

ตอนที่ 1 สกัดด้วย petroleum ether

3.1 สกัดด้วย petroleum ether

นำเอาผงบรเพ็ดที่ตากแห้งแล้วไปสกัดด้วย petroleum ether (b.p. 50 - 70 °) เป็นเวลา 7 วัน กรอง กลั่นได้ petroleum ether แล้วระเหยที่บน water bath จนแห้ง ได้ crude extract เป็นน้ำมันเหนียวสีเขียวเกือบดำ ตามผลการทดลองต่อไปนี้

ตารางที่ 1

ปริมาณของ crude extract ที่สกัดด้วย petroleum ether

| ครั้งที่ | บรเพ็ดแห้ง (kg.) | petroleum ether (l.) | crude extract (g) | % โดยน้ำหนักของ crude extract |
|----------|------------------|----------------------|-------------------|-------------------------------|
| 1 | 5 | 8 | 35 | 0.7 |
| 2 | 10 | 15 | 69.5 | 0.695 |
| 3 | 10 | 18.5 | 70.2 | 0.702 |
| 4 | 15 | 25 | 105.4 | 0.702 |
| 5 | 20 | 35 | 137.5 | 0.69 |

3.2 การแยกสารบริสุทธิ์ออกจาก crude extract

นำเอา crude extract ที่สกัดด้วย petroleum ether 35 g. ละลายใน petroleum ether 100 ml. ผ่าน solution ลงใน column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm. ยาว 120 cm. ใช้ alumina 600 g. เป็น adsorbent แล้ว elute ด้วย solvents ต่าง ๆ เก็บ eluate ที่ออกมา fraction ละ 1 l. กลั่นได้ solvent ออกจนเหลือ solution ปริมาณ

25 ml. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก

ตารางที่ 2

การแยกสารออกจาก crude extract ที่สกัดด้วย petroleum ether โดยวิธี
column chromatography

| eluent | จำนวน fraction | สารที่ได้อะไรและ m.p. | น้ำหนักของสาร (g) |
|--------------------------------|----------------|--|-------------------|
| petroleum ether | 13 | วุ้นปนน้ำมันและของแข็ง m.p. 75 - 80° | 0.023 |
| benzene:petroleum ether (1:19) | 8 | สาร m.p. 205 - 206° | 0.027 |
| | | ปนกับสาร m.p. 79-80° และน้ำมันสีเหลือง | 0.229 |
| benzene:petroleum ether (1:9) | 6 | ตะกอนเป็นขุยเหมือนฝ้าย m.p. 125 - 128° | 0.042 |
| benzene:petroleum ether (1:4) | 7 | ของแข็งรูปเส้นกายสีขาว ตกผลึกข้างขวด m.p. 130 - 136° | 0.098 |
| benzene:petroleum ether (3:7) | 6 | ผลึกรูปเข็มสีขาว m.p. 146 - 151° | 0.048 |
| benzene:petroleum ether (2:3) | 5 | ผลึกรูปเข็ม 3 - 4 ผลึก | - |
| benzene:petroleum ether (1:1) | 4 | สารเหนียวติดก้นขวด | - |
| benzene | 6 | สารเหนียวสีน้ำตาลแดง | - |
| chloroform | 6 | วุ้น เมื่อแห้งเป็นผง m.p. 73 - 78° | 0.012 |

| eluent | จำนวน fraction | สารที่โคและ m.p. | น้ำหนักของสาร (g.) |
|-------------------|----------------|---|--------------------|
| isopropyl alcohol | 6 | วุ้นเมื่อแห้งเป็นผงสีขาว m.p. 72 - 75° | - |
| ethyl alcohol | 5 | สารสีน้ำตาลเมื่อแห้งจะ สีขาว | - |
| methyl alcohol | 8 | วุ้นแห้งสีขาว | - |
| acetone | 4 | สารลักษณะเหมือนแป้ง- เปียกกลางคืนจะสีขาว | - |

3.3 การทำสารให้บริสุทธิ์ (purification)

3.3.1 วิธีทำสาร m.p. 75 - 80° ให้บริสุทธิ์

นำสาร m.p. 75 - 80° ที่ได้จากการ elute ด้วย petroleum ether มาตกผลึกใน petroleum ether โดยตั้งสีขาวบนน้ำมัน นำมาทำ TLC. พบว่ามีแต่น้ำมัน เท่านั้นที่เป็น impurity จึงนำไปตกผลึกใหม่ด้วย benzene โดยผลึกเป็นเม็ดเล็ก ๆ สีขาว m.p. 80 - 81° กำหนดให้เป็นสาร ก. น้ำหนัก 0.019 g.

3.3.2 วิธีทำสาร m.p. 79 - 80° และ 205 - 206° ให้บริสุทธิ์

นำสารที่ได้จากการ elute ด้วย benzene : petroleum ether (1 : 19) มาตกผลึกด้วย benzene เมื่อ solution เย็นลง สาร m.p. 79 - 80° ตกผลึกออกมากจน กรอง solution ที่เหลือทิ้งทิ้งไว้ ประมาณ 3 วัน โดยลึกรูปเป็นผอม m.p. 205 - 206° ที่อุณหภูมิประมาณ 20° ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้จะกลับละลายใหม่ นำผลึกที่ได้ทิ้ง 2 หนักนี้ มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปดังนี้

สาร m.p. 79 - 80° นำมาตกผลึกใหม่ด้วย benzene จนได้ผลึกเป็น
แผ่นบางใส m.p. 80 - 81° พบว่าเป็นสารเดียวกับสาร ก. โดยการทำให้
m.p., m.m.p., TLC. และค่า R_f .

สาร m.p. 205 - 206° นำมาตกผลึกด้วย benzene ที่อุณหภูมิ 20°
จนได้ผลึกเป็นแผ่นเล็กบาง m.p. 206 - 207° กำหนดให้เป็นสาร ข.
หนัก 0.023 g.

3.3.3 วิธีทำสาร m.p. 125 - 128° ไทบริสทุธิ์

นำสารที่มีลักษณะเป็นผง m.p. 125 - 128° ซึ่งได้จากการ elute
ด้วย benzene : petroleum ether (1 : 9) มาตกผลึกด้วย petro-
leum ether จะได้สาร 2 ชนิด สารที่มี m.p. 130 - 135° จะตก
ผลึกเป็นเส้นยาว ๆ ที่ข้าง ๆ ขวด สาร m.p. 85 - 95° จะเหลืออยู่บนขวด
ซึ่งมีปริมาณน้อยมาก ไม่พอที่จะนำมาศึกษาอย่างละเอียด

นำผลึกรูปเส้นสายมาตกผลึกใหม่ด้วย methyl alcohol จะได้ผลึกเป็นแผ่น
ใส m.p. 138 - 139° แลวนำมาตกผลึกใหม่ด้วย petroleum ether
จะได้ผลึกรูปเข็มใส m.p. ไม่เปลี่ยนแปลง กำหนดให้เป็นสาร ค. หนัก
0.031 g.

3.3.4 วิธีทำสาร m.p. 130 - 135° ไทบริสทุธิ์

นำสาร m.p. 130 - 136° ที่ elute ด้วย benzene : petroleum
ether (1 : 4) ตกผลึกด้วย solvents ต่าง ๆ เหมือนข้อ 3.3.3 ได้
ผลึกรูปเข็ม m.p. 138 - 139° พบว่าเป็นสารเดียวกับสาร ค. โดยการ
ทำ m.p., m.m.p., TLC. และค่า R_f .

