บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

เก็บลำต้นกำลังเสือโคร่ง จากกิ่งอำเภอศรีวิไล อำเภอบึงกาฬ จังหวัดหนองคาย ในเดือนมกราคม 2536 นำลำต้นและใบกำลังเสือโคร่งมาเปรียบเทียบลักษณะกับต้นกำลังเสือโคร่ง (*Zizyphus attopoensis* Pierre) ซึ่งเก็บที่ท้องทุ่งแสลงหลวงอยู่ระหว่างจังหวัดเพชรบูรณ์และจังหวัดพิษณุโลก เมื่อวันที่ 24 พฤษภาคม พ.ศ. 2504 มีหมายเลขกำกับเป็น BKF 63407 ที่หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ บางเขน กรุงเทพฯ พบว่าใบของกำลังเสือโคร่งที่เก็บจากจังหวัดหนองคายมีเส้นใบที่เห็นชัดเจน 3 เส้น เหมือนกับใบของกำลังเสือโคร่งหมายเลขกำกับ BKF 63407 และตามกิ่งก้านยังมีหนามแหลมลักษณะคล้ายเล็บไก่เหมือนกันอีกด้วย ซึ่งเป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนว่าต้นกำลังเสือโคร่งที่นำมาจากจังหวัดหนองคายคือ *Zizyphus attopoensis* Pierre จากนั้นนำลำต้นกำลังเสือโคร่งมาตากให้แห้งลับเป็นชิ้นเล็กๆ บดให้ละเอียดแล้วจึงสกัดด้วยเมทานอล เฮกเซน และคลอโรฟอร์มตามลำดับ นำสิ่งสกัดนี้ไปหาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์สาร

2.2.1 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น สำหรับกลั่นตัวทำละลายที่มากเกินพอแบบลดความดัน

2.2.2 เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Fisher-Johns Melting point Apparatus) ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศ สหรัฐอเมริกา

2.2.3 Fourier transform Infrared Spectrophotometer (IR) model IR-400 FT 1760X ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศ สหรัฐอเมริกา

2.2.4 Mass Spectrometer (MS) model JMS-DX-300 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น

2.2.5 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) model AC-F 200 ของบริษัท Bruker Spectro Spin ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.2.6 Gas Chromatrograp (GC) model GC-7AG ของบริษัท Shimadsu ประเทศญี่ปุ่น

2.3 สารเคมี

2.3.1 ตัวทำละลาย ใช้คอมเมอร์เชียลเกรด ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมทานอล แอซีโตน เอทิลแอซิเตต และอีเทอร์

2.3.2 ตัวดูดซับ ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60G Art. 7734 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี และซิลิกาเจลชนิด 60G Art 7731 สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ของบริษัท E. Merck Damstadt

2.3.3 TLC plastic sheets silica gel 60G F_{254} สำหรับทำทินแลร์โครมาโทกราฟีของบริษัท E. Merck Damstadt

2.4 เทคนิคต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

2.4.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวขนาดต่างๆ ที่เหมาะสมกับปริมาณสิ่งสกัดที่ต้องการแยก โดยให้อัตราส่วนของสิ่งสกัดที่ต้องการแยกต่อตัวดูดซับ ประมาณ 1:20-30 โดยน้ำหนัก ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วที่เหมาะสม

2.4.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography)

ใช้ Sinter Glass เบอร์ 2 บรรจุซิลิกาเจลสูง 3.5 เซนติเมตร วิธีนี้ใช้ปั๊มน้ำเพื่อช่วยให้ตัวทำละลายไหลอย่างรวดเร็ว

2.4.3 ทินแลร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography)

เตรียมโครมาโทเพลท (chromatoplate) โดยใช้ซิลิกาเจลชนิด 60G Atr.7731 เคลือบบนกระจกขนาด 5x20 เซนติเมตร หรือขนาด 20x20 เซนติเมตร หรือใช้โครมาโทเพลทสำเร็จรูป แต้มสารด้วยหลอดรูเล็ก (capillary tube) แล้ว develop ในขวดแก้วที่มีตัวทำละลายอยู่ ปล่อยให้ตัว ทำละลายซึมขึ้นไปจนถึง solvent front นำโครมาโทเพลทไปตรวจหาตำแหน่งสารโดยใช้ไอโอดีน

2.4.4 การกลั่น

การกลั่นมี 2 แบบ คือ การกลั่นธรรมดา ใช้กลั่นแยกตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำเช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และการกลั่นลดความดัน ใช้กลั่นแยกตัวทำละลายที่มีขั้วและจุดเดือดสูง เช่น เมทานอล เพื่อให้ตัวทำละลายเดือดที่อุณหภูมิต่ำลง และป้องกันการสลายตัวของสารที่ถูกแยกมากับตัวทำละลายนั้น

