

บทที่ 2

2.1 การทดลอง

2.1.1 Column chromatography¹¹

ใช้ Aluminium oxide S standardised for column chromatography ของบริษัท Riedel-De Haën Ag., Seelze Hannover เป็น adsorbent ส่วน column ที่ใช้เป็น column แก้ว ขนาดกว้างสม่ำเสมอ ปลายข้างหนึ่ง เรียวเล็กต่อกับสายยางที่มี clip สำหรับเปิดปิด กอนบรรจุ alumina ใส่สำลีเล็กน้อยเพื่อป้องกัน alumina ไหลออกไปกับ solvent ได้ solvent ลงไปประมาณ 2 ใน 3 ของ column แก้ว แล้วค่อยๆ ใส่อdsorbent ลงไปตามปริมาณที่ต้องการ รอจนผิว adsorbent ไม่ลดต่ำลงอีกแล้วจึงปิด clip เพื่อ ให้ solvent ไหลออกไป จนผิวหน้าของ adsorbent เกือบแห้งจึงปิด clip แล้วจึงเทสารที่ต้องการแยกลงไป

2.1.2 Thin layer chromatography^{6,15}

ใช้ Aluminium oxide DF for thin layer-chromatography ของบริษัท Riedel-De Haën Ag., Seelze-Hannover เป็น adsorbent การทำ chromatophates ใช้ Desaga spreader ที่ปรับความหนา 0.25 มม. ซึ่งเตรียมได้โดยใช้ adsorbent 40 กรัมผสมกับน้ำกลั่น 40 ม.ล. เขย่าให้เข้ากัน 1-2 นาที จะได้ chromatophates ขนาด 20 X 20 ซม. จำนวน 4 แผ่น ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที แล้วจึง activated ที่อุณหภูมิ 100-110° อีกประมาณ 30 นาที solvent system ที่ใช้มี 50 % (v/v) ether-petroleum ether, 50% (v/v) chloroform-petroleum ether, 2% (v/v) methanol-chloroform , Detecting agent ใช้ 2, 7'-dichlorofluorescein solution (0.2% in ethanol) ซึ่งเมื่อ

spray แห้งแล้วนำไปส่องใน UV-light บริเวณที่มีสารที่ต้องการจะเรืองแสง
ทำให้มองเห็น spots ต่างๆ ชัดเจนยิ่งขึ้น

2.1.3 Liebermann-Burchard reaction⁹

ละลายสารที่ต้องการทดสอบจำนวนเล็กน้อยใน chloroform 4-5 หยด
หยด acetic anhydride ลงไป 2-3 หยด และกรดกำมะถันเข้มข้น 1 หยด เขย่า
ให้เข้ากัน ถ้ามีสีเกิดขึ้นแสดงว่าสารนั้นเป็นพวก steroids หรือ triterpenoids

2.1.4 Infrared spectrum¹⁰

เครื่องมือที่ใช้คือ Microspec ของ Beckman Infrared Spectropho-
meter.
Model 1325 Cat. no. 132501Y และ Unicam SP 200G ของบริษัท Unicam
Instruments Limited, Cambridge. สารที่จะหา IR-absorption
ต้องนำไปทำเป็น KBr pellets หรือละลายใน liquid paraffin การตรวจ
ลักษณะ absorption peaks ของสารนั้นใช้วิธีเปรียบเทียบกับ standard
characteristic peaks ที่มีอยู่ใน literature

2.1.5 การหาจุดหลอมเหลว (Melting point, m.p.)

ใช้เครื่องมือของ Fisher-Johns Melting Point Apparatus.

2.1.6 การหา specific rotation, $[\alpha]$

ใช้เครื่องมือ polarimeter ของบริษัท Bellingham Stanley Limited
London. Model D₄ serial no. 632494 สารที่ต้องการหา $[\alpha]$
ต้องนำไปละลายใน chloroform และบรรจุใน cell ยาว 2 เซนติเมตร

2.2 การสกัด (Extraction)

ใบประยงค์สดหนัก 5 ก.ก. ตากให้แห้ง บดให้ละเอียดได้น้ำหนัก 1.65 ก.ก. แบ่งแช่ด้วย petroleum ether 3 ขวดๆละประมาณ 3 ลิตร แช่ไว้ 7 วัน กรองเอาสารละลายสีเขียวที่ได้ไปกลั่นเอาตัวทำละลายออก ได้สารมีลักษณะเป็นยางเหนียวสีเขียวจนเกือบดำ ส่วนกากที่เหลือก็นำไปสกัดด้วย petroleum ether อีก 2 ครั้ง รวมสิ่งที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้งได้สารที่เป็นยางข้นสีเขียวจนเกือบดำหนัก 90 กรัม (5.4% โดยน้ำหนักจากใบประยงค์แห้ง)

