

บทที่ 3

การวิเคราะห์และวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การสกัด

ใบแก้วสดที่นำมาใช้ในการวิจัย ได้จากบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการสกัดใบแก้วสดหนัก 18 กิโลกรัม นำมาบดให้ละเอียดกับเมธานอล โดยใช้เครื่องบด นำมากรองเอากากใบแก้วสดออก นำส่วนที่เป็นสารละลายเมธานอลที่ได้ไปกลั่น ด้วยเครื่องสุญญากาศแบบหมุน จะได้สารมีลักษณะขุ่นหนืดหนัก 837 กรัม และนำไปสกัดต่อด้วย คลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้ง จนสารละลายคลอโรฟอร์มที่ได้ไม่มีสี นำสารละลายคลอโรฟอร์มที่ได้ไปกลั่นธรรมดา เพื่อนำตัวทำละลายออกบางส่วน แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกอีกครั้งบนอ่างน้ำเดือด จะได้สารที่มีลักษณะเหนียวสีเขียวเข้มบดหนัก 166 กรัม นำสารส่วนนี้ไปสกัดต่อด้วยเฮกเซนหลาย ๆ ครั้ง จนสารละลายเฮกเซนที่ได้ไม่มีสี นำสารละลายเฮกเซนที่ได้ไปกลั่นธรรมดา เพื่อนำตัวทำละลายบางส่วนออก แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายที่เหลือออกบนอ่างน้ำเดือด จะได้สารขุ่นหนืดสีเขียบบดหนัก 52 กรัม และนำสิ่งสกัดจากคลอโรฟอร์มที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซน นำมาสกัดด้วยอีเทอร์ ทำซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จนสารละลายอีเทอร์ไม่มีสี นำไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อนำตัวทำละลายบางส่วนออก แล้วนำตัวทำละลายที่เหลือออกโดยนำไประเหยบนอ่างน้ำเดือด จะได้สารมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวเข้มบดหนัก 44 กรัม ส่วนสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มที่เหลือจากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาจะมีลักษณะเป็นของแข็งร่วนสีดำนหนัก 46 กรัม นำสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ มาทำการแยกสารออกโดยใช้ คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยการชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมในอัตราส่วนต่าง ๆ คือ เฮกเซน เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม : เมธานอล เมธานอล และเก็บสารที่ชะด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เป็นลำดับส่วน โดยเก็บลำดับส่วนละเท่า ๆ กัน และนำมาตรวจสอบด้วยซินแลร์โครมา-

โทกราฟีรวมส่วนที่มีสารเหมือนกันเข้าด้วยกัน สำหรับสารที่เป็นของแข็งจะตกผลึกออกมา และทำสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการนำไปตกผลึกซ้ำหลาย ๆ ครั้ง ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ในกรณีที่สารมีปริมาณน้อย และในกรณีที่สารที่เป็นน้ำมันสามารถ ทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromato-graphy และ นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างดังต่อไปนี้

3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้

3.2.1 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 1

สาร 1 เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 132-134 °C

ได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน ตกผลึกให้บริสุทธิ์ด้วย เมธานอลร้อน ได้ผลึกของ

สาร 1 หนัก 80 มิลลิกรัม R_f 0.57 (คลอโรฟอร์ม 80%-เฮกเซน 20%) จากการทดสอบสาร 1 ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Libermann Burchardt และพอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 ละลายได้ดีใน คลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ละลายในเมธานอลที่ร้อน

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) ν_{max} (ซม.) (รูปที่ 3) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ต่างๆซึ่งรวบรวมไว้ในตารางที่ 11 พร้อมทั้งระบุถึงการดูดกลืนที่สำคัญเท่านั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ความถี่ต่างๆของสาร 1

แถบการดูดกลืน (cm^{-1})	ลักษณะ แถบการดูดกลืน	แสดงลักษณะ
3200-3600	w	O-H การสั่นแบบยืดของแอลกอฮอล์
3090	w	C-H การสั่นแบบยืดของแอลคีน
2960, 2860	s	C-H การสั่นแบบยืดของ CH_3 , CH_2
1640	w	C=C การสั่นแบบยืดของแอลคีน
1460	w	C-H การสั่นแบบงอของ CH_3 , CH_2
2380	m	C-H การสั่นแบบงออย่างมีสมมาตรของ CH_3
1040, 1020	m	C-O การสั่นแบบยืด, O-H สั่นแบบงอของ แอลกอฮอล์ (คู่ควบ)
890	w	C-H การสั่นแบบงอออกนอกระนาบของ $\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 4) ปรากฏสัญญาณของโปรตอน ที่ 4.08 พีพีเอ็ม (s, 1H) และ 4.67 พีพีเอ็ม (s, 1H) แสดงถึงโปรตอน ประเภท terminal methylene group ($=\text{CH}_2$) และสัญญาณที่ 3.48 พีพีเอ็ม (s, 1H) แสดงถึงโปรตอนที่เกาะกับคาร์บอนที่ต่อกับออกซิเจนอะตอม (HC-OH) และสัญญาณที่ 0.34-2.04 พีพีเอ็ม แสดงถึงหมู่ CH_3 , $-\text{CH}_2$ และ $-\text{CH}_3$ แสดงถึงหมู่ CH_3 ของไตรเทอร์-

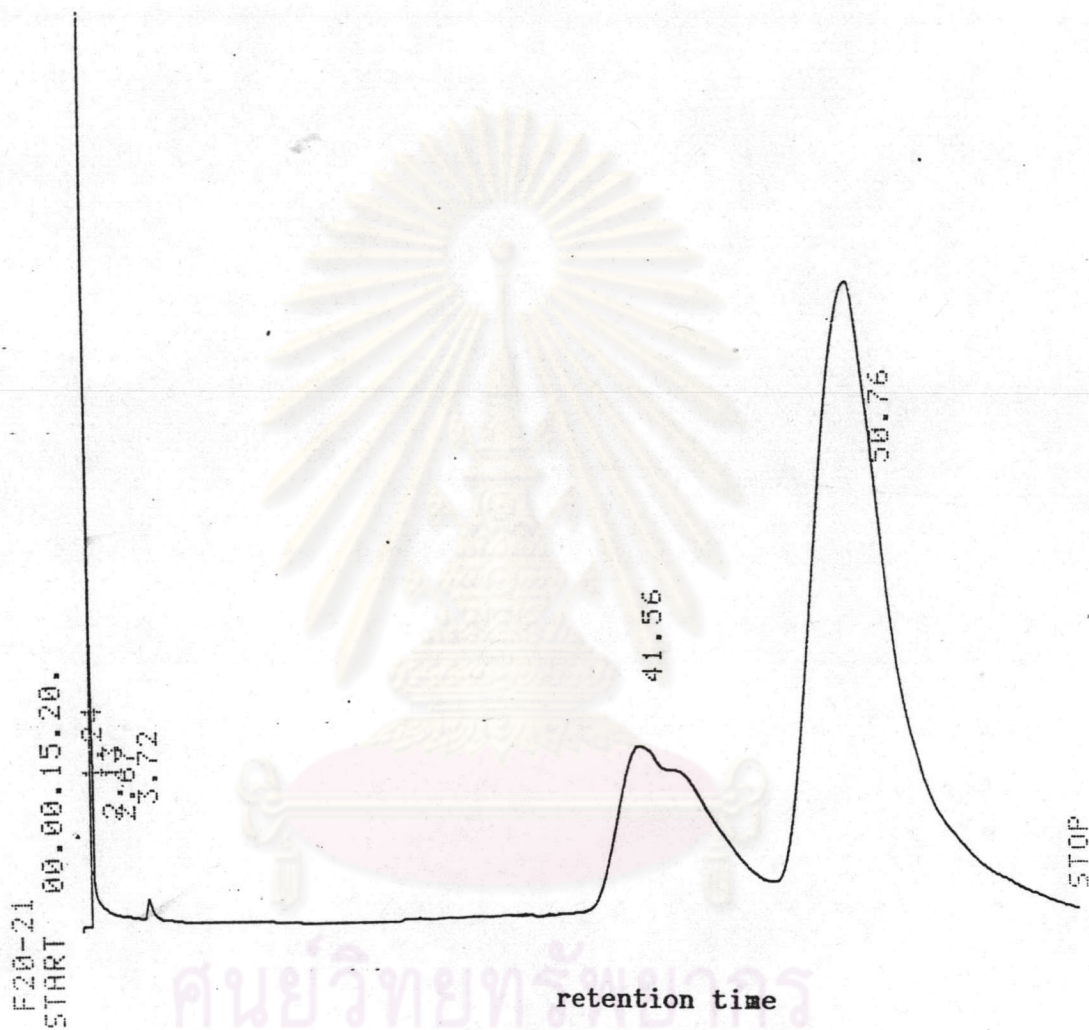
พีนอยด์

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 5) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 111.89 และ 151.5 พีพีเอ็ม แสดงถึงคาร์บอนที่เกาะกันด้วยพันธะคู่ สัญญาณที่ 77.58 พีพีเอ็ม แสดงสัญญาณของ C-OH และสัญญาณที่ 56.03-12.15 พีพีเอ็ม เป็นสัญญาณของหมู่ $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ และ $-\text{CH}$ ตามลำดับ

จากข้อมูลทางสเปกตรัมดังกล่าวมาแล้วนั้น จะพบว่าสาร 1 น่าจะเป็นสารประเภทไตรเทอร์พีนอยด์ ที่มีพันธะคู่อยู่ 1 พันธะและมีโปรตอนประเภท terminal methylene และเป็นแอลกอฮอล์