3.3.5 วิธีทำสาร m.p. 146 - 151° ไทบริสทุธิ์

นำสาร m.p. 146 - 151° ที่ elute ด้วย benzene : petroleum
ether (3 : 7) มาตกผลึกด้วย petroleum ether ได้ผลึกรูปเข็ม m.p.

150 - 156° นำมาตกผลึกใหม่ด้วย ethyl alcohol โดยลึกลงเป็น
 แขนบาง ๆ m.p. 167 - 168° แล้วนำมาตกผลึกใหม่ด้วย petro-
 leum ether โดยลึกลงเป็นใส m.p. 167 - 168° กำหนดให้เป็น
 สาร ง. หนัก 0.26 g.

3.4 การตรวจลักษณะของสารประกอบที่แยกออกมาได้

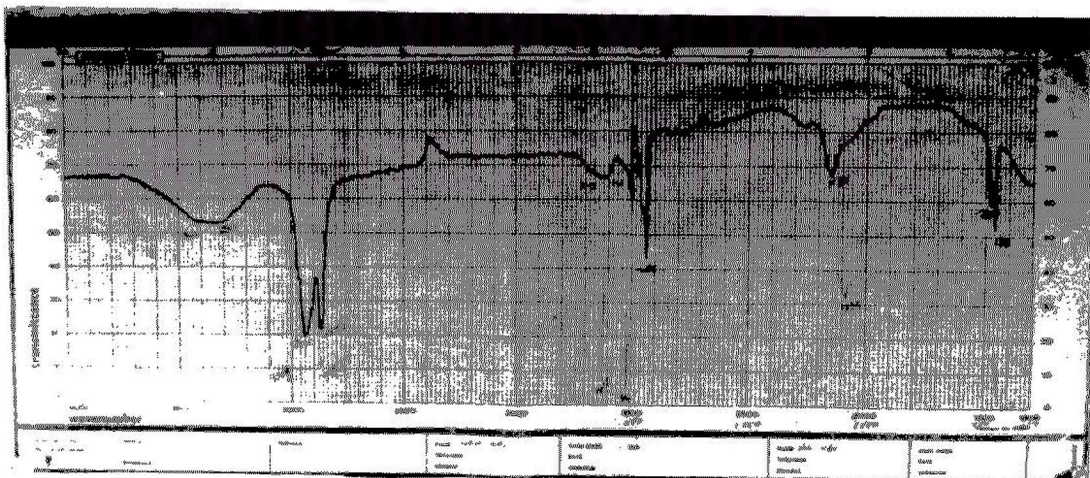
3.4.1 การตรวจลักษณะของสาร ก. m.p. 80 - 81°

3.4.1.1 Physical properties ของสาร ก.

สาร ก. ละลายได้ดีใน chloroform, benzene, petroleum
 ether ไม่ละลายน้ำ R_f (benzene) = 0.20 infra-red
 spectrum ของสาร ก. มี characteristic peaks ตามรูป
 ที่ 1 และตารางที่ 3

รูปที่ 1

Infra-red spectrum ของสาร ก. m.p. 80 - 81°



ตารางที่ 3

IR. absorption peaks ของสาร ก. n.p. 80 - 81°

| Frequency (cm ⁻¹) | Band Type | Assignments |
|-------------------------------|------------------------|---|
| 3400-3200 | very broad | Stretching vibration of -OH |
| 2910, 2850 | sharp | CH- stretching vibration of -CH ₃ and -CH ₂ - |
| 1470, 1465 | sharp | -CH ₂ - bending vibration |
| 1390, 1370 | two broad peaks (weak) | associated -OH in-plane bending vibration |
| 1050 | broad | C-O stretching vibration of primary alcohol |
| 720, 710 | sharp | (CH ₂) _n , rocking, n = 4 |

การตรวจหาธาตุต่าง ๆ ในสาร ก. ไม่พบ nitrogen, sulfur หรือ halogens การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ carbon และ hydrogen ได้ ผลดังนี้ C = 81.70 % H = 13.58 %

คำนวณจากสูตร (C₂₆H₅₄O) ได้ C = 81.60 %, H = 14.22 %

3.4.1.2 การตรวจหา functional groups ของสาร ก.

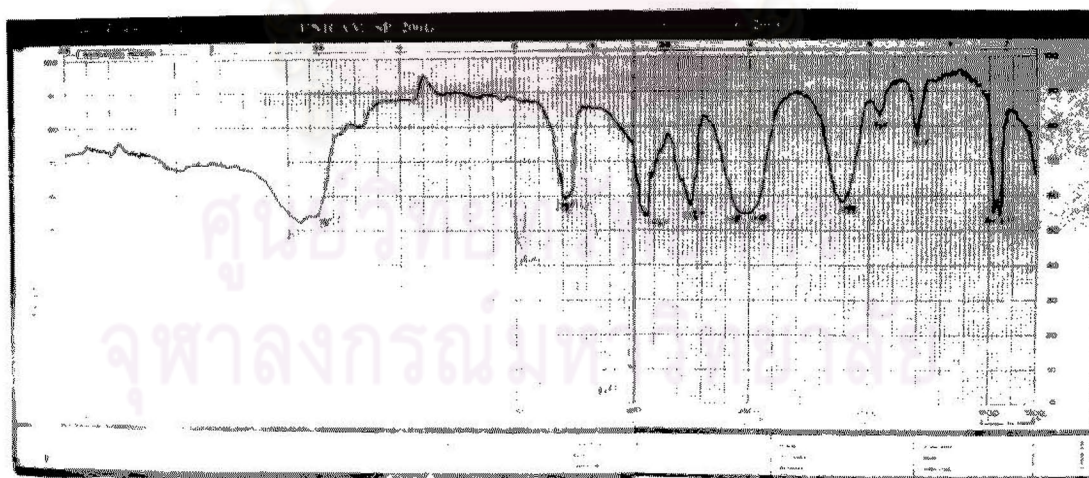
การตรวจหา functional groups ของสาร ก. ตาม standard methods พบว่า ไม่พบกัลโบรมีนในคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ไม่พบกัลสารละลาย KMnO₄ ไม่ทำปฏิกิริยากับ 2, 4 -dinitrophenylhydrazine ไม่ reduce Tollen's reagent และ Fehling's solution และไม่เปลี่ยนสีสารละลาย ferric chloride

3.4.1.3 การสังเคราะห์ derivative ของสาร ก. (acetylation)

ละลายสาร ก. หนัก 237 mg. ด้วย pyridine 8 ml. ในขวดกวนกลม
เติม acetic anhydride 4 ml. reflux บน water bath 6 ชม.
ทำให้เย็น เทลงในน้ำผสมน้ำแข็ง 50 ml. คนให้ทั่ว กรองตะกอนขาวออก
ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่เย็นจนหมดกลิ่น pyridine และ acetic acid
ทำให้แห้ง จะได้ crude derivative 243 mg. ตกผลึกใน benzene
หลาย ๆ ครั้ง โดยลึกรูปแผ่นบางใส m.p. 60 - 61° infra-red
spectrum ของ acetate ของสาร ก. มี characteristic
peaks ตามรูปที่ 2 และตารางที่ 4

รูปที่ 2

Infra-red spectrum ของ acetate ของสาร ก.



