

บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง



2.1 พืชตัวอย่าง

ใบแก้วไต้จาก บริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เก็บประมาณเดือน กรกฎาคม

ปี พ.ศ. 2534

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

- Fisher Johns Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา จุดหลอมเหลวที่รายงานเป็นจุดหลอมเหลวที่อ่านได้ โดยไม่ได้ปรับเทียบมาตรฐานเทอร์โมมิเตอร์ที่ใช้

- IR Spectrum บันทึกด้วยเครื่อง Perkin - Elmer Model IR

- NMR Spectrum บันทึกด้วยเครื่อง Bruker AC 200 MHz. Fourier Transform NMR Spectrometer

- MS Spectrum บันทึกด้วยเครื่อง Jeol Mass Spectrometer Model JMS-DX-300/JMA 2000 ที่ 70 อิเล็กตรอนโวลต์ (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

- เครื่องอบสารในสุญญากาศ ของบริษัท Gallenkamp ประเทศอังกฤษ

- เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ของ บริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น

- Elemental analysis บันทึกด้วยเครื่อง Perkin Elmer CHNO Analyzer Model 240 C (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

- High Performance Liquid Chromatography Model 803 C ของ
บริษัท Gilson ใช้ UV Detector

2.3 สารเคมี

2.3.1 ตัวทำละลาย ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, ไดคลอโร-
มีเทน, เมทานอล, เอธิลเอซีเตต, แอซีโตน, อีเธอร์ และเอทานอล ซึ่งในระดับคุณภาพ
สูงสุดจากบริษัทผู้ผลิตต่าง ๆ และนำมาใช้โดยตรง ส่วนตัวทำละลายที่ใช้ในคอลัมน์โครมา-
โทกราฟี นำมากลั่นลำดับส่วนก่อนใช้ทุกครั้ง สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ทำอินแลย์ โครมาโท-
กราฟี และตกผลึกใช้เกรดคุณภาพวิเคราะห์ (A.R. Grade)

2.3.2 สารเคมีอื่น ๆ

- ซิลิกาเจล 60 Art 7734 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt
ใช้สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

- ซิลิกาเจล 60 G Art 7731 ของบริษัท E. Merck,
Darmstadt ใช้สำหรับทำอิน - แลย์ โครมาโทกราฟี

- อะลูมินา 60 Art 1077 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt
ใช้สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

2.4.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดสม่ำเสมอ เส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของคอลัมน์แก้ว ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่ต้องการจะแยกต่อตัวดูดซับ 1 : 20 ส่วน ตอนล่างของคอลัมน์แก้ว เป็นปลายตีบมีที่ปิดเปิด คอยปรับอัตราการไหลของตัวชะ

วิธีเตรียมคอลัมน์ทำโดย อุดปลายด้านล่างของคอลัมน์ด้วยสารสี ที่สะอาด รดยาชี้แทงแก้วตันสารสีให้อยู่ที่ปลายด้านล่าง แล้วบรรจุตัวทำละลายลงไปตามประมาท ครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ปล่อยให้ตัวทำละลายไหลออกช้า ๆ ชั่งตัวดูดซับ (ซิลิกาเจลหรืออะลูมินา) จำนวนเท่าที่ต้องการใช้ แบ่งมาทีละน้อยผสมกับตัวทำละลายจำนวนหนึ่ง กวนให้เข้ากันจนเป็นสเลอรี่ แล้วเทลงในคอลัมน์ เคาะคอลัมน์เบา ๆ เพื่อให้ตัวดูดซับ เรียงตัวกันแน่นสม่ำเสมอและไม่มีฟองอากาศ เทสเลอรี่ลงในคอลัมน์เรื่อย ๆ จนหมดปล่อยให้ตัวทำละลายไหลออกไปจนเหลือประมาณ 5 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าของตัวดูดซับ ทำผิวหน้าให้เรียบ รดยาชี้แทงแก้ว เปลี่ยนผิวหน้าของซิลิกาเจลค่อย ๆ เทสารที่ต้องการแยกที่คลุกเคล้า กับตัวดูดซับ ลงในคอลัมน์ช้า ๆ รดยาไม่ให้มีฟองอากาศเปลี่ยนผิวหน้าให้เรียบ ล้างผิวในของคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน ปล่อยให้ระดับของตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงผิวของ ตัวดูดซับ ทำเช่นนี้จนสารละลายเหนือผิวหน้าของตัวดูดซับไม่มีสี แล้วจึงใส่ตัวดูดซับทับลงไปอีก เพื่อเคลือบปิดผิวหน้าเล็กน้อย แล้วจึงชะ คอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่จะใช้ แยกสารต่อไป

2.4.2 ควิลคอลลัมน์โครมาโทกราฟี

ใช้คอลัมน์แก้ว เบอร์ 3 เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร ตัวดูดซับที่ใช้นี้คือ ซิลิกาเจล 60 Art. 7730 หรือ อะลูมินา 60 Art.1092 (เป็นตัวดูดซับที่ใช้ในการทำซินแลร์โครมาโทกราฟี) ใช้คอลัมน์แก้วลงในขวดดูด ที่มีจุกยางรองรับ ต่อขวดดูดเข้ากับเครื่องสูบน้ำ เพื่อให้ภายในขวดดูดเป็นสุญญากาศ วางกระดาษกรองของ Whatman เบอร์ 1 ที่กั้นคอลัมน์ ผสมตัวดูดซับเข้ากับตัวทำละลาย เกลลงในคอลัมน์ การเทแต่ละครั้งไม่ควรเกิน 1 เซนติเมตร ปรับผิวและกดตัวดูดซับให้แน่นเพื่อให้ตัวดูดซับมีความแน่นมากยิ่งขึ้น จึงควรชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายในแต่ละครั้ง โดยระวังไม่ให้ตัวทำละลายต่ำกว่าระดับของตัวดูดซับ ทำซ้ำแบบเดิมจนกระทั่งได้ปริมาณตัวดูดซับตามต้องการ แต่ไม่ควรสูงเกินกว่า 4 เซนติเมตร ปรับผิวให้เรียบ นำตัวดูดซับคลุกกับสารที่ต้องการแยก มาเกลี่ยให้เรียบบนผิวของตัวดูดซับจนหมด ปิดทับด้วยกระดาษกรอง เพื่อให้ผิวหน้าของตัวดูดซับเรียบ ตลอดเวลา แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกต่อไป

2.4.3 ซินแลร์โครมาโทกราฟี

2.4.3.1 วิธีเตรียมภาชนะสำหรับ develop (developing tank)

ใช้ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทขนาดพอเหมาะที่จะใส่แผ่นกระดาษเคลือบตัวดูดซับได้อย่างสะดวก วางกระดาษกรองให้ทาบผิวด้านในของขวดแก้ว เติมตัวทำละลายในขวดให้สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาขวดให้ตัวทำละลายซึมเปียกกระดาษกรองทั่วทั้งแผ่น เพื่อให้ภายในขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

2.4.3.2 วิธีเตรียมโครมาโทเพลท (Chromatoplate)

