

2.1 การทดลอง2.1 Column chromatography

ใช้ silica gel 60 art 7734 for column chromatography และ aluminium oxide 90, standardised for chromatographic adsorption ของบริษัท E. Merck, Darmstadt. เป็น adsorbent ส่วน column ที่ใช้เป็น column แก้วขนาดสม่ำเสมอ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม. และยาว 120 ซม. ปลายข้างหนึ่งเร็วเล็กต่อกับสายยางที่มีคลิป (clip) สำหรับเปิดปิด ก่อนบรรจุ adsorbent ใส่สำลีเล็กน้อยเพื่อป้องกันไม่ให้ adsorbent ไหลออกไปกับ solvent ใส่ solvent ลงไปประมาณ 1 ใน 4 ของ column แก้ว แล้วค่อย ๆ ใส่ adsorbent ที่ผสมกับ solvent ที่ได้บรรจุไว้ในกรวยแยกลงไปตามปริมาณที่ต้องการ พร้อมกับเปิดคลิปให้ solvent ไหลออก เมื่อระดับของ solvent ลดลงอยู่เหนือผิว adsorbent ประมาณ 1 ซม. จึงปิดคลิป แล้วเทสารที่ต้องการแยกลงไป

กรณีที่ใช้ alumina เป็น adsorbent บรรจุ column ด้วยวิธี dry packing โดยใส่ solvent ลงไปประมาณ 1 ใน 2 ของ column แก้ว แล้วค่อย ๆ เท adsorbent ตามปริมาณที่ต้องการผ่านกรวยกรองลงไป ใน column ทั้งไว้ประมาณ 3 ชั่วโมงก่อนที่จะนำไปใช้งาน

2.1.2 Thin layer chromatography (T.L.C)

ใช้ silica gel G.F. 254 (Type 60) for thin layer chromatography ของบริษัท E. Merck, Darmstadt. เป็น adsorbent เตรียม chromatoplates โดยใช้ adsorbent 40 กรัมต่อน้ำกลั่น 78 ซม.³ เขย่าให้เข้ากัน (1 - 2 นาที) เทใส่ spreader ที่ปรับให้ adsorbent มีความหนา 0.25 มม. จะได้ chromatoplates ขนาด 20 x 20 ซม. จำนวน 5 แผ่น ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วนำมา activate โดยอบที่อุณหภูมิ 100 - 110° ประมาณ 30 นาที เก็บไว้ใน desiccator เพื่อเตรียมไว้สำหรับทำ T.L.C. ต่อไป



2.1.3 Solvent system

solvent system ที่ใช้ตามลำดับดังนี้คือ n-hexane, สารละลายผสมระหว่าง chloroform : n-hexane ในอัตราส่วน 1:4, 1:1, และ 3:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) ตามลำดับ, chloroform, สารละลายผสมระหว่าง methyl alcohol : chloroform ในอัตราส่วน 1:19 และ 1:9 (ปริมาตร:ปริมาตร) ตามลำดับ

2.1.4 การเตรียม reagents ที่ใช้ในการทดสอบ⁴

2.1.4.1 Dragendorff's reagent

ละลาย bismuth nitrate (8 กรัม) ใน concentrated nitric acid (12 ซม.³) เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลาย potassium iodide (27.2 กรัม) ในน้ำกลั่น (50 ซม.³) แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ซม.³

2.1.4.2 Kraut's reagent

ละลาย bismuth nitrate (8 กรัม) ใน concentrated nitric acid (20 ซม.³) เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลายของ potassium iodide (27.2 กรัม) ในน้ำกลั่น (50 ซม.³) แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ซม.³

2.1.4.3 Marme's reagent

ละลาย cadmium iodide (10 กรัม) ในน้ำกลั่น (50 ซม.³) เทสารละลายที่เตรียมไว้ลงในสารละลายของ potassium iodide (5 กรัม) ในน้ำกลั่น (20 ซม.³) แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ซม.³

2.1.4.4 Mayer's reagent

ละลาย mercuric chloride (1.3 กรัม) ในน้ำกลั่น (60 ซม.³) เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลายของ potassium iodide (5 กรัม) ในน้ำกลั่น (10 ซม.³) แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ซม.³

2.1.4.5 Valser's reagent

ละลาย red mercuric iodide (14 กรัม) ในสารละลายของ potassium iodide (10 กรัม) ในน้ำกลั่น (80 ซม.³) แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ ปริมาตร 100 ซม.³

2.1.4.6 Wagner's reagent

ละลาย potassium iodide (2 กรัม) ในน้ำกลั่น (50 ซม.³) เติม iodine (1.27 กรัม) ลงในสารละลายที่เตรียมได้ คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ ปริมาตร 100 ซม.³

2.1.4.7 Dragendorff's spray reagent

สารละลาย ก : ละลาย bismuth nitrate (0.85 กรัม) ลงในสารละลายของ glacial acetic acid : น้ำ (10:40) โดยปริมาตร

สารละลาย ข : ละลาย potassium iodide (8 กรัม) ในน้ำกลั่น (20 ซม.³) เมื่อต้องการใช้ให้ผสมสารละลาย ก และ ข อย่างละ 1 ซม.³) เข้าด้วยกันใส่ glacial acetic acid ลงไป (4 ซม.³) และน้ำกลั่น (20 ซม.³)

2.1.4.8 Functional groups reagents

การเตรียมสารละลายเพื่อตรวจสอบ carbonyl group, unsaturation, phenolic group ของสารได้ทำตามวิธีมาตรฐานที่ไว้กันอยู่ทั่ว ๆ ไป

2.1.5 Solvents

ได้แก่ n-hexane (b.p. 60-80), chloroform, methyl alcohol ฯลฯ ถ้าหากไม่ใช่ชนิด reagent grade ต้องนำมากลั่นก่อนใช้ ส่วน solvent ที่ใช้กับ spectrophotometer ต้องเป็น analar grade ทั้งสิ้น

2.1.6 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.1.6.1 Ultraviolet spectrophotometer ใช้เครื่อง Varian - Techtron UV - VIS spectrophotometer model 635 ของบริษัท Varian - Techtron Pty. Ltd, Melbourne, Australia.

2.1.6.2 Infrared spectrophotometer ใช้เครื่อง microspec ของ Perkin - Elmer 283 grating spectrophotometer ของบริษัท Perkin - Elmer (สารที่จะหา IR absorption ต้องนำไปทำเป็น KBr pellets การตรวจสอบลักษณะ absorption peaks ของสารนั้นใช้วิธีเปรียบเทียบกับ standard characteristic peaks ที่มีอยู่ใน literature^{7,8)}

2.1.6.3 Nuclear magnetic resonance ใช้เครื่อง Perkin - Elmer NMR 220 MHz ส่งไปทำที่ Liverpool University, Liverpool, England การตรวจสอบลักษณะ absorption peaks ของสารนั้นใช้วิธีเปรียบเทียบกับ standard characteristic peaks ที่มีอยู่ใน literature⁸.

2.1.6.4 Mass spectrometer

ส่งไปทำที่ Liverpool University, Liverpool, England

2.1.6.5 การหาจุดหลอมเหลว (Melting points, mp) ใช้เครื่อง Fisher - Johns melting point apparatus

2.1.6.6 การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ธาตุ

ส่งไปทำการวิเคราะห์ที่ Liverpool University, England และที่กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประเทศไทย

2.2 การสกัด (Extraction)

นำใบเขยตายสดที่บดละเอียด 1.3 กก. มาสกัดด้วย methyl alcohol โดยวิธีแช่สารไว้ในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาครั้งละ 3 วัน ทำซ้ำ ๆ กัน 3 ครั้ง กรองสารละลายที่สกัดได้ แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกจนเหลือปริมาตร 150 - 200 ซม.³ เติลสารละลายที่เหลืออยู่ลงใน beaker ตั้งทิ้งไว้โดยใช้พัดลมเป่าจนแห้ง ผลที่สุดจะได้สารที่มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวมืด นำเอา crude ที่ได้ไปละลายใน glacial acetic acid คนจนกระทั่งสารละลายเกือบเป็นเนื้อเดียวกัน

แล้วเทลงในน้ำอุ่นทำให้มีเปอร์เซ็นต์ของ acetic acid ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ นำมากรองผ่าน diatomaceous earth จะได้สารละลายสีน้ำตาลใส นำสารละลายกรดที่ได้ไปทดสอบกับ alkaloid reagents ได้แก่ Dragendorff's reagent, Kraut's reagent, Marme's reagent, Mayer's reagent, Valser's reagent และ Wagner's reagent ให้ positive test กับ reagents ดังกล่าวทุกชนิด นำสารละลายดังกล่าวมาทำให้เป็นด่างด้วยสารละลาย ammonia เข้มข้น ปรับ pH ให้ได้ 7 - 8 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง นำไปสกัดด้วย chloroform หลาย ๆ ครั้งจนกระทั่ง chloroform ที่ใช้สกัดครั้งสุดท้ายให้ negative test กับ Dragendorff's spray reagent นำ chloroform ที่สกัดได้รวมกัน ทำให้ปราศจากน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate ประมาณ 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว กรองระเหยแยกเอาตัวทำละลายออก และทำให้แห้งบน water bath ได้ crude ที่มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลอมแดง ซึ่งเหมาะสมสำหรับการทดลองต่อไป

2.3 การแยกสาร (Separation)

ละลายสารที่ได้จาก 2.2 (3.2 กรัม) ใน chloroform (50 ซม.³) แล้วนำสารละลายดังกล่าวไปใส่ใน silica gel (ประมาณ 10 กรัม) ระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง evaporator จนกระทั่งตัวทำละลายแห้งจะได้ผง silica gel สีเหลืองอมแดง นำมาเทลงใน column chromatography ซึ่งมี silica gel (200 กรัม) เป็น adsorbent แล้ว elute column ด้วย solvent system ตามในหัวข้อ 2.1.3

เก็บ eluent ครั้งละ 250 ซม.³ นำแต่ละ fraction ที่ได้ไปกลั่นไล่ตัวทำละลายออกจนเหลือสารในขวดกลั่นประมาณ 15 - 20 ซม.³ ถ่ายใส่ขวดรูปกรวยขนาด 50 ซม.³ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก แยกสารออกเป็นพวก ๆ โดยการทดสอบด้วย T.L.C. ได้ดังตารางที่ 1

