

บทที่ 3

วิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อค้นหาประเภทของสารอินทรีย์

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อค้นหาประเภทของสารอินทรีย์ของสิ่งสกัดเอทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล(การสกัดวิธีที่ 2) จากผักเบี้ยหิน โดยการทดลองหา สเตียรอยด์ ไทรเทอร์ปีนอยด์ เฟลวานอยด์และแอลคาลอยด์ จากผลการทดลอง(ตารางที่ 2.3) พบว่าในสิ่งสกัดเอทานอล เฮกเซนและไดคลอโรมีเทนให้ผลบวกกับรีเอเจนต์ที่ใช้ทดสอบ สเตียรอยด์และไทรเทอร์ปีนอยด์ ส่วนสิ่งสกัดเมทานอลก็ให้ผลบวกกับสเตียรอยด์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารที่ให้ผลบวกกับสเตียรอยด์เป็นสารประเภทไกลโคไซด์ที่มีส่วนอะไกลโคนเป็นสารประเภท สเตียรอยด์ ในขณะที่เฟลวานอยด์ให้ผลบวกกับสิ่งสกัดในเมทานอล แต่จากการแยกสารจากสิ่ง สกัดเมทานอลพบสารเพียงตัวเดียวคือสารพวกไกลโคไซด์ จึงคาดว่าสารที่ให้ผลบวกกับการ ทดสอบในครั้งนี้อาจจะเป็นสารพวกแทนนินที่มีส่วนประกอบของเฟลวานอยด์ ในขณะที่การ ทดสอบหาแอลคาลอยด์ให้ผลไม่ชัดเจนในสิ่งสกัดเมทานอล ส่วนสิ่งสกัดอื่นๆให้ผลลบ ผลที่ ได้จากการทดลองครั้งนี้เป็นผลการทดสอบเบื้องต้น ซึ่งไม่จำเป็นว่าจะต้องเป็นไปตามการ ทดสอบนี้ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารที่มีอยู่ในสิ่งสกัดต่างๆอาจจะมีปริมาณน้อยเกินกว่าที่รีเอเจนต์ จะเข้าทำปฏิกิริยาได้ ดังนั้นประเภทของสารที่จะพบในสิ่งสกัดโดยการแยกออกมาโดยใช้วิธี ทางโครมาโทกราฟีคาดว่าจะมีสเตียรอยด์และไทรเทอร์ปีนอยด์ และอาจจะพบแอลคาลอยด์ และเฟลวานอยด์



3.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าว

จากผลการทดลองพบว่าในสิ่งสกัดเมทานอลในช่วงความเข้มข้น 0.05 กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม ให้ผลในการยับยั้งได้ดีที่สุด แต่เมื่อสังเกตโดยรวมกับสิ่งสกัดอื่นๆ และที่ความเข้มข้นอื่นๆ จะเห็นได้ว่าต้นข้าวสามารถเจริญเติบโตทั้งรากและกาบใบได้เหมือนกับต้นข้าวที่ใช้เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสาร จึงกล่าวได้ว่าผักเบี้ยหินไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว หรืออาจจะกล่าวได้อีกอย่างหนึ่งว่า เมล็ดข้าวมีความแข็งแรงมากพอที่จะถูกสารที่ปล่อยออกมาจากผักเบี้ยหินยับยั้งการเจริญเติบโตได้

ปกติผักเบี้ยหินเป็นวัชพืชที่ขึ้นอยู่ในแปลงผัก ดังนั้นบทบาทของผักเบี้ยหินที่มีต่อข้าว นั้นคงจะมีผลหรือมีบทบาทน้อยกว่าที่มีต่อผัก

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาว

ผักเบี้ยหินเป็นวัชพืชที่ขึ้นในแปลงผัก จากการสังเกตพบว่าบริเวณที่ผักเบี้ยหินเจริญนั้นจะไม่มีผักขึ้นเลย จึงเป็นไปได้ว่าผักเบี้ยหินอาจจะปล่อยสารออกมา มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของผักได้ เมื่อนำเอาสิ่งสกัดที่ได้จากผักเบี้ยหินมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาวพันธุ์เบา ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมใช้ปลูก ผลการทดสอบกับสิ่งสกัดวิธีที่ 1 พบว่า สิ่งสกัดเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาวที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม และสิ่งสกัดที่ให้ผลรองลงมาเป็นสิ่งสกัดที่ได้จากเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาวที่ความเข้มข้น 0.05 กรัม ส่วนในสิ่งสกัดอื่นๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาวได้

เนื่องจากในการสกัดวิธีที่ 1 มีข้อผิดพลาดในการสกัด จึงทำให้ผลที่ได้จากการทดลองนี้ไม่สามารถสรุปได้ จึงนำสิ่งสกัดที่ได้จากวิธีที่ 2 มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาว จากการทดสอบพบว่าสิ่งสกัดที่ได้จากเมทานอลและไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 กรัม : เซลลูโลส 1.5 กรัม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาว ในขณะที่เดียวกันสิ่งสกัดเฮกเซนไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาว จากผลการทดลองดังกล่าว สิ่งสกัดที่ได้จากเมทานอลและไดคลอโรมีเทนจึงเป็นสิ่งสกัดที่น่าสนใจที่อาจจะนำไปสู่การค้นพบสารแอลลิโลพาธิค เมื่อแยกสิ่งสกัดเมทานอลและไดคลอโรมีเทน

ด้วยวิธีทาง โครมาโทกราฟี นำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพโดยทำเป็นช่วงๆ ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 2.11 จากผลการทดสอบพบว่า สารในรหัส DT₂11-DT₂14 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตในส่วนของรากที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 กรัม:1.5 กรัมเซลลูโลส ส่วนรหัส DT₂15-DT₂17 ให้ผลในการยับยั้งที่ความเข้มข้น 0.05 กรัม:1.5 กรัมเซลลูโลส และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของส่วนรากได้ทุกความเข้มข้น ขณะเดียวกันสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดเมทานอลในรหัส MT₂1-MT₂3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาวที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.05 กรัม เมื่อสังเกตโดยรวมๆแล้ว พบว่าทุกๆรหัสจะยับยั้งการเจริญเติบโตของรากเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นจึงนำสารที่บริสุทธิ์แล้วซึ่งอยู่ในช่วงที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพไปทดสอบ ปรากฏว่าปริมาณสารที่ทำให้บริสุทธิ์มีน้อยไม่สามารถนำมาทดสอบได้ อย่างไรก็ตามได้นำสารรหัส ST₂ ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับผักกาดขาวพบว่าที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.0034 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาว ในขณะที่เดียวกันนี้ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.0034 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม กลับแสดงผลที่ทำให้ผักกาดขาวเจริญเติบโตดีขึ้นโดยเฉพาะใบจะมีขนาดใหญ่จนสังเกตเห็นได้ชัด

การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง CELL LINES

จากการนำสิ่งสกัดในวิธีที่ 2 มาทดสอบเบื้องต้นพบว่า สิ่งสกัดใดคลอโรมีเทนและเมทานอล ได้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพกับ CELL LINES ต่างๆ ปรากฏว่าให้ผลกับ CELL LINES ดังต่อไปนี้ คือ Human Casopharyngeal Carcinoma (KB) (IC₅₀10 µg/ml), Human Leukemia (IC₅₀10 µg/ml) , Human Mammary Concer (IC₅₀10 µg/ml) , Human Carcinoma of stomach (DT₂=IC₅₀1 µg/ml ; MT=IC₅₀10 µg/ml)

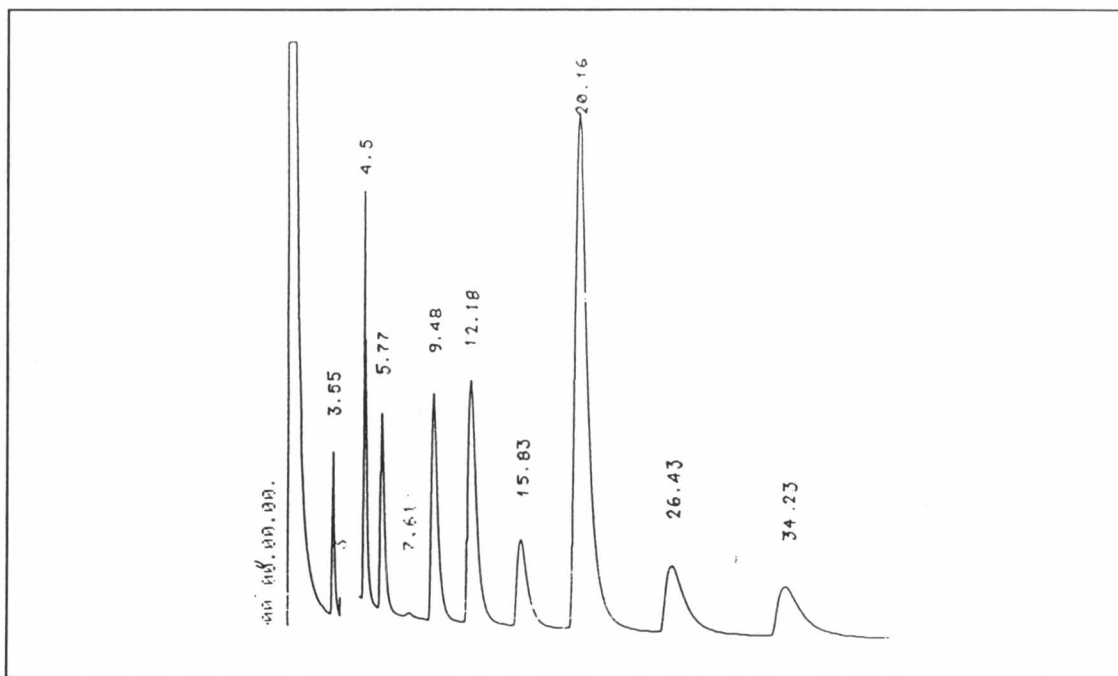
จากผลการทดลองเบื้องต้นเหล่านี้ อาจเป็นไปได้ว่าสารที่แยกได้จากผักเบี้ยหินสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไปในอนาคตได้

3.3 การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล

การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ก

สาร ก มีลักษณะเป็นแผ่นแวววาวสีขาวหนัก 0.0207 กรัม จุดหลอมเหลว 54-56 องศาเซลเซียส สาร ก ได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน และทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกผลึกด้วยเอซิโตน-เฮกเซน จากการทดสอบทางเคมีพบว่า สาร ก ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann Burchard, 2,4-DNP, 5% FeCl₃ และ Br₂ ใน CCl₄ แสดงว่า สาร ก ไม่ใช่สารประกอบประเภทสเตียรอยด์หรือไตรเทอร์ปีนอยด์ ไม่มีหมู่คาร์บอนิล ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล ไม่มีพันธะที่ไม่อิ่มตัว จากข้อมูลข้างต้นเหล่านี้ทำให้ทราบว่า สาร ก น่าจะเป็นสารประกอบที่อิ่มตัว

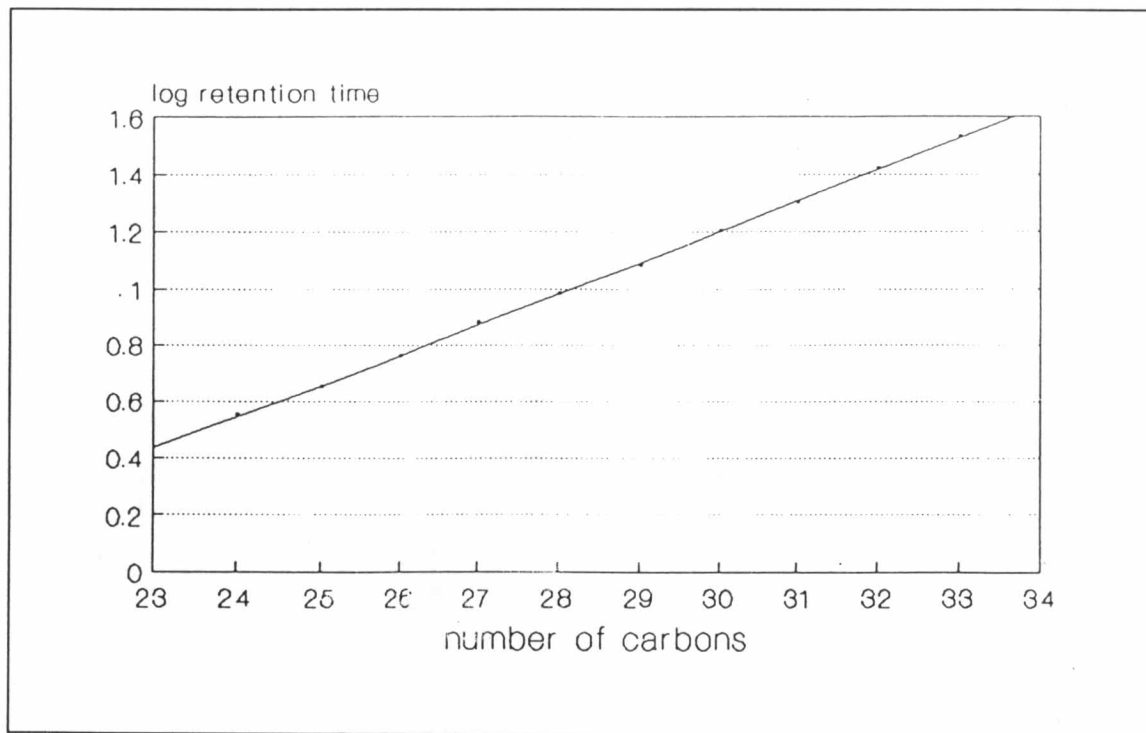
อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) รูปที่ 3.1 ปรากฏแถบการดูดกลืนของหมู่ CH₃ และ CH₂ เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบทางปฏิกิริยาเคมี จากข้อมูลดังกล่าว สาร ก น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนไฮโดรเจน ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไฮโดรเจน พบว่ามีลักษณะเหมือนกัน สำหรับข้อมูลแถบการดูดกลืนแสงของสาร ก แสดงดังตารางที่ 3.1



รูปที่ 3.2 แสดงแก๊สโครมาโทแกรมของของผสมไฮโดรคาร์บอนไซ้ตรงมาตรฐาน

ตารางที่ 3.2 retention time ของของสารผสมไฮโดรคาร์บอนไซ้ตรงมาตรฐาน

จำนวนคาร์บอน	retention time	log retention time
tetracosane(C ₂₄)	3.55	0.55
pentacosane(C ₂₅)	4.50	0.65
hexacosane(C ₂₆)	5.77	0.76
heptacosane(C ₂₇)	7.61	0.88
octacosane(C ₂₈)	9.48	0.98
nonacosane(C ₂₉)	12.18	1.08
triacontane(C ₃₀)	15.83	1.20
hentriacontane(C ₃₁)	20.16	1.30
dotriacontane(C ₃₂)	26.43	1.42
tritriacontane(C ₃₃)	34.23	1.53



รูปที่ 3.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของผสมไฮโดรคาร์บอนไซตรง

เมื่อนำค่า log retention time ของสาร ก มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ก็จะสามารถหาจำนวนคาร์บอนของ สาร ก ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสาร ก

retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน
4.65	0.67	25
5.88	0.77	26
7.40	0.87	27
9.46	0.97	28
12.11	1.08	29
15.78	1.20	30
20.21	1.30	31
26.51	1.42	32
33.88	1.53	33

จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.3) พบว่า สาร ก เป็นของผสมของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนไซ้ตรง 9 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.4

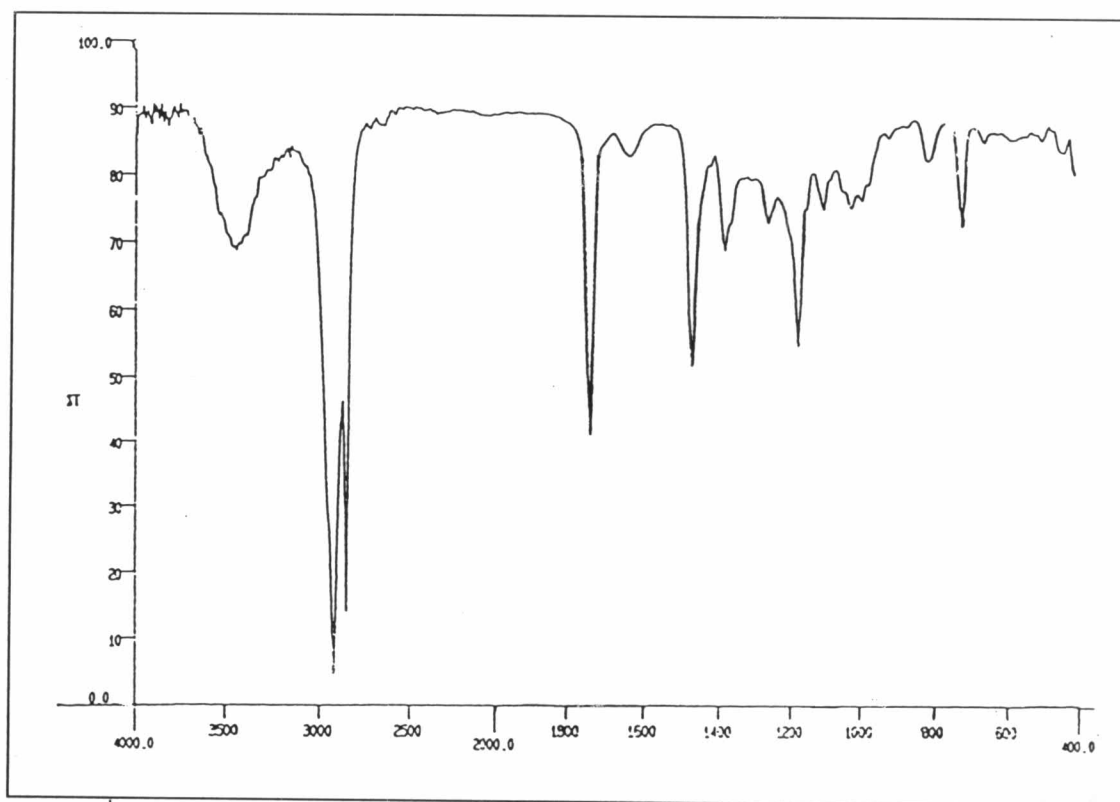
ตารางที่ 3.4 สารผสมไฮโดรคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในสาร ก

ชื่อสารประกอบ	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	มวลโมเลกุล	ปริมาณสาร (%)
pentacosane	$C_{25}H_{52}$	$CH_3-(CH_2)_{23}-CH_3$	352	0.10
hexacosane	$C_{26}H_{54}$	$CH_3-(CH_2)_{24}-CH_3$	366	0.37
heptacosane	$C_{27}H_{56}$	$CH_3-(CH_2)_{25}-CH_3$	380	2.93
octacosane	$C_{28}H_{58}$	$CH_3-(CH_2)_{26}-CH_3$	394	4.80
nonacosane	$C_{29}H_{70}$	$CH_3-(CH_2)_{27}-CH_3$	408	38.43
triacontane	$C_{30}H_{72}$	$CH_3-(CH_2)_{28}-CH_3$	422	5.85
hentriacontane	$C_{31}H_{74}$	$CH_3-(CH_2)_{29}-CH_3$	436	29.46
dotriacontane	$C_{32}H_{76}$	$CH_3-(CH_2)_{30}-CH_3$	450	3.13
tritriacontane	$C_{33}H_{78}$	$CH_3-(CH_2)_{31}-CH_3$	464	11.99

การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ข

สาร ข เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองเข้ม มีกลิ่นหอม ได้จากลำดับส่วนที่ 5-16 (HT₂) และลำดับส่วนที่ 17-35 (HT₃) จากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีถูกชะออกมาด้วยเฮกเซน เมื่อนำ สาร ข มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล จะได้ผลึกอสัณฐานสีขาวหนัก 0.4103 กรัม จุดหลอมเหลว 68-71 องศาเซลเซียส สาร ข ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตน เอทิลแอซิเตต แต่ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา 5% FeCl₃ และ Br₂ ใน CCl₄

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) (รูปที่ 3.4) แสดงการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 1730 ซม.⁻¹ ซึ่งเป็นของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ และแถบการดูดกลืนอื่นๆ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสารไฮโดรคาร์บอน ข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร ข แสดงไว้ดังตารางที่ 3.5



รูปที่ 3.4 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ข

ตารางที่ 3.5 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร ข

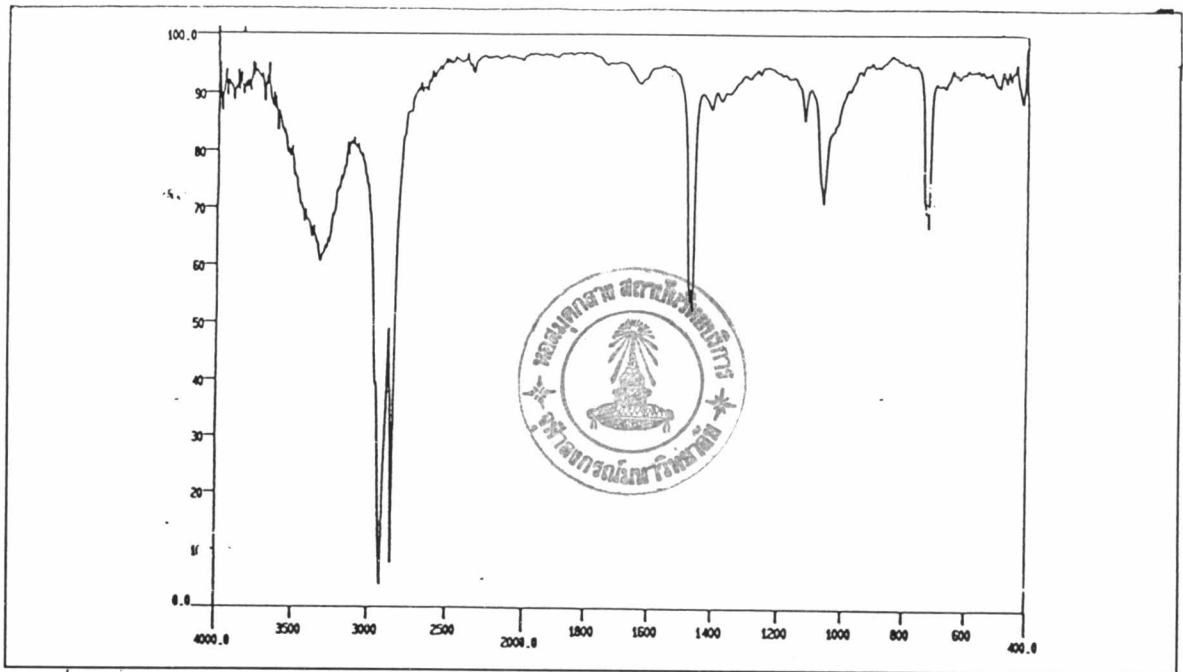
แถบการดูดกลืน(cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
2920, 2840	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2, CH_3
1730	สูง	C=O สั่นแบบยืดของคาร์บอนิล
1480-1470	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ CH_2, CH_3
1170	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืด
730-720	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอนอกระนาบของคาร์บอนที่มีมากกว่า 7

จากการทดสอบปริเอเจนต์ต่างๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่าสาร ข น่าจะเป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์ไฮโดรเจน

การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ค

สาร ค มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวอยู่ในน้ำมันสีเหลืองเข้ม ซึ่งได้จากลำดับส่วนที่ 36-47 ($\text{HT}_2, 4$) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วนที่อยู่ในช่วง 3:1-7:3 และเมื่อนำสาร ค มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล จะได้ผลึกอสัณฐานสีขาวหนัก 0.6477 กรัม จุดหลอมเหลว 74-79 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.63 (เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 9:1) สาร ค ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตน เอทิลแอซิเตต แต่ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา 5% FeCl_3 และ Br_2 ใน CCl_4 แสดงว่า สาร ค ไม่ใช่สารประกอบประเภทฟีนอล และไม่มีพันธะที่ไม่อิ่มตัวในโมเลกุล

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) รูปที่ 3.5 จะปรากฏแถบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่แอลกอฮอล์ปฐมภูมิที่มีความถี่ $3630-3210 \text{ cm}^{-1}$ นอกจากนี้ยังพบแถบการดูดกลืนของหมู่ CH_3 และ CH_2 เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบทางปฏิกิริยาเคมี จากข้อมูลดังกล่าว สาร ค น่าจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์ ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารประกอบแอลกอฮอล์ พบว่ามีลักษณะเหมือนกัน ข้อมูลแสดงแถบการดูดกลืนแสงของสาร ค แสดงดังตารางที่ 3.6

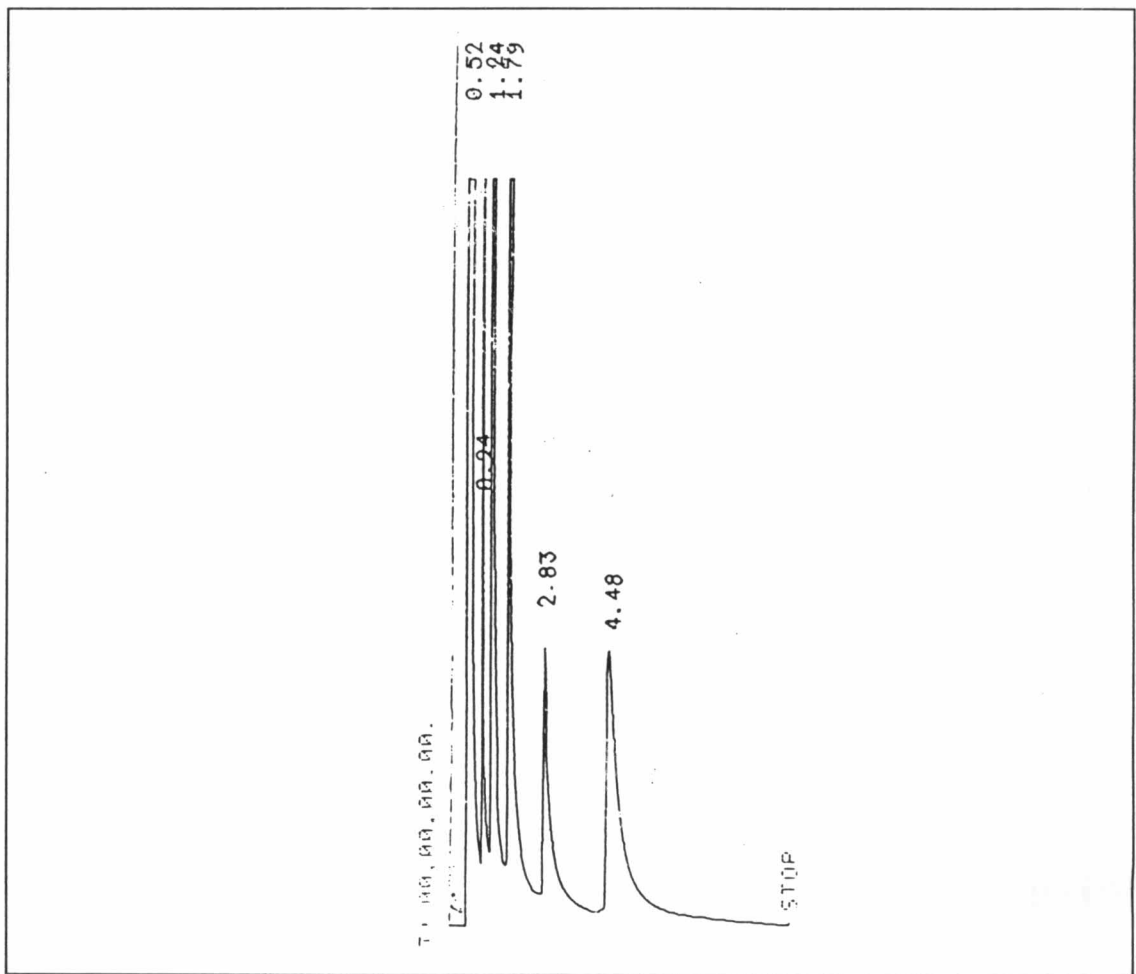


รูปที่ 3.5 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ค

ตารางที่ 3.6 แสดงแถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร ค

แถบการดูดกลืน(cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3630-3210	ปานกลาง	O-H สั่นแบบยืดของแอลกอฮอล์
2910, 2840	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2, CH_3
1460	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ CH_2, CH_3
1050	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืด
730-720	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงออนุกรมของคาร์บอนที่มีมากกว่า 7

