

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและวิธีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 Column Chromatography (5)

ใช้ Alumina oxide S standardised for column chromatography ของบริษัท Riedel-De Haen AG., Seelze Hannover เป็น adsorbent ส่วน column ที่ใช้เป็น column แก้วขนาดกว้างสม่ำเสมอ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร และยาว 120 เซนติเมตร ปลายข้างหนึ่งเรียวเล็กต่อกับสายยางที่มีคลิบสำหรับปิดเปิด ก่อนบรรจุ alumina ใส่สำลีเล็กน้อยเพื่อป้องกัน alumina ไหลออกไปกับ solvent ใส solvent ลงไปประมาณ ๒ ใน ๓ ของ column แก้ว แล้วค่อย ๆ ใส adsorbent ลงไปตามปริมาณที่ต้องการ รองหน้า adsorbent ไม่ลดตัวลงไปอีกจึงเปิดคลิบเพื่อให้ solvent ไหลออกจนผิวหน้าของ adsorbent เกือบแห้งจึงปิดคลิบแล้วเทสารที่ต้องการแยกลงไป

2.1.2 Thin Layer Chromatography (6)

ใช้ Silica gel G. (acc. to Stahl for thin layer chromatography) ของบริษัท Riedel-De Haen AG., Seelze Hannover เป็น adsorbent เตรียม chromatoplates โดยใช้ adsorbent 30 กรัมต่อน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากัน (1-2 นาที) เทใส่ desage spreader ที่ปรับให้ adsorbent มีความหนา 0.25 มิลลิเมตร จะได้ chromatoplate ขนาด 20 X 20 เซนติเมตร จำนวน 5 แผ่น ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที แล้วจึง activate โดยอบที่อุณหภูมิ 100-110° นานอีก 30 นาที เก็บไว้ใน desiccator เพื่อเตรียมไว้สำหรับทำ TLC ต่อไป

Solvent system ที่ใช้คือ 50% (ปริมาตร/ปริมาตร) ether-petroleum ether 50% (ปริมาตร/ปริมาตร) chloroform-petroleum ether 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) . methanol chloroform

Detecting agent ใช้สารละลาย 2',7'-dichlorofluorescein (0.2% ใน ethanol) เมื่อ spray แท่งแล้วนำไปส่อง UV-light บริเวณที่มีสารจะเรืองแสงทำให้มองเห็นจุดต่าง ๆ ชัดเจนยิ่งขึ้น

2.1.3 การตรวจสอบสาร

ก. Liebermann-Burchard reaction ละลายสารที่ต้องการทดสอบจำนวนเล็กน้อยใน chloroform 4-5 หยด ค่อย ๆ หยด acetic anhydride ลงไป 1 หยด และเติม sulphuric acid เข้มข้นลงไปอีก 1 หยดแล้วเขย่า ถ้ามีสีเกิดขึ้นก็แสดงว่าสารนั้นเป็นพวก steroids หรือ triterpenoid

ข. การตรวจ functional group การตรวจหา carbonyl group และ unsaturation ของสารได้ทำตามวิธีมาตรฐานซึ่งมีรายละเอียดอยู่ใน Vogel^(7a) หรือ Shriner^(7b)

2.1.4 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

Ultraviolet lamp ใช้ Desaga uvis ที่ 366 nm ของบริษัท Heidelberg Germany

Ultraviolet spectrum ใช้ Varian Techtron UV-vis spectrophotometer Model 635 ของบริษัท Varian Techtron Pty. Ltd. Melbourne, Australia

Infrared spectrum^(8ab) ใช้ Unicam SP 200 G ของบริษัท Unicam Instruments Ltd. Cambridge,

การหาจุดหลอมเหลว ใช้ Fisher-Johns melting point apparatus

การหา specific rotation ใช้ polarimeter ของบริษัท Bellingham Stanby Ltd. London model D₄ serial no.632494

Nuclear magnetic resonance spectrum ใช้ Perkin Elmer, Model R 12 B ส่งไปทำที่กองพิษวิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ธาตุ ส่งไปวิเคราะห์ที่ Australian Microanalytical Service, Australia

2.1.5 การทำสารให้แห้ง

ก่อนทำการวิเคราะห์โดย UV, IR, NMR และ mass spectrum ต้องทำสารให้แห้งด้วย Abderhalden vacuum drying apparatus โดยใช้ anhydrous phosphorus pentoxide เป็นตัวดูดความชื้นเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง

2.1.6 Solvent

ได้แก่ petroleum ether (b.p. 65-70°) chloroform, ether, methanol acetone ฯลฯ ถ้าหากไม่ใช่ชนิด reagent grade ต้องนำมากลั่นก่อนเอาไปใช้ ส่วน solvent ที่ใช้กับ spectrophotometer เป็นชนิด Analar grade ทั้งสิ้น

2.2 สารที่นำมาใช้ในการศึกษา

สารที่นำมาศึกษานี้เป็นสารที่ได้มาจากผู้ที่ศึกษาใบประยงค์มาก่อน ซึ่งได้มาโดยการสกัดใบประยงค์แห้งที่บดละเอียดด้วย petroleum ether ใช้วิธีแช่สารไว้ในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง แช่ทิ้งไว้นานครั้งละประมาณ 7 วัน แช่ซ้ำ 3 ครั้งเพื่อเอาสารที่ละลายในตัวทำละลายชนิดนี้ออก กรอง แล้วนำไปกลั่นจนเหลือปริมาตร 200-300 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถ้วยออกจากขวดกลั่นใส่ใน beaker ตั้งถังไว้บน water bath เพื่อให้แห้ง ผลที่สุดได้สารที่มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวอมดำ นำมาเก็บรวบรวมไว้สำหรับเอาไปแยกเอาสารที่ต้องการต่อไป

2.3 การแยกสาร

นำสารจาก 2.2 จำนวน 35 กรัมละลายใน 50% ether-petroleum ether 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่สารละลายนี้ลงใน column chromatography ซึ่งบรรจุ aluminium oxide S จำนวน 650 กรัม แล้ว elute column ด้วย petroleum ether, 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ether-petroleum ether, 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) ether-petroleum ether, 50% (ปริมาตร/

ปริมาตร) ether-petroleum ether, 75% (ปริมาตร/ปริมาตร) ether-petroleum ether, ether และ chloroform ตามลำดับ โดยเก็บ eluate ครั้งละ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำแต่ละ fraction ไปกลั่นเอาตัวทำละลายออกจนเหลือสารละลายในขวดกลั่นประมาณ 25-30 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถ่ายใส่ขวดรูปกรวยขนาด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก แล้วรวบรวมสารแต่ละ fraction เข้าเป็นพวก ๆ โดยใช้ TLC ผลปรากฏว่าสารที่ต้องการจะศึกษานั้นตกผลึกมาใน fraction ของ 20% ether-petroleum ether ได้ผลเหมือนกับที่ พิพัฒน์ การเที่ยง^(2b5c) ได้พบไว้ m.p. 94-99° น้ำหนัก 0.102 กรัม จึงทำ column chromatography ซ้ำ ๆ หลายครั้งเพื่อเก็บรวบรวมสารนี้ไว้ ศึกษาสูตรโครงสร้างต่อไป

