



2.1 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ตลอดการทดลองและอื่น ๆ

2.1.1 Column Chromatography<sup>24</sup> ใช้ Aluminium Oxide Standardised for Chromatography ของบริษัท Riedel Dehaën Ag., Seelze-Mannover เป็น adsorbent ในอัตราส่วนระหว่าง Aluminium oxide ต่อสารที่ต้องการจะแยกเท่ากับ 30 ต่อ 1 วิธีเตรียมคอลัมน์ทำไคดังนี้ สำหรับคอลัมน์ที่ไมมี Sintered glass ต้องใช้สำลีหรือใยแก้วที่สะอาดที่สุดที่ปลายคืบของคอลัมน์ซึ่งมีสายยางสวมอยู่ การปิดเปิดคอลัมน์ใช้ clip แทน Stop-cock ขณะที่คอลัมน์ปิดอยู่ให้บรรจุ Solvent ที่ต้องการให้ลงไปจนเกือบเต็ม แล้วปล่อยให้ Solvent ไหลออกเสียบ้างเพื่อไล่ฟองอากาศ เมื่อฟองอากาศออกหมดแล้ว จึงปิดคอลัมน์และเติม Solvent ลงไปอีกจนได้ระดับสูงประมาณ  $\frac{2}{3}$  ของคอลัมน์ แล้วเททรายที่สะอาดลงไปให้สูงขึ้นมาจากสำลีหรือใยแก้วประมาณ 0.5-1.0 ซม. ต่อจากนั้นจึงค่อย ๆ บรรจุ Aluminium oxide ลงไปให้ติดต่อกันจนหมด เปิดคอลัมน์ให้ Solvent ไหลออก จนระดับของ Aluminium oxide ไม่ลดลงต่อไป จึงปิดคอลัมน์แล้วเติมทรายที่สะอาดลงไปจนได้ความสูงเท่ากับตอนแรก ทรายที่เติมลงไปตอนหลังนี้เพื่อป้องกันไม่ให้ผิวหน้าของคอลัมน์ถูกกระทบกระเทือนหรือเป็นรอย ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ Solvent แหกไปจากผิวหน้าของ Alumina เมื่อต้องการจะใช้คอลัมน์ต้องปล่อยให้ระดับของ Solvent ลดลงจนเกือบแห้ง (Just dry) จึงค่อย ๆ รินสารละลายที่ต้องการจะแยกลงไป เมื่อระดับของสารละลายลดลงจนเกือบแห้ง จึงใช้ Solvent ที่เป็นตัวละลายสารนั้นจำนวนน้อย ๆ ล้างผิวภายในคอลัมน์ให้สะอาด ปล่อยให้ระดับของ Solvent ลดลงจนเกือบแห้งอีกครั้งหนึ่ง แล้วจึง elute หรือ develop คอลัมน์ด้วย Solvent ที่ต้องการ

24,32

2.1.2 Thin Layer Chromatography ใช้ Silica gel G.

(acc. to Stahl for thin layer chromatography) ของบริษัท E. Merck Ag. ประเทศเยอรมัน เป็น adsorbent การทำ Chromatoplates ใช้ Desaga spreader ทำการ Chromatoplates ขนาด 20 x 20 ซม.หนา 0.25 มม. จำนวน 5 plates ต้องใช้ adsorbent 30 กรัม ค่อน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันในขวดก้นกลมหรือขวดรูปกรวย ที่มี-จุดปิดเป็นเวลา 1-2 นาที แล้วจึงเทลงใน Spreader ที่ adjust ความหนาไว้เรียบร้อยแล้ว Chromatoplates ที่เตรียมได้นี้ต้องปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องพลองเป็นเวลา  $\frac{1}{2}$  - 1 ชม. แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 125° อีก 30 นาที และเก็บไว้ใน Desiccator ที่มี Anhydrous calcium chloride บรรจุอยู่ เวลาจะใช้จึงนำออกมา spot สารละลายของสารที่ต้องการทดสอบในกลอโรฟอร์มด้วย Micropipette (ใช้สารประมาณ 0.5 มิลลิกรัม ต่อ 1 spot) บนตำแหน่งของ Chromatoplate ซึ่งห่างจากขอบ 1.5 ซม. (Starting line) แต่ละ spot ควรห่างกัน 4 ซม. ห่างกันตรงข้ามจึงเส้นตายคั่นสอให้ขนานกับ Starting line และห่างจาก Starting line 10 ซม. เส้นนี้เรียกว่า Solvent front เมื่อ Solvent ระบายไปจาก spots หมดแล้วจึงขม Chromatoplate ลงใน tank ที่มี เบนซีน-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1:9) เป็น Developing solvent บรรจุสูงขึ้นมาจากก้น Tank ประมาณ 1 ซม. ปิด Tank ด้วยกระจก ปิดอับให้ระดับของ Developing solvent ขึ้นขึ้นไปจนถึง Solvent front (ประมาณ 15-30 นาที) จึงยก plate ออกจาก Tank ทำ plate ให้แห้งแล้ว spray ด้วย 2, 7 - Dichlorofluorescein Solution (0.2% ในเอทิลแอลกอฮอล์) ซึ่งเป็น Detecting agent หลังจาก Detecting agent แห้งแล้วจะเห็น Spots ของสารปรากฏขึ้นบน Chromatoplate บางกรณีต้องดูด้วย Ultraviolet light จึงจะมองเห็น Spots เหล่านั้น Rf value

ของแต่ละ spot ทั่วได้จากสูตรต่อไปนี้

$$R_f \text{ value} = \frac{\text{ระยะทางของสารจาก Starting line}}{\text{ระยะทางของ Developing solvent จาก Starting line}}$$

2.1.3 Liebermann - Burchard Reaction <sup>21</sup> ละลายสารที่ต้องการทดสอบ จำนวน 2 - 3 มิลลิกรัมในคลอโรฟอร์ม 4 - 5 หยด ค่อย ๆ หยด Acetic anhydride ลงไป 2 - 3 หยด และกรอกตามระดับเข้มข้น 1 หยด เขย่า ถ้ามีสีเกิดขึ้นแสดงว่าสารนั้นเป็นสารประกอบพวก Steroids หรือ Triterpenoids.

2.1.4 Infra - red spectrum Infra - red spectra ของสารต่าง ๆ ทั่วได้จากเครื่อง Perkin - Elmer - 421 Infrared Spectrophotometer และ Perkin - Elmer - 237 Grating Infrared Spectrophotometer

2.1.5 การหาจุดหลอมเหลวใช้เครื่อง Fisher - Johns melting point apparatus.

2.1.6 การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของธาตุต่าง ๆ ส่งไปทำที่กองเคมี กรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงอุตสาหกรรม

2.1.7 การทำสารให้แห้งก่อนการวิเคราะห์หรือก่อนทำ Infra - red spectra ใช้ Abderhalden vacuum drying apparatus โดบมี anhydrous phosphorous pentoxide เป็นตัวดูดความชื้นเป็นเวลานาน 12 - 24 ชม.

2.1.8 การทำสารให้แห้งที่ไม่เกี่ยวกับการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของธาตุหรือการทำ Infra - red spectra ให้ทำใน desiccator ที่มี anhydrous calcium chloride บรรจุอยู่ ภายใต้ความกดก้นต่ำ ๆ

### 2.1.9 Hydrogenation ใช้ Simple Apparatus For Hydrogenation<sup>33</sup>

2.1.10 บีโตร์เลียมอีเทอร์ที่ใช้ตลอดการทดลอง ใช้บีโตร์เลียมอีเทอร์ที่มีจุดเดือดระหว่าง 40-60° และ Solvent ที่ใช้ตลอดการทดลองนี้ทุกชนิดนำมาอุ่นใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

## 2.2 การสกัด (Extraction)

### 2.2.1 การสกัดสารจากต้นถอยแถบน้ำด้วยบีโตร์เลียมอีเทอร์

ใช้บีโตร์เลียมอีเทอร์จำนวน 50 ลิตร สกัดต้นถอยแถบน้ำที่ตากแห้ง และกละเอียดแล้วหนัก 5,000 กรัม ใน Soxhlet Apparatus เป็นเวลานาน 30 ชม. กรองผ่าน Fluted filter paper แล้วนำสิ่งที่กรองได้ไปกลั่นได้บีโตร์เลียมอีเทอร์ออกจนเกือบแห้ง จึงนำมาระเหยบน Water bath และเป่าด้วยลมร้อนจากเครื่องเป่าจนบีโตร์เลียมอีเทอร์ออกหมด จะได้ Crude extract มีลักษณะเป็นยางเหนียวสีน้ำตาล 42 กรัม (0.84% โดยน้ำหนักจากต้นถอยแถบน้ำ)

## 2.3 การแยกสาร (Separation)

### 2.3.1 วิธีแยกสารจาก Crude extract ที่ได้จากการสกัดต้นถอยแถบน้ำด้วยบีโตร์เลียมอีเทอร์

นำ Crude extract ที่ได้จากการสกัดต้นถอยแถบน้ำด้วยบีโตร์เลียมอีเทอร์ตามวิธี 2.2.1 จำนวน 42 กรัม ละลายในเบ็นซีน 400 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. ยาว 100 ซม. ใช้ Aluminium Oxide (1200 กรัม) เป็น Adsorbent

และใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็น Solvent เตรียมคอลัมน์ตามวิธี 2.1.1 elute คอลัมน์ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์, อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์(1:19), อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์(1:9), อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์(1:4), อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์(1:1) อะซีโตนและเมทิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ รับ Eluate ครั้งละ 2 ลิตรแล้วนำ Eluate ที่รับไว้แต่ละครั้ง (Fraction) มากลับใส่ Solvent ออกจนเหลือสารละลายประมาณ 50 มิลลิลิตร จึงทิ้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ผลที่ได้จาก Column chromatography แสดงไว้ในตารางที่ 1 (หน้า 8 )

จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าสารแต่ละชนิดที่ตกผลึกออกมามีปริมาณ น้อยมาก ดังนั้นจึงต้องนำตัวอย่างน้ำที่ตกค้างและบดละเอียดแล้วมาสกัด ตามวิธี 2.2.1 และแยกตามวิธี 2.3.1 อีกหลาย ๆ ครั้ง เพื่อรวบรวม ให้มีปริมาณมากพอที่จะทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ได้ต่อไป ดังตารางที่ 2 (หน้า 10 )

## 2.4 การทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)

### 2.4.1 วิธีทำสาร m.p. 70 - 75° ในบริสุทธิ์

นำสาร m.p. 70 - 75° ซึ่งได้จากการ elute คอลัมน์ตามวิธี 2.3.1 จำนวน 2.22 กรัม มาตกผลึก 6 ครั้ง ในเบนซีน จะได้ผลึกรูป ขนากสีขาว เหนียว และเป็นแวว มีจุดหลอมเหลว 79 - 80°หนัก 1.90 กรัม ถ้าหนักให้เป็นสาร ก.

ตารางที่ 1

การแยกสารออกจาก Crude extract โดยวิธี Column Chromatography

ชนิดของ Eluant	จำนวน fraction (ครั้งละ 2 ลิตร)	m.p ของสารที่ตกผลึก ( $^{\circ}\text{C}$ )	น. น. ของสารที่ตกผลึก(กรัม)	Liebermann - Burchard Reaction
ปิโตรเลียมอีเทอร์	1	Semisolid สีเหลือง	1.50	แดง $\rightarrow$ เขียว
ปิโตรเลียมอีเทอร์	14	น้ำมัน	0.62	แดง $\rightarrow$ เขียว
อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 19)	5	น้ำมัน	0.28	เหลือง $\rightarrow$ น้ำตาล $\rightarrow$ เขียว
อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 19)	4	70-75	0.32	-
อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 19)	6	60-185	0.44	เหลือง $\rightarrow$ แดง
อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 9)	3	130-134	0.35	แดง $\rightarrow$ ม่วง $\rightarrow$ น้ำเงิน $\rightarrow$ เขียว
อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 9)	6	130-150	0.51	แดง $\rightarrow$ ม่วง $\rightarrow$ น้ำเงิน $\rightarrow$ เขียว
อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 9)	4	115-118	0.03	เหลืองแกมเขียว
อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 9)	5	166-168	0.01	เหลือง

ตารางที่ 1 (ต่อ)

การแยกสารออกจาก Crude extract โดยวิธี Column chromatography

ชนิดของ Eluant	จำนวน fraction (ครั้งละ 2 ลิตร)	m.p. ของสารที่ตกผลึก (°C)	น. น. ของสารที่ตกผลึก(กรัม)	Liebermann - Burchard Reaction
อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 4)	20	น้ำมัน	1.97	น้ำตาล → เขียว
อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 1)	5	198-204	0.03	ม่วง → แดง
อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 1)	23	ยางแข็ง	1.41	ม่วง → น้ำตาล
อะซีโตน	10	น้ำมัน	1.10	น้ำตาล
เมทิลแอลกอฮอล์	10	Semisolid	1.80	น้ำตาล