ตารางที่ 4

IR. absorption peaks ของ acetate ของสาร ก.

| Frequency (cm ⁻¹) | Band Type | Assignments |
|-------------------------------|------------|--|
| 2925, 2851 | sharp | CH stretching vibration of -CH ₃ and -CH ₂ |
| 1730 | sharp | C=O stretching vibration |
| 1460 | sharp | CH bending vibration of -CH ₂ - |
| 1360 | very sharp | CH bending vibration of -CH ₃ (symmetrical) |
| 1240 | broad | C-O symmetric stretching of acetate C-O-C (so called acetate band) |
| 1030 | broad | C-O stretching vibration |
| 730, 720 | sharp | (CH ₂) _n rocking, n = 4 |

3.4.1.4 การ hydrolyse acetyl derivative ของสาร ก.

ละลาย acetyl derivative ของสาร ก. 25 mg. ใน methyl alcohol 5 ml. ในขวดก้นกลม เติมสารละลาย 10% KOH 4 ml. reflux บน water bath เป็นเวลา 6 ชม. ทำให้เย็น เทลงในน้ำกลั่น 25 ml. คนให้ทั่ว กรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดฤทธิ์ด่าง ทิ้งไว้จนตะกอนแห้ง โคลงสกัดสีน้ำตาล 16 mg. นำมาตกผลึกใน benzene หลาย ๆ ครั้ง จนได้ผลึกรูปแผ่นบาง ๆ m.p. 80° - 81° พบว่าเป็นสารเดียวกับสาร ก. โดยการนำ m.p., m.m.p., TLC. และค่า R_F.

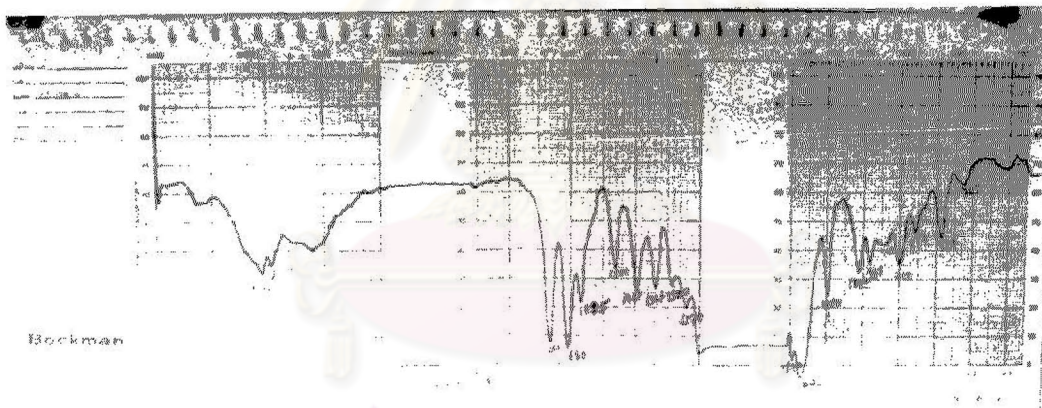
3.4.2 การตรวจลักษณะของสาร ข. m.p. 206 - 207°

3.4.2.1 Physical properties ของสาร ข.

สาร ข. ละลายได้ดีใน chloroform, benzene, ether, ethyl alcohol ร้อน และสารละลาย NaOH แต่ไม่ละลายน้ำ และสารละลาย HCl $R_f(\text{benzene}) = 0.3$ infra-red spectrum ของสาร ข. มี characteristic peaks ตามรูปที่ 3 และตารางที่ 5

รูปที่ 3

Infra-red spectrum ของสาร ข. m.p. 205 - 207°



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5

IR. absorption peaks ของสาร m.p. 206 - 207°

| Frequency (cm ⁻¹) | Band Type | Assignment |
|-------------------------------|-----------|--|
| 2920, 2850 | broad | Chelation (Intramolecular H-bond) with C = O |
| 1760 | sharp | $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{C}=\text{C}- \end{array}$ |
| 1680, 830 | sharp | C=C stretching vibration of trisubstituted double bond $\text{CR}'\text{R}'' = \text{CR}'''\text{H}$ |
| 1460 | sharp | CH bending vibration of CH ₂ |
| 1370 | sharp | C-CH ₃ bending vibration gem-dimethyl group. |
| 1100 | sharp | C-O symmetrical stretching of secondary alcohol. |

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ carbon และ hydrogen โดยลคั้งนี้

C = 63.49 % H = 6.96 %

3.4.2.2 การตรวจหา functional groups ของสาร ข. l.p. 206 - 207

การตรวจหา functional groups ของสาร ข. ตาม standard methods พบว่า สามารถฟอกสี bromine in carbontetrachloride ฟอกสีสารละลาย $KMnO_4$ ทำปฏิกิริยากับ 2, 4 - dinitrophenylhydrazine เรืองแสงใน U.V. ทำปฏิกิริยากับ Liebermann-Burchard reagent ใคสีเหลืองจําปา

3.4.3 การตรวจลักษณะของสาร ค. n.p. 138 - 139

3.4.3.1 Physical properties ของสาร ค.

สาร ค. ละลายใค้กัใน chloroform, benzene, ether, acetone, petroleum ether ีรอน, ethyl alcohol, methyl alcohol แต่ไม่ละลายน้ำ infra-red spectrum ของสาร ค. มี characteristic peaks ตามรูปที่ 4 และตารางที่ 6

รูปที่ 4

002807

Infra-red spectrum ของสาร ค. n.p. 138 - 139



ตารางที่ 6

IR. absorption peaks ของสาร ค. r.p. 138 = 139

| Frequency (cm ⁻¹) | Band Type | Assignments |
|-------------------------------|--------------|--|
| 3440 | very broad | stretching vibration of -OH |
| 2980-2825 | sharp | CH stretching vibration of CH ₃ and CH ₂ |
| 1670-1641 | broad (weak) | C=C stretching vibration of R ₂ C = CHR |
| 1450 | sharp | CH ₂ bending vibration |
| 1380 | sharp | C-CH ₃ bending vibration (symmetrical) |
| 1050, 1020 | sharp | C-O stretching vibration of 3 B - OH equatorial steroid |
| 950 | weak | CH out of plane bending vibration of trans RCH=CHR |
| 808 | sharp | CH out of plane bending vibration of R ₂ C = CHR |

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ carbon และ hydrogen ได้ดังนี้

C = 82.58 % H = 12.02 %

คำนวณจากสูตร C₂₉H₅₀O ได้ดังนี้

C = 84.05 % H = 12.07 %

3.4.3.2 การตรวจหา functional groups ของสาร ค.