2.5 การสกัด

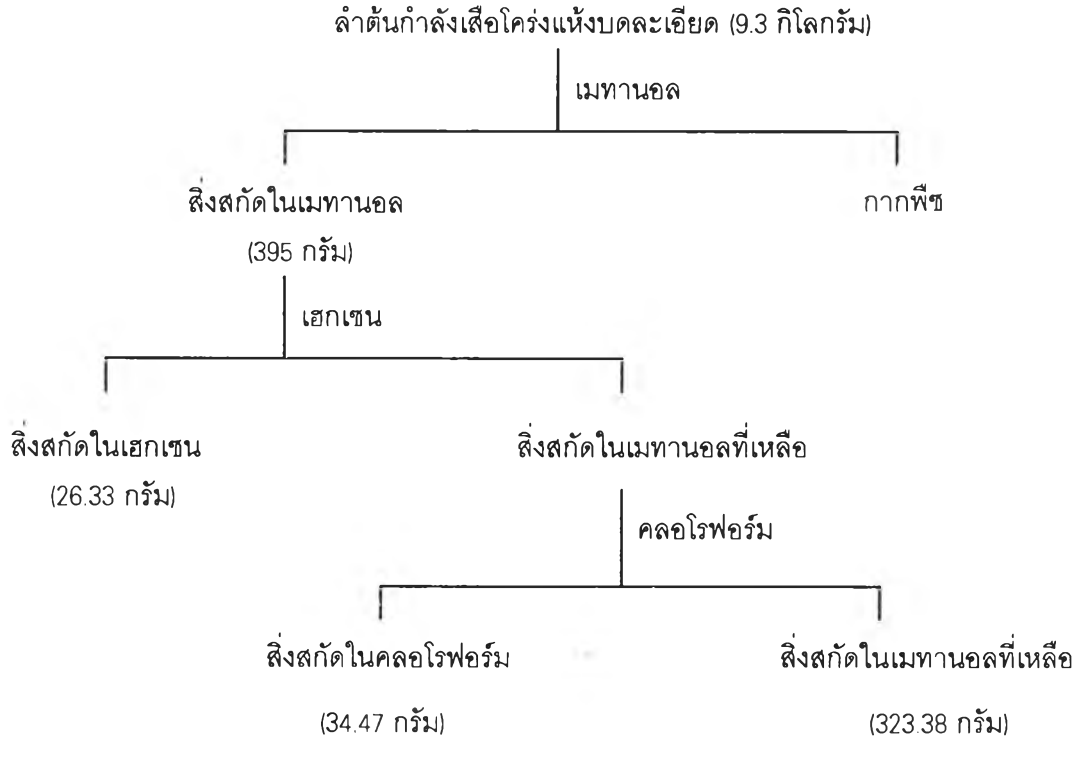
นำลำต้นกำลังเสือโคร่งที่ตากแห้งและบดละเอียดหนัก 9.3 กิโลกรัม มาแช่ในเมทานอล จำนวน 30 ลิตร เป็นเวลา 3-4 วัน กรองสารละลายที่ได้แล้วนำไปกลั่นแยกเมทานอลออกจนเกือบหมด โดยกลั่นแบบลดความดันแล้วระเหยแห้งบนอ่างน้ำเดือด (ทำเช่นนี้ซ้ำอีกหลายๆครั้ง จนกระทั่งสารละลายมีสีจาง) จะได้สิ่งสกัดในเมทานอลมีลักษณะเหนียวข้น สีน้ำตาลแดง หนัก 395 กรัม

นำสิ่งสกัดในเมทานอลมาละลายด้วยเฮกเซนจำนวน 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยการกวนบนอ่างน้ำเดือด กรองแยกสารละลายที่ได้ แล้วนำไปกลั่นแยกเฮกเซน โดยกลั่นแบบธรรมดา (ทำซ้ำจนสารละลายไม่มีสี) จะได้สิ่งสกัดในเฮกเซน มีลักษณะเหนียวข้น สีเขียวเข้ม หนัก 26.33 กรัม

นำสิ่งสกัดในเมทานอลที่เหลือจากการละลายด้วยเฮกเซน มาละลายด้วยคลอโรฟอร์มโดยวิธีเดียวกับการละลายด้วยเฮกเซน จะได้สิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มมีลักษณะแข็ง สีเขียวเข้ม หนัก 34.47 กรัม และสิ่งสกัดในเมทานอลที่เหลือหนัก 323.38 กรัม

