

สารที่ใช่และวิธีทำการวิจัย



สารที่ใช่ (Materials)

ก) สำหรับการสกัดและการเตรียมอนุพันธ์บางตัวของสารที่ต้องการ
สารละลายและรีเอเจนต์ที่ใช่

- Chloroform
- Phenol "Detached crystal"
- Purified distilled water
- 2N. Na OH
- Ethanol 99%
- Acetic anhydride
- Conc. sulphuric acid
- Anhydrous ethanol
- Ether
- Pyridine (anhydrous)

เครื่องมือที่ใช่

- Soxhlet extractor
- Thermostatic heater
- Mortar and pestle
- Magnetic stirrer
- Rotating vacuum evaporator (Büchi)

- Beaker 250 ml; 500 ml.
- Erlenmeyer flask 150 ml; 50 ml.
- Buchner funnel
- Suction flask
- Water bath
- round bottom flask 50 ml.
- Condenser
- Small bottle with screw cap

ข) สำหรับ Thin layer Chromatography

solvent systems ที่ใช้

1. n-Butanol, n-propanol, 2 N. NH_4OH 10+60+30
2. Petroleum ether, ethyl acetate 67+33
3. Chloroform, acetic 50+50
4. Toluene, chloroform, acetone 40+25+35
5. Chloroform, ethyl acetate 50+50
6. Chloroform, methanol 97+3
7. Ethyl acetate
8. Methanol
9. Chloroform, Formic acid 50+50

006442

รินเอาที่บนคลอโรฟอร์มมาใช้

เครื่องมือที่ใช้

กระดาษ (Plate) ขนาด 5 x 15 ซม.

ที่เท Plate

Hot air oven

Adsorbents ใช้ Silica gel G (E. Merck)

โดยใช้ตัวกรอง Silica gel G 35 กรัม ต่อน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 75