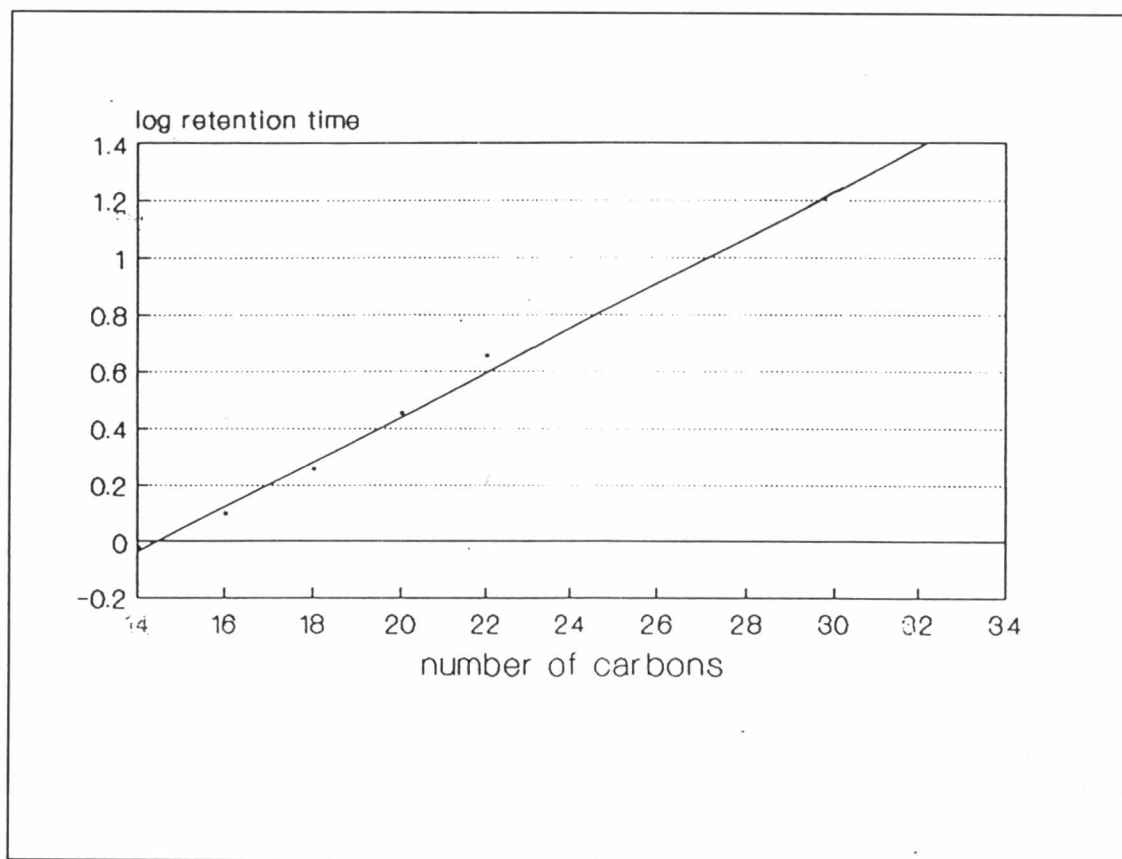
จากการทดสอบรีเอเจนต์ต่างๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่าสาร ค น่าจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์ ดังนั้นจึงนำสาร ค มาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 อุณหภูมิของคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียส และการไหลของ N_2 50 มิลลิลิตร/นาที) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแอลกอฮอล์ไฮดรอกซีที่มีจำนวนคาร์บอน 14, 16, 18, 20 และ 22 ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังรูปที่ 3.6 เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานเปรียบเทียบระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์ไฮดรอกซี ได้กราฟเส้นตรง ดังรูปที่ 3.7 เมื่อนำค่า log retention time ของสาร ค มาอ่านเทียบกับกราฟ จะสามารถหาจำนวนคาร์บอนของ สาร ค ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.7



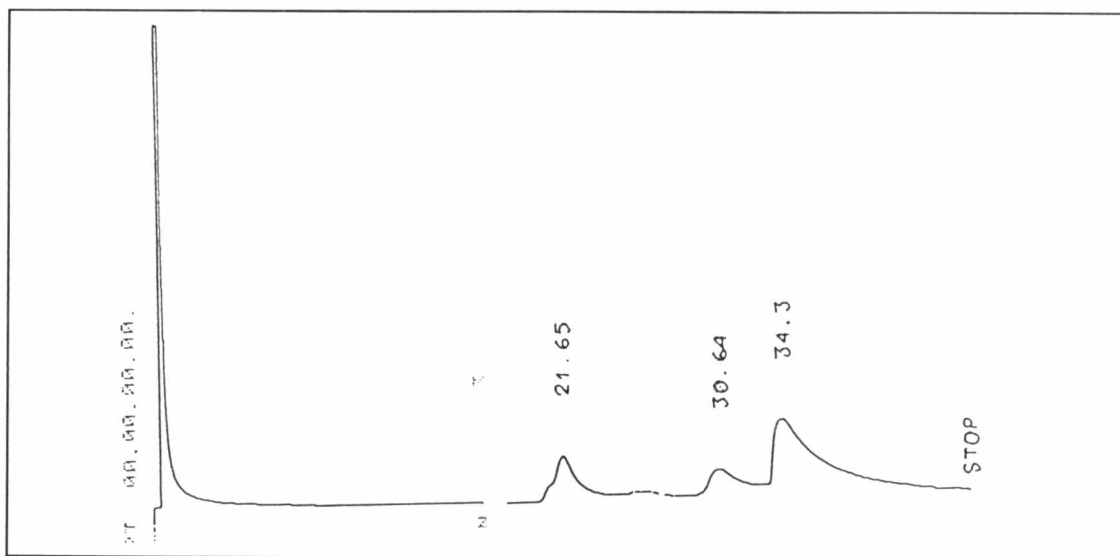
รูปที่ 3.6 แสดงแก๊สโครมาโทแกรมของของสารผสมมาตรฐานแอลกอฮอล์ไฮดรอกซี

ตารางที่ 3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐาน แอลกอฮอล์ไซตรง

สาร	retention time (นาที)	log retention time
tetradecanol(C ₁₄)	0.94	-0.027
hexadecanol(C ₁₆)	1.24	0.093
heptadecanol(C ₁₈)	1.79	0.253
eicosanol(C ₂₀)	2.83	0.452
docosanol(C ₂₂)	4.48	0.651



รูปที่ 3.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log retention time กับ จำนวนคาร์บอนของสารผสมมาตรฐานแอลกอฮอล์ไซตรง



รูปที่ 3.8 แสดงแก๊สโครมาโทแกรมของ สาร ค

เมื่อนำค่า log retention time ของ สาร ค มาอ่านเทียบกับกราฟ ก็จะสามารถหาจำนวนคาร์บอนของ สาร ค ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐาน แอลกอฮอล์สี่ตรง

retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน
21.75	1.337	30
25.89	1.413	31
30.46	1.484	32
34.19	1.534	33

จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.7) พบว่า สาร ค เป็นของผสมของสารประกอบแอลกอฮอล์สี่ตรง 4 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.9

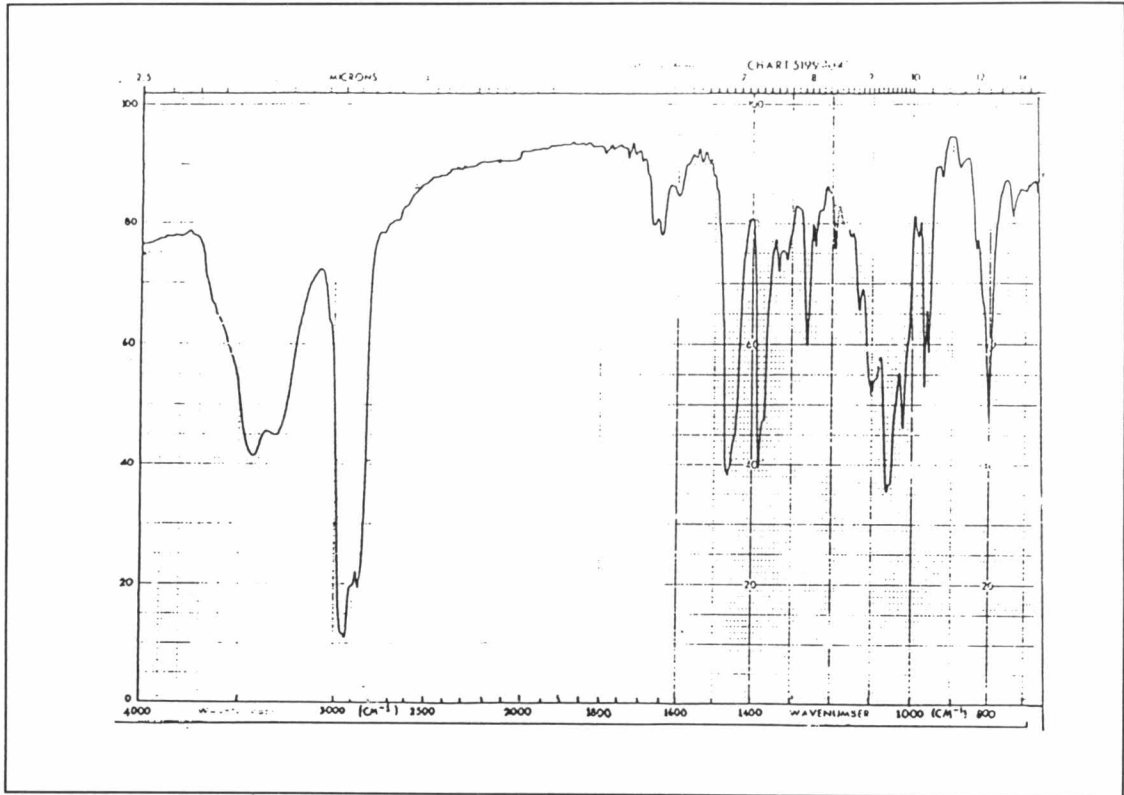
ตารางที่ 3.9 สารผสมของแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ในสาร ค

ชื่อสารประกอบ	สูตรโมเลกุล	สูตรโครงสร้าง	มวลโมเลกุล	ปริมาณสาร (%)
triacontanol	$C_{30}H_{72}O$	$CH_3-(CH_2)_{28}-CH_2-OH$	448	16.61
hentriacontanol	$C_{31}H_{74}O$	$CH_3-(CH_2)_{29}-CH_2-OH$	462	1.92
dotriacontanol	$C_{32}H_{76}O$	$CH_3-(CH_2)_{30}-CH_2-OH$	476	14.45
tritriacontanol	$C_{33}H_{78}O$	$CH_3-(CH_2)_{31}-CH_2-OH$	490	67.00

การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ง

สาร ง เป็นผลึกเข็มสีขาวในน้ำมันสีส้มในลำดับส่วนที่ 48-54 (HT₂5) และ 55-59 (HT₂6) จากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 13:7-3:2 เมื่อนำสาร ง มาตกผลึกใหม่ด้วยเฮกเซนร้อน จะได้ผลึกเข็มสีขาวใส 3.6550 กรัม จุดหลอมเหลว 138-142 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.60 (เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 3:2) สาร ง ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน แอซิโตน เอทิลแอซิเตต แต่ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และ Br_2 ใน CCl_4 แสดงว่า สาร ง เป็นสารประกอบประเภทสเตียรอยด์ที่มีพันธะไม่อิ่มตัวภายในโมเลกุล

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) รูปที่ 3.9 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่เป็นลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิลที่ความถี่ $3630-3210 \text{ cm}^{-1}$ นอกจากนี้ยังแสดงถึงพันธะไม่อิ่มตัวที่มีอยู่ในโมเลกุลที่ความถี่ 1645 cm^{-1} ข้อมูลแถบการดูดกลืนแสงของสาร ง แสดงดังตารางที่ 3.10

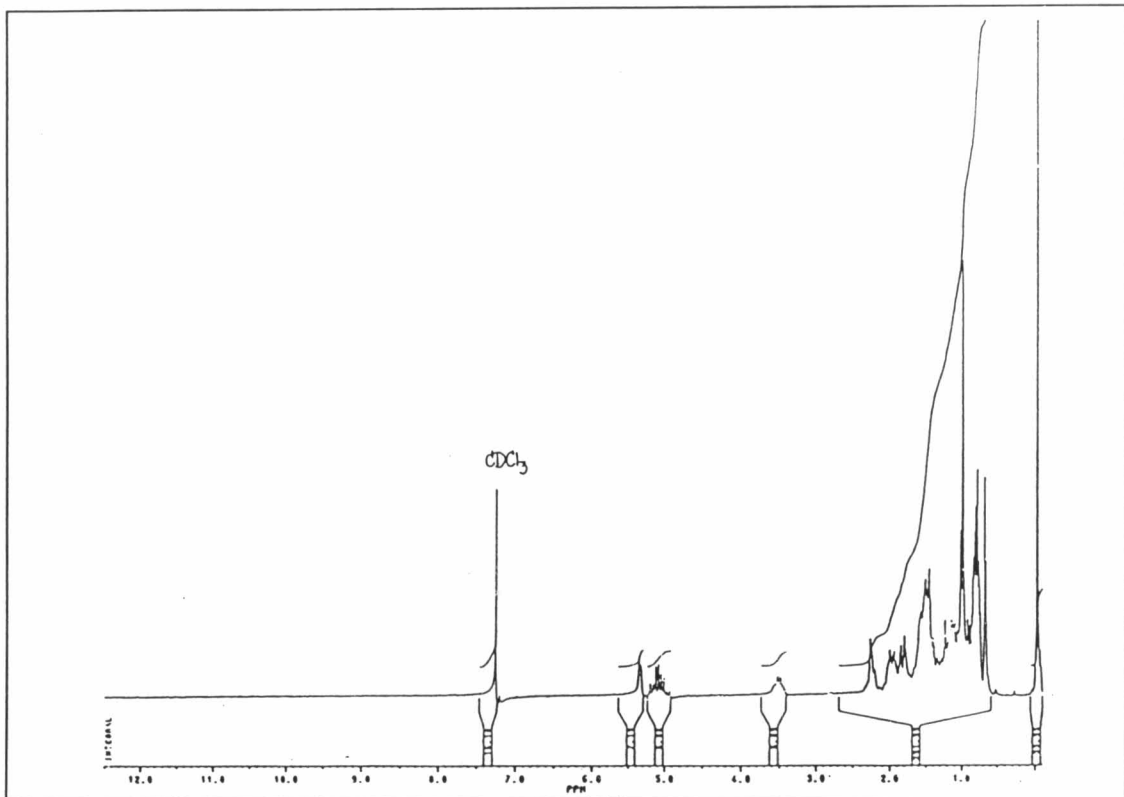


รูปที่ 3.9 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ง

ตารางที่ 3.10 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมที่สำคัญของสาร ง

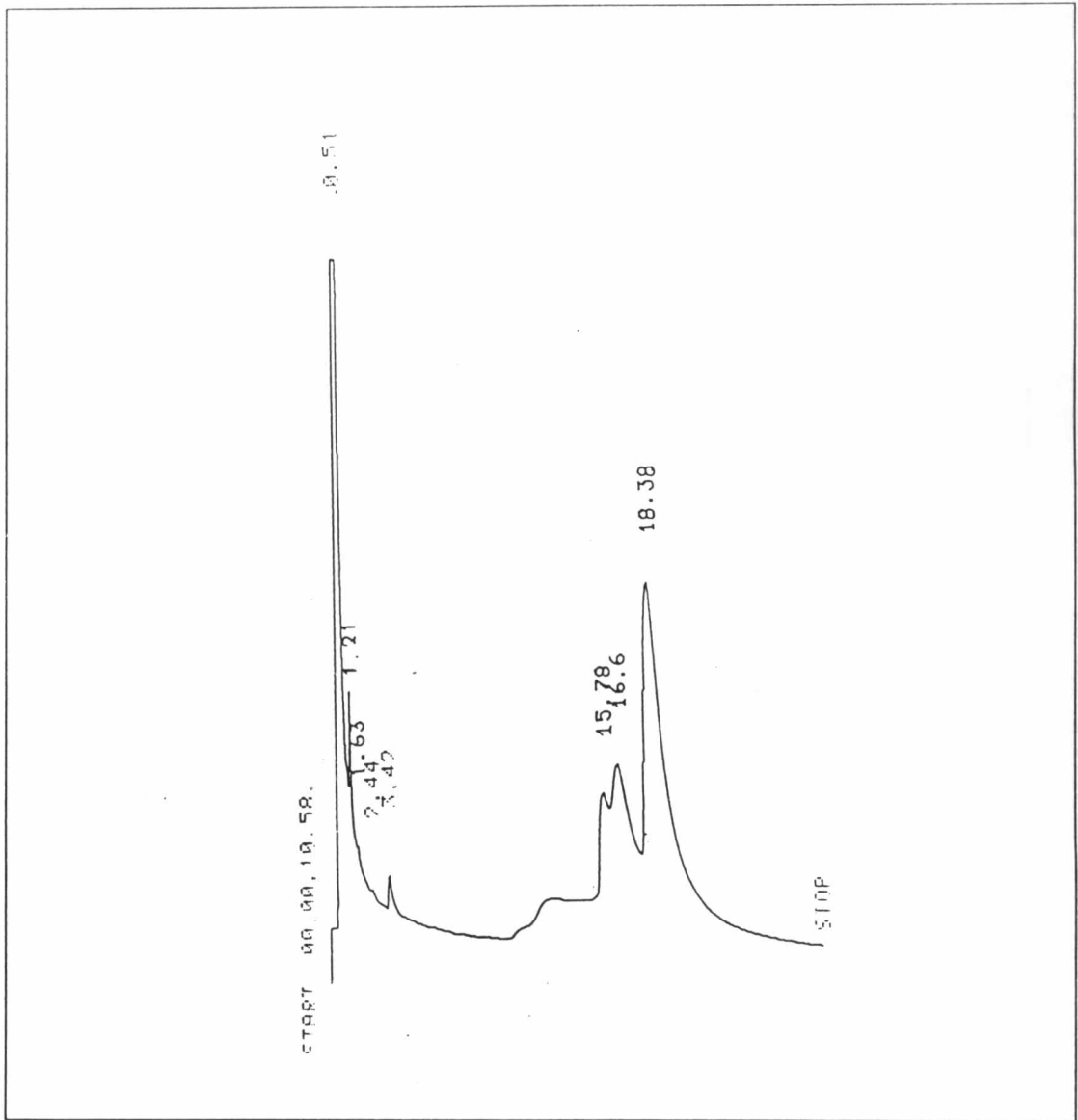
แถบการดูดกลืน (cm ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3630-3210	ปานกลาง	O-H สั่นแบบยืดแอลกอฮอล์
2980-2940	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1650-1640	ปานกลาง	C=C สั่นแบบยืด
1460, 1380	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ CH ₂ , CH ₃
1060-1050	ปานกลาง	C-O สั่นแบบยืดของ แอลกอฮอล์
840, 800	ต่ำ	C-H สั่นแบบงอของคาร์บอนที่มากกว่า 7

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) รูปที่ 3.10 ปรากฏสัญญาณของโปรตอนของหมู่ -CH₃, -CH₂-, -CH ของสเตียรอยด์ที่ (ppm) : 0.5-2.5 นอกจากนี้ที่ (ppm): 3.37 แสดงโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซี 5.1 ppm แสดง -CH=CH- และที่ 5.2 ppm แสดง C=CH-

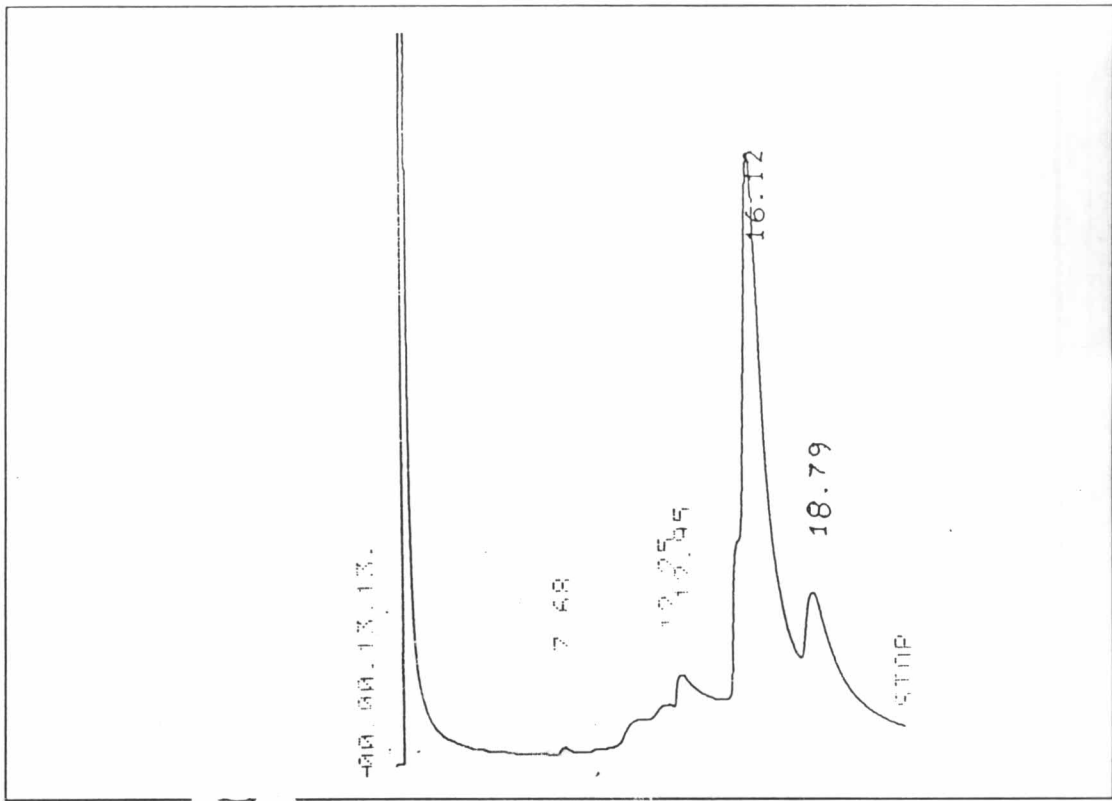


รูปที่ 3.10 แสดงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ง

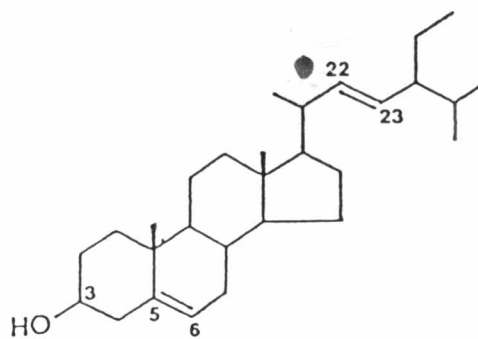
จากการทดสอบด้วยรีเอเจนต์ต่างๆ ข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม สมบัติทางกายภาพ พบว่าสาร ง น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตียรอยด์ ดังนั้นจึงนำสาร ง มาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 อุณหภูมิของคอลัมน์ 260 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียส และการไหลของ N_2 50 มิลลิลิตร/นาที่) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วย campesterol, stigmasterol และ β sitosterol ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังรูปที่ 3.11 ได้ค่า retention time เป็น 15.78, 16.60 และ 18.38 นาที ตามลำดับ เมื่อนำสาร ง ซึ่งมีค่า retention time เป็น 16.12 และ 18.78 นาที ดังรูป 3.12 มาเทียบกับของผสมมาตรฐานสเตียรอยด์ พบว่าเป็นของผสมสเตียรอยด์ระหว่าง stigmasterol และ β sitosterol



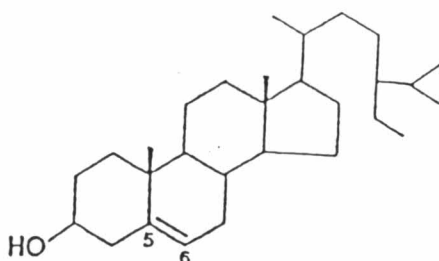
รูปที่ 3.11 แสดงแก๊สโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานสเต็มเตียรอยด์



รูปที่ 3.12 แสดงแก๊สโครมาโทแกรมของสาร

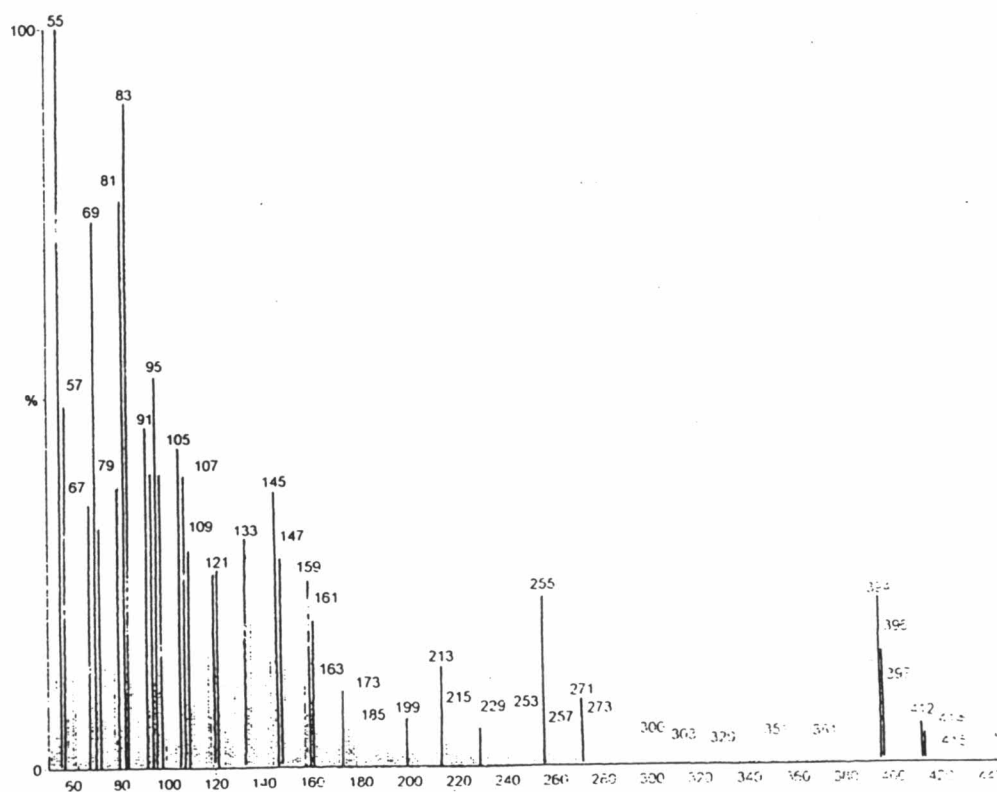


STIGMASTEROL



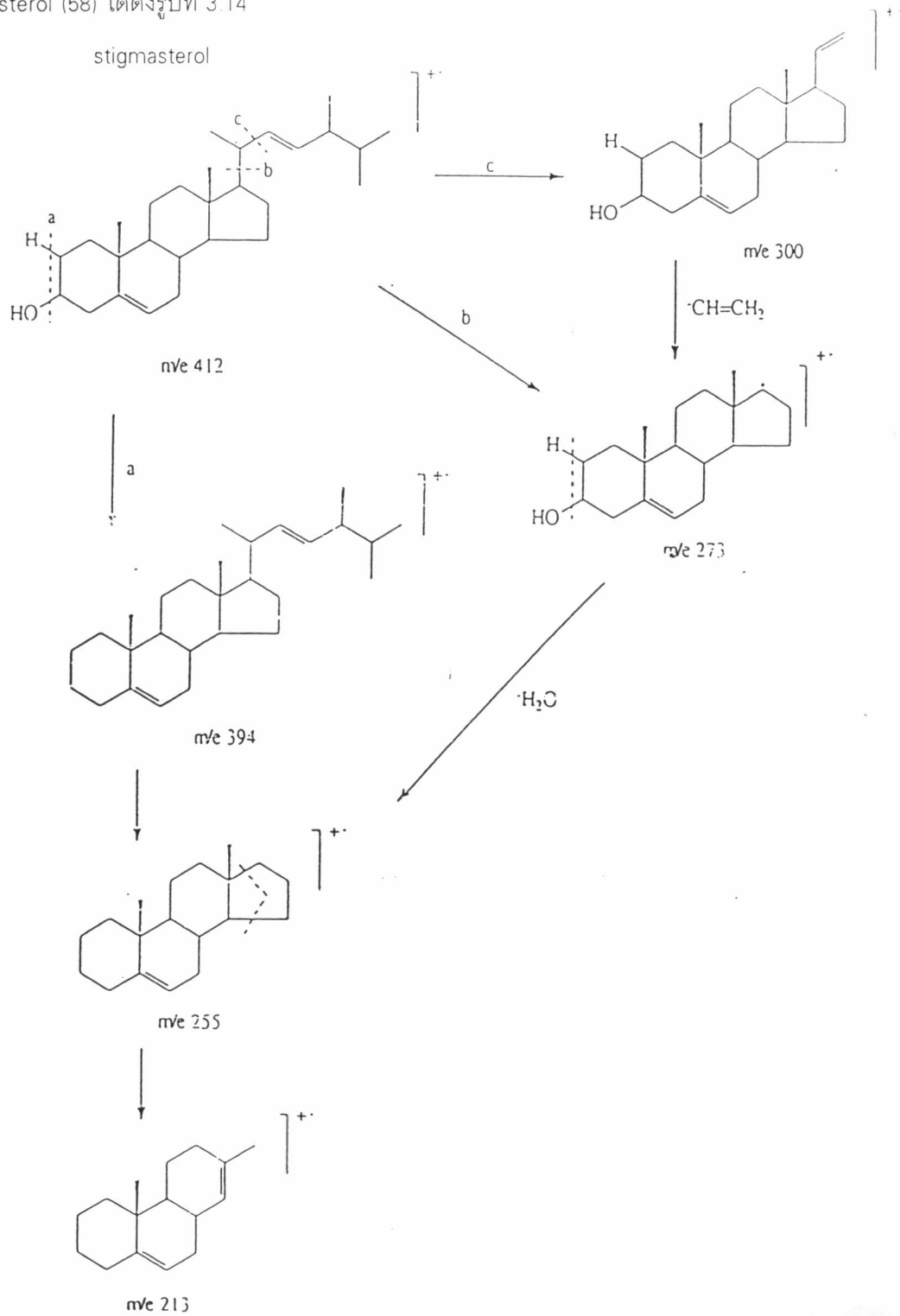
β SITOSTEROL

เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของ สาร ง จึงนำมาวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกตรัม ซึ่ง
จะปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ m/e 414 และ 412 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของ
stigmasterol และ β sitosterol ตามลำดับ ซึ่งแสดงไว้ดังรูปที่ 3.13