ส่วน column ที่ใช้ alumina เป็น adsorbent ได้ทำเช่นเดียวกัน แต่เก็บ eluent ครั้งละ 100 ซม.³ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ผลของการแยก crude extract โดย column chromatography
(silica gel)

Eluent	Fractions (fraction ละ 250ซม. ³)	ลักษณะของสารและจุดหลอมเหลว
n-hexane	1 - 4	semisolid ปนน้ำมันสีเหลือง
	5 - 7	น้ำมันสีเหลือง
	8 - 10	น้ำมันไม่มีสี
chloroform:n-hexane 1:4 โดยปริมาตร	11 - 20	น้ำมันสีเหลือง
chloroform:n-hexane 1:1 โดยปริมาตร	21 - 25	น้ำมันสีน้ำตาล
	26 - 31	ผลึกรูปเข็มสีขาวปนน้ำมันสีน้ำตาล m.p.123-129°
	32 - 40	ผลึกรูปเข็มสีขาว เล็กน้อยปนน้ำมันสีเหลือง
chloroform:n-hexane 3:1 โดยปริมาตร	41 - 45	น้ำมันสีเหลือง
	46 - 50	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง ในน้ำมันสีเหลือง เล็กน้อย m.p. 170-174°
	51 - 60	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
chloroform	61 - 70	น้ำมันสีน้ำตาล เข้มปนผลึกรูปเข็มสีเหลือง เล็กน้อย

หมายเหตุ จากตารางที่แสดงปริมาณของสารที่ได้และจำนวน fraction ที่มีสารออกมาไม่ได้เป็นไปตามที่กล่าวนี้ทุก column แต่เปลี่ยนแปลงไปตามขนาดของ column ที่ใช้ และปริมาณของสารและใช้ T.L.C. ติดตามสารใน fraction ต่างๆและรวมเข้าเป็นพวกเดียวกันได้

ตารางที่ 2 ผลของการแยก crude extract โดย column chromatography
(alumina)

Eluent	Fraction (fraction ละ 250 ³)	ลักษณะของสารและจุดหลอมเหลว
n-hexane	1 - 3	semisolid ปนน้ำมันสีเหลือง
	4 - 6	น้ำมันสีเหลือง
	7 - 10	น้ำมันไม่มีสี
chloroform:n-hexane 1:4 โดยปริมาตร	11 - 20	น้ำมันสีเหลือง
	21 - 23	ผลึกรูปเข็มสีขาวปนน้ำมันสีเหลือง m.p. 125 - 129°
	23 - 25	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
chloroform:n-hexane 1:1 โดยปริมาตร	26 - 29	น้ำมันสีน้ำตาล
	30 - 32	น้ำมันสีน้ำตาลปนเหลือง
	33 - 38	ผลึกสีขาวปนน้ำมันสีเหลือง m.p. 145.5-148°
	39 - 45	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
chloroform:n-hexane 3:1 โดยปริมาตร	46 - 50	น้ำมันสีเหลือง
chloroform	51 - 60	น้ำมันสีเหลือง

หมายเหตุ จากการทดลองปรากฏว่า สารสีเหลืองไม่สามารถที่จะทำการแยกออกมาจาก column
ได้ แม้ว่าจะใช้ solvent ที่เป็น methyl alcohol แล้วก็ตาม

2.4 การทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)

จาก silica gel column ใน fraction ที่ 26 - 31 เมื่อใช้สารละลายผลผสมระหว่าง chloroform : n-hexane (1:1 โดยปริมาตร) เป็น eluent ได้สารตกผลึกออกมาเป็นรูปเข็ม ทดสอบด้วย T.L.C. พบว่ายังมีน้ำมันและสารอีกตัวหนึ่งเจือปนอยู่ นำสารใน fraction นี้ทั้งหมดมารวมกันแล้วแยกโดยวิธี preparative thin layer chromatography ใช้ chloroform : n-hexane (3:1 โดยปริมาตร) เป็นตัวทำละลายสำหรับแยก ขูดเอาสารที่มีค่า Rf value เท่ากันมาสกัดด้วยสารละลายผลผสมระหว่าง methyl alcohol : chloroform (1:19 โดยปริมาตร) ทำสารแต่ละสารให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกผลึกใน n-hexane และทดสอบด้วย T.L.C. จนไม่มีสารอื่น ๆ เจือปนในที่สุดได้สารมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว m.p. 131 - 132° (หนัก 0.0173 กรัม 0.54 % ของ crude extract) กำหนดให้เป็นสาร A ส่วนอีกสารหนึ่งมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว m.p. 139 - 140° แต่มีปริมาณน้อยมาก จึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างได้

สารใน fraction ที่ 46 - 50 เมื่อใช้สารละลายผลผสมระหว่าง chloroform : n-hexane (3:1 โดยปริมาตร) เป็น eluent ได้สารตกผลึกออกมาเป็นรูปเข็มสีเหลือง จากการทดสอบด้วย T.L.C. พบว่ามีน้ำมันเจือปนอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกผลึกหลาย ๆ ครั้งในสารละลายผลผสมระหว่าง chloroform : n-hexane (1:1 โดยปริมาตร) และทดสอบด้วย T.L.C. จนไม่มีสารอื่น ๆ เจือปน ได้สารมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง m.p. 176 - 178° (หนัก 0.0917 กรัม 2.87 % ของ crude extract) กำหนดให้เป็นสาร B

ส่วนสารที่ได้จาก alumina column ใน fraction ที่ 33 - 38 เมื่อใช้สารละลายผลผสมระหว่าง chloroform : n-hexane (1:1 โดยปริมาตร) เป็น eluent ได้สารตกผลึกออกมา แต่ T.L.C. แสดงให้ทราบว่ายังมีน้ำมันเจือปนอยู่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีตกผลึกหลาย ๆ ครั้งในสารละลายผลผสมระหว่าง chloroform : n-hexane (1:3 โดยปริมาตร) และทดสอบด้วย T.L.C. จนไม่มีสารอื่น ๆ เจือปน ได้สารมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวใส m.p. 159 - 160° (หนัก 0.0782 กรัม 6.14 % ของ crude extract) กำหนดให้เป็นสาร C

2.5 การตรวจสอบลักษณะของสารที่แยกออกได้

2.5.1 การตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและ colour reactions ของสาร A

สาร A (m.p. 131 - 132^o) ละลายได้ดีใน n-hexane ร้อน, benzene, chloroform, acetone, ethyl alcohol, methyl alcohol, และ glacial acetic acid แต่ละลายได้เล็กน้อยใน n-hexane เย็น, benzene เย็น และ ether สาร A ฟอกสีสารละลายของ KMnO_4 และให้สีกับ Dragendorff's spray reagent

Rf 0.42 (ใน chloroform : n-hexane 3:1 โดยปริมาตร)

Mol. wt. 199 (Mass spectrum)

Analysis : Found C = 72.54 %, H = 4.91 %, N = 6.82 %

Calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$ C = 72.35 %, H = 4.55 %, N = 7.03 %

UV spectrum ให้ λ_{max} ethyl alcohol 329.6 nm log ϵ 1.5, 310.1 nm log ϵ 1.5
236.4 nm log ϵ 2.4, 211 nm log ϵ 2.3

ตามรูปที่ 1 หน้า 11

IR spectrum ให้ ν_{max} KBr, cm^{-1} ตามรูปที่ 2 หน้า 12

ตารางที่ 3 หน้า 13

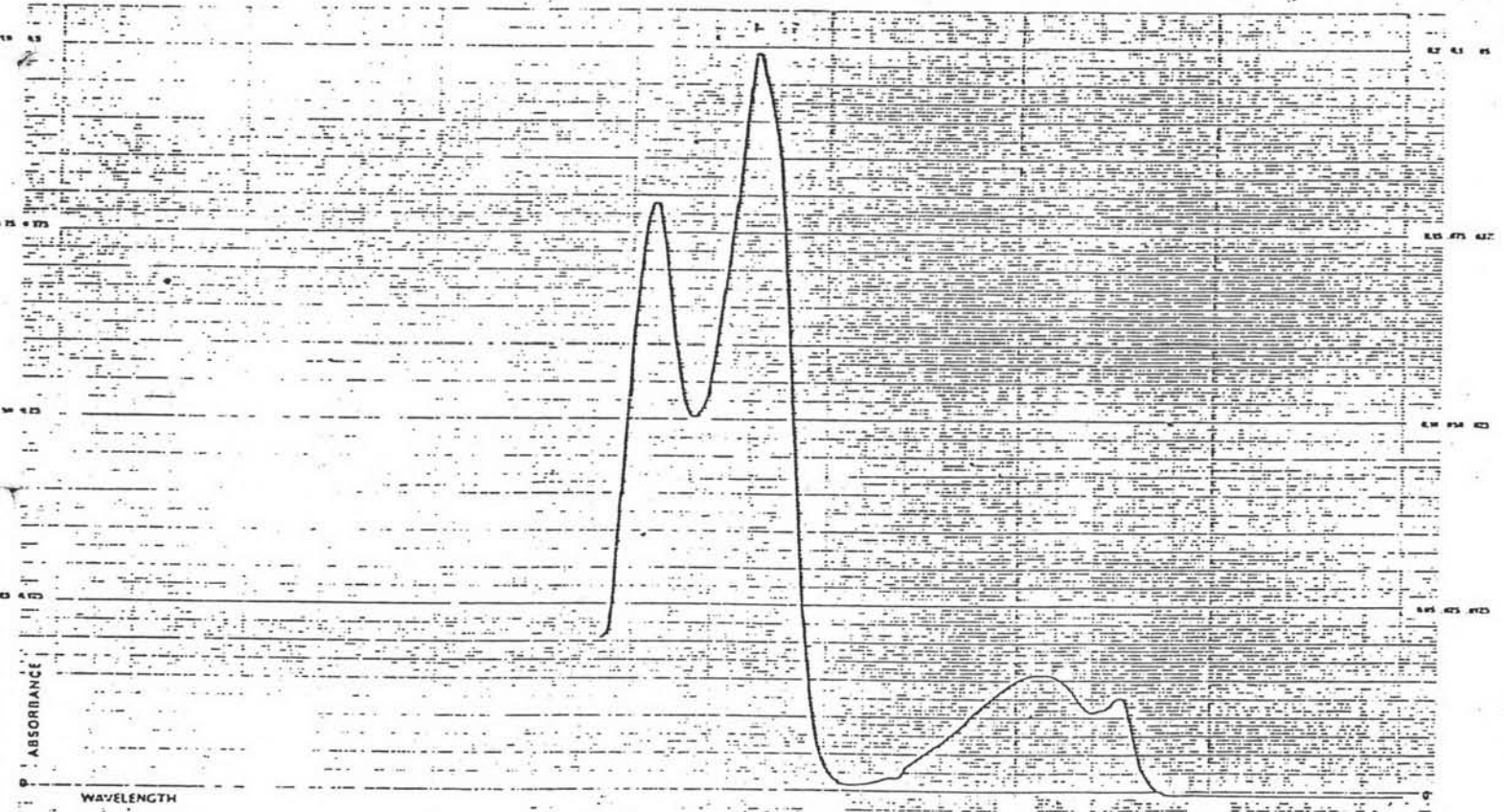
$^1\text{H-NMR}$ spectrum (ใน CDCl_3) ตามรูปที่ 3 หน้า 15

