คำนำ

ต้นสารพัดพิษเป็นพันธุ์ไม้ในตระกูล Acanthaceae Nees มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ เรียกว่า Clinacanthus burmanii Nees หรืออาจจะเรียกชื่อว่า Clinacanthus nutans Burm ได้อีกด้วย

ลักษณะโดยทั่ว ๆ ไป ต้นสารพัดพิษเป็นไม้ต้นพุ่มเล็ก ๆ รูปร่างของใบมีลักษณะเป็นรูปหอก ปลายใบแหลม โคนเท่ากันมีลักษณะกลมมน ตัวใบมีความยาวประมาณ 3 นิ้ว กว้าง 0.5–0.8 นิ้ว และเส้นใบเป็นตาข่ายเห็นได้ชัดเจน ก้านใบยาวประมาณ 0.25 นิ้ว กลีบเลี้ยงยาวประมาณ 0.25 นิ้ว และมีขนเล็กน้อย ช่อดอกมีกลีบดอกตั้งแต่ 5 กลีบขึ้นไป และมีสีแดง มีความยาวประมาณ 1.25 นิ้ว(12),(14)

โดยปรกติ ต้นสารพัดพิษจะมีอายุยืนตั้งแต่ 20–30 ปี หรือนานกว่านั้น หากไม่ถูกภัยธรรมชาติ เช่น น้ำท่วม หรือไฟป่า ลำต้นของต้นสารพัดพิษขนาดใหญ่ วัดโดยรอบจะมีขนาดตั้งแต่ 12–24 นิ้ว และยาวกว่า 100 ฟุต ซึ่งในป่าอีกอำเภอกบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี ต้นสารพัดพิษเกี่ยงต้นเดียว สามารถเลื้อยขึ้นไปคลุมต้นยางขนาดใหญ่สูงกว่า 100 ฟุต ได้มิดทั้งต้น ต้นสารพัดพิษขนาดใหญ่ จะออกดอกเป็นครั้งแรกเป็นสีแดงเข้ม มีลักษณะเหมือนหัวงูฉกกวัด เมื่อออกแก่จะเป็นสีน้ำตาลเข้ม หรือน้ำตาลอ่อน มองเผิน ๆ คล้ายกับหัวงูกำลังชูคอ แต่มีผู้นำมาปลูกตามบ้าน ตามสวน ลำต้นไม่ใหญ่โตเหมือนในป่าตามธรรมชาติ ลักษณะของใบเรียวแหลม สีเขียวอ่อน ใช้เป็นไม้ประดับบ้านได้อย่างดี การปลูกก็ง่ายมาก เพียงหักกิ่งไปปลูกในที่ ๆ มีความชื้นก็ขึ้น แต่ไม่ชอบที่แฉะ

ต้นสารพัดพิษ เป็นพืชที่ปลูกกันทั่ว ๆ ไปในประเทศจีนตอนใต้ อินโดจีน ปีนัง ชะวา บอร์เนียว และประเทศไทย ใบของต้นสารพัดพิษนำไปใช้ประโยชน์ทางยาได้มาก กล่าวกันว่าถ้าถูกงูกะปะกัด ให้เอาใบของต้นสารพัดพิษนี้ ตำผสมกับเหล้าโรง แล้วคั้นเอาน้ำเหล้ามาดื่ม ส่วนกากก็เอาไปพอกที่แผลซึ่งถูกงูกัดนั้น ก็จะหายได้ภายใน 1–2 ชั่วโมง ซึ่งการรักษาพิษงูร้ายต่างๆ ด้วยใบของต้นสารพัดพิษนี้ ได้มีหลักฐานที่ยืนยันแน่นอนหลายราย นอกจากนั้นยังใช้แก้พิษตะขาบแมงป่องขบต่อย และตอแขนอื่น ๆ ได้ดีมาก(1) หรืออาจจะใช้ใบสารพัดพิษเคี่ยวกับน้ำมันงา เช่น น้ำมันมะพร้าวใช้รักษาแผลคนไข้ที่ถูกน้ำร้อนลวก ไฟลวก และถูกกรดต่าง ๆ ได้ดี โดยจะลอนพิษแสบร้อนจากบริเวณบาดแผลภายใน $\frac{1}{2}$ – 1 ชั่วโมง และตากบาดแผลไม่สาหัส ก็จะไม่มีอาการพองและไม่มีแผลเป็นเลย

ตามสรรพคุณดังกล่าวนี้ ทำให้คิดว่า ในใบของต้นสารภีพิษ น่าจะมีสารประกอบบางอย่างที่เป็น Active principles ซึ่งใช้ป้องกันพิษสัตว์ร้ายต่าง ๆ โดยเฉพาะพวกงูพิษได้ดีพอสมควร จึงได้นำเอาใบและก้านอ่อน ฯ ของต้นสารภีพิษมาทำการค้นคว้า การวิเคราะห์ส่วนใหญ่ทางด้านโครงสร้างและกุ่มหมู่ทางเคมีเป็นส่วนใหญ่

จากการตรวจสอบ Literatures ทางวิทยาศาสตร์ ที่เกี่ยวกับการค้นคว้าสมุนไพร เท่าที่มีอยู่ในห้องสมุดต่าง ๆ ของประเทศไทย ปรากฏว่ายังไม่มีผู้ใดทำการวิจัยต้นสารภีพิษมาก่อนเลย จึงเป็นการสมควรที่จะเสนอการวิจัยเกี่ยวกับต้นสารภีพิษ เพื่อศึกษา Chemical compounds ในต้นพืชชนิดนี้ว่า มีสารประกอบชนิดใดบ้าง และสารประกอบเหล่านี้ มีประโยชน์ในทางรักษาพิษงู หรือนำเอาไปใช้ทำอะไรได้บ้าง

การทดลอง

1. Alumina สำหรับ column chromatography

ใช้ Standard Merck's aluminium oxide

2. Alumina สำหรับ thin layer chromatography

ใช้ Merck's reagent aluminium oxide

3. Silica gel สำหรับ thin layer chromatography

ใช้ Riedel de Hann ขนาดเล็กกว่า 0.08 มิลลิเมตร

4. Infra - red Spectra

ใช้ Perkin Elmer Infra - red Model 421

5. Liebermann - Burchard Test[5],[13]

ละลายสารตัวอย่างจำนวนเล็กน้อยใน chloroform หยด acetic anhydride ลงไป 2 – 3 หยด แล้วหยด conc. H_2SO_4 ลงไป 1 หยด ถ้ามีสีเกิดขึ้นภายใน 1 – 2 นาที แสดงว่า มี steroids หรือ triterpenoids

6. Thin - layer chromatography[4],[15]

ใช้ alumina 20 กรัม กับน้ำ 40 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วทำ plate ขนาด 20 + 20 เซนติเมตร โดยใช้ Desaga spreader ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึง activate ที่ 100 – 120 °C เป็นเวลา $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ทำให้เย็นแล้วขีดเส้นขนาน 2 เส้นบน plate โดยให้ห่างจากริม plate ประมาณ 2 เซนติเมตร กำหนดให้เส้นล่างเป็น base line และเส้นบนห่างจากเส้นล่าง 15 เซนติเมตร เป็น solvent front ใช้สารประมาณ 1 – 2 มิลลิกรัม ละลายใน solvent แล้วหยดสารนี้ลงที่ plate โดยพยายามทำจุดให้เล็กที่สุด ให้จุดหนึ่ง ๆ ห่างกัน 4 เซนติเมตร เมื่อ solvent แห้งแล้ว เอา plate ใส่ใน tank ซึ่งมี eluting solvent อยู่ลึก 1 เซนติเมตร แล้วปิดด้วยฝาแก้ว eluting solvent จะค่อย ๆ ซึมขึ้นไปบน plate ด้วยอัตราเร็วลดลงเรื่อย ๆ เมื่อระยะทางระหว่าง solvent front และ base line เพิ่มขึ้น สำหรับเวลาที่ใช้ จะขึ้นอยู่กับชนิดของ solvent ที่ใช้ แต่อย่างไรก็ตาม มักจะใช้เวลาระหว่าง 20 – 45 นาที เมื่อ solvent front ถึงเส้นบน นำเอา plate ออกจาก tank ทิ้งไว้ให้ solvent ระเหย แล้ว spray plate ด้วย reagent ที่เหมาะสม เพื่อจะได้มองเห็น compound ใน plate ได้ชัดเจน

1. <u>การสกัด</u> (Extraction)

ใช้ใบสารพัดพิษรวมทั้งกิ่งอ่อน ๆ นำเอาไปตากให้แห้ง บดให้ละเอียดประมาณ 5.8 กิโลกรัม แล้ว extract โดย Soxhlet apparatus ใช้ petroleum ether (b.p.60-80°C) ประมาณ 25 ลิตร เป็นตัวทำละลาย สกัดเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง นำสิ่งที่สกัดได้มากรอง แล้วกลั่นเอาตัวทำละลายออก จะได้ crude product มีลักษณะเป็น semi-solid สีเขียวเข้ม หนักประมาณ 66 กรัม (1.14 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของ raw material ที่แห้งและบดละเอียด)

2. <u>การแยกสาร</u> (Separation)

เอา crude product 66 กรัม ไปทำให้แห้ง โดย rotary evaporator จะได้ dry product หนัก 46 กรัม (0.79 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของ raw material ที่แห้งและบดละเอียด) แล้วละลายใน benzene จนละลายหมด โดยพยายามใช้ benzene ให้น้อยที่สุดเท่าที่จะน้อยได้ (ในการทดลองนี้ ใช้ dry crude product 10 กรัม ละลายใน benzene 100 ml.) ย่านลงใน column chromatography ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ยาว 110 เซนติเมตร โดยใช้ standard alumina (1200 กรัม) เป็น adsorbent ซึ่ง pack โดย wet packing method แล้ว elute column ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กัน แบ่งรองรับ eluant fraction ละ 1 ลิตร แล้วกลั่นเอาตัวทำละลายออก ผลของการ elute เป็นดังนี้

Eluant	Number of 1 litre fractions collected	m.p.of compounds, °C	Liebermann -Burchard Test	Remark
Petroleum ether	1	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	-	
	2-17	น้ำมันสีเหลือง	-	
	18-33	amorphous crystal m.p.87-88°C	ไม่ให้	สาร ก.
	34-61	สารสีขาว m.p.180-200°C เกาะรอม ๆ ข้างขวด	แดง→น้ำตาล→เหลือง	สาร ข.

