

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.1.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

งานวิจัยนี้เป็นการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทำการสกัดและแยกสิ่งสกัด ควบคู่ไปกับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ในขั้นตอนแรกได้สกัดสารจากหุ้มนอกของด้วยเอทานอล แล้วนำมาสกัดต่อด้วยเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอทิลเอซิเตต และบิวทานอล ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีของแข็งที่เหลือจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและน้ำ และของแข็งที่เหลือจากการสกัดด้วยบิวทานอลและน้ำ (แผนภาพที่ 1.1) เมื่อนำสิ่งสกัดต่าง ๆ ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เบื้องต้นพบว่าสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม ซึ่งมีองค์ประกอบ 2.19 % (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ที่ความเข้มข้น 0.10 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของราก และกาบใบของต้นข้าวมากที่สุด รองลงมาคือ สิ่งสกัดเอทิลเอซิเตต, เอทานอลที่เหลือ, เฮกเซน, บิวทานอล และน้ำที่เหลือ ซึ่งมีองค์ประกอบ 0.29 %, 1.01 %, 2.35 %, 0.29 % และ 6.02 % ( น้ำหนักโดยน้ำหนัก ) ตามลำดับ โดยจะพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 0.05 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ( ตารางที่ 2.1 ) เมื่อนำสิ่งสกัดเฮกเซนมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ๖๕ ส่วนย่อย SA<sub>11</sub>-SA<sub>1</sub> (ตารางที่ 2.3) พบว่า SA<sub>18</sub> ซึ่งมีองค์ประกอบ 1.66 % ( น้ำหนักโดยน้ำหนัก ) ทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวมากที่สุดคือ 100.00 % ต่อการงอกของรากและกาบใบ เมื่อทำการแยกซ้ำด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี จะได้น้ำมันสีคาบอยู่กับของแข็งสีเขียว ในลำดับส่วนที่ 6 - 20 ( ตารางที่ 2.4 ) ซึ่งเมื่อนำมาแยกซ้ำอีกครั้งโดยวิธีด้านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่าได้ของแข็งสีขาว ( สาร 7 ) ในลำดับส่วนที่ 11-25 ( ตารางที่ 2.5 ) ในลำดับส่วน SA<sub>17</sub> และ SA<sub>19</sub> พบว่าได้ สาร 7 ด้วย ส่วนที่ออกฤทธิ์รองลงมาคือ SA<sub>16</sub> มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองปนอยู่กับผลึกรูปเข็ม เมื่อแยกและทำ

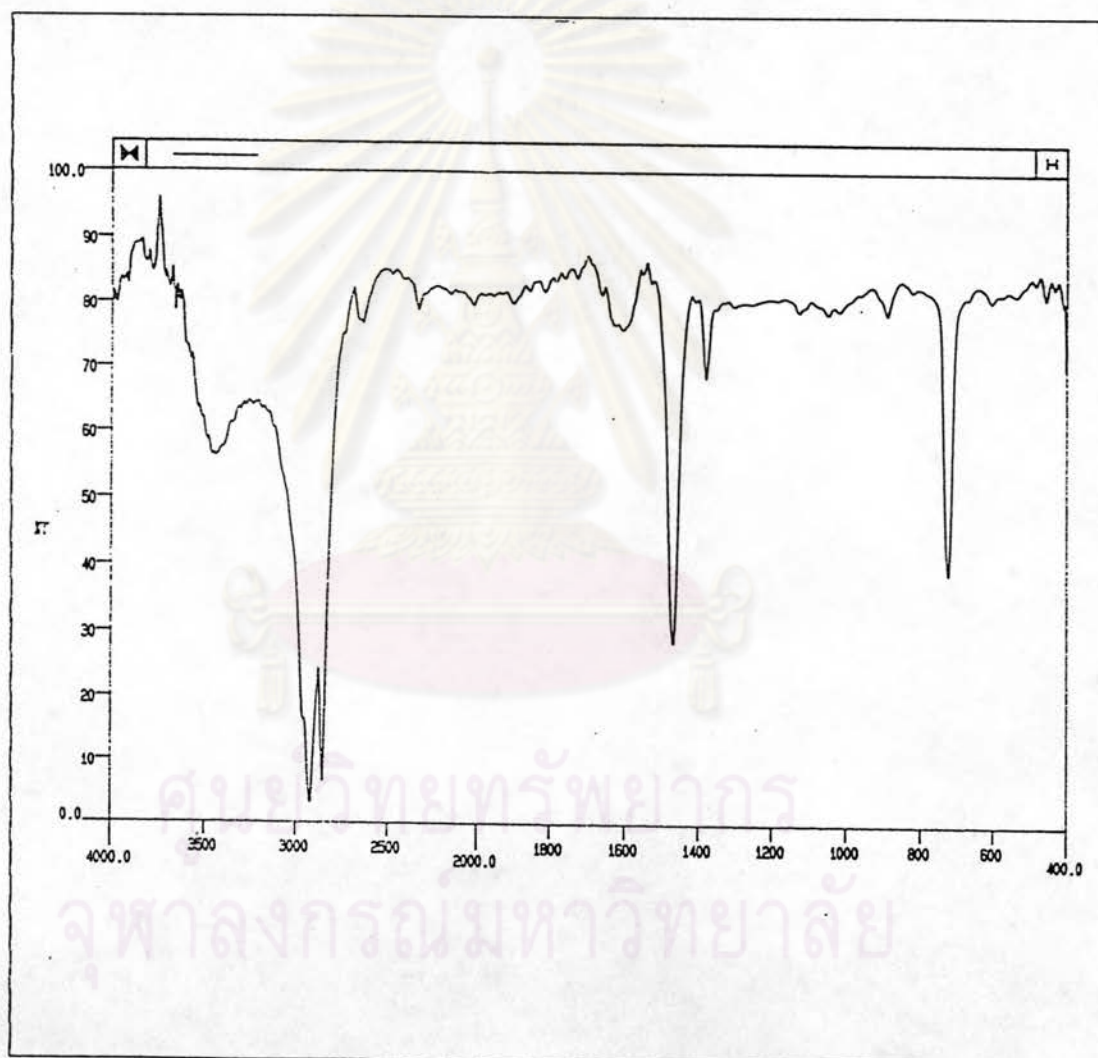
สารให้บริสุทธิ์จะได้ สาร 6 ซึ่งแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าวได้น้อย เมื่อนำสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวมากที่สุด มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนย่อย SA<sub>2</sub>1-SA<sub>2</sub>13 ( ตารางที่ 2.9 ) พบว่า SA<sub>2</sub>6 ซึ่งมีองค์ประกอบ 0.89 % (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ที่ทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวมากที่สุด เมื่อนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ สาร 10 รองลงมาคือ SA<sub>2</sub>7, SA<sub>2</sub>8, SA<sub>2</sub>9 และ SA<sub>2</sub>5 ซึ่ง SA<sub>2</sub>5 มีองค์ประกอบ 0.02 % (น้ำหนักโดยน้ำหนัก) เมื่อนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ สาร 9 ส่วนสิ่งสกัดเอทิล-แอลกอฮอล์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวรองจากคลอโรฟอร์ม เมื่อนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี จะได้ส่วนย่อย SA<sub>4</sub>1-SA<sub>4</sub>7 ( ตารางที่ 2.16 ) พบว่าส่วนย่อยต่าง ๆ ไม่แสดงผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว สิ่งสกัดบิวทานอล ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวรองจากเอทิลแอลกอฮอล์ เมื่อนำมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี จะได้ส่วนย่อย SA<sub>5</sub>1-SA<sub>5</sub>7 ( ตารางที่ 2.18 ) พบว่าส่วนย่อยต่าง ๆ เหล่านี้ไม่แสดงผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

### 3.2 การทำสารให้บริสุทธิ์และ การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้ในสิ่งสกัดเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม และบิวทานอลของหญ้าค้อนกลอง

#### 3.2.1 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร 1

สาร 1 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวแวววาว ได้จากลำดับส่วนที่ 1-6 (SA<sub>1</sub>1) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน ( ตารางที่ 2.1 ) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน เมื่อนำ สาร 1 มาตกผลึกด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อน จะได้แผ่นผลึกแวววาวสีขาวหนัก 0.79 กรัม ( 0.015 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก ) จุดหลอมเหลว 64.0-65.0 องศาเซลเซียส TLC ให้ค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.93 [ เฮกเซน: ไซคลอโรมีเทน ( 9:1 ) ] สาร 1 ละลายได้ดีในเฮกเซน และไซคลอโรมีเทน สาร 1 ให้ผลลบบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, 2,4-DNP, 5% FeCl<sub>3</sub> และ Br<sub>2</sub> ใน CCl<sub>4</sub> แสดงว่า สาร 1 ไม่ใช่สารประกอบประเภท สเตอโรยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ ไม่มีหมู่คาร์บอนิลในโมเลกุล, ไม่ใช่สารประกอบจำพวกฟีนอล แต่เป็นสารที่อิมตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.1) ปรากฏเฉพาะแถบการดูดกลืนแสงของหมู่  $-CH_3$  และ  $-CH_2-$  เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบปฏิกิริยาเคมี จากข้อมูลดังกล่าว สาร 1 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนระเจ็ตรง เหมือนมาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนระเจ็ตรงมาตรฐาน พบว่ามีลักษณะเหมือนกันทุกประการ (52) ข้อมูลของแถบการดูดกลืนแสงของ สาร 1 แสดงไว้ดังตารางที่ 3.1

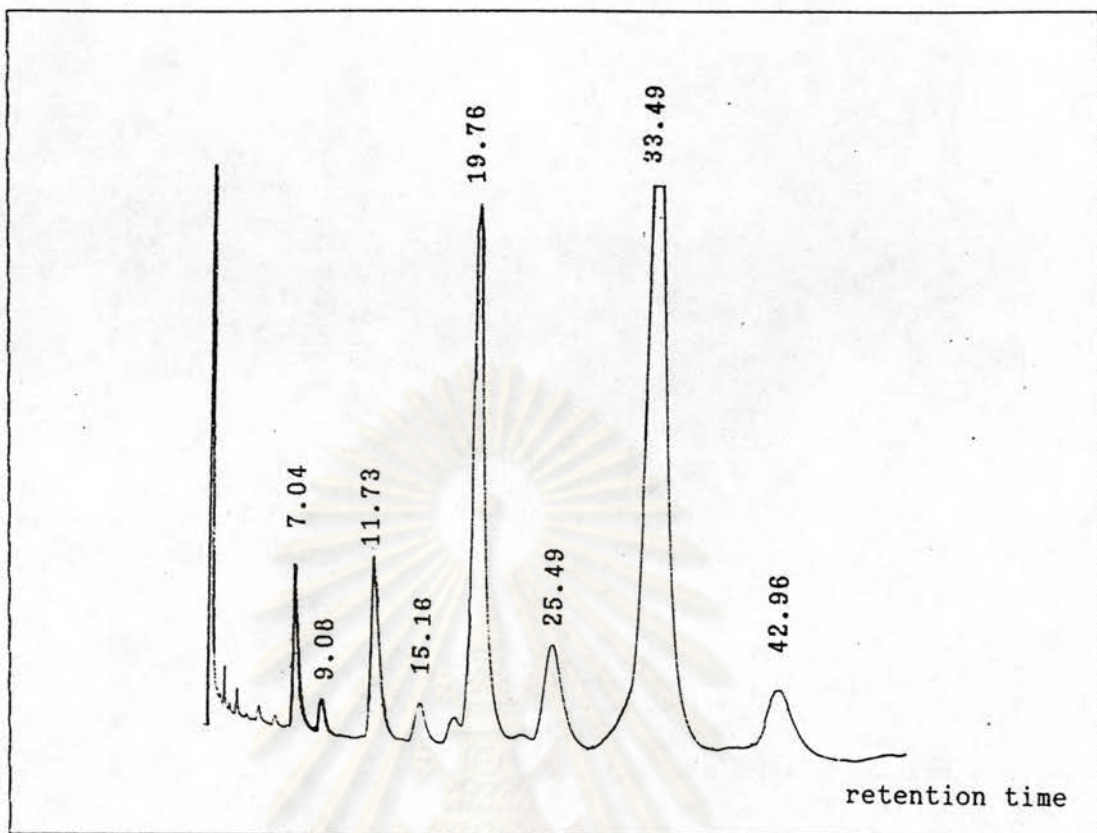


รูปที่ 3.1 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 1

ตารางที่ 3.1 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 1

| แถบการดูดกลืนแสง (cm. <sup>-1</sup> ) | ความเข้ม | แสดงลักษณะ   |
|---------------------------------------|----------|--|
| 2919, 2849                            | สูง      | C-H สั้นแบบยืดของ -CH <sub>2</sub> -, -CH <sub>3</sub>           |
| 1468                                  | ปานกลาง  | C-H สั้นแบบงอของ -CH <sub>2</sub> -                              |
| 1379                                  | ต่ำ      | C-H สั้นแบบงอของ -CH <sub>3</sub>                                |
| 725                                   | ปานกลาง  | C-H สั้นแบบงอแบบโคกลงของ (-CH <sub>2</sub> -) <sub>n</sub> , n>4 |

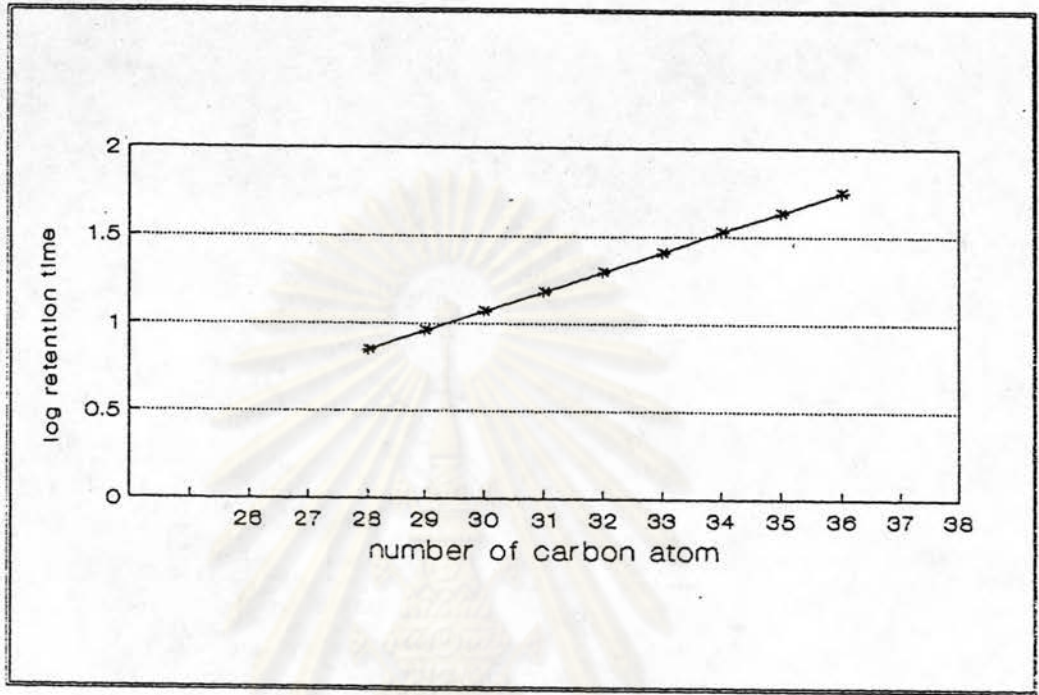
จากการทดสอบด้วยรีเอเจนต์ต่าง ๆ และข้อมูลทางสเปกตรัม พบว่า สาร 1 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนระเหยง่าย เมื่อนำ สาร 1 มาวิเคราะห์ด้วย แก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิของคอลัมน์ 260 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียส และการไหลของ N<sub>2</sub> 50 มิลลิลิตร/นาที) โดยเปรียบเทียบกับของผสมมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนระเหยง่าย ที่มีจำนวนคาร์บอน 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 และ 35 ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังในรูปที่ 3.2 เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของของผสมมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนระเหยง่าย ได้กราฟเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.2 แสดงแก๊สโครมาโทแกรมของของผสมไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงมาตรฐาน

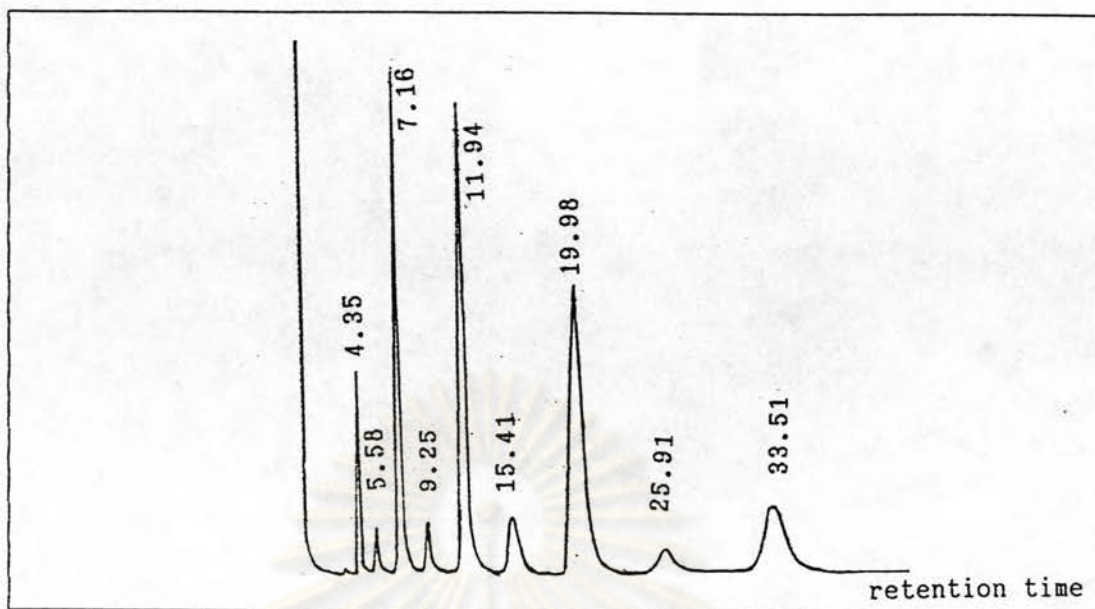
ตารางที่ 3.2 retention time ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงมาตรฐาน

| จำนวนคาร์บอน | retention time | log retention time |
|--------------|----------------|--------------------|
| 28           | 7.04           | 0.848              |
| 29           | 9.08           | 0.958              |
| 30           | 11.73          | 1.069              |
| 31           | 15.16          | 1.181              |
| 32           | 19.76          | 1.296              |
| 33           | 25.49          | 1.406              |
| 34           | 33.49          | 1.525              |
| 35           | 42.96          | 1.633              |



รูปที่ 3.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log retention time กับ  
จำนวนคาร์บอนของของผสมมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนระเหยง่าย

จากข้อมูลข้างต้น ทำให้ทราบว่า จำนวนคาร์บอนกับ log retention time มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง เมื่อนำ สาร 1 มาเปรียบเทียบกับของผสมมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนระเหยง่าย ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีดังรูปที่ 3.4 ได้ค่า retention time และคำนวณหาค่า log retention time โดยนำเทียบหาจำนวนคาร์บอนของ สาร 1 ได้ดังแสดงในตารางที่ 3.3



รูปที่ 3.4 แสดงแก๊สโครมาโทแกรมของ สาร 1

ตารางที่ 3.3 retention time ของ สาร 1

| retention time | log retention time | จำนวนคาร์บอน |
|----------------|--------------------|--------------|
| 4.35           | 0.638              | 26           |
| 5.58           | 0.747              | 27           |
| 7.16           | 0.855              | 28           |
| 9.25           | 0.966              | 29           |
| 11.94          | 1.077              | 30           |
| 15.41          | 1.187              | 31           |
| 19.98          | 1.301              | 32           |
| 25.91          | 1.414              | 33           |
| 33.51          | 1.525              | 34           |

จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.3) พบว่า สาร 1 เป็นของผสมของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนระเหยง่าย 6 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ไส้คาร์บอนตรงชนิดต่าง ๆ ใน สาร 1

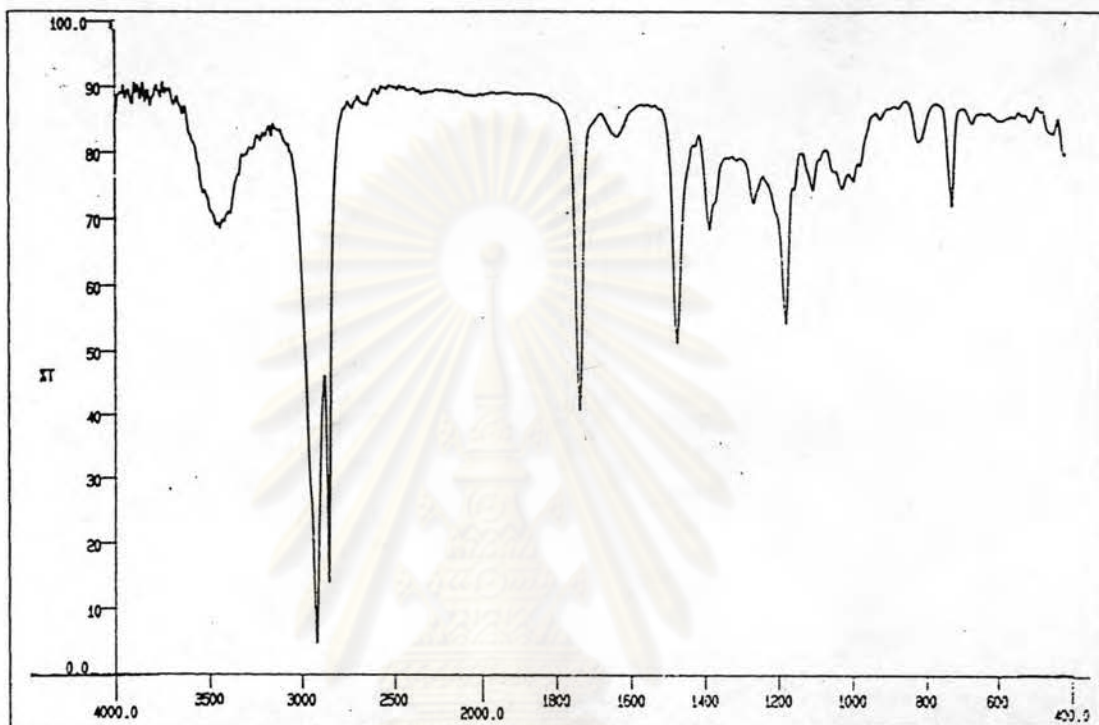
| ชื่อสารประกอบ    | สูตรโมเลกุล                     | สูตรโครงสร้าง  | มวลโมเลกุล | ปริมาณสาร (%) |
|------------------|---------------------------------|--|------------|---------------|
| hexacosane       | C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>24</sub> -CH <sub>3</sub> | 366        | 4.33          |
| heptacosane      | C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>25</sub> -CH <sub>3</sub> | 380        | 1.23          |
| octacosane       | C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>26</sub> -CH <sub>3</sub> | 394        | 17.51         |
| nonacosane       | C <sub>29</sub> H <sub>60</sub> | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>27</sub> -CH <sub>3</sub> | 408        | 2.25          |
| triacontane      | C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>28</sub> -CH <sub>3</sub> | 422        | 27.51         |
| hentriacontane   | C <sub>31</sub> H <sub>64</sub> | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>29</sub> -CH <sub>3</sub> | 436        | 4.17          |
| dotriacontane    | C <sub>32</sub> H <sub>66</sub> | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>30</sub> -CH <sub>3</sub> | 450        | 28.70         |
| tritriacontane   | C <sub>33</sub> H <sub>68</sub> | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>31</sub> -CH <sub>3</sub> | 364        | 3.36          |
| tetratriacontane | C <sub>34</sub> H <sub>70</sub> | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>32</sub> -CH <sub>3</sub> | 478        | 10.85         |

### 3.2.2 การทำสาร 2 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 2 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวอยู่ในน้ำมันสีเหลือง ซึ่งได้จากลำดับส่วนที่ 7-12 (SA<sub>1</sub>2) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 2.2) ซึ่งถูกชะด้วย เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (9:1) เมื่อนำ สาร 2 มาตกผลึกด้วยแอซิโตนร้อน จะได้ของแข็งสีขาวหนัก 0.23 กรัม ( $4.46 \times 10^{-3}$  % โดยน้ำหนักของหย้าก่อนกลองบดแห้ง) จุดหลอมเหลว 65.0-66.0 องศาเซลเซียส TLC ให้ค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.96 [เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน (9:1)] สาร 2 ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทนและคลอโรฟอร์ม แต่ละลายได้น้อยในเฮกเซน, เมทานอลและเอทานอล สาร 2 ให้ผลลบบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard แสดงว่า สาร 2 ไม่ใช่สารประกอบประเภท สเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ ให้ผลลบบกับ 2,4 DNP แสดงว่าไม่มีหมู่คาร์บอนิลของอัลดีไฮด์หรือคีโตนในโมเลกุล, นอกจากนี้ยังให้ผลลบบกับ 5% FeCl<sub>3</sub> และ Br<sub>2</sub> ใน CCl<sub>4</sub> แสดงว่า สาร 2 ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล แต่เป็นสารที่อิ่มตัวตามลำดับ



อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.5) แสดงแถบการดูดกลืนแสง ของ หมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ที่ความถี่  $1734 \text{ cm}^{-1}$  และแถบการดูดกลืนแสงอื่น ๆ ซึ่งเป็นลักษณะ เฉพาะของสารไฮดรคาร์บอน ข้อมูลการดูดกลืนแสงของ สาร 2 แสดงไว้ดังตารางที่ 3.5



รูปที่ 3.5 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 2

ตารางที่ 3.5 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 2

| แถบการดูดกลืนแสง ( $\text{cm}^{-1}$ ) | ความเข้ม | แสดงลักษณะ  |
|---------------------------------------|----------|---|
| 2918, 2851                            | สูง      | C-H สั่นแบบยืดของ $-\text{CH}_2-$ , $-\text{CH}_3$    |
| 1734                                  | สูง      | C=O สั่นแบบยืดของเอสเทอร์                             |
| 1470                                  | ปานกลาง  | C-H สั่นแบบงอของ $-\text{CH}_2-$ , $-\text{CH}_3$     |
| 1174                                  | ปานกลาง  | C-O สั่นแบบยืด  |
| 720                                   | ปานกลาง  | C-H สั่นแบบงอแบบโคลงของ $(-\text{CH}_2-)_n$ , $n > 4$ |

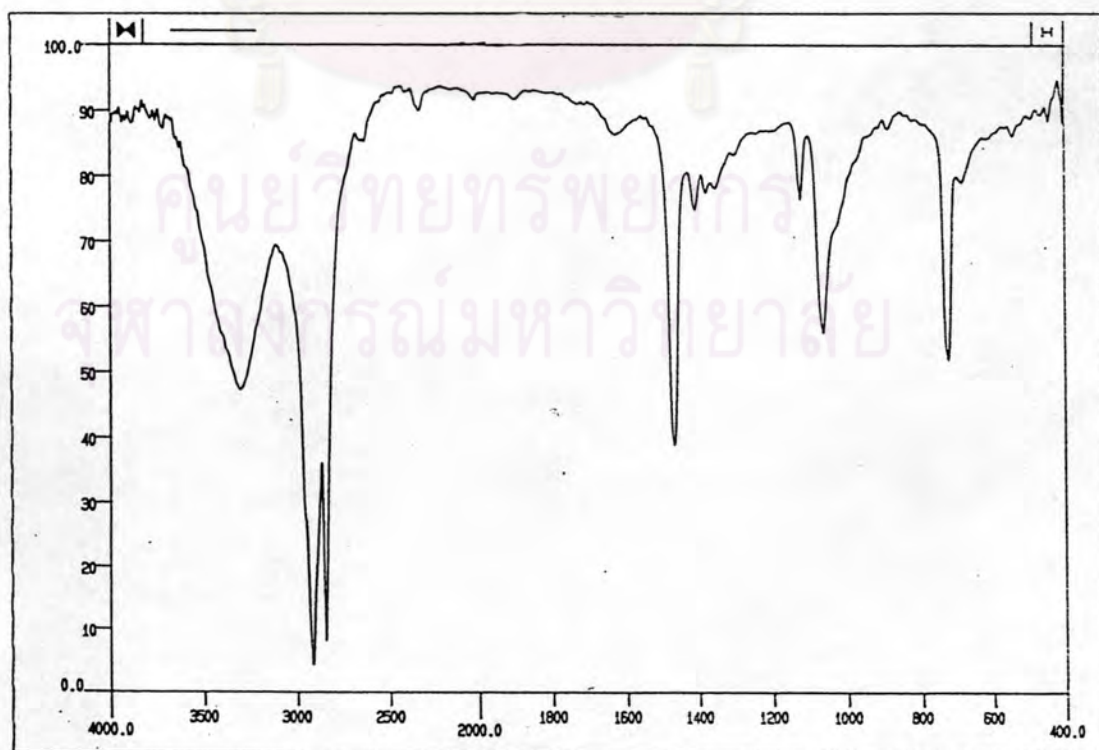
จากข้อมูลดังกล่าวทั้งหมดข้างต้น แสดงว่า สาร 2 น่าจะเป็น

สารประกอบประเภทเอสเทอร์โซ่ตรง

### 3.2.3 การทำสาร 3 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 3 มีลักษณะ เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวบนอยู่ในน้ำมันสีส้ม ได้จากลำดับส่วนที่ 13-16 (SA<sub>13</sub>) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีดังแสดงในตารางที่ 2.2 ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(17:3)เมื่อนำ สาร 3 มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล จะได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 1.03 กรัม ( $2.06 \times 10^{-2}$  % น้ำหนักโดยน้ำหนัก) จุดหลอมเหลว 77.0-78.0 องศาเซลเซียส TLC ให้ค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.54 [เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:1)] สาร 3 ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทนและคลอโรฟอร์ม ละลายได้น้อยในเฮกเซน, เมทานอล และเอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับ 5% FeCl<sub>3</sub> และ Br<sub>2</sub> ใน CCl<sub>4</sub> แสดงว่า สาร 3 ไม่ใช่สารประกอบจำพวกฟีนอล แต่เป็นสารที่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.6) แสดงแถบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ที่ความถี่ 3500-3100 ซม.<sup>-1</sup>(OH) และ 1063 ซม.<sup>-1</sup>(C-O) นอกจากนั้นพบแถบการดูดกลืนของหมู่ -CH<sub>3</sub> และ -CH<sub>2</sub>- ที่ต่อกันเป็นรัศตรงยาวเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของสารประกอบจำพวกแอลกอฮอล์รัศตรงยาวทั่วไป พบว่ามีลักษณะเหมือนกันทุกประการ(52) ข้อมูลการดูดกลืนแสงของ สาร 3 แสดงดังตารางที่ 3.6

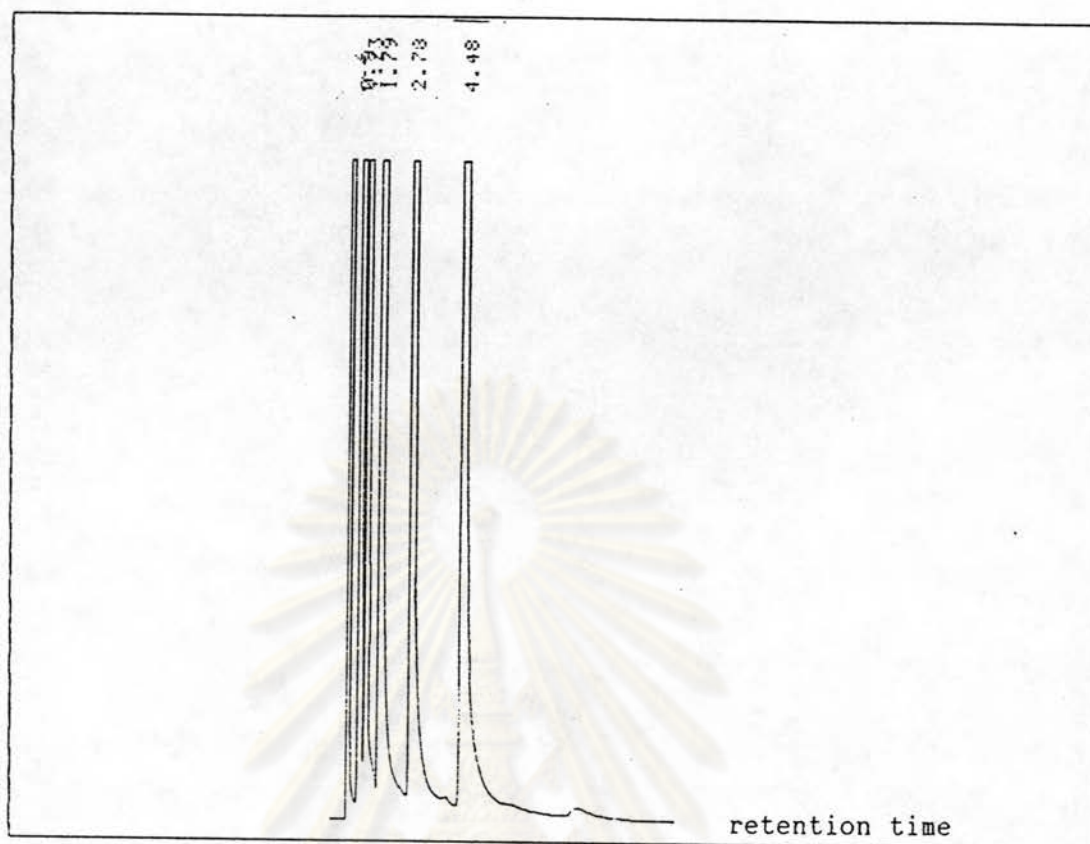


รูปที่ 3.6 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 3

ตารางที่ 3.6 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 3

| แถบการดูดกลืนแสง (ซม. <sup>-1</sup> ) | ความเข้ม | แสดงลักษณะ   |
|---------------------------------------|----------|--|
| 3500-3100                             | ปานกลาง  | O-H สั้นแบบยืดของ R-OH   |
| 2918, 2849                            | สูง      | C-H สั้นแบบยืดของ -CH <sub>2</sub> -, -CH <sub>3</sub>             |
| 1467                                  | ปานกลาง  | C-H สั้นแบบงอของ -CH <sub>2</sub> -, -CH <sub>3</sub>              |
| 1063                                  | ปานกลาง  | C-O สั้นแบบยืดและ O-H สั้นแบบงอ                                    |
| 723-684                               | ปานกลาง  | C-H สั้นแบบงอแบบโคลงของ (-CH <sub>2</sub> -) <sub>n</sub> ,<br>n>4 |

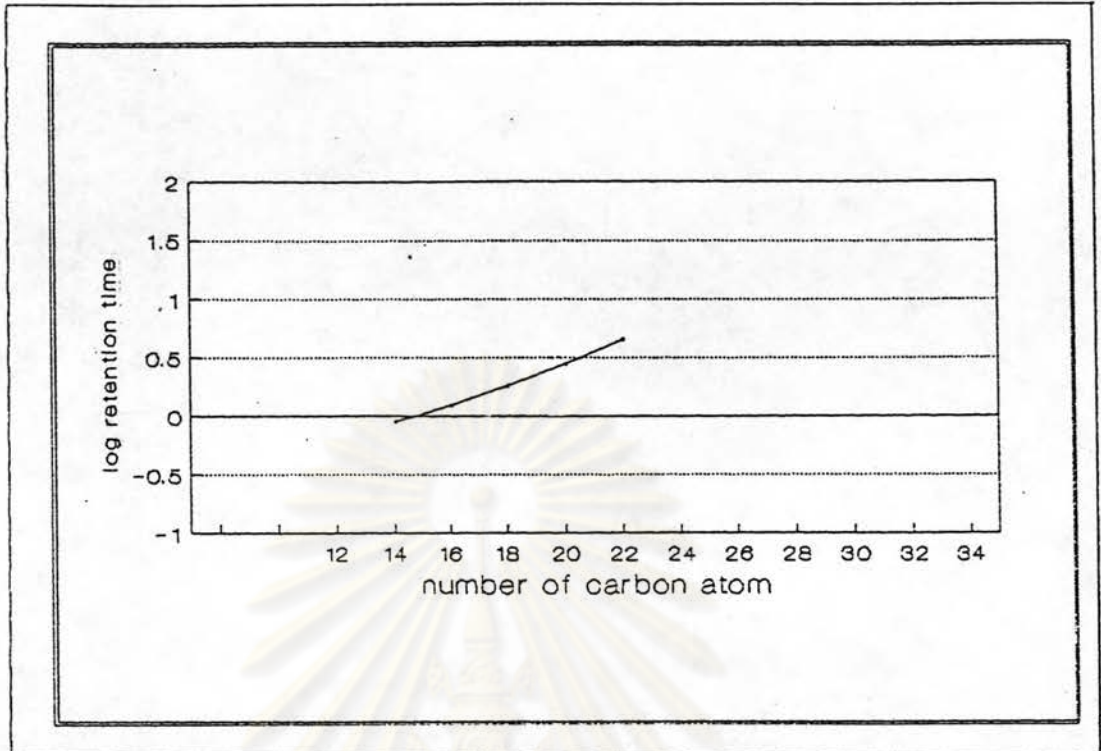
จากการทดสอบด้วยรีเอเจนต์ต่าง ๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่า สาร 3 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์รั่ตรง เมื่อนำ สาร 3 มาวิเคราะห์ด้วย แก๊สโครมาโทกราฟี ( คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียส และการไหลของ N<sub>2</sub> 50 มิลลิลิตร/นาที ) โดยเปรียบเทียบ กับของผสมมาตรฐานของแอลกอฮอล์รั่ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอน 14, 16, 18, 20 และ 24 ได้แก๊สโครมาโทแกรม ( รูปที่ 3.7 ) ซึ่งสร้างขึ้นโดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของของผสมมาตรฐานแอลกอฮอล์รั่ตรง ( รูปที่ 3.8 ) เมื่อนำค่า log retention time ของ สาร 3 มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเท่าที่ทราบ จำนวนคาร์บอนของ สาร 3 ได้ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.7



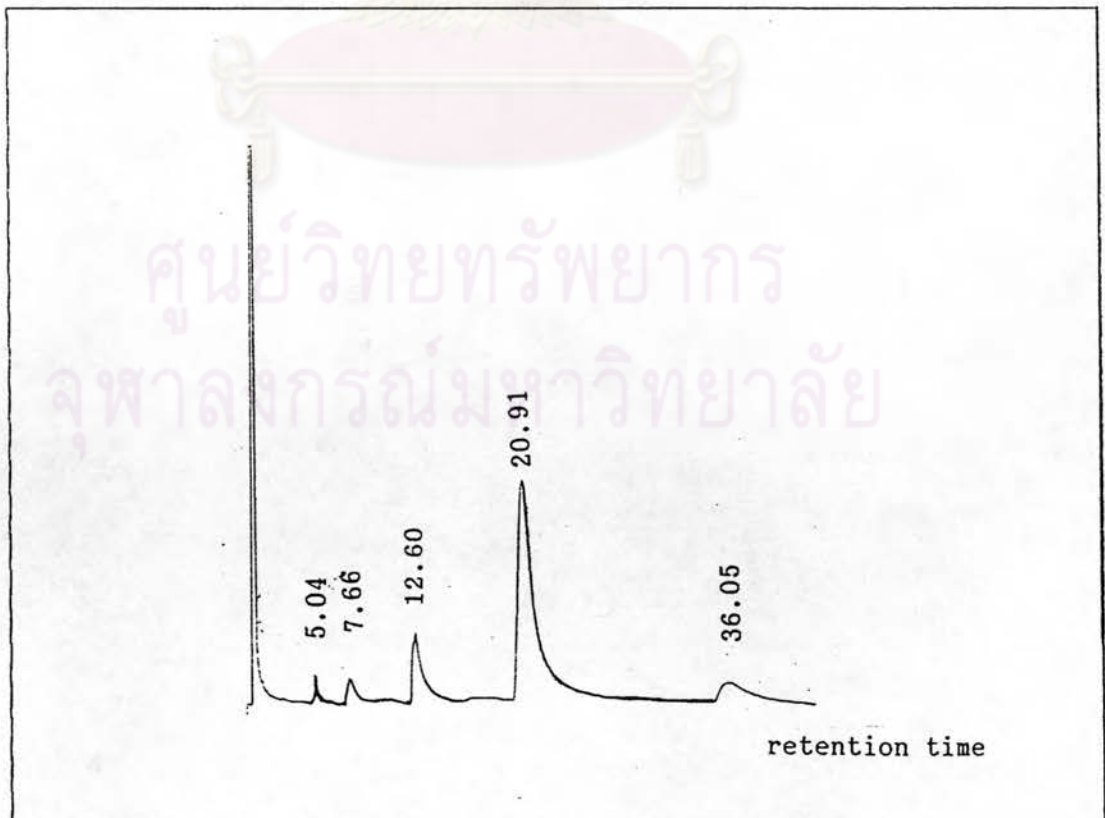
รูปที่ 3.7 แสดงแก๊สโครมาโทแกรมของของผสมมาตรฐานแอลกอฮอล์ไร้ตรง

ตารางที่ 3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของของผสมมาตรฐานแอลกอฮอล์ไร้ตรง

| จำนวนคาร์บอน | retention time (นาที) | log retention time |
|--------------|-----------------------|--------------------|
| 14           | 0.90                  | -0.045             |
| 16           | 1.23                  | 0.090              |
| 18           | 1.79                  | 0.252              |
| 20           | 2.78                  | 0.444              |
| 22           | 4.48                  | 0.651              |



รูปที่ 3.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของของผสมมาตรฐานแอลกอฮอล์ระเหยง่าย



รูปที่ 3.9 แสดงแก๊สโครมาโทแกรมของ สาร 3

ตารางที่ 3.8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของ สาร 3 กับจำนวนคาร์บอน

| สาร   | retention time (นาที) | log retention time | จำนวนคาร์บอน | ปริมาณสาร % |
|-------|-----------------------|--------------------|--------------|-------------|
| สาร 3 | 5.04                  | 0.702              | 23           | 0.49        |
|       | 7.66                  | 0.884              | 25           | 3.26        |
|       | 12.60                 | 1.100              | 27           | 14.49       |
|       | 20.91                 | 1.320              | 30           | 66.74       |
|       | 36.05                 | 1.557              | 33           | 12.06       |

จากข้อมูลในตารางที่ 3.8 และการเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 3.8)

ทำให้ทราบว่า สาร 3 เป็นของผสมของสารประกอบแอลกอฮอล์รั้งตรง 5 ชนิด ดังแสดงไว้ใน

ตารางที่ 3.9

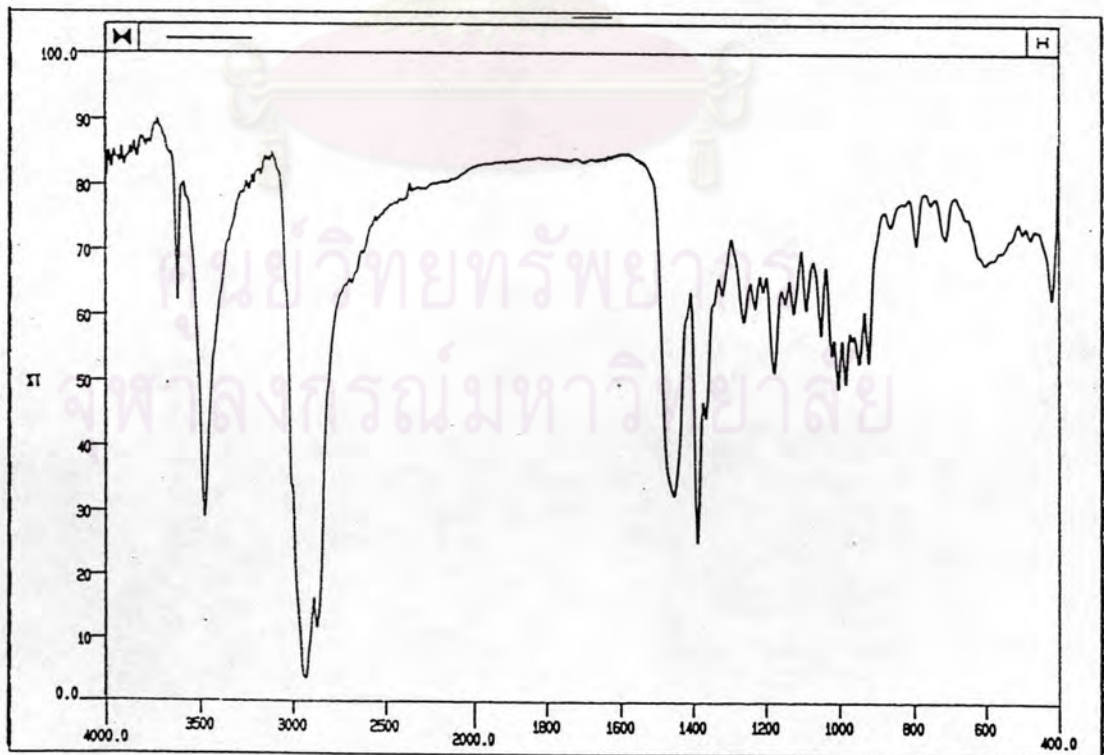
ตารางที่ 3.9 แอลกอฮอล์รั้งตรงชนิดต่าง ๆ ใน สาร 3

| ชื่อสารประกอบ   | สูตรโมเลกุล                       | สูตรโครงสร้าง   | มวลโมเลกุล | ปริมาณสาร (%) |
|-----------------|-----------------------------------|---|------------|---------------|
| propacosanol    | C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> O | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> -OH | 340        | 0.49          |
| pentacosanol    | C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> O | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>24</sub> -OH | 368        | 3.26          |
| heptacosanol    | C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> O | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>26</sub> -OH | 396        | 14.49         |
| triacontanol    | C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> O | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>29</sub> -OH | 438        | 66.74         |
| tritriacontanol | C <sub>33</sub> H <sub>68</sub> O | CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>32</sub> -OH | 480        | 12.06         |