ตารางที่ 4 หน้า 16

รูปที่ 1 UV spectrum ของสารประกอบ A m.p. 131-132°

VARIAN TECHTRON

Part No. 71-100014-00



WAVELENGTH PRESENTATION

nm/cm	1	2	5	10	20
nm/fs	25	75	125	150	200
START 1	[]				
FINISH 1	[]				
SCAN SPEED	10	25	50	100	
SPLIT WIDTH	02	03	04	08	

PHOTOMETRIC PRESENTATION (Abs fs)

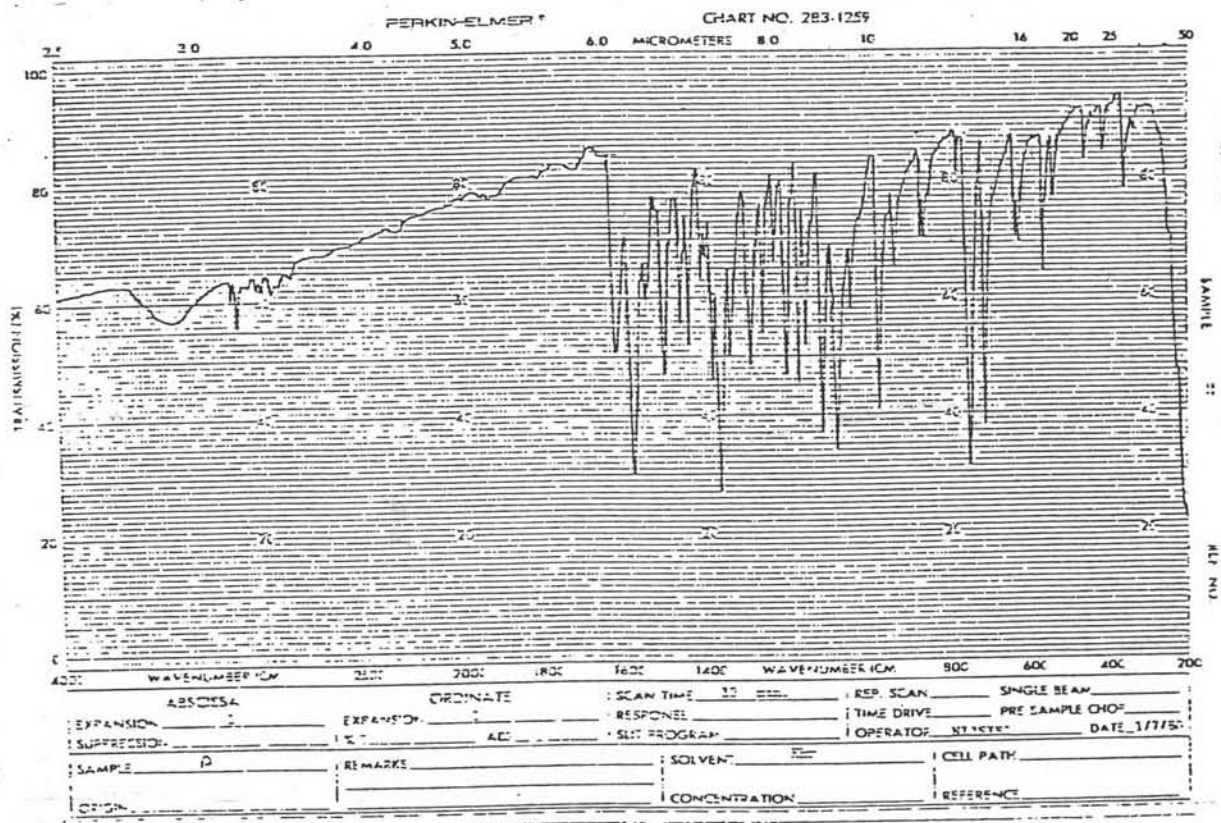
METER RANGE	RECORDER RANGE					
0-1	A	B	C	D	E	F
0-5	20	40	60	80	100	
0-10	40	80	120	160	200	
0-20	80	160	240	320	400	

Sample & Formulas

Concentration	Date	Ref. No.
Reference	Operator	P
Path Length		



รูปที่ 2 IR spectrum ของสารประกอบ A m.p. 131-132°



ตารางที่ 3 IR absorption peaks ของสารประกอบ A m.p. 131 - 132°

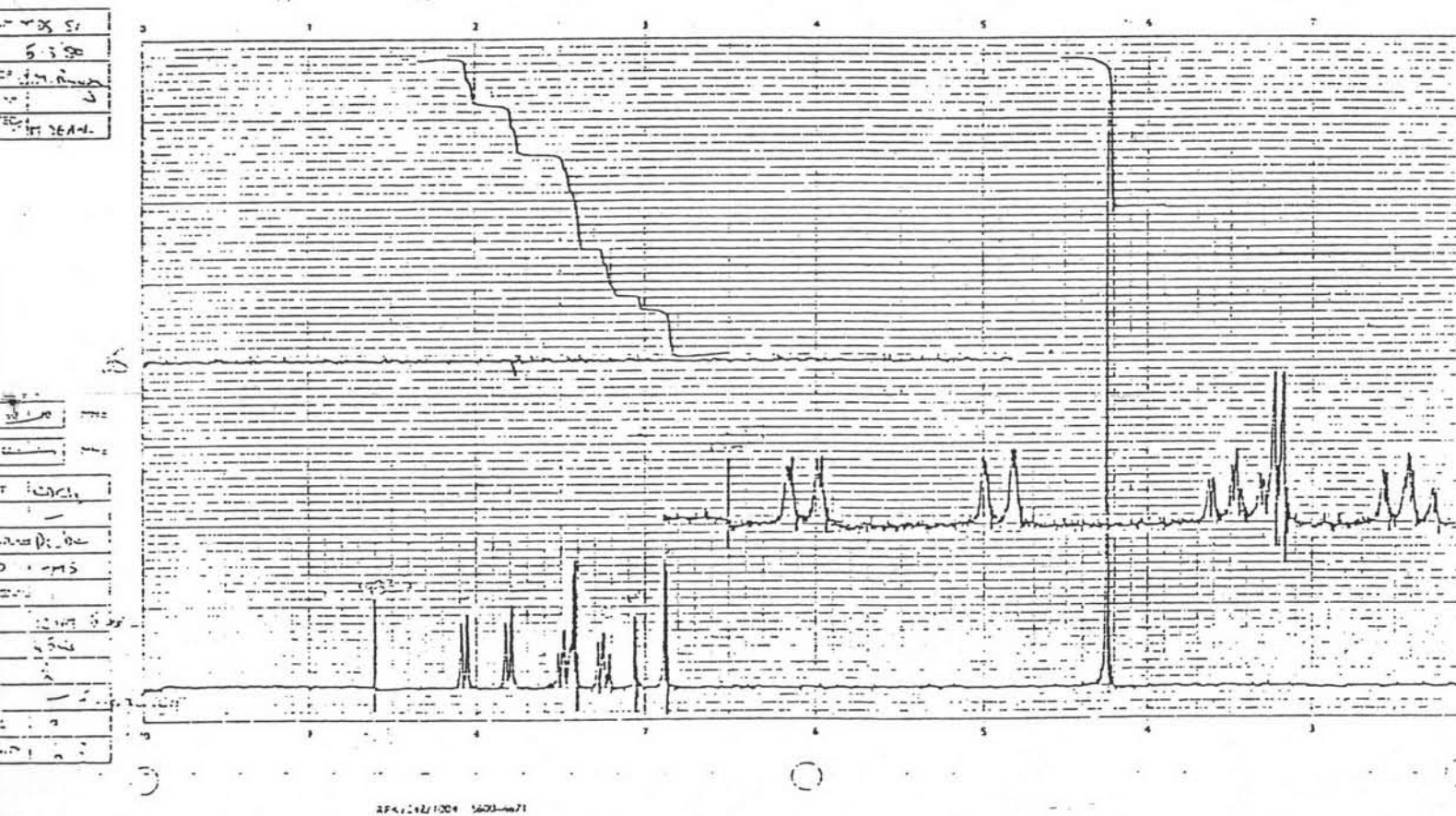
Frequency (cm^{-1})	Intensity	Assignments
3160	w	=CH- stretching vibration
3130	w	(furan ring)
3040	w	=CH- stretching vibration
3010	w	(phenyl ring)
2960	w	-CH ₃ stretching vibration (asymmetric)
2860	w	-CH ₃ stretching vibration (symmetric)
1625	m	Quinoline ring vibration
1580	s	C=C ring stretching vibration (aromatic)
1550	m	C-O vibration (furan ring)
1510	m	
1470	m	-CH ₃ bending vibration (asymmetric)
1450	m	
1420	w	
1410	w	
1390	s	-CH ₃ bending vibration (symmetric)
1370	s	
1345	s	
1300	s	C-N stretching vibration

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Frequency (cm^{-1})	Intensity	Assignments
1265	s	=C-O-C stretching vibration (asymmetric)
1240	m	
1210	s	
1180	s	-CH ₃ rocking vibration
1160	s	=CH- in plane bending vibration (aromatic)
1120	s	
1085	s	=C-O-C stretching vibration (symmetric)
1050	m	
980	s	=CH- in plane bending vibration (1,2
940	m	disubstituted benzene)
875	m	=CH- out of plane bending vibration
865	m	(two adjacent hydrogen)
790	w	=CH- out of plane bending (furan ring)
775	s	=CH- out of plane bending vibration
720	s	(four adjacent hydrogen)

รูปที่ 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ A m.p. $131-132^\circ$

005165



ตารางที่ 4 $^1\text{H-NMR}$ absorption peaks ของสารประกอบ A m.p. 131 - 132 $^{\circ}$

