หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 วิธีการทดลอง

3.1.1 Thin layer chromatography (TLC)

เตรียม chromatoplates โดยใช้ silica gel GF_{254} (type 60) for thin layer chromatography Art. 7730 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt เป็น adsorbent ผสม adsorbent 30 กรัมต่อน้ำกลั่น 60 ซม.^{3} ในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 ซม.^{3} เขย่า 2-3 นาที เทใส่ Desaga spreader ที่ปรับให้มีความหนา 0.25 ม.ม. เคลือบลงบนแผ่นแก้วขนาด 20×20 ซม. ซึ่งล้างสะอาดด้วยน้ำ และเช็ดด้วย acetone จะได้ chromatoplates 5 แผ่น ปล่อยให้แห้ง 30 นาที แล้ว activated ในตู้อบอุณหภูมิ 105°C 30 นาที เก็บไว้ใน desiccator

ละลายสารด้วยตัวทำละลายที่ดีที่สุด ใช้หลอด capillary ดูดสารจุดลงบน chromatoplate ห่างจากขอบล่างประมาณ 2 ซม. แต่ละจุดห่างกันประมาณ 1.5 ซม. ปล่อยให้แห้ง แล้วจุ่มลงในถังแก้ว (tank) ที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย 150 ซม.^{3} ปิดฝาถังแก้วทิ้งให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึงระดับที่ห่างจากขอบบน 1 ซม. จึงเอาออก ทำให้แห้ง นำไปดูด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm. ซึ่ง plate จะเรืองแสง บริเวณมีสารจะทึบเห็นเป็นจุดต่าง ๆ กรณีที่สารมีพันธะเป็นพันธะคู่น้อยมักไม่ค่อยเห็น ต้องนำไปใส่ในแทงค์ที่บรรจุ iodine สารจะเกิด weak complex กับ iodine เป็นสีน้ำตาล หรือพ่นด้วยสารละลาย 25% H_2SO_4 แล้วอบที่อุณหภูมิ 110°C

3.1.2 Quick column chromatography

ใช้ sintered glass funnel เบอร์ 4 เป็น column เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. สูง 9 ซม. ปลายด้านล่างของ funnel ต่อลงในแผ่นยางซึ่งวางอยู่บนขวดชมพู่ รองรับสารที่แผ่นยางมีหลอดสำหรับต่อกับ water pump เพื่อดูด column ด้วยความดันประมาณ 80 มม. ของปรอท เตรียม column ได้โดยใส่ทรายบน funnel พอให้ผิวเรียบ วางกระดาษกรอง

whatman เบอร์ 1 บนชั้นทราย ใช้ silica gel 60 Art. 7729 for column chromatography ของบริษัท E. Merck, Darmstadt เป็น adsorbent ผสมกับ hexane จนเป็น slurry เทลงบนกระดาษกรองใน funnel พร้อมกับดูดด้วย water pump จนตัวทำละลายหมด กดบนผิวของ silica gel ปรับให้แน่นและเรียบ และสูงไม่เกิน 4 ซม. นำสารที่จะแยก (ปริมาณ 10-25 กรัม) มาละลายด้วย chloroform ใน beaker ขนาด 150 ซม.^{3} ใส่ silica gel ชนิดเดียวกันลงไป (เพื่อให้สารเคลือบ) ในปริมาณน้อยที่สุด ปล่อยให้ chloroform ระเหยแห้ง โรยผง silica gel ที่ถูกสารเคลือบแล้วนี้ลงบนผิวของ column ที่เตรียมไว้ กดให้แน่น ปิดทับด้วยกระดาษกรองอีกครั้งเป็นชั้นบนสุดเพื่อรักษาผิว adsorbent ให้เรียบ เริ่มใช้ hexane เป็น eluent โดยริน hexane 210 ซม.^{3} ลงบนกระดาษกรองชั้นบน พร้อมทั้งดูดด้วย water pump จนสารละลายหมดจาก column จึงเปลี่ยนขวดที่รองรับใหม่ แล้วต่อด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ตามต้องการด้วยวิธีการเดียวกัน

3.1.3 Column chromatography

ใช้หลอดแก้วขนาดสม่ำเสมอ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม. ยาว 30 ซม. เป็น column ซึ่งสวมอยู่ในหลอดแก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 ซม. ที่ปลายบนและล่างมีหลอดนำกาซต่อให้น้ำเข้าออก ทำหน้าที่เป็น condenser ป้องกันการแตกของ adsorbent จากการ elute ด้วย hexane กับ ether ปลายล่างของตัว column มีที่ปรับอัตราการไหลของสารละลาย ในการเตรียม column เริ่มโดยใส่สำลีชุบ hexane ลงไปก่อน พร้อมกับหล่อ column ด้วยน้ำไว้ตลอดเวลา เติม hexane ให้เหนือสำลี จนสำลีไม่มีฟองอากาศ ใส่ทรายจำนวนเล็กน้อยบนสำลี ปรับให้ผิวเรียบ ผสม silica gel 60 Art. 7734 for column chromatography (ใช้ปริมาณ adsorbent ต่อสาร 30:1 โดยน้ำหนัก) กับ hexane จนเป็น slurry เทใส่ column พร้อมกับปล่อยให้ตัวทำละลายไหลออก จน adsorbent ไม่ลดตัวลงอีก ปล่อยให้ไหลต่อไป จนเหลือตัวทำละลายอยู่เหนือ adsorbent 1.5 ซม. เคลือบ silica gel ชนิดเดียวกัน (ในปริมาณน้อยที่สุด) ด้วยสารที่ต้องการแยก โรย silica gel ที่สารเคลือบอยู่นี้ลงใน column ปรับผิวให้เรียบ ใส่สำลีทับที่ผิวบน แล้ว elute ด้วย hexane: ether 80:20 (อัตราส่วนโดยปริมาตร) เก็บสารละลายครั้งละ 10-25 ซม.^{3}

011297

3.1.4 Preparative thin layer chromatography (PTLC)

เตรียม plate โดยใช้ silica gel ชนิดเดียวกันกับที่ใช้ทำ TLC plate จำนวน 60 กรัม เขย่ากับน้ำกลั่น 120 ซม.^{3} เทใส่ Desaga spreader ที่ปรับให้มีความหนา 0.75 มม. เคลือบบนแผ่นแก้วขนาด 20×20 ซม. ได้ chromatoplates 3 แผ่น ทิ้งให้แห้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C 30 นาที เก็บไว้ใน desiccator

ละลายสารด้วยตัวทำละลายที่ดีที่สุด ใช้หลอดหยดที่ใส่สำลีให้โผล่ออกมาเล็กน้อย ดูดสารละลายที่มีสารจำนวน 30 มก. ใส่สารลงบน chromatoplate ให้เป็นแถบที่เล็กที่สุด นำไปใส่ในถังแก้ว (tank) ที่มี ethyl acetate : benzene 20:80 (อัตราส่วนโดยปริมาตร) บรรจุอยู่ ปิดฝาถังแก้ว รอจนตัวทำละลายขึ้นสูงถึงระดับที่ต้องการ เอา plate ออกทำให้แห้ง นำไปส่อง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm. ถ้าเห็นไม่ชัด เอาแผ่นแก้วขนาด 20×20 ซม. วางทับบน plate เหลือให้ plate โผล่ออกมาข้างละประมาณ 2 มม. พ่นด้วย 25% H_2SO_4 นำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C จะปรากฏแถบสีม่วงตรงที่มีสาร นำไปส่อง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm. อีกครั้งเพื่อยืดเส้นกำหนดตำแหน่งของสาร ขูดส่วนที่มีสารใส่ในขวดชมพู่ และสกัดด้วยตัวทำละลายที่ละลายสารนั้น ๆ ได้ดีที่สุด

3.1.5 Paper chromatography (PC)

ใช้วิธีการนี้วิเคราะห์หาน้ำตาล และกรดอะมิโน โดยดำเนินการปฏิบัติดังต่อไปนี้

ก. การวิเคราะห์หาน้ำตาล ใช้ดินสอลากเส้นให้ขนาดขอบด้านกว้างของกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9×44 ซม.) จากขอบบนเข้ามา 5 ซม. ทำเครื่องหมายตำแหน่งที่จะจุด สารบนเส้นแต่ละจุดห่างกัน 4 ซม. เตรียมสารละลายของน้ำตาลมาตรฐาน โดยผสม glucose, galactose, arabinose, xylose และ rhamnose อย่างละ 0.5% โดยน้ำหนักใน 10% isopropanol เพื่อป้องกัน bacteria จุดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานเปรียบเทียบกับสาร นำไปใส่ในถังแก้วทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. ยาว 48 ซม. ซึ่งอิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย n-butanol-benzene-pyridine-water (BBPW) ในอัตราส่วน 5:1:3:3 โดยปริมาตร ดำเนินการทำแบบ descending ปล่อยให้ตัวทำละลาย

ซึมออกนอกกระดาษ โดยทิ้งไว้ประมาณ 18-24 ชม. เอาออกมาทำให้แห้ง พ่นด้วยสารละลาย aniline hydrogen phthalate ซึ่งเตรียมจากการละลาย phthalic acid 16 กรัม ใน aniline 9.2 ซม.^{3} n-butanol 490 ซม.^{3} ether 490 ซม.^{3} และน้ำ 20 ซม.^{3} นำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C 5 นาที ตำแหน่งที่มีน้ำตาลจะเป็นสีน้ำตาล น้ำตาลแดง หรือน้ำตาลเข้ม

