

### บทที่ 3

#### วิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้ในสิ่งสกัดเฮกเซน และเมทานอล จากดอกนนทรี

##### 1. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 1

สาร 1 มีลักษณะเป็นผลึกแวววาวสีขาวหนัก 3.52 กรัม (4.99 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซน) จุดหลอมเหลว 49 - 51 องศาเซลเซียส มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.90 (ซิลิกาเจล : 5 % คลอโรฟอร์มในเฮกเซน) สาร 1 ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งจากการทดสอบทางเคมี พบว่าสาร 1 จะให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, 2,4-DNP และ  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  แสดงว่าสาร 1 ไม่ใช่สารประกอบประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ ไม่มีหมู่คาร์บอนิล และเป็นสารที่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 15) จะปรากฏเฉพาะแถบการดูดกลืนแสงของหมู่  $CH_3$  และ  $CH_2$  เท่านั้น จากข้อมูลดังกล่าวสาร 1 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนไซตรง ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนไซตรง พบว่ามีลักษณะเหมือนกัน (42) สำหรับข้อมูลแถบการดูดกลืนแสงของสาร 1 แสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงแถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1

แถบการดูดกลืนแสง ( เซนติเมตร <sup>-1</sup> )	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
2918 , 2849	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ $CH_2$ , $CH_3$
1465	สูง	C-H สั่นแบบงอของ $CH_2$ , $CH_3$
1378	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอของ $CH_3$
721	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ $(-CH_2-)_n$ , $n > 4$

การพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสาร 1 ทำได้โดยนำมาเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนไซโตรเจน ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (รูปที่ 17) พบว่าสาร 1 ให้ค่า retention time เท่ากับ 2.76, 3.52, 4.33, 5.62, 6.99, 9.22, 11.61, 15.51, 19.61, 24.97 และ 33.44 นาที โดยค่า log retention time เท่ากับ 0.44, 0.54, 0.64, 0.74, 0.84, 0.96, 1.06, 1.19, 1.29, 1.39 และ 1.52 ตามลำดับ และจากกราฟเทียบมาตรฐาน (รูปที่ 16) พบว่าสาร 1 เป็นของผสมของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไซโตรเจน 11 ชนิด ซึ่งแสดงดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 สารประกอบไฮโดรคาร์บอนไซโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในสาร 1

ชื่อสารประกอบ	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	มวลโมเลกุล	ปริมาณสาร ( % )
tricosane	$C_{23}H_{48}$	$CH_3-(CH_2)_{21}-CH_3$	324	0.30
tetracosane	$C_{24}H_{50}$	$CH_3-(CH_2)_{22}-CH_3$	338	0.09
pentacosane	$C_{25}H_{52}$	$CH_3-(CH_2)_{23}-CH_3$	352	2.57
hexacosane	$C_{26}H_{54}$	$CH_3-(CH_2)_{24}-CH_3$	366	0.85
heptacosane	$C_{27}H_{56}$	$CH_3-(CH_2)_{25}-CH_3$	380	17.92
octacosane	$C_{28}H_{58}$	$CH_3-(CH_2)_{26}-CH_3$	394	2.68
nonacosane	$C_{29}H_{60}$	$CH_3-(CH_2)_{27}-CH_3$	408	45.06
triacontane	$C_{30}H_{62}$	$CH_3-(CH_2)_{28}-CH_3$	422	2.54
hentriacontane	$C_{31}H_{64}$	$CH_3-(CH_2)_{29}-CH_3$	436	20.43
dotriacontane	$C_{32}H_{66}$	$CH_3-(CH_2)_{30}-CH_3$	450	0.11
trtriacontane	$C_{33}H_{68}$	$CH_3-(CH_2)_{31}-CH_3$	464	7.45

## 2. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 2

สาร 2 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 6.60 กรัม (9.35 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซน) จุดหลอมเหลว 60 - 63 องศาเซลเซียส มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.86 (ซิลิกาเจล : 10 % คลอโรฟอร์มในเฮกเซน) ได้จากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งจากการทดสอบทางเคมี พบว่าสาร 2 จะให้ผลลบกับ 2,4-DNP และ  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  แสดงว่าสาร 2 ไม่มีหมู่คาร์บอนิล และเป็นสารที่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 19) จะปรากฏแถบดูดกลืนแสง ซึ่งได้แก่แถบการดูดกลืนแสงของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ที่ความถี่ 1736 เซนติเมตร<sup>-1</sup> และลักษณะเฉพาะของไฮโดรคาร์บอนไซตรง ซึ่งข้อมูลแถบการดูดกลืนแสงของสาร 2 แสดงดังตารางที่ 14

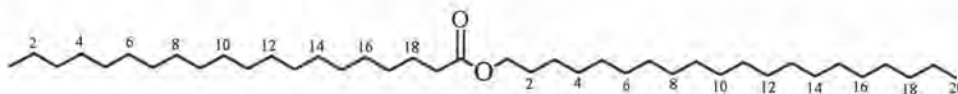
ตารางที่ 14 แสดงแถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 2

แถบการดูดกลืนแสง ( เซนติเมตร <sup>-1</sup> )	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
2919 , 2849	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ $CH_2$ , $CH_3$
1736	สูง	C=O สั่นแบบยืดของเอสเทอร์
1466	สูง	C-H สั่นแบบงอของ $CH_2$ , $CH_3$
1376	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอของ $CH_3$
1175	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืด
722	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ $(-CH_2-)_n$ , $n > 4$

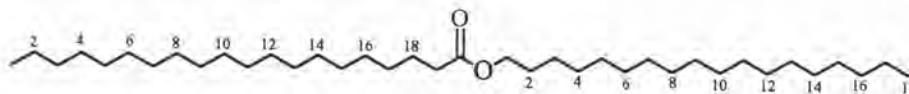
โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 20) ปรากฏสัญญาณของหมู่  $-CH_3$  ที่ค่า chemical shift ( $\delta$ ) 0.85 ppm, ที่ค่า chemical shift ( $\delta$ ) 1.23 และ 1.55 ppm จะปรากฏสัญญาณของหมู่  $(-CH_2-)_n$  ซึ่งมีความเข้มสูงมาก แสดงว่าสาร 2 ประกอบไปด้วยหมู่  $CH_2$  เป็นจำนวนมากในโมเลกุล, ที่ค่า chemical shift ( $\delta$ ) 2.36 ppm แสดง  $-CH_2-C=O$  และที่ค่า chemical shift ( $\delta$ ) 4.05 ppm ปรากฏสัญญาณของหมู่  $-CH_2-O-C=O$

จากข้อมูลดังกล่าว แสดงว่าสาร 2 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์ไฮโดรเจน ดังนั้นจึงทำการยืนยันโครงสร้างของสาร 2 โดยการวิเคราะห์ด้วย mass spectrometer ได้แมสสเปกตรัม ( รูปที่ 21 ) เมื่อทำการสืบค้นข้อมูลแมสสเปกตรัมของเอสเทอร์ ( library search ) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST ( National Institued of Standard Testing ) ( โดยการเปรียบเทียบไอออนเชิงโมเลกุลและชิ้นส่วนของการแตกมวล ) พบแมสสเปกตรัมของสาร 2 มีลักษณะคล้ายกับแมสสเปกตรัมของ Eicosanoic acid, Eicosyl ester (  $C_{40}H_{80}O_2$  ) ( รูปที่ 23 ) และแมสสเปกตรัมของ Eicosanoic acid, Octadecyl ester (  $C_{38}H_{76}O_2$  ) ( รูปที่ 24 ) ซึ่งพบว่าส่วนของกรดคาร์บอกซิลิกในสาร 2 เป็น Eicosanoic acid มีสูตรโมเลกุลคือ  $C_{20}H_{42}O_2$  และส่วนของแอลกอฮอล์นั้นจะเป็น Eicosyl alcohol (  $C_{20}H_{42}O$  ) และ Octadecyl alcohol (  $C_{18}H_{38}O$  ) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสาร 2 เป็นของผสมของสารประกอบเอสเทอร์ไฮโดรเจน 2 ชนิด ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง ดังนี้

Eicosanoic acid, Eicosyl ester (  $C_{40}H_{80}O_2$  )



Eicosanoic acid, Octadecyl ester (  $C_{38}H_{76}O_2$  )



