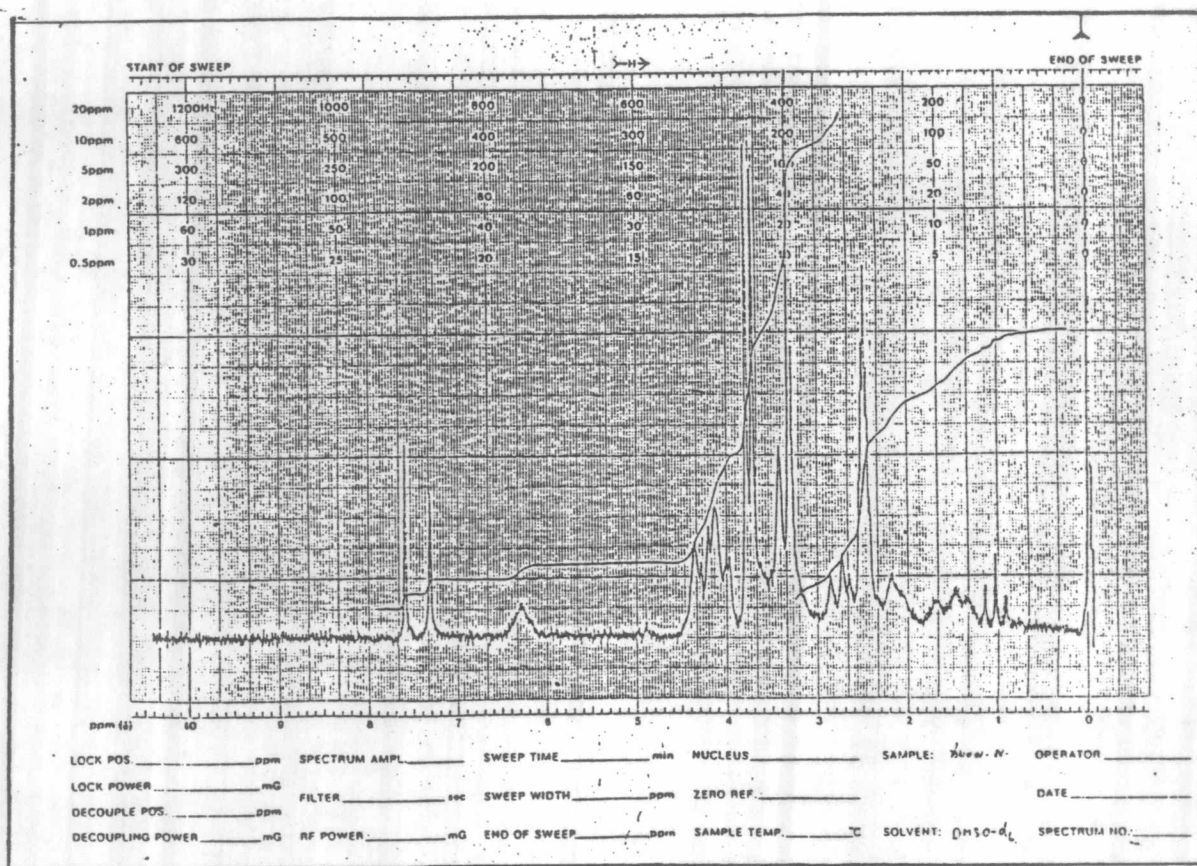
ละลายสาร A (5 mg) ใน 10 % กรดไฮโดรคลอริก ( $5 \text{ cm}^3$ ) แล้วใส่ crucible ไปตั้งบน water bath จนแห้ง ทิ้งไว้สักพักจะได้ผลึกสีขาว m.p.  $201 - 203^\circ$