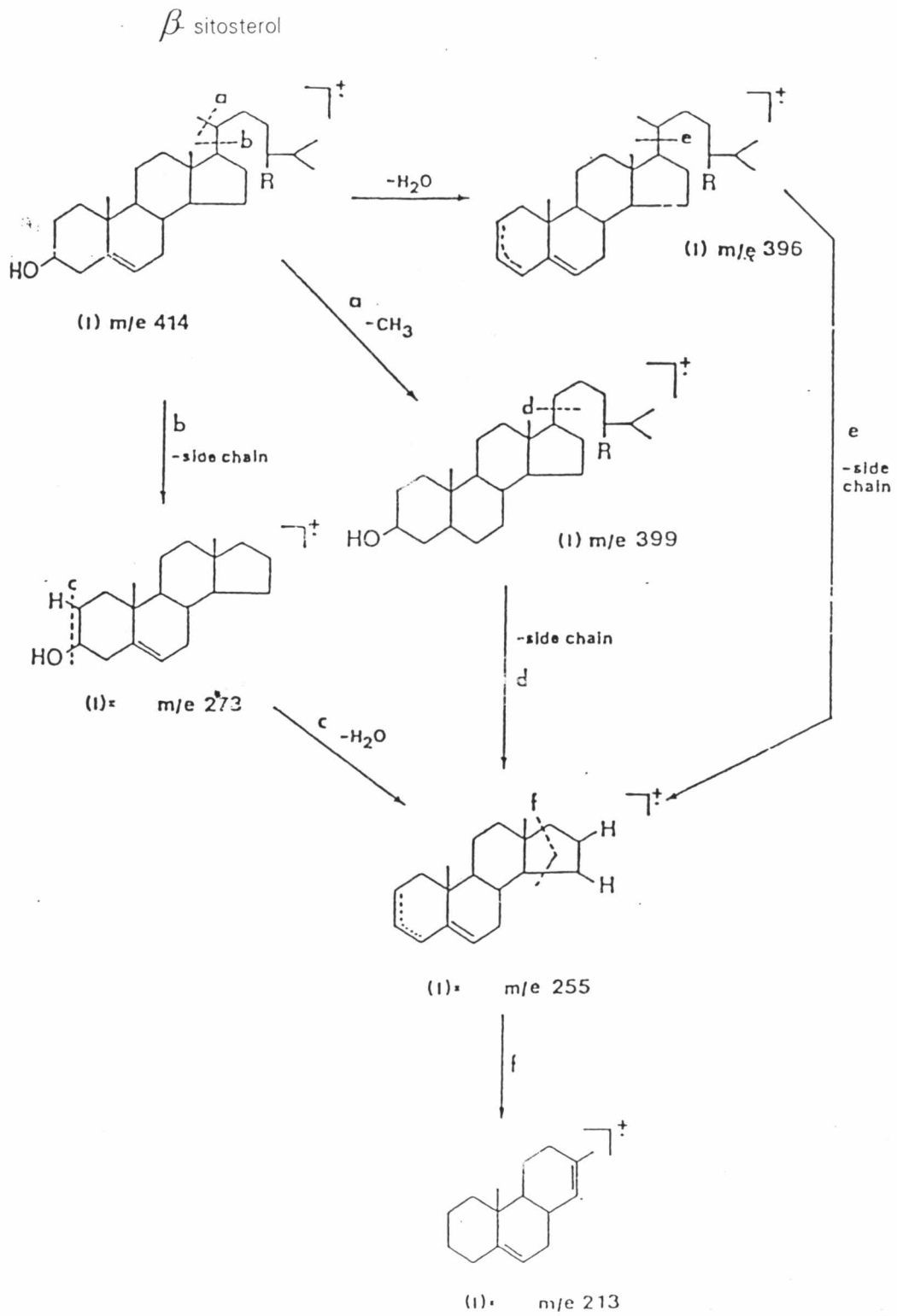


รูปที่ 3.13 แสดงแมสสเปกตรัมของสาร ง

จากแมสสเปกตรัมสามารถเขียนรูปแบบการแตกตัวของ stigmasterol และ β -sitosterol (58) ได้ดังรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.14 แสดงรูปแบบการแตกตัวของ stigmasterol

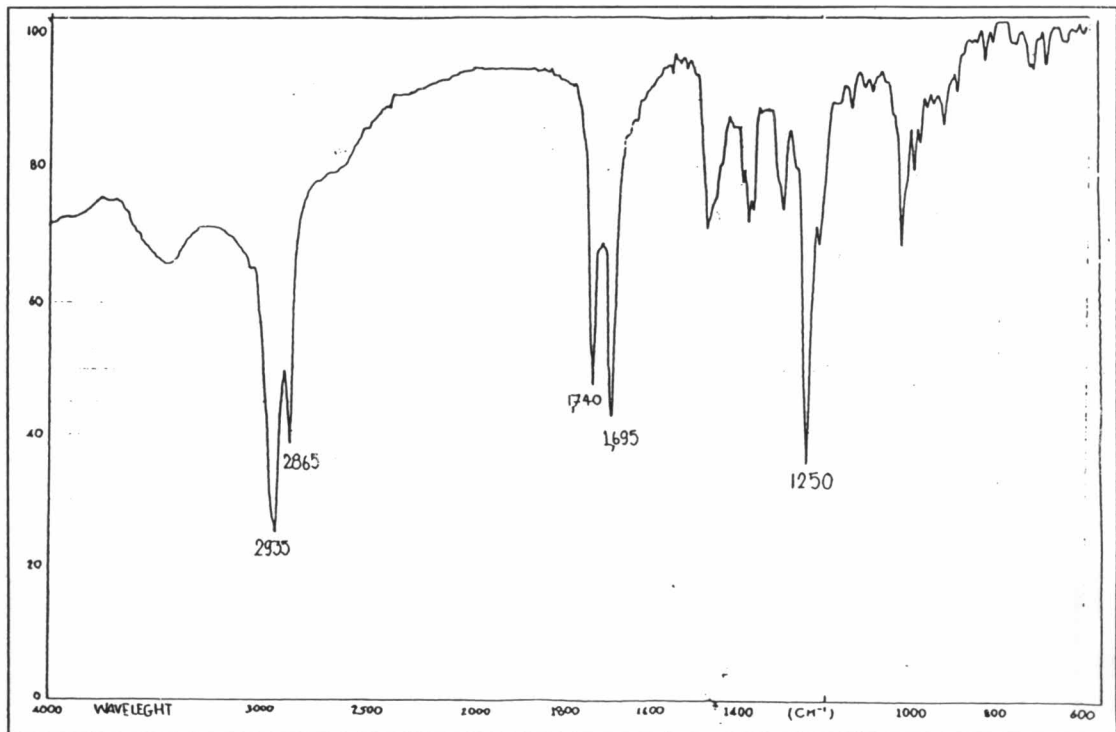


รูปที่ 3.15 แสดงรูปแบบการแตกตัวของ β sitosterol

การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ๑

สาร ๑ เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีส้มได้จากลำดับส่วนที่ 48-54 (HT₂5) และ 55-59 (HT₂6) จากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 13:7-3:2 เมื่อนำ สาร ๑ มาตกผลึกใหม่ด้วยไดคลอโรมีเทน-เฮกเซนร้อน จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 0.0450 กรัม จุดหลอมเหลว 285-287 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.45 (เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 3:2) สาร ๑ ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอลกอฮอล์ แต่ละลายได้เล็กน้อยใน แอซิโตน เมทานอล ไม่ละลายใน เฮกเซน นอกจากนี้ยังให้สารละลายสีม่วงกับปฏิกิริยา Liebermann Burchard ฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 และให้ผลบวกกับ 2,4-DNP แต่ให้ผลลบกับ 5% $FeCl_3$ จากการทดสอบทางปฏิกิริยาเคมี แสดงว่า สาร ๑ เป็นสารประกอบประเภทไทรเทอร์ปีนอยด์ที่มีหมู่คาร์บอนิลและมีพันธะที่ไม่อิ่มตัวภายในโมเลกุล

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) รูปที่ 3.16 แสดงการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 1740 และ 1695 cm^{-1} ซึ่งแสดงลักษณะเฉพาะของหมู่คาร์บอนิลประเภทเอสเทอร์และคีโตน ตามลำดับ ข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร ๑ แสดงดังตารางที่ 3.11

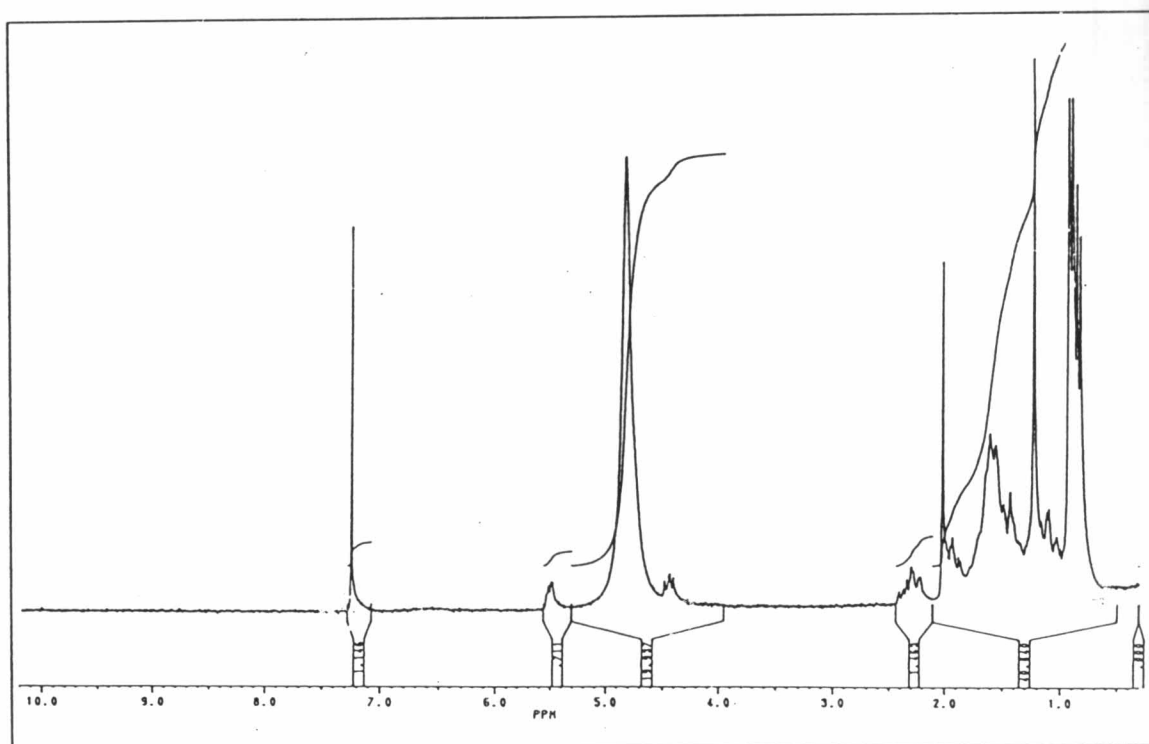


รูปที่ 3.16 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ๑

ตารางที่ 3.11 แสดงแถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร จ

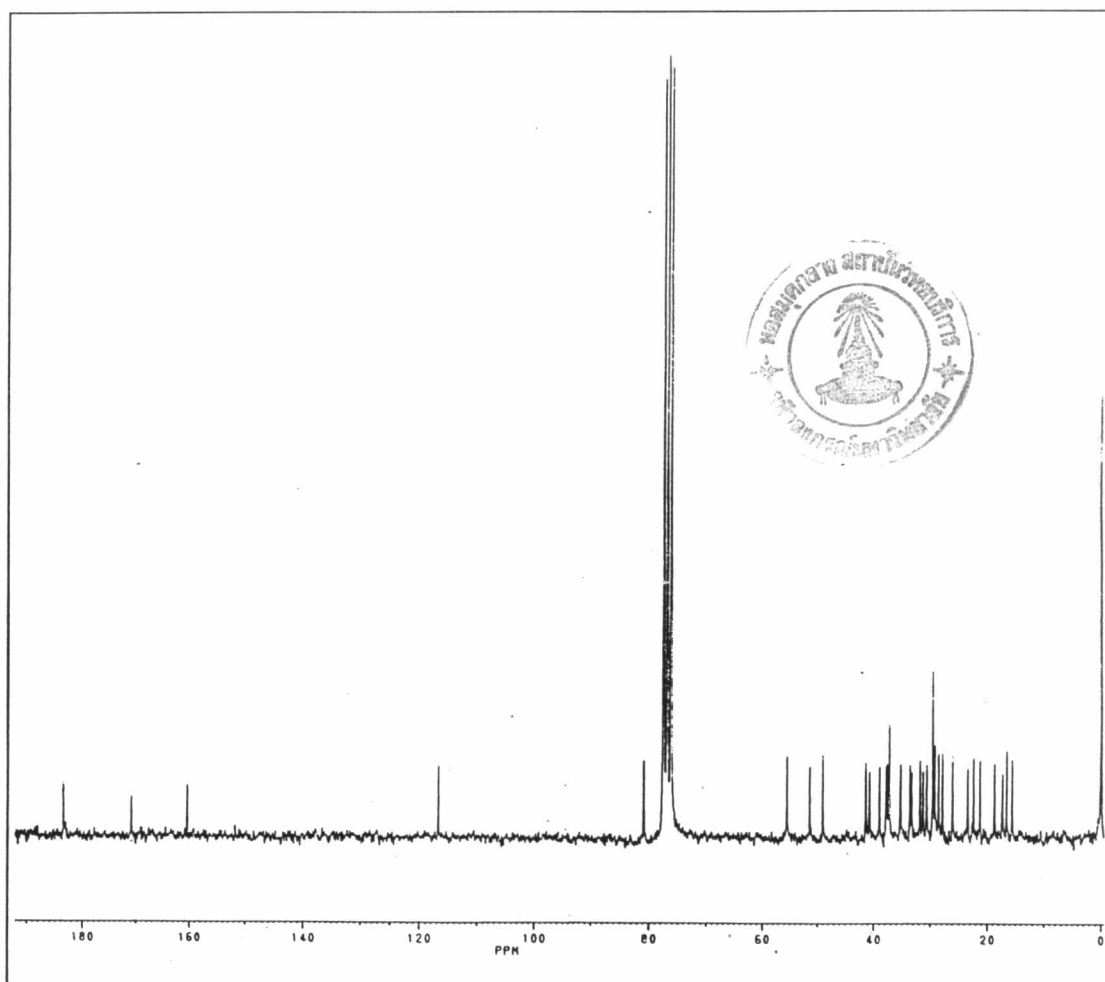
แถบการดูดกลืน(ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3450	ปานกลาง	O-H สั่นแบบยืดของ แอลกอฮอล์
2935, 2865	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH ₂ ,CH ₃
1740	สูง	C=O สั่นแบบยืดของเอสเทอร์
1695	สูง	C=O สั่นแบบยืดของคีโตน
1475,1380	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ CH ₂ ,CH ₃
1305,1205, 1035	ต่ำ	C-O สั่นแบบยืด

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 0.7-2.0, 2.15-2.47, 4.37-4.50, 4.8, 5.4 ppm ดังรูปที่ 3.17



รูปที่ 3.17 โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร จ

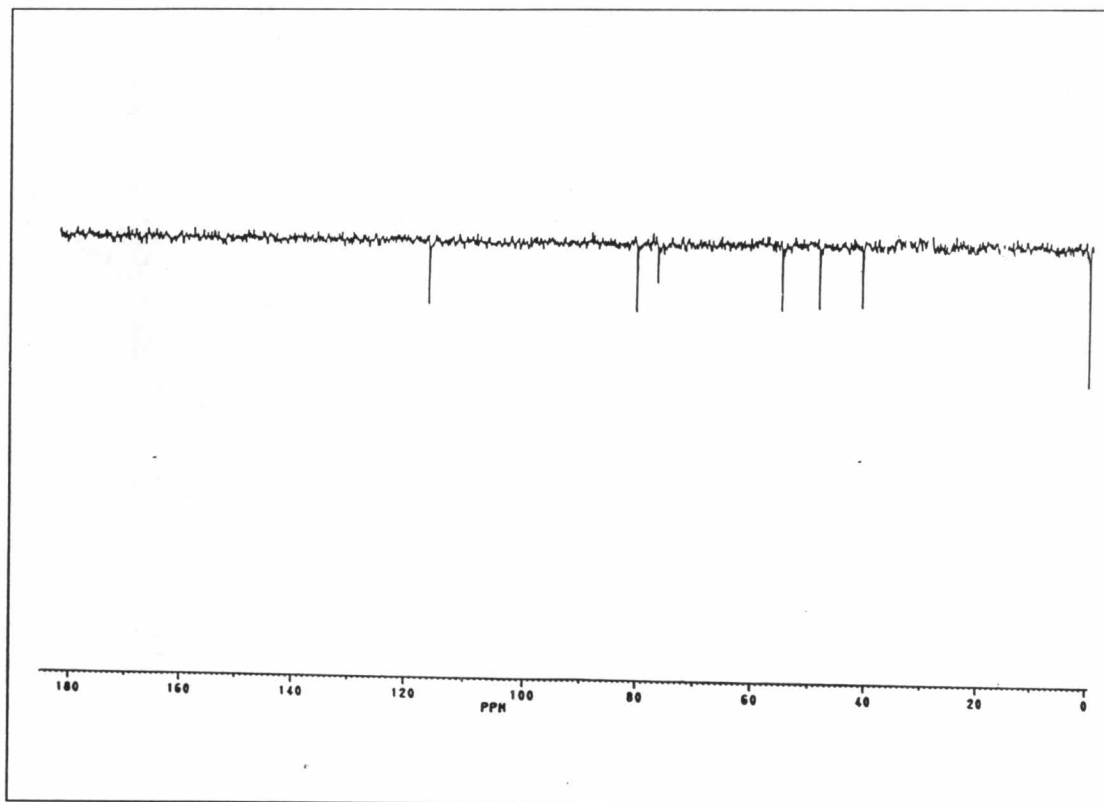
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 183.5, 171.12 เป็นลักษณะเฉพาะของหมู่คาร์บอนิลที่เป็นคีโตนและเอสเทอร์ ตามลำดับ และที่ $\delta(\text{ppm})$: 160.05, 118.21 เป็นลักษณะของคาร์บอนที่มีพันธะคู่ นอกจากนี้ยังปรากฏสัญญาณ ดังรูปที่ 3.18



รูปที่ 3.18 แสดงคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ๑

จากการทดสอบด้วยรีเอเจนต์ต่างๆ ข้อมูลทางอินฟราเรดสเปกตรัม โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ทำให้ทราบว่า สาร ๑ เป็นสารประกอบประเภทไทรเทอร์ปีนอยด์ที่มีหมู่เอสเทอร์ คีโตน และพันธะคู่ภายในโมเลกุล จากการนับสัญญาณคาร์บอนทั้งหมดพบว่ามีทั้งหมด 32 สัญญาณ แสดงว่า สาร ๑ มีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 32 คาร์บอน

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ δ (ppm): 118 เป็นของโปรตอนที่เกิดอยู่บนคาร์บอนที่มีพันธะคู่(C=CH) ที่ δ (ppm): 80.95 เป็นเมทิลโปรตอนที่ดีต่อกับออกซิเจนของหมู่เอสเทอร์ นอกจากนี้ยัง ปรากฏสัญญาณดังรูปที่ 3.19

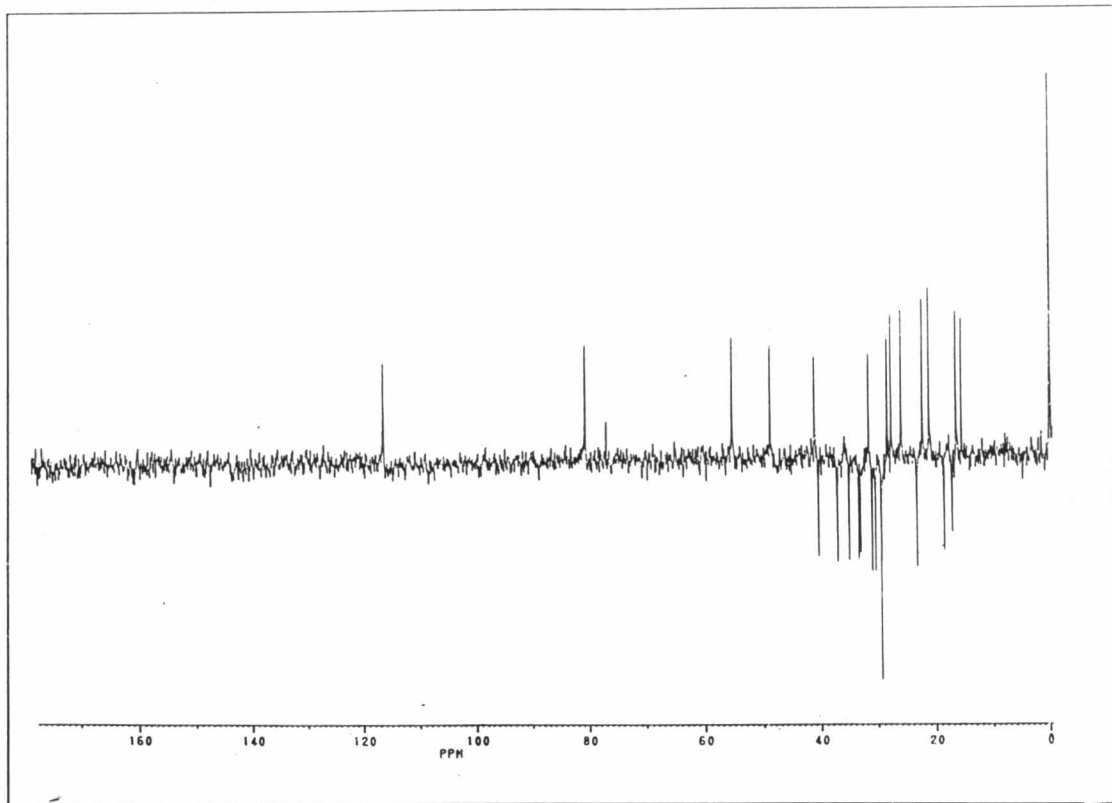


รูปที่ 3.19 แสดง DEPT 90 ของสาร จ

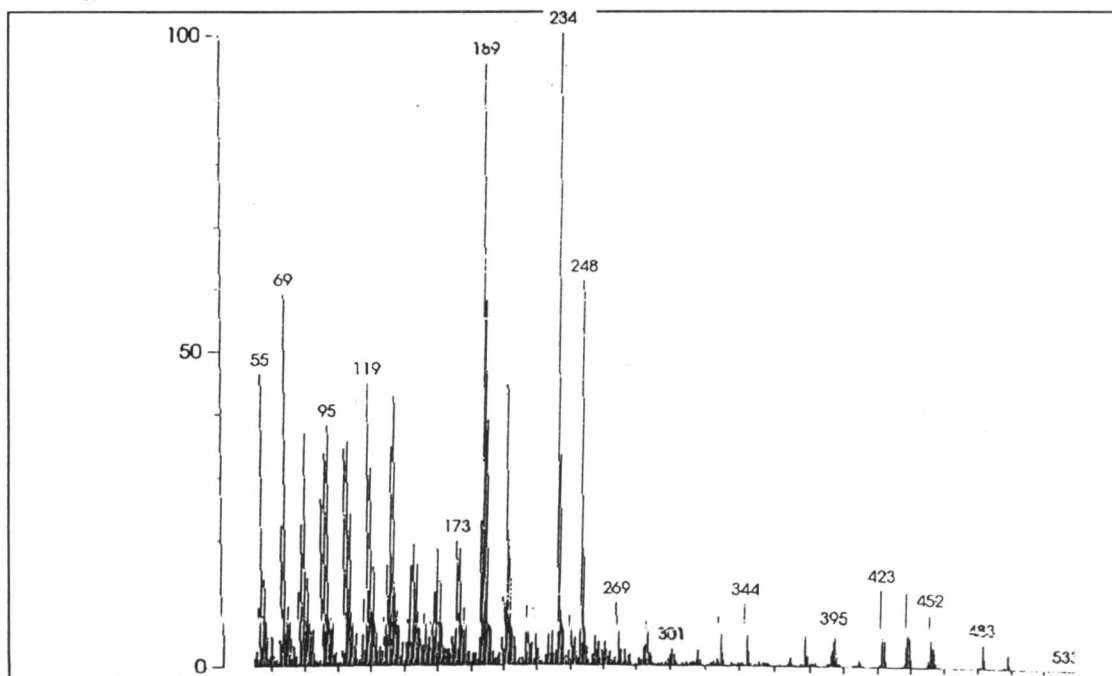
DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) รูปที่ 3.20 ปรากฏสัญญาณเมทิลและเมทิลคาร์บอนที่ 15.49, 16.86, 21.90, 23.01, 26.44, 28.15, 28.95, 32.10, 41.35, 49.17, 55.63, 80.95 และ 118.21 ppm ปรากฏสัญญาณเมทิลคาร์บอนด้านล่างที่ 17.79, 18.93, 23.88, 29.84, 30.95, 31.66, 33.69, 33.89, 35.67, 37.83 และ 40.89 ppm

จากข้อมูล คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม DEPT 135 และ DEPT 90 ทำให้ทราบว่าในสัญญาณคาร์บอนทั้งหมด 32 สัญญาณ เป็นเมทิลคาร์บอน 8 สัญญาณ เมทิลคาร์บอน 11 สัญญาณ เมทิลคาร์บอน 5 สัญญาณ และควอเตอร์นารีคาร์บอน 8 สัญญาณ เมื่อรวบรวมข้อมูลทำให้ทราบสูตรโมเลกุลว่าเป็น C₃₂H₅₁O₃ มีมวลโมเลกุล 483

รูปที่ 3.20 แสดง DEPT 135 ของสาร จ



แมสสเปกตรัม รูปที่ 3.21 ปรากฏฟิคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ไม่ใช่ชัดเจนนัก ปรากฏฟิคที่สำคัญคือ 248, 234 และ 189 ซึ่งเป็นสัญญาณของฟิคที่เกิดจากการแตกตัวแล้ว