ตารางที่ 2

ปริมาณของ Crude extract และสารที่สกัดและแยกได้

ครั้งที่ ทำ	น้ำหนักของ น้ำหมักชนิดอบแห้ง น้ำสกัดกากแห้งและ บดละเอียด (กรัม)	น้ำหนักของ Crude ex- tract ที่สกัด โดยวิธี 2. 2. 1 (กรัม)	น้ำหนักของสารที่แยกออกจาก Crude extract โดยวิธี 2. 3. 1 (กรัม)							หมายเหตุ
			สาร m.p. 70-75	สาร m.p. 60-105	สาร m.p. 130-134	สาร m.p. 130-150	สาร m.p. 115-118	สาร m.p. 166-168	สาร m.p. 198-204	
1	2,000	21	0.15	0.20	0.18	0.27	0.01	-	-	
2	8,000	54	0.58	0.63	0.55	0.65	0.06	0.04	0.03	
3	6,000	50	0.34	0.47	0.40	0.53	0.05	0.02	0.02	
4	5,000	40	0.32	0.46	0.28	0.52	0.03	0.01	0.01	สาร m.p. 166-168
5	3,000	36	0.10	0.38	0.22	0.47	0.02	-	-	และ
6	7,000	53	0.44	0.70	0.48	0.67	0.04	0.02	0.03	198-204
7	4,000	40	0.21	0.24	0.32	0.44	0.02	-	-	ซึ่งเป็นบาง ครั้งสกัด ได้
รวม	35,000	294	2.22	3.00	2.43	3.55	0.23	0.09	0.09	
เฉลี่ย	5,000	42	0.32	0.44	0.35	0.51	0.03	0.01	0.01	



#### 2.4.2 วิธีทำสาร m.p. 60 - 185° ในบริสุทธิ์

นำสาร m.p. 60 - 185° ซึ่งได้จากการ elute คอลัมน์ด้วย อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 19) ตามหัวข้อ 2.3.1 จำนวน 3.08 กรัม ละลายในเบนซีน 15 มิลลิลิตร ย้ายลงใน Column Chromatography ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 90 เซนติเมตร ใช้ Aluminium Oxide (100 กรัม) เป็น Adsorbent และใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็น Solvent , elute คอลัมน์ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 19), เบนซีน-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 9), เบนซีน-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 4), เบนซีน - ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 1) ตามลำดับ รับ Fraction ละ 75 มิลลิลิตร ได้ผลทั้งแสดงไว้ในตาราง ที่ 3 (หน้า 12)

นำสาร m.p. 77 - 79° ที่ได้ตามตาราง ที่ 3 จำนวน 1.04 กรัม มาตกผลึกในเบนซีน 5 ครั้ง จะได้สารซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับสาร ก. มีจุดหลอมเหลว 79 - 80° หนัก 0.85 กรัม เมื่อทำ mixed melting point กับสาร ก. m.p. ไม่เปลี่ยนแปลง และ Infra - red spectrum ก็ identical กับสาร ก. ทุกประการ แสดงว่าสาร m.p. 79 - 80° ที่ได้ตามตารางที่ 3 เป็นสารชนิดเดียวกับสาร ก. (0.94% โดยน้ำหนักจาก Crude extract)

ส่วนสาร m.p. 185 - 212° ที่ได้ตามตารางที่ 3 เช่นเดียวกัน แบ่งมา 0.60 กรัม ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกหลาย ๆ ครั้งในอะซิโตน-เมทิลแอลกอฮอล์ (1 : 4) แต่ตกผลึกอย่างมาก และผลสุดท้ายจะได้ สารซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มละเอียด ไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว 213 - 214° หนัก 0.25 กรัม (0.36% โดยน้ำหนักจาก Crude extract) กำหนดให้เป็นสาร ข. และจากการทดลองพบว่าถ้าทำให้เป็น acetyl derivative

ตารางที่ 3

Column Chromatography ของสาร m.p. 60 -135°

ชนิดของ Eluant	จำนวนfractions (fraction ละ 75 ml)	m.p. (°C)	น.น. (กรัม)	Liebermann-Burchard Reaction
ปิโตรเลียมอีเทอร์	4	น้ำมัน	0.15	-
ปิโตรเลียมอีเทอร์	5	77-79	1.04	-
เบนซีน-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 19)	6	105-212	1.79	เหลือง → แดง
เบนซีน-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 9)	5	-	-	-
เบนซีน-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 4)	5	-	-	-
เบนซีน-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 1)	5	-	-	-

หรือ Benzoyl derivative แล้ว จะสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายกว่าการทำโดยตรงดังกล่าว

#### 2.4.2.1 การทำสาร ข. ให้บริสุทธิ์โดยทำเป็น Acetyl

derivative ละลายสาร m.p. 185 - 212° จำนวน 0.5 กรัม ใน Pyridine 5 มิลลิลิตร เติม Acetic anhydride จำนวน 2.5 มิลลิลิตร ปิ่คจุกเขมาแรง ๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วเทลงในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว กรอง และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้งจนหมดกลิ่น Pyridine ทำตะกอนในแห้งจะได้สารหนัก 0.54 กรัม ตกผลึกสารที่ได้หลาย ๆ ครั้งในอะซีโตน จะได้ Acetyl derivative มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม, สี m.p. 217 - 218° จำนวน 0.41 กรัม

#### 2.4.2.2 การทำสารข. ให้บริสุทธิ์โดยทำเป็น Benzoyl

derivative ละลายสาร m.p. 185 - 212° จำนวน 0.3 กรัม ใน Pyridine 3 มิลลิลิตร เติม Benzoyl chloride ที่กลั่นใหม่จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ปิ่คจุกเขมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จึงเทลงในน้ำกลั่นจำนวน 25 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว รินน้ำทิ้ง และคนตะกอนกับสาร ละลายไซเคเลียม การนอเนตชัน 5% และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดกลิ่น Pyridine ทำตะกอนให้แห้งจะได้สารหนัก 0.32 กรัม ตกผลึกสารที่ได้ในอะซีโตน หลาย ๆ ครั้ง จะได้ Benzoyl derivative มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี m.p. 254 - 256° จำนวน 0.2 กรัม

#### 2.4.3 วิธีทำสาร m.p. 130 - 134° ให้บริสุทธิ์

นำสาร m.p. 130 - 134° ซึ่งได้จากการ clute คอลัมน์ด้วย อีเทอร์ - ปีโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 9) ตามวิธี 2.3.1 จำนวน 1.0 กรัม มาตกผลึกหลาย ๆ ครั้งในคลอโรฟอร์มและเมทิลแอลกอฮอล์ (1 : 6)

จะได้สารซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว  $136 - 137^{\circ}$  จำนวน 0.84 กรัม กำหนดให้เป็นสาร ก.

#### 2.4.4 วิธีทำสาร m.p. 130 - 158<sup>o</sup> ในบริสุทธิ

นำสาร m.p. 130 - 158<sup>o</sup> ซึ่งได้จากการ elute คอลัมน์ด้วย อีเทอร์ - ปีโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 9) ตามวิธี 2.3.1 จำนวน 2.0 กรัม มาทำ Fractional crystallisation ในคอลโรฟอร์มและเมทิลแอลกอฮอล์ (1 : 6) จนจุดหลอมเหลวของสารที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลง ผลสุดท้ายจะได้สาร 2 ชนิด เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี ชนิดหนึ่งมีจุดหลอมเหลว  $136 - 137^{\circ}$  น้ำหนัก 0.25 กรัม อีกชนิดหนึ่งมีจุดหลอมเหลว  $168 - 169^{\circ}$  น้ำหนัก 0.95 กรัม (0.58% โดยน้ำหนักจาก Crude extract ) กำหนดให้เป็นสาร ง. สำหรับสาร m.p.  $136 - 137^{\circ}$  เมื่อเปรียบเทียบ Infrared spectrum กับสาร ค. แล้วปรากฏว่า identical กันทุกประการ และเมื่อทำ mixed melting point ก็ไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าสาร m.p.  $136 - 137^{\circ}$  ที่ได้จากการทำ Fractional crystallisation ของสาร m.p. 130 - 158<sup>o</sup> เป็นสารชนิดเดียวกับสาร ค. (0.83% จากน้ำหนัก Crude extract )

#### 2.4.5 วิธีทำสาร m.p. 115 - 118<sup>o</sup> ในบริสุทธิ

นำสาร m.p. 115 - 118<sup>o</sup> ซึ่งได้จากการ elute คอลัมน์ด้วย อีเทอร์ - ปีโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 9) ตามวิธี 2.3.1 จำนวน 0.2 กรัม มาตกผลึกในอะซีโตนและปีโตรเลียมอีเทอร์ (3 : 1) 4 ครั้ง จะได้สาร m.p.  $120 - 121^{\circ}$  น้ำหนัก 0.16 กรัม (0.06% โดยน้ำหนักจาก Crude extract ) กำหนดให้เป็นสาร จ.

## 2.5 การตรวจลักษณะของสารประกอบที่แยกออกมาได้

(Identification Of Compounds)

### 2.5.1 การตรวจลักษณะของสาร ก., ก.ป. 79 - 30

#### 2.5.1.1 Physical Properties and Colour Reaction

ของสาร ก. ลักษณะของสาร ก. เป็นผลึกรูปอนนิก สีขาว เบาและมีแฉว ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เท็นซีนและเมทิลแอลกอฮอล์ไม่ละลาย ในน้ำ ไม่ให้สีกับ Liebermann - Buchard Reaction ไม่ฟอกสีโบรมีน ในคาร์บอนเตตระคลอไรด์ หา RI value (ตามวิธี 2.1.2) ได้ 0.30 เมื่อทำการวิเคราะห์หาธาตุต่าง ๆ พบว่ามี

C = 81.72 %, H = 14.21 %

คำนวณจาก Ceryl alcohol ( $C_{26}H_{54}O$ ) เปรียบเทียบได้

C = 81.60 %, H = 14.22 %

Infra - red spectrum ของสาร ก. (รูปที่ 1 หน้า 42 )

แสดง Absorption peaks ดังตารางที่ 5 ( หน้า 52 )

#### 2.5.1.2 Acetylation ของสาร ก.<sup>30</sup> ละลายสาร ก. 0.5

กรัมด้วย Pyridine 5 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Acetic anhydride ลงไป 2.5 มิลลิลิตร ต่อ Reflux Condenser แล้ว reflux บน Water bath เป็นเวลา 3 ชม. ทำให้เป็น เกล็ดในน้ำกลั่น ปนน้ำแข็งจำนวน 50 มิลลิลิตร ปล่อยให้แห้ง กรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น หลายครั้งจนหมดเกล็ด Pyridine ทำตะกอนในแห้ง จะได้สารหนัก 0.55 กรัม

สกัดสารที่ได้ในปิโตรเลียมอีเทอร์จนจุลหอยเหลวคงที่ จะได้ Acetyl derivative ของสาร ก. มีลักษณะเป็น Amorphous solid จำนวน 0.4 กรัม มีจุดหลอมเหลว 60.5 - 61° ค่า Rf value (2.1.2) ได้ 0.66

ผลจากการวิเคราะห์พบว่า

C = 79.26 %, H = 13.23 %

คำนวณจาก Ceryl acetate ( $C_{28}H_{56}O_2$ ) เปรียบเทียบได้

C = 79.18 %, H = 13.29 %

Infra-red spectrum ของ Acetyl derivative ของสาร ก. (รูปที่ 2 หน้า 42) แสดง Absorption peaks ดังตารางที่ 6 (หน้า 33)

2.5.1.3 Hydrolysis ละลาย Acetyl derivative ของสาร ก. จำนวน 0.2 กรัมด้วยเบ็นซีน 2 - 3 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ในเมทิลแอลกอฮอล์ 4 มิลลิลิตร reflux บน Water bath เป็นเวลา 5 ชม. ทำให้เย็น เทลงในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร คนขึ้นทั่ว กรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดคราบ ทำตะกอนให้แห้ง จะได้สารหนัก 0.17 กรัม สกัดสารที่ได้ในเบ็นซีน 3 ครั้ง จะได้สารซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปขนนก มีจุดหลอมเหลว 79 - 80° เพื่อหา mixed melting point กับสาร ก., m.p. ไม่เปลี่ยนแปลง และมี Rf value (2.1.2) เท่ากับสาร ก.

13.30  
 2.5.1.4 Oxidation ของสาร ก. ละลายสาร ก. 0.6 กรัม  
 ด้วย Glacial acetic acid จำนวน 10 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด  
 50 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถันเข้มข้นลงไป 0.6 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ  
 เติมสารละลายของโซเดียมไดโครเมตจำนวน 0.88 กรัม ในน้ำกลั่น 1  
 มิลลิลิตร reflux บน Water bath เป็นเวลา 2 ชม. ทำให้เย็น  
 เหลงในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว กรอง อุ่นตะกอนกับกรดกำมะถัน  
 ข้น 5 % จำนวน 20 มิลลิลิตร บน Steam bath ทำให้เย็น กรอง  
 ตะกอนออก ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด ทำตะกอนให้แห้ง จะได้  
 สารหนัก 0.58 กรัม ตกผลึกสารที่ได้ในเบนซีนและเอทิลแอลกอฮอล์  
 (8 : 1) จะได้สาร 2 ชนิด ตกผลึกออกมา ชนิดแรกมีจุดหลอมเหลว 82.5°  
 กำหนดให้เป็นสาร จ. ชนิดหลังมีจุดหลอมเหลว 81° กำหนดให้เป็นสาร ข.  
 สารทั้งสองชนิดมีลักษณะเป็น Amorphous solid ทา Rf value (2.1.2)  
 ได้ 0.75 และ 0.05 ตามลำดับ

ผลจากการวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดพบว่า

สารจ. มี C = 82.00 %, H = 13.65 %

คำนวณจาก Ceryl cerotate ( $C_{52}H_{104}O_2$ ) เปรียบเทียบ  
 ได้ C = 82.03 %, H = 13.77 %

สารข. มี C = 78.83 % H = 12.96 %

คำนวณจาก Cerotic acid ( $C_{26}H_{52}O_2$ ) เปรียบเทียบ  
 ได้ C = 78.72 %, H = 13.21 %

Infra - red spectrum ของสาร จ. m.p. 82.5° (รูปที่ 3  
 หน้า 43) แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 7 (หน้า 33)