เตรียมโดยใช้ซิลิกาเจล 60 Art. 7731 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt เป็นตัวดูดซับ ทรายผสมซิลิกาเจลกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 2 เขย่าให้เข้ากันลงในขวดที่มีฝาปิด เกลลงใน Desaga Spreader ที่ปรับให้หนา 0.25 มม. บนกระดาษขนาด 20 ซม. x 5 ซม. หรือขนาด 20 ซม. x 20 ซม. ที่ล้างสะอาดด้วยน้ำ

และใช้คกรามันบนกระจกด้วยแอซีโตน จะได้โรครมาโรทเพลท นำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 120°C ประมาณ 2 ชั่วโมง

2.4.3.3 การแยกสารตัวอย่าง

ละลายสารที่ต้องการศึกษา ด้วยตัวทำละลายที่ดีที่สุด ใช้หลอดแคปิลลารีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 0.5 มม. จุ่มลงในสารละลายที่ต้องการทดสอบ แต้มสารลงบนโรครมาโรทเพลทห่างจากขอบด้านล่าง 1.5 ซม. แต้มแต่ละจุดห่างกันประมาณ 1 ซม. ด้านบนขีดเส้นระดับตัวทำละลายไว้ ปลอ่ยให้สารที่แต้มไว้แห้งสนิท นำไปจุ่มในขวดแก้วที่เตรียมไว้ ปลอ่ยให้สารละลายในขวดแก้วซึมขึ้นไปจนถึงเส้นระดับตัวทำละลาย นำโรครมาโรทเพลทออกจากถังแก้ว ทิ้งไว้ให้แห้ง

2.4.3.4 การหาตำแหน่งของสารที่ทำการชะละลาย

2.4.3.4.1 ส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้โรครมาโรทเพลทจะต้องเคลือบด้วยซิลิกาเจล ชนิดที่ดูดกลืนคลื่นแสงได้ เมื่อส่องดูด้วย แสงอัลตราไวโอเล็ต บริเวณตำแหน่งของสารปรากฏเป็นจุดสีม่วงปรากฏ แต่ในการหาตำแหน่งของสารด้วยวิธีนี้ สารจะต้องสามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ สารที่มีพันธะคู่น้อยหรือไม่มีเลย จะไม่ปรากฏจุดสีม่วง

2.4.3.4.2 ใช้ไอโอดีนในการทำให้เกิด สารประกอบ

เชิงซ้อนที่มีสี โดยการนำเกล็ดไอโอดีน จำนวนพอประมาณใส่ในถังแก้วที่มีฝาปิดสนิท ปลอ่ยให้ไอโอดีนระเหิดขึ้นมาเป็นไอในถังแก้ว นำโรครมาโรทเพลทที่ผ่านการชะแล้วไปใส่ในถังแก้วปิดฝาให้สนิท ไอโอดีนจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารเป็นสารสีน้ำตาล ทำให้เห็นตำแหน่งของสารได้

2.4.3.4.3 ฟันด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 50% นาโรครมา

- ใ้ทเพลทที่ชะแล้้วมาฟันด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 50% อบในตู้ที่อุณหภูมิ 150°C

ประมาณ 15 นาที บริเวณตำแหน่งของสารจะเกิดเป็นจุดสีต่าง ๆ

2.4.4 การกลั่น

การกลั่น ใช้ในการแยกตัวทละลายที่มากเกินพอออกจากสารละลายที่ได้จากการชะคอลัมน์ และเพื่อทำให้ตัวทละลายต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการทดลองบริสุทธิ์ การกลั่นมี 2 แบบคือ

2.4.4.1 การกลั่นแบบธรรมดา ใช้กับตัวทละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม

2.4.4.2 การกลั่นแบบลดความดัน ใช้กับตัวทละลายที่มีจุดเดือดสูง เช่น เมธานอลและน้ำเป็นต้น เพื่อให้ตัวทละลายเดือด ที่อุณหภูมิต่ำลง และช่วยป้องกันการสลายตัวของสารที่สกัดได้ เครื่องมือที่ใช้เรียกว่า เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

2.5 การสกัด

น้ำใบแก้วสดหนัก 18 กิโลกรัมมาสกัดด้วยตัวทละลายดังต่อไปนี้

2.5.1 น้ำใบแก้วสด มาบั่นให้ละเอียดกับเมธานอล (20 ลิตร) โดยใช้เครื่องบั่นน้ำของผสมที่ได้จากการบั่นมากรองแยกเอากากออก น้ำสารละลายที่ได้ไปกลั่นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนจนมีปริมาณเมธานอลเหลืออยู่ประมาณ (90 ซม.³) จะได้สิ่งสกัดในเมธานอลเป็นสารที่มีลักษณะขุ่นหนืดสีน้ำตาล 837 กรัม ซึ่งจะนำไปทำการสกัดด้วยตัวทละลายที่เหมาะสมชนิดอื่นต่อไป

2.5.2 น้ำสิ่งทีสกัดได้จากเมธานอลหนัก 545 กรัม สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ครั้งละ 200 ซม.³ โดยกวนเข้าด้วยกันบนอ่างน้ำเดือดทิ้งไว้สักครู่ นำมากรองจะได้สารทีละลายในคลอโรฟอร์ม ทา้ำหลาย ๆ ครั้งจนสารละลายไม่มีสี น้ำสารละลายที่ได้นี้มาทา

