บทที่ 3

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการใช้ Column chromatography แยก Crude extract ซึ่งได้จากการสกัดใบประยงค์ตากแห้งและบดละเอียดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ Fraction แรก ๆ เป็น Wax ต่อมาเป็นน้ำมัน สารจุดหลอมเหลว 87 - 88° (สาร ก.) สารจุดหลอมเหลว 137 - 138° (สาร ข.) สารจุดหลอมเหลว 105 - 106° (สาร ค.) สารจุดหลอมเหลว 126 - 127° (สาร ง.) และสารจุดหลอมเหลว 176 - 178° (สาร จ.) สำหรับสาร ก. ไม่สามารถวิเคราะห์ต่อไปได้เนื่องจากมีปริมาณน้อยมาก

3.1 สาร ก. จุดหลอมเหลว 87 - 88°

สาร ก. ได้จากการ Elute column ด้วย 10 % อีเทอร์ - ปิโตรเลียมอีเทอร์ใน Fraction 3 - 5 แล้วตกผลึกด้วยเบนซีน จะได้สารจุดหลอมเหลว 87 - 88° มี C = 82.52 %, H = 14.42 % Infra - red spectrum ของสารตัวนี้แสดง broad band absorption มี maximum ที่ 3450 cm^{-1} (polymeric association of OH stretching vibration) และ stromg absorption ที่ 1050 cm^{-1} (C-OH stretching vibration of primary alcohol) ที่ 2905, 2835 cm^{-1} ($C-CH_3$ asymmetrical bending bibration และ 725, 715 cm^{-1} (methylene vibration) ไม่มี absorption peak ของ Olefinic linkage, branched chain skeleton หรือ carbonyl group อยู่เลย ซึ่งแสดงว่าสาร ก. เป็น Saturated long chain primary alcohol และจากการตรวจคุณสมบัติทางเคมี ปรากฏว่าได้ผลสอดคล้องกัน

จากการตรวจสอบ Literature [1,10,18] พบว่า Myricyl alcohol ($C_{30}H_{62}O$) มีเปอร์เซ็นต์ C = 83.99%, H = 12.15% ใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ที่หาได้จากสาร ก. จึงนำสาร ก. ไปทำ Acetyl derivative เพื่อเปรียบเทียบกับ Derivative ของ Myricyl alcohol

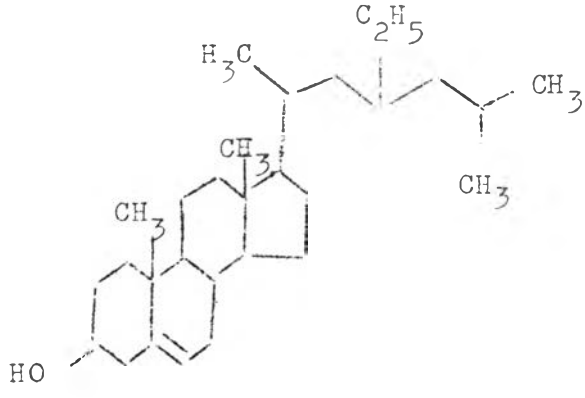
Acetyl derivative ของสาร ก. เตรียมโดยให้สาร ก. ทำปฏิกริยากับ Acetic anhydride ใน Pyridine ได้สารมีลักษณะเป็น Amorphous solid หลอมเหลวที่ 74 - 75° และแสดง IR. absorption peaks ของ Acetexic group ที่ 1735,1240 และ 1040 cm^{-1} ส่วน Absorption peaks ของ Alcoholic hydroxyl group ที่ 3400 - 3200 และ 1050 cm^{-1} หายไป

ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าสาร ก. ควรเป็น Myricyl alcohol[1] มีสูตรดังนี้

$$CH_3 - (CH_2)_{28} - CH_2 - OH$$

3.2 สาร ข. จุดหลอมเหลว 137 - 138°

สาร ข. ได้จากการ Elute column ด้วย 20 % อีเทอร์ - ปิโตรเลียมอีเทอร์ใน Fraction หลัง ๆ (6 - 8) แล้วตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มและเมทิลแอลกอฮอล์ (1 : 2) ได้สารจุดหลอมเหลว 137 - 138° มี C = 83.53 % H = 12.24 % ในการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีพบว่าเป็น Unsaturated steroid IR - spectrum แสดง Absorption peaks ที่ 3550 - 3200, 1050 cm^{-1} (3β-hydroxy group) 3220,1630,835 และ 795 cm^{-1} (Trisubstituted ethylene) เมื่อเปรียบเทียบ IR. spectrum ของสาร ข. กับ IR. spectrum ของ β- Sitosterol ปรากฏว่า Identical กันทุก Peaks Mixed melting point ของสาร ข. กับ β - Sitosterol มีค่าคงที่ Rf value จาก TCL มีค่าเท่ากันไม่ว่าจะใช้ Solvent อะไร นอกจากนี้ Acetate ของสาร ข. มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ Acetate ของ β - Sitosterol อีกด้วย จึงเชื่อว่าสาร ข. เป็น β - Sitosterol[1,2] ซึ่งมีสูตรโมเลกุล $C_{29}H_{50}O$ มีสูตรโครงสร้างดังนี้



3.3 สาร ง. จุดหลอมเหลว 126 - 127°

สาร ง. ได้จากการ Elute column ด้วย 50 % อีเทอร์ - ปิโตรเลียมอีเทอร์ใน Fraction หลัง ๆ (6 - 15) จะได้สารผสมของสาร ง. สาร ก. และน้ำมันสีเหลือง ซึ่งแยกจากกันโดยทำ Columnchromatography ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง แล้วทำให้สาร ง. บริสุทธิ์โดยตกผลึกในอีเทอร์ - ปิโตรเลียมอีเทอร์ 2 : 3 หลาย ๆ ครั้ง ได้สารผลึกรูปเข็มไม่มีสี จุดหลอมเหลว 126 - 127° สารนี้ให้ Colour test กับ Liebermann Burchard Reaction แสดงว่าเป็นพวก Steriods หรือ Triterpeniods

สาร ง. ฟอกสี Bromine in carbontetrachloride ไม่เกิดฟองแก๊สและฟอกสีสารละลายด่างทับทิมจึงอาจมี unsaturation เมื่อนำสารนี้ทำปฏิกริยากับโลหะโซเดียมใน Dry benzene ให้แก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้น และสามารถเกิด Ester กับ Acetic anhydride แต่ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย Ferric chloride แสดงว่ามี Alcoholic hydroxyl group สารนี้ยังให้ตะกอนเหลืองกับ 2,4 dinitro phenylhydrazene แต่ไม่ reduce Tollen's reagent แสดงว่ามี Ketonic group อยู่ด้วย

IR. spectrum ของสาร ง. แสดง Absorption peaks ที่ 3500 - 3400 cm^{-1} แสดงถึง Inter and Intramolecular hydrogen bond (single

bridge) ของ OH, 1070 cm^{-1} ส. unsaturation secondary alcohol, 3078 1630, 1420 และ 880 cm^{-1} แสดงถึง unsymmetrical disubstituted ethylene $CR_1R_2 = CH_2$ [6,9,17] 1700 cm^{-1} เป็น Absorption peaks ของ Ketone ที่ 2960, 2940, 2850, 1460 และ 1830cm^{-1} เป็น Absorption peaks ของ -CH, $-CH_2$ และ $-CH_3$ จาก IR. spectra ของสาร ง. ไม่พบ Absorption peaks ของ Aromatic nucleus และของ Mono, sym - di- tri หรือ tetra substituted ethylene เลย

จาก NMR. ของสาร ง. ทราบว่ามี $-CH_3$ groups (1.13, 1.16 ppm) ซึ่งเป็น $-CH_3$ ต่อกับ C-OH มี Methylene group (two proton signal at 4.68 4.68 ppm) Axial hydrogen ที่ตำแหน่งที่ C_3 (multiplet at ~ 3.3 ppm)

จาก Mass spectrum พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 458 ซึ่งเข้ากับสูตร $C_{30}H_{50}O_3$

ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าสาร ง. เป็น Unsaturated hydroxy Ketone โดย Double bond เป็นชนิด Terminal methylene มี secondary alcoholic hydroxyl group อยู่ที่ตำแหน่ง alpha ของ unsaturation มี methyl group ต่ออยู่กับ Carbond ที่ต่ออยู่กับ -OH และมี Ketonic group เพื่อสนับสนุนเหตุผลเหล่านี้จึงเตรียมอนุพันธ์ต่อไปนี้