2.8.1.1 B การเตรียม methyl iodide derivative ของสาร A<sup>7</sup> สารละลาย A (60 mg) ใน benzene ( $6 \text{ cm}^3$ ) คนให้ละลายให้หมด ใช้ syringe ฉีด methyl iodide  $2 \text{ cm}^3$  นำไป reflux พร้อมทั้ง heat 3 ชั่วโมง จะได้ตะกอนสีขาว กรอง นำมาตกผลึกใน ethanol ผสมกับ diethyl ether ได้ผลึกรูปเข็ม m.p.  $262 - 264^\circ$  หนัก 54 mg (83 % total yield)



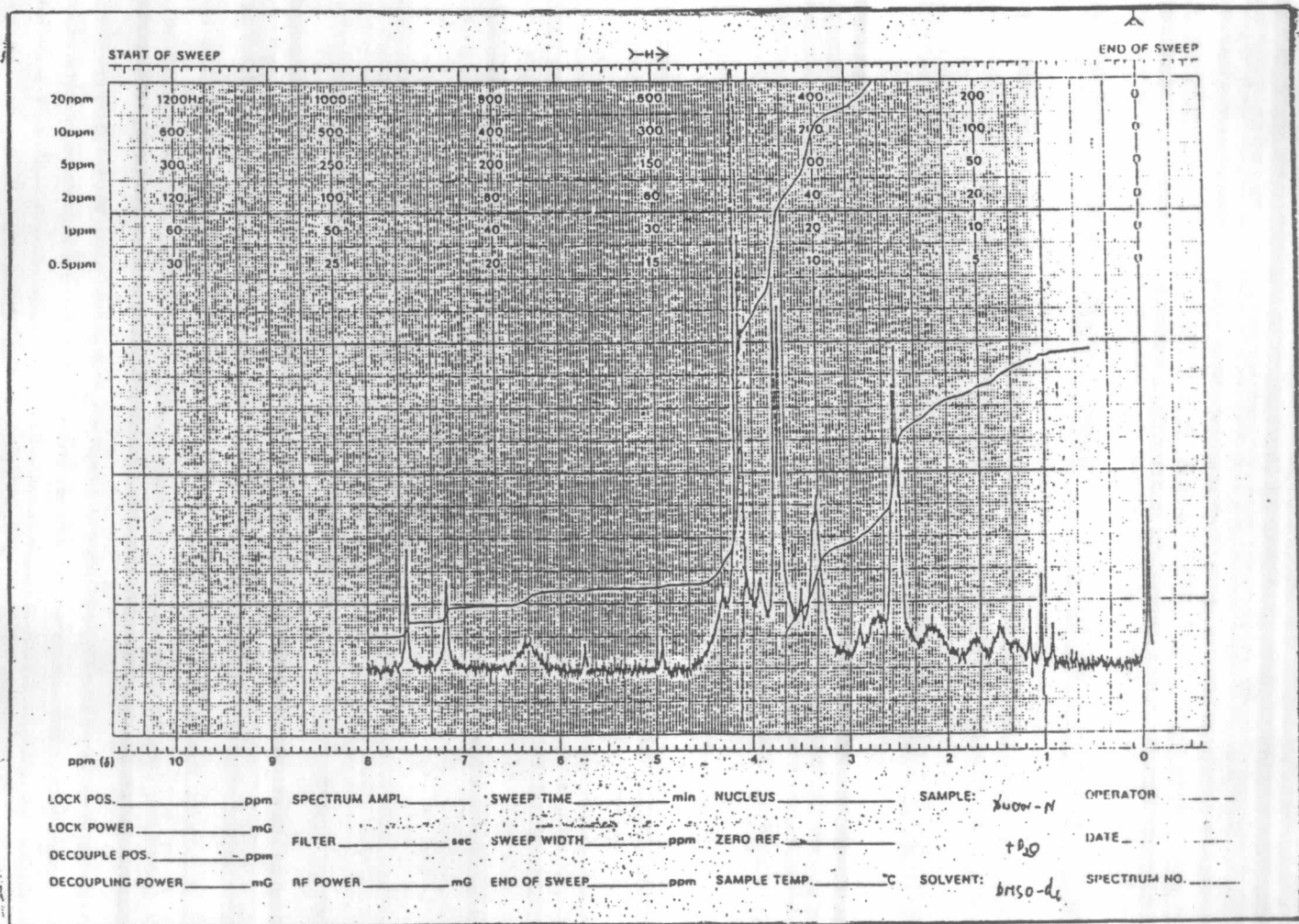


รูปที่ 6 IR absorption peaks ของ methyl iodide derivative ของสาร m.p. 176-178°



รูปที่ 7 <sup>1</sup>H NMR absorption peaks ของ methyl iodide derivative ของสาร m.p. 176-178°