Infra-red spectrum ของสาร ช. m.p.  $51^{\circ}$  (รูปที่ 4 หน้า 43) แสดง Absorption peaks ดังตารางที่ 8 (หน้า 34) ซึ่ง identical กับ Infra-red spectrum ของ Cerotic acid (รูปที่ 5 หน้า 44) ทุกประการ

2.5.1.5 การเตรียม Amide ของสาร ช. <sup>33</sup> เติม Thionyl chloride ซึ่งกลั่นใหม่จำนวน 0.5 มิลลิลิตรลงในขวดก้นกลมขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีสารช. บรรจุอยู่ 0.1 กรัม เขย่าให้เข้ากัน แล้ว reflux บน Water bath เป็นเวลา 3 ชม. จึงกลั่นได้ Thionyl chloride ที่เหลือออกให้หมด เติมสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น (sp.gr. 0.88) ที่ทำให้เย็นใน Freezer กลั่นได้จำนวน 5 มิลลิลิตรลงไปในบน Water bath 2 - 3 นาที เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร กรองเอาตะกอนออกล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดกลั่นแอมโมเนีย พักตะกอนให้แห้ง จะได้สารหนัก 0.09 กรัม ตกผลึกสารที่ได้ในเอทิลแอลกอฮอล์ 2 ครั้ง จะได้สารซึ่งมีลักษณะเป็น Amorphous solid จำนวน 0.05 กรัม มีจุดหลอมเหลว  $105 - 107^{\circ}$

ผลจากการวิเคราะห์พบว่า

C = 79.06 %, H = 13.30%, N = 3.49 %

คำนวณจาก Amide ของ Cerotic acid ( $C_{26}H_{53}ON$ ) เปรียบเทียบได้

C = 78.92 %, H = 13.50 %, N = 3.54 %



Infra-red spectrum ของ Amide ของสาร ๑. (รูปที่ 6 หน้า 44) แสดง Absorption peaks ดังตารางที่ ๑ (หน้า 34 )

#### 2.5.1.6. Hydrolysis สาร ๑. m.p. ๘2.5 ในสาร ๑.

๐.15 กรัม ในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ จำนวน ๐.25 กรัม ในน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร

Reflux บน water bath จนปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นสมบูรณ์ (ประมาณ 2 ชม.) - จะได้สารละลายซึ่งมีลักษณะเหมือนน้ำส้ม ทำสารละลายที่ได้ให้เป็นกรด ด้วยกรดกำมะถัน 5% เติมน้ำกลั่นทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว กรองเอาตะกอนออก ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมด กรดน้ำกลั่นให้แห้ง จะได้สารหนัก ๐.16 กรัม

24,32

#### 2.5.1.7 Preparative Thin Layer Chromatography

ละลายสาร ๐.16 กรัม ซึ่งได้จากวิธี 2.5.1.6 ในกลอโรฟอร์ม 3 มิลลิลิตร ใช้ Micropipette ดูดสารละลายจำนวน 1 มิลลิลิตร spot ให้เป็นเส้นตรง (streak) ลงบน Starting line ของ Chromatoplate ขนาด 20 x 20 ซม. ซึ่งมี Silica gel หนา 2 มิลลิเมตรเป็น Adsorbent (ใช้ทั้งหมด 3 plates) หลังจาก Solvent ระเหยไปหมดแล้ว จึงจุ่ม Chromatoplates ลงใน Tank ที่มีชั้นซิลิกาเจลแอลกอฮอล์ (3 : 1) เป็น Developing solvent ปิดฝา Tank ปล่อยให้ Developing solvent ซึมขึ้นไปจนได้ระยะทางประมาณ 15 เซนติเมตรจาก Starting line จึงยก Chromatoplate ออกจาก Tank ทำให้แห้งแล้ว spray ด้วย 2, 7-dichlorofluorescein solution ทำ Plate ให้แห้งอีกครั้งหนึ่ง จึงส่องดูด้วย Ultra-violet light จะเห็นสารแยกเป็น 2 แถบ แถบบนอยู่เกือบประชิดกับ Solvent front และแถบล่างอยู่ที่ Starting line แยกแถบทั้งสองออกจาก

Plate ด้วย Spatula พัดน้ำแต่ละส่วนไปสกัดเอาสารออกจาก Silica gel ที่มีใน Soxhlet Apparatus โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็น Solvent เป็นเวลานาน 12 ชม. หลังจากกลั่นไคลโคโรฟอร์มออกหมดแล้ว สำหรับแถบบนจะได้สาร 0.07 กรัม และแถบล่างจะได้สารประมาณ 0.06 กรัม ตยลึกรสารที่ได้จากแถบบนในเบ้นซิ่น 2 ครั้ง จะได้สารซึ่งมีลักษณะเป็น Amorphous solid มีจุดหลอมเหลว  $79 - 80^{\circ}$  มี Rf value 0.30 (2.1.2) เมื่อทำ mixed melting point กับสาร ก. ก็ไม่เปลี่ยนแปลง และ Infra-red spectrum ก็ identical กับสาร ก. ทุกประการ

ส่วนสารที่ได้จากแถบล่าง หลังจากตกผลึกในเอทิลแอลกอฮอล์ 2 ครั้ง จะได้สารซึ่งมีลักษณะเป็น Amorphous solid มีจุดหลอมเหลว  $80 - 81^{\circ}$  มี Rf value 0.05 (2.1.2) ซึ่งเท่ากับสาร ข. เมื่อทำ mixed melting point กับสาร ข. mp. ไม่เปลี่ยนแปลง และ Infra-red spectrum ก็ identical กับสาร ก. ทุกประการ

### 2.5.2 การตรวจลักษณะของสาร ก., m.p. 213 - 214

#### 2.5.2.1 Physical Properties and Colour Reaction

ของสารข. สารข. เป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว  $213 - 214^{\circ}$  ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม เบ้นซิ่น อีเธอร์ ไม่ละลายในน้ำ ให้สีเหลืองซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีแดงทับทึบที่ Liebermann-Burchard Reaction ฟอสฟอโร มีนในคาร์บอนเตตระคลอไรด์แต่ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น ทา Rf value (2.1.2) ได้ 0.40 เมื่อทำการวิเคราะห์หาธาตุต่าง ๆ ไม่ปรากฏว่ามีธาตุอื่นอยู่เลยนอกจากคาร์บอนและไฮโดรเจน ผลจากการวิเคราะห์พบว่า

$$C = 84.50 \%, H = 11.89 \%$$

คำนวณจาก Lupeol ( $C_{30}H_{50}O$ ) เปรียบเทียบได้

C = 84.44 %, H = 11.81 %

Infra - red spectrum ของสาร ข. (รูปที่ 7 หน้า 45) แสดง Absorption peaks ถึงตารางที่ 10 (หน้า 35) ซึ่ง identical กับ Infra - red spectrum ของ Lupeol<sup>29(a)</sup> ทุกประการ

2.5.2.2 Acetylation ของสาร ข. ทำตามวิธี 2.4.2.1 ผลปรากฏว่า Acetyl derivative ของสาร ข. ที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว 217 - 218° มี Rf value 0.82 (2.1.2) ผลจากการวิเคราะห์พบว่า

C = 81.93 %, H = 11.27 %

คำนวณจาก Acetate of Lupeol ( $C_{32}H_{52}O_2$ ) เปรียบเทียบได้

C = 81.99 %, H = 11.18 %

Infra - red spectrum ของ Acetyl derivative ของสาร ข. (รูปที่ 8 หน้า 45) แสดง Absorption Peaks ถึงตารางที่ 11 (หน้า 36) ซึ่ง Identical กับ Infra - red spectrum ของ Lupeyl acetate (รูปที่ 9 หน้า 46) ทุกประการ

2.5.2.3 Benzoylation ของสาร ข. ทำตามวิธี 2.4.2.2 ผลปรากฏว่า Benzoyl derivative ของสาร ข. มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว 254 - 256° มี Rf value 0.90 (2.1.2) ผลจากการวิเคราะห์พบว่า

C = 83.95 %, H = 10.12 %

คำนวณจาก Benzoate of Lupeol ( $C_{37}H_{54}O_2$ ) เปรียบเทียบได้

C = 83.72 %, H = 10.25 %

Infra - red spectrum ของ Benzoyl derivative ของ สาร ข. (รูปที่ 10 หน้า 46) แสดง Absorption peaks ดังตารางที่ 12 (หน้า 36 )

2.5.2.4 Hydrolysis ละลาย Acetyl derivative ของสาร ข. จำนวน 0.2 กรัม ในเบ็นซีน 1 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลม ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ในเมทิลแอลกอฮอล์ 4 มิลลิลิตร แล้วทำตามวิธี 2.5.1.3 จะได้สารหนัก 0.18 กรัม นำสารทั้งหมดละลายในเบ็นซีน 2 มิลลิลิตร ย่นสารละลายที่ ได้ลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 ซม. ยาว 40 ซม. ใช้ Aluminium oxide (20 กรัม) เป็น Adsorbent บีโตรีเลียมอีเทอร์เป็น Solvent ได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 (หน้า 23 )

ตารางที่ 4

Column Chromatography ของ Hydrolysis Product จาก Acetate

ของสาร 1.

ชนิดของ Eluant	จำนวน Fractions (Fraction ละ 50 ml)	จุดหลอมเหลวของ สารที่แยกได้(°C)	Rf value (2.1.2)
ปิโตรเลียมอีเทอร์	1	น้ำมันใส	0.34
ปิโตรเลียมอีเทอร์	9	-	-
เบนซีน-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 9)	10	-	-
เบนซีน-ปิโตรเลียมอีเทอร์ (1 : 1)	5	-	-
เบนซีน	6	208-212	0.40
เบนซีน	4	-	-
คลอโรฟอร์ม	5	-	-

นำสารค.p. 208 - 212<sup>°</sup> จำนวน 0.18 กรัม มาตกผลึกใน อะซีโตน - เมทิลแอลกอฮอล์ (1:3) หลาย ๆ ครั้ง จนได้สารซึ่งมีจุดหลอม เหลวครั้งที่ 213 - 214<sup>°</sup> มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มละเอียด สี จำนวน 0.1 กรัม ทา Rf value (2.1.2) ได้ 0.40 ซึ่งเท่ากับสาร ข. และเมื่อทำ mixed melting point กับสาร ข. ปรากฏว่าจุดหลอมเหลวไม่เปลี่ยนแปลง

### 2.5.3 การตรวจลักษณะของสาร ค.ค.p. 136 - 137<sup>°</sup>

#### 2.5.3.1 Physical Properties และ Colour Reaction

ของสาร ค. ผลึกของสาร ค. เป็นแผ่นสีขาว มีจุดหลอมเหลว 136 - 7<sup>°</sup> ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม เป็นชั้น อีเทอร์ อะซีโตน ไม่ละลายในน้ำ ทา Rf value (2.1.2) ได้ 0.22 ซึ่งเท่ากับ Rf value ของ  $\beta$ -sitosterol ให้สีแดงซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินทันทีและเปลี่ยนเป็นสีเขียวในที่สุดกับ Liebermann - Burchard Reaction สุกสีโบรมีนในคาร์บอนเตตราคลอไรด์ แต่ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น เมื่อทำการวิเคราะห์หาธาตุต่าง ๆ พบว่ามี

$$C = 83.88 \%, \quad H = 12.00 \%$$

คำนวณจาก  $\beta$ -sitosterol ( $C_{29}H_{50}O$ ) เปรียบเทียบได้

$$C = 83.99 \%, \quad H = 12.15 \%$$

Infra - red spectrum ของสาร ค. (รูปที่ 11 หน้า 47 ) แสดง Absorption peaks ดังตารางที่ 13 (หน้า 37 ) ซึ่งเกือบ identical กับ Infra - red spectrum ของ  $\beta$ -sitosterol (รูปที่ 12 หน้า 47 ) ต่างกันตรงตำแหน่ง  $960 - 950 \text{ cm}^{-1}$  ซึ่งปรากฏเป็น Doublet ใน Spectrum ของสาร ค. แต่เป็น Singlet ใน Spectrum ของ  $\beta$ -sitosterol

แต่ถ้าเปรียบเทียบ Infra - red spectrum ของสาร ค. กับของสารซึ่งได้จากการผสมระหว่าง  $\beta$  - sitosterol กับ Traces of stigmasterol (รูปที่ 13 หน้า 48 ) ปรากฏว่า identical กันทุกประการ

2.5.3.2 Acetylation ของสาร ค. ละลายสาร ค. 0.5 กรัม ใน Pyridine 5 มิลลิลิตร เติม Acetic anhydride 2.5 มิลลิลิตร แล้วทำตามวิธี 2.4.2.1 จะได้สารหนัก 0.54 กรัม ตกผลึกสารที่ได้ไปคลอโรฟอร์มและเมทิลแอลกอฮอล์ (1:6) หลาย ๆ ครั้งจนจุดหลอมเหลวคงที่ จะได้ Acetyl derivative ของสาร ค. มีลักษณะเป็นแผ่นใส มีจุดหลอมเหลว 127 - 128° ทา Rf value (2.1.2) ได้ 0.67 ซึ่งเท่ากับ Rf value ของ  $\beta$  - sitosteryl acetate ใน Conditions เดียวกัน

ผลจากการวิเคราะห์ Acetyl derivative ของสาร ค. พบว่ามี

C = 81.20 %, H = 11.25 %

คำนวณจาก  $\beta$  - sitosteryl acetate ( $C_{31}H_{52}O_2$ ) เปรียบเทียบได้

C = 81.52 %, H = 11.48 %

Infra - red spectrum ของ Acetate ของสาร ค. (รูปที่ 14 หน้า 48 ) แสดง Absorption peaks ดังตารางที่ 14 (หน้า 38 ) ซึ่งเกือบ identical กับ Infra - red spectrum ของ  $\beta$  - sitosteryl acetate (รูปที่ 15 หน้า 49) ยกเว้นตรงตำแหน่ง  $970 - 950 \text{ cm}^{-1}$  ซึ่งปรากฏเป็น Doublet ใน Spectrum ของ Acetyl derivative ของสาร ค. แต่เป็น Singlet ใน Spectrum ของ  $\beta$  - sitosteryl acetate.