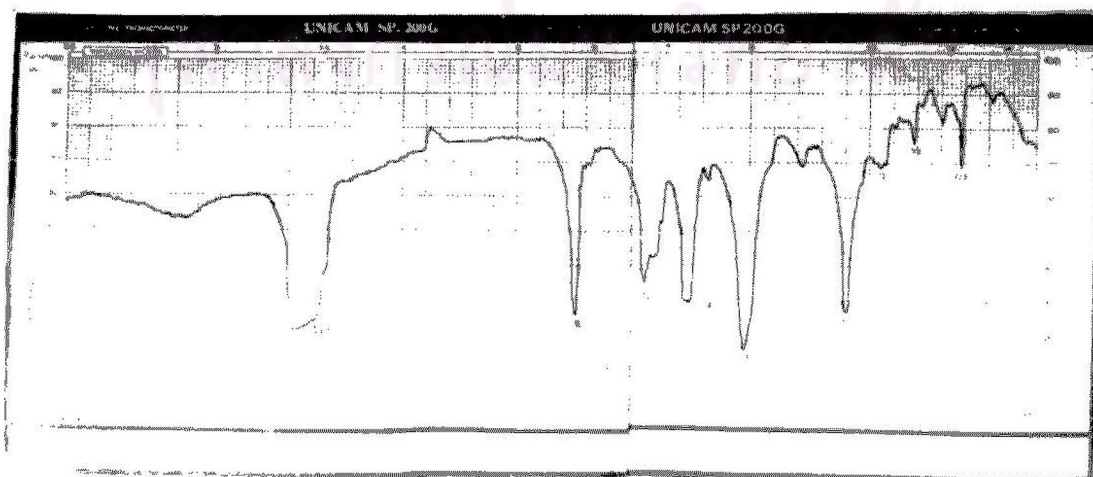
การตรวจหา functional groups ของสาร ค. ตาม standard methods พบว่า สามารถฟอกสี bromine in carbontetrachloride แต่ไม่เกิด gas HBr. ฟอกสีสารละลาย $KMnO_4$ ไม่ทำปฏิกิริยากับ 2, 4-dinitrophenylhydrazine ไม่ reduce Tollen's reagent, Fehling's solution และ Benedict's solution ไม่ให้สีกับสารละลาย ferric chloride

3.4.3.8 การสังเคราะห์ derivative ของสาร ค. (acetylation)

ละลายสาร ค. หนัก 111 mg. ด้วย pyridine 3 ml. ในขวดกนกกลม เติมน้ำ acetic anhydride 3 ml. เขย่าขวด ตั้งทิ้งไว้ 1 คืน แล้วนำเอาไปแยกได้ crude derivative 52 mg. นำมาตกผลึกด้วย ethyl alcohol หลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกเป็นแผ่นบาง m.p. $129 - 130^\circ$ infra-red spectrum ของ acetate ของสาร ค. มี characteristic peaks ตามรูปที่ 5 และตารางที่ 7

รูปที่ 5

Infra-red spectrum ของ acetate ของสาร ค.



ตารางที่ 7

IR. absorption peaks ของ acetate ของสาร ค. n.p. 129-130

| Frequency (cm^{-1}) | Band Type | Assignment |
|--------------------------------|------------|--|
| 2953-2851 | broad | CH stretching vibration of CH_3 , $-\text{CH}_2-$ |
| 1720 | very sharp | C=O stretching vibration of ketone |
| 1460, 1435 | sharp | CH bending vibration of CH_3 and CH_2- |
| 1380-1359 | sharp | C- CH_3 bending vibration (syn.) |
| 1240 | sharp | C=O symmetric stretching of acetate = C-O-C (so called acetate band) |
| 1030 | sharp | C-O stretching vibration |
| 970 | weak | CH out of plane of trans R-CH=CH-R |
| 800 | weak | CH out of plane bending vibration of $\text{R}_2\text{C} = \text{CHR}$ |

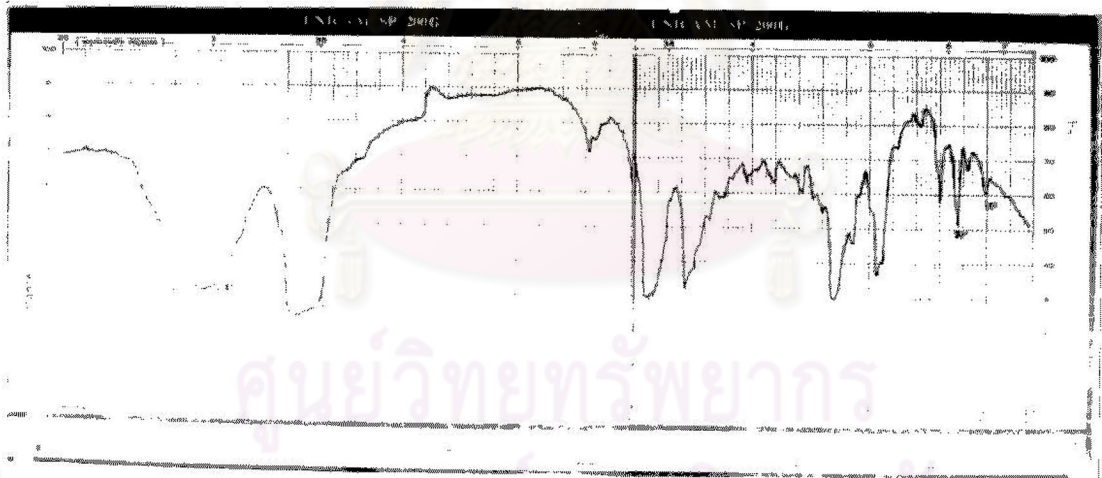
3.4.4 การตรวจลักษณะของสาร ง. n.p. 167 - 168

3.4.4.1 Physical properties ของสาร ง.

สาร ง. ละลายได้ดีใน chloroform, acetone, benzene, ether, ethyl alcohol, petroleum ether ร้อน และ methyl alcohol, R_f (petroleum ether : ether, 1 : 3) = 0.67 infra-red spectrum ของสาร ง. มี characteristic peaks ตามรูปที่ 6 ตารางที่ 8

รูปที่ 6

Infra-red spectrum ของสาร ง. n.p. 167 - 168



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8

IR. absorption peaks ของสาร ง. n.p. 167 - 168

| Frequency (cm ⁻¹) | Band Type | Assignments |
|-------------------------------|-------------------------------|---|
| 3353 | very broad | stretching vibration of -OH |
| 2950-2851 | broad | CH stretching vibration of -CH ₃ |
| 1445 | broad | CH bending vibration of -CH ₂ - |
| 1380 | broad | C-CH ₃ bending vibration |
| 1050 | sharp | C-O stretching vibration |
| 960 | sharp | C-H out of plane bending vibration of trans disubstituted alkene RCH = CHR |
| 830, 790 | one pair of band (weak) | CH out of plane bending vibration of R ₂ C = CHR trisubstituted alkene |

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ carbon และ hydrogen ไก้มลทินนี้

$$C = 84.32 \% \quad H = 11.55 \%$$

คำนวณจากสูตร C₂₉H₄₈O ไก้มลทินนี้

$$C = 84.40 \% \quad H = 11.72 \%$$

3.4.4.2 การตรวจหา functional groups ของสาร ง.