เมื่อนำสาร 1 มาทำ TLC พบว่าให้จุดสารเพียงจุดเดียว แต่เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย GLC พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 41.56 และ 50.76 นาที ดังรูปที่ 1 แสดงว่าสาร 1 เป็นสารผสม และไม่สามารถแยกออกจากกันโดยวิธีโครมาโทกราฟีธรรมดา ดังนั้นสาร 1 น่าจะเป็นของผสมระหว่างไตรเทอร์พีนอยด์ที่เป็นแอลกอฮอล์ 2 สารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกัน ต่างกันที่หมู่แทนที่ และจำนวนของคาร์บอน สูตรโครงสร้างที่แน่นอนของสารทั้งสอง ยังไม่สามารถสรุปได้จากข้อมูลที่มีอยู่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



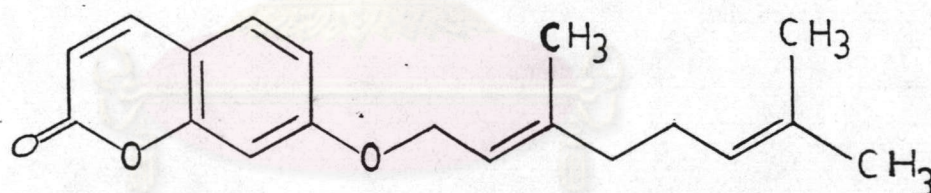
ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แก๊สโครมาโทแกรมของสาร 1

3.2.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 2

สาร 2 เป็นผลึกรูปแท่งสีขาว จุดหลอมเหลว $64-65^{\circ}\text{C}$ ตกผลึกให้บริสุทธิ์ด้วย คลอโรฟอร์ม-เฮกเซนหลาย ๆ ครั้ง ค่า R_f 0.60 (คลอโรฟอร์ม 80% - เฮกเซน 20%) น้มาทดสอบกับ Br_2 ใน CCl_4 ฟอกจางสี และไม่ให้เกิด HBr ฟอกสีสารละลาย KMnO_4 แสดงถึงพันธะคู่

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี นั่นคือ อินฟราเรดสเปกตรัม แมสสเปกตรัม นิวเคลียร์แมกเนติกเรเซอร์แนนซ์ (เอ็นเอ็มอาร์) สเปกตรัมทั้งโปรตอน และคาร์บอน-13 และ 2D-เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ซึ่งจะกล่าววิเคราะห์โดยละเอียดต่อไป ได้ระบุว่าสาร 2 นี้คือ 7-geranyloxycoumarin มีสูตรโครงสร้างดังต่อไปนี้



สูตรโครงสร้างนี้ได้มาจากการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสเปกโทรสโกปีดังต่อไปนี้

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 6) แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความถี่ต่าง ๆ ซึ่งรวบรวมไว้ในตารางที่ 12 พร้อมทั้งระบุถึงการดูดกลืนที่สำคัญเหล่านั้น

ตารางที่ 12 การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ความถี่ต่าง ๆ ของสาร 2

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ลักษณะแถบการดูดกลืน	แสดงลักษณะ
3080, 3060	w	C-H การสั่นแบบยืดของ C=C-H
2980, 2900, 2850	w	C-H การสั่นแบบยืดของ-CH ₂ , CH ₃
1750	s	C=O สั่นแบบยืดของเอสเทอร์ (α , β unsaturated-lactone
1600, 1500, 1450, 1400	m	C=C สั่นแบบยืดของพวก แอโรแมติก
1345, 1285, 1250, 1020	m	C-O สั่นแบบไม่สมมาตรของเอซีเตต ($=C-O-\overset{O}{\parallel}{C}$)
895, 850, 835	m	C-H สั่นแบบออกนอกระนาบของ แอลคีนประเภท R ₂ C = CHR
780, 760	m	C-H สั่นแบบออกนอกระนาบของ แอโรแมติก

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 7) ปราบกฏสัญญาณของโปรตอนที่
ต่าง ๆ ดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 13

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 13 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2

(พีพีเอ็ม)	ลักษณะ	Integration	Assignment
1.61	s	3H	-CH ₃ (C-7'')
1.67	s	3H	-CH ₃ (C-8')
1.77	s	3H	-CH ₃ (C-3'')
2.19, 2.11	m	4H	-CH ₂ (C-4', 5')
4.6	d, J = 6.6 Hz	2H	-CH ₂ (C-1')
5.11	broad	1H	= CH- (C-6')
5.48	t, J = 6.6 Hz	1H	= CH- (C-2')
7.65	d, J = 9.5 Hz	1H	โปรตอนที่เกาะกับพันธะคู่ที่ เป็นแอโรแมติก
7.37	d, J = 8.4 Hz	1H	(C-4)
6.86	d, J = 8.5 Hz	1H	(C-5)
6.82	s	1H	(C-8)
6.25	d, J = 9.5 Hz	1H	(C-3)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 8) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่
ต่าง ๆ ดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 2

พีพีเอ็ม	Assignment
161.9	C-2
161.11	C-7
155.67	C-8a
143.53	C-4
128.57	C-5
113.01	C-6
112.72	C-5
112.24	C-4a
101.39	C-8
142.14	C-3
131.75	C-7
123.46	C-6
118.27	C-2
65.31	C-1
39.34	C-5
26.06	C-4
25.57	C-8
17.56	C-7
16.60	C-3

การกำหนดสัญญาณของโปรตอนและคาร์บอน สามารถทำได้อย่างถูกต้องแน่นอน จากเทคนิคของเอ็นเอ็มอาร์ กล่าวคือ ข้อมูล DEPT 90 (รูปที่ 9) แสดงเฉพาะ สัญญาณที่เป็นของคาร์บอนประเภทเทอร์เชียรี (-CH) ข้อมูล DEPT 135 (รูปที่ 10) แสดงสัญญาณของหมู่เมทิล (-CH₃), หมู่CH และ หมู่เมทิลีน (-CH₂-) ซึ่งอยู่ใต้เส้นฐาน ซึ่งทำให้สามารถกำหนดสัญญาณของคาร์บอนหมู่ต่าง ๆ เหล่านี้ได้ จาก C-H Correlation (รูปที่ 12) ทำให้สามารถกำหนดได้ว่าโปรตอนตัวไหน มีพันธะอยู่กับคาร์บอนตัวไหน และ จาก Correlated Spectroscopy (COSY) ซึ่งให้ 2-D สเปกตรัม (รูปที่ 11) ทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่าง ¹H-¹H ได้ นั่นคือ ทำให้ทราบว่าโปรตอนตัวไหน coupling กับโปรตอนตัวไหน ทำให้สามารถกำหนดความสัมพันธ์ของหมู่ที่มีโปรตอนเหล่านั้น ได้ว่ามี พันธะต่ออยู่ด้วยกันหรือไม่

จากข้อมูลต่าง ๆ ดังกล่าว สาร 2 จึงอาจจะเป็น 7-geranyloxycoumarin ((E)-ไอโซเมอร์) หรือ 7-nerilyloxycoumarin ((Z)-ไอโซเมอร์) จากการค้นคว้า จากเอกสารอ้างอิง เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสาร 2 กับของสารทั้งสอง ที่อาจจะเป็นได้ ได้พบข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม [51] จึงได้ทำการเปรียบเทียบ เคมีคลิฟท์ดังแสดงไว้ในตารางที่ 15

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ค่าโปรตอนเคมีคัลลิตี้ของสาร 2, 7-geranyloxy coumarin และ 7-nerlyoxycoumarin [51]

ตำแหน่งโปรตอน	(พีพีเอ็ม)		
	สาร 2	7-nerlyoxy-coumarin	7-geranyloxy-coumarin
C-8 , 7"	1.67 , 1.61	1.67 , 1.61	1.67 , 1.60
C-3"	1.77	1.80	1.77
C-1	4.6 (d, J=6.6Hz, 2H)	4.52 (d, 1H)	4.59 (d, 1H)
C-2	5.48 (t, J=6.6Hz, 1H)	5.44 (t, 1H)	5.47 (t, 1H)
C-6	5.10 (broad, 1H)	5.08 (b, 1H)	5.09 (b, 1H)
C-4, 5	2.19, 2.11 (m, 4H)	2.14, 2.09	2.14, 2.10

จากการเปรียบเทียบข้อมูลทางโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมดังกล่าว จะเห็นได้ว่ามีค่าใกล้เคียงกับของ 7-geranyloxy coumarin [51] ดังนั้นสาร 2 น่าจะเป็น 7-geranyloxy coumarin และข้อมูลที่ยืนยันได้ดียิ่งอีกอย่างหนึ่งคือ จุดหลอมเหลวของสารทั้งสามนี้ 7-nerlyoxycoumarin มีจุดหลอมเหลว 54-56°C และ 7-geranyloxy coumarin มีจุดหลอมเหลว 65-67°C [52] ในขณะที่สาร 2 มีจุดหลอมเหลว 64-65°C ซึ่งใกล้เคียงกับจุดหลอมเหลวของ 7-geranyloxy coumarin

จากข้อมูลแมสสเปกตรัม (รูปที่ 13) ปรากฏพีคของไอออนเชิงโรมเลข (M⁺) ที่ m/e 298 คำนวณสูตรโรมเลขได้ C₁₉ H₂₂ O₃ และคำนวณความไม่อิ่มตัวได้เท่ากับ 7

พบพิศการแตกตัวที่สำคัญที่ 229, 175, 162, 136, 137, 69

จากข้อมูลทั้งหมดทำให้สรุปได้ว่าสาร 2 คือ 7-geranyloxy coumarin

จากการค้นหาข้อมูลพบว่าเคยมีการรายงานการค้นพบ 7-geranyloxy coumarin จากพืชชนิดอื่น แต่ไม่มีรายงานการค้นพบสารนี้ในใบของต้นแก้ว (*Murraya paniculata* (Linn.) Jack) มาก่อนเลย ดังนั้น การรายงานนี้จึงเป็นการรายงานการพบสารนี้ในใบต้นแก้วเป็นครั้งแรก