ขั้นตอนการสกัดสรุปได้ดังแผนภาพที่ 1

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดลำต้นกำลังเสือโคร่ง



2.6 การแยกสาร

2.6.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน

นำสิ่งสกัดในเฮกเซนหนัก 26.33 กรัม ละลายด้วยเฮกเซนจำนวนเล็กน้อย ผสมกับซิลิกาเจลจนร่วน บรรจุในคอลัมน์ที่มีซิลิกาเจลอยู่แล้ว 503 กรัม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ชะด้วยตัวทำละลายดังนี้ เฮกเซน , เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม , คลอโรฟอร์ม , คลอโรฟอร์ม-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 700 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำไปกลั่น แยกตัวทำละลายออกจนเหลือปริมาตร 20-30 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทลงในขวดรูปกรวยขนาด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร หลังจากนั้นตรวจสอบองค์ประกอบในสารละลาย ด้วยวิธีทินแลร์โครมาโทกราฟี ตามข้อ 2.4.3 รวมส่วนที่ให้ผลเหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	0.93
10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	2-4	น้ำมันสีเหลือง	0.51
	5-6	น้ำมันสีเหลือง	0.04
	7-13	น้ำมันสีเหลืองส้มปนตะกอนขาวเล็กน้อย	0.03
20% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	14-19	น้ำมันสีเหลืองปนตะกอนขาว	0.36
40% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	20-22	น้ำมันสีเหลือง	0.72
	23	น้ำมันสีเหลืองปนตะกอนละเอียดสีขาวเล็กน้อย	0.23
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	24-25	น้ำมันสีเหลืองส้มปนตะกอนขาว	0.89
	26-28	น้ำมันเหนียวหนืดสีเขียวเข้มปนตะกอน	7.63
60% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	29-31	น้ำมันสีเขียวเข้มอมน้ำตาลปนตะกอน	0.92
80% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	32-34	น้ำมันสีเขียวปนตะกอนขาว	2.89

ตารางที่ 2 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
คลอโรฟอร์ม	35-36	น้ำมันสีเขียว	0.26
	37-38	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	0.37
	39-41	น้ำมันสีเขียวขี้ม้าปนตะกอนเล็กน้อย	0.42
5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	42-43	น้ำมันเหนียวหนืดสีเขียวอมน้ำตาล	1.35
	44	น้ำมันสีเขียวขี้ม้าปนตะกอนสีน้ำตาล	0.53
	45-46	คราบสีเขียวขี้ม้าปนตะกอนสีน้ำตาล	0.29
	47-48	น้ำมันสีเขียวเข้มปนตะกอนสีขาว	1.86
25% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	49	น้ำมันสีน้ำตาล	0.13
	50-51	คราบสีเหลืองอมน้ำตาลปนตะกอนสีน้ำตาล	0.37
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	52-57	น้ำมันสีน้ำตาลปนตะกอนสีน้ำตาล	0.91
เมทานอล	58-59	น้ำมันสีน้ำตาลปนตะกอนสีน้ำตาล	1.12

2.6.1.1 การแยกสารลำดับส่วนที่ 26-28 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน

นำสารจากลำดับส่วนที่ 26-28 ซึ่งเป็นน้ำมันเหนียวหนืดสีเขียวเข้มเกือบดำปนตะกอนหนัก 7.63 กรัมมาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.8 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลหนัก 150 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 26-28 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซนด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-5	คราบน้ำมันสีเหลือง	น้อยมาก
10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	6-9	คราบน้ำมันสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
	10	คราบน้ำมันสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
30% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	11-12	คราบน้ำมันสีเหลือง	น้อยมาก
	13-17	คราบสีขาว	0.004
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	18-20	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.024
60% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	21-23	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.014
	24-26	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.012
	27	คราบน้ำมันสีเหลือง	น้อยมาก
	28-29	คราบน้ำมันสีเหลืองเข้ม	0.003
	30	คราบน้ำมันสีเหลืองเข้ม	0.005
	31	คราบสีน้ำตาลอ่อน	0.117
	32-33	น้ำมันสีชมพูม่วงปนตะกอนขาว	0.425
	34-40	น้ำมันสีเขียวปนผลึกรูปเข็ม	4.568
80% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	41-47	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	0.202
คลอโรฟอร์ม	48-52	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	0.117
5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	53-57	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	0.131
	58-59	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	0.181
	60-62	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	0.167
20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	63	คราบสีเขียวแกมเหลือง	0.057
	64	คราบสีเขียวปนตะกอนสีน้ำตาล	0.132
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	65-70	คราบสีเขียว	0.098