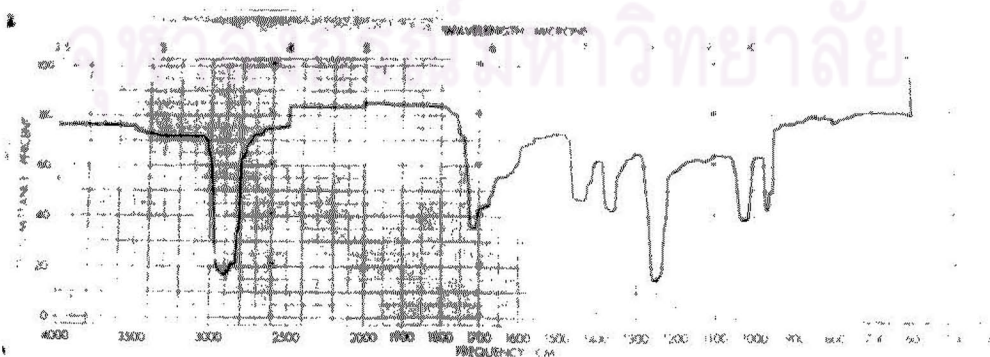
การตรวจหา functional groups ของสาร ง. ตาม standard methods พบว่า ฟอกสี bromine in carbontetrachloride แต่ไม่ให้ gas HBr ฟอกสีสารละลาย $KMnO_4$ ไม่ทำปฏิกิริยากับ 2, 4-dinitrophenylhydrazine ไม่ reduce Tollen's reagent, Fehling's solution และไม่เปลี่ยนสีสารละลาย ferric chloride

3.4.4.3 การสังเคราะห์ derivative ของสาร ง. (acetylation)

ละลายสาร ง. 100 mg. ลงใน pyridine 3 ml. ในขวดกลั่นกลม เติม acetic anhydride 3 ml. เขย่า แล้ว reflux ใน water bath 4 ชม. แล้วนำเอาไปแยก ได้ crude derivative 75 mg. ตกผลึกใน ethyl alcohol หลาย ๆ ครั้ง จนได้ผลึกเป็นแผ่นบาง m.p. 143 - 144° infra-red spectrum ของ acetate ของสาร ง. มี characteristic peaks ตามรูปที่ 7 และตารางที่ 9

รูปที่ 7

Infra-red spectrum ของ acetate ของสาร ง.



ตารางที่ 9

IR. absorption peaks ของ acetate ของสาร ง.

| Frequency (cm^{-1}) | Band Type | Assignments |
|--------------------------------|-----------|---|
| 2893 | broad | CH stretching vibration of CH_3 and CH_2 |
| 1730 | sharp | C=O stretching vibration |
| 1465-1430 | broad | CH stretching vibration of CH_2 and CH_3 |
| 1355 | broad | C- CH_3 bending vibration (symmetrical) |
| 1250 | sharp | C-O asymmetric stretching of acetate C-O-C (so called acetate band) |
| 1039 | sharp | C-O stretching vibration of secondary alcohol |
| 970 | sharp | CH out of plane of trans-RCH = CHR |

3.5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง ตอนที่ 1

บรเพ็ดเป็นพืชที่ประกอบด้วย น้ำตาล glycosides และน้ำมันเป็นส่วนมาก การสกัดด้วย petroleum ether fraction แรก ๆ จะมีน้ำมันปนออกมามาก fraction ต่อ ๆ ไปจึงจะมี solid มากขึ้น เมื่อนำ crude extract ไปแยก

ด้วย column chromatography โดยใช้ standardised alumina เป็น adsorbent ใช้ petroleum ether และ benzene : petroleum ether เป็น eluents จะได้สารออกมา 4 ชนิด กำหนดให้เป็น

สาร ก. m.p. 80-81°

สาร ข. m.p. 206-207°

สาร ค. m.p. 138-139°

สาร ง. m.p. 167-168°

3.5.1 สาร ก. m.p. 80 - 81°

สาร ก. เป็นส่วนที่แยกโดยการ elute column ด้วย petroleum ether ถกผลึกด้วย benzene ได้สาร m.p. 80 - 81° ไม่พอกสี bromine in carbontetrachloride ไม่พอกสีสารละลาย KMnO_4 และไม่ทำปฏิกิริยากับ Liebermann-Burchard reagent R_f (benzene) = 0.29 ซึ่งเท่ากับ ceryl alcohol¹⁴

IR. spectrum แสดง absorption peaks ของ -OH ($3400-3200 \text{ cm}^{-1}$ และ 1750 cm^{-1}) CH_3 , $-\text{CH}_2$ (2910 , 2850 , 1465 , 1370 , 730 และ 710 cm^{-1}) ไม่มี absorption peaks ของ olefinic linkage, branched chain skeleton หรือ carbonyl group อยู่เลย แสดงว่า สาร ก. นี้เป็น saturated long chain alcohol ซึ่ง identical กับ IR. spectrum ของ ceryl alcohol ทุกประการ¹⁶

ผลจากการวิเคราะห์ธาตุต่าง ๆ พบว่ามี

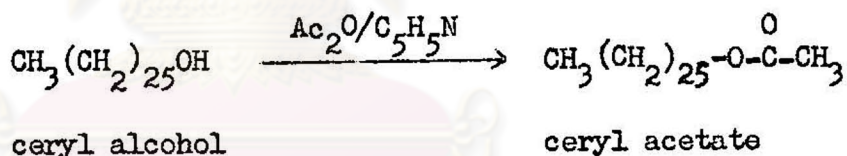
C = 81.70 % H = 13.58 %

คำนวณจากสูตร $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}$ พบว่ามี

C = 81.60 % H = 14.22 %

ceryl alcohol หรือ 1-hexacosanol¹⁶ มีสูตร $C_{26}H_{54}O$ พบในธรรมชาติ ส่วนมากอยู่ใน wax ที่สกัดจากพืช หรือสัตว์¹⁸ อาจะอยู่ใน form ของ ester of fatty acids หรือ free alcohol เช่นใน chinese insect wax, cock-foot, rye-glass¹⁸ ฯลฯ IR. spectrum ของ ceryl alcohol¹⁶ แสดง absorption peaks (3320, 2920, 2850, 1470, 1460, 1370, 1060, 730, 720 cm^{-1}) ได้เตรียม acetyl derivative ของสาร ก. พบว่าเหมือนกับ ceryl acetate ทุกประการ โดยการหา m.p., m.m.p. ค่า R_f และเมื่อ hydrolyse จะได้ alcohol เดิมกลับคืนมา

จากเหตุผลดังกล่าวนี้จึงสรุปได้ว่า สาร ก. คือ ceryl alcohol มีสูตรโครงสร้าง และปฏิกิริยา acetylation ดังนี้



3.5.2 สาร ข. m.p. 206-207°

สาร ข. เป็นส่วนที่แยกโดยการ elute column ด้วย benzene : petroleum ether (1 : 19) ตกผลึกด้วย benzene ได้สาร m.p. 206-207° ฟอกสี bromine in carbontetrachloride ฟอกสีสารละลาย $KMnO_4$ ทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine ได้ตะกอนสีเหลือง เรืองแสงใน UV. แสดงว่า สารนี้เป็น unsaturated carbonyl compound

IR. absorption peaks ของสาร แสดงว่ามี $C=O$ ($1760\text{ }cm^{-1}$) $C=C$ ($1680, 920, 830\text{ }cm^{-1}$) มี CH_2- และ CH_3 ($1460, 1370\text{ }cm^{-1}$) $C-O$ ($1100\text{ }cm^{-1}$)