Peak labeled	Position of protons (δ , ppm)	Proton assignments	approximate integrated area (P.U.)	No. of proton
A	4.25	protons of O-CH_3	18.5	3
B	6.90	protons of furan ring at β position	5.5	1
C	7.60	protons of furan ring at α position	6	1
D	7.43	aromatic proton at position 7	6	1
E	7.65	aromatic proton at position 6	5.5	1
F	7.97	aromatic proton at position 8	6	1
G	8.24	aromatic proton at position 5	5.5	1

2.5.2 การตรวจคุณสมบัติทางกายภาพและ colour reaction ของสาร B

สาร B (m.p. $176 - 178^{\circ}$) ละลายได้ดีใน chloroform acetone, ethyl - alcohol, methyl alcohol และ glacial acetic acid แต่ละลายได้เล็กน้อยใน ether สาร B ฟอกสีกับสารละลาย $KMnO_4$ และให้สีกับ Dragendorff's spray reagent และพบว่า

Rf 0.55 (ใน methyl alcohol : chloroform 1:19 โดยปริมาตร)

Mol. wt. 285 (Mass spectrum)

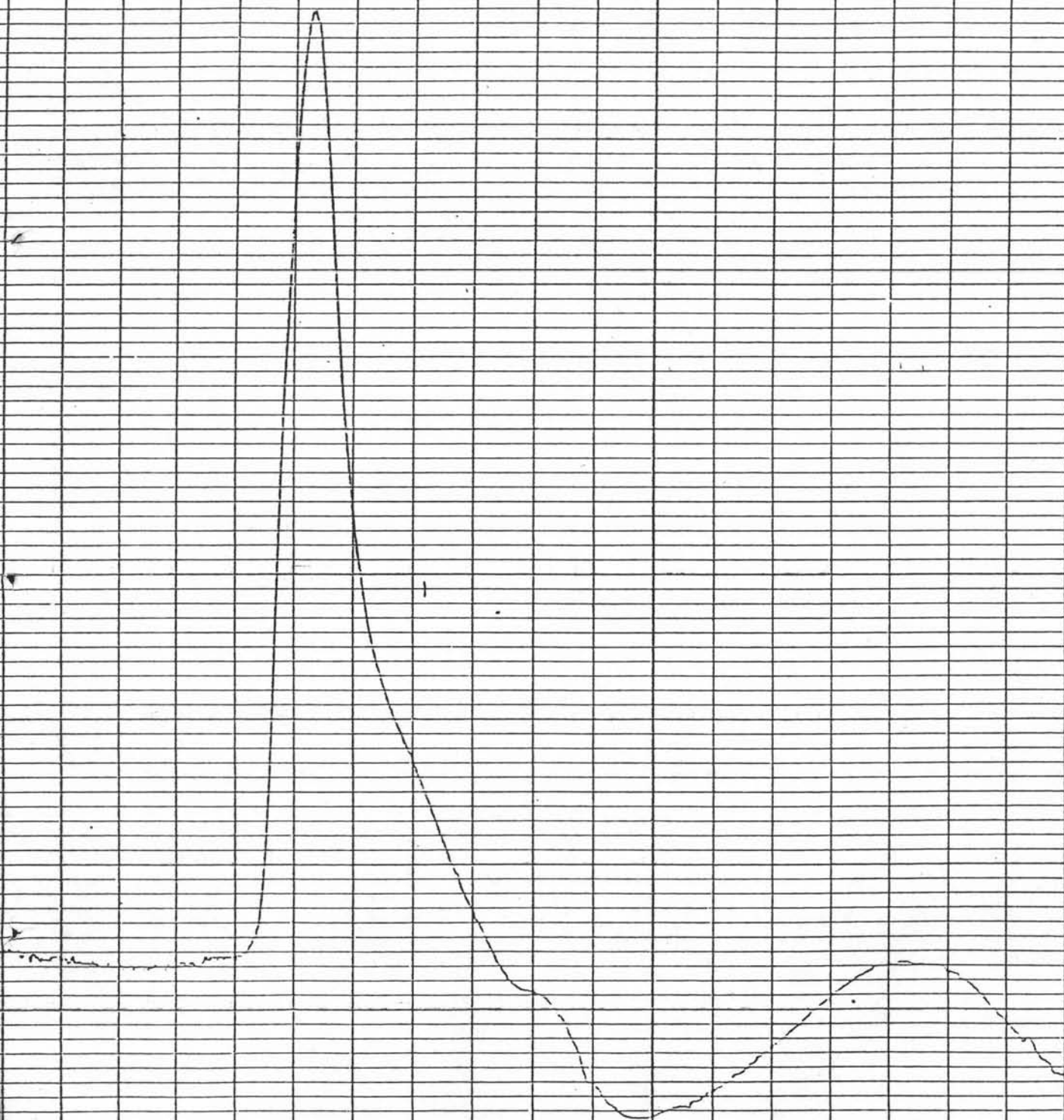
Analysis : Found C = 67.44 %, H = 5.37 %, N = 5.33 %

Calculated for $C_{16}H_{15}O_4N$ C = 67.36 %, H = 5.23 %, N = 4.91 %

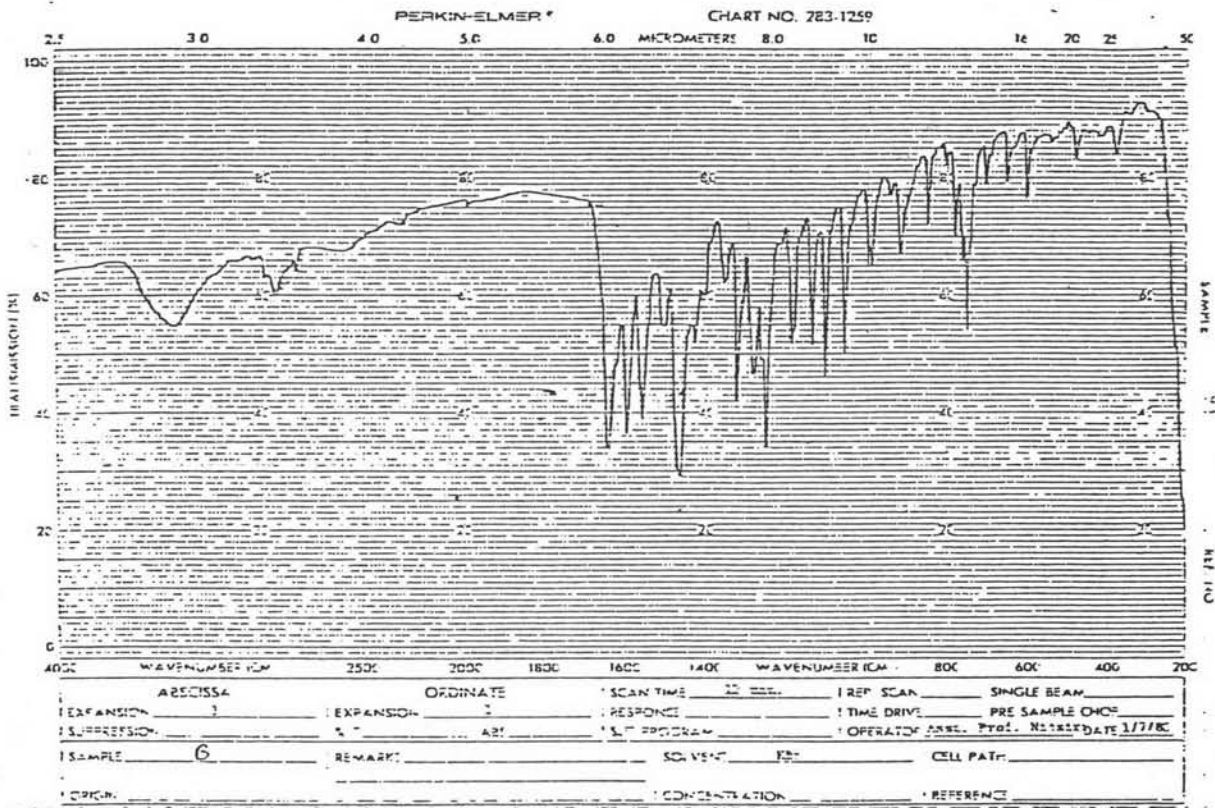
UV spectrum ให้ λ_{max} ethyl alcohol	398 nm log 0.86,	324 nm log 0.78
	277 nm log 1.94	ตามรูปที่ 4 หน้า 18
IR spectrum ให้ ν_{max}^{KBr} , cm^{-1}	ตามรูปที่ 5	หน้า 19
	ตารางที่ 5	หน้า 20
1H -NMR spectrum (ใน $CDCl_3$)	ตามรูปที่ 6	หน้า 22
	ตารางที่ 6	หน้า 23

การตรวจสอบหา functional groups ตาม standard method ปรากฏว่าให้ ตะกอนสีเหลืองส้มเมื่อร้อน กับ 2, 4 - dinitrophenylhydrazine

รูปที่ 4 UV spectrum ของสารประกอบ B m.p. 176-178°



รูปที่ 5 IR spectrum ของสารประกอบ B m.p. 176-178°



ตารางที่ 5 IR absorption peaks ของสารประกอบ B m.p. 176 - 178°

Frequency (cm^{-1})	Intensity	Assignments
3450	m	O-H stretching vibration (hydrogen bonded)
3050	w	=CH- stretching vibration (aromatic)
2995	w	-CH ₃ stretching vibration (asymmetric)
2940	m	
2830	w	-CH ₃ stretching vibration (symmetric)
1645	s	C=O stretching vibration
1600	s	-C=C ring stretching vibration (aromatic)
1560	s	
1465	s	-CH ₃ bending vibration (asymmetric)
1430	m	
1410	m	
1360	w	-CH ₃ bending vibration (asymmetric)
1325	m	
1285	m	=C-O-C stretching vibration (asymmetric)
1255	s	
1190	s	-CH ₃ rocking vibration
1140		=CH- in plane bending vibration (aromatic)
1110		

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Frequency (cm^{-1})	Intensity	Assignments
1060	s	=C-O-C stretching vibration (symmetric)
850	m	=CH- out of plane bending vibration (isolated hydrogen)
760	m	=CH- out of plane bending vibration
750	s	(four adjacent hydrogen)

ตารางที่ 6 . $^1\text{H-NMR}$ absorption peaks ของสารประกอบ B m.p. 176 - 178 $^{\circ}$