3.2.3 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 3

สาร 3 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 123-125 °C ได้จาก
 สิ่งสกัดในเฮกเซน ตกผลึกให้บริสุทธิ์ด้วยเฮกเซน ได้ผลึกของสาร 3 หนัก 90 มิลลิกรัม
 ค่า R_f 0.35 (คลอโรฟอร์ม 80% - เฮกเซน 20%) จากการทดสอบสาร 3 ให้สารละลาย
 สีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard แสดงว่าเป็นสารพวกสเตอรอยด์ และพอกจางสี
 Br_2 ใน CCl_4 ไม่ให้ก๊าซ HBr สาร 3 ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เอทานอล
 แอซีโตน และเอซิลแอซีเตต ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน

อินฟราเรดสเปกตรัม (ชม.⁻¹) (รูปที่ 14) แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่
 ความถี่ต่าง ๆ ซึ่งรวบรวมไว้ในตารางที่ 16 พร้อมทั้งระบุถึงการดูดกลืนที่สำคัญเหล่านั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 การดูดกลืนรังสีที่มีความถี่ต่าง ๆ ของสาร 3

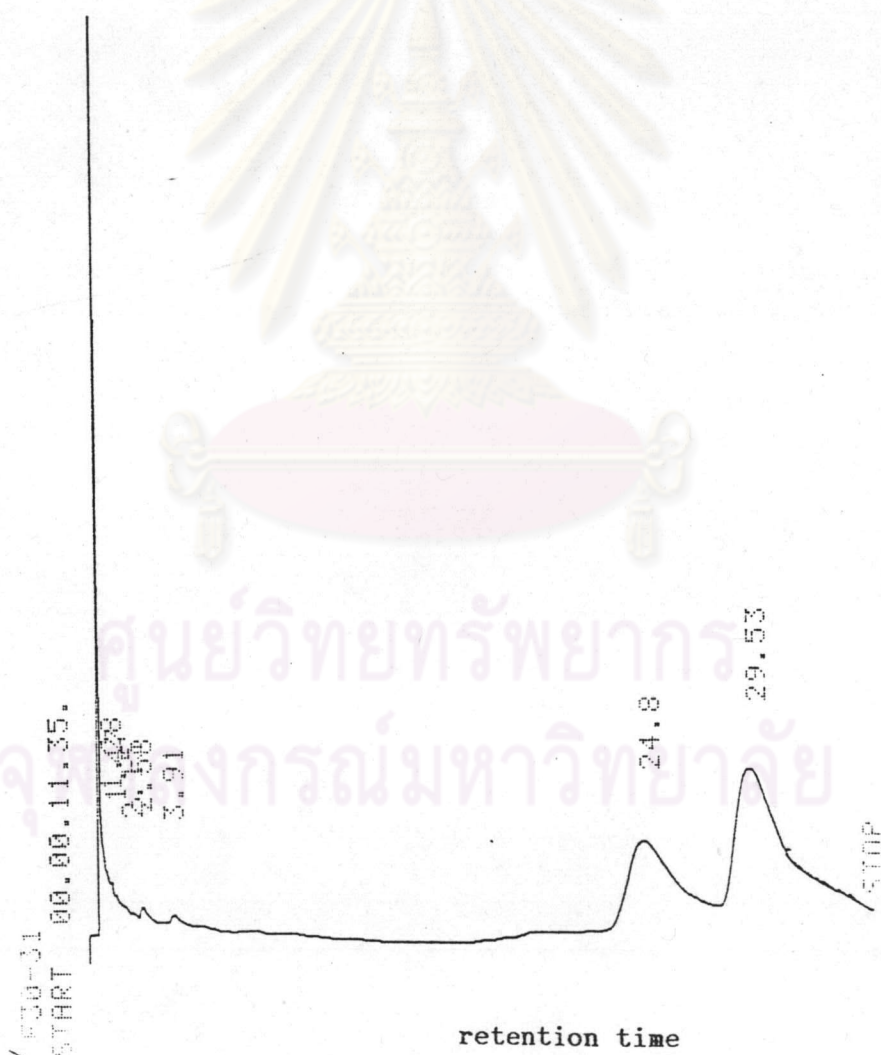
แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ลักษณะแถบการดูดกลืน	แสดงลักษณะ
3430	broad, m	การสั่นแบบยืดของ O-H
2940, 2840	s	C-H การสั่นแบบยืดของ -CH ₃ , CH ₂
1640	w	สั่นแบบยืดของ C=C
1460	m	C-H สั่นแบบงอของ -CH ₃ , -CH ₂ -
1380	m	C-H สั่นแบบงอในระนาบของ R ₁ R ₂ C = R ₃ H
1050	m	การสั่นแบบยืดของ C-O ของ secondary alcohol
970, 950	m	การสั่นแบบงอออกนอกระนาบของ R ₁ HC=CR ₂ H
840, 800	w	การสั่นแบบงอออกนอกระนาบของ R ₁ R ₂ C = R ₃ H

จากข้อมูลทางด้านอินฟราเรดสเปกตรัม และการทดสอบปฏิกิริยาเคมี แสดงว่า
สารนี้เป็นสารประเภทสเตอรอยด์

โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 15) ให้ความถี่สัญญาณที่ 0.70-1.06 พีพีเอ็ม
แสดงถึงโปรตอนของหมู่แองกูลาร์เมทิล (angular methyl groups) และสัญญาณที่ 1.12
-2.37 พีพีเอ็ม แสดงถึงเมทิลีน โปรตอน (-CH₂-), เมโรน โปรตอน (CH) ของ
สเตอรอยด์ และสัญญาณที่ 3.53 พีพีเอ็ม (m, -OH) และสัญญาณที่ 5.16 พีพีเอ็ม

(dd, $-HC=CH-$) และสัญญาณที่ 5.35 พีพีเอ็ม ($-C=CH$)

เมื่อนำสาร 3 มาทำ TLC พบว่าให้จุดสารจุดเดียว เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย GLC พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 24.48 และ 29.28 นาที ดังรูปที่ 2 แสดงว่า สาร 3 เป็นสารผสมไม่ใช่สารบริสุทธิ์ และไม่สามารถแยกออกจากกันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีธรรมดา จากข้อมูลทั้งหมดสาร 3 ควรเป็นของผสมระหว่างสเตอรอยด์ที่เป็นอัลกอฮอล์ อย่างน้อย 2 สารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกัน ต่างกันที่พันธะคู่ หรืออาจต่างกันที่จำนวนคาร์บอน สูตรโครงสร้างที่แน่นอนของสารทั้ง 2 ยังไม่สามารถระบุได้จากข้อมูลเหล่านี้

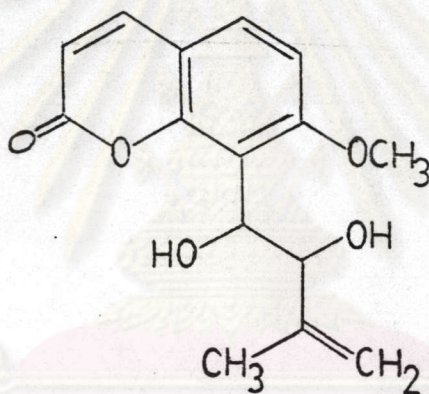


รูปที่ 2 แกสโครมาโทแกรมของสาร 3

3.2.4 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 4

สาร 4 เป็นผลึกรูปเหลี่ยมสีขาว จุดหลอมเหลว 131-132 องศาเซลเซียส ตกผลึกให้บริสุทธิ์ด้วยเอซิลแอซีเตต-เฮกเซน หลาย ๆ ครั้ง ค่า R_f 0.43 ให้ผลบวกกับ Br_2 ใน CCl_4 แต่ไม่ให้เกิด HBr พอกสีสารละลาย $KMnO_4$ แสดงถึงพันธะคู่ เมื่อทำปฏิกิริยากับโลหะ Sodium ให้เกิด Hydrogen แสดงว่ามีแอซิดิคลไฮโดรเจน

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป ท้าให้วิเคราะห์ได้ว่า สาร 4 นี้คือ murrangatin หรือ 7-methoxy-8-(1', 2'-dihydroxy-3'-butenyl)coumarin ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง :



รายละเอียดของการวิเคราะห์ข้อมูลที่ทำให้สามารถกำหนดโครงสร้างของสาร 4 เป็นดังต่อไปนี้

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 19) แสดงแถบการดูดกลืนต่าง ๆ ที่สำคัญ ดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 17 พร้อมกับการระบุถึงการดูดกลืนเหล่านั้น

ตารางที่ 17 แสดงการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสาร 4

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ลักษณะแถบการดูดกลืน	แสดงลักษณะ
3475 - 3490	broad, m	O-H สั้นแบบยึด
3080	w	C-H สั้นแบบยึดแบบไม่สมมาตรของ $R_1R_2C = CH_2$
2960, 2900, 2850	broad, m	C-H สั้นแบบยึดของ $-CH_2, CH_3$
1700 - 1740	s	C = O สั้นแบบยึดของ Ester ประเภท α, β -unsaturated - Lactone
1600, 1560, 1500	s	C = C สั้นแบบยึดของ aromatic system
1430, 1440	m	C-H สั้นแบบงอของ $-CH_2, CH_3$
1400	s	C-H สั้นแบบของ $=CH_2, =CH-$
1280, 1260	s	C-O สั้นแบบยึดไม่สมมาตรของ acetate = $C-O-\overset{O}{\parallel}{C}$
1120, 1095, 1060	s	C-O สั้นแบบยึดของ secondary alcohol
760, 835	s	C-H สั้นแบบงอนอกระนาบของ $=CH_2$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 (รูปที่ 20) ปรากฏสัญญาณที่
ต่าง ๆ ซึ่งรวบรวมไว้ในตารางที่ 18 พร้อมกับ assignment ของแต่ละสัญญาณ