2.6.2 การแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม

นำสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มหนัก 10 กรัม มาแยกโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลหนัก 250 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
25% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	1	จุดน้ำมันใสไม่มีสี	น้อยมาก
	2-3	คราบน้ำมันใสไม่มีสี	น้อยมาก
	4-6	คราบน้ำมันใสไม่มีสีปน ตะกอนขาวเล็กน้อย	น้อยมาก
30% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	7-11	คราบน้ำมันสีเหลือง	น้อยมาก
	12-13	คราบน้ำมันสีเหลือง	น้อยมาก
	14-15	คราบน้ำมันสีเหลือง	น้อยมาก
40% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	16-20	คราบน้ำมันสีเหลืองเข้มปน ตะกอนขาวเล็กน้อย	น้อยมาก
	21	น้ำมันสีเขียวขี้ม้าปนตะกอน	0.05
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	22-23	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	0.15
	24-25	น้ำมันสีเขียวอมเหลือง	0.03
	26-39	น้ำมันสีเขียวขี้ม้าปนตะกอน	0.28
60% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	40-43	น้ำมันสีเขียวขี้ม้าปนตะกอนขาว	0.01
	44-46	คราบน้ำมันสีเขียวขี้ม้า	0.01
70% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	47	คราบน้ำมันสีเขียวอมเหลือง	0.18
	48-54	น้ำมันสีเขียวอมเหลืองปน ตะกอน	0.47
80% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	55-59	น้ำมันสีเหลืองอมเขียวปน ตะกอนขาวคล้ายเส้นใย	2.39

ตารางที่ 4 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
คลอโรฟอร์ม	60-62	คราบน้ำมันสีเหลืองอมเขียว	0.08
	63-64	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.13
5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	65	น้ำมันสีเหลืองอมน้ำตาล	0.01
	66	น้ำมันสีน้ำตาล	1.43
	67-68	น้ำมันสีน้ำตาลอมเขียว	0.96
	69-70	น้ำมันสีเหลืองปนตะกอน	1.14
	71	คราบสีน้ำตาลอมเหลือง	0.15
	72-73	น้ำมันสีเหลืองอมน้ำตาล	0.46
20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	74-75	คราบน้ำมันสีเหลืองอม น้ำตาล	0.22
	76-78	น้ำมันสีเหลืองปนตะกอนสี น้ำตาล	0.38
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	79-83	น้ำมันสีเหลืองปนตะกอนสี น้ำตาล	0.53
เมทานอล	84-87	ตะกอนสีน้ำตาลเข้ม	0.56

2.6.3 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอล

นำสิ่งสกัดในเมทานอลหนัก 25 กรัม ละลายด้วยเมทานอลนำเฉพาะส่วนที่ละลายมาแยกโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร (วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว) บรรจุ ซิลิกาเจลสูง 4 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่สภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจาก คอลัมน์ครั้งละ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอลด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	1-4	ของแข็งสีเขียวเข้มเกือบดำ	0.896
คลอโรฟอร์ม	5	คราบน้ำมันสีเหลืองอมเขียว	0.025
5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	6	คราบสีขาว	0.009
	7-8	น้ำมันสีเขียวขี้ม้า	0.975
10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	9	น้ำมันสีน้ำตาลอมเขียวปน ตะกอนสีน้ำตาล	1.668
	10	น้ำมันสีน้ำตาลแดงปน ตะกอนสีน้ำตาล	1.215
25% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	11-12	น้ำมันสีน้ำตาล	1.499
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	13-16	น้ำมันเหนียวหนืดสีน้ำตาล แดงปนตะกอนสีน้ำตาล	1.924
เมทานอล	17-20	น้ำมันเหนียวหนืดสีน้ำตาล เข้มปนตะกอน	2.016

2.6.3.1 การแยกสารลำดับส่วนที่ 1-4 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็วของสิ่งสกัดในเมทานอล

นำสารจากลำดับส่วนที่ 1-4 ซึ่งเป็นของแข็งสีเขียวเข้มเกือบดำหนัก 0.896 กรัม มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.7 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลหนัก 30 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไประเหยบนอ่างน้ำเดือดจนเหลือปริมาตรประมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 1-4 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็วของสิ่งสกัดใน เมทานอลโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	1-14	คราบน้ำมันสีเหลืองอ่อน	0.019
25% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	15	คราบน้ำมันสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
	16-17	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.011
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	18-21	น้ำมันสีเขียวขี้ม้า	0.186
	22-23	น้ำมันสีเขียวขี้ม้าอมน้ำตาล	0.027
	24-25	คราบน้ำมันสีเขียวขี้ม้าอม เหลือง	0.018
75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	26-30	น้ำมันสีเขียวปนตะกอน	0.094
	31-37	น้ำมันสีเขียวปนตะกอน	0.203
คลอโรฟอร์ม	38-41	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.031
	42	คราบน้ำมันสีเขียวอมเหลือง	0.152
5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	43-44	คราบน้ำมันสีเหลืองหม่น	0.044
10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	45-49	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.007
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	50	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.005