Peak labeled	Position of protons (δ , ppm)	Proton assignments	Approximate integrated area (P.U.)	No. of protons
A	3.67	protons of N-CH_3 group	13.5	3H
B	3.88	protons of O-CH_3 group	14	6H
C	3.94			
D	6.07	aromatic proton at position 4	5.5	1H
E	7.18	aromatic proton at position 7	4.5	1H
	7.39	aromatic proton at position 5	5	1H
	7.64	aromatic proton at position 6	5	1H
	8.25	aromatic proton at position 8	4	1H
F	13.76	proton of O-H bonded group	5	1H

2.5.3 การตรวจคุณสมบัติทางกายภาพและ colour reaction ของสาร C

สาร C (m.p. 159 - 169°) ละลายได้ดีใน chloroform, acetone, methyl alcohol และ acetic acid แต่ละลายได้เล็กน้อยใน ether สาร C ฟอกสีสารละลาย KMnO_4 และให้สีกับ Dragendorff's spray reagent และพบว่า

Rf 0.51 (methyl alcohol : chloroform 1:1

Mol. wt. 250 (Mass spectrum)

Analysis : Found C = 77.06 %, H = 5.59 %, N = 11.13 %

Calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ON}_2$ C = 76.80 %, H = 5.60 %, N = 11.20 %

UV spectrum ให้ λ_{max} ethyl alcohol 305 nm log ϵ 1.36, 230 nm log ϵ 1.7

207 nm log ϵ 1.85 ตามรูปที่ 7 หน้า 25

IR spectrum ให้ ν_{max} KBr, cm^{-1} ตามรูปที่ 8 หน้า 26

ตารางที่ 7 หน้า 27

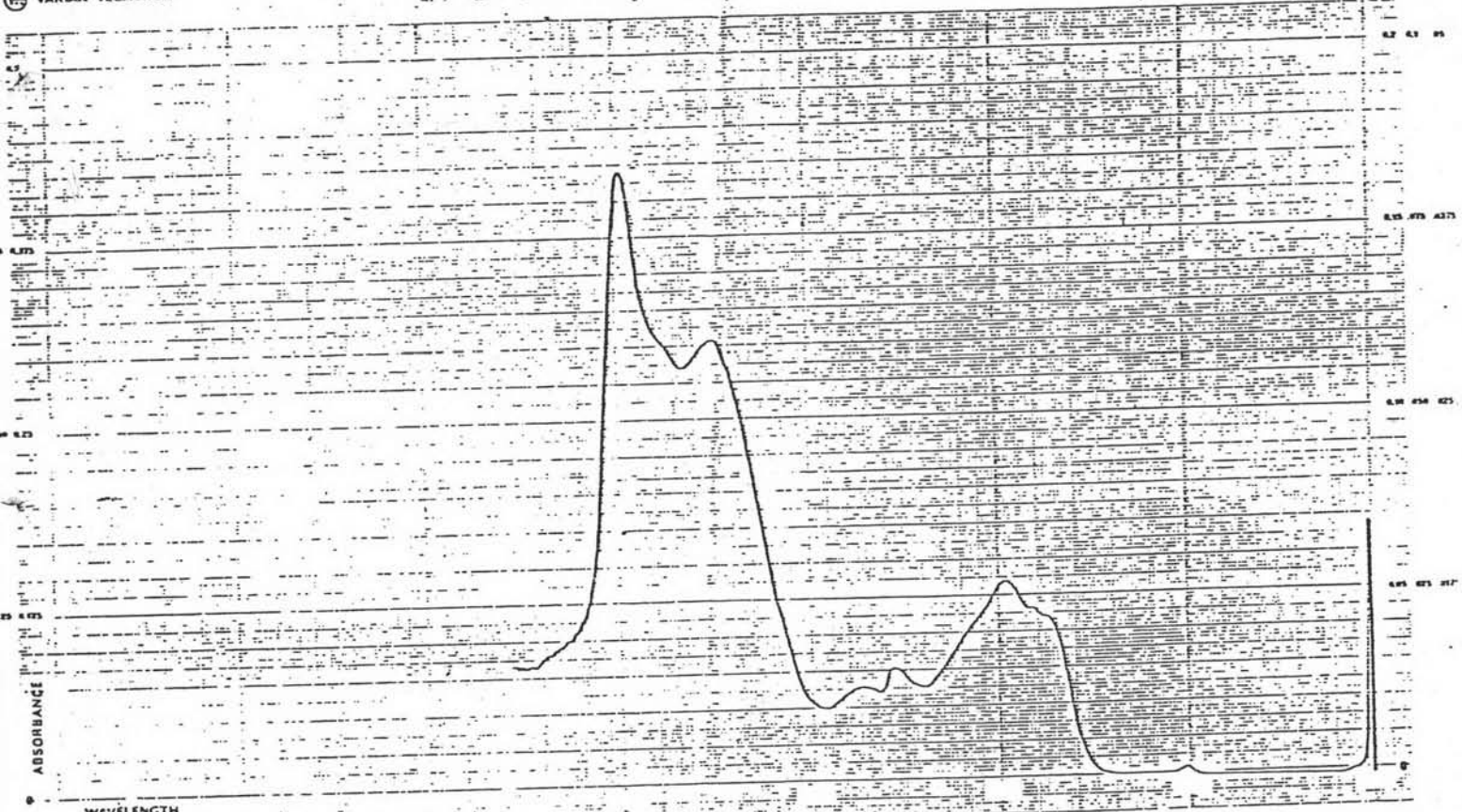
$^1\text{H-NMR}$ spectrum (ใน CDCl_3) ตามรูปที่ 9 หน้า 29

ตารางที่ 8 หน้า 30

รูปที่ 7 UV spectrum ของสารประกอบ C m.p. 159-160°

Part No. 71-100014-00

VARIAN TECHTRON



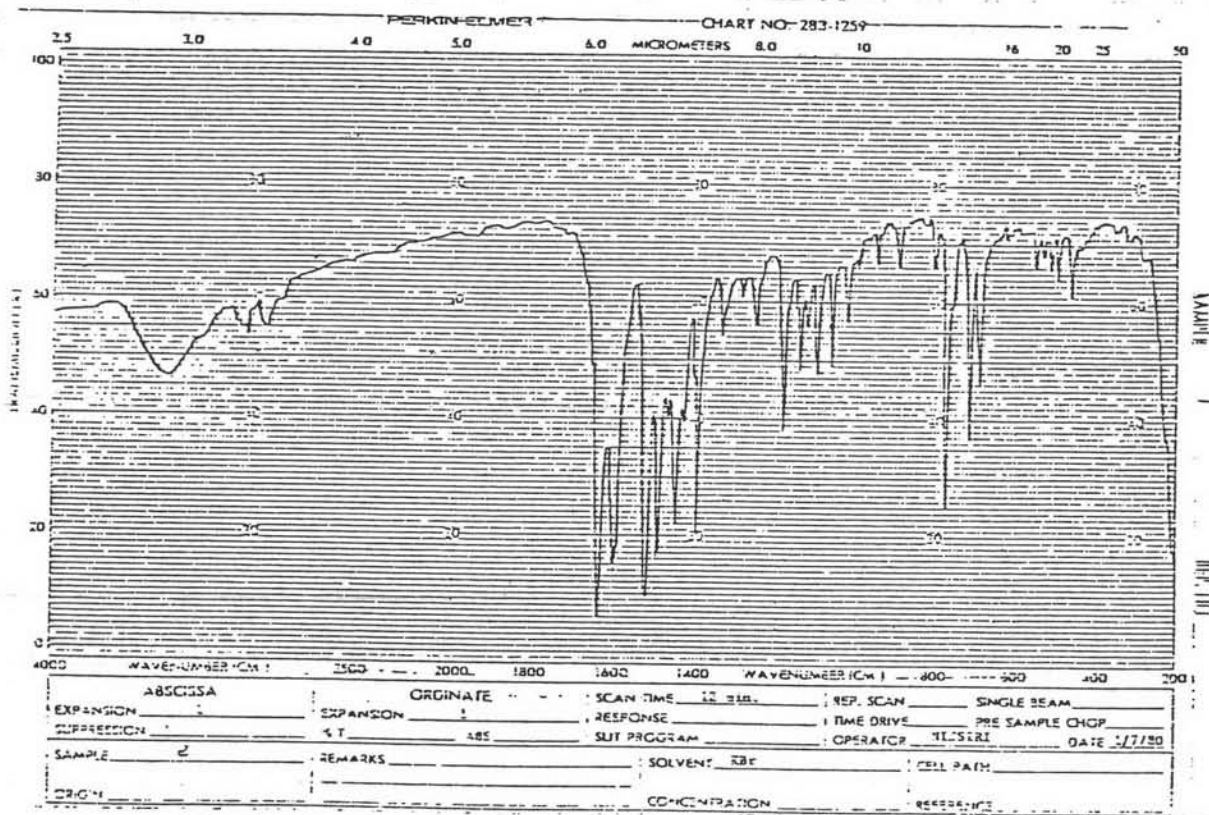
WAVELENGTH	PRESENTATION
nm/cm	1 2 3 4 5
nm/fs	25 30 35 40 45
STAIR 1	
STAIR 2	
SCAN SPEED	10 20 30 40
SPLIT WIDTH	0.2 0.3 0.4 0.5

PHOTOMETRIC PRESENTATION (Abs fs)

METER RANGE	RECORDER RANGE
0.1	A B C D E F
0.5	0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6
1.0	0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6
2.0	0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6