ตารางที่ 18 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4

(พีพีเอ็ม)	ลักษณะ	Integration	Assignment
1.66	s	3H	-CH ₃ (C-3'')
3.86	s	3H	-OCH ₃ (C-7'')
4.52	broad, s	2H	=CH ₂ (C-4')
4.57	broad, d, J = 8.0 Hz)	1H	-CH(OH)-(C-2')
5.23	broad, d, J = 8.0 Hz	1H	-CH(OH)-(C-1')
			โปรตอนที่เกาะกับพันธะคู่ที่ เป็นแอโรแมติก
7.59	d, J = 9.5 Hz	1H	C-4
7.34	d, J = 8.7 Hz	1H	C-5
6.82	d, J = 9.5 Hz	1H	C-6
6.15	d, J = 8.5 Hz	1H	C-3

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 21) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่
ต่าง ๆ ดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4

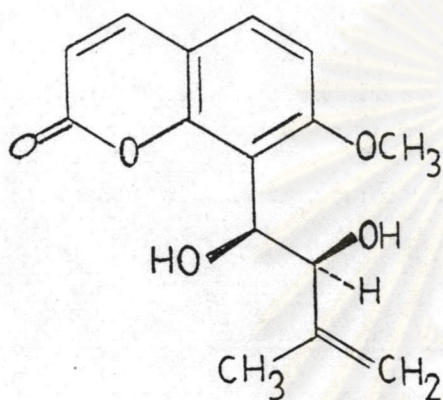


พีพีเอ็ม	Assignment
160.34	C-2
160.14	C-7
152.72	C-8a
143.90	C-4a
128.60	C-5
115.98	C-8
113.52	C-3
113.04	C-4a
112.92	C-6
143.70	C-3"
107.84	C-4'
78.15	C-1'
69.39	C-2'
56.19	C-7'
17.36	C-3''

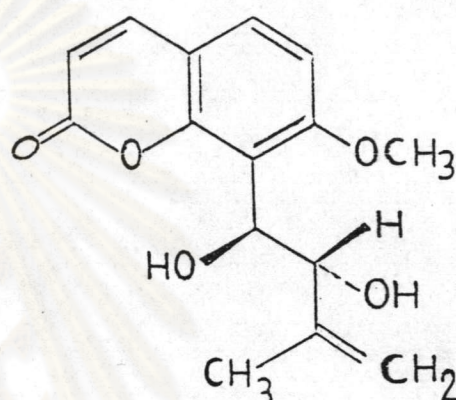
แมสสเปกตรัม (รูปที่ 22) ปราบกฏพีคของไอออนเชิงโรมเลกุล (M^+) ที่

m/e 276 จากการคำนวณได้สูตรโรมเลกุล $C_{15}H_{16}O_5$ ซึ่งจำนวนของโปรตอนและ

คาร์บอนสอดคล้องกับที่ได้จากข้อมูลของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม และคาร์บอน-13
 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมคือ 16 โปรตอน และ 15 คาร์บอน ตามลำดับ จากสูตรโมเลกุล
 $C_{15}H_{16}O_5$ คำนวณได้จำนวนความไม่อิ่มตัว (วงแหวน + พันธะคู่) เท่ากับ 6



murrangatin



minumicrolin

จากข้อมูลทั้งหมดสาร 4 น่าจะเป็น murrangatin หรือ minumicrotin ซึ่ง
 เป็น threo-isomer จึงทำการเปรียบเทียบลักษณะผลึก และจุดหลอมเหลวของสาร 4 กับ
 ของ murrangatin และ minumicrolin ที่มีผู้ค้นพบในพืชสกุล *Murraya* [53] พบว่า
 ลักษณะผลึกและจุดหลอมเหลวของสาร 4 เหมือนกับ murrangatin และ minumicrolin
 คือ 131-132°C จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกตรัมของสาร 4 กับของ
 murrangatin และของ minumicrolin เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 4 ดัง
 แสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 โพรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 เปรียบเทียบกับของ

murrangatin [53] และของ minumicrolin

ตำแหน่งโปรตอน	δ (พีพีเอ็ม)		
	Minumicrolin (CDCl ₃)	murrangatin (CDCl ₃)	สาร 4 (CDCl ₃)
C-H ที่ C-4	7.62 (d, J = 9.5 Hz, 1H)	7.62 (d, J = 9.5 Hz, 1H)	7.57 (d, J = 9.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-5	7.40 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	7.39 (d, J = 8.6 Hz, 1H)	7.34 (d, J = 8.7 Hz, 1H)
C-H ที่ C-6	6.88 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	6.86 (d, J = 8.6 Hz, 1H)	6.82 (d, J = 8.7 Hz, 1H)
C-H ที่ C-3	6.24 (d, J = 9.5 Hz, 1H)	6.24 (d, J = 9.5 Hz, 1H)	6.15 (d, J = 9.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-1'	5.42 (d, J = 8.0 Hz, 1H)	5.32 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	5.23 (d, J = 8.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-2'	4.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H)	4.54 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	4.52 (d, J = 8.5 Hz, 1H)
=CH ₂ ที่ C-4'	4.99 (m, 2H)	4.66 (s, 2H)	4.57 (s, 2H)
O-CH ₃ ที่ C-7 [*]	3.94 (s, 3H)	3.96 (s, 3H)	3.86 (s, 3H)
CH ₃ ที่ C-3''	1.88 (s, 3H)	1.77 (s, 3H)	1.66 (s, 3H)

จากข้อมูลลักษณะของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์พบว่า สำหรับ minumicrolin โปรตอนที่ตำแหน่ง C-1' และ C-2' จะปรากฏมีลักษณะเป็น doublets ที่ 5.42 และ 4.52 มีค่า $J = 8.0$ Hz แต่ในกรณีของ murrangatin โปรตอนที่ตำแหน่ง C-2' บางส่วน จะถูกบดบังภายใต้ C-4' โปรตอน ซึ่งมีลักษณะเป็น singlet (2H) ที่ 4.66 พีพีเอ็ม และโปรตอนที่ C-1' จะปรากฏที่ 5.32 (d, $J = 8.5$ Hz) [53] สาร 4 ปรากฏ สัญญาณของ C-2' ที่ 4.52 พีพีเอ็ม บางส่วนจะถูกบดบังภายใต้ C-4' โปรตอน ซึ่งมีลักษณะ เป็น singlet (2H) ที่ 4.57 พีพีเอ็ม และโปรตอนที่ C-1' จะปรากฏที่ 5.23 (d, $J = 8.5$ Hz) ส่วนที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดคือ สัญญาณของหมู่ CH_2 ที่ซึ่ง minumicrolin แสดงสัญญาณเป็นมัลติเพลท ที่ 4.99 พีพีเอ็ม ในขณะที่ murrangatin และสาร 4 แสดงสัญญาณเป็นซิงเกิลท ที่ 4.66 พีพีเอ็ม และ 4.57 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ดังนั้นสาร 4 น่าจะเป็น murrangatin ซึ่งเป็น erythro-isomer จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูล ทางคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 และ murrangatin ดังตารางที่ 21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ตารางที่ 21 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 4 เปรียบเทียบกับของ

murrangatin

ตำแหน่งคาร์บอน	δ (พีพีเอ็ม)	
	murrangatin [54] (CDCl ₃)	สาร 4 (CDCl ₃)
C-2	160.5	160.34
C-7	159.9	160.14
C-8a	152.4	152.72
C-4	143.9	143.90
C-3	143.7	143.70
C-5	128.4	128.60
C-8	115.8	115.98
C-3'	113.1	113.52
C-4a	112.5	113.04
C-6	112.3	112.92
C-4'	107.7	107.84
C-1'	75.6	78.15
C-2'	68.9	69.39
C-7"	55.9	56.19
C-3'	17.0	17.36

จากข้อมูลทางแมสสเปกตรัมแสดงพีคของโมเลกุลเชิงไอออนที่ 276 จากการ
หลุดออกไปของ H_2O ที่ m/e 258 (276-18), ของหมู่ $-CH(OH)-C(CH_3) =$
 CH_2 ที่ 205 (276-71), 206 (276-70) และที่ 175

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมด สรุปได้ว่า สาร 4 คือ murrangatin
หรือ 7-methoxy-8-(1,2'-dihydroxy-3'-methyl-3'-butenyl)coumarin ซึ่งเคย
มีผู้รายงานการค้นพบในใบของ Murraya paniculata (Linn.) Jack [53]

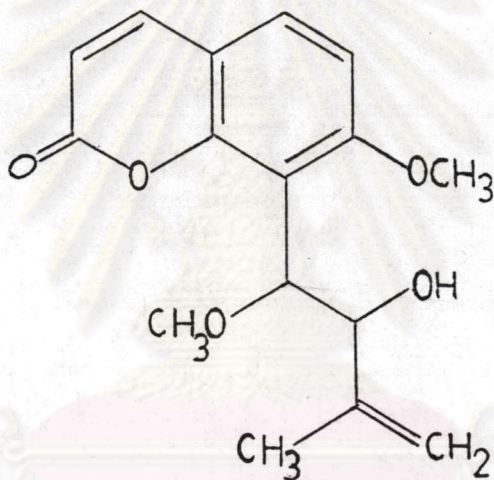


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.5 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 5

สาร 5 เป็นผลึกรูปเหลี่ยมสีขาว จุดหลอมเหลว 153-154 °C ตกผลึกให้บริสุทธิ์ด้วยเฮกเซน หลาย ๆ ครั้ง ค่า R_f 0.61 น้มาทดสอบกับ Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลบวก และไม่ให้เกิด HBr พอกสีสารละลาย $KMnO_4$ แสดงถึงพันธะคู่

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี ทำให้สามารถระบุได้ว่าสาร 5 คือ 1-methylmurrangatin ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง



รายละเอียดการวิเคราะห์ข้อมูลที่สนับสนุนสูตรโครงสร้างของสาร 5 เป็น

ดังต่อไปนี้ :

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 23) แสดงการดูดกลืนคลื่นแสงที่เป็นลักษณะของหมู่ -OH ที่ 3470 cm^{-1} , 3080 cm^{-1} (C = C-H) 1745 (α , B unsaturated - lactone), 1600, 1495, 1445 cm^{-1} (C = C) และ 1250, 1010 cm^{-1} (C-O-C) และหมู่ vinylidene ($\text{CH}_2\text{-C}=\text{CH}_2$), 780, 760 cm^{-1} (แสดงการสั่นแบบโคลงใน aromatic system)