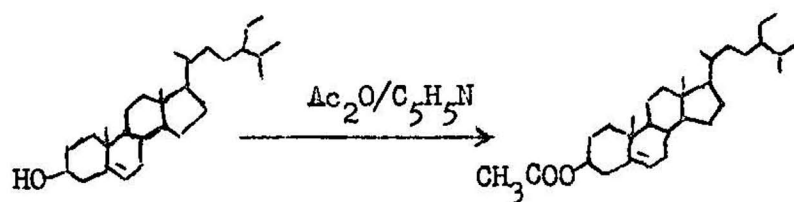
ผลจากการวิเคราะห์หาธาตุต่าง ๆ พบว่ามี

C = 63.49 % H = 6.96 %

แต่สารนี้ไม่ได้ identify ท่อไป เพราะมีปริมาณน้อย

3.5.3 สาร ค. m.p. 138 - 139°

สาร ค. แยกโดยการ elute column ด้วย benzene : petroleum ether (1 : 4) ตกผลึกด้วย methyl alcohol จนได้สารที่มี m.p. 138 - 139° สาร ข. ฟอกสี bromine in carbon tetrachloride แต่ไม่ให้ gas HBr ฟอกสีสารละลาย $KMnO_4$ ไม่ทำปฏิกิริยากับ 2, 4-dinitrophenylhydrazine ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย ferric chloride ทำปฏิกิริยากับ Liebermann-Burchard reagent ใกล้เคียง R_f (benzene : petroleum ether 1 : 9) = 0.23 IR. spectrum แสดง characteristic ของ -OH ($3440, 1050\text{ cm}^{-1}$) trisubstituted ethylene ($1641, 808\text{ cm}^{-1}$) พบว่า สาร ค. เป็น unsaturated steroid compound ซึ่ง identical กับ β -sitosterol²³ โดยการหาค่า m.p., m.m.p., และ TLC. เพื่อที่จะยืนยันว่าเป็น β -sitosterol แน่ จึงใช้วิธีเตรียม acetyl derivative จากการทดสอบพบว่า acetate ของสาร ค. เหมือนกับ β -sitosteryl acetate ทุกประการ โดยการหาค่า m.p., m.m.p., และค่า R_f จากเหตุผลดังกล่าว จึงสรุปได้ว่า สาร ค. คือ β -sitosterol มีสูตรโครงสร้าง และปฏิกิริยา acetylation ดังต่อไปนี้



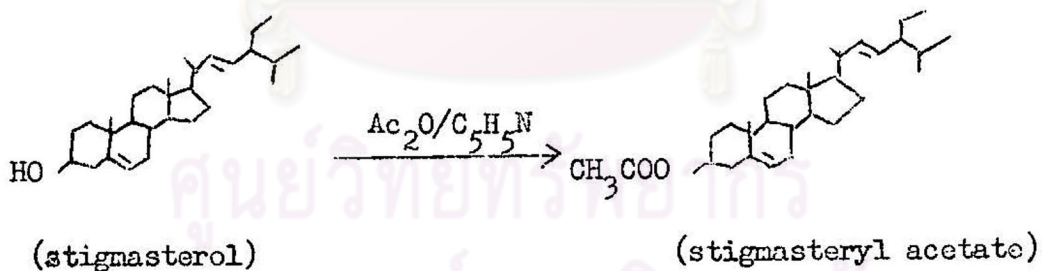
(β -sitosterol)

(β -sitosteryl acetate)

3.5.4 สาร ง. m.p. 167 - 168°

สาร ง. แยกโดยการ elute column ด้วย benzene : petroleum ether 3 : 7 ตกผลึกใน ethyl alcohol จนได้ผลึกที่มี m.p. 167 - 168° ออกสี bromine in carbontetrachloride แต่ไม่ให้ gas HBr ทำปฏิกิริยากับ Liebermann - Burchard reagent ได้สีน้ำเงิน R_f (petroleum ether : ether, 1 : 3) = 0.62 IR. spectrum แสดง characteristic ของ -OH (3353 cm^{-1}), $-\text{CH}_2-$ ($2950-2851\text{ cm}^{-1}$) C-CH₃ (1380 cm^{-1}), C-O (1050 cm^{-1}) ซึ่ง identical กับ stigmasterol¹⁶ ทุกประการ โดยการห่า m.p., m.m.p. และ TLC เพื่อจะยืนยันว่า สาร ง. เป็น stigmasterol แน่จน จึงใช้วิธีเตรียม acetyl derivative พบว่า acetate ของสาร ง. เหมือนกับ stigmasteryl acetate ทุกประการ โดยการห่า IR., m.p., m.m.p. และ TLC.

จากเหตุผลดังกล่าว พอสรุปได้ว่า สาร ง. คือ stigmasterol มีสูตรโครงสร้าง และปฏิกิริยา acetylation ดังนี้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตอนที่ 2 สกักคาย solvents อื่น ๆ

3.6 การสกักคาย isopropyl alcohol

นำบรเพ็ดที่เหลือจากการสกักคาย petroleum ether มาทำให้แห้ง แล้ว สกักคาย isopropyl alcohol กรอง กลั่นได้ solvents ออก จะได้ crude extract ประมาณ 500 g.

3.6.1 วิธีแยกสารจาก crude extract

crude extract ที่สกักคาย isopropyl alcohol นี้ ถ้าใช้ column chromatography ไม่สามารถจะแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ จึงแยกโดยการสกัก คาย solvents ต่าง ๆ แล้วทำ column chromatography โดยล้ง ต่อไปนี้

petroleum ether โคน้ำมันขุ่นสีเขียวเข้ม ซึ่งไม่ถูก absorb โดย alumina ฉะนั้น จึงทำให้บริสุทธิ์ โดย column chromatography ต่อไปนี้

benzene โคนสารละลายสีเขียวย่นน้ำตาล ทำ column chromatography ได้ รุน น้ำมัน และน้ำตาล รุนนี้เมื่อ recolumn จะได้สาร m.p. 79 - 80°

chloroform โคนสารละลายสีน้ำตาลเป็นยางเหนียว ทำ column chromatography ได้ ผงสีขาว m.p. 60 - 70° น้ำมัน, น้ำตาล และ NaCl

methyl alcohol โคนตะกอนขาว เมื่อแห้งแล้วเป็นน้ำมันเหนียว

water สารเหนียว มีรสขมจัด ให้ positive test กับ alkaloid reagents แต่ purify ไม่ได้

ของแข็งที่เหลือ เป็นผงสีเหลือง m.p. 70 - 75° ทำ column chromatography โคน้ำมันและน้ำมันเหนียวเล็กน้อย สารส่วนใหญ่ตกอยู่ใน column

3.6.2 การ hydrolyse crude extract จาก isopropyl alcohol

นำเอา crude extract มาละลายใน ethyl alcohol แล้ว reflux ด้วย HCl ที่มีความเข้มข้น 5 %, 10 %, 20 %, และ 50 % ตามลำดับ ใช้เวลาแตกต่างกัน ตั้งแต่ 2, 4, 6 ชม. ผลที่ได้จากการ hydrolyse แบ่งออกเป็น 3 ส่วน

1. ส่วนที่เป็น wax จะลอยอยู่ข้างบน
2. ส่วนที่ละลายน้ำ จะใสสารละลายสีเหลืองแกมน้ำตาล
3. ส่วนที่เป็นของแข็งสีดำ อยู่ก้นขวด