### 3. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 3

สาร 3 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 1.01 กรัม ( 1.43 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซน ) จุดหลอมเหลว 69 - 71 องศาเซลเซียส มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.40 ( ซิลิกาเจล : 50 % คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ) สาร 3 ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนในอัตราส่วน 3 : 7 และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มกับเมทานอล ซึ่งจากการทดสอบทางเคมีพบว่า สาร 3 จะให้ผลลบกับ 2,4-DNP และ  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  แสดงว่าสาร 3 ไม่มีหมู่คาร์บอนิล และเป็นสารที่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม ( รูปที่ 25 ) แสดงแถบการดูดกลืนแสงซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ที่ความถี่ 3590 - 3120 เซนติเมตร<sup>-1</sup> และ 1063 เซนติเมตร<sup>-1</sup> นอกจากนั้นยังแสดงแถบการดูดกลืนแสง ที่เป็นลักษณะเฉพาะของไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกันเป็นโซ่ตรงยาว ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของแอลกอฮอล์โซ่ตรงยาว พบว่ามีลักษณะเหมือนกัน ( 42 ) ซึ่งข้อมูลแถบการดูดกลืนแสงของสาร 3 แสดงดังตารางที่ 15

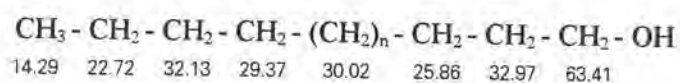
ตารางที่ 15 แสดงแถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 3

แถบการดูดกลืนแสง ( เซนติเมตร <sup>-1</sup> )	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3590 - 3120	ปานกลาง	O-H สั่นแบบยืดของ R-OH
2918 , 2849	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ $CH_2$ , $CH_3$
1467	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ $CH_2$ , $CH_3$
1378	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอของ $CH_3$
1063	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืด และ O-H สั่นแบบงอ
723	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ $(-CH_2-)_n$ , $n > 4$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( รูปที่ 26 ) ปรากฏสัญญาณของหมู่  $-CH_3$  ที่ค่า chemical shift (  $\delta$  ) 0.89 ppm , ที่ค่า chemical shift (  $\delta$  ) 1.30 และ 1.60 ppm จะปรากฏสัญญาณของหมู่  $(-CH_2-)_n$  ซึ่งมีความเข้มสูงมาก แสดงว่าสาร 3 ประกอบไปด้วยหมู่

$\text{CH}_2$  เป็นจำนวนมากในโมเลกุล และที่ค่า chemical shift ( $\delta$ ) 3.65 ppm ปรากฏสัญญาณของหมู่  $-\text{CH}_2-\text{OH}$

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 27) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ค่า chemical shift ( $\delta$ ) 14.29 - 32.97 ppm ( $\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-$ ) และ 63.41 ppm ( $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ) โดยสัญญาณที่ 30.02 ppm เป็นสัญญาณของ  $(-\text{CH}_2-)_n$  ซึ่งมีโครงสร้างคร่าว ๆ ดังนี้



จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่าสาร 3 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์ไซตรง ซึ่งสามารถทำการพิสูจน์โครงสร้างของสาร 3 ได้โดยนำมาเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน แอลกอฮอล์ไซตรง ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (รูปที่ 29) พบว่าสาร 3 ให้ค่า retention time เท่ากับ 16.16 และ 26.63 นาที โดยค่า log retention time เท่ากับ 1.21 และ 1.42 ตามลำดับ และจากกราฟเทียบมาตรฐาน (รูปที่ 28) พบว่าสาร 3 เป็นของผสมของสารประกอบแอลกอฮอล์ไซตรง 2 ชนิด ซึ่งแสดงดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 สารประกอบแอลกอฮอล์ไซตรงชนิดต่าง ๆ ในสาร 3

ชื่อสารประกอบ	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	มวลโมเลกุล	ปริมาณสาร (%)
heptacosanol	$\text{C}_{27}\text{H}_{56}\text{O}$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{25}-\text{CH}_2-\text{OH}$	396	32.31
triacontanol	$\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{28}-\text{CH}_2-\text{OH}$	438	67.69



#### 4. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 4

สาร 4 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 0.869 กรัม ( 1.23 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซน ) จุดหลอมเหลว 68 - 69 องศาเซลเซียส มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.40 ( ซิลิกาเจล : 50 % คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ) สาร 4 ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนในอัตราส่วน 3 : 7 และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มกับเมทานอล ซึ่งจากการทดสอบทางเคมีพบว่า สาร 4 จะให้ผลลบกกับ 2,4 - DNP และ  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  แสดงว่าสาร 4 ไม่มีหมู่คาร์บอนิล และเป็นสารที่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม ( รูปที่ 31 ) แสดงแถบการดูดกลืนแสง เช่นเดียวกับสาร 3 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ที่ความถี่ 3595 - 3110 เซนติเมตร<sup>-1</sup> และ 1063 เซนติเมตร<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังแสดงแถบการดูดกลืนแสง ที่เป็นลักษณะเฉพาะของไฮโดรคาร์บอนที่ต่อกันเป็นโซ่ตรงยาว ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของแอลกอฮอล์โซ่ตรงยาว พบว่ามีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ( 42 )

จากข้อมูลดังกล่าว แสดงว่าสาร 4 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์โซ่ตรง ซึ่งสามารถทำการพิสูจน์โครงสร้างของสาร 4 ได้โดยนำมาเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ( รูปที่ 33 ) พบว่าสาร 4 ให้ค่า retention time เท่ากับ 6.64, 16.11 และ 27.28 นาที โดยค่า log retention time เท่ากับ 0.82, 1.21 และ 1.43 ตามลำดับ และจากกราฟเทียบมาตรฐาน ( รูปที่ 32 ) พบว่าสาร 4 เป็นของผสมของสารประกอบแอลกอฮอล์โซ่ตรง 3 ชนิด ซึ่งแสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 สารประกอบแอลกอฮอล์โซ่ตรงชนิดต่าง ๆ ในสาร 4

ชื่อสารประกอบ	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	มวลโมเลกุล	ปริมาณสาร ( % )
propacosanol	$C_{23}H_{48}O$	$CH_3-(CH_2)_{21}-CH_2-OH$	340	3.42
heptacosanol	$C_{27}H_{56}O$	$CH_3-(CH_2)_{25}-CH_2-OH$	396	54.24
triacontanol	$C_{30}H_{58}O$	$CH_3-(CH_2)_{28}-CH_2-OH$	438	42.34



### 5. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 5

สาร 5 มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 0.99 กรัม (0.57 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซนและเมทานอล) จุดหลอมเหลว 134 - 136 องศาเซลเซียส มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.67 (ซิลิกาเจล : 10 % เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) สาร 5 ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนในอัตราส่วน 3 : 7 และได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเมทานอล ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนในอัตราส่วน 4 : 6 และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเฮกเซนร้อน ซึ่งจากการทดสอบทางเคมีพบว่าสาร 5 ให้สารละลายสีเดียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และฟอกจางสี  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  แสดงว่าสาร 5 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ และเป็นสารที่ไม่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 35) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซิลที่ความถี่ 3600 - 3200 เซนติเมตร<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังแสดง disubstituted vinyl ที่ความถี่ 970, 960 เซนติเมตร<sup>-1</sup> และ trisubstituted vinyl ที่ความถี่ 837, 802 เซนติเมตร<sup>-1</sup> ซึ่งข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร 5 แสดงดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงแถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 5

แถบการดูดกลืนแสง (เซนติเมตร <sup>-1</sup> )	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3600 - 3200	สูง	O-H สั่นแบบยืดของ R-OH
2938, 2867	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ $CH_2$ , $CH_3$
1641	ปานกลาง	C=C สั่นแบบยืดของอัลคีน
1464	สูง	C-H สั่นแบบงอของ $CH_2$ , $CH_3$
1381	สูง	C-H สั่นแบบงอของ $CH_3$
1061	สูง	C-O สั่นแบบยืด และ O-H สั่นแบบงอ
970, 960	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอนอกกระนาบของ $R_1CH=CHR_2$
837, 802	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอนอกกระนาบของ $R_1R_2C=CHR_3$

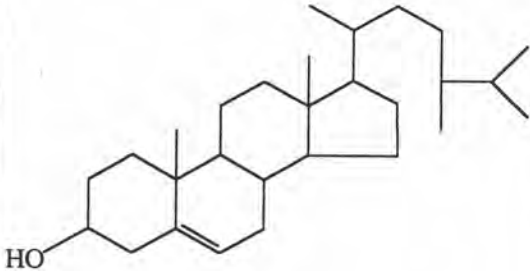
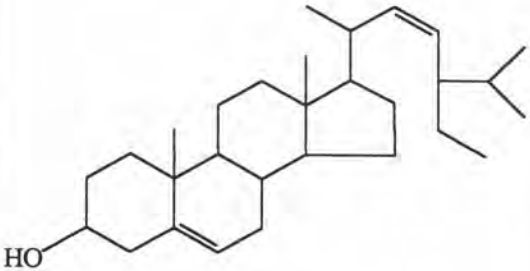
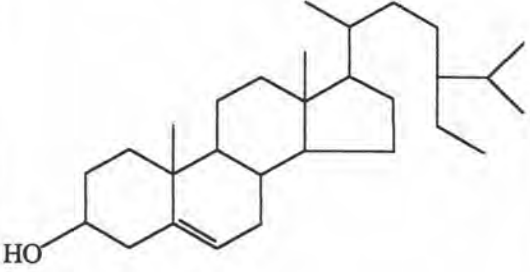


โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( รูปที่ 36 ) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนแสดงลักษณะเฉพาะที่ chemical shift ( $\delta$ ) 0.70 - 2.30 ppm แสดง  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  ของสเตอรอยด์ นอกจากนี้ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 3.55 ppm แสดงโปรตอนบนคาร์บอนที่อยู่ติดกับหมู่ไฮดรอกซี ( $-\text{CH}-\text{OH}$ ) , ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 5.10 ppm แสดง  $-\text{CH}=\text{CH}-$  และที่ chemical shift ( $\delta$ ) 5.35 ppm แสดง  $-\text{CH}=\text{C}-$

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( รูปที่ 37 ) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 39 คาร์บอน และผลจากการทำ DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( รูปที่ 38 ) จะปรากฏสัญญาณดังนี้ ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 11.95 - 56.83 ppm แสดง  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$  ของสเตอรอยด์, ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 71.77 ppm แสดงคาร์บอนที่อยู่ติดกับหมู่ไฮดรอกซี ( $-\text{CH}-\text{OH}$ ) , ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 121.68 ppm แสดง  $-\text{CH}=\text{C}-$ , ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 129.24, 138.28 ppm แสดง  $-\text{CH}=\text{CH}-$  และที่ chemical shift ( $\delta$ ) 140.72 ppm แสดง  $-\text{CH}=\text{C}-$

จากข้อมูลที่กล่าวมาทั้งหมด แสดงว่าสาร 5 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ ดังนั้นจึงทำการยืนยันโครงสร้างของสาร 5 โดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของสเตอรอยด์ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี ( รูปที่ 40 ) พบว่าสาร 5 ให้ค่า retention time เท่ากับ 19.63, 20.63 และ 23.53 นาที โดยค่า log retention time เป็น 1.29, 1.31 และ 1.37 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าตรงกับ campesterol, stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol ตามลำดับ ซึ่ง stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol เป็นสเตอรอยด์ที่มีจำนวนคาร์บอน 29 อะตอมเท่ากัน แต่ต่างกันที่ stigmasterol มีพันธะคู่มากกว่า  $\beta$ -sitosterol 1 พันธะ ( ตำแหน่ง  $\text{C}_{22-23}$  เป็น disubstituted vinyl,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ) โดยคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏชัดเจนว่ามี 2 พันธะคู่ ดังนั้นพอจะสรุปได้ว่าสาร 5 เป็นของผสมสเตอรอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ campesterol ( 7.76 % ), stigmasterol ( 46.16 % ) และ  $\beta$ -sitosterol ( 46.08 % ) ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 สเตอรอยด์ชนิดต่าง ๆ ของสาร 5

ชื่อสารประกอบ	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	มวลโมเลกุล	ปริมาณสาร (%)
campesterol	$C_{28}H_{48}O$		400	7.76
stigmasterol	$C_{29}H_{48}O$		412	46.16
$\beta$ -sitosterol	$C_{29}H_{50}O$		414	46.08

#### 6. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 6

สาร 6 มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.081 กรัม ( $7.9 \times 10^{-2}$  % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซนและเมทานอล) จุดหลอมเหลว 265 - 270 องศาเซลเซียส มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.55 ( ซิลิกาเจล : 20 % เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ) สาร 6 ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเมทานอล ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 2 : 98 และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเอทานอลร้อน ซึ่งจากการทดสอบทางเคมีพบว่าสาร 6 ให้สารละลายสีเดียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และฟอกจางสี  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  แสดงว่าสาร 6 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ และเป็นสารที่ไม่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม ( รูปที่ 41 ) แสดงแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ไฮดรอกซีที่มีความถี่ 3640 - 3160 เซนติเมตร<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังแสดงหมู่ C - O สั่นแบบยืดของหมู่ไฮดรอกซีและของน้ำตาลที่ 1170 - 1020 เซนติเมตร<sup>-1</sup> ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไกลโคไซด์ และแถบการดูดกลืนแสงที่ 890 เซนติเมตร<sup>-1</sup> แสดงแอนโนเมอริกโปรตอนที่มีทิศทางการสั่นตามแนวแกนของน้ำตาลที่เป็นบีตาไอโซเมอร์ (anomeric axial proton of  $\beta$ -sugar) ซึ่งข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร 6 แสดงดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงแถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 6

แถบการดูดกลืนแสง ( เซนติเมตร <sup>-1</sup> )	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3640 - 3162	สูง	O-H สั่นแบบยืดของ R-OH
3023	ต่ำ	C-H สั่นแบบยืดของอัลคีน
2935 , 2710	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>
1630	ต่ำ	C=C สั่นแบบยืดของอัลคีน
1464	สูง	C-H สั่นแบบงอของ CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>
1380	สูง	C-H สั่นแบบงอของ CH <sub>3</sub>
1170 - 1020	สูง	C-O สั่นแบบยืด และ O-H สั่นแบบงอ
890	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอของแอนโนเมอริกโปรตอนที่มีทิศทางการแกว่งของน้ำตาลที่เป็นปีตาไอโซเมอร์ ( anomeric axial proton of $\beta$ -sugar )
840, 800	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอนอกระนาบของ R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> C=CHR <sub>3</sub>

โปรตอนเอ็นเอมเมอร์สเปกตรัม ( รูปที่ 42 ) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนแสดงลักษณะเฉพาะที่ chemical shift ( $\delta$ ) 0.54 - 2.42 ppm แสดง CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH ของสเตอรอยด์ นอกจากนี้ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 3.63 ppm แสดงโปรตอนบนคาร์บอนที่อยู่ติดกับน้ำตาล -CH-O-sugar , ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 2.78 - 3.56 ppm แสดงโปรตอนของน้ำตาล , ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 4.20 ppm ( 1H , d , J = 7.8 Hz ) แสดงแอนโนเมอริกโปรตอน , ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 5.09 ppm แสดง -CH=CH- และที่ chemical shift ( $\delta$ ) 5.31 ppm แสดง -CH=C-

คาร์บอน-13 เอ็นเอมเมอร์สเปกตรัม ( รูปที่ 43 ) เมื่อเปรียบเทียบกับคาร์บอน-13 เอ็นเอมเมอร์สเปกตรัมของสาร 5 ( รูปที่ 37 ) พบว่าปรากฏสัญญาณที่คล้ายกันมากดังนี้คือ ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 11.64 - 56.16 ppm แสดง CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH ของสเตอรอยด์ , ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 121.20 ppm แสดง -CH=C- , ที่ chemical shift ( $\delta$ ) 128.80, 138.03 ppm แสดง -CH=CH- และที่ chemical shift ( $\delta$ ) 140.43 ppm แสดง

-CH=C- นอกจากนี้จะปรากฏสัญญาณของคาร์บอนของน้ำตาลอีก 6 ตัว คือที่ chemical shift ( $\delta$ ) 70.06 , 73.43 , 76.69 , 76.93 และ 100.74 ppm ซึ่งสามารถเปรียบเทียบกับ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของน้ำตาลกลูโคส ได้ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของน้ำตาลที่มีอยู่ในสาร 6 กับน้ำตาลกลูโคส

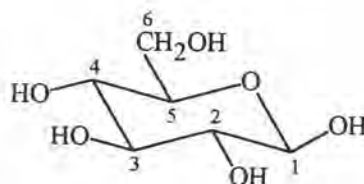
ตำแหน่งคาร์บอน	steroid-3-O- $\beta$ -glycoside ในสาร 6	น้ำตาลกลูโคส (51)
C-1	100.74	97.4
C-2	73.43	75.9
C-3	76.93	77.5
C-4	70.06	71.3
C-5	76.69	77.4
C-6	61.05	62.5

จากข้อมูลที่กล่าวมาทั้งหมด แสดงว่าสาร 6 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์กลูโคไซด์ ดังนั้นจึงทำการยืนยันโครงสร้างโดยนำสาร 6 มาทำการไฮโดรไลส์ด้วย 10 % HCl ในเอทานอล ได้ส่วนของ aglycone (สาร 6.1) และส่วนของ glycone ในชั้นน้ำ (สาร 6.2)