ตารางที่ 22 แสดงการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสาร 5

แถบการดูดกลืน (cm^{-1})	ลักษณะแถบการดูดกลืน	แสดงลักษณะ
3470	s	O-H สั่นแบบยืด
3060	w	C-H สั่นแบบยืดของ -C=C-H ใน aromatic system
2980, 2940, 2830	m	C-H สั่นแบบยืดของ -CH ₂ , CH ₃
1745	s	C = O สั่นแบบยืดของ α , B-unsaturated lactone
1600, 1495, 1445	s	C = C สั่นแบบยืดของแอรโรแมติก (aromatic system)
1400	m	C-H สั่นแบบงอของ $\text{R}_1\text{R}_2\text{C} = \text{CH}_2$
1345, 1285, 1250, 1010	s	C-O สั่นแบบยืดที่ไม่สมมาตรของ C-O-C
1120	s	C-O สั่นแบบยืดของ secondary alcohol

ตารางที่ 22 แสดงการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสาร 5 (ต่อ)

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ลักษณะแถบการดูดกลืน	แสดงลักษณะ
895	s	C-H สั้นแบบโคลง $R_1R_2C = CH_2$
780, 760	w	C-H สั้นแบบโคลงในแอโรแมติก (aromatic system)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5 (รูปที่ 24) ปรากฏสัญญาณที่ต่าง ๆ ซึ่งรวบรวมไว้ในตารางที่ 22 พร้อมกับ assignment ของแต่ละสัญญาณ

ตารางที่ 23 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5

(พีพีเอ็ม)	ลักษณะ	Integration	Assignment
1.66	s	3H	CH ₃ (C-3'')
3.91	s	3H	OCH ₃ (C-7'')
3.30	s	3H	OCH ₃ (C-1'')
4.68	broad, d	2H	=CH ₂ (C-4')
4.94	d (J = 8.8 Hz)	1H	-CH(OCH ₃)-(C-1')

ตารางที่ 23 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5 (ต่อ)

(พีพีเอ็ม)	ลักษณะ	Integration	Assignment
3.10	br., s	1H	-OH
5.03	d (J = 8.8 Hz)	1H	-CH(OH)-(C-2') โปรตอนที่เกาะกับพันธะคู่ เป็น แอรโรมติก
7.60	d (J = 9.5 Hz)	1H	(C-4)
7.42	d (J = 8.6 Hz)	1H	(C-5)
6.88	d (J = 8.6 Hz)	1H	(C-6)
6.26	d (J = 9.5 Hz)	1H	(C-3)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 25) บราควิสัญญาณของคาร์บอนที่
ต่าง ๆ ดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 24



ตารางที่ 24 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5

พีพีเอ็ม	Assignment
161.31	C-2
160.42	C-7
153.84	C-8a
143.68	C-4
129.02	C-5
114.13	C-8
113.41	C-3
113.20	C-4a
112.78	C-6
107.88	C-4'
143.28	C-3'
77.82	C-2'
76.42	C-7''
57.52	C-1'
56.18	C-7'
17.23	C-3''

ข้อมูลทางเทคนิคของเอ็นเอ็มอาร์ได้แก่ DEPT 90 (รูปที่ 26) DEPT 135 (รูปที่ 27) และ COSY ต่างก็สอดคล้องกับสูตรโครงสร้างที่เสนอไว้

จากข้อมูลทั้งหมดระบุว่าสาร 5 คือ 1-methylmurrangatin จึงทำการยืนยันโดยเปรียบเทียบลักษณะผลึก และจุดหลอมเหลวของสาร 5 กับ จุดหลอมเหลวของ 1-methylmurrangatin ที่มีการรายงานไว้ [54] พบว่าลักษณะผลึกและจุดหลอมเหลวของสาร 5 เหมือนกับ 1-methylmurrangatin และได้ทำการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกตรัมของสาร 5 กับ ของ 1-methylmurrangatin เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 5 ดังแสดงใน ตารางที่ 25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 25 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 5 เทียบกับของ

1-methylmurrangatin [55]

ตำแหน่งโปรตอน	δ (พีพีเอ็ม)	
	1-methylmurrangatin (CDCl ₃)	สาร 5 (CDCl ₃)
C-H ที่ C-4	7.56 (d, J = 9.0 Hz, 1H)	7.60 (d, J = 9.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-5	7.34 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	7.42 (d, J = 8.6 Hz, 1H)
C-H ที่ C-6	6.79 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	6.88 (d, J = 8.6 Hz, 1H)
C-H ที่ C-3	6.18 (d, J = 9.0 Hz, 1H)	6.26 (d, J = 9.5 Hz, 1H)
O-CH ₃ ที่ C-7"	3.84 (s, 3H)	3.91 (s, 3H)
O-CH ₃ ที่ C-1"	3.26 (s, 3H)	3.30 (s, 3H)
C-H ที่ C-1'	5.0 (d, J = 8.0 Hz, 1H)	4.94 (d, J = 8.8 Hz, 1H)
O-H ที่ C-2'	2.80 (br., s, 1H)	3.10 (br., s, 1H)
C-H ที่ C-2'	4.84 (d, 1H)	5.03 (d, 1H)
CH ₃ ที่ C-3"	1.62 (s, 3H)	1.66 (s, 3H)
CH ₂ ที่ C-4'	4.60 (br., d, 2H)	4.68 (br., d, 2H)

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 30) แสดงโมเลกุลเชิงไอออน (M^+) ที่ 290 และจากการวิเคราะห์ธาตุ ทำให้ทราบว่าสาร 5 มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{16}H_{18}O_5$ และข้อมูลทางแมสสเปกตรัม บราจกฏการแตกตัวของหมู่ CH_3OH ที่ m/e 258

จากข้อมูลทั้งหมด ทำให้สรุปได้ว่า สาร 5 คือ 1-methylmurrangatin ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังที่แสดงไว้ก่อนหน้า

จากการค้นคว้าข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงต่าง ๆ ไม่พบว่ามีกรรายงานการค้นพบ 1-methylmurrangatin มาก่อนในใบต้นแก้ว มีแต่การเตรียม 1-methylmurrangatin จาก phebalosin ที่แยกจากใบของต้นแก้ว [6] การรายงานนี้จึงเป็นรายงานการค้นพบ 1-methylmurrangatin ในใบของต้นแก้วเป็นครั้งแรก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.6 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 6

สาร 6 เป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน ได้จากสิ่งสกัดในอีเทอร์ ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-212 C, ตัวทำละลายที่ใช้หาสารคือ (คลอโรฟอร์ม 95% : เฮกเซน 5%) อัตราการไหลของตัวทำละลาย 8.0 ซม.³/นาที, ความดัน 0.15 Kpsi) ได้สาร 6 หนัก 0.30 กรัม มีค่า R_f 0.46 (คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เมธานอล ไม่ละลายในเฮกเซน จากการตรวจสอบด้วย เอ็นเอ็มอาร์ พบว่าสารนี้เป็นสารผสม ซึ่งไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นกว่านี้ โดย preparative HPLC ที่ใช้

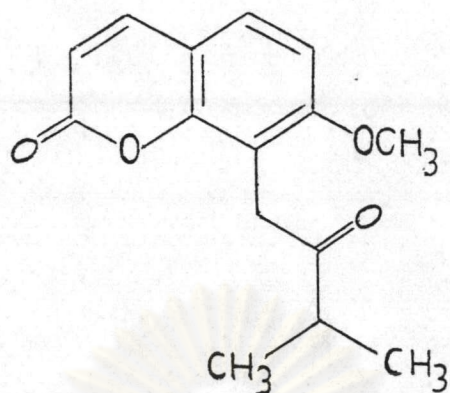
อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 31) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3100 ซม.⁻¹ แสดงลักษณะการสั่นแบบยืดของ C = C-H ที่ 1760 ซม.⁻¹ เป็นการยืดของ C = O ที่ 1610, 1570, 1500 เป็นการยืดของ C = C ในวงแหวนแมติก และที่ 1260, 1050, 1030 เป็นการยืดของ C-O ดังตารางที่ 26

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 26 การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ความถี่ต่าง ๆ ของสาร 6

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ลักษณะแถบการดูดกลืน	แสดงลักษณะ
3100	w	C-H การยืดของแอลกอฮอล์
2980, 2880	s	C-H การยืดของ -CH ₂ -, -CH ₃
1750	s	C = O การยืดของเอสเทอร์ (α , β unsaturated - lactone)
1610, 1580, 1500	s	C = C การยืดของแอลกอฮอล์
1365, 1395	m	C-H การงอของ gem-dimethyl
1260	s	C-O การยืดของเอสเทอร์
820, 810	s	C-H การงอของวงแอลกอฮอล์

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (รูปที่ 32), DEPT 90 และ DEPT 135 (รูปที่ 36) , C-H COSY (รูปที่ 34) เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมทำให้ทราบประเภทของคาร์บอนว่าเป็นคาร์บอนประเภทไหนได้ และจาก C-H Correlation ทำให้สามารถกำหนดได้ว่าและจากค่า Integrals ที่ต่างกันของโปรตอน ทำให้สามารถทราบว่าสาร 6 นี้มีสารประกอบอยู่อย่างน้อย 2 ชนิด และสามารถแยกสัญญาณของโปรตอนของสารที่มีอยู่มากที่สุดได้คือ สาร 6A ซึ่งจากข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม สามารถระบุได้ว่าสาร 6A คือ isomeranzin ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง ดังนี้ :



รายละเอียดการวิเคราะห์ทางเอ็นเอ็มอาร์ที่สนับสนุนสูตรโครงสร้างของสารนี้เป็นดังต่อไปนี้