2.5.3.3 Benzoylation ของสาร ค. ละลายสาร ค.

0.2 กรัม ใน Pyridine 2 มิลลิลิตร เติม Benzoyl chloride ที่กลั่นใหม่ลงไป 1 มิลลิลิตร แล้วทำตามวิธี 2.4.2.2 ได้สาร 0.23 กรัม ตกผลึกสารที่ได้นั้นในคลอโรฟอร์มและเมทิลแอลกอฮอล์ (1:6) หลาย ๆ ครั้ง จนจุดหลอมเหลวคงที่ จะได้ Benzoyl derivative ของสาร ค. มีลักษณะเป็นแผ่นใส มีจุดหลอมเหลว 145 - 146° จำนวน 0.12 กรัม ทา Rf value (2.1.2) ได้ 0.75 ซึ่งเท่ากับ Rf value ของ  $\beta$ -sitosteryl benzoate ใน Conditions เดียวกัน

ผลจากการวิเคราะห์ Benzoyl derivative ของสาร ค. พบว่ามี

$$C = 83.70 \%, \quad H = 10.45 \%$$

คำนวณจาก  $\beta$ -sitosteryl benzoate ( $C_{36}H_{54}O_2$ ) เปรียบเทียบได้

$$C = 83.34 \%, \quad H = 10.49 \%$$

Infra-red spectrum ของ Benzoyl derivative ของสาร ค. (รูปที่ 16 หน้า 49) แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 15 (หน้า 39) ซึ่งเกือบ identical กับ Infra-red spectrum ของ  $\beta$ -sitosteryl benzoate (รูปที่ 17 หน้า 50) ยกเว้นตรงตำแหน่ง  $980 - 960 \text{ cm}^{-1}$  ซึ่งปรากฏเป็น Doublet ใน Spectrum ของ Benzoyl derivative ของสาร ค. แต่เป็น Singlet ใน Spectrum ของ  $\beta$ -sitosteryl benzoate.



2.5.3.4 Hydrolysis ละลาย Acetyl derivative ของสาร ค. จำนวน 0.2 กรัมด้วยเม้นชั่น 1 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 25 มิลลิลิตร เติมสารละลายของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ในเมทิลแอลกอฮอล์ 4 มิลลิลิตร แล้วทำตามวิธี 2.5.3 จะได้สาร 0.17 กรัม ตกตะกอนสารที่ได้ในคอลโรฟอร์มและเมทิลแอลกอฮอล์ (1:6) จนจุดหลอมเหลวของสารคงที่ จะได้สารซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่น มีจุดหลอมเหลว 136 - 137° จำนวน 0.09 กรัม ทา Rf value (2.1.2) ได้ 0.22 ซึ่งเท่ากับ Rf value ของสาร ค. และเมื่อทำ mixed melting point กับ สาร ค. ก็ไม่เปลี่ยนแปลง

2.5.3.5 Oxidation สาร ค.<sup>2</sup> ละลายสาร ค. 0.3 กรัม ด้วย dry toluene 30 มิลลิลิตร และ Cyclohexanone ที่กลั่นใหม่ 3 มิลลิลิตร ในขวดสองคอซึ่งมี Dropping funnel และ Condenser สำหรับกลั่นคอลอยู่กบละข้าง ทั้ง Dropping funnel และ Receiver ที่ต่อกับ Condenser มี Calcium chloride tube ต่ออยู่เพื่อป้องกันความชื้น คลอ ๆ กลั่นสิ่งที่อยู่ในขวดสองคอจนได้ Distillate ประมาณ 10 มิลลิลิตร จึงคลอ ๆ หยดสารละลายของ Aluminium isopropoxide 0.3 กรัม ใน Dry toluene 10 มิลลิลิตร จาก Dropping funnel จนหมด ลอกอุณหภูมิจึงเล็กน้อย จึงเติมสารละลายอิ่มตัวของ Rochell salt ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) ลงไป 3 มิลลิลิตร แล้วผ่านไอน้ำลงไปในสารผสมนั้นประมาณ 1 ซม. ทำให้เป็น สกัคสารละลายที่ได้ด้วยคอลโรฟอร์ม 3 ครั้ง ๆ ละ 100 ml. ล้าง Chloroform extracts ด้วยน้ำกลั่น เติม anhydrous sodium sulphate ลงไป 10 กรัม ทั้งไว้ค้างคืน กรองเอา Sodium sulphate ออก หลังจากกลั่นไล่คอลโรฟอร์มออกหมดแล้ว ตกตะกอนสารที่ได้ในอะซีโตน - เมทิลแอลกอฮอล์ (1:3) จนจุดหลอมเหลวของสารไม่เปลี่ยนแปลง ได้สารซึ่งมีลักษณะเป็น

amorphous solid สีขาว หลอมเหลวที่  $85 - 86^{\circ}$  จำนวน 0.13 กรัม  
หา Rf value (2.1.2) ได้ 0.27 ซึ่งเท่ากับ Rf value ของ Oxidation Product of  $\beta$  - sitosterol โดยวิธีเดียวกัน

Infra - red spectrum ของสารที่ได้จากการ oxidise สาร ค. (รูปที่ 18 หน้า 50) แสดง Absorption peaks ที่  $1680\text{ cm}^{-1}$  (C = O stretching vibration of  $\alpha, \beta$  - unsaturated ketone) ซึ่ง identical กับ Infra - red spectrum ของ Oxidation Product จาก  $\beta$  - sitosterol (รูปที่ 19 หน้า 51) ทุกประการ

#### 2.5.3.6 Hydrogenation ของสาร ค. <sup>33</sup> ละลายสาร ค.

0.25 กรัม ด้วย Glacial acetic acid 10 มิลลิลิตร ในขวดกัน  
กลมขนาด 50 มิลลิลิตร เติม  $\text{PtO}_2$  ลงไป 0.03 กรัม เป็น Catalyst  
แล้วทำการ hydrogenate ภายใต้อุณหภูมิปกติ ก่อนเป็นครั้งคราวเพื่อ  
ป้องกันการตกตะกอน และคนตลอดเวลาด้วย Magnetic stirrer (ประ-  
มาณ 12 ชม.) ใช้แก๊สไฮโดรเจนทั้งหมดประมาณ 16.0 มิลลิลิตร (The-  
oretical ควรใช้ 13.5 มิลลิลิตร) กรองเอา Catalyst ออก เติมน้ำ  
กลั่นลงไป 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน สกัดสารละลายที่ได้ด้วยอีเทอร์  
ครั้งละ 50 มิลลิลิตร 4 ครั้ง รวม Ether extracts เข้าด้วยกัน ล้าง  
Ether extracts ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตขุ่น 5 ٪ จนหมดกรก สุก  
ท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดล้าง เติม Anhydrous sodium sulphate  
จำนวน 10 กรัม เพื่อดูดน้ำออกจาก Ether extracts ทิ้งไว้ค้างคืน กรอง  
แล้วนำไประเหยเอาอีเธอร์ออก ตกผลึกสารที่ได้ในออกโทฟอร์ม - เมทิล-  
แอลกอฮอล์ (1:6) จนจุดหลอมเหลวของสารคงที่ ที่  $144 - 146^{\circ}$  มีลักษณะ  
เป็นแผ่น ไม่มีสี เมื่อทำ mixed melting point กับ Hydrogenation  
Product of  $\beta$  - sitosterol โดยวิธีเดียวกันปรากฏว่าไม่เปลี่ยนแปลง

และ  $\lambda_f$  value (2.1.2) ของสารทั้งสองมีค่าเท่ากัน (0.14) และ Infra - red spectrum ของสารซึ่งได้จากการ hydrogenate สาร ค. (รูปที่ 20 หน้า 51) ก็ identical กับ Infra - red spectrum ของ Hydrogenation product of  $\beta$  - sitosterol (รูปที่ 21 หน้า 52) ทุกประการ

#### 2.5.4 การตรวจลักษณะสาร ง., m.p. 168 - 9

##### 2.5.4.1 Physical Properties and Colour Reaction

ของสาร ง. ลักษณะของสาร ง. เป็นขี้กรุบเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 168 - 169° ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม เม็นอิน ฮีเซอร อะซีโตน ไม่ละลายในน้ำ ให้สีแดงซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินทันทีและเปลี่ยนเป็นสีแดงในที่สุดกับ Liebermann - Burchard Reaction ฟอกสีไขมันในคาร์บอนเตตราคลอไรด์แต่ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น เมื่อทำการวิเคราะห์หาธาตุต่าง ๆ พบว่ามี

$$C = 84.50 \%, \quad H = 11.81 \%$$

คำนวณจาก Stigmasterol ( $C_{29}H_{48}O$ ) เปรียบเทียบได้

$$C = 84.40 \%, \quad H = 11.72 \%$$

Infra - red spectrum ของสาร ง. (รูปที่ 22 หน้า 52) แสดง Absorption peaks ดังตารางที่ 16 (หน้า 40) ซึ่ง identical กับ Infra - red spectrum ของ Stigmasterol<sup>29(b)</sup> ทุกประการ

2.5.4.2 Acetylation ของสาร ง. ละลายสาร ง. 0.5 กรัม

ใน Pyridine 5 มิลลิลิตร เติม Acetic anhydride 2.5 มิลลิลิตร แล้วทำตามวิธี 2.4.2.1 ใ้สารหนัก 0.53 กรัม ตกผลึกสารที่ไ้ในคลอโรฟอร์ม - เมทิลแอลกอฮอล์ (1 : 6) จนใ้สารซึ่งมีจุดหลอมเหลวคงที่ จะใ้ Acetyl derivative ของสาร ง. มีลักษณะเป็นแผ่น ใส มีจุดหลอมเหลว 144 - 145° จำนวน 0.38 กรัม ทา Rf value (2.1.2) ไ้ 0.66 ผลจากการวิเคราะห์ Acetyl derivative ของสาร ง. พบว่ามี

$$C = 81.73 \%, \quad H = 10.98 \%$$

คำนวณจาก Stigmasteryl acetate ( $C_{31}H_{50}O_2$ ) เปรียบเทียบไ้ดังนี้

$$C = 81.88 \%, \quad H = 11.08 \%$$

Infra - red spectrum ของ Acetate ของสาร ง. (รูปที่ 23 หน้า 53) แสดง Absorption peaks ดังตารางที่ 17 (หน้า 41)

2.5.4.3 Benzoylation ของสาร ง. ละลายสาร ง. 0.2 กรัม

ใน Pyridine 2 มิลลิลิตร เติม Benzoyl chloride ที่กลั่นใหม่ 1 มิลลิลิตรลงไป แล้วทำตามวิธี 2.4.2.2 จะใ้สารหนัก 0.24 กรัม ตกผลึกสารที่ไ้ในคลอโรฟอร์ม - เมทิลแอลกอฮอล์ (1 : 6) จนใ้สารซึ่งมีจุดหลอมเหลวคงที่ จะใ้ Benzoyl derivative ของสาร ง. มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม ใส มีจุดหลอมเหลว 162 - 163° จำนวน 0.16 กรัม ทา Rf value (2.1.2) ไ้ 0.79

ผลจากการวิเคราะห์ Benzoyl derivative ของสาร ง. พบว่ามี

C = 83.78 %, H = 10.18 %

คำนวณจาก Stigmasteryl benzoate ( $C_{36}H_{52}O_2$ ) เปรียบ  
เทียบได้

C = 83.67 %, H = 10.14 %

Infra - red spectrum ของ Benzoate ของสาร ง. (รูปที่ 24  
หน้า 53) แสดง Absorption peaks ดังในตารางที่ 10 (หน้า 41)

2.5.4.4 Hydrolysis ละลาย Acetyl derivative ของ  
สาร ง. จำนวน 0.2 กรัม ด้วยเบ็นซีน 1 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด  
25 มิลลิลิตร เติมสารละลายของโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม ใน  
เมทิลแอลกอฮอล์ 4 มิลลิลิตร แล้วทำตามวิธี 2.5.1.3 จะได้สารหนัก  
0.17 กรัม ผกฉีกสารที่ได้ในคลอโรฟอร์ม - เมทิลแอลกอฮอล์ (1:6)  
จนได้สารที่มีจุดหลอมเหลวคงที่ จะได้สารที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว มี  
จุดหลอมเหลว 160 - 169° เมื่อทำ mixed melting point กับสาร  
ง. ก็ไม่เปลี่ยนแปลง และหา Rf value (2.1.2) ได้ 0.21 ซึ่งเท่ากับ  
Rf value ของสาร ง.

Infra - red spectra ของสารต่าง ๆ ทำโดยวิธี Nujol และ KBr - pellets ส่วนการตรวจลักษณะ Absorption peaks ของสารนั้น ใช้วิธีเปรียบเทียบกับ Standard characteristics และ Absorption peaks ที่มีอยู่ใน Literatures 5,11,23,27,29 ปรากฏผลดังต่อไปนี้

ตารางที่ 5

IR. absorption peaks ของสาร n.m.p. 79-80

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments.
3400-3200	very broad	stretching vibration of polymeric OH
2960-2840	very sharp	CH stretching vibration of $-\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2-$
1470, 1460	very sharp	CH bending vibration of $-\text{CH}_2-$ and $-\text{CH}_3$
1395, 1370	two broad peaks (weak)	associated OH in-plane bending vibration.
1050	sharp	C-O stretching vibration of primary alcohol.
725, 715	sharp	$(\text{CH}_2)_n$ rocking; $n > 4$

ตารางที่ 6

IR. absorption peaks ของ Acetate ผลิตจาก, m.p. 60.5-61°

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
1735	very sharp	C=O stretching vibration
1240, 1040	sharp	C-O-C stretching vibration of acetoxy group.