ข. <u>การวิเคราะห์กรดอะมิโน</u> ใช้กระดาษกรองชนิดเดียวกันขนาด 21×28 ซม. ใช้ดินสอลากเส้นห่างจากขอบ 2 ซม. ขนานกับด้านยาว ทำเครื่องหมายบนตำแหน่งที่จะจุดสารบนเส้น แต่ละจุดห่างกัน 3 ซม. ม้วนกระดาษเป็นรูปทรงกระบอก เย็บต่อปลายทั้งสอง นำไปแช่ในถังแก้วทรงกระบอก เส้นผ่าศูนย์กลาง 12 ซม. สูง 32 ซม. ซึ่งมีสารละลาย acetonitrile : 0.1 M ammonium acetate (pH7) 7:3 อยู่สูง 1 ซม. ดำเนินการทำแบบ ascending ปล่อยจนตัวทำละลายซึมจนถึงระดับต่ำกว่าขอบบน 1 ซม. เอาออกมาทำให้แห้ง พ่นด้วย 0.1% ninhydrin ใน acetone นำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C 2-3 นาที ตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนจะปรากฏเป็นสีม่วง

3.1.6 <u>Ion exchange resins</u> เพื่อแยกเอา cation และ anion ออกจากสาร โดยดำเนินการปฏิบัติดังต่อไปนี้

ใช้ Amberlite resins IRA-400 (Cl) ของบริษัท BDH Labaratory chemicals Division Poole England เป็น anion exchange resins ก่อนใช้ต้องแช่ด้วย 4N NaOH ทิ้งไว้ค้างคืน ล้างด้วยน้ำ deionize จนหมดฤทธิ์ด่าง (ตรวจด้วย phenolphthalein) แล้วบรรจุลงใน column เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. ยาว 60 ซม. ในทำนองเดียวกันกับการทำ column chromatography ใช้ปริมาณสาร 3.5 มก. ต่อ resins 1 กรัม ใช้น้ำ deionize เป็น eluent

ใช้ Amberlite resins IR-120 (Na) เป็น cation exchange resins แช่ด้วย 4N HCl ทิ้งไว้ค้างคืน ล้างด้วยน้ำ deionize จนหมด chloride (ตรวจด้วยสารละลาย silver nitrate) บรรจุลงใน column ใช้ปริมาณสาร 7 มก. ต่อ resins 1 กรัม ใช้น้ำ deionize เป็น eluent

3.1.7 เครื่องมือและเคมีภัณฑ์

สารเคมีที่ใช้ได้แก่ hexane, ether, chloroform, n-butanol, acetone, ethyl acetate, methanol ฯลฯ ถ้าเป็นชนิด commercial grade ต้องนำมากลั่นก่อนใช้เสมอ

หาจุดหลอมเหลวโดยใช้ Fisher Johns melting point apparatus

UV spectra บันทึกด้วยเครื่อง Double beam spectrophotometer Model 220A ของบริษัท Hitachi, Japan.

IR spectra บันทึกด้วยเครื่อง Shimadzu Infrared Spectrophotometer IR-440 ของบริษัท Shimadzu Corporation Kyoto, Japan.

NMR spectra บันทึกด้วยเครื่อง Fourier Transform NMR Spectrometer Model FX 902 ของบริษัท JEOL JAPAN ที่ 89.55 MHz สำหรับ ^{1}H-NMR และที่ 22.50 MHz สำหรับ ^{13}C-NMR

Mass spectra บันทึกด้วยเครื่อง MS-21-490B ของบริษัท Dupont Instruments U.S.A.

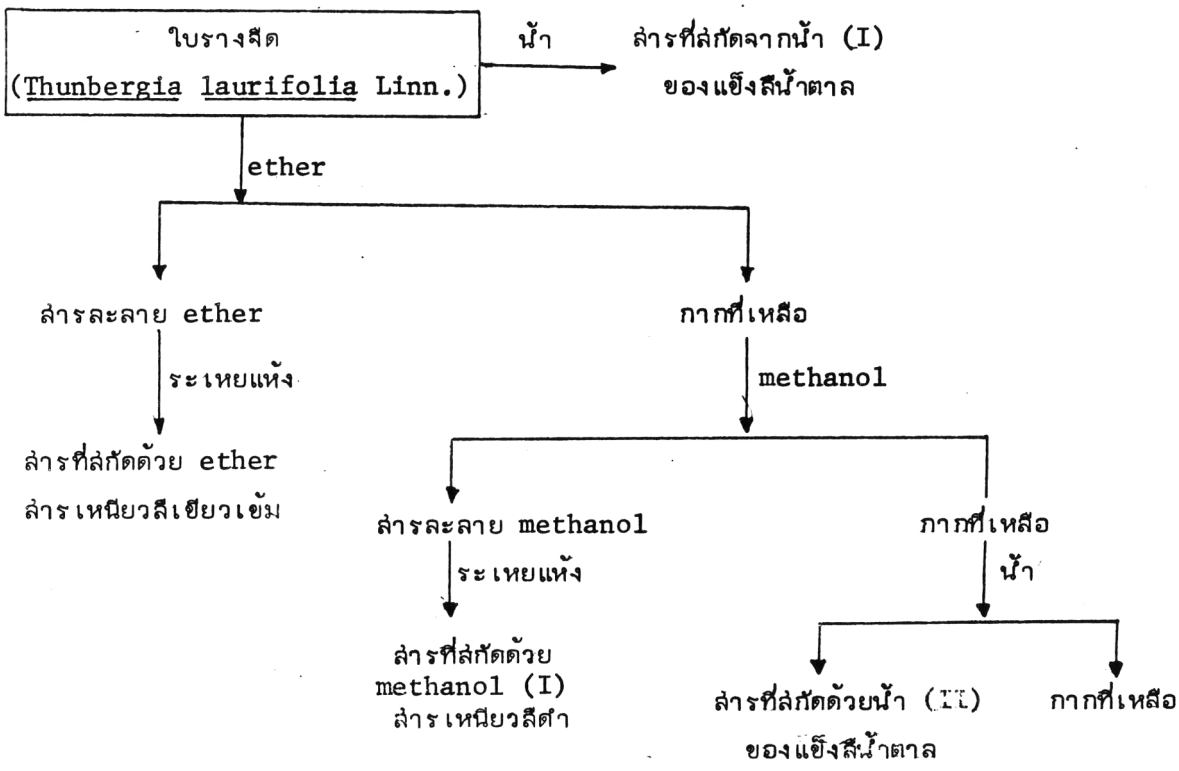
GLC spectra บันทึกด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatography Model 3700 ของบริษัท Varian Techtron Pty, Ltd. Melbourne Australia.

หาธาตุต่าง ๆ จากเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer, AA-5 Varian Techtron PTY, LTD. Melbourne Australia.

3.2 การสกัด (Extraction)

นำเอาใบรางจืดแห้งที่บดละเอียดแล้วมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ดัง scheme ที่ 2 และแสดงผลการสกัดอยู่ในตารางที่ 1

seheme ที่ 2 การสกัดใบรางจืดแห้งด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ



ตารางที่ 1 การสกัดใบรางจืดด้วย ether และ methanol (I)

สกัดครั้งที่	น้ำหนักใบรางจืดแห้ง (กรัม)	ether			methanol (I)		
		ปริมาตร (ลิตร)	น้ำหนักสารที่สกัด (กรัม)	เปอร์เซ็นต์	ปริมาตร (ลิตร)	น้ำหนักสารที่สกัด (กรัม)	เปอร์เซ็นต์
1	357.0	4.0	13.74	3.9	3.5	36.30	10.2
2	334.0	4.0	12.06	3.6	3.5	33.25	9.9
3	378.0	4.4	15.53	4.1	4.0	40.06	10.6
4	322.0	4.0	12.80	3.9	3.5	30.42	9.5
5	280.0	4.0	10.30	3.7	3.5	24.30	8.7
6	388.0	5.0	16.10	4.2	4.0	41.07	10.6
	รวม 2059.0		รวม 80.53	3.9		รวม 205.4	9.9

3.2.1 การสกัดด้วย ether

สกัดใบรางจืดแห้งด้วย ether โดยใช้เครื่อง soxhlet ใช้เวลาสกัดประมาณ 1-2 สัปดาห์ กรองสารละลายที่สกัดได้ กลั่นไล่ ether ออกจนแห้ง จะได้สารที่สกัดจาก ether มีลักษณะเหนียว สีเขียวเข้ม 80.53 กรัม (3.9% จากใบแห้ง 2059 กรัม)

3.2.2 การสกัดด้วย methanol

นำเอากากใบที่สกัดด้วย ether แล้วไปสกัดต่อด้วย methanol โดยวิธีการเดียวกันกับการสกัดด้วย ether ระเหยไล่ methanol ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 50°C จะได้สารสกัดจาก methanol (I) ลักษณะเหนียวสีดำ 205.4 กรัม (9.9% จากใบแห้ง 2059 กรัม) แล้วนำเอาสารนี้ไปละลายในตัวทำละลายต่าง ๆ ตาม scheme ที่ 3 และผลที่แยกออกได้ดังตารางที่ 2 ซึ่งดำเนินการทดลองดังต่อไปนี้