### 3.2.4 การทาสาร 4 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 4 มีลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีขาวไม่มีสีรูปหกเหลี่ยมอยู่ในน้ำมันสีแดง ได้จากลำดับส่วนที่ 17-19 ( $SA_14$ ) จากการทาคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 3) ซึ่งถูกชะด้วยของผสมระหว่างเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (4:1) เมื่อนำ สาร 4 มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน จะได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 0.03 กรัม ( $6.0 \times 10^{-4}\%$  น้ำหนักโดยน้ำหนัก) จุดหลอมเหลว 278.0-280.0 องศาเซลเซียส TLC ให้ค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.66 [ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน(1:1)] สาร 4 ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม ละลายได้น้อยในเฮกเซน, เมทานอล และเอทานอล นอกจากนี้ยังให้สารละลายสีม่วงแดงกับ ปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ให้ผลลบกับ 5%  $FeCl_3$  และ 2,4-DNP และไม่พอกจางสี  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  แสดงว่า สาร 4 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไตรเทอร์พีนอยด์อิมตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.10) แสดงแถบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซิล(-OH) ที่ความถี่ 3500-3200  $cm^{-1}$  ข้อมูลการดูดกลืนแสงของ สาร 4 แสดงดังตารางที่ 3.10 (53)

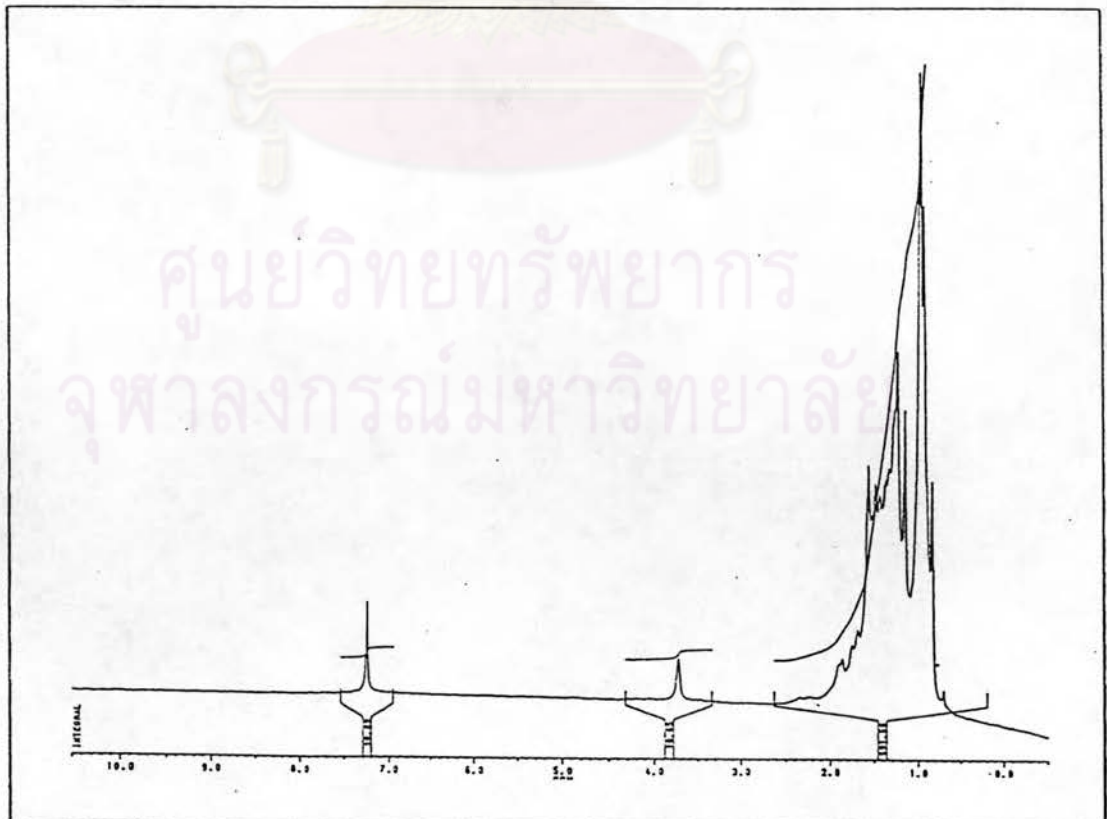


รูปที่ 3.10 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 4

ตารางที่ 3.10 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 4

| แถบการดูดกลืนแสง (cm. <sup>-1</sup> ) | ความเข้ม       | แสดงลักษณะ   |
|---------------------------------------|----------------|--|
| 3500-3200                             | ปานกลาง(กว้าง) | O-H สั้นแบบยืดของ R-OH                                 |
| 2990-2880                             | สูง            | C-H สั้นแบบยืดของ -CH <sub>2</sub> -, -CH <sub>3</sub> |
| 1450                                  | ปานกลาง        | C-H สั้นแบบงอของ -CH <sub>2</sub>                      |
| 1375, 1385                            | ปานกลาง        | C-H สั้นแบบงอของ gem-dimethyl                          |
| 1050, 1010                            | ปานกลาง        | C-O สั้นแบบยืดของ OH ที่ต่อกับวง                       |

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl<sub>3</sub>) ปรากฏสัญญาณของโปรตอน  
ที่  $\delta$  (ppm): 0.85-1.56 (m, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>- และ -CH<) และที่  $\delta$  (ppm): 3.72 (1H, s,  
>CH-OH) ดังรูปที่ 3.11 (53)



รูปที่ 3.11 แสดงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 4

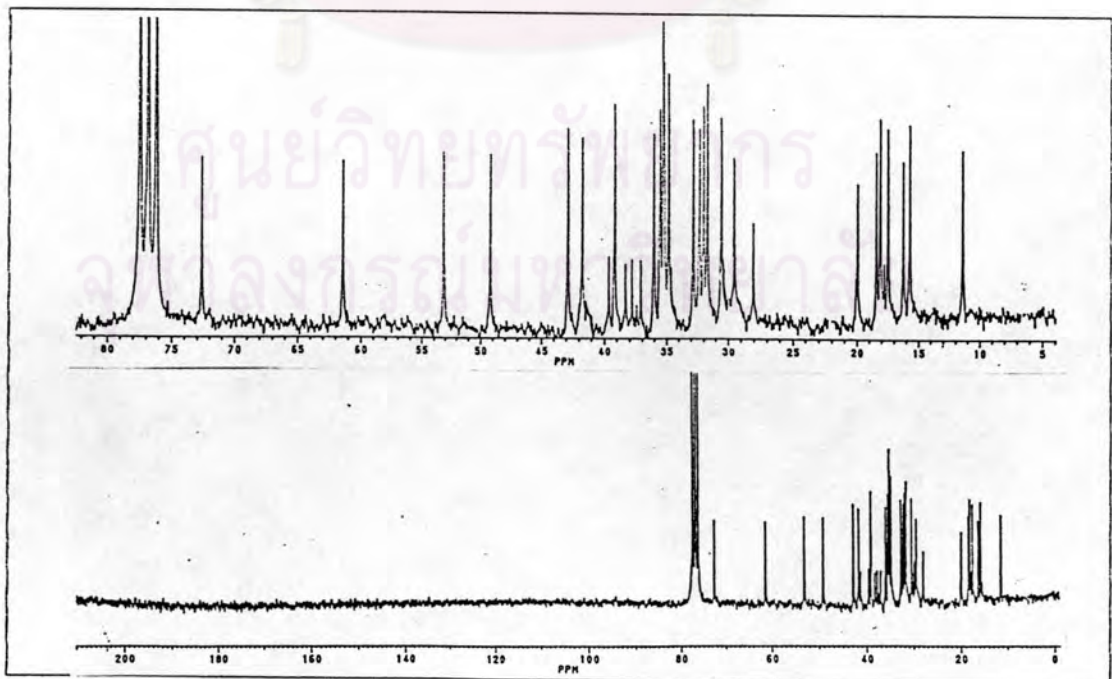


คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (  $\text{CDCl}_3$  ) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 30 สัญญาณที่  $\delta(\text{ppm})$ : 11.42, 15.73, 16.25, 17.48, 18.11, 18.45, 19.95, 28.10, 29.54, 30.55, 31.67, 31.99, 32.31, 32.83, 34.84, 35.23, 35.29, 35.54, 36.06, 37.17, 37.90, 38.42, 39.19, 39.71, 41.75, 42.89, 49.20, 53.17, 61.41 และ 72.63 ดังรูปที่ 3.12 (54)

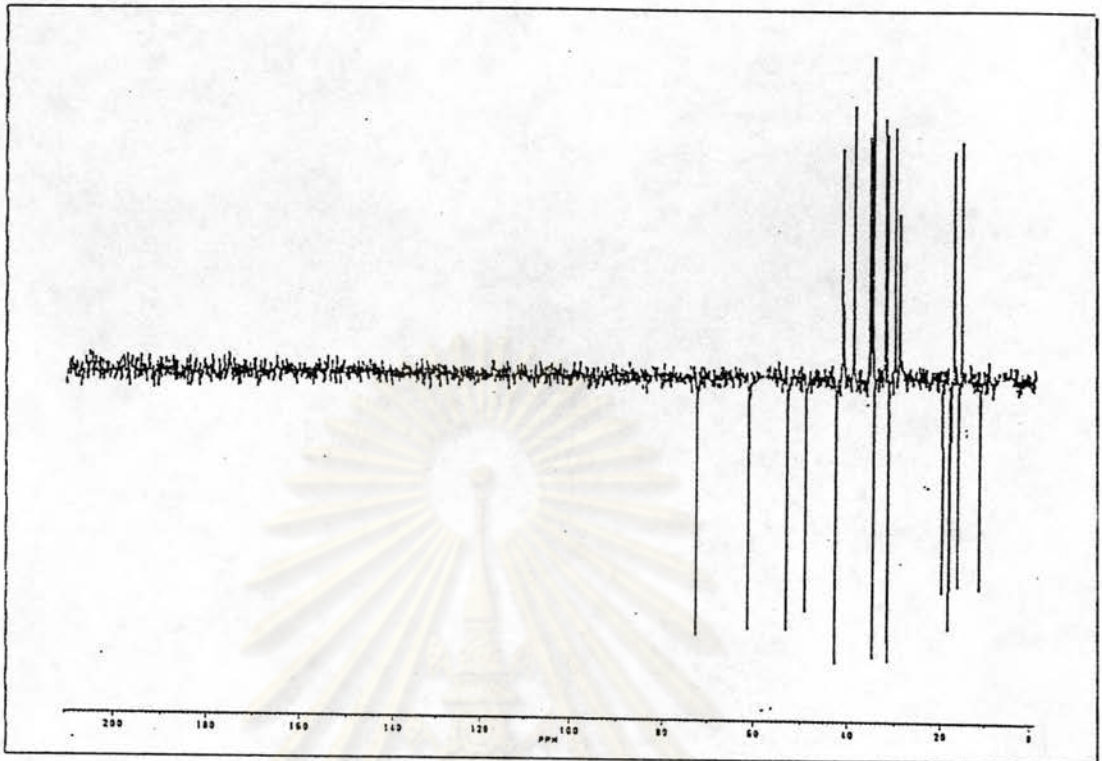
DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (  $\text{CDCl}_3$  ) ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ  $-\text{CH}<$ ,  $-\text{CH}_3$  13 สัญญาณคือ ที่  $\delta(\text{ppm})$ : 11.42, 16.25, 18.11, 18.45, 19.95, 31.67, 31.99, 34.84, 42.89, 49.20, 53.17, 61.41 และ 72.63

ปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ  $-\text{CH}_2-$  11 สัญญาณคือ ที่  $\delta(\text{ppm})$ : 15.73, 17.48, 29.54, 30.55, 32.31, 32.83, 35.29, 35.54, 36.06, 39.18 และ 41.75 ดังในรูปที่ 3.13

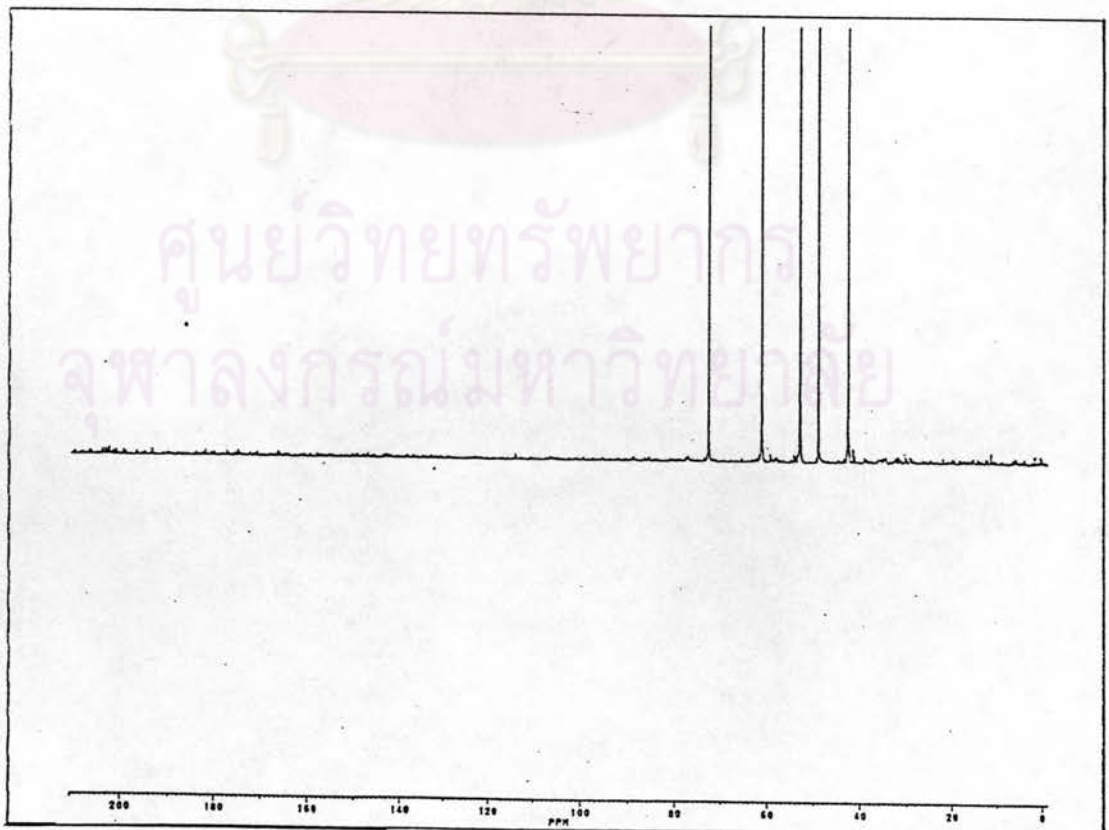
DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (  $\text{CDCl}_3$  ) ปรากฏสัญญาณของ  $-\text{CH}-$  5 สัญญาณคือที่  $\delta(\text{ppm})$ : 42.89, 49.20, 53.17, 61.41 และ 72.63 ดังรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.12 แสดงคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 4



รูปที่ 3.13 แสดง DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 4

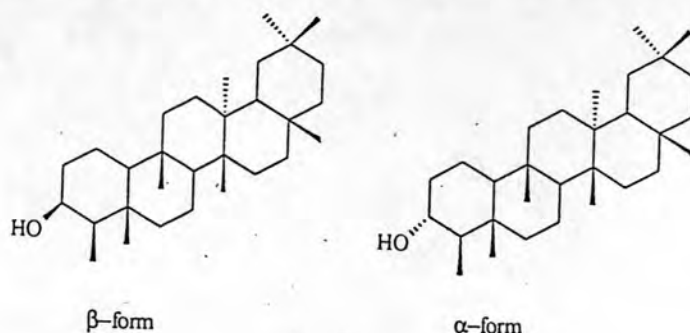


รูปที่ 3.14 แสดง DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 4

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 3.12) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 30 สัญญาณ และจากผลการทำ DEPT-135 และ DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมพบเมทาไธคาร์บอน (-CH-) ทั้งหมด 5 สัญญาณ, เมทิลีนคาร์บอน (-CH<sub>2</sub>-) 11 สัญญาณ, เมทิลคาร์บอน 8 สัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 11.42, 16.25, 18.11, 18.45, 19.95, 31.67, 31.99 และ 34.84 และควอเตอร์นารีคาร์บอน 6 สัญญาณ ที่  $\delta$  (ppm): 28.10, 35.23, 37.17, 37.90, 38.42 และ 39.71 ตามลำดับ จากข้อมูลข้างต้น ทำให้ทราบว่า สาร 4 ประกอบด้วยคาร์บอน 30 อะตอม ไฮโดรเจน 52 อะตอม (จาก -CH< 5 อะตอม, จาก -CH<sub>2</sub>- 22 อะตอม, จาก -CH<sub>3</sub> 24 อะตอม และจาก -OH 1 อะตอม) ดังนั้น สาร 4 น่าจะมีสูตรโมเลกุลเป็น C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O มีมวลโมเลกุล 428 เมื่อคำนวณความไม่อิ่มตัวจะได้เท่ากับ 5 ซึ่งต้องไม่ใช่น้ำตาล

จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพ, ทางเคมีและทางสเปกโทรสโกปีของ สาร 4 และเปรียบเทียบกับการศึกษาเอกสารอ้างอิงคาดว่า สาร 4 น่าจะเป็น friedelan-3 $\beta$ -ol (54) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม กับ friedelan-3 $\beta$ -ol ทำให้สามารถยืนยันโครงสร้างได้ชัดเจนยิ่งขึ้น และสามารถกำหนดสัญญาณที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้ดังแสดงในตารางที่ 3.11

สาร 4 อาจอยู่ในอีกไอโซเมอร์หนึ่งคือในรูปแอลฟา ( $\alpha$ -form) ความแตกต่างระหว่าง 2 รูปคือ จุดหลอมเหลวและค่า R<sub>f</sub> รูปบีตา ( $\beta$ -form) จะมีจุดหลอมเหลว 278.0-280.0 องศาเซลเซียส และมีค่า R<sub>f</sub> 0.68 (คลอโรฟอร์ม) ส่วน รูปแอลฟาจะมีจุดหลอมเหลว 288.0-290.0 องศาเซลเซียส และมีค่า R<sub>f</sub> 0.52 (คลอโรฟอร์ม) (53, 55, 56) จากการทดลองพบว่า สาร 4 มีจุดหลอมเหลว 278.0-280 องศาเซลเซียส และมีค่า R<sub>f</sub> 0.66 (คลอโรฟอร์ม) แสดงว่า สาร 4 มีสูตรโครงสร้างเป็นรูป บีตา

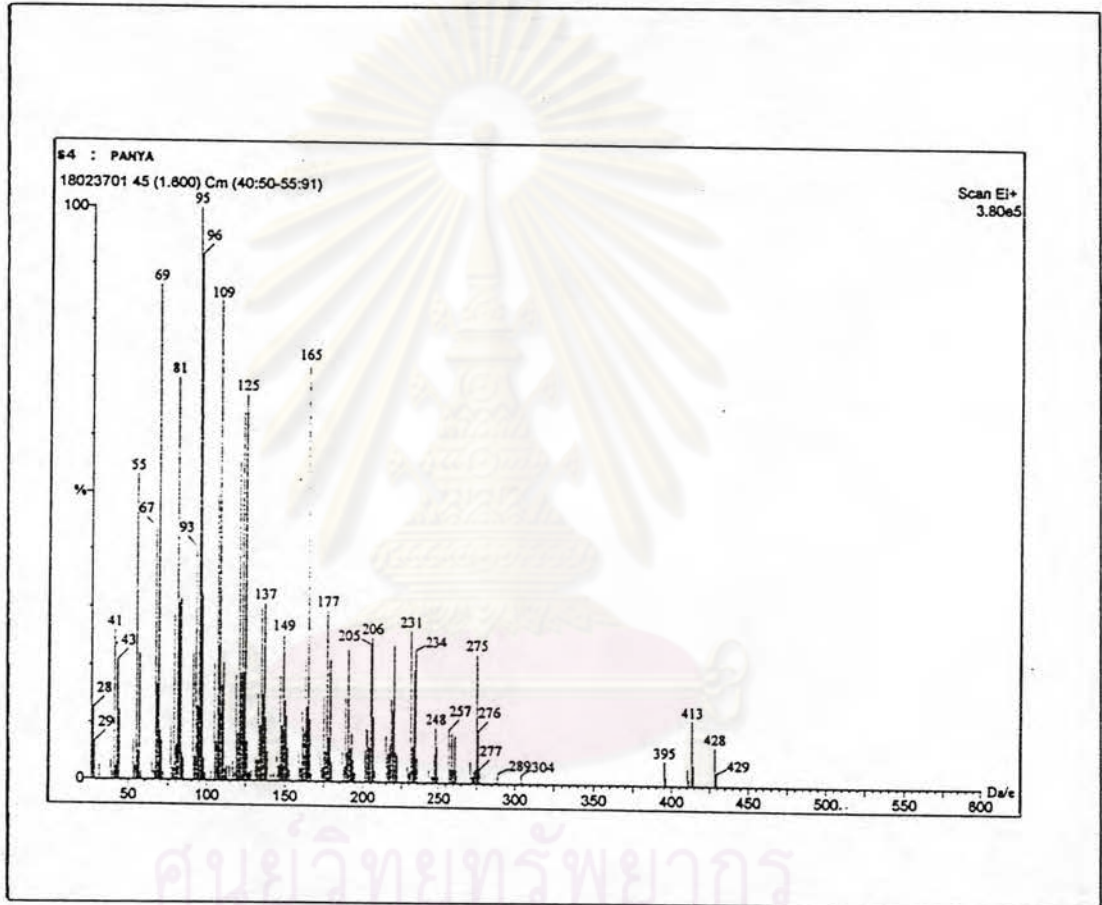


ตารางที่ 3.11 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 4 เมื่อเทียบกับ

friedelan-3 $\beta$ -ol (54)

| ตำแหน่ง<br>คาร์บอน | เคมีกัลซีฟท์ (ppm) |                             | ตำแหน่ง<br>คาร์บอน | เคมีกัลซีฟท์ (ppm) |                             |
|--------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|
|                    | สาร 4              | friedelan-<br>3 $\beta$ -ol |                    | สาร 4              | friedelan-<br>3 $\beta$ -ol |
| 1                  | 16.23              | 16.43                       | 16                 | 36.06              | 36.15                       |
| 2                  | 35.29              | 35.28                       | 17                 | 29.55              | 30.08                       |
| 3                  | 72.62              | 72.77                       | 18                 | 41.75              | 42.91                       |
| 4                  | 49.28              | 49.28                       | 19                 | 35.23              | 35.39                       |
| 5                  | 37.90              | 37.90                       | 20                 | 28.10              | 28.22                       |
| 6                  | 41.75              | 41.81                       | 21                 | 32.84              | 32.90                       |
| 7                  | 17.48              | 17.60                       | 22                 | 39.71              | 39.34                       |
| 8                  | 53.17              | 53.25                       | 23                 | 11.42              | 11.59                       |
| 9                  | 37.17              | 37.17                       | 24                 | 15.73              | 15.84                       |
| 10                 | 61.42              | 61.44                       | 25                 | 18.11              | 18.27                       |
| 11                 | 35.54              | 35.63                       | 26                 | 18.45              | 18.66                       |
| 12                 | 30.55              | 30.69                       | 27                 | 19.95              | 20.13                       |
| 13                 | 38.42              | 38.35                       | 28                 | 31.98              | 32.12                       |
| 14                 | 39.19              | 39.72                       | 29                 | 34.83              | 35.04                       |
| 15                 | 32.31              | 32.40                       | 30                 | 31.67              | 31.81                       |

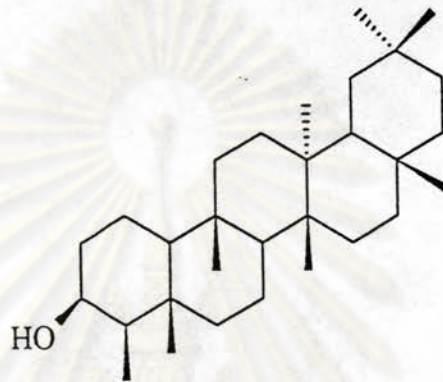
แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโรมเลข (M<sup>+</sup>) ที่ m/e (% relative intensity) 428(8.06) นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 413(12.04), 395(5.02) 304 (2.15), 275(23.15), 249(6.22), 233(19.55), 218(14.52), 207(11.27), 205(23.86), 195(1.51), 193(8.43) และ 165(72.73) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.15



รูปที่ 3.15 แสดง แมสสเปกตรัมของ สาร 4

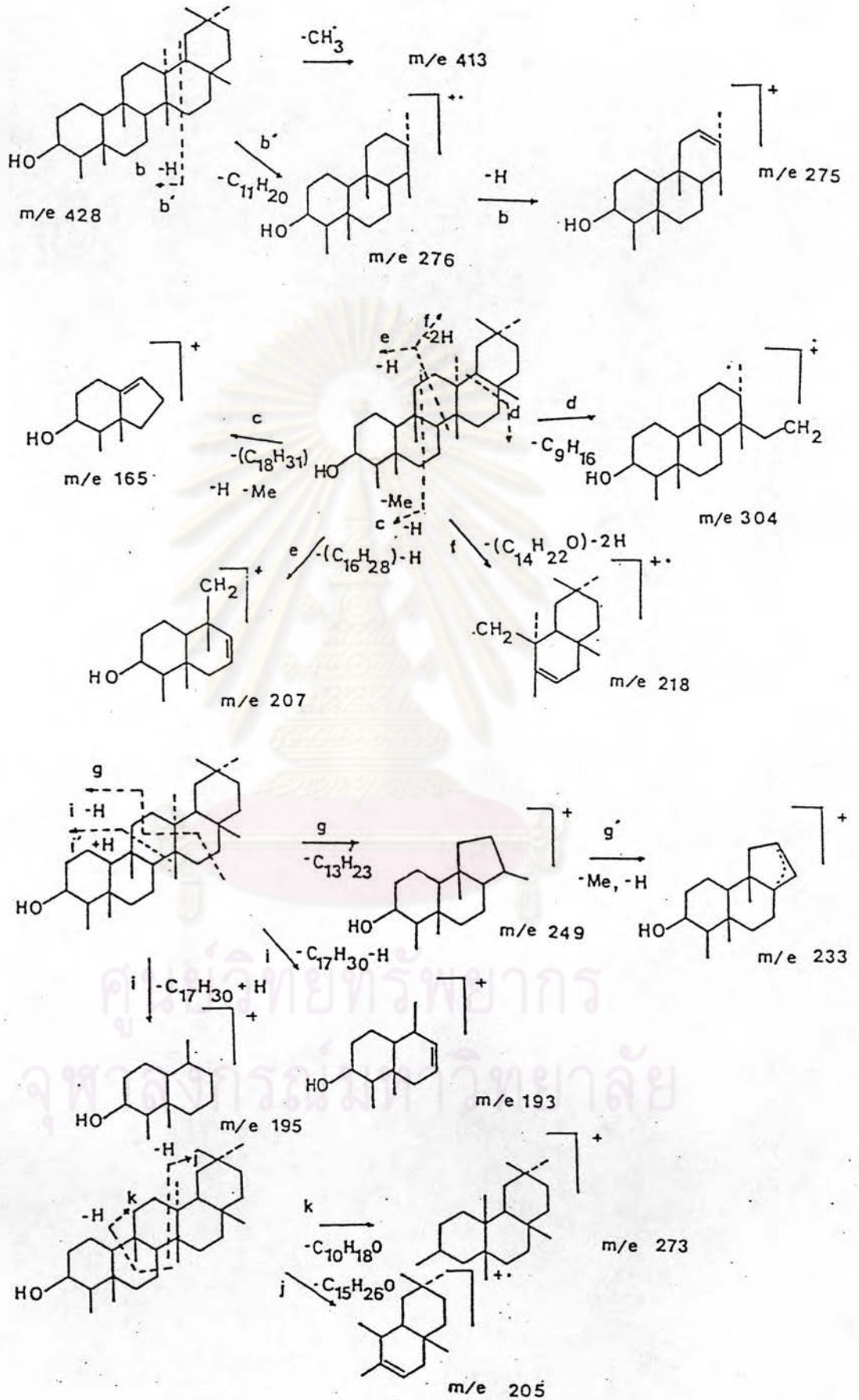
เมื่อพิจารณาการแตกตัวเป็นชิ้นส่วนของ สาร 4 พบว่ามีรูปแบบการแตกเป็นชิ้นส่วนเช่นเดียวกับ friedelan-3 $\beta$ -ol ทุกประการ (57) ดังแผนภาพที่ 3.2

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 3.15) ปรากฏพีคของไอออนเชิงโรมเลข (M<sup>+</sup>) ที่ m/e 428 เมื่อนำมาคำนวณหาสูตรโมเลกุลได้เป็น C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O ซึ่งพบว่า สอดคล้องกับข้อมูลของ ไรบรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม เพราะฉะนั้น สาร 4 คือ friedelan-3 $\beta$ -ol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



สาร 4 friedelan-3β-ol

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภาพที่ 3.1 แสดงรูปแบบการแตกตัวของ สาร 4 (58)

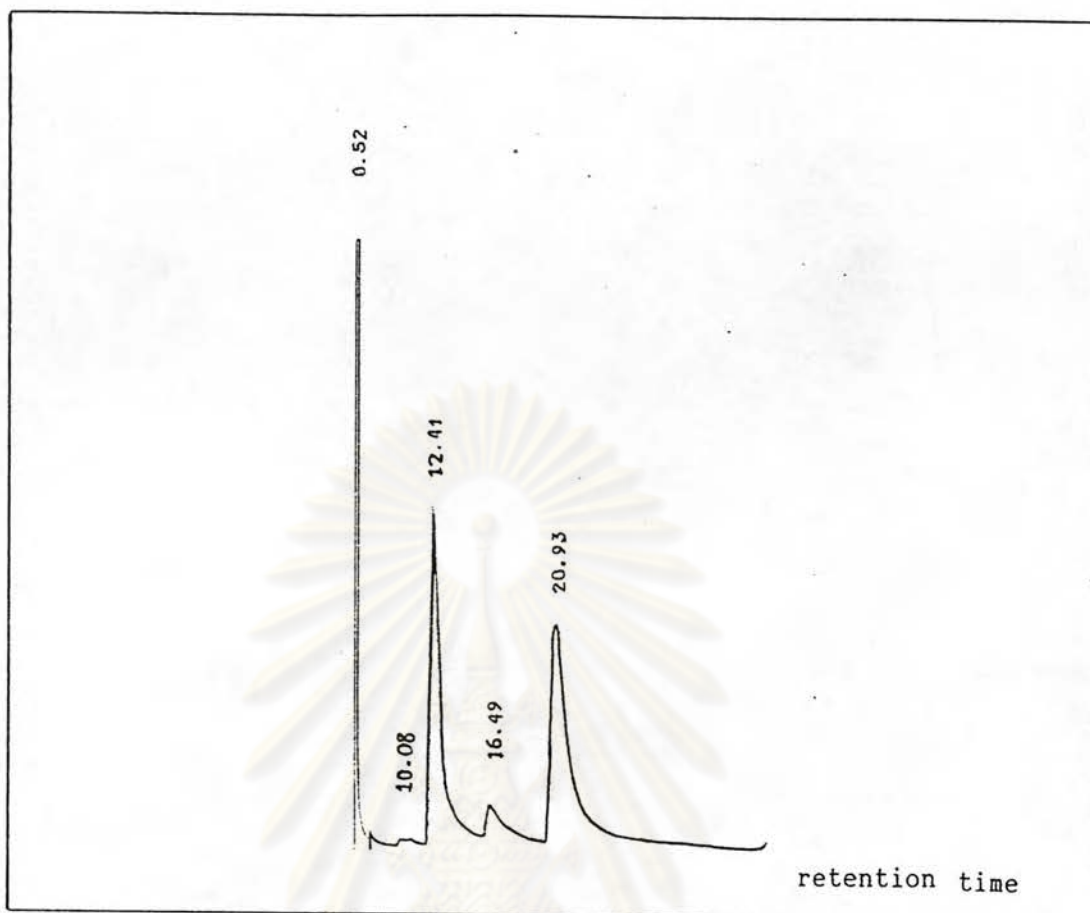
### 3.2.5 การทำสาร 5 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 5 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวบนอยู่ในน้ำมันสีส้ม ใต้จากลำดับส่วนที่ 20-22 (SA<sub>15</sub>) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 2.2) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (7:3) เมื่อนำ สาร 5 มาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล จะได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 3.71 กรัม ( $7.42 \times 10^{-2}$  % น้ำหนักโดยน้ำหนัก) จุดหลอมเหลว 77.0-78.0 องศาเซลเซียส TLC ให้ค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.55 [เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(7:1)] สาร 5 ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทนและคลอโรฟอร์มละลายน้อยในเฮกเซน, เมทานอล และเอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลกับ 5% FeCl<sub>3</sub> และ Br<sub>2</sub> ใน CCl<sub>4</sub> แสดงว่า สาร 5 ไม่ใช่สารประกอบจากพวกฟีนอล แต่เป็นสารที่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแถบการดูดกลืนแสง เช่นเดียวกับ สาร 3 ดังรูปที่ 3.6 ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ ที่ความถี่ 3500-3100  $\text{cm}^{-1}$ (OH) และ 1062  $\text{cm}^{-1}$ (C-O) นอกจากนั้นพบเพียงแถบการดูดกลืนของหมู่ -CH<sub>3</sub> และ -CH<sub>2</sub>- ที่ต่อกันเป็นโซ่ตรงยาวเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของแอลกอฮอล์โซ่ตรงยาวทั่วไป พบว่ามีลักษณะเหมือนกันทุกประการ (52)

จากการทดสอบด้วยรีเอเจนต์ต่าง ๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่า สาร 5 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์โซ่ตรง เมื่อนำ สาร 5 มาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ดังในหัวข้อ 3.2.3 ได้ค่า retention time 10.08, 12.41, 16.49, 20.93 และ 36.05 นาที ดังในรูปที่ 3.16 เมื่อนำค่า log retention time ของ สาร 5 มาเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปที่ 3.8 ทำให้ทราบจำนวนคาร์บอนของ สาร 5 ได้ว่า เป็นของผสมของสารประกอบแอลกอฮอล์โซ่ตรง 5 ชนิด ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.12





รูปที่ 3.16 แสดง แก๊สโครมาโทแกรมของ สาร 5

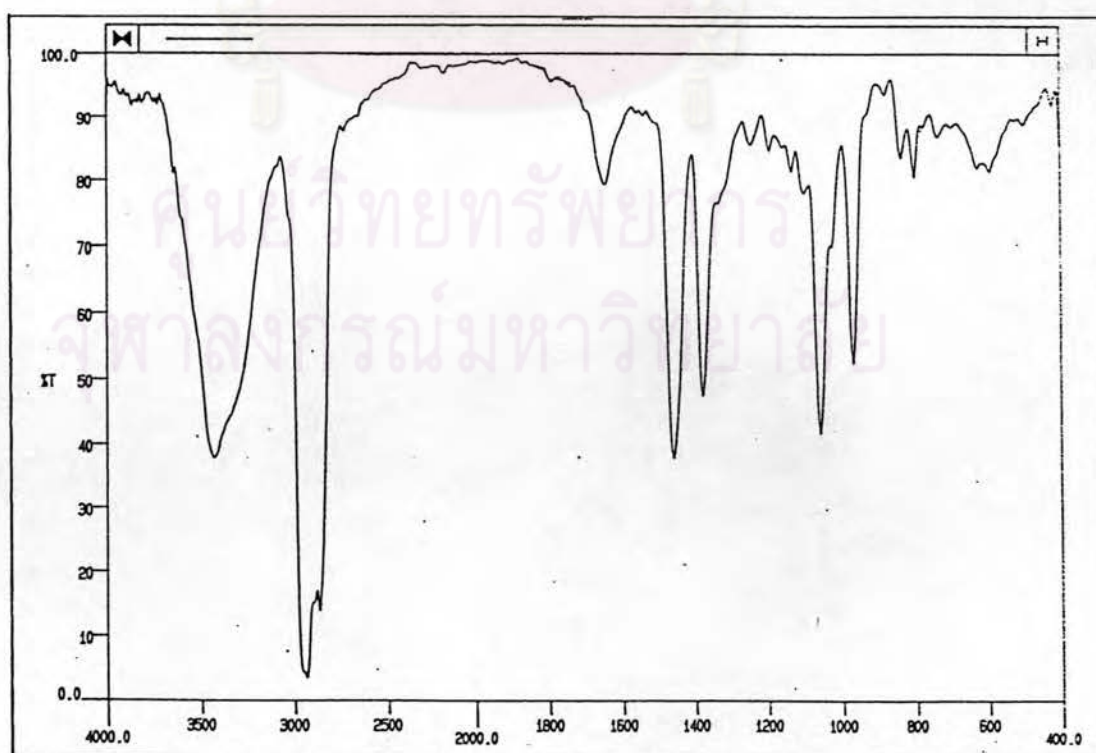
ตารางที่ 3.12 แอลกอฮอล์ตรงชนิดต่าง ๆ ใน สาร 5

| ชื่อสารประกอบ   | สูตรโมเลกุล     | สูตรโครงสร้าง         | มวลโมเลกุล | ปริมาณสาร (%) |
|-----------------|-----------------|-----------------------|------------|---------------|
| hexacosanol     | $C_{26}H_{54}O$ | $CH_3-(CH_2)_{25}-OH$ | 382        | 0.29          |
| heptacosanol    | $C_{27}H_{56}O$ | $CH_3-(CH_2)_{26}-OH$ | 396        | 39.67         |
| nonacosanol     | $C_{29}H_{60}O$ | $CH_3-(CH_2)_{28}-OH$ | 424        | 8.61          |
| triacontanol    | $C_{30}H_{62}O$ | $CH_3-(CH_2)_{29}-OH$ | 438        | 44.04         |
| tritriacontanol | $C_{33}H_{68}O$ | $CH_3-(CH_2)_{32}-OH$ | 480        | 6.89          |

### 3.2.6 การทำสาร 6 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 6 มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาวปนอยู่ในน้ำมันสีเหลือง ใต้จากลำดับส่วนที่ 23-28 (SA<sub>15</sub>) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 2.2) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2) ซึ่งเมื่อนำ สาร 6 มาตกผลึกด้วยเฮกเซน จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 1.32 กรัม ( $2.64 \times 10^{-2} \%$  น้ำหนักกรดน้ำหนัก) จุดหลอมเหลว 163.0 -164.0 องศาเซลเซียส (59) TLC ให้ค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.62 [เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)] สาร 6 ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม, อีเทอร์, เมทานอล, เอทานอล, แอซิโตนและเอทิลแอซิเตต ละลายได้น้อยในเฮกเซน สาร 6 ให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และพอกจางสี  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  แสดงว่า สาร 6 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ที่ไม่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.17) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่เป็นลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิลที่ความถี่ 3600-3300  $cm^{-1}$  นอกจากนี้ยังแสดง disubstituted vinyl ที่ความถี่ 969  $cm^{-1}$  และ trisubstituted vinyl ที่ความถี่ 838 และ 802  $cm^{-1}$  ข้อมูลการดูดกลืนแสงของ สาร 6 (60) แสดงไว้ในตารางที่ 3.13



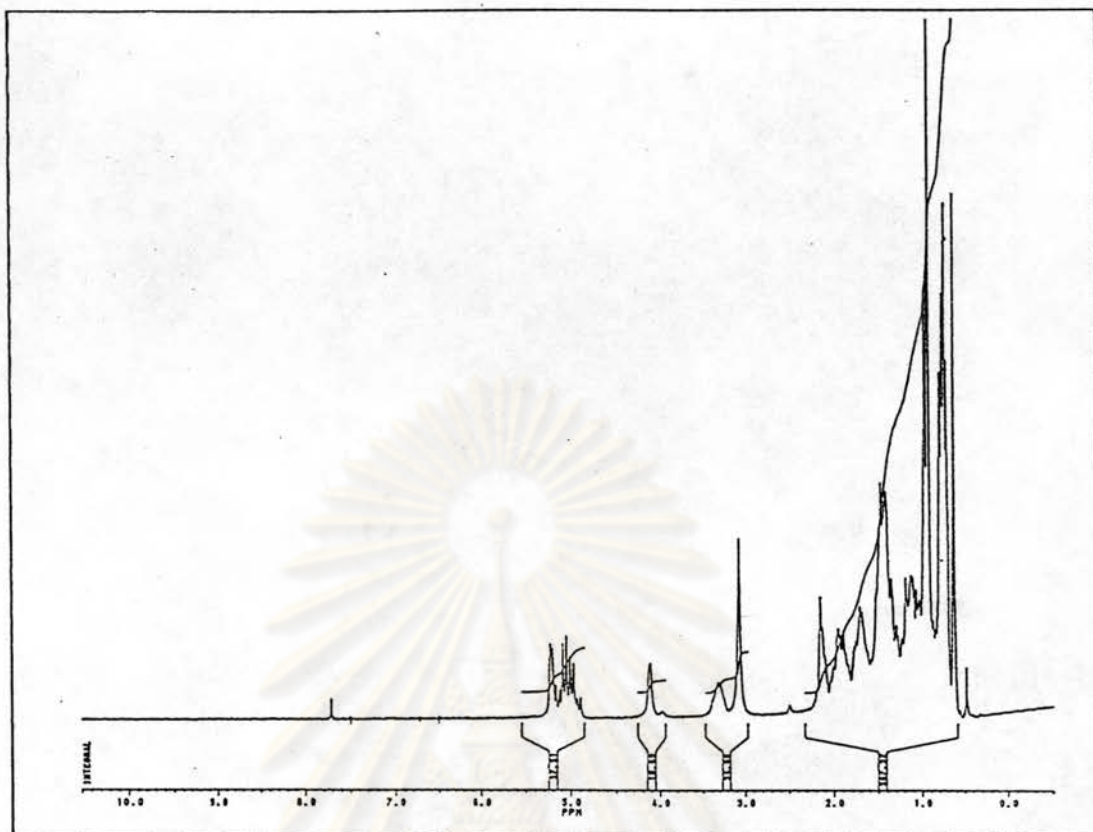
รูปที่ 3.17 แสดง อินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 6

ตารางที่ 3.13 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 6

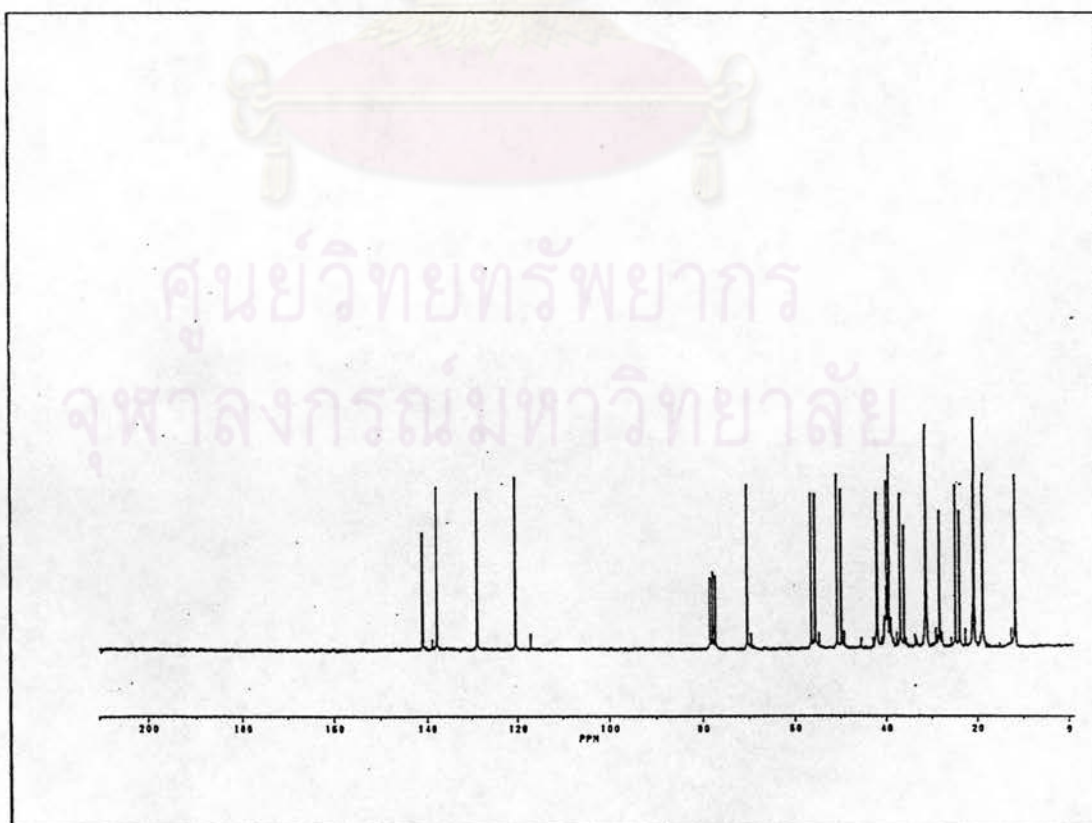
| แถบการดูดกลืนแสง (cm. <sup>-1</sup> ) | ความเข้ม | แสดงลักษณะ  |
|---------------------------------------|----------|---|
| 3600-3300                             | ปานกลาง  | O-H สั้นแบบยืดของ R-OH  |
| 2937-2867                             | สูง      | C-H สั้นแบบยืดของ -CH <sub>2</sub> -, -CH <sub>3</sub>                    |
| 1645                                  | ต่ำ      | C=C สั้นแบบยืดของอัลคีน   |
| 1459-1377                             | ปานกลาง  | C-H สั้นแบบงอของ -CH <sub>2</sub> -, -CH <sub>3</sub>                     |
| 1377                                  | ปานกลาง  | C-H สั้นแบบงออย่างมีสมมาตรของ -CH <sub>3</sub>                            |
| 1058                                  | ปานกลาง  | C-O สั้นแบบยืดและ O-H สั้นแบบงอ   |
| 969                                   | ต่ำ      | C-H สั้นแบบงอนอกระนาบของ R <sub>1</sub> CH=CHR <sub>2</sub>               |
| 838, 802                              | ต่ำ      | C-H สั้นแบบงอนอกระนาบของ R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> C=CHR <sub>3</sub> |

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( รูปที่ 3.18 ) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนของหมู่ -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-, -CH< ของสเตอรอยด์ ที่ δ (ppm): 0.50-2.50 นอกจากนี้ที่ δ (ppm): 3.37 แสดงโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซี, ที่ 5.00 แสดง -CH=CH- และที่ 5.22 แสดง >C=CH- จากข้อมูลโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมดังกล่าวพบว่ามี ลักษณะของสเปกตรัมเหมือนกับ stigmasterol ทุกประการ (61)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl<sub>3</sub>) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 28 สัญญาณคือที่ δ(ppm): 11.68, 11.84, 18.67, 19.01, 20.68, 20.83, 23.91, 24.87, 28.38, 31.26, 31.36, 31.44, 31.58, 36.11, 36.97, 39.26, 39.91, 41.77, 42.05, 49.77, 50.71, 55.51, 56.41, 70.37, 120.45, 128.80, 137.84 และ 140.95 (62) ดังรูปที่ 3.19