ตารางที่ 7

IR. absorption peaks ของสาร Q., m.p. 82.5°

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
1735	very sharp	C=O stretching vibration of ester.
730, 720	sharp	( $\text{CH}_2$ ) <sub>n</sub> rocking; n > 4

ตารางที่ 8

IR. absorption peaks ของกรดไขมัน T.M.P. 81

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
1708	very sharp	C=O stretching vibration of monobasic aliphatic acids which do not carry electron attracting substituents.
1415	sharp	bending vibration of $\text{CH}_2$ adjacent to carboxyl group.
1300	sharp	coupled C-O and C-H in-plane deformation modes.
940	broad (weak)	OH deformation vibration of the carboxyl group.

ตารางที่ 9

IR. absorption peaks ของ Amide T.M.P. 105-7

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
3400, 3180	sharp	NH stretching vibration of primary amide.
1650	very sharp	C=O stretching vibration of associated primary amide
1630	sharp	NH deformation of primary amide



10  
ตารางที่ 10

IR. absorption peaks 7000-700 cm<sup>-1</sup> 1.  $\mu$ m.p. 213 - 214

Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Band Type	Assignments
3400-3200	very broad	stretching vibration of polymeric OH
3080	sharp	CH stretching vibration of asymmetric =CH <sub>2</sub> .
2970-2850	very sharp	CH stretching vibration of -CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> - and $\overset{\curvearrowright}{\text{C}}\text{H}$ .
1635	sharp	nonconjugated C=C stretching vibration.
1480-1430	sharp	CH bending vibration of -CH <sub>3</sub> and -CH <sub>2</sub> -
1380, 1370	doublet	CH bending vibration of gem-dimethyl groups.
1180	sharp	skeletal vibration of (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> C< with no free hydrogen atom on the central carbon atom.
1035	sharp	C - O stretching vibration of 3 $\beta$ - OH equatorial triterpenes.
885	very sharp	CH out - of - plane bending vibration of = CH <sub>2</sub> .

ตารางที่ 11

IR. absorption peaks ของ Acetate ของสารที่ 1, m.p. 217-218

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments.
1725	very sharp	C=O stretching vibration.
1240, 1020	very sharp (singlet)	C-O-C stretching vibration of acetate. ( $\text{C}_3$ -equatorial)

ตารางที่ 12

IR. absorption peaks ของ Benzoate ของสารที่ 1, m.p. 254-6

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
3080-3040	sharp (weak)	CH stretching vibration of phenyl.
1704	very sharp	C=O stretching vibration of $\alpha, \beta$ -unsaturated and aryl ester.
1595, 1575	sharp	C=C stretching vibration of phenyl.
1270, 1100	very sharp	C-O stretching vibration of benzoate.

ตารางที่ 12 (ต่อ)

IR. absorption peaks ของ Benzoate ๗๐๙๗๗๗, m.p. 254-6

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
1060, 1020	sharp	CH - in - plane bending vibration of phenyl.
705	very sharp	CH out - of - plane bending vibration of monosubstituted phenyl.

ตารางที่ 13

IR. absorption peaks ของสารค., m.p. 136-7

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
3550-3200	very broad	stretching vibration of polymeric OH.
3020	very weak	CH stretching vibration of C=CH
2970-2830	very sharp	CH stretching vibration of -CH <sub>3</sub> and -CH <sub>2</sub> -
1630	broad (weak)	C=C stretching vibration of R <sub>2</sub> C=CHR.

ตารางที่ 13 (ต่อ)

IR. absorption peaks ของสาร A., m.p. 136-7°

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
1050	sharp	C - O stretching vibration of $3\beta$ - OH equatorial steroid.
965	sharp	CH out - of-plane bending vibration of trans RCH = CHR.
805, 795	one pair of bands	CH out - of - plane bending vibration of $R_2C = CHR$ .

ตารางที่ 14

IR. absorption peaks ของ Acetate ของสาร B., m.p. 127 - 8°

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
1735	very sharp	C=O stretching vibration.
1255, 1030	very sharp	C-O-C stretching vibration of acetate.

ตารางที่ 15

IR. absorption peaks of Benzoate ตาราง ค.,ค.ป.145-6

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
3080-3020	triplet	CH stretching vibration of phenyl.
1705	very sharp	C=O stretching vibration of $\alpha, \beta$ - unsaturated and aryl ester.
1592, 1578	sharp	C=C stretching vibration of benzoyl
1265, 1100	very sharp	C-O stretching vibration of benzoate.
705	very sharp	CH out - of plane bending vibration of monosubstituted benzene.

ตารางที่ 16

IR. absorption peaks ของสาร, m.p. 168 - 9

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments.
2970-2850	very sharp	CH stretching vibration of $-\text{CH}_3$ , $-\text{CH}_2-$ and $\frac{1}{2}\text{CH}$
3020	very weak	CH stretching vibration of $\text{RCH}=\text{CHR}$ (trans) and $\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$ .
3550-3200	very broad	stretching vibration of polymeric OH
1625	broad (weak)	nonconjugated C=C stretching vibration.
1045	sharp	C-O stretching vibration of $\beta$ - OH equatorial steroid.
965	sharp	CH out - of - plane bending vibration of $\text{RCH}=\text{CHR}$ . (trans)
830, 790	one pair of bands	CH out - of - plane bending vibration of $\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$ .

ตารางที่ 17

IR. absorption peaks ของ Acetate อนุกรม 4. m.p. 144-5

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments.
1725	very sharp	C=O stretching vibration.
1250, 1030	very sharp	C-O-C stretching vibration of acetate.

ตารางที่ 18

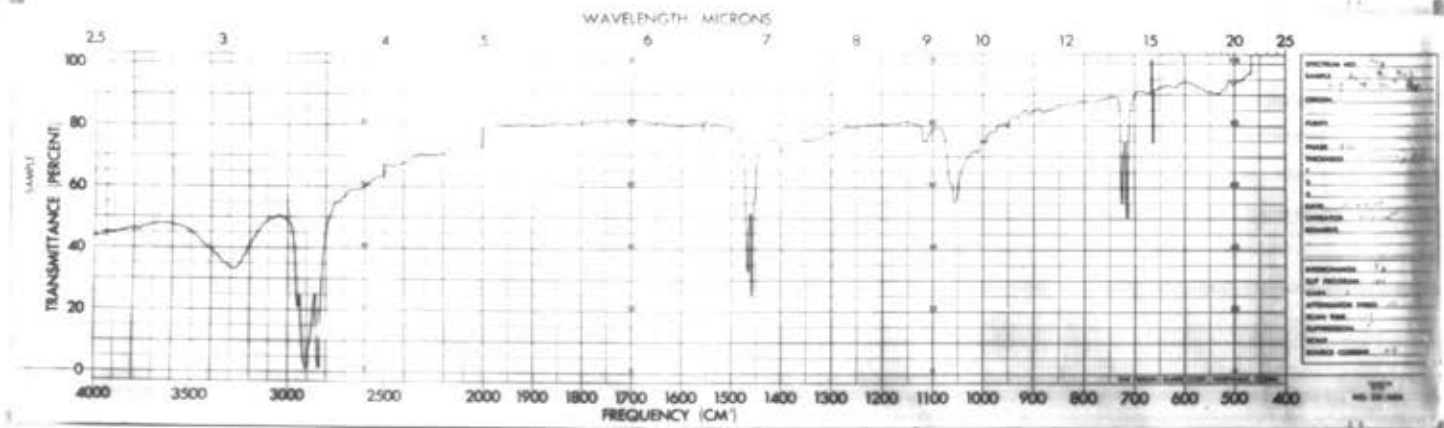
IR. absorption peaks ของ Benzoate อนุกรม 1. m.p. 162-3

Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Band Type	Assignments
3080-3020	triplet	CH stretching vibration of phenyl.
1705	very sharp	C=O stretching vibration of $\alpha$ , $\beta$ - unsaturated and aryl ester.
1592-1579	sharp	<del>C=C</del> stretching vibration of benzoyl.
1265, 1100	very sharp	C-O-C stretching vibration of benzoate.
710	very sharp	CH out - of - plane bending vibration of monosubstituted benzene.

รูปที่ 1

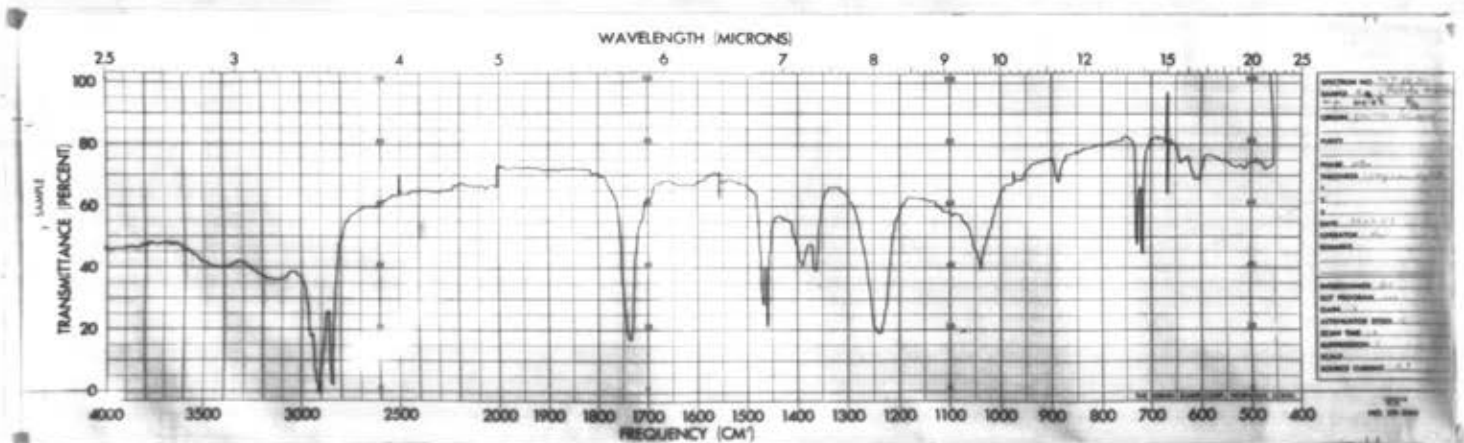


IR. spectrum ของสาร ก.



รูปที่ 2

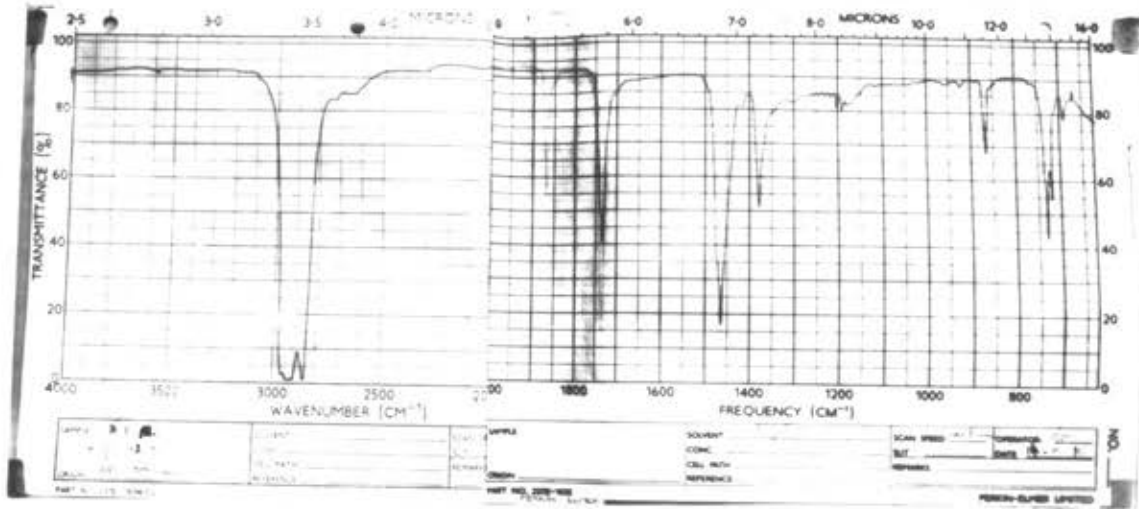
IR. spectrum ของ Acetate ของสาร ก.





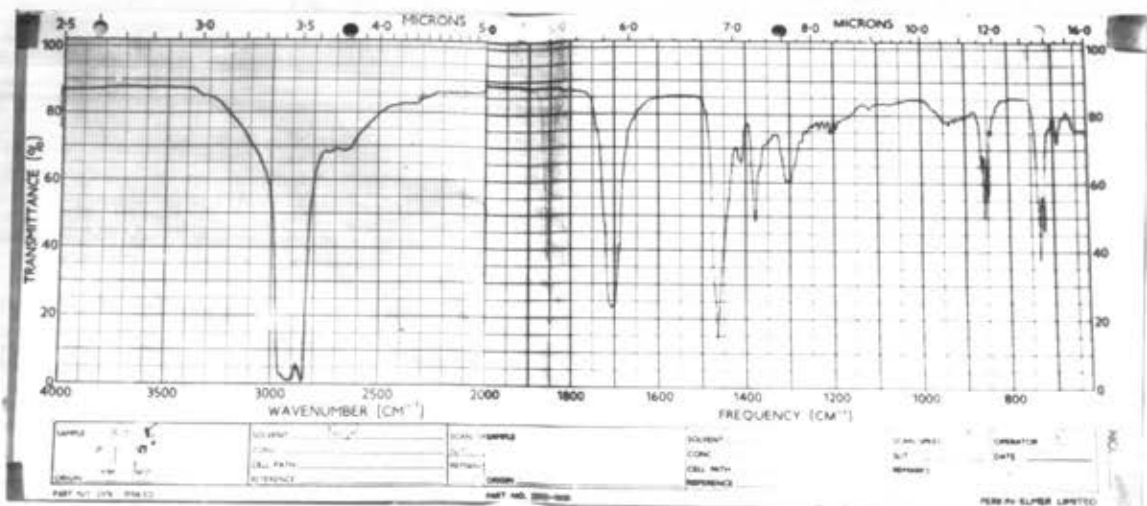
รูปที่ 3

IR. spectrum ของสาร ก.