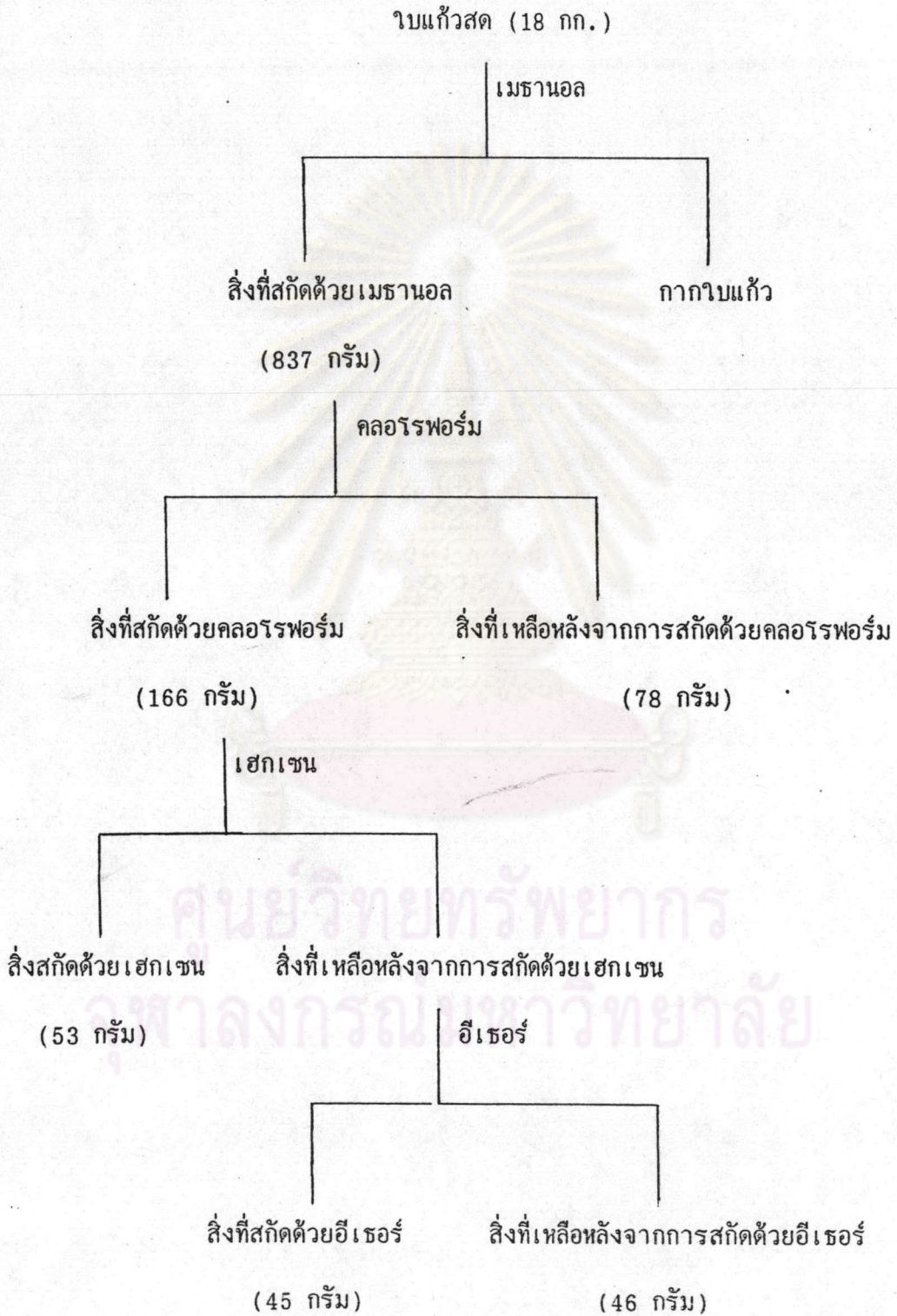
การกลั่น แบบธรรมดา จนเหลือสารละลายในขวดก้นกลมประมาณ 300 ซม.³ เทใส่
 ปีกเกอร์นำไปประเหยให้แห้งบนอ่างน้ำเดือด จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจะได้สิ่งสกัดเป็น
 สารที่มีลักษณะเหนียวสีเขียวเข้มบนตาหนัก 116 กรัม

2.5.3 นำสิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มาสกัดต่อด้วยเฮกเซน
 (200 ซม.³) โดยใช้วิธีกวนเฮกเซนกับสิ่งสกัด กรองแล้วนำไปกลั่น นำเฮกเซนที่ได้
 จากการกลั่นไปสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จนใสไม่มีสี จะได้สิ่งสกัดจากเฮกเซน เป็นสารชั้น
 หนักหนัก 53 กรัม

2.5.4 นำสิ่งสกัดจากคลอโรฟอร์มที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซนไปสกัดต่อด้วย
 อีเทอร์ (200 ซม.³) โดยใช้วิธีกวนอีเธอร์กับสิ่งสกัด กรองแล้วนำไปกลั่น นำอีเธอร์
 ที่ได้จากการกลั่นไปสกัดซ้ำหลาย ๆ ครั้งจนใสไม่มีสี จะได้สิ่งสกัดจากอีเธอร์ มีลักษณะเป็น
 น้ำมันสีเขียวเข้มบนตาหนัก 44 กรัม จะเหลือสิ่งสกัดหลังจากการสกัดด้วยอีเธอร์มีลักษณะ
 เป็นของแข็งร่วนสีตาหนัก 46 กรัม ผลการสกัดทั้งหมดสรุปได้ตามแผนภาพที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 1 แสดงการสกัดใบแก้วสด ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ดังแผนภาพ



2.6 การแยกสารของใบแก้วจากสิ่งสกัดในตัวละลายต่าง ๆ ดังนี้

2.6.1 การแยกสารจากสิ่งที่เหลือหลังจากการสกัดด้วยอีเธอร์

นำสิ่งเหลือหลังจากการสกัดด้วยอีเธอร์หนัก 40 กรัม มาทำการแยกโดยใช้วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับหนัก 600 กรัม ใช้สารละลายชะคอลัมน์ตามอัตราส่วนต่าง ๆ กัน โดยเริ่มจาก เฮกเซน - คลอโรฟอร์ม, คลอโรฟอร์ม, คลอโรฟอร์ม - เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 800 ซม³. นำไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อแยกตัวทำละลายออก จนเหลือสารละลายประมาณ 50 ซม³. เทใส่ขวดรูปชมพู่ตรวจสอบด้วยซินแลร์โครมาโทกราฟี รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน นำไประเหยบนอ่างน้ำเดือดจนแห้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ในกรณีที่สารมีลักษณะเป็นของแข็ง สำหรับสารที่เป็นน้ำมันทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รายละเอียดของการแยกสิ่งสกัดในส่วนนี้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ผลของการแยกสารของสิ่งที่เหลือหลังจากการสกัดด้วยอีเทอร์

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ช่วงลำดับที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	1:1	1 - 5	น้ำมันสีเขียวอ่อน
		6 - 10	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	3:7	11 - 20	น้ำมันสีเขียวปนดำ
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	1:9	21 - 27	น้ำมันสีเขียวปนดำ
คลอโรฟอร์ม	100	28 - 29	น้ำมันสีดำ
		30 - 48	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	19:1	49 - 78	น้ำมันสีเหลือง
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	9:1	79 - 97	น้ำมันสีน้ำตาลดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	17:3	98 - 110	น้ำมันสีน้ำตาลดำ
		111 - 150	ของแข็งอสีฐานสีขาวปริมาณ เล็กน้อยในน้ำมันสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	7:3	151 - 153	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ
		154 - 156	น้ำมันสีส้มปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	1:1	157 - 159	ตะกอนสีเหลืองอ่อนปริมาณ เล็กน้อยในสารละลายสีน้ำตาล
		160 - 170	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม
เมธานอล		171 - 190	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน

2.6.2 การแยกสารจากสิ่งสกัดานอีเธอร์

นำสิ่งสกัดจากอีเธอร์หนัก 38 กรัม มาแยกโดย วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 600 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่าง ๆ กัน และเก็บแต่ละส่วนเหมือนหัวข้อ 2.6.1 รายละเอียดและผลของการแยกแสดงไว้ใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดานอีเธอร์

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ช่วงเวลาตัดที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	90:10	1 - 21	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	67:33	22 - 30	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	70:30	31 - 94	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
		95 - 212	ของแข็งอสัณฐานสีขาวน น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	60:40	213 - 281	น้ำมันสีเหลืองปนดำ *
		282 - 313	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	40:60	314 - 319	น้ำมันสีเหลือง
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	20:80	420 - 438	น้ำมันสีเหลืองปนดำ
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	10:90	439 - 442	น้ำมันสีเหลือง
คลอโรฟอร์ม	100	443 - 477	น้ำมันสีเหลืองปนดำ *
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	90:10	478 - 490	น้ำมันสีส้มปนดำ