ปริมาณของสารทั้ง 3 ชนิด นี้แตกต่างกันตามความเข้มข้นของกรด และเวลาที่ใช้

ตารางที่ 10

ปริมาณของสารที่ได้จากการ hydrolyse ด้วยกรด HCl

| สารที่ใช้ (g.) | % ของกรด | เวลาที่ใช้ (h.) | ส่วนที่ลอย (g.) | ส่วนที่จมอยู่ก้นขวด (g.) |
|-------------------|----------|--------------------|--------------------|-----------------------------|
| 100.7 | 5 % | 2 | 64.1 | 11.8 |
| 100 | 5 % | 4 | 46.7 | 14.0 |
| 100 | 5 % | 6 | 38.0 | 15.8 |
| 100.2 | 10 % | 2 | 40 | 18.4 |
| 100.8 | 10 % | 4 | 35.5 | 21 |
| 101 | 10 % | 6 | 28.7 | 23.0 |
| 104 | 20 % | 2 | 27.9 | 24 (d.) |
| 96.3 | 50 % | 2 | 27.5 | 25 (d.) |

3.6.2.1 วิธีแยก hydrolysis product ส่วนที่เป็น wax

หลังจาก hydrolyse แล้ว นำส่วนที่เป็น wax มาล้างด้วยน้ำจนหมดกรด ทำให้แห้งใน desiccator (ใช้ความร้อนไม่ไ้จะ decomposed หมด) นำมาละลายใน benzene ทำ column chromatography ใช้ standardised alumina เป็น adsorbent โดยล้กั้

ตารางที่ 11

ผลที่ได้จากการนำ wax มาทำ column chromatography

| eluents | จำนวน fraction | สารที่ได้ และ m.p. | น้ำหนักของ สาร (g.) |
|---------------------------------|----------------|---|---------------------|
| Petroleum ether | 4 | วุ้นสีขาว | 0.3 |
| benzene:petroleum ether (1:1) | 8 | วุ้นปน semisolid | 0.1 |
| benzene | 5 | amorphous solid m.p. 72-80° | 0.13 |
| benzene:chloroform (1:9) | 4 | ผลึกรูปเข็ม m.p. 137 - 139° | 7-8 ผลึก |
| benzene:chloroform (1:4) | 4 | น้ำมันสีเหลือง | - |
| benzene:chloroform (1:1) | 5 | น้ำมันเกาะกอนสี- น้ำตาล | - |
| chloroform | 2 | น้ำมันสีเหลือง | - |
| chloroform:methyl alcohol (1:1) | 6 | ผลึกของ NaCl | 0.3 |
| methyl alcohol | 6 | ผลึกสีขาว (decom- pose ที่ 176-180°) | 0.2 |

นำสาร m.p. 72 - 80° จาก fraction ที่ elute ด้วย benzene มาทำให้บริสุทธิ์ โดยตกผลึกใหม่ใน benzene จนได้ผลึก m.p. 80-81° พบว่าเป็นสารเดียวกับสาร ก. โดยการหา m.p., m.m.p., TLC และค่า R_f

3.6.2.2 วิธีแยก hydrolysis product ส่วนที่ละลายน้ำ

dilute สารละลายด้วยน้ำจนเป็นกรที่เจือจางมาก จะได้ผงสีขาว suspend อยู่ในน้ำ ซึ่งผ่านกระดาษกรองได้ นำ dilute solution นี้ไปทำ centrifuge จะได้ตะกอนสีน้ำตาลอ่อน มีรสขม นำไปวิเคราะห์ทางธาตุต่าง ๆ พบว่ามี nitrogen แต่ไม่ให้ positive test กับ alkaloid reagents

นอกจากนี้ยังนำส่วนที่ละลายน้ำมาสกัดด้วย ether แยกได้น้ำมันสีเหลืองเล็กน้อยติดกันขวด ทำการทดสอบต่อไปไม่ได้

3.6.2.3 วิธีแยก hydrolysis product (ส่วนที่จมน้ำ)

บดส่วนที่เป็นของแข็งนี้ให้ละเอียด ล้างด้วยน้ำจนหมดทุกประการ ทำให้แห้งใน desiccator ละลายสารนี้ (35g.) ใน benzene 100 ml. นำไปทำ column chromatography โคนดกดังนี้

ตารางที่ 12

ผลที่ได้จากการนำเอาส่วนที่จมน้ำมาทำ column chromatography

| eluents | จำนวน fraction | สารที่ได้ และ m.p. | น้ำหนักของสาร (g.) |
|--------------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| benzene | 2 | วุ้นสีขาว | 0.05 |
| benzene | 6 | วุ้นปนผลึกรูปเข็มฝอย | 0.1 |
| benzene:chloroform (1:9) | 5 | ผลึกรูปเข็ม m.p.137° | 0.07 |
| | 8 | สารเหนียวขุ่น | - |

วิธีทำไขมันลิกรูปไขมันที่ปนกับวาน (fraction ที่ 2) ให้บริสุทธิ์

นำสารนี้มาตกผลึกใน benzene จะได้ไขมันลิกรูปไขมันออกมาก่อน กรอง (ถ้าทิ้งไว้นาน วนจะตกลงมาปนด้วย) แล้วนำมาตกผลึกใหม่ด้วย benzene จนไขมันลิกรูปไขมันเป็นแผ่นเล็กใส m.p. 206 - 207° พบว่าเป็นสาร ข. โดยการ ทำ m.p., m.m.p., TLC และค่า R_f แต่มีปริมาณน้อยมาก

วิธีทำสาร m.p. 137 - 138° (fraction ที่ 3) ให้บริสุทธิ์

นำสาร m.p. 137 - 138° มาตกผลึกด้วย methyl alcohol จนได้ ผลึก m.p. 138 - 139° พบว่าเป็นสารเดียวกับสาร ค. โดยการ ทำ m.p. m.m.p., TLC และค่า R_f

3.7 การสกัดด้วย chloroform

นำบรเพื่อที่เหลือจากการสกัดด้วย isopropyl alcohol ทำให้แห้ง นำ มาสกัดด้วย chloroform กรอง กลั่นได้ solvent จนได้ crude extract ออกมาประมาณ 230 g. เป็นน้ำมันสีเหลืองปนน้ำตาล

3.7.1 วิธีแยกสารออกจาก crude extract จากการสกัดด้วย chloroform

นำเอา crude extract ที่สกัดด้วย chloroform 30 g. ละลายใน chloroform 100 ml. ผ่าน solution ที่กรองใน column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 cm. ยาว 150 cm. ใช้ alumina 600 g. เป็น adsorbent เก็บ eluate ที่ออกมา fraction ละ 1 ลิตร แล้ว elute ด้วย solvents ต่าง ๆ กลั่นได้ solvents จนเหลือ solution ประมาณ 25 ml. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก

ตารางที่ 13

การแยกสารออกจาก crude extract ที่สกัดด้วย chloroform โดย
วิธี column chromatography

| eluents | จำนวน fraction | สารที่ได้ |
|---------------------------------|-------------------|---|
| chloroform | 2 | ไครน เมื่อ recolumn จะได้ ผลึกสีขาว m.p. 79-80° |
| chloroform | 10 | ได้ solution สีเขียวเหลือง- เหลือง เมื่อแห้งเป็นน้ำมันเหนียวสี เหลือง |
| methyl alcohol:chloroform (1:9) | 5 | ไครน กับสารเหนียวสีน้ำตาล มีรา คำขึ้น เชื่อว่าเป็นน้ำตาล |
| methyl alcohol:chloroform (1;4) | 3 | ไครน เหนียวสีน้ำตาล |
| methyl alcohol:chloroform (1:1) | 4 | ไครน เหนียวคึกกนขวก |
| methyl alcohol | 12 | ได้ NaCl ปนสารเหนียวสีน้ำตาล |