รูปที่ 8  $^1\text{H}$  NMR absorption peaks ของ methyl iodide derivative เมื่อใส่  $\text{D}_2\text{O}$

ตารางที่ 5

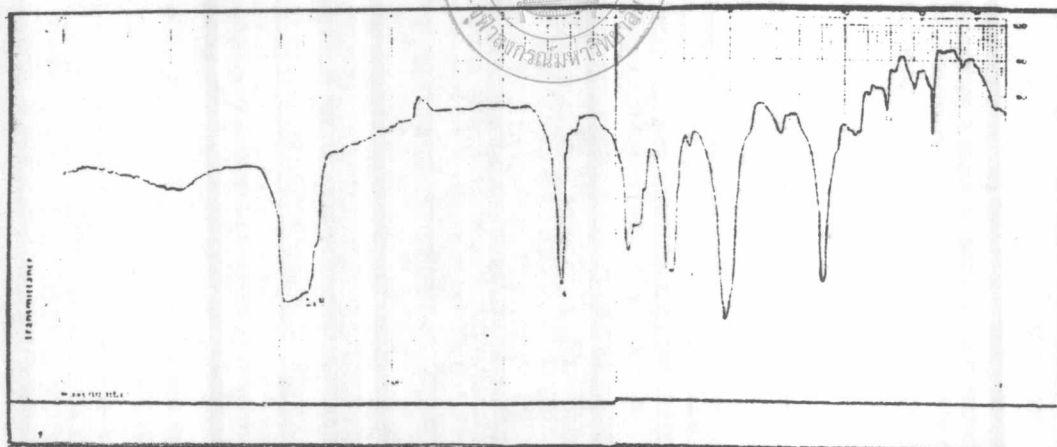
$^1\text{H}$  NMR absorption peaks ของ methyl iodide derivative ของสาร m.p. 176-178 $^{\circ}$

Peak labeled	Chemical shift	Proton assignments	Approximate integrated area (P.U.)	No. of proton
O	0	CH <sub>3</sub> protons ของ (CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Si	-	-
A	2.47	CH <sub>3</sub> protons ของ DMSO-d <sub>6</sub>	30	-
B	3.32	protons ของน้ำผลึก ไนโมเลกุล	35	-
C	3.4	CH <sub>3</sub> protons ของ $\begin{array}{c} + \\   \\ - \text{N}-\text{CH}_3 \\   \end{array}$	14	3
D	3.7	protons ของ methoxy group	13	3
E	3.8	protons ของ methoxy group และ protons ที่ ตำแหน่งที่ 20	21	5
F	6.3	proton ของ olefinic	4.5	1
G	7.34	proton ของ aromatic ตำแหน่งที่ 1	4.8	1
H	7.6	Proton ของ aromatic ตำแหน่งที่ 4	4.7	1