2.4 การทำสารให้บริสุทธิ์

สาร m.p. 94-99° ที่ได้จาก elute column ด้วย 20% ether-petroleum ether ใน fraction ที่ 59-60 ตกผลึกออกมาเป็นรูปเข็มเล็ก ๆ จากการทำให้ TLC พบว่ามีน้ำมันเท่านั้นที่เจือปนอยู่ จึงนำมารวมกันแล้วตกผลึกซ้ำหลาย ๆ ครั้งใน 10% acetone-petroleum ether จนได้ผลึกรูปเข็มไม่มีสี m.p. 104-105° หนัก 0.067 กรัม (0.19% ของ crude extract) และเมื่อทำ TLC ให้จุดเดียวเท่านั้น แสดงว่าสารนั้นบริสุทธิ์

2.5 การตรวจลักษณะของสารที่แยกออกมาได้

2.5.1 การตรวจคุณสมบัติทางกายภาพและ colour reaction ของสาร

สารที่มี m.p. 104-105° ปรากฏว่าจะละลายได้ดีใน chloroform, benzene, acetic acid, และ ethyl acetate แต่ละละลายได้เล็กน้อยใน methanol หรือ ethanol และใน ether เย็น ละลายได้ในน้ำร้อนและตกผลึกกลับเป็นรูปเข็มเล็ก ๆ เมื่อเย็น ให้สีกับ Liebermann-Burchard เป็นสีน้ำตาลแดง เขียว และเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินในที่สุดเหมือนกับสีของ stigmasterol พลอกสี bromine ใน carbon tetrachloride ค่อนข้างช้า หาค่า Rf. ได้ 0.21 (75% ether-petroleum ether) รัศ specific rotation ที่ 30° ได้ -64.19 (0.9238/25 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร ใน chloroform) และเมื่อนำไปตรวจหาธาตุต่าง ๆ โดยวิธี Lassaigne's test ปรากฏว่าไม่พบ N, S และ halogen

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณของธาตุมี C = 68.69, H = 6.82 และ OCH₃ = 30.7% แต่เมื่อคำนวณ
จากสูตร C₂₂H₂₆O₆ ได้ C = 68.39, H = 6.74 และ OCH₃ = 32.12%

UV spectrum ให้ $\lambda_{\max}^{\text{hexane}}$ 230 nm log ϵ 1.77 และ $\lambda_{\max}^{\text{hexane}}$ 230 nm log ϵ

1.386 ตามรูปหน้า 56

IR spectrum ของสารตามรูปหน้า 57 แสดง absorption peaks ตารางที่ 11 หน้า 59

NMR spectrum (CDCl₃) ตามรูปหน้า 57

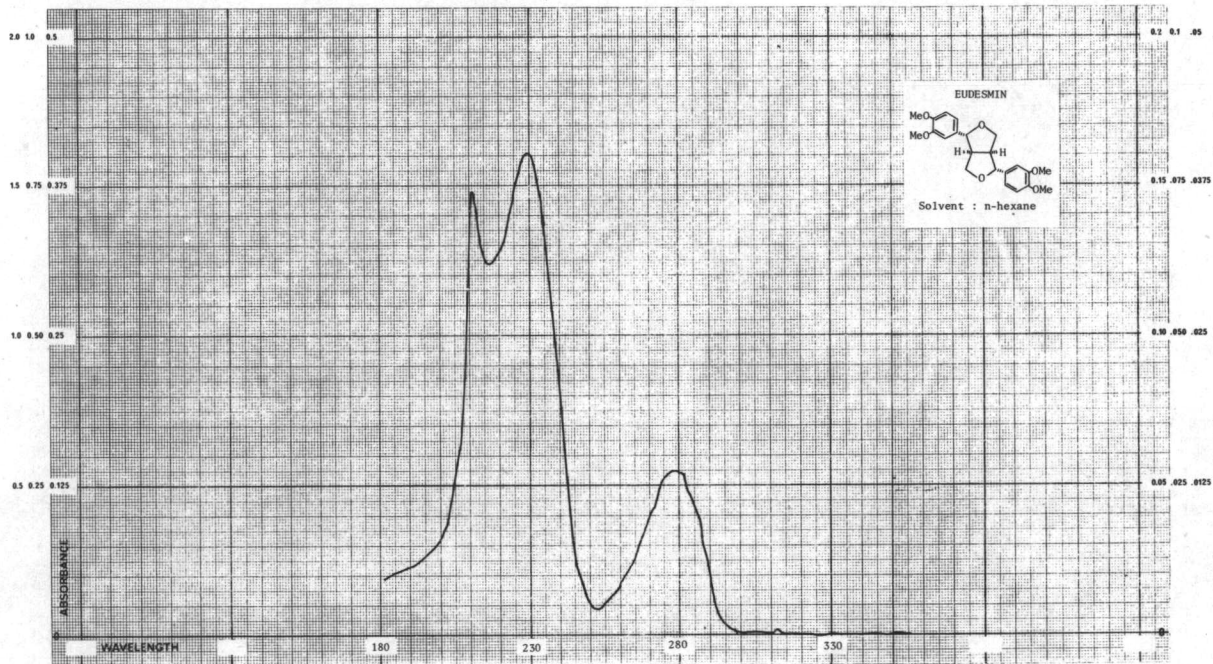
C¹³-NMR spectrum เป็น ppm. (CDCl₃) ตามรูปหน้า 57

2.5.2 การตรวจหา functional group

การหา functional group ตาม standard method^(7a,b) ปรากฏว่าไม่ให้ตะกอนสีเหลือง
กับ 2,4-dinitrophenylhydrazine แต่ฟอกสี bromine ใน carbon tetrachloride ได้อย่าง
ช้า ๆ ไม่เกิดปฏิกิริยาให้เห็นการเปลี่ยนแปลงทันที ไม่ฟอกสีสารละลาย potassium permanganate