ตารางที่ 2 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในอีเทอร์ (ต่อ)

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ขบวนการลำดับที่	ลักษณะของสาร
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	67:33	491 - 545	น้ำมันสีส้มปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	60:40	546 - 563	น้ำมันสีส้มปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	50:50	564 - 594	น้ำมันสีส้มปนน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	30:70	595 - 603	น้ำมันสีน้ำตาลดำ
เมธานอล	100	604 - 616	น้ำมันสีน้ำตาล

* ส่วนที่นำไปทำการแยกต่อ

2.6.2.1 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 213 - 281 จากข้อ 2.6.2

ลักษณะ เป็นน้ำมันสีเหลืองปนดำหนัก 11.5 กรัมมาทำการแยกซ้ำโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีอะลูมินาหนัก 230 กรัม เป็นตัวดูดซับแล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยรับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 250 ซม.³ นำไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อแยกตัวทำละลายออกจนเหลือสารละลายประมาณ 25 ซม.³ เทใส่ขวดรูปชมพู่ นำไประเหยบนอ่างน้ำเดือดจนเหลือปริมาตร 10 ซม.³ ตรวจสอบด้วยซินแลร์โครมาโทกราฟี รวมขวดที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 213 - 281 จากการทำคอลัมน์

โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในอีเธอร์จากข้อ 2.6.2

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ขวดลำดับที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	67:33	1 - 7	น้ำมันสีขาว
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	75:25	8 - 15	น้ำมันสีขาว
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	70:30	16 - 27	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	65:35	28 - 36	น้ำมันสีเหลืองอ่อนปนเขียว
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	60:40	37 - 48	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	55:45	49 - 58	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	50:50	59 - 71	น้ำมันสีเหลืองปนเขียวคล้ำ
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	40:60	72 - 86	น้ำมันสีเหลืองปนดำ
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	30:70	89 -110	น้ำมันสีเหลืองปนสีน้ำตาล
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	20:80	111 -123	น้ำมันสีเหลืองปนสีน้ำตาลดำ
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	10:90	124 -133	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
คลอโรฟอร์ม	100	134 -151	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน
คลอโรฟอร์ม: เมทานอล	95:5	152 -165	คราบน้ำมันสีน้ำตาล

2.6.2.2 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 443 - 477 จากข้อ 2.6.2

ลักษณะ เป็นน้ำมันสีส้มปนดำหนัก 12 กรัมมาทำการแยกซ้ำโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีอะลูมินาหนัก 240 กรัม เป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยรับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 250 ซม.³ นำไปกลั่นแบบธรรมดาเพื่อแยกตัวทำละลายออกจนเหลือสารละลายประมาณ 20 ซม.³ เทใส่ขวดรูปชมพู่ นำไประเหยบนอ่างน้ำเดือดจนเหลือปริมาตร 10 ซม.³ ตรวจสอบด้วยซินแลร์โครมาโทกราฟี รวมขวดที่มีสารเหมือนกันเข้าด้วยกัน ผลการแยกแสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 443 - 477 จากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสิ่งสกัดในอีเธอร์ จากข้อ 2.6.2

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ขวดลำดับที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	60:40	1 - 5	น้ำมันสีขาวยปริมาณน้อย
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	40:60	6 - 12	น้ำมันสีขาวยปริมาณน้อย
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	30:70	13 - 19	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	25:75	20 - 27	น้ำมันสีเหลืองปนเขียว
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	33:67	28 - 35	น้ำมันสีส้มอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	15:85	36 - 48	น้ำมันสีส้มปนเขียว
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	10:90	49 - 63	น้ำมันสีเขียวอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	5:95	64 - 75	น้ำมันสีเขียวอ่อน
คลอโรฟอร์ม	100	76 - 88	น้ำมันสีเหลืองอ่อน

ตารางที่ 4 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 443 - 477 จากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสิ่งสกัดในอีเทอร์ จากข้อ 2.6.2 (ต่อ)

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ขวดลำดับที่	ลักษณะของสาร
คลอโรฟอร์ม: เมทานอล	95:5	89 - 94	น้ำมันสีเหลืองปนเขียว
คลอโรฟอร์ม: เมทานอล	90:10	95 -101	น้ำมันสีน้ำตาลปนเขียว
คลอโรฟอร์ม: เมทานอล	66:34	102 -113	น้ำมันสีเขียวอ่อน
คลอโรฟอร์ม: เมทานอล	50:50	114 -120	น้ำมันสีเขียวอ่อน

2.6.3 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน

นำสิ่งสกัดจากเฮกเซนหนัก 37 กรัมมาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 615 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่าง ๆ กัน และเก็บแต่ละส่วนเหมือนหัวข้อ 2.6.1 ผลการทดลองสรุปไว้ในตารางที่ 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ช่วงเวลาตัดที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน	100	1 - 8	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	85:15	9 - 15	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	75:25	16 - 19	น้ำมันสีเหลืองเข้ม
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	50:50	20 - 21	ของแข็งอสัณฐานสีขาว (1)
			ในน้ำมันสีเหลือง
		22 - 23	น้ำมันสีเหลืองบนส้ม
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	40:60	24 - 26	น้ำมันสีส้ม
		27 - 29	ผลึกรูปเข็ม สีขาว (2) ในน้ำมัน สีเหลืองบนส้ม
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	30:70	30 - 31	ผลึกรูปเข็มสีขาว (3) ในน้ำมันสีส้ม
		32 - 37	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีดำ
		38 - 69	น้ำมันสีเหลืองบนดำ *
		70 - 83	น้ำมันสีน้ำตาล
		84 - 116	น้ำมันสีน้ำตาลบนดำ
		117- 134	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	20:80	138 - 234	น้ำมันสีส้มบนดำ
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	10:90	235 - 247	น้ำมันสีส้มบนดำ

ตารางที่ 5 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน (ต่อ)

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ช่วงลำดับที่	ลักษณะของสาร
คลอโรฟอร์ม	100	248 - 313	น้ำมันสีส้มปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	95:5	314 - 352	น้ำมันสีส้มปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	15:85	353 - 354	น้ำมันสีส้มปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	50:50	355 - 360	น้ำมันสีเหลืองปนเขียว
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	30:70	361 - 386	น้ำมันสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	10:90	387 - 402	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ
เมธานอล	100	403 - 420	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน

* ส่วนที่นำไปทำการแยกต่อ

2.6.3.1 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 38 - 69 จากข้อ 2.6.3
 ลักษณะสารเป็นน้ำมันสีเหลืองปนดำหนัก 13.6 กรัมมาทำการแยกซ้ำโดยคอลัมน์โครมา -
 กราฟี ซึ่งมีอะลูมินาหนัก 300 กรัม เป็นตัวดูดซับแล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยรับ
 สารละลายที่ชะได้ครั้งละ 250 ซม.³ นำไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อแยกตัวทำละลายออก
 จนเหลือสารละลายประมาณ 25 ซม.³ เทใส่ขวดรูปชมพู่ นำไประเหยบนอ่างน้ำเดือดจน
 เหลือปริมาตร 10 ซม.³ ตรวจสอบด้วยธินแลร์โครมาโทกราฟี รวมขวดที่เหมือนกันเข้า
 ด้วยกัน ผลการแยกแสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 38 - 69 จากการทำคอลัมน์โครมา -
 โตรกราฟี ของสิ่งสกัดในเฮกเซน จาก 2.6.3

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ช่วงเวลาตัดที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	75:25	1 - 13	น้ำมันสีขาว
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	70:30	14 - 16	น้ำมันสีขาว
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	60:40	17 - 18	น้ำมันสีเหลืองอ่อนปนเขียว
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	50:50	20 - 23	น้ำมันสีเหลืองปนเขียวเข้ม
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	40:60	24 - 65	น้ำมันสีเหลืองปนดำ
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	30:70	66 - 72	น้ำมันสีเหลืองปนเขียวเข้ม *
คลอโรฟอร์ม	100	73 -108	น้ำมันสีเหลืองปนเขียวเข้ม *
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	70:30	109 -140	น้ำมันสีเหลืองปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	40:60	141 -150	น้ำมันสีเหลืองปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	10:90	151 -160	น้ำมันสีเหลืองปนเขียว
เมธานอล	100	161 -171	น้ำมันสีเหลืองปนเขียว

* ส่วนที่นำไปทำการแยกต่อ

2.6.3.1.1 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 66 - 108 จาก
 ข้อ 2.6.3.1 ลักษณะสารเป็นน้ำมันสีเหลืองปนเขียวเข้มหนัก 3.51 กรัม มาทำการแยก
 ซ้ำโดยคอลัมน์โครมาโตรกราฟี ซึ่งมีอะลูมินาหนัก 75 กรัม เป็นตัวดูดซับแล้วชะคอลัมน์ด้วย

ตัวทาละลายโดยรับสารที่จะได้ครั้งละ 25 ซม.³ น้ำไประเหยบนอ่างน้ำเดือดจนมีปริมาตร 10 ซม.³ ตรวจสอบด้วยอินแลร์โรครมาโทกราฟี รวมขวดที่มีสารเหมือนกันเข้าด้วยกัน ผลการแยกแสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 66 - 108 จากการทำคอลัมน์โคร -
มาโทกราฟี จาก 2.6.3.1

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ขวดลำดับที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	40:60	1 - 2	น้ำมันสีขาวยปริมาณน้อย
		3 - 10	น้ำมันสีน้ำตาล
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	30:70	11 - 24	คราบน้ำมันสีเขียวปนดำ
		25 - 37	คราบน้ำมันสีเขียวปนดำ
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	20:80	38 - 47	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ
		48 - 51	น้ำมันสีน้ำตาล
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม	10:90	52 - 61	น้ำมันสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม	100	62 - 70	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ

2.6.4 การแยกสารที่เหลือหลังจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มด้วยซิลิกา เจล

นำสิ่งสกัดจากเมฆานอลที่เหลือหลังจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มหนัก

42 กรัม มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกา เจลหนัก 630 กรัมชะคอลัมน์

ด้วยตัวทาละลายตามอัตราส่วนต่าง ๆ กัน และเก็บแต่ละส่วนเหมือนหัวข้อ 2.6.1 ผลการแยกแสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเมธานอลที่เหลือหลังจากการสกัดด้วย
คลอโรฟอร์ม ด้วยซิลิกาเจล

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ช่วงเวลาตัดที่	ลักษณะของสาร
คลอโรฟอร์ม	100	1 - 14	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	90:10	15 - 19	น้ำมันสีเหลืองปนสีส้ม
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	80:20	20 - 35	น้ำมันสีส้มปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	70:30	36 - 43	น้ำมันสีส้มแดงปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	60:40	44 - 52	น้ำมันสีส้มปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	50:50	53 - 57	น้ำมันสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	40:60	58 - 68	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	30:70	69 - 80	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	20:80	81 - 91	น้ำมันสีน้ำตาล
เมธานอล	100	92 - 118	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน

เนื่องจากผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเมธานอลที่เหลือปรากฏว่าได้แต่ส่วนที่เป็นน้ำมัน จึงนำสิ่งสกัดในเมธานอลที่เหลือมาทำการแยกอีกครั้งโดยใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ

นำสิ่งสกัดานเมธานอลที่เหลือหนัก 36.00 กรัม มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมา -
 โทกราฟี โดยใช้อะลูมินาหนัก 700 กรัมชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย ตามอัตราส่วนต่าง ๆ
 กัน และเก็บแต่ละส่วนเหมือนหัวข้อ 2.6.1 ผลการแยกแสดงไว้ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดานเมธานอลที่เหลือหลังจากการสกัดด้วย
 คลอโรฟอร์ม ด้วยอะลูมินา

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาณ	ช่วงลำดับที่	ลักษณะของสาร
คลอโรฟอร์ม	100	1 - 15	น้ำมันสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	90:10	16 - 20	ผลึกสีเหลี่ยมสีขาว เป็นมันวาว ในน้ำมันสีน้ำตาลปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	80:20	21 - 40	ตะกอนสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	70:30	41 - 63	ตะกอนสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	60:40	64 - 87	น้ำมันสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	50:50	88 -115	น้ำมันสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	40:60	116-150	น้ำมันสีน้ำตาล
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	30:70	151 -183	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	20:80	184 -201	น้ำมันสีน้ำตาลแดง
เมธานอล	100	202 - 220	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน



จากการแยกสารจากสิ่งสกัดในเมธานอลที่เหลือนด้วยซิลิกาและอะลูมินา ได้แต่ละส่วนคล้ายกัน แต่ปริมาณสารที่ได้มีปริมาณน้อยจึงทำการแยกอีกครั้ง โดยใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ โดยใส่สิ่งสกัด 57 กรัม ใช้ซิลิกาหนัก 1710 กรัมโดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟี วิธีการเตรียมคอลลัมน์ดูได้จากหัวข้อ 2.4.2 และเก็บแต่ละส่วนเหมือนหัวข้อ 2.6.1 ผลการแยกแสดงไว้ในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเมธานอลที่เหลือนหลังจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ โดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ขวดลำดับที่	ลักษณะของสาร
คลอโรฟอร์ม	100	1	น้ำมันสีเหลืองปนเขียวคล้ำ
		2 - 3	น้ำมันสีเหลืองปนเขียวอ่อน
		4 - 8	น้ำมันสีส้มปนเขียว
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	90:10	9	น้ำมันสีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน
		10 - 21	น้ำมันสีน้ำตาลแดงเข้ม
		22 - 24	น้ำมันสีน้ำตาลแดง
		25 - 30	คราบน้ำมันสีน้ำตาลในน้ำมันสีเหลืองอ่อน
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	80:20	31 - 42	น้ำมันสีน้ำตาลปนดำ
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	70:30	43 - 52	น้ำมันสีแดงปนเหลือง
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	60:40	53 - 58	น้ำมันสีแดงเข้ม