Sample & Formula		
Concentration	Date	Ref No.
Reference	Operator	
Path Length		

รูปที่ 8 IR spectrum ของสารประกอบ C m.p. 159-160°



ตารางที่ 7 IR absorption peaks ของสารประกอบ C m.p. 159 - 160°

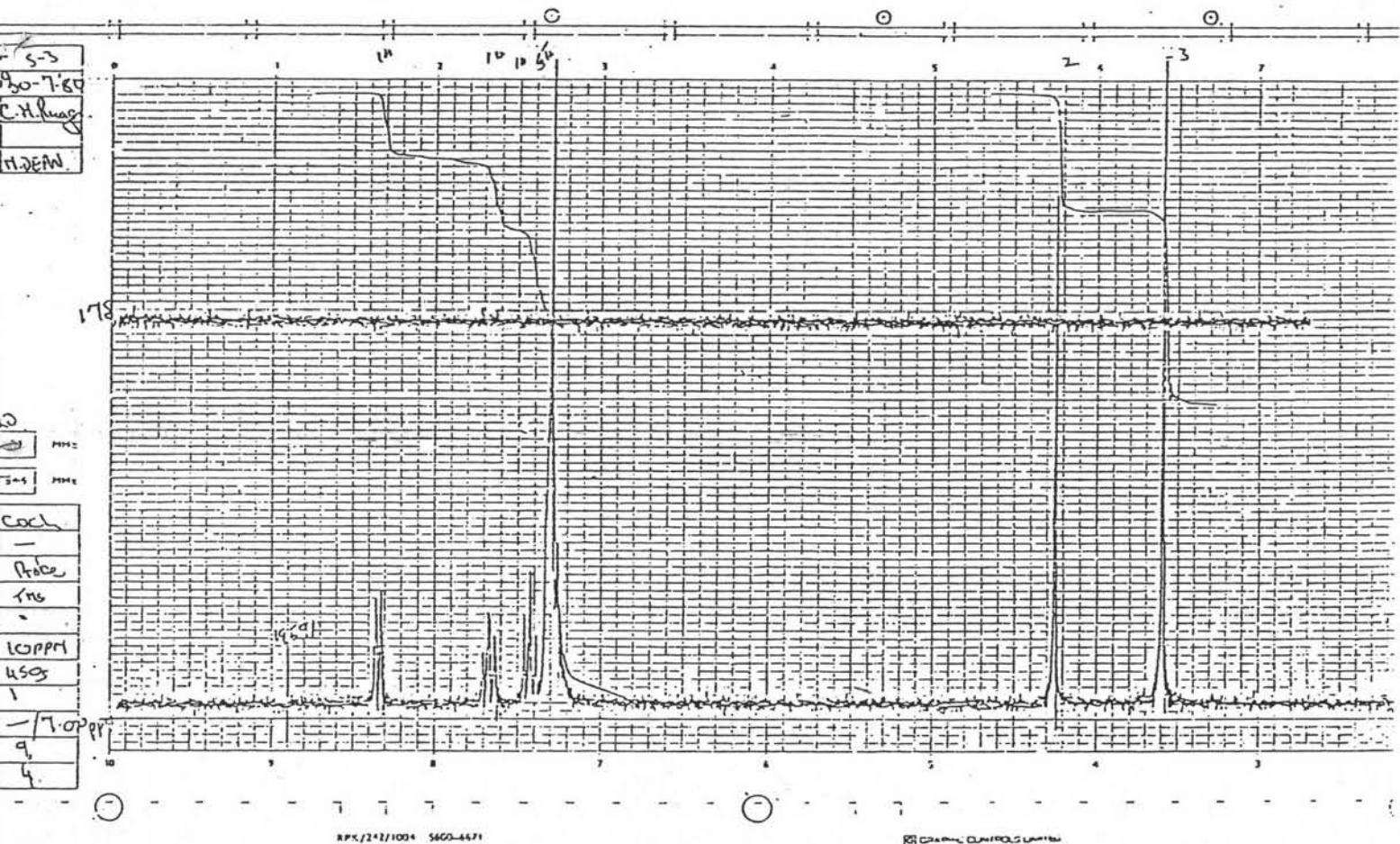
Frequency (cm^{-1})	Intensity	Assignments
3080	w	=CH- stretching vibration (aromatic)
3060	w	
3030	w	
2940	w	-CH ₂ , -CH ₃ stretching vibration
2860	w	
1640	s	C=O stretching vibration
1605	s	C=C ring stretching vibration
1600	s	(aromatic)
1530	s	C=N- stretching vibration
1495	s	(Ar-C(=O)-N=C<)
1490	s	-CH ₃ , -CH ₂ - bending vibration
1400	s	-CH ₃ bending vibration
1290	m	C-N stretching vibration
1190	s	-CH ₃ rocking vibration
1150	m	=CH- in plane bending vibration
1130	m	(aromatic)
1100	m	
950	m	=CH- in plane bending vibration
900	m	(1, 2 - disubstituted benzene)

ตารางที่ 7 (ต่อ)



Frequency (cm^{-1})	Intensity	Assignments
775	s	=CH- out of plane bending vibration (four adjacent hydrogen)
715	s	=CH- out of plane bending vibration
690	s	(monosubstituted benzene)

รูปที่ 9 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ C m.p. $159-160^\circ$ ของสาร B)



ตารางที่ 8 $^1\text{H-NMR}$ absorption peaks ของสารประกอบ C m.p. 159 - 160°

Peak labeled	Position of protons (δ , ppm)	Proton assignments	Approximate integrated area (P.U.)	No. of protons
O	0	CH_3 protons in $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	-	-
A	3.61	protons of N- CH_3 group	24	3
B	4.28	protons of benzyl- CH_2 -group	15	2
C	7.32	protons of benzyl-phenyl group	48	9
D	8.36	protons of quinazolone aromatic group		

2.6 การทดสอบ alkaloids

Alkaloid reagents

Reagents	สาร A	สาร B	สาร C
Dragendorff's	positive	positive	positive
Kraut's	positive	positive	positive
Marme's	positive	positive	positive
Mayer's	positive	positive	positive
Valser's	positive	positive	positive
Wagner's	positive	positive	positive

2.7 การเตรียมอนุพันธ์ของสาร

2.7.1 การเตรียม picrate ของสาร A⁶

ละลายสาร A (5 ม.ก.) ใน hydrochloric acid เสือจาง (5 ชม.³) เติม สารละลายอิ่มตัว picric acid ในน้ำลงไป (5 ชม.³) จะได้ตะกอนสีเหลืองตกลงมาในสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที กรองตะกอนสีเหลืองนี้แล้วล้างด้วยน้ำ 2 - 3 ครั้ง ตกผลึกใหม่ด้วย methyl alcohol จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง m.p. 166 - 167^o (หนัก 2.4 ม.ก. 48 % โดยน้ำหนัก)

2.7.2 การ acetylation ของ B⁹

ละลายสาร B (50 ม.ก.) ใน anhydrous pyridine (5 ชม.³) เติม acetic anhydride ลงไป (5 ชม.³) นำสารละลายนี้มา reflux บน water bath (24 ช.ม.) คนต่อไปอีก (ประมาณ 12 ช.ม.) แล้วเทลงในน้ำแข็ง (10 กรัม) ซึ่งจะได้ผลึกสีเหลืองอ่อนตกลงมา ตั้งทิ้งไว้ (ประมาณ 2 ช.ม.) พร้อมทั้งคนตามไปด้วยเป็นครั้งคราว นำมากรองแล้วล้างด้วยน้ำ 2 - 3 ครั้ง อบผลึกที่กรองได้ให้แห้งแล้วตกผลึกใน chloroform : n-hexane (1:1 โดยปริมาตร) จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนตกลงมา m.p. 209 - 210^o (หนัก 21.4 ม.ก. 42.80 % โดยน้ำหนัก) พบว่า

Rf 0.55 (ใน methyl alcohol : chloroform 1:19 โดยปริมาตร)

Mol. wt. 327 (Mass spectrum)

Analysis : Found C = 66.04 %, H = 5.59 %, N = 4.02 %

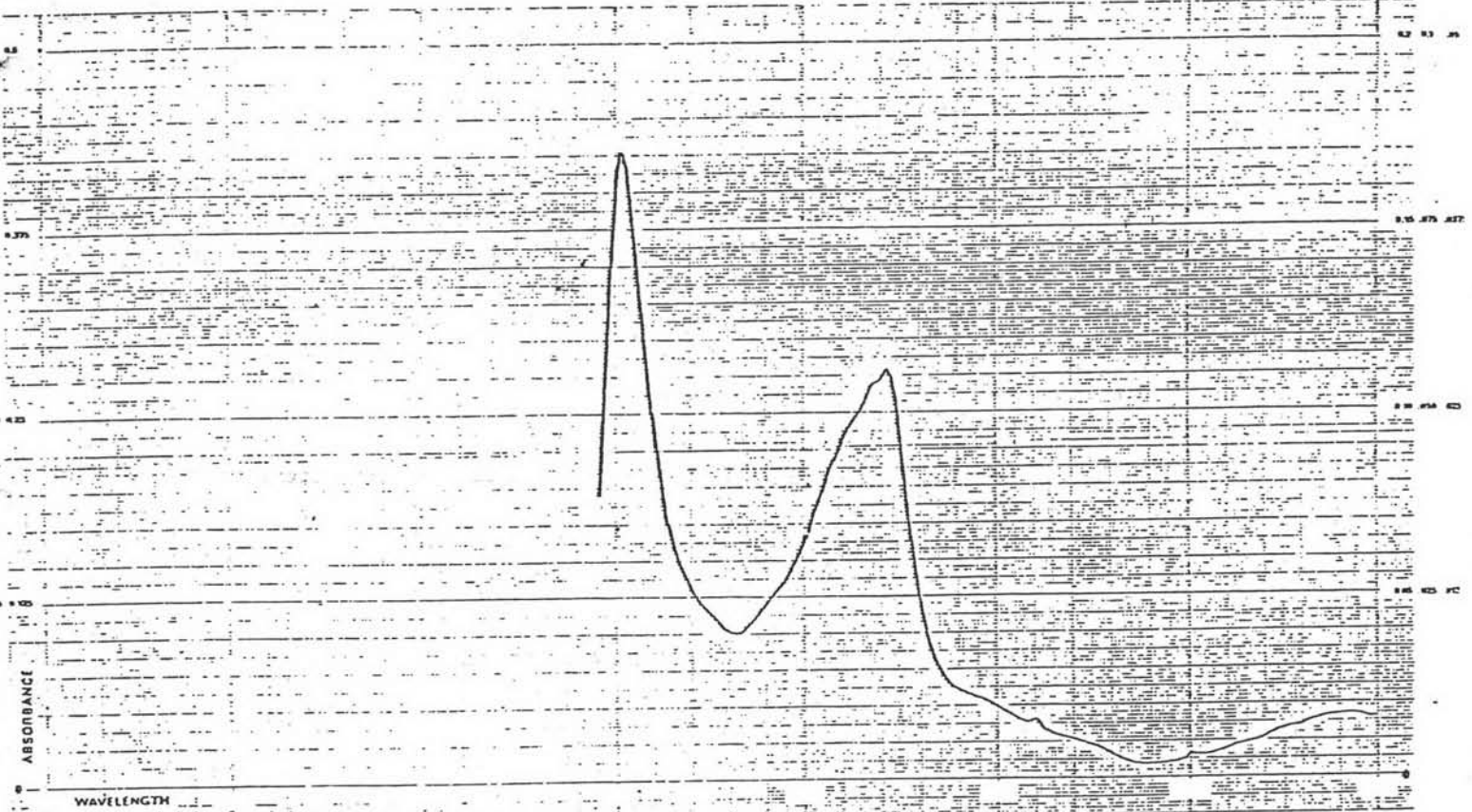
Calculated for C₁₈H₁₇O₅N C = 66.06 %, H = 5.20 %, N = 4.28 %