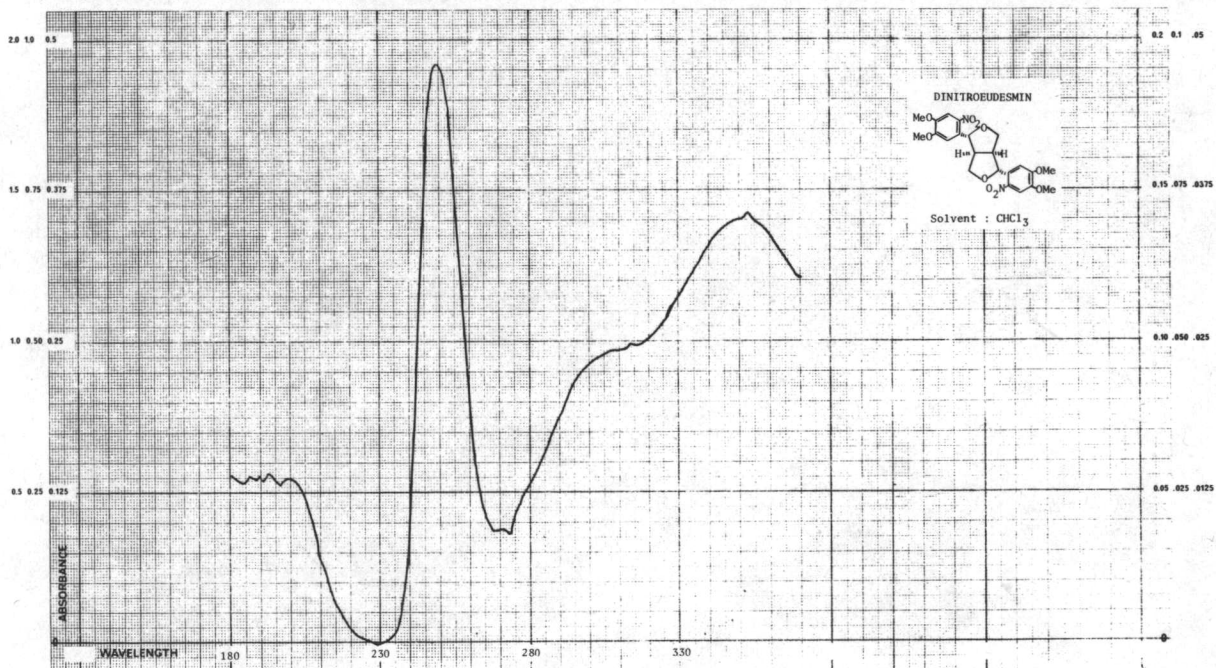
VARIAN TECHTRON

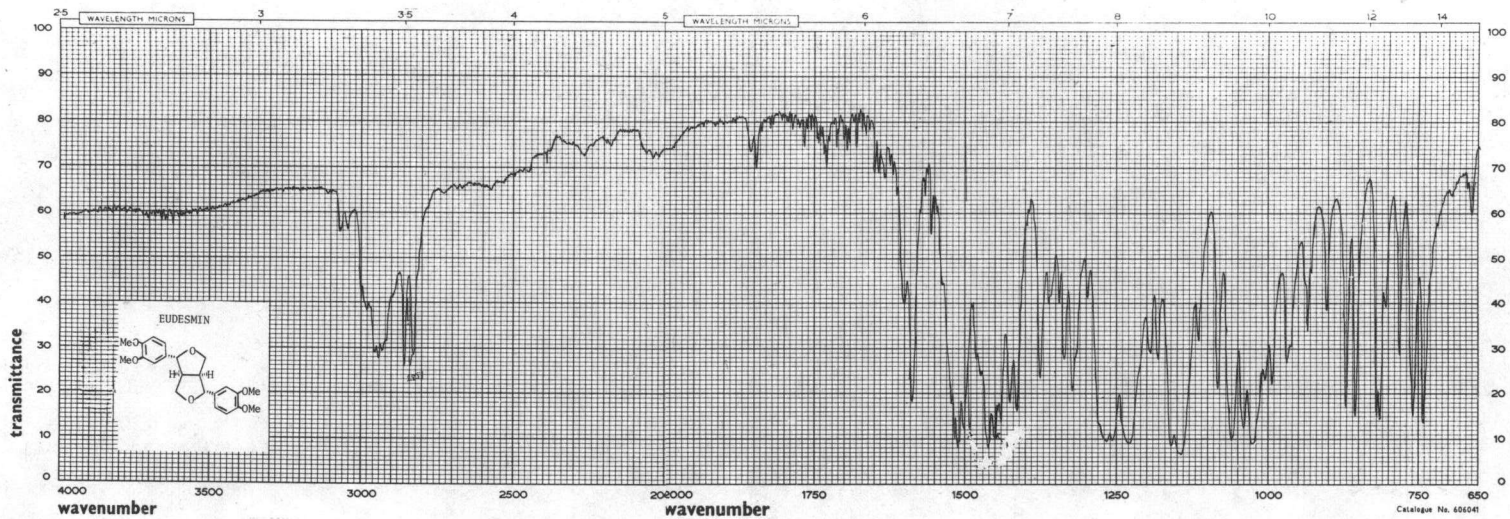
Part No. 71-100014-00



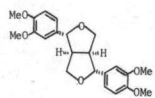
VARIAN TECHTRON

Part No. 71-100014-00

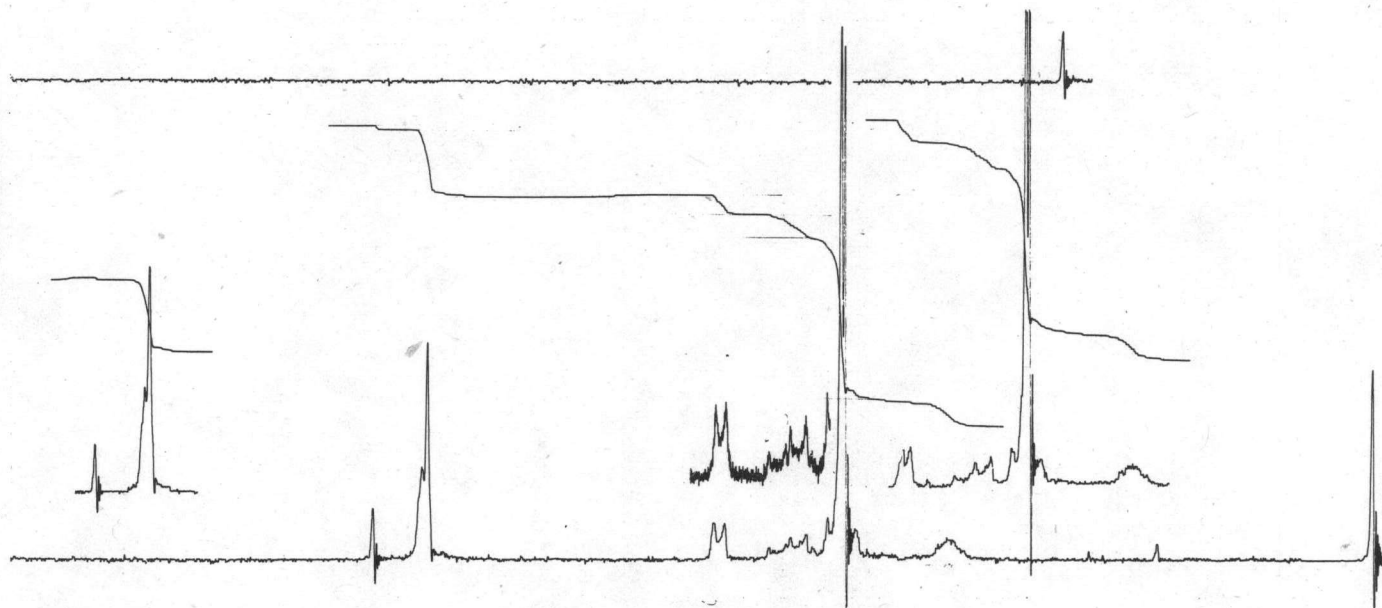


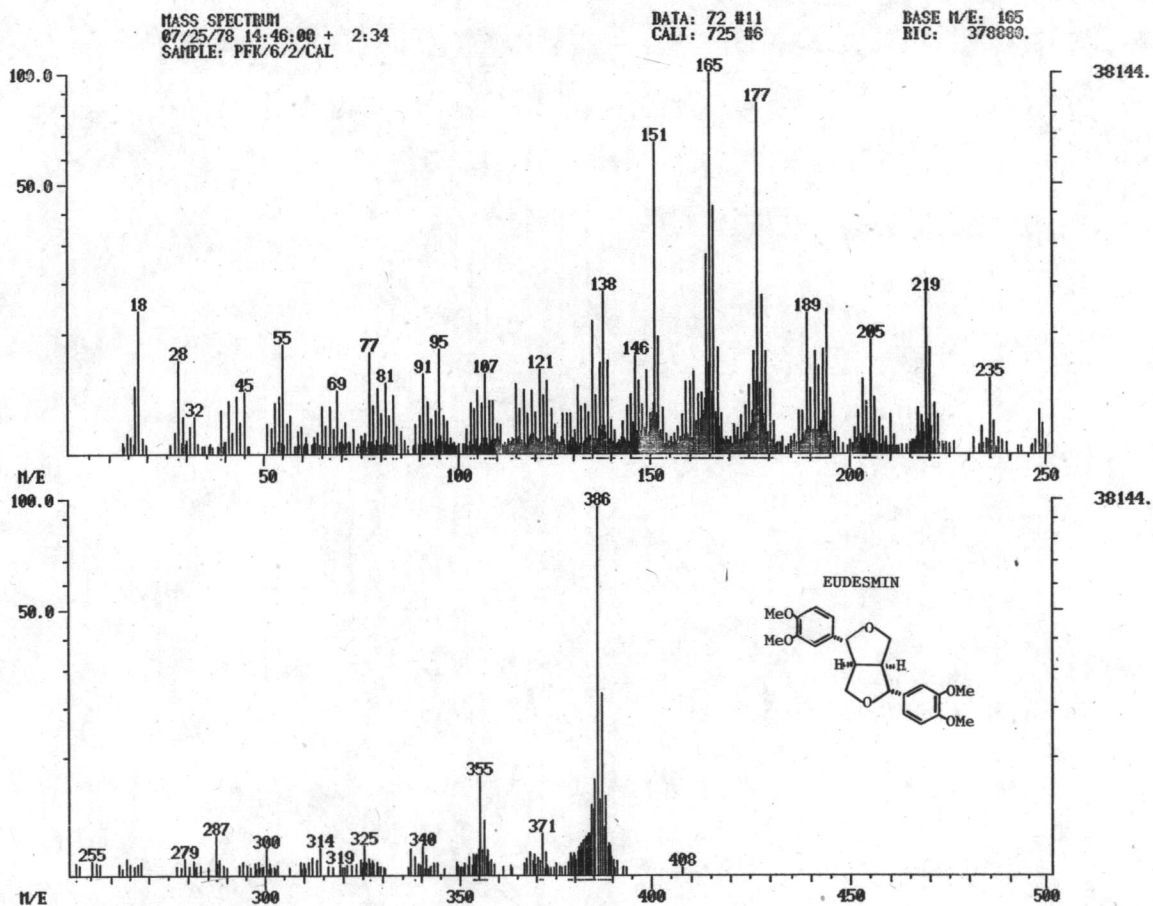