เมื่อนำสาร 6.1 มาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (รูปที่ 45) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของสเตอรอยด์ (รูปที่ 44) พบว่าสาร 6.1 ให้ค่า retention time เท่ากับ 19.15, 20.31 และ 22.77 นาที โดยค่า log retention time เป็น 1.27, 1.30 และ 1.35 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าตรงกับ campesterol, stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol ตามลำดับ ดังนั้นพอจะสรุปได้ว่าสเตอรอยด์ที่มีอยู่ในสาร 6 เป็นของผสมสเตอรอยด์ 3 ชนิด ได้แก่ campesterol, stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol

ส่วนสาร 6.2 เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อยืนยันโครงสร้างว่าเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเปรียบเทียบกับ retention time กับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ได้แก่ rhamnose, fructose และ glucose พบว่า retention time ของน้ำตาล rhamnose เป็น

3.21 นาที, fructose เป็น 4.46 นาที และ glucose เป็น 4.96 นาที ( รูปที่ 46 ) ส่วน retention time ของสาร 6.2 เป็น 4.91 นาที ( รูปที่ 47 ) แสดงว่าส่วนของน้ำตาลในสาร 6 คือ น้ำตาลกลูโคส ( glucose ) ซึ่งมีโครงสร้างดังนี้

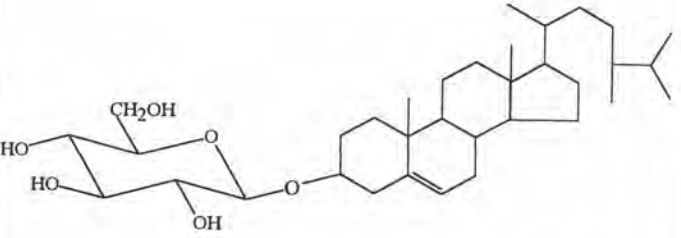
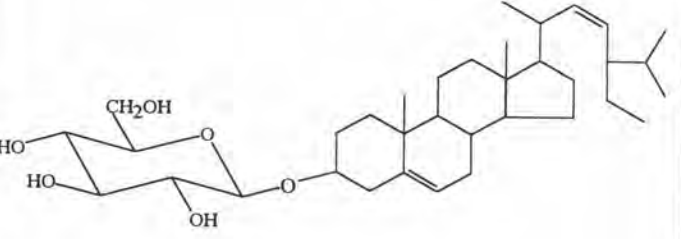
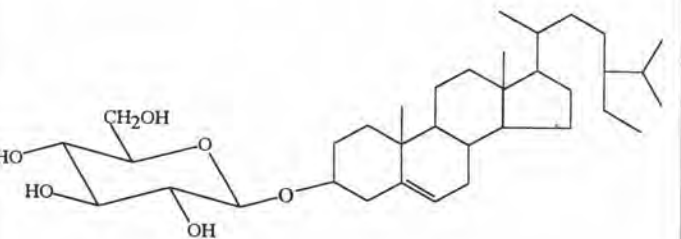


D - Glucose (  $\beta$  - form )

จากข้อมูลทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าสาร 6 นี้เป็นของผสมสเตอรอยด์ ไกลโคไซด์ 3 ชนิด ซึ่งสเตอรอยด์แต่ละชนิดต่อกับน้ำตาลกลูโคสเพียง 1 โมเลกุลเท่านั้น ได้แก่ campesterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, stigmasterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside และ  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในตารางที่ 22



ตารางที่ 22 สเตอรอยด์ไกลโคไซด์ชนิดต่าง ๆ ที่พบในสาร 6

ชื่อสาร	สูตร โครงสร้าง
campesterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	
stigmasterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	
$\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside	

### 7. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 7

สาร Z มีลักษณะเป็นผลึกรูปเหลี่ยมสีขาวใสหนัก 3.018 กรัม ( 2.96 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเมทานอล ) จุดหลอมเหลว 130 องศาเซลเซียส ( จะมีการหลอมเหลวอีกครั้งที่อุณหภูมิ 238 องศาเซลเซียส ) มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.67 ( ซิลิกาเจล : 20 % เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ) สาร Z ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเมทานอล ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 5 : 95 และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ซึ่งจากการทดสอบทางเคมีพบว่าสาร Z จะให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard แต่จะให้ผลบวกกับ 2,4 - DNP แสดงว่าสาร Z ไม่ใช่สารประกอบประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์ปีนอยด์ แต่มีหมู่คาร์บอนิลอยู่ในโมเลกุล

อินฟราเรดสเปกตรัม ( รูปที่ 48 ) แสดงแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ไฮดรอกซิลที่ความถี่ 3424 - 3020 เซนติเมตร<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังแสดงแถบการดูดกลืนแสงของ C=C สันแบบยืดของสารประกอบอะโรมาติกที่ความถี่ 1613 , 1520 เซนติเมตร<sup>-1</sup> และ C-O สันแบบยืดที่ความถี่ 1235 - 1013 เซนติเมตร<sup>-1</sup> ซึ่งเป็นพีคที่กว้าง ( broad ) ซึ่งข้อมูลการดูดกลืนแสงของ สาร Z แสดงดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 แสดงแถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร Z

แถบการดูดกลืนแสง ( เซนติเมตร <sup>-1</sup> )	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3424 - 3020	สูง	O-H สันแบบยืด
3090	ต่ำ	C-H สันแบบยืดของสารประกอบอะโรมาติก
2984 , 2890	ต่ำ	C-H สันแบบยืดของ CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>
1703	สูง	C=O สันแบบยืดของเอสเทอร์
1613 , 1520	ปานกลาง	C=C สันแบบยืดของสารประกอบอะโรมาติก
1464	ปานกลาง	C-H สันแบบงอของ CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>
1375	ปานกลาง	C-H สันแบบงอของ CH <sub>3</sub>
1235 - 1013	สูง	C-O สันแบบยืด และ O-H สันแบบงอ
774	ต่ำ	C-H สันแบบงอนอกกระนาบของสารประกอบอะโรมาติก

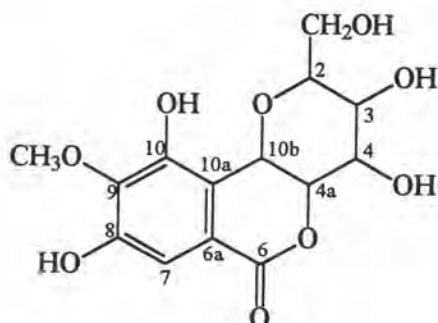
โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( รูปที่ 49 ) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมโทน์ และหมู่เมทิลีนที่ 3.20 - 3.98 ppm ส่วนสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมทอกซีจะปรากฏสัญญาณที่ 3.76 ( 3H, s, CH<sub>3</sub> ) ppm โปรตอนของหมู่เมโทน์ของคาร์บอนที่ 10b จะให้สัญญาณที่ 4.95 ( 1H, d, CH ) ppm ซึ่งจะเห็นว่าสัญญาณนั้นเป็น doublet ชัดเจนและมีค่า coupling constant ( J ) เท่ากับ 10 เฮิรตซ์ ( Hz ) ( รูปที่ 50 ) ทำให้พอสรุปได้ว่าโปรตอนที่คาร์บอนที่ 10b และ 4a นั้นเป็น trans กัน สำหรับสัญญาณที่ 4.86, 5.36, 5.57 ( 3H, s, br. ) แสดงโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซี ส่วนสัญญาณของโปรตอนของวงอะโรมาติกจะให้สัญญาณที่ 6.98 ( 1H, s, CH ) ppm และสัญญาณที่ 9.68 และ 8.42 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซีที่ติดกับวงอะโรมาติก

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( รูปที่ 51 ) พบสัญญาณของคาร์บอน 14 สัญญาณ และผลจากการทำ DEPT 90 ( รูปที่ 52 ) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH และ DEPT 135 ( รูปที่ 52 ) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH, CH<sub>3</sub> ( up phase ) และ CH<sub>2</sub> ( down phase ) พบว่ามีเมทิลคาร์บอน (-CH<sub>3</sub>) 1 หมู่ ซึ่งปรากฏสัญญาณที่ 59.89 ppm แสดง -OCH<sub>3</sub>, มีเมทิลีนคาร์บอน (-CH<sub>2</sub>-) 1 หมู่ ที่ 61.15 ppm แสดง -CH<sub>2</sub>-OH, มีเมโทน์คาร์บอน (-CH-) 6 หมู่ ปรากฏสัญญาณที่ 70.77, 72.19, 73.77, 79.84, 81.78 และ 109.55 ppm โดยสัญญาณที่ 109.55 แสดงเมโทน์คาร์บอนของวงอะโรมาติก ส่วนสัญญาณที่เหลือเป็นควอเทอร์นารีคาร์บอน 6 อะตอม ปรากฏสัญญาณที่ 116.03, 118.09, 140.69, 148.09, 150.96 และ 163.43 ppm โดยสัญญาณที่ 163.43 ppm แสดงหมู่คาร์บอนิล