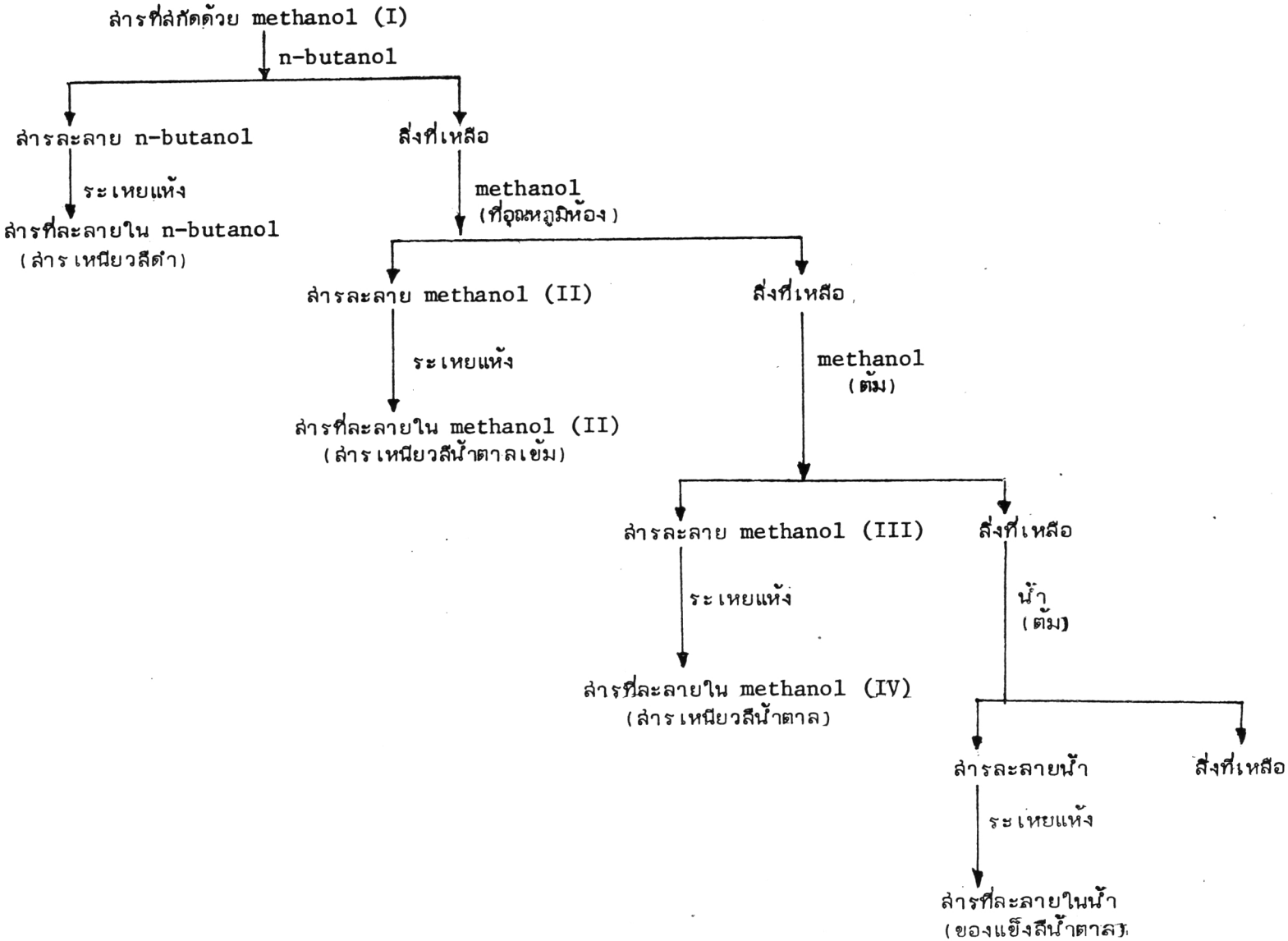
ก. ละลายสารสกัดจาก methanol (I) ด้วย n-butanol จนสารละลายสีจางมาก เพื่อแยกเอาส่วนที่ละลายและไม่ละลายในตัวทำละลายนี้ออกจากกัน เอาส่วนที่ละลายไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดจาก n-butanol มีลักษณะเหนียวสีดำ 101.41 กรัม (4.9% จากใบแห้ง 2059 กรัม)

ข. นำเอาสารสกัดจาก methanol (I) ที่ไม่ละลายใน ข้อ ก. ไปละลายกับ methanol ที่อุณหภูมิห้อง โดยวิธีการแบบเดียวกันกับข้อ ก. จะได้สารสกัดจาก methanol (II) ลักษณะเป็นสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม 41.69 กรัม (1.1% จากใบแห้ง 2059 กรัม)

ค. นำเอาสารสกัดจาก methanol (I) ที่ไม่ละลายในข้อ ข. ไปละลายด้วย methanol และให้ความร้อนโดยตั้งบน water bath เมื่อแยกเอาส่วนละลายและไม่ละลายใน methanol ร้อนนี้ออกจากกัน โดยวิธีเดียวกันกับข้อ ก. จะได้สารที่ละลาย methanol (III) 22.27 กรัม (0.6% จากใบแห้ง 2059 กรัม)

ง. ละลายสารที่ละลายใน methanol (I) ซึ่งไม่ละลายใน methanol ร้อนในข้อ ค. ด้วยน้ำกลั่น โดยวิธีเดียวกันกับข้อ ก. จะได้สารที่ละลายน้ำ ลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล 7.8 กรัม (0.4% จากใบแห้ง 2059 กรัม)

scheme ที่ 3 แสดงการแยกสารที่สกัดด้วย methanol (I) ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ



ตารางที่ 2 สารที่สกัดด้วย methanol (I) ละลายด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

ครั้งที่	น้ำหนักสารที่ละลาย methanol (I) (กรัม)	น้ำหนักสารที่ละลาย n-butanol (กรัม)	น้ำหนักสารที่ละลาย methanol (II) (กรัม)	น้ำหนักสารที่ละลาย methanol (III) (กรัม)	น้ำหนักสารที่ละลาย น้ำกลั่น (กรัม)
1	75.60	39.57	15.54	10.25	3.60
2	111.72	61.84	26.15	12.02	4.20
รวม	187.32	101.41	41.69	22.27	7.80
		4.9%*	1.1%*	0.6%*	0.4%*

*คิดเปอร์เซ็นต์จากใบแห้ง 2059 กรัม

3.2.3 การสกัดด้วยน้ำ

ได้ทำการสกัดสารจากใบรางจืดแห้งโดยตรง และจากกากใบ (สกัดด้วย ether และ methanol แล้ว) ดังต่อไปนี้

ก. ต้มใบรางจืดแห้งด้วยน้ำกลั่น กรองจะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม ทำซ้ำอีก 2-3 ครั้ง จนสีของสารละลายจางลง รวมสารละลายที่กรองได้ไประเหยไล่น้ำออก ได้สารที่ละลายน้ำ (I) ลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล 17.28 กรัม (17.28% จากใบแห้ง 100 กรัม)

ข. ต้มกากใบแห้งซึ่งสกัดด้วย ether และ methanol แล้ว ด้วยน้ำกลั่นในทำนองเดียวกันกับข้อ ก. จะได้สารที่ละลายน้ำ (II) ลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาล 9.26 กรัม (9.26% จากกากใบ 100 กรัม)

3.3 การแยกสาร (Separation)

3.3.1 ส่วนที่สกัดด้วย ether

แยกสารที่ละลายใน ether 30 กรัม ออกเป็น fraction ต่าง ๆ ด้วยวิธี quick column chromatography ใช้ silica gel 60 Art. 7729 เป็น adsorbent แล้ว elute ด้วย hexane, hexane:ether, ether, ether:chloroform, chloroform, chloroform:methanol และ methanol ตามลำดับ ตรวจสอบแต่ละ fraction ด้วย TLC รวม fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปกลั่นจนตัวทำละลายเหลือประมาณ 20 ซม.^{3} รินใส่ในขวดรูปชมพู่ ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ดังแสดงในตารางที่ 3

นำสารที่ได้จากการรวม fraction 41-55 ในตารางที่ 3 ไปล้างผลึกด้วย hexane หลายครั้งจนหมดสารเหนียวสีเขียวที่ปนอยู่ ตกผลึกใหม่ด้วย methanol กำหนดให้เป็นสาร (1) มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข้มสีขาว mp. 148-154°C 316 มิลลิกรัม นำสารที่ละลายใน ether ที่เหลือ 50.53 กรัม มาแยกโดยวิธีเดียวกัน จะได้ผลึกสาร (1) อีก 533 มิลลิกรัม เมื่อตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ hexame:ether 1:1 พบว่าเป็น 2 จุดซ้อนเหลื่อมกันอยู่ จึงนำสารที่ได้ทั้งหมดไปแยกใหม่ด้วย column ชนิดที่มีน้ำหล่อภายนอก ใช้ silica gel 60 Art.7743 20 กรัม แล้ว elute ด้วย hexane:ether 90:10 เก็บครั้งละ 10-25 ซม.^{3}