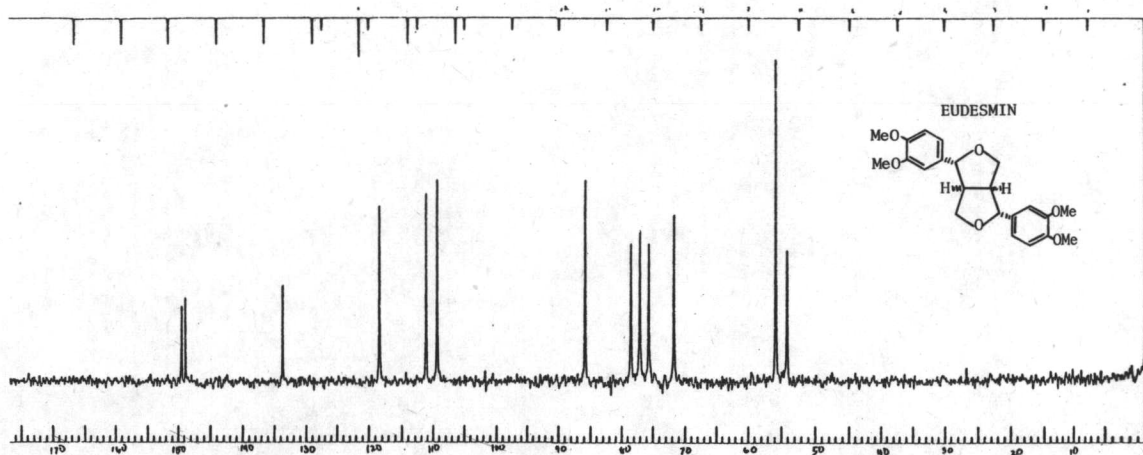


| | |
|----------------------|-------------------|
| SOLVENT | CDCl ₃ |
| CONC. | 20mg/0.55ml |
| TEMPERATURE | 35°c. |
| REF. STD. | TMS 1% |
| SWEEP RANGE | 10ppm |
| SWEEP TIME | 20mins/60 |
| OFFSET | 5ppm |
| H ₁ LEVEL | 8 8 |
| SENSITIVITY | 8 2 |



EUDESMIN
m.p. 104-105°c.