แมสสเปกตรัม ( รูปที่ 53 ) พบไอออนเชิงโมเลกุล ( M<sup>+</sup> ) ที่ m/e เท่ากับ 328 มีสูตรโมเลกุล C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> ซึ่งคำนวณความไม่อิ่มตัว ( double bond equivalent, DBE ) ได้เท่ากับ 7

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น พบว่าสาร Z น่าจะเป็นสารประกอบประเภท isocoumarin type ซึ่งพบว่าสาร Z นั้นมีจุดหลอมเหลวตรงกับ bergenin คือ 130 องศาเซลเซียส จึงได้เปรียบเทียบข้อมูลทางสเปกตรัมของสาร Z กับ bergenin ( 52, 53 ) เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร Z โดยเปรียบเทียบข้อมูลโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ดังแสดงในตารางที่ 24 และข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ดังแสดงในตารางที่ 25

สูตรโครงสร้างของ bergenin เป็นดังนี้



ตารางที่ 24 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 7 กับ bergenin

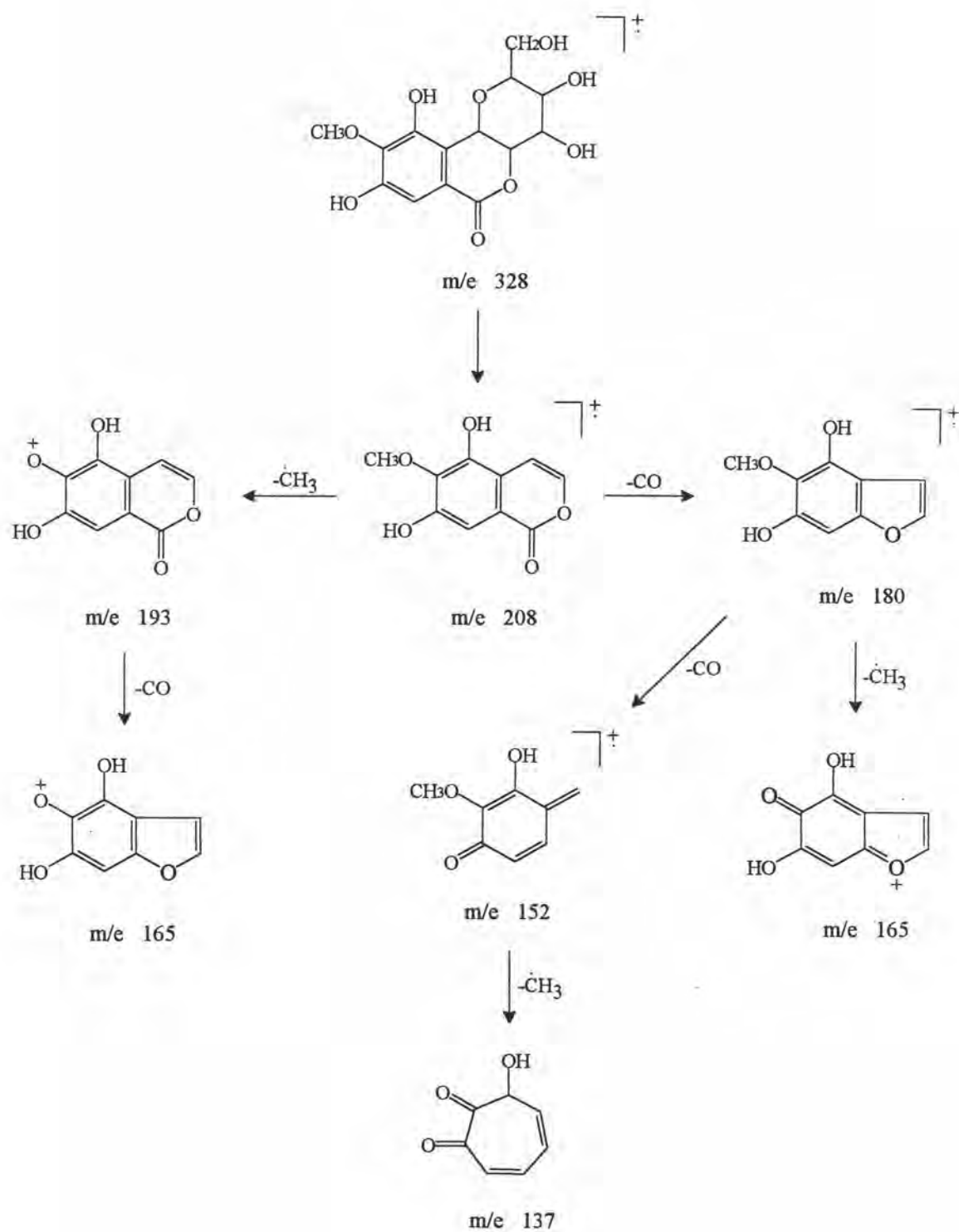
ตำแหน่งของ โปรตอน	ค่าเคมีคัลชิฟท์ ( chemical shift , ppm )	
	สาร 7	bergenin (52,53)
2 - H	3.20 - 3.98	3.1 - 4.1
3 - H		
4 - H		
4a - H		
11 - H		
10b - H	4.95	4.9
3 - OH	4.86 , 5.36 , 5.57	5.2 - 5.5
4 - OH		
11 - OH		
7 - H	6.98	7.12
8 - OH	9.68 , 8.42	9.6 , 8.4
10 - OH		
-OCH <sub>3</sub>	3.76	3.8

ตารางที่ 25 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร Z กับ bergenin

ตำแหน่งของ คาร์บอน	ค่าเคมีคัลชิฟท์ (chemical shift , ppm)	
	สาร Z	bergenin (52)
C - 2	70.77	70.66
C - 3	72.19	72.58
C - 4	73.77	73.87
C - 4a	79.84	79.76
C - 6	163.43	163.38
C - 6a	118.09	117.91
C - 7	109.55	109.80
C - 8	150.96	150.87
C - 9	140.69	140.64
C - 10	148.09	147.97
C - 10a	116.03	115.63
C - 10b	81.78	81.72
C - 11	61.15	61.26
-OCH <sub>3</sub>	59.89	59.92

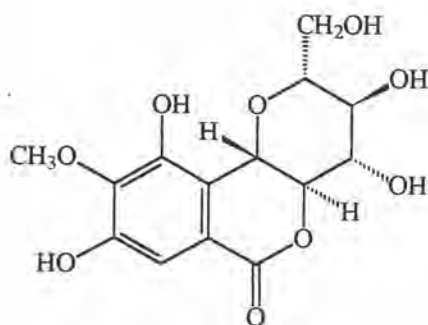
สำหรับข้อมูลทางแมสสเปกตรัมของ bergenin ได้มีการศึกษาโดย B.S. Joshi และ V.N. Kamat (53) พบว่า bergenin จะเกิดแตกตัวเป็น isocoumarin ซึ่งมีเสถียรภาพมาก ได้พีกที่ m/e 208 ซึ่งเป็นพีกที่มีความเข้มสูงสุด หลังจากนั้นจะมีการสูญเสียหมู่คาร์บอนิล ได้พีกที่ m/e 180 นอกจากนี้ยังมีชิ้นส่วนของการแตกมวลที่สำคัญคือที่ m/e 193 , 165 , 152 และ 137 ( รูปที่ 53 ) ซึ่งรูปแบบการแตกตัวของสาร Z ได้แสดงในแผนภาพที่ 2

แผนภาพที่ 2 แสดงรูปแบบการแตกตัวของ สาร 7





เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม และคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร Z กับ bergenin ( ตารางที่ 24 , 25 ) พบว่าค่า chemical shift ของคาร์บอนทุกตำแหน่งใกล้เคียงกันมาก และการแตกชิ้นส่วนของโครงสร้างข้างต้น สอดคล้องกับข้อมูลแมสสเปกตรัมของสาร Z จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีทั้งหมดพอจะสรุปได้ว่าสาร Z น่าจะเป็น bergenin ซึ่งพบว่า bergenin นี้มีฤทธิ์เป็น anti - inflammatory กับหนู ( rat - paw oedema ) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีพอ ๆ กับ phenylbutazone ซึ่งเป็นสารอ้างอิงในการทดสอบนี้ (25) ซึ่ง bergenin มีสูตรโครงสร้างดังนี้ (53)