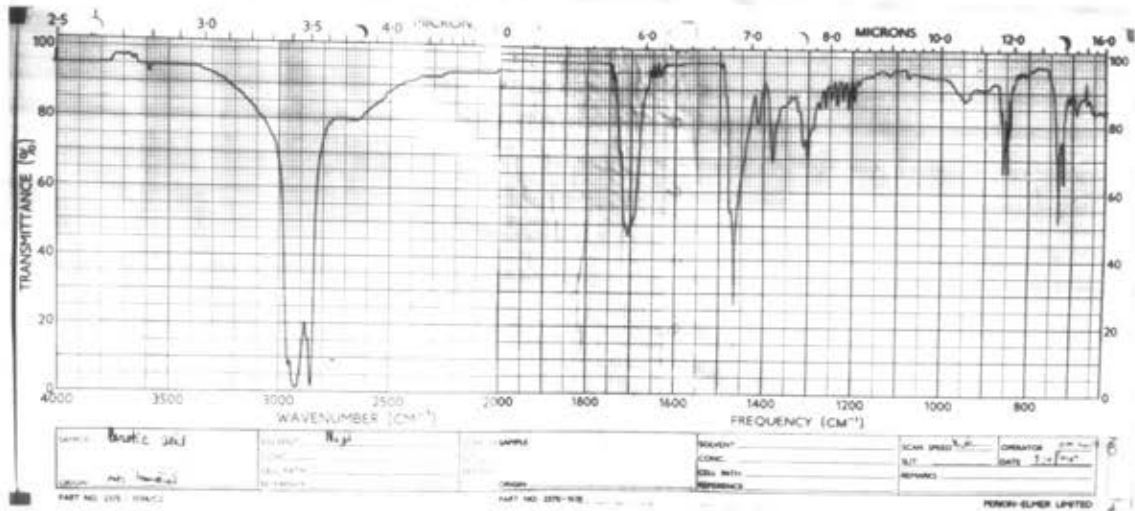
รูปที่ 4

IR. spectrum ของสาร ข.



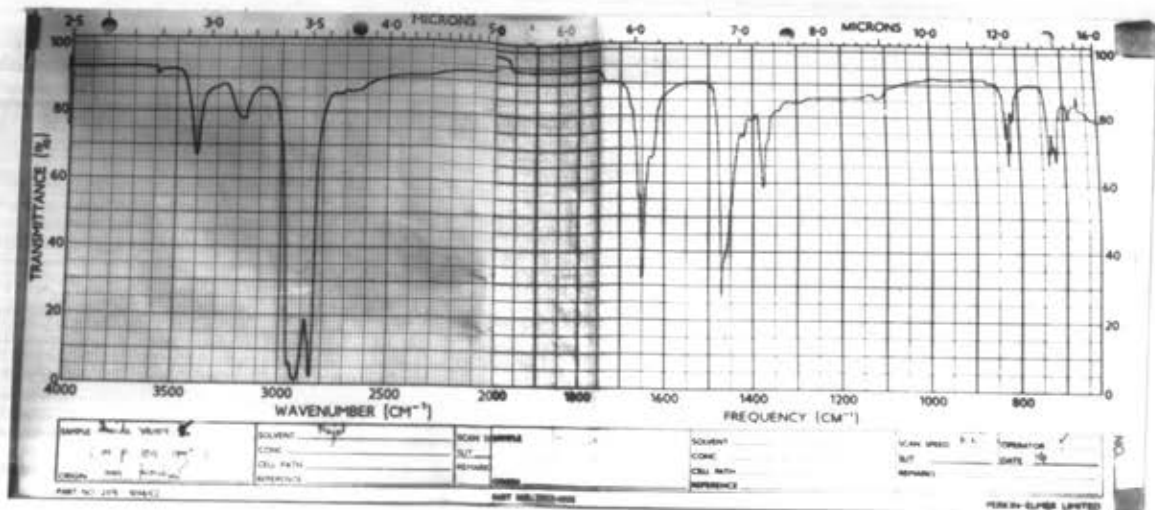
รูปที่ 5

IR. spectrum ของ Cerotic acid



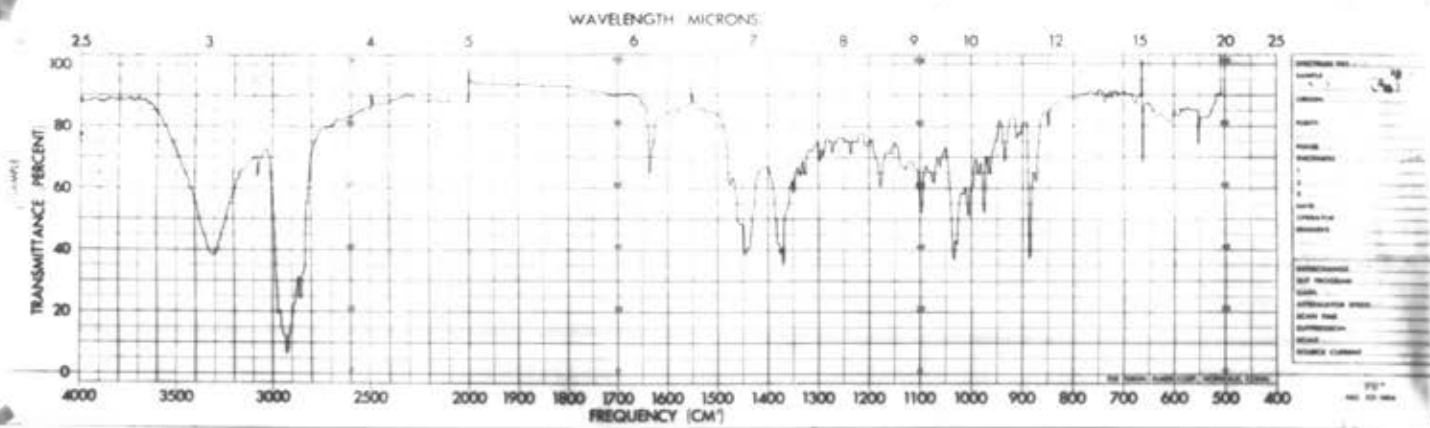
รูปที่ 6

IR. spectrum ของ Amide ของสาร ข.



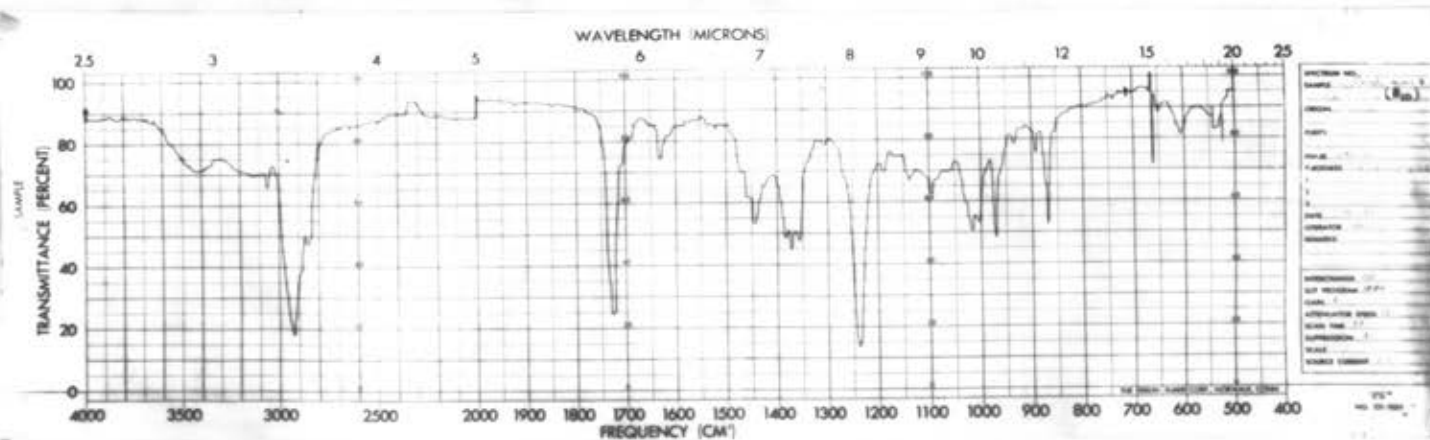
รูปที่ 7

IR. spectrum ของสาร ข.



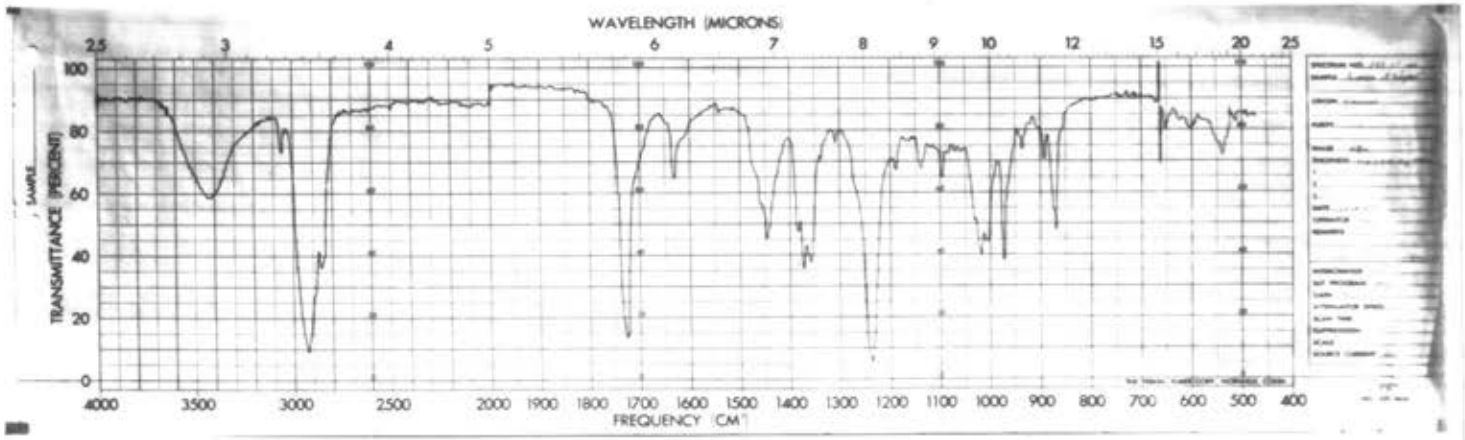
รูปที่ 8

IR. spectrum ของ Acetate ของสาร ข.



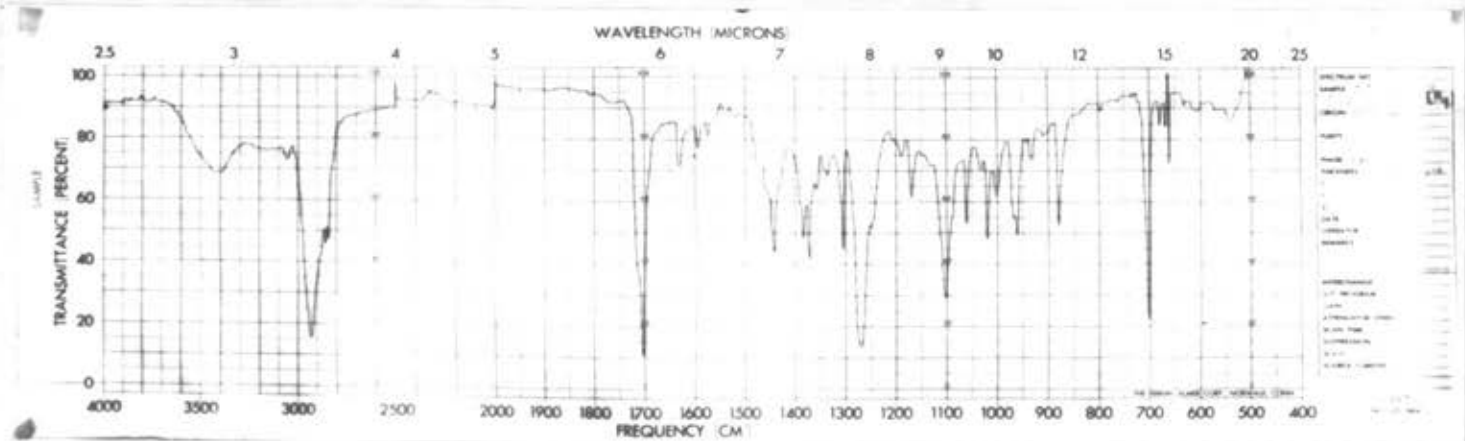
รูปที่ 9

IR. spectrum ของ Lupeyl acetate



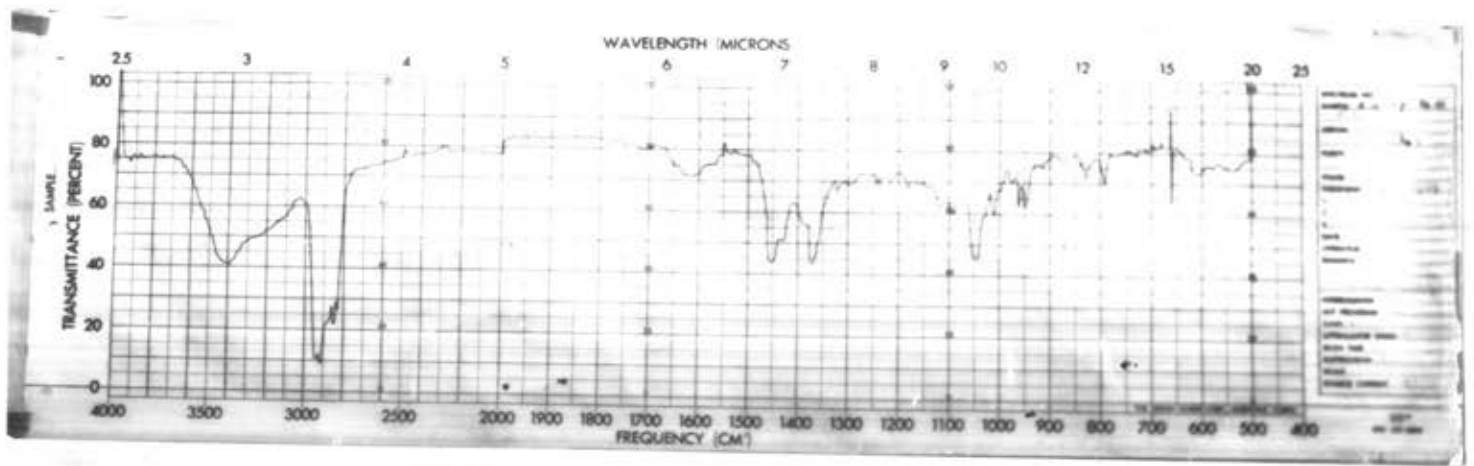
รูปที่ 10

IR. spectrum ของ Benzate ของสาร ๗.