ตารางที่ 11 IR Absorption Peaksของสาร m.p. 104-105°

| Frequency (cm^{-1}) | Band Type | Assignments |
|-----------------------------------|-----------|--------------------------------|
| 3060 | sharp | aromatic C-H stretching |
| 3036 | | |
| 3000 | | |
| 2950 | sharp | methyl C-H stretching |
| 2835 | | |
| 2000-1650 | weak | overtone or combination region |
| 1590 | sharp | C - C ring stretching |
| 1470 | broad | -CH ₂ -O scissoring |
| 1230 | broad | asymmetric C-O-C stretching |
| 1150 | broad | C-O stretching vibration |
| 1030 | sharp | symmetric C-O-C stretching |
| 300 | sharp | out of plane ring C-H bending |
| 740 | | |

2.6 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร

2.6.1 Nitration สาร m.p. 104-105° (9)

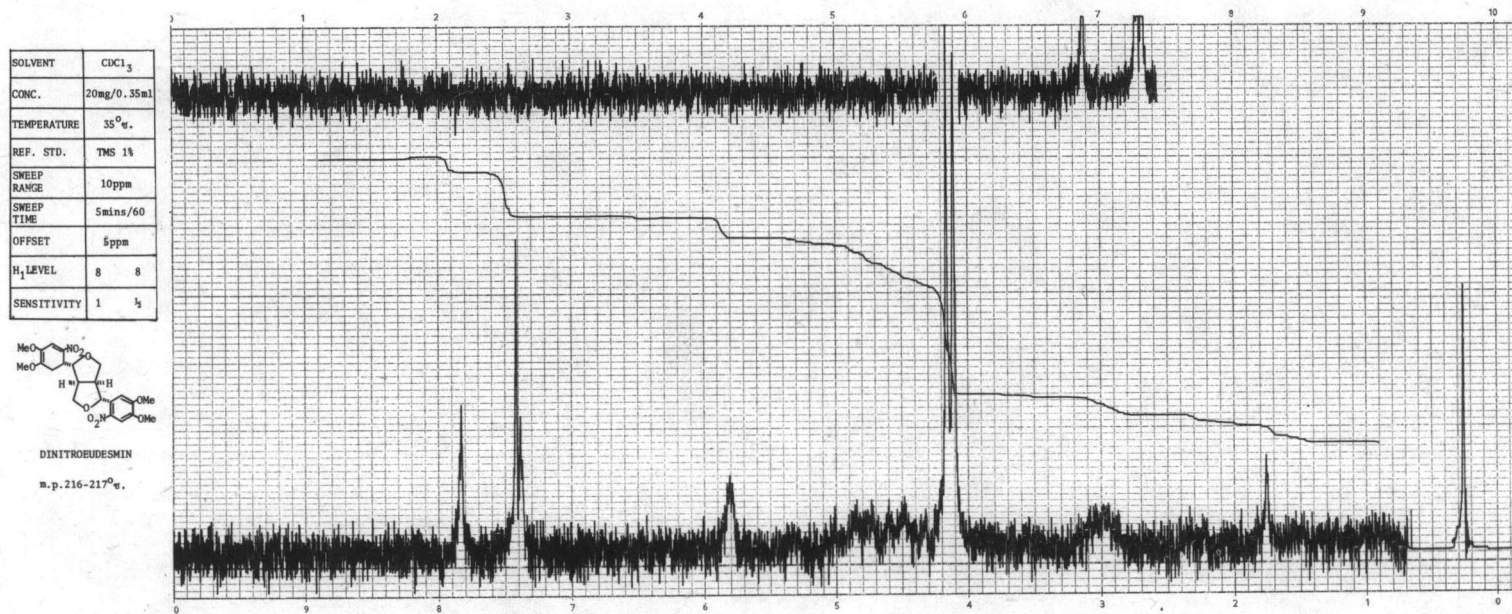
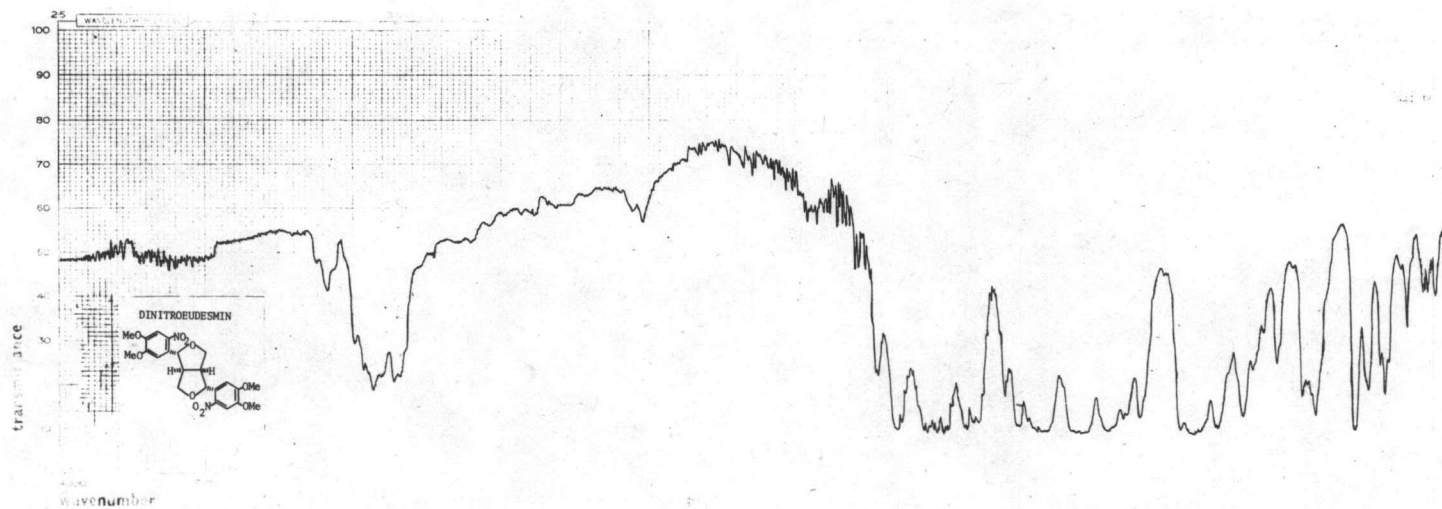
ละลายสาร 200 มิลลิกรัมใน acetic acid 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำผสมระหว่าง nitric acid และ acetic acid 2 และ 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อ nitric acid ทำปฏิกิริยาแล้วจะได้ผลึก nitro derivative ตกผลึกลงมาในสารละลาย และหลังจากนั้น 5 นาที เติมน้ำลงไปกรองตะกอนที่เกิดขึ้น แล้วล้างด้วยน้ำ นำมาตกผลึกครั้งแรกด้วย acetic acid และตกผลึกอีกครั้งด้วย ethyl acetate ได้ผลึกสีเหลืองอ่อนรูปเข็ม m.p. 216-217° น้ำหนัก 140 มิลลิกรัม (70% โดยน้ำหนัก) จากการวิเคราะห์พบ C = 56.10, H = 5.08 และ N = 5.52% คำนวณจากสูตร $C_{22}H_{24}N_2O_{10}$ ได้ C = 55.46, H = 5.04 และ N = 5.88%

UV spectrum ให้ λ_{max} chloroform 249 nm $\log \epsilon$ 5.36 ตามรูปหน้า 56

IR spectrum ของสาร \checkmark KBr λ_{max} ตามรูปหน้า 61 แสดง absorption peaks ตารางที่ 12 หน้า 62

NMR spectrum ($CDCl_3$) ตามรูปหน้า 61

สารที่สังเคราะห์ได้นี้จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อถูกแสง ละลายใน sulphuric acid ให้สีแดงสด ละลายได้ดีใน chloroform และเกือบจะไม่ละลายใน alcohol