### 8. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 8

สาร 8 มีลักษณะเป็นผลึกเม็ดสีขาวหนัก 0.581 กรัม (0.57 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเมทานอล) จุดหลอมเหลว 182 - 184 องศาเซลเซียส มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.41 ( ซิลิกาเจล : คลอโรฟอร์ม ) สาร 8 ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเมทานอล ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1 : 9 และ 2 : 8 และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเมทานอลร้อน ซึ่งจากการทดสอบทางเคมี พบว่าสาร 8 จะให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann - Burchard , 2,4-DNP และ  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  แสดงว่าสาร 8 ไม่ใช่สารประกอบประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ ไม่มีหมู่คาร์บอนิล และเป็นสารที่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม ( รูปที่ 54 ) แสดงแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ไฮดรอกซิลที่มีความถี่ 3570 - 3080 เซนติเมตร<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังแสดงแถบการดูดกลืนแสงของ C-O สั้นแบบยืดที่มีความถี่ 1129 - 1054 เซนติเมตร<sup>-1</sup> ซึ่งเป็นพีกที่กว้าง ( broad ) ข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร 8 แสดงดังตารางที่ 26

ตารางที่ 26 แสดงแถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 8

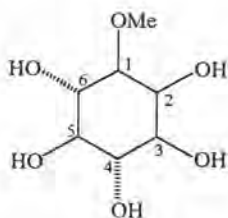
แถบการดูดกลืนแสง ( เซนติเมตร <sup>-1</sup> )	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3570 - 3080	สูง	O-H สั้นแบบยืด ของ R-OH
2954 , 2900	ปานกลาง	C-H สั้นแบบยืดของ CH, CH <sub>3</sub>
1453 , 1381	ต่ำ	C-H สั้นแบบงอของ CH <sub>3</sub> และ O-H สั้นแบบงอ
1129 - 1054	ปานกลาง	C-O สั้นแบบยืด

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( รูปที่ 55 ) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมแทนที่ติดอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลที่ค่า chemical shift 3.00 (t) , 3.43 (s) , 4.24 (d) , 4.37, 4.42 (dd) และ 4.55, 4.64 (dd) ppm

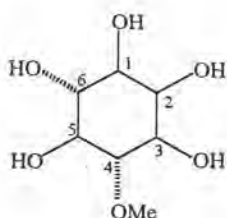
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 56) พบสัญญาณของคาร์บอน 7 สัญญาณ และผลจากการทำ DEPT 90 (รูปที่ 57) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH และ DEPT 135 (รูปที่ 57) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH, CH<sub>3</sub> (up phase) และ CH<sub>2</sub> (down phase) พบว่ามีเมทิลคาร์บอน (-CH<sub>3</sub>) 1 หมู่ ซึ่งปรากฏสัญญาณที่ 59.69 ppm แสดง -OCH<sub>3</sub> ส่วนสัญญาณที่เหลือเป็นเมทิลคาร์บอน (-CH-) 6 หมู่ ปรากฏสัญญาณที่ 70.18, 71.05, 72.02, 72.47, 72.68 และ 83.79 ppm แสดงว่าต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซี (-OH)

จากข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่ามีหมู่เมทิลคาร์บอน 6 หมู่ ซึ่งแต่ละหมู่ต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซี (-OH) และมีหมู่เมทอกซี 1 หมู่ จึงสามารถคำนวณสูตรโมเลกุลได้เป็น C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 194 จำนวนความไม่อิ่มตัว (double bond equivalent, DBE) ได้เท่ากับ 1

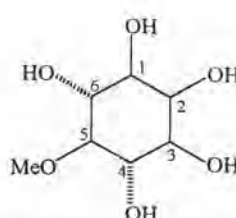
จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น พบว่าสาร 8 น่าจะเป็นสารประกอบประเภท O-methylcyclohexanols ซึ่ง O-methylcyclohexanols นั้นมีไอโซเมอร์ (isomer) อยู่มากมายหลายแบบ ดังรูปข้างล่างนี้



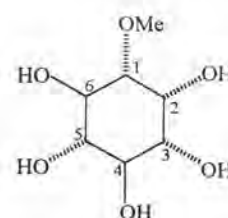
(1)



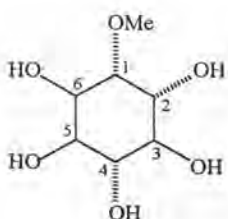
(2)



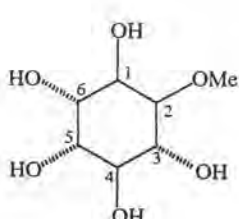
(3)



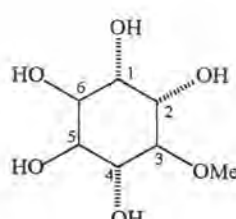
(4)



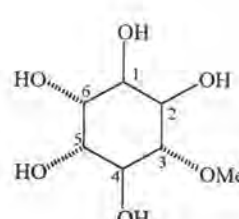
(5)



(6)



(7)



(8)

ซึ่งแต่ละไอโซเมอร์ จะมีคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมที่คล้ายกันมาก ( 54 ) จึงได้ทำการยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 8 โดยการนำสาร 8 ไปวัดค่า specific optical rotation ซึ่งแต่ละไอโซเมอร์ จะมีค่า specific optical rotation ที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 27

ตารางที่ 27 แสดงค่า specific optical rotation ของสารประกอบประเภท O-methylcyclohexanols

สาร	ค่า specific optical rotation [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> (56)	จุดหลอมเหลว (56)
( 1 ) D-1-O-Methyl-myo-inositol ( D-(+)-Bornesitol )	+ 32° w	201 - 202 °C
( 2 ) D-4-O-Methyl-myo-inositol ( D-Ononitol )	+ 7° w	172 °C
( 3 ) D-5-O-Methyl-myo-inositol ( Sequoyitol )	0	235 °C
( 4 ) L-1-O-Methyl-myo-inositol ( L-(-)-Bornesitol )	- 32° w	201 - 202 °C
( 5 ) D-1-O-Methyl-chiro-inositol	+ 61° w	207 - 208 °C
( 6 ) L-2-O-Methyl-chiro-inositol ( Quebrachitol )	- 80° w	191 °C
( 7 ) D-3-O-Methyl-chiro-inositol ( 3-O-Methyl-D-(+)-pinitol )	+ 66° w	187 °C
( 8 ) L-3-O-Methyl-chiro-inositol ( 3-O-Methyl-L-(-)-pinitol )	- 65° w	186 °C

เมื่อนำสาร 8 ไปวัดค่า specific optical rotation , [  $\alpha$  ]<sub>D</sub><sup>23</sup> พบว่าวัดค่าได้เท่ากับ + 72.4 ° w ( c 2.7, H<sub>2</sub>O ) ซึ่งจะเห็นว่ามีความใกล้เคียงกับค่า specific optical rotation ของ