2.7 การทำให้สารบริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

2.7.1 การทำ ZAP-1 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

ZAP-1 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 2-4 ซึ่งชะด้วย 10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน (ตารางที่ 2) เป็นน้ำมันสีเหลือง หนัก 0.51 กรัม ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเมทานอล ค่า R_f เป็น 0.653 (ซิลิกาเจล : 10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (NaCl) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 2923 , 2854 (s), 1465 (m), 1370 (m) และ 722 (w) (รูปที่ 10)

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ DB-1 , อุณหภูมิคอลัมน์ 250 ^{0}C , อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 ^{0}C , อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที) โดยเปรียบเทียบ ZAP-1 กับไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงยาวมาตรฐานที่มีจำนวนคาร์บอนเป็น 13 , 14 , 15 , 16 , 17 , 18 และ 19 อะตอม ตามลำดับ พบว่าไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงยาวมาตรฐาน มีค่า retention time (นาที) เป็น 12.65 , 13.70 , 14.65 , 15.66, 16.80, 18.30 และ 19.93 (รูปที่ 11,12) ส่วน retention time ของ ZAP-1 แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 retention time จากแก๊สโครมาโทแกรมของ ZAP-1

retention time (นาที)
13.55
14.13
15.40
15.46
15.93
16.63
17.88
18.00

2.7.2 การทำ ZAP-2 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

ZAP-2 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 24 และ 25 ซึ่งชะด้วย 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน (ตารางที่ 2) ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเฮกเซน จะได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 60 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 76-78 ^{0}C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน ไม่ละลายในเอทิลแอซิเตตและเมทานอล ค่า R_f เป็น 0.653 (ซิลิกาเจล : คลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3200-3500 (m) , 2919,2849 (s) , 1468 (m) , 1063 (m) และ 724 (m) (รูปที่ 14)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 0.88 (3H,t) , 1.20 (s) , 1.58 (m) และ 3.64 (2H,t) (รูปที่ 15)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 14.05 , 22.61 , 25.66 , 29.36 , 29.61 , 31.85 , 32.74 และ 63.03 (รูปที่ 16)

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1 , อุณหภูมิคอลัมน์ 250 ^{0}C , อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 ^{0}C , อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที) โดยเปรียบเทียบ ZAP-2 กับแอลกอฮอล์โซ่ตรงยาวมาตรฐานที่มีจำนวนคาร์บอนเป็น 14 , 16 , 18 , 20 , 22 และ 30 อะตอมตามลำดับ พบว่าแอลกอฮอล์โซ่ตรงยาวมาตรฐาน มีค่า retention time (นาที) เป็น 0.90 , 1.23 , 1.79 , 2.78 , 4.48 และ 36.07 (รูปที่ 17) ส่วน retention time ของ ZAP-2 แสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 retention time และพื้นที่ใต้พีคจากแก๊สโครมาโทแกรมของ ZAP-2

retention time (นาที)	พื้นที่ใต้พีค	%
5.04	4083	0.58
7.66	26950	3.84
12.60	119742	17.05
20.91	551611	78.53

2.7.3 การทำ ZAP-3 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

ZAP-3 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 32 และ 33 ซึ่งชะด้วย 60% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 26-28 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (ตารางที่ 3) ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเฮกเซน จะได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 30 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 65-67 ^{0}C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเฮกเซน ค่า R_f เป็น 0.761 (ซิลิกาเจล : คลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3000-3500 (broad,s) , 2919,2849 (s) , 1705 (s) และ 724 (m) (รูปที่ 20)

เตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของ ZAP-3 ด้วย diazomethane แล้ววิเคราะห์ด้วย GC-MS (คอลัมน์ DB-1 , อุณหภูมิคอลัมน์ 250 ^{0}C , อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 ^{0}C , อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที) ได้แก๊สโครมาโทแกรม (รูปที่ 21) มีค่า retention time (นาที) ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 retention time และพื้นที่ใต้พีคจากแก๊สโครมาโทแกรมของ ZAP-3

retention time (นาที)	พื้นที่ใต้พีค	%
16.05	20161	0.53
19.44	313644	8.22
20.76	836214	21.92
21.87	40644	1.06
27.61	56856	1.49
30.08	412981	10.83
30.34	72962	1.91
33.05	277025	7.26
35.73	707241	18.54
38.90	639931	16.78
42.68	197727	5.18
47.45	100408	2.63
49.76	138902	3.64