ตารางที่ 12 แสดง IR Absorption Peaks ของ Dinitro Derivative m.p. 216-217°

| Frequency (cm^{-1}) | Band Type | Assignments |
|-----------------------------------|-----------|---|
| 3080 | sharp | aromatic C-H stretching |
| 3030 | | |
| 3000 | | |
| 2950 | sharp | methyl C-H stretching |
| 2835 | | |
| 2000-1650 | weak | overtone or combination region |
| 1590 | broad | C = C ring stretching |
| 1480 | | |
| 1540 | broad | asymmetric (ArNO_2) N = O stretching |
| 1345 | broad | symmetric (ArNO_2) N = O stretching |
| 1230 | broad | asymmetric C-O-C stretching |
| 1070 | broad | -CH ₂ -O stretching |
| 800 | sharp | out of plane ring C-H bending |
| 740 | | |

2.6.2 bromination สาร m.p. 104-105^o(9)

ผสม bromine 2 หยดลงใน acetic acid 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วค่อย ๆ หยดลงใน สาร 100 มิลลิกรัม ซึ่งจะละลายอยู่ใน acetic acid 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าในน้ำเย็นทิ้งไว้ สักครู่ เติม sodium sulphite ลงไปเพื่อกำจัด bromine ที่เหลือ จะเกิดตะกอนสีขาวขึ้น กรองตะกอน ที่ได้ล้างน้ำหลาย ๆ ครั้ง นำไปตกผลึกใน acetic acid ได้ผลึกรูปเข็มไม่มีสี m.p. 172-173^o น้ำหนัก 60.1 มิลลิกรัม (60% โดยน้ำหนัก) จากการวิเคราะห์พบ C = 48.68, H = 4.52 และ Br = 29.4% คำนวณจากสูตร $C_{22}H_{24}O_6Br_2$ ได้ C = 48.54, H = 4.39 และ Br = 29.25%

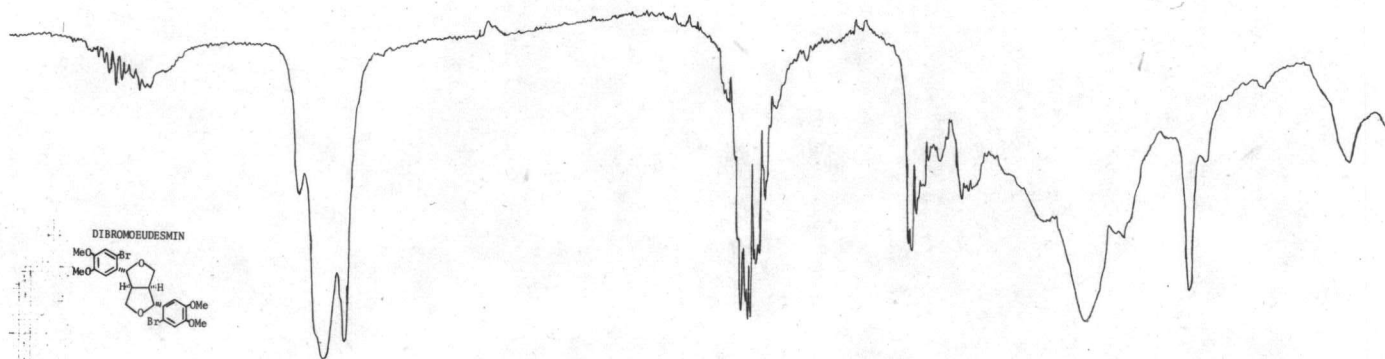
UV spectrum λ_{max} chloroform 235 nm $\log \epsilon$ 4.95 และ λ_{max} chloroform 287 nm $\log \epsilon$

5.73 ตามรูปหน้า 65

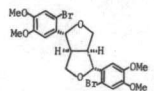
IR spectrum ของสาร $\sqrt{\text{KBr}}$ λ_{max} ตามรูปหน้า 64 แสดง absorption peaks ตารางที่ 13 หน้า 66

NMR spectrum ($CDCl_3$) ตามรูปหน้า 64

ผลึกของ bromo derivative นี้ จะละลายได้ดีใน organic solvent ทุกชนิด ละลายใน sulphuric acid ให้สีแดงและจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนแดงอย่างรวดเร็ว ต่อมาจะเปลี่ยนสีอย่างช้า ๆ เป็นสีเขียวมึนและเขียวอมฟ้า ในที่สุดสารละลายนี้จะไม่มีสีและมีตะกอนดำ ๆ เกิดขึ้น



| | |
|----------------------|--------------------|
| SOLVENT | CDCl ₃ |
| CONC. | 20mg/0.35ml |
| TEMPERATURE | 35 ^o g. |
| REF. STD. | TMS 1% |
| SWEEP RANGE | 10ppm |
| SWEEP TIME | 5mins/60 |
| OFFSET | - |
| H ₁ LEVEL | 8 8 |
| SENSITIVITY | 2 2 |

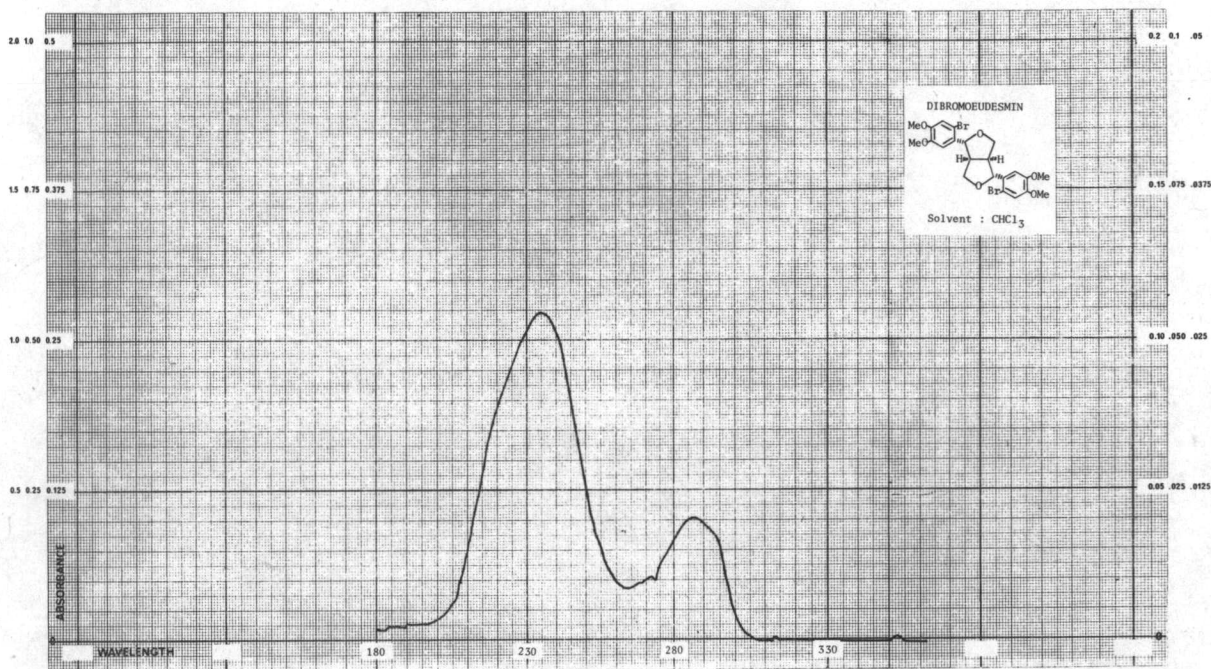


DIBROMOEDESMIN
m.p. 172-173^og.