Acetyl derivative ของสาร ง. เตรียมโดยให้สาร ง. ทำปฏิกิริยากับ Acetic anhydride ใน Pyridine ได้สารมีลักษณะเป็น Amorphous solid สีขาว หลอมเหลวที่ 90 - 91° แสดง IR. absorption peaks ของ Acetoxic group ที่ 1720, 1240 และ 1040 cm^{-1} ส่วน Region ที่เคยให้ Absorption peaks ของ Alcoholic - OH Intensity ลดลงมาก Absorption peak ของ unsaturation และ Ketone ยังมีเหมือนเดิมทุกประการ

2,4 - dinitrophenylhydrazone ของสาร ง. เตรียมโดยให้สาร ง

ทำปฏิกริยากับ 2,4 - dinitrophenylhydrazene reagent ได้สารเป็น Amorphous solid สีเหลืองเข้มจุดหลอมเหลว 183 - 185° แสดง IR. absorption peaks ของ C=N-NH- ที่ 3310, 1610 และ 740 cm^{-1} และแสดง Absorption peaks ของ 1,2,4 - trisubstituted benzene ที่ 1580, 880, 825 cm^{-1} Absorption peaks ที่ 1508 และ 1328 เป็นของ Nitro group ส่วน Absorption peaks ของ Alcoholic -OH และ unsaturation ยังคงเหมือนเดิม

Reduction สาร ง. ทำโดยให้สาร ง. ทำปฏิกริยากับ Isopropyl alcohol ใช้ Aluminium isopropoxide เป็น Catalyst กลั่นไล่ Acetone ที่เกิดขึ้นขณะทำปฏิกริยาได้สารผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 173 - 175° มี C = 77.59 % , H = 11.71 % แสดง Absorption peaks ของ 3 β - alcoholic - OH ที่ 1040 cm^{-1} ส่วน Absorption peak ของ Ketone ที่ 1700 cm^{-1} หายไป Absorption peaks ของ Alcoholic- OH เดิมที่ 1070 cm^{-1} และ Absorption peaks ของ unsaturation ยังอยู่เหมือนเดิมแสดงว่า Ketonic group ถูก reduce ไปเป็น Secondary alcohol และมี - OH อยู่ที่ตำแหน่งที่ C_3 (equatorial) เหมือนกับของ Steroids หรือของ Triterpenoids Reduction ของสาร ง. นี้มีจุดหลอมเหลวใกล้เคียงกับสาร จ. และเมื่อทำ Mixed melting point ปรากฏว่าลงที่ Rf value จาก TCL. ใน Solvent ต่าง ๆ เท่ากับสาร จ. มี C = 77.69 % ,H =11.51% ซึ่งใกล้เคียงกับสาร ง. และที่สำคัญที่สุด IR. spectrum ของ Reduction product ของสาร ง. Identical กับ IR. spectrum ของสาร จ. ซึ่งยืนยันได้ว่า Reduction product ของสาร ง. เป็นสารตัวเดียวกับสาร จ.

3.4 สาร จ. จุดหลอมเหลว 176 - 178°

สาร จ. ได้จากการ Elute column ด้วย 75 % อีเทอร์ - ปิโตรเลียมอีเทอร์ แล้วตกผลึกด้วยเย็นจัด จะได้สารผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 176 - 178°

C = 77.69 %, H= 11.51% สารนี้ให้ Colour test กับ Liebermann Burchard Reaction แสดงว่าเป็นสารประกอบพวก Steroids หรือ Triterpenoids

สารนี้ฟอกสี Bromine in carbontetrachloride ไม่เกิดฟองแก๊ส และฟอกสีสารละลายด่างทับทิม จึงการมี unsaturation เมื่อนำสารนี้ทำปฏิกริยากับโลหะโซเดียมใน Dry benzene ให้แก๊สไฮโดรเจนเกิดขึ้นและสามารถเกิด Ester กับ Acetic anhydride แต่ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย Ferric chloride แสดงว่ามี Alcoholic -OH สารนี้ไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4 - dinitrophenylhydrazene แสดงว่าไม่มี Carbonyl group