2.7.4 การทำ ZAP-4 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

ZAP-4 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 36 และ 37 ซึ่งชะด้วย 60% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 26-28 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (ตารางที่ 3) ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเฮกเซน จะได้ผลึกรูปเข็มใส ไม่มีสี หนัก 50 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 153-155 ^{0}C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม , เอทิลแอซิเตต ละลายได้บ้างในเฮกเซน ค่า R_f เป็น 0.653 (ซิลิกาเจล : 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3200-3600 (m) , 2937,2867 (s) , 1643 (w) ,1462 , 1380 (m) , 1056 (m) , 970 (m) และ 802 (m) (รูปที่ 35)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 0.68-2.28 (m) , 3.50 (1H,m) , 5.09 (1H,m)และ 5.35 (2H,d) (รูปที่ 36)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 11.78-56.79 , 71.72 , 121.63 , 129.20 , 138.23 และ 140.68 (รูปที่ 37)

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1 , อุณหภูมิคอลัมน์ 260 ^{0}C , อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 ^{0}C , อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตรต่อนาที) โดยเปรียบเทียบ ZAP-4 กับสเตอรอยด์มาตรฐาน ได้แก่ cholesterol , campesterol , stigmasterol และ β-sitosterol พบว่าสเตอรอยด์มาตรฐานมีค่า retention time (นาที) เป็น 16.16 , 19.96 , 21.23 และ 24.26 (รูปที่ 38) ส่วน retention time ของ ZAP-4 แสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 retention time และพื้นที่ใต้พีคจากแก๊สโครมาโทแกรมของ ZAP-4

retention time (นาที)	พื้นที่ใต้พีค	%
20.22	62595	4.47
21.38	94980	73.84
24.39	273967	21.29

2.7.5 การทำ ZAP-5 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

ZAP-5 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 29-31 ซึ่งชะด้วย 60% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน(ตารางที่2) ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว เป็นเงาวาว หนัก 20 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 216-218 ^{0}C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน ค่า R_f เป็น 0.387 (ซิลิกาเจล:20% เอทิลแอซิเตตในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3200-3500 (m) , 2934,2867 (s) , 1644 (w) ,1454 , 1373 (m) , 1011 (m) และ 879 (w) (รูปที่ 39)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 0.71-1.98 (m) , 2.36 (1H,m) , 3.18 (1H,m) , 3.34-3.80 (AB quatet,2H) , 4.59 และ 4.68 (1H,s) (รูปที่ 40)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 14.69 , 15.24 , 15.95 , 18.25 , 19.01 , 20.80 , 25.22 , 27.03 , 27.35 , 27.90 ,29.17 , 29.76 , 33.90 , 34.28 , 37.13 , 37.30 , 38.96 , 38.79 , 40.90 , 42.68 , 47.33 , 48.77 , 50.40 , 55.29 , 60.51 , 78.90 , 109.53 และ 150.35 (รูปที่ 41)

DEPT-90 (δ,ppm) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 37.30 , 47.43 , 48.77 , 50.40 , 55.29 และ 78.90 (รูปที่ 42)

DEPT-135 (δ,ppm) ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ 14.69 , 15.24 , 15.95 , 19.01 , 27.90 , 37.30 , 47.73 , 48.77 , 50.40 , 55.29 และ 78.90 ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 18.25 , 20.80 , 25.22 , 27.03 , 27.35 , 29.17 , 29.76 , 33.90 , 34.22 , 38.78 , 60.51 และ 109.53 (รูปที่ 43)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 442 นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของการแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญที่ m/e (% relative intensity) ดังนี้ 427(3.1) , 411(13.1) , 279(20.0) , 234(17.2) , 220(11.3) , 207(28.8) , 203(27.5) , 189(23.1) , 167(86.5) และ 149(100.0) (รูปที่ 47)

2.7.6 <u>การทำ ZAP-6 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี</u>

ZAP-6 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 32-34 ซึ่งชะด้วย 80% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน (ตารางที่ 2) ลำดับส่วนที่ 55-59 ซึ่งชะด้วย 80% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 4) และลำดับส่วนที่ 31-37 ซึ่งชะด้วย 75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 1-4 จากสิ่งสกัดในเมทานอล (ตารางที่ 6) ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว เป็นเงาวาว หนัก 200 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 276-278 ^0C (สลายตัว) ละลายได้ดีในเมทานอล , DMSO , เอทิลแอซิเตต ละลายได้บ้างในคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเฮกเซน ค่า R_f เป็น 0.347 (ซิลิกาเจล : 20% เอทิลแอซิเตตในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3100-3500 (broad,m) , 3077 (w) , 2942,2869 (s) , 1688 (s) ,1643 (m) , 1453 (m) , 1375 (m) และ 885 (m) (รูปที่ 48)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$+DMSO) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 0.66-2.30 (m), 3.00 (1H,m) , 3.17 (1H,m) 4.60(1H,s) และ 4.73 (1H,s) (รูปที่ 49)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$+DMSO) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 14.22 , 15.05 , 15.63 , 17.88 , 18.91 , 20.48 , 25.16 , 26.98 , 27.65 , 29.26 , 30.28 , 31.89 , 33.99 , 36.57 , 36.77 , 37.81 , 38.40 , 40.36 , 42.01 , 46.47 , 48.88 , 50.16 , 55.02 , 55.62 , 77.93 , 108.83 , 150.29 และ 177.73 (รูปที่ 50)