UV spectrum	ให้ λ	ethyl alcohol	305 nm loge 1.98	และ 206.3 nm
		max	loge 2.17	ตามรูปที่ 10 หน้า 33
IR spectrum	ให้ ν	KBr	ตามรูปที่ 11	หน้า 34
		max	ตารางที่ 9	หน้า 35
¹ H-NMR spectrum	(ใน CDCl ₃)		ตามรูปที่ 12	หน้า 37
			ตารางที่ 10	หน้า 38

รูปที่ 10 UV spectrum ของสารประกอบ m.p. 209-210° (acetate ของสาร B)

VARIAN TECHTRON

Part No. 71-100014-00

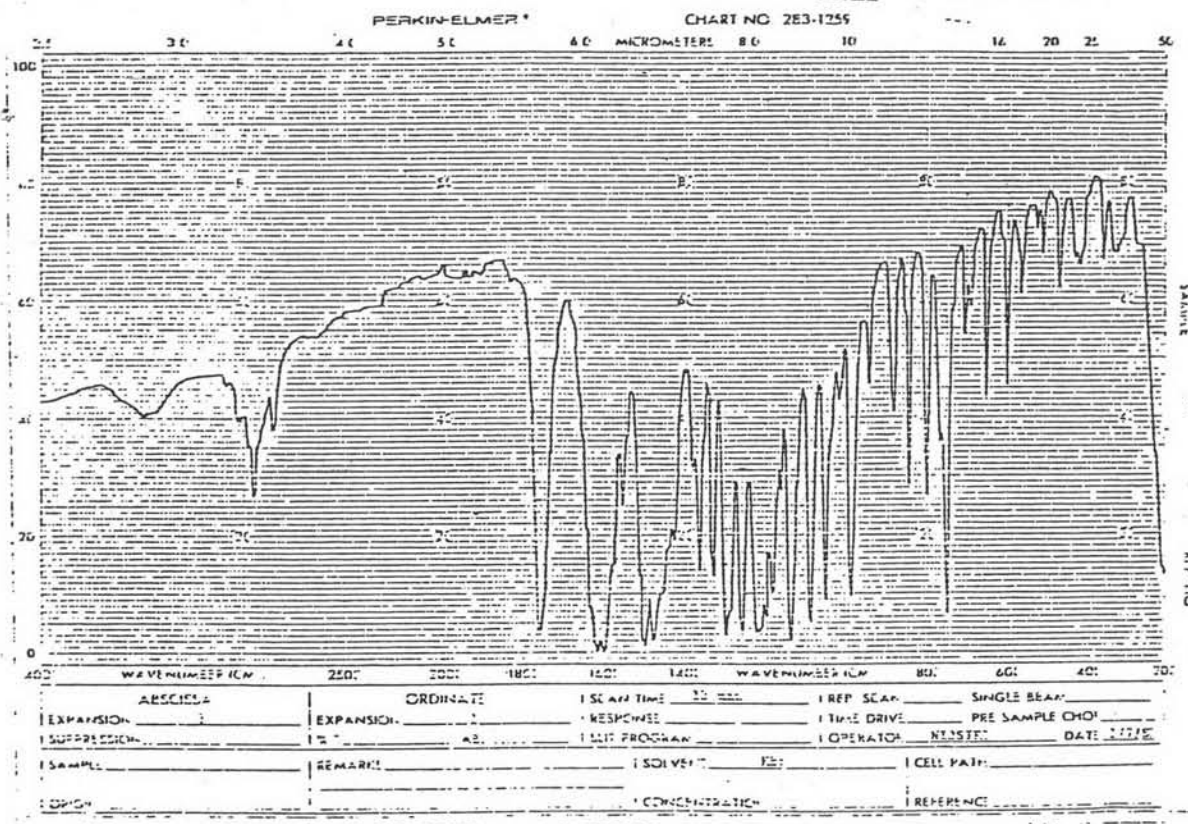


WAVELENGTH	PRESENTATION
nm/cm	1 2 5 10 20
nm fs	33 36 175 334 700
START λ	
FINISH λ	
SCAN SPEED	10 25 50 100
SPLIT WIDTH	0.2 0.5 1.0 2.0

PHOTOMETRIC	PRESENTATION (Abs fs)
METER RANGE	RECORDOR RANGE
0-1	A B C D E F
0-5	0.25 0.5 1 2 4 8
0-10	0.1 0.2 0.4 0.8 1 2 4 8
0-20	0.05 0.1 0.2 0.4 0.8 1 2 4 8

Sample & Standards		
Concentration	Date	Ref. No.
Reference	Operator	4
Path Length	mm	

รูปที่ 11 IR spectrum ของสารประกอบ m.p. 209-210° (acetate ของสาร B) ,

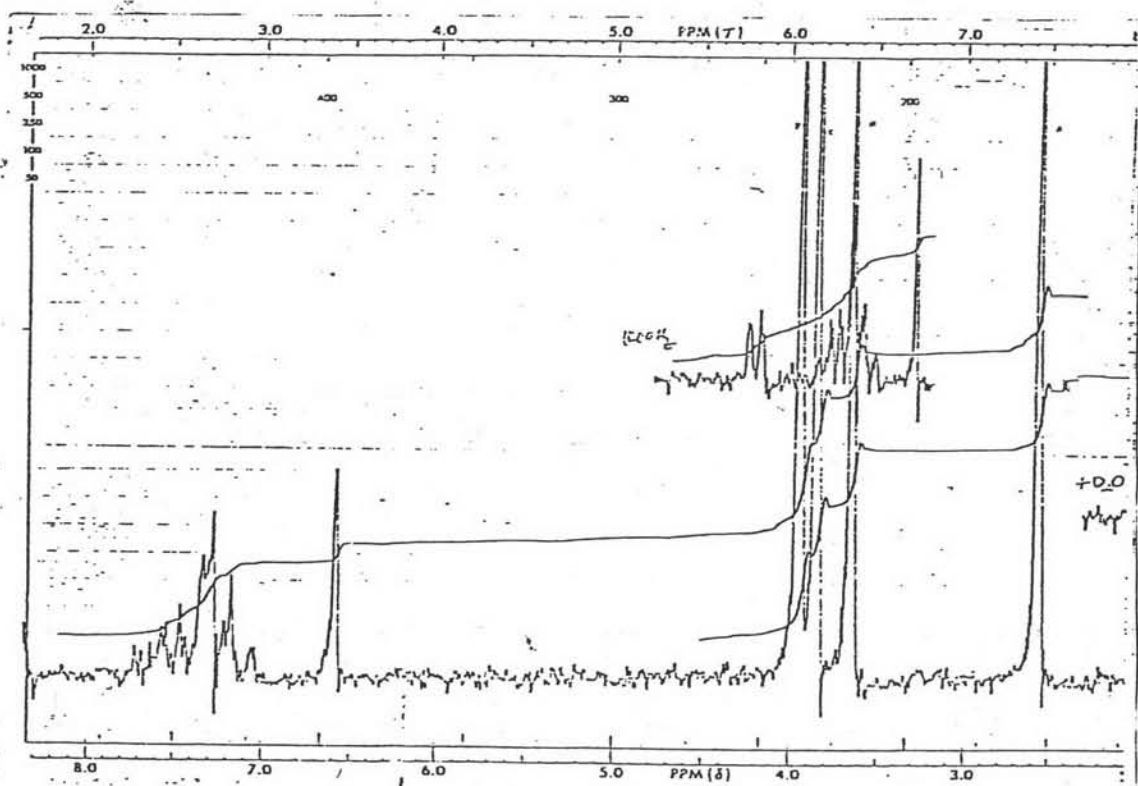


ตารางที่ 9 IR absorption peaks ของสารประกอบ m.p. 209 - 210°
(acetate ของสาร B)

Frequency (cm^{-1})	Intensity	Assignments
3080	w	=CH- stretching vibration (aromatic)
3020	w	
2980	w	-CH ₃ stretching vibration (asymmetric)
2950	m	
2845	m	-CH ₃ stretching vibration (symmetric)
1760	s	C-O stretching vibration (ester)
1620	s	C=O stretching vibration (Quinoline)
1605	s	C=C ring stretching vibration (aromatic)
1555	m	
1500	s	
1480	s	
1460	m	-CH ₃ bending vibration (asymmetric)
1440	m	
1430	m	
1380	m	-CH ₃ bending vibration (symmetric)
1365	s	
1335	s	C-N stretching vibration
1300	s	=C-O-C stretching vibration (asymmetric)
1260	s	
1230	s	

ตารางที่ 9 (ต่อ)

Frequency (cm^{-1})	Intensity	Assignments
1205	s	=C-O-C stretching vibration (asymmetric)
1185	s	=CH- in plane bending vibration (aromatic)
1165	m	
1140	s	
1095	s	
1060	s	=C-O-C stretching vibration (symmetric)
1020	m	
885	m	=CH- out of plane bending vibration
845	s	(isolated hydrogen)
770	m	=CH- out of plane bending vibration
750	s	(four adjacent hydrogens)

รูปที่ 12 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ m.p. $209-210^\circ$ (acetate ของสาร B)

ตารางที่ 10 $^1\text{H-NMR}$ absorption peaks ของสารประกอบ m.p. 209 - 210 $^{\circ}$
(acetate ของสาร B)

Peak labeled	Position of protons (δ , ppm)	Proton assignments	Approximate integrated area (P.U.)	No. of protons
O	0	CH_3 protons in $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	-	-
A	2.6	protons of $\text{O}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{CH}_3$ group	21	3
B	3.15	protons of $\text{N}-\text{CH}_3$ group	20	3
C	3.35	protons of $\text{O}-\text{CH}_3$	47	6
D	3.95			
E	6.6	aromatic proton at position 4	4	1
G	7-7.7	protons of aromatic group	27	4

2.7.3.1 การเตรียม picrate ของสาร C

ละลายสาร C (18 ม.ก.) ใน hydrochloric acid เจือจาง (3 ซม.³) เดิมสารละลายอิ่มตัวของ picric acid ในน้ำลงไป (5 ซม.³) จะได้ตะกอนสีเหลืองเกิดขึ้น ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที กรองตะกอนสีเหลืองแล้วล้างด้วยน้ำ 2 - 3 ครั้ง และตกผลึกใหม่ด้วย methyl alcohol จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง m.p. 172 - 173° (หมัก 11.7 ม.ก. 65 % โดยน้ำหนัก)

2.7.3.2 การเตรียม hydrochloride derivative ของสาร C¹⁰

ละลายสาร C (5 ม.ก.) ใน 10 % hydrochloric acid (5 ซม.³) แล้วนำไปประเหบบน water bath คนแห้ง จะได้ผลึกสีขาว m.p. 215° d.