รูปที่ 3.21 แสดงแมสสเปกตรัมของ สาร จ

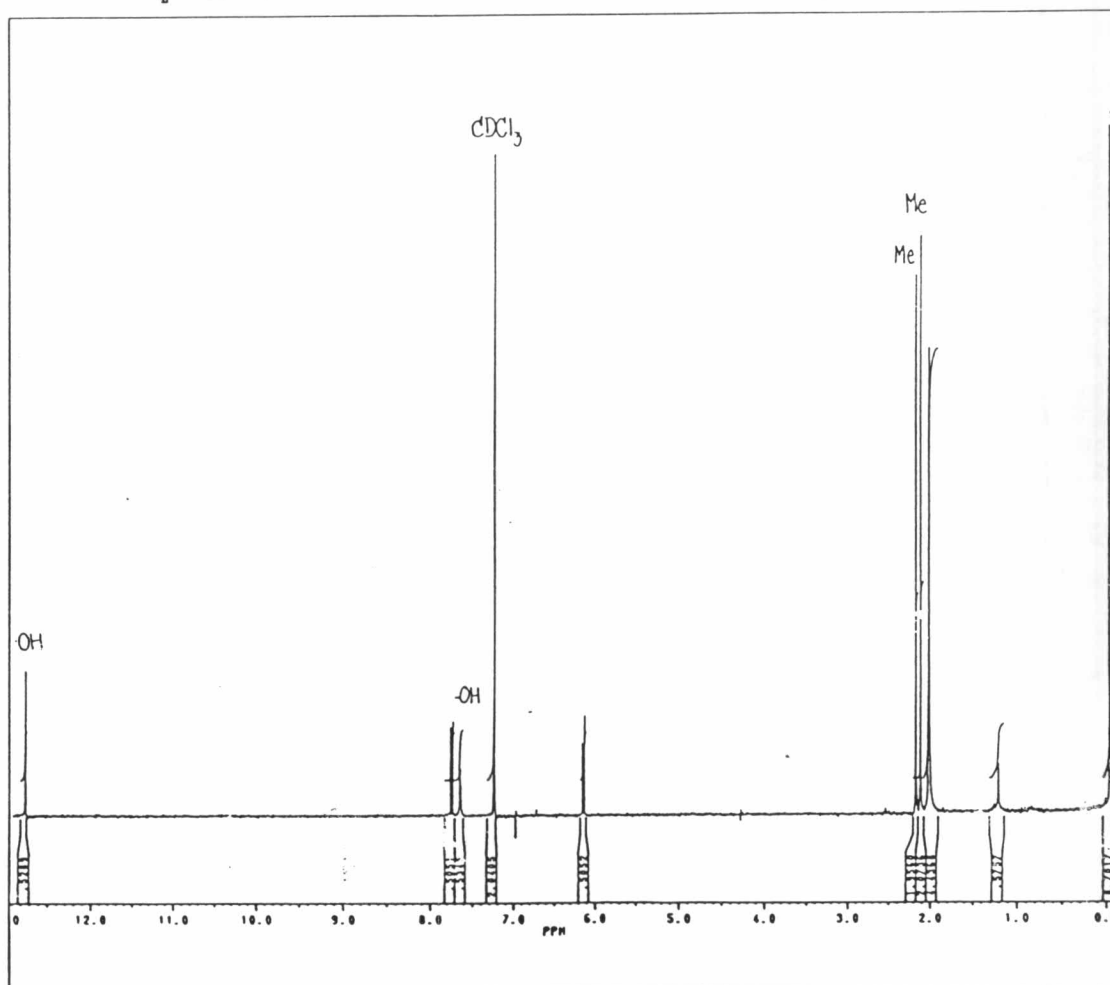
จากลักษณะสูตรโมเลกุลที่ได้จะเห็นว่าจำนวนไฮโดรเจนเป็นเลขคี่ แสดงให้เห็นว่า สาร **จ** จะต้องมีไนโตรเจนหรือเฮโลเจนเป็นองค์ประกอบ ข้อมูลจากแมสสเปกตรัมพบเบสพีคที่ 189 ซึ่งเป็นพีคที่เกิดการสูญเสียแอสติค ที่ตำแหน่ง C_3 ของพีคที่ 249 นั่นคือ เมื่อสาร **จ** เกิดการแตกตัวออกจากกัน ลักษณะของการแตกตัวจะแสดงให้เห็นเป็น 2 ส่วน ซึ่งก็คือพีคที่ 234 กับ 249 ซึ่งเมื่อนำค่า m/z ทั้งสองมารวมกันแล้วพบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 483 ซึ่งได้เท่ากับสูตรโมเลกุลที่ได้มาแล้วข้างต้น แต่จากสูตรโมเลกุลที่มีไฮโดรเจนเป็นเลขคี่ โดยที่ไม่มีไนโตรเจนและเฮโลเจน ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อน ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลที่ถูกต้องคาดว่าเป็นน้ำหนักโมเลกุลดังนี้คือ 482 ($C_{32}H_{50}O_3$) กับ 484 ($C_{32}H_{52}O_3$) ซึ่งจากการคำนวณค่า DBE พบว่า สูตรโมเลกุล $C_{32}H_{50}O_3$ มี DBE เท่ากับ 8 ในขณะที่ สูตรโมเลกุล $C_{32}H_{52}O_3$ มี DBE เท่ากับ 7 เมื่อดูความเป็นไปได้จากสารประกอบประเภทไทรเทอร์ปีนอยด์จะประกอบด้วยวงจำนวน 5 วง ซึ่งเมื่อรวมกับหมู่คาร์บอนิล 2 หมู่และพันธะคู่อีก 1 หมู่ จะได้ค่า DBE เท่ากับ 8 ดังนั้นสูตรโมเลกุลที่เป็นไปได้ที่สุดคือ $C_{32}H_{50}O_3$ อย่างไรก็ตามข้อมูลทั้งหมดนี้ยังมีไม่เพียงพอที่จะเสนอสูตรโครงสร้างที่ถูกต้องได้

การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ๑

สาร ๑ เป็นผลึกอสัณฐานสีเหลืองซึ่งในน้ำมันสีดำเหลือง ได้จากลำดับส่วนที่ 71-79(HT₂7) และ 128-135(DT₂8) จากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เครื่องโครมาโทรอน นำผลึกที่ได้มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เฮกเซนร้อน จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง(สาร ๑) หนัก 0.0117 กรัม จุดหลอมเหลว 242-245 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.49 (เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน (3:2) สาร ๑ ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน เอทิลเอซิเตต แต่ละลายได้เล็กน้อยใน แอซิโตน เมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann Burchard ฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลบวกกับ 2,4-DNP และ 5% $FeCl_3$ แสดงให้เห็นว่า สาร ๑ เป็นสารประกอบประเภทฟีนอล ที่มีหมู่คาร์บอนิลและพันธะไม่อิ่มตัวภายในโมเลกุล

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) รูปที่ 3.22 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซีที่ δ (ppm) : 12.74 และ 7.64 ซึ่งเป็นหมู่ไฮดรอกซีที่แทนที่อยู่บนวงแอรอมาติก โดย δ ที่ 12.74 ppm เป็นลักษณะเฉพาะของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่ง C_4 กับหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C_5 ของสารประกอบพวกเฟลวานอยด์(59-61) นอกจากนี้ที่ δ (ppm) 7.75(1H, doublet of doublet , $J = 6$ Hz, $-CH=CH-$) และ 6.14 (1H, doublet of doublet , $J = 6$ Hz, $-CH=CH-$) จากลักษณะดังกล่าวแสดงว่าจะต้องมีโปรตอนที่เกาะอยู่บนคาร์บอนที่ติดกัน และที่ δ (ppm): 2.17 และ 2.11 แสดงลักษณะของหมู่เมทิลที่ถูกแทนที่อยู่บนวงแอรอมาติก จากข้อมูลของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมทำให้ทราบว่า มีหมู่แทนที่บนวงแอรอมาติกทั้งหมด 4 หมู่คือ หมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ และ หมู่เมทิล 2 หมู่ ซึ่งข้อมูลของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมทำให้ทราบว่า มีจำนวนโปรตอนทั้งหมด 10 โปรตอน

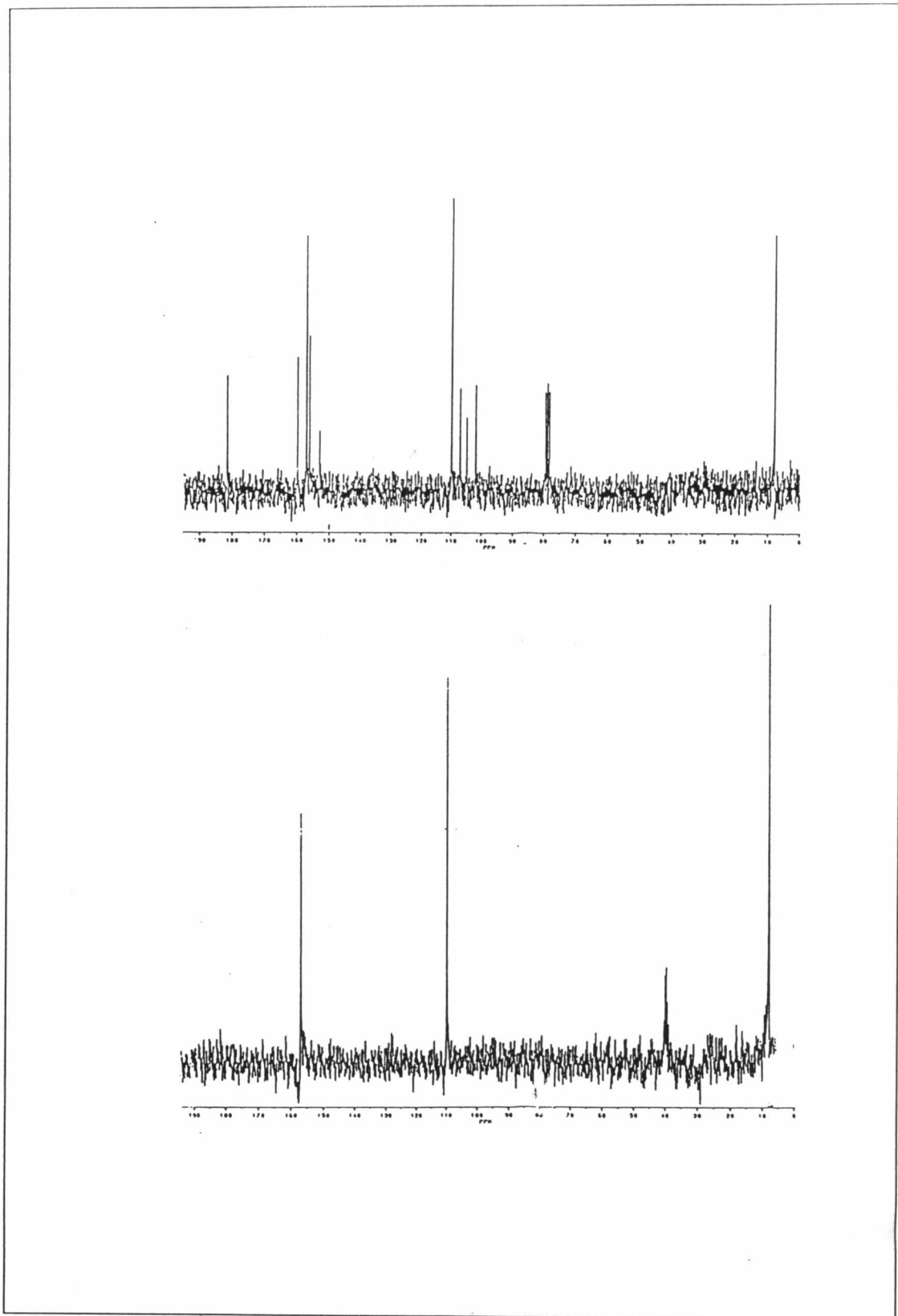
รูปที่ 3.22 แสดงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร อ



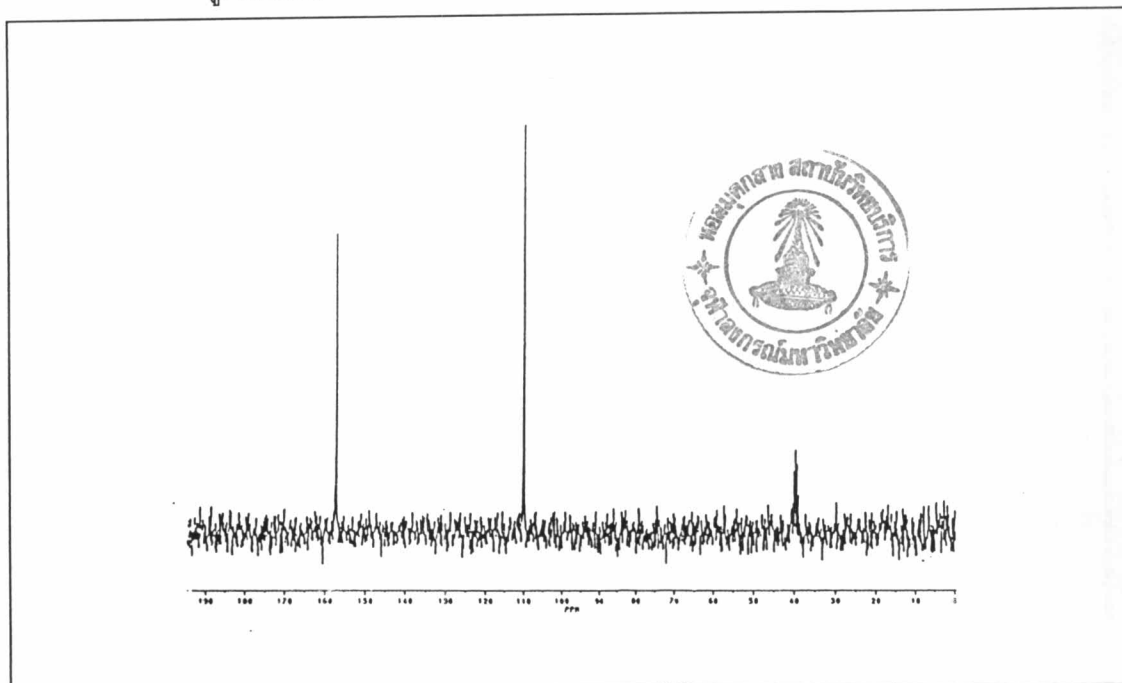
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 3.23 ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่เคมีคัลชิฟท์ที่ 181 ppm เป็นลักษณะเฉพาะของหมู่คาร์บอนิล และช่วงเคมีคัลชิฟท์ 161-102 ppm เป็นลักษณะเฉพาะของวงแหวนอะโรมาติกหรือพันธะคู่

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณเมทิลคาร์บอนที่ 110 และ 161 ดังรูปที่ 3.23

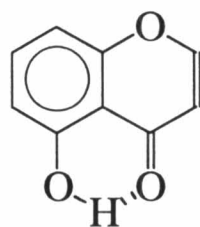
DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณเมทิลและเมทิลคาร์บอนด้านบนที่ 161, 110, 8.05 และ 7.95 และไม่ปรากฏสัญญาณเมทิลคาร์บอนด้านล่าง ดังรูปที่ 3.24



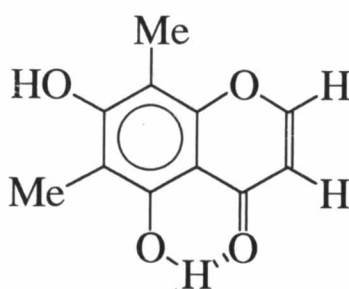
รูปที่ 3.23 แสดงคาร์บอน-13 เอ็มเอ็มอาร์สเปกตรัม DEPT 135

รูปที่ 3.24 แสดง DEPT 90 ของสาร จ

จากคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมจะปรากฏสัญญาณทั้งหมด 11 สัญญาณ แสดงให้เห็นว่า สาร จ มีจำนวนคาร์บอนทั้งหมด 11 คาร์บอน จากการทำให้ DEPT 135 และ DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบสัญญาณที่ 161 และ 110 ppm ซึ่งเป็นของหมู่เมทอีนและจากข้อมูลของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมที่ให้พีคที่สอดคล้องกันทำให้ทราบว่าหมู่เมทอีนข้างหนึ่งน่าจะต่ออยู่กับออกซิเจนและอีกข้างหนึ่งน่าจะต่ออยู่กับหมู่คาร์บอนิล (O ที่ 181 ppm) ส่วนสัญญาณที่ 2.17 และ 2.11 ppm เป็นของหมู่เมทิลที่อยู่บนวงแหวนโรมาติก ดังนั้นจะมีสัญญาณที่เหลือทั้งหมด 6 สัญญาณซึ่งก็คือวงแหวนโรมาติกนั่นเอง สูตรโดยทั่วไปของสาร จ คือ $C_{11}H_{10}O_4$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 206 สูตรโครงสร้างโดยทั่วไปมีลักษณะดังรูปข้างล่างนี้



จากหมู่แทนที่ที่เหลือคือ หมู่เมทิล 2 หมู่ (จากค่า δ ที่ปรากฏจะเห็นว่าค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นหมู่เมทิลจะต้องมีสิ่งแวดล้อมที่เหมือนหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งที่เป็นไปได้คือคาร์บอนที่ตำแหน่งที่ 6 กับ 8) และหมู่ไฮดรอกซีอีก 1 หมู่ ก็นำไปแทนลงในวงแอโรมาติกในส่วนที่เหลือคือคาร์บอนในตำแหน่งที่ 7 ซึ่งจะได้สูตรโครงสร้างดังรูปข้างล่างนี้

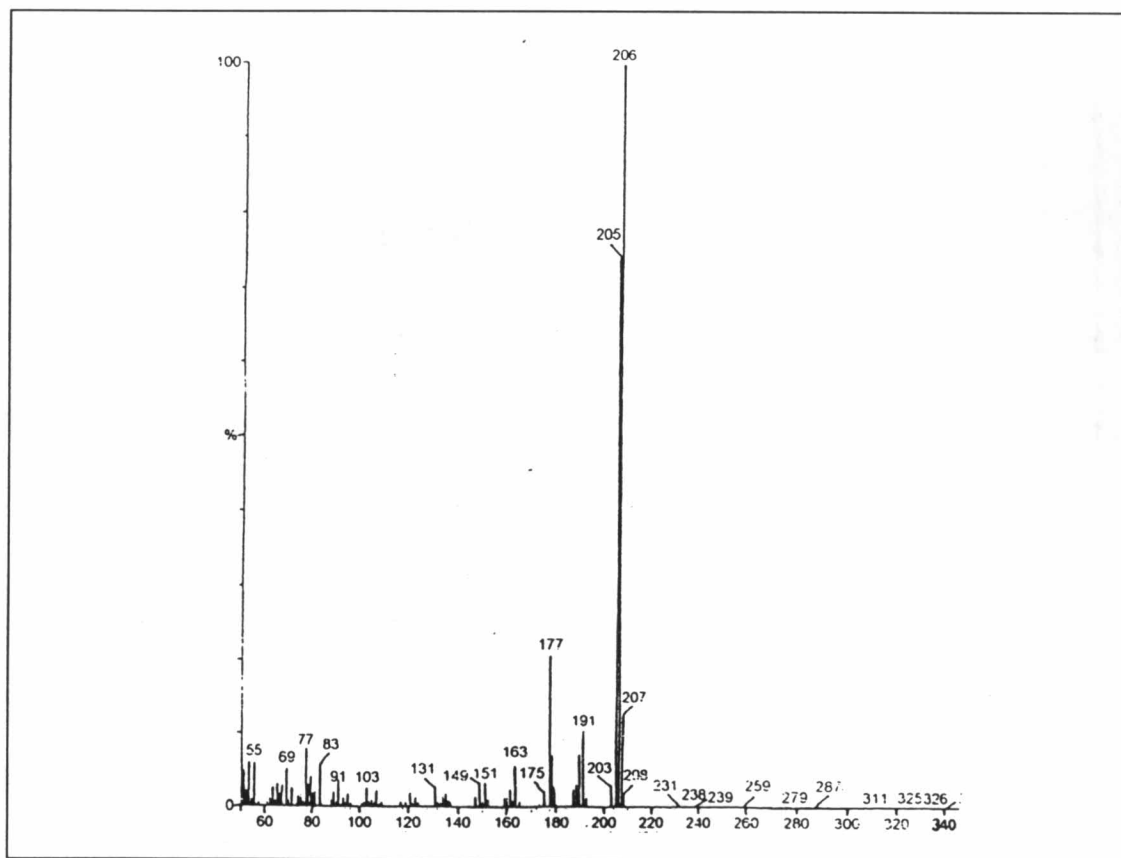


จากการเปรียบเทียบข้อมูลทำให้สามารถกำหนดตำแหน่งของสัญญาณคาร์บอนได้ (62-64) ดังตารางที่ 3.12

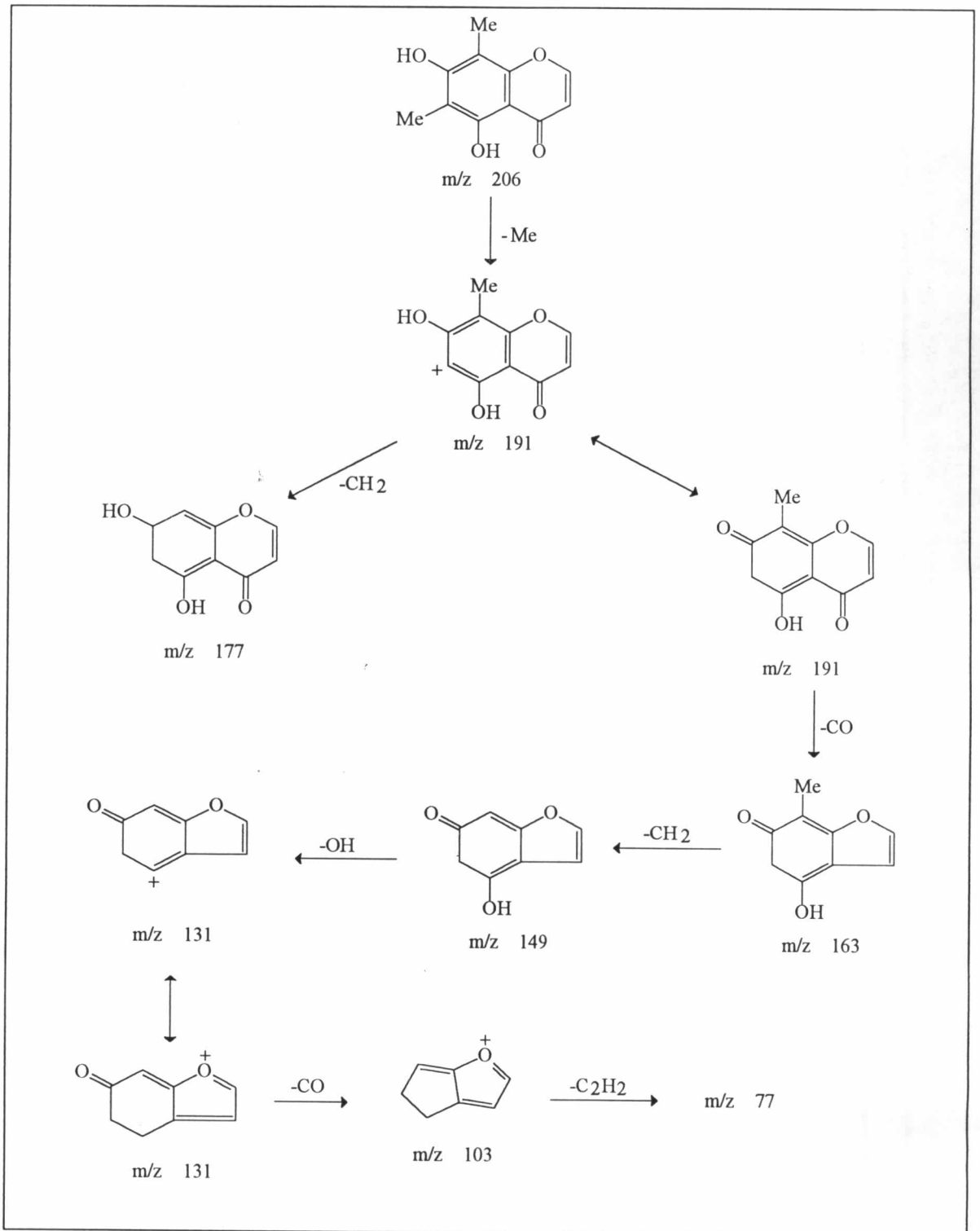
ตารางที่ 3.12 เปรียบเทียบคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร จ กับ chromone(65)

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลชิฟท์ (ppm)	
	chromone	สาร <u>จ</u>
2	145.5	157.0
3	113.0	110.0
4	177.6	182
5	125.3	154
6	125.8	107
7	133.8	161
8	118.3	102
8a	156.6	156
4a	125.0	106
CH ₃	-	8.05, 7.95

เพื่อเป็นการยืนยันสูตรโครงสร้างที่ได้โดยอาศัยข้อมูลแมสสเปกตรัม รูปที่ 3.25 ซึ่งปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 206 เท่ากับมวลโมเลกุลของสาร น และสามารถเขียนรูปแบบการแตกตัวได้ดังรูปที่ 3.26

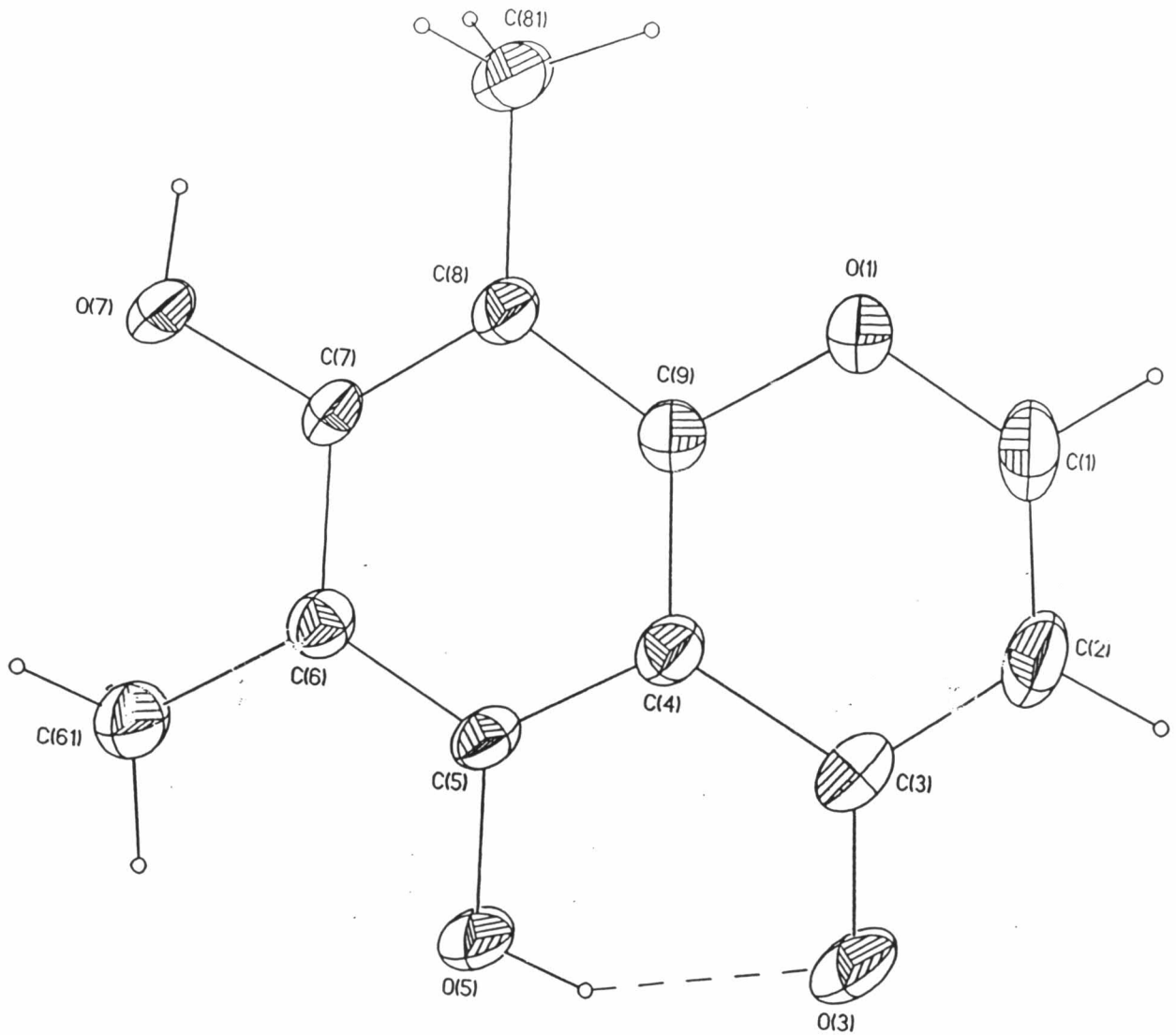


รูปที่ 3.25 แมสสเปกตรัมของ สาร น



รูปที่ 3.26 รูปแบบการแตกตัวของ สาร ๑

สาร ๑ ถูกยืนยันโครงสร้างที่ถูกต้องอีกครั้งด้วย X-Ray Crystallography ดังแสดงอยู่ในรูปที่ 3.27