DEPT-90 (δ,ppm) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 37.81 , 46.47 , 48.88 , 50.16 , 55.02 และ 77.93 (รูปที่ 51)

DEPT-135 (δ,ppm) ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ 14.22 , 15.05 , 15.63 , 18.91 , 27.65 , 37.81 , 46.47 , 48.88 , 50.16 , 55.02 และ 77.93 ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 17.88 , 20.48 , 25.16 , 26.98 , 29.26 , 30.28 , 31.89 , 33.99 , 36.77 , 38.40 และ 108.83 (รูปที่ 52)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 456 นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของการแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญที่ m/e (% relative intensity) ดังนี้ 438 (4.6) , 248 (33.6) , 220 (26.1) , 207 (57.9) , 203 (29.0) และ 189 (100.0) (รูปที่ 56)

เตรียมอนุพันธ์ของ ZAP-6 เป็นอนุพันธ์ acetate โดยนำ ZAP-6 30 มิลลิกรัม รีฟรักซ์กับ acetic anhydride โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ในเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น เทของผสมลงในน้ำผสมน้ำแข็ง กรองแยกของแข็ง แล้วนำของแข็งมาตกผลึกซ้ำด้วยคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 20 มิลลิกรัม (กำหนดให้เป็นสาร ZAP-6A) จุดหลอมเหลว 258 ^oC (สลายตัว) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3300-3500 (s) , 2946,2870 (s) , 1736 (s) , 1694 (s) ,1644 (m) , 1458 (m) , 1373 (m) , 1246 (s) , 1027 (m) และ 885 (m) (รูปที่ 57)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 0.83 (6H,s) , 0.84 (3H,s) , 0.93 (3H,s) , 0.97 (3H,s) , 1.69 (3H,s) , 2.04 (3H,s) , 2.99 (1H,m) , 4.47 (1H,m) , 4.61 (1H,s) และ 4.74 (1H,s) (รูปที่ 58)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 14.58 , 15.96 , 16.09 , 16.38 , 18.09 , 19.27 , 20.79 , 21.24 , 23.63 , 25.37 , 27.87 , 29.62 , 30.50 , 32.09 , 34.17 , 36.97 , 37.05 , 37.73 , 38.35 , 40.63 , 42.35 , 46.87 , 49.20 , 50.33 , 55.35 , 56.32 , 80.89 , 109.66 , 150.33 , 170.99 และ 181.86 (รูปที่ 59)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 498 (รูปที่ 60)

2.7.7 การทำ ZAP-7 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

ZAP-7 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 47 และ 48 ซึ่งชะด้วย 5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน (ตารางที่ 2) และลำดับส่วนที่ 76-78 ซึ่งชะด้วย 20% เมทานอลในคลอโรฟอร์มในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 4) ตกผลึกด้วยเมทานอลร้อนจะได้ของแข็งอสัณฐานสีขาว หนัก 270 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 268-269 ^{0}C ละลายได้บ้างในเมทานอลร้อน ไม่ละลายในเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเอทิลแอซิเตต

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3300-3500 (s) ,1632 (m) , 1462 , 1375 (s) 1070 (s) และ 892 (w) (รูปที่ 61) ซึ่งพบว่า น่าจะเป็นไกลโคไซด์ จึงทำการแยกสลายด้วยน้ำ โดยใช้ 10% HCl ในเอทานอล รีฟลักซ์กับ ZAP-7 100 มิลลิกรัม เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ตรวจปฏิกิริยาด้วยการทำทินแลร์โครมาโทกราฟี เพื่อดูว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังนี้

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

แยกส่วนของ aglycone และน้ำตาลออกจากกันได้โดยการกลั่นระเหยเอทานอลแบบสุญญากาศแบบหมุนให้เหลือเอทานอลเพียงเล็กน้อย เติมน้ำแล้วสกัดด้วยอีเทอร์ จะแยกได้ aglycone อยู่ในชั้นอีเทอร์ และน้ำตาลอยู่ชั้นน้ำ