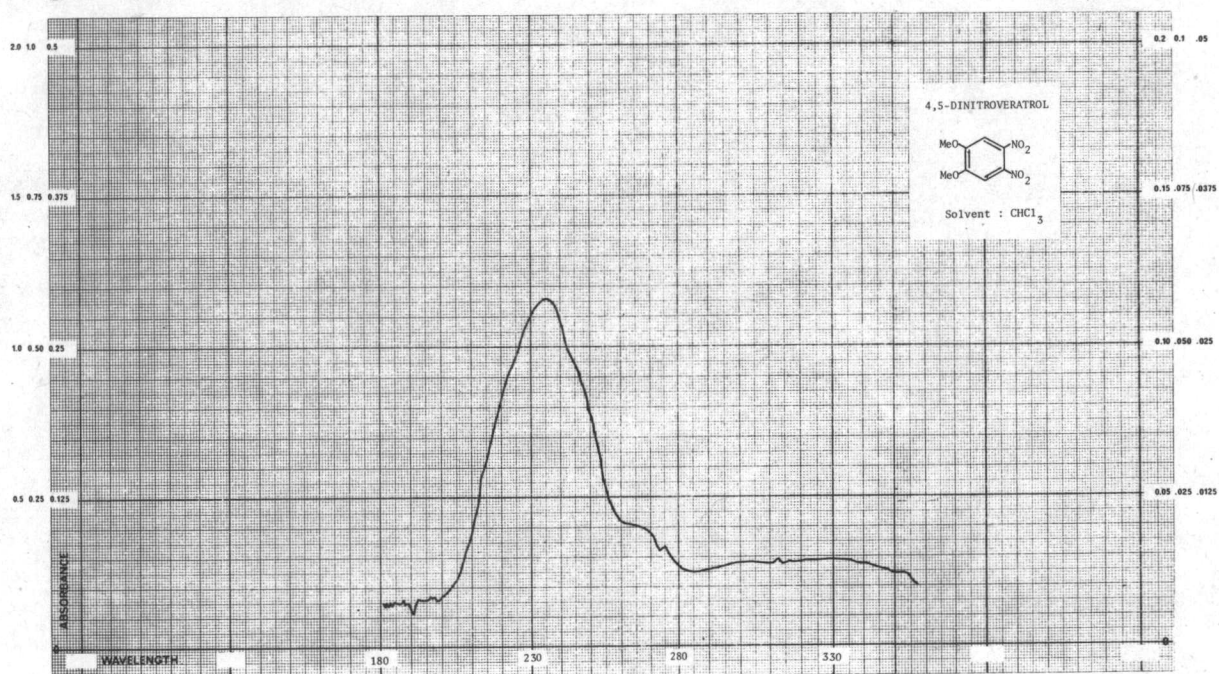
VARIAN TECHTRON

Part No. 71-100014-00



VARIAN TECHTRON

Part No. 71-100014-00



ตารางที่ 13 แสดง IR Absorption Peaks ของ Dibromo Derivative m.p. 172-173°

| Frequency (cm^{-1}) | Band Type | Assignments |
|-----------------------------------|-----------|--|
| 3000 | sharp | aromatic C-H stretching |
| 2950 } 2340 } | sharp | methyl C-H stretching |
| 2000-1650 | weak | overtone or combination region |
| 1750 | sharp | inductive and field effects due to bromo derivative |
| 1470 | sharp | CH_2 -O scissoring |
| 1170 | broad | C-O stretching vibration |
| 1030 | sharp | symmetric C-O-C stretching |
| 800 } 740 } | sharp | out of plane ring C-H bending |

2.6.3 Oxidation สาร m.p. 104-105°⁽⁹⁾

ใช้สาร 50 มิลลิกรัมต้มกับ nitric acid 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในขวดก้นกลม 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ประมาณ 10 นาที เมื่อสารถูก oxidised จะเห็นควันสีน้ำตาลแกมแดงของ nitrogen dioxide ออกมา จากนั้นเติมน้ำลงไปจะมีตะกอนเกิดขึ้น กรองตะกอนออกล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง นำไปตกผลึกใน methanol และตกผลึกซ้ำอีกครั้งใน ethanol ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง m.p. 129-130° น้ำหนัก 30 มิลลิกรัม (60% โดยน้ำหนัก)

UV spectrum λ chloroform
max 235 nm log E 4.45 ตามรูปหน้า 65

IR spectrum ให้ \checkmark KBr
max ตามรูปหน้า 69 แสดง absorption peaks
ตามตารางที่ 14 หน้า 70