ตารางที่ 3 การแยกสารที่ละลายใน ether extract 30 กรัม ด้วยวิธี quick column chromatography ใช้ silica gel 60 Art. 7729 เก็บสารละลาย fraction ละ 200 ซม.^{3}

Eluent (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	fraction	ลักษณะสาร	
		ลีของสารละลาย	ระเหยเหลือ 20 ซม.^{3}
hexane	1- 4	ใส	ไขลีเหลืองอ่อน
hexane	5- 9	เหลืองแก่	น้ำมันลีส้มแดง
hexane	10-17	เหลืองอ่อน	น้ำมันลีเหลือง
hexane:ether			
99:1-96:4	18-29	เหลือง	น้ำมันลีเหลือง
95:5-94:6	30-40	เหลือง	น้ำมันลีเหลือง
93:7-90:10	41-55	เขียวอมเหลือง	ผลึกรูปเข็มปนน้ำมันลีเขียว
85:15-60:40	56-70	ฟ้าแก่	น้ำมันลีฟ้าเข้ม
55:45-10:90	71-82	เขียวเข้ม	น้ำมันลีดำ
ether	83-90	เหลืองอ่อน	น้ำมันลีเหลือง
ether:chloroform			
90:10-50:50	91-95	เขียวเข้ม	น้ำมันลีดำ
40:60	96-100	เหลืองอ่อน	น้ำมันลีเหลือง
30:70	101-110	เขียวเข้ม	น้ำมันลีดำ
20:80-chloroform	111-116	เหลืองอ่อน	น้ำมันลีเหลือง
chloroform:methanol			
90:10	117-120	เหลือง	น้ำมันลีเหลือง
80:20-50:50	121-127	เหลือง	น้ำมันลีเหลือง
40:60-methanol	128-134	เหลืองอ่อน	น้ำมันลีเหลือง

จากการใช้ TLC ตรวจสอบ fraction ต่าง ๆ ปรากฏว่า fraction ที่ 11-12 แสดงจุดกลม R_f 0.36 กำหนดให้เป็นสาร (2) fraction ที่ 13-30 ยังคงเป็นสาร (1) และ fraction ที่ 31-32 แสดงจุดกลม R_f 0.34 กำหนดให้เป็นสาร (3) จึงนำสาร (1) ไปแยกด้วยวิธีเดียวกันอีก 16 ครั้ง รวม fraction ที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วตกผลึกด้วย methanol จะได้สาร (2) เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว 120 มิลลิกรัม สาร (3) 90 มิลลิกรัม และยังมีส่วนของสาร (1) ที่ยังไม่แยกออกจากกันอีก 140 มิลลิกรัม

3.3.1.1 การตรวจลักษณะของสาร (1), (2) และ (3)

จากการทดสอบกับ Liebermann Burchard reagent ปรากฏว่าสารทั้ง (1), (2) และ (3) ให้สีม่วงแล้วเปลี่ยนเป็นสีเขียว สารทั้งสามนี้ละลายได้ดีใน hexane, ether, chloroform, และ methanol ร้อน คุณสมบัติทางกายภาพและข้อมูลทาง spectra ต่าง ๆ มีดังต่อไปนี้

<u>สาร (1)</u> มี mp. 148-154°C, R_f 0.36, MW 414 และ 412 (จาก MS ให้ M^+ ที่ m/e 414 และที่ m/e 412) ตามรูปที่ 1 หน้า 44 ^1H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shift ที่ 0.60-2.37 (c, CH, CH_2, CH_3), 3.52 (b,OH), 5.08 (m,-HC=CH-), 5.32 (m, =CH-), ตามรูปที่ 5 หน้า 46; ^{13}C NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shift ที่ 11.87-56.89 ปรากฏ 41 peaks (C, CH, CH_2, CH_3), 71.74 (<u>C</u>-OH) 70.98 (<u>C</u>-OH), 117.46, 121.63, 129.28, 129.32, 138.17, 138.27, 139.46 และ 140.71 (C=C) ตามรูปที่ 2 หน้า 44 ; GLC มี retention time 25.40, 28.40 และ 32.16 นาที ตามรูปที่ 20 หน้า 53

<u>สาร (2)</u> mp. 149-158°C ; R_f 0.36 ; MW = 414 และ 412 (MS ให้ M^+ ที่ m/e 414 และที่ m/e 412) ตามรูปที่ 7 หน้า 47; UV ให้ λ_{max} (ethanol) ที่ 202 nm. ; IR (KBr) (cm^{-1}) 3450 (OH), 2970-2900 (CH, CH_2, CH_3), 1465 (CH_2), 1390 (CH_3), 1060-1070 (OH) และ 980 ($\overset{R}{H}\!>\!C\!=\!C\!<\!\overset{H}{R}$) ตามรูปที่ 9 หน้า 48 ; ^1H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 0.7-2.31 (c, CH, CH_2, CH_3), 3.52 (b,OH), 5.09 (m,-HC=CH-), 5.35 (m, =CH-) ตามรูปที่ 12 หน้า 49 ; ^{13}C NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 11.86-56.89 ปรากฏ

36 peaks (C, CH, CH_2, CH_3), 71.77 (C-OH), 121.64, 129.30, 138.25 และ 140.74 (C=C) ตามรูปที่ 32 หน้า 56 ; GLC มี retention time 25.39 และ 28.90 นาที ตามรูปที่ 21 หน้า 53

สาร (3) mp. 145-155°C ; R_f 0.34 ; MW 414 และ 412 (จาก MS ให้ M^+ ที่ m/e 414 และ m/e 412) ตามรูปที่ 8 หน้า 47 ; UV ให้ λ_{max} (ethanol) ที่ 204 nm. ; IR (KBr)(cm^{-1}) 3450 (OH), 3000-2900 (CH, CH_2, CH_3), 1465, 1390 (CH_2, CH_3), 1107-1040 (OH), 974 ($\overset{R}{H}>C=C<\overset{H}{R}$) ตามรูปที่ 34 หน้า 57 ; ^1H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 0.55-2.4 (c, CH, CH_2, CH_3), 3.62 (b, OH), 5.16 (m, -HC=CH-) ตามรูปที่ 35 หน้า 58 ; ^{13}C NMR (δ,$CDCl_3$, off resonance) มี chemical shifts ที่ 11.89-56.19 ปรากฏ 40 peaks (ก่อนทำ off resonace, C, CH, CH_2, CH_3), 71.09 (d, C-OH), 117.49 (d, =CH-), 129.52 (d, =CH-), 138.16 (d, =CH-), 139.57 (s, =C<) ตามรูปที่ 38 หน้า 60 ; GLC มี retention time 28.30 และ 32.12 นาที ตามรูปที่ 22 หน้า 53

3.3.1.2 Hydrogenation

นำเอาสาร (1), (2) และ (3) ไปทำ hydrogenation ใช้ ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย และ palladium on charcoal (Pd/C) เป็น catalyst แล้วศึกษาข้อมูลทาง spectra ของสารที่ทำ hydrogenation นั้น ๆ ดังต่อไปนี้

สาร (1) ใช้สาร (1) 80 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 23 ซม.^{3} ที่มีหลอดนำกาซต่ออยู่กับขวด เติม ethyl acetate 15 ซม.^{3} และ Pd/C 8 มิลลิกรัม ใส่ magnetic bar ลงในขวด ล่วมปากขวดด้วยลูกโป่ง ไล่อากาศในขวดออกโดยผ่านกาซ hydrogen เข้าทางหลอดนำกาซ แล้วปล่อยออก ทำซ้ำ ๆ กัน 2-3 ครั้ง เพื่อให้อากาศในขวดถูกแทนที่หมด แล้วจึงบรรจุกาซ hydrogen ไว้ในลูกโป่งพอล่มควร ปิดหลอดนำกาซ นำขวดนี้ไปตั้งบน magnetic stirrer ทิ้งไว้ประมาณ 15 ซม. กรองเอา Pd/C ออก นำสารละลายที่ได้ไประเหยไล่ตัวทำละลายออกครึ่งหนึ่ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก จะได้ผลึกขาว แล้ว

ตกผลึกใหม่ด้วย methanol กำหนดให้เป็นสาร (4) ^{1}H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 0.54-2.37 (c, CH, CH_2, CH_3), 3.52 (b, OH) ตามรูปที่ 6 หน้า 46 แต่จากการตรวจสอบด้วย TLC ปรากฏเป็น 2 จุด มี R_f 0.61 และ 0.35 ตามลำดับ

สาร (2) ใช้สาร (2) 50 มิลลิกรัม ไปทำ hydrogenation ด้วยวิธีการเดียวกัน ใช้ Pd/C 5 มิลลิกรัม จะได้สาร (5) ^{1}H NMR (δ,$CDCl_3$) chemical shifts ที่ 0.65-2.2 (c, CH, CH_2, CH_3), 3.52 (b, OH) ตามรูปที่ 14 หน้า 50 ; ^{13}C-NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 12.01-56.52 ปรากฏ 29 peaks (C, CH, CH_2, CH_3), 71.39 (C-OH), 7.81 (C-OH, trace), 121.68 และ 124.79 (C=C, trace) ตามรูปที่ 4 หน้า 45 ; GLC retention time 29.22 และ 31.24 นาที ตามรูปที่ 26 หน้า 54 ; R_f 0.35