รูปที่ 3.27 แสดงโครงสร้างของสาร ๑ ด้วย X-Ray Crystallography

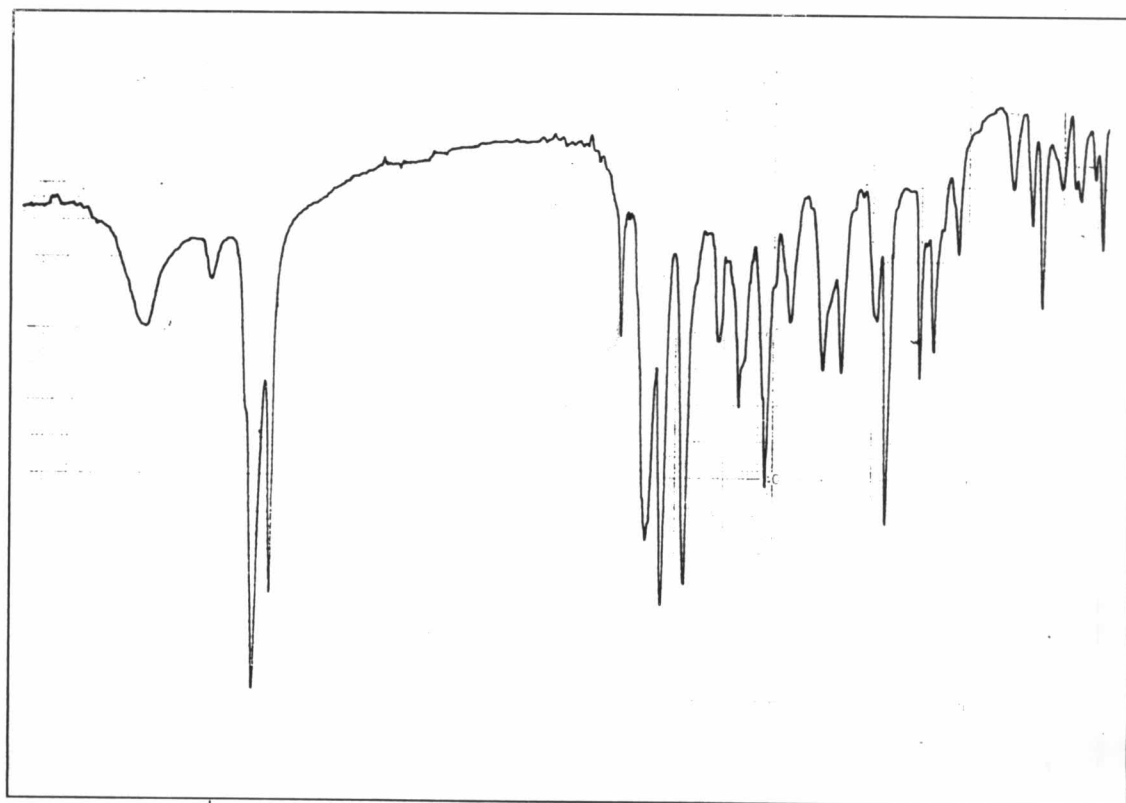
สาร ๑ มีชื่อทางเคมีว่า 6,8-dimethyl-5,7-dihydroxychromone หรือเรียกอีกชื่อว่า Leptorumol (6F. ซึ่งเป็นครั้งแรกที่พบ โดยใช้เทคนิคของอัลตราไวโอเล็ต-วิสิเบิล ในการพิสูจน์โครงสร้างของสาร ๑



การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ข

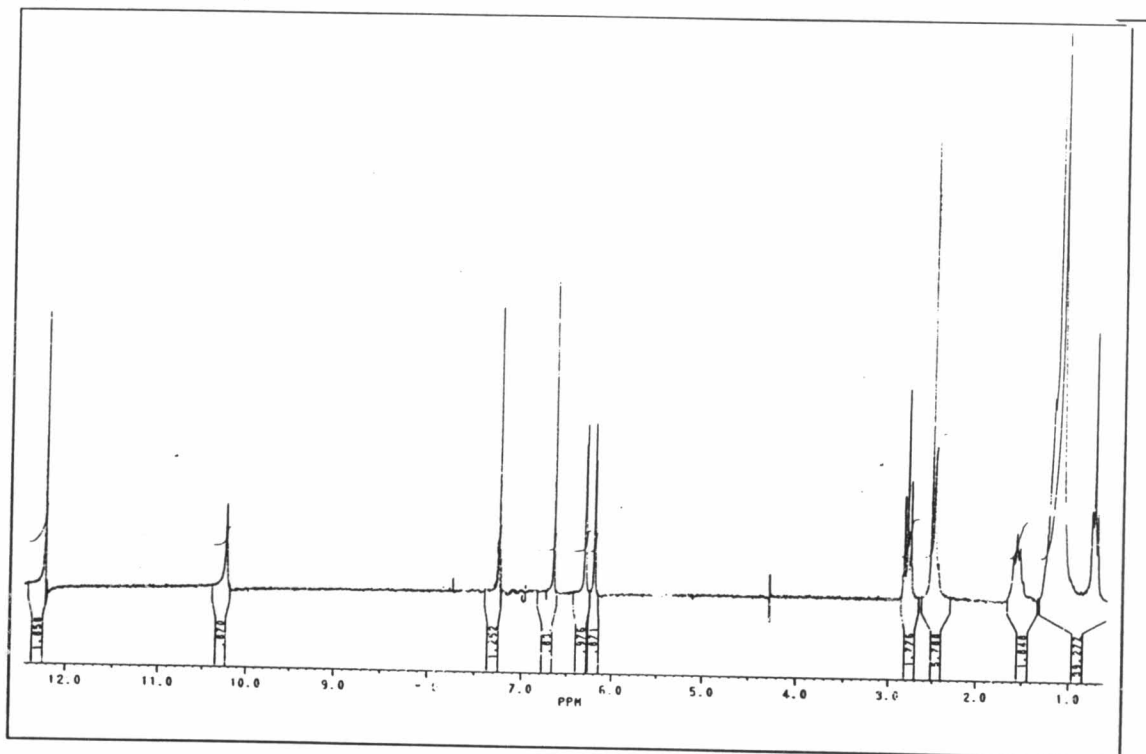
สาร ข เป็นผลึกอสัณฐานสีเหลืองซึ่งในน้ำมันสีดำเหลือง อยู่ในลำดับส่วนที่ 136-171 ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วน 3:2-1:1 (HT₂8-HT₂10) ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เครื่องโครมาโทรอน ตกผลึกโดยใช้คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน ได้ผลึกอสัณฐานสีเหลือง (สาร ข) หนัก 0.0372 กรัม จุดหลอมเหลว 128-130 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.78 (ไดคลอโรมีเทน) สาร ข ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทนเมทานอล ร้อน ละลายได้เล็กน้อยในไดคลอโรมีเทน เอทิลเอซิเตต เมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann Burchard ฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 และให้ผลบวกกับ 2,4-DNP และ 5% $FeCl_3$ แสดงให้เห็นว่า สาร ข เป็นสารประกอบประเภทฟีนอล ที่มีหมู่คาร์บอนิลและพันธะไม่อิ่มตัวภายในโมเลกุล

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) รูปที่ 3.28 แสดงการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 1710, 1660, 1630 และ 1580 cm^{-1} ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่คาร์บอนิล นอกจากนี้ยังพบแถบการดูดกลืนที่ 1365, 1170 และ 1073 cm^{-1}



รูปที่ 3.28 แสดงการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร ข

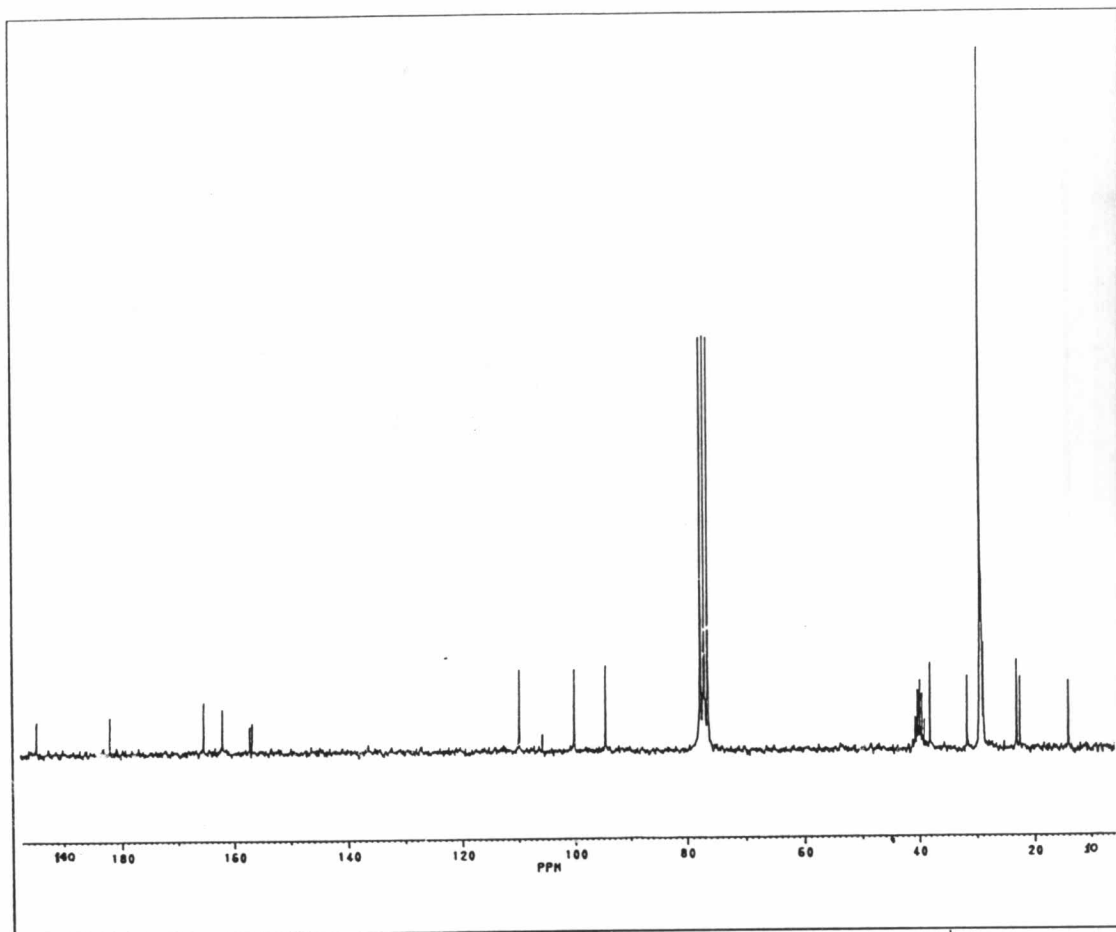
โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 3.29 ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 12.21, 10.22 ppm ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซี โดยเฉพาะที่เคมีคัลชิฟท์ที่ 12.21 ppm เป็นลักษณะการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิล ที่เคมีคัลชิฟท์ 6.30(d, 1H) และ 6.19 (d, 1H) เป็นเมไทน์คาร์บอนที่มีโปรตอนของคาร์บอนที่ติดกัน($\text{CH}=\text{CH}$) ในขณะที่ช่วง 2.78-0.75 ppm คาดว่าเป็นไฮโดรคาร์บอนโซ่ยาว



รูปที่ 3.29 แสดงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร ข

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 3.30 ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 194.31, 181.95, 165.39, 161.91 ซึ่งน่าจะเป็นคาร์บอนิลคาร์บอน และที่เคมีคัลชิฟท์ 156.66, 157.55 ppm เป็นคาร์บอนของวงแหวนอะโรมาติกหรือของแอลคีนที่ติดกับหมู่ไฮดรอกซีซึ่งมี 2 หมู่ และในช่วง 37.96-13.83 cm^{-1} เป็นของไฮโดรคาร์บอนโซ่ยาว

รูปที่ 3.30 แสดงคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร ข

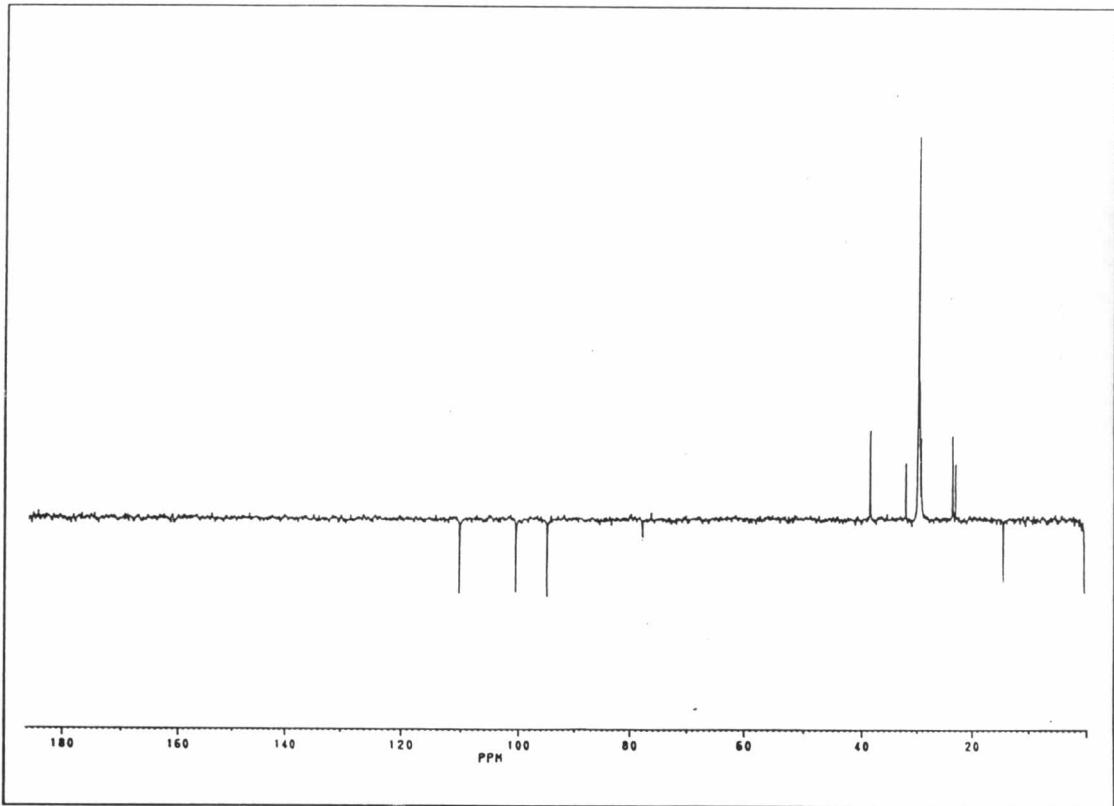


DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 3.31 ปรากฏสัญญาณเมทิลและเมทไธน์คาร์บอนด้านบนที่ 109, 105, 100 และ 13.83 ปรากฏสัญญาณเมทิลีนคาร์บอนด้านล่างที่ 37.96, 31.61, 30.27, 30.08, 29.38, 29.16, 28.64, 23.47 และ 22.08 ppm

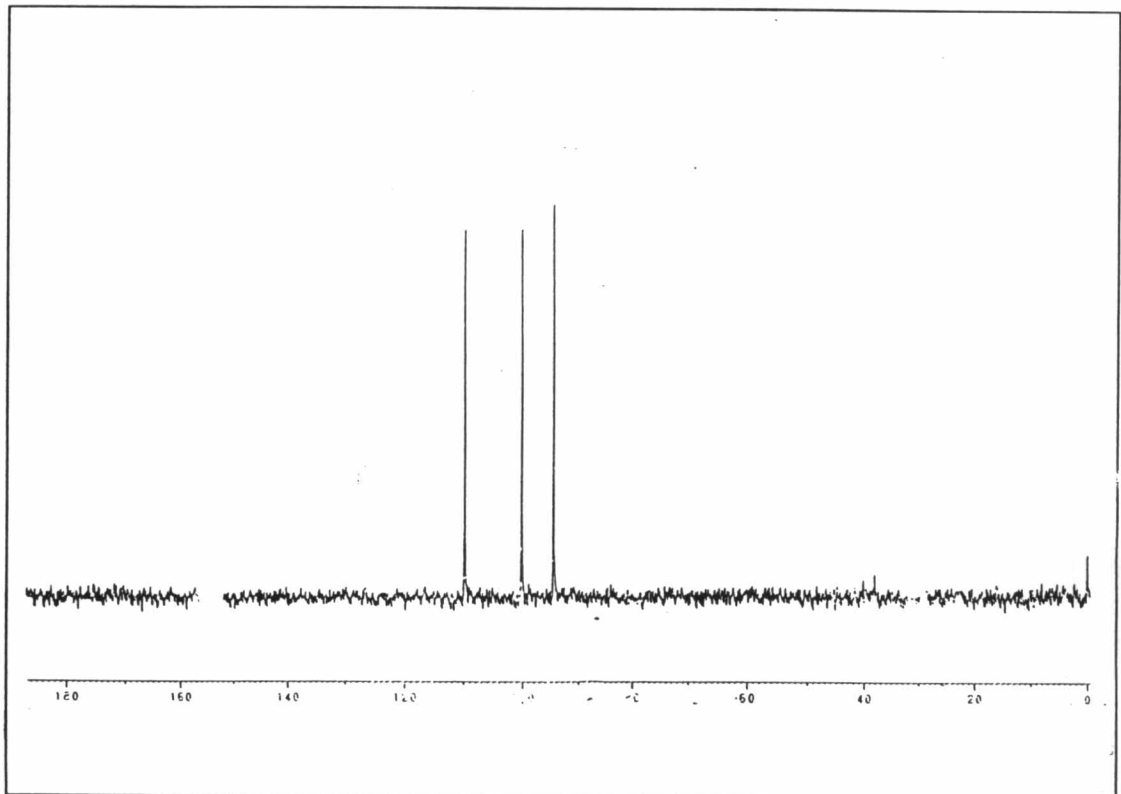
DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 3.32 ปรากฏสัญญาณเมทไธน์คาร์บอนที่ 109, 105 และ 100 ppm

จากข้อมูลดังกล่าวสามารถบอกสูตรโมเลกุลของสาร ข ในช่วงที่ไม่รวมไฮโดรคาร์บอน ไช่ยาวอาจจะเป็น $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{O}_6$ ซึ่งมีมวลโมเลกุล 221

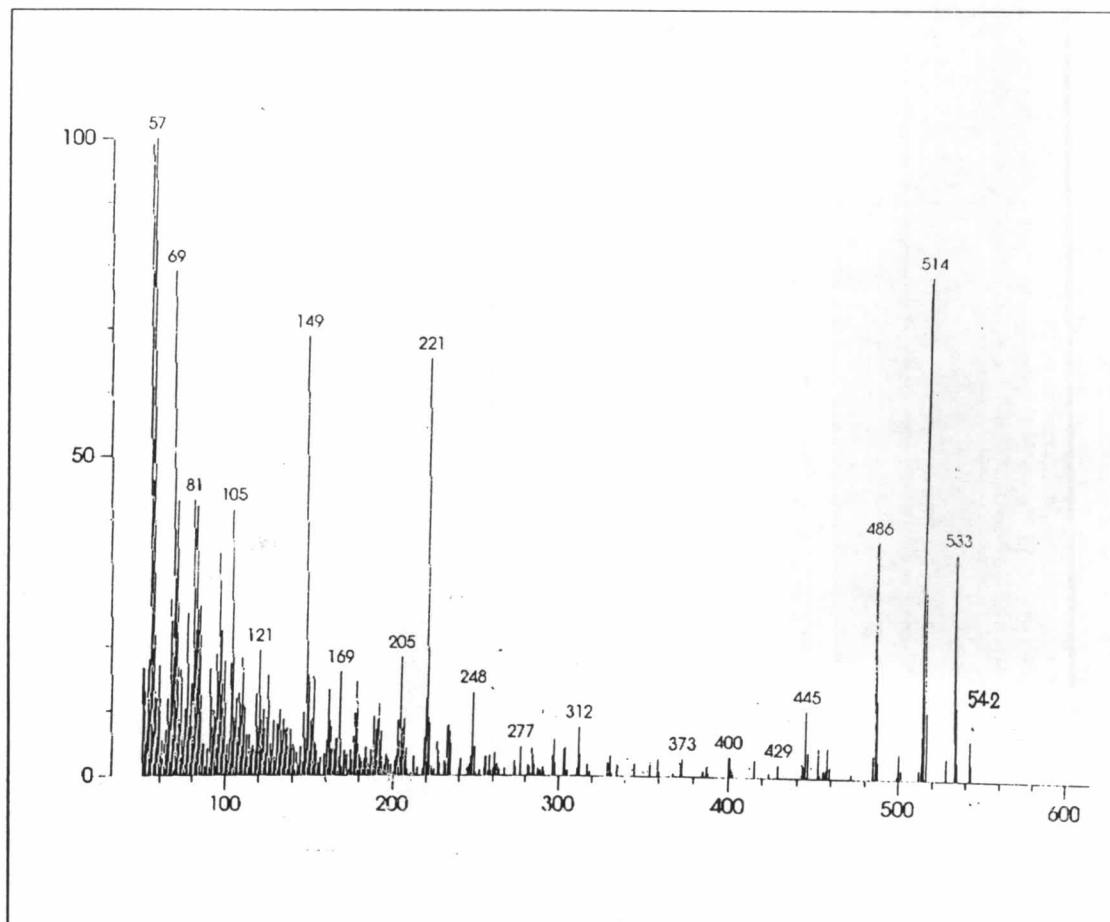
รูปที่ 3.31 แสดง DEPT 135 ของสาร X



รูปที่ 3.32 แสดง DEPT 90 ของสาร X



แมสสเปกตรัม รูปที่ 3.33 ปรากฏพีกของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 542 นอก
จากนี้ยังพบ พีกที่ 514, 486, 248, 221, 205, 169, 148, 121, 105, 81, 69 และ 57



รูปที่ 3.33 แสดงแมสสเปกตรัมของสาร ๓

จากข้อมูลของแมสสเปกตรัม ปรากฏว่าพบพีก m/z ที่ 221 แสดงว่าสูตรโมเลกุลที่
เสนอข้างต้นให้ข้อมูลที่สอดคล้องกัน โมเลกุลของ สาร ๓ คาดว่าจะไม่มีวงอะโรมาติกแต่จะเป็น
ของอัลคีน ซึ่งอยู่ในลักษณะคอนจูเกตกับหมู่คาร์บอนิลซึ่งมีอยู่ 4 หมู่ มีหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่โดย
หมู่หนึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจน และอีกตัวหนึ่งเกาะอยู่บนพันธะคู่ สำหรับพันธะคู่คาดว่าจะมีอยู่ 3
พันธะคู่ โดยคู่หนึ่งจะ coupling กันและมีหมู่เกาะที่คล้ายคลึงกัน คู่หนึ่งจะถูกแทนที่หมด ส่วน
อีกคู่หนึ่งจะถูกแทนที่ตำแหน่งเดียว อย่างไรก็ตาม สาร ๓ ยังไม่สามารถพิสูจน์โครงสร้างที่
แน่นอนได้

การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ฅ

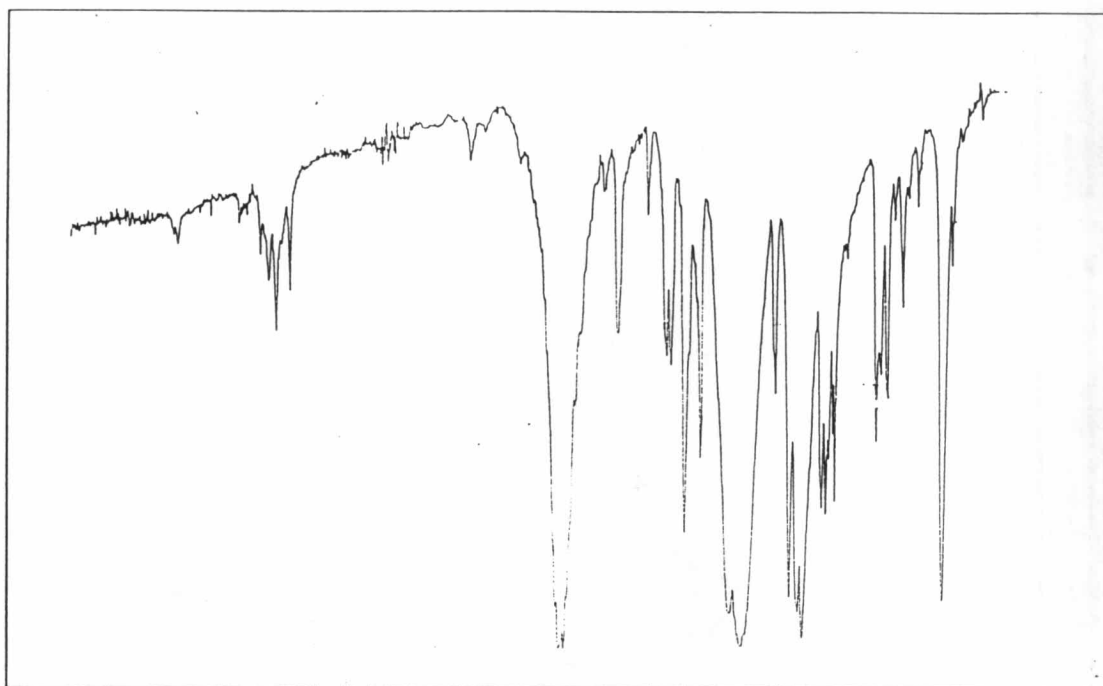
สาร ฅ เป็นผลึกสีขาวในน้ำมันสีดำเหลือง อยู่ในลำดับส่วนที่ 196-205 ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วนที่ 1:4 แยกผลึกออกจากน้ำมันสีดำเหลืองโดยใช้สมบัติการละลาย เนื่องจากน้ำมันสีดำเหลืองละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ ส่วนผลึกไม่ละลาย ละลายน้ำมันสีดำเหลือง แล้วกรองผลึกด้วยกระดาษกรอง ล้างผลึกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ นำผลึกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี โดยนำผลึกที่ได้ไปละลายด้วยไดคลอโรมีเทนร้อนจนมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร จึงไปผ่านเครื่องโครมาโทกราฟี สาร ฅ ถูกชะออกมาด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลแอลกอฮอล์ในอัตราส่วน 4:1 ปล่อยให้สารละลายที่ได้ทิ้งไว้ให้ตกผลึก กรอง จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว (สาร ฅ)หนัก 0.1125 กรัม มีจุดหลอมเหลว 293-294 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.38 (เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 3:2) สาร ฅ ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทนร้อน แต่ละลายได้เล็กน้อยในเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน เอทิลแอลกอฮอล์

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) รูปที่ 3.34 แสดงการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 1725 cm^{-1} เป็นลักษณะเฉพาะของหมู่คาร์บอนิล แถบการดูดกลืนที่ $1600, 1580, 1505$ และ 1460 cm^{-1} เป็นลักษณะเฉพาะของวงแหวนโรมาติก นอกจากนี้ยังพบแถบการดูดกลืนดังตารางที่ 3.13

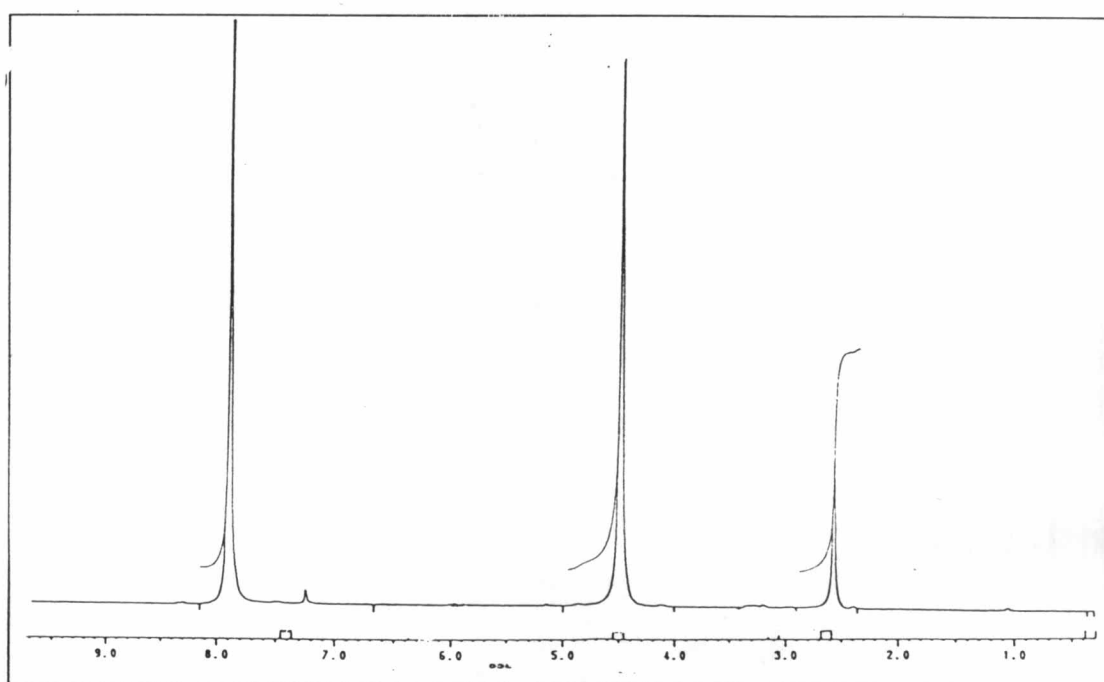
ตารางที่ 3.13 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญของสาร ฅ

แถบการดูดกลืน(cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3450	ปานกลาง	O-H สั่นแบบยืดของแอลกอฮอล์
2935, 2865	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2, CH_3
1665	สูง	C=C สั่นแบบยืดของแอลคีน
1615	สูง	C=O สั่นแบบยืดของคาร์บอนิล
1425, 1380	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ CH_2, CH_3
1115	ต่ำ	C-O สั่นแบบยืด

รูปที่ 3.34 แสดงแถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ณ

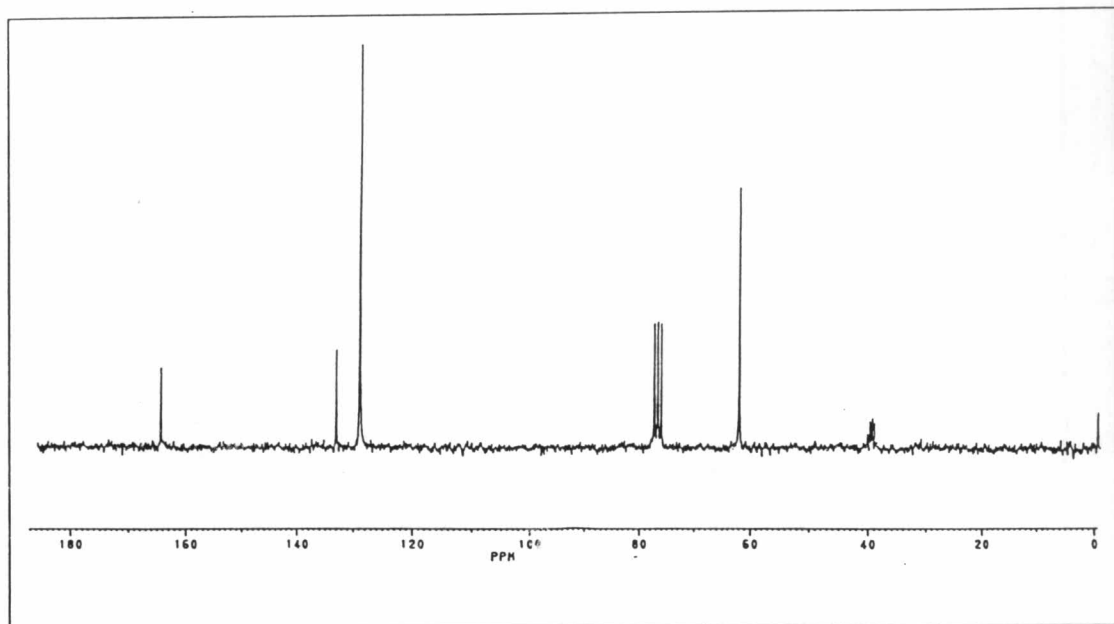


โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 3.35 ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ δ (ppm): 7.70, 4.49 และ 2.57



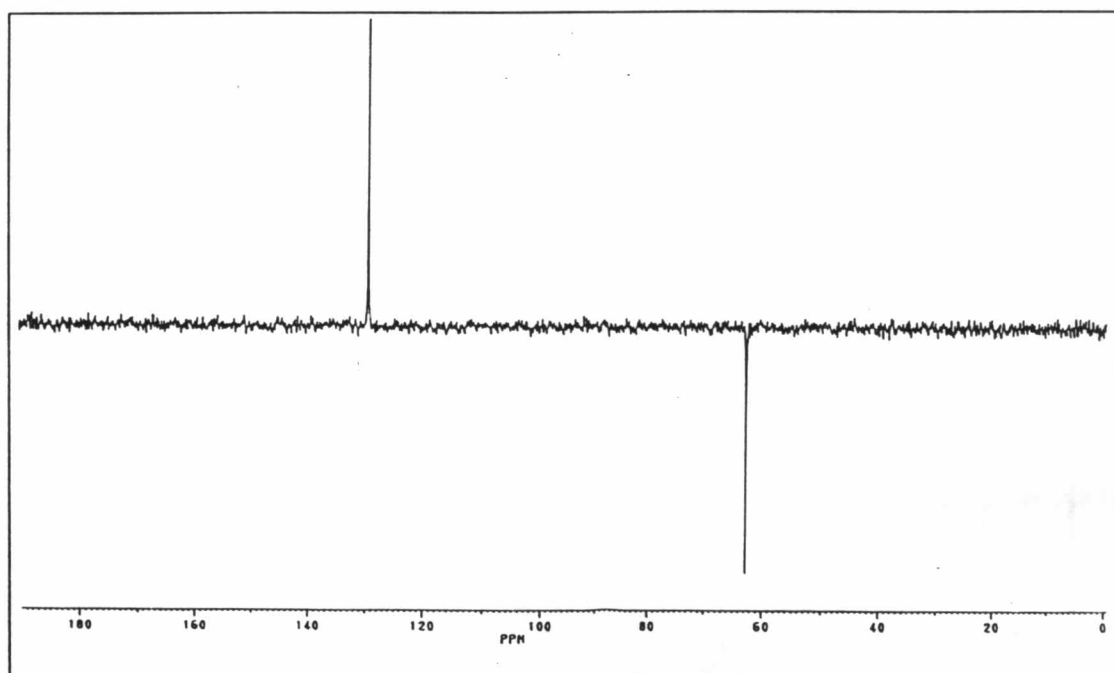
รูปที่ 3.35 แสดงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ณ

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 3.36 ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ δ (ppm): 165 ซึ่งเป็นของหมู่คาร์บอนิลที่เป็นเอสเทอร์ และที่ δ (ppm): 133, 129 เป็นของอะโรมาติก



รูปที่ 3.36 แสดงคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ฅ

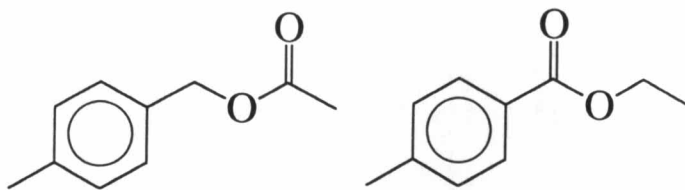
DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 3.37 ปรากฏสัญญาณคาร์บอนด้านบนที่ 129 ppm ซึ่งเป็นเมไทน์คาร์บอนของอะโรมาติก และปรากฏสัญญาณเมทิลีนคาร์บอนด้านล่างที่ 62 ppm ที่เป็นของหมู่เมทิลีนที่มีออกซิเจนเกาะอยู่ด้วย



รูปที่ 3.37 แสดง DEPT 135 ของสาร ฅ

จากข้อมูลข้างต้นเหล่านี้ คาดว่า สาร ฅ จะประกอบไปด้วยวงแหวนอะโรมาติกที่มี
ลักษณะการแทนที่ดังแสดงในรูปที่ 3.38

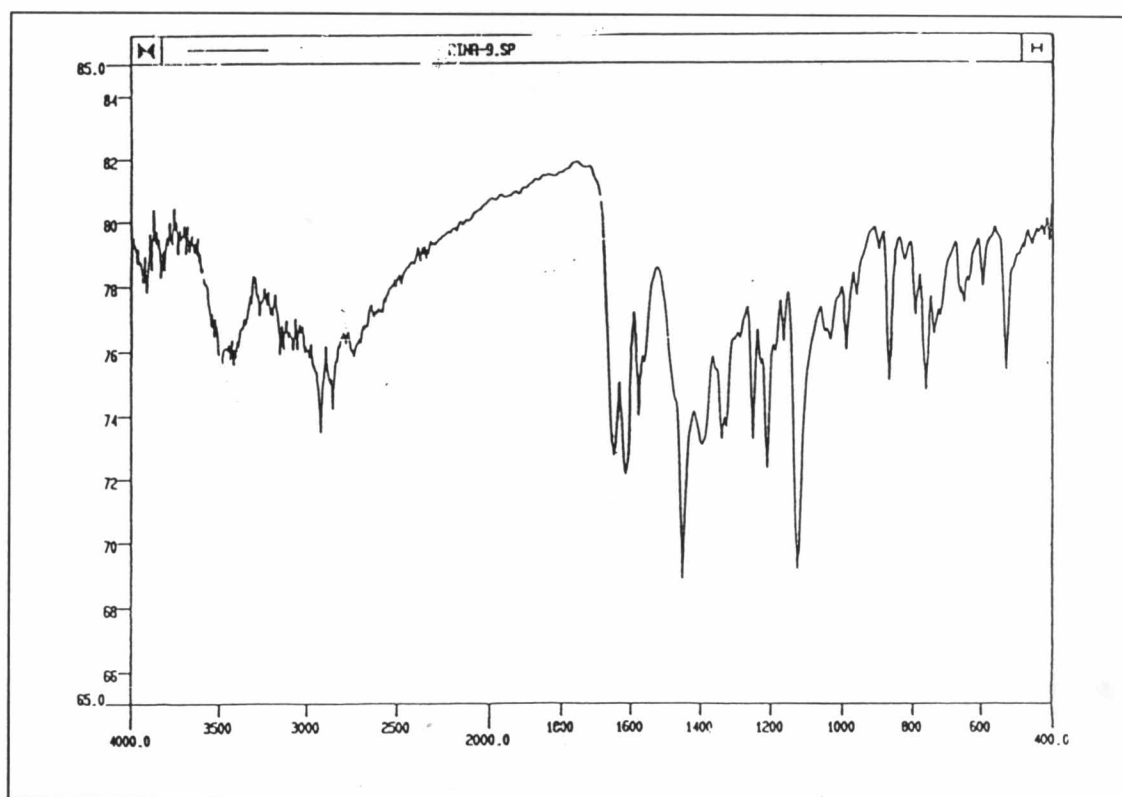
รูปที่ 3.38 แสดงลักษณะส่วนหนึ่งของสูตรโครงสร้างของสาร ฅ



การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ฏ

สาร ฏ มีลักษณะเป็นผลึกอสัณฐานสีเหลืองซึ่งอยู่ในน้ำมันสีดำเหลือง ซึ่งอยู่ในลำดับส่วนที่ 206-219 และ 220-250 ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับ ไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:9 และไดคลอโรมีเทน(DT₂13-DT₂14) จะได้สารที่มีผลึกเข็มสีเหลือง นำผลึกที่ได้ผ่านเครื่องโครมาโทรอนอีกครั้ง แล้วปล่อยให้ตกตะกอนอีกครั้งซึ่งจะได้ผลึกเข็มสีเหลือง (สาร ฏ) มีน้ำหนัก 0.0172 กรัม มีจุดหลอมเหลว 257-259 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.54 (ไดคลอโรมีเทน) สาร ฏ ละลายได้ดีในเมทานอลไดคลอโรมีเทนร้อน แต่ละลายได้เล็กน้อยในเมทานอลร้อน ไดคลอโรมีเทนร้อน ไม่ละลายในเฮกเซน เอทิลเอซิเตต แอซิโตน

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) รูปที่ 3.39 แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3500 และ 1665 ซม.⁻¹ แสดงลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซีและหมู่คาร์บอนิลที่เกิดคอนจูเกตกับพันธะคู่ ตามลำดับ ข้อมูลการดูดกลืนของสาร ฏ แสดงดังตารางที่ 3.14



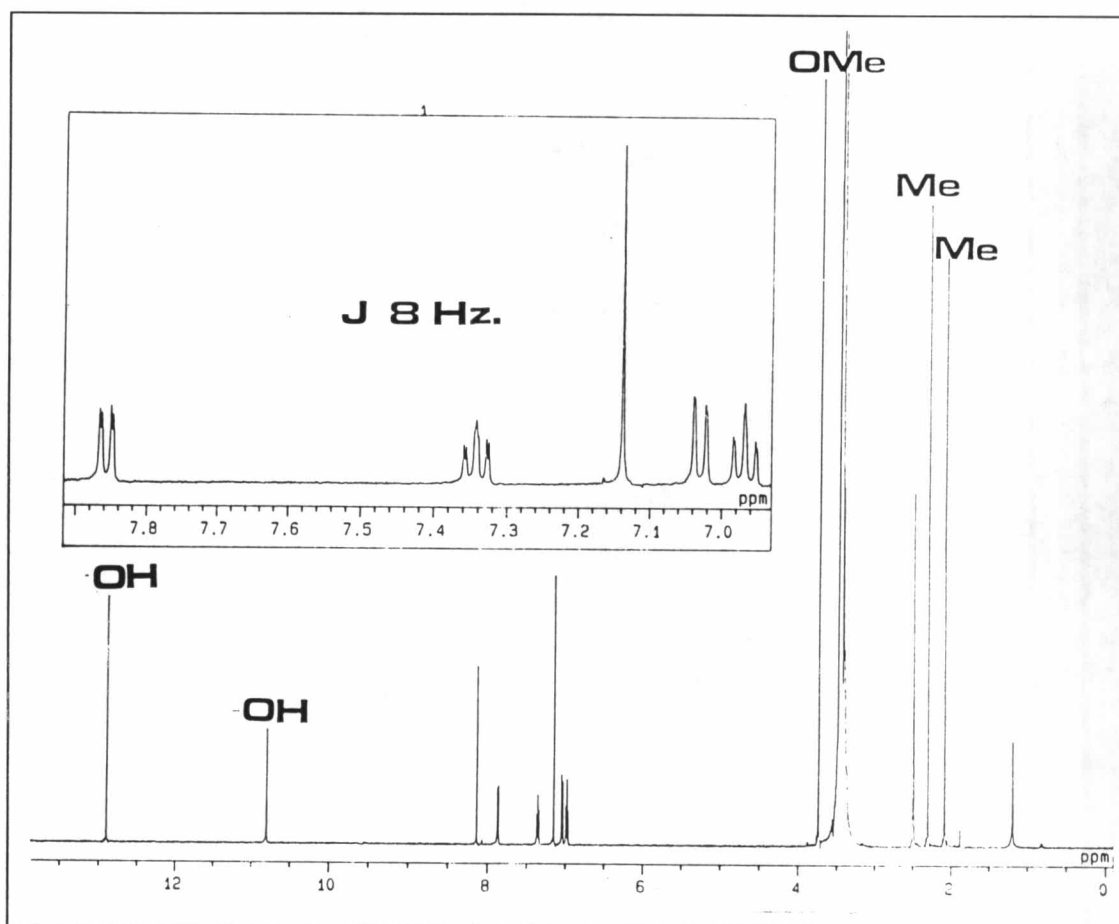
รูปที่ 3.39 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ฏ



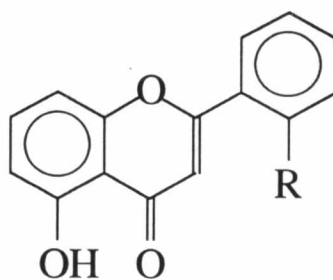
ตารางที่ 3.14 แสดงแถบการดูดกลืนที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร ฏ

แถบการดูดกลืน(cm^{-1})	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3450	ปานกลาง	O-H สั่นแบบยืดของแอลกอฮอล์
2935, 2865	สูง	C-H สั่นแบบยืดของ CH_2 , CH_3
1665	สูง	C=C สั่นแบบยืดของแอลคีน
1615	สูง	C=O สั่นแบบยืดของคาร์บอนิล
1425, 1380	ปานกลาง	C-H สั่นแบบงอของ CH_2 , CH_3
1115	ต่ำ	C-O สั่นแบบยืด

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$) รูปที่ 3.40 ปรากฏสัญญาณโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซีที่ δ (ppm) : 12.97 และ 10.90 ซึ่งเป็นหมู่ไฮดรอกซีที่แทนที่อยู่บนวงอะโรมาติกหรือที่พันธะคู่ โดยเฉพาะที่ δ ที่ 12.94 ppm เป็นลักษณะของการเกิดพันธะไฮโดรเจนของหมู่คาร์บอนิลที่ตำแหน่ง C_4 กับหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C_5 ของสารประกอบประเภทเฟลวานอยด์ นอกจากนี้ในช่วง δ ที่ 8.00-6.90 ppm แสดงลักษณะของโปรตอนที่อยู่บนวงอะโรมาติกและจากลักษณะของโปรตอนที่ขึ้นในช่วงนี้บ่งบอกว่า สาร ฏ จะต้องประกอบด้วยวงอะโรมาติกจำนวน 2 วง นั่นคือ ที่ค่า δ (ppm): 7.9(d,1H,J=8Hz), 7.4(t,1H,J=8Hz) และ 7.05(m,2H,J=8Hz) เป็นโปรตอนที่เกิดการcouplingกัน แสดงว่าจะต้องมีโปรตอนที่อยู่บนวงอะโรมาติกติดกันทั้ง 4 ตัว จากลักษณะโครงสร้างของเฟลวานอยด์จะเห็นว่าวงอะโรมาติกที่สามารถมีโปรตอนติดกันทั้ง 4 ตัวได้คือวง B (เนื่องจากวง A ที่ตำแหน่ง C_5 มีหมู่ไฮดรอกซีแทนที่อยู่แล้ว ซึ่งจะมีโปรตอนเหลืออยู่เพียง 3 ตัวเท่านั้น) นั่นคือจะต้องมีหมู่แทนที่อยู่ตำแหน่งออร์โธ ในขณะที่สัญญาณที่ δ (ppm) : 7.12(s,1H) อาจจะเป็นโปรตอนอีกตัวหนึ่งที่อยู่บนวงอะโรมาติกอีกวงหรืออยู่ที่ตำแหน่ง C_3 จากข้อมูลทางเคมีและโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม คาดว่าสาร ฏ จะเป็นสารประเภทเฟลวานอยด์ ที่มีลักษณะโครงสร้างหลักดังรูปข้างล่างนี้



รูปที่ 3.40 แสดงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ๓



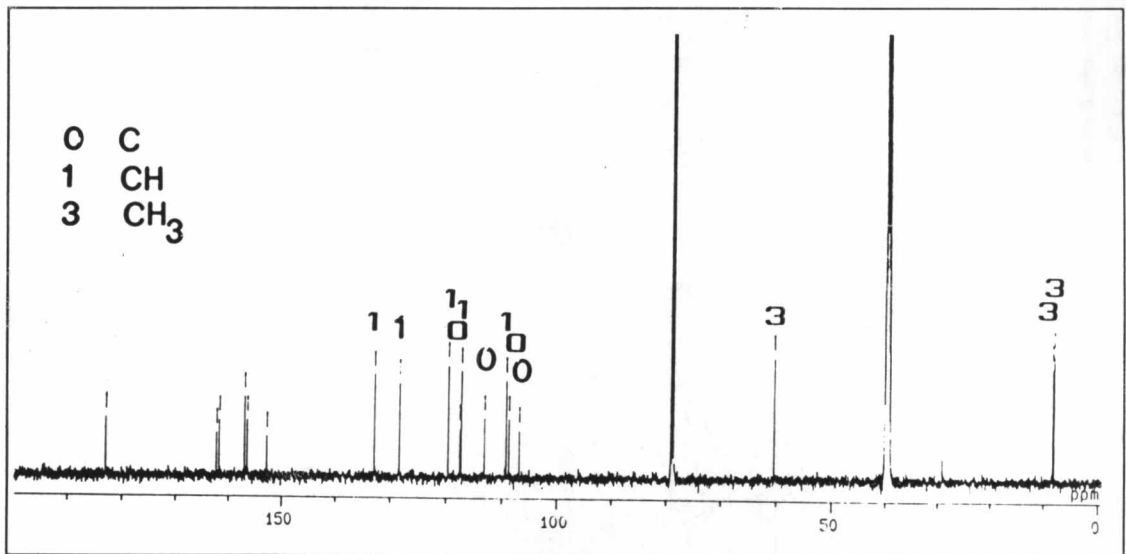
R = -Ome หรือ -OH

รูปแสดงลักษณะโครงสร้างหลักของสาร ๓

และที่ δ (ppm): 3.73 เป็นลักษณะเฉพาะของหมู่เมทอกซีและที่ δ (ppm): 2.08 (s,3H,Me) 2.30(s,3H,Me) เป็นลักษณะของหมู่เมทิลที่เกาะอยู่บนวงอะโรมาติกหรือพันธะคู่ ซึ่งจากค่า δ ที่ขึ้นนี้ คาดว่าหมู่เมทิลขึ้นในที่มีสิ่งแวดล้อมที่เหมือนกัน และจากข้อมูลนี้บอกจำนวนโปรตอนว่ามีทั้งหมดเท่ากับ 12 โปรตอน

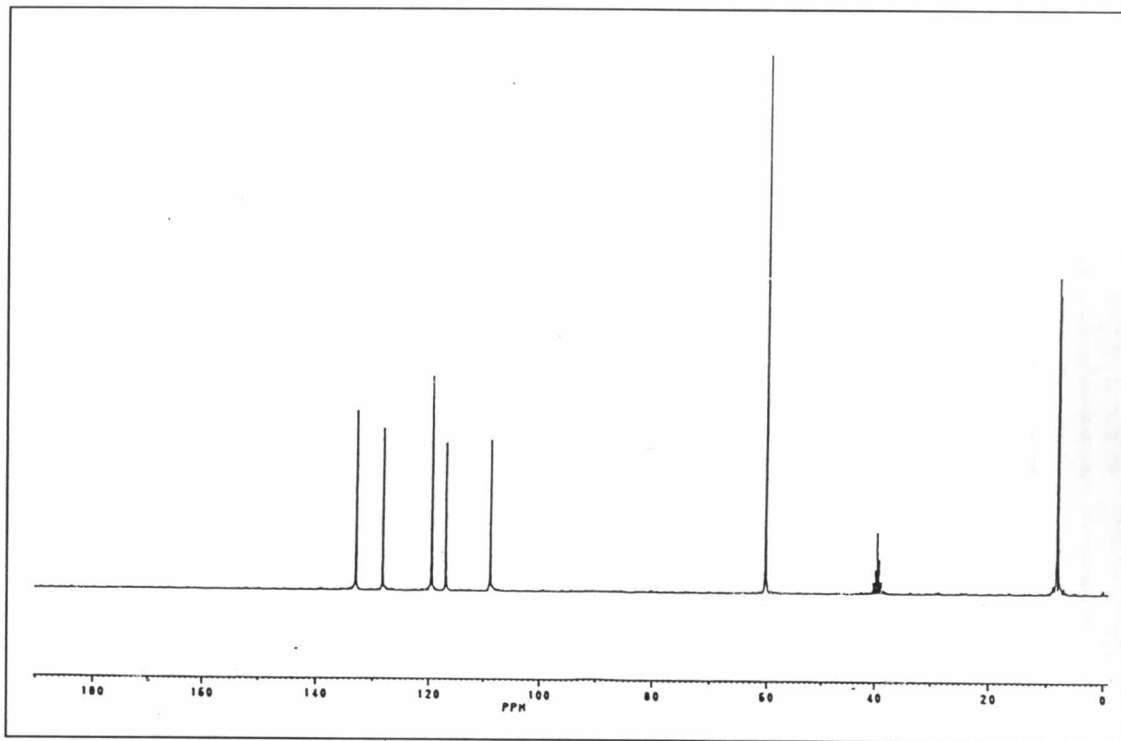
คาร์บอน-13-เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 3.41) ปรากฏสัญญาณของหมู่คาร์บอนิลที่เคมีคัลชิฟท์ที่ 182.98 ppm ซึ่งให้ข้อมูลที่สอดคล้องกันกับข้อมูลเบื้องต้น ดังนั้นหมู่คาร์บอนิลจะต้องอยู่ที่ตำแหน่ง C_4 และสามารถนับจำนวนคาร์บอนได้ทั้งหมด 18 คาร์บอน

รูปที่ 3.41 แสดงคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ฤ



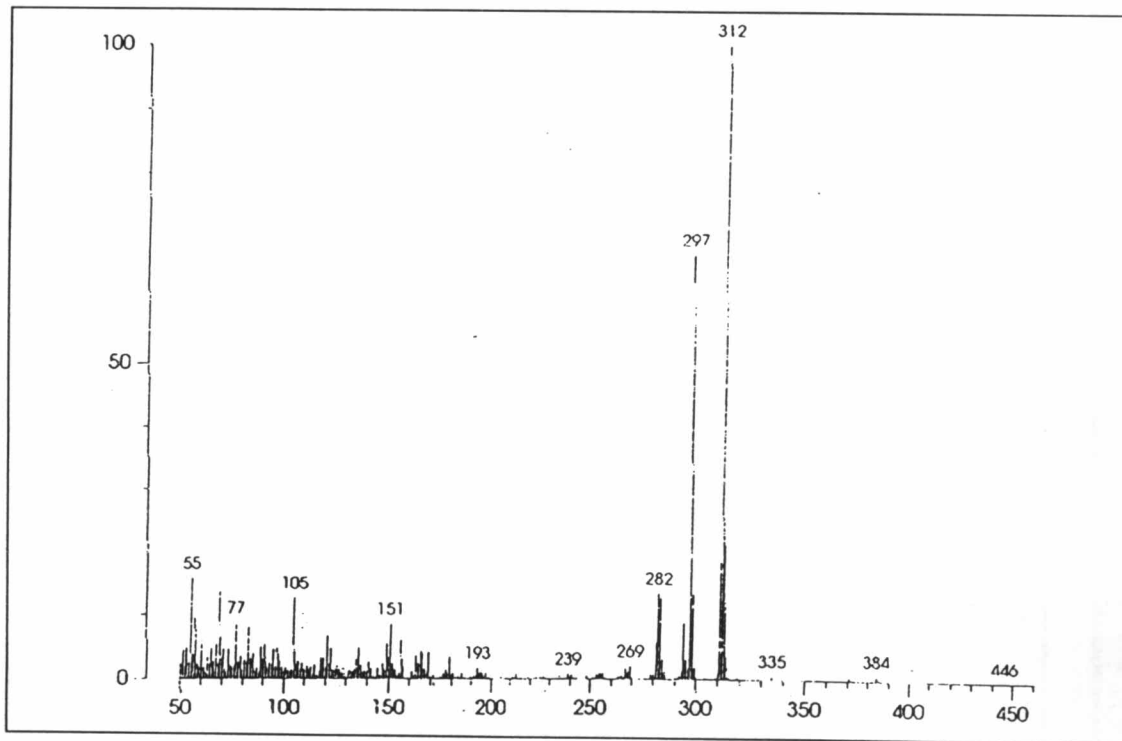
DEPT 135 ดังรูปที่ 3.42 แสดงสัญญาณของหมู่เมทไธน์และเมทิล ทำให้ทราบว่า มี หมู่เมทิล 3 หมู่ เมทไธน์คาร์บอน 5 หมู่

รูปที่ 3.42 แสดง DEPT 135 ของ สาร ญ

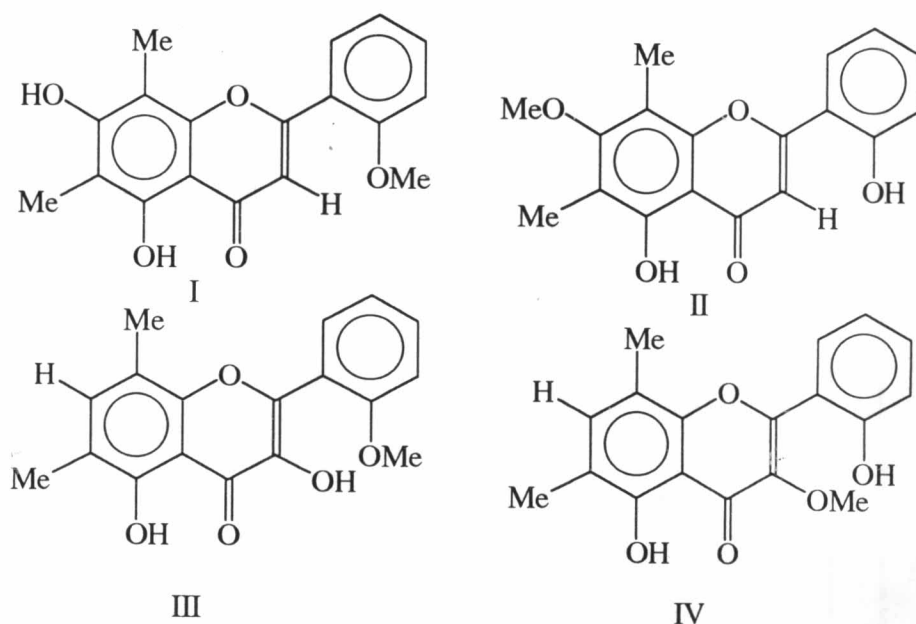


แมสสเปกตรัม รูปที่ 3.43 ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 312 ปรากฏเบสพีคที่ 297 และยังพบการแตกตัวที่ 294, 282, 267, 179, 165, 151, 121 และ 89

รูปที่ 3.43 แสดงแมสสเปกตรัมของ สาร ญ



จากข้อมูลสเปกโทรสโกปีทั้งอินฟราเรดสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT 135 และแมสสเปกตรัม ทำให้ทราบสูตรโมเลกุลของสาร ฤ เป็น $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_4$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 312 มีค่า DBE เท่ากับ 11 เมื่อนำหมู่ต่างๆ คือ หมู่ไฮดรอกซี 1 หมู่ หมู่เมทิล 2 หมู่ และหมู่เมทอกซี 1 หมู่ แทนที่ลงในโมเลกุลดังรูปที่กล่าวมาแล้ว จากการค้นคว้าเอกสารอ้างอิง(66-69) ได้มีรายงานว่าสารประกอบประเภทเฟลวานอยด์โปรตอนตำแหน่ง C_6 และ C_8 จะมีค่า δ ขึ้นประมาณที่ 92 และ 97 ppm ตามลำดับ ซึ่งจากค่า δ ของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมไม่ปรากฏพีคของหมู่เมทิลที่ตำแหน่งดังกล่าว ซึ่งจากการค้นคว้าเอกสารอ้างอิงพบว่าส่วนใหญ่แล้วหมู่เมทิลจะขึ้นที่ตำแหน่ง C_6 และ C_8 และเมื่อพิจารณาลักษณะของตำแหน่ง C_6 และ C_8 พบว่าหมู่ที่อยู่ข้างเคียงมีลักษณะที่คล้ายกัน จึงเป็นไปได้ว่าหมู่เมทิลทั้งสองหมู่เกาะอยู่ที่ตำแหน่ง C_6 และ C_8 จากข้อมูลทั้งหมดพบว่ายังเหลือตำแหน่งที่ถูกแทนที่ได้อีก 3 ตำแหน่งคือ C_3 , C_7 และ C_2 แต่ยังมีหมู่แทนที่อีกเพียง 2 หมู่คือหมู่ไฮดรอกซีและหมู่เมทอกซี ดังนั้นในตำแหน่งที่ C_3 และ C_7 จะต้องมีตำแหน่งหนึ่งที่ไม่มีหมู่แทนที่ไปเกาะ แต่สำหรับที่ตำแหน่ง C_2 จะต้องมีหมู่แทนที่แน่นอนเนื่องจากถูกบังคับจากลักษณะของโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมดังที่กล่าวแล้วข้างต้น เมื่อนำหมู่ฟังก์ชันนัลที่เหลือแทนลงในตำแหน่งที่ว่างจะได้สูตรโครงสร้างที่เป็นไปได้ 4 สูตรดังแสดงในรูป ข้างล่างนี้

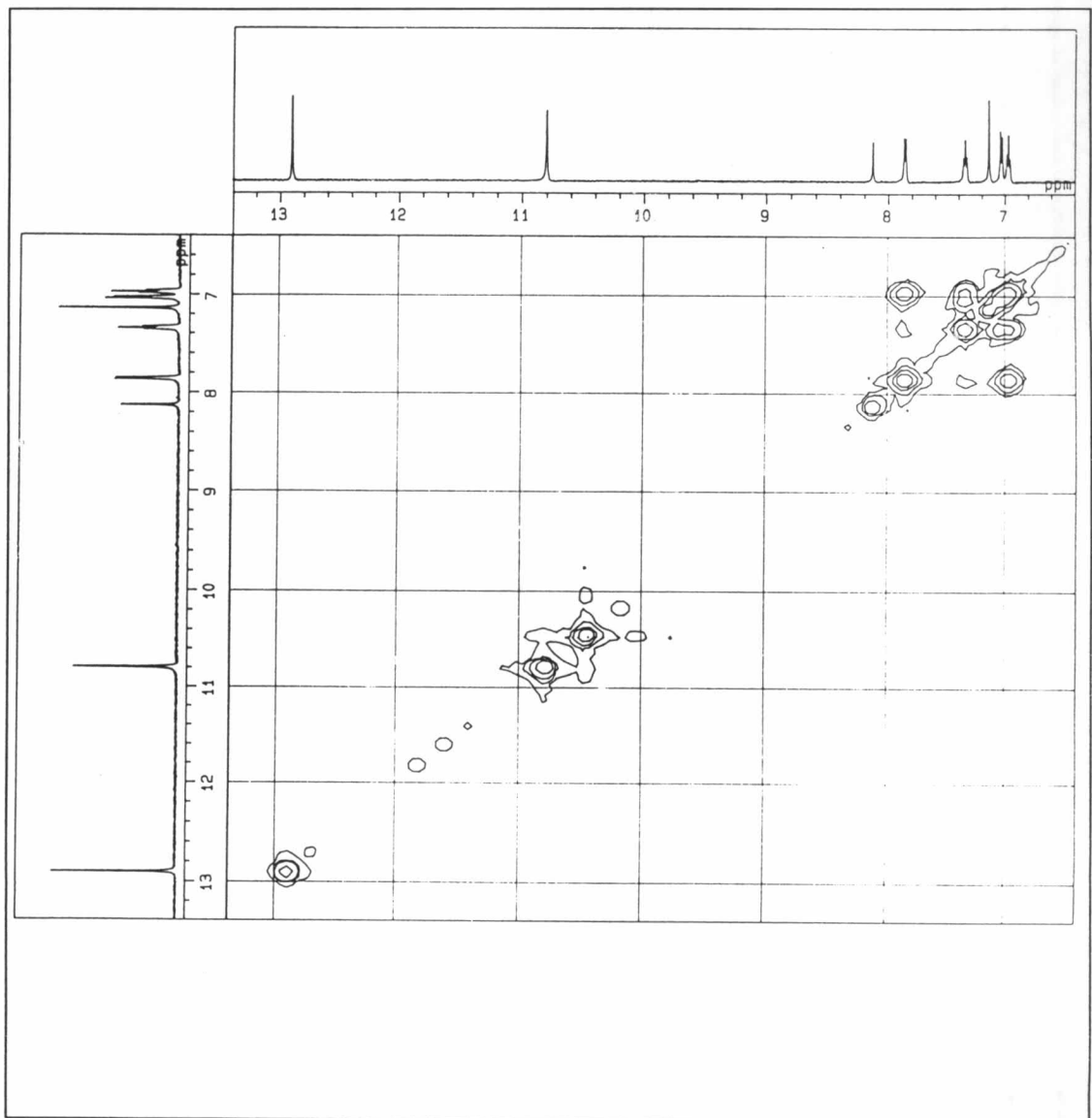


รูปแสดงสูตรโครงสร้างที่เป็นไปได้ของสาร ฤ

จากสูตรโครงสร้างที่เสนอทั้ง 4 สูตรจะต้องทำการยืนยันสูตรโครงสร้างที่ถูกต้องโดยใช้เทคนิคต่างๆดังนี้

H-H COSY (รูปที่ 3.44) สามารถกำหนดตำแหน่งค่าเคมีคัลชิฟท์ของโปรตอนตำแหน่งต่างๆได้ดังแสดงในตารางที่ 3.15

รูปที่ 3.44 แสดง H-H COSY ของสาร ญ

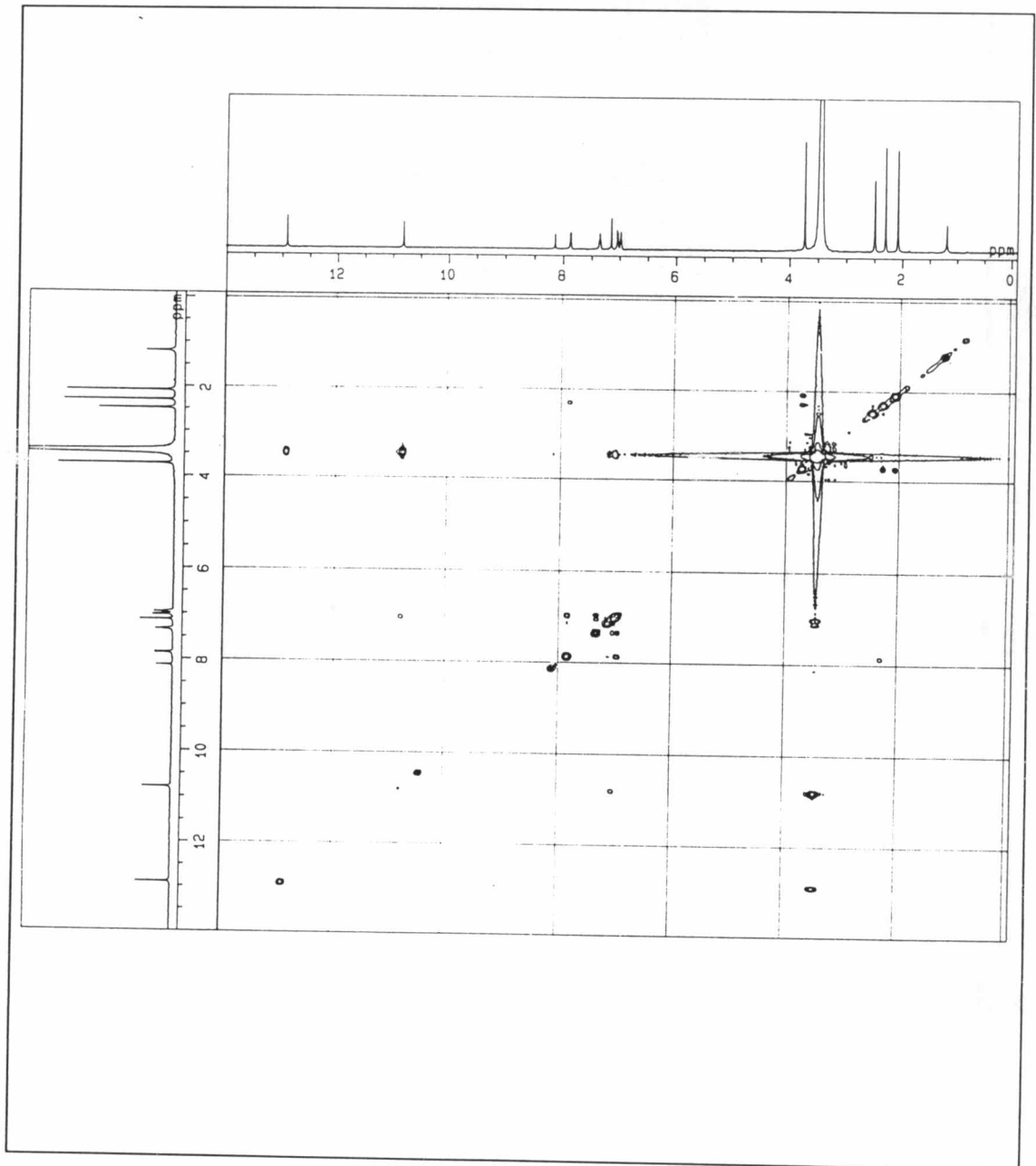


ตาราง 3.15 แสดงค่าเคมีคัลซิฟท์ของโปรตอนบนคาร์บอนตำแหน่งต่างๆ

ตำแหน่งคาร์บอน	ค่าเคมีคัลซิฟท์(ppm)ของโปรตอน
3/7	7.13
3	7.03
4	7.86
5	6.96
6	7.35
-OH	10.79,12.90
-OMe	3.73
Me	2.08,2.30

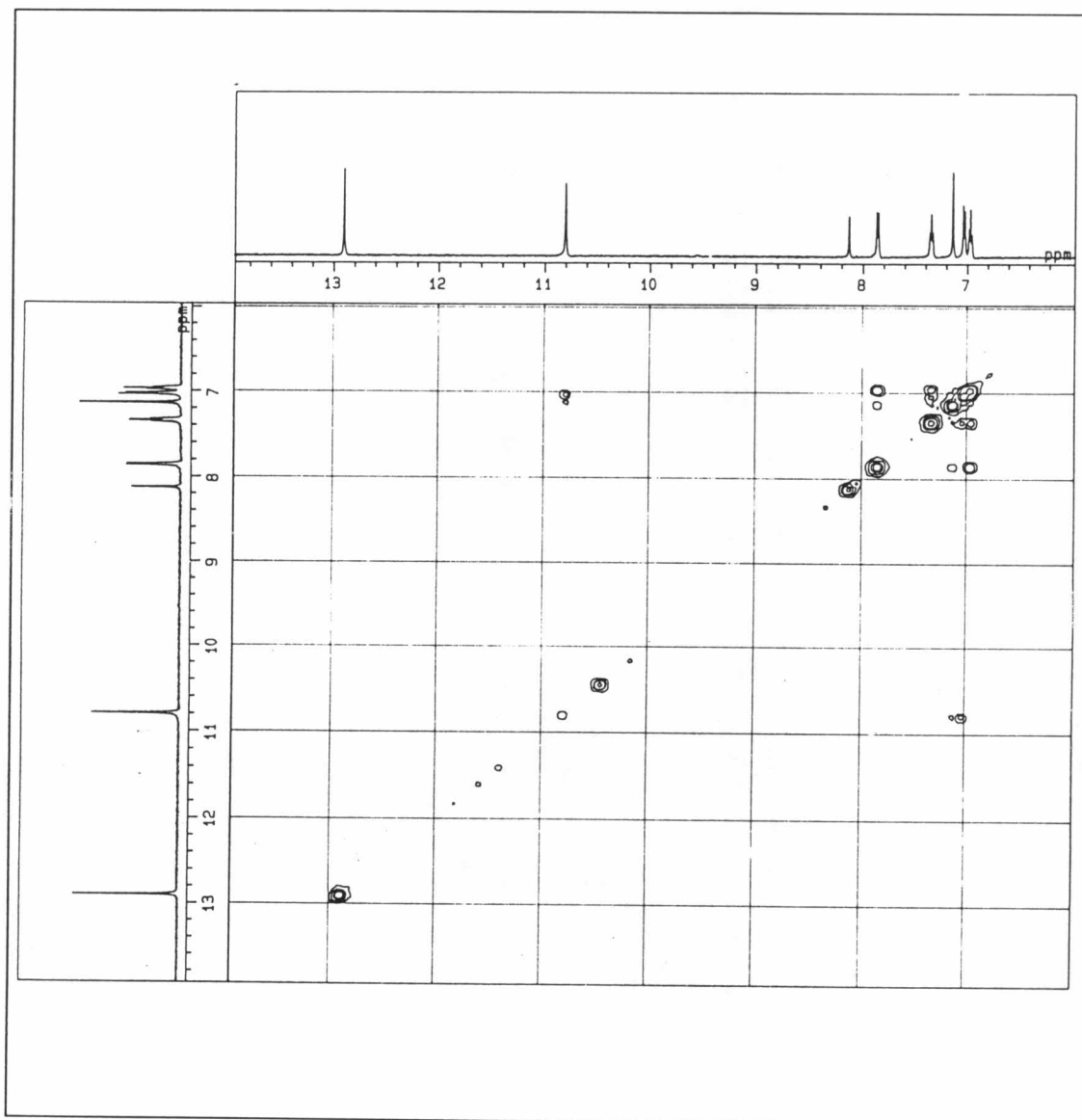
H-H NOESY (รูปที่ 3.45) จากสเปกตรัมจะเห็นโปรตอนที่เคมีคัลซิฟท์ที่ 3.73 ppm ซึ่งเป็นโปรตอนของหมู่เมทอกซีที่สามารถเกิดการ coupling กับโปรตอนของหมู่เมทิลที่เคมีคัลซิฟท์ที่ 2.03 และ 2.30 ppm นั้นแสดงให้เห็นว่าหมู่เมทอกซีจะต้องอยู่ระหว่างหมู่เมทิลทั้งสอง ในขณะที่โปรตอนที่ตำแหน่ง C₆ สามารถเกิดการ coupling กับหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง C₈ (2.30 ppm) นอกจากนี้โปรตอนของหมู่ไฮดรอกซีที่เคมีคัลซิฟท์ที่ 10.79 ppm สามารถเกิดการ coupling กับโปรตอนที่แทนที่อยู่บนวงแหวนอะโรมาติกในตำแหน่ง C₃. จากลักษณะดังกล่าวทำให้ทราบว่าหมู่ที่แทนที่อยู่บนวงแหวนอะโรมาติกวง B ในตำแหน่งออร์โธคือหมู่ไฮดรอกซี

รูปที่ 3.45 แสดง H-H NOESY ของ สาร ญ



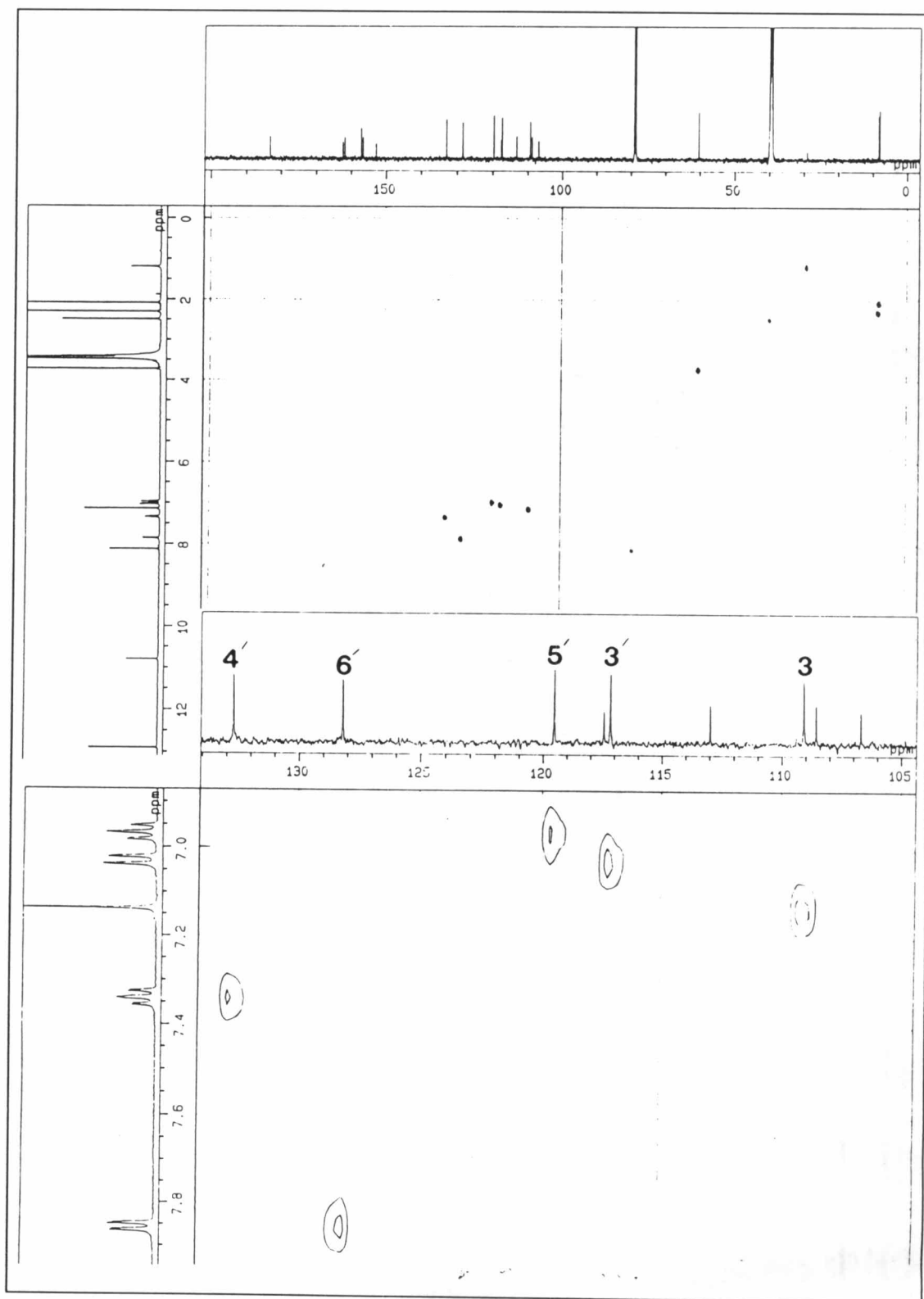
H-H NOESY(รูปขยาย) (รูปที่ 3.46) จากสเปกตรัมเมื่อพิจารณาโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C₂ จะเห็นว่าเกิดการ coupling กับโปรตอนที่อยู่ในตำแหน่ง C₃ และ C₃

รูปที่ 3.46 แสดง H-H NOESY รูปขยายของสาร ญ



C-H COSY (รูปที่ 3.47) จากสเปกตรัมทำให้ทราบถึงค่าเคมีคัลชิฟท์ของเมไธน์คาร์บอน
ดังแสดงในตารางที่ 3.16

รูปที่ 3.47 แสดง C-H COSY ของสาร ญ



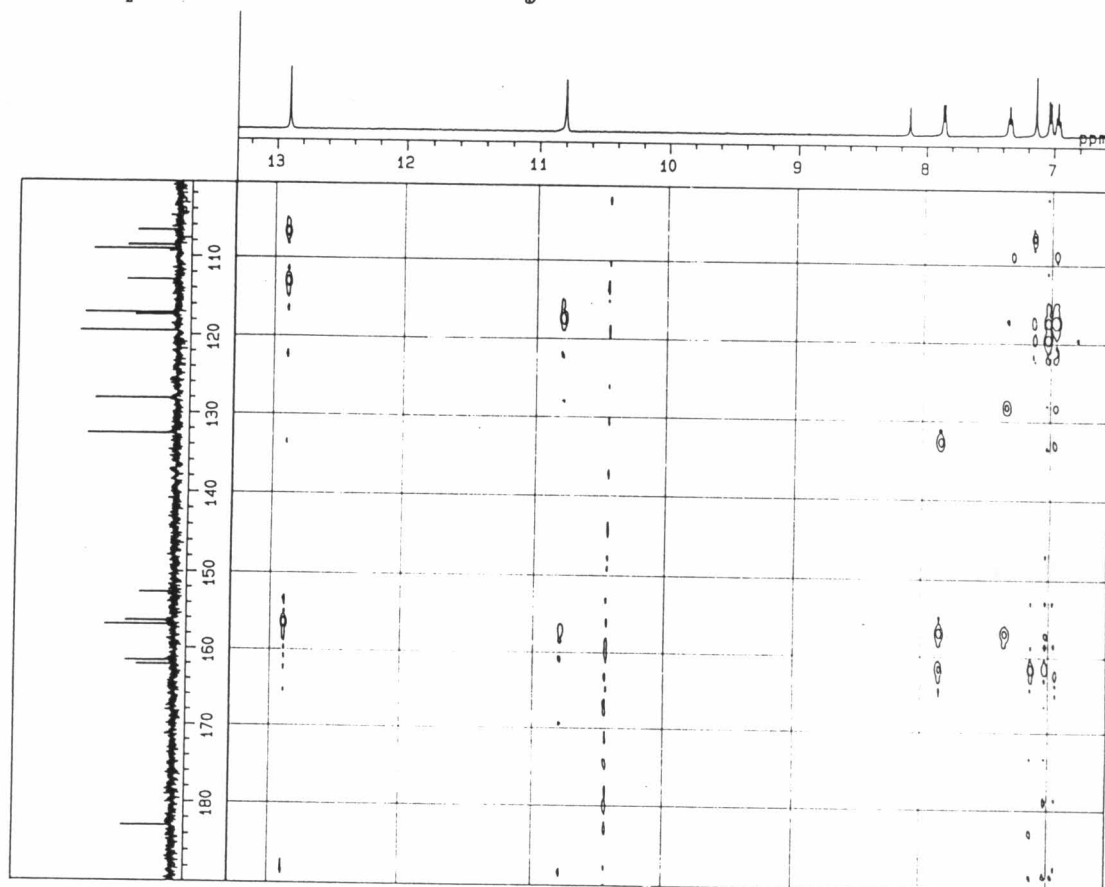
ตารางที่ 3.16 แสดงความสัมพันธ์ของค่าเคมีคัลชิฟท์ของเมโทน์คาร์บอนระหว่างโปรตอนและคาร์บอน

ตำแหน่งคาร์บอน	ค่าเคมีคัลชิฟท์(ppm)	
	โปรตอน	คาร์บอน
3	7.13	108.92
3'	7.03	117.26
4'	7.35	133.02
5'	6.96	119.67
6'	7.85	128.38
-Me(C ₆)	2.08	8.07
-Me(C ₈)	2.30	8.33
-OMe(C ₇)	3.73	60.34

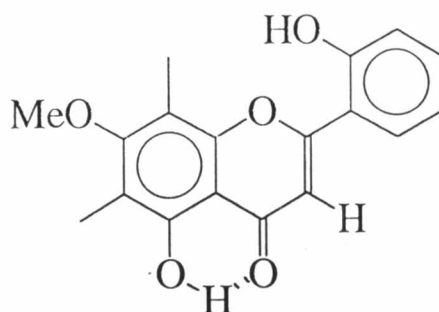


HMBC (รูปที่ 3.48) จากสเปกตรัมจะเห็นได้ว่าโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C₅ สามารถ coupling กับคาร์บอนที่ตำแหน่ง C_{4a}, C₅ และ C₆ โปรตอนของหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง C₂ สามารถเกิดการ coupling กับคาร์บอนที่ตำแหน่ง C₁, C₂, และ C₃. ในขณะที่โปรตอนตำแหน่ง C₆ สามารถเกิดการ coupling กับคาร์บอนที่ตำแหน่ง C₂, C₂, และ C₆.