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 32) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 7.63 พีพีเอ็ม (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, C-4), 7.36 พีพีเอ็ม (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, C-5), 6.84 พีพีเอ็ม (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, C-6), 6.18 พีพีเอ็ม (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, C-3) แสดงถึงโปรตอนที่เกาะกับพันธะคู่ที่เป็นแอโรแมติก และสัญญาณที่ 4.00 พีพีเอ็ม (s, 2H, C-1'), 3.86 พีพีเอ็ม (s, 3H, C-7") เป็นสัญญาณของโปรตอนที่เกาะกับคาร์บอนที่ต่อกับออกซิเจน และที่ 2.81-2.84 พีพีเอ็ม (m, 1H, C-3') เป็นสัญญาณของโปรตอนที่เกาะกับคาร์บอนที่ต่อกับหมู่ CH-C และสัญญาณที่ 1.22 พีพีเอ็ม (s, 3H, C-4'), 1.20 พีพีเอ็ม (s, 3H, C-3") เป็นสัญญาณของโปรตอนที่แสดงถึงหมู่เมทิล 2 หมู่ที่เกาะอยู่บนคาร์บอนตัวเดียวกัน (gem-dimethyl)

คาร์บอน-13 แบบ DEPT 90 และ DEPT 135 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 33) แสดงสัญญาณคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลที่ 161.05 (C-2), 160.76 (C-2") พีพีเอ็ม และสัญญาณที่แสดงถึงคาร์บอนที่เป็นแอโรแมติกที่ 143.65 (C-4), 127.39 (C-5), 112.69 (C-3), 107.09 (C-6), 160.23 (C-7), 152.98 (C-8a), 112.80 (C-4a), 113.13 (C-8) พีพีเอ็ม และสัญญาณที่ 55.92 พีพีเอ็ม แสดงถึงหมู่อีเทอร์ ($-\text{OCH}_3$) สัญญาณที่ 40.51 พีพีเอ็ม แสดงถึงคาร์บอนที่ต่อกับหมู่ $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}$ และสัญญาณที่ 18.22 และ

18.21 พีพีเอ็ม แสดงถึงเมธิลคาร์บอน และข้อมูล C-H correlation สาร 6A น่าจะเป็น isomeranzin ซึ่งมีผู้ค้นพบใน *Skimmia japonica* [56] จึงทำการเปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกตรัมของสาร 6A กับ isomeranzin เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 6A ดังแสดงในตารางที่ 27

ตารางที่ 27 ปรอทอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ 6A เทียบกับ isomeranzin [56]

ตำแหน่งโปรตอน	δ (พีพีเอ็ม)	
	สาร <u>6A</u> (CDCl ₃)	isomeranzin (CDCl ₃)
C-H ที่ C-4	7.63 (d, J = 9.5 Hz, 1H)	7.77 (d, J = 9.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-5	7.36 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	7.43 (d, J = 8.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-6	6.84 (d, J = 8.5 Hz, 1H)	6.88 (d, J = 8.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-3	6.18 (d, J = 9.5 Hz, 1H)	6.24 (d, J = 9.5 Hz, 1H)
CH ₂ ที่ C-1'	4.00 (s, 2H)	4.05 (s, 2H)
C-H ที่ C-3'	2.81-2.84 (septet, 1H)	2.83 (septet, 1H)
O-CH ₃ ที่ C-7''	3.86 (s, 1H)	3.90 (s, 3H)
CH ₃ ที่ C-4'	1.22 (s, 1H)	1.26 (s, 3H)
CH ₃ ที่ C-3'	1.20 (s, 3H)	1.19 (s, 3H)

ข้อมูลเหล่านี้ช่วยยืนยันว่า สาร 6A น่าจะเป็น isomeranzin ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง ดังกล่าว

ส่วนสารที่ผสมอยู่กับ isomeranzin นั้นยังไม่สามารถวิเคราะห์ได้ว่าเป็นสารอะไร แต่จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสารผสมนี้ อาจจะพอสรุปได้ว่าสารที่ปนอยู่เป็น สารประกอบอนุพันธ์ของ coumarin

3.2.7 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 7

สาร 7 เป็นน้ำมันสีน้ำตาลปนส้ม ได้จากสิ่งสกัดในอีเธอร์ ทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้ preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-212 C, ตัวทำละลายที่ใช้พาสารคือ คลอโรฟอร์ม, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 6 ซม.³/นาที, ความดัน 0.14 Kpsi) ได้สาร 7 หนัก 120 มิลลิกรัม มีค่า R_f 0.41 (คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม, อีเธอร์ ไม่ละลายในเฮกเซน

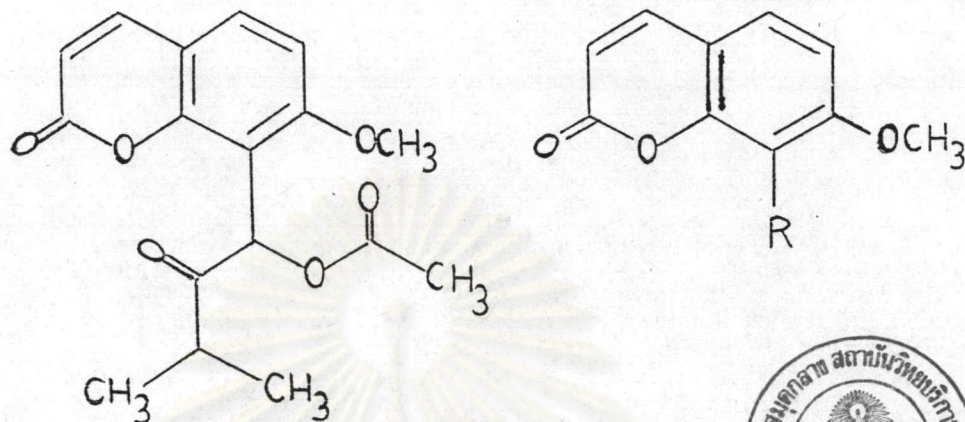
อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 35) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3460 ซม.⁻¹ แสดงลักษณะของแอลกอฮอล์ ที่ 1730 ซม.⁻¹ แสดงถึงหมู่เอสเทอร์ และการดูดกลืนที่ 1610 แสดงลักษณะของหมู่คีโตนที่ 1570, 1500 แสดงลักษณะการยืดของ C = C ในวงแอโรแมติก ดังตารางที่ 28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 28 การดูดกลืนรังสีอินฟราเรดที่ความถี่ต่าง ๆ ของสาร 7

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ลักษณะแถบการดูดกลืน	แสดงลักษณะ
3100	w	C-H การยืดของแอโรแมติก
2980, 2880	s	C-H การยืดของ -CH ₂ -, -CH ₃
1730, 1760	s	C = O การยืดของเอสเทอร์ (, B unsaturated - lactone)
1610	s	C = O การยืดของคีโตน
1570, 1500	s	C = C การยืดของแอโรแมติก
1370, 1395	s	C-H การงอของ gem-dimethyl
1040, 1020	s	C-O การสั่นแบบยืดที่ไม่สมมาตรของ = C-O-C
840	m	C-H สั่นแบบงอของพวกแอโรแมติก

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี ทำให้ทราบว่า สาร 7 นี้เป็นสารผสมกัน 2 ชนิด คือ 7A และ 7B ซึ่งไม่ประสบความสำเร็จในการ แยกออกจากกัน โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ทางโครมาโทกราฟี อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลทาง สเปกโทรสโกปีที่ได้ สามารถวิเคราะห์ได้ว่า สาร 7A คือ hainanmurpanin หรือ 7-methoxy-8-(1'-acetoxy-2'-oxo-3'-methylbutyl)coumarin และสาร 7B คือ 7-methoxycoumarin ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังต่อไปนี้ :



7A

7B

รายละเอียดการวิเคราะห์ที่ทำาให้ทราบสูตรโครงสร้างของสารทั้งสองมีดังต่อไปนี้
การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 7A

โปรตอน-1 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 36) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่

7.64 พีพีเอ็ม (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, C-4), 7.49 พีพีเอ็ม (d, $J = 8.7$, 1H, Hz, C-5), 6.88 พีพีเอ็ม (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, C-6), 6.21 พีพีเอ็ม (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, C-3) แสดงถึงโปรตอนที่เกาะกับพันธะคู่ที่เป็นแอโรแมติก และสัญญาณที่ 6.93 พีพีเอ็ม (s, 1H) แสดงถึงโปรตอนที่เกาะกับคาร์บอนที่ต่อกับวงแอโรแมติก และต่อกับออกซิเจน (Ar-CH-O) สัญญาณที่ 3.87 พีพีเอ็ม (s, 3H) แสดงถึงคาร์บอนของหมู่เอเธอร์ (-OCH₃) สัญญาณที่ 2.78-2.82 พีพีเอ็ม (m, 1H, C-3') แสดงถึงโปรตอนที่เกาะกับคาร์บอนที่ต่อกับหมู่คีโตน (-CH-C-) สัญญาณที่ 2.12 พีพีเอ็ม (s, 3H, C-2'') แสดงถึงเมทิลที่ต่อกับหมู่คีโตน และสัญญาณที่ 1.13 พีพีเอ็ม (d, $J = 6.89$ Hz, 3H, C-4'), 0.99 พีพีเอ็ม (d, $J = 6.66$ Hz, 3H, C-3') เป็นสัญญาณของโปรตอนที่แสดงถึงหมู่เมทิล 2 หมู่ที่เกาะอยู่บนคาร์บอนตัวเดียวกัน (gem-dimethyl)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 37) แสดงสัญญาณ $C = O$ ของหมู่คีโตนที่ 207.64 พีพีเอ็ม (C-2') และที่ 169.62 (C-1''), 160.76 (C-2) พีพีเอ็ม แสดง $C = O$ คาร์บอนของหมู่เอสเทอร์ และสัญญาณที่ 159.71 (C-7), 153.52 (C-8a), 143.38 (C-4), 130.31 (C-5), 113.46 (C-6), 113.04 (C-4a), 111.49 (C-8) และ 107.92 (C-3) พีพีเอ็ม แสดงถึงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็นแอโรแมติก สัญญาณที่ 56.36 พีพีเอ็ม แสดงถึงหมู่อีเธอร์ ($-OCH_3$) สัญญาณที่ 69.23 พีพีเอ็ม แสดงถึง คาร์บอนที่เป็นพันธะคู่ที่ต่อกับออกซิเจน สัญญาณที่ 20.69 พีพีเอ็มแสดงถึง เมทิลคาร์บอนที่ต่อกับหมู่เอสเทอร์ (CH_3-C-OR) สัญญาณที่ 36.06 พีพีเอ็ม แสดงถึงคาร์บอนที่ต่อกับหมู่คีโตน ($CH-C$) และสัญญาณที่ 18.97, 17.86 พีพีเอ็ม แสดงถึงเมทิลคาร์บอน