สาร (3) ใช้สาร (3) จำนวน 50 มิลลิกรัม ไปทำ hydrogenation ใช้ Pd/C 5 มิลลิกรัม จะได้สาร (6) มี R_f 2 ค่า เท่ากับ R_f ของสาร (4) คือ 0.61 และ 0.35 ; GLC มี retention time 28.54 และ 29.88 นาที ตามรูปที่ 42 หน้า 62

3.3.1.3 PTLC ของสาร (4) และ (6)

จากการทำ TLC ของสาร (4) และ (6) พบว่ามี 2 จุดแยกห่างกันพอที่จะทำ PTLC ได้ จึงทำการแยกสาร (4) และ (6) โดยทำ PTLC ดังต่อไปนี้

สาร (6) ใช้สาร (6) จำนวน 50 มิลลิกรัม แยกโดย PTLC โดยใช้ ethyl acetate : benzene 25:75 เป็น developing solvent ได้สารที่มี R_f 0.61 จำนวน 10 มิลลิกรัม กำหนดให้เป็นสาร (6A) ^{1}H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 0.88 (m), 1.26 (m), 1.52-2.38 (c) ตามรูปที่ 15 หน้า 50 ; GLC มี retention time 28.47 นาที ตามรูปที่ 43 หน้า 62 เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยมาก จึงทำ ^{13}C NMR ไม่ได้ ส่วนสารที่มี R_f 0.35 ได้จำนวน 30 มิลลิกรัม กำหนดให้เป็นสาร (6B) ^{1}H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 0.69-2.31 (c, CH, CH_2,

CH_3) และ 3.60 (b, OH) ตามรูปที่ 36 หน้า 58 ; ^{13}C NMR (δ,$CDCl_3$, off resonace) มี chemical shifts ที่ 12.01-56.90 ปรากฏ 26 peaks (ก่อนทำ off resonace, C, CH, CH_2, CH_3), 71.31 (d, C-OH), 126.31 และ 142.66 (s, >C=C<) ตามรูปที่ 39 หน้า 60 ; GLC มี retention time 28.47 นาที ตามรูปที่ 44 หน้า 62

ในทำนองเดียวกัน ได้แยกสาร (4) 60 มิลลิกรัม เป็นสารที่มี R_f 0.61 ซึ่งมีค่าเท่ากับ R_f ของสาร (6A) มีจำนวน 20 มิลลิกรัม กำหนดให้เป็นสาร (4A) จึงรวมสาร (4A) และ (6A) เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำ ^1H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 0.88 (c), 1.26 (s) และ 1.54-2.27 (c) ตามรูปที่ 15 หน้า 50; ^{13}C NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 11.48-56.90 ปรากฏ 46 peaks (C, CH, CH_2, CH_3) 125.33 และ 143.61 (C=C) เนื่องจากมีปริมาณน้อยมาก peaks จึงมี intensity ต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 33 หน้า 57 ส่วนสารที่มี R_f 0.35 ได้ 32 มิลลิกรัม กำหนดให้เป็นสาร (4B) ^{13}C NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 12.01-56.87 ปรากฏ 44 peaks (C, CH, CH_2, CH_3), 71.31 (C-OH), 71.39 (C-OH), 126.31 และ 142.36 (C=C) ตามรูปที่ 3 หน้า 45

3.3.1.4 ข้อมูล spectra ของ authentic samples

β-sitosterol mp. 137-8°C ; R_f 0.36 ; MW 414 ; UV ให้ λ_{max} (ethanol) ที่ 203 nm. ; IR (KBr)(cm^{-1}) 3430 (b), 2940, 2880, 1465, 1387, 1038 และ 960 ตามรูปที่ 10 หน้า 48 ; ^1H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 0.68-2.31 (c, CH, CH_2, CH_3), 3.52 (b, OH), 5.35 (m, =CH-) ตามรูปที่ 18 หน้า 52 ; ^{13}C NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 11.99-56.79 ปรากฏ 26 peaks (C, CH, CH_2, CH_3), 71.77 (C-OH), 121.64 (>C=CH-) และ 140.74 (>C=CH) ตามรูปที่ 29 หน้า 55 ; GLC มี retention time 28.88 นาที ตามรูปที่ 24 หน้า 53

stigmasterol mp. 169-170°C ; R_f 0.36 ; MW 412 ; UV ให้ λ_{max} (ethanol) ที่ 203 nm ; IR (KBr)(cm^{-1}) 3350 (b), 2970,

2900, 1465, 1390, 1065, 1030, 980 และ 969 ตามรูปที่ 9 หน้า 48 ; ^{1}H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 0.70-2.30 (c, CH, CH_2, CH_3), 3.51 (b, OH), 5.09 (m,-HC=CH-), 5.30 (m,>C=CH) ตามรูปที่ 16 หน้า 51 ; ^{13}C NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 12.05-56.87 ปรากฏ 24 peaks (C, CH, CH_2, CH_3), 71.77 (C-OH), 121.64 (>C=CH), 129.25 (-HC=CH-), 138.25 (-CH=CH-) และ 140.72 (>C=CH-) ตามรูปที่ 30 หน้า 55; GLC มี retention time 25.38 นาที ตามรูปที่ 23 หน้า 53

stigmastanol ได้จาก hydrogenation ของ β-sitosterol หรือ stigmasterol, R_f 0.35 ; MW 416 ; UV ให้ λ_{max} (ethanol) ที่ 202 nm ; IR (KBr)(cm^{-1}) 3450 (b), 2900, 2890, 1470-1460, 1380 และ 1050 ตามรูปที่ 11 หน้า 49 ; ^{1}H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 0.65-2.31 (c, CH, CH_2, CH_3) และ 3.58 (b, OH) ตามรูปที่ 17 หน้า 51 ; ^{13}C NMR (δ, $CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 12.01-56.54 ปรากฏ 26 peaks (C, CH, CH_2, CH_3) และ 71.39 (C-OH) ตามรูปที่ 28 หน้า 54 ; GLC มี retention time 29.18 นาที ตามรูปที่ 27 หน้า 54

α-spinasterol R_f 0.34 ; MW 412 ; GLC มี retention time 28.22 นาที ตามรูปที่ 25 หน้า 53

ergosterol mp. 160-3°C ; R_f 0.35 ; MW 396 ; ^{1}H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 0.63-2.45 (c, CH, CH_2, CH_3), 3.61 (b, OH), 5.20-5.57 (c,>C=CH-,-HC=CH-) ตามรูปที่ 37 หน้า 59 ; ^{13}C NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่ 12.09-55.80 ปรากฏ 20 peaks (C, CH, CH_2, CH_3), 70.44 (C-OH), 116.32 (>C=CH-), 119.59 (>C=CH-), 131.98 (-HC=CH-), 135.55 (-HC=CH-), 139.77 (>C=CH-), 141.26 (>C=CH-) ตามรูปที่ 40 หน้า 61

$\Delta^{8:14}$-ergostenol ได้จาก hydrogenation ของ ergosterol, R_f 0.31 ; MW 400 ; ^{1}H NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shifts ที่

0.69-2.31 (c, CH, CH_2, CH_3), 3.57 (b, OH), ตามรูปที่ 37 หน้า 59 ; ^{13}C NMR (δ,$CDCl_3$) มี chemical shiffs ที่ 12.81-56.83 ปรากฏ 24 peaks (C, CH, CH_2, CH_3), 71.27 (C-OH), 126.31 และ 142.66 (>C=C<) ตามรูปที่ 41 หน้า 61

3.3.2 ส่วนที่สกัดด้วย n-butanol

การทดลองที่ 1 ละลายสารที่ละลายใน n-butanol 3.22 กรัม ด้วย methano) 20 ซม.^{3} นำไปตั้งบน water bath จนละลายหมด กรองแล้วเก็บสารละลายสีน้ำตาลเข้ม ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก จะได้ผลึกใสรูปเข็ม และรูปสี่เหลี่ยมปนกับสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม เมื่อนำผลึกนี้ไปหาจุดหลอมเหลว ปรากฏว่าอุณหภูมิสูงกว่า 340°C ยังไม่หลอมเหลว ละลายได้ดีในน้ำ และให้ตะกอนขาวกับสารละลาย silver nitrate แสดงว่ามี Cl^- ให้ตะกอนละเอียดสีเหลืองกับสารละลาย sodium coboltinitrite แสดงว่ามี K^+