IR. spectrum ของสาร จ. แสดง Absorption peaks ที่ 3500 - 3200 cm^{-1} แสดงถึง Inter and Intramolecular hydrogen bond (single bridge) และ polymeric association ของ OH ,1070 cm^{-1} เป็น unsaturation secondary alcohol,1040 cm^{-1} เป็น C_3 substituted (equatorial) hydroxy ของ Steriods หรือ Triterpenoids,3078, 1630, 1425 และ 880 cm^{-1} แสดงถึง Unsymmetrical disubstituted ethylene $CR_1R_2=CH_2$ Strong absorption peaks ที่ 2975, 2960, 2940, 2850 และ 1460, 1380 แสดงถึง -CH, $-CH_2-$, $-CH_3$ จาก IR. spectrum ของสาร จ. ไม่พบว่ามี Absorption peaks ของ Carbonyl, romatic nucleus หรือ Unsaturation แบบอื่นอีก

Mass spectrum ของสาร จ. บอกให้ทราบว่าน้ำหนักโมเลกุลของสาร จ. เท่ากับ 460 ซึ่งเข้ากับสูตร $C_{30}H_{52}O_3$

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าสาร จ. เป็น Unsaturated Trihydroxy compound (Unsaturated Triol) โดยมี Double bond เป็นแบบ Terminal Methylene Secondary alcoholic hydroxy 2 groups อยู่ที่ตำแหน่ง alpha ของ unsaturation และอยู่ C_3(equatorial) เหมือนกับของ Steroids หรือของ Triterpenoids นอกจากนี้สารตัวนี้ยังมี Methyl groups อีกด้วย เพื่อสนับ

สนุนเหตุผลเหล่านี้จึงเตรียมอนุพันธ์ต่อไปนี้

Acetyl derivative ของสาร จ. เตรียมโดยให้สาร จ. ทำปฏิกริยากับ Acetic anhydride ใน Pyridene เมื่อได้ Crude Acetylation product แล้วทำให้แห้ง ทำ Acetylate ซ้ำอีก 2 ครั้ง เมื่อทำ TCL ปรากฏว่ามี 2 spots จึงแยกโดย Column chromatography สารตัวที่ออกมาก่อนเป็นผลึกรูปขนนกสีขาว จุดหลอมเหลว 163 - 164° แสดง IR. absorption peaks ของ Acetoxic group ที่ 1720, 1240 และ 1040 cm^{-1} Absorption ของ hydroxy groups หายไปหมด แต่ Unsaturation และ -CH, $-CH_2-$, $-CH_3$ ยังอยู่คงเดิม แสดงว่าสารจุดหลอมเหลว 163 - 164° นี้ Alcoholic -OH ถูก Acetylate หมด และจากน้ำหนักโมเลกุลของ Acetate นี้เท่ากับ 586 แสดงว่าเป็น Triacetate

ส่วนใน Fraction หลัง ๆ ในการแยก Acetate ของสาร จ. ได้ Amorphous solid สีขาว จุดหลอมเหลว 146 - 147° แสดง IR. absorption peaks ที่ 1720, 1240 และ 1030 cm^{-1} ซึ่งเป็น Absorption peaks ของ Acetoxic group peaks 3550 - 3200, 1070cm^{-1} ยังคงมีอยู่แต่ Intensity น้อยลง ส่วน Absorption peaks ของ unsaturation และของ $-CH_2-$, $-CH_3$ ยังคงเดิม แสดงว่าสารจุดหลอมเหลว 145 - 147° นี้ alcoholic -OH ถูก acetylate ไม่หมด

Hydrogenation สาร จ. ตอนแรกทำโดยใช้ PtO_2 เป็น Catalyst ได้สารผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 201 - 202° IR. absorption peaks ของ Unsymmetrical disubstituted ethylene ที่ 3078, 1630, 1425 และ 880 cm^{-1} หายไปเกือบหมด ที่ไม่หมดเข้าใจว่าคงมี Traces ของ Unhydrogenate ของสาร จ. เหลืออยู่ ส่วน Absorption peaks อื่น ๆ คือ hydroxy groups และ -CH , $-CH_2-$, $-CH_3$ ยังอยู่เหมือนเดิมทุกประการ จึงทำการ Hydrogenate สารใหม่ โดยใช้ Palladium black เป็น Catalyst ได้ Amorphous solid สีขาวจุดหลอมเหลว 202 - 3° IR. absorption peaks ของ Unsymmetrical disubstitu