หมายเหตุ การแยก crude extract ที่สกัดด้วย chloroform
โดย column chromatography นั้น สารส่วนใหญ่ติดอยู่ใน column
เป็น band สีน้ำตาล

สาร m.p. 79 - 81° คือ ceryl alcohol แต่มีปริมาณน้อย สาร
อื่น ๆ นอกจาก NaCl ไม่ได้ผล จึงไม่ได้ทำการทดลองต่อไป

3.8 การสกัดด้วย ethyl alcohol

นำบรเพื่อที่สกัดด้วย chloroform แล้วทำให้แห้ง สกัดด้วย ethyl
alcohol จะได้สารสีน้ำตาลแก่ ประมาณ 78 g. สารที่ได้นั้นส่วนใหญ่ละลายได้ในน้ำ

3.8.1 วิธีแยก crude extract ที่ได้จากการสกัดด้วย ethyl alcohol

นำ crude extract ซึ่งสกัดด้วย ethyl alcohol 35 g. ละลายใน ethyl alcohol ร้อน 100 ml. นำมาทำ column chromatography elute ด้วย solvents ต่าง ๆ เก็บ elute ครั้งละ 1 ลิตร กั้นได้ solvents จนเหลือ solution ประมาณ 25 ml. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก

ตารางที่ 14

การแยกสารออกจาก crude extract ที่สกัดด้วย ethyl alcohol โดยวิธี column chromatography

| eluents | จำนวน fraction | สารที่ได้ |
|--------------------------------|----------------|---|
| chloroform | 5 | ได้วุ้นผลึกรูปเข็ม เมื่อ recolumn โดยใช้ petroleum ether เป็น eluent จะได้ผลึกรูปเข็ม m.p. 104-105° แต่มีจำนวนน้อย จึงไม่สามารถจะทำการทดลองต่อไปได้ |
| ethyl alcohol:chloroform (1:9) | 6 | ได้วุ้นน้ำมันสีเหลือง |
| ethyl alcohol:chloroform (1:4) | 5 | ได้น้ำมันสีเหลืองมีจุดสีน้ำตาลปน |
| ethyl alcohol:chloroform (1:1) | 3 | ได้น้ำมันปน semisolid |
| ethyl alcohol | 5 | ได้ตะกอนสีน้ำตาล decompose ที่ 270° |
| acetone | 7 | ได้ของเหลวเหนียว เมื่อทิ้งค้าง- จะขุ่น |

หมายเหตุ การแยก crude extract ที่สกัดด้วย ethyl alcohol โดย column chromatography นั้น สารส่วนใหญ่ที่คั่งอยู่ใน column

3.9 การสกัดด้วย ethyl acetate

นำบรเพ็ดที่เหลือจากการสกัดด้วย ethyl alcohol มาทำให้แห้ง แล้วสกัดต่อไปด้วย ethyl acetate กรอง แล้วทำให้แห้ง จะได้ semisolid สีน้ำตาล

3.9.1 วิธีแยกสารออกจาก crude extract ที่สกัดด้วย ethyl acetate

โดยวิธี column chromatography

crude extract ที่ละลายได้ในน้ำร้อน เมื่อเย็นลงจะขุ่น และจะ decompose ถ้าเก็บไว้แห้ง crude นี้จะละลายได้ดีใน ethyl alcohol แต่ไม่ตกผลึก นำ crude extract 30 g. ละลายใน chloroform 100 ml. ทำ column chromatography แล้ว elute ด้วย solvents ต่าง ๆ เก็บ eluate ที่ออกมา fraction ละ 1 ลิตร กลั่นได้ solvent จนเหลือ solution ประมาณ 25 ml. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก

ตารางที่ 15

การแยกสารออกจาก crude extract ที่สกัดด้วย ethyl acetate โดยวิธี column chromatography

| eluents | จำนวน fraction | สารที่ได้ |
|---------------------------------|----------------|--|
| chloroform | 5 | ไคตะกอนปนขุ่น |
| chloroform | 11 | ไคตะกอนขาว. m.p. 75-80° แต่มีจำนวนน้อยมาก |
| methyl alcohol:chloroform (1:1) | 7 | ไคสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม |
| methyl alcohol | 4 | ไคผลึก m.p. 72-73° |
| methyl alcohol | 8 | ไคคราบสีเหลืองที่ก้นขวด |

หมายเหตุ การแยก crude extract ที่สกัดด้วย ethyl acetate โดย column chromatography นั้น สารส่วนใหญ่ตกอยู่ใน column

3.10 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง ตอนที่ 2

บรเพ็ดที่เหลือจากการสกัดด้วย petroleum ether แลวนำมาสกัดด้วย solvents ที่มี polarity สูงขึ้น เช่น chloroform, isopropyl alcohol, ethyl alcohol และ ethyl acetate ได้ผลดังต่อไปนี้ crude extract ที่ได้จากการสกัดด้วย isopropyl alcohol นั้น ไม่สามารถจะแยกด้วย column chromatography จึงนำ crude extract นี้ไป hydrolyse ด้วย 10 % HCl จะได้สารออกมาเป็น 3 ส่วน คือ

1. ส่วนที่เป็น wax ลอยอยู่ข้างบน แยกได้ ceryl alcohol (โดยการทำ m.p., m.m.p., TLC. และค่า R_f) กับผงสีขาว
m.p. $170^\circ - 180^\circ$ (d.)
2. ส่วนที่ละลายน้ำ เมื่อทำให้แห้ง จะได้สารเหนียว รสขม แต่มีจำนวนน้อย ไม่พอที่จะทำการทดลองต่อไป
3. ของแข็งที่อยู่ก้นขวด แยกได้ β -sitosterol (โดยการทำ m.p., m.m.p., TLC. และค่า R_f)

crude extract ที่ได้จากการสกัดด้วย chloroform ส่วนใหญ่เป็นน้ำมัน น้ำตาล glycosides และ pigment สีเขียวเข้ม เมื่อทำ column chromatography สารส่วนใหญ่จะตกอยู่ใน column ไม่ได้ทำการทดลองต่อไป

crude extract ที่ได้จากการสกัดด้วย ethyl alcohol ส่วนใหญ่จะเป็นสารที่ละลายได้ในน้ำ ให้ positive test กับ alkaloid reagents แต่ทำให้บริสุทธิ์ไม่ได้ เมื่อทำ column chromatography จะได้สาร m.p. $105 - 106^\circ$ และสาร m.p. 270° (d) แต่มีอยู่เพียงเล็กน้อย ไม่พอที่จะทำการทดลองต่อไป crude ที่ได้จากการสกัดด้วย ethyl acetate สารส่วนใหญ่เป็นสารที่ละลายน้ำ และละลายได้ในสารละลาย NaOH แต่ทำให้บริสุทธิ์ไม่ได้ เนื่องจากสารนี้สลายตัวเมื่อถูกความร้อน และพบว่ามี nitrogen แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ alkaloid reagents.