ตารางที่ 10 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเมธานอลที่เหลือหลังจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยใช้ซิลิกาเป็นตัวดูดซับ โดยควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

ตัวชะ	อัตราส่วนโดย ปริมาตร	ขวดลำดับที่	ลักษณะของสาร
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	50:50	61 - 63	น้ำมันสีส้มปนเหลือง
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	40:60	64 - 75	น้ำมันสีส้มปนเหลือง
คลอโรฟอร์ม: เมธานอล	20:80	76 - 87	น้ำมันสีน้ำตาลแดง
เมธานอล	100	88 - 93	น้ำมันสีน้ำตาลแดง

2.7 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และทางสเปกโทรสโกปี

2.7.1 การทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และทางสเปกโทรสโกปี

สาร 1 เป็นของแข็งอัญฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง ใต้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (2.6.3) ในลำดับที่ 20-21 (ตารางที่ 5) จากการชะซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วยเฮกเซน : คลอโรฟอร์ม (50:50) แยกน้ำมันออกจากผลึกโดยคนด้วยเฮกเซน แล้วกรองเอาน้ำมันที่ละลายออก นำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยเมธานอลที่ร้อนหลาย ๆ ครั้ง ใต้ผลึกมีลักษณะเป็นแผ่นสีขาวหนัก 80 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 132-134°C R_f 0.57 (คลอโรฟอร์ม 80% - เฮกเซน 20%) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน และละลายได้ในเมธานอลที่ร้อน ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Libermann - Burchard และพอกจางสี Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) max (cm.⁻¹) (รูปที่ 3) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3430 (O-H), 2960 และ 2860 (C-H), 1020 (C-O)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 4) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 4.80 (s, 1H), 4.67 (s, 1H) แสดงถึงโปรตอนที่ติดกับคาร์บอนที่เกาะกันด้วยพันธะคู่, 3.43 (s, 1H) และสัญญาณที่ 2.04-0.34 แสดงถึงเมทิลีนและเมทิลโปรตอน

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 5) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่สำคัญที่ δ 151.45, 149, 112, 109, 108 แสดงถึงคาร์บอนที่ติดกับพันธะคู่ (olefinic carbon) และสัญญาณที่ 56.03-12.15 พีพีเอ็ม

2.7.2 การทำสาร 2 ให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และสเปกโทรสโกปี

สาร 2 เป็นของแข็งในน้ำมันสีส้มปนเหลือง ได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (2.6.3) ในลำดับส่วนที่ 27-29 (ตารางที่ 5) ได้จากการชะขลิกล้างคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วย เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม (40:60) ทำการแยกน้ำมันออกโดยคนด้วยเฮกเซน กรองแยกของแข็งออก แล้วนำมาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เฮกเซน หลาย ๆ ครั้งได้ผลึก รูปแท่งสีขาวหนัก 86 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 64-65°C (จุดสลายตัว) R_f 0.60 คลอโรฟอร์ม 80% - เฮกเซน 20%) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์มละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซนเมื่อร้อน

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) max (cm.⁻¹) (รูปที่ 6) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3080, 3060 (C = C-H), 2980, 2900 และ 2850 (C-H), 1750 (C = O), 1600, 1500, 1450 (C = C), 1285, 1250, 1020 (C-H สันแบบงอออกนอกกระนาบของ R₁R₂C = CHR₃)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 7) ปรากฏ

สัญญาณโปรตอนที่มี 7.65 (d, J=9.5Hz, 1H), 7.37 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.86 (d, J=8.5Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.25 (d, J=9.5Hz, 1H), 5.48 (t, J=6.6Hz, 1H), 5.1 (m, 1H), 4.6 (d, J=6.6Hz, 2H), 2.19, 2.11 (m, 4H), 1.77 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.61 (s, 3H)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 8)

ปรากฏสัญญาณคาร์บอน 19 สัญญาณที่ 161.9 (C = O), 161.11, 115.67, 143.53, 128.57, 113.01, 112.72, 112.24 และ 101.39 (เป็นคาร์บอนของวงแอรอแมติก), 131.75, 123.46, 118.27 และ 142.14 (C = C), 65.31 (C-O), 39.34, 25.57, 26.06, 17.56 และ 16.60

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 13) ปรากฏพีคของไอออนเชิงบวก (M⁺) ที่ 298 (คำนวณสูตรโมเลกุลได้ $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3$) พบพีคการแตกตัวที่สำคัญที่ 229, 187, 162, 137 และ 69

2.7.3 การทาสาร 3 ให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และทางสเปกโทรสโกปี

สาร 3 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีส้ม จากลำดับส่วนที่ 30-31 (ตารางที่ 5) ซึ่งชะด้วยเฮกเซน : คลอโรฟอร์ม (30:70) ในการทำซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสิ่งสกัดในเฮกเซน (2.6.3) แยกน้ำมันออกโดยคนด้วยเฮกเซนกรองเอาน้ำมันที่ละลายออก และนำผลึกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยนำมาตกผลึกซ้ำหลาย ๆ ครั้งด้วยเฮกเซนที่ร้อนจะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 90 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 121-126°C R_f 0.35 (คลอโรฟอร์ม 80% - เฮกเซน 20%) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เอทานอล แอซีโตน และเอซิลแอซีเตต ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ให้สารละลาย

ลายสีเกี่ยวข้องกับฏิกิริยา Liebermann-Burchard และพอกจางสี Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) (รูปที่ 14) แสดง
การดูดกลืนที่ความถี่ 3440 (O-H), 2940-2840 (C-H), 1660-1640 (C = C) และ
1050 (C-O)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 15)
ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 5.35 (d, 1H), 5.16 (q, 2H), 3.53 (m, 1H) และ
สัญญาณที่ 2.37-0.69 พีพีเอ็ม

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 16)
ปรากฏสัญญาณที่ 6 136.5, 131.05; 121.66, 117.28 แสดงถึงคาร์บอนที่
ต่อกับพันธะคู่ 71.76 (C-O) และสัญญาณที่ 56.80-12.00

2.7.4 การทำสาร 4 ให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และ
ทางสเปกโทรสโกปี