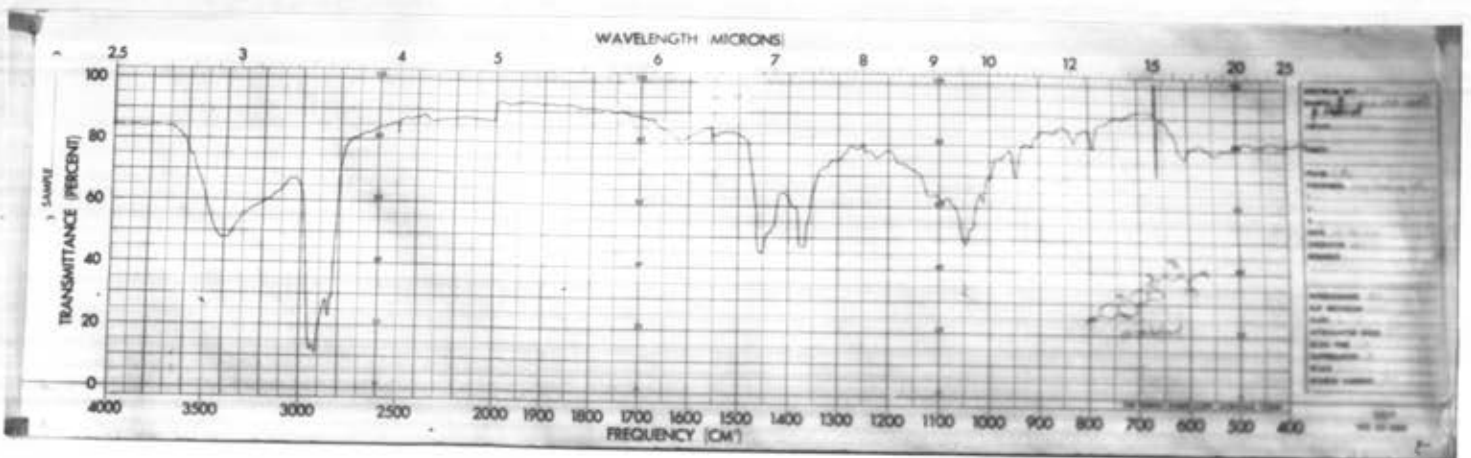
รูปที่ 11

IR. spectrum ของสาร ก.

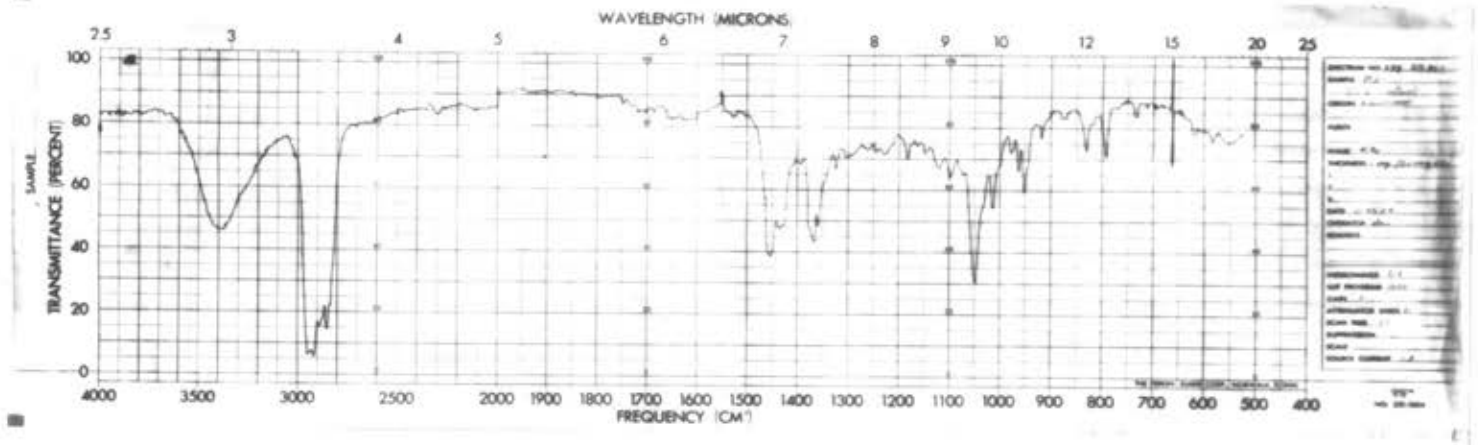


รูปที่ 12

IR. spectrum ของ  $\beta$  - sitosterol

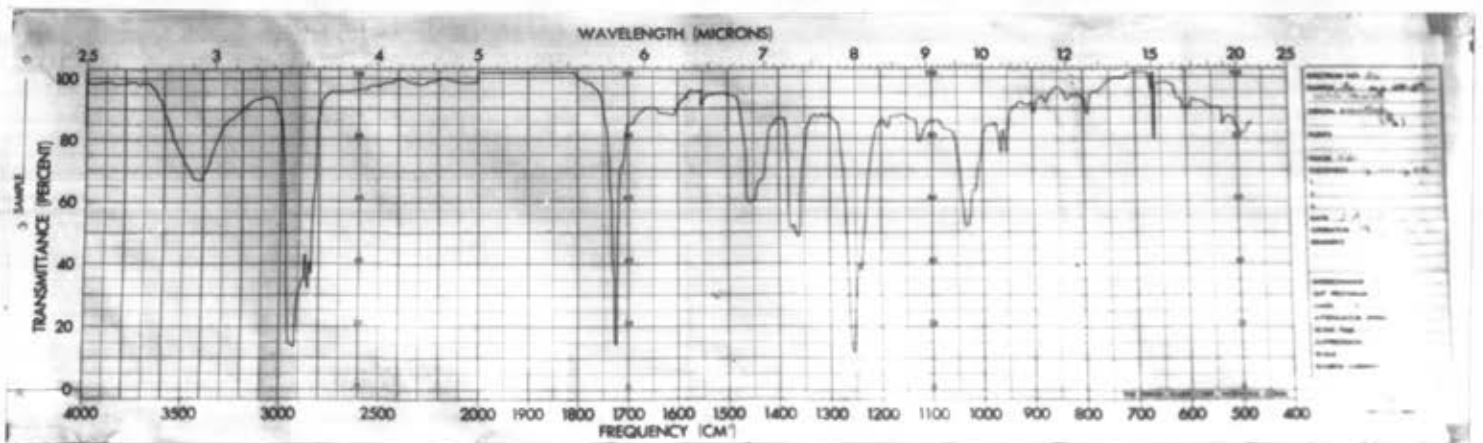


รูปที่ 13

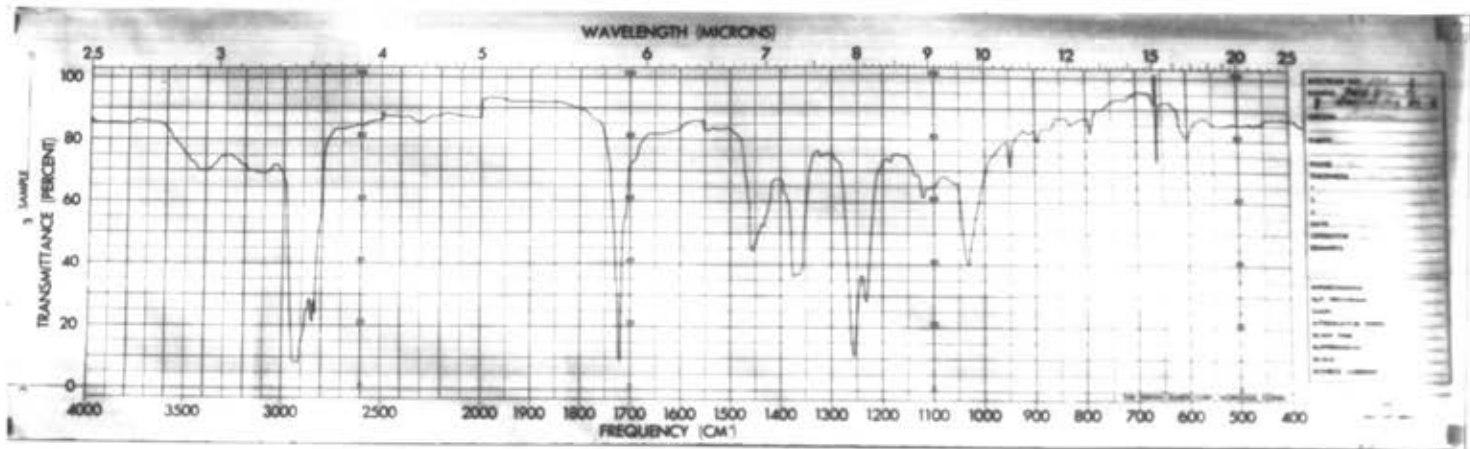
IR. spectrum ของ  $\beta$ -sitosterol + Traces of Stigmasterol

รูปที่ 14

IR. spectrum ของ Acetate ของสาร ค.

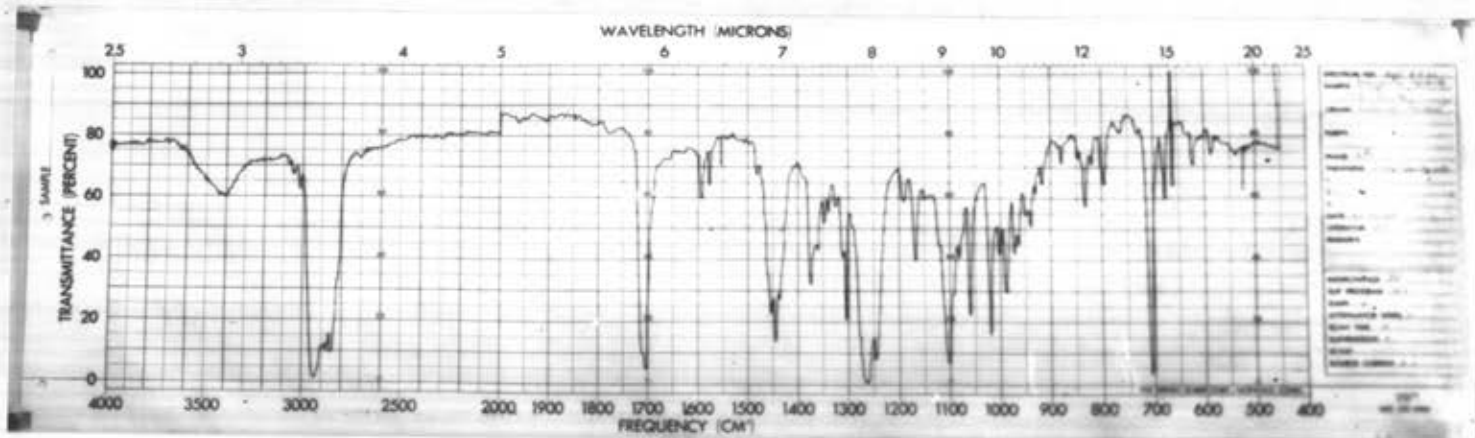


រូបទី 15

IR. spectrum របស់  $\alpha$  &  $\beta$  sitosteryl acetate

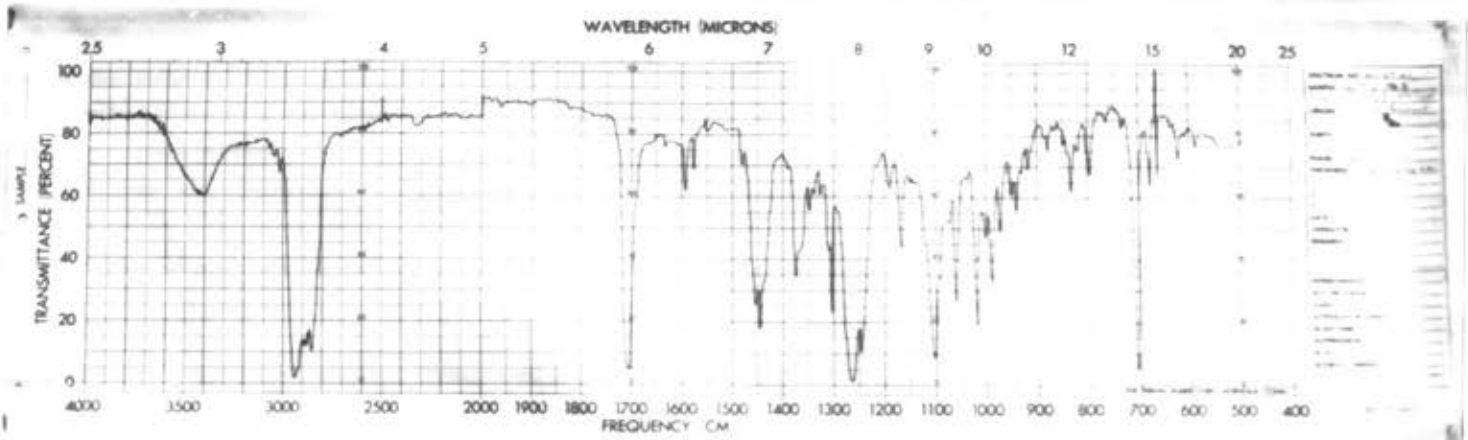
រូបទី 16

IR. spectrum របស់ Benzoin Benzoyl គី.