ethylene ที่ 3078,1630,1425 และ 880 cm^{-1} หายไปหมด ดังนั้น Hydro genation product ที่ได้จึงเป็น Saturated compound ที่แปลกก็คือ Hydro genation product ที่ได้จาก PtO_2 เป็น Catalyst มี Rf value เท่ากัน Hydrogenation product ที่ได้จากการใช้ Palladium black เป็น Catalyst แต่ IR. spectrum เหมือนกันมาก ที่น่าสังเกตอีกอย่างหนึ่งก็คือ Absorption peaks ที่ 1070 cm^{-1} อันเป็น Absorption peaks ของ α - unsaturated secondary alcohol ของสาร จ. ซึ่งเมื่อ Hydrogenate แล้วนอกจาก Shift ไปที่ 1100 cm^{-1} ซึ่งเป็น Normal secondary alcohol absorption peak แต่ IR. spectrum ของ Hydrogenation product absorption peak ของ Alcohol - OH ที่ 1070 cm^{-1} ยังอยู่คงเดิม

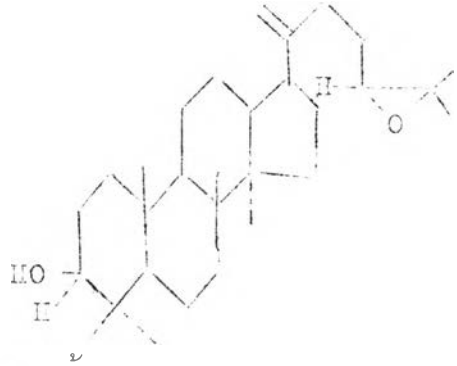
<u>สรุปผลการทดลอง</u>

สาร ง. หลอมเหลวที่ 126 - 127° เป็น Triterpene น้ำหนักโมเลกุล 458 สูตรโมเลกุล $C_{30}H_{50}O_3$ มี Ketone หนึ่ง group Acoholic - OH 2 group group หนึ่งอยู่ที่ C_3 (equatorial) อีก group หนึ่งเป็นชนิด -C-OH และมี unsaturation แบบ $\backslash c = CH_2$
CH_3

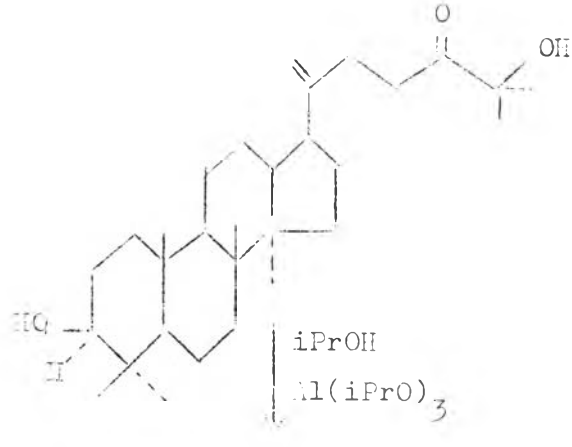
สาร จ. จุดหลอมเหลว 175 - 178° เป็น Triterpene น้ำหนักโมเลกุล 460 สูตรโมเลกุล $C_{30}H_{52}O_3$ มี Alcoholic -OH 3 group ปรากฏว่า OH 2 group และ $\backslash c = CH_2$ เหมือนกับของสาร ง. ส่วน OH อีก group เป็น Secondary alcohol

จากปฏิกริยาเคมี reaction, spectral data และสูตรโมเลกุลของสาร ง. และ จ. ปรากฏว่ามีความสัมพันธ์กับ Aglaiol ที่ทราบสูตรโครงสร้างแน่นอนแล้ว และแยกได้จากใบไม้ชนิดเดียวกัน จึงเชื่อว่าสาร ง. และ จ. มีสูตรโครงสร้างดังนี้

สูตรโครงสร้างของ Aglaiol $C_{30}H_{50}O_2$



สูตรโครงสร้างของสาร ง. Hydroxyketone $C_{30}H_{50}O_3$



สูตรโครงสร้างของสาร จ. Triol $C_{30}H_{52}O_3$