Eluant	Number of 1 litre fractions collected	m.p. of compounds, °C	Liebermann-Burchard Test	Remark
5% ether in petroleum ether	1-12	ผลึกรูปเข็มไม่มีสี m.p.151-154°C	แดง-น้ำตาล - เขียว-เขียวมี้ม่วง-น้ำตาล	สาร ก.
	13-28	ผลึกรูปเข็มไม่มีสี m.p.125-130°C	แดง-ม่วง-น้ำเงิน เขียว-น้ำตาล	สาร ง.
10% ether in petroleum ether	1-41	ผลึกเป็นก้อนๆสีขาว m.p.235-240°C	น้ำตาล-น้ำตาลแดง-เหลือง	สาร จ.
20% ether in petroleum ether	1-15	น้ำมันสีเหลือง	-	
50% ether in petroleum ether	1-35	น้ำมันสีเหลือง	-	
Chloroform	1-42	น้ำมันสีเหลือง	-	

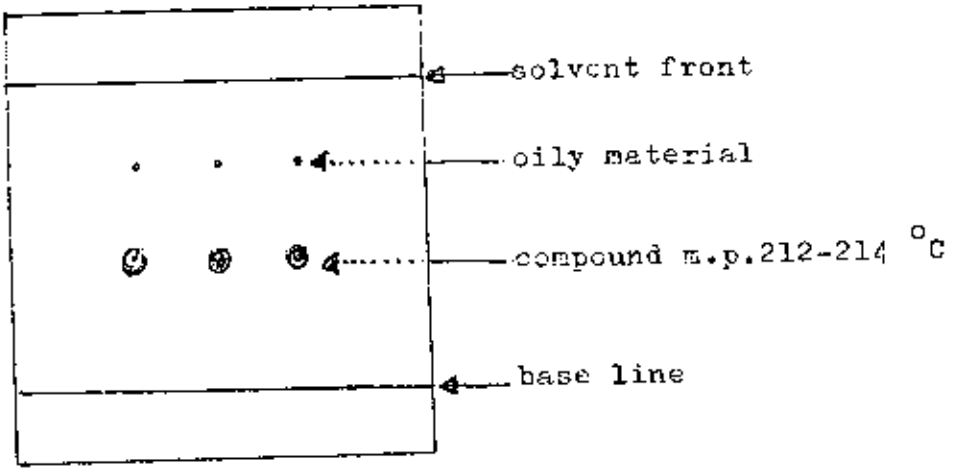
3. การทำให้สารบริสุทธิ์ (Purification)

3.1 การทำให้สาร ก.บริสุทธิ์

สาร ก.(สารก่อนทำให้บริสุทธิ์หนัก 425 มิลลิกรัม) ได้จากการ elute column chromatography ด้วย petroleum ether ใน fraction ต่าง ๆ ซึ่งจะตกผลึกออกมาตั้งแต่ solvent ยังไม่แห้ง เป็น amorphous crystal จึงกรอง ล้างผลึกด้วย petroleum ether เอาผลึกที่กรองได้มาตกผลึกอีกหลาย ๆ ครั้งใน benzene ในที่สุดจะได้ amorphous crystal สีขาว มีจุดหลอมเหลวต่ำ 87-88°C หนัก 323 มิลลิกรัม (0.70 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของ crude extract)

3.2 <u>การทำให้สาร ข.บริสุทธิ์</u>

สาร ข. (สารก่อนทำให้บริสุทธิ์หนัก 650 มิลลิกรัม) ได้จากการ elute column chromatography ด้วย petroleum ether ใน fraction หลัง ๆ ซึ่งจะปรากฏเห็นเป็นสารสีขาวเกาะอยู่ข้าง flask เมื่อsolvent แห้งแล้ว สารใน fraction เหล่านี้จะมีจุดหลอมเหลวต่างกันมาก ได้พยายามตกผลึกหลาย ๆ ครั้ง ในตัวทำละลายต่าง ๆ ชนิด ไม่สามารถจะทำให้ได้สารที่มีจุดหลอมเหลวคงที่ได้ จึงเอามาทดลองแยกด้วย thin layer chromatography โดยใช้ alumina G เป็น adsorbent และใช้ 10 % ether in benzene เป็น eluting solvent แล้ว spray ด้วย 0.05 % morin ปรากฏผลดังนี้



เมื่อลองตัดเอา spot เหล่านี้ มา eluteออกด้วย chloroform แล้วเอาไประเหย chloroform ออกจนหมด ปรากฏว่าที่จุดกลางของplate จะมีสารสีขาวเหลืออยู่ ส่วนในจุดเฉลี่ยตอนบน จะปรากฏเหลือแต่เพียงน้ำมัน ๆ เท่านั้น

จากนี้ จึงลองเอา fraction ต่าง ๆ ที่ได้จาก column chromatography และมีสารตัวนี้อยู่ มาทำ thin layer chromatography ทุก ๆ fractions แล้วรวบรวมสารที่มี Rf. value [illegible] เอาไว้ด้วยกัน เพื่อทำPreparative layer ของสาร ข.ต่อไป

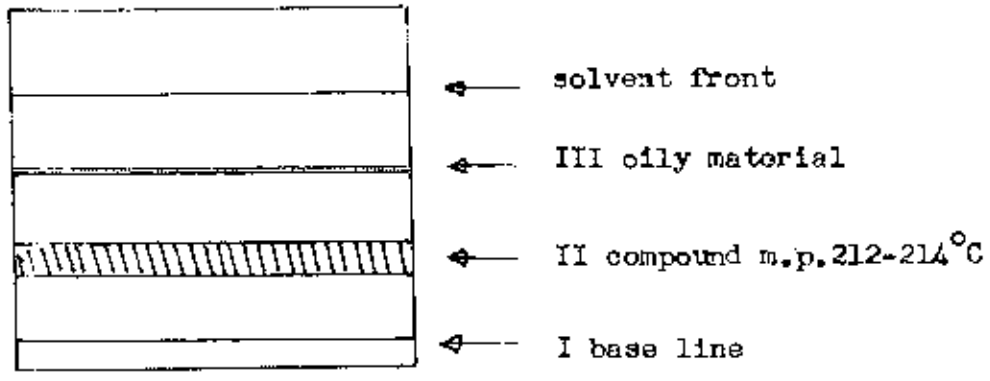
<u>Preparative layer chromatography ของสาร ข.</u>[4]

การเตรียม thick layer plate สำหรับทำ chromatography นั้น ทำได้ดังนี้ คือ

ใช้ Merck's standard aluminium oxide 40 กรัม และ aluminium oxide G 10 กรัม กับน้ำ 40 กรัม เขย่าอย่างแรงในขวดที่มีจุกปิดสนิท เมื่อผสมกันดีทุกส่วนแล้ว จึงเท slurry material นั้นลงใน Desaga spreader ซึ่งได้ adjust ให้มีความหนา 2 มิลลิเมตร ลากผ่านไปบน plate ขนาด 20 + 20 เซ็นติเมตร อย่างช้า ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศประมาณ 1 ชั่วโมง จึงเอาไป activate ที่ 100 – 120 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้เย็น แล้วเก็บไว้ใน desicator เพื่อจะได้ใช้ต่อไป

ขีดเส้นขนาน 2 เส้นบน plateโดยให้ห่างจากริม plate ประมาณ 2 เซ็นติเมตร กำหนดให้เส้นล่างเป็นbase line และเส้นบนห่างจากเส้นล่าง 15 เซ็นติเมตร เป็น solvent front ใช้สาร ข.ครั้งละประมาณ 200 มิลลิกรัม ละลายในchloroform

2–4 มิลลิลิตร แล้วใช้ dropper ขีดเป็นเส้นไปบนส่วนบนของbase line เมื่อ solvent แห้งแล้ว เอา plate ใส่ใน glass tank ซึ่งมี 10 % ether in benzene เป็น eluting solvent ให้ด้านล่างของ plate จุ่มลึกประมาณ 1 เซ็นติเมตร ปิดปาก tank ด้วยกระจก เมื่อ solvent front ถึงเส้นบน ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 45 นาที ยก plate ออกจาก tank ทิ้งไว้ในอากาศให้ solvent ระเหยออกไป แล้ว spray ด้วย 0.05 % morin เมื่อส่องดูด้วย U.V.light ที่ wavelength 254 หรือ 350 mμ ก็จะมองเห็น band ต่าง ๆ 3 bands ด้วยกัน รวมทั้งที่ base line ด้วย



ตัดแต่ละ band ออกมาป่นให้เป็นผงละเอียด ใส่ลงใน column chromatography แล้ว elute เร็ว ๆ ด้วย chloroform นำแต่ละ fraction ไประเหยเอา solvent ออก ปรากฏผลดังนี้

band I (base line) ได้เป็นน้ำมัน ๆ ไม่ได้ identify

band II จะได้เป็นสารสีขาว ๆ ซึ่งเมื่อเอามาลองละลายใน chloroform แล้ว spot ใน thin layer of alumina G run ใน 10 % ether in benzene แล้ว spray ด้วย morin ยังคงแยกเป็น 3 จุดอีก จึงเอา fraction นี้ ไปทำ preparative layer chromatography อีก 2 ครั้ง จนสารที่ได้ออกมา เมื่อเอาไปทดลองแยกด้วย thin layer of alumina G จะมีเพียงจุดเดียว จึงเอาสารทั้งหมดตกผลึกใน acetone/methanol(1:1) ได้ผลึกรูปเข็มไม่มีสี มีจุดหลอมเหลวคงที่ที่ 212-214°C หนัก 526 มิลลิกรัม (1.14 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของ crude extract)

band III (oily material) เป็นน้ำมัน ๆ ไม่ได้ identify

3.3 การทำให้สาร ค.บริสุทธิ์

สาร ค. (สารก่อนทำให้บริสุทธิ์หนัก 833 มิลลิกรัม) ได้จากการ elute column chromatography ด้วย 5 % ether in petroleum ether ใน fraction แรก ๆ ซึ่งผลึกจะตกออกมาตั้งแต่ solvent ยังไม่แห้ง เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 151–154°C จึงเอามาตกผลึกอีกหลาย ๆ ครั้งใน ethyl alcohol ในที่สุดจะได้ผลึกมีลักษณะเป็นแผ่น ๆ สีขาว จุดหลอมเหลวคงที่ที่ 168–169°C หนัก 640 มิลลิกรัม (1.4 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของ crude extract) ซึ่งเมื่อทำ mixed melting point กับ stigmasterol ปรากฏว่าไม่เปลี่ยนแปลง

3.4 การทำให้สาร ง.บริสุทธิ์

สาร ง. (สารก่อนทำให้บริสุทธิ์หนัก 735 มิลลิกรัม) ได้จากการ elute column chromatography ด้วย 5 % ether in petroleum ether ใน fraction หลัง ๆ ผลึกบางส่วนจะตกออกมาตั้งแต่ solvent ยังไม่แห้งเช่นเดียวกัน เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 125–130°C นำมาตกผลึกหลาย ๆ ครั้งใน chloroform/methanol (1:2) ในที่สุด จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลวคงที่ที่ 137–138°C หนัก 560 มิลลิกรัม (1.22 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของ crude extract) ซึ่งเมื่อทำ mixed melting point กับ β-sitosterol ปรากฏว่าไม่เปลี่ยนแปลง

3.5 การทำให้สาร จ.บริสุทธิ์

สาร จ. (สารก่อนทำให้บริสุทธิ์หนัก 52 มิลลิกรัม) ได้จากการ elute column chromatography ด้วย 10 % ether in petroleum ether ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนน้อยมาก ตกผลึกออกมาครั้งแรก มีลักษณะเป็นก้อน ๆ สีขาว จุดหลอมเหลว 235–240°C แต่ที่อุณหภูมิ 215–228°C จะเปลี่ยน form เป็นรูปเข็มหมด จึงเอามาตกผลึกหลาย ๆ ครั้งใน acetone/methanol (1:2) ในที่สุด ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว ซึ่งที่อุณหภูมิ 215–228°C จะเปลี่ยน form เป็นรูปเข็มหมด และหลอมเหลวที่ 241–242°C ได้สารหนัก 43 มิลลิกรัม (0.09 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของ crude extract)

4. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร ก.

4.1 การตรวจหาคุณสมบัติทางกายภาพ

สาร ก.เป็น amorphous crystal สีขาว มีจุดหลอมเหลว 87–88 °C ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ใน organic solvent ทุกชนิด โดยละลายได้มากน้อยแตกต่างกัน แต่ถ้าทำให้ร้อนจะละลายได้ดีใน organic solvent ทุกชนิด และเมื่อนำไปตรวจหาธาตุโดยวิธี Lassaigne's Test (24) ปรากฏว่าไม่มีธาตุอื่นนอกจากคาร์บอนและไฮโดรเจน ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของธาตุ มีดังนี้

C= 82.23 %, H = 14.30 %

และจากการคำนวณสำหรับ myricyl alcohol ($C_{30}H_{62}O$)

C= 82.11 %, H = 14.24 %

(2),(16),(17)

Infra-red spectrum ของสาร ก.เป็นดังนี้ (ภาพหน้า 31)

Groups	Bands, cm^{-1}
Polymeric association of OH stretching vibration	3400
C-OH stretching vibration of primary alcohol	1050
$-CH_2-$ stretching vibration	2910,2840
$-CH_2-$bending vibration	1467
$C-CH_3$ bending vibration (asymmetrical)	1458
$C-CH_3$ bending vibration (symmetrical)	1367
rocking modes of CH_2 or $(CH_2)_n$	727,715

4.2 การตรวจหา functional group

ตรวจหา functional group ตามวิธี standard method (22) ปรากฏว่าสารนี้เป็น saturated alcohol

4.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์

ก. Acetylation

ใช้สาร ก.100 มิลลิกรัม ละลายใน anhydrous pyridine จนละลายหมด เติม acetic anhydride ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วต้มให้เดือด under reflux condenser เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็น เทลงในน้ำแข็ง ประมาณ 5-10 มิลลิลิตร กรอง acetylated product ล้างด้วยน้ำจนหมด pyridine ตั้งไว้ให้แห้งในอากาศ แล้วเอาไปตกผลึกหลาย ๆ ครั้งใน petroleum ether / methanol(2:1 ผลที่สุดจะได้ amorphous crystal สีขาว มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 74-75 °C หนัก 63 มิลลิกรัม ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจน มีดังนี้

C = 79.99 %, H = 13.32 %

และจากการคำนวณสำหรับ myricyl acetate ($C_{32}H_{64}O_2$)

C = 79.93 %, H = 13.41 %

Infra-red Spectrum (2),(16),(17) ของ acetate ของสาร ก. เป็นดังนี้ (ภาพหน้า 31)

Groups	Bands, cm^{-1}
Disappearance of OH stretching vibrations at 3400,1050 cm^{-1}	
C=O stretching vibration of normal saturated ester	1732
C-O- stretching vibration of acetate	1233
$-CH_2-$ stretching vibration	2901,2819
$-CH_2-$ bending vibration	1464
$C-CH_3$ bending vibration (asymmetrical)	1457
$C-CH_3$ bending vibration (symmetrical)	1359
Rocking modes of CH_2 or (CH_2) n	723,714

ข. Benzoylation

ใช้สาร ก. 100 มิลลิกรัม ละลายใน anhydrous pyridine เล็กน้อย เติม benzoyl chloride1 มิลลิลิตร แล้วอุ่นสัก 2-3 นาที เทลงในน้ำปนน้ำแข็ง 5-10 มิลลิลิตร พร้อมกันคนแรง ๆ ตั้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วรินน้ำใส ๆ ข้างบนทิ้ง ส่วนที่เหลือเติม 5 % Na_2CO_3 solution ลงไปประมาณ 5 ml. คนให้เข้ากัน แล้วกรองออก ล้างจนหมดด่างและ pyridine ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ จึงเอามาตกผลึกใน petroleum ether /methanol (2:1) ได้ผลึกเป็นแผ่น ๆ สีขาว มีจุดหลอมเหลวคงที่ที่ 67-68 °C หนัก 40 มิลลิกรัม ผลของการหาเปอร์เซนต์ของคาร์บอน และไฮโดรเจน มีดังนี้

C = 81.97 %, H = 12.37 %

และจากการคำนวณสำหรับ myricyl benzoate ($C_{37}H_{66}O_2$)

C = 81.85 %, H = 12.25 %

Infra-red Spectrum[2],[16],[17] ของ benzoate ของสาร ก. เป็นดังนี้ (ภาพหน้า 31)

Groups	Bands, cm^{-1}
Disappearance of OH stretching vibrations at 3400,1050 cm^{-1}	
C=O stretching vibration of normal saturated ester	1711
C-O- stretching vibration of benzoate	1271,1105
C=C stretching vibration of phenyl conjugated	1594,1575
$-CH_2-$ stretching vibration	2902,2817
$-CH_2-$ bending vibration	1464
$C-CH_3$ bending vibration (asymmetrical)	1456
$C-CH_3$ bending vibration (symmetrical)	1385
Rocking modes of CH_2 or (CH_2) n	714,703

4.4 Oxidation[10]

ละลายสาร ก.หนัก 100 มิลลิกรัม ใน glacial acetic acid 15 มิลลิลิตร เอา potassium dichromate 0.5 กรัม ละลายในน้ำ 5 มิลลิลิตร หยด conc.H_2SO_4 ลงไป 1 มิลลิลิตร เอาสารละลายของสาร ก.ใน glacial acetic acid เทลงในสารละลายของ potassium dichromate reflux 30 นาที แล้วเท mixture ลงในน้ำ สารที่ถูก oxidise จะไม่ละลายน้ำ จึงตกตะกอนออกมา ล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้งจนหมดกรด แล้วตกผลึกหลาย ๆ ครั้งใน benzene ผลที่สุดจะได้ amorphous crystal สีขาว มีจุดหลอมเหลวคงที่ ที่ 93–94°C หนัก 45 มิลลิกรัม ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอน และไฮโดรเจน มีดังนี้

$$C = 79.87\ \%,\ H = 13.24\ \%$$

และจากการคำนวณสำหรับ myrissic acid ($C_{30}H_{60}O_2$)

$$C = 79.60\ \%,\ H = 13.30\ \%$$

Infra-red spectrum[2],[16],[17] ของ oxidation product ของสาร ก.เป็นดังนี้ (ภาพหน้า32)

Grpups	Bands, cm^{-1}
Disappearance of OH stretching vibrations at 3400, 1050 cm^{-1}	
C=O vibration : saturated aliphatic acid	1705
C-O- stretching vibrations or OH deformation vibrations	1410,1300
Band progression in solid fatty acid	1300-1180
$-CH_2-$ stretching vibrations	2920,2850
$-CH_2-$ bending vibration	1462
$C-CH_3$ bending vibration	1379
rocking mode of CH_2 or $(CH_2)n$	730,720

ลักษณะของ Spectrum ดังกล่าวนี้ เป็นทำไม เปรียบเทียบกับ Standard spectrum ของ myrissic acid[19] ปรากฏว่า identical ทั้งทุกประการ

5. การวิเคราะห์ตาสูตรโครงสร้างของสาร ข.

5.1 การตรวจคุณสมบัติทางกายภาพ

สาร ข. เป็นผลึกรูปเข็มไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว 212–214°C ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีใน organic solvent ทุกชนิด เมื่อทดลองทำ Liebermann-Burchard Test จะได้สีแดง ซึ่งเมื่อทิ้งไว้สักครู่จะเป็นสีน้ำตาล และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองในที่สุด เมื่อนำเอาไปตรวจหาธาตุ โดย Lassaigne's Test[24] ปรากฏว่าไม่มีธาตุอื่น นอกจากคาร์บอนและไฮโดรเจน ผลของการวิเคราะห์ตาเปอร์เซนต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจน มีดังนี้

C = 84.62 %, H = 11.53 %

และจากการคำนวณสำหรับ lupeol ($C_{30}H_{50}O$)

C = 84.44 %, H = 11.81 %

Rf value ของสาร ข. เท่ากับ 0.75 เมื่อใช้ alumina C เป็น adsorbent ใช้ 10 % ether in benzene เป็น eluting solvent ซึ่งจะเป็น spot ได้ชัดเจนเมื่อ spray ด้วย 0.05 % morin แล้วส่องดูด้วย U.V.light

Infra-red spectrum[2],[16],[17] ของสาร ข. เป็นดังนี้ (ภาพหน้า 33)

Groups	Bands, cm^{-1}
Polymeric association of OH stretching vibration	3340
C-OH stretching vibration of secondary alcohol	1100
C=C stretching vibration of non-conjugated	1638
CH stretching vibration of $CR_1R_2 = CH_2$	3075
$-CH_2-$ stretching vibration	2922,2860
$C-CH_3$ bending vibration (asymmetrical)	1448
$C-CH_3$ bending vibration (symmetrical)	1372

ลักษณะของ spectrum ที่กล่าวมานี้เหมือนกัน product ที่ได้จากการ hydrolyse acetate ของสาร ข. และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ standard spectrum ของ lupeol[20] ปรากฏว่า identical กันทุกประการ

5.2 การตรวจหา functional group

ตรวจหา functional group ตาม standard method[22] ปรากฏว่าสาร ข. นี้ทำปฏิกิริยา bromine และทำ derivative กับ acetic anhydride และ benzoyl chloride ได้ นอกจากนั้น ยังให้สีกับ acid iron reagent เช่นเดียวกับ unsaturated steroids[3]

5.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์

ก. Acetylation

ใช้สาร ข. 200 มิลลิกรัม pyridine จำนวนเล็กน้อย และ acetic anhydride 10 หยด ปิดจุก เขย่าอย่างแรง ไม่ reflux แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมน้ำจำนวนเล็กน้อยลงใน acetylated product แล้วกรองออก ล้างด้วยน้ำจนหมด pyridine หลังจากตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศแล้ว เอาไปตกผลึกหลาย ๆ ครั้งใน ethyl alcohol จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 216–217°C หนัก 195 มิลลิกรัม มาตรวจการวิเคราะห์ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอน และไฮโดรเจน มีดังนี้

C = 82.16 %, H = 11.23 %

และจากการคำนวณสำหรับ lupeol acetate ($C_{32}H_{52}O_2$)

C = 81.99 %, H = 11.18 %

เมื่อเอา acetate ของสาร ข. ไปทำ mixed melting point กับ lupeol acetate ปรากฏว่า melting point คงที่

Infra-red spectrum[2],[16],[17] ของ acetate ของสาร ข. เป็นดังนี้ (ภาพหน้า 34)

Groups	Bands, cm^{-1}
Disappearance of OH stretching vibrations at 3340,1100 cm^{-1}	
C=O stretching vibration of ester	1725
C-O stretching vibration of acetate	1238
C=C stretching vibration of non-conjogated	1632
CH stretching vibration of $CR_1R_2 = CH_2$	3055
$-CH_2-$ stretching vibration	2922,2859
$C-CH_3$ bending vibration (asymmetrical)	1445
$C-CH_3$ bending vibration (symmetrical)	1370

ข. Hydrolysis ของ acetate ของสาร ข.

ใช้ acetate ของสาร ข. 200 มิลลิกรัม ละลายใน benzene 10ml. เติม KOH 1 กรัม ซึ่งละลายอยู่ใน methyl alcohol 10–15 มิลลิลิตร แล้ว reflux บน water-bath เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เท hydrolysed productลงในน้ำเย็น กรองเอาตะกอนออก ล้างจนเป็นกลางแล้วตกผลึกใน acetone/methanol (1:1) ได้ผลึกรูปเข็มไม่มีสี มีจุดหลอมเหลวคงที่ที่ 212–214°C หนัก 125 มิลลิกรัม

ค. Benzoylation

ใช้สาร ข. 200 มิลลิกรัม pyridine จำนวนเล็กน้อย และ benzoyl chloride1 มิลลิลิตร นำเอา benzoylation product ไปตกผลึกใน chloroform /methanol(1:2) จะได้ผลึกลักษณะเป็น plate สีขาว มีจุดหลอมเหลวคงที่ที่ 255–257°C หนัก 180 มิลลิกรัม ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจน มีดังนี้

C = 83.59 %, H = 10.17 %

และจากการคำนวณสำหรับ lupeol benzoate ($C_{37}H_{54}O_2$)

C = 83.36 %, H = 10.31 %

Infra-red spectrum[2],[16],[17] ของ benzoate ของสาร ข. เป็นดังนี้ (ภาคผนวก 34)

Groups	Bands, cm^{-1}
Disappearance of OH stretching vibrations at 3340,1100 cm^{-1}	
C=O stretching vibration of ester	1704
C-O stretching vibration of benzoate	1271,1102
C=C stretching vibration of non-conjugated	1631
C=C stretching vibration of phenyl conjugated	1593,1577
CH stretching vibration of $CR_1R_2 = CH_2$	3050
$-CH_2-$ stretching vibration	2930,2860
$C-CH_3$ bending vibration (asymmetrical)	1444
$C-CH_3$ bending vibration (symmetrical)	1372

5.4 Hydrogenation[11]

ก. Hydrogenation ของ acetate ของสาร ข.

ใช้ Adam's platinum oxide 30 มิลลิกรัม และ glacial acetic acid 15 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ต่อ reaction flask นี้เข้ากับเครื่อง hydrogenator ผ่าน hydrogen ประมาณ 2 ชั่วโมง จนระดับของ hydrogen คงที่ แล้วเติม acetate ของสาร ข. หนัก 460 มิลลิกรัม ลงใน reaction flask ดังกล่าว ทำการ hydrogenate ที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนระดับระดับของ hydrogen คงที่ hydrogen ที่ถูกใช้ประมาณ 32.5 มิลลิลิตร (theoretical used 24.6 มิลลิลิตร) กรองเอา catalyst ออก แล้วเติมน้ำจำนวนเล็กน้อยลงใน filtrate สารที่ถูก hydrolyse จะตกตะกอนออกมา กรองแล้วเอาไปตกผลึกใน ethyl alcohol หลาย ๆ ครั้ง จะได้ผลึกรูป triangular plate สีขาว มีจุดหลอมเหลวคงที่ ที่ 245-246°C หนัก 370 มิลลิกรัม และผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอน และไฮโดรเจน มีดังนี้

C = 81.67 %, H = 11.60 %

และจากการคำนวณสำหรับ luparol acetate ($C_{32}H_{54}O$)

C = 81.60 %, H = 11.60 %

5. Hydrolysis ของ hydrogenated product ของ acetate ของสาร ข.

ใช้ hydrogenated product ของ acetate ของสาร ข. 350 มิลลิกรัม ละลายใน benzene 20 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม potassium hydroxide 2 กรัม ซึ่งละลายอยู่ใน methyl alcohol 15–20 มิลลิลิตร ลงใน reaction flask reflux ใน water-bath เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เท hydrolysed product ลงในน้ำเย็น กรองตะกอนขาว ล้างจนเป็นกลาง นำเอาไปตกผลึกใน ethyl alcohol หลาย ๆ ครั้ง จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลวตั้งแต่ 201–202 °C หนัก 290 มิลลิกรัม ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอน และไฮโดรเจน มีดังนี้

$$C = 83.86\ \%,\ H = 12.42\ \%$$

และจากการคำนวณสำหรับ lupanol ($C_{30}H_{52}O$)

$$C = 84.00\ \%,\ H = 12.20\ \%$$

6. การหาสูตรโครงสร้างของสาร ค.

6.1 การตรวจคุณสมบัติทางกายภาพ

สาร ค. มีลักษณะเป็นเกล็ดเป็นแผ่น ๆ สีขาว มีจุดหลอมเหลว 168–169 °C ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีใน organic solvent ทุกชนิด เมื่อทดลองทำ Lieberman -Burchard Test จะให้สีแดง แล้วเปลี่ยนไปเป็น สีน้ำตาล–เขียว–เขียวขี้ม้า อย่างรวดเร็ว และเมื่อตั้งทิ้งไว้จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อนำไปตรวจหาธาตุโดยวิธี Lassaigne's Test[24] ปรากฏว่าไม่มีธาตุอื่นเลย นอกจากคาร์บอนและไฮโดรเจน ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจน มีดังนี้

$$C = 84.51\ \%,\ H = 11.77\ \%$$

และจากการคำนวณสำหรับ stigmasterol ($C_{29}H_{48}O$)

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

Infra-red spectrum ของสาร ก.เป็นดังนี้ (ภาพหน้า 35)[2],[16],[17]

Groups	Bands.cm^{-1}
Polymeric association of OH stretching vibration	3330
C-OH stretching vibration of equatorial secondary cyclic alcohol	1050
CH stretching vibration of -CH = CH- (trans.)	962
$-CH_2-$ stretching vibration	2920,2854
$C-CH_3$ bending vibration (asymmetrical)	1450
$C-CH_3$ bending vibration (symmetrical)	1372

ลักษณะของ spectrum ที่กล่าวนี้ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ standard spectrum ของ stigmasterol[21] ปรากฏว่า identical กันทุกประการ

6.2 การตรวจหา functional group

ตรวจหา functional group ตาม standard method[22] ปรากฏว่า สาร ก.มีหมู่ที่ของ bromine และมี derivative กับacetic anhydride และbenzoyl chloride ได้

ทดสอบ unsaturated steroids[3]

ละลายสาร ก.0.1 มิลลิกรัม ในacetic acid จำนวนเล็กน้อย เติม ferric chloride solution 2-3 หยด จะได้สีชมพู และเมื่อเติมconc.H_2SO_4 ลงไป 1-2 หยด สีชมพูจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม

6.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์

ก. Acetylation

ใช้สาร ก.10 มิลลิกรัม pyridine จำนวนเล็กน้อย และ acetic anhydride 5 หยด นำไปทำ acetylation product ไปตกผลึกใน chloroform/ ethanol (1:3) ได้ผลึกเป็นแผ่น ๆ สีขาว มีจุดหลอมเหลวคงที่ที่ 143-144°C น้ำหนัก 85 มิลลิกรัม ผลของการวิเคราะห์ธาตุเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอน และไฮโดรเจน มีดังนี้

C = 83.87 %, H = 10.13 %

และจากการคำนวณสำหรับ stigmasteryl benzoate

C = 83.66 %, H = 10.10 %

Infra-red spectrum (2),(16),(17) ของ acetate ของสาร ค.เป็นดังนี้ (ภาพหน้า 35)

Groups	Bends, cm^{-1}
Disappearance of OH stretching vibrations at 3330,1050cm^{-1}	
C=O stretching vibration of ester	1721
C-O- stretching vibration of acetate	1251
CH stretching vibration of -CH = CH- (trans.)	962
$-CH_2-$ stretching vibration	2921,2848
$C-CH_3$ bending vibration (asymmetrical)	1449
$C-CH_3$ bending vibration (symmetrical)	1362

ข. <u>Benzoylation</u>

ใช้สาร ค.100 มิลลิกรัมpyridine จำนวนเล็กน้อย และ benzoyl chloride 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำเอา benzoylation product ไปตกผลึกใน chloroform/methanol (1:3) จะได้ผลึกเป็นแผ่น ๆ สีขาว มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 165-166°C หนัก 72 มิลลิกรัม ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์ของคาร์บอน และไฮโดรเจน มีดังนี้

C = 83.87 %, H = 10.13 %

และจากการคำนวณสำหรับ stigmasteryl benzoate ($C_{36}H_{52}O_2$)

C = 83.66 %, H = 10.10 %

Infra-red Spectrum[2],[16],[17] ของ benzoate ของสาร ค. เป็นดังนี้ (ภาพหน้า 35)

Groups		Bands.cm^{-1}
Disappearance of OH stretching vibrations at 3330,1050 cm^{-1}		
C=O	stretching vibration of ester	1708
C-O-	stretching vibration of benzoate	1267,1102
C=C	stretching vibration of phenyl conjugated	1592
CH	stretching vibration of -CH=CH- (trans.)	968
$-CH_2-$	stretching vibration	2940,2849
$C-CH_3$	bending vibration (asymmetrical)	1448
$C-CH_3$	bending vibration (symmetrical)	1375

6.4 <u>Oxidation</u> โดย Oppenauer Method[18]

ละลายสาร ค. 300 มิลลิกรัม ด้วย dry toluene 30 มิลลิลิตร ในขวดสองคอ เติม cyclohexane ที่กลั่นใหม่ ๆ 3 มิลลิลิตร จากขวดสองคอ ซึ่งใช้เป็น reaction flask คอหนึ่งต่อกับ dropping funnel ซึ่งตอนปลายมี calcium chloride tube ต่ออยู่ ส่วนอีกคอหนึ่งต่อกับ condenser สำหรับกลั่นและที่ adapter มี calcium chloride tube ต่ออยู่เช่นเดียวกัน เมื่อกลั่น distillate ได้ประมาณ 10 มิลลิลิตร ลดอุณหภูมิ เพื่อให้อัตราการกลั่นลดลง ในขณะเดียวกันค่อย ๆ หยดสารละลาย aluminium iso-propoxide 0.3 กรัม ใน dry toluene 10 มิลลิลิตร ลงไปทีละหยด ให้หมดในเวลา $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ค่อย ๆ ทำให้ reaction flask เย็นลง เติมสารละลายเข้มข้นของ Rochelle salt (sodium potassium tartrate) 3 มิลลิลิตร แล้วผ่าน steam เข้าไปใน reaction flask เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อไล่ volatile matter ออกไป ทำให้เย็น extract ด้วย chloroform ล้าง chloroform layer ด้วยน้ำ แล้ว dry ด้วย anhydrous sodium sulphate กรอง filtrate ออกมาระเหยจนแห้ง นำเอาส่วนที่เหลือไปตกผลึกใน acetone/methanol (1:2) ผลที่สุดจะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลวคงที่ ที่ 127-128°C หนัก 230 มิลลิกรัม ผลของการหาเปอร์เซนต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจน มีดังนี้

C = 84.83 %, H= 11.23 %

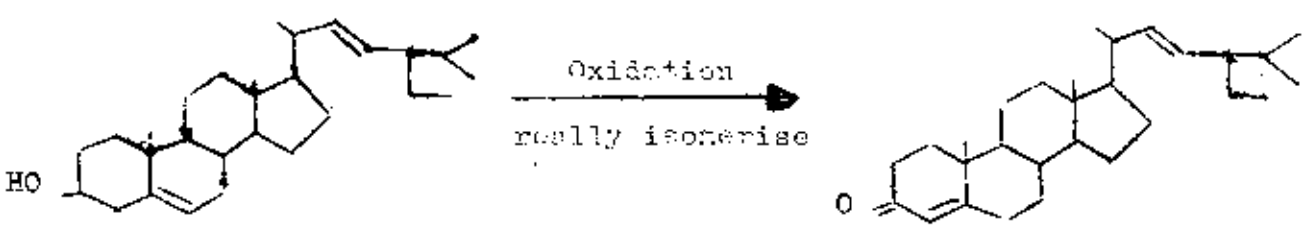
และจากการคำนวณสำหรับ Stigmastadienone ($C_{29}H_{46}O$)

C = 84.81 %, H = 11.29 %

Infra-red spectrum (2),(16),(17) ของ oxidation product ของสาร ก.เป็นดังนี้(ภาพหน้า 36)

Groups	Bands.cm^{-1}
Disappearance of OH stretching vibrations at 3330,1050cm^{-1}	
C=O stretching vibration of α,β- unsaturated ketone, -CH=CH-CO-	1680
C=O and C=C conjugated stretching vibration	1622
CH stretching vibration of -CH = CH- (trans.)	962
$-CH_2-$ stretching vibration	2929,2859
$C-CH_3$ bending vibration (asymmetrical)	1462
$C-CH_3$ bending vibration (symmetrical)	1379

การที่เกิดมี conjugated double bond ขึ้น เนื่องจากเกิด really isomerise โดย traces ของ $H_3O^{\oplus}$ หรือ $OH^{\ominus}$ ดังนี้



7. การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร ง.

7.1 การตรวจสอบเบื้องต้นทางกายภาพ

สาร ง.เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 137–138 °C ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีใน organic solvent ทุกชนิด เมื่อทดลองทำ Liebermann-Burchard Test จะให้สีแดง แล้วเปลี่ยนไปเป็น ม่วง–น้ำเงิน–เขียว อย่างรวดเร็ว

และเมื่อตั้งทิ้งไว้ จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อนำไปตรวจหาธาตุโดยวิธี Lassaigne's Test[24] ปรากฏว่าไม่มีธาตุอื่น นอกจากคาร์บอนและไฮโดรเจน และผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจน มีดังนี้

$$C = 83.69\ \%,\ H = 12.11\ \%$$

และจากการคำนวณสำหรับ β-sitosterol ($C_{29}H_{50}O$)

$$C = 83.96\ \%,\ H = 12.15\ \%$$

7.2 <u>การตรวจหา functional group</u>

ตรวจหา functional group ตาม standard method[22] ปรากฏว่า สาร ง. นี้ฟอกสีของ bromine และทำ derivative กับ acetic anhydride และ benzoyl chloride ได้ เมื่อทดสอบ unsaturated steroids[3] ตามวิธีที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 6.2 ปรากฏว่าให้ positive test

7.3 <u>การสังเคราะห์อนุพันธ์</u>

ก. <u>Acetylation</u>

ใช้สาร ง. 200 มิลลิกรัม pyridine จำนวนเล็กน้อย และ acetic anhydride 10 มล. นำเอา acetylation product ไปตกผลึกใน chloroform/methanol (2:1) จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลวคงที่ที่ 127–128 °C หนัก 145 มิลลิกรัม ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจน มีดังนี้

$$C = 81.75\ \%,\ H = 11.37\ \%$$

และจากการคำนวณสำหรับ β - sitosteryl acetate ($C_{31}H_{52}O_2$)

$$C = 81.52\ \%,\ H = 11.47\ \%$$

ข. <u>Benzoylation</u>

ใช้สาร ง. 200 มิลลิกรัม pyridine จำนวนเล็กน้อย และ benzoyl chloride 1 มิลลิลิตร นำเอา benzoylation product ไปตกผลึกใน chloroform/methanol (1:2) จะได้ผลึกรูปเกล็ดเงินผืนผ้าสีขาว มีจุดหลอมเหลวคงที่ที่ 143–144 °C หนัก 172 มิลลิกรัม ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจน มีดังนี้

C = 83.25 %, H = 10.24 %

และจากการคำนวณสำหรับ β-sitosteryl benzoate ($C_{36}H_{54}O_2$)

C = 83.34 %, H = 10.49 %

7.4 Infra-red Spectra

เนื่องจาก infra-red spectrum ของสาร ง. แสดงถึง broad band absorption มี maximum ที่ 3400 cm^{-1} (Polymeric association of OH stretching vibration) และ 1050 cm^{-1} (equatorial secondary cyclic alcohol) ซึ่ง identical กับของ β-sitosterol นอกจากนั้น infra-red spectra ของ acetate และ benzoate ของสาร ง. ยังแสดงถึง strong absorption peak ที่ 1727 และ 1723 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งเป็น stretching vibration ของ ester อีกด้วย

มีข้อแตกต่างอันหนึ่งก็คือ spectra ของสาร ง., acetate และ benzoate ของสารนี้ จะมี absorption peaks เพิ่มขึ้นที่ 962, 966 และ 961 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งตรงกับตำแหน่ง absorption ของ double bond ที่ side chain ของ stigmasterol ถ้าหากสาร ง. เป็น β-sitosterol ที่บริสุทธิ์แล้ว ไม่ควรจะมี absorption peaks ดังกล่าว ปรากฏใน derivatives ของสาร หรือตัวสารเอง ดังนั้น จึงนำสาร ง. มาทำ hydrogenation เพื่อให้ได้เป็น stigmastanol ซึ่งเป็น saturated compound ของทั้ง β-sitosterol และ stigmasterol และทำ oxidation เพื่อแยก ketones ของ β-sitosterol และ stigmasterol ออกจากกัน

7.5 Hydrogenation

ใช้ Adam's platinum oxide 60 มิลลิกรัม และ glacial acetic acid 20 มิลลิกรัม ใส่ใน flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ต่อ reaction flask เข้ากับเครื่อง hydrogenator ผ่าน hydrogen ประมาณ 2 ชั่วโมง จนระดับของ hydrogen คงที่ hydrogen ที่ถูกใช้ไปประมาณ 38.5 มิลลิลิตร (theoretical used 26.9 มิลลิลิตร) กรอง catalyst ออก เติมน้ำจำนวนเล็กน้อยลงใน filtrate แล้ว

extract ออกด้วย ether ล้าง etherial extract ด้วย sodium bicarbonate solution จนหมดกรด แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดด่าง ระเหย ether จนแห้ง นำไปตกผลึกใน ethyl alcohol จนจุดหลอมเหลวลงที่ที่ 144–146°C หนัก 325 มิลลิกรัม

นำสารนี้ไป run infra-red spectrum ปรากฏว่า spectrum จะ identical กับ spectrum ของ commercial β-sitosterol ซึ่ง hydrogenate มาด้วย condition เดียวกัน และ absorption peak ของสาร ง.ที่ 970–960 cm^{-1} ก็หายไปด้วย

7.6 <u>Oxidation</u>

ใช้สาร ง.300 มิลลิกรัม ทำ oxidation โดย Oppenauer Method ดังอธิบายไว้ในหัวข้อ 6.4 นำเอา oxidation product ไปตกผลึกใน acetone/methanol (1:2) จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว ซึ่งเมื่อเอาไปตกผลึกอีกหลาย ๆ ครั้ง จะได้จุดหลอมเหลวลงที่ ที่ 127–128°C หนัก 75 มิลลิกรัม ส่วน mother liquor ระเหย solvent จนแห้ง แล้วตกผลึกใน methanol ที่อุณหภูมิ −5°C จะได้ amorphous crystal สีขาว หนัก 135 มิลลิกรัม มีจุดหลอมเหลวลงที่ ที่ 84–85°C

นำสารที่มีจุดหลอมเหลว 127–128°C และ 84.85 °C ไป run infra-red spectrum ปรากฏว่า สารที่มีจุดหลอมเหลว 127–128°C จะมี spectrum identical กับของ stigmastadienone ส่วนสารที่มีจุดหลอมเหลว 84–85°C จะมี spectrum identical กับของ commercial β-sitosterol ซึ่ง oxidise มาด้วย condition เดียวกัน และ absorption peak ที่ 970–960 cm^{-1} ก็หายไปด้วย

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

สารที่ได้จากการสกัดใบสารพัดพิษแห้งด้วย petroleum ether แล้วนำสิ่งที่สกัดได้มาแยกโดย column chromatography ได้พบ known compounds 4 ชนิดด้วยกัน และยังไม่ทราบว่า สารที่สกัดได้ตัวใดตัวหนึ่งนั้น จะเป็น active principle ของต้นไม้ชนิดนี้ ซึ่งจะใช้ป้องกันพิษสัตว์ร้ายต่าง ๆ โดยเฉพาะพิษงูได้หรือไม่ การที่เป็นเช่นนี้ น่าจะคิดไปได้เป็น 2 ประการ คือ ประการแรก ไม่ได้มี active principle ดังคำบอกเล่าจริง เป็นแต่เพียงความเชื่อถือที่ไม่มีมูลเท่านั้น ประการที่สอง อาจจะเป็นเพราะว่าวิธีการที่ใช้ในการสกัดนั้นไม่ได้อยู่ใน condition เดียวกับเวลาที่ใช้ในการแก้พิษงู คือเวลาที่ใช้จริง ๆ ใช้ในไม้สด ๆ ตำผสมกับเหล้าโรง แต่ในการทดลองนี้ใช้ใบไม้แห้งมาสกัดสารออกด้วย petroleum ether ซึ่งการนำมาผึ่งแดดจนแห้งแล้วจึงสกัดสารออกนั้น อาจจะทำให้ตัวยาสลายไปหมดหรือสารตัวยานั้นอาจจะไม่ออกมากับ petroleum ether ที่ใช้สกัดก็ได้

อย่างไรก็ตาม สารที่สกัดได้นี้ ก็น่าสนใจพอที่จะใช้ศึกษาได้ตามสมควร จึงได้ศึกษาถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารที่แยกออกมา ดังต่อไปนี้

จากการ elute column chromatography ด้วย petroleum ether ใน fraction แรก ๆ จะได้สาร $C_{30}H_{62}O$, m.p. 87-88°C (I) infra-red spectrum ของสารตัวนี้ จะแสดง broad band absorption มี maximum ที่ 3400 cm^{-1} (Polymeric association of OH stretching vibration) และ strong absorption peak ที่ 1050cm^{-1} (C-OH stretching vibration of primary alcohol) ที่ 2910,2840 cm^{-1} ($-CH_2$ - stretching vibration) และ 1467 ($-CH_2$ - bending vibration), 1458 ($C-CH_3$ asymmetrical bending vibration), 1367 ($C-CH_3$ symmetrical bending vibration) และ 727,715 cm^{-1} (rocking mode ของ CH_2 หรือ $(CH_2)n$) แสดงว่า สารตัวนี้จะต้องเป็น long chain aliphatic alcohol และการที่ไม่ปรากฏ bands ที่ 2950, 1450 และ 1380 cm^{-1} แสดงว่า -OH group จะต้องอยู่ที่ส่วนปลายของ chain และไม่มี branch chain เลย

ในการ confirm ว่า สารตัวนี้มี -OH group อยู่ด้วย จึง form acetyl และ benzoyl derivatives จะได้ acetate, $C_{32}H_{64}O_2$, m.p.74-75°C (II) และ benzoate, $C_{37}H_{66}O_2$, m.p.67-68°C(III) และเมื่อ oxidise โดยใช้ $K_2Cr_2O_7$ กับ conc. H_2SO_4 จะได้ acid, $C_{30}H_{60}O_2$, m.p. 94-95°C (IV)

จากการทดลองเหล่านี้แสดงว่า สารตัวนี้ควรจะเป็น myricyl alcohol[8][9][23] ดังนี้

$CH_3-(CH_2)_{28}-CH_2-O-OC-CH_3$ (II)
Myricyl acetate

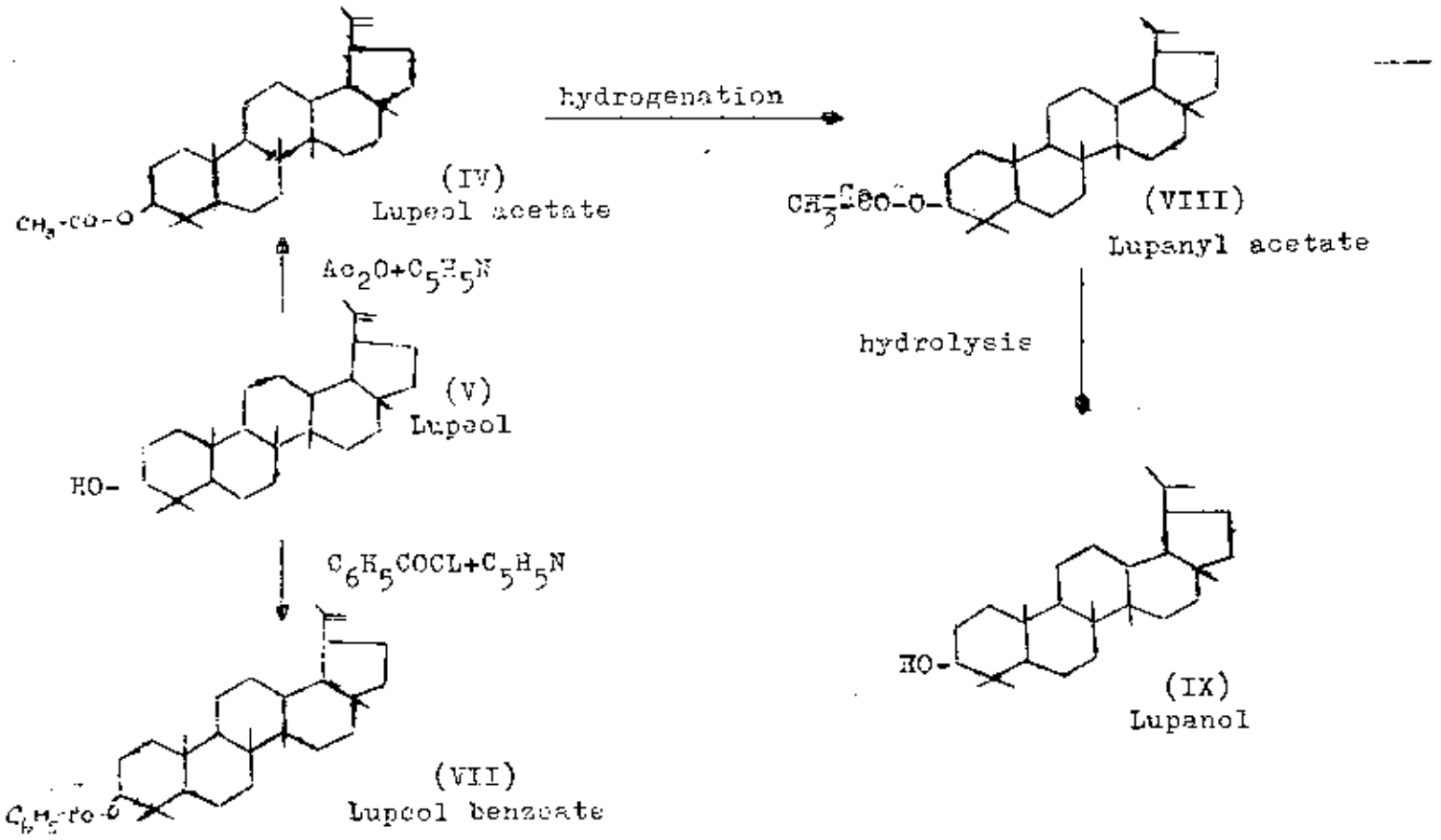
$\downarrow Ac_2O+C_5H_5N$

$CH_3-(CH_2)_{28}-CH_2-OH$ (I) $\xrightarrow{K_2Cr_2O_7+conc.H_2SO_4}$ $CH_3(CH_2)_{28}COOH$(IV)
Myricyl alcohol Myrissic acid

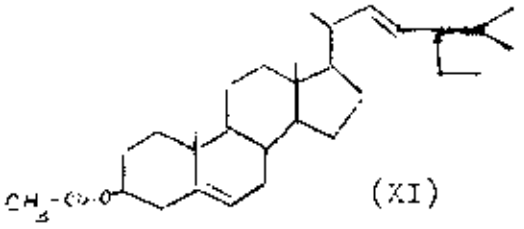
$\downarrow C_6H_5COCl + C_5H_5N$

$CH_3-(CH_2)_{28}-CH_2-O-OC-C_6H_5$ (III)
Myricyl benzoate

ในการ elute column chromatography ด้วย petroleum ether ใน fraction หลัง ๆ จะได้สาร $C_{30}H_{50}O$,m.p. 212-214 °C(V)ซึ่งมี infra-red spectrum identical กับ product ที่ได้จากการ hydrolyse acetate ของสารนี้เอง และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ standard spectrum ของ lupeol ปรากฏว่า identical กันทุกประการด้วย จึง form acetyl และ benzoyl derivatives เพื่อ confirm ว่า สารนี้ มี -OH group จะได้ acetate,$C_{32}H_{52}O$,m.p.216-217 °C (VI) และ benzoate,$C_{37}H_{54}O_2$,m.p.255-257°C (VII) นอกจากนี้ เมื่อนำ acetate ของสารนี้ไป hydrogenate จะได้ lupanyl acetate, $C_{32}H_{54}O$,m.p. 245-246°C (VIII)ซึ่งเมื่อ hydrolyse จะได้ lupanol,$C_{30}H_{52}O$,m.p. 201-202°C , (IX) ซึ่งแสดงว่าสารตัวนี้เป็น lupeol[9] จริงดังนี้

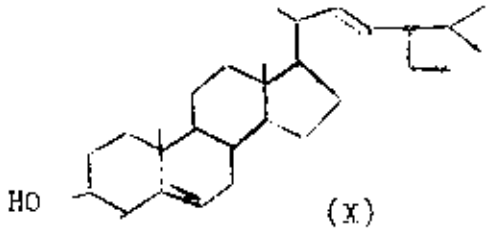


ต่อมา เมื่อ elute column chromatography ด้วย 5% ether in petroleum ether ในfraction แรก ๆ จะได้สาร $C_{29}H_{48}O$,m.p.168-169°C (X) ซึ่งมี infra-red spectrum identical กับ standard spectrum ของstigmasterol ทุกประการ ซึ่ง form acetyl และ benzoyl derivatives เพื่อ confirm ว่า สารตัวนี้ มี -OH group และเป็น stigmasterol จริง ปรากฏว่า จะได้ acetate,$C_{31}H_{50}O_2$,m.p.143-144°C (XI) และ benzoate, $C_{36}H_{52}O_2$, m.p. 165-166°C (XII) และเมื่อ Oxidise ด้วย Oppenauer method ได้ ketone, $C_{29}H_{46}O$,m.p.127-128°C (XIII) จากการทดลองเหล่านี้ แสดงว่า สารตัวนี้ คือ stigmasterol (7)(9) ดังนี้



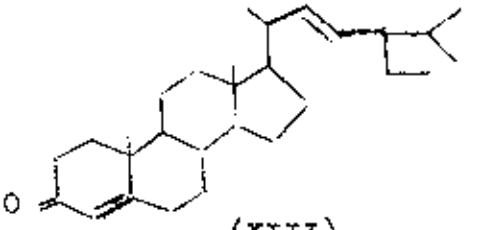
(XI)
Stigmasteryl acetate

$Ac_2O+C_5H_5N$



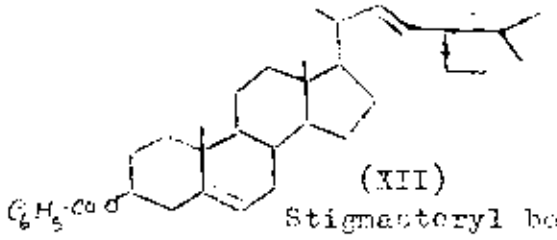
(X)
Stigmasterol

Oxidation
Oppenauer method
really isomerise



(XIII)
Stigmastadienone

$C_6H_5COCl+C_5H_5N$

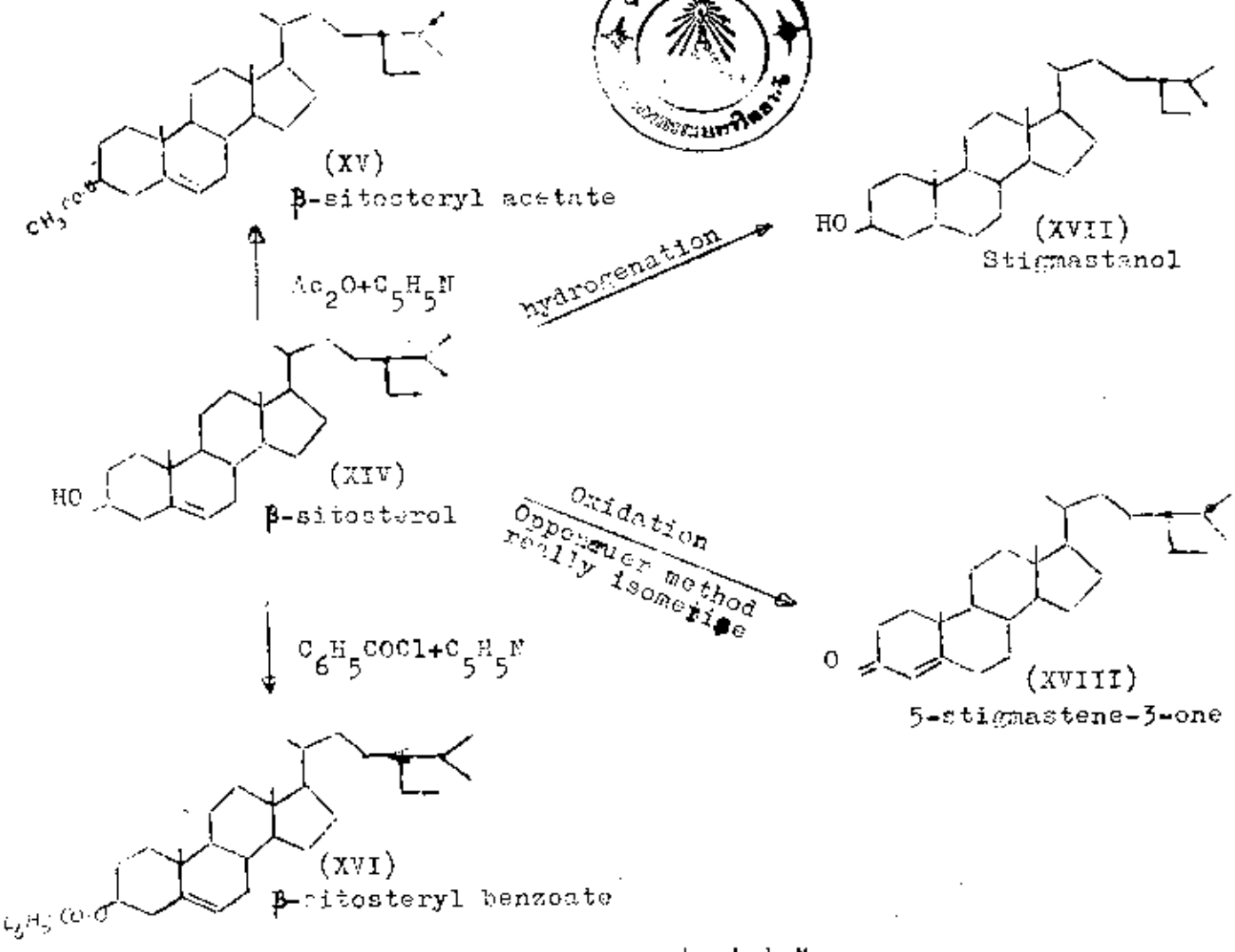


(XII)
Stigmasteryl benzoate

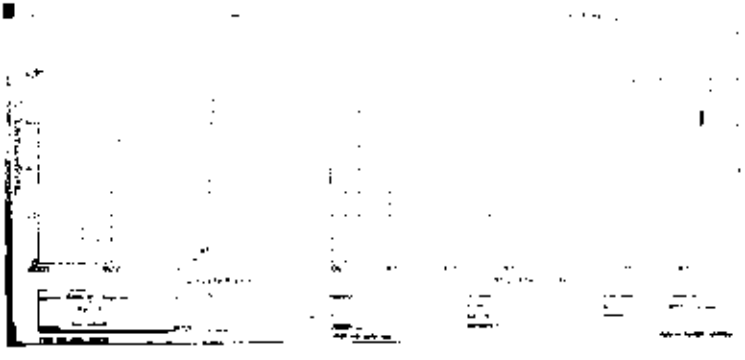
ในการ elute column chromatography ด้วย 5 % ether in petroleum ether ใน fraction หลัง ๆ จะได้สาร $C_{29}H_{50}O$, m.p.137-138 °C (XIV) ซึ่งแสดงคุณสมบัติต่าง ๆ ว่าน่าจะเป็น β-sitosterol จึง form acetyl และ benzoyl derivatives จะได้ acetate, $C_{31}H_{52}O_2$, m.p.127-128°C (XV) และ benzoate, $C_{36}H_{52}O_2$, m.p. 143-144 °C (XVI) ซึ่งเป็นลักษณะ derivatives ของ β-sitosterol เช่นเดียวกัน แต่มีข้อแตกต่างอันหนึ่งก็คือ ไม่ว่าจะเป็น infra-red spectra ของสาร acetate หรือ benzoate ของสารก็ตาม จะมี absorption peaks เพิ่มขึ้นที่ 962,966 และ 961 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งตรงกับตำแหน่ง absorption ของ double bond ที่ side chain ของ stigmasterol ถ้าหากสารนี้เป็น β-sitosterol ที่บริสุทธิ์แล้ว ไม่ควรจะมี absorption peaks ดังกล่าวปรากฏใน derivatives ของสาร หรือตัวสารเอง เพราะ β-sitosterol ที่บริสุทธิ์นั้น ไม่มี double bond ที่ side chain มีแต่ใน stigmasterol ซึ่งจัดแตกต่างของ structure ของ β-sitosterol กับ stigmasterol ก็คือ double bond ที่ side chain นี่เอง เนื่องจากในต้นไม้ที่ใช้ทดลองนี้ ปรากฏว่ามี stigmasterol อยู่ด้วย และสารทั้งสองตัวนี้ (β-sitosterol และ stigmasterol) แยกจากกันได้ยาก ดังนั้น การที่ derivatives ของสารและตัวสารเอง แสดง absorption peaks ของ double bond ที่ side chain อาจจะเป็นเพราะมี stigmasterol ปนอยู่ด้วย ซึ่งเมื่อทดลองเอา commercial β-sitosterol ปนกับ commercial stigmasterol ด้วยอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แล้วนำไป run infra-red spectra ผลปรากฏว่า แม้จะใช้ stigmasterol เพียงจำนวน traces ปนกับ β-sitosterol spectrum ก็ยังแสดง absorption peak ของ double bond ที่ side chain (970-960 cm^{-1}) อีก ดังนั้น จึงนำสารนี้มาทำ hydrogenation จะได้สาร $C_{29}H_{52}O$, m.p.144-146 °C (XVII) ซึ่งเมื่อนำไป run infra-red spectrum จะ identical กับ spectrum ของ commercial β-sitosterol ซึ่ง hydrogenate มาด้วย condition เดียวกัน และ absorption peak ของสารที่ 970-960 cm^{-1} หายไปด้วย และทดลองทำ oxidation โดย Oppenauer method เพื่อแยก β-sitosterol ออกจาก stigmasterol

จะได้ ketone, $C_{29}H_{46}O$, m.p. 127-128°C (XIII) กับ ketone, $C_{29}H_{48}O$, m.p. 84-85 °C (XVIII) ซึ่งแยกจากกันได้โดย fractional crystallization และ ketone (XIII) จะให้ spectrum identical กับ stigmastadienone ส่วน ketone (XVIII) จะให้ spectrum identical กับของ commercial β-sitosterol ซึ่ง oxidise ภายใต้ condition เดียวกัน และ absorption peak ที่ 970-960 cm^{-1} หายไปด้วย

จากการทดลองเหล่านี้ แสดงว่าสารตั้งต้นคือ β-sitosterol[9] ดังนี้



นอกจากนี้ ยังมีสารประกอบอีกชนิดหนึ่ง ที่ไม่ได้ identify มี m.p. 235-240°C ได้จากการ elute column chromatography ด้วย 10 % ether in petroleum ether ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนเล็กน้อย



p

p

p