ข้อมูลปรตอนเอ็นเอ็มอาร์, คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์, DEPT 135 ซึ่ง จะบอกถึงคาร์บอนประเภท $-CH_3$ (primary carbon), $-CH_2$ (secondary carbon), $C-H$ (tertiary carbon), DEPT 90 จะบอกคาร์บอนชนิด CH (tertiary carbon) และ $C-H$ correlation ต่างช่วยยืนยันสนับสนุนสอดคล้องกับสูตรโครงสร้างที่หาไว้

จากการค้นคว้าเอกสารอ้างอิงต่าง ๆ พบที่มีการรายงานเกี่ยวกับ 7-methoxy-8-(1'-acetoxy-2'-oxo-3'-methylbutyl)coumarin [16] และเพื่อเป็นการยืนยัน สูตรโครงสร้างของสาร 7A ว่าเป็นสารนี้จริง จึงได้ทำการเปรียบเทียบปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 7A กับของ 7-methoxy-8-(1'-acetoxy-2'-oxo-3'-methylbutyl)coumarin ที่ได้รายงานไว้ในเอกสารอ้างอิงดังกล่าว ซึ่งผลการเปรียบเทียบ รวบรวมไว้ในตารางที่ 29

ตารางที่ 29 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 7A เมื่อเทียบกับ

Hainanmurpanin [16]

ตำแหน่งโปรตอน	δ (พีพีเอ็ม)	
	สาร 7A (CDCl ₃)	Hainanmurpanin
C-H ที่ C-4	7.68 (d, J = 9.5 Hz, 1H)	7.64 (d, J = 9.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-5	7.54 (d, J = 8.7 Hz, 1H)	7.49 (d, J = 8.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-6	6.92 (d, J = 9.5 Hz, 1H)	6.88 (d, J = 9.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-3	6.22 (d, J = 8.7 Hz, 1H)	6.21 (d, J = 8.5 Hz, 1H)
C-H ที่ C-1'	6.96 (s, 1H)	6.93 (s, 1H)
C-H ที่ C-3'	2.83 (hept., 1H)	2.81 (hept., 1H)
CH ₃ ที่ C-4'	1.20 (s, 3H)	1.13 (s, 3H)
CH ₃ ที่ C-3''	1.06 (s, 3H)	0.99 (s, 3Hs)
CH ₃ ที่ C-2''	2.00-2.50	2.12 (3H, s)
O-CH ₃ ที่ C-7''	3.87 (s, 3H)	3.87 (s, 3H)

จะเห็นได้ว่า ของโปรตอนที่ตำแหน่งต่าง ๆ สอดคล้องกัน ซึ่งเป็นการยืนยัน
ได้ดีว่า สาร 7A คือสารดังกล่าว และจากการค้นคว้าเอกสารได้พบว่า มีผู้รายงาน
การค้นพบสารนี้ในต้นแก้วไว้ก่อนหน้าแล้ว [16]

สาร 7B

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 36) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 7.59
พีพีเอ็ม (d, J = 8.6 Hz, 1H, C-4), 7.41 พีพีเอ็ม (d, J = 8.7 Hz, 1H,
C-5), 6.80 พีพีเอ็ม (d, J = 8.7 Hz, 1H, C-6), 6.18 พีพีเอ็ม (d, J =
8.6 Hz, 1H, C-3) แสดงถึงโปรตอนที่เกาะกับพันธะคู่ที่เป็นแอโรแมติก และสัญญาณที่
5.40 พีพีเอ็ม (s, 1H, C-1') สัญญาณที่ 3.80 พีพีเอ็ม (s, 3H) แสดงถึงหมู่อีเทอร์
(-OCH₃) และสัญญาณที่ 2.24 พีพีเอ็ม (s, 3H) แสดงถึงหมู่ C-CH₃ สัญญาณที่
1.94 พีพีเอ็ม (s, 3H) แสดงถึงหมู่ O-C-CH₃ และสัญญาณที่ 1.78 พีพีเอ็ม (s, 3H),
1.74 พีพีเอ็ม (s, 3H) แสดงถึง allyl methyl (CH₃C = C)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 37) แสดงสัญญาณที่ 160.76
พีพีเอ็ม แสดงถึง O-C^O ที่เป็น α , B-unsaturated (C-2) และสัญญาณที่ 107.74
พีพีเอ็ม (C-6), 112.41 พีพีเอ็ม (C-8), 113.43 พีพีเอ็ม (C-4a), 114.10 พีพีเอ็ม
(C-3), 129.57 พีพีเอ็ม (C-5), 143.00 พีพีเอ็ม (C-4), 153.52 พีพีเอ็ม (C-8a)
159.22 พีพีเอ็ม (C-7), แสดงถึง สัญญาณของคาร์บอนที่เป็นแอโรแมติก สัญญาณที่ 56.31
พีพีเอ็ม แสดงถึงหมู่อีเทอร์ (-OCH₃) สัญญาณที่ 27.23 พีพีเอ็ม และ 21.51 พีพีเอ็ม
แสดงถึงเมทิลที่เกาะกับคาร์บอนที่เกาะกันด้วยพันธะคู่ (C-3'', C-4') สัญญาณที่ 20.17 พีพีเอ็ม
แสดงถึงหมู่ CH₃-C- และสัญญาณที่ 20.04 พีพีเอ็ม แสดงถึงหมู่ CH₃-C^O

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมดคือ โปรตอน (รูปที่ 36), คาร์บอน-13 (รูปที่ 37), DEPT 90 (รูปที่ 38), DEPT 135 (รูปที่ 39), H-H COSY (รูปที่ 40), C-H COSY (รูปที่ 45) เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม สาร 7B แสดงว่าเป็นอนุพันธ์ของ 7-methoxycoumarinที่ยังไม่ทราบสูตรโครงสร้างของหมู่แทนที่ ที่แน่นอนในตำแหน่งที่ 8 ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง ที่ให้ไว้ก่อนหน้า

3.2.8 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสาร 8

สาร 8 เป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน ได้จากสิ่งสกัดในอีเธอร์ นำมาทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-121 C, ตัวทำละลายที่ใช้ พาสารคือ คลอโรฟอร์ม, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 4 ซม.³/นาที, ความดัน 0.08 Kpsi) ได้สารหนัก 70 มิลลิกรัม มีค่า R_f 0.52 (คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเฮกเซน

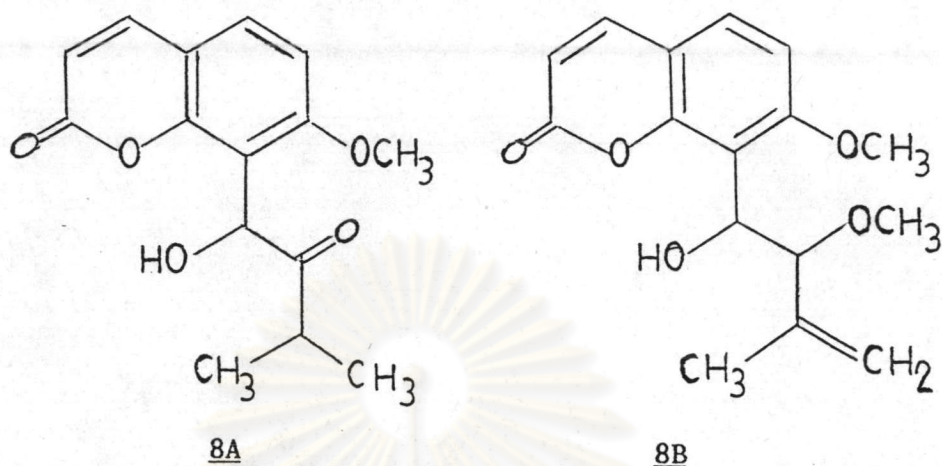
อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 43) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3460 ซม.⁻¹ แสดงลักษณะของแอลกอฮอล์ ที่ 1750 ซม.⁻¹ แสดงการยึด C = O ของหมู่เอสเทอร์ ที่ 1610, 1570, 1500 ซม.⁻¹ แสดงถึงการสั่นแบบยึดของ C = C ที่เป็นแอโรแมติก และ ที่ 1250, 1120, 1100 ซม.⁻¹ แสดงการสั่นแบบยึดของ C-O ดังแสดงในตารางที่ 30

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 30 แสดงการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสาร 8

แถบการดูดกลืน (ซม. ⁻¹)	ลักษณะแถบการดูดกลืน	แสดงลักษณะ
3460	broad, m	การสั่นแบบยืดของ O-H
3080	w	C-H การยืดของแอโรแมติก
2980, 2940, 2850	m	C-H การยืดของ -CH ₂ -, CH ₃
1730	s	C = O การยืดของเอสเทอร์ (α , β unsaturated - lactone)
1610, 1570, 1500	s, m	C = C การยืดของแอโรแมติก
1340, 1495	s	C-H การงอของ gem-dimethyl
1250	s	C-O การยืดของเอสเทอร์
1120, 1100	s	C-O-C การงอของพวกอีเทอร์
840, 810	m	C-H การงอของวงแอโรแมติก