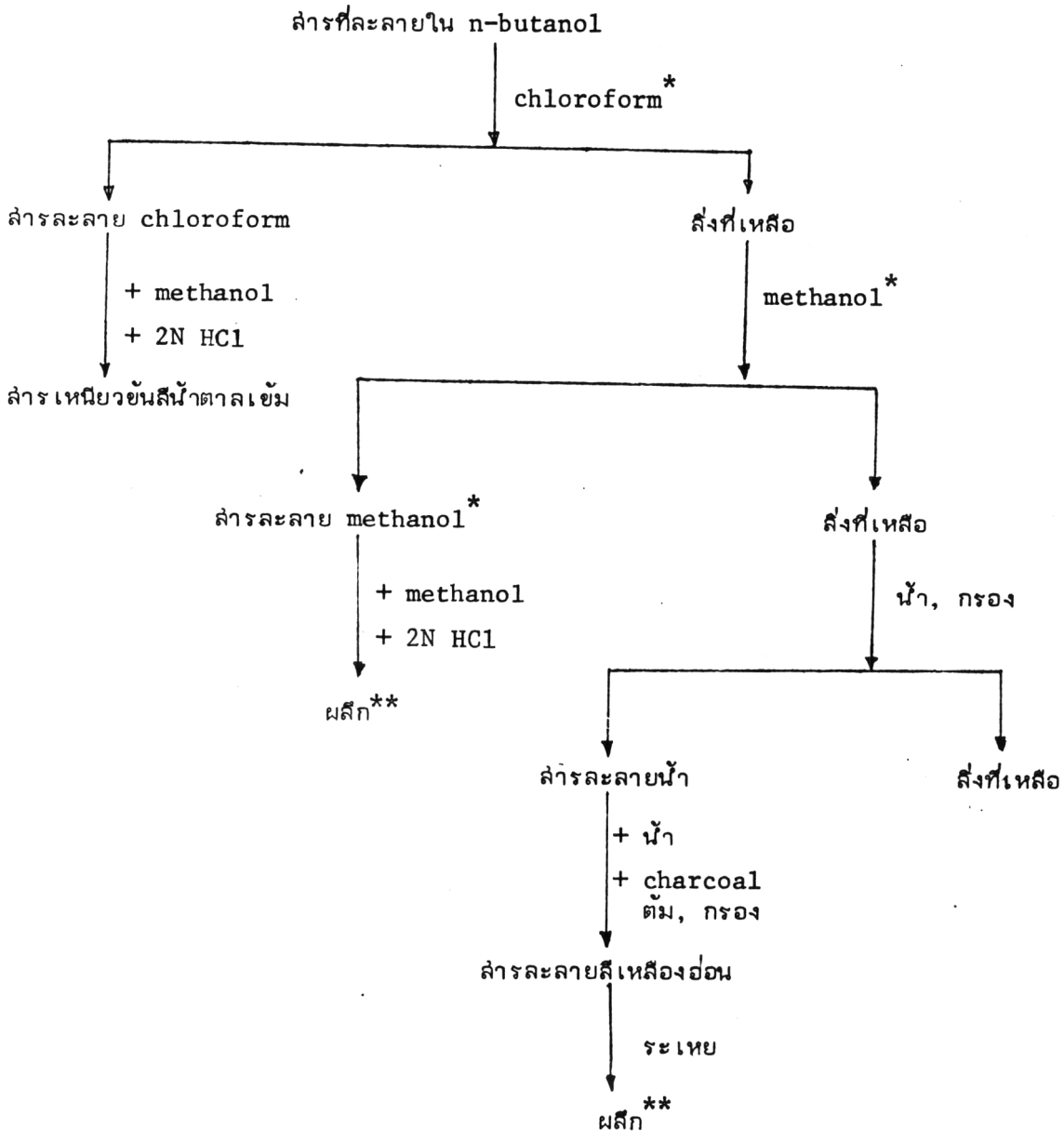
การทดลองที่ 2 นำเอาสารที่ละลายใน n-butanol 6.84 กรัม ไปละลายกับ methanol* ที่ทำให้ปราศจากน้ำมากที่สุด กรองสารละลายแล้วปล่อยไว้ให้ตกผลึก ได้ผลึกลักษณะเดียวกันกับที่ได้ในการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 นำเอาสารที่ละลายใน n-butanol 25.04 กรัม ไปละลายด้วย chloroform* และ methanol* ตามลำดับ แล้วละลายสิ่งที่เหลืออยู่ด้วยน้ำ กรองสารละลายน้ำ แล้วฟอกสีด้วย activated charcoal กรองแล้วเก็บสารละลายสีเหลืองอ่อน ไประเหยไล่ตัวทำละลายออกตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึกได้ผลึกลักษณะเหมือนที่พบในการทดลองที่ 1 แบ่งเอาสารละลาย chloroform* และ methanol* ที่ได้ข้างบนมา hydrolyse โดยเติม methanol 20 ซม.^{3} และ 2N HCl 3 ซม.^{3} ใช้ ether สกัดสารอินทรีย์ออกจากชั้นน้ำ ปล่อยให้สารละลาย ether ตกผลึก ส่วนที่ละลายใน chloroform* จะได้สารเหนียวข้นสีน้ำตาลเข้ม และส่วนที่ละลายใน methanol* ได้สารเหนียวสีน้ำตาลปนผลึกของเกลืออนินทรีย์ ดังแสดงใน scheme ที่ 4

---

*หมายถึงการทำให้ปราศจากน้ำ โดยแช่ไว้กับ sodium sulfate ที่ไร้น้ำ

scheme ที่ 4 สรุปการทดลองที่ 3



หมายเหตุ * chloroform และ methanol ที่ใช้นี้ทำให้ปราศจากน้ำด้วยการคนและตั้งทิ้งไว้กับ sodium sulfate ที่ไร้น้ำ

** ผลึกรูปเข็ม และสี่เหลี่ยมปนสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม เหมือนกับผลึกที่ได้จากการทดลองที่ 1 การที่ hydrolyse สารละลาย methanol แล้วยังมีผลึกนี้ เนื่องจาก methanol ยังมีน้ำปนอยู่ ทำให้ละลายผลึกนี้ออกมาด้วย

การทดลองที่ 4 นำเอาสารที่ละลายใน n-butanol 45.60 กรัม มาละลายด้วยน้ำกลั่น กรองแล้วเก็บสารละลาย นำไประเหยไล่น้ำออกโดยใช้ rotary evaporator ได้ผลึกเหมือนในการทดลองที่ 1 ปนกับสารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม นำเอาสิ่งที่เหลือ ที่ไม่ละลายน้ำ ไปละลายด้วย chloroform* กรองเก็บสารละลาย แล้วนำไประเหยไล่ตัวทำละลายออก จะได้สารเหนียวสีน้ำตาลเข้ม

การทดลองที่ 5 นำเอาสารที่ละลายใน n-butanol จำนวน 11.42 กรัม ไป hydrolyse ด้วย 2N HCl โดยวิธีเดียวกันกับในการทดลองที่ 3 ได้ผลึกสักษณะเดียวกันกับในการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 6 นำเอาสารที่ละลายใน n-butanol 9.30 กรัม ไปแยกโดย quick column chromatography ใช้ silica gel 60 เป็น adsorbent แล้ว elute ด้วย chloroform, chloroform:ethyl acetate, ethyl acetate, ethyl acetate:methanol, methanol, methanol:water และ n-butanol:acetic acid:water (BAW) เก็บ fraction ละ 50 ซม.^{3} นำแต่ละ fraction ไปตรวจสอบด้วย TLC รวมพวกที่เหมือนกัน ระเหยสารละลายออกจนเหลือประมาณ 20 ซม.^{3} ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก ดังแสดงในตารางที่ 4 ล้างสารที่ได้จากการรวม fraction 13-15 ด้วย hexane และตกผลึกด้วย methanol ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว 10 มิลลิกรัม R_f และ mp. บอกให้ทราบว่าเป็นสาร (1) ส่วนผลึกจาก fraction ที่ 85-138 มีลักษณะเหมือนที่ได้ในการทดลองที่ 1

ตารางที่ 4 การแยกสารที่ละลายใน n-butanol 9.30 กรัม ด้วย quick column chromatography ใช้ silica gel 60 Art, 7729 เก็บสารละลาย fraction ละ 50 ซม.^{3}

Eluent (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	fraction	ลักษณะสาร	
		สีของสารละลาย	ระเหยเหลือ 20 ซม.^{3}
chloroform	1- 4	เหลืองอ่อน	ของเหลวสีเหลือง
chloroform:ethyl acetate			
100:0-90:10	5- 8	เหลืองอ่อน	ของเหลวสีเหลือง
90:10	9-12	ชา	ของเหลวสีชา
90:10	13-15	ชาออกเหลือง	ผลึกรูปเข็มปนสารสีชา
90:10-80:20	16-19	ชา - เหลือง	สารเหนียวสีชา
70:30-40:60	20-32	ชา	สารเหนียวสีชา
40:60-10:90	33-44	เหลืองอ่อน	สารเหนียวสีเหลือง
10:90-0:100	45-57	เหลือง	สารเหนียวสีเหลือง
ethyl acetate:methanol			
100:0-90:10	58-61	ชาเข้ม	สารเหนียวสีชาเข้ม
85:15-40:60	62-70	ชา	สารเหนียวสีชา
40:60	71-84	ชา	ผลึกรูปเข็มและสี่เหลี่ยมปนสารสีน้ำตาล
40:60-30:70	85-91	ชา	ผลึกรูปเข็มและสี่เหลี่ยมปนสารสีน้ำตาล
30:70-0:100	92-120	ชาอ่อน	ผลึกรูปเข็มและสี่เหลี่ยมปนสารสีน้ำตาล
methanol:water			
80:20-50:50	121-138	เหลือง	ผลึกรูปเข็มและสี่เหลี่ยมปนสารสีน้ำตาล
BAW = 4:1:5	139-158	ชาอ่อน	สารเหนียวสีน้ำตาล