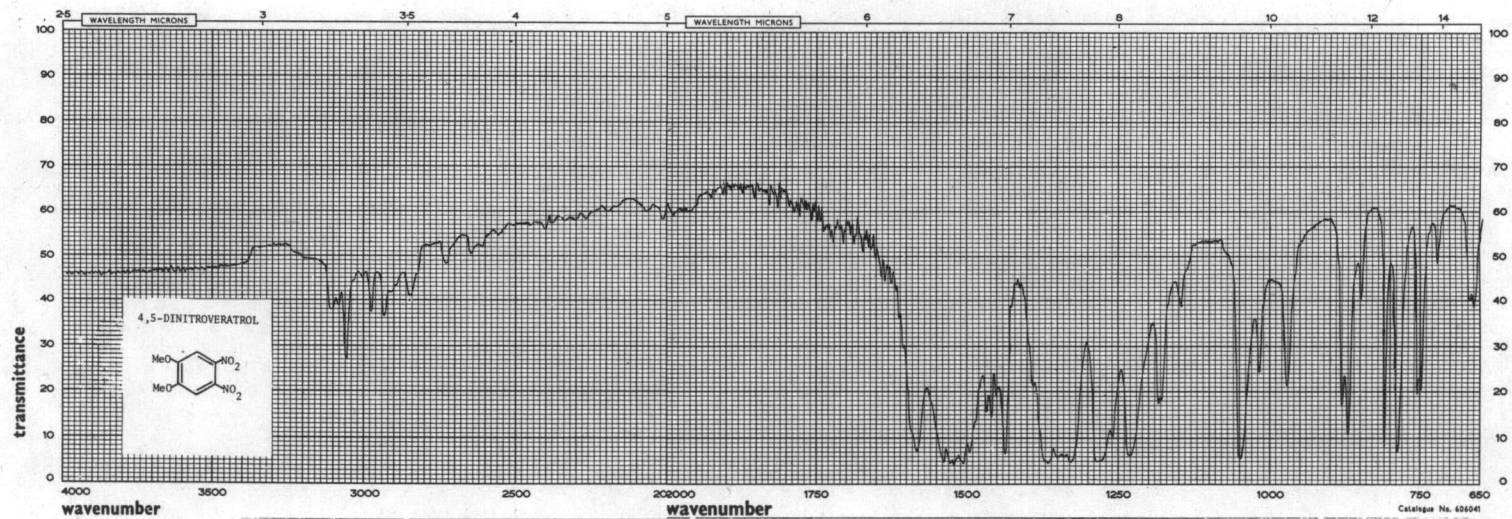
NMR spectrum (CDCl₃) ตามรูปหน้า 69

2.6.4 การสังเคราะห์ 4,5 -Dinitroveratrol

ใช้ Catechol 7 กรัมละลายใน acetone 100 ลูกบาศก์เซนติเมตรในขวดก้นกลม 3 คอ ขนาด 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติม anhydrous potassium carbonate 70 กรัมและ methyl iodide 30 กรัม reflux บน electrothermal 5 ชั่วโมง กรองเอาชั้น acetone ออก ล้างสารที่ติดอยู่บน potassium carbonate ด้วย acetone หลาย ๆ ครั้ง รวมชั้น acetone ทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วกลั่นไล่ acetone ออก นำส่วนที่เหลือมาเติมน้ำลงไป 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสกัดด้วย ether หลาย ๆ ครั้ง รวมชั้นของ ether เข้าด้วยกันนำไปทำให้แห้งด้วย anhydrous calcium chloride ค้างคืน และกลั่นสารเก็บที่ b.p. 204° น้ำหนัก 5.799 กรัม

นำสารที่กลั่นได้นี้ 2.3 กรัม ค่อยหยดลงใน nitric acid 9 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งอยู่ในขวดก้นกลม 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร คนตลอดเวลาด้วย mechanical stirrer ที่อุณหภูมิ 0-3° ประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นค่อย ๆ หยด sulphuric acid 10 ลูกบาศก์เซนติเมตรลงไปให้ละลาย พร้อมทั้งคนตลอดเวลา หลังจาก sulphuric acid หมดแล้วคนต่อไปอีกประมาณ 15 นาที นำไปตั้งบน

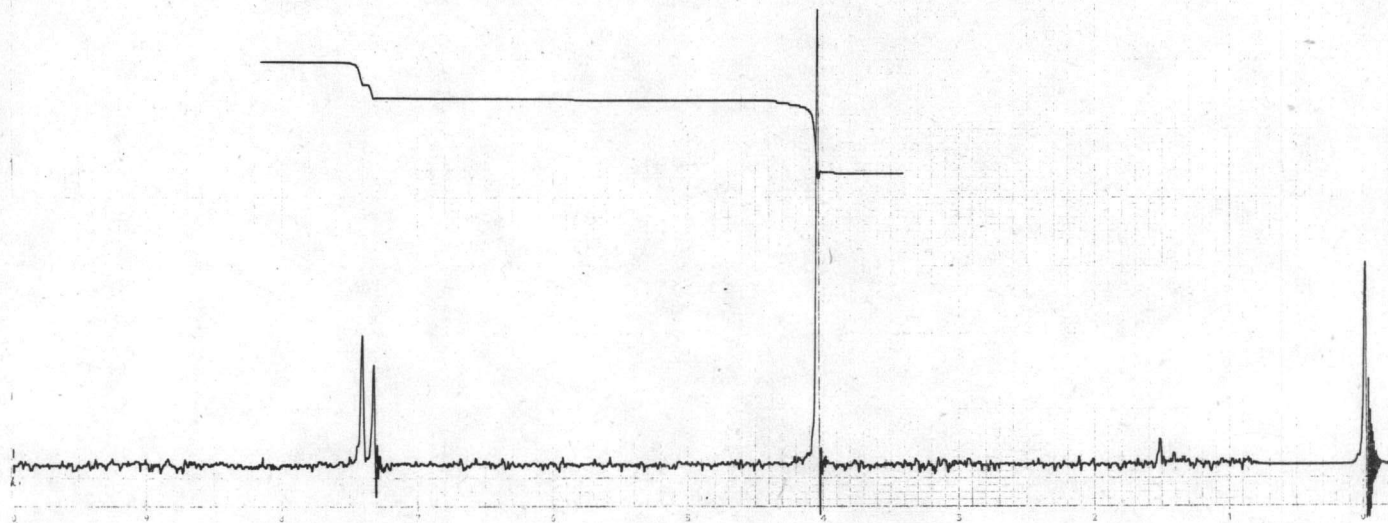
water bath ที่อุณหภูมิ 55° เป็นเวลา 10 นาที แล้วเพิ่มเป็น 60° อีก 10 นาที เทสารละลายนี้ลงในน้ำแข็ง 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร คนสักครู่จะเห็นตะกอนสีเหลืองเกิดขึ้น กรองตะกอนที่ได้ล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งไม่มีการตกเหลืออยู่ จากนั้นนำไปตกผลึกใน methanol ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน m.p. $130-131^{\circ}$ น้ำหนัก 3.97 กรัม (85.82%) เมื่อทำ mixed m.p. กับสารที่เกิดขึ้นจากการ oxidation ของสาร m.p. $104-105^{\circ}$ ปรากฏว่า m.p. $129-130^{\circ}$ ไม่เปลี่ยนแปลง และจาก IR spectrum แสดง absorption peaks ซึ่ง identical กับสารที่ได้จากการ oxidation สาร m.p. $104-105^{\circ}$ ทุกประการ



| | |
|----------------------|-------------------|
| SOLVENT | CDCl ₃ |
| CONC. | 20mg/0.35ml |
| TEMPERATURE | 35°c. |
| REF. STD. | TMS 1% |
| SWEEP RANGE | 10ppm |
| SWEEP TIME | 5mins/60 |
| OFFSET | - |
| H ₁ LEVEL | 8 8 |
| SENSITIVITY | 4 2 |



4,5-DINITROVERATROL
m.p. 129-130°c.



ตารางที่ 14 แสดง IR Absorption Peaks ของ Oxidation Product m.p. 129-130°C

| Frequency (cm^{-1}) | Band Type | Assignments |
|-----------------------------------|-----------|---|
| 3050 | sharp | aromatic C-H stretching |
| 2985 | sharp | methyl C-H stretching |
| 1400-1650 | weak | overtone or combination region |
| 1590) | broad | C - C ring stretching |
| 1480) | | |
| 1540 | broad | asymmetric (ArNO_2) N=O stretching |
| 1345 | broad | symmetric (ArNO_2) N=O stretching |
| 1230 | sharp | asymmetric C-O-C stretching |
| 1030 | sharp | symmetric C-O-C stretching |
| 800) | sharp | out of plane ring C-H bending |
| 750) | | |