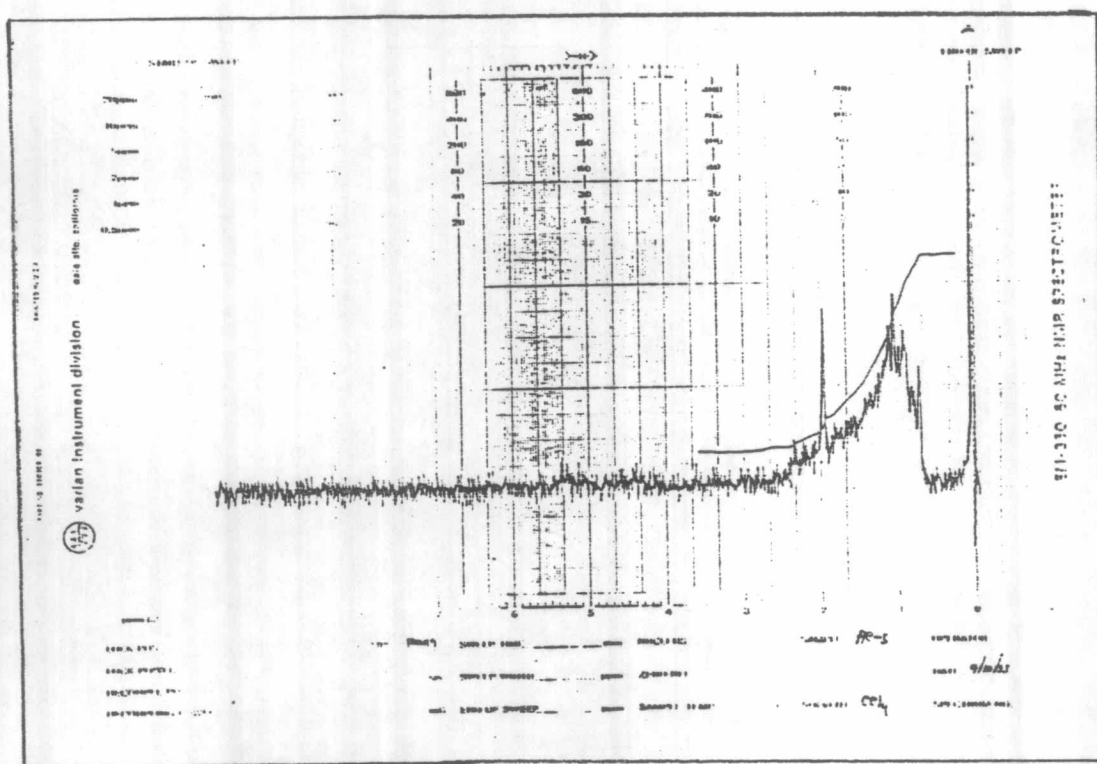
### 2.8.2.1 การเตรียมอนุพันธ์ของสาร

#### 2.8.2.1 A Acetate ของสาร B<sup>8</sup>

ละลายสาร B (25 mg) ใน anhydrous pyridine ( $2.5 \text{ cm}^3$ ) เติม acetic anhydride ลงไป ( $2.5 \text{ cm}^3$ ) นำสารละลายนี้มา reflux บน water bath 24 ชั่วโมง แล้วเทลงในน้ำแข็ง (5 g) คนประมาณ 15 นาที จะได้ผลึกสีขาว กรอง แล้วนำไปตกผลึกใน ethanol หลาย ๆ ครั้ง จะได้ผลึกเป็นแผ่นบาง ๆ สีขาว m.p.  $129 - 130^\circ$  (16 mg)



รูปที่ 9 IR spectrum ของ acetate ของสาร m.p. 138 - 139<sup>o</sup>



รูปที่ 10 <sup>1</sup>H NMR spectrum ของ acetate ของสาร m.p. 138 - 139<sup>o</sup>

ตารางที่ 6

IR absorption peaks ของ acetate ของสาร B m.p. 138 - 139°

Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Intensity	Assignments
2890 - 2980	broad	CH stretching vibration of CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub>
1725	s	C = O stretching vibration of Ketone
1460, 1435	s	CH bending vibration of CH <sub>3</sub> and CH <sub>2</sub>
1360 - 1380	s	C - CH <sub>3</sub> bending vibration
1250	s	C = O symmetric stretching of acetate
1035	s	C - O stretching vibration
970	s	CH out of plane of trans R - CH = CH - R
810	w	CH out of plane bending vibration of R <sub>2</sub> C = CHR