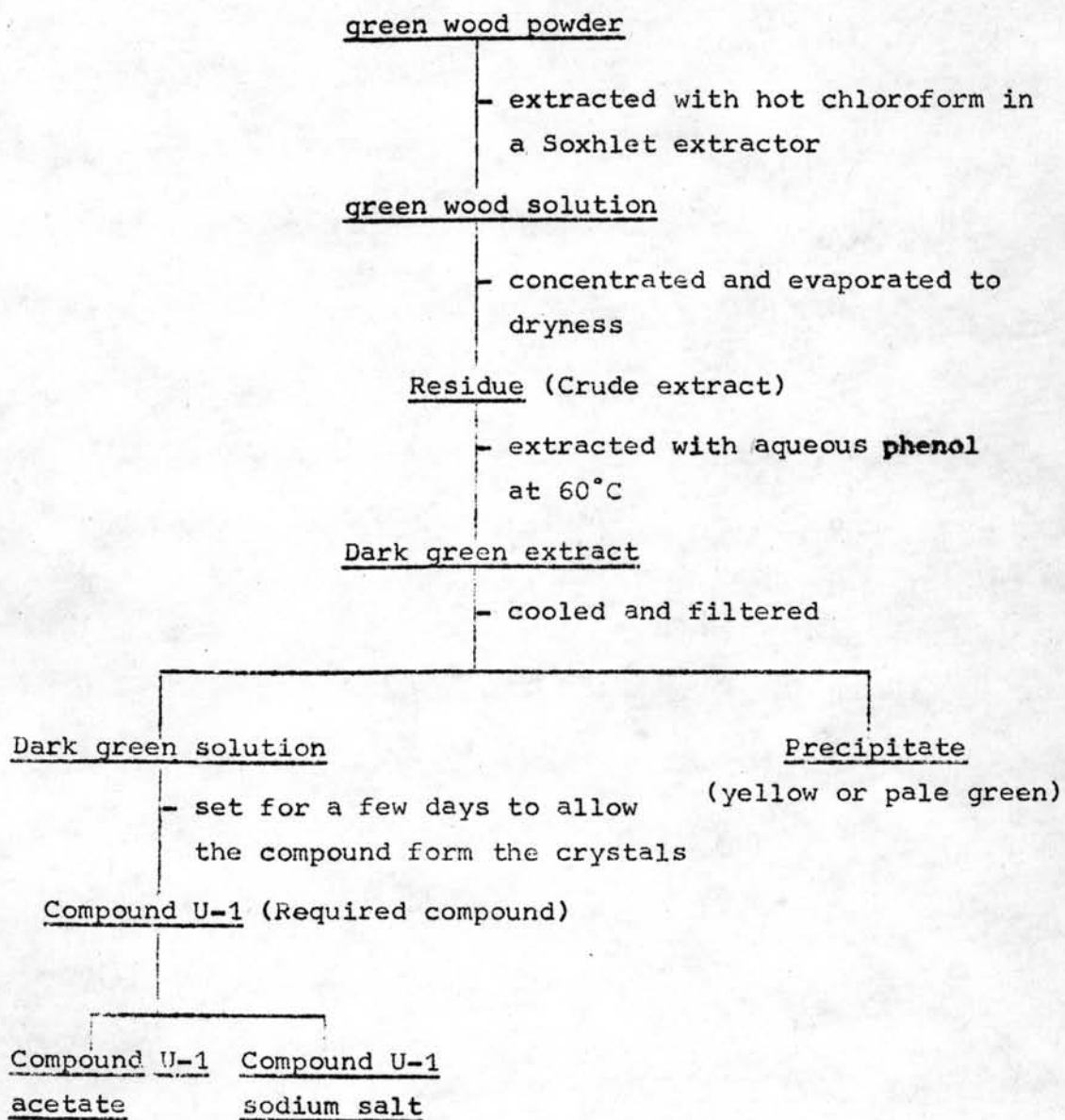
มิลลิลิตร

สำหรับ layer thickness เมื่อเท plate แล้ว - 0.25 มิลลิเมตร
เวลาใช้ของอบที่ 105° ซ. เป็นเวลา 1 ซ.ม.

ค) สำหรับหาคัดสมบัติทางกายภาพของสาร
เครื่องมือที่ใช้

1. Melting point apparatus ใช้เครื่อง Büchi melting point apparatus
2. Carbon-Hydrogen analyzer ใช้เครื่อง Thomas Micro Carbon-Hydrogen Analyzer Model 35
3. Mass spectrometer ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์สุรินทร์ ภูมิบางกูร ช่วยติดต่อทำให้ที่ Department of Chemistry, Purdue University
4. Ultraviolet and visible spectrophotometer ใช้เครื่อง Beckman Model 124 spectrophotometer ได้รับความอนุเคราะห์ให้ใช้โดยบริษัท Abbot Pharma
5. Infrared spectrophotometer ใช้เครื่องมือ Perkin-Elmer IR 283 infrared spectrophotometer

แผนผังแสดงขั้นตอนโดยย่อของการทดลองเพื่อแยกสกัดให้ได้สารที่ต้องการ



วิธีทำการทดลอง (Method)

การสกัดรงควัตถุสีเขียวออกจากไม้มองเขาเขียว

1. นำท่อนไม้ที่ต้องการมาล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ
2. สับท่อนไม้ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยเลือกเอาเฉพาะส่วนที่มีสีเขียวมากที่สุด แล้วนำไปบดให้เป็นผงละเอียด
3. ใส่มงไม้ลงไปในถุงผ้าประมาณครึ่งละ 2 กิโลกรัม เสร็จแล้วปิดทับด้วยกระดาษกรองบนผงไม้นั้น แล้วเอาท่อนแก้ว (glass block) วางทับด้านบนไว้อีกที เพื่อป้องกันการลยตัวของผงไม้ขณะทำการสกัด
4. นำถุงผ้าที่บรรจุผงไม้แล้วนี้ไปใส่ไว้ในเครื่องมือสำหรับใช้สกัดต่อเนื่อง (Soxhlet extractor) โดยใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย (solvent)
5. ในการสกัดครั้งแรก ๆ สารละลาย (solution) ที่ได้จะมีสีเขียวเข้ม ต้องทำการสกัดต่อเนื่องกันจนกระทั่งสารสีเขียวออกมาจนหมดจากผงไม้ โดยสังเกตได้จากคลอโรฟอร์มที่ไหลออกมาจาก siphon tube ของเครื่องสกัดนั้นปราศจากสี
6. ใช้วิธีเดียวกันนี้ทำการสกัดผงไม้จำนวนใหม่ซ้ำอีก (ครั้งละ 2 ก.ก. อีก 4 ครั้ง) แล้วนำสารละลายสีเขียวที่ได้จากการสกัดทั้งหมดมารวมกัน
7. นำสารละลายทั้งหมดที่ได้มาทำการระเหยแห้ง โดยใช้เครื่องมือสำหรับระเหยภายใต้สูญญากาศ (Rotating vacuum evaporator) จะได้ของแข็งเป็น Crude extract (60 กรัม)

8. นำ Crude extract ที่ได้มีมาบดให้เป็นผงละเอียด แล้วนำไปเก็บไว้ในที่ปราศจากความชื้นเพื่อใช้สำหรับทำการสกัดสารที่ต้องการในขั้นต่อไป