สาร 4 เป็นผลึกรูปเหลี่ยมสีขาว ได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (2.6.3)
จากลำดับส่วนที่ 38-69 (ตารางที่ 5) จากการชะชิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วย
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม (30:70) สารในส่วนนี้มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลปนเหลือง
หนัก 13.6 กรัม เมื่อทำอินแลร์โครมาโทกราฟี ตรวจสอบพบว่า ปรากฏจุดสารขึ้น 2 จุด
และมีสีเขียวปนอยู่ จึงนำมาแยกสารซ้ำโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้อะลูมินาเป็นตัว
ดูดซับ (2.6.3.1) และนำลำดับส่วนที่ 66-108 (2.6.3.1.1) ซึ่งได้จากการชะด้วย
เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม (30:70) สารในส่วนนี้มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองปนเขียว
เข้มหนัก 7.3 กรัม เมื่อทำอินแลร์โครมาโทกราฟี ตรวจสอบพบว่าปรากฏจุดสารขึ้น 1 จุด
แต่มีสีเขียวปนอยู่ จึงนำมาทำการแยกซ้ำโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้อะลูมินาเป็นตัว
ดูดซับ และนำลำดับส่วนที่ 52-61 (2.6.3.1.2) ซึ่งได้จากการชะด้วย เฮกเซน :
คลอโรฟอร์ม (10:90) สารในส่วนนี้ มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลปนเหลืองหนัก 180

มิลลิกรัม เมื่อทำซินแอร์โครมาโทกราฟี ตรวจสอบพบว่าปรากฏสารขึ้น 1 จุด และมีสีเขียวปน อยู่เล็กน้อย จึงทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-121 C, ตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 8 ซม³ /นาที่, ความดัน 0.16 Kpsi) ได้สารมีลักษณะเป็นผลึกรูปสี่เหลี่ยมสีขาวนวลในน้ำมัน สีเขียวอ่อนหนัก 90 มิลลิกรัม นำมาแยกน้ำมันโดยการคนด้วยเอซิลแอซีเตต แยกเอาผลึก ออกมา ตกผลึกใหม่ด้วย เอซิลแอซีเตต-เฮกเซน ได้ผลึกรูปเหลี่ยมสีขาวหนัก 50 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 131-132°C (สลายตัว) R_f 0.43 (เมทานอล 10% - คลอโรฟอร์ม 90%) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม แอซีโตน ละลายในเอทานอล, เอซิลแอซีเตต เมื่อร้อน ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ไม่ละลายน้ำ

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) ν_{\max} (ซม.⁻¹) (รูปที่ 19) แสดงการ ดูดกลืนที่ความถี่ 3450 (O-H), 2800-3010 (C-H), 1720 (C = O), 1610-1450 (C = C), 1150 (C-O), 840 (= CH₂ wag of methylene)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม(CDCl₃) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 20) ปรากฏ สัญญาณโปรตอนที่ 7.95 (d, J=9.5Hz, 1H), 7.34 (d, J=8.7Hz, 1H), 6.82 (d, J=8.7Hz, 1H), 6.20 (d, J=9.5Hz, 1H), 5.23 (br, d, J=8.0Hz, 1H), 4.57 (br, d, J=8.0Hz, 1H), 4.52 (broad, 2H), 3.86 (s, 3H), 1.66 (s, 3H)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 21) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่สำคัญที่ 160.34 (C = O), 160.14, 152.72, 143.90, 128.60, 115.98, 113.52, 113.04, 112.92 (คาร์บอนของวงแอรอแมติก), 143.90, 107.84 (C = C), 78.15 (C-O), 69.39 (C-O), 56.19 (O-CH₃) และ 17.36

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 22) ปรากฏพีคของไอออนเชิงบวกเสถียร (M⁺) ที่ 276 พบพีคการแตกตัวที่สำคัญที่ 258, 229, 220, 205, 189, 175 และ 162

2.7.5 การทำสาร 5 ให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และทางสเปกโทรสโกปี

สาร 5 เป็นรูปสีเหลืองสีขาว ได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (2.6.3) จากการชะขลิกลาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟีด้วย เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม (30:70) ลำดับส่วนที่ 38-69 (ตารางที่ 5) สารในส่วนนี้มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลปนเหลืองหนัก 13.7 กรัม เมื่อทำอินแลร์โครมาโทกราฟี ตรวจสอบพบว่าปรากฏจุดสารขึ้น 2 จุด และมีสีเขียวปนอยู่ จึงทำการแยกสารซ้ำโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้อะลูมินาเป็นตัวดูดซับ (2.6.3.1) และนำลำดับส่วนที่ 24-65 (ตารางที่ 6) จากการชะด้วยเฮกเซน : คลอโรฟอร์ม (20:30) สารมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองปนดำหนัก 146 มิลลิกรัม เมื่อทำอินแลร์โครมาโทกราฟีตรวจสอบพบว่าปรากฏจุดสารขึ้น 1 จุด แต่ยังมีสีเขียวปนอยู่เล็กน้อย จึงทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-121 C, ตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 8 ซม³/นาที, ความดัน 0.17 Kpsi) ได้สารมีลักษณะเป็นผลึกรูปเหลี่ยมสีขาวนวล ขนาดตกผลึกด้วยเฮกเซนร้อนหลาย ๆ ครั้งจะได้ผลึกรูปเหลี่ยมสีขาวหนัก 56 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 153-154°C (สลายตัว) R_f 0.61 (เมธานอล 10% - คลอโรฟอร์ม 90%) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม อะซีโตน เฮกเซนร้อน

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) ν_{max} (ซม.⁻¹) (รูปที่ 23) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3470 (O-H), 3060 (C = C-H), 2980, 2940, 2830 (C-H), 1745 (C = O), 1600, 1495, 1445 (C = C), 1120 (C-O), 895 (การสั่นแบบงอของ $R_1R_2C = CH_2$)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 28) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที 7.60 (d, J=9.5Hz, 1H), 7.42 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.88 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.26 (d, J=9.5Hz, 1H), 5.03 (d, J=8.8Hz, 1H), 4.94 (d, J=8.8

Hz, 1H), 4.68 (br, d, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.10 (br, s, 1H), 1.66 (s, 3H)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (ทีพีเอ็ม) (รูปที่ 25) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่สำคัญที่ 161.31 (C = O), 160.42, 153.84, 143.68, 129.02, 114.13, 113.41, 107.88 และ 112.78 (เป็นคาร์บอนของวงแอรอแมติก), 143.28, 113.41 (C = C), 77.82, 76.48, 57.52, 56.18 และ 17.23

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 30) ปรากฏพีคของไอออนเชิงบวก (M^+) ที่ 290 พบพีคการแตกตัวที่สำคัญที่ 258, 206, 205, 175, 162, 147 และ 134

2.7.6 การทำสาร 6 ให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และทางสเปกโทรสโกปี

สาร 6 เป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน ได้จากสิ่งสกัดในอีเทอร์ (2.6.2) ในลำดับที่ 314-319 (ตารางที่ 2) จากการชะซิลิกาเจลคอลัมน์ด้วย เฮกเซน : คลอโรฟอร์ม (20:30) สารในส่วนนี้มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลือง เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟี พบว่าปรากฏจุดสารขึ้นหนึ่งจุด แต่มีลักษณะเป็นวงรีและมีสีเขียวปน จึงนำมาทำการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้ preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-212 C, ตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม 95% : เฮกเซน 5%, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 8.0 ซม.³/นาที, ความดัน 0.15 Kpsi) ได้สารมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อนหนัก 0.30 กรัม R_f 0.46 (คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม อีเทอร์ เมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน

อินฟราเรดสเปกตรัม (neat) ν_{max} (ซม.⁻¹) (รูปที่ 31) แสดงการดูดกลืนที่ 3100 (C = C-H), 2970, 2910 และ 2850 (C-H), 1760 (C = O), 1610, 1570, 1500 (C = C), 1260, 1050 (C-O)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (ทีพีเอ็ม) (รูปที่ 32) ปรากฏ

สัญญาณโปรตอนที่ 7.63 (d, J=9.5Hz, 1H), 7.36 (d, J=8.5Hz, 1H), 6.84 (d, J=8.5Hz, 1H), 6.18 (d, J=9.5Hz, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.81-2.84 (m, 1H) และ 1.21 (d, 6H)

2.7.7 การทำสาร 7 ให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และทางสเปกโทรสโกปี

สาร 7 เป็นน้ำมันสีน้ำตาลปนส้ม ได้จากสิ่งสกัดในอีเธอร์ (2.6.2.) ในลำดับที่ 443-477 (ตารางที่ 2) ได้จากการชะขลิกาเจลคอลัมน์ด้วย คลอโรฟอร์ม สารในส่วนนี้มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองปนดำหนัก 2.3 กรัม เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยอินฟราเรด-มาทกราฟฟี พบว่าปรากฏจุดสารขึ้นหนึ่งจุด แต่มีลักษณะเป็นวงรี จึงนำมาทำการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้ preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-212 C, ตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 6 ซม.³/นาที, ความดัน 0.14 Kpsi) ได้สารมีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลปนส้ม R_f 0.41 (คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม และเอซีโตน ไม่ละลายในเฮกเซน

อินฟราเรดสเปกตรัม (neat) ν_{\max} (ซม.⁻¹) (รูปที่ 35) แสดงการดูดกลืนที่ 3460 (O-H), 3100 (C = C-H), 2980 และ 2880 (C-H), 1730 (C = O), 1610, 1570, 1500 (C = C), 1410, 1370 (gem-dimethyl), 1040, 1020 (C-O) จากข้อมูลโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์, คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมพบว่า สาร 8 นี้มีสาร 2 ชนิดปนกันอยู่ และไม่สามารถแยกออกจากกันได้ โดยใช้ HPLC และเนื่องจากสารมีปริมาณน้อย จึงไม่สามารถนำไปแยกโดยใช้วิธีอื่นที่เหมาะสม แต่จากข้อมูลทั้งหมดก็สามารถหาสูตรโครงสร้างของสารทั้งสองได้

สาร 7A

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 36) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 7.64 (d, J=9.5Hz, 1H), 7.49 (d, J=8.7Hz, 1H), 6.88 (d, J=8.7

Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.21 (d, J=9.5Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.75-2.8
2 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 1.13 (d, 3H), และ 0.99 (d, 3H)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (รูปที่ 42) ปรากฏสัญญาณ
ของคาร์บอนที่ 207.64 (C = O), 169.62 (-C-O) และ 160.76 (C = O),
19.71, 153.52 143.38, 130.31, 111.47, 113.46, 113.04, 107.92
(คาร์บอนของวงแอรอแมติก), 69.30, 56.36, 36.06, 20.69, 18.98 และ
17.86 พีพีเอ็ม

สาร 7B

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 36) ปรากฏสัญญาณ
โปรตอนที่ 7.59 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.41 (d, J=8.7Hz, 1H), 6.80 (d,
J=8.7Hz, 1H), 6.18 (d, J=8.6Hz, 1H), 5.40 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.24
(s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.78 (s, 3H) และ 1.74 (s, 3H)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 37) ปรากฏ
สัญญาณคาร์บอนที่ 207.64, 169.62, 160.76, 114.76, 143.00, 142.67,
129.43, 113.43, 107.74, 107.6, 159.22, 112.42, 153.52, 56.31,
76.36, 27.23, 21.51, 20.17 และ 20.04

2.7.8 การทำสาร 8 ให้บริสุทธิ์และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และ
ทางสเปกโทรสโกปี

สาร 8 เป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน ได้จากสิ่งสกัดในอีเธอร์ (2.6.2) ใน
ลำดับที่ 491-545 (ตารางที่ 2) ได้จากการชะขลิกาเจลดอมนด้วย คลอโรฟอร์ม :
เมธานอล (40:20) สารในส่วนนี้มีลักษณะเป็นสีน้ำตาลค้ำหนัก 0.1 กรัม เมื่อนำมาตรวจ
สอบด้วยซินแนร์โครมาโทกราฟีพบว่าปรากฏจุดสารขึ้นหนึ่งจุด แต่มีสีเขียวบนอยู่ จึงทำการ
แยกให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-121 C,

ตัวทำละลายที่ใช้คือ คลอโรฟอร์ม, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 4 ซม.³/นาที, ความดัน 0.08 Kpsi) วัสดุสารมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อนหนัก 0.1 กรัม R_f 0.52

(คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเฮกเซน

อินฟราเรดสเปกตรัม (neat) ν_{\max} (ซม.⁻¹) (รูปที่ 43) แสดงการดูดกลืนที่ 3460 (O-H), 3100 (C = C-H), 2980, 2880 (C-H), 1730 (C=O), 1610, 1570, 1500 (C=C), 1410, 1370 (gem-dimethyl), 1040, 1020 (C-O) จากข้อมูลโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ และคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่ามีสัญญาณอยู่สองกลุ่ม แสดงว่า สาร 8 มีสารปนกันอยู่สองชนิดคือ 8A และ 8B ซึ่งมีข้อมูลแสดงดังนี้

สาร 8A

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 44) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 7.65 (d, J=9.5Hz, 1H), 7.47 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.87 (d, J=8.6Hz, 1H), 6.28 (d, J=9.5Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 4.26 (broad, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.63-2.59 (m, 1H), 1.13 (d, J=7.04Hz, 3H) และ 0.98 (d, J=6.67Hz, 3H)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 45) ปรากฏสัญญาณที่ 160.51 (C = O), 159.99, 153.42, 143.43, 129.51, 114.57, 107.83, 113.30 และ 113.61 (คาร์บอนของวงแอรแมติก), 68.42, 35.86, 19.58, 17.92 และ 56.15

สาร 8B

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 44) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 7.65 (d, J=9.5Hz, 1H), 7.37 (d, J=8.5Hz, 1H), 6.87 (d, J=8.5Hz, 1H), 6.26 (d, J=9.5Hz, 1H) เป็นโปรตอนที่เกาะกับพันธะคู่ของแอรแมติก, 5.35 (d, J=8.8Hz, 1H), 5.16 (s, 1H), 5.08

(s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.09 (s, 3H) และ 1.84 (d, 3H)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) (พีพีเอ็ม) (รูปที่ 45) ปรากฏ
สัญญาณที่ δ 160.51 (C = O), 153.42, 107.93, 143.73, 113.20, 128.11,
113.29, 158.98 และ 114.57 (เป็นคาร์บอนของวงแอรแมติก), 143.28, 116.33
(C = C), 66.44, 56.5, 56.37 และ 16.79



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย