



2.1. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้

2.1.1. Column Chromatography (21)

ใช้ Aluminium oxide S standardised for column chromatography ของบริษัท Riedel-De Haën Ag., Seelze Hannover เป็น adsorbent ส่วน column ที่ใช้เป็น column แก้ว ขนาดกว้างสม่ำเสมอ กัน ปลายข้างหนึ่งเรียวยาวเล็กต่อกับสายยางที่มี clip สำหรับเปิดปิด ก่อนบรรจุ alumina ใส่สำลีเล็กน้อยเพื่อป้องกัน alumina ไหลออกไปกับ solvent ใส solvent ลงไปประมาณ 2 ใน 3 ของ column แก้ว ค่อย ๆ ใส adsorbent ลงไปตามปริมาณที่ต้องการ รอจนผิว adsorbent ไม่ลจกตัวลงไปอีก จึงเปิด clip เพื่อให้ solvent ไหลออกจนผิวหน้าของ adsorbent เกือบแห้งจึงปิด clip แล้วจึงเทสารที่ต้องการแยกลงไป

2.1.2. Thin Layer Chromatography (T.L.C.) (4)(24)

ใช้ Aluminium oxide DF for thin layer chromatography ของบริษัท Riedel-De Haën Ag., Seelze-Hannover เป็น adsorbent การทำ chromatoplates ใช้ Desaga spreader ที่ปรับความหนา 0.25 มม. และใช้ adsorbent 40 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 40 มล. เขย่า จะได้ chromatoplates ขนาด 20x20 ซม. จำนวน 4 แผ่น ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึง activated ที่อุณหภูมิ 100-110°

Solvent systems ที่ใช้คือ Benzene : Petroleum ether = 1 : 9, methanol, n-butanol : acetic acid : water = 7 : 1 : 1

Detecting agent ใช้ 2', 7'- dichlorofluorescein solution (0.2% ใน ethanol) ซึ่งเมื่อ spray แห้งแล้ว นำไปส่องใน UV-light บริเวณที่มีสารจะเรืองแสง ทำให้มองเห็น spots ต่าง ๆ ชัดเจนยิ่งขึ้น

2.1.3. Liebermann-Burchard Reaction (6)

ละลายสารที่ต้องการทดสอบจำนวนเล็กน้อยใน chloroform 4-5 หยด หยด acetic anhydride ลงไป 2-3 หยด และกรอกกำมะถันเข้มข้น 1 หยด เขย่าให้เข้ากัน ถ้ามีสีเกิดขึ้น แสดงว่าสารนั้นเป็นพวก steroids หรือ triterpenoids

2.1.4. Infrared Spectrum (3)(20)

เครื่องมือที่ใช้คือ Microspec ของ Beckmann Infrared Spectrophotometer Model 1325 Cat. no. 132501 Y และ Unicam SP. 200 G ของบริษัท Unicam Instruments Limited, Cambridge สารที่จะหา IR-absorption ต้องนำไปทำเป็น KBr-pellets การตรวจลักษณะ Absorption peaks นั้นใช้เปรียบเทียบกับ standard characteristic peaks ที่มีอยู่ใน literature (3)(20)

2.1.5. การหาจุดหลอมเหลว (Melting Point Determination)

ใช้เครื่อง Fisher-Johns Melting Point Apparatus

2.1.6. Alkaloid Precipitating Reagents (7)

ละลายสารที่ต้องการทดสอบเล็กน้อยในกรกเกลือ 2% แล้วทดสอบด้วย Alkaloid reagents ต่อไปนี้

Phosphotungstic acid

ละลาย Phosphotungstic acid 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.

Picric acid

ใช้สารละลายอิ่มตัวของ Picric acid ในน้ำกลั่น

Wagner's reagent

ละลาย Iodine crystal 1.27 กรัม และ Potassium iodide 2.75 กรัม ในน้ำ 5 มล. แล้วทำเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

Mayer's reagent

ละลาย Mercurous chloride 1 กรัมในน้ำ 100 มล. เติม Potassium iodide ลงไปที่ละน้อย จนตะกอนที่เกิดครั้งแรกละลายหมดพอดี

2.1.7. Solvents

Solvent ทุกชนิดที่ใช้ตลอดการทดลองนี้ ถ้าไม่ใช่ Reagent grade กลั่นก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง ส่วน solvent ที่ใช้ในการตกผลึกเป็น Analar grade ทั้งสิ้น

2.1.8. การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ธาตุต่าง ๆ

ส่งไปวิเคราะห์ที่กรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงอุตสาหกรรม และที่ Australian Microanalytical Service, University of Melbourne

2.1.9. การทำ X-ray Crystallography

ทำที่แผนกวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2. การสกัด (Extraction)

ใบพังพวยฝรั่งแห้งและบดละเอียด 1600 กรัม (จากใบสด 9.00 กก.) แช่ด้วย Petroleum ether จำนวน 5 ลิตร 3 ครั้ง ๆ ละ 7 วัน ได้สารละลายสีน้ำตาล แล้วกลั่นได้ตัวทำละลายออกจนเหลือ 1 ลิตร สกัด Alkaloid โดยเขย่ากับกรดเกลือ 0.5% 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ลิตร แยกเอาชั้นกรดเกลือไปทำให้เป็นกลางด้วย NH_4OH 10% ได้ตะกอนสีเหลืองอ่อน ซึ่งจะรวมตัวแข็งและสีเหลืองเข้มขึ้นเมื่อถูกอากาศ ทำให้แห้งใน desiccator ได้ของแข็งสีน้ำตาลหนัก 0.5 กรัม (0.03% โดยน้ำหนักของใบพังพวยฝรั่งแห้ง) ให้เป็น crude M

ล้างชั้น Petroleum ether ด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด กลั่นได้ตัวทำละลายออกได้ crude สีน้ำตาลหนืดหนัก 20.0 กรัม (1.25% โดยน้ำหนักของใบพังพวยฝรั่งแห้ง) ให้เป็น crude N

นำใบพังพวยฝรั่งที่สกัดด้วย Petroleum ether แล้ว ไปสกัดด้วย benzene 6 ลิตร ใน Soxhlet apparatus นาน 30 ชั่วโมง กลั่นได้ตัวทำละลาย ได้ crude สีน้ำตาลหนืดหนัก 69.0 กรัม (4.31% โดยน้ำหนักของใบพังพวยฝรั่งแห้ง)

ละลาย crude สีน้ำตาลที่สกัดออกมากับ benzene ด้วยกรดเกลือ 0.5% จำนวน 2 ลิตร ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน และเปลี่ยนสีเข้มขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ กรองตะกอนที่ไม่ละลายในกรดเกลือออก นำเอาสารละลายที่กรองได้ ทำให้เป็นกลางด้วย NH_4OH 10% ได้ตะกอนสีเหลืองเกิดขึ้น กรองตะกอน ทำให้แห้งใน desiccator ได้สารสีน้ำตาลหนัก 18.8 กรัม (1.17% โดยน้ำหนักของใบพังพวยฝรั่งแห้ง) ให้เป็น crude O

ล้างตะกอนที่ไม่ละลายในกรดเกลือ จนหมดกรด เมื่อแห้งหนัก 51.7 กรัม (3.23% โดยน้ำหนักของใบพังพวยฝรั่งแห้ง) ละลายตะกอนใน benzene 500 มล.

ได้สารละลายสีค่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก กำหนดให้เป็นตะกอน S ซึ่งหนัก 27.6 กรัม (1.72% โดยน้ำหนักของใบพังพวยฝรั่งแห้ง หรือ 40.0% โดยน้ำหนักของ crude extract จาก benzene) ส่วนสารละลายสีค่านั้นเอาไปกลั่นได้ตัวทำละลายออกให้หมด จะได้ crude สีค่าหนัก 24.0 กรัม (1.50% โดยน้ำหนักของใบพังพวยฝรั่งแห้ง หรือ 34.78% โดยน้ำหนักของ crude extract จาก benzene) กำหนดให้เป็น crude P

แผนผังแสดงการสกัดสารจากใบพังพวยฝรั่ง

ใบพังพวยฝรั่งแห้ง 1600 กรัม

แช่ใน petroleum ether เย็น 15 ลิตร, กรอง

Petroleum ether extract

ระเหยจนเหลือปริมาตร 1 ลิตร

สกัดด้วย 0.5% HCl 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ลิตร

Petroleum ether

ล้างจนหมดกรดด้วยน้ำกลั่น
ระเหยจนแห้ง

Crude สีดำหนัก 20.0 กรัม
(Crude N)

Acid extract

ทำเป็นกลางด้วย
10% NH_4OH

ตะกอนวุ้นสีเหลืองในสารละลายสีขาว

กรองและทำให้แห้งใน
desiccator

ตะกอนเหลืองปนน้ำตาล
0.5 กรัม
(Crude M)

ส่วนที่ไม่ละลายใน petroleum ether
(ใบพังพวยฝรั่งแห้ง)

Reflux กับ Benzene 6 ลิตรใน
Soxhlet Apparatus

Benzene extract

ระเหยจนแห้ง

Crude สีดำเหนียว 69.0 กรัม

ละลายด้วย 0.5% HCl 2 ลิตร
กรอง

ของแข็งสีเขียวปนน้ำตาล

ล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดกรด
กรอง ทำให้แห้งโดยทิ้ง
ไว้ในอากาศ

ของแข็งสีเขียวปนน้ำตาล
51.7 กรัม

ละลายในเบนซีน 500 มล.

ตะกอน S
27.6 กรัม

ส่วนที่ละลายในเบนซีน
กลั่นให้แห้ง
Crude สีดำหนัก 24.0 กรัม
(Crude P)

Acid soluble

ทำเป็นกลางด้วย
10% NH_4OH

ตะกอนวุ้นสีเหลืองในสารละลายสีขาว

กรองและทำให้
แห้งใน
desiccator

ตะกอนสีเหลืองปนน้ำตาล
18.8 กรัม
(Crude O)

นอกจากนี้ยังได้สกัดใบพังกาวยฝรั่งโดยการแช่ใน solvents ต่าง ๆ ด้วยวิธีเดียวกัน แต่ไม่ได้แยกเอา Alkaloid ออก ได้ผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1

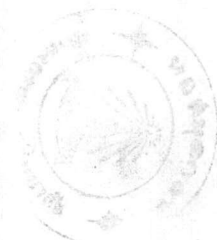
ปริมาณของ crude extract ที่สกัดได้โดยใช้ solvents ต่าง ๆ

น้ำหนักใบแห้งบดละเอียด (กรัม)	ชนิดของ solvent	ปริมาตรของ solvent (ลิตร)	น.น. crude (กรัม)	% crude (a)	น.น. ตะกอน s (กรัม)	% ของตะกอน s (b)
600	petroleum ether	12	20.0	3.33	-	-
600	benzene	12	35.0	5.75	12.0	34.29
1000	benzene	12	51.5	5.15	18.0	34.95
1500	benzene	36	65.5	4.37	25.0	38.16
1500	ethanol (c)	6	155.0	10.33	36.0	23.22
2300	benzene	12	128.5	5.59	45.0	35.02

(a) % โดยน้ำหนักของ crude โดยคิดเทียบจากน้ำหนักของใบแห้ง

(b) % โดยน้ำหนักของตะกอน s โดยคิดเทียบจากน้ำหนักของ crude ที่แยกออกมาได้

(c) ใบที่สกัดด้วย ethanol คือใบที่เหลือจากสกัดด้วย benzene แล้ว



2.3. การแยกสาร (Separation)

ได้ทำการแยก crude N, P และ crude จากการสกัดด้วย benzene ส่วน crude M และ O นั้น ละลายได้ในกรดเกลือ 0.5% และให้ positive test กับ Alkaloid precipitating reagents (2.1.6.) และจากการวิเคราะห์ธาตุโดยวิธี Lassaigne sodium decomposition test (23) พบว่ามีธาตุ nitrogen ซึ่งแสดงว่าเป็น Alkaloid จึงไม่ทำการแยกต่อไป

2.3.1. การแยก crude N, P และ crude จากการสกัดด้วย benzene โดย Column Chromatography

ละลาย crude N 20.0 กรัม ใน benzene 200 มล. ผ่านลงใน column แก้ว ซึ่งบรรจุ Aluminium oxide S จำนวน 300 กรัม เป็น adsorbent มี benzene เป็นตัวทำละลายตามการทดลอง 2.1.1. elute ด้วย benzene, ส่วนผสมของ benzene : chloroform 3:1, 2:1, 1:1 และ chloroform ตามลำดับ โดยเก็บ eluate ครั้งละ 1000 มล. กลับเอาตัวทำละลายออกจนเหลือ 20 มล. ฉายใส่ flask แล้วตั้งทิ้งให้ตกผลึก ได้ผลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2

การแยกสารจาก crude N โดย Column Chromatography

Eluent	fraction ที่	ลักษณะของสารและจุดหลอมเหลว	น้ำหนักสาร (กรัม)
benzene	1 - 2	semisolid และน้ำมันสีเหลือง	-
	3	ผลึกเกล็ดรูป 6 เหลี่ยม m.p. 210-5°	2-3 เกล็ด
	4 - 6	ผลึกฝอย m.p. 75-83°	0.10
	7 - 10	น้ำมันเหลือง	-
	11 - 16	ผลึกรูปเข็ม m.p. 129-35°	0.08
	17 - 29	น้ำมันสีเหลือง	-
benzene : chloroform 3:1	30 - 34	น้ำมันสีเหลือง	-
benzene : chloroform 2:1	35 - 39	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	-
benzene : chloroform 1:1	40 - 42	น้ำมันสีน้ำตาล	-
chloroform	43 - 47	น้ำมันสีเขียว	-

ส่วนที่ติดอยู่ใน column เอาออกมาสกัดด้วย acetone 1 ลิตรนาน 7 วัน กรอง ระเหยตัวทำละลายออกจนเหลือ 50 มล. จะตกตะกอนสีเขียวอ่อน หากจุดหลอมเหลวได้ 250-7°

ได้ใช้วิธีนี้สำหรับแยก crude P ด้วย และได้ผลเช่นเดียวกัน

เพื่อจะแยกผลึกที่มีจุดหลอมเหลว 210-5° ให้ได้มากขึ้น จึงใช้ crude (จากการสกัดด้วย benzene ดังตารางที่ 1) 25.0 กรัม และ Aluminium oxide S 400 กรัม เป็น adsorbent แต่ใช้ eluent ไม่เหมือนเดิม ได้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3



Eluent	fraction ที่	ลักษณะของสารและจุดหลอมเหลว	น้ำหนักสาร (กรัม)
petroleum ether	1 - 3	semisolid และน้ำมันสีเหลือง	-
5% ether in petroleum ether	4 - 8	wax สีเหลือง	-
ether	9 - 16	ผลึกฝอย m.p. 84-6°	0.18
	16 - 20	น้ำมันสีเหลือง	-
10% ether in petroleum ether	21 - 25	ผลึกเข็ม m.p. 130-7°	0.25
	26 - 45	น้ำมันสีเหลือง	-
20% ether in petroleum ether	46 - 47	น้ำมันสีเหลืองเข็ม	-
	48 - 49	ผลึกใสรูปเข็มแบบไบเฟอริ่น m.p. 145-7°	2-3 เกล็ค
30% ether in petroleum ether	50 - 61	น้ำมันสีเขียว	-
	62 - 77	น้ำมันสีเหลืองเข็ม	-
50% ether in petroleum ether	78 - 84	น้ำมันสีเขียว	-
	85 - 99	น้ำมันและผงสีเหลือง ที่ decompose เมื่อถูกอากาศ	0.03
75% ether in petroleum ether	100 - 104	น้ำมันสีเขียว	-
	105 - 120	น้ำมันและผงสีเหลือง ที่ decompose เมื่อถูกอากาศ	0.02
benzene	121 - 125	น้ำมันสีเขียว	-

ทดลองเปลี่ยนใช้ Basic active aluminium oxide เป็น adsorbent โดยใช้ eluent ทั้งตารางที่ 2 และที่ 3 ได้ผลเช่นเดียวกัน

เพื่อให้ได้ผลดีสารมากพอ จึงทำ Column chromatography อีกหลาย ๆ column ทั้งตามวิธีตารางที่ 2 และที่ 3 แต่ปรากฏว่า ผลึกสาร m.p. $210-5^{\circ}$ และ $145-9^{\circ}$ มีเพียงบาง column และปริมาณน้อยเกินไปใช้วิเคราะห์ไม่ได้

สำหรับ crude extract จาก ethanol เมื่อทำ Column chromatography โดยใช้ acetone, methanol และ ethanol เป็น eluents ได้ตะกอนสีเขียวอ่อน ไม่หลอมเหลว ละลายน้ำได้ วิเคราะห์ anion โดยเติม HNO_3 dil. และ AgNO_3 ได้ตะกอนขาว ซึ่งละลายได้ใน NH_4OH แสดงว่ามี chloride ion และจากการทำ flame test พบว่ามี potassium ion แสดงว่าตะกอนที่ได้คือ KCl และได้ผลึกสารจุดหลอมเหลว $270-5^{\circ}$ เล็กน้อย

2.3.2. การแยกสารจากตะกอน S โดยล้างด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ และตกผลึก

นำตะกอน S ซึ่งเป็นผงสีเขียว มีจุดหลอมเหลว $250-7^{\circ}$ น้ก 27.6 กรัม ล้างด้วย petroleum ether เป็นหลาย ๆ ครั้ง จนไม่มีสี แล้วล้างด้วย chloroform เป็น จนสารละลายมีสีจางลง และเหลือตะกอนเพียง 18.0 กรัม ละลายตะกอนนี้ใน chloroform เป็น จำนวน 10 ครั้ง ๆ ละ 100 มล. กรองเอาส่วนที่ละลายออกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จะมีตะกอนเบาสีขาวลอยอยู่ข้างบน กรองเอาตะกอนที่เกิดขึ้นนี้ออก ปล่อยให้สารละลายระเหยต่อไปอีก มีตะกอนเกิดขึ้นแล้ว กรองออกอีก ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง รวมตะกอนที่ได้ทั้งหมดตกผลึกในตัวทำละลายผสมของ ethanol และ methanol หลาย ๆ ครั้ง จะได้ผลึกรูปเข็ม มีน้ำหนัก decant วนออก และล้างด้วย methanol จนเหลือแต่ผลึกรูปเข็มเบา มีน้ำหนักเล็กน้อย หลอมเหลวที่ $273-7^{\circ}$ น้ก 7.0 กรัม

ตะกอน S จากการสกัดทุกครั้ง (ตามตารางที่ 1) เมื่อล้างและตกผลึกโดยวิธีเดียวกันนี้ ได้ผลึกสารจุดหลอมเหลว $270-7^{\circ}$ เพียงอย่างเดียว

2.4. การทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)

2.4.1. สารที่มีจุดหลอมเหลว 75 - 87°

นำสารที่มีจุดหลอมเหลว 75-87° น้ก 1.5 กรัม ดังด้วย petroleum ether จำนวนเล็กน้อย และตกผลึกใน petroleum ether ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จะได้ผลึกผอมสีขาวหนัก 500 มก. มีจุดหลอมเหลวคงที่ 88° กำหนดให้เป็นสาร A

2.4.2. สารที่มีจุดหลอมเหลว 130 - 8°

นำสารที่มีจุดหลอมเหลว 130-8° น้ก 1.5 กรัม ละลายใน methanol ร้อน เมื่อคั้งให้เย็น มีผลึกรูปเข็มผอมเป็นกระจุก กรอง และตกผลึกซ้ำใน petroleum ether หลาย ๆ ครั้ง จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว เบา และมีวาว น้ก 500 มก. มีจุดหลอมเหลวคงที่ 138-9° กำหนดให้เป็นสาร B

2.4.3. สารที่มีจุดหลอมเหลว 270 - 7°

นำสารที่ได้จากการล้างตะกอนที่ไม่ละลายใน benzene มีน้กปนเล็กน้อย และมีจุดหลอมเหลว 270-7° น้ก 7.0 กรัม ตกผลึกใน ethanol ซึ่งแต่ละครั้งจะมีน้กตกออกมาพร้อมผลึก decant เอาน้กเบาออก และล้างผลึกที่ติดกัน flask ด้วย ethanol หลาย ๆ ครั้ง จนผลึกที่ได้ไม่มีน้กเหลือ มีจุดหลอมเหลว 275-9° จึงตกผลึกด้วย absolute ethanol อีกหลายครั้ง จนได้ผลึกรูปเข็มใส น้ก 5.13 กรัม มีจุดหลอมเหลวคงที่ 279-80° กำหนดให้เป็นสาร C

สารที่มีจุดหลอมเหลว 210-5° และ 145-9° มีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถรวบรวมให้มากพอที่จะทำให้อบริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของสารได้

2.5. การตรวจลักษณะของสารประกอบที่แยกออกมาได้ (Identification of Compounds)

2.5.1. การตรวจลักษณะของสาร A m.p. 88°

2.5.1.1. Physical Properties and Colour Reaction ของสาร A

สาร A เป็นผลึกสีขาว เป็นกระจุก มีจุดหลอมเหลว 88° ละลายได้ดีใน chloroform, ether, benzene และ methanol ไม่ละลายน้ำ petroleum ether ไม่ให้สีกับ Libermann-Burchard reagent (6)

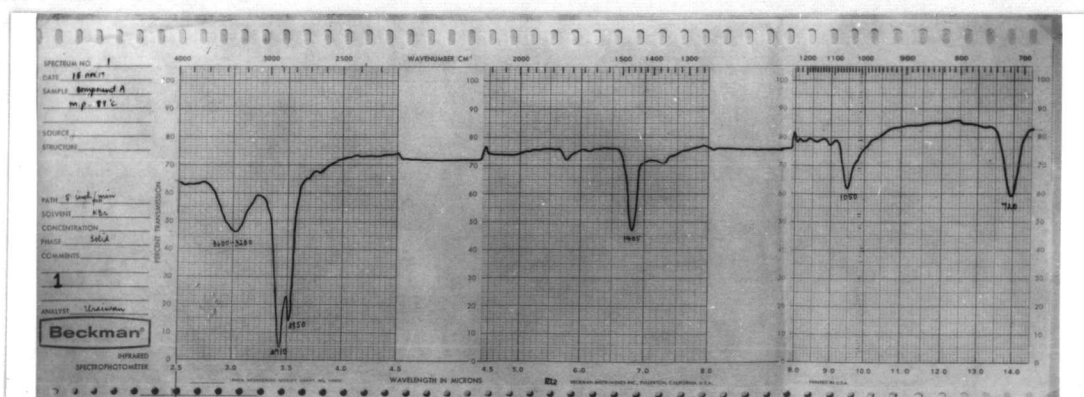
Rf value (วิธี 2.1.2.) ใน benzene : petroleum ether = 1 : 9
ได้ 0.74

การตรวจธาตุต่าง ๆ โดยวิธี Lassaigne sodium decomposition test (23)
ไม่พบ nitrogen, sulfur และ halogen

ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ carbon และ hydrogen มีดังนี้

C = 82.31%

H = 14.19%



รูปที่ 1 IR spectrum ของสาร A

ตารางที่ 4 IR Absorption peaks ของสาร A (3)(20)

Frequency (cm ⁻¹)	Band Type	Assignments
3600 - 3200	very broad	stretching vibration of polymeric -OH
2910, 2850	sharp	CH - stretching vibration of -CH ₃ and -CH ₂ -
1465	sharp	-CH ₂ - bending vibration
1050	broad	C-O stretching vibration of primary alcohol
720	sharp	(CH ₂) _n rocking, n = 4

2.5.1.2. การตรวจหา functional groups ของสาร A (23)

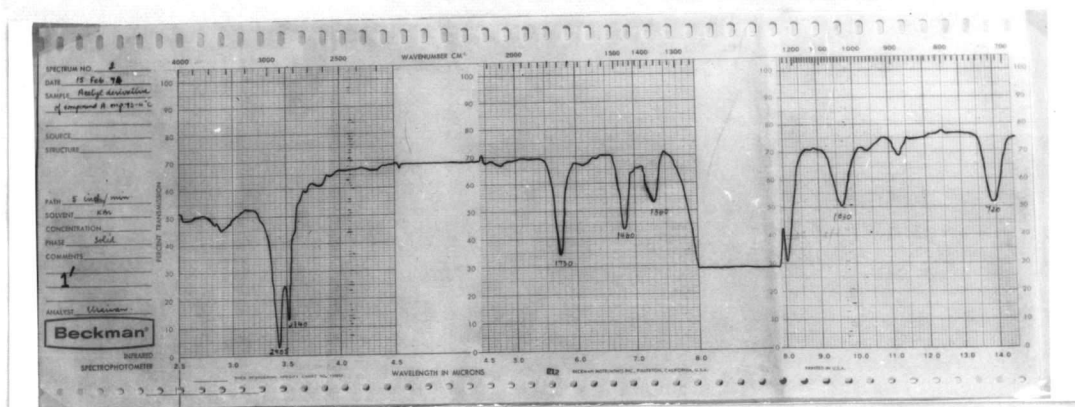
โดยใช้วิธี Standard method พบว่า ไม่ฟอกสี Br₂ in CCl₄ และเป็น alcohol

2.5.1.3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร A

006695

Acetylation (27)

ละลายสาร A หนัก 100 มก. ใน pyridine กลิ่นใหม่ ๆ 3 มล. ในขวดที่กลมขนาด 25 มล. เติม acetic anhydride 2 มล. reflux บน waterbath 5 ชั่วโมง ทำให้เย็น เติมน้ำสดน้ำแข็ง 50 มล. คนให้ทั่ว กรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นเย็นหลาย ๆ ครั้งจนหมดกลิ่น pyridine และ acetic acid ทำตะกอนให้แห้งได้ตะกอนสีขาวหนัก 95 มก. ตกผลึกใน petroleum ether 3 ครั้ง ได้ amorphous solid สีขาว หนัก 52 มก. หลอมเหลวที่ 73-4°



รูปที่ 2 IR. spectrum ของ Acetate ของสาร A

ตารางที่ 5 IR Absorption peaks ของ Acetate ของสาร A (3)(20)

Frequency (cm^{-1})	Band Type	Assignments
2905, 2840	sharp	CH stretching vibration of $-\text{CH}_3$ and $-\text{CH}_2-$
1730	sharp	C = O stretching vibration
1460	sharp	CH bending vibration of $-\text{CH}_2-$
1360	broad	C-H bending vibration of $-\text{CH}_3$ (symmetrical)
1240	very sharp	C-O symmetric stretching of acetate = C-O-C (so called acetate band)
1030	broad	C-O stretching vibration
720	sharp	$(\text{CH}_2)_n$ rocking, $n = 4$

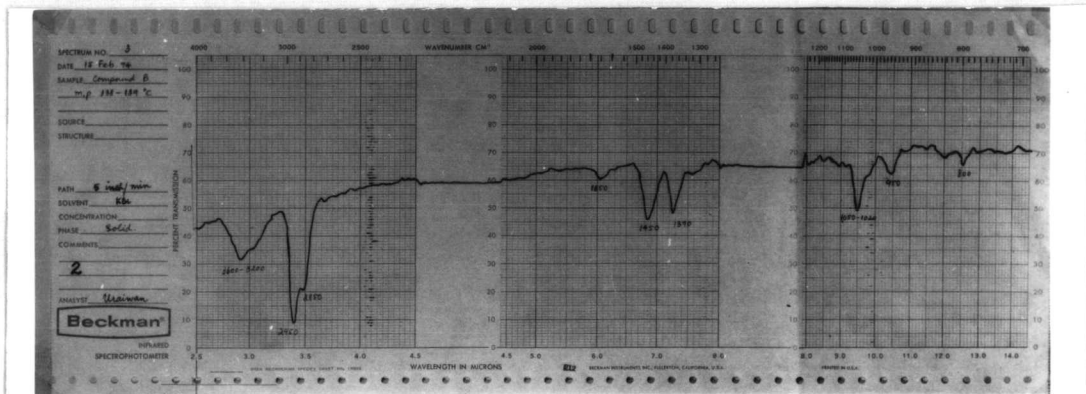
2.5.2. การตรวจลักษณะของสาร B m.p. 138-9°

2.5.2.1. Physical Properties and Colour Reaction ของสาร B

สาร B เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว เบาและเป็นเงา มีจุดหลอมเหลว 138-9° ละลายได้ใน benzene, ether, chloroform และ acetone แต่ไม่ละลายน้ำ Rf value (ตามวิธี 2.1.2.) ใช้ benzene : petroleum ether 1 : 9 ได้ 0.23 ทำปฏิกิริยากับ Liebermann-Burchard reagent (6) จะได้สีแกมซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินและเขียวตามลำดับ

ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ carbon และ hydrogen มีดังนี้

$$C = 83.89\% \quad H = 12.05\%$$



รูปที่ 3 IR. spectrum ของสาร B

ตารางที่ 6

IR. Absorption peaks ของสาร B m.p. 138-9°C (3) (20)

Frequency (cm ⁻¹)	Band Type	Assignments
3600 - 3200	very broad	stretching vibration of polymeric -OH
2950, 2850	sharp	CH stretching vibration of -CH ₃ and -CH ₂ -
1650	broad	C = C stretching vibration of R ₂ C = CHR
1450	broad (weak)	-CH ₂ - bending vibration
1370	broad (weak)	C-CH ₃ bending vibration (symmetrical)
1050, 1020	sharp	C - O stretching vibration of 3 β - OH equatorial steroid
950	weak	CH out-of-plane bending vibration of trans RCH = CHR
800	sharp	CH out-of-plane bending vibration of R ₂ C = CHR

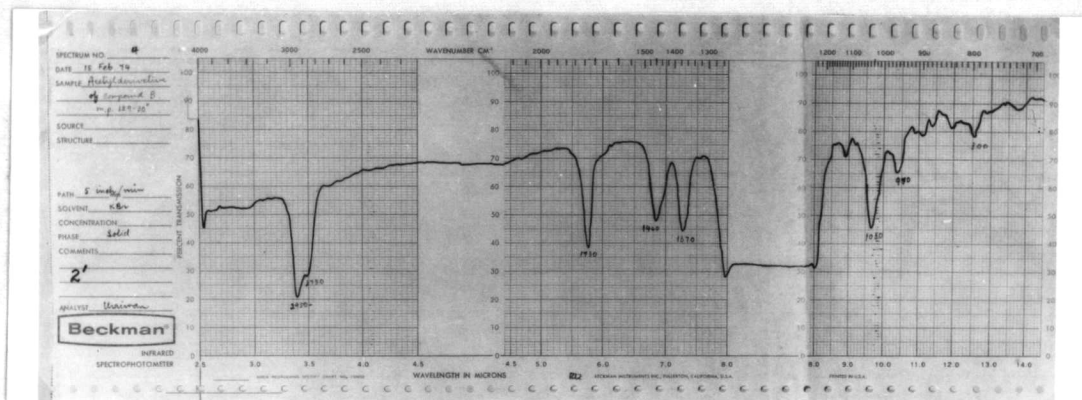
2.5.2.2. การตรวจหา functional group ของสาร B (23)

โดยใช้ Standard method พบว่า สาร B พอกสี Br_2 in CCl_4 ไม่ให้ฟองก๊าซ HBr พอกสี KMnO_4 ไม่ให้ตะกอนกับ 2,4-dinitro-phenylhydrazine (2,4-DNP) และไม่ reduce Tollen's reagent, Fehling's solution และ Benedict's solution ไม่เปลี่ยนสีสารละลาย FeCl_3

2.5.2.3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร B

Acetylation (27)

ละลายสาร B หนัก 200 มก. ใน pyridine 5 มล. เติม acetic anhydride 2.5 มล. ทำตามวิธี 2.4.1.3. จะได้สารหนัก 215 มก. ตกผลึกด้วย ethanol 5 ครั้ง จะได้ผลึกเป็นแผ่นใส หนัก 100 มก. มีจุดหลอมเหลว $129-30^\circ$



รูปที่ 4 IR. spectrum ของ acetate ของสาร B

ตารางที่ 7

IR. Absorption peaks ของ Acetate ของสาร B m.p. 129-30° (3)(20)

Frequency (cm ⁻¹)	Band Type	Assignments
2950 - 2750	broad	CH stretching vibration of -CH ₃ and -CH ₂ -
1730	very sharp	C = O stretching vibration
1460	sharp	CH bending vibration of -CH ₂ -
1370	sharp	CH bending vibration of -CH ₃ (symmetrical)
1240	very 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 R ₂ C = CHR

2.5.3. การตรวจลักษณะของสาร C m.p. 279-80°

2.5.3.1. Physical Properties and Colour Reaction ของสาร C

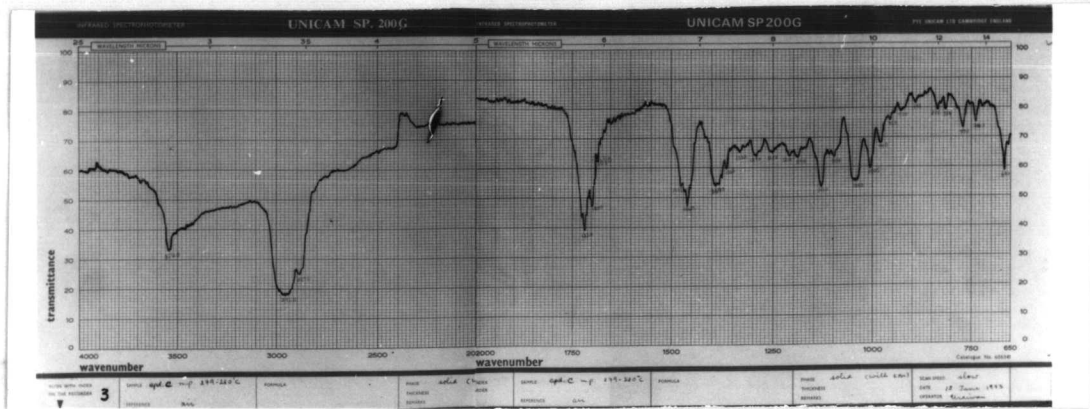
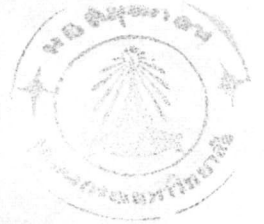
สาร C เป็นผลึกรูปเข็มใส หลอมเหลวที่จุดหลอม 279-80° ละลายได้ใน ethanol ร้อน, acetic acid ร้อน ละลายได้บ้างใน ether, acetone, ethylacetate, chloroform ไม่ละลายน้ำและ petroleum ether ทำปฏิกิริยา

กับ Liebermann-Burchard reagent จะให้สีม่วงซึ่งเบดึ้นเป็นสีน้ำเงินและ
 เชี่ยวตามลำดับ (10) หา Rf value (2.1.2.) ใน n-butanol : acetic acid :
 water = 7 : 1 : 1 ได้ 0.76 หาธาตุต่าง ๆ โดยวิธี Lassaigne sodium
 decomposition test (23) ไม่พบ nitrogen, sulfur และ halogen
 ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ carbon และ hydrogen มีดังนี้

$$C = 78.39\% \quad H = 10.59\%$$

คำนวณจากสูตร $C_{30}H_{48}O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 456 ได้

$$C = 78.95\% \quad H = 10.53\%$$



รูปที่ 5 IR. spectrum ของสาร C

2.5.3.2. การตรวจหา Functional group ของสาร C (24)

โดยใช้ standard Method พบว่า สาร C ฟอกสี Br_2 in CCl_4 ไม่
 ให้ฟองก๊าซ HBr ฟอกสี $KMnO_4$ ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2,4-DNP ไม่เปลี่ยน
 สีสารละลาย $FeCl_3$

ตารางที่ 8 (3)(20)

IR. Absorption peaks ของสาร C m.p. 279-80°C

Frequency (cm ⁻¹)	Band Type	Assignments
3540	broad	Stretching vibration of dimeric -OH
2950 - 2890	broad	H-bond with C = O to a carboxylic acid dimer band
1720, 1700	sharp	C = O stretching vibration
1680, 835	weak	C = C stretching vibration of trisubstituted double bond $CR_1R_2 = CR_3H$
1460	sharp	CH bending vibration of -CH ₂ -
1400	sharp	CH bending vibration of -CH ₃ (symmetrical)
1040	broad	C-O stretching vibration of 3β-OH in triterpenes
1370	weak	C-CH ₃ bending vibration Gem-di-methyl group

2.5.3.3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร C

Acetylation (27)

ละลายสาร C 500 มก. ใน pyridine กัดใหม่ ๆ 5 มล. เติม acetic anhydride 7 มล. ทำตามวิธี 2.4.1.3. จะได้กะกอนสีขาวหนัก 529 มก. ตกผลึก

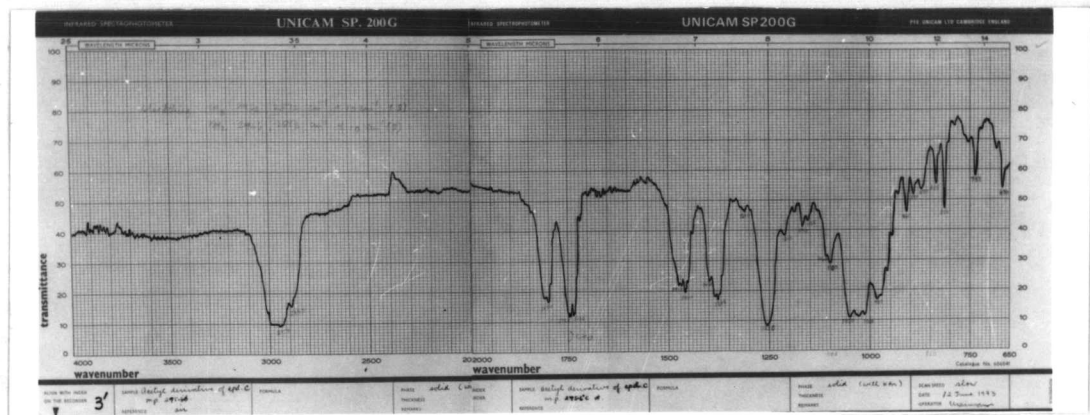
ใน methanol 5 ครั้ง ได้ผลดีกรุปเข็มเป็นกระจุก ไม่มีสี และเบาว่าเดิมหนัก 450 มก. มีจุดหลอมเหลวคงที่ 278-9°

ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ carbon และ hydrogen มีดังนี้

$$C = 77.15\% \quad H = 9.93\%$$

จากการคำนวณจากสูตร $C_{32}H_{50}O_4$ คือเพิ่ม $CH_3-C(=O)$ ให้กับ $C_{30}H_{48}O_3$ 1 หมู่ และ ลบ H 1 อะตอม ได้

$$C = 77.11\% \quad H = 10.04\%$$



รูปที่ 6 IR. spectrum ของ acetate ของสาร C

ตารางที่ 9 (3)(20)

IR. Absorption peaks ของ Acetate ของสาร C m.p. 278-9°

Frequency (cm ⁻¹)	Band Type	Assignments
2950 - 2890	broad	H-bond with C = O to a carboxylic acid dimer band
1800	sharp	C = O stretching vibration
1750	sharp	C = O stretching vibration
1680, 835	weak	C = C stretching vibration of trisubstituted double bond
		$CR_1R_2 = CR_3H$
1460, 1380	sharp	CH bending vibration of -CH ₂ - and -CH ₃ (symmetrical)
1250	sharp	C-O symmetric stretching of acetate -C-O-C- (so called acetate band)

Methylation (27)

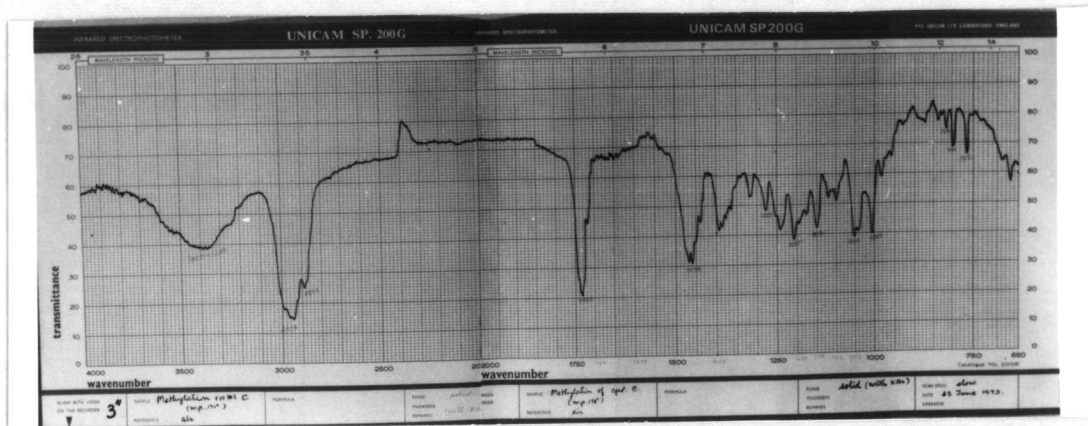
ละลายสาร C หนัก 200 มก. ใน dry acetone 25 มล. เติม Methyl iodide 4 มล. และ anhydrous Potassium Carbonate 5 กรัม เป็น Catalyst reflux บน water bath นาน 10 ชั่วโมง กรองตะกอน คัมของแข็งสีขาวที่กรองได้ใน dry acetone อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 10 มล. เพื่อละลายเอาสารอินทรีย์ที่ติดอยู่ออกให้หมด รวม dry acetone ที่กรองได้ทั้งหมด

ระเหยจนแห้ง จะได้ของแข็งสีขาวหนัก 185 มก. ตกผลึกด้วย methanol 3 ครั้ง
 จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวเป็นกระจุก และเป็นปุย หนัก 120 มก. มีจุดหลอมเหลว 171°
 ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ carbon และ hydrogen มีดังนี้

$$C = 79.57\% \quad H = 10.82\%$$

จากการคำนวณจากสูตร $C_{31}H_{50}O_3$ คือเพิ่ม $-CH_3$ 1 หมู่ และลด H
 1 อะตอมในสูตร $C_{30}H_{48}O_3$ ได้

$$C = 79.15\% \quad H = 10.64\%$$



รูปที่ 7 IR. spectrum ของ Methyl ester ของสาร C

ตารางที่ 10(3)(20)

IR. Absorption peaks ของ Methyl ester ของสาร C m.p. 171°

Frequency (cm ⁻¹)	Band Type	Assignments
3600 - 3200	very broad	Stretching vibration of dimeric -OH
2950, 2890	broad	H-bond with C = O to a carboxylic dimer
1740	sharp	C = O stretching vibration
1470, 1400	sharp	CH - bending vibration of -CH ₂ - and -CH ₃ (symmetrical)
1370	weak	C-CH ₃ bending vibration of Gem- dimethyl group
1150	sharp	asymmetric stretching of ester type R-CO-OCH ₃
1050, 1005	broad	C-O stretching vibration of 3β-OH in Triterpene
830	weak	C = C stretching vibration of trisubstituted double bond CR ₁ R ₂ = CR ₃ H

Hydrogenation (5) [\hat{H}]

ละลายสาร C หนัก 100 มก. ใน Absolute Ethanol 20 มล. เติม Pd-C 30 มก. เป็น Catalyst นำไปผ่าน H_2 -gas ที่ condition ปรกติ จนระดับ gas ใน burette ไม่ลดลงอีก นาน 2 ชั่วโมง กรอง Pd-C ออกให้หมด และล้างด้วย Absolute Ethanol ร้อนจำนวนเล็กน้อย ระเหยส่วนที่ กรองได้และตั้งไว้ให้ตกผลึก ได้ผลึกรูปเข็มใส หนัก 85 มก. มีจุดหลอมเหลว $275-7^\circ$ ตกผลึกซ้ำด้วย ethanol อีก 8 ครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มใส มีจุดหลอมเหลว $278-9^\circ$ เมื่อทำ Mixed melting point กับสาร C พบว่าจุดหลอมเหลวไม่เปลี่ยนแปลง และทำ TLC. เทียบกับสาร C โดยใช้ n-Butanol : Acetic acid : water = 7 : 1 : 1 มี Rf value เท่ากัน

แสดงว่า double-bond ในสาร C ไม่ถูก hydrogenate โดยใช้ condition ปรกติ จึงทดลองโดย hydrogenate ภายใต้ความกดดันสูง

Hydrogenation ภายใต้ความกดดัน 45 ปอนด์/ตารางนิ้ว [\hat{H}_p]

ละลายสาร C หนัก 200 มก. ใน Absolute Ethanol 50 มล. เติม Pd-C 50 มก. นำไปผ่าน H_2 -gas ภายใต้ความกดดัน 45 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 4 ชั่วโมง กรอง และตกผลึกเช่นเดียวกับการ hydrogenate ครั้งแรก ได้ผลึกรูป เข็มใส หนัก 120 มก. มีจุดหลอมเหลว $277-8^\circ$ และการทำ Mixed melting point กับสาร C หรือ กับ \hat{H} ก็ไม่เปลี่ยนแปลง ทำ TLC. เทียบกับสาร C และ \hat{H} มี Rf value เท่ากัน

วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ carbon และ hydrogen ได้ดังนี้

$$C = 78.94\% \quad H = 10.53\%$$

คำนวณจากสูตร $C_{30}H_{50}O_3$ คือการเพิ่ม H 2 อะตอม ให้กับ $C_{30}H_{48}O_3$

ได้

$$C = 78.60\% \quad H = 10.92\%$$

แต่จากการคำนวณจากสูตร $C_{30}H_{48}O_3$ ได้

C = 78.95% H = 10.53%

พบว่า ใกล้เคียงกับการคำนวณจากสูตร $C_{30}H_{48}O_3$ มากกว่า แต่เพื่อ
ยืนยันให้แน่ใจ จึงนำ \hat{H}_p ไปทำ Methylation อีก

Methylation ของ Hydrogenated Product (\hat{H}_p)

ละลาย \hat{H}_p หนัก 100 มก. ใน dry acetone 20 มล. เติม Methyl iodide 3 มล. และ anhydrous potassium carbonate 3 กรัม ทำเช่นเดียวกับการเตรียม Methylation ของสาร C ได้ของแข็งสีขาวหนัก 90 มก. ตกผลึกใน methanol 3 ครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวเป็นกระจุก หนัก 65 มก. มีจุดหลอมเหลว $171-2^\circ$ ทำ Mixed melting point กับ Methyl ester ของสาร C ซึ่ง มีจุดหลอมเหลว 171° แล้วไม่เปลี่ยนแปลง คือ หลอมที่ $171-2^\circ$ ทำ TLC เทียบกับ Methyl ester ของสาร C ใน methanol มี Rf value เท่ากัน

แสดงว่า สาร C และ hydrogenated product ของสาร C เป็นสารชนิดเดียวกันแน่นอน

นั่นคือ double bond ในสาร C ไม่ถูก hydrogenate โดย H_2 -gas ที่ใช้ Pd-C เป็น Catalyst ไม่ว่าที่ condition ปรกติ หรือภายใต้ความกดดัน 45 ปอนด์/ตารางนิ้วก็ตาม

Hydrogenation of Methyl ester ของสาร C ภายใต้ความกดดัน

45 ปอนด์/ตารางนิ้ว

ละลาย Methyl ester ของสาร C หนัก 100 มก. ใน Absolute Ethanol 25 มล. เติม Pd-C 30 มก. เป็น Catalyst ผ่าน H_2 -gas ภายใต้ความกดดัน 45 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 4 ชั่วโมง ทำเช่นเดียวกับการ hydrogenate สาร C ได้ตะกอนสีขาวหนัก 84 มก. ตกผลึกใน methanol 3 ครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มเบา

เป็นกระจุกหนัก 52 มก. มีจุดหลอมเหลว $171-2^{\circ}$ ทำ Mixed melting point กับ Methyl ester ของสาร C หลอมเหลวที่ $170-2^{\circ}$ และทำ TLC. เทียบกับ Methyl ester ของสาร C ก็มี Rf value เท่ากัน ซึ่งแสดงว่าสารที่ผ่านการ hydrogenate แล้วยังเป็น Methyl ester ของสาร C ตัวเดิม

การศึกษาและผลที่ได้จากการศึกษาทาง X-ray ใช้ผลึกเดี่ยวของสาร C

ผลึกที่ใช้มีลักษณะใส เป็นแผ่นราบคล้ายกระจุก แต่มีลักษณะยาว

ใช้ผลึกขนาด $2.5 \times 0.5 \times 0.1$ มม. กับ Mo K_{α} - Radiation

($\lambda_{K_{\alpha}} = 0.7107 \text{ \AA}$) โดยจัดผลึกให้หมุนได้รอบแกนยาวตามลักษณะภายนอกของผลึก (Needle axis) ซึ่งจะเรียกเป็น c-axis หรือ [001] axis

รูปถ่าย Diffraction	ผล
1. Oscillation Photograph	1.1. มี plane of symmetry (m หรือ σ_h) ตั้งฉากกับ [001] axis ซึ่งเป็นแกนหมุน 1.2. $c = 7.16 \text{ \AA}$
2. Weissenberg Photograph (hko) layer	2.1. มี plane of symmetry ตั้งฉากกับ 2 แกนที่เหลือ คือ a และ b axis สรุปว่า ผลึกนี้เป็น orthorhombic ($a \neq b \neq c$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$) 2.2. มี systematic absence $h \neq 2n$ หายไป อาจมี screw axis 2_1 ขนานกันกับ a-axis 2.3. พบว่า $a = 32.0 \text{ \AA}$ $b = 12.5 \text{ \AA} (\pm 0.1)$
3. Weissenberg Photograph (hk 1) และ (hk 2) layer	3.1. พบ symmetry plane เหมือนเดิม 2 planes 3.2. ไม่พบ systematic absence อื่น

การหาความหนาแน่นของสาร C โดย Floating Method (17)

ใส่ carbon tetrachloride 2 มล. ในหลอดทดลอง เติมผลึกสาร C 4 - 5 เก็ด็ด ซึ่งจะลอยอยู่บนผิวของตัวทำละลาย ค่อย ๆ หยก chlorobenzene ทีละหยก เขย่า จนกระทั่งเมื่อถึงหลอดตั้งไว้ ผลึกจะลอยอยู่ในสารละลายผสมของ carbon tetrachloride และ chlorobenzene ไม่จมลงก้นหลอดหรือลอยอยู่บนผิวของสารละลายอีก ใช้ pipette ดูด สารละลายผสม 2 มล. ไปชั่งน้ำหนักและหาความหนาแน่นเป็นกรัมต่อ มล. ของสารละลายผสม ความหนาแน่นนี้ก็คือ ความหนาแน่นของสาร C = 1.175543 กรัม/มล. ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ข้อมูลการหาความหนาแน่นของสาร C

ครั้งที่	น้ำหนักสารละลายผสม (กรัม)	ปริมาตรสารละลายผสม (มล.)	ความหนาแน่น (กรัม/มล.)	ความหนาแน่นเฉลี่ย (กรัม/มล.)
1	2.34933	2	1.17466	1.175543
2	2.34870	2	1.17435	
3	2.35102	2	1.17551	
4	1.17774	1	1.17774	
5	1.17568	1	1.17568	
6	1.17532	1	1.17532	

การคำนวณหาจำนวนโมเลกุลต่อ 1 unit cell ของสาร C

ให้ 1 unit cell มี Z โมเลกุล
 $\rho_{\text{observed}} = 1.1755$ กรัม/มด.

น.น.โมเลกุลของสาร C = 456

ความยาวทั้ง 3 ด้านของ unit cell จาก X-ray

$$= 12.5, 32.0, 7.16 \text{ \AA}$$

$$\therefore \text{Density} = 1.1755 = \frac{Z \times 456}{12.5 \times 32.0 \times 7.0 \times 10^{-24} \times 6.025 \times 10^{23}}$$

$$Z = 4.347$$

\therefore ใน 1 unit cell มี 4 โมเลกุล

การคำนวณหา Density โดยใช้ $Z = 4$

$$\rho_{\text{calc.}} = \frac{4 \times 456}{12.5 \times 32.0 \times 7.0 \times 10^{-24} \times 6.025 \times 10^{23}}$$

$$= 1.081 \text{ กรัม/มด.}$$