2.7.3.3 Hydrogenation ของสาร C⁶

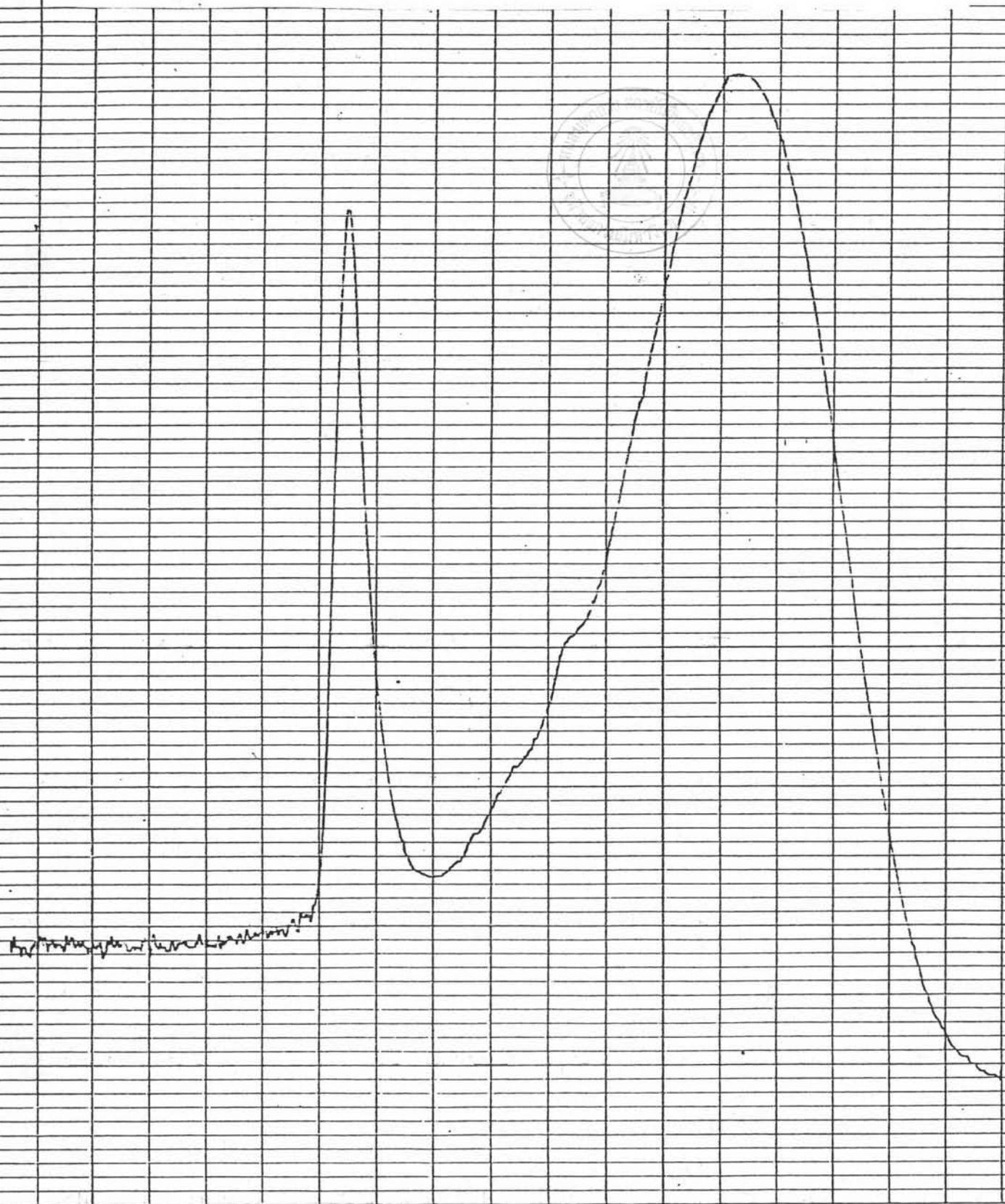
ละลายสาร C (50 ม.ก.) ใน absolute ethyl alcohol (25 ซม.³) ใส่ Pd/C ชนิด 10 % (ประมาณ 30 ม.ก.) ลงไปเป็น catalyst ทำ hydrogenation ภายใต้ความกดดันบรรยากาศที่อุณหภูมิห้อง คนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งปริมาตรของก๊าซ hydrogen ที่ใช้ไปคงที่ คนต่อไปอีกประมาณ 1 ซม. กรองเอา catalyst ออก แล้วระเหยให้แห้งบน water bath ตกผลึก สารที่ได้ใน chloroform : n-hexane (1:3 โดยปริมาตร) แล้วทำให้บริสุทธิ์ด้วย preparative thin layer chromatography จะได้ผลึกสีขาว m.p. 197-198° (หมัก 21 ม.ก. 42 % โดยน้ำหนัก) พบว่า

Rf 0.69 (ใน methyl alcohol : chloroform 1:1 โดยปริมาตร)

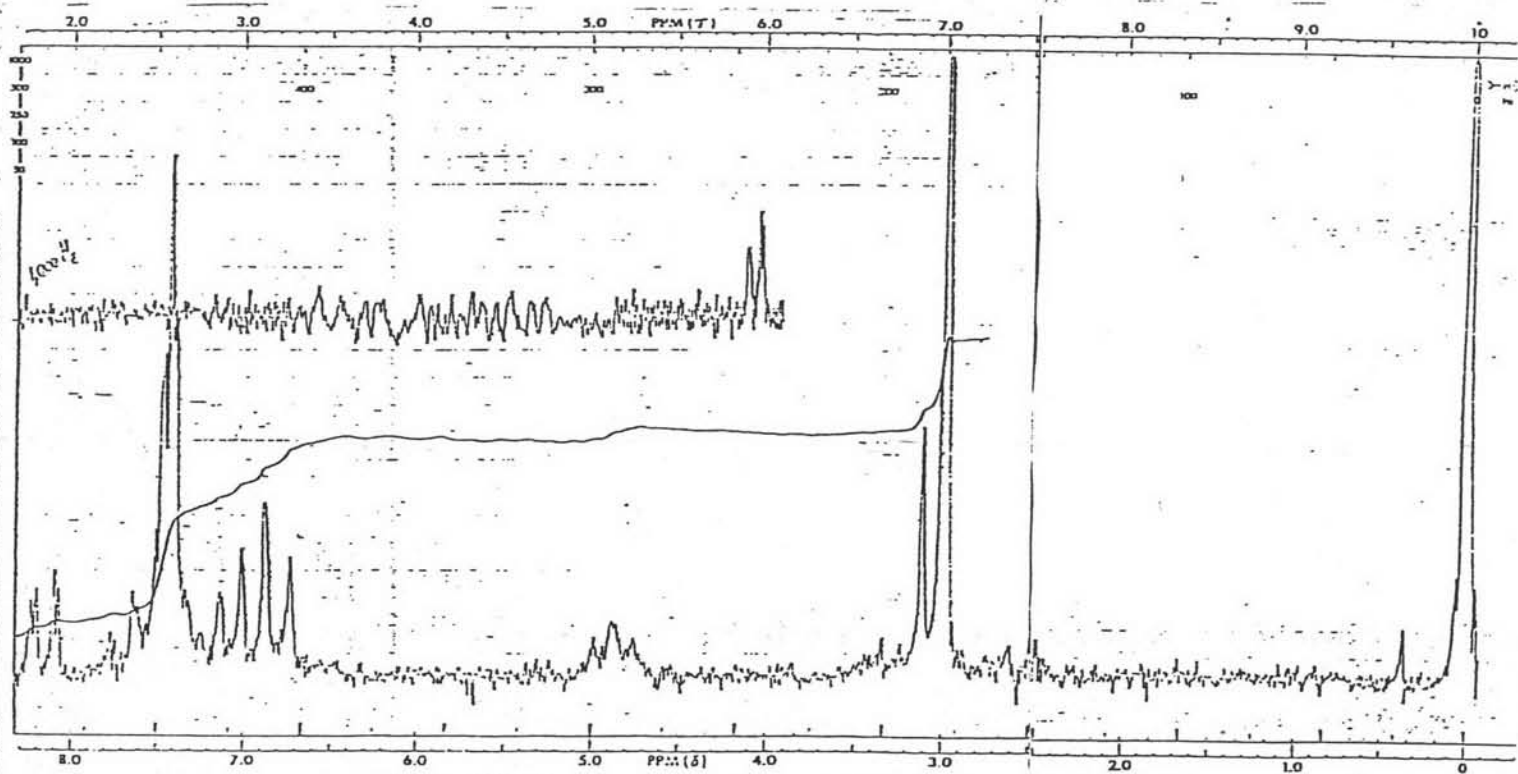
UV spectrum ให้ $\lambda_{\text{ethyl alcohol max}}$ 352 nm log ϵ 0.88 , 272 nm log ϵ 0.84 ตามรูปที่ 13 หน้า 40

¹H-NMR spectrum ใน (CDCl₃) ตามรูปที่ 14 หน้า 41
ตารางที่ 11 หน้า 42

รูปที่ 13 UV spectrum ของสารประกอบ m.p. 197-198° (dihydro derivative ของสาร C)



รูปที่ 14 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารประกอบ m.p. 197-198 $^{\circ}$ (dihydro derivative ของสาร C)



ตารางที่ 11 $^1\text{H-NMR}$ absorption peaks ของสารประกอบ m.p. 197 - 198°

(dihydro derivative ของสาร C)

Peak labeled	Position of protons (δ , ppm)	Proton assignments	Approximate integrated area (P.U.)	No. of protons
O	0	CH_3 protons in $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	-	-
A	3	protons of N-CH_3 group	34	3
B	3.1	protons of benzyl $-\text{CH}_2-$ group		5
C	4.7-5	proton of $\text{H-C} \begin{matrix} \diagup \text{N} \\ \diagdown \text{N} \end{matrix}$	5	1
D	6.7-6.9	proton of N-H group	7	1
E	7-8.3	proton of benzyl-phenyl and quinazolone aromatic group	61	9