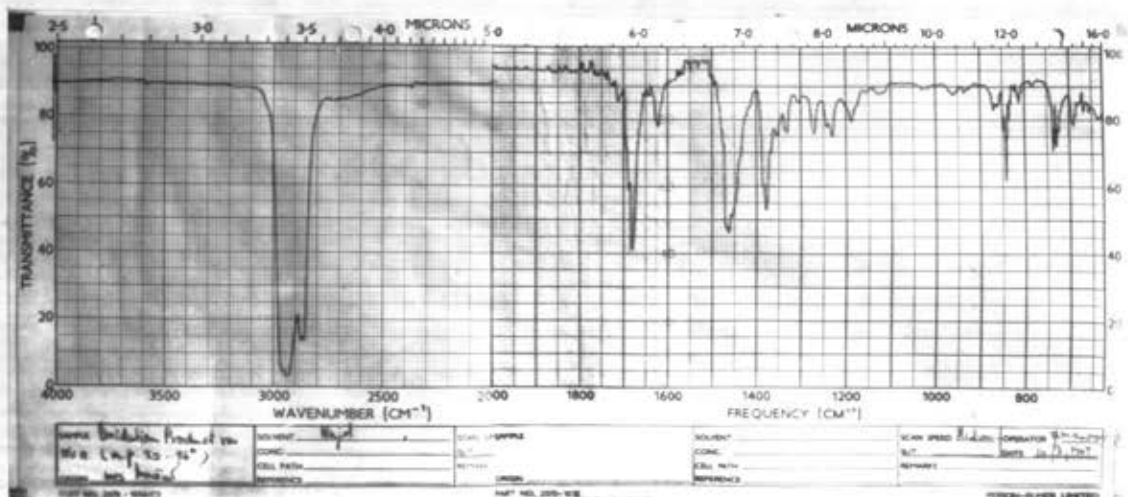
รูปที่ 17

IR. spectrum ของ  $\beta$  - sitosteryl benzoate



รูปที่ 18

IR. spectrum ของ Oxidation Product ของสาร ก.

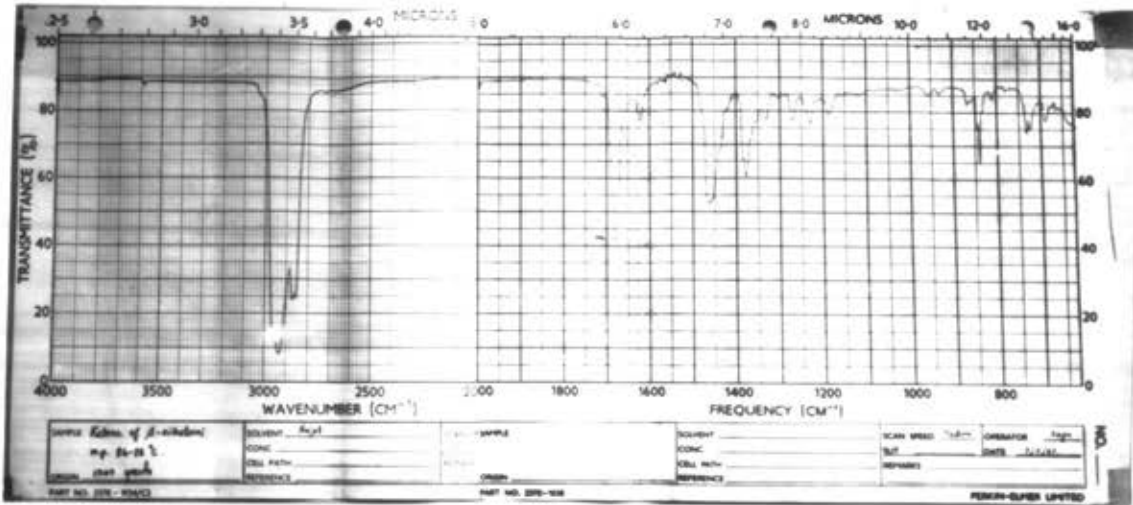






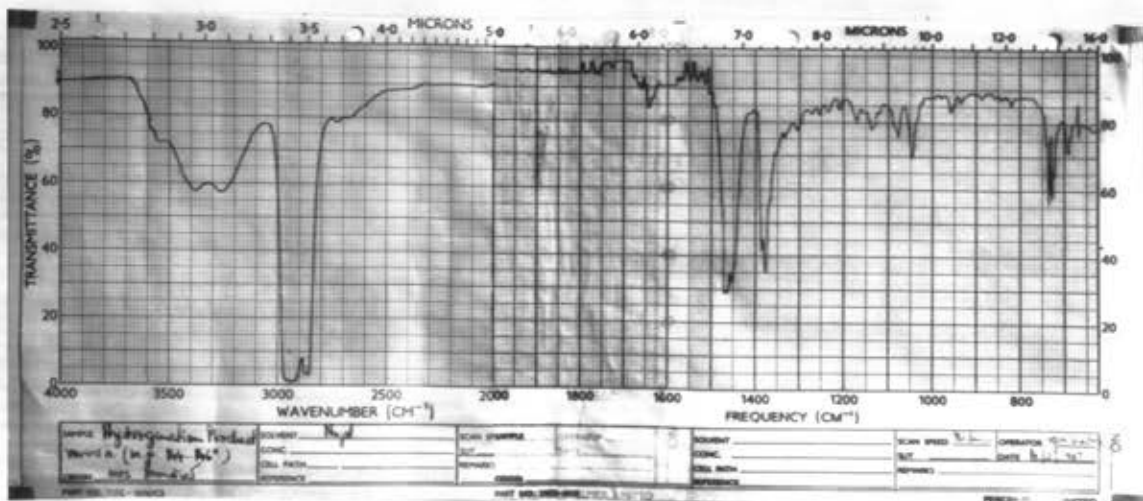
รูปที่ 19

IR. spectrum ของ Oxidation Product ของ  $\beta$  - sitosterol



รูปที่ 20

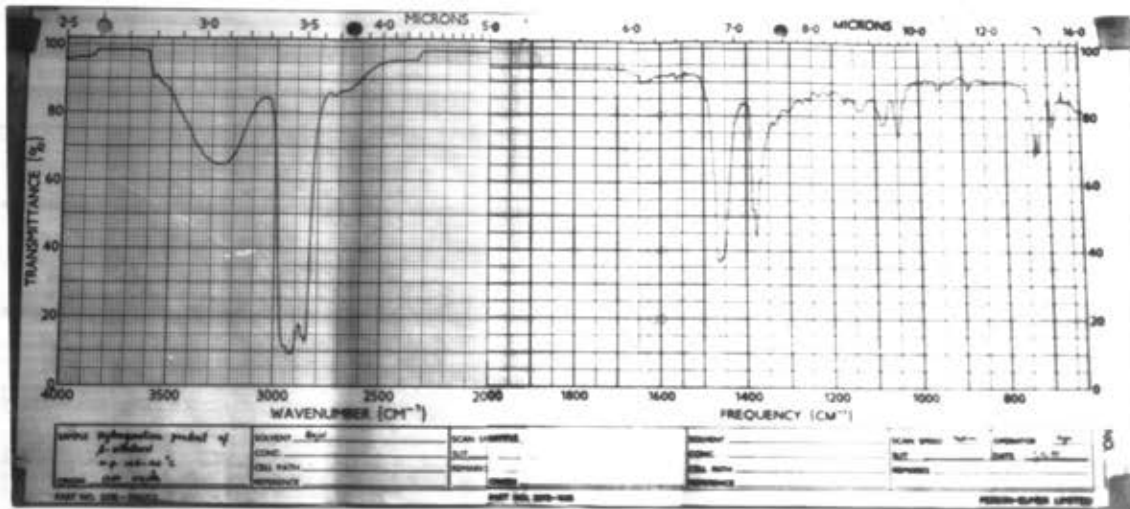
IR. spectrum ของ Hydrogenation Product ของสาร ก.





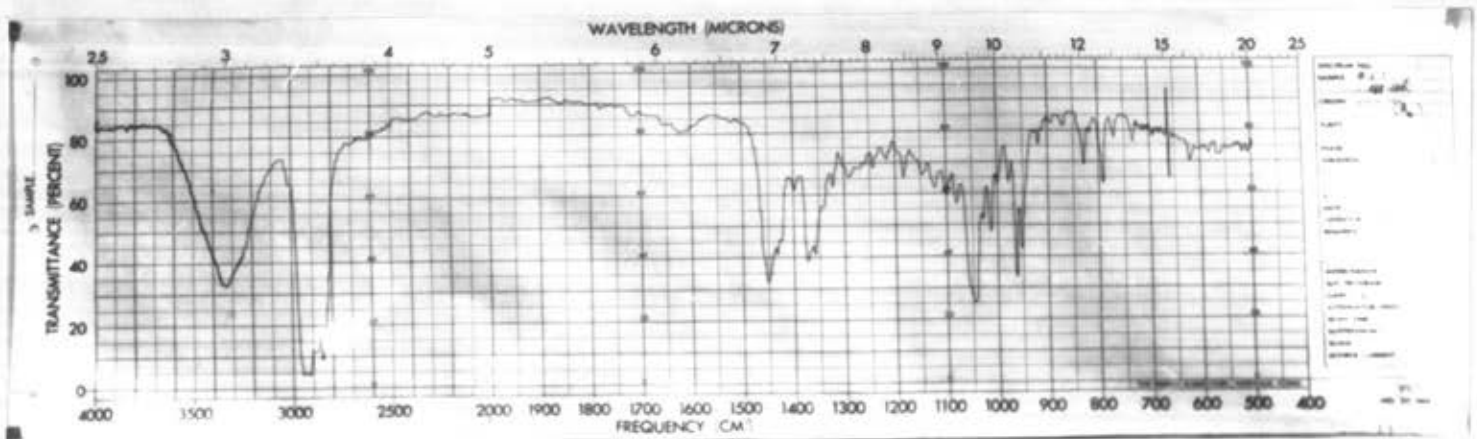
รูปที่ 21

IR. spectrum ของ Hydrogenation Product ของ  $\beta$ - sitosterol



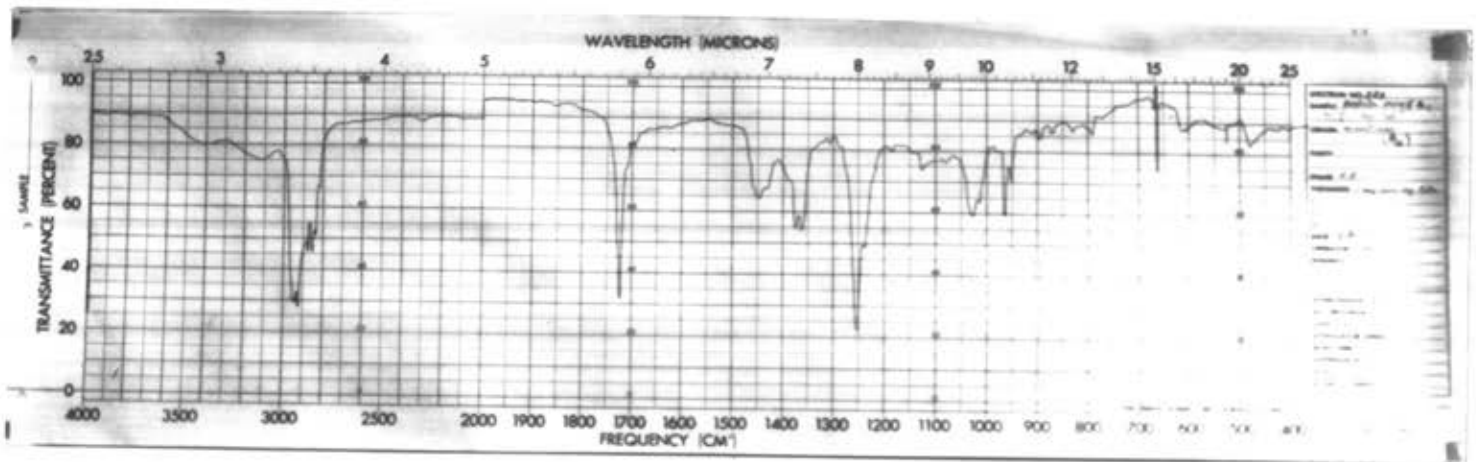
รูปที่ 22

IR. spectrum ของสาร 3.



รูปที่ 23

IR. spectrum ของ Acetate ของสาร ก.



รูปที่ 24

IR. spectrum ของ Benzoate ของสาร ก.

