

บทที่ 2



2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 Column Chromatography

ใช้ Florisil Art 12518(60-100 mesh ASTM) สำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography) ของบริษัท E. Merck, Darmstadt เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ส่วน คอลัมน์ ที่ใช้เป็น คอลัมน์แก้ว ขนาดกว้างลึบมาเสมอกันโดยมีขนาด 2 x 50 เซนติเมตร ปลายข้างหนึ่งเรียบเสียบกับสายยางที่มี clip สำหรับเปิดปิดการบรรจุ Florisil ต้องทำในห้องปรับอากาศ หรืออาจใช้ jacketed florisil column ซึ่งสามารถทำให้เย็นได้ ด้วยน้ำเย็น เพื่อป้องกันการ crack ของคอลัมน์ ก่อนบรรจุ florisil ใส่น้ำสีเล็กน้อย เพื่อป้องกัน florisil ไหล ออกไปกับตัวทำละลาย ไล่ตัวทำละลายลงไปประมาณ 2 ใน 3 ของ คอลัมน์แก้ว แล้วค่อย ๆ ไล่ตัวดูดซับ (adsorbent) ลงไปตามปริมาณที่ต้องการ รอจนผิวของตัวดูดซับ (adsorbent) ไม่หลุดตัวลงอีกแล้วจึงเปิด clip เพื่อให้ตัวทำละลายไหลออกจนผิวหน้าของตัวดูดซับ (Adsorbent) เกือบแห้ง จึงปิด clip แล้วจึงเทสารที่ต้องการแยกลงไป

2.1.2 Thin Layer Chromatography

ใช้ Silica gel G (type 60) สำหรับ thin layer chromatography ของบริษัท E. Merck, Darmstadt. เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) การเตรียม chromatoplates ใช้ Desaga spreader ที่ปรับความหนา 0.25 มิลลิเมตร ซึ่งเตรียมโดยใช้ตัวดูดซับ (adsorbent) 40 กรัม ผสมน้ำกลั่น 80 cm^3 เขย่าให้เข้ากัน 1 - 2 นาที จะได้ chromatoplates ขนาด 20 x 20 ตารางเซนติเมตร จำนวน 4 แผ่น ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วจึง activated ที่อุณหภูมิ 100 - 110 $^{\circ}$ C อีกประมาณ 30 นาที

ตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษาส่วนมากเป็นตัวทำละลายผสมดังต่อไปนี้ hexane, 5 % (V/V) diethyl ether-hexane, 10 % (V/V) diethyl ether-hexane, 20 % (V/V) diethyl ether-hexane, 50% (V/V) diethyl ether-hexane, 100 % diethyl ether,

Detecting agent ใช้ vanillin solution (3 กรัมใน 0.5 % conc H_2SO_4 ใน methanol) ซึ่งเมื่อ spray แห้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ $100^{\circ}C$ ประมาณ 10 นาที บริเวณที่มีสารจะเห็นเป็นจุดสีต่าง ๆ อย่างชัดเจน

2.1.3 การหา Specific rotation, $[\alpha]$

ใช้เครื่องมือ polarimeter ของบริษัท Bellingham Stanley Limited London. Model D_4 serial no. 632494 สารที่ต้องการหา $[\alpha]$ ต้องนำไปละลายใน chloroform แล้วบรรจุใน cell ยาว 2 เดซิเมตร

2.1.4 การหา Refractive index, (n)

ใช้เครื่องมือ Abbe 60 Refractometer ของบริษัท Bellingham & Stanley, Limited.

2.1.5 การหา Specific gravity, (d)

ใช้ Pycnometer แบบ Gay-Lussac ขนาด 5 cm^3 ของบริษัท Fisher, U.S.A.

2.1.6. Gas Chromatography-/Mass Spectrometer (G.C.-M.S.)

ของบริษัท Dupont 21-490B with 21-094B data system ที่ Mississippi State Forest Product Laboratory, Mississippi State University, U.S.A.

อุณหภูมิที่ใช้ $80 - 200^{\circ}C$, $6^{\circ}/\text{min}$.

column ที่ใช้ 3 % SE 30 on chromosorb HMDS, column แก้ว

2.1.7 เครื่องกลั่นไอน้ำ (Hydrosteam distillation)

เครื่องกลั่นไอน้ำ ทำด้วย stainless steel มีความจุประมาณ 25 dm^3 จุพืชสดได้ประมาณ 2 กิโลกรัม ส่วนภายในมีตะแกรงเจาะเป็นรู เพื่อใช้รองพืชสด และส่วนที่เหลือใต้ตะแกรงสำหรับใช้ใส่น้ำในการกลั่นไอน้ำ

2.1.8 เครื่อง Rotayapor

ใช้ของบริษัท Buchi, Switzerland.

2.1.9 ตัวทำละลายและสารเคมี

ตัวทำละลายที่ใช้ในการค้นคว้า ได้แก่ hexane, diethyl ether ชนิด reagent grade ได้นำไปกลั่นก่อนนำมาใช้

สารเคมีใช้ sodium sulphate, anhydrous ของบริษัท Fluka AG, Buchs.SG, Switzerland.