- การศึกษาส่วน aglycone

นำชั้นอีเทอร์มาเติม anh. Na_2SO_4 กรองแยกสารละลายมาระเหยไล่อีเทอร์ จะได้ของแข็งสีขาว ตกผลึกซ้ำด้วยคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล จะได้ผลึกรูปเข็ม สีขาว (ZAP-7A) หนัก 20 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 135-137 ^{0}C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เอทิลแอซิเตต ละลายได้บ้างในเฮกเซน ค่า R_f เป็น 0.662 (ซิลิกาเจล : 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3600-3200 (m) , 2937,2893 (s) , 1638 (w) ,1463 , 1381 (m) , 1055 (m) , 971 (m) และ 801 (m) (รูปที่ 62)

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1 , อุณหภูมิคอลัมน์ 260 ^{0}C , อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 ^{0}C , อัตรการไหลของแก๊สไนโตรเจน 45 มิลลิลิตรต่อนาที) โดยเปรียบเทียบ ZAP-7A กับสเตอรอยด์มาตรฐาน เช่นเดียวกับ ZAP-4 พบว่า ZAP-7A มี retention time (นาที) เป็น 21.81 , 22.75 และ 26.15 และสเตอรอยด์มาตรฐานมี retention time (นาที) เป็น 16.06,21.56,23.23 และ 26.23 (รูปที่ 63)

เตรียมอนุพันธ์ของ ZAP-7 เป็นอนุพันธ์ acetate โดยนำ ZAP-7 50 มิลลิกรัม รีฟลักซ์กับ acetic anhydride โดยใช้ pyridine เป็นตัวทำละลาย ใช้เวลา 4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น เทของผสมลงในน้ำผสมน้ำแข็ง กรองแยกของแข็ง แล้วนำของแข็งมาตกผลึกซ้ำด้วยคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล จะได้ผลึกรูปเข็มใส แวววาว หนัก 40 มิลลิกรัม (กำหนดให้เป็นสาร ZAP-7B) จุดหลอมเหลว 151-153 ^{o}C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 2959,2906 (s) , 1754 (s) , 1645 (w) , 1222 (s) และ 1041 (s) (รูปที่ 65)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 0.66-1.87 (m) , 1.99 (3H,s) , 2.01 (3H,s) , 2.03 (3H,s) , 2.06 (3H,s) , 3.45 (1H,m) , 3.71 (1H,m) , 4.12 (2H,dd) , 4.58 (1H,d) , 5.03 (4H,m) , 5.10 (1H,m) และ 5.24 (2H,d) (รูปที่ 66)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 11.76-79.98 , 99.55 , 122.06 , 129.22 , 138.25 , 140.27 , 169.19 , 169.30 , 170.24 และ 170.58 (รูปที่ 67)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^{+}) ที่ 498 , 496 และ 384 (รูปที่ 69)

2.7.8 <u>การทำ ZAP-8 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี</u>

ZAP-8 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 69 และ 70 ซึ่งชะด้วย 5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 4) ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล จะได้ผลึกรูปแท่งสีเหลืองอ่อน หนัก 25 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 252-254 ^{o}C ละลายได้ดีในเมทานอล , DMSO ละลายได้บ้างในคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเฮกเซน ค่า R_f เป็น 0.587 (ซิลิกาเจล : 10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3383 (s) , 2741 (w) , 1701 (s) ,1644 (m) และ 880 (m) (รูปที่ 70)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$+DMSO) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 0.81-2.50 (m) , 2.01 (1H,dd,J=4.7,8.6 Hz) , 4.14 (1H,d,J=8.6 Hz) , 4.51 (1H,s) , 4.62 (1H,s) และ 9.72 (1H,d,J=4.6 Hz) (รูปที่ 71)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$+DMSO) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 14.33 , 14.44 , 16.29 , 17.72 , 18.93 , 23.94 , 24.69 , 24.97 , 25.47 , 29.30 , 30.12 , 31.86 , 33.74 , 36.53 , 37.50 , 40.37 , 41.41 , 42.21 , 46.56 , 47.42 , 48.65 , 49.53 , 55.35 , 61.82 , 72.35 , 79.83 , 109.95 , 150.10 , 177.80 และ 205.97 (รูปที่ 72)

DEPT-90 (δ,ppm) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 37.50 , 46.56 , 48.65 , 49.53 , 61.82 , 72.35 , 79.83 และ 205.97 (รูปที่ 73)

DEPT-135 (δ,ppm) ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ 14.33 , 14.44 , 16.29 , 18.93 , 24.97 , 25.47 , 37.50 , 46.56 , 48.65 , 49.53 , 61.82 , 72.35 , 79.83 และ 205.97 ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 17.72 , 23.94 , 24.69 , 29.30 , 30.12 , 31.86 , 33.74 , 36.53 และ 109.95 (รูปที่ 74)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 470 นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของการแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญที่ m/e (% relative intensity) ดังนี้ 452 (100.0) , 248 (85.0) , 203 (70.9) และ 189 (81.8) (รูปที่ 78)