การเตรียมสารละลายของฟีนอล (aqueous phenol) สำหรับใช้ในการสกัดขั้นต่อไป

ละลาย phenol ชนิด detached crystal (80 กรัม) ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (20 มิลลิลิตร) ใน beaker คนให้ละลายโดยใช้ความร้อนจาก water bath ช่วยและ

ต้องควบคุมอุณหภูมิของสารละลายที่ได้นี้ให้อยู่ที่อุณหภูมิ 60 - 65° ซ. อยู่ตลอดเวลาเพื่อสำหรับนำไปใช้เป็นตัวสกัดในขั้นต่อไป

การสกัดสารที่ต้องการ (Compound U-1) ออกจาก Crude extract และทำให้ตกผลึกในสารละลายของฟีนอล

นำผงสกัด (Crude extract) ที่ได้ (10 กรัม) มาสกัดด้วยสารละลายของฟีนอลที่เตรียมไว้แล้ว (120 มิลลิลิตร) การสกัดอาจทำใน beaker ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใส่ผงสกัดลงไปก่อนแล้วเหสารละลายของฟีนอลลงไปพร้อมกับคนให้ทั่วกัน นำไปอุ่นบน water bath ให้อุณหภูมิ 60° - 65° ซ. คนตลอดเวลาประมาณ 15 นาที แล้วนำสารละลายที่ได้นี้มากรองด้วย Buchner funnel โดยใช้ suction flask ข้อสำคัญก็คือระหว่างการกรองต้องคอยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 60° - 65° ซ. เสมอ เมื่อกรองเสร็จครั้งหนึ่งแล้วจะมีตะกอนตกอยู่บนกระดาษกรอง ควรนำตะกอนนี้มาสกัดซ้ำอีกด้วยสารละลายของฟีนอลโดยใช้วิธีเดียวกัน สกัดตะกอนที่ได้อีกหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งตะกอนที่เหลืออยู่ครั้งสุดท้ายเปลี่ยนจากสีเขียวกลายเป็นสีเขียวอ่อน (pale green) หรือสีเหลือง (yellow) เมื่อสกัดเสร็จแล้วรวมสารละลายของฟีนอลที่สกัดได้ทั้งหมดไว้ด้วยกัน แล้วเก็บไว้ในขวดคอแคบ หรือ Erlenmeyer flask ขนาด 150 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 3 - 4 วัน เพื่อรอให้เกิดการตกผลึกของสารประกอบที่ต้องการ หลังจากนั้นนำมารองด้วย Buchner funnel โดยใช้ suction flask จะได้ผลึกของสารประกอบที่ต้องการ ทำให้แห้งและเก็บไว้ในที่ปราศจากความชื้น สารประกอบที่ได้นี้คือ Compound U-1 (300 มิลลิกรัม)

การทำให้สารประกอบที่ได้ออกมาบริสุทธิ์ขึ้น (Recrystallization):

นำผลึกของ Compound U-1 ที่ได้ออกมาตกผลึกซ้ำอีกด้วยสารละลายของฟีนอลที่เตรียมไว้แล้ว โดยใช้ปริมาณของ Compound U-1 100 มิลลิกรัม ต่อปริมาณของสารละลายฟีนอล 8 - 10 มิลลิลิตร เสร็จแล้วอุ่นบน water bath ให้อุณหภูมิ 60° - 65° ซ.

พร้อมกับเขย่าเบา ๆ ให้ละลายจนหมด จากนั้นนำมากรองแล้วทิ้งสารละลายที่กรองได้
นี้ไว้เป็นเวลา 3 - 4 วัน เพื่อรอให้เกิดการตกผลึกของสารประกอบที่มีบริสุทธิ์ตามที่ต้องการ
คือ Compound U-1 (60 มิลลิกรัม)

การเตรียมเกลือโซเดียมของสารประกอบที่ต้องการ (Compound U-1 Sodium Salt):

นำผลึกของ Compound U-1 ที่ได้นำมาทำให้เป็นผง (110 มิลลิกรัม) แล้วนำ
ไปใส่ในหลอดหรือขวดขนาดเล็กที่มีฝาปิดได้ เติม 2N. Sodium hydroxide (6 มิลลิลิตร)
ลงไป เขย่าให้ผงของ Compound U-1 กระจายเป็นตะกอนแขวนลอยอยู่ในสารละลาย
ของ Sodium hydroxide จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเขย่าด้วยไฟฟ้า (Electric
shaking instrument) โดยใช้เวลาในการเขย่า 24 ชั่วโมง เสร็จแล้วนำเอา
ของผสม (mixtures) ที่ได้นี้มากรองด้วย Buchner funnel โดยใช้ suction flask
จะได้อะกอนสีเขียวเข้ม (dark green amorphous powder) นำตะกอนที่ได้นี้มาล้าง
ด้วย Ethanol 99% 3 - 4 ครั้ง แล้วทำให้แห้ง เก็บไว้ในขวดที่ปราศจากความชื้น
เพื่อป้องกันการสลายตัวของสาร ตะกอนที่ได้นี้คือ Compound U-1 sodium salt.
(72.4 มิลลิกรัม)