ตารางที่ 5 สรุปการทดลอง 1-6 ของสารที่ละลายใน n-butanol

การทดลอง	น.น.สาร (กรัม)	การทดลอง
1	3.22	ตกผลึกใน methanol
2	6.84	ตกผลึกใน methanol*
3	25.04	แยกโดยการละลายกับ chloroform* methanol* และน้ำกลั่น ตามลำดับ
4	4.60	แยกโดยการละลายกับน้ำกลั่น chloroform* ตามลำดับ
5	11.41	hydrolyse ด้วย 2N HCl
6	9.30	แยกโดย quick column chromatography
รวม	101.41	

3.3.3 ส่วนที่ละลายใน methanol (II)

การทดลองที่ 1 นำเอาสารที่ละลายใน methanol (II) มา 2.02 กรัม ละลายด้วย methanol* กรองได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม ตั้งไว้ให้ตกผลึก ได้ผลึกรูปเข็มและรูปสี่เหลี่ยมปนกับสารเหนียวสีน้ำตาลเหมือนในการทดลองที่ 1 ในหัวข้อ 2.3.2

การทดลองที่ 2 นำเอาสารที่ละลายใน methanol (II) 3.40 กรัม มา hydrolyse ด้วย 2N hydrochloric acid เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3 ในหัวข้อ 2.3.2 ได้ผลึกลักษณะเดียวกันกับที่ได้จากการทดลองที่ 1

3.3.4 ส่วนที่ละลายใน methanol (III)

การทดลองที่ 1 นำเอาสารที่ละลายใน methanol (III) 1.77 กรัม มาดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ในหัวข้อ 2.3.3 ได้ผลเช่นเดียวกัน

การทดลองที่ 2 นำสารที่ละลายใน methanol (III) 3.02 กรัม มาดำเนินการทดลอง เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 2 ในหัวข้อ 2.3.3 ได้ผลเช่นเดียวกัน

3.3.5 ส่วนที่ละลายในน้ำกลั่น

การทดลองที่ 1 นำเอาสารที่สกัดด้วยน้ำ 2.02 กรัม มาละลายน้ำ 15 ซม.^{3} กรองแล้วนำสารละลายสีน้ำตาลที่ได้มาเติม 2N hydrochloric acid 3 ซม.^{3} เอาไปต้มบน water bath 20 นาที ต้องคอยระวังไม่ให้น้ำแห้ง ยกลงแล้วตั้งทิ้งไว้ ได้ผลเหมือนการทดลองที่ 3 ในหัวข้อ 2.3.2

การทดลองที่ 2 นำเอาสารที่สกัดด้วยน้ำ 0.86 กรัม มาฟอกสีด้วยการต้มกับ activated charcoal กรองได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน ระเหยไล่น้ำออก จะได้ผลึกรูปเข็มปนรูปสี่เหลี่ยมปนสารสีน้ำตาลอ่อน

3.3.6 การแยกสารที่สกัดจากใบรางจืดด้วยน้ำ

ดำเนินการทดลองเป็น 3 ตอนด้วยกัน ตอนแรกเป็นการทดลองเกี่ยวกับสารที่สกัดด้วยน้ำ (I) ตอนที่สองเกี่ยวกับสารละลายที่สกัดด้วยน้ำโดยตรง และตอนสุดท้ายทดลองกับสารที่สกัดด้วยน้ำ (II) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 นำเอาสารที่สกัดด้วยน้ำ (I) มาทำการทดลองดังต่อไปนี้

(1) ละลายสารที่สกัดด้วยน้ำ (I) 1 กรัม ด้วยน้ำ 25 ซม.^{3} กรองได้สารละลายใสสีน้ำตาลเข้ม ใช้สารละลายนี้ทดสอบ cation และ anion ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงการทดสอบ cation และ anion

cation	reagents	ผล
Pb^{++}	6N ammonium acetate + 1N potassium chromate	-
Hg^{++}	stannous chloride solution	-
Cu^{++}	0.1N potassium ferricyanate	-
Fe^{+++}	0.5M potassium thiocyanate	-
Mn^{++}	6N nitric acid + sodium bismuthoxide	-
Zn^{++}	4N sodium hydroxide + dithizone solution	-
Ca^{++}	0.1N ammonium chromate + 0.4N hydrochloric acid แล้วเผาดูสีเปลวไฟ	ดูยากมีสีอิฐปน
K^{+}	6N acetic acid + sodium cobaltinitrite	+
Mg^{++}	4N ammonium hydroxide + sodium dihydrogen phosphate	-
Na^{+}	zinc uranyl acetate solution	-
anion		
$SO_4^{=}$	6N hydrochloric acid + barium chloride	ทิ้งไว้สักครู่จะขุ่นเล็กน้อย
Cl^{-}	6N nitric acid + silver nitrate solution	+
NO_3^{-}	conc. sulfuric acid + ferric sulphate	-
$PO_4^{\equiv}$	6N nitric acid + 0.5M ammonium molybdate	-

(2) ทำการ acetylate สารที่สกัดด้วยน้ำ (I) โดยใช้สารนี้ที่แห้งปราศจากน้ำ 3 กรัม บดให้ละเอียด ผสมเข้ากับ sodium acetate ที่ปราศจากน้ำ 2 กรัม

ใส่ลงในขวดกันกลม ขนาด 50 ซม.^{3} เติม acetic anhydride 20 ซม.^{3} reflux บน water bath นาน 4 ชม. แล้วเทลงใน beaker ขนาด 100 ซม.^{3} ที่บรรจุน้ำแข็งอยู่ คนแล้วตั้งทิ้งไว้ 40 นาที กรองได้ตะกอนหยาบสีน้ำตาลเข้ม ล้างตะกอนด้วยน้ำ นำเอาตะกอนที่ได้นี้มาละลายในตัวทำละลายเป็นลำดับดังต่อไปนี้

- ละลายด้วย ether เมื่อระเหยไล่ตัวทำละลายได้สารเหนียวสีเหลืองเข้ม

- ละลายด้วย ethyl acetate เมื่อระเหยไล่ตัวทำละลายพองวด เติม ether ลงไป จะได้ตะกอนขุ่นสีน้ำตาล กรองได้ตะกอนเม็ดละเอียดสีน้ำตาล เมื่อนำตะกอนนี้มาละลาย ethyl acetate อีกครั้งหนึ่ง แล้วระเหยพองวด เติม ether อีก สารละลายจะขุ่น กรองได้สารเหนียวสีน้ำตาลเข้มติดกระดาษกรอง

- ละลายด้วย chloroform เมื่อระเหยไล่ตัวทำละลายออก ได้สารเหนียวสีเหลือง

- ละลายด้วย methanol เมื่อระเหยไล่ตัวทำละลายออกได้สารเหนียวสีน้ำตาล

(3) นำเอาสารส่กัดด้วยน้ำ (I) 0.5 กรัม ละลายน้ำ 0.5 ซม.^{3} ไปทดสอบหากรดอะมิโน โดยใช้ PC ดำเนินการทดสอบตามหัวข้อ 2.1.5 ใช้ acetonitrile: 0.1M ammonium acetate (pH7) 7:3 เป็น developing solvent พบว่ามีสีและ R_f เท่ากับ histidine, glycine, serine และ methionine

(4) นำเอาสารละลายที่หา amino acid แล้วไปทดสอบหาน้ำตาลต่อ โดยใช้ PC ดำเนินการทดสอบตามหัวข้อ 2.1.5 ใช้ BBPW 5:1:3:3 เป็น developing solvent และตรวจสอบด้วยการพ่นสารละลาย aniline hydrogen phthalate ทำการทดลองอีกครั้ง แต่เปลี่ยน developing solvent เป็น phenol ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ พบว่ามี R_f และสีใกล้เคียงกับ glucose นอกจากนี้มีน้ำตาลอื่น แต่มีปริมาณน้อยมาก ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นน้ำตาลอะไร

(5) นำเอาสารที่สกัดด้วยน้ำ (I) 5.09 กรัม ละลายน้ำ 50 ซม.^{3} ไปผ่าน anion exchange resins (IRA-400) 332 กรัม ตามวิธีในหัวข้อ 2.1.6 ประมาณ

2-3 ครั้ง เก็บสารละลายที่ได้ไประเหยไล่น้ำ จนเหลือประมาณ 50 ซม.^{3} แล้วผ่านต่อไปยัง cation exchange resins (IR-120) 300 กรัม ประมาณ 2-3 ครั้ง เมื่อระเหยไล่น้ำจนแห้ง จะได้สารเหนียวลีน้ำตาลเข้ม 0.8 กรัม (2.7% จากใบแห้ง 100 กรัม) นำสารที่ได้นี้ไปทดสอบหาน้ำตาลและกรดอะมิโน ตามวิธีในข้อ ก. พบว่ามีน้ำตาล R_f ใกล้เคียงกับ glucose, arabinose, galactose, xylose และ rhamnose และไม่พบกรดอะมิโนในส่วนนี้