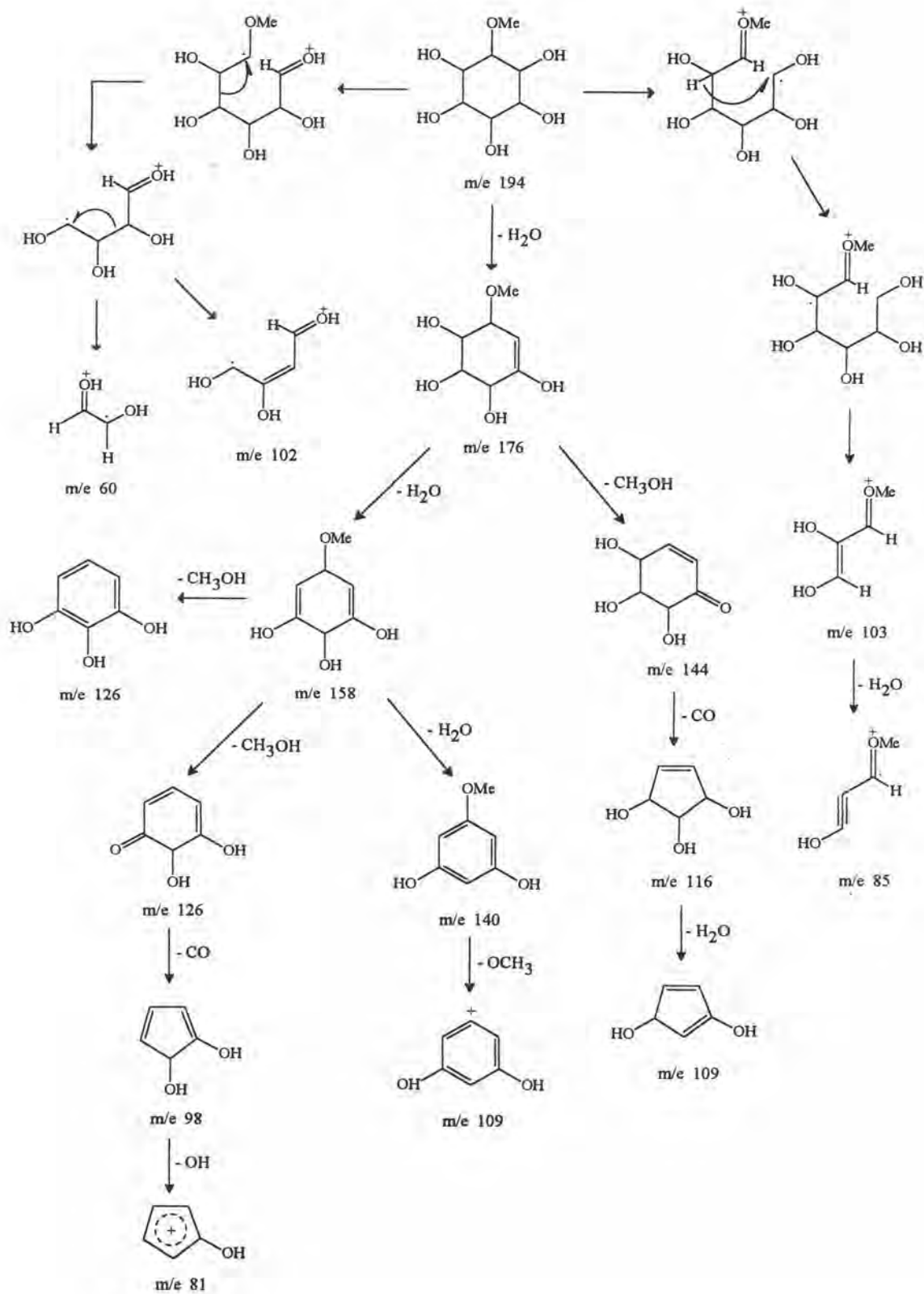
3-O-Methyl-D-(+)-pinitol และเมื่อดูจุดหลอมเหลวของสาร 8 กับ 3-O-Methyl-D-(+)-pinitol พบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกันอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 8 กับ 3-O-Methyl-D-(+)-pinitol จะได้ดังแสดงในตารางที่ 28

ตารางที่ 28 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 8 กับ 3-O-Methyl-D-(+)-pinitol

ตำแหน่ง ของ คาร์บอน	ค่าเคมีคัลชิฟท์ (chemical shift, ppm)	
	สาร 8	3-O-Methyl-D-(+)-pinitol (54)
C - 1	72.02	71.7
C - 2	70.18	69.8
C - 3	83.79	82.5
C - 4	72.68	72.1
C - 5	71.05	70.6
C - 6	72.47	71.4
-OCH <sub>3</sub>	59.69	59.4

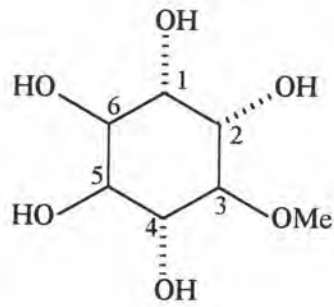
สำหรับข้อมูลทางแมสสเปกตรัมของสาร 8 จะเห็นว่าไม่พบไอออนเชิงโมเลกุล เนื่องจากสาร 8 มีการสูญเสีย H<sub>2</sub>O ได้ง่าย จึงทำให้ไม่เห็นไอออนเชิงโมเลกุล แต่ยังมีชิ้นส่วนของ การแตกมวลคือที่ m/e 176, 158, 144, 140, 126, 109, 98 และ 97 (รูปที่ 58) ซึ่งรูปแบบการแตกตัวของสาร 8 ได้แสดงในแผนภาพที่ 3

แผนภาพที่ 3 แสดงรูปแบบการแตกตัวของ สาร 8





จากข้อมูลทางสเปกโทสโกปีทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่าสาร 8 น่าจะเป็น 3-O-Methyl-D-(+)-pinitol หรือ D-3-O-Methyl-chiro-inositol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



### 9. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร 9

สาร 9 มีลักษณะเป็นผลึกเข็มเล็กสีขาวหนัก 0.0164 กรัม ( $1.6 \times 10^{-2}$  % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเมทานอล) จุดหลอมเหลว 221 - 223 องศาเซลเซียส มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.54 (ซิลิกาเจล : คลอโรฟอร์ม) สาร 9 ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเมทานอล ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 25 : 75 และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเอทานอลร้อน ซึ่งจากการทดสอบทางเคมีพบว่า สาร 9 จะให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, 2,4 - DNP และ  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  แสดงว่าสาร 9 ไม่ใช่สารประกอบประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ ไม่มีหมู่คาร์บอนิล และเป็นสารที่อิมิตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 59) แสดงแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ไฮดรอกซิลที่ความถี่ 3650 - 3010 เซนติเมตร<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังแสดงแถบการดูดกลืนแสงของ C-O สันแบบยืดที่ความถี่ 1196 - 1002 เซนติเมตร<sup>-1</sup> ซึ่งเป็นพีกที่กว้าง (broad) ซึ่งข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร 9 แสดงดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 แสดงแถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 9

แถบการดูดกลืนแสง (เซนติเมตร <sup>-1</sup> )	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3650 - 3010	สูง	O-H สันแบบยืด ของ R-OH
2920	ปานกลาง	C-H สันแบบยืดของ CH
1446 - 1371	ปานกลาง	O-H สันแบบงอ
1196 - 1002	สูง	C-O สันแบบยืด

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 60) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนของหมู่เมไธนที่ติดอยู่กับหมู่ไฮดรอกซิลที่ค่า chemical shift ในช่วง 2.8 - 4.6 ppm

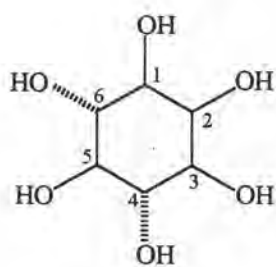
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 61) พบสัญญาณของคาร์บอน 4 สัญญาณ และผลจากการทำ DEPT 90 (รูปที่ 62) แสดงสัญญาณของคาร์บอนที่เป็น CH พบว่าเป็นเมไธนคาร์บอน (-CH-) ทั้ง 4 สัญญาณ ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าสัญญาณที่ 71.81 และ 72.71 ppm มีความเข้มสูงเป็นสองเท่า ซึ่งน่าจะเกิดจากการซ้อนทับกันของ 2 สัญญาณ

ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าสาร 9 เป็นโมเลกุลที่สมมาตรกัน มีเมไธน์คาร์บอน (-CH-) ในโมเลกุล 6 หมู่ และพบว่ามี chemical shift อยู่ในช่วง 70 - 80 ppm แสดงว่าต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซี (-OH)

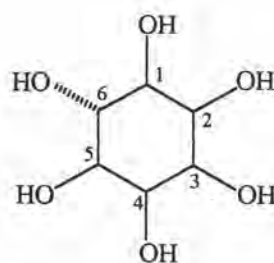
แมสสเปกตรัม (รูปที่ 63) จะเห็นว่าจะไม่พบไอออนเชิงโมเลกุล ( $M^+$ ) เนื่องจากสาร 9 นี้เป็นสารที่มีหมู่ไฮดรอกซีมาก จึงเกิดการสูญเสีย  $H_2O$  ได้ง่ายทำให้ไม่เห็นไอออนเชิงโมเลกุล แต่จากข้อมูลทางเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมพบว่ามีหมู่เมไธน์ 6 หมู่ ซึ่งหมู่เมไธน์แต่ละหมู่ต่ออยู่กับหมู่ไฮดรอกซี จึงสามารถคำนวณสูตรโมเลกุลได้เป็น  $C_6H_{12}O_6$  ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 180 คำนวณความไม่อิ่มตัว (double bond equivalent, DBE) ได้เท่ากับ 1

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น พบว่าสาร 9 น่าจะเป็นสารประกอบประเภท cyclohexanols ซึ่ง cyclohexanols นั้นมีไอโซเมอร์ (isomer) อยู่หลายแบบ แต่ไอโซเมอร์ที่มีลักษณะเป็นโมเลกุลที่สมมาตรกันนั้นมี 2 ไอโซเมอร์ จึงได้ทำการยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 9 โดยการเปรียบเทียบข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมกับ myo-inositol และ epi-inositol (54) ดังแสดงในตารางที่ 30

สูตรโครงสร้างของ myo-inositol และ epi-inositol เป็นดังนี้



myo - inositol



epi - inositol

ตารางที่ 30 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 9, myo-inositol และ epi-inositol

ค่าเคมีคัลชิฟท์ของสาร ( chemical shift , ppm )		
สาร 9	myo-inositol (54)	epi-inositol (54)
71.81 *	71.1 *	66.8
72.59	72.2	70.1
72.71 *	72.4 *	71.7 *
75.18	74.3	74.5 *

หมายเหตุ \* ความเข้มของสัญญาณเป็นสองเท่า

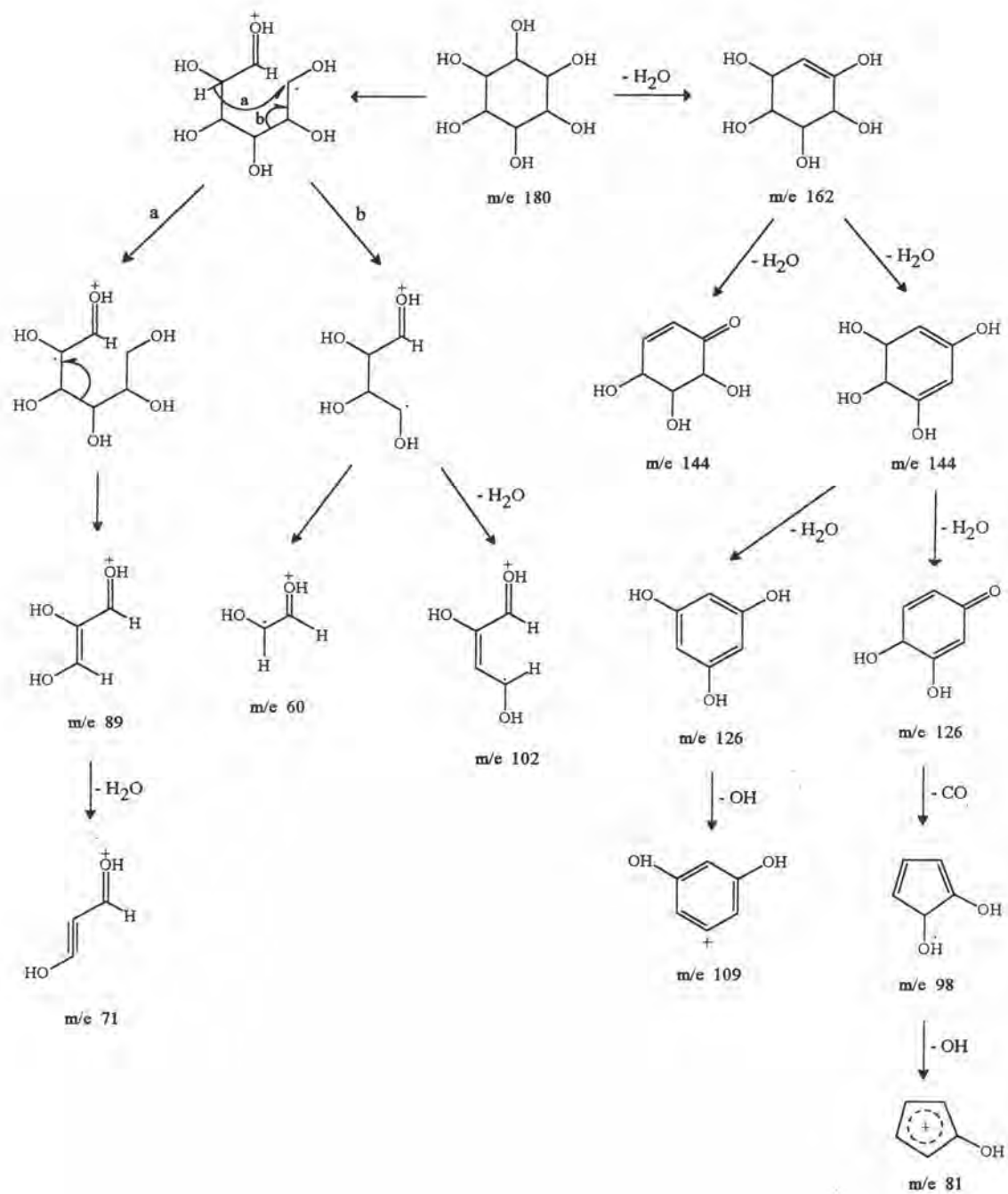
เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมแล้วพบว่าค่า chemical shift ของสาร 9 ใกล้เคียงกับค่า chemical shift ของ myo-inositol ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าสาร 9 น่าจะเป็น myo-inositol ซึ่งสามารถ label ตำแหน่งของคาร์บอนของสาร 9 ได้โดยเปรียบเทียบ กับ myo-inositol ดังตารางที่ 31

ตารางที่ 31 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 9 กับ myo-inositol

ตำแหน่งของ คาร์บอน	ค่าเคมีคัลชิฟท์ ( chemical shift , ppm )	
	สาร 9	myo-inositol (54)
C - 1	72.71	72.4
C - 2	72.59	72.2
C - 3	72.71	72.4
C - 4	71.81	71.1
C - 5	75.18	74.3
C - 6	71.81	71.1

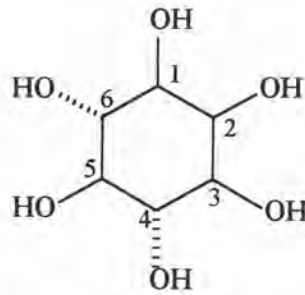
สำหรับข้อมูลทางแมสสเปกตรัมของสาร 9 จะไม่พบไอออนเชิงโมเลกุล เนื่องจากสาร 9 มีการสูญเสีย  $H_2O$  ได้ง่าย จึงทำให้ไม่เห็นไอออนเชิงโมเลกุล แต่ยังมีชิ้นส่วนของ การแตกมวลคือที่  $m/e$  144 , 126 , 109 , 102 , 89 , 71 และ 60 ( รูปที่ 63 ) ซึ่งรูปแบบ การแตกตัวของสาร 9 ได้แสดงในแผนภาพที่ 4

แผนภาพที่ 4 แสดงรูปแบบการแตกตัวของ สาร 9





จากข้อมูลทางสเปกโทสโกปีทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่าสาร 9 น่าจะเป็น myo-  
inositol ซึ่ง myo-inositol นี้จะมีรสหวาน ไม่สามารถหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ได้ (optical  
inactive) เป็น rat antispectacled eye factor , mouse antialopecia factor และเป็น growth  
factor สำหรับสัตว์และจุลินทรีย์ (55) สูตรโครงสร้างของ myo-inositol เป็นดังนี้



### การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

1. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*)  
แบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) และเชื้อรา (*C. albicans*)

การทดสอบนี้ เป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก  
แบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อรา เมื่อได้รับสารที่สกัดได้จากดอกนนทรี ซึ่งแสดงดังตารางที่ 32

ตารางที่ 32 แสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และ  
เชื้อรา เมื่อได้รับสารที่สกัดได้จากดอกนนทรี

สาร	เชื้อ	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g}/\text{disc.}$ )	$\varnothing$ Inhibition zone (cm)			
			1	2	3	$\bar{X}$
สาร 5 (5.1 mg)	<i>S. aureus</i>	10	-	-	-	-
		100	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	10	-	-	-	-
		100	-	-	-	-
	<i>C. albicans</i>	10	-	-	-	-
		100	-	-	-	-
สาร 6 (5.1 mg)	<i>S. aureus</i>	10	-	-	-	-
		100	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	10	-	-	-	-
		100	-	-	-	-
	<i>C. albicans</i>	10	0.65	0.75	0.65	0.68
		100	0.85	0.70	0.75	0.77

ตารางที่ 32 แสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และ เชื้อรา เมื่อได้รับสารที่สกัดได้จากดอกนนทรี ( ต่อ )

สาร	เชื้อ	ความเข้มข้น ( µg/disc. )	Ø inhibition zone ( cm )			
			1	2	3	$\bar{X}$
สาร Z ( 4.9 mg )	S. aureus	10	-	-	-	-
		100	-	-	-	-
	E. coli	10	-	-	-	-
		100	-	-	-	-
	C. albicans	10	0.70	0.65	0.65	0.68
		100	0.65	0.70	0.70	0.68
สาร 8 ( 4.9 mg )	S. aureus	10	-	-	-	-
		100	-	-	-	-
	E. coli	10	0.75	0.65	0.70	0.70
		100	0.75	0.70	0.70	0.73
	C. albicans	10	-	-	-	-
		100	-	-	-	-

จากผลการทดสอบพบว่า สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ( E. coli ) คือ สาร 8 ( 3-O-Methyl-D-(+)-pinitol ) และสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา ( C. albicans ) คือ สาร 6 ( ของผสมสเตอรอยด์ไกลโคไซด์ ) และสาร Z ( bergenin ) ซึ่งคาดว่าสารเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้