2.2 การทดลอง

2.2.1 การกลั่นด้วยไอน้ำ (Hydrosteam distillation)

นำใบฝรั่งสดหนัก 1.5 กิโลกรัมจากแหล่งต่าง ๆ กันตามตารางมากลั่นด้วยไอน้ำ (hydrosteam distillation) ทำการกลั่น 3 ครั้ง กลั่นครั้งละประมาณ 5 ชั่วโมง แยกชั้นของ น้ำมันกับน้ำโดยใช้กรวยแยกชั้นน้ำมันนำมาล้กด้วย diethyl ether ที่กลั่นใหม่ ๆ จากนั้นนำชั้นของ diethyl ether มาทำให้แห้งด้วย anhydrous sodium sulphate และระเหยเอาตัวทำละลาย ออกโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 30 °C จะได้น้ำมันของใบฝรั่งตั้งได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 1

2.3 การแยกน้ำมัน (Oil fractional separation)

นำน้ำมันที่ได้จาก 2.2 จำนวน 2 กรัม ผ่านลงไปนใน column แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุ florisil จำนวน 40 กรัม เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) โดยมี hexane เป็นตัวทำละลาย ตามการเตรียมวิธี 2.1.1 elute ด้วย hexane, 5 % (V/V) diethyl ether-hexane, 10 % (V/V) diethyl ether-hexane, 50 % (V/V) diethyl ether-hexane, 100 % diethyl ether โดยเก็บ eluate ครั้งละ 100 cm³ นำแต่ละ fraction ที่ได้ไป กลั่นไล่ตัวทำละลายออกจนเหลือสารในขวดกลั่นประมาณ 10 cm³ รวม fraction ต่าง ๆ เป็น พวก ๆ โดยใช้ TLC ตามหัวข้อ 2.1.2 ได้เป็น 3 fraction ใหญ่ ๆ ตาม polarity

ของสาร ลากนั้นน้ำทั้ง 3 fraction ไปทำการแยก และหาสูตรโครงสร้างของน้ำมัน โดยใช้ gas - chromatography / mass spectrometer (G.C.-M.S.)

ตารางที่ 1 แสดงถึงค่าคงที่ทางฟิสิกส์ของน้ำมันใบฝรั่ง

รายการวิเคราะห์	ฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง บริเวณตึกเคมี 3 กรุงเทพฯ (ล.ค.)	ฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง อำเภอกระทุ่มแบน สมุทรสาคร (ร.ค.)	ฝรั่งพันธุ์เวียดนาม อำเภอลำพราหมณ์ นครปฐม (ร.ค.)
Percentage Yield ครั้งที่ 1	0.28	0.30	0.15
ครั้งที่ 2	0.27	0.29	0.14
Specific gravity 28°C	0.89	0.89	0.89
Optical rotation 28°C	+9.42	+15.94	-11.29
Refractive index 28°C	1.492	1.488	1.496



ตารางที่ 2

ผลการวิเคราะห์ของน้ำมันหอมระเหยในใบฝรั่งพันธุ์พื้นเมือง

Compound	MS Fragmentation or Reference	%
Aliphatic hydrocarbons		
1. 2, 2-dimethylpentane	27, 29, 41, 43, 56, 57, 86, 97, 100	0.57
2. n-undecane	29, 41, 43, 56, 57, 71, 85, 98, 99, 113, 156	0.40
3. α -pinene	27, 28, 30, 31	0.23
4. β -pinene	27, 30, 31	0.06
5. Limonene	27, 29, 31	3.68
6. Cardinene	28	0.40
7. Copaene	28, 26	0.34
8. β -caryophyllene	27, 29	21.21
9. Longifolene	29	6.74
10. α -caryophyllene(Humullene)	28, 29	1.29
11. α -muurolene*	41, 55, 67, 69, 79, 81, 93, 94, 107, 109, 119, 121, 133, 135, 161, 189, 204, 205	9.14
12. γ -muurolene*	41, 55, 69, 79, 81, 91, 93, 105 107, 119, 121, 133, 147, 148, 161, 189, 204, 205	1.60

Compound	MS Fragmentation or Reference'	%
Aliphatic hydrocarbons		
13. $C_{15}H_{24}$ (γ - cardinene)	41,79,91,105,111,161,189,202	0.68
14. β - selinene	28,29	1.37
Alcohol compounds:-		
15. $C_{15}H_{26}O$	41,43,55,69,79,81,93,95, 109,121,135,149,177,204,221	2.45
16. $C_{15}H_{26}O$	18,28,41,43,67,69,79,93,94, 105,107,109,119,121,134,135, 148,161,189,204,205,212,220, 222	8.85
17. Nerolidol	27,29	3.20
18. $C_{15}H_{22}O$ (Farnesyl acetate)	41,43,55,67,69,71,79,82,83, 91,93,95,96,105,107,108,109, 119,120,122,123,124,133,135, 136,147,149,161,179,189,204, 105,220,222	3.65
19. Patchouli alcohol	29	1.20
20. Guaiol*	41,43,55,69,91,93,105,107,119, 135,149,161,189,204,205,220, 221,222.	1.60

Compound	MS Fragmentation or Reference	%
21. $C_{15}H_{26}O$	41, 43, 55, 59, 67, 69, 81, 82, 83, 93, 95, 96, 109, 121, 123, 138, 149, 161, 164, 189, 202, 204, 205, 220, 222, 223	0.77
22. $C_{15}H_{26}O$	41, 43, 55, 69, 79, 81, 82, 93, 95 105, 107, 109, 119, 121, 135, 136, 161, 189, 204, 220, 222	2.42
23. $C_{15}H_{26}O$	41, 43, 55, 67, 69, 81, 82, 93, 95, 107, 109, 119, 121, 122, 133, 150, 159, 161, 183, 198, 202, 204, 220, 222	1.58
24. Cedrol	27, 29	3.34
25. Farnesol	27, 29	0.46
Miscellaneous		
26. M.W. 429-431	18, 28, 32, 41, 43, 57, 59, 68, 69 71, 73, 83, 91, 93, 95, 97, 107, 110, 119, 121, 122, 147, 161, 177, 207, 221, 355, 429	1.85

หมายเหตุ * สํารกัหา standard เทียบไมได้ แตํเทียบจาก fragmentation pattern จาก computer