การทดลองที่ 2 ใบรางจืดแห้ง 100 กรัม ต้มกับน้ำกลั่น กรองจะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม ทำซ้ำใหม่จนสารละลายสีจาง รวมสารละลายทั้งหมดได้ 920 ซม.^{3} เติมสารละลาย 10% lead acetate 50 ซม.^{3} นำไปต้มประมาณ 20 นาที กรองตะกอน tannin ทิ้ง จะได้สารละลายสีเหลือง 830 ซม.^{3} ผ่านกาซ hydrogen sulfide จาก Kipp's apparatus ลงในสารละลายนี้ เพื่อตกตะกอน lead sulfide กรองตะกอนดำนี้ออก ต้มไล่กาซ hydrogen sulfide บน water bath จะได้สารละลายสีเหลือง 400 ซม.^{3} แบ่งสารละลายนี้ 100 ซม.^{3} ไปวิเคราะห์หา cation โดยใช้เครื่อง Atommic Absorbtion Spectrophotometer (AAS) ดังแสดงในตารางที่ 7

นำเอาสารละลายส่วนที่เหลือจากการแยกไปวิเคราะห์หาธาตุ จำนวน 300 ซม.^{3} ไประเหยไล่น้ำออก จะได้สารเหนียวลีน้ำตาล เมื่อเอาสารนี้ไปละลายด้วย ether*, chloroform* และ ethyl acetate* ตามลำดับ หลังจากระเหยไล่ตัวทำละลายส่วนที่ละลายใน ether* ออก จะได้สารเหนียวลีเหลือง ส่วนที่ละลายใน chloroform* และ ethyl acetate* จะได้สารเหนียวลีเหลืองอ่อน

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ของธาตุต่าง ๆ หาโดยใช้ AAS

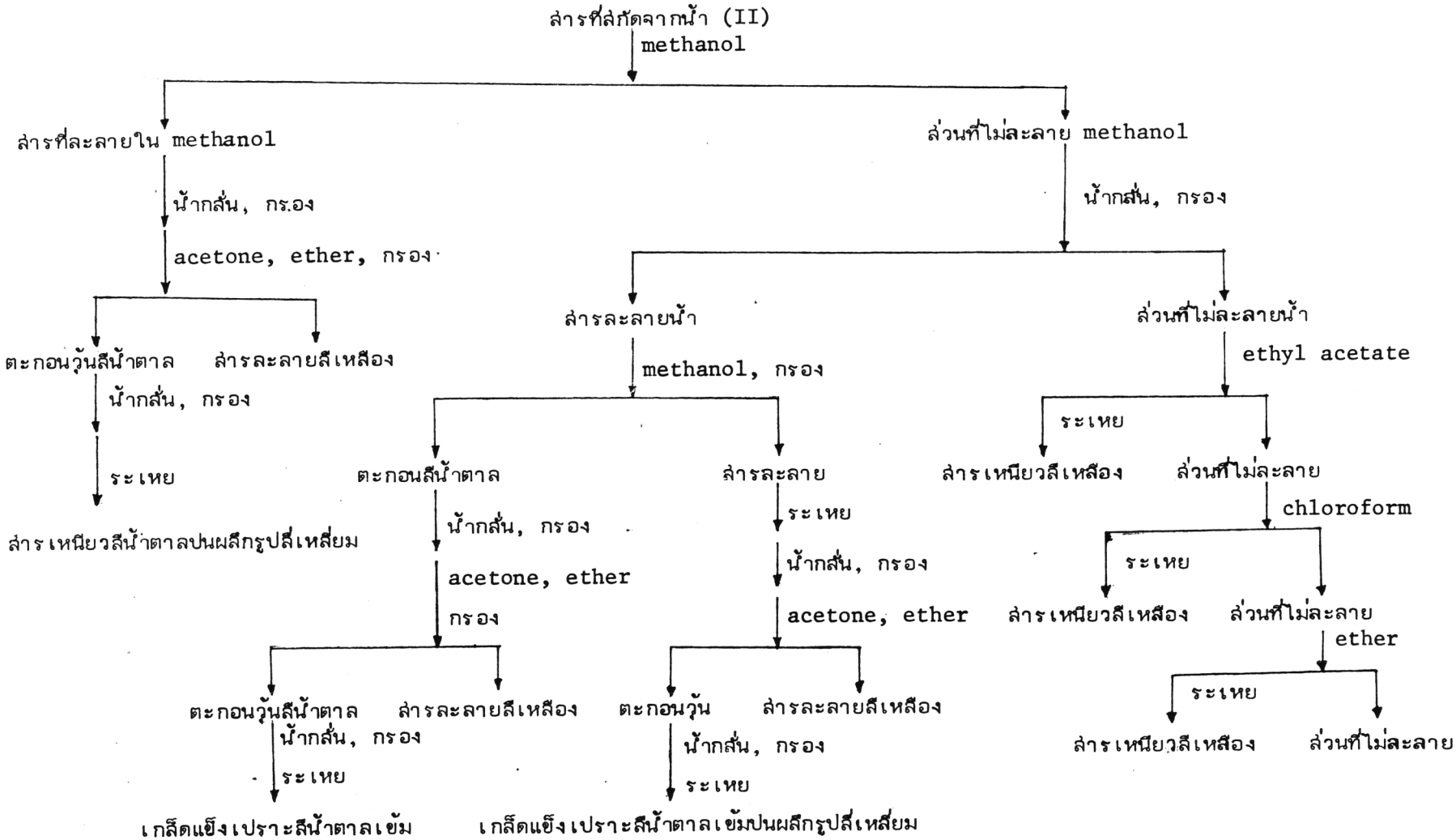
ครั้งที่	น้ำหนักใบแห้ง (กรัม)	10% lead acetate ($ซม.^3$)	สารละลาย* ($ซม.^3$)	AAS (%)					
				K^+	Mg^{++}	Na^+	Ca^{++}	Mn^{++}	Zn^{++}
1	100.00	80.00	400.00	22.00	0.30	7.8×10^{-3}	5.2×10^{-3}	7.9×10^{-4}	10.8×10^{-5}
2	200.00	160.00	250.00	12.50	0.21	3.8×10^{-3}	3.2×10^{-3}	5.0×10^{-4}	5.0×10^{-5}
3	300.00	200.00	530.00	17.70	0.27	4.0×10^{-3}	3.9×10^{-4}	6.0×10^{-4}	5.7×10^{-5}
			% average	17.40	0.26	5.2×10^{-3}	4.1×10^{-3}	6.3×10^{-4}	6.8×10^{-5}

หมายเหตุ *สารละลายที่กรอง lead sulfide และตัมไล่กาซ Hydrogen sulfide แล้ว

การทดลองที่ 3 แยกสารที่สกัดด้วยน้ำ (II) ออกเป็นส่วน ๆ ดังแสดงใน scheme ที่ 5

นำเอาสารที่สกัดด้วยน้ำ (II) 17.28 กรัม ไปละลายกับ methanol แยกเอาส่วนที่ละลายไประเหยไล่ methanol ออก จะได้สารที่ละลายใน methanol ลักษณะเหนียวสีน้ำตาล (มีผลึกปนเหมือนในสารที่สกัดด้วยน้ำ) เติมน้ำลงไปละลายในสารนี้ กรองได้สารละลายสีน้ำตาล เติม acetone สารละลายจะเริ่มขุ่น เติมต่อไปจนตะกอนไม่ตกออกมาอีก แล้วเติม ether เพื่อให้ตะกอนตกออกมาอีก กรองได้สารละลายสีน้ำตาล ทำให้งวดแล้วตั้งทิ้งไว้ ได้สารเหนียวสีน้ำตาล ส่วนตะกอนสีน้ำตาลที่ติดบนกระดาษกรองล้างออกด้วยน้ำ เมื่อระเหยไล่น้ำออก ได้สารเหนียวและมีผลึกรูปสี่เหลี่ยมปน

นำเอาส่วนที่ไม่ละลายใน methanol มาละลายน้ำ แล้วกรองแยกส่วนที่ละลายออกมา แล้วนำไประเหยให้งวด เติม methanol จะมีตะกอนขุ่น แยกเอาส่วนที่ละลายและไม่ละลายออกจากกัน นำเอาส่วนที่ไม่ละลายใน methanol ไปเติมน้ำ กรอง แล้วเติม acetone และ ether ลงไปในสารละลายนี้ จะมีส่วนที่ไม่ละลายแยกออก ลักษณะเป็นตะกอนวุ้นสีน้ำตาล ละลายได้ดีในน้ำ เมื่อระเหยไล่น้ำออก จะได้สารเป็นเกล็ดแข็งเปราะสีน้ำตาลเข้ม เกาะติดขวด นำเอาส่วนที่ละลายใน methanol ไประเหยไล่น้ำออก เติมน้ำกลั่น กรอง แล้วเติม acetone และ ether ลงไปในสารละลายนี้ แยกเอาส่วนที่ไม่ละลายออกไปละลายในน้ำ เมื่อระเหยน้ำออก จะได้สารเป็นเกล็ดแข็งเปราะสีน้ำตาลเข้ม มีผลึกรูปสี่เหลี่ยมปนเล็กน้อย

นำเอาส่วนที่ไม่ละลายทั้งใน methanol และน้ำไปละลายกับ ethyl acetate, chloroform และ ether ตามลำดับ เมื่อระเหยสารละลายแต่ละชนิดให้งวดแล้วปล่อยทิ้งไว้ จะได้สารที่ละลายในตัวทำละลายทั้งสาม มีลักษณะเป็นสารเหนียวไม่เป็นรูปผลึก

scheme ที่ 5 แสดงการแยกสารที่สกัดจากน้ำ (II)