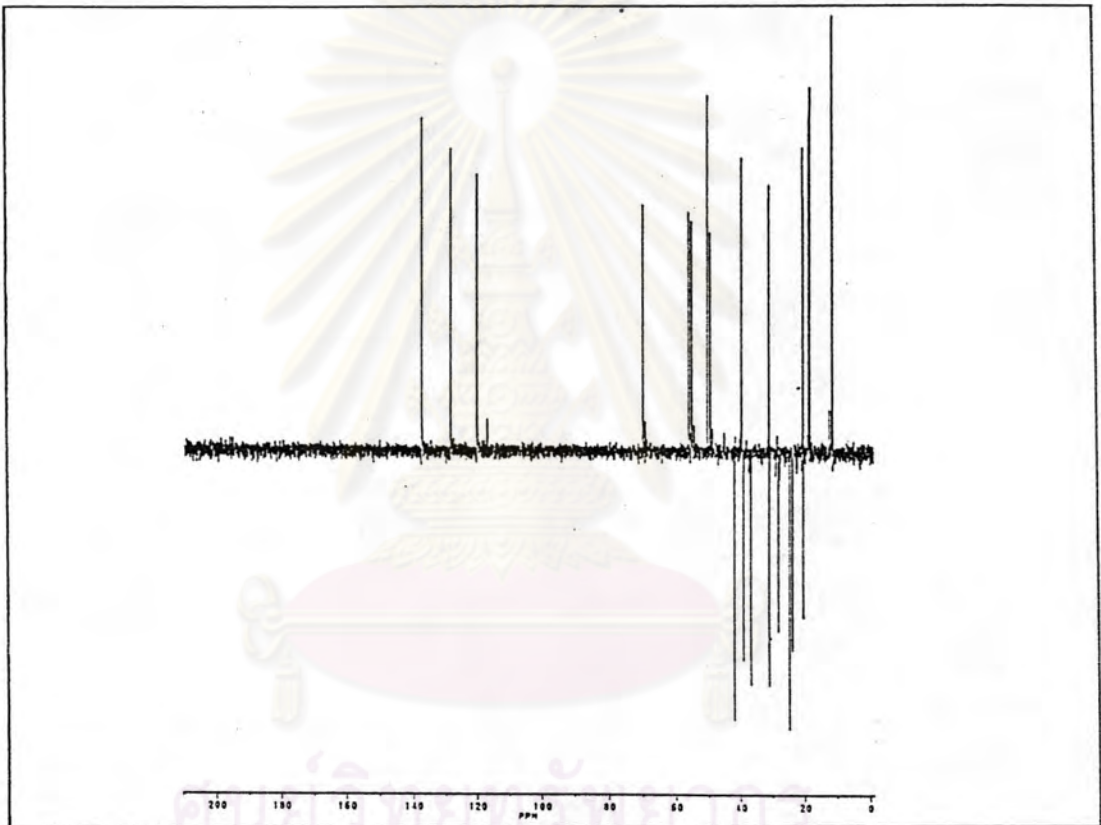


รูปที่ 3.18 แสดง โปรตอนเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 6



รูปที่ 3.19 แสดง คาร์บอน-13 เอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 6

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( $\text{CDCl}_3$ ) ปรากฏ  
 สัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ  $-\text{CH}_2-$  9 สัญญาณคือ ที่  $\delta$  (ppm): 20.67, 23.91,  
 24.87, 28.38, 31.26, 31.36, 36.11, 39.26 และ 41.77  
 ปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ  $-\text{CH}<$  และ  $-\text{CH}_3$  17 สัญญาณคือ ที่  $\delta$  (ppm) :  
 11.68, 11.84, 18.67, 19.01, 20.89, 20.67, 31.45, 31.50, 39.91, 49.78,  
 50.71, 55.51, 56.41, 70.37, 120.45, 128.80 และ 137.84 ดังรูปที่ 3.20

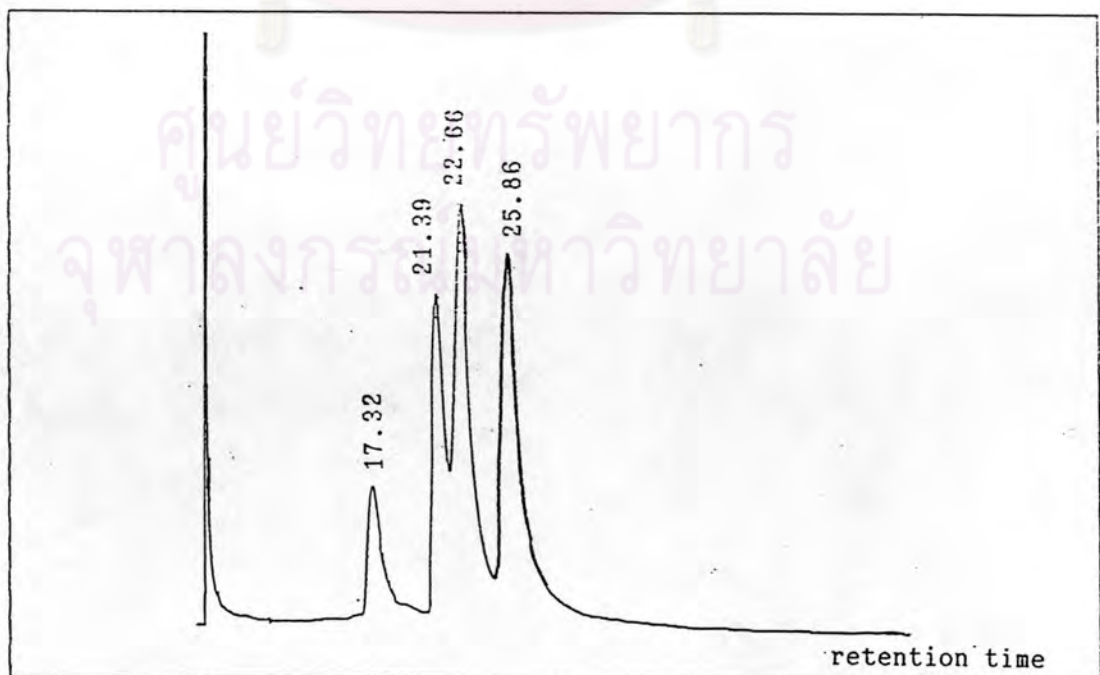


รูปที่ 3.20 แสดง DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 6

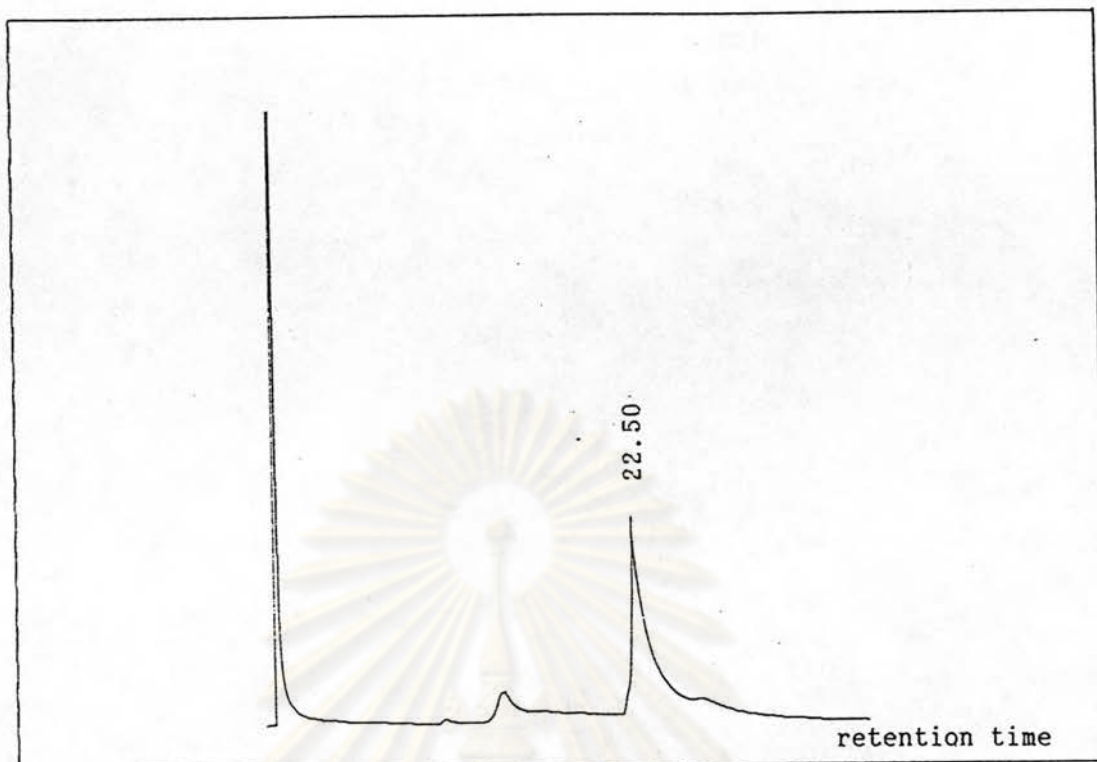
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 3.19) ปรากฏสัญญาณของ  
 28 คาร์บอน และผลจากการทำ DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 3.20)  
 ปรากฏสัญญาณดังนี้คือ ที่  $\delta$  (ppm): 11.68-56.41 แสดง  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-$  และ  $-\text{CH}<$  ของ  
 สเตอรอยด์ ส่วนที่  $\delta$  (ppm): 70.37 แสดงคาร์บอนที่อยู่ติดกับหมู่ไฮดรอกซิล นอกจากนี้ที่  $\delta$   
 (ppm): 120.45 แสดง  $-\text{CH}=\text{C}$ , ที่  $\delta$  (ppm): 128.80 และ 137.84 แสดง  $-\text{CH}=\text{CH}-$   
 และที่  $\delta$  (ppm): 140.95 สอดคล้องกับ  $-\text{CH}=\text{C}<$  ซึ่งเป็นควอเตอร์นารีคาร์บอน นอกจากนี้ยัง  
 ตรวจพบสัญญาณที่หายไปของ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม เมื่อเทียบกับ DEPT 135

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม 2 สัญญาณ ที่  $\delta$  (ppm): 41.77 และ 36.11 แสดงว่าเป็นสัญญาณของ ควอเทอร์นารีคาร์บอน จากคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 28 สัญญาณ แต่หลังจากพิจารณาผลจาก DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม จะต้องมี 29 คาร์บอน (  $-\text{CH}_2-$  9 สัญญาณ,  $-\text{CH}$  และ  $-\text{CH}_3$  17 สัญญาณ และ 3 สัญญาณ) โดยมีสัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 20.68 ใน คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม แยกสัญญาณเป็น 2 สัญญาณ ด้านบนและด้านล่าง

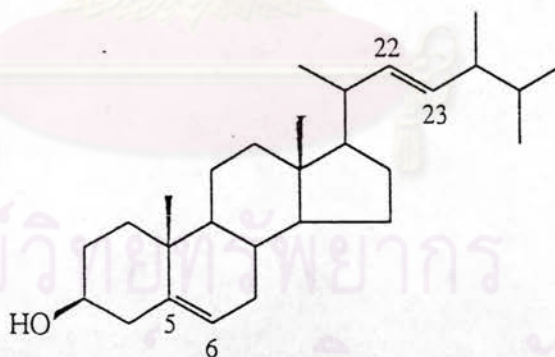
จากการทดสอบปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, ข้อมูลอินฟราเรด สเปกตรัมและเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่า สาร 6 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ เมื่อนำ สาร 6 มาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ( คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 260 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียส และการไหลของ  $\text{N}_2$  50 มิลลิลิตร/นาที ) โดยเปรียบเทียบกับของผสมมาตรฐานสเตอรอยด์ ได้แก่ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังในรูปที่ 3.21 ได้ค่า retention time เป็น 17.32, 21.39, 22.66 และ 25.86 นาที ตามลำดับ เมื่อนำ สาร 6 ซึ่งมีค่า retention time เป็น 22.50 นาที ดังรูปที่ 3.22 มาเทียบ พบว่า สาร 6 เป็นสารประกอบสเตอรอยด์ชนิด stigmasterol



รูปที่ 3.21 แสดง แก๊สโครมาโทแกรมของของผสมมาตรฐานสเตอรอยด์



รูปที่ 3.22 แสดง แก๊สโครมาโทแกรมของ สาร 6



สาร 6 stigmasterol

เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของ สาร 6 ได้ทำการเปรียบเทียบ  
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 6 กับ stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol  
(61-63) ดังแสดงในตารางที่ 3.14 ข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า  
สาร 6 คือ stigmasterol

ตารางที่ 3.14 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 6 เมื่อเปรียบเทียบกับ stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol

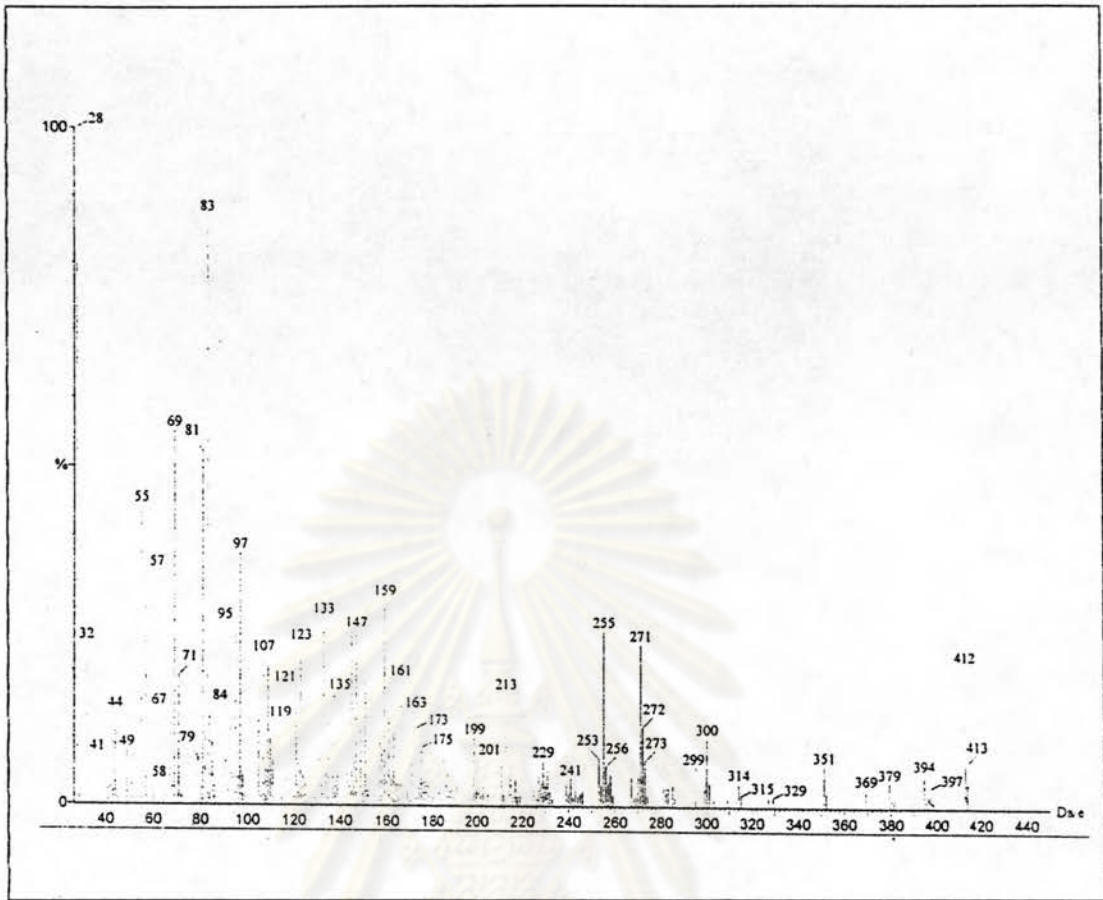
| ตำแหน่งคาร์บอน | สาร 6  | stigmasterol<br>(61-63) | $\beta$ -sitosterol<br>(61-63) |
|----------------|--------|-------------------------|--------------------------------|
| 1              | 36.97  | 37.40                   | 37.30                          |
| 2              | 31.27  | 31.70                   | 31.80                          |
| 3              | 70.37  | 71.80                   | 71.90                          |
| 4              | 41.77  | 42.40                   | 42.40                          |
| 5              | 140.95 | 140.90                  | 140.90                         |
| 6              | 120.45 | 121.70                  | 121.80                         |
| 7              | 31.52  | 31.90                   | 32.00                          |
| 8              | 31.44  | 31.90                   | 32.00                          |
| 9              | 49.78  | 50.30                   | 50.30                          |
| 10             | 36.11  | 36.60                   | 36.60                          |
| 11             | 20.83  | 21.10                   | 21.10                          |
| 12             | 39.26  | 39.80                   | 39.90                          |
| 13             | 42.05  | 42.40                   | 42.40                          |
| 14             | 56.41  | 57.00                   | 56.80                          |
| 15             | 23.92  | 24.40                   | 24.30                          |
| 16             | 28.38  | 28.90                   | 28.20                          |



ตารางที่ 3.14 (ต่อ)

| ตำแหน่งคาร์บอน | สาร 6  | stigmasterol<br>(61-63) | $\beta$ -sitosterol<br>(61-63) |
|----------------|--------|-------------------------|--------------------------------|
| 17             | 55.51  | 56.00                   | 56.20                          |
| 18             | 11.84  | 12.20                   | 11.90                          |
| 19             | 19.01  | 19.40                   | 19.40                          |
| 20             | 39.91  | 40.50                   | 36.20                          |
| 21             | 20.67  | 21.10                   | 19.10                          |
| 22             | 137.84 | 138.40                  | 34.00                          |
| 23             | 128.80 | 129.40                  | 29.30                          |
| 24             | 50.71  | 51.19                   | 50.30                          |
| 25             | 31.36  | 31.90                   | 26.20                          |
| 26             | 18.67  | 19.00                   | 18.80                          |
| 27             | 20.67  | 21.10                   | 19.80                          |
| 28             | 24.87  | 25.40                   | 32.10                          |
| 29             | 11.68  | 12.00                   | 11.90                          |

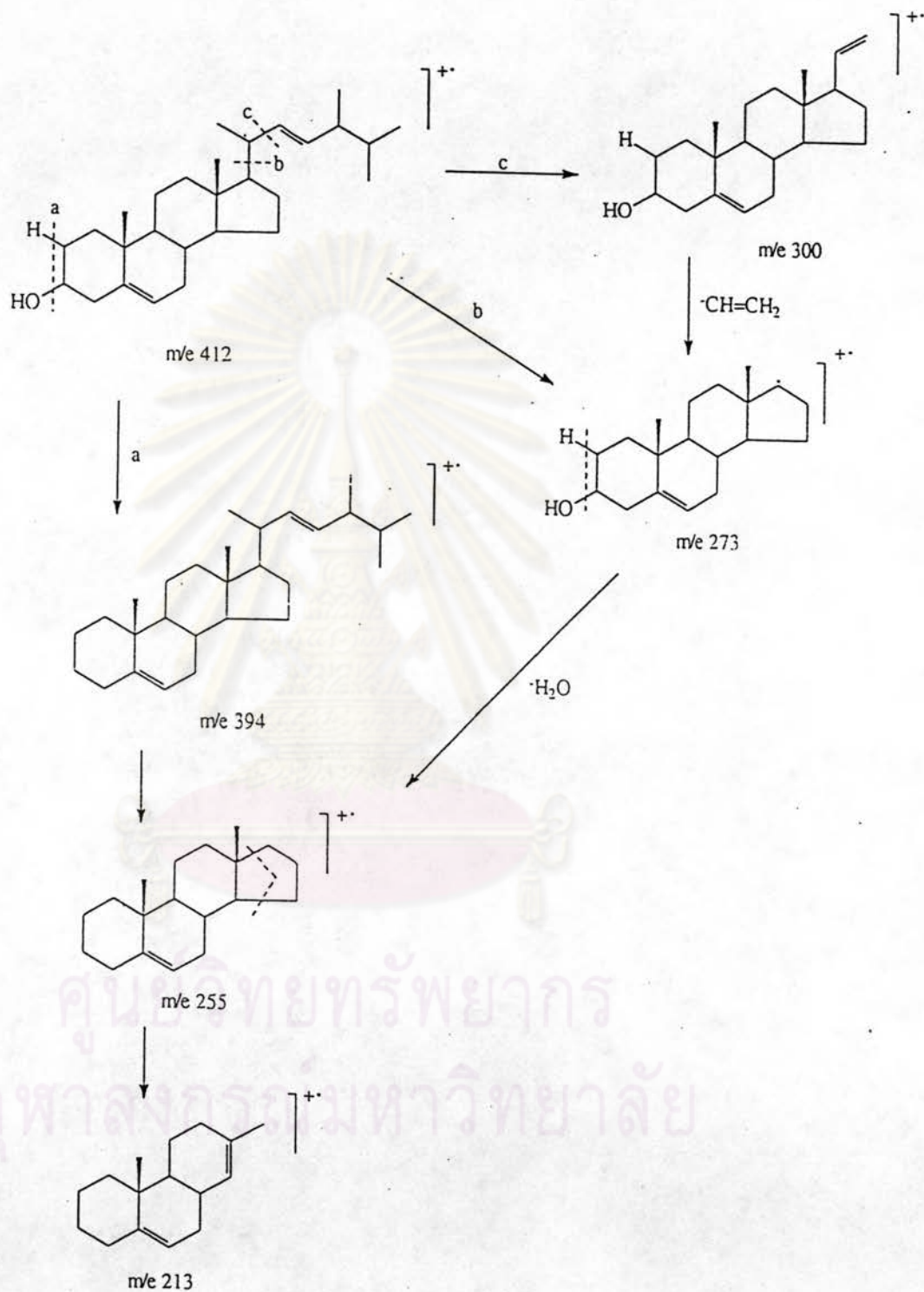
แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงบวก (M<sup>+</sup>) ที่ m/e  
 (% relative intensity) 412(21.41), 394(5.08), 300(10.26), 273(6.72),  
 255(26.21) และ 213(16.87) (64) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3.15



รูปที่ 3.23 แสดง แมสสเปกตรัมของ สาร 6

เมื่อพิจารณาการแตกตัวเป็นชิ้นส่วนของ สาร 6 พบว่ามีรูปแบบการแตกเป็นชิ้นส่วนเช่นเดียวกับ stigmasterol ทุกประการ (65,66) ดังแผนภาพที่ 3.3

แมสสเปกตรัม (รูปที่ 3.23) ปรากฏพีคของไอออนเชิงบวก (M<sup>+</sup>) ที่ m/e 412 เมื่อนำมาคำนวณหาสูตรโมเลกุลได้เป็น C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O ซึ่งพบว่า สอดคล้องกับข้อมูลของ ไรบรตอนและ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม เพราะฉะนั้น สาร 6 คือ stigmasterol



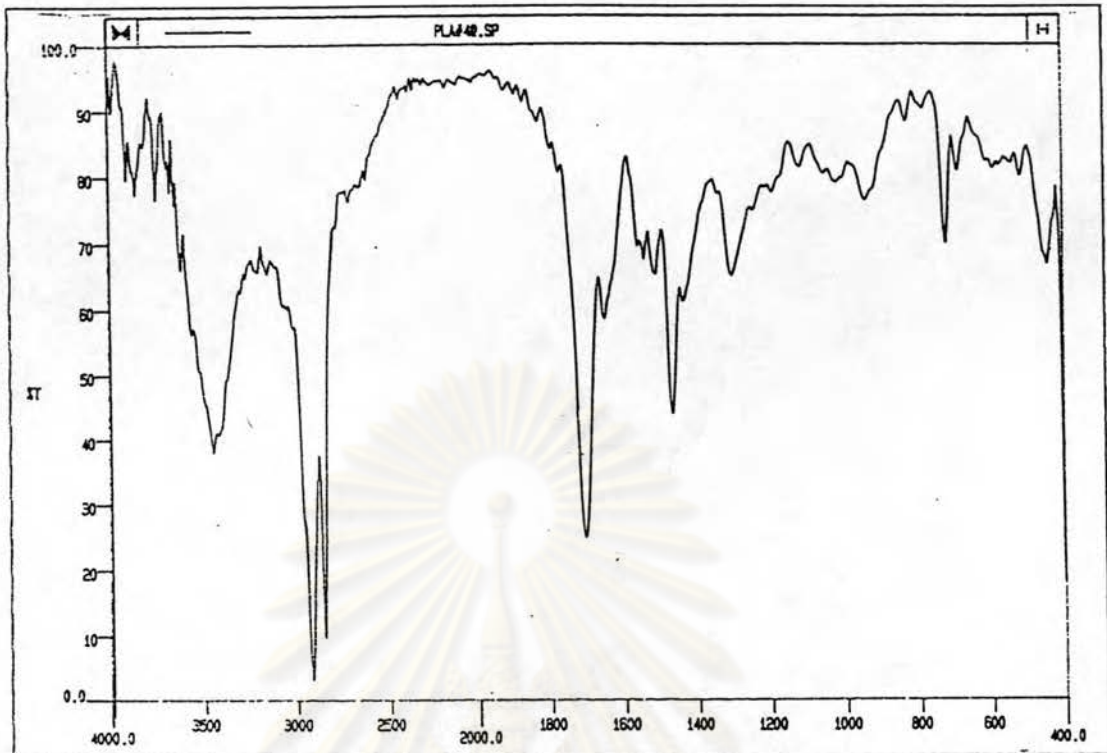
แผนภาพที่ 3.2 แสดงรูปแบบการแตกตัวของ สาร 6 (65,66)

### 3.2.8 การทำสาร 7 ให้บริสุทธิ์และการหาสูตรโครงสร้าง

สาร 7 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวบนอยู่ในน้ำมันสีน้ำตาล ได้จากลำดับส่วนที่ 67-70 (SA<sub>18</sub>) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเอกเซน(ตารางที่ 2.2) โดยการนำส่วนนี้มาทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ (ตารางที่ 2.4) สาร 7 จะถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1 - 3:7) ซึ่งเป็นลำดับส่วนที่ 6-20 หลังจากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยวิธีผ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่ง สาร 7 จะออกมาที่ลำดับส่วน 11-25 โดยใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ( ตารางที่ 2.5 ) เมื่อนำ สาร 7 มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ได้ผลึกอสัณฐานสีขาวหนัก 0.03 กรัม ( $6.00 \times 10^{-4}$  % น้ำหนักโดยน้ำหนัก) จุดหลอมเหลว 73.0-74.0 องศาเซลเซียส TLC ให้ค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.03 [เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (9:1)] สาร 7 ละลายได้ในน้อยในไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม แต่ไม่ละลายในเมทานอล, เอทานอล และเอซิโตน นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับ 5% FeCl<sub>3</sub> และ Br<sub>2</sub> ใน CCl<sub>4</sub> แสดงว่า สาร 7 ไม่ใช่สารประกอบประเภทฟีนอลแต่เป็นสารอิมตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.24) แสดงแถบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซีที่ 3500-3200 ซม.<sup>-1</sup> และ หมู่คาร์บอนิลที่ 1705 ซม.<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังพบแถบการดูดกลืนแสงของหมู่ -CH<sub>3</sub> และ -CH<sub>2</sub>- ที่ต่อกันเป็นโซ่ตรงยาว ข้อมูลการดูดกลืนแสงของ สาร 7 (67) แสดงไว้ดังตารางที่ 3.15

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



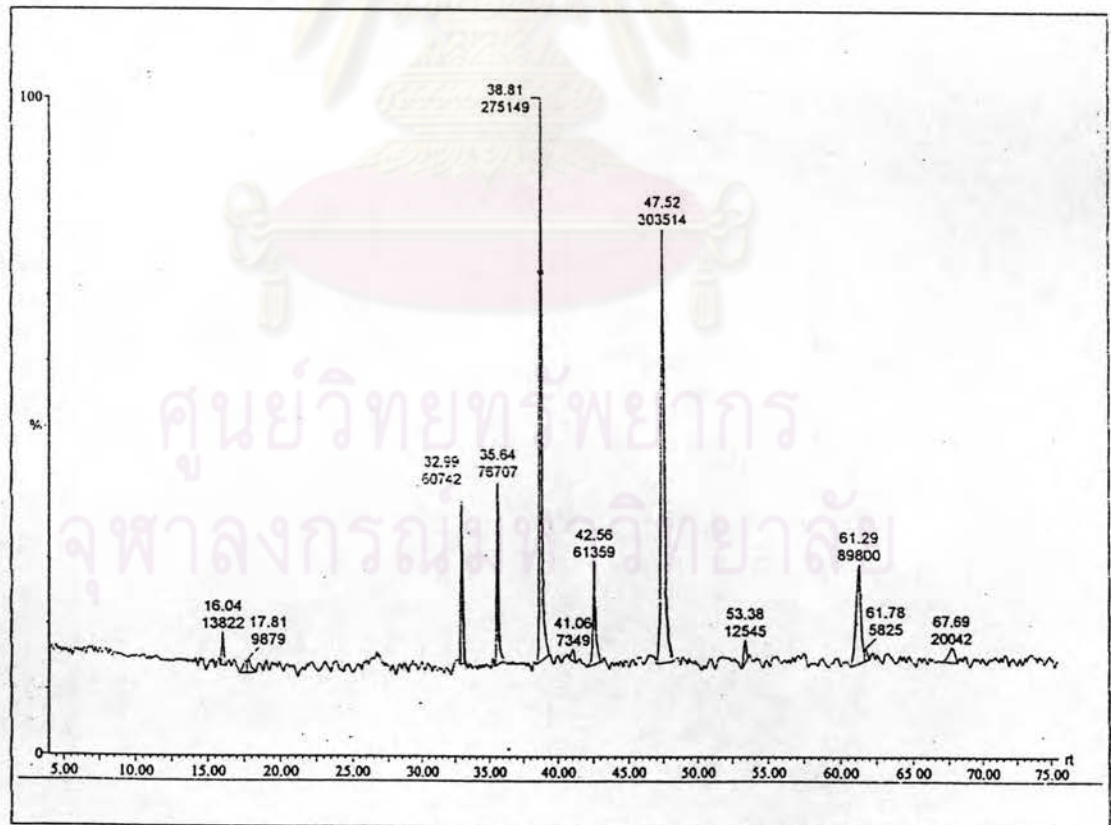
รูปที่ 3.24 แสดง อินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 7

ตารางที่ 3.15 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 7

| แถบการดูดกลืนแสง (ซม. <sup>-1</sup> ) | ความเข้ม   | แสดงลักษณะ  |
|---------------------------------------|------------|---|
| 3500-3200                             | ต่ำ, กว้าง | O-H สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอกซิลิก                                   |
| 2919, 2850                            | สูง        | C-H สั่นแบบยืดของ -CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -             |
| 1705                                  | ปานกลาง    | C=O สั่นแบบยืดของหมู่คาร์บอกซิลิก                                   |
| 1466, 1435                            | ปานกลาง    | C-H สั่นแบบงอของ -CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -              |
| 1410                                  | ปานกลาง    | C-O-H สั่นแบบงอในระนาบ  |
| 1301                                  | ปานกลาง    | C-O สั่นแบบยืด  |
| 1021                                  | ต่ำ        | O-H สั่นแบบงอนอกระนาบ   |
| 724, 690                              | ปานกลาง    | C-H สั่นแบบงอแบบโรตลงของ (-CH <sub>2</sub> -) <sub>n</sub> ,<br>n>4 |

จากข้อมูลดังกล่าว ชี้ให้เห็นว่า สาร 7 น่าจะเป็นสารประกอบประเภท กรดอินทรีย์ไร้ตรง เพื่อความสะดวกในการหาสูตรโครงสร้างของ สาร 7 จึงจะต้องเปลี่ยน กรดอินทรีย์ไร้ตรงเป็นอนุพันธ์ methyl ester โดยทำตามหัวข้อ 2.5.1 ซึ่งอนุพันธ์ methyl ester ของกรดอินทรีย์ไร้ตรง จะง่ายต่อการวิเคราะห์ด้วยการทำแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์

เมื่อนำอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ไร้ตรง มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (คอลัมน์ชนิด OV-1 อุณหภูมิคอลัมน์ 150.0-180.0 องศาเซลเซียส, อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส/นาที, อุณหภูมิ injection 280.0 องศาเซลเซียส และการไหลของ N<sub>2</sub> 50 มิลลิลิตร/นาที) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3.25 ซึ่งมี สามารถทราบจำนวนคาร์บอนของ methyl ester ของ สาร 7 ตารางที่ 3.16

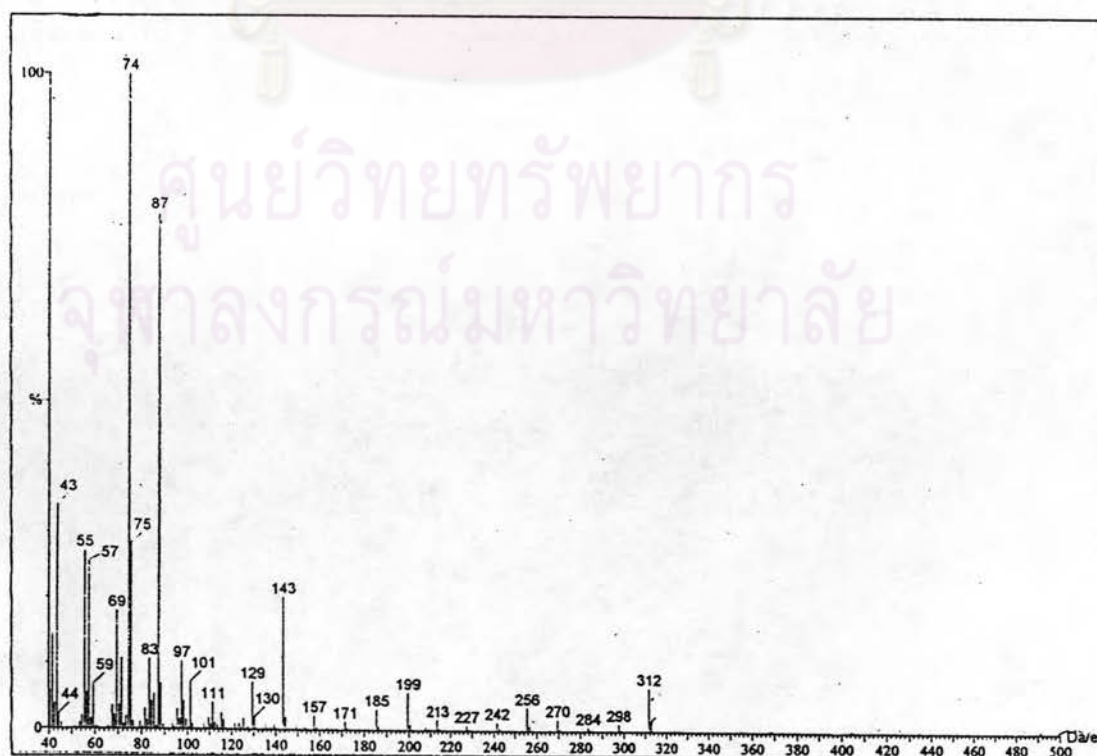


รูปที่ 3.25 แสดง แก๊สโครมาโทแกรม ของ สาร 7

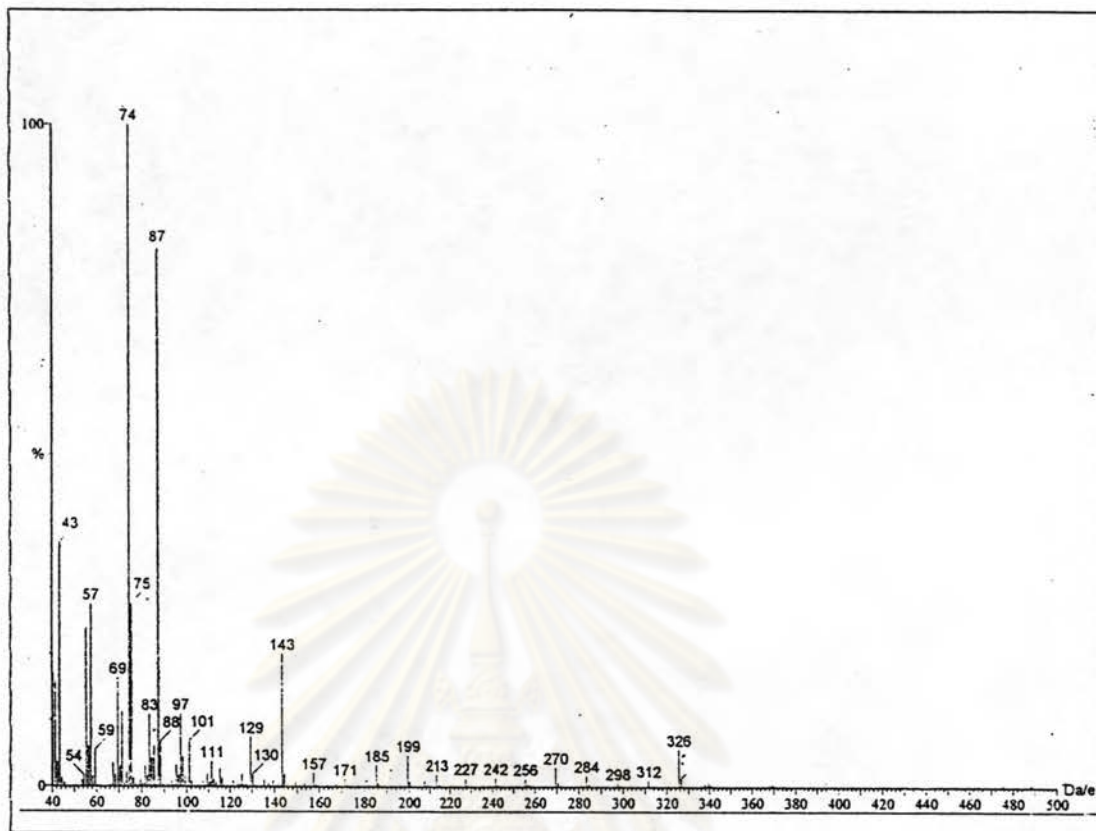
ตารางที่ 3.16 จำนวนคาร์บอนของ อนุพันธ์ methyl ester ชนิดต่าง ๆ ของ สาร 7

| m/e | retention time<br>(นาที) | จำนวนคาร์บอน | ปริมาณสาร (%) |
|-----|--------------------------|--------------|---------------|
| 312 | 39.99                    | 20           | 6.98          |
| 326 | 35.64                    | 21           | 8.82          |
| 340 | 38.82                    | 22           | 31.64         |
| 354 | 42.56                    | 23           | 7.05          |
| 368 | 47.54                    | 24           | 34.90         |
| 396 | 61.31                    | 26           | 10.33         |

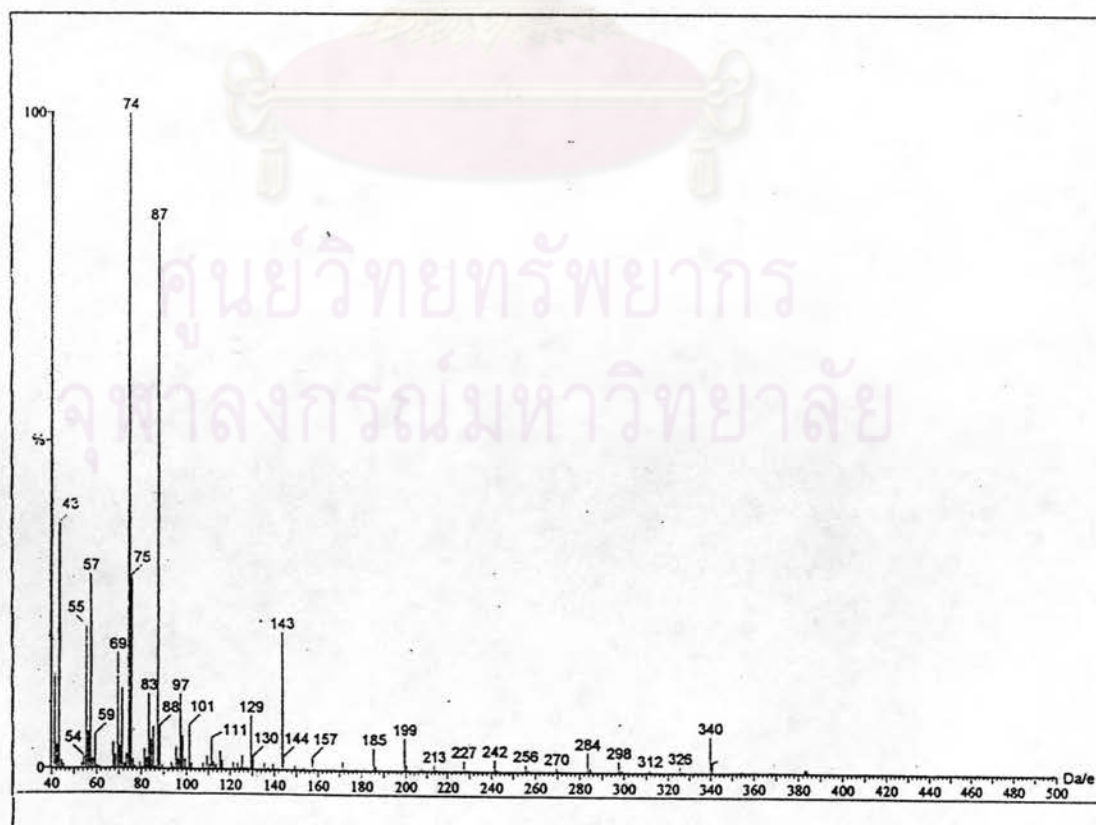
จากสมบัติทางกายภาพและเคมี ข้อมูลทางสเปกตรัมสรีดปี แก๊ส  
โครมาโทกราฟี พบว่า สาร 7 เป็นของผสมของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย แสดงดังตารางที่ 3.18



รูปที่ 3.26 แสดงแมสสเปกตรัมของ methyl ester ของ สาร 7 ที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 20

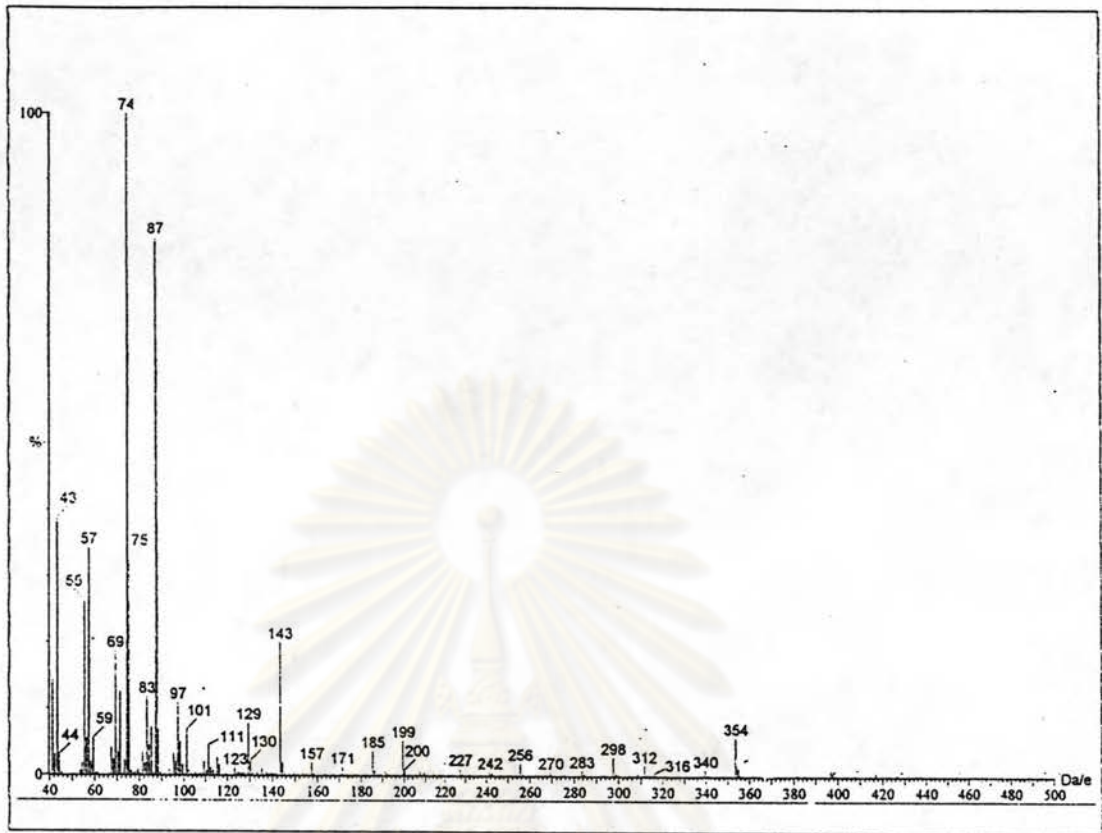


รูปที่ 3.27 แสดงแมสสเปกตรัมของ methyl ester ของ สาร 7 ที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 21

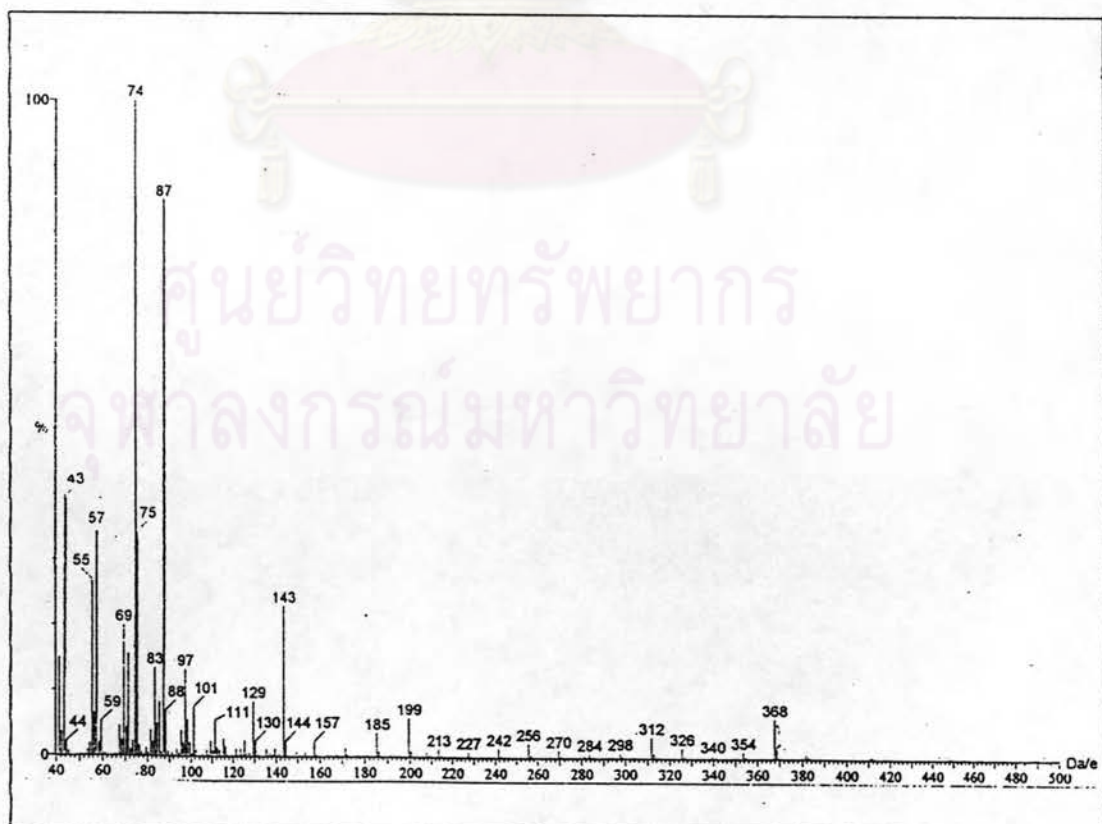


รูปที่ 3.28 แสดงแมสสเปกตรัมของ methyl ester ของ สาร 7 ที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 22

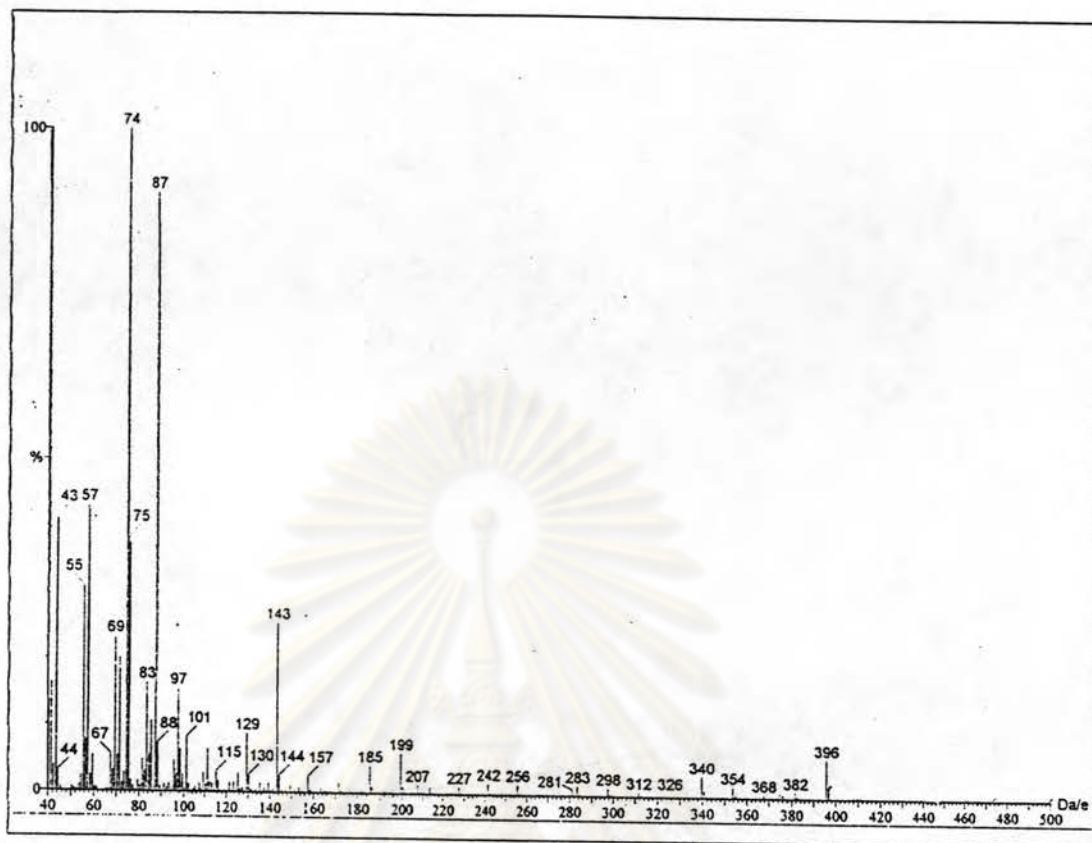




รูปที่ 3.29 แสดงแมสสเปกตรัมของ methyl ester ของ สาร 7 ที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 23



รูปที่ 3.30 แสดงแมสสเปกตรัมของ methyl ester ของ สาร 7 ที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 24



รูปที่ 3.31 แสดง แมสสเปกตรัมของ methyl ester ของ สาร 7 ที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 26

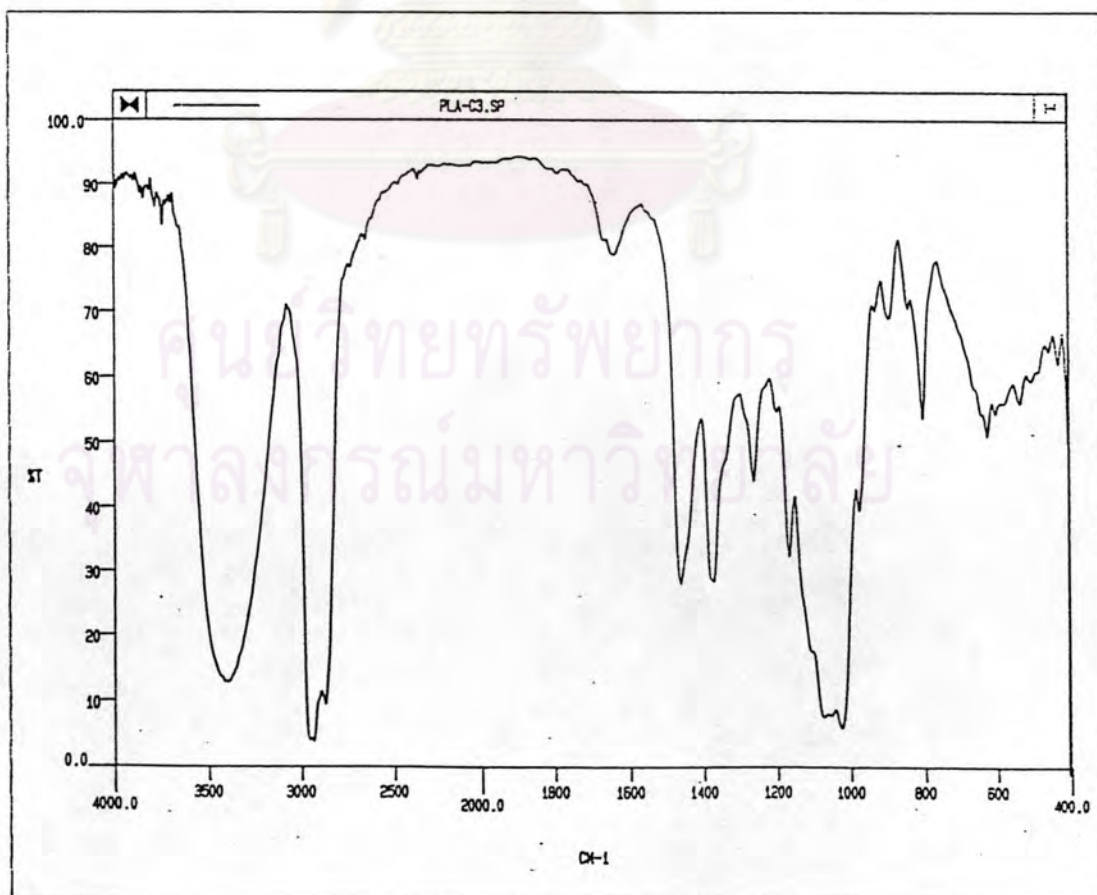
ตารางที่ 3.17 กรดอินทรีย์โซ่ตรงชนิดต่าง ๆ ของ สาร 7

| ชื่อสารประกอบ      | สูตรโมเลกุล       | สูตรโครงสร้าง                | มวล<br>โมเลกุล | ปริมาณสาร<br>(%) |
|--------------------|-------------------|------------------------------|----------------|------------------|
| nonadecanoic acid  | $C_{19}H_{36}O_2$ | $CH_3-(CH_2)_{16}-CH_2-COOH$ | 298            | 6.98             |
| doicosanoic acid   | $C_{20}H_{40}O_2$ | $CH_3-(CH_2)_{17}-CH_2-COOH$ | 312            | 8.82             |
| heneicosanoic acid | $C_{21}H_{42}O_2$ | $CH_3-(CH_2)_{18}-CH_2-COOH$ | 326            | 31.64            |
| dodecosanoic acid  | $C_{22}H_{44}O_2$ | $CH_3-(CH_2)_{19}-CH_2-COOH$ | 340            | 7.05             |
| tricosanoic acid   | $C_{23}H_{46}O_2$ | $CH_3-(CH_2)_{20}-CH_2-COOH$ | 354            | 34.90            |
| pentacosanoic acid | $C_{25}H_{48}O_2$ | $CH_3-(CH_2)_{22}-CH_2-COOH$ | 380            | 10.33            |

### 3.2.8 การทำสาร 8 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 8 เป็นผงละเอียดสีขาวแยกได้จากน้ำมันสีดำ ซึ่งได้จากลำดับส่วนที่ 55-72 (ส่วนย่อย SA<sub>2</sub>7) จากการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 2.7) uly ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน(1:9) เมื่อตกผลึกด้วยเอทานอลร้อนได้สารที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.45 กรัม(0.09%น้ำหนักโดยน้ำหนัก)จุดหลอมเหลว 270.0-278.0 องศาเซลเซียส (สลายตัว) TLC ให้ค่า R<sub>f</sub>เท่ากับ 0.22 (เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน (1:9)) ละลายได้ดีใน เอทานอลร้อน สาร 8 ให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, พอกจางสี Br<sub>2</sub> ใน CCl<sub>4</sub>, ให้ผลลบกับ 2,4-DNP และ 5% FeCl<sub>3</sub> แสดงว่าสารนี้มีโครงสร้างของสารประกอบสเตอรอยด์ที่ไม่มีอิมตัว แต่ไม่ใช่สารประกอบจากพวกพีนอล และไม่มีหมู่คาร์บอนิลอยู่ในวงเบญจก

จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.32) แสดงการดูดกลืนแสงที่สำคัญ(68)ดังตารางที่ 3.18



รูปที่ 3.32 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 8

ตารางที่ 3.18 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 8

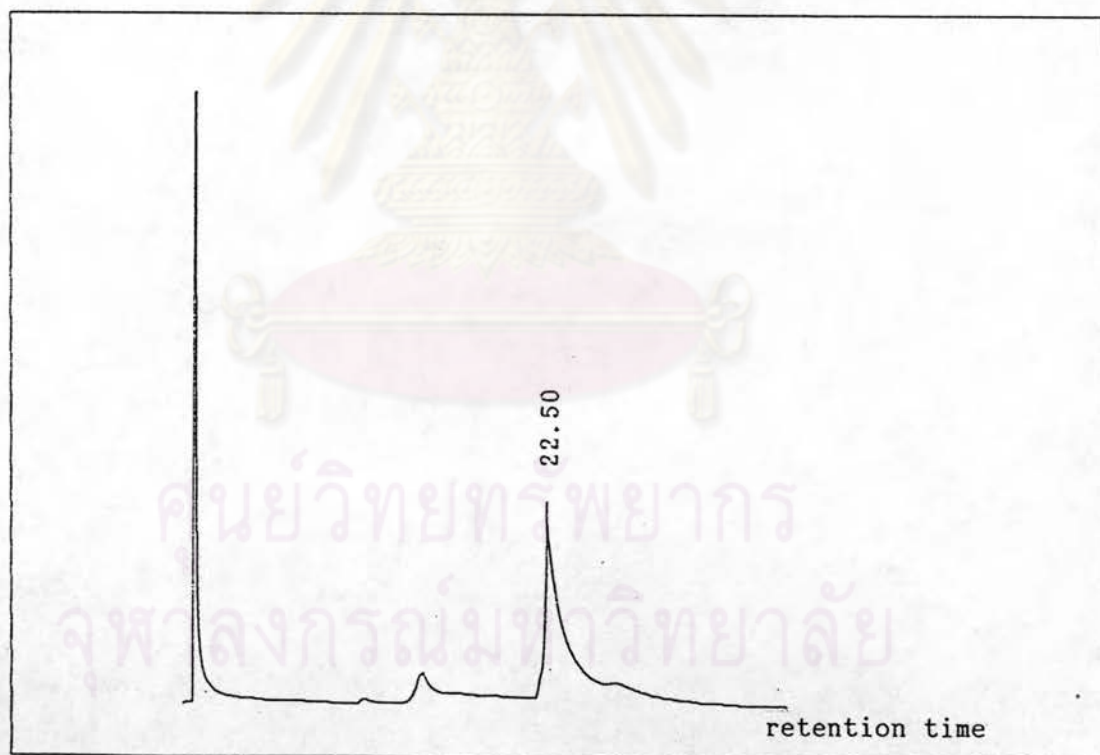
| แถบการดูดกลืนแสง (ซม. <sup>-1</sup> ) | ความเข้ม     | การแปลความหมาย  |
|---------------------------------------|--------------|---|
| 3600-3100                             | สูง, (กว้าง) | O-H สั้นแบบยึดของ R-OH  |
| 2936, 2878                            | สูง          | C-H สั้นแบบยึดของ -CH <sub>2</sub> -, -CH <sub>3</sub>                                      |
| 1637                                  | ต่ำ          | >C=C< สั้นแบบยึดของอัลคีน   |
| 1461                                  | ปานกลาง      | C-H สั้นแบบงออย่างมีสมมาตรของ -CH <sub>2</sub> -<br>และอย่างไม่มีสมมาตรของ -CH <sub>3</sub> |
| 1371                                  | ปานกลาง      | C-H สั้นแบบงออย่างมีสมมาตรของ -CH <sub>3</sub>  |
| 1261-1025                             | สูง          | C-O สั้นแบบยึด  |
| 891                                   | ต่ำ          | แอนนเมอรักริปรตอนที่เป็นปีต้าไอโซเมอร์  |
| 801                                   | ต่ำ          | C-H สั้นแบบงอนอกระนาบของ<br>trisubstituted vinyl  |

จากเอกสารอ้างอิงรายงานว่า ลักษณะแถบการดูดกลืนแสงของ -OH ที่กว้างในช่วง 3500-3200 ซม.<sup>-1</sup> และที่ 1261, 1197, 1165, 1073 และ 1025 ซม.<sup>-1</sup> แสดง C-O สั้นแบบยึดของน้ำตาลซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไกลโคไซด์ และที่ 891 ซม.<sup>-1</sup> แสดงแอนนเมอรักริปรตอนที่มีทิศทางตามแนวแกนของน้ำตาลที่เป็นปีต้าไอโซเมอร์ (anomeric axial proton of  $\beta$ -sugar) (69) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของ สาร 8 พบว่า สาร 8 น่าจะเป็นไกลโคไซด์

เมื่อนำ สาร 8 มาทำปฏิกิริยาไฮดรอลิซิส (ดูการทดลองจากหัวข้อ 2.5.1) จะได้ส่วน aglycone เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว (สาร 8.1) หนัก 0.10 กรัม มีจุดหลอมเหลว 167.0-168.0 องศาเซลเซียส มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.62 (โตคลอโรมีเทน:เฮกเซน (2:3)) ละลายได้ดีใน โตคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม ละลายได้น้อยในเมทานอล และเฮกเซน ให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, ฟอกจางสี Br<sub>2</sub> ใน CCl<sub>4</sub>,

ให้ผลลบกับ 2,4-DNP และ 5% FeCl<sub>3</sub> แสดงว่า สาร 8.1 เป็นสารประกอบสเตอรอยด์ที่ไม่อิ่มตัว แต่ไม่ใช่สารประกอบจากพวกฟีนอล และไม่มีหมู่คาร์บอนิล

อินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 8.1 พบว่ามีลักษณะคล้ายกับอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 6 (รูปที่ 3.17) จากข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม แสดงว่า สาร 8.1 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ จึงทำการยืนยันสูตรโครงสร้างของ สาร 8.1 ด้วยการวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยเทคนิคจีแอลซี (gas-liquid chromatography) ทำเช่นเดียวกับ สาร 6 โดยของผสมสเตอรอยด์ที่ใช้เป็นมาตรฐานคือ cholesterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol และ stigmasterol (รูปที่ 3.21) จากการวิเคราะห์พบว่า สาร 8.1 มีค่า retention time เป็น 22.50 นาที (รูปที่ 3.33) ซึ่งเมื่อเทียบกับสเตอรอยด์มาตรฐาน แล้วพบว่า เท่ากับ stigmasterol



รูปที่ 3.33 แสดงโครมาโทแกรมของ สาร 8.1

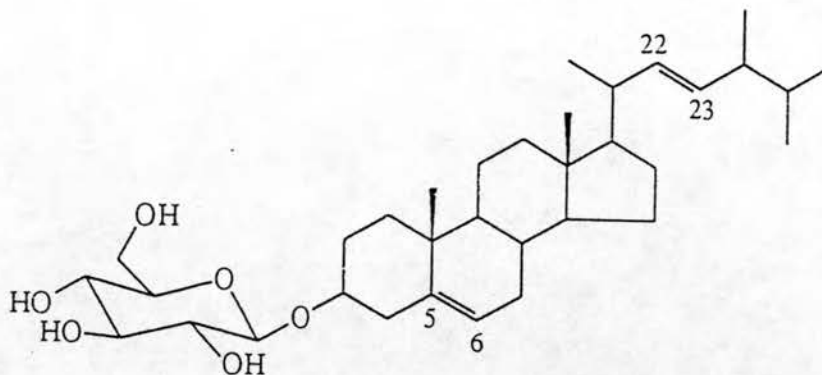
จากข้อมูลข้างต้นยืนยันได้แน่ๆ ว่า สาร 8.1 คือ stigmasterol

หลังจากที่นำส่วน glycone ซึ่งเป็นของแข็งสีขาว (สาร 8.2) ไปวิเคราะห์น้ำตาลโดยเทคนิค paper chromatography (ดูการทดลองจากข้อ 2.5.1) ได้ค่า  $R_f$  ดังแสดงในตารางที่ 3.19

ตารางที่ 3.19 แสดงค่า  $R_f$  ของสารละลายมาตรฐานน้ำตาลชนิดต่าง ๆ และ สาร 8.2

| น้ำตาล    | ค่า $R_f$ ใน BTPW        |             | สีที่ให้กับสารละลาย<br>aniline hydrogen<br>phthalate |
|-----------|--------------------------|-------------|--|
|           | จากเอกสารอ้างอิง<br>(63) | จากการทดลอง |  |
| Rhamnose  | 0.47                     | 0.52        | เหลือง-น้ำตาล  |
| Xylose    | 0.35                     | 0.39        | แดง  |
| Arabinose | 0.29                     | 0.32        | แดง  |
| Glucose   | 0.24                     | 0.28        | น้ำตาล   |
| Galactose | 0.21                     | 0.25        | น้ำตาล   |
| สาร 8.2   |                          | 0.28        | น้ำตาล   |

จากการศึกษาน้ำตาลในชั้นน้ำ (สาร 8.2) โดยใช้ paper chromatography เปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน พบว่าค่า  $R_f$  ของ สาร 8.2 เท่ากับ 0.28 ซึ่งเท่ากับน้ำตาลมาตรฐาน glucose แสดงว่า สาร 8.2 คือ glucose จากข้อมูลทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า สาร 8 คือ stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังแสดงไว้ในหน้าถัดไป

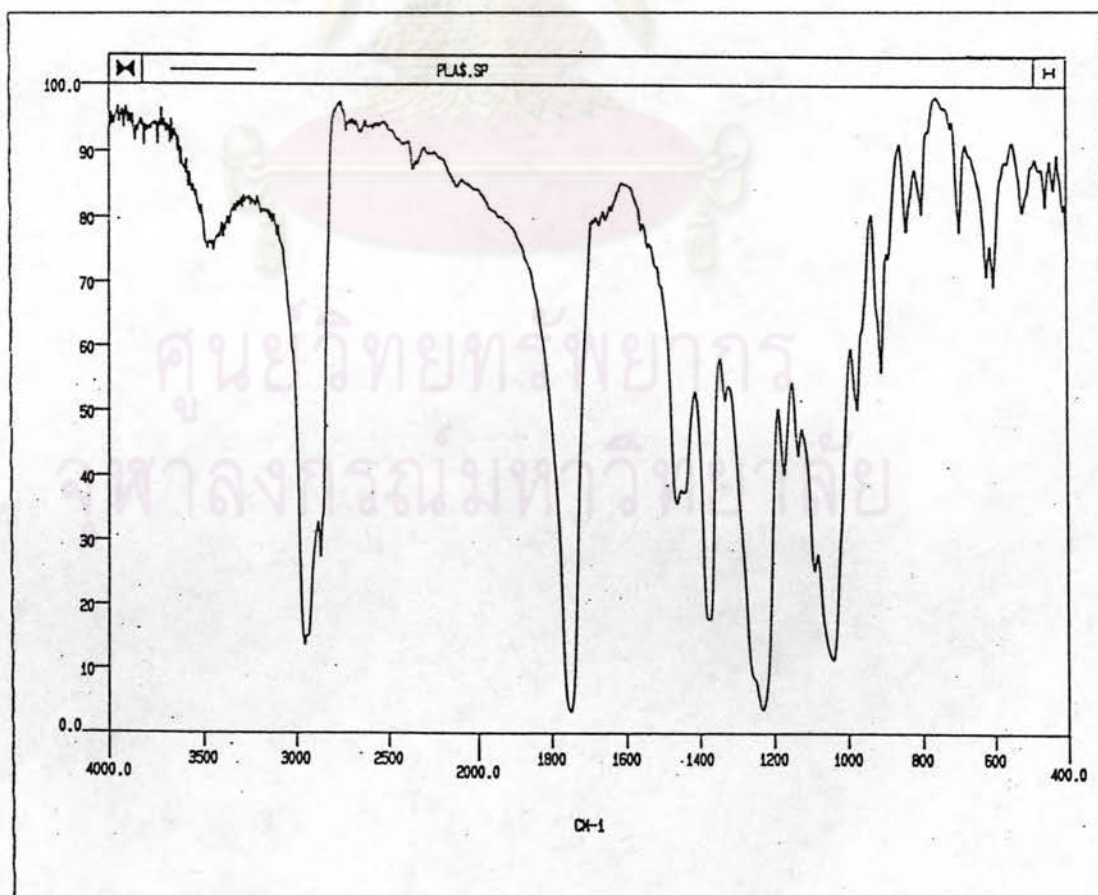


สาร 8 stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

เพื่อเป็นการยืนยันสูตรโครงสร้างของ สาร 8 ได้ทำการเตรียมอนุพันธ์  
 แอซิเตดของ สาร 8 (หัวข้อ 2.4.7) ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว (สาร 8.3) จุดหลอมเหลว 166.0-  
 168.0 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม, ไดคลอโรมีเทน ละลายได้น้อยใน เฮกเซน,  
 เมทานอล และเอทานอล

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.34) แสดงการดูดกลืนแสงที่สำคัญ (53)

ดังตารางที่ 3.20



รูปที่ 3.34 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 8.3

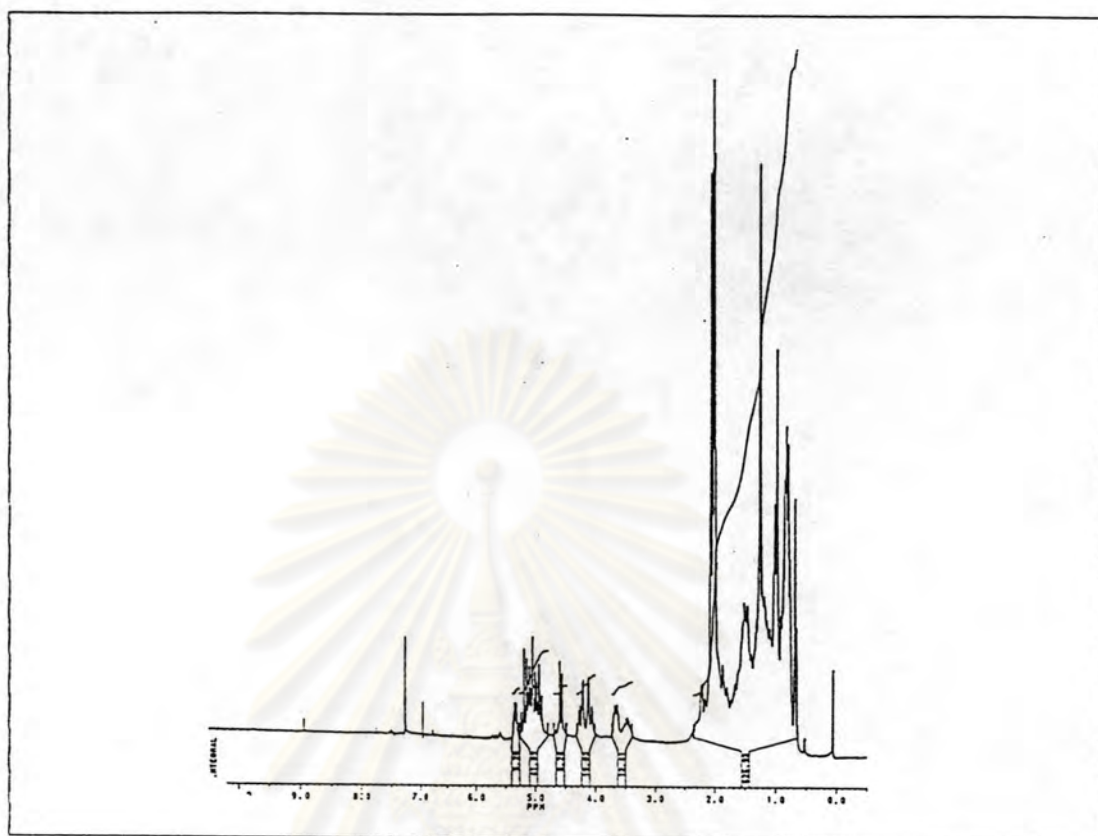
ตารางที่ 3.20 แสดงแถบการดูดกลืนแสงจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 8.3

| แถบการดูดกลืนแสง (ซม. <sup>-1</sup> ) | ความเข้ม | แสดงลักษณะ  |
|---------------------------------------|----------|---|
| 2957-2870                             | สูง      | C-H สั้นแบบยึดของ -CH <sub>2</sub> -, -CH <sub>3</sub>                    |
| 1750                                  | สูง      | C=O สั้นแบบยึดของ CH <sub>3</sub> -COOR                                   |
| 1670-1653                             | ต่ำ      | C=C สั้นแบบยึดของอัลคีน   |
| 1463                                  | ปานกลาง  | C-H สั้นแบบงอของ -CH <sub>2</sub> -, -CH <sub>3</sub>                     |
| 1378                                  | ปานกลาง  | C-H สั้นแบบงออย่างมีสมมาตรของ -CH <sub>3</sub>                            |
| 1231, 1041                            | ปานกลาง  | COO สั้นแบบยึด และ O-C-C สั้นแบบยึด<br>ของ CH <sub>3</sub> -COOR          |
| 1091-1041                             | ปานกลาง  | C-O สั้นแบบยึดและ O-H สั้นแบบงอ   |
| 974                                   | ต่ำ      | C-H สั้นแบบงอนอกระนาบของ R <sub>1</sub> CH=CHR <sub>2</sub>               |
| 841, 800                              | ต่ำ      | C-H สั้นแบบงอนอกระนาบของ R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> C=CHR <sub>3</sub> |

จากอินฟราเรดสเปกโตรสโกปีของอนุพันธ์แอซีเตตของ สาร 8.3 พบแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญที่ 1750, 1231 และ 1041 ซม.<sup>-1</sup> ซึ่งแสดงลักษณะสำคัญของหมู่แอซีเตตแทนที่ แถบการดูดกลืนแสงของหมู่ไฮดรอกซี บริเวณ 3500-3200 ซม.<sup>-1</sup> ที่หายไป

โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl<sub>3</sub>) ปรากฏสัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 0.68-1.55(*m*), 1.99(*s*), 2.01(*s*), 2.04(*s*), 2.07(*s*), 3.62(*m*), 4.59(*d*), 5.09(*m*), 5.33(*m*) (53) ดังรูปที่ 3.35



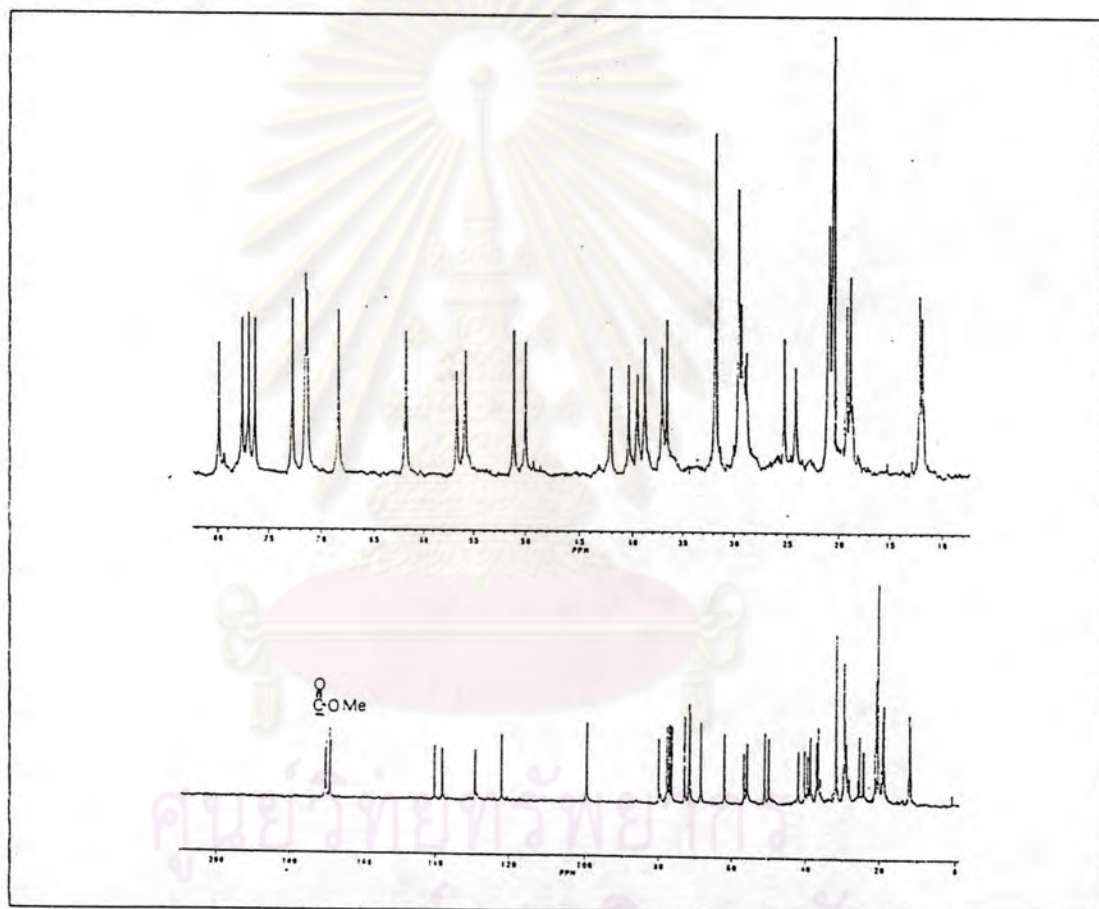


รูปที่ 3.35 แสดง ปรอทอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 8.3

จากปรอทอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 3.35) ที่  $\delta$  5.33 และ 5.09 ppm แสดงปรอทอนของ  $-\text{CH}=\text{C}<$  และ  $-\text{CH}=\text{CH}-$  ตามลำดับ ที่  $\delta$  (ppm): 1.99, 2.01, 2.05 และ 2.07 แสดงปรอทอนของหมู่เอซีเตต 4 หมู่ และที่  $\delta$  4.59 ppm (1H, d,  $J=7.1$  Hz) แสดงแอนเมอริกปรอทอน (anomeric proton) ของน้ำตาล จากการศึกษาคู่สารอ้างอิง (69,70) พบว่า น้ำตาลที่ยึดอยู่กับรมเลขของสเตอรอยด์ และแอนเมอริกปรอทอนกับปรอทอนที่ C-2 ซึ่งโครงสร้างรูปแบบเก้าอี้ (chair conformation) ที่เป็นไปได้ของ  $\beta$ -D-glucopyranoside มี 2 แบบ แบบที่ 1 แอนเมอริกปรอทอน ( $\text{H}^*$ ) กับปรอทอนที่ C-2 อยู่ในแนวศูนย์สูตร (equatorial) ทั้ง 2 อะตอม จะมีค่าคงตัวคู่ควบ ( $J$ ) เท่ากับ 2-4 Hz แบบที่ 2 แอนเมอริกปรอทอนกับปรอทอนที่ C-2 อยู่ในทิศทางตามแนวแกน ทั้ง 2 อะตอม จะมีค่าคงตัวคู่ควบ ( $J$ ) เท่ากับ 7-10 Hz สาร 8.3 วัดค่าคงตัวคู่ควบที่ 4.59 ppm ได้เท่ากับ 7.1 Hz สรุปได้ว่าแอนเมอริกปรอทอนกับปรอทอนที่ C-2 อยู่ในทิศทางตามแนวแกน ทั้ง 2 อะตอม



คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( $\text{CDCl}_3$ ) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 43 สัญญาณคือที่  $\delta$  (ppm): 11.93, 12.16, 18.93, 19.25, 20.49, 20.52, 20.60, 20.65, 20.93, 21.01, 21.12, 24.25, 25.31, 28.81, 29.33, 29.59, 31.73, 31.77, 31.81, 36.59, 37.08, 38.79, 39.53, 40.40, 42.09, 50.05, 51.13, 55.82, 56.72, 61.97, 68.39, 71.54, 72.80, 79.94, 99.50, 122.05, 129.15, 138.20, 140.18, 169.21, 169.32, 170.25 และ 170.61 ดังรูปที่ 3.36



รูปที่ 3.36 แสดง คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 8.3

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 3.36) แสดงสัญญาณของคาร์บอนิลของหมู่เอซีเตตที่  $\delta$  (ppm): 169.21, 169.32, 170.25 และ 170.61 และแสดงสัญญาณของพันธะคู่ที่  $\delta$  (ppm): 140.18, 138.20, 129.15 และ 122.05 นอกจากนี้ยังพบสัญญาณแสดงคาร์บอนของน้ำตาลที่ 99.50, 72.79, 71.54, 71.36, 68.39 และ 62.18 พบสัญญาณที่แสดงคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของสเตอรอยด์ซึ่งตรงกับมวลเลขของน้ำตาลที่  $\delta$  79.94 ppm สัญญาณอื่น ๆ นอกเหนือจากนี้มีลักษณะเหมือนสเปกตรัมของ สาร 6 (71) (ตารางที่ 3.21)

ตารางที่ 3.21 แสดงการเปรียบเทียบ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 8.3 กับ  
stigmasteryl-3-O- $\beta$ -D-glucoopyranoside tetraacetate

| ตำแหน่งคาร์บอน | เคมีคลิพิท์ (ppm)        |  |
|----------------|--------------------------|--|
|                | อนุพันธ์แอซีเตตของ สาร 8 | stigmasteryl-3- $\beta$ -D-glucoopyranoside tetraacetate |
| 1              | 37.07                    | 37.27  |
| 2              | 29.52                    | 29.50  |
| 3              | 79.95                    | 80.07  |
| 4              | 38.79                    | 38.95  |
| 5              | 140.19                   | 140.42   |
| 6              | 122.05                   | 122.16   |
| 7              | 31.77                    | 31.96  |
| 8              | 31.73                    | 31.96  |
| 9              | 50.04                    | 50.27  |
| 10             | 36.59                    | 36.78  |
| 11             | 20.93                    | 21.07  |
| 12             | 39.53                    | 39.82  |
| 13             | 42.08                    | 42.36  |
| 14             | 56.72                    | 56.83  |
| 15             | 24.25                    | 24.32  |
| 16             | 28.81                    | 28.93  |
| 17             | 55.82                    | 56.12  |

ตารางที่ 3.21 (ต่อ)

| ตำแหน่งคาร์บอน | เคมีคัลชิฟท์ (ppm)       |   |
|----------------|--------------------------|---|
|                | อนุพันธ์แอซีเตตของ สาร 8 | stigmasteryl-3- $\beta$ -D-glucopyranoside tetraacetate |
| 18             | 12.16                    | 12.03   |
| 19             | 19.25                    | 19.39   |
| 20             | 40.39                    | 40.47   |
| 21             | 21.12                    | 21.07   |
| 22             | 138.20                   | 138.30  |
| 23             | 129.15                   | 129.50  |
| 24             | 51.13                    | 50.27   |
| 25             | 31.77                    | 31.96   |
| 26             | 18.93                    | 19.12   |
| 27             | 21.01                    | 21.07   |
| 28             | 25.31                    | 25.40   |
| 29             | 11.93                    | 12.03   |
| 1'             | 99.50                    | 99.68   |
| 2'             | 71.54                    | 72.03   |
| 3'             | 72.80                    | 73.03   |
| 4'             | 68.39                    | 68.69   |
| 5'             | 71.36                    | 71.78   |
| 6'             | 61.98                    | 62.19   |

ตารางที่ 3.21 (ต่อ)

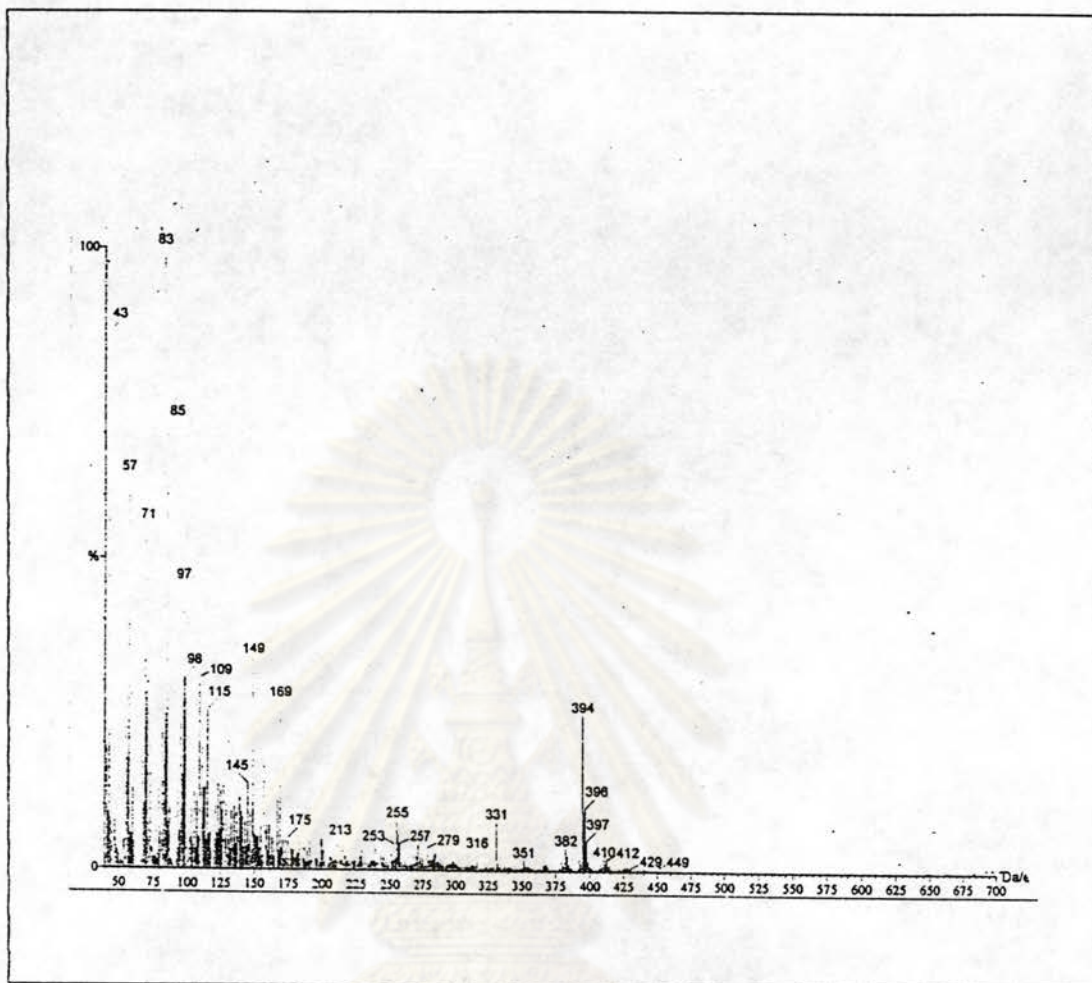
| ตำแหน่งคาร์บอน  | เคมีคัลชิฟท์ (ppm)       |   |
|---|--------------------------|---|
|   | อนุพันธ์แอซีเตตของ สาร 8 | stigmasteryl-3-β-D-glucopyranoside tetraacetate |
| $\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{-C-O} \end{array}$ | 20.66, 20.61             | 20.58, 20.58                                    |
|   | 20.52, 20.50             | 20.69, 20.69                                    |
| $\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{CH}_3\text{-C} \end{array}$   | 170.61, 170.26           | 172.90, 170.59                                  |
|   | 169.32, 169.22           | 170.27, 169.35                                  |

จากข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของอนุพันธ์แอซีเตตของ สาร 8

ยืนยันได้ว่าอนุพันธ์ดังกล่าวคือ stigmasteryl-3-O-β-D-glucopyranoside tetraacetate (C<sub>43</sub>H<sub>68</sub>O<sub>10</sub> มวลโมเลกุล 744)

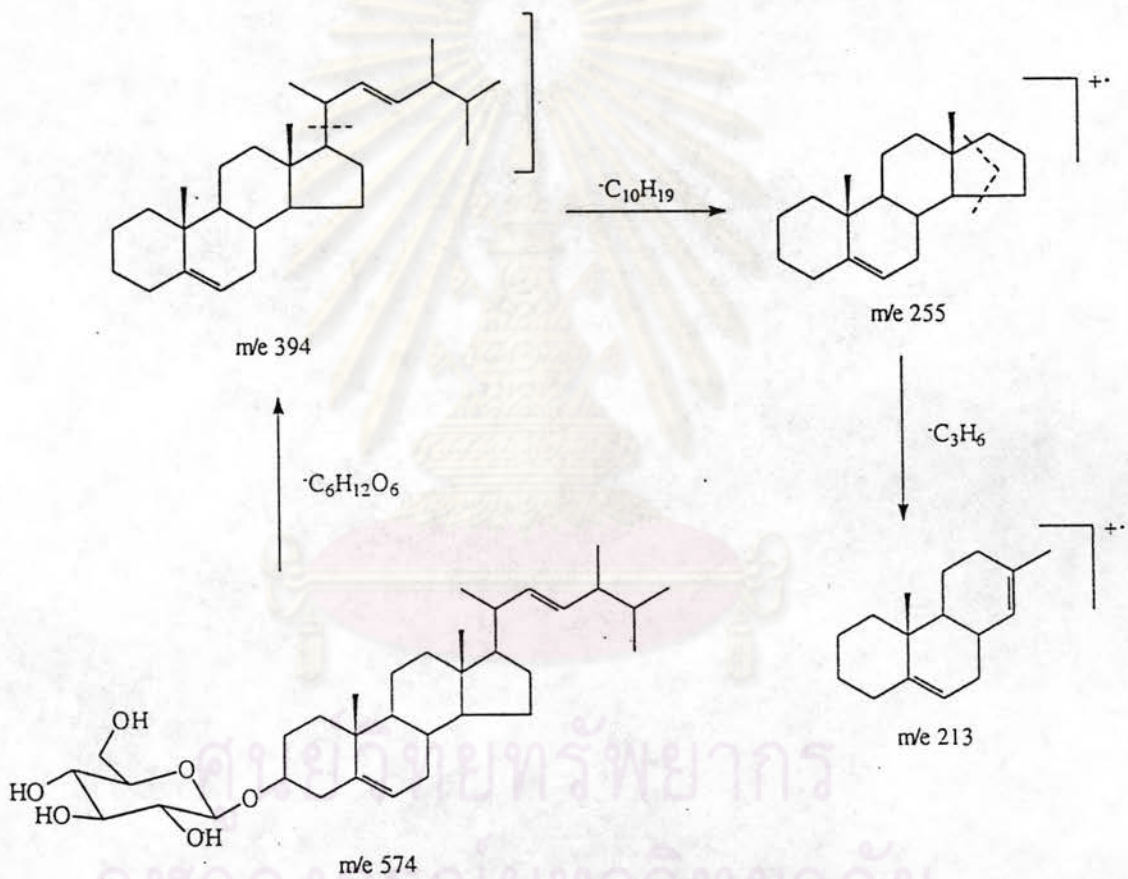
ดังนั้น สาร 8 คือ stigmasteryl-3-O-β-D-glucopyranoside (C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub> มวลโมเลกุล 574)

เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัมของ สาร 8 (รูปที่ 3.37) ไม่พบไอออนเชิงโมเลกุล (M<sup>+</sup>) เนื่องจากเกิดการสูญเสียโมเลกุลของน้ำตาลก่อน จึงพบแต่ส่วนของสเตอรอยด์ และการแตกเป็นชิ้นส่วนของสเตอรอยด์ จากแมสสเปกตรัมพบไอออนชิ้นส่วนสำคัญที่ m/e 412, 394, 255 และ 213 ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับ สาร 6 โดยมีกลไกการแตกเป็นชิ้นส่วน และยังคงพบ m/e ของการแตกตัวของน้ำตาลที่สำคัญคือที่ 331, 169 และ 109 ดังแผนภาพที่ 3.3



รูปที่ 3.37 แสดงแมสสเปกตรัมของ สาร 8

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



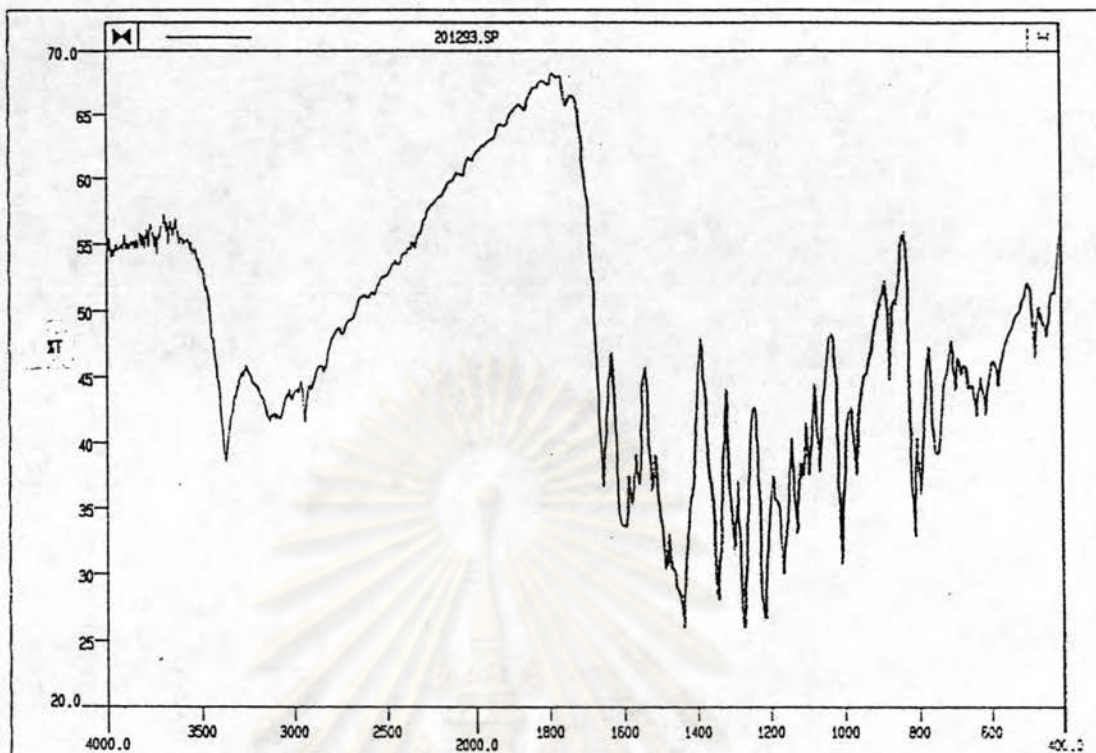
แผนภาพที่ 3.3 รูปแบบการแตกเป็นชิ้นของ สาร 8 (53)

### 3.2.9 การทำสาร 9 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 9 มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวเป็นผงอยู่ภายในชั้นสีน้ำตาล ได้จากลำดับส่วน 26-42 (ส่วนย่อย SA<sub>25</sub>) ซึ่งถูกชะด้วย คลอโรฟอร์ม:เมทานอล(19:1)ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม(ตารางที่ 2.7) เมื่อนำ SA<sub>25</sub> มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำจะได้ สาร 9 ซึ่งจะมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองใส ได้จากลำดับส่วน 30-39 ซึ่งถูกชะด้วย ไดคลอโรมีเทน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ เมื่อนำ สาร 9 มาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลและกับไดคลอโรมีเทน จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองใสหนัก 0.225 กรัม ( $4.5 \times 10^{-3}$  % น้ำหนักโดยน้ำหนัก) จุดหลอมเหลว 240.0-242.0 องศาเซลเซียส TLC ให้ค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.55 [ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)] สาร 9 ละลายได้ดีในเมทานอลร้อน ละลายได้น้อยในไดคลอโรมีเทน, คลอโรฟอร์ม, เฮกเซนและเอทานอล สาร 9 ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard แสดงว่า สาร 9 ไม่ใช่สารประกอบประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ สาร 9 สามารถพอกจางสี Br<sub>2</sub> ใน CCl<sub>4</sub> และให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-DNP แสดงว่า สาร 9 เป็นสารประกอบประเภทไม้อิ่มตัวและมีหมู่คาร์บอนิลในวงหกเหลี่ยม นอกจากนี้ สาร 9 ให้สารละลายสีแดงเลือดนกกับ Cyanidin test แสดงว่า สาร 9 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ ชนิดฟลาโวนอล (flavonol)(42)

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.38) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่กว้าง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่ 3500-3000 ซม.<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังแสดงแถบการดูดกลืนแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะของหมู่คาร์บอนิลของสารประกอบประเภท conjugated ketone (72) ที่ 1653 ซม.<sup>-1</sup> ข้อมูลการดูดกลืนแสงของ สาร 9 แสดงดังตารางที่ 3.22



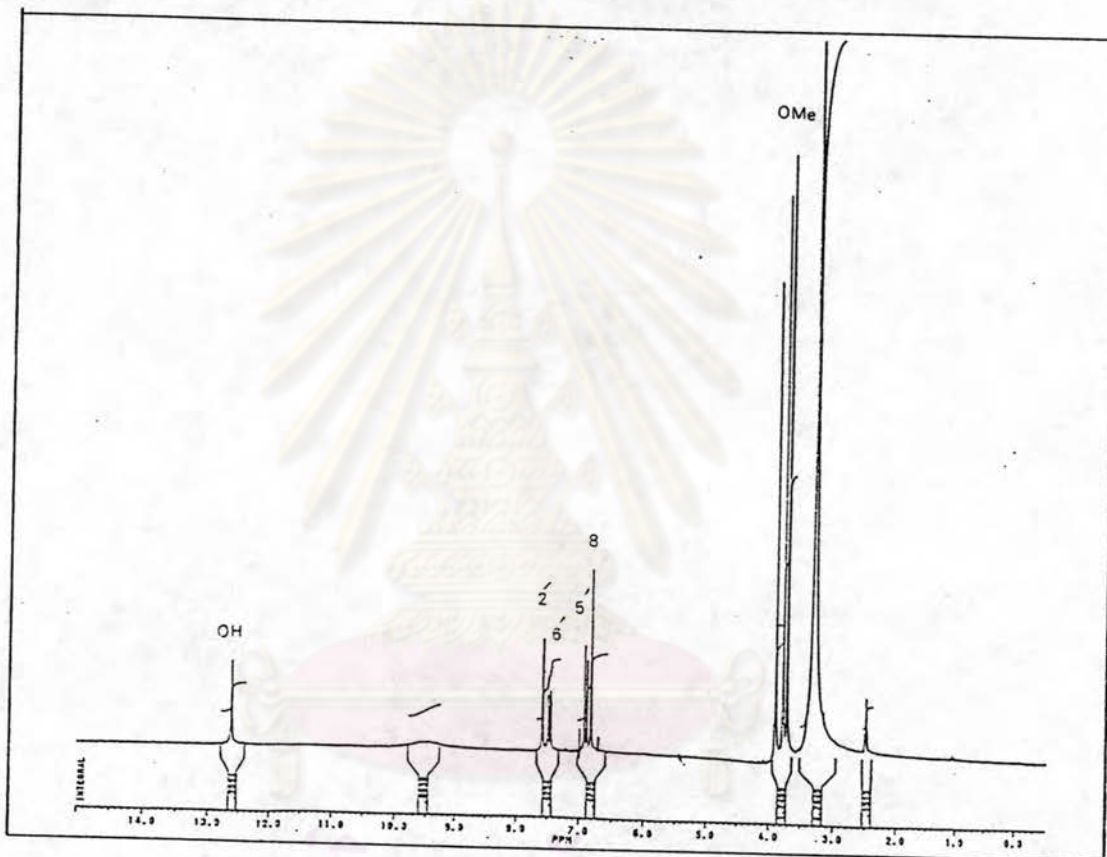


รูปที่ 3.38 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 9

ตารางที่ 3.22 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 9

| แถบการดูดกลืนแสง (cm. <sup>-1</sup> ) | ความเข้ม     | แสดงลักษณะ   |
|---------------------------------------|--------------|--|
| 3500-3000                             | สูง, (กว้าง) | O-H สันแบบยึด  |
| 2940, 2833                            | สูง          | C-H สันแบบยึดของ -CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> - |
| 1653                                  | สูง          | C=O สันแบบยึดของคาร์บอนิลของ<br>conjugated ketone      |
| 1594, 1575, 1524                      | สูง          | C=C สันแบบยึดของแอโรมาติก                              |
| 1343                                  | สูง          | C-H สันแบบงอของ -CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -  |
| 1274                                  | สูง          | C-O สันแบบยึดไม่สมมาตรของ C-O-C                        |
| 1092-1065                             | สูง          | C-O สันแบบยึดแบบสมมาตรของ C-O-C                        |
| 793                                   | ต่ำ          | =C-H สันแบบงอนอกระนาบของแอโรมาติก                      |

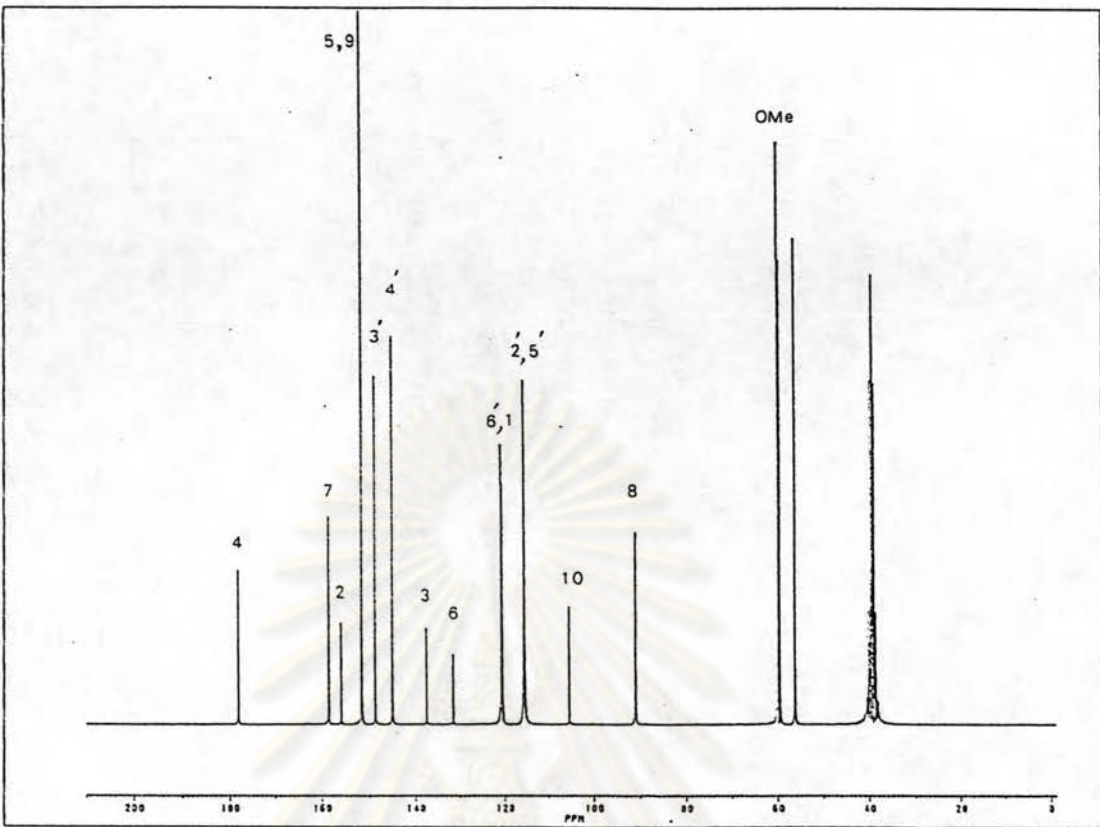
โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) รูปที่ 3.39 ปรากฏสัญญาณ  
ของโปรตอน 15 สัญญาณ คือที่  $\delta$  (ppm): 3.71(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.77(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.81  
(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 6.81(1H, s, -CH=), 6.89(1H, d, J = 9.0 Hz, -CH=CH-), 7.47  
(1H, d, J = 9.0 Hz, -CH=CH-), 7.58(1H, s, -CH=), 9.65(1H, br., OH) และ 12.63  
(1H, s, -OH)



รูปที่ 3.39 แสดงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 9

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของโปรตอนของหมู่  
เมทอกซีที่  $\delta$  (ppm): 3.71, 3.77 และ 3.81, สัญญาณโปรตอนของวงแอรมาติกที่  $\delta$  (ppm):  
6.81, 6.89, 7.47 และ 7.58 ตามลำดับ สัญญาณของหมู่ไฮดรอกซี ปรากฏสัญญาณที่  $\delta$  (ppm):  
9.65 และ 12.63 (73)

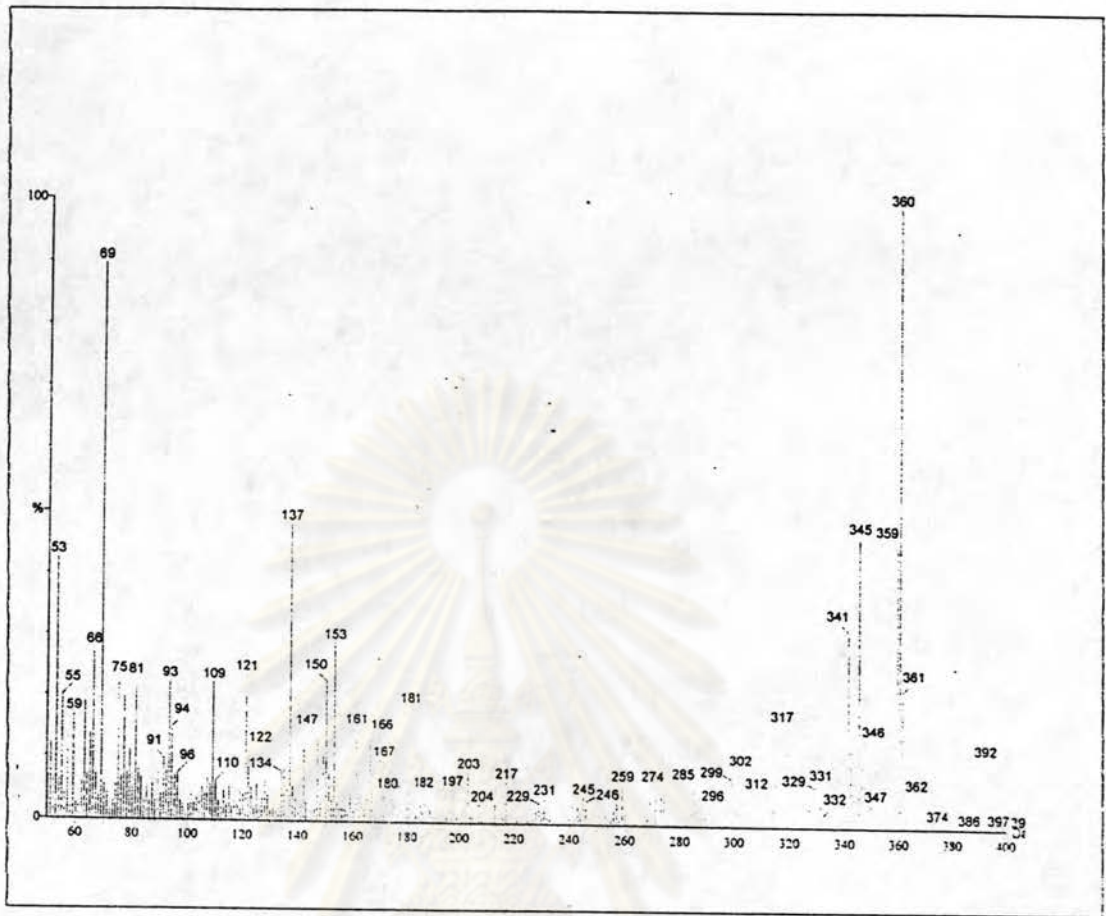
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของ  
คาร์บอน 17 สัญญาณ คือที่  $\delta$  (ppm): 56.30, 59.58, 59.98, 91.06, 105.48, 115.56,  
115.70, 120.64, 120.83, 131.50, 137.61, 145.25, 148.78, 151.66, 155.93,  
158.53 และ 178.14 ดังในรูปที่ 3.40



รูปที่ 3.40 แสดงคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 9

จาก คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน  
 ที่  $\delta$ (ppm): 56.30, 59.58 และ 59.98 ซึ่งเป็นสัญญาณเฉพาะของ  $sp^3$  คาร์บอนอะตอม  
 ที่ต่ออยู่กับอะตอมที่สามารถดึงอิเล็กตรอน (electronegative atom)(72) ซึ่งในที่นี้ น่าจะเป็น  
 คาร์บอนของหมู่เมทอกซี (-OCH<sub>3</sub>), ที่  $\delta$  (ppm): 91.06, 105.48, 115.56, 115.70,  
 120.64, 120.83, 131.50, 137.61, 145.25, 148.78, 151.66, 155.93 และ  
 158.53 เป็นสัญญาณเฉพาะของ  $sp^2$  คาร์บอนอะตอม ในวงแหวนมาติกและของอัลคีนและที่  
 $\delta$  (ppm): 178.14 เป็นสัญญาณเฉพาะของคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิล (conjugated ketone)  
 (72)

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงบวก (M<sup>+</sup>) ที่ m/e  
 (% relative intensity) 360(100.0) นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 345(47.5), 331(7.2),  
 317(16.7), 302(9.4), 181(18.8), 153(29.2), 137(48.3) และ 109(22.4)  
 91(9.7) (74) ดังในรูปที่ 3.41



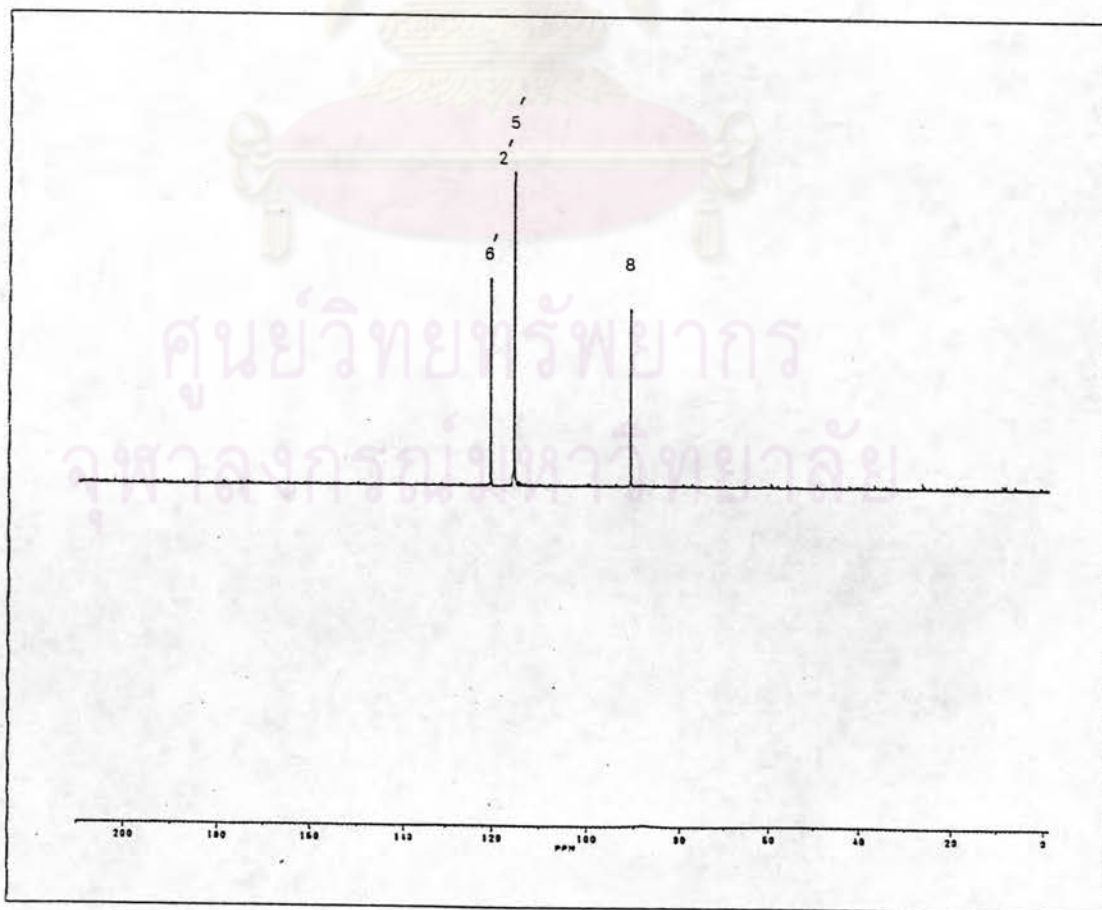
รูปที่ 3.41 แสดงแมสสเปกตรัมของ สาร 9

จากแมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโรมเลกุล ( $M^+$ ) ที่  $m/e$  360(100.0%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สาร 9 น่าจะมีมวลโมเลกุลเป็น 360 เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลโปรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ทำให้ทราบว่า สาร 9 ประกอบด้วย คาร์บอน 18 อะตอมแต่สัญญาณที่ปรากฏนั้นมีเพียง 17 สัญญาณ จะสังเกตเห็นว่า ที่  $\delta$  151.66 ppm มีความเข้มสูงมากซึ่งน่าจะเกิดจากการซ้อนทับกันของ 2 สัญญาณ, ไฮดรเจน 15 อะตอม (จาก  $-CH=4$  อะตอม, จาก  $-OCH_3$  3 หมู่ เท่ากับ 9 อะตอม และจาก  $-OH$  2 หมู่ เท่ากับ 2 อะตอม) และออกซิเจน 5 อะตอม (จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมพบว่า มี  $-OCH_3$  3 หมู่ เท่ากับ 3 อะตอม, จาก  $-OH$  2 หมู่ เท่ากับ 2 อะตอม) เมื่อรวมมวลอะตอมของ ไฮดรเจน คาร์บอน และออกซิเจน ที่ปรากฏสัญญาณให้เห็นรวมมวลได้เท่ากับ 311 ซึ่งยังขาดอยู่อีก 49 ซึ่งเมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสารประกอบเพอร์ออกไซด์ที่พบโดยทั่วไปจะต้องมีออกซิเจนอีก 2 อะตอมคือ ออกซิเจนของหมู่คาร์บอนิล ( $>C=O$ ) และ ของอีเทอร์ ( $C-O-C$ ) (75) เมื่อเทียบกับมวลโมเลกุลที่คาดว่าจะจะเป็นไปได้ จากข้อมูลแมสสเปกตรัมพบว่ายังขาดอีกเท่ากับ 17 ซึ่งน่าจะเป็นหมู่ไฮดรอกซี

1 หมู่เพราะฉะนั้น สาร 9 จึงน่าจะมีออกซิเจนทั้งหมด 8 อะตอม และ ไฮโดรเจน 16 อะตอม และน่าจะมีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_{18}H_{16}O_8$  มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 360 จากสูตรโมเลกุลที่คาดไว้ดังกล่าวพบว่า จำนวนโปรตอน คาร์บอน และออกซิเจน สอดคล้องกันกับมวลโมเลกุลที่ได้จากแมสสเปกตรัมทุกประการ และสามารถคำนวณความไม่อิ่มตัว ได้เท่ากับ 11

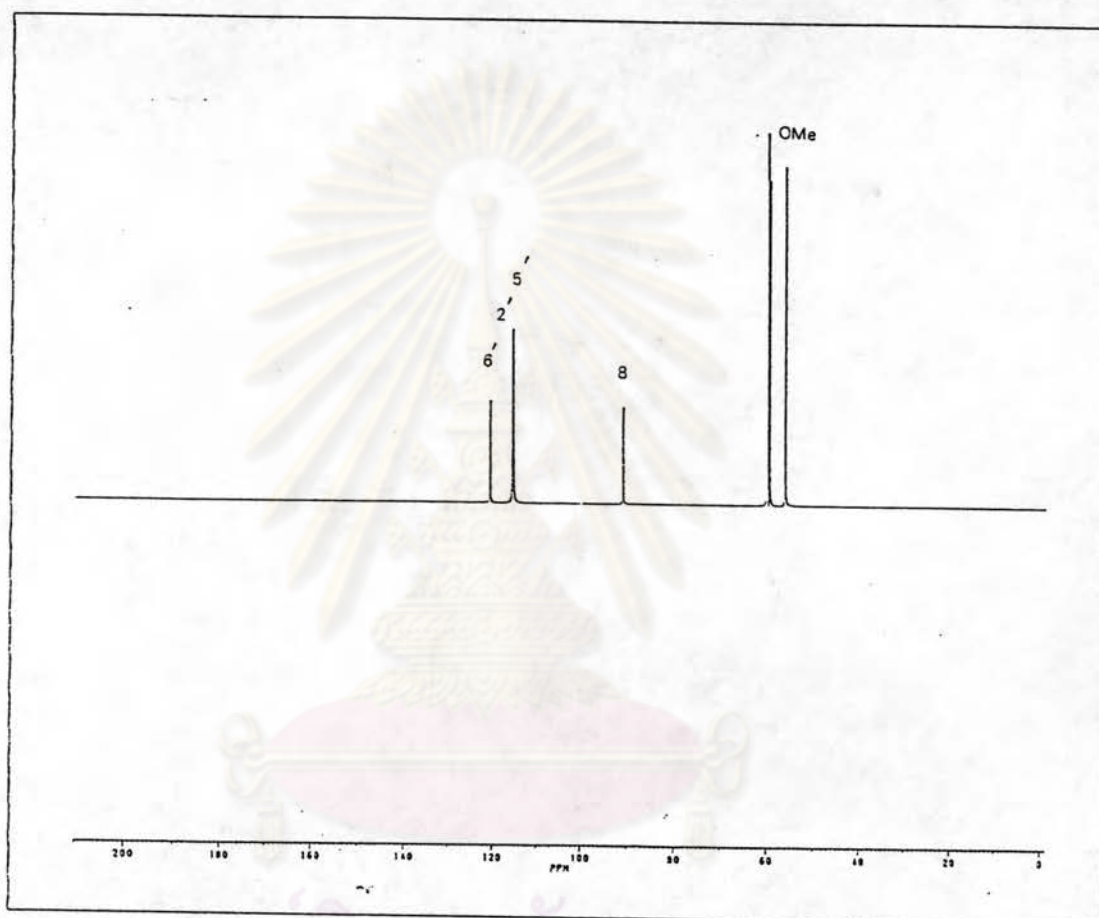
เมื่อนำ สาร 9 มาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของธาตุ โดยเครื่อง elemental analyzer (ข้อ 2.2.1) สามารถหาสูตรโมเลกุลได้เป็น  $C_{18}H_{16}O_8$  ซึ่งสอดคล้องกับที่ทำนายไว้ และเมื่อนำ สาร 9 มาวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยเครื่อง high resolution mass spectrometer ได้มวลโมเลกุลซึ่งเป็น base peak 360.0845 (cal. 360.0946) แสดงว่าสูตรโมเลกุลที่ทำนายไว้ถูกต้อง

DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของ  $-CH=$  4 สัญญาณคือ ที่  $\delta$  (ppm): 91.06, 115.58, 115.70 และ 120.64 ดังในรูปที่ 3.42



รูปที่ 3.42 แสดง DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 9

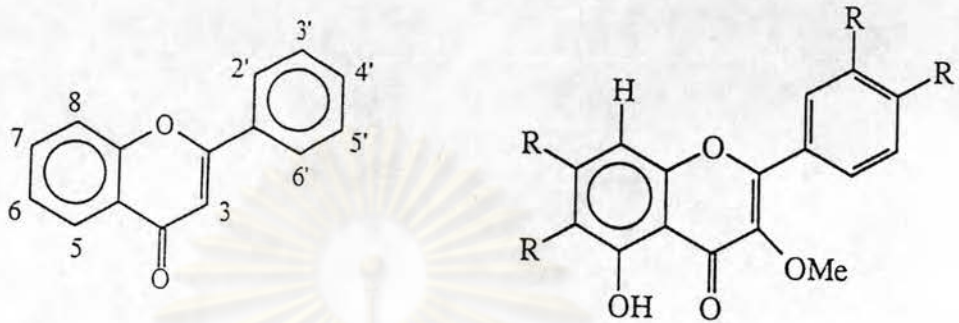
DEPT-135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏ สัญญาณด้านบน (up phase) ของ  $-CH=$  และ  $-CH_3$  7 สัญญาณคือ ที่  $\delta$  (ppm): 56.29, 59.58, 59.98, 91.06, 115.58, 115.70 และ 120.64 แต่ไม่ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ  $-CH_2-$  ดังในรูปที่ 3.43



รูปที่ 3.43 แสดง DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 9

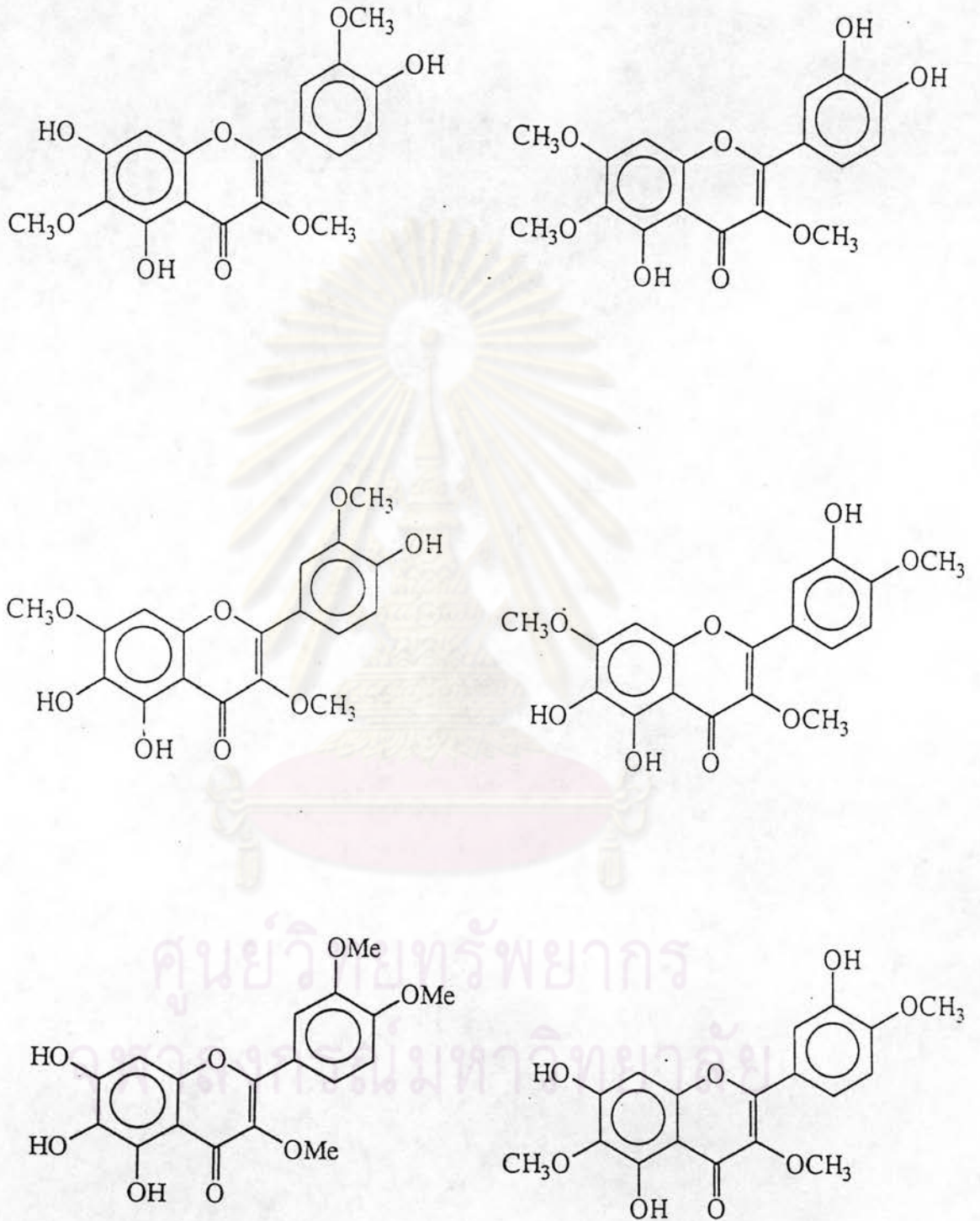
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 3.40) ปรากฏสัญญาณของ คาร์บอน 17 สัญญาณ จากผลการทำ DEPT-135 และ DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์-สเปกตรัมพบสัญญาณของเมทิลคาร์บอน ( $-CH=$ ) ที่  $\delta$  (ppm): 91.06, 115.58, 115.70 และ 120.64 แต่ไม่ตรวจพบสัญญาณของ เมทิลีนคาร์บอน ( $-CH_2-$ ) ส่วนเมทิลคาร์บอน ปรากฏสัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 56.29, 59.58 และ 59.98 สำหรับควอเตอร์นารีคาร์บอน 11 อะตอม ปรากฏสัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 105.48, 120.83, 131.50, 137.61, 145.25, 148.78, 151.66(2C), 155.93, 158.53 และ 178.14 ตามลำดับ

จากผลการทดสอบปฏิกิริยาเคมีด้วย Cyanidin test ทำให้ทราบว่า สาร 9 เป็นสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ ชนิดฟลาโวนอล ซึ่งสูตรโครงสร้างหลักโดยทั่วไปได้ แสดงไว้ข้างล่างนี้



รูปที่ 3.44 โครงสร้างหลักโดยทั่วไปของ ฟลาโวนอล (75)

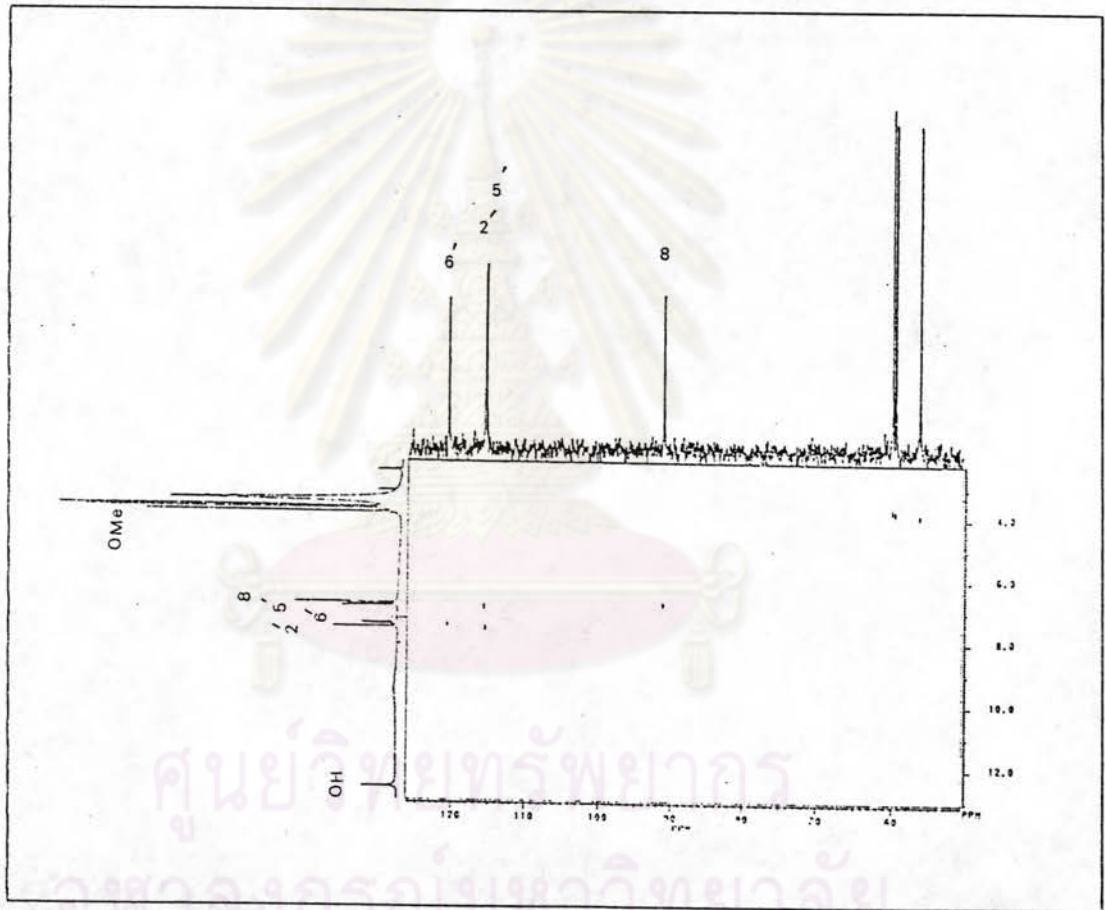
จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ทำให้ทราบว่า สาร 9 มีหมู่แทนที่ ทั้งหมด 6 หมู่โดยแบ่งเป็น  $-OCH_3$  3 หมู่ และ  $-OH$  3 หมู่ เมื่อแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วยหมู่ ต่าง ๆ เหล่านี้ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3, 5, 6, 7, 8, 2', 3', 4', 5' และ 6' จาก โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม, คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม, DEPT 90 และ DEPT 135 ทำให้เราทราบว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีที่เกิดพันธะไฮโดรเจนกับ คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ซึ่งเป็นหมู่คาร์บอนิลชนิด conjugated ketone (75), มีเมทิลคาร์บอน ที่ติดกัน ( $-CH=CH-$ ) และมี เมทิลคาร์บอนที่ไม่ติดกันอีก 2 อะตอม ซึ่งจากการศึกษาเอกสารอ้างอิง พบว่า ลักษณะสัญญาณโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 9 น่าจะมีโครงสร้างเป็น 3',4'-Dioxygenated flavonoids ประเภท ฟลาโวนอล เพราะไม่ปรากฏสัญญาณของ H-3 ที่ประมาณ 6.3 ppm ฟลาโวนอลจะมี H-8 ปรากฏสัญญาณในช่วง 6.3-6.5 ppm, H-5' จะปรากฏสัญญาณ ในช่วง 6.7-7.1 ppm, H-2' และ H-6' จะปรากฏสัญญาณในช่วง 7.2-7.9 ppm โดยส่วน ใหญ่แล้ว H-2' จะปรากฏสัญญาณที่สูงกว่า H-6' (75) ดังนั้นจึงสามารถทำนายสูตรโครงสร้างของ สาร 9 ที่เป็นไปได้ ดังแสดงไว้ข้างล่างนี้ (76)



รูปที่ 3.45 แสดงโครงสร้างที่เป็นไปได้ของ สาร 9



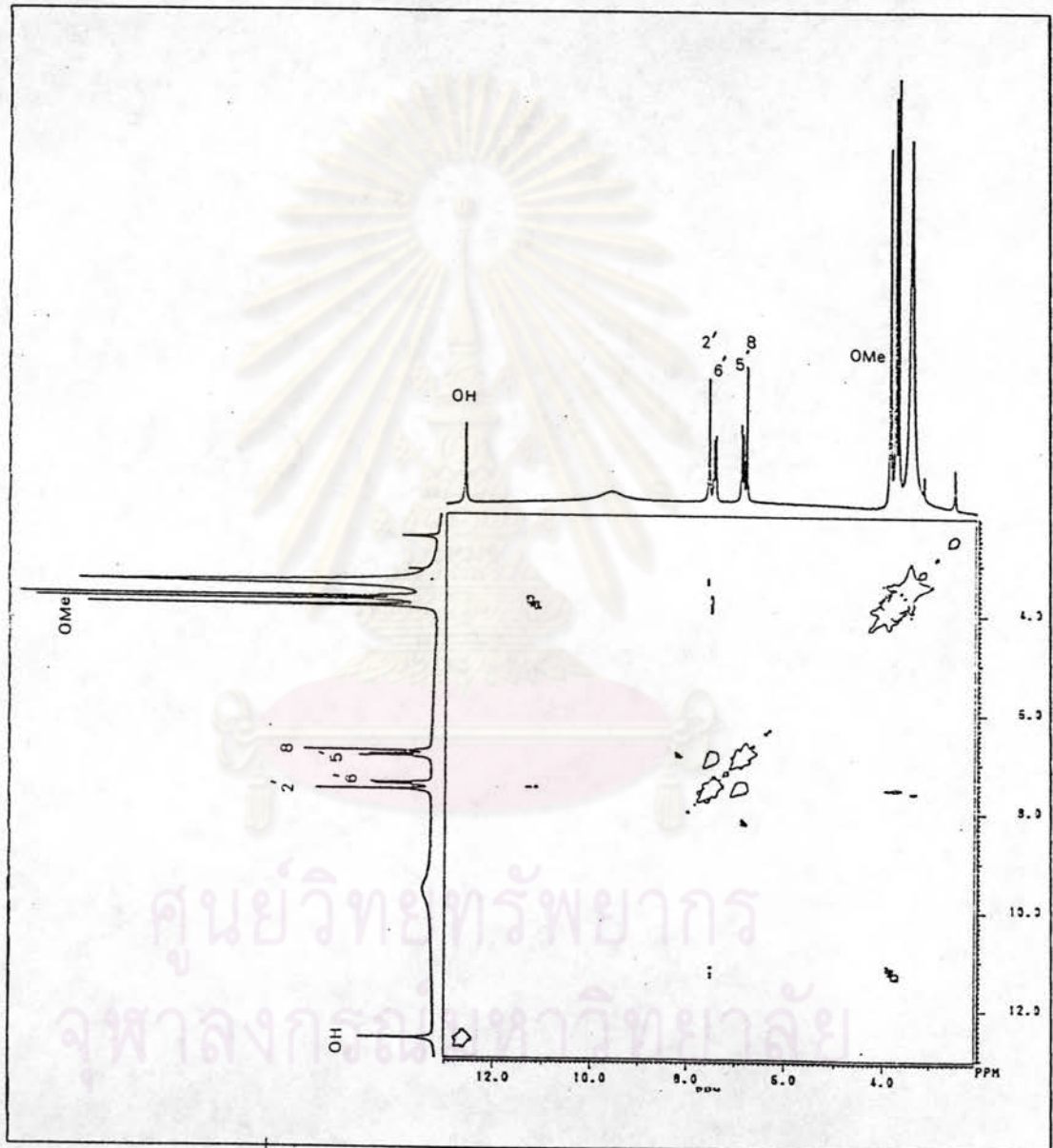
โปรตอน-คาร์บอน-13 CHCORR (รูปที่ 3.46) ปรากฏสัญญาณของเมทอกซีที่  $\delta$  (ppm): 3.71, 3.77 และ 3.81 สอดคล้องกับสัญญาณของเมทอกซี คาร์บอนที่  $\delta$ (ppm): 59.98, 59.58 และ 56.29 ตามลำดับ โปรตอนที่  $\delta$ (ppm): 6.61 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$ (ppm): 91.06, โปรตอนที่  $\delta$ (ppm): 6.89 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$  (ppm): 115.80, โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.47 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$  (ppm) : 120.64 และโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.58 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$  (ppm): 115.70



รูปที่ 3.46 แสดงโปรตอน-คาร์บอน-13 CHCORR ของ สาร 9

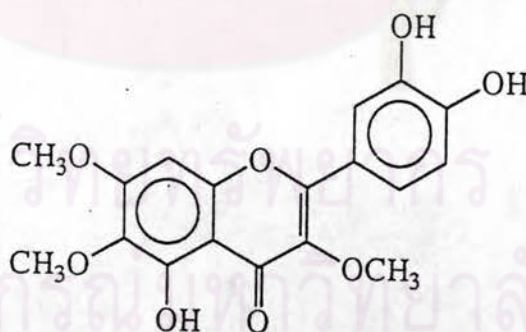


โปรตอน-โปรตอน COSY (รูปที่ 3.48) ปรากฏสัญญาณที่แสดงให้  
 ทราบว่า โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 6.89 อยู่ติดกับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.47 และ โปรตอนที่  $\delta$   
 (ppm): 7.47 อยู่ใกล้กับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 3.71

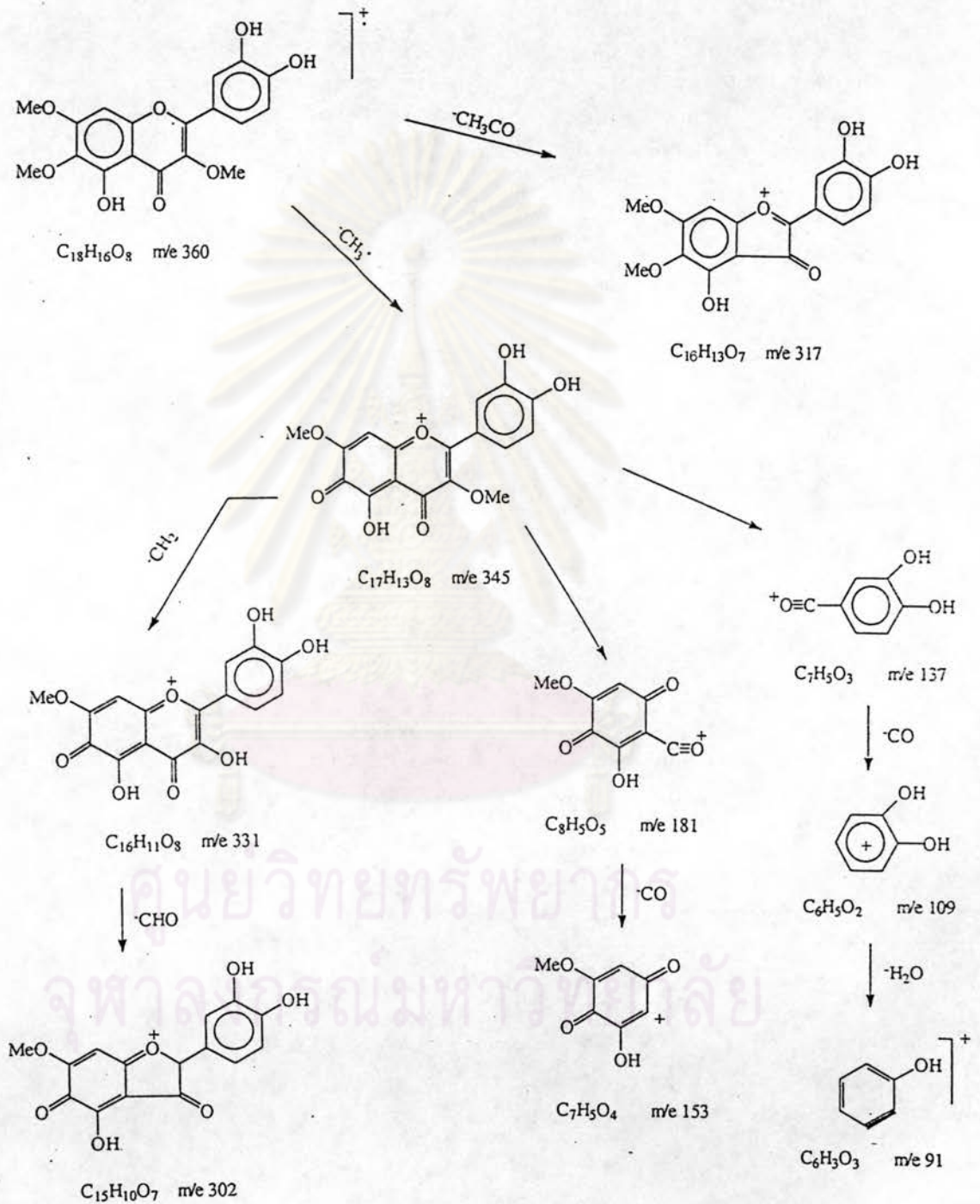


รูปที่ 3.48 แสดงโปรตอน-โปรตอน COSY ของ สาร 9

จากเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมสรุปได้ว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ทั้งนี้เพราะ โปรตอนที่หมู่ไฮดรอกซีสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุให้ โปรตอนตำแหน่งนี้เกิด deshield มากจึงปรากฏสัญญาณสูงถึง 12.63 ppm (72), คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ควรจะมีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซีซึ่ง coupling กับหมู่ไฮดรอกซีที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (จาก NOESY), คาร์บอนตำแหน่งที่ 5' และ 6' เป็นเมทิลที่ติดกัน (-CH=CH-) (จาก NOESY และ COSY), คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 และ 8 จะต้องเป็น -C-OCH<sub>3</sub> และ -CH= ที่อยู่ติดกัน (จาก NOESY), คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 น่าจะมีหมู่เมทอกซี (-OCH<sub>3</sub>) เพราะสามารถเกิด coupling กับโปรตอนตำแหน่งที่ 6' (จาก NOESY และ COSY) เพราะฉะนั้นคาร์บอนตำแหน่งที่ 3' และ 4' จะต้องมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี(-OH) และคาร์บอนตำแหน่งที่ 2' จึงเป็นเมทิล (-CH=) ซึ่งปรากฏสัญญาณเดี่ยว จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นโครงสร้างที่น่าจะเป็นไปได้มากที่สุด คือ



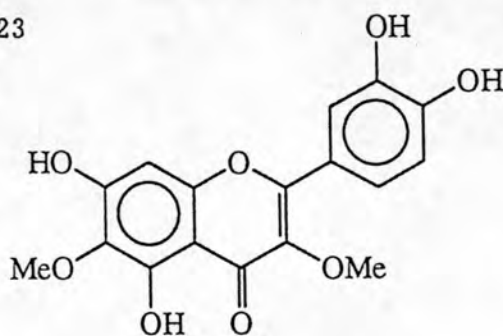
แสดงโครงสร้างของ สาร 9 ที่ เป็นไปได้มากที่สุด



แผนภาพที่ 3.4 แสดงรูปแบบการแตกตัวของ สาร 9 (75, 78)

จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงพบว่าคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของเฟลโรวนและเฟลโรวนอลที่ตำแหน่งที่ 8 มักจะไม่มีหมู่แทนที่และเป็นตำแหน่งที่มีค่า chemical shift ค่อนข้างต่ำคือประมาณ 90.0-95.0 ppm (77) แสดงว่า สาร 9 น่าจะมีโครงสร้างดังแสดงไว้ เมื่อพิจารณาการแตกมเลกุลของ สาร 9 ดังแสดงในแผนภาพ 3.4 จะพบ m/e 345 ซึ่งเป็นการแตก  $-CH_3$  ออกจาก คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 แสดงว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี, พบ m/e 317 เป็นการแตก  $CH_3CO-$  ออกจากมเลกุลซึ่งแสดงว่าคาร์บอน ตำแหน่งที่ 3 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี, พบขึ้น m/e 302 เป็นการยืนยันว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของ ring A มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี, พบ m/e 137 ซึ่งแสดงให้ทราบว่าโครงสร้างของ ring B มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ และ พบ m/e 181 เป็นการยืนยันว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 ของ ring A มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี จากการพิจารณาการแตกตัวของโครงสร้างของ สาร 9 ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าเป็นดังที่เสนอไว้ข้างต้น

จากการศึกษาเอกสารอ้างอิง(73)พบว่า สาร 9 มีชื่อสามัญว่า Chrysosplenol D หรือ quercetagetin -3,6,7-trimethyl ether มีจุดหลอมเหลว 238.0-240.0 องศาเซลเซียส ปรอทอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO+ $CDCl_3$ ) แสดงสัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 7.60(1H, d, J = 2.5 Hz, -CH=), 7.5(1H, dd, J = 9.0, 2.5 Hz, -CH=), 6.83(1H, d, J = 9.0 Hz, -CH=), 6.5 (1H, s, -CH=), 3.90 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>) และ 3.85 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>) อย่างไรก็ตามพบว่าข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมที่รายงานไว้นั้นยังไม่สมบูรณ์ ยังไม่ได้รายงาน คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม จากการศึกษาดังกล่าวจึงพบว่าได้มีรายงาน ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับ สาร 9 คือ Axillarin (77) ซึ่งทำให้สามารถช่วยในการยืนยันสูตรโครงสร้างของ สาร 9 ได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.23



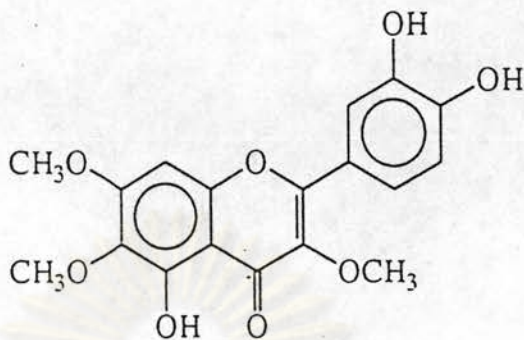
แสดงสูตรโครงสร้างของ Axillarin

ตารางที่ 3.23 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 9 เทียบกับ Axillarin(77)

| ตำแหน่ง<br>คาร์บอน | เคมีกัลซีท์ (ppm) |           | ตำแหน่ง<br>คาร์บอน | เคมีกัลซีท์ (ppm) |           |
|--------------------|-------------------|-----------|--------------------|-------------------|-----------|
|                    | สาร 9             | Axillarin |                    | สาร 9             | Axillarin |
| 2                  | 155.93            | 155.55    | 1'                 | 120.83            | 121.85    |
| 3                  | 137.61            | 137.34    | 2'                 | 115.70            | 115.74    |
| 4                  | 178.14            | 178.09    | 3'                 | 145.24            | 145.29    |
| 5                  | 151.66            | 152.37    | 4'                 | 148.78            | 148.76    |
| 6                  | 131.49            | 131.28    | 5'                 | 115.56            | 115.43    |
| 7                  | 158.53            | 157.91    | 6'                 | 120.54            | 120.54    |
| 8                  | 91.05             | 93.92     | OCH <sub>3</sub>   | 59.98             | 59.95     |
| 9                  | 151.66            | 151.61    | OCH <sub>3</sub>   | 59.58             | 56.18     |
| 10                 | 105.48            | 104.37    | OCH <sub>3</sub>   | 56.29             |           |

จากการเปรียบเทียบ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 9 กับ Axillarin พบว่า สารทั้งสองไม่ซ้ำสารเดียวกัน แต่มีความคล้ายคลึงกันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ring B ส่วน ring A สาร 9 และ Axillarin จะมีคาร์บอนตำแหน่งที่ 8 ไม่ถูกแทนที่เหมือนกัน และใน สาร 9 ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 มีค่าเคมีกัลซีท์ที่ต่ำกว่าปกติแสดงว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 จะต้องต่อกับหมู่ เมทอกซี ไม่ใช่ หมู่ไฮดรอกซี ซึ่งจะสอดคล้องกับข้อมูลจาก แมสสเปกตรัม จากการเปรียบเทียบข้อมูลทำให้สามารถกำหนดตำแหน่งของสัญญาณคาร์บอนได้

จากข้อมูลดังกล่าวมาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า สาร 9 คือสารประกอบ ประเภทเฟลวอนอล มีชื่อสามัญว่า quercetagenin-3,6,7-trimethyl ether หรือ 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,6,7-trimethoxy-4H-1-benzopyran-4-one



สาร 9:

2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-3,6,7-trimethoxy-4H-1-benzopyran-4-one

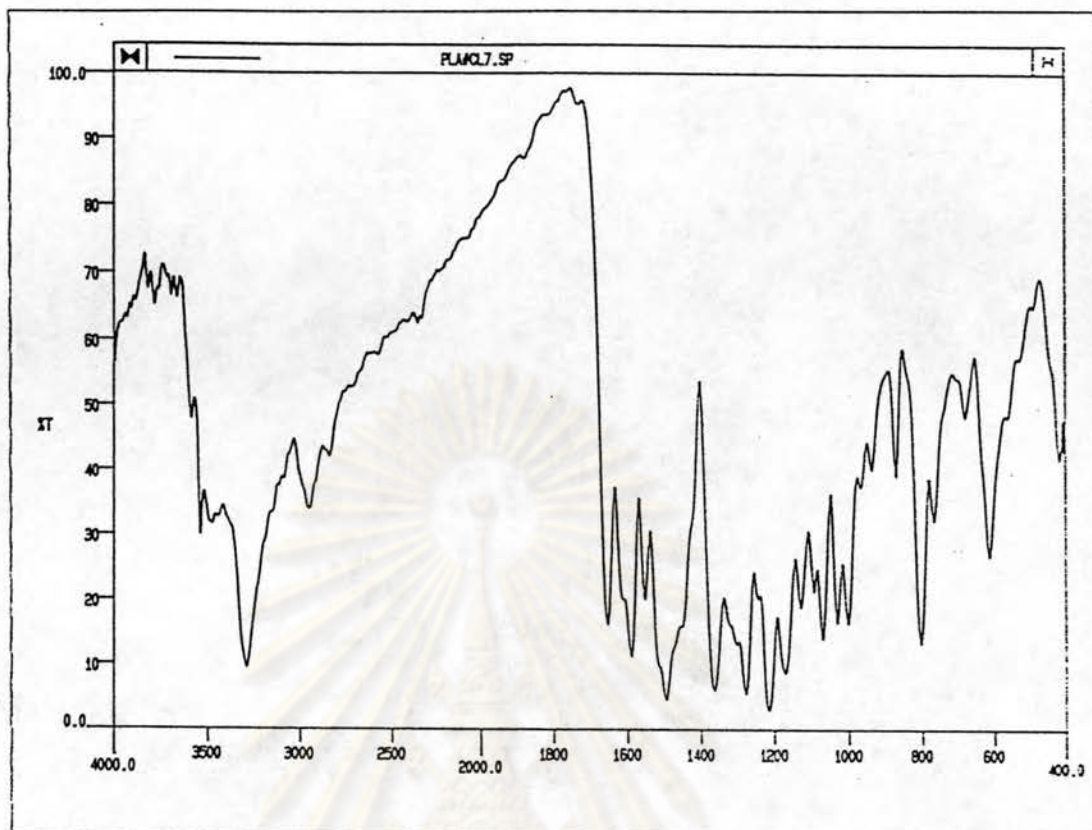
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3.2.10 การทาสาร 10 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 10 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีเหลืองอยู่ในน้ำมันสีน้ำตาล ได้จากลำดับส่วน 43-54 (ส่วนย่อย SA<sub>26</sub>) ซึ่งถูกชะด้วย คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (19:1) ในการทาคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 2.7) เมื่อนำ SA<sub>26</sub> มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ สาร 10 จะมีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง ได้จากลำดับส่วน 11-29 ซึ่งถูกชะด้วย เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:9) (ตารางที่ 2.11) เมื่อนำ สาร 10 มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทนร้อน จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง หนัก 0.155 กรัม ( $3.1 \times 10^{-3}$  ๕ หนักโดยน้ำหนัก) จุดหลอมเหลว 218.0-220.0 องศาเซลเซียส TLC ให้ค่า R<sub>f</sub> เท่ากับ 0.65 [ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)] สาร 10 ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม ละลายได้น้อยใน เฮกเซน, เมทานอล และเอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard แสดงว่า สาร 10 ไม่ใช่สารประกอบประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ สาร 10 สามารถพอกจางสี Br<sub>2</sub> ใน CCl<sub>4</sub> และให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-DNP แสดงว่า สาร 10 เป็นสารประกอบประเภทไม่อิ่มตัวและมีหมู่คาร์บอนิลในวงเลกุล นอกจากนี้ สาร 10 ให้สารละลายสีแดงเลือดนกกับ Cyanidin test แสดงว่า สาร 10 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ ชนิดฟลาโวนอล (flavonol) (72)

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.49) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่กว้าง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่ 3500-3000 ซม.<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังแสดงแถบการดูดกลืนแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะของหมู่คาร์บอนิลของ conjugated ketone (72) ที่ 1653 ซม.<sup>-1</sup> ข้อมูลการดูดกลืนแสงของ สาร 10 แสดงดังตารางที่ 3.24

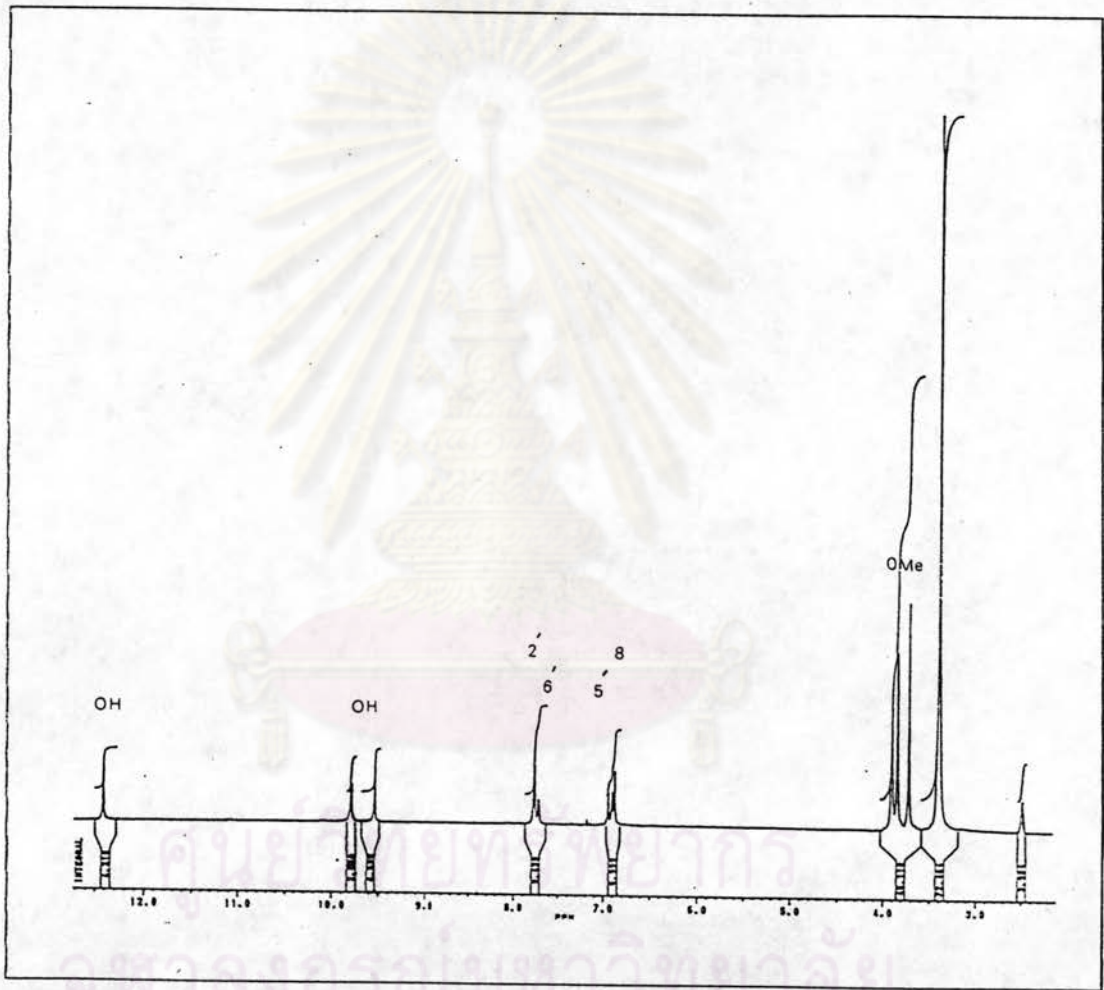


รูปที่ 3.49 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 10

ตารางที่ 3.24 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 10

| แถบการดูดกลืนแสง (cm. <sup>-1</sup> ) | ความเข้ม    | แสดงลักษณะ   |
|---------------------------------------|-------------|--|
| 3500-3000                             | สูง (กว้าง) | O-H สันแบบยึด  |
| 2951                                  | สูง         | C-H สันแบบยึดของ -CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> - |
| 1653                                  | สูง         | C=O สันแบบยึด conjugated ketone                        |
| 1589, 1552, 1495                      | สูง         | C=C สันแบบยึดของแอโรมาติก                              |
| 1362                                  | สูง         | C-H สันแบบงอของ -CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -  |
| 1277                                  | สูง         | C-O สันแบบยึดไม่สมมาตรของ C-O-C                        |
| 1092-1069                             | สูง         | C-O สันแบบยึดแบบสมมาตรของ C-O-C                        |
| 802                                   | ต่ำ         | =C-H สันแบบงอนอกระนาบของแอโรมาติก                      |

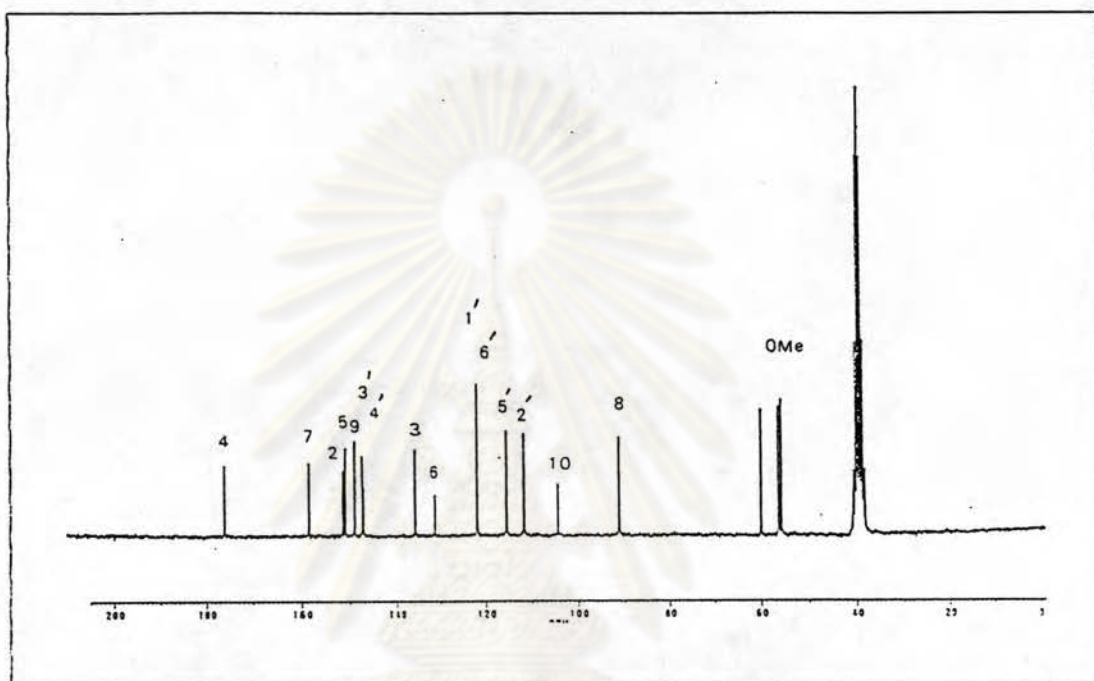
โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) (รูปที่ 3.50) ปรากฏสัญญาณ  
 ของโปรตอน 16 สัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 3.73(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.85(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.91  
 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 6.88(1H, s, -CH=), 6.94(1H, d, J = 8.0 Hz, -CH=CH-), 7.72  
 (1H, d, J = 8.0 Hz, -CH=CH-), 7.77(1H, s, -CH=), 9.76(1H, s, -OH), 9.77(1H, s,  
 -OH) และ 12.41(1H, s, -OH)



รูปที่ 3.50 แสดงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร 10

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม(79) ปรากฏสัญญาณของโปรตอน  
 ของหมู่เมทอกซีที่  $\delta$  (ppm): 3.73, 3.85 และ 3.91, สัญญาณโปรตอนของวงแอโรมาติกที่  
 $\delta$  (ppm): 6.88, 6.94, 7.72 และ 7.77 ตามลำดับ และสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซี ปรากฏที่  
 $\delta$  (ppm): 9.76, 9.76 และ 12.41

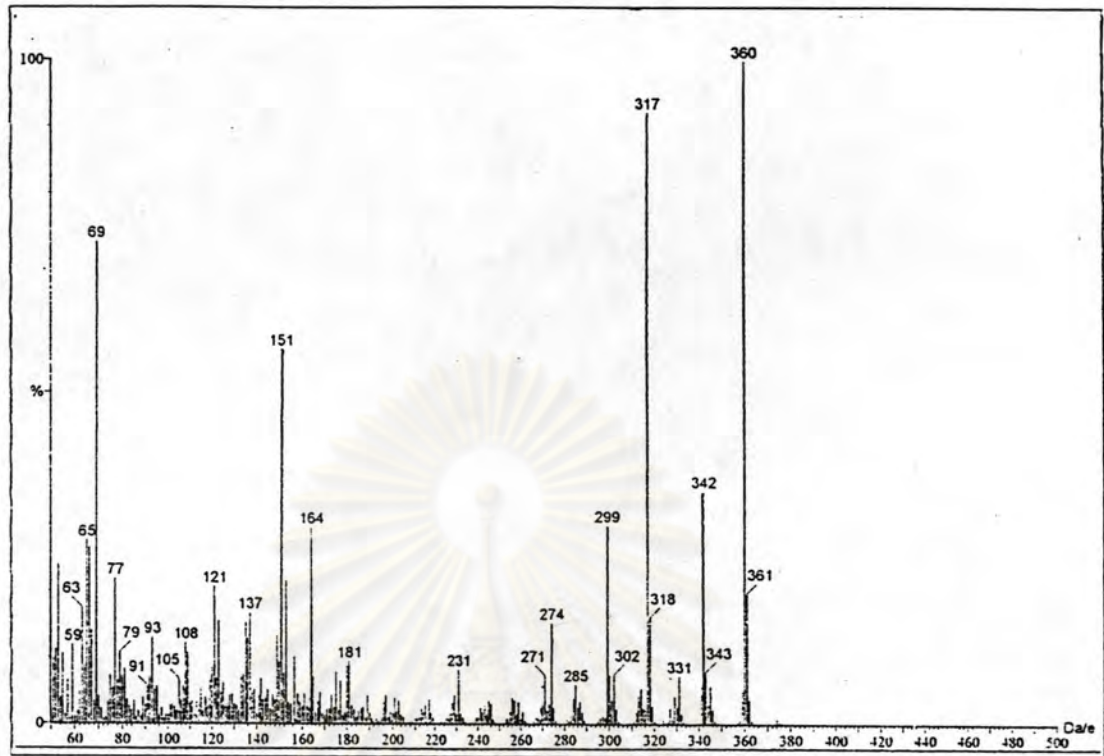
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของ  
คาร์บอน 17 สัญญาณ ที่  $\delta$  (ppm): 55.88, 56.45, 60.09, 91.28, 104.34, 111.77,  
115.56, 121.94, 131.28, 135.95, 147.14, 147.43, 148.99, 151.03, 151.57,  
158.57 และ 176.11 ดังในรูปที่ 3.51



รูปที่ 3.51 แสดงคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 10

จาก คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน  
ที่  $\delta$  (ppm) : 55.88, 56.45 และ 60.09 ซึ่งเป็นสัญญาณเฉพาะของ  $sp^3$  คาร์บอนอะตอม ที่  
ต่ออยู่กับอะตอมที่สามารถดึงอิเล็กตรอน (electronegative atom) (72) ซึ่งในที่นี้น่าจะเป็น  
คาร์บอนของหมู่เมทอกซี ( $-OCH_3$ ), ที่  $\delta$  (ppm): 91.28, 104.34, 111.77, 115.56,  
121.94, 131.28, 135.95, 147.14, 147.43, 148.99, 151.03, 151.57 และ  
158.57 เป็นสัญญาณเฉพาะของ  $sp^2$  คาร์บอนอะตอม ในวงแอโรมาติก และของอัลคีน และ ที่  $\delta$   
176.11 ppm เป็นสัญญาณเฉพาะของคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลชนิด conjugated ketone (72)

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโรมเลกุล ( $M^+$ ) ที่พบว่า  $m/e$   
(%relative intensity) จะปรากฏสัญญาณที่ 360(100.0) นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 345(5.8),  
342(35.4), 317(91.9), 299(29.6), 181(9.0), 164(29.6), 151(56.6) และ  
137(16.7) (79) ดังแสดงในรูปที่ 3.52



รูปที่ 3.52 แสดงแมสสเปกตรัมของ สาร 10

จาก แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงบวก (M<sup>+</sup>) ที่ m/e 360 (100.0%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สาร 10 น่าจะมีมวลโมเลกุลเป็น 360 เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลปรอทอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ทำให้ทราบว่า สาร 10 ประกอบด้วย คาร์บอน 17 อะตอม, ไฮโดรเจน 16 อะตอม (จาก -CH= 4 อะตอม, จาก -OCH<sub>3</sub> 3 หมู่ เท่ากับ 9 อะตอม และจาก -OH 3 หมู่ เท่ากับ 3 อะตอม) และออกซิเจน 6 อะตอม (จาก -OCH<sub>3</sub> 3 หมู่ เท่ากับ 3 อะตอม, จาก -OH 3 หมู่ เท่ากับ 4 อะตอม) เมื่อรวมมวลอะตอมของไฮโดรเจน คาร์บอน และออกซิเจน ตามจำนวนที่ปรากฏสัญญาณนั้นได้ค่าเท่ากับ 316 อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของสารประกอบเฟลวอนอยด์ที่พบโดยทั่วไปจะมี ออกซิเจนอีก 2 อะตอมจาก หมู่คาร์บอนิล (-C=O) และ จากอีเทอร์ (C-O-C) (75) เมื่อเทียบกับมวลโมเลกุลที่คาดว่าจะเป็นไปได้ จากข้อมูลแมสสเปกตรัมพบว่ายังขาดอีกเท่ากับ 12 จะต้องเป็นคาร์บอน 1 อะตอมเท่านั้น เพราะฉะนั้น สาร 10 จึงน่าจะมีคาร์บอน 18 อะตอม, มีออกซิเจน 8 อะตอม และ ไฮโดรเจน 16 อะตอมและน่าจะมีสูตรโมเลกุลเป็น C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub> มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 360 จากสูตรโมเลกุลที่คาดไว้พบว่าจำนวนปรอทอน คาร์บอน และ

ออกซิเจน สอดคล้องกันกับมวลโมเลกุลที่ได้จากแมสสเปกตรัมทุกประการ และสามารถคำนวณความไม่อิ่มตัว ได้เท่ากับ 11

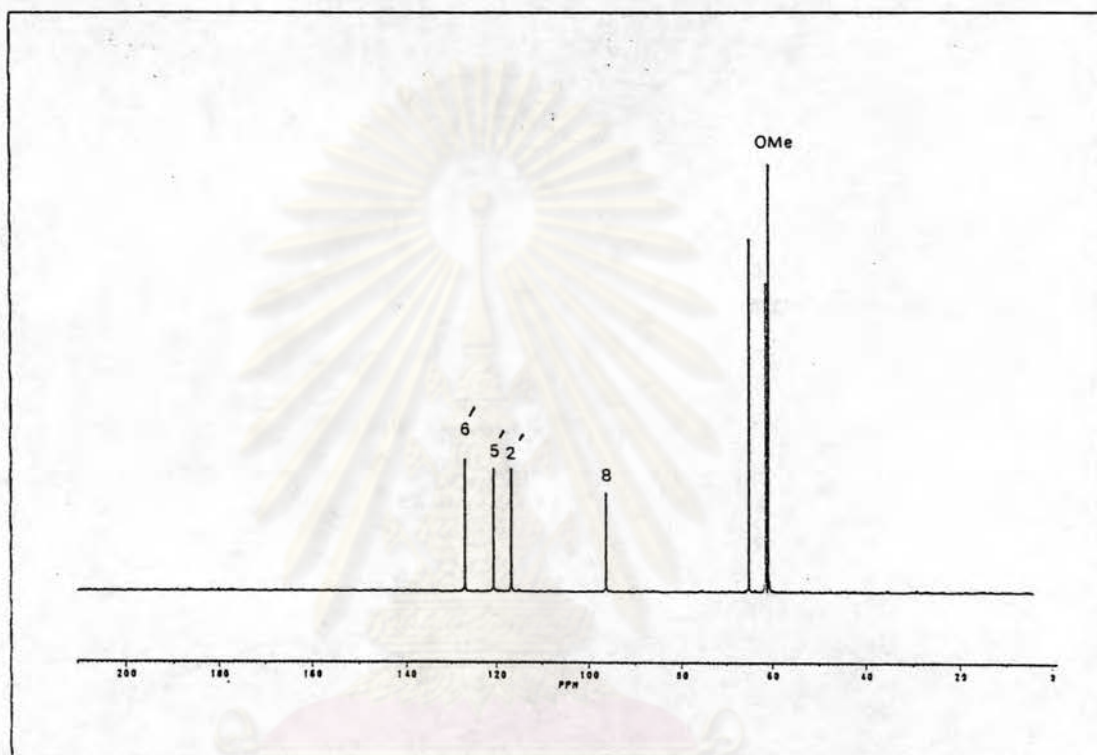
เมื่อนำ สาร 10 มาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ประกอบของธาตุ โดยเครื่อง elemental analyzer (ข้อ 2.2.1) สามารถหาสูตรโมเลกุลได้เป็น  $C_{18}H_{16}O_8$  ซึ่งสอดคล้องกับที่ทำนายไว้ และเมื่อนำ สาร 10 มาวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยเครื่อง high resolution mass spectrometer ได้ มวลโมเลกุล 360.0845 (Cal. 360.0946) เป็น base peak แสดงว่าสูตรโมเลกุลที่ทำนายไว้ถูกต้อง

DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( DMSO ) ปรากฏสัญญาณของ  $-CH=$  4 สัญญาณคือที่  $\delta$  (ppm): 91.28, 111.77, 115.56 และ 121.94 ดังในรูปที่ 3.53



รูปที่ 3.53 แสดง DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ของ สาร 10

DEPT-135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏ สัญญาณด้านบน (up phase) ของ  $-\text{CH}=\text{}$  และ  $-\text{CH}_3$  7 สัญญาณคือที่  $\delta$  (ppm): 55.88, 56.45, 60.09, 91.28, 111.77, 115.56 และ 121.94 ตามลำดับ แต่ไม่ปรากฏ สัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ  $-\text{CH}_2-$  ดังในรูปที่ 3.54



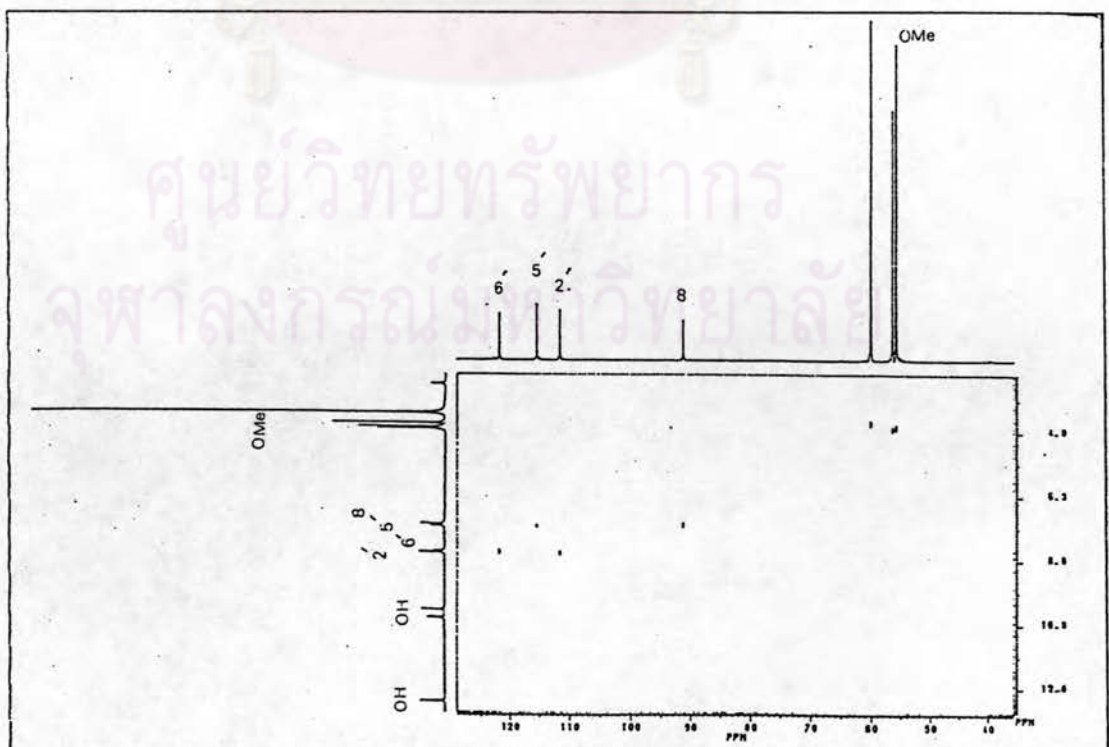
รูปที่ 3.54 แสดง DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 10

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 3.51) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 17 สัญญาณ จากผลการทำ DEPT-135 และ DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมพบ สัญญาณของเมทิลคาร์บอน ( $-\text{CH}=\text{}$ ) ที่  $\delta$  (ppm): 91.28, 111.77, 115.56 และ 121.94 แต่ไม่ตรวจพบสัญญาณของ เมทิลีนคาร์บอน ( $-\text{CH}_2-$ ) ส่วนเมทิลคาร์บอน จะปรากฏสัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 55.88, 56.45 และ 60.09 สำหรับควอเตอร์นารีคาร์บอน 11 อะตอม ปรากฏ สัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 104.34, 131.28, 135.95, 147.14, 147.43, 148.99, 151.03, 151.57, 158.57 และ 176.11 ตามลำดับ จากสัญญาณที่  $\delta$  121.94 ppm เมื่อทำ DEPT-135 และ DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่าสัญญาณนี้มีความเข้มลดลงมา แสดง ว่าที่ตำแหน่งนี้ มี 2 สัญญาณซ้อนกันอยู่ เป็นสัญญาณของ ควอเตอร์นารีคาร์บอนกับเมทิลคาร์บอน ซึ่งเป็นการยืนยันว่า สาร 10 มี คาร์บอน 18 อะตอม

จากผลการทดสอบปฏิกิริยาเคมีด้วย Cyanidin test ท้าให้ทราบว่า สาร 10 เป็นสารประกอบประเภท เพลวอนอยด์ ชนิด เพลวอนอล ซึ่งมีสูตรโครงสร้างหลักโดยทั่วไป ได้แสดงไว้ในรูปที่ 3.44

จากเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมพบว่า สาร 10 มีลักษณะคล้ายกับ สาร 9 มาก คือมีหมู่แทนที่ทั้งหมด 6 หมู่โดยแบ่งเป็น  $-OCH_3$  3 หมู่ และ  $-OH$  3 หมู่ เช่นกัน ดังนั้นสูตรโครงสร้างของ สาร 10 ที่เป็นไปได้ ก็เป็นเช่นเดียวกับที่แสดงไว้ในการวิเคราะห์ สาร 9 รูปที่ 3.45

โปรตอน-คาร์บอน-13 CHCORR (รูปที่ 3.55) ปรากฏสัญญาณของเมทอกซีโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 3.73, 3.85 และ 3.91 สอดคล้องกับสัญญาณของเมทอกซีคาร์บอน ที่  $\delta$  (ppm): 60.09, 55.88 และ 56.45 ตามลำดับ โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 6.88 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$  (ppm): 91.28, โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 6.94 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$  (ppm): 115.56, โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.72 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$  (ppm): 121.94 และโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.77 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$  (ppm): 111.77

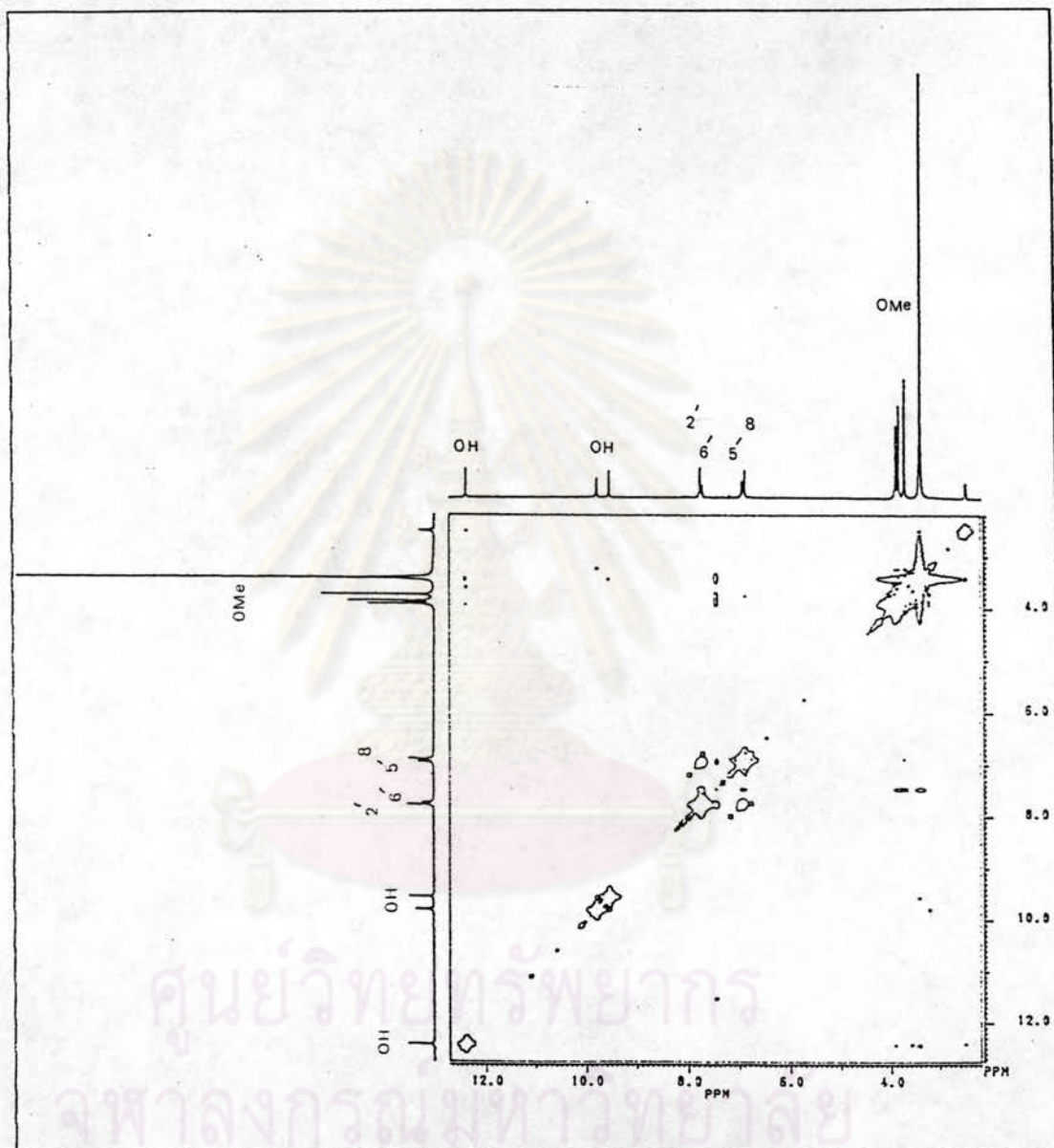


รูปที่ 3.55 แสดง โปรตอน-คาร์บอน-13 CHCORR ของ สาร 10



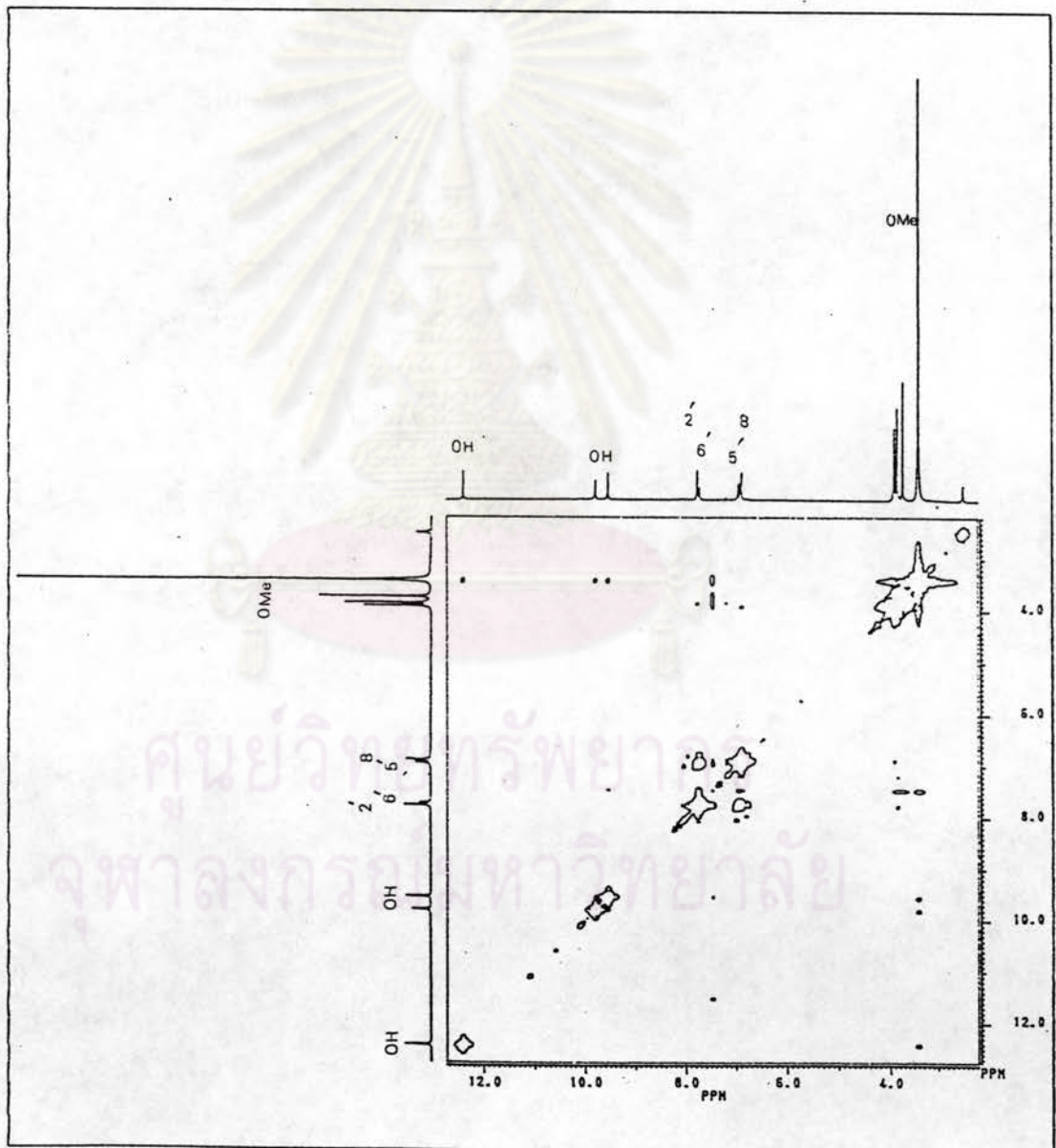
โปรตอน-โปรตอน NOESY (รูปที่ 3.56) ปรากฏสัญญาณที่แสดงให้

ทราบว่า โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 6.94 อยู่ติดกับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.72



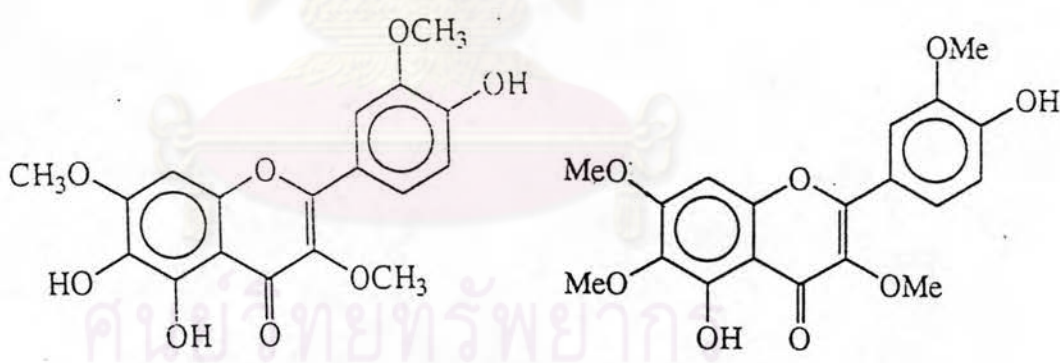
รูปที่ 3.56 แสดงโปรตอน-โปรตอน NOESY ของ สาร 10

โปรตอน-โปรตอน COSY (รูปที่ 3.57) ปรากฏสัญญาณที่แสดงให้  
 ทราบว่า โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 6.94 อยู่ติดกับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.72, โปรตอนที่  $\delta$   
 (ppm): 6.88 อยู่ใกล้กับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 3.85 และ โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.77 อยู่  
 ใกล้กับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 3.73



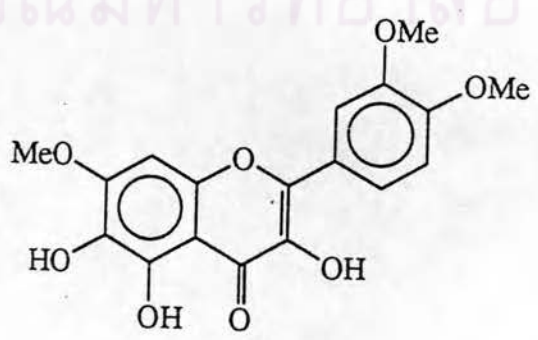
รูปที่ 3.57 แสดงโปรตอน-โปรตอน COSY ของ สาร 10

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมสรุปได้ว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ควรจะมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ทั้งนี้เพราะ โปรตอนที่หมู่ไฮดรอกซีสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุให้โปรตอนตำแหน่งนี้เกิด deshield มากจึงปรากฏสัญญาณสูงถึง 12.41 ppm ตำแหน่งที่ 5' และ 6' เป็นเมทิลที่ติดกัน (-CH=CH-) (จาก NOESY และ COSY) คาร์บอนตำแหน่งที่ 2' จึงเป็นเมทิล (-CH=) ซึ่งปรากฏสัญญาณเดี่ยว และเกิด coupling กับหมู่เมทอกซี (จาก COSY) เพราะฉะนั้น คาร์บอนตำแหน่งที่ 3' จึงต้องมีหมู่แทนที่เป็น หมู่เมทอกซี (-OCH<sub>3</sub>) คาร์บอน-13 ของเฟลวอนและเฟลวอนอลที่ตำแหน่งที่ 8 มักจะไม่มีหมู่แทนที่และเป็นตำแหน่งที่ค่า chemical shift มีค่อนข้างต่ำคือประมาณ 90.0-95.0 ppm (77). คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 และ 8 จะต้องเป็น -C-OCH<sub>3</sub> และ -CH= ที่อยู่ติดกัน (จาก COSY) ส่วนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3, 6 และ 4' จะต้องมีหมู่แทนที่ เพราะโปรตอนไม่แสดงสัญญาณ และเหลือหมู่แทนที่อีก 3 หมู่ คือ หมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ และหมู่เมทอกซีอีก 1 หมู่ จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น โครงสร้างที่เป็นไปได้มากที่สุด 3 โครงสร้าง คือ

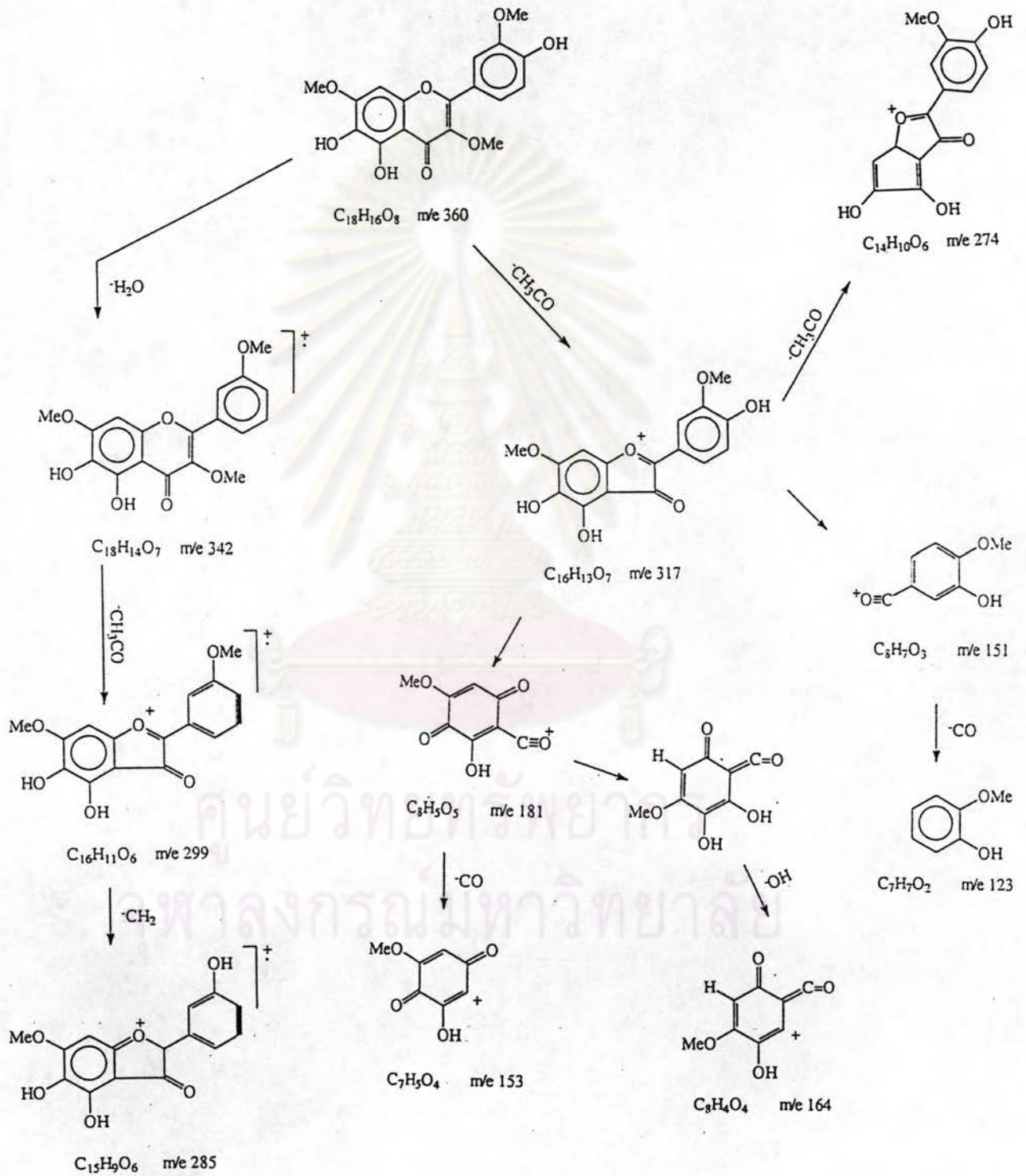


I

II



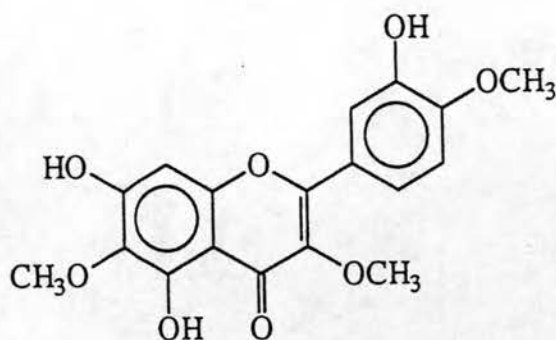
III



แผนภาพที่ 3.5 แสดงรูปแบบการแตกตัวของ สาร 10 (78, 79)

จากข้อมูลทั้งหมด อาจจะสามารถวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของ สาร 10 ได้ คาร์บอนตำแหน่งที่ 3, 6, และ 4' ที่ยังไม่ทราบว่ามีหมู่แทนที่อะไร เมื่อพิจารณาคาร์บอนตำแหน่งที่ 5' ถ้าคาร์บอนตำแหน่งที่ 4' มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีคาร์บอนตำแหน่งที่ 5' จะปรากฏสัญญาณที่ ๕ ประมาณ 115 ppm แต่ถ้าคาร์บอนตำแหน่งที่ 4' มีหมู่เมทอกซีเป็นหมู่แทนที่ คาร์บอนตำแหน่งที่ 5' จะปรากฏสัญญาณที่ ๕ ประมาณ 111 ppm (77) ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 4' ของ สาร 10 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี และเมื่อพิจารณาการแตกตัว ในการทำแมสสเปกตรัมของ สาร 10 พบ m/e ที่สำคัญคือ m/e 151 (แผนภาพที่ 3.5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ring B จะต้องมีหมู่เมทอกซีและหมู่ไฮดรอกซีอย่างละหนึ่งหมู่ในกรณีซึ่งมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่จะต้องไม่พบ m/e 151 แต่จะพบ m/e 137 ดังเช่นการแตกตัวของ สาร 9 (แผนภาพที่ 3.4), พบ m/e 317 เป็นการแตก  $\text{CH}_3\text{CO}-$  ออก ซึ่งยืนยันว่า ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี, พบ m/e 342 เป็นการลบน้ำออก แสดงว่า ring B มีหมู่ไฮดรอกซีที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3', พบ m/e 181 เป็นการยืนยันว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 7 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี, พบ m/e 164 แสดงว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี เพราะฉะนั้นตำแหน่งที่ 6 น่าจะเป็นหมู่ไฮดรอกซี จึงสรุปว่า สาร 10 มีโครงสร้างเป็นดังรูป (I)

จากการศึกษาเอกสารอ้างอิงพบว่ามีผู้รายงาน สาร 10 แล้ว (80) มีชื่อสามัญว่า Chrysosphenol-C หรือ Quercetagenin-3,3',7-trimethyl ether มีจุดหลอมเหลว 218.0-220.0 องศาเซลเซียส ไรปรตอนเอ็นเอ็มอาร์ (DMSO) แสดงสัญญาณที่ ๕(ppm): 7.67 (1H, s(H-2'), -CH=), 7.07 (1H, d(H-5'), J = 2.5 Hz, -CH=CH-), 7.70 (1H, d(H-6'), J = 2.5 Hz, -CH=CH-), 6.84 (1H, s(H-8), -CH=) และ 12.43 (1H, s(5), -OH) อย่างไรก็ตามพบว่าข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมที่รายงานไว้นั้นยังไม่สมบูรณ์ จากการศึกษาศึกษาเอกสารอ้างอิงสามารถหาข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับ สาร 10 คือ Centaureidin (77)



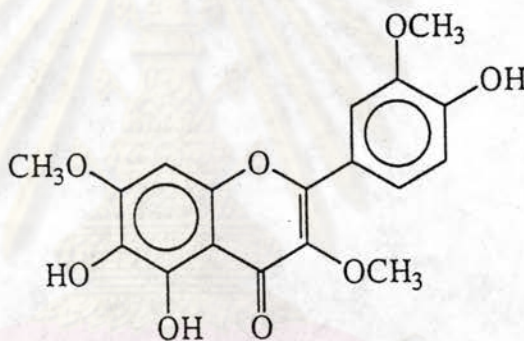
Centaureidin

ตารางที่ 3.25 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 10 เทียบกับ Centaureidin(77)

| ตำแหน่ง<br>คาร์บอน | เคมีกัลซีท์ (ppm) |              | ตำแหน่ง<br>คาร์บอน | เคมีกัลซีท์ (ppm) |              |
|--------------------|-------------------|--------------|--------------------|-------------------|--------------|
|                    | สาร 10            | Centaureidin |                    | สาร 10            | Centaureidin |
| 2                  | 151.57            | 155.13       | 1'                 | 121.94            | 122.36       |
| 3                  | 135.95            | 137.63       | 2'                 | 111.77            | 114.90       |
| 4                  | 176.11            | 178.09       | 3'                 | 147.43            | 146.37       |
| 5                  | 151.03            | 152.23       | 4'                 | 147.14            | 150.18       |
| 6                  | 131.28            | 131.28       | 5'                 | 115.56            | 111.93       |
| 7                  | 158.57            | 158.03       | 6'                 | 121.94            | 120.30       |
| 8                  | 91.28             | 93.97        | OCH <sub>3</sub>   | 60.09             | 59.88        |
| 9                  | 148.99            | 151.67       | OCH <sub>3</sub>   | 56.45             | 59.72        |
| 10                 | 104.34            | 104.31       | OCH <sub>3</sub>   | 55.88             | 55.63        |

จากการเปรียบเทียบ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 10 กับ Centaureidin ดังแสดงในตารางที่ 3.25 พบว่าสารทั้งสองไม่ใช่สารเดียวกัน ใน ring B จะเห็นความแตกต่างที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2', 4' และ 5' อย่างชัดเจน

จากข้อมูลดังกล่าวมาทั้งหมดสามารถสรุปแสดงว่า สาร 10 คือ สารประกอบประเภท flavanol ชื่อสามัญว่า Chrysosphenol-C หรือ quercetagetin-3, 3',7-trimethyl ether หรือ ตามระบบ IUPAC จะเรียกได้ว่า 2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-5,6-dihydroxy-3,7-dimethoxy-4*H*-1-benzopyran-4-one



สาร 10

2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-5,6-dihydroxy-3,7-dimethoxy-4*H*-1-benzopyran-4-one

### 3.2.11 การทำสาร 11 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

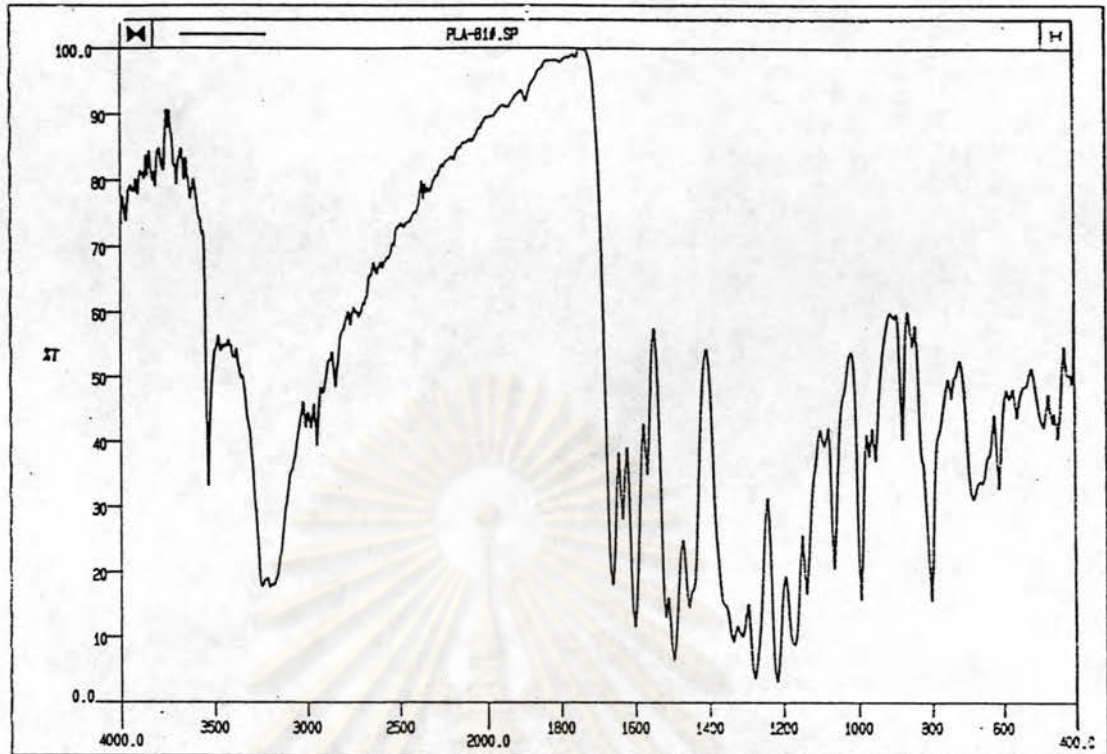
สาร 11 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีเหลืองอยู่ในน้ำมันสีน้ำตาล

ได้จากลำดับส่วน 41-52 (SA<sub>5</sub>4) ซึ่งถูกชะด้วย 1:1 ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(19:1) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดบิวทานอล (ตารางที่ 2.17) เมื่อนำ สาร 11 มาตกผลึกด้วยเมทานอลร้อน จะได้ของแข็งอสัณฐานสีเหลืองหนัก 0.125 กรัม ( $2.5 \times 10^{-3}$  % น้ำหนักโดยน้ำหนัก) จุดหลอมเหลว 280.0-282.0 องศาเซลเซียส (สลายตัว) TLC ให้ค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.15 [1:1 ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)] สาร 11 ละลายได้ดีในเมทานอลร้อน ละลายได้น้อยใน 1:1 ไดคลอโรมีเทน, คลอโรฟอร์ม, เฮกเซน และเอทานอล สาร 11 ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard แสดงว่า สาร 11 ไม่ใช่สารประกอบประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ และ สาร 11 สามารถพอกจางสี  $Br_2$  ใน  $CCl_4$  และให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-DNP แสดงว่า สาร 11 เป็นสารประกอบประเภทไม่อิ่มตัวและมีหมู่คาร์บอนิลในวงเลกุล นอกจากนี้ สาร 11 ให้สารละลายสีแดงเลือดนกกับ Cyanidin test แสดงว่า สาร 11 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทฟลาโวนอยด์ ชนิดฟลาโวนอล (flavonol)(42)

อินฟราเรดสเปกตรัม (รูปที่ 3.58) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่กว้าง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ที่  $3500-3000$   $cm^{-1}$  นอกจากนี้ยังแสดงแถบการดูดกลืนแสงที่เป็นลักษณะเฉพาะของหมู่คาร์บอนิลของสารประกอบประเภท conjugated ketone (72) ที่  $1659$   $cm^{-1}$  ข้อมูลการดูดกลืนแสงของ สาร 11 แสดงดังตารางที่ 3.26

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



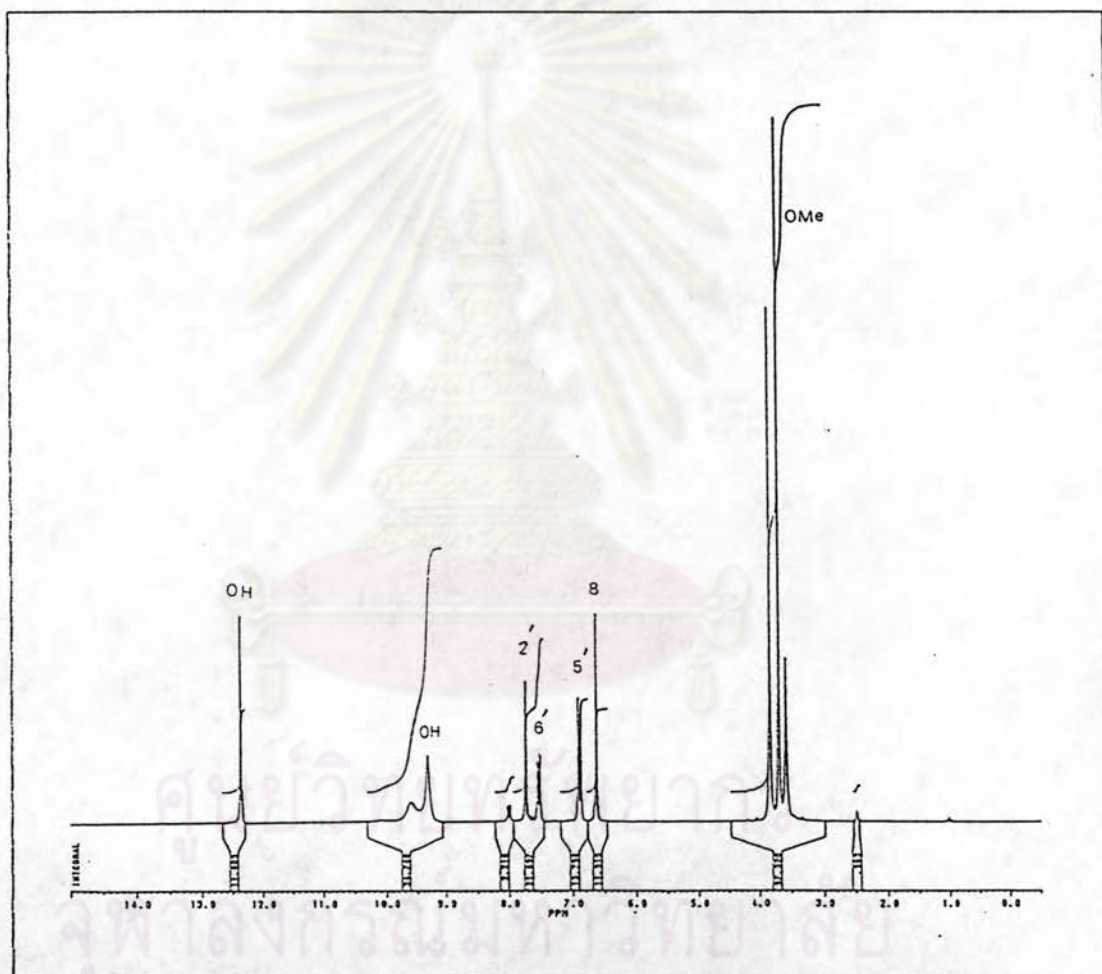


รูปที่ 3.58 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 11

ตารางที่ 3.26 แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่สำคัญจากอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 11

| แถบการดูดกลืนแสง (cm. <sup>-1</sup> ) | ความเข้ม     | แสดงลักษณะ  |
|---------------------------------------|--------------|---|
| 3500-3000                             | สูง, (กว้าง) | O-H สั้นแบบยึด  |
| 2945, 2913                            | สูง          | C-H สั้นแบบยึดของ -CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> - |
| 1659                                  | สูง          | C=O สั้นแบบยึดของคาร์บอนิลของ conjugated ketone         |
| 1599, 1564, 1517                      | สูง          | C=C สั้นแบบยึดของแอโรมาติก                              |
| 1334                                  | สูง          | C-H สั้นแบบงอของ -CH <sub>3</sub> , -CH <sub>2</sub> -  |
| 1277                                  | สูง          | C-O สั้นแบบยึดไม่สมมาตรของ C-O-C                        |
| 1082-1062                             | สูง          | C-O สั้นแบบยึดแบบสมมาตรของ C-O-C                        |
| 799                                   | ต่ำ          | =C-H สั้นแบบงอนอกระนาบของแอโรมาติก                      |

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) (รูปที่ 3.59) ปรากฏสัญญาณ  
 ของโปรตอน 14 สัญญาณคือที่  $\delta$  (ppm): 3.70(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 3.84(3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 6.63  
 (1H, s, -CH=), 6.90 (1H, d, J = 9.0 Hz, -CH=CH-), 7.54 (1H, dd, J = 9.0, 2.5 Hz,  
 -CH=CH-), 7.74 (1H, d, J = 2.5 Hz, -CH=), 9.32 (2H, br., -2OH), 9.60  
 (1H, s, -OH) และ 12.37(1H, s, -OH)

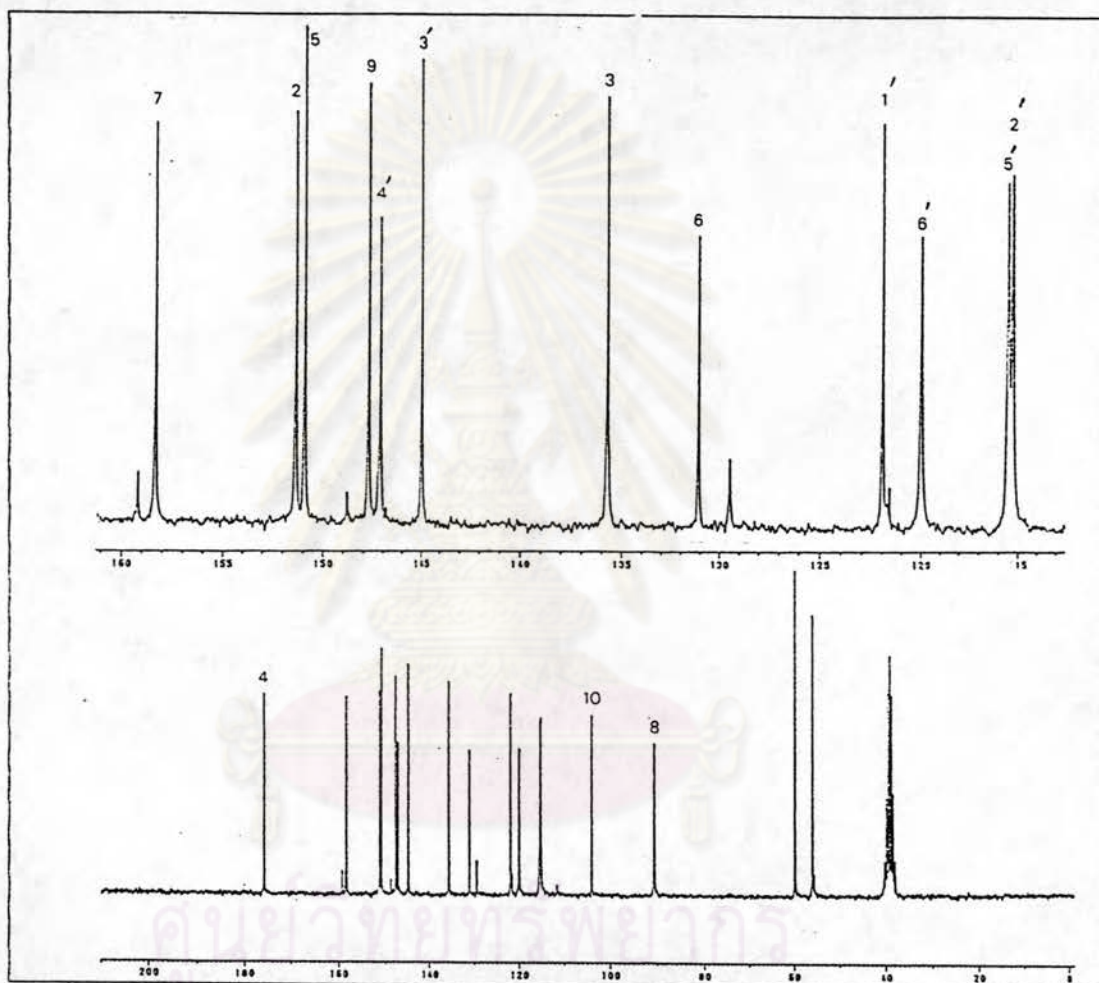


รูปที่ 3.59 แสดงโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 11

จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของโปรตอนของหมู่  
 เมทอกซีที่  $\delta$  (ppm): 3.70 และ 3.84 , สัญญาณโปรตอนของวงแอโรมาติกที่  $\delta$  (ppm):  
 6.63, 6.90, 7.54 และ 7.74 ตามลำดับ และสัญญาณของหมู่ไฮดรอกซี ที่  $\delta$  (ppm):  
 9.32, 9.60 และ 12.37 (79) ตามลำดับ

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม(DMSO)ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน

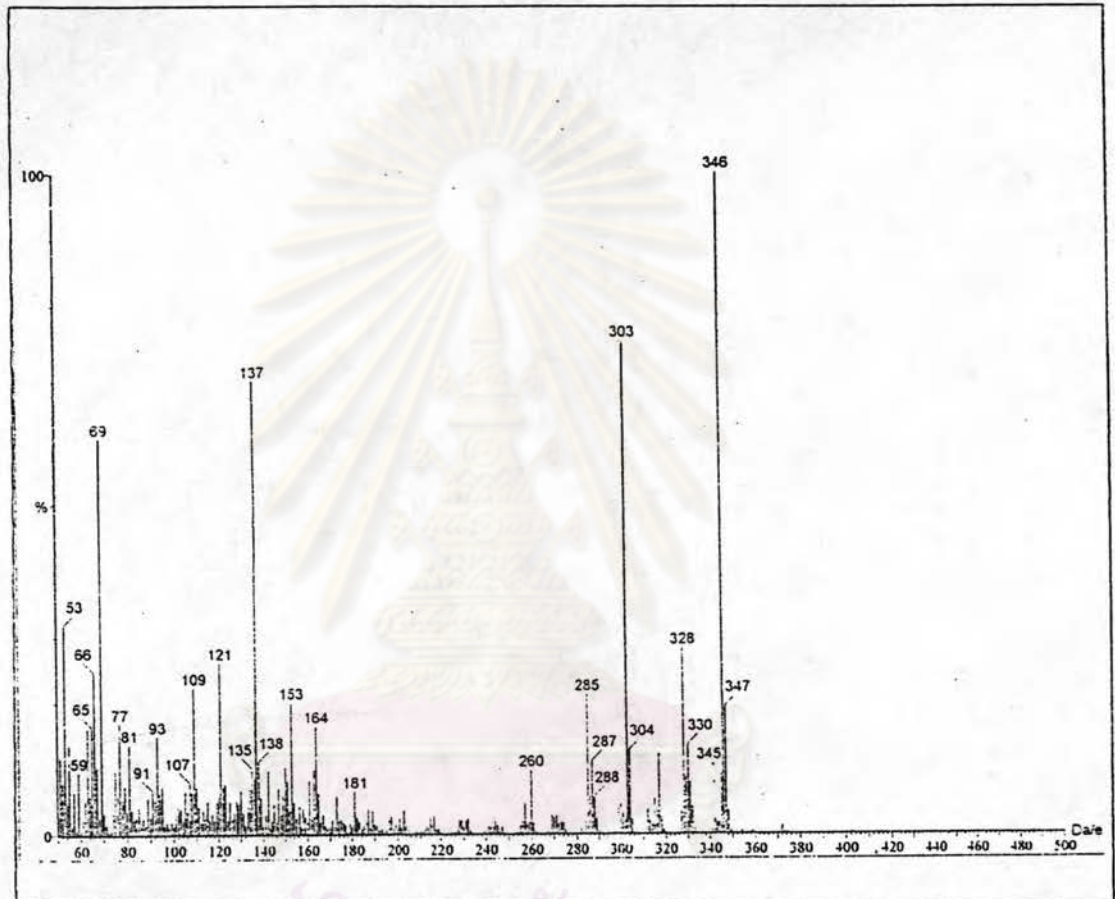
17 สัญญาณคือที่  $\delta$  (ppm): 56.17, 59.98, 90.79, 104.21, 115.34, 115.57, 120.06, 122.03, 129.52, 135.79, 145.04, 147.22, 147.79, 150.99, 151.43, 158.39 และ 175.89 ppm ดังในรูปที่ 3.60



รูปที่ 3.60 แสดงคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 11

จาก คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน ที่  $\delta$  (ppm): 56.17 และ 59.98 ซึ่งเป็นสัญญาณเฉพาะของ  $sp^3$  คาร์บอนอะตอม ที่ต่ออยู่กับ อะตอมที่สามารถดึงอิเล็กตรอน (electronegative atom) ซึ่งในที่นี้น่าจะเป็น คาร์บอนของหมู่ เมทอกซี ( $-OCH_3$ ), ที่  $\delta$  (ppm): 90.79, 104.21, 115.34, 115.57, 120.06, 122.03, 131.28, 135.79, 145.04, 147.22, 147.79, 150.99, 151.43 และ 158.39 เป็นสัญญาณเฉพาะของ  $sp^2$  คาร์บอนอะตอม ในวงแอโรมาติกและของอัลคีนและที่  $\delta$  (ppm) : 175.89 เป็นสัญญาณเฉพาะของคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลชนิด conjugated ketone (72)

แมสสเปกตรัม ปรากฏพิคของไอออนเชิงโมเลกุล ( $M^+$ ) ที่  $m/e$  (% relative intensity) 346(100.0) นอกจากนี้ยังพบพิคที่ 345(9.3), 330(13.5), 328(28.3), 317(12.2), 304(12.7), 303(75.2), 285(21.2), 181(6.4), 164(16.7), 153(19.9), 137(68.8), 109(22.5) และ 91(6.43) (79) ดังในรูปที่ 3.61



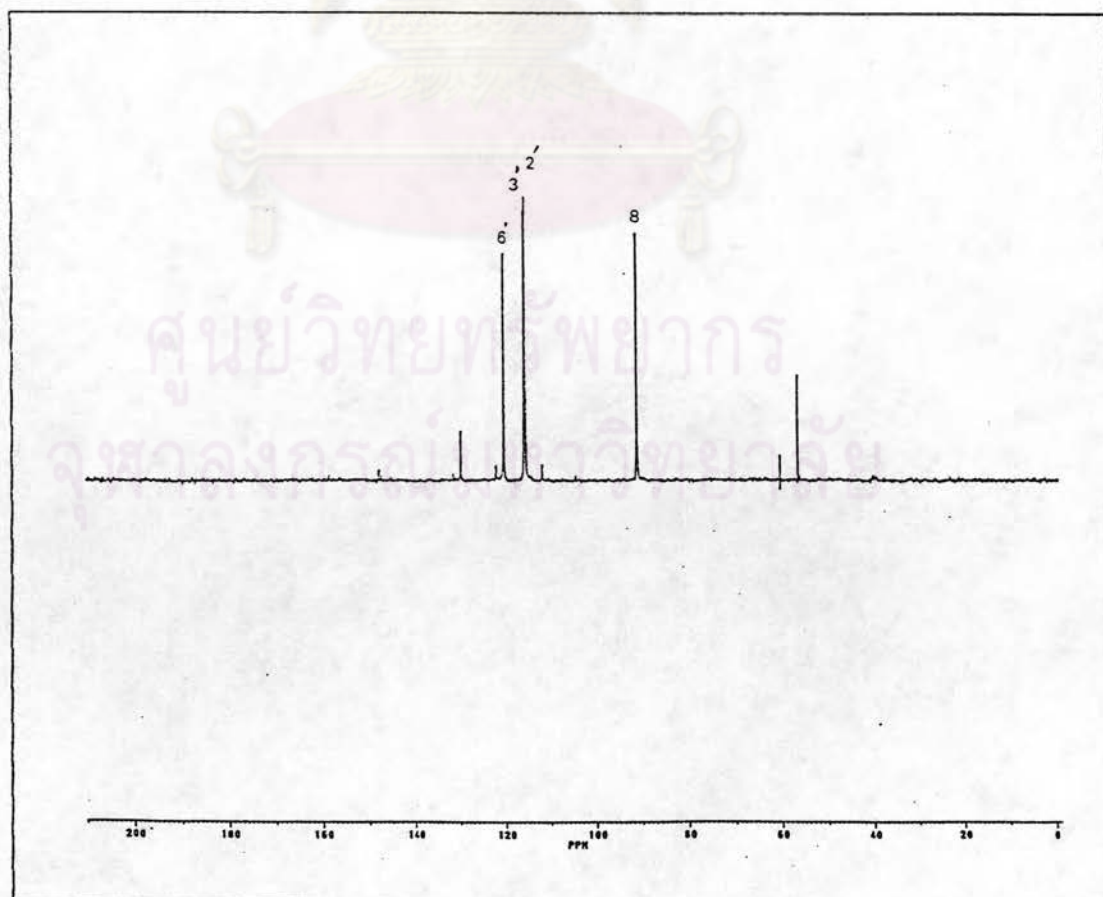
รูปที่ 3.61 แสดงแมสสเปกตรัมของ สาร 11

จากแมสสเปกตรัม ปรากฏพิคของไอออนเชิงโมเลกุล ( $M^+$ ) ที่  $m/e$  346(100.0%) แสดงให้เห็นว่า สาร 11 น่าจะมีมวลโมเลกุลเป็น 346 เมื่อวิเคราะห์ข้อมูล ไรบรตอนและคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ท้าให้ทราบว่า สาร 11 ประกอบด้วย คาร์บอน 17 อะตอม ไฮโดรเจน 14 อะตอม (จาก  $-CH=$  4 อะตอม, จาก  $-OCH_3$  2 หมู่ เท่ากับ 6 อะตอม และจาก  $-OH$  4 หมู่ เท่ากับ 4 อะตอม) และออกซิเจน 6 อะตอม (จาก  $-OCH_3$  2 หมู่ เท่ากับ 2 อะตอม, จาก  $-OH$  4 หมู่ เท่ากับ 4 อะตอม) เมื่อรวมมวลอะตอมของ ไฮโดรเจน คาร์บอน และออกซิเจน ที่ปรากฏสัญญาณนั้นได้ค่าเท่ากับ 314 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณา จากโครงสร้างของสารประกอบเฟลวอนอยส์ที่พบโดยทั่วไปจะมีออกซิเจนอีก 2 อะตอมของ

หมู่คาร์บอนิล ( $-C=O$ ) และ ของอีเทอร์ ( $C-O-C$ ) (75) เพราะฉะนั้น สาร 11 น่าจะมีออกซิเจนทั้งหมด 8 อะตอม และน่าจะมีสูตรโมเลกุลเป็น  $C_{17}H_{14}O_8$  มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 346 จากสูตรโมเลกุลที่คาดไว้ดังกล่าวพบว่า จำนวนโปรตอน คาร์บอน และออกซิเจน สอดคล้องกันกับมวลโมเลกุลที่ได้จากแมสสเปกตรัม และสามารถคำนวณความไม่อิ่มตัว ได้เท่ากับ 11

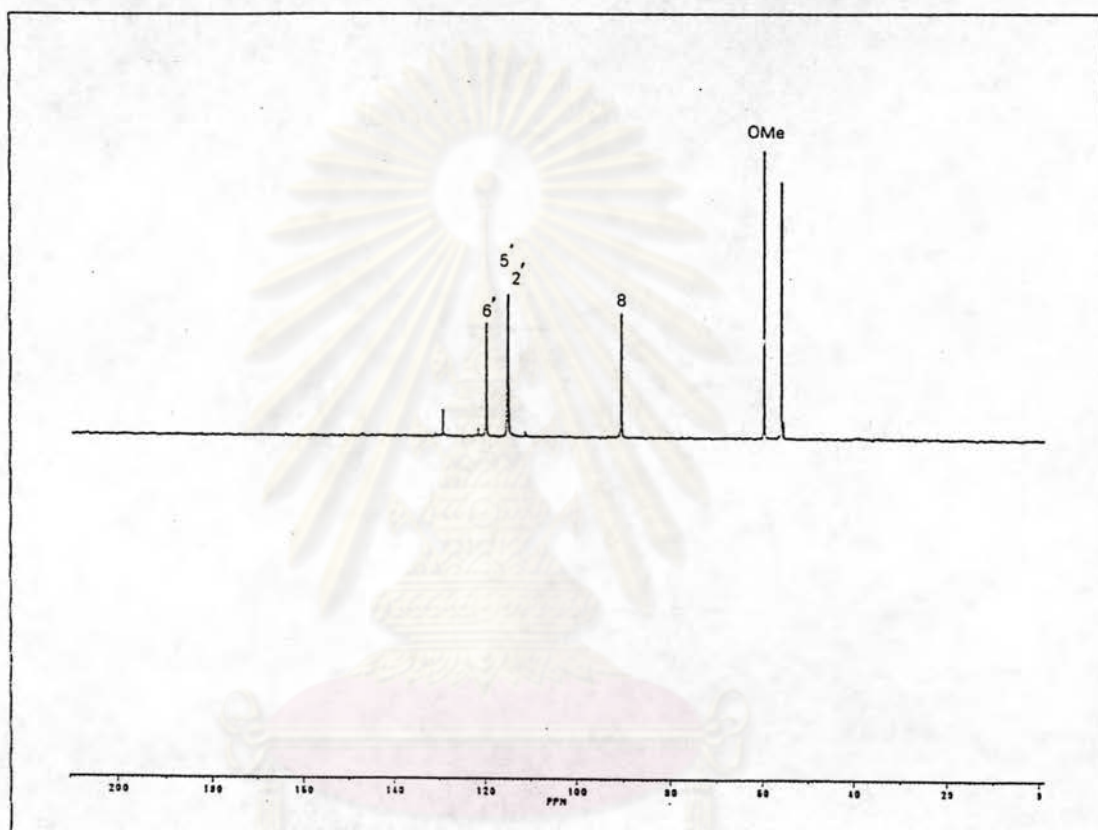
เมื่อนำ สาร 11 มาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของธาตุโดยเครื่อง elemental analyzer (ข้อ 2.2.1) สามารถหาสูตรโมเลกุลได้เป็น  $C_{17}H_{14}O_8$  ซึ่งสอดคล้องกับที่ทำนายไว้ และเมื่อนำ สาร 11 มาวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยเครื่อง high resolution mass spectrometer ได้มวลโมเลกุล 346.0689 (Cal. 346.0789) ซึ่งเป็น base peak แสดงว่าสูตรโมเลกุลที่ทำนายไว้ถูกต้อง

DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของ  $-CH=$  4 สัญญาณคือที่  $\delta$  (ppm): 90.79, 115.34, 115.57 และ 120.06 ดังในรูปที่ 3.62



รูปที่ 3.62 แสดง DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 11

DEPT-135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏ สัญญาณด้านบน (up phase) ของ  $-CH=$  และ  $-CH_3$  6 สัญญาณคือที่  $\delta$  (ppm): 56.17, 59.98, 90.79, 115.34, 115.57 และ 120.06 แต่ไม่ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ  $CH_2$  ดังในรูปที่ 3.63



รูปที่ 3.63 แสดง DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ของ สาร 11

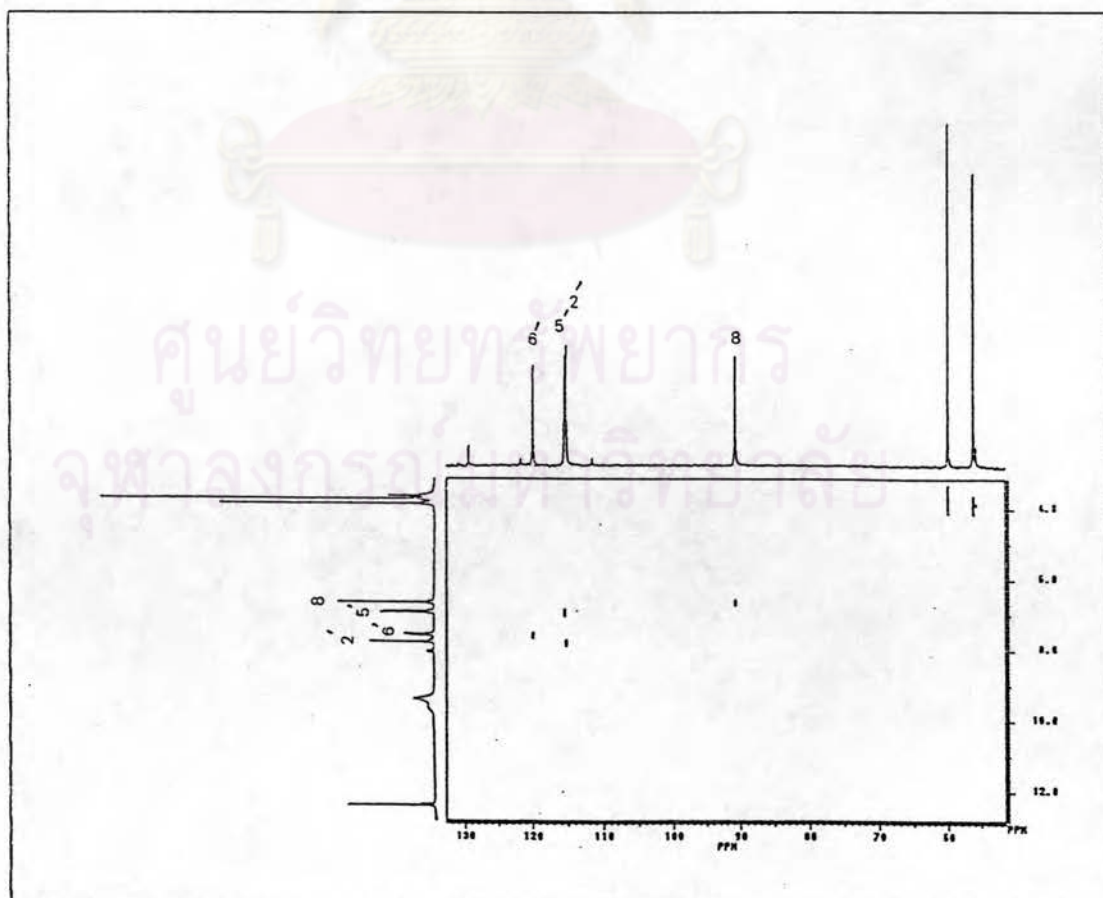
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (รูปที่ 3.60) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 17 สัญญาณ จากผลการทำ DEPT-135 และ DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมพบ สัญญาณของเมทิลคาร์บอน ( $-CH_3$ ) ที่  $\delta$  (ppm): 90.79, 115.34, 115.57 และ 120.06 แต่ไม่ตรวจพบสัญญาณของ เมทิลีนคาร์บอน ( $-CH_2-$ ) ส่วนเมทิลคาร์บอน ปรากฏสัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 56.17 และ 59.98 สำหรับควอเตอร์นารีคาร์บอน 11 อะตอม ปรากฏสัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 104.21, 122.03, 131.28, 135.79, 145.04, 147.22, 147.79, 150.99, 151.43, 158.39 และ 175.89 ตามลำดับ

จากผลการทดสอบปฏิกิริยาเคมีด้วย Cyanidin test ท้าให้ทราบว่า

สาร 11 เป็นสารประกอบประเภท เฟลโวนอยด์ ชนิด เฟลโวนอล ซึ่งได้แสดงสูตรโครงสร้าง ดังรูปที่ 3.44

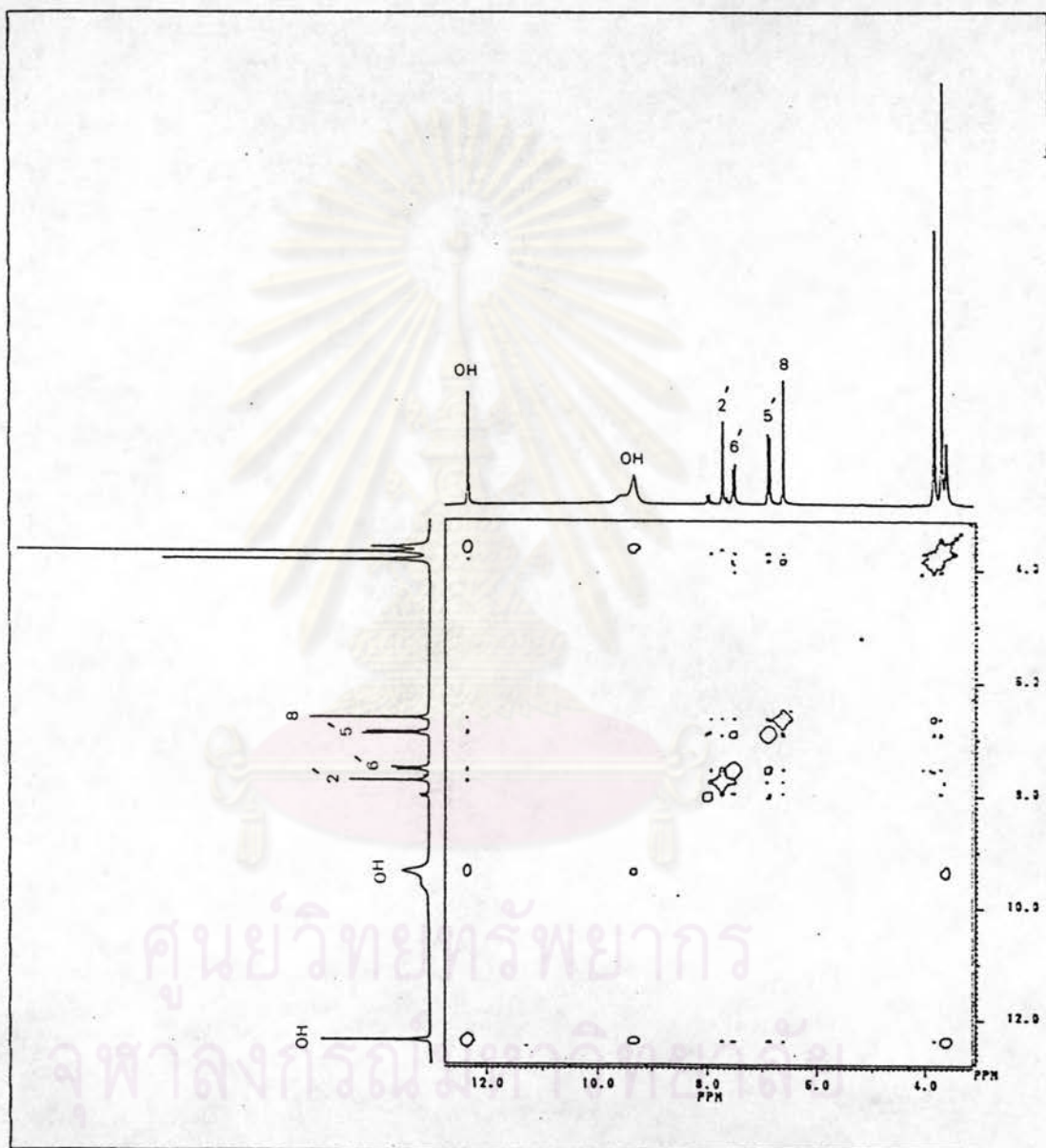
จากโปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ท้าให้ทราบว่า สาร 11 มีหมู่แทนที่ ทั้งหมด 6 หมู่โดยแบ่งเป็น  $-OCH_3$  4 หมู่ และ  $-OH$  2 หมู่ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ สาร 9 และ สาร 10 สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้ด้วยการทำเทคนิคเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมต่อไปนี้

โปรตอน-คาร์บอน-13 CHCORR (รูปที่ 3.64) ปรากฏสัญญาณของ เมทอกซีโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 3.70 และ 3.84 สอดคล้องกับสัญญาณของเมทอกซี คาร์บอน ที่  $\delta$  (ppm): 59.98 และ 56.17 ตามลำดับ โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 6.63 ตรงกับสัญญาณของ คาร์บอนที่  $\delta$  (ppm): 90.79, โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 6.90 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$  (ppm): 115.57, โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.34 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$  (ppm): 120.06 และโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.57 ตรงกับสัญญาณของคาร์บอนที่  $\delta$  (ppm): 115.34



รูปที่ 3.64 แสดงโปรตอน-คาร์บอน-13 CHCORR ของ สาร 11

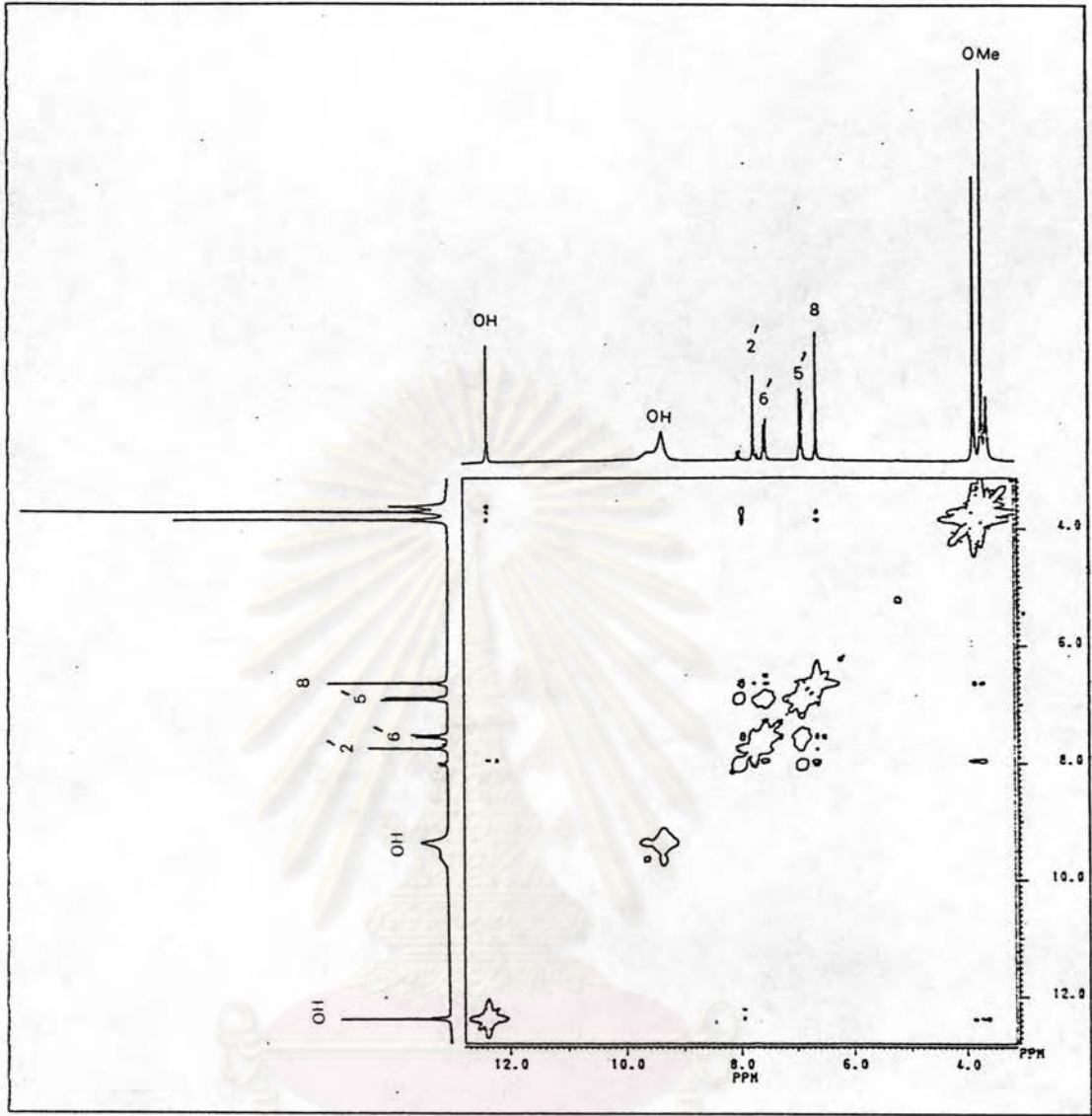
โปรตอน-โปรตอน NOESY (รูปที่ 3.65) ปรากฏสัญญาณที่แสดงให้  
ทราบว่าเป็นโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 6.90 อยู่ติดกับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.34, โปรตอนที่  $\delta$   
(ppm): 6.63 อยู่ใกล้กับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 3.84 และ โปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 9.32 อยู่  
ใกล้กับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 12.37



รูปที่ 3.65 แสดง โปรตอน-โปรตอน NOESY ของ สาร 11

โปรตอน-โปรตอน COSY (รูปที่ 3.66) ปรากฏสัญญาณที่แสดงให้  
ทราบว่าเป็นโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 6.90 อยู่ติดกับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 7.34 และ โปรตอนที่  
 $\delta$  (ppm): 9.60 อยู่ใกล้กับโปรตอนที่  $\delta$  (ppm): 12.37

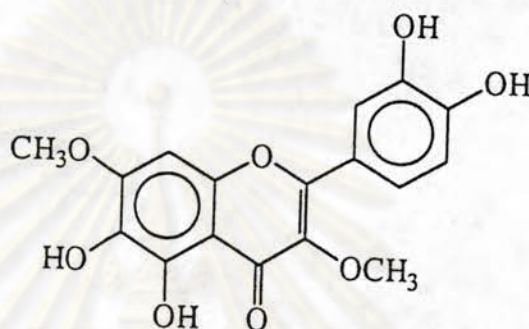




รูปที่ 3.66 แสดงโปรตอน-โปรตอน COSY ของ สาร 11

จาก โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมสรุปได้ว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ควรจะมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี (-OH) ทั้งนี้เพราะ โปรตอนที่หมู่ไฮดรอกซีสามารถเกิดพันธะไฮดรเจนกับหมู่คาร์บอนิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ได้ซึ่งเป็นเหตุให้โปรตอนตำแหน่งนี้เกิด deshield มากจึงปรากฏสัญญาณสูงถึง 12.37 ppm (72) คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ควรจะมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี ซึ่ง coupling กับหมู่ไฮดรอกซีที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (จาก NOESY) คาร์บอนตำแหน่งที่ 5' และ 6' เป็นเมทน์ที่ติดกัน (-CH=CH-) (จาก NOESY และ COSY) คาร์บอนตำแหน่งที่ 3' และ 4' จะต้องมีหมู่แทนที่เพราะที่ตำแหน่งนี้โปรตอนไม่แสดงสัญญาณ ซึ่งหมู่แทนที่น่าจะเป็นหมู่ไฮดรอกซีที่ติดกัน (จาก COSY) ดังนั้น คาร์บอนตำแหน่งที่ 2' จึงเป็นเมทน์ (-CH=) ปรากฏสัญญาณเดี่ยว คาร์บอนตำแหน่งที่ 8 มักจะไม่มีหมู่แทนที่ และเป็นตำแหน่งที่ค่า

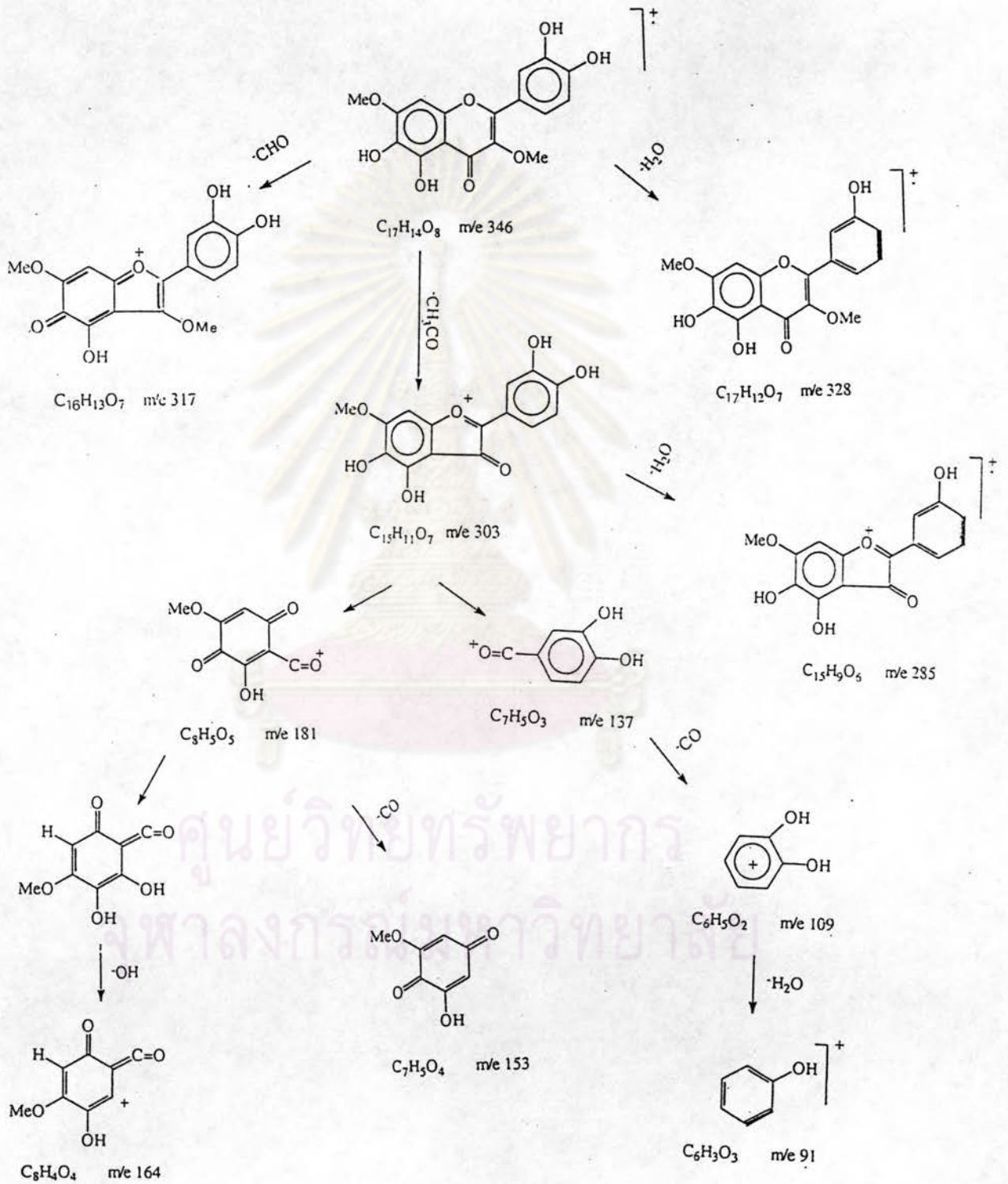
chemical shift มีค่อนข้างต่ำคือประมาณ 90.0-95.0 ppm (77) ซึ่งคาร์บอนตำแหน่งที่ 8 coupling กับ หมู่เมทอกซี แสดงว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 มีหมู่แทนที่เป็น  $-C-OCH_3$  ที่อยู่ติดกับ  $-CH=$  ที่ตำแหน่งที่ 8 (จาก COSY) เมื่อพิจารณาจากหมู่แทนที่ที่ที่เหลือแล้ว คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ต้องมีหมู่เมทอกซี ( $-OCH_3$ ) ซึ่งสามารถเขียนโครงสร้างที่น่าจะเป็นไปได้มากที่สุดคือ



แสดงโครงสร้างของ สาร 11 ที่เป็นไปได้มากที่สุด

เมื่อพิจารณาการแตกตัวของ สาร 11 ดังแสดงในแผนภาพที่ 3.6

จะเห็นว่า มีการแตกของโรมเลขคู่ที่สำคัญคือ  $m/e$  328 เป็นการแตก  $H_2O$  ออก แสดงว่า ring B หมู่ไฮดรอกซีที่ติดกับ เมทิลคาร์บอน, พบ  $m/e$  303 เป็นการแตก  $-CH_3CO$  ออก แสดงว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี, พบ  $m/e$  137 ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่า ring B มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่, พบ  $m/e$  181 แสดงให้ทราบว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 ของ ring A มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี และพบ  $m/e$  164 แสดงให้ทราบว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของ ring A มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี



แผนภาพที่ 3.6 แสดงรูปแบบการแตกตัวของ สาร 11 (78, 79)

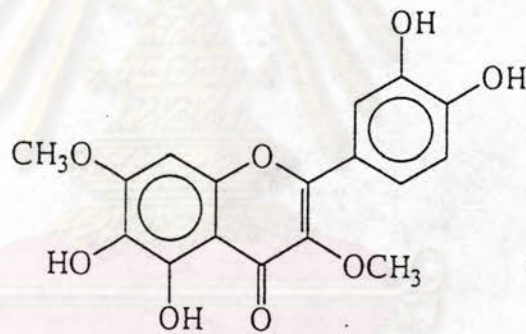
จากการศึกษาเอกสารอ้างอิง พบว่า สาร 11 มีชื่อสามัญว่า quercetagenin-3,7-dimethyl ether (81) มีจุดหลอมเหลว 278.0-280.0 องศาเซลเซียส ปรอทอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ( $\text{CCl}_4$ ) แสดงสัญญาณที่  $\delta$  (ppm): 7.60 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 7.5 (1H, dd,  $J = 9.0, 2.5$  Hz,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 6.83 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz,  $-\text{CH}=\text{}$ ), 6.5 (1H, s,  $-\text{CH}=\text{}$ ), 3.90 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ) และ 3.85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ) อย่างไรก็ตามพบว่าข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมที่รายงานไว้นั้นยังไม่สมบูรณ์ จากการศึกษาดูเอกสารอ้างอิงพบสารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับ สาร 11 และได้มีรายงานเกี่ยวกับคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปก-ตรัมไว้ คือ Axillarin (77) ซึ่งได้แสดงโครงสร้างและข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีของสารนี้ไว้ในการศึกษาสูตรโครงสร้างของ สาร 9

ตารางที่ 3.27 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 11 เทียบกับ Axillarin(77)

| ตำแหน่ง<br>คาร์บอน | เคมีกัลซีท์ (ppm) |           | ตำแหน่ง<br>คาร์บอน | เคมีกัลซีท์ (ppm) |           |
|--------------------|-------------------|-----------|--------------------|-------------------|-----------|
|                    | สาร 11            | Axillarin |                    | สาร 11            | Axillarin |
| 2                  | 151.44            | 155.55    | 1'                 | 122.03            | 121.85    |
| 3                  | 135.78            | 137.34    | 2'                 | 115.35            | 115.74    |
| 4                  | 178.90            | 178.09    | 3'                 | 145.04            | 145.29    |
| 5                  | 150.52            | 152.37    | 4'                 | 147.22            | 148.76    |
| 6                  | 131.28            | 131.28    | 5'                 | 115.57            | 115.43    |
| 7                  | 158.39            | 157.91    | 6'                 | 120.05            | 120.54    |
| 8                  | 90.79             | 93.92     | $\text{OCH}_3$     | 59.98             | 59.95     |
| 9                  | 147.77            | 151.61    | $\text{OCH}_3$     | 56.16             | 56.18     |
| 10                 | 104.20            | 104.37    |                    |                   |           |

จากการเปรียบเทียบ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 11 กับ Axillarin ดังในตารางที่ 3.27 พบว่า สารทั้งสองไม่ซ้ำตัวเดียวกัน แต่มีความคล้ายคลึงกันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ring B

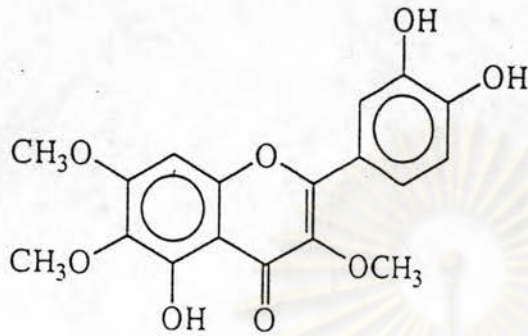
จากข้อมูลดังกล่าวมาทั้งหมดแสดงว่า สาร 11 คือสารประกอบประเภท เพลโรนอล มีชื่อสามัญว่า quercetagetin-3,7-dimethyl ether หรือ ตามระบบ IUPAC 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,6-dihydroxy-3,7-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-one สูตรโครงสร้างของ สาร 11 ดังแสดงไว้ข้างล่าง



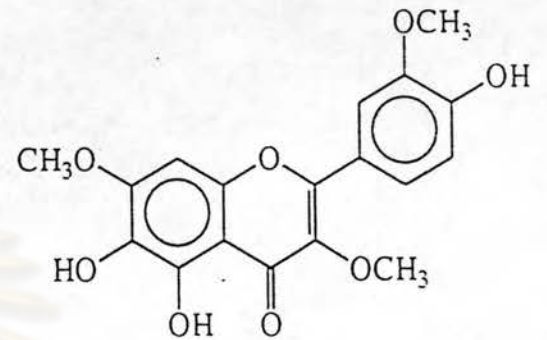
สาร 11 :

2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,6-dihydroxy-3,7-dimethoxy-4H-1-benzopyran-4-one

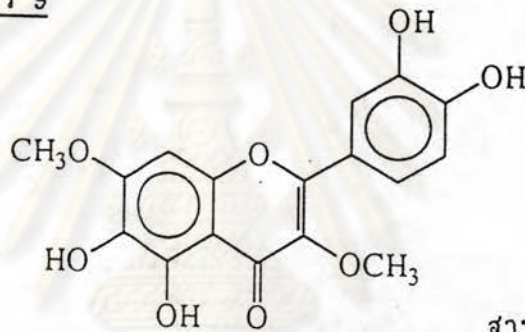
หลังจากที่สามารถกำหนดสูตรโครงสร้างของ สาร 9, สาร 10 และ สาร 11  
 ได้แล้ว เมื่อพิจารณาจากสูตรโครงสร้างพบว่าสารทั้ง 3 ตัวมีสูตรโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันมาก  
 ดังรูปข้างล่างนี้



สาร 9

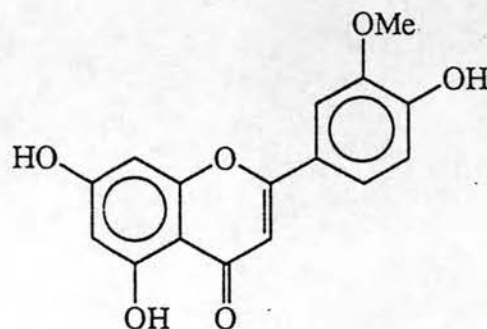


สาร 10



สาร 11

จะสังเกตเห็นได้ว่าทั้ง 3 สูตรจะแตกต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ใน ring A และ  
 คาร์บอนตำแหน่งที่ 3' ใน ring B เท่านั้น เมื่อนำข้อมูล คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ  
 สารทั้ง 3 มาพิจารณาร่วมกันกับสารที่มีสูตรใกล้เคียงสารพวกนี้ คือ Axillarin, centaureidin  
 และ Chrysoeriol(77) แสดงไว้ในตารางที่ 3.28 สำหรับ Chrysoeriol จะพิจารณาใน  
 ring B เทียบกับ สาร 10 Chrysoeriol มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปข้างล่างนี้



Chrysoeriol

ตารางที่ 3.28 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของ สาร 9, สาร 10 และ สาร 11

เทียบกับ Axillarin(77), Centaureidin(77) และ Chrysoeriol(77)

| ตำแหน่ง<br>คาร์บอน | เคมีกัลซีท์ (ppm) |           |        |              |        |             |
|--------------------|-------------------|-----------|--------|--------------|--------|-------------|
|                    | สาร 9             | Axillarin | สาร 11 | Centaureidin | สาร 10 | Chrysoeriol |
| 2                  | 155.93            | 155.55    | 151.44 | 155.13       | 151.57 | 163.7       |
| 3                  | 137.61            | 137.34    | 135.78 | 137.63       | 135.95 | 103.3       |
| 4                  | 178.14            | 178.09    | 178.90 | 178.09       | 176.11 | 181.8       |
| 5                  | 151.66            | 152.37    | 150.52 | 152.23       | 151.03 | 157.4       |
| 6                  | 131.49            | 131.28    | 131.28 | 131.28       | 131.28 | 98.8        |
| 7                  | 158.53            | 157.91    | 158.39 | 158.03       | 158.57 | 164.2       |
| 8                  | 91.05             | 93.92     | 90.79  | 93.97        | 91.28  | 94.0        |
| 9                  | 151.66            | 151.61    | 147.77 | 151.67       | 148.99 | 161.6       |
| 10                 | 105.48            | 104.37    | 104.20 | 104.31       | 104.34 | 103.3       |
| 1'                 | 120.83            | 121.85    | 122.03 | 122.36       | 121.94 | 120.4       |
| 2'                 | 115.70            | 115.74    | 115.35 | 114.90       | 111.77 | 110.2       |
| 3'                 | 145.24            | 145.29    | 145.04 | 146.37       | 147.43 | 150.8       |
| 4'                 | 148.78            | 148.76    | 147.22 | 150.18       | 147.14 | 148.0       |
| 5'                 | 115.56            | 115.43    | 115.57 | 111.93       | 115.56 | 115.8       |
| 6'                 | 120.54            | 120.54    | 120.05 | 120.30       | 121.94 | 121.7       |
| OCH <sub>3</sub>   | 59.98             | 59.95     | 59.98  | 59.88        | 60.09  | 56.0        |
| OCH <sub>3</sub>   | 59.58             | 56.18     | 56.16  | 59.72        | 56.45  |             |
| OCH <sub>3</sub>   | 56.29             |           |        | 55.63        | 55.88  |             |

เมื่อพิจารณาข้อมูลจากตารางที่ 3.28 แล้วจะเห็นได้ว่า คาร์บอนตำแหน่งที่ 8 ใน ring A จะปรากฏสัญญาณที่ประมาณ 90.78-94.00 ppm ซึ่งพอจะสรุปได้ว่าถ้าคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี สัญญาณของคาร์บอนตำแหน่งที่ 8 จะปรากฏสัญญาณที่ประมาณ 90.05-91.23 ppm แต่ สัญญาณของคาร์บอนตำแหน่งที่ 8 จะปรากฏสัญญาณที่ประมาณ 93.92-94.00 ppm ถ้าคาร์บอนตำแหน่งที่ 7 มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี, คาร์บอนตำแหน่งที่ 2' ใน ring B จะปรากฏสัญญาณที่ประมาณ 114.90-115.74 ppm เมื่อคาร์บอนตำแหน่งที่ 3' มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีและจะปรากฏสัญญาณที่ประมาณ 110.00-111.77 ppm เมื่อคาร์บอนตำแหน่งที่ 3' มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี, คาร์บอนตำแหน่งที่ 5' ใน ring B จะปรากฏสัญญาณที่ประมาณ 115.43-115.80 ppm เมื่อคาร์บอนตำแหน่งที่ 4' มีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซีและจะปรากฏสัญญาณที่ประมาณ 111.93 ppm เมื่อคาร์บอนตำแหน่งที่ 4' มีหมู่แทนที่เป็นหมู่เมทอกซี



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3.3 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

#### 3.3.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

การทดสอบนี้ เป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวเมื่อได้รับสารจากหญ้าค้อนกลอง โดยเป็นการศึกษาความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เทียบกับความยาวมาตรฐานที่ต้นข้าวไม่ได้รับสารซึ่งเท่ากับ 100% ถ้าความยาวของรากและกาบใบใกล้เคียงกับความยาวมาตรฐาน แสดงว่า สารนั้นไม่มีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว แต่ถ้าสั้นกว่า แสดงว่า สารนั้นมีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว จากผลการทดสอบพบว่า

สาร 1 คือ ของผสมไฮดรคาร์บอนระเหยง่าย ( $C_{26}-C_{34}$ ) มีองค์ประกอบ  $1.50 \times 10^{-2}\%$  ใช้น้ำหนักโดยน้ำหนัก ได้จากส่วน SA<sub>1</sub>1 เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ความเข้มข้น 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ระหว่าง สาร 1 กับ ส่วน SA<sub>1</sub>1 พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวทั้งคู่เลย แสดงว่า สาร 1 ไม่เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพกับต้นข้าว

สาร 2 คือ ของผสมเอสเทอร์ระเหยง่าย มีองค์ประกอบ  $4.46 \times 10^{-3}\%$  ใช้น้ำหนักโดยน้ำหนัก ได้จากส่วน SA<sub>1</sub>2 เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ความเข้มข้น 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ระหว่าง สาร 2 กับ ส่วน SA<sub>1</sub>2 พบว่า สาร 2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในส่วนรากและกาบใบได้ 57.49 % และ 32.74 % ตามลำดับ, ส่วน SA<sub>1</sub>2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในส่วนรากและกาบใบได้ 62.92 % และ 13.69 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร 2 อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวในส่วนของกาบใบเล็กน้อย แต่จะไม่มีผลต่อการงอกของราก

สาร 3 คือ ของผสมแอลกอฮอล์ระเหยง่าย ( $C_{23}, C_{25}, C_{27}, C_{30}, C_{33}$ ) มีองค์ประกอบ  $2.06 \times 10^{-2}\%$  ใช้น้ำหนักโดยน้ำหนัก ได้จากส่วน SA<sub>1</sub>3 เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ความเข้มข้น 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ระหว่าง สาร 3 กับ ส่วน SA<sub>1</sub>3 พบว่า สาร 3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในส่วนของกาบใบได้ 12.68 % ส่วนการงอกของราก 0.00%, ส่วน SA<sub>1</sub>3 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวเลยแสดงว่า สาร 2 อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวในส่วน

กาบใบเล็กน้อย แต่จะไม่มีผลต่อการงอกของรากเลย

สาร 4 คือ สารประกอบประเภทไตรเทอร์พีนอยด์ (friedelan-3 $\beta$ -ol) มีองค์ประกอบ  $6.00 \times 10^{-4}\%$  น้ำหนักโดยน้ำหนัก เนื่องจากสารที่ได้มีปริมาณน้อยจึงไม่สามารถนำไปทดสอบหาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้

สาร 5 คือ ของผสมแอลกอฮอล์ระเหยง่าย (C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>33</sub>) มีองค์ประกอบ  $7.42 \times 10^{-2}\%$  น้ำหนักโดยน้ำหนัก ได้จากส่วน SA<sub>15</sub> เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ความเข้มข้น 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ระหว่าง สาร 5 กับ ส่วน SA<sub>15</sub> พบว่า สาร 5 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวในส่วนกาบใบได้ 34.34 % ส่วนการงอกของรากเป็น 0.00%, ส่วน SA<sub>15</sub> มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในส่วนรากและกาบใบได้ 2.08 % และ 3.47 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร 5 อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวในส่วนกาบใบเล็กน้อย แต่จะไม่มีผลต่อการงอกของราก

สาร 6 คือ สารประกอบสเตอรอยด์ (stigmasterol) มีองค์ประกอบ  $2.64 \times 10^{-2}\%$  น้ำหนักโดยน้ำหนัก ได้จากส่วน SA<sub>16</sub> เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ความเข้มข้น 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ระหว่าง สาร 6 กับ ส่วน SA<sub>16</sub> พบว่า สาร 6 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวในส่วนรากและกาบใบเลย ส่วน SA<sub>16</sub> มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในส่วนรากและกาบใบได้ 18.79 % และ 7.79 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร 6 ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวเลย

สาร 7 คือ ของผสมของกรดอินทรีย์ระเหยง่าย (C<sub>19</sub>-C<sub>25</sub>) มีองค์ประกอบ  $4.02 \times 10^{-3}\%$  น้ำหนักโดยน้ำหนัก ได้จากส่วน SA<sub>18</sub> เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ความเข้มข้น 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ระหว่าง สาร 7 กับ ส่วน SA<sub>18</sub> พบว่า สาร 7 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในส่วนรากและกาบใบได้ 97.70 % และ 98.77 % ตามลำดับ, ส่วน SA<sub>18</sub> มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในส่วนรากและกาบใบได้ 100.00 % และ 100.00 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร 7 มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวทั้งในส่วนรากและกาบใบ แต่ สาร 7 ไม่ได้เป็นตัวที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพียงกลุ่มเดียวในส่วน SA<sub>18</sub> จึงนำส่วน SA<sub>18</sub> ที่เหลือจากการสกัดแยกเอา สาร 7 ออกไปแล้ว

นำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าที่ความเข้มข้น 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม SA<sub>18</sub> ที่เหลือนี้ ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในส่วนรากและกาบใบได้ 100.00 % และ 100.00%ตามลำดับ นั้นเป็นข้อยืนยันว่า ยังมีสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้นข้าวอีก หรือมีสารที่ส่งเสริมให้แสดงฤทธิ์มากขึ้น แต่ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีที่ใช้อยู่ ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจและศึกษาต่อไป

สาร 8 คือ สารประกอบประเภทสเตอรอยด์ไกลโคไซด์

(stigmasteryl-3-o-β-D-glucopyranoside) มีองค์ประกอบ  $9.0 \times 10^{-2}$ % น้ำหนักโดยน้ำหนัก ได้จากส่วน SA<sub>27</sub> เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ความเข้มข้น 0.001 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ระหว่าง สาร 8 กับ ส่วน SA<sub>27</sub> พบว่า สาร 8 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในส่วนรากและกาบใบได้ 31.49% และ 0.44% ตามลำดับ, ส่วน SA<sub>27</sub> มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวในส่วนรากและกาบใบได้ 90.09 % และ 100.00 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร 8 อาจมีส่วนในการยับยั้งการงอกของรากเล็กน้อย และยังมีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้นข้าวอีกในส่วนที่เหลือ จึงนำส่วน SA<sub>27</sub> ที่เหลือจากการสกัดแยก สาร 8 ออกไปแล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าที่ความเข้มข้น 0.001 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม SA<sub>18</sub> ที่เหลือนี้ ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวใน ส่วนรากและกาบใบได้ 84.00 % และ 78.00 % ตามลำดับ นั้นเป็นข้อยืนยันว่า ยังมีสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้นข้าวอีก แต่ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีที่ใช้อยู่ ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจและศึกษาต่อไป

สาร 9 คือ สารประกอบประเภท เฟลโวนอยด์

(2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-5-hydroxy-3,6,7-trimethoxy,4H-1-Benzopyran-4-one มีองค์ประกอบ  $4.50 \times 10^{-3}$ % น้ำหนักโดยน้ำหนัก ได้จากส่วน SA<sub>25</sub> เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ความเข้มข้น 0.001 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ระหว่าง สาร 9 กับ ส่วน SA<sub>25</sub> พบว่า สาร 9 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในส่วน รากและกาบใบได้ 17.25% และ 12.21% ตามลำดับ, ส่วน SA<sub>25</sub> มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวใน ส่วนรากและกาบใบได้ 94.24 % และ 55.74 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร 9 อาจมีส่วนในการยับยั้งการงอกของรากและกาบใบได้เล็กน้อย และยังมีสารที่มีฤทธิ์ทาง

ชีวภาพต่อต้านข้าวอีกใน SA<sub>25</sub> ที่เหลือ จึงนำส่วน SA<sub>25</sub> ที่เหลือจากการสกัดแยก สาร 9 ออกไป แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าที่ความเข้มข้น 0.001 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม SA<sub>18</sub> ที่เหลือนี้ ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวในสวนรากและกาบใบได้ 88.00 % และ 90.00 % ตามลำดับ นั้นเป็นข้อยืนยันว่า ยังมีสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านข้าวอีก แต่ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีที่ใช้อยู่ ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจและศึกษาต่อไป

สาร 10 คือ สารประกอบประเภท เฟลโวนอยด์ (2-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-5,6-dihydroxy-3,7-dimethoxy,4H-1-Benzopyran-4-one) มีองค์ประกอบ  $3.10 \times 10^{-3}\%$  น้ำหนักโดยน้ำหนัก ได้จากส่วน SA<sub>26</sub> เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ความเข้มข้น 0.001 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ระหว่าง สาร 10 กับ ส่วน SA<sub>26</sub> พบว่า สาร 10 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในสวนรากและกาบใบได้ 10.77% และ 1.55% ตามลำดับ, ส่วน SA<sub>26</sub> มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวในสวนรากและกาบใบได้ 100.00 % และ 100.00 % ตามลำดับ แสดงว่า สาร 10 อาจมีส่วนในการยับยั้งการงอกของรากและกาบใบได้เล็กน้อย และยังมีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านข้าวอีกใน SA<sub>26</sub> ที่เหลือ จึงนำส่วน SA<sub>26</sub> ที่เหลือจากการสกัดแยก สาร 10 ออกไป แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าที่ความเข้มข้น 0.001 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม SA<sub>18</sub> ที่เหลือนี้ ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวในสวนรากและกาบใบได้ 97.21 % และ 98.12 % ตามลำดับ นั้นเป็นข้อยืนยันว่า ยังมีสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านข้าวอีก แต่ไม่สามารถแยกได้ด้วยวิธีที่ใช้อยู่ ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจและศึกษาต่อไป

สาร 11 คือ สารประกอบประเภท เฟลโวนอยด์ (2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-5,6-dihydroxy-3,7-dimethoxy,4H-1-Benzopyran-4-one) มีองค์ประกอบ  $2.50 \times 10^{-3}\%$  น้ำหนักโดยน้ำหนัก ได้จากส่วน SA<sub>54</sub> เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวที่ความเข้มข้น 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ระหว่าง สาร 11 กับ ส่วน SA<sub>54</sub> พบว่า สาร 11 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในสวนรากและกาบใบได้ 42.77% และ 35.22% ตามลำดับ ส่วน SA<sub>54</sub> มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวในสวนรากและกาบใบได้ 13.64% และ 26.14% ตามลำดับ แสดงว่า สาร 11 อาจมีส่วนในการยับยั้งการงอกของรากและกาบใบได้เล็กน้อย

จากผลการทดสอบ พบว่า สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวมากที่สุด คือ สาร 7 (ของผสมกรดอินทรีย์โดยตรง C<sub>19</sub>-C<sub>25</sub>) คาดว่าสารนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเกษตรได้ในอนาคต ส่วนใหญ่แล้วสารประกอบชนิดนี้สามารถจะสกัดได้จากพืชทั่ว ๆ ไป แต่ชนิดของของผสมกรดอินทรีย์โดยตรงที่ได้จากพืชนั้น จะมีจำนวนคาร์บอนในโมเลกุลที่แตกต่างกันซึ่งความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของต้นข้าวอ่อนจึงไม่เท่ากัน ๗ ได้มีผู้ทำการวิจัยเกี่ยวกับของผสมกรดอินทรีย์โดยตรงว่าจำนวนคาร์บอนอยู่ในช่วงใดจะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนมากที่สุด (82) โดยนำของผสมกรดอินทรีย์โดยตรงในพืชชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.01-0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม มาทดสอบกับต้นข้าวอ่อนโดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบดังเช่นที่กล่าวมาแล้วในตอนต้น ๆ เพื่อความสะดวกในการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งของของผสมกรดอินทรีย์โดยตรงที่สกัดได้จากพืชชนิดต่าง ๆ จึงขอยกมาพิจารณาเฉพาะความเข้มข้นของของผสมกรดอินทรีย์โดยตรงที่ 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 3.29

ตารางที่ 3.29 แสดง เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและกาบใบของของผสมกรดอินทรีย์โดยตรงชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากพืชชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม

| ชนิดของพืช     | จำนวนคาร์บอน                     | เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการงอก |       |
|----------------|----------------------------------|-----------------------------|-------|
|                |                                  | ราก                         | กาบใบ |
| ต้นงา          | C <sub>12</sub> -C <sub>24</sub> | 95.98                       | 91.50 |
| รากโหนดทะนงแดง | C <sub>16</sub> -C <sub>35</sub> | 76.94                       | 65.64 |
| โรงกางใบเล็ก   | C <sub>21</sub> -C <sub>36</sub> | 64.28                       | 61.42 |
| ผักปอดนา       | C <sub>29</sub> -C <sub>33</sub> | 33.27                       | 13.75 |
| หญ้าค้อนกลอง   | C <sub>19</sub> -C <sub>25</sub> | 97.77                       | 98.77 |

จากข้อมูลข้างต้นพอสรุปได้ของผสมกรดอินทรีย์ไร้ช่ตรงที่มีจำนวนคาร์บอนประมาณ 12-25 อะตอมสามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของต้นข้าวอ่อนได้ และหุ้าค่อนกลองซึ่งสกัดได้ของผสมของกรดอินทรีย์ไร้ช่ตรงมีจำนวนคาร์บอน 19-25 อะตอมซึ่งอยู่ในช่วงที่สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต้นข้าวอ่อนได้ แต่เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่แสดงในตารางที่ 3.29 ก็ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดเพราะข้อมูลที่ไม่ได้มาจากการทดลองภายใต้สภาวะเดียวกัน

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มพบว่าที่ความเข้มข้น 0.05 กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 100.00 % ทั้งการงอกของรากและกาบใบ และเมื่อนำสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มมาสกัดแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีสามารถแยกส่วน SA<sub>25</sub>, SA<sub>26</sub>, SA<sub>27</sub>, SA<sub>28</sub> และ SA<sub>29</sub> ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 100 % ของการงอกของรากและกาบใบ ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม ซึ่งในส่วน SA<sub>25</sub>, SA<sub>26</sub> และ SA<sub>27</sub> สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ สาร 9, สาร 10 และ สาร 8 ตามลำดับ แต่สารทั้งสามมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว้น้อยมาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารทั้งสามไม่สามารถแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้เมื่ออยู่เดี่ยว ๆ อาจจะต้องทำงานร่วมกับสารตัวอื่น ซึ่งเป็นแนวทางที่น่าทาการวิจัยเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ร่วมกันของสาร จึงได้ออกแบบงานวิจัยอย่างง่าย ๆ ขึ้น โดยเริ่มจากการผสมสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตมากที่สุดก่อนในที่นี้คือ สาร 7 ซึ่งเป็นของผสมกรดอินทรีย์ไร้ช่ตรง โดยพิจารณาจากสิ่งสกัดเฮกเซนซึ่งมีของผสมกรดอินทรีย์ไร้ช่ตรงที่สามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้สูง ของผสมกรดอินทรีย์ไร้ช่ตรงอาจผสมอยู่ในสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มบ้างจึงอาจมีส่วนทาให้ส่วนย่อยต่าง ๆ ในการแยกสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้ เพื่อหาข้อมูลที่จะมาสนับสนุนสมมติฐานนี้จึงได้ทาการผสมของผสมกรดอินทรีย์ไร้ช่ตรง 0.0005 กรัมเข้ากับ สาร 8, สาร 9, สาร 10 และ สาร 11 ที่ละตัวโดยตัวละ 0.0005 กรัมซึ่ง สาร 8, สาร 9 และ สาร 10 เป็นสารที่อยู่ในส่วนที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด ส่วน สาร 11 เป็นสารประกอบ เพลวโนลเหมือนกับ สาร 9 และ สาร 10 จากนั้นนำของผสมแต่ละชนิดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวโดยเปรียบเทียบกับกรดอินทรีย์ไร้ช่ตรง 0.0005 กรัมที่ไม่ผสมสาร ได้ผลการทดลองดังตาราง 3.30

ตารางที่ 3.30 แสดงเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและกาบใบ  
ของของผสมกรดอินทรีย์โดยตรงกับ สาร 8, สาร 9, สาร 10 และ สาร 11  
ความเข้มข้น(กรด :สาร) 0.0005:0.0005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม

| ของผสมกรดอินทรีย์<br>ผสมกับสาร | % ความยาว |       | % การยับยั้ง |       |
|--------------------------------|-----------|-------|--------------|-------|
|                                | ราก       | กาบใบ | ราก          | กาบใบ |
| ไม่ใส่สาร                      | 74.46     | 83.93 | 26.54        | 16.07 |
| <u>สาร 8</u>                   | 31.50     | 79.50 | 68.50        | 20.50 |
| <u>สาร 9</u>                   | 84.68     | 85.31 | 15.32        | 14.69 |
| <u>สาร 10</u>                  | 57.89     | 17.09 | 42.11        | 81.91 |
| <u>สาร 11</u>                  | 82.54     | 73.39 | 17.46        | 26.61 |

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 3.30 จะเห็นว่า สาร 10 และ สาร 8 เท่านั้นที่  
เมื่อผสมกับของผสมอินทรีย์โดยตรงแล้วสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวได้  
ส่วน สาร 9 และ สาร 11 ไม่สนับสนุนการทดลองนี้ การทดลองนี้ยังเชื่อได้ว่าไม่มากเพราะปริมาณ  
สารที่ใช้น้อยเกินไป คือควรจะทำในช่วงความเข้มข้น 0.05 - 0.005 กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม  
ซึ่งเป็นช่วงที่ยอมรับผลได้ และอีกประการหนึ่งคือ สารผสมละลายได้น้อยมากในตัวทำลายที่ใช่และ  
สารผสมไม่ละลายในน้ำ ทำให้ของผสมกระจายได้ไม่ทั่วถึงและปริมาณของสารไม่เหมาะสมในการ  
ดูดซึมของรากของต้นข้าว จึงต้องทำการศึกษาถึงความเหมาะสมต่อไป

จากข้อมูลที่กล่าวมานี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ  
วัชพืชต่าง ๆ หรือพืชที่เราไม่ต้องการได้บ้าง โดยนำของผสมกรดอินทรีย์โดยตรง(C<sub>12</sub>-C<sub>25</sub>)ไป  
ทดสอบดูก่อนว่าปริมาณเท่าใดจึงจะออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อวัชพืชได้มากที่สุด ซึ่งเป็น  
เรื่องที่น่าสนใจและน่าจะมีการศึกษาต่อไปอีก

### 3.3.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้จากเอกลสารอ้างอิง

สาร 1 คือ ของผสมไฮโดรคาร์บอนไรซ์ตรง (C<sub>26</sub>-C<sub>34</sub>) จากการ  
ศึกษาข้อมูลพบว่า ของผสมไฮโดรคาร์บอนไรซ์ตรง (C<sub>27</sub>-C<sub>33</sub>) ใช้รักษาอาการอักเสบของผิวหนัง  
(skin inflammatory disorders) (83)

สาร 3 และ สาร 5 คือ ของผสมแอลกอฮอล์ไรซ์ตรง (C<sub>23</sub>-C<sub>33</sub>)  
จากรายงานพบว่าของผสมของแอลกอฮอล์ไรซ์ตรงที่มีจำนวนคาร์บอน 28-32 และ 30-36 มีผล  
ยับยั้งการกินของแมลงกินฝ้ายในระดับสูง (84)

สาร 4 คือ สารประกอบประเภทไตรเทอร์พีนอยด์ (friedelan-3 $\beta$ -ol)  
จากการรายงานพบว่าสารนี้ใช้ป้องกันอาการอักเสบ (anti-inflammatory) และอาการชัก  
(anticonvulsant) (85)

สาร 6 คือ stigmasterol มีรายงานว่า stigmasterol แยกได้  
เป็นครั้งแรกโดย Windaus และ Hauth ใน ค.ศ.1906 จาก *Physostigma venenosum*  
มีรายงานว่า stigmasterol เป็นสารที่มีความสำคัญในการใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์  
ฮอร์โมนเพศบางชนิด (86) นอกจากนี้มีผลในการยับยั้งการกินของแมลงกินฝ้ายสูง (84), ใช้  
เป็นยาระบายสำหรับมนุษย์และสัตว์ (87), ใช้เป็นส่วนผสมในยาระดมเพื่อป้องกันศีรษะล้าน (88)  
และใช้เป็นยาป้องกันโรคผิวหนัง (89)

สาร 7 คือ ของผสมของกรดไรซ์ตรง (C<sub>19</sub>-C<sub>25</sub>) จากการรายงาน  
พบว่าของผสมของกรดไรซ์ตรงที่มีจำนวนคาร์บอน 21, 22, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 33,  
34 และ 36 มีผลยับยั้งการกินของแมลงกินฝ้ายในระดับสูง (84)

สาร 8 คือ สารประกอบประเภทสเตอรอยด์ไกลโคไซด์  
(stigmasteryl-3-o- $\beta$ -D-glucopyranoside) มีรายงานว่าสารนี้สามารถออกฤทธิ์ในการ  
ส่งเสริมการเจริญเติบโตของร่างกาย (growth promoting activity) (90)