การเตรียมสารประกอบเกลืออะซิเตตของสารประกอบที่ต้องการ (Compound U-1
acetate)

ในการเตรียมอนุพันธ์อะซิเตตของ Compound U-1 นี้ อาจแบ่งวิธีทำได้ 2
วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 เป็นวิธีที่ต้องใช้ความร้อนช่วย (Hot Method)

ก่อนทำการทดลองควรวีธีนี้ควรอบภาชนะทุกชิ้นให้แห้ง ปราศจากความชื้นก่อน
ที่จะนำมาใช้ นำผลึกของ Compound U-1 มาทำให้เป็นผงละเอียด (50 มิลลิกรัม)
ใส่ลงไปใน round bottom flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acetic anhydride
(10 มิลลิลิตร) และหยด Conc. sulphuric acid ลงไปเล็กน้อย (1-2 หยด)

เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันแล้วใส่ condenser คำนบนของ flask เพื่อทำการ reflux บน water bath ที่อุณหภูมิ 100° ซ. เป็นเวลานาน 30 นาที ขณะเกิดปฏิกิริยาจะสังเกตเห็นสารละลายเริ่มเปลี่ยนจากสีน้ำเงินไปเป็นสีแดง เมื่อครบเวลาแล้วปล่อยให้ไวให้เย็น กรองด้วย Buchner funnel โดยใช้ suction flask จะได้ผงตะกอนสีแดงแยกอยู่บนกระดาษกรอง ล้างผงตะกอนที่ได้ด้วย anhydrous ethanol และ ether ตามลำดับ เมื่อแห้งแล้วเก็บใส่ขวดที่มีฝาปิดสนิทให้ปราศจากความชื้นเพราะสารนี้สลายตัวได้ง่าย สารที่เตรียมได้นี้คือ Compound U-1 acetate (32 มิลลิกรัม) จากการทดลองครั้งนี้พบว่ายังไม่สามารถตกผลึกสารนี้ได้เพราะเนื่องจากการสลายตัว (decomposition) ง่ายของมันนั่นเอง

วิธีที่ 2 เป็นวิธีที่ไม่ต้องใช้ความร้อน (Cold Method)

ก่อนทำการทดลองควรอบภาชนะทุกชิ้นที่ใช้ให้แห้งปราศจากความชื้นเช่นกัน นำผลึกของ Compound U-1 มาทำให้เป็นผงละเอียด (25 มิลลิกรัม) ใส่ลงไปใน Erlenmeyer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีจุกแก้วสำหรับปิดได้ เติม acetic anhydride (5 มิลลิลิตร) พร้อมกับเขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วเติม anhydrous pyridine (1 ml.) ลงไป ปิดจุกเพื่อป้องกันความชื้น จากนั้นนำไปวางบน magnetic stirrer เพื่อคนให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ขณะที่คนอยู่นี้จะสังเกตเห็นสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีแดงเข้มอย่างช้า ๆ เมื่อคนจนครบเวลาล้างด้วยน้ำผสมทั้งหมดที่ได้มากรองด้วย Buchner funnel โดยใช้ suction flask จะได้ผงตะกอนสีแดงแยกอยู่บนกระดาษกรอง ล้างผงตะกอนที่ได้ด้วย anhydrous ethanol และ ether ตามลำดับ เมื่อแห้งแล้วเก็บใส่ขวดที่มีฝาปิดปราศจากความชื้น สารที่ได้นี้คือ Compound U-1 acetate เช่นกัน (22.1 มิลลิกรัม)

เมื่อได้สารประกอบที่ต้องการทั้งหมดแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การนำสารประกอบที่ได้จากการทดลองไปหาคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารเหล่านั้นต่อไป คือ

1. หาจุดหลอมตัวของสาร (Melting point)
2. หาปริมาณของ C และ H (Microanalysis)
3. หาน้ำหนักโมเลกุลของสาร (Molecular weight) โดยการทำให้ Mass spectrometry
4. ทำ Ultraviolet and visible absorption spectra เพื่อทราบค่า maximum absorption peaks (λ_{\max}) ของสารนั้น ๆ
5. ทำ Infrared absorption spectra เพื่อทราบค่า maximum absorption peaks (ν_{\max}) ของสารนั้น ๆ