จากข้อมูลทั้งหมดทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี สามารถระบุได้ว่าสาร 8 มีสารบนกันอยู่ 2 ชนิดคือ สาร 8A และ 8B ได้พยายามทำการแยกสารทั้งสองด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี รวมทั้ง preparative HPLC หลายครั้ง แต่ไม่สามารถแยกสารทั้งสองนี้ออกจากกันได้ อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่ายินดีที่ ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่มีอยู่ของสาร 8 นี้เพียงพอที่จะวิเคราะห์ได้ว่าสาร 8A คือ 7-methoxy-8-(1'-hydroxy-2'-oxo-3'-methylbutyl)coumarin สาร 8B คือ 7-methoxy-8-(1'-hydroxy-2'-methoxy-3'-methyl-3'-butenyl)coumarin ซึ่ง มีสูตรดังต่อไปนี้ตามลำดับ



รายละเอียดของการวิเคราะห์สารทั้งสองเป็นดังต่อไปนี้

สาร **8A**

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 44) บราควิสัญญาณของโปรตอนที่ 7.65 พีพีเอ็ม (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, C-4), 7.47 พีพีเอ็ม (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, C-5), 6.87 พีพีเอ็ม (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, C-6), 6.28 พีพีเอ็ม (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, C-3) แสดงถึงโปรตอนที่เกาะกับพันธะคู่ที่เป็นแอโรแมติก และสัญญาณที่ 5.90 พีพีเอ็ม (s, 1H) แสดงถึงโปรตอนที่เกาะกับคาร์บอนที่ต่อกับพันธะคู่และออกซิเจน สัญญาณที่ 3.88 พีพีเอ็ม (s, 3H) แสดงถึงหมู่เอเธอร์ ($-OCH_3$) สัญญาณที่ 2.63–2.59 พีพีเอ็ม (m, 1H) และสัญญาณที่ 1.13 พีพีเอ็ม (d, $J = 7.04$ Hz, 3H) และ 0.98 พีพีเอ็ม (d, $J = 6.67$ Hz, 3H) เป็นสัญญาณของโปรตอนที่แสดงถึงหมู่เมทิล 2 หมู่ที่เกาะอยู่บนคาร์บอนตัวเดียวกัน (gem-dimethyl)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 45) แสดงสัญญาณคาร์บอนิลคาร์บอนของหมู่เอสเทอร์ที่ 160.51 พีพีเอ็ม (C-2) และสัญญาณที่แสดงถึงคาร์บอนที่เป็นแอโรแมติกที่ 159.99 (C-7), 153.42 (C-8a), 143.43 (C-4), 129.51 (C-5), 116.33 (C-8), 113.61 (C-3), 113.29 (C-4a), 107.83 (C-6) พีพีเอ็ม และสัญญาณที่ 68.42 พีพีเอ็ม แสดงถึงคาร์บอนที่ต่อกับวงแอโรแมติกและออกซิเจน (C-1')

สัญญาณที่ 56.15 พีพีเอ็ม แสดงถึงหมู่อีเทอร์ ($-OCH_3$) สัญญาณที่ 35.86 พีพีเอ็ม และ
สัญญาณที่ 19.58, 17.92 พีพีเอ็ม แสดงถึงเมทิลคาร์บอน

จากข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมที่แสดงรายละเอียดไว้
แล้วนั้น สามารถรวบรวมไว้ดังตารางที่ 31 และ 32 สามารถแสดงรายละเอียดของ
สูตรโครงสร้างได้ดังต่อไปนี้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 31 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 8A

(พีพีเอ็ม)	ลักษณะ	Integration	Assignment
0.98	d (J = 6.67 Hz)	3H	CH ₃ (C-4)
1.13	d (J = 7.04 Hz)	3H	CH ₃ (C-3")
2.63-2.59	m	1H	CH (C-3)
3.88	s	3H	OCH ₃ (C-7")
4.26	broad, s	1H	OH (C-1')
5.90	s	1H	CH(OH)(C-1') โปรตอนที่ เกาะกับพันธะคู่ที่เป็นแอลกอฮอล์
6.28	d (J = 9.5 Hz)	1H	(C-3)
6.87	d (J = 8.6 Hz)	1H	(C-6)
7.47	d (J = 8.6 Hz)	1H	(C-5)
7.65	d (J = 9.5 Hz)	1H	(C-4)

ตารางที่ 32 คาร์บอน-13 เอ็มเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 8A

พีพีเอ็ม	Assignment
160.51	C-2
159.99	C-7
153.42	C-8a
143.43	C-4
129.51	C-5
116.33	C-8
113.61	C-3
113.29	C-4a
107.83	C-6
68.42	C-1
56.15	C-7
35.86	C-3
19.58	C-3
17.92	C-4

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมดคือ โบรตอน (รูปที่ 45), คาร์บอน-13 (รูปที่ 46), DEPT 90 และ DEPT 135 (รูปที่ 46) และ C-H COSY เอ็มเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 48) ต่างสอดคล้องกับสูตรโครงสร้างของ 7-Methoxy-8-(1-

hydroxy-2'-oxo-3'-methylbutyl)coumarin ซึ่งเคยมีผู้รายงานการค้นพบในใบ
ของ *Murraya paniculata* (Linn.) Jack [57]



สาร 8B

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 44) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 7.65 พีพีเอ็ม (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, C-4), 7.38 พีพีเอ็ม (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, C-5), 6.87 พีพีเอ็ม (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, C-6), 6.26 พีพีเอ็ม (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, C-3) แสดงถึงโปรตอนที่เกาะกับพันธะคู่ของวงแอรแมติก และสัญญาณที่ 5.35 พีพีเอ็ม (d, $J = 8.8$ Hz, 1H) 3.98 พีพีเอ็ม (d, $J = 8.8$ Hz, 1H) เป็นสัญญาณของโปรตอนที่เกาะที่ตำแหน่ง C-1' และ C-2' สัญญาณที่ 5.16 พีพีเอ็ม (s, 1H), 5.08 พีพีเอ็ม (s, 1H) เป็นสัญญาณของเมธิลีน โปรตอน สัญญาณที่ 3.96 พีพีเอ็ม (s, 3H) และ 3.09 พีพีเอ็ม (s, 3H) เป็นสัญญาณของ CH_3O - โปรตอนที่ตำแหน่ง C-7" และ C-2" สำหรับสัญญาณที่ 1.84 (s, 3H) เป็นสัญญาณของ allyl methyl

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 45) แสดงสัญญาณคาร์บอนิลคาร์บอนของ α , β unsaturated ester ที่ 160.51 พีพีเอ็ม (C-2) และสัญญาณที่แสดงถึงคาร์บอนที่เป็นแอรแมติกที่ 113.61 (C-3), 143.73 (C-4), 113.20 (C-4a), 128.11 (C-5), 107.83 (C-6), 159.99 (C-7), 114.57 (C-8), 153.42 (C-8a), และสัญญาณที่ 56.37, 56.50 พีพีเอ็ม แสดงถึงหมู่ $-\text{OCH}_3$ (C-7"), (C-2") สัญญาณที่ 143.28, 116.33 พีพีเอ็ม แสดงถึง $\text{C} = \text{C}$ (C-3'), (C-4') และสัญญาณที่ 87.96 พีพีเอ็ม (C-1'), 66.44 พีพีเอ็ม (C-2'), 16.79 พีพีเอ็ม (C-3') แสดงถึงหมู่เมธิลที่เกาะกับคาร์บอนที่เกาะกันด้วยพันธะคู่

จากข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมที่แสดงรายละเอียด
ไว้แล้วนั้น สามารถรวบรวมไว้ดังตารางที่ 33 และ 34 สามารถแสดงรายละเอียด
สูตรโครงสร้างได้ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 33 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 8B

(พีพีเอ็ม)	ลักษณะ	Integration	Assignment
1.84	s	3H	CH ₃ (C-3'')
3.09	s	3H	OCH ₃ (C-2'')
3.96	s	3H	OCH ₃ (C-7'')
3.98	d, J = 8.8 Hz	1H	CH (C-2')
5.08	s	1H	=CH ₂ (C-4')
5.16	s	1H	=CH ₂ (C-4')
5.35	d, J = 8.8 Hz	1H	CH (C-1') โปรตอนที่เกาะกับ พันธะคู่ที่เป็นแอโรแมติก
6.26	d, J = 9.5 Hz	1H	(C-3)
6.87	d, J = 8.5 Hz	1H	(C-6)
7.38	d, J = 8.5 Hz	1H	(C-5)
7.65	d, J = 9.5 Hz	1H	(C-4)

ตารางที่ 34 คาร์บอน-13 เอ็มเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 8B

พีพีเอ็ม	Assignment
160.51	C-2
159.99	C-7
153.4	C-8a
143.73	C-4
128.11	C-5
114.57	C-8
113.61	C-3
113.20	C-4a
107.83	C-6
143.28	C-3
116.33	C-4
87.96	C-1*
66.44	C-2'
56.50	C-2"
56.37	C-7"
16.79	C-3'

ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมดคือ โพรตอน (รูปที่ 44), คาร์บอน-13 (รูปที่ 45) DEPT 90 และ DEPT 135 (รูปที่ 46) และ C-H COSY เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 48) ต่างสอดคล้องกับสูตรโครงสร้างของ 7-methoxy-8-(1'-hydroxy-2'-methoxy-3'-methyl-3'-butenyl)coumarin ซึ่งมีโครงสร้างดังที่แสดงไว้ก่อนหน้า

จากการค้นคว้าข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงต่าง ๆ ไม่พบว่ามีรายงานการค้นพบ 7-methoxy-8(1'-hydroxy-2'-methoxy-3'-methyl-3'-butenyl)coumarin มาก่อนในใบต้นแก้วการรายงานนี้จึงเป็นรายงานการค้นพบ 7-methoxy-8(1'-hydroxy-2'-methoxy-3'-methyl-3'-butenyl)coumarin ในใบของต้นแก้วเป็นครั้งแรก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย