บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

พืชตัวอย่าง

นำดอกนนทรีมาทำการทดลอง ซึ่งนนทรีนี้จะขึ้นอยู่ทั่วไป และออกดอกในราวเดือนมีนาคม - มิถุนายน ซึ่งได้เก็บดอกนนทรีมาจากหน้าตึกเคมี 3 และหน้าตึกสถาปัตยกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2537 ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลักษณะของดอกนนทรี *Peltophorum pterocarpum* ที่หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ บางเขน กรุงเทพมหานคร พบว่ามีลักษณะเหมือนกับดอกนนทรี ซึ่งมี Herbarium number 13941 หลังจากนั้นจึงนำมาตากแห้งประมาณ 2 - 3 สัปดาห์ แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของดอกนนทรีต่อไป

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

1. จุดหลอมเหลว (Melting point)

Fisher Johns Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับหาจุดหลอมเหลว

2. ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR

Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (FT - NMR) model AC - F 200 ของบริษัท Bruker ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ และ model JNM - A 500 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น สำหรับวัดโปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรา สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัด เตรียมโดยละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม - ดี ($CDCl_3$), สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ - $ดี_6$ (DMSO - d_6), สารละลายเมทานอล - ดี (MeOD) หรือสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม - ดี ($CDCl_3$) กับไดเมทิลซัลฟอกไซด์ - $ดี_6$ (DMSO - d_6) โดยน้ำหนักของสารตัวอย่างที่ใช้วัดโปรตอนสเปกตราประมาณ 10 - 20 มิลลิกรัม และประมาณ 20 - 50 มิลลิกรัม สำหรับวัดคาร์บอนสเปกตรา อุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจวัดประมาณ 25 - 30 องศาเซลเซียส

3. อินฟราเรดสเปกตรา (IR)

Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FT - IR) model IR - 400 FT 1760X ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตราของสาร สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยผสมกับโปตัสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นเม็ด (Pellet) เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร

4. Gas Chromatography (GC)

Gas Chromatography model GC - 7AG ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น สำหรับบันทึกแก๊สโครมาโทแกรม

5. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

High Performance Liquid Chromatography model LC - 3A ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น ใช้ UV detector และ RI detector

6. แมสสเปกตรา (MS)

Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GC - MS) GC model 8000 - MS model Trio 2000 ของบริษัท Fisons Instrument ประเทศอังกฤษ ใช้ Electron Impact source (EI) ซึ่งมีความต่างศักย์ 70 โวลต์ กระแส 300 ไมโครแอมป์ อุณหภูมิ 180 - 300 องศาเซลเซียส สำหรับบันทึกแมสสเปกตรา

7. Polarimeter

Polarimeter model DIP - 370 Digital polarimeter ของบริษัท Jasco ประเทศญี่ปุ่น สำหรับวัดค่า specific optical rotation

8. เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น สำหรับกลั่นสารละลาย

สารเคมี

1. ตัวทำละลาย ใช้ตัวทำละลายชั้นคุณภาพอุตสาหกรรม โดยนำมากลั่นก่อนใช้ทุกครั้งเพื่อทำให้บริสุทธิ์ ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม แอซิโตน เอทิลแอซิเตต เอทานอล และเมทานอล

2. รีเอเจนต์ที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาเคมี มีดังนี้ 2,4 - DNP, Br_2 ใน CCl_4

3. ตัวดูดซับ ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60G Art. 7734 ของบริษัท E. Merck สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี และซิลิกาเจลชนิด 60G Art. 7731 สำหรับทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี และควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

4. TLC aluminium sheets silica gel 60G F_{254} สำหรับทำทินแลเยอร์โครมาโทกราฟีของบริษัท E. Merck Damstadt

เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

1. ควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Quick Column Chromatography) (36)

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยกสารออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ก่อน เพื่อความรวดเร็ว ซึ่งสามารถที่จะนำไปแยกเป็นสารกลุ่มย่อย ๆ ด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อไป

การ pack column

ใช้ sintered glass เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร เป็นคอลัมน์ โดยนำ sintered glass วางลงบนขวดดูดซึ่งต่อกับปั๊มน้ำ โดยมีขอบยางรองรับอยู่ บรรจุซิลิกาเจล ชนิด 60G Art. 7731 ซึ่งใช้เป็นตัวดูดซับลงใน sintered glass สูงประมาณ 4 เซนติเมตร ระหว่างบรรจุซิลิกาเจลต้องเปิดปั๊มน้ำ แล้วเทตัวทำละลายลงบนผิวหน้าซิลิกาเจล เพื่อให้ตัวทำละลายไหลผ่านลงขวดดูด ซึ่งจะทำให้ซิลิกาเจลอัดตัวกันแน่นยิ่งขึ้น นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากัน ทำให้เป็นผงละเอียดโดยนำมาบดด้วยครก (motar) และกรองอีกครั้งหนึ่ง ก่อนจะบรรจุสิ่งสกัดลงในคอลัมน์ให้รองผิวหน้าซิลิกาเจลด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ที่ตัดเป็นแฉกไว้แล้ว จากนั้นจึงบรรจุสิ่งสกัดลงในคอลัมน์แล้วกดผิวหน้าให้เรียบ ชะคอลัมน์ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกสารครั้งละเท่า ๆ กัน

2. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) (37)

ขนาดของคอลัมน์แก้วที่ใช้ ขึ้นอยู่กับ ปริมาณสารที่ต้องการแยก ถ้าปริมาณสารที่ต้องการแยกมีปริมาณมาก ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้ก็จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง และความยาวของคอลัมน์มากกว่า เมื่อมีปริมาณสารที่ต้องการแยกน้อย

การ pack column

นำคอลัมน์แก้วมาอุดปลายด้านล่าง ซึ่งมีลักษณะเรียวเล็กด้วยสำลีที่สะอาด โดยใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ปลายด้านล่าง บรรจุตัวทำละลายลงไปครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ เปิดที่เปิดปิด

ด้านล่างของคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านเพื่อไล่ฟองอากาศ ผสมซิลิกาเจลชนิด 60G Art. 7734 กับตัวทำละลาย คนให้เข้ากันจนเป็น slurry เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศในคอลัมน์ ระหว่างบรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ต้องเปิดคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งเคาะคอลัมน์ไปเบา ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลเรียงตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เมื่อบรรจุซิลิกาเจลแล้วก็ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเหลือประมาณ 3 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าซิลิกาเจล จึงปิดที่เปิดปิดด้านล่างของคอลัมน์ นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วน แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ช้า ๆ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปรับบริเวณผิวหน้าให้เรียบ ฉีดล้างด้านในคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นปล่อยให้ระดับของสารละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจล แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารต่อไป

3. <u>ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี</u> (Thin Layer Chromatography , TLC) (38)

โครมาโทเพลท (chromatoplate) ที่ใช้เป็นชนิด TLC aluminium sheets silica gel 60G F_{254} หนา 0.2 มิลลิเมตร ของบริษัท E. Merck Damstadt

การเตรียมภาชนะสำหรับ develope ใช้ขวดแก้วสะอาดที่มีฝาปิด ขนาดใหญ่พอใส่โครมาโทเพลทได้ จากนั้นนำกระดาษกรองมาใส่ลงในขวดแก้ว โดยให้กระดาษกรองทาบผิวด้านในขวด แล้วเติมตัวทำละลายลงในขวดให้สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาขวด เพื่อให้ในขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

การแต้มสาร ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 0.05 เซนติเมตร แต้มสารที่ต้องการตรวจสอบลงบนโครมาโทเพลท โดยให้จุดเริ่มต้นห่างกันไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร และห่างจากขอบล่างประมาณ 2 เซนติเมตร ด้านบนขีด solvent front ไว้ รอจนกว่าจุดที่แต้มสารแห้งสนิท จึงนำไป develope

การ develope จุ่มโครมาโทเพลทที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิดฝา ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึงขีด solvent front แล้วจึงนำโครมาโทเพลทออกจากขวดแก้ว โดยปล่อยทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยไปจนหมด จึงนำไปตรวจสอบหาตำแหน่งของสารต่อไป

การตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยสามารถใช้แสงอัลตราไวโอเลต หรือ ไอโอดีน การใช้ไอโอดีนเป็นตัวตรวจสอบ ทำได้โดยนำโครมาโทเพลทที่ develope แล้วใส่ในขวดที่มีเกล็ดไอโอดีน ปิดฝาขวดให้สนิท ปล่อยจนกระทั่งบริเวณที่มีสารเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้น

4. การกลั่น (Distillation)

การกลั่น เป็นการแยกตัวทำละลายที่มากเกินพอออกจากสารละลาย การกลั่นมี 2 แบบ ได้แก่ การกลั่นแบบธรรมดา และการกลั่นแบบลดความดัน โดยพิจารณาจากจุดเดือดของตัวทำละลาย ถ้าตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ ก็จะใช้การกลั่นแบบธรรมดา เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม แต่ถ้าตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูงและมีขั้ว ก็จะใช้การกลั่นแบบลดความดัน เช่น เมทานอล ทั้งนี้เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารที่สกัดออกมา โดยตัวทำละลายจะเดือดก่อนถึงจุดเดือด เพราะการกลั่นแบบลดความดันจะใช้ความร้อนต่ำกว่าการกลั่นแบบธรรมดาเมื่อตัวทำละลายเป็นชนิดเดียวกัน เครื่องมือที่ใช้ในการกลั่นแบบนี้ เรียกว่า เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator)

การทดสอบทางปฏิกิริยาเคมี

1. การทดสอบสเตอรอยด์ และไตรเทอร์ปีนอยด์ (ทดสอบด้วยปฏิกิริยา Liebermann - Burchard) (39)

ละลายสารประมาณ 1 มิลลิกรัม ในคลอโรฟอร์มจำนวนเล็กน้อย หยดแอซิติกแอนไฮไดรด์ 2 - 3 หยด เขย่า หยด conc. H_2SO_4 1 หยด โดยภายใน 1 ชั่วโมง ถ้าสีเปลี่ยนจาก ชมพู ⟶ ม่วง ⟶ น้ำเงิน ⟶ เขียว แสดงว่าเป็นสเตอรอยด์ แต่ถ้าเป็นไตรเทอร์ปีนอยด์ สีจะเปลี่ยนจาก ชมพู ⟶ ม่วง

2. การทดสอบหมู่คาร์บอนิล (40)

นำสารประมาณ 1 มิลลิกรัม มาละลายในเอทานอล 0.5 มิลลิลิตร เติม 2,4 - DNP 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ ถ้าเป็นสารที่มีหมู่คาร์บอนิลอยู่ในโมเลกุลจะได้ตะกอนสีเหลือง

3. การทดสอบความไม่อิ่มตัว (40)

นำสารประมาณ 1 มิลลิกรัม มาละลายใน CCl_4 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 3% Br_2 ใน CCl_4 ทีละหยด เขย่าทุกครั้ง ถ้าสารที่มีพันธะที่ไม่อิ่มตัวอยู่ในโมเลกุล สีของ Br_2 จะจางหายไป และไม่มีแก๊สไฮโดรเจนโบรไมด์เกิดขึ้น

I16185651

การเตรียมอนุพันธ์ของสารที่สกัดได้

เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้ หรือเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่แทนที่บางหมู่ของสารบริสุทธิ์ให้ง่ายต่อการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร

1. การไฮโดรไลส์ไกลโคไซด์ด้วยกรด (acid hydrolysis of glycoside) (41)

นำสารประกอบไกลโคไซด์ หนัก 0.20 กรัม มาเติม 10 % HCl ในเอทานอล จำนวน 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปรีฟลักซ์บนเครื่องอังไอน้ำเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่โดยการทำทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว นำสารละลายมากลั่นไล่ตัวทำละลายออกโดยการกลั่นแบบลดความดัน จากนั้นนำสารที่ได้ไปแขวนลอยในน้ำ แล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ได้ aglycone ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์ และ glycone ในชั้นน้ำ

การศึกษาส่วน aglycone

นำสารละลาย aglycone ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์มากำจัดน้ำออกด้วย anhydrous Na_2SO_4 จากนั้นนำมากรอง และระเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทนผสมกับเฮกเซนได้ผลึกรูปเข็มสีขาว

การศึกษาส่วน glycone

หลังจากแยก aglycone ซึ่งได้จากการไฮโดรไลส์ด้วยกรดออกแล้ว เติมซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) กรองตะกอนสีขาวออก จะได้สารละลายซึ่งเป็นส่วนของน้ำตาล นำสารละลายที่เหลือมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน

นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งได้ฉีดสารละลายที่ได้เทียบกับสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลที่พบมากในสารจำพวกไกลโคไซด์ เช่น glucose, galactose, arabinose, xylose, sucrose และ rhamnose ซึ่งจะดูที่ค่า retention time แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

การสกัด

ทำการสกัดดอกนนทรีที่ตากแห้งด้วยตัวทำละลายต่อไปนี้ คือ เฮกเซน และเมทานอล ตามลำดับ การที่ใช้เฮกเซนทำการสกัดก่อน เนื่องจากดอกนนทรีนี้จะมีไข (wax) อยู่มาก ซึ่งเป็นสารชนิดไม่มีขั้ว (non - polar compound) ดังนั้นจึงใช้เฮกเซนซึ่งเป็นสารละลายที่ไม่มีขั้ว (non - polar solvent) สกัดเอาสารชนิดที่ไม่มีขั้วออกไปก่อน ขั้นตอนการสกัดดังแผนภาพที่ 2.1

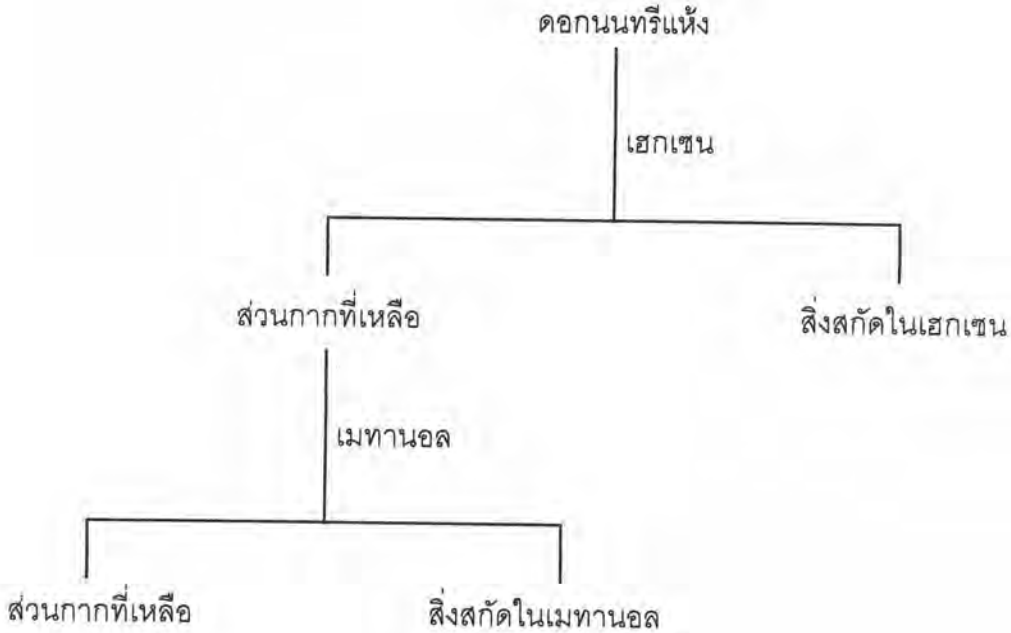
1. การสกัดด้วยเฮกเซน

นำดอกนนทรีที่ตากแห้ง หนัก 5.1 กิโลกรัม สกัดด้วยเฮกเซน โดยแช่เฮกเซนที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 - 5 วัน แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากรองและกลั่นแยกเฮกเซนออกจนเกือบหมด นำเฮกเซนที่กลั่นแยกได้มาสกัดดอกนนทรีอีก ทำเช่นนี้ซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายเฮกเซนที่กรองออกมาได้ไม่มีสีจึงหยุดสกัด จะได้สิ่งสกัด (crude) ในเฮกเซน (Fraction I) มีลักษณะเป็นของแข็งสีส้มเหลืองหนัก 72.80 กรัม (1.43 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก) จากนั้นจึงนำดอกนนทรีที่ถูกสกัดด้วยเฮกเซนไปสกัดด้วยเมทานอลต่อไป

2. การสกัดด้วยเมทานอล

นำดอกนนทรีที่สกัดด้วยเฮกเซนแล้ว มาสกัดต่อด้วยเมทานอล ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จะได้สิ่งสกัดในเมทานอล (Fraction II) มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำ หนัก 652.45 กรัม (12.79 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก)

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดดอกนนทรีแห้ง



ตารางที่ 2 แสดงผลของสิ่งสกัดที่สกัดได้จากดอกนนทรี

น้ำหนักของดอกนนทรี (กก.)	น้ำหนักและเปอร์เซ็นต์ yield (% น้ำหนักโดยน้ำหนัก)	
	สิ่งสกัดในเฮกเซน	สิ่งสกัดในเมทานอล
5.1	มีลักษณะเป็นของแข็งสีส้มเหลือง หนักเท่ากับ 72.80 กรัม (1.43 %)	มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลดำหนักเท่ากับ 652.45 กรัม (12.79 %)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดเฮกเซน

1. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสิ่งสกัดในเฮกเซนหนัก 70.57 กรัม (Fraction I) มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 780.24 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามาก คือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับคลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 1000 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10 - 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วน (fraction) มาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ และวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซนแสดงไว้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ใช้คอลัมน์ 6.6 x 140 เซนติเมตร)

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$F_1$1	เฮกเซน	1 - 2	ของแข็งสีขาว	7.67
$F_1$2	เฮกเซน	3 - 7	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลืองอ่อน	5.67
$F_1$3	เฮกเซน	8 - 18	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลืองอ่อน	8.35
$F_1$4	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (1 : 9 และ 2 : 8)	19 - 22	ของแข็งในน้ำมันสีเหลืองส้ม	1.62
$F_1$5	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (3 : 7)	23 - 25	ของแข็งในน้ำมันสีเหลือง	2.97
$F_1$6	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (3 : 7)	26 - 33	ของแข็งในน้ำมันสีเหลือง	4.06

ตารางที่ 3 แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$F_1$7	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (3 : 7)	34 - 38	ของแข็งในน้ำมันสีส้มเหลือง	1.21
$F_1$8	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (4 : 6 และ 1 : 1)	39 - 50	ของแข็งในน้ำมันสีส้มเหลือง	1.95
$F_1$9	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (6 : 4 , 7 : 3 และ 8 : 2)	51 - 67	ของแข็งในน้ำมันสีส้มเหลือง	6.36
$F_1$10	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (8 : 2) และ คลอโรฟอร์ม	68 - 77	ของแข็งในน้ำมันสีส้มเหลือง	2.12
$F_1$11	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (2 : 98)	78 - 80	น้ำมันสีน้ำตาล	3.24
$F_1$12	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (2 : 98)	81 - 84	ของแข็งเล็กน้อยในน้ำมันสีเหลือง	1.81
$F_1$13	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (5 : 95)	85 - 86	ของแข็งเล็กน้อยในน้ำมันสีน้ำตาล	3.01
$F_1$14	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (1 : 9)	87 - 90	ของแข็งเล็กน้อยในน้ำมันสีน้ำตาล	2.79
$F_1$15	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (3 : 7 , 4 : 6) และ เมทานอล	91 - 97	ของแข็งเล็กน้อยในน้ำมันสีน้ำตาล	1.61

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดเมทานอล

1. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอล โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสิ่งสกัดในเมทานอลหนัก 101.78 กรัม (Fraction II) มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจลหนัก 460.52 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามาก คือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับคลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 1000 มิลลิลิตร นำแต่ละส่วนที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10 - 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วน (fraction) มาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ และวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอลแสดงไว้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอล โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ใช้คอลัมน์ 5.1 x 170 เซนติเมตร)

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$F_2$1	เฮกเซน	1	น้ำมันสีน้ำตาล	0.13
$F_2$2	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (1 : 9)	2 - 6	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.10
$F_2$3	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (2 : 8 และ 4 : 6)	7 - 12	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	1.18
$F_2$4	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (4 : 6)	13 - 21	น้ำมันสีส้มแดง	1.77
$F_2$5	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (4 : 6)	22 - 30	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีแดง	2.55

ตารางที่ 4 แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอล โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$F_2$6	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (4 : 6)	31 - 110	ผลึกเข็มในน้ำมันสีแดง	4.02
$F_2$7	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (4 : 6 และ 1 : 1)	111 - 150	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีแดง	2.82
$F_2$8	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (6 : 4 และ 8 : 2)	151 - 176	ของแข็งในน้ำมันสีเขียว	3.58
$F_2$9	คลอโรฟอร์ม : เฮกเซน (8 : 2)	177 - 179	ของแข็งในน้ำมันสีน้ำตาล	2.78
$F_2$10	คลอโรฟอร์ม	180 - 189	ของแข็งในน้ำมันสีน้ำตาล	0.65
$F_2$11	คลอโรฟอร์ม	190 - 193	น้ำมันสีเขียวดำ	3.20
$F_2$12	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (2 : 98)	194 - 196	ของแข็งในน้ำมันสีเขียว	0.54
$F_2$13	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (2 : 98)	197 - 203	ของแข็งในน้ำมันสีเขียวดำ	3.95
$F_2$14	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (2 : 98)	204 - 207	ของแข็งในน้ำมันสีเขียวดำ	2.17
$F_2$15	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (2 : 98)	208 -215	ของแข็งในน้ำมันสีเขียวดำ	3.29
$F_2$16	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (5 : 95)	216 - 218	ของแข็งในน้ำมันสีน้ำตาล	1.02
$F_2$17	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (5 : 95)	219 - 239	ผลึกในน้ำมันสีน้ำตาล	12.69
$F_2$18	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (5 : 95 และ 1 : 9)	240 - 244	น้ำมันสีน้ำตาลดำ	5.08

ตารางที่ 4 แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอล โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$F_2$19	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (1 : 9 และ 2 : 8)	245 -258	ของแข็งในน้ำมันสีน้ำตาลดำ	29.26
$F_2$20	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (4 : 6 , 7 : 3) และ เมทานอล	259 - 265	ของเหลวสีน้ำตาลดำ	8.30

2. การแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นในลำดับส่วนที่ 245 - 258 ($F_2$19)

นำสารลำดับส่วนที่ 245 - 258 มีลักษณะเป็นของแข็งในน้ำมันสีน้ำตาลดำหนัก 29.26 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 351.6 กรัม เป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามาก คือ สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 800 มิลลิลิตร โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับการแยกสารจากสิ่งสกัดเมทานอล ซึ่งผลการแยกสารแสดงไว้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 245 - 258 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
R_1	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (5 : 95)	1	ของแข็งน้อยมากในน้ำมันสีเหลือง	0.05
R_2	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (15 : 85)	2 - 4	ของแข็งเล็กน้อยในน้ำมันสีน้ำตาล	1.08
R_3	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (15 : 85)	5 - 6	ของแข็งในน้ำมันสีน้ำตาล	2.71
R_4	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (15 : 85)	7 - 12	ของแข็งในน้ำมันสีเหลืองส้ม	5.04
R_5	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (15 : 85)	13 - 19	ของแข็งเล็กน้อยในน้ำมันสีน้ำตาล	3.86
R_6	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (25 : 75)	20 - 22	ของแข็งในน้ำมันสีน้ำตาล	4.83
R_7	เมทานอล : คลอโรฟอร์ม (4 : 6) และ เมทานอล	23 - 25	ของแข็งในน้ำมันสีน้ำตาล	3.52

การทำสารให้บริสุทธิ์ และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารในสิ่งสกัดเฮกเซน และเมทานอลจากดอกนนทรี

1. การทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 1 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว ได้จากลำดับส่วนที่ 1 - 2 ($F_1$1) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 3) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน และเมื่อนำสาร 1 มาตกผลึกด้วยเอทิลแอซิเตตร้อน จะได้ผลึกเป็นแผ่นแวววาวสีขาวหนัก 3.52 กรัม (4.99 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซน) จุดหลอมเหลว 49 - 51 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.90 (ซิลิกาเจล : 5 % คลอโรฟอร์มในเฮกเซน) สาร 1 ละลายได้ดีใน เฮกเซน ละลายได้เล็กน้อยในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม เอทิลแอซิเตต และแอซิโตน ไม่ละลายในเมทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard , 2,4 - DNP และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 2918, 2849 (s), 1465 (m), 1378 (w), 721 (m) เซนติเมตร$^{-1}$ (รูปที่ 15)

จากการทดสอบรีเอเจนต์ต่าง ๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่าสาร 1 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง ดังนั้นจึงนำสาร 1 มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิของคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตร / นาที เครื่องตรวจวัดแบบ FID) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอน 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 และ 33 ได้แก๊สโครมาโทแกรม (รูปที่ 17) จากนั้นนำมาสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ซึ่งสร้างขึ้นโดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง ได้กราฟเส้นตรง (รูปที่ 18) เมื่อนำค่า log retention time ของสาร 1 มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำให้ทราบจำนวนคาร์บอนของสาร 1 ได้ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงและสาร 1 กับจำนวนคาร์บอน

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน	ปริมาณสาร (%)
tetracosane	3.36	0.53	24	6.96
pentacosane	4.26	0.63	25	9.14
hexacosane	5.48	0.74	26	5.04
heptacosane	7.37	0.86	27	0.12
octacosane	9.02	0.96	28	8.55
nonacosane	11.62	1.06	29	11.86
triacontane	15.14	1.18	30	5.42
hentriacontane	19.37	1.28	31	39.46
dotriacontane	25.37	1.40	32	6.84
tritriacontane	32.94	1.52	33	6.60
สาร 1	2.76	0.44	23	0.30
	3.52	0.54	24	0.09
	4.33	0.64	25	2.57
	5.62	0.74	26	0.85
	6.99	0.84	27	17.92
	9.22	0.96	28	2.68
	11.61	1.06	29	45.06
	15.51	1.19	30	2.54
	19.61	1.29	31	20.43
	24.97	1.39	32	0.11
	33.44	1.52	33	7.45

2. การทำสาร 2 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 2 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง ได้จากลำดับส่วนที่ 3 - 7 ($F_1$2) และลำดับส่วนที่ 8 - 18 ($F_1$3) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 3) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน และเมื่อนำสาร 2 มาตกผลึกด้วยเอทิลแอซิเตตร้อน จะได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 6.60 กรัม (9.35 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซน) จุดหลอมเหลว 60 - 63 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.86 (ซิลิกาเจล : 10 % คลอโรฟอร์มในเฮกเซน) สาร 2 ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทน ไม่ละลายในเฮกเซน เมทานอล เอทิลแอซิเตต และแอซิโตน นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 2919, 2849 (s), 1736 (s), 1466 (m), 1376 (w), 1175 (m) และ 722 (m) เซนติเมตร $^{-1}$ (รูปที่ 19)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) 0.85 (t), 1.23 (s), 1.55 (m), 2.36 (t) และ 4.05 (t) ppm (รูปที่ 20)

จากการทดสอบรีเอเจนต์ต่าง ๆ ข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม และเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่าสาร 2 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์โซ่ตรง ดังนั้นจึงนำสาร 2 มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ เพื่อดูไอออนเชิงโมเลกุลและการแตกมวลของสารประกอบเอสเทอร์โซ่ตรงนี้ ได้แมสสเปกตรัมดังรูปที่ 21 ซึ่งจะเห็นว่าพบไอออนเชิงโมเลกุลที่ m/e เท่ากับ 592 และ 564 โดยดูจากแมสสเปกตรัมรูปที่ 22 และทำการสืบค้นข้อมูลแมสสเปกตรัมของเอสเทอร์ (library search) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NIST (National Instituted of Standard Testing) โดยการเปรียบเทียบไอออนเชิงโมเลกุล และชิ้นส่วนของการแตกมวล พบแมสสเปกตรัมที่มีลักษณะคล้ายกันกับแมสสเปกตรัมของสาร 2 คือแมสสเปกตรัมของ Eicosanoic acid , Eicosyl ester ($C_{40}H_{80}O_2$) (รูปที่ 23) และแมสสเปกตรัมของ Eicosanoic acid , Octadecyl ester ($C_{38}H_{76}O_2$) (รูปที่ 24) ซึ่งในส่วนของกรดคาร์บอกซิลิกจะเห็นว่ามีน้ำหนักโมเลกุลที่ m/e เท่ากับ 312 ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของ Eicosanoic acid ที่มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{40}O_2$ และในส่วนของแอลกอฮอล์นั้นจะเป็น $C_{20}H_{42}O$ และ $C_{18}H_{38}O$

3. การทำสาร 3 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 3 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองส้ม ได้จากลำดับส่วนที่ 23 - 25 ($F_{1}5$) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 3) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน ในอัตราส่วน 3 : 7 เมื่อนำสาร 3 มาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มกับเมทานอล จะได้ผลึกอสัณฐานสีขาวหนัก 1.01 กรัม (1.43 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซน) จุดหลอมเหลว 69 - 71 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.40 (ซิลิกาเจล : 50 % คลอโรฟอร์มในเฮกเซน) สาร 3 ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทน ไม่ละลายในเฮกเซน เมทานอล เอทิลแอซิเตต และแอซิโตน นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับ 2,4 - DNP และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 3590 - 3120 (m), 2918, 2849 (s), 1467 (m), 1378 (w), 1063 (m) และ 723 (m) เซนติเมตร $^{-1}$ (รูปที่ 25)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) 0.89 (t), 1.30 (s), 1.60 (m) และ 3.65 (t) ppm (รูปที่ 26)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน ที่ค่า chemical shift (δ) 14.29, 22.72, 25.86, 29.37, 30.02, 32.13, 32.97 และ 63.41 ppm (รูปที่ 27)

จากการทดสอบรีเอเจนต์ต่าง ๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่าสาร 3 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์โซ่ตรง ดังนั้นจึงนำสาร 3 มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิของคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตร / นาที เครื่องตรวจวัดแบบ FID) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอน 14, 16, 18, 20, และ 22 ได้แก๊สโครมาโทแกรม (รูปที่ 29) จากนั้นนำมาสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ซึ่งสร้างขึ้นโดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง ได้กราฟเส้นตรง (รูปที่ 30) เมื่อนำค่า log retention time ของสาร 3 มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำให้ทราบจำนวนคาร์บอนของสาร 3 ได้ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรงและสาร 3 กับจำนวนคาร์บอน

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน	ปริมาณสาร (%)
$CH_3(CH_2)_{12}CH_2$-OH	1.15	0.06	14	11.16
$CH_3(CH_2)_{14}CH_2$-OH	1.54	0.19	16	29.72
$CH_3(CH_2)_{16}CH_2$-OH	2.24	0.35	18	31.22
$CH_3(CH_2)_{18}CH_2$-OH	3.55	0.55	20	10.68
$CH_3(CH_2)_{20}CH_2$-OH	5.67	0.75	22	17.22
สาร 3	16.16	1.21	27	32.31
	26.63	1.42	30	67.69

4. การทำสาร 4 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 4 มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองส้ม ได้จากลำดับส่วนที่ 26 - 33 (F_16) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 3) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน ในอัตราส่วน 3 : 7 เมื่อนำสาร 4 มาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มกับเมทานอล จะได้ผลึกอสัณฐานสีขาวหนัก 0.869 กรัม (1.23 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซน) จุดหลอมเหลว 68 - 69 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.40 (ซิลิกาเจล : 50 % คลอโรฟอร์มในเฮกเซน) สาร 4 ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทน ละลายเล็กน้อยในเฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เอทิลแอซิเตต และแอซิโตน นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับ 2,4 - DNP และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 3595 - 3110 (m), 2918, 2849 (s), 1460 (m), 1376 (w), 1063 (m) และ 723 (m) เซนติเมตร $^{-1}$ (รูปที่ 31)

จากการทดสอบรีเอเจนต์ต่าง ๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่าสาร 4 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์โซ่ตรง ดังนั้นจึงนำสาร 4 มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิของคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตร / นาที

เครื่องตรวจวัดแบบ FID) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอน 14, 16, 18, 20, และ 22 ได้แก๊สโครมาโทแกรม (รูปที่ 33) จากนั้นนำมาสร้างกราฟเทียบมาตรฐาน ซึ่งสร้างขึ้นโดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง ได้กราฟเส้นตรง (รูปที่ 34) เมื่อนำค่า log retention time ของสาร 4 มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ทำให้ทราบจำนวนคาร์บอนของสาร 4 ได้ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรงและสาร 4 กับจำนวนคาร์บอน

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน	ปริมาณสาร (%)
สาร 4	6.64	0.82	23	3.42
	16.11	1.21	27	54.24
	27.28	1.43	30	42.34

5. การทำสาร 5 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 5 มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลือง ได้จากลำดับส่วนที่ 26 - 33 ($F_1$6) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเฮกเซน (ตารางที่ 3) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน ในอัตราส่วน 3 : 7 และได้จากลำดับส่วนที่ 31 - 110 ($F_2$6) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเมทานอล (ตารางที่ 4) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเฮกเซน ในอัตราส่วน 4 : 6 เมื่อนำสาร 5 มาตกผลึกด้วยเฮกเซนร้อน จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 0.99 กรัม (0.57 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเฮกเซนและเมทานอล) จุดหลอมเหลว 134 - 136 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.67 (ซิลิกาเจล : 10 % เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) สาร 5 ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน อีเทอร์ เมทานอล เอทานอล เอทิลแอซิเตต และแอซิโตน ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน นอกจากนี้ยังให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 3600 - 3200 (s), 2938 - 2867 (s), 1641 (m), 1464 (s), 1381 (s), 1061 (s), 970, 960 (m) และ 837, 802 (m) เซนติเมตร $^{-1}$ (รูปที่ 35)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) 0.70 - 2.30 (m), 3.55 (m), 5.10 (m) และ 5.35 (d) ppm (รูปที่ 36)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 39 คาร์บอน ที่ค่า chemical shift (δ) 11.95, 12.01, 12.21, 18.75, 18.99, 19.36, 19.78, 21.05, 21.18, 23.03, 24.28, 25.37, 26.05, 28.21, 28.88, 29.12, 29.67, 31.62, 31.87, 33.91, 36.11, 36.47, 37.22, 39.65, 39.74, 40.46, 42.79, 45.80, 50.11, 51.21, 55.93, 56.02, 56.74, 56.83, 71.77, 121.68, 129.24, 138.28 และ 140.72 ppm (รูปที่ 37)

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) จะปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ค่า chemical shift (δ) 11.95, 12.01, 12.21, 18.75, 18.99, 19.36, 19.78, 21.18, 29.12, 31.87, 36.47, 40.46, 45.80, 50.11, 51.21, 55.93, 56.02, 56.74, 56.83, 71.77, 121.68, 129.24 และ 138.28 ppm
ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ CH_2 ที่ค่า chemical shift (δ) 21.05, 23.03, 24.28, 25.37, 26.05, 28.21, 28.88, 29.67, 31.62, 33.91, 37.22, 39.65, 39.74 และ 42.79 ppm (รูปที่ 38)

จากการทดสอบปฏิกิริยา **Liebermann - Burchard** ข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม และเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่าสาร 5 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ ดังนั้นจึงนำสาร 5 มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิของคอลัมน์ 260 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตร / นาที) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ ได้แก่ **cholesterol**, **campesterol**, **stigmasterol** และ **β - sitosterol** ได้แก๊สโครมาโทแกรม (รูปที่ 40) ซึ่งสามารถเปรียบเทียบค่า retention time ระหว่างสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์กับสาร 5 ได้ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์กับสาร 5 จากแก๊สโครมาโทแกรม

สาร	retention time (นาที)	log retention time	พื้นที่ใต้พีก	ปริมาณสาร (%)
cholesterol	14.80	1.17	10808	1.18
campesterol	19.58	1.29	101052	11.02
stigmasterol	20.85	1.31	203911	22.24
β - sitosterol	23.38	1.37	600852	65.55
สาร 5	19.63	1.29	84932	7.76
	20.63	1.31	505398	46.16
	23.53	1.37	504535	46.08

จากโครมาโทแกรมสาร 5 ประกอบด้วย 7.76 % campesterol , 46.16 % stigmasterol และ 46.08 % β - sitosterol

6. การทำสาร 6 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 6 มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวในน้ำมันสีเขียวดำ ได้จากลำดับส่วนที่ 208 - 215 ($F_2$15) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเมทานอล (ตารางที่ 4) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 2 : 98 เมื่อนำ สาร 6 มาตกผลึกด้วยเอทานอลร้อน จะได้สารที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.081 กรัม (7.9×10^{-2} % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเมทานอล) จุดหลอมเหลว 265 - 270 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.55 (ซิลิกาเจล : 20 % เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) สาร 6 ละลายได้ในเอทานอลร้อน และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน อีเทอร์ เมทานอล เอทานอล เอทิลแอซิเตต และแอซิโตน สาร 6 ให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann - Burchard และฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 แสดงว่าสารนี้มีโครงสร้างของสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ที่ไม่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 3640 - 3160 (s), 3023 (w), 2935 - 2710 (s), 1630 (w), 1464 (s), 1380 (s), 1170 - 1020 (s), 890 (w) และ 840, 800 (w) เซนติเมตร $^{-1}$ (รูปที่ 41)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของโปรตอน ที่ค่า chemical shift (δ) 0.54 - 2.42 (m), 2.78 - 3.56 (m), 3.63 (m), 4.20 (d), 4.46 (t), 5.09 (m) และ 5.31 (m) ppm (รูปที่ 42)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน ที่ค่า chemical shift (δ) 11.64, 11.75, 12.09, 18.59, 18.90, 19.07, 19.68, 20.57, 20.92, 22.58, 23.83, 24.85, 25.39, 27.77, 28.67, 29.22, 31.37, 33.31, 35.45, 36.18, 36.79, 41.82, 45.11, 49.58, 50.57, 55.39, 56.16, 61.05, 70.06, 73.43, 76.69, 76.93, 100.74, 121.20, 128.80, 138.03 และ 140.43 ppm (รูปที่ 43)

จากการทดสอบปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม และเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่าสาร 6 น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ไกลโคไซด์ ดังนั้นจึงนำสาร 6 มาทำการไฮโดรไลส์ด้วยกรด จะได้ส่วนของ aglycone (สาร 6.1) ซึ่งสารมีน้อยมากไม่สามารถตกผลึกออกมาได้ เมื่อนำมาหาค่า R_f ได้เท่ากับ 0.71 (ซิลิกาเจล : 10 % เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) และให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, ฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 ดังนั้นจึงทำการยืนยันสูตรโครงสร้างของสาร 6.1 โดยนำมาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิของคอลัมน์ 260 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 องศาเซลเซียส และอัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 50 มิลลิลิตร/นาที) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ ได้แก่ campesterol , stigmasterol และ β-sitosterol ได้แก๊สโครมาโทแกรม (รูปที่ 45) ซึ่งสามารถเปรียบเทียบค่า retention time ระหว่างสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์กับสาร 6.1 ได้ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์กับสาร 6.1 จากแก๊สโครมาโทแกรม

สาร	retention time (นาที)	log retention time
campesterol	19.00	1.27
stigmasterol	20.13	1.30
β - sitosterol	22.46	1.35
สาร 6.1	19.15	1.27
	20.31	1.30
	22.77	1.35

จากแก๊สโครมาโทแกรมพบว่าสาร 6.1 ประกอบด้วย campesterol , stigmasterol และ β - sitosterol

เมื่อนำส่วนที่เป็น glycone (สาร 6.2) ซึ่งสารมีน้อยมากไม่สามารถตกผลึกออกมาได้ มาวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ได้แก่ rhamnose, glucose และ fructose ได้โครมาโทแกรม (รูปที่ 47) ซึ่งสามารถเปรียบเทียบค่า retention time ระหว่างสารละลายน้ำตาลมาตรฐานกับ สาร 6.2 ได้ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงค่า retention time ของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานกับสาร 6.2 จาก HPLC โครมาโทแกรม

สาร	retention time (นาที)	log retention time
rhamnose	3.21	0.51
fructose	4.46	0.65
glucose	4.96	0.70
สาร 6.2	4.91	0.69

จาก HPLC โครมาโทแกรมพบว่าสาร 6.2 ประกอบด้วย น้ำตาล glucose

7. การทำสาร 7 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 7 มีลักษณะเป็นผลึกในน้ำมันสีน้ำตาล ได้จากลำดับส่วนที่ 219 - 239 ($F_2$17) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเมทานอล (ตารางที่ 4) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 5 : 95 เมื่อนำสาร 7 มาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มกับเมทานอล จะได้สารที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเหลี่ยมสีขาวใสหนัก 3.018 กรัม (2.96 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเมทานอล) จุดหลอมเหลว 130 องศาเซลเซียส (จะมีการหลอมเหลวอีกครั้งที่อุณหภูมิ 238 องศาเซลเซียส) มีค่า R_f เท่ากับ 0.67 (ซิลิกาเจล : 20 % เมทานอลในคลอโรฟอร์ม) สาร 7 ละลายได้ในเมทานอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ไม่ละลายในเฮกเซน คลอโรฟอร์ม แอซิโตน และเอทิลแอซิเตต

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 3424 - 3020 (s), 3090 (w), 2984, 2890 (w), 1703 (s), 1613, 1520 (m), 1464 (m), 1375 (m) และ 1235 - 1013 (s) เซนติเมตร$^{-1}$ (รูปที่ 48)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) 3.20 - 3.98 (m), 3.76 (s), 4.86 (s), 4.95 (d), 5.36 (s), 5.57 (s), 6.98 (s), 8.42 (s) และ 9.68 (s) ppm (รูปที่ 49)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 14 คาร์บอน ที่ค่า chemical shift (δ) 59.89, 61.15, 70.77, 72.19, 73.77, 79.84, 81.78, 109.55, 116.03, 118.09, 140.69, 148.09, 150.96 และ 163.43 ppm (รูปที่ 51)

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ค่า chemical shift (δ) 70.77, 72.19, 73.77, 79.84, 81.78 และ 109.55 ppm (รูปที่ 52)

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ค่า chemical shift (δ) 59.89, 70.77, 72.19, 73.77, 79.84, 81.78 และ 109.55 ppm

ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ CH_2 ที่ค่า chemical shift (δ) 61.15 ppm (รูปที่ 52)

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ m/e (% relative intensity) 328 (17%) นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของการแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญที่ m/e 208 (100%), 193 (9.5%), 180 (19%), 165 (16%), 152 (22%) และ 137 (8%) (รูปที่ 53)

8. <u>การทำสาร 8 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง</u>

สาร 8 มีลักษณะเป็นของแข็งในน้ำมันสีน้ำตาลดำ ได้จากลำดับส่วนที่ 246 - 247 ($F_2$19) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเมทานอล (ตารางที่ 4) ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1 : 9 และ 2 : 8 เมื่อนำสาร 8 มาตกผลึกด้วยเมทานอลร้อน จะได้ผลึกเป็นเม็ดสีขาวหนัก 0.581 กรัม (0.57 % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเมทานอล) จุดหลอมเหลว 182 - 184 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.41 (ซิลิกาเจล : คลอโรฟอร์ม) สาร 8 ละลายได้ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และน้ำ ละลายได้เล็กน้อยในเมทานอล และเอทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน คลอโรฟอร์ม แอซิโตน และเอทิลแอซิเตต

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 3570 - 3080 (s), 2954, 2900, 2845 (m), 1453, 1381 (m) และ 1129 - 1054 (m) เซนติเมตร $^{-1}$ (รูปที่ 54)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) 3.00 (t), 3.43 (s), 4.24 (d), 4.37 (d), 4.42 (d), 4.55 (d) และ 4.64 (d) ppm (รูปที่ 55)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 7 คาร์บอน ที่ค่า chemical shift (δ) 59.69, 70.18, 71.05, 72.02, 72.47, 72.68 และ 83.79 ppm (รูปที่ 56)

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ค่า chemical shift (δ) 70.18, 71.05, 72.02, 72.47, 72.68 และ 83.79 ppm (รูปที่ 57)

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ค่า chemical shift (δ) 70.18, 71.05, 72.02, 72.47, 72.68 และ 83.79 ppm (รูปที่ 57) จากรูปจะเห็นว่าไม่ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ CH_2 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารนี้ไม่มี CH_2 อยู่ในโมเลกุล

แมสสเปกตรัม จะเห็นว่าไม่พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) แต่จะพบชิ้นส่วนของการแตกมวล (mass fragmentation) ที่ m/e (% relative intensity) 144 (3 %), 140 (7 %), 116 (10 %), 109 (8 %), 102 (15 %) และ 85 (39 %) (รูปที่ 58)

9. การทำสาร 9 ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 9 มีลักษณะเป็นของแข็งในน้ำมันสีน้ำตาล ได้จากลำดับส่วนที่ 245 - 258 ($F_2$19) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดเมทานอล (ตารางที่ 4) โดยการนำส่วนนี้มาทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ (ตารางที่ 5) สาร 9 จะถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเมทานอลกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 25 : 75 ซึ่งเป็นลำดับส่วนที่ 20 - 22 (R_6) เมื่อนำสาร 9 มาตกผลึกด้วยเอทานอลร้อน จะได้สารที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มเล็กสีขาวหนัก 0.0164 กรัม (1.6×10^{-2} % โดยน้ำหนักของสิ่งสกัดเมทานอล) จุดหลอมเหลว 221 - 223 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.54 (ซิลิกาเจล : คลอโรฟอร์ม) สาร 9 ละลายได้ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และน้ำ ไม่ละลายในเฮกเซน คลอโรฟอร์ม แอซิโตน เอทิลแอซิเตต เมทานอล และเอทานอล

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงแถบการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 3650 - 3010 (s), 2920 (m), 1446 - 1371 (m) และ 1196 - 1002 (s) เซนติเมตร $^{-1}$ (รูปที่ 59)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ค่า chemical shift (δ) 2.78 - 2.96 (m), 3.02 - 3.18 (m), 3.24 - 3.36 (m), 3.42 - 3.81 (m), 4.37 (d) และ 4.43 - 4.58 (m) ppm (รูปที่ 60)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 4 คาร์บอน ที่ค่า chemical shift (δ) 71.81, 72.59, 72.71 และ 75.18 ppm (รูปที่ 61)

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ค่า chemical shift (δ) 71.81, 72.59, 72.71 และ 75.18 ppm (รูปที่ 62) ซึ่งจะเห็นว่าสาร 9 ประกอบด้วย CH อยู่ในโมเลกุลเท่านั้น ไม่มี quaternary carbon หรือ CH_2 ในโมเลกุลเลย

แมสสเปกตรัม จะเห็นว่าไม่พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) แต่จะพบชิ้นส่วนของการแตกมวล (mass fragmentation) ที่ m/e (% relative intensity) 144 (4 %), 126 (1 %), 109 (4 %), 102 (39 %), 89 (12 %), 71 (36 %) และ 60 (61 %) (รูปที่ 63)