รูปที่ 3.48 แสดง HMBC ของสาร ญ



จากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นทำให้สรุปได้ว่าสูตรโครงสร้างที่ถูกต้องคือสูตรโครงสร้างที่
2 ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างดังนี้

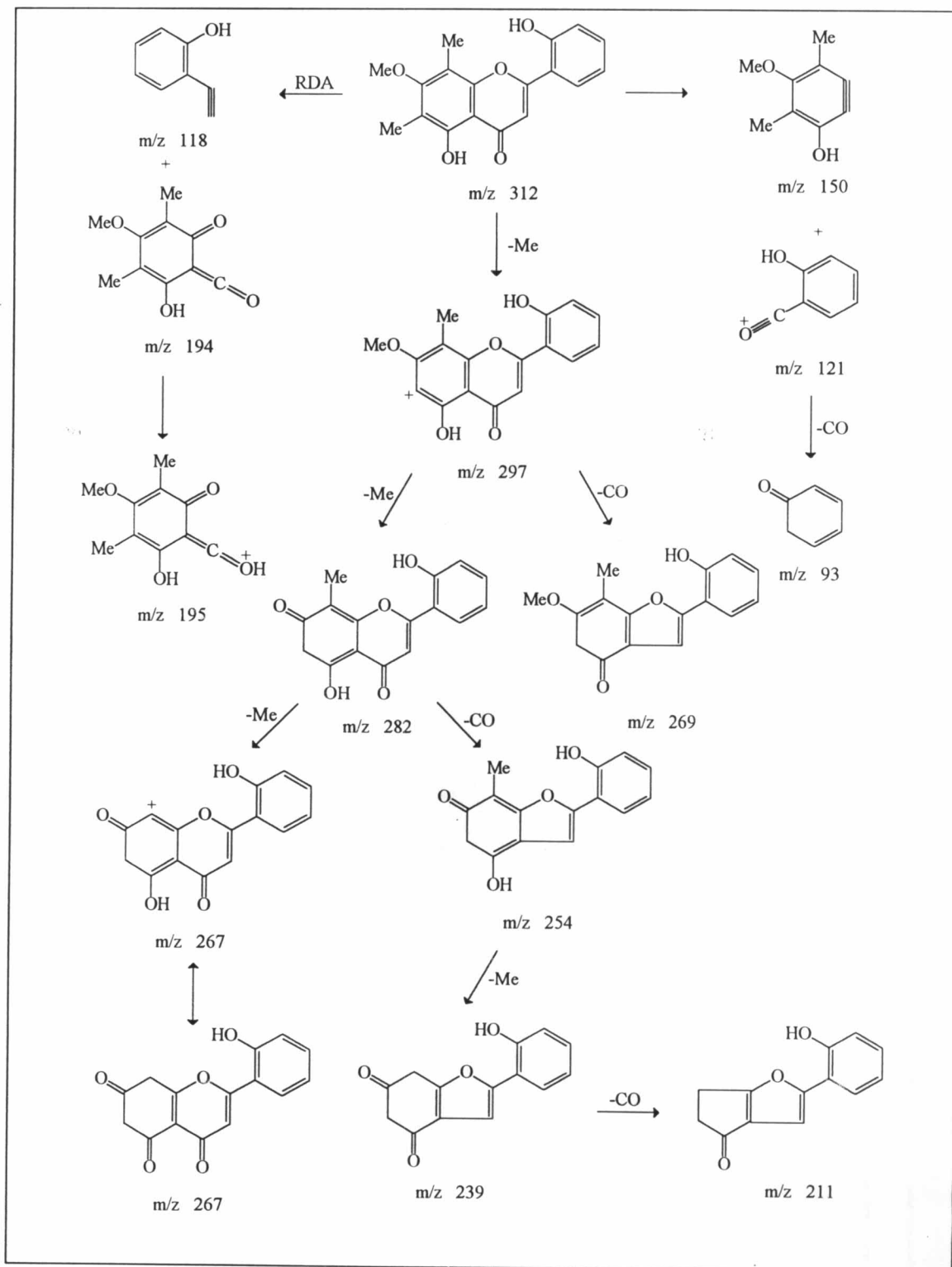


เมื่อนำสูตรโครงสร้างของสาร ญ ไปทำ Library Structure Search และค้นคว้าจาก
Chemical Abstract ตั้งแต่ปี ค.ศ.1938-1995 พบว่าสาร ญ ยังไม่มีการค้นพบมาก่อน ดังนั้นเพื่อ
ยืนยันสูตรโครงสร้างที่ได้ จึงนำไปเปรียบเทียบกับสูตรโครงสร้างที่ใกล้เคียง(68-69)ซึ่งจะทำการ
เปรียบเทียบเป็นส่วนๆนั่นคือ นำวงแอมโรมาติกวง A มาเปรียบเทียบกับ 5-hydroxy-7-methoxy-
6,8-dimethylflavone(I)(70) ในขณะที่เดียวกันนำวงแอมโรมาติกวง B มาเปรียบเทียบกับ
2 -hydroxy-7-methoxyisoflavone(II)(65)

ตารางที่ 3.17 แสดงการเปรียบเทียบสาร ญ กับโครงสร้างที่รายงานมาแล้ว

ตำแหน่ง	เคมีคัลชิฟท์(ppm)		
	สาร ญ	Flavone(I)	isoflavone(II)
2	161.66	162.7	155.44
3	108.92	105.5	122.09
4	182.84	183.2	178.62
5	156.19	157.2	127.84
6	113.02	114.2	115.79
7	162.20	163.7	164.94
8	109.74	108.9	99.87
4a	106.55	107.5	157.97
8a	152.57	153.0	117.15
1'	117.26	131.6	121.11
2'	156.89	126.2	157.66
3'	117.26	129.1	111.37
4'	133.02	131.7	131.84
5'	119.67	129.1	120.60
6'	128.38	126.2	129.78
-OMe(C ₇)	60.34	60.6	-
-Me(C ₆)	8.07	8.4	-
-Me(C ₈)	8.33	8.7	-

จากแมสสเปกตรัมสามารถเขียนรูปแบบการแตกตัวของ สาร ๓ ได้ดังรูปที่ 3.49



รูปที่ 3.49 รูปแบบการแตกตัวของสาร ๓

เนื่องจากสาร ญ ยังไม่มีการรายงานมาก่อน ดังนั้นจึงทำการกำหนดตำแหน่งค่าเคมีคัลลิตี้ของคาร์บอนและโปรตอน ดังแสดงในตารางที่ 3.18

ตารางที่ 3.18 แสดงการกำหนดตำแหน่งค่าเคมีคัลลิตี้ของคาร์บอนและโปรตอน

ตำแหน่ง	ค่าเคมีคัลลิตี้(ppm)	
	คาร์บอน	โปรตอน
2	161.66	-
3	108.92	7.13
4	182.84	-
5	156.19	-
6	113.02	-
7	162.20	-
8	108.74	-
4a	106.55	-
8a	152.57	-
1'	117.26	-
2'	156.89	-
3'	117.26	7.03
4'	133.02	7.35
5'	119.67	6.96
6'	128.38	7.85
-OMe(C ₇)	60.34	3.73
-Me(C ₆)	8.07	2.08
-Me(C ₈)	8.33	2.30

สาร ญ เป็นสารที่ไม่มีใครรายงานว่ามีการค้นพบมาก่อน มีชื่อทางเคมีว่า 6,8-Dimethyl-2',5-Dihydroxy-7-methoxyflavone หรือเรียกอีกชื่อว่า 2(2-hydroxyphenyl)-5-hydroxy-6,8-dimethyl-7-methoxy-5H-1-benzopyran-4-one

การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ฏ

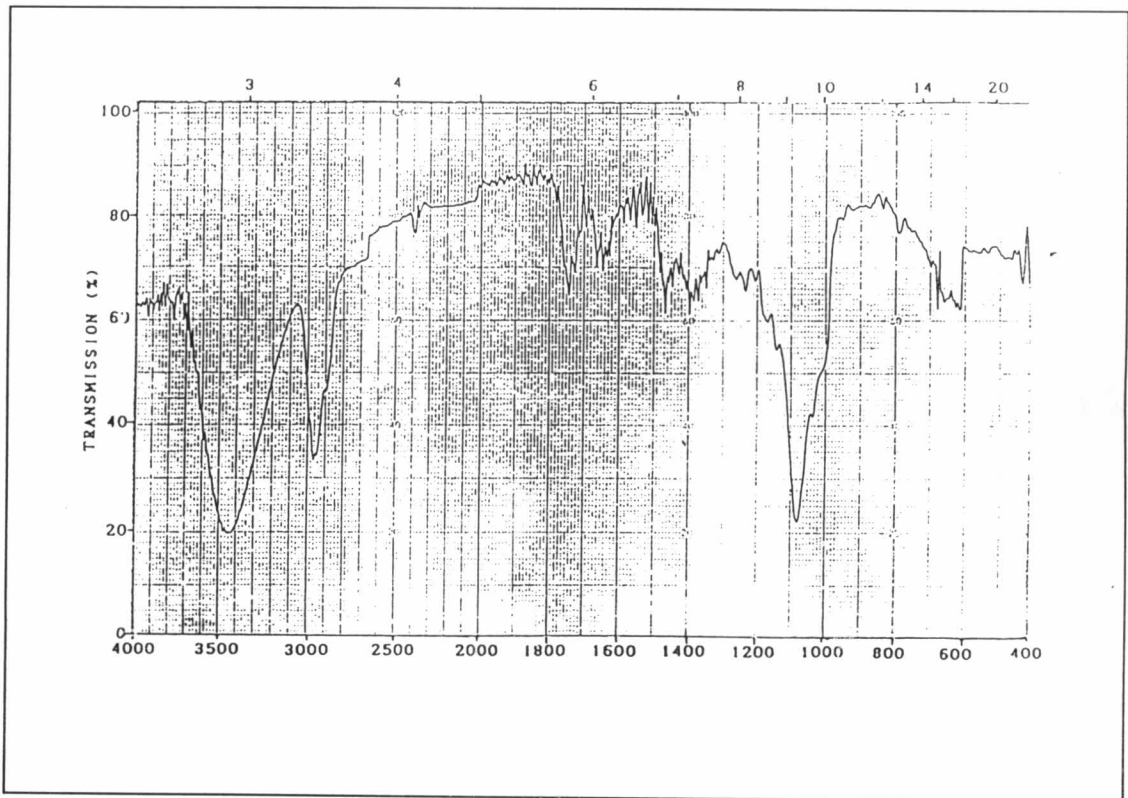
สาร ฏ เป็นตะกอนสีขาวในน้ำมันสีดำ อยู่ในลำดับส่วนที่ 278-282 (DT₂15) และ 16-27 (MT₂5) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วนที่ 7:3 และ 9:1) จากสิ่งสกัดที่ได้จากไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ตามลำดับ ตกผลึกโดยใช้เอทานอลร้อน จะได้ตะกอนสีขาวหนัก 0.0885 กรัม เมื่อนำมาหาจุดหลอมเหลวพบว่าจะละลายตัวที่ 273 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.45 (ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล อัตราส่วน 4:1) สาร ฏ ละลายได้ดีในเอทานอลร้อน แต่ละลายได้เล็กน้อยในเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน เอทิลแอกซิเตต ไดคลอโรมีเทน จากลักษณะดังกล่าวข้างต้นพอจะบอกได้ว่า สาร ฏ ที่ได้เป็นสารประกอบประเภทไกลโคไซด์

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) รูปที่ 3.45 แสดงการดูดกลืนแสงที่สำคัญดังแสดงในตารางที่ 3.16

ตารางที่ 3.16 แสดงการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ฏ

แถบการดูดกลืน(ซม. ⁻¹)	ความเข้ม	แสดงลักษณะ
3450	สูง	O-H สันแบบยืดของแอลกอฮอล์
2965	สูง	C-H สันแบบยืดของ CH ₂ , CH ₃
1645	ต่ำ	C=C สันแบบยืดของแอลคีน
1425,1380	ต่ำ	C-H สันแบบงอของ CH ₂ , CH ₃
1085	สูง	C-O สันแบบยืด

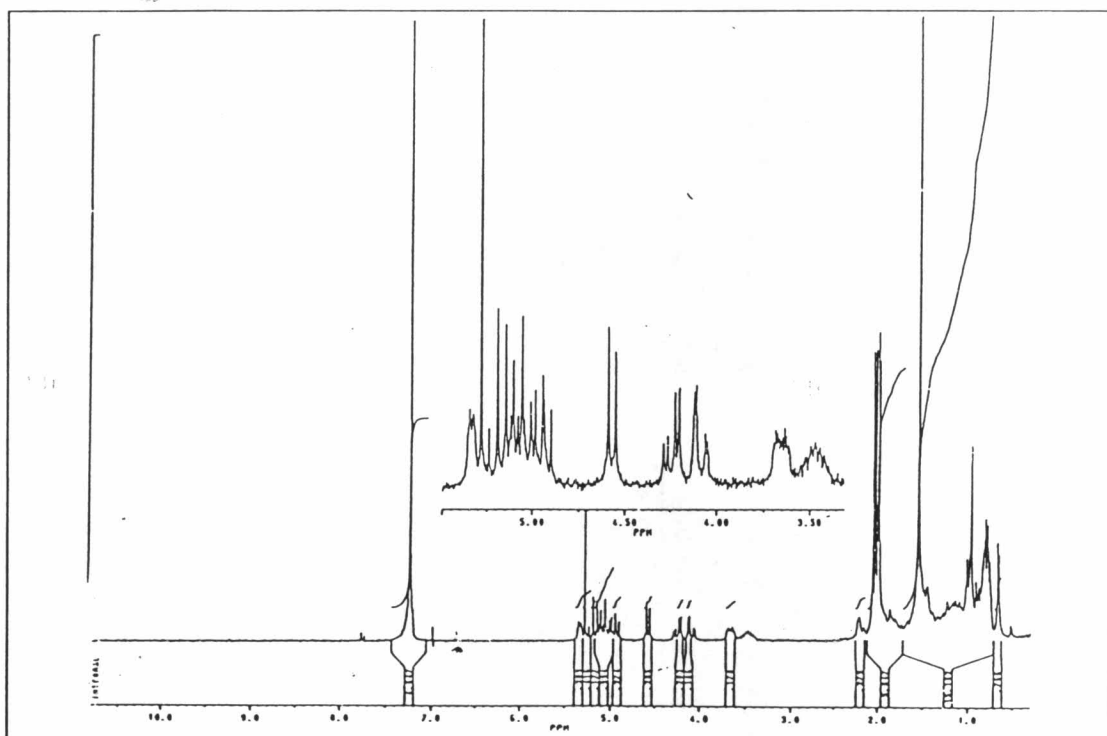
รูปที่ 3.45 แสดงแถบการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ฏ



เนื่องจากสาร ฏ เป็นสารประกอบประเภทไกลโคไซด์ ซึ่งละลายได้ยากในตัวทำละลายต่างๆ ไป ดังนั้นการที่จะนำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างจะต้องลดความมีขั้วลง วิธีที่นิยมใช้กันก็คือการทำเอซีเทิลชัน โดยนำสาร ฏ มาจำนวน 40 มิลลิกรัม นำมาเตรียมอนุพันธ์เอซีเตดตั้งวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.5. จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว สาร ฏ* จำนวน 25 มิลลิกรัม มีจุดหลอมเหลวได้ 120-123 องศาเซลเซียส ค่า R_f เท่ากับ 0.35 ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม เอทิลเอซีเตต ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน และไม่ละลายในเมทานอล

สารประกอบประเภทไกลโคไซด์ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนของอะไกลโคน และน้ำตาล ซึ่งส่วนอะไกลโคนจะวิเคราะห์โดยใช้แมสสเปกตรัม และส่วนน้ำตาลจะวิเคราะห์โดยใช้โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม และคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม โดยจะดูค่าเคมีคัลชิฟท์ของโปรตอนและคาร์บอนของน้ำตาลเท่านั้น

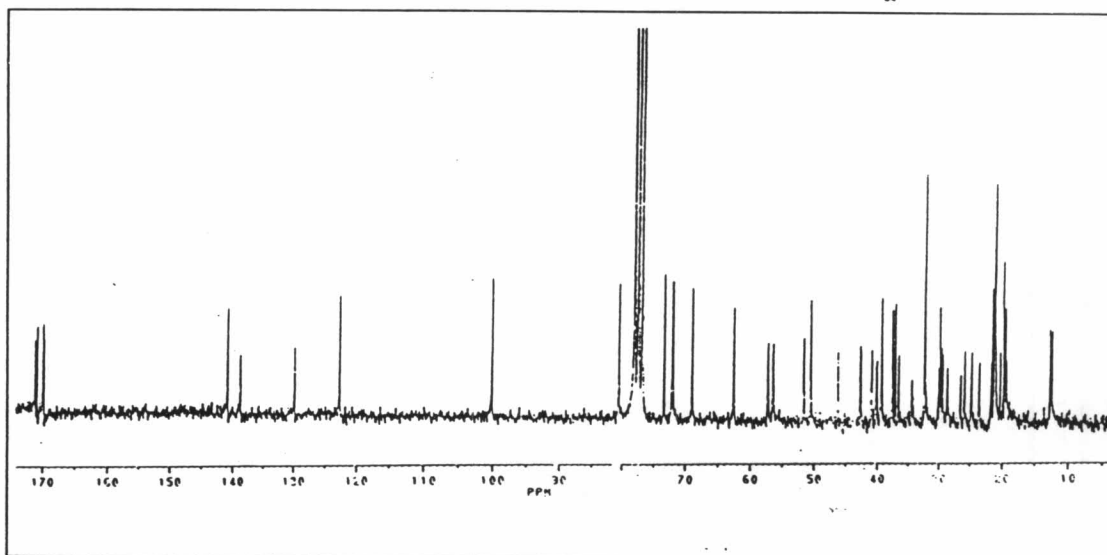
โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 3.46 ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ $\delta(\text{ppm})$: 2.1 แสดงหมู่เมทิลของการทำเอซิติลเลชันจำนวน 4 หมู่



รูปที่ 3.46 แสดงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ก*

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) รูปที่ 3.47 ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 99.65, 72.98, 71.35, 71.16, 68.21 และ 61.85

รูปที่ 3.47 แสดงคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร ก*

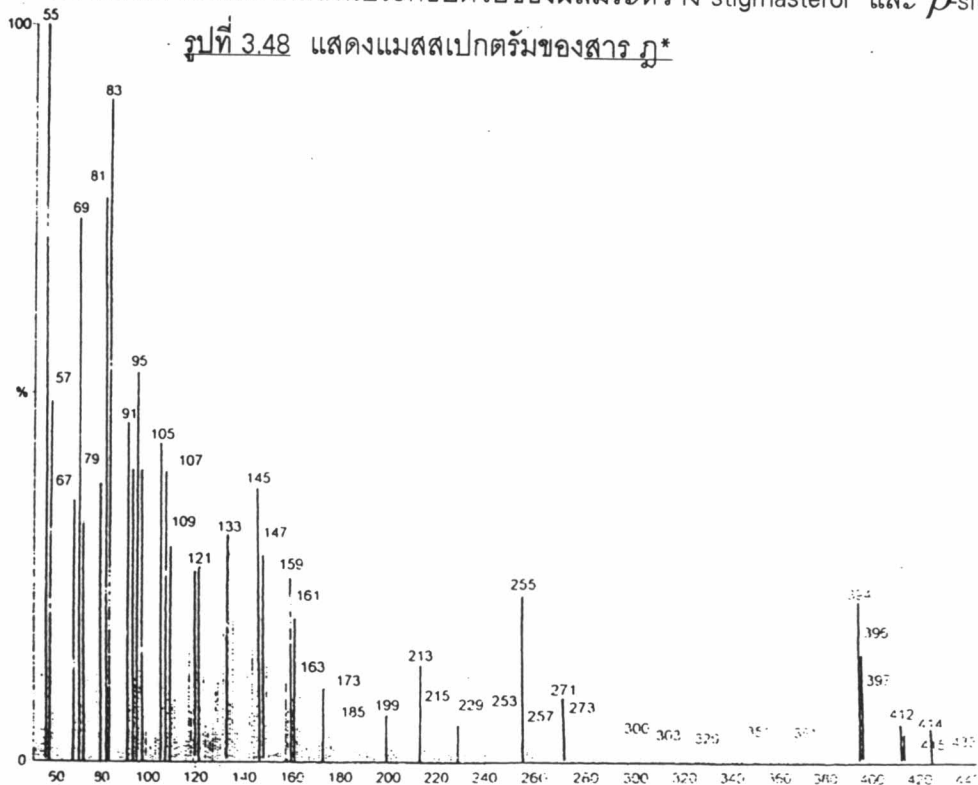


เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับส่วนของน้ำตาลชนิดอื่นๆ พบว่า ให้ค่า δ (ppm) ตรงกับน้ำตาลกลูโคสดังแสดงในตารางที่ 3.17

ตารางที่ 3.17 แสดงการเปรียบเทียบค่าเคมีคัลซิฟท์สาร μ^* กับน้ำตาลกลูโคส

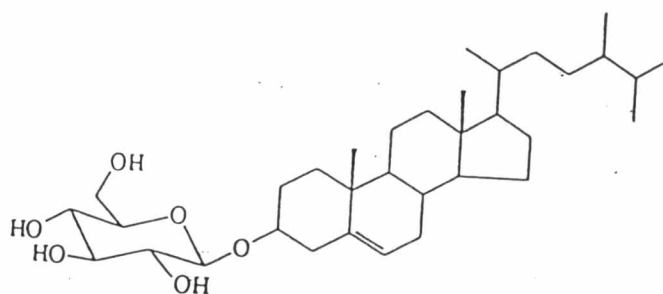
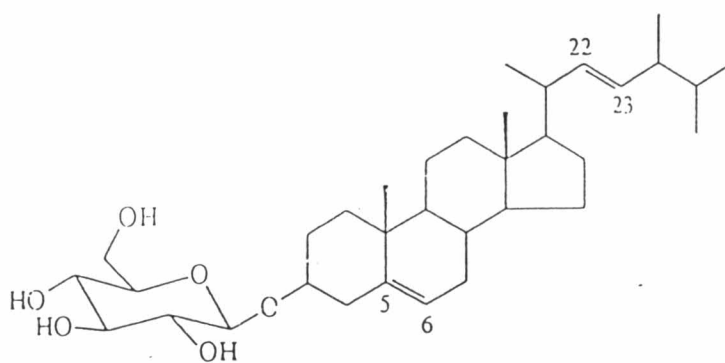
ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลซิฟท์ (ppm)	
	อนุพันธ์แอซิเตต	stigmasteryl-3- β -D-glucoryranoside tetraacetate
1'	99.65	99.68
2'	71.35	72.03
3'	72.98	73.03
4'	68.21	68.69
5'	71.16	71.78
6'	61.85	62.19

แมสสเปกตรัมของสาร μ^* รูปที่ 3.48 จะไม่พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) เนื่องจากเกิดการสูญเสียโมเลกุลของน้ำตาลก่อน จึงพบแต่ส่วนของสเตียรอยด์และการแตกตัวจะเป็นชิ้นส่วนของสเตียรอยด์ จากแมสสเปกตรัมพบไอออนชิ้นส่วนที่สำคัญที่ m/z 414 และ 412 นั้นแสดงให้เห็นว่าส่วนอะไกลโคนประกอบด้วยของผสมระหว่าง stigmasterol และ β -sitosterol



ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าอนุพันธ์เอซิติเตตของสาร ฎ* คือ ของผสมระหว่าง stigmasteryl-3-O-β-D-glucopyranoside tetraacetate ($C_{43}H_{68}O_{10}$ มวลโมเลกุล 744) และ β-sitosteryl-3-O-β-D-glucopyranoside tetraacetate ($C_{43}H_{66}O_{10}$ มวลโมเลกุล 742)

ดังนั้นสาร ฎ ก็คือ ของผสมระหว่าง stigmasteryl-3-O-β-D-glucopyranoside ($C_{35}H_{58}O_6$ มวลโมเลกุล 744) และ β-sitosteryl-3-O-β-D-glucopyranoside ($C_{35}H_{56}O_6$ มวลโมเลกุล 742) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างแสดงดังรูปข้างล่างนี้

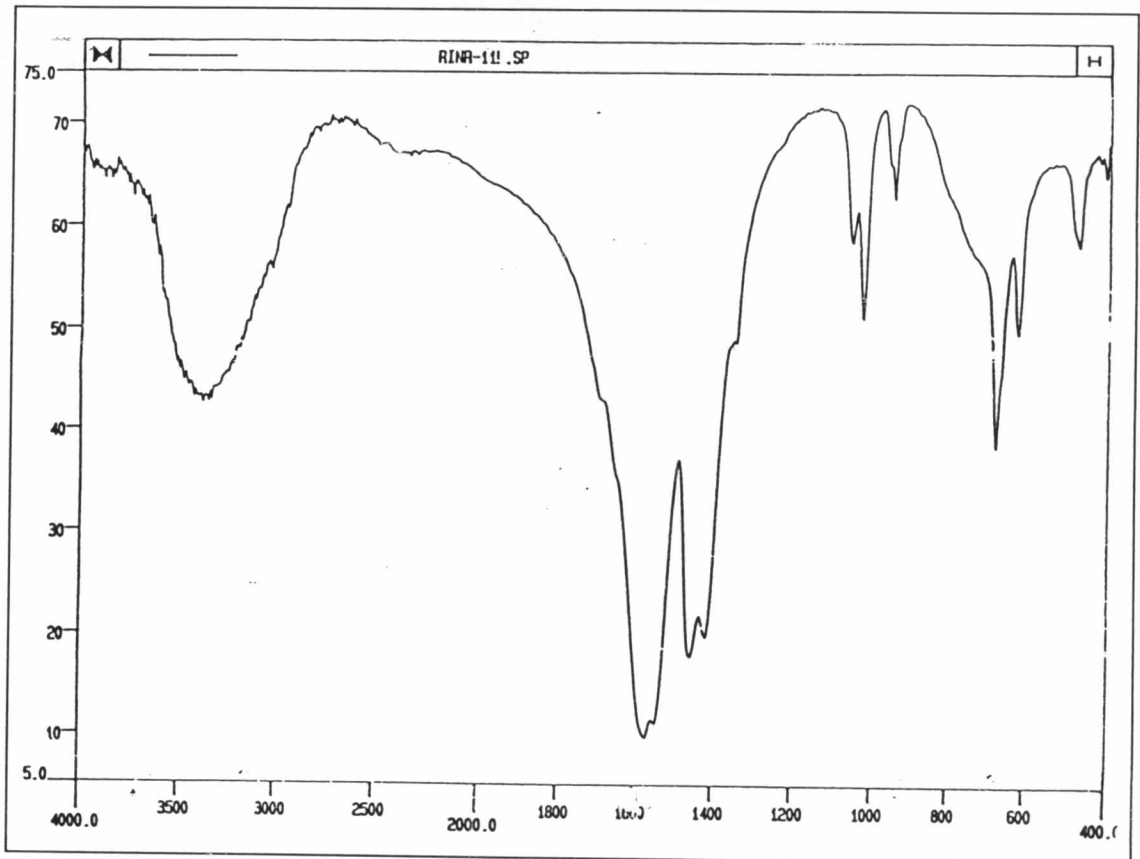


การตรวจสอบหาสูตรโครงสร้างของสาร ฏ

สาร ฏ เป็นสารที่ตกผลึกลงมาหลังจากนำสิ่งสกัดเมทานอลมาระเหยตัวทำละลาย ออก ผลึกที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกแท่ง เหลี่ยมและเข็ม นำผลึกที่ได้มาตกผลึกใหม่ด้วยน้ำกลั่น ระเหยน้ำออกจนสารละลายเข้มข้นจึงนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมเมทานอลลงไปผลึกจะตกลง มา กรองและนำผลึกที่ได้มาทำการตกผลึกใหม่ในลักษณะเหมือนเดิม แต่ปล่อยให้แห้งให้ตกผลึก เองจะได้ผลึกในลักษณะเป็นเข็ม เหลี่ยม และแท่งสีขาว (สาร ฏ) จำนวน 45 กรัม หาคจุดหลอม เหลวปรากฏว่าสูงกว่า 300 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ

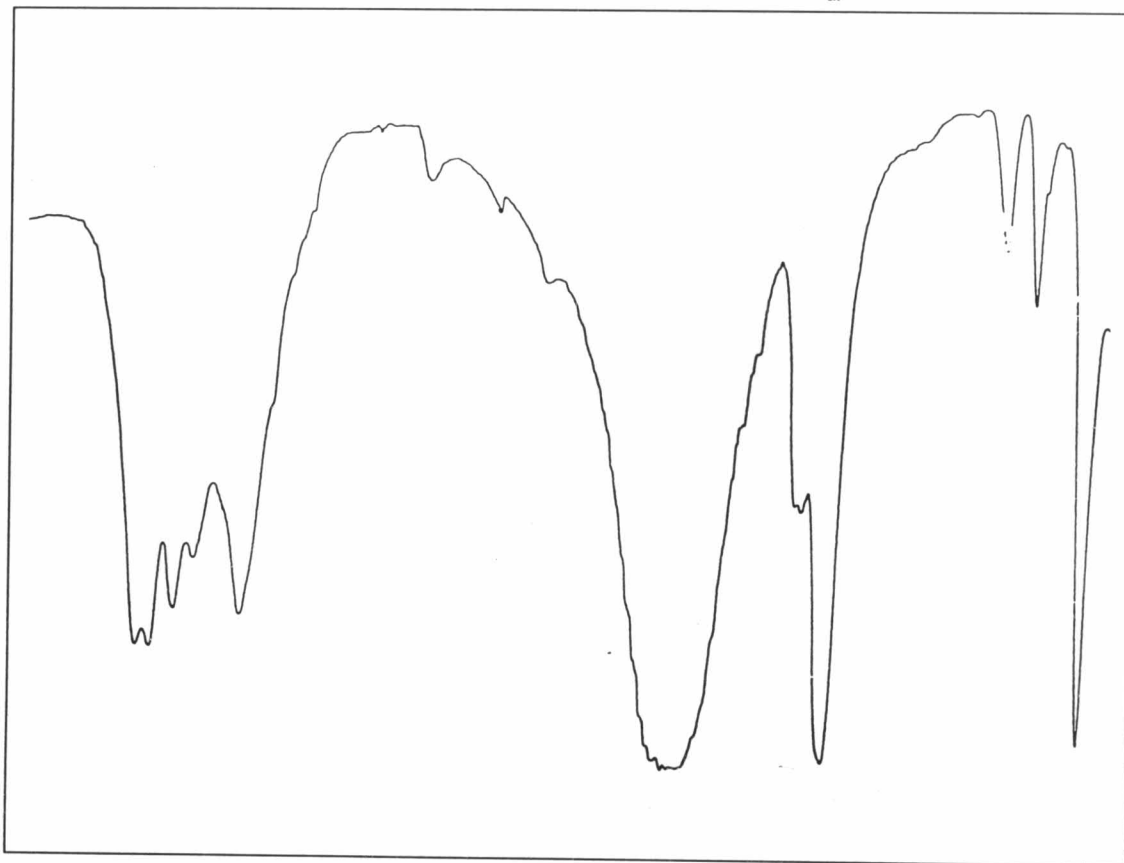
อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนแสง ดังแสดงในรูป 3.49

รูปที่ 3.49 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร ฏ



เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐานแคลเซียมออกซาลาเลต ดังแสดงในรูปที่ 3.50

ตารางที่ 3.50 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐานแคลเซียมออกซาลेट



ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบ สาร ฎ ที่ได้จากอินฟราเรดสเปกตรัมของสารมาตรฐานแล้ว พบว่าอินฟราเรดสเปกตรัมมีลักษณะของสเปกตรัมที่คล้ายคลึงกัน จึงคาดว่า สาร ฎ น่าจะเป็น แกลีออกซาลेट