2.3 การแยกสาร (Separation)

นำสารที่ได้จาก 2.2 จำนวน 30 กรัมละลายใน petroleum ether 500 ม.ล. นำสารละลายนี้ลงใน column แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.2 ซม. ซึ่งบรรจุ aluminium oxide S จำนวน 400 กรัมเป็น adsorbent (ได้ column ของ alumina ยาว 52 ซม.) โดยมี petroleum ether เป็นตัวทำละลายตามการเตรียมวิธี 2.1.1 elute ด้วย petroleum ether, 10% (v/v) ether-petroleum ether, 20% (v/v) ether-petroleum ether, 50%, 75% (v/v) E+pe, ether และ chloroform โดยเก็บ elute ครั้งละ 500 ม.ล. นำแต่ละ fraction ที่ได้ไปกลั่นไล่ตัวทำละลายออกจนเหลือสารในขวดกลั่นประมาณ 50 ม.ล. ปล่อยให้ flask แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก แยกสารออกเป็นพวๆโดยใช้ TLC ได้ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1.

Eluent	จำนวน fraction fraction ละ 500m.l.	ลักษณะของสารและจุดหลอมเหลว	น.น. (กรัม)
petroleum ether	1.5	Wax สีขาว	5.30
	0.5	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	2.18
	3	น้ำมันสีเหลือง	
	4	สารสีขาว m.p.67-9 น้ำมันสีเหลือง	0.20
	6	Amorphous สีขาว m.p.84-6 (Myricyl alcohol) น้ำมันสีเหลือง	0.40
	6	Myricyl alcohol น้ำมันสีเหลือง	
10% ether- petroleum ether	1	น้ำมันสีเหลือง	
	4	Aglaiol m.p.110-2	0.25
	5	Amorphous สีขาว	
	2	น้ำมันสีเหลือง	
20% ether- petroleum ether	6	Amorphous สีขาว น้ำมันสีเหลือง	
	6	ผลึกรูปเข็มสีขาว m.p.135-7 (β -sitosterol)	0.20
	12	น้ำมันสีเหลือง	
petroleum ether	6	น้ำมันสีเหลือง	
	6	ผลึกเป็นเกล็ดไม่มีสี m.p.90-5 ผลึกรูปเข็มต่างๆ m.p.90-2	

Eluent	จำนวนfraction fraction ละ 500ม.ล.	ลักษณะของสารและจุดหลอมเหลว	น.น. (กรัม)
50 % ether- petroleum ether	2	น้ำมันดีเซล ผลึก m.p.88-90	
	15	น้ำมันดีเซล	
75% ether- petroleum ether	13	น้ำมันดีเซล	
		ผลึกรูปเข็ม m.p.198-208	
75% ether- petroleum ether	25	น้ำมันดีเซล	
		ผลึกรูปเข็ม m.p.125-7	0.18
		(Aglaiondiol)	
		Amorphous สีขาว	
ether	12	น้ำมันดีเซล	
		Amorphous สีขาว	
chloroform	1	น้ำมันดีเซลเข้มข้น	
	2	น้ำมันดีเซลน้ำตาลเข้ม	
	8	น้ำมันดีเซล	
		ผลึกรูปเข็ม m.p.165-7	0.12
		(AgIaitriol)	

นอกจากนี้ยังได้นำส่วนของ alumina ใน column ตอนล่างที่มีดีเซลลงไปจน
ถึงขาวมาสกัดด้วย acetone โดยใช้ Soxhlet extractor ก็จะได้ aglaitriol
ออกมากับน้ำมันดีเซล

2.4 การทำสารใหม่บริสุทธิ์ (Purification)

2.4.1 Aglaiol

จากการใช้ TLC ตรวจสอบใน fractions ต่างๆ aglaiol จะถูก elute ออกมาด้วย petroleum ether และ 10% ether-petroleum ether สิ่งที่จะออกมาด้วยก็มีน้ำมันสีเหลือง, Myricyl alcohol และ Amorphous สีขาว นำผลรวมของ fraction ต่างๆ ที่มี aglaiol มาตกผลึกหลายๆ ครั้งด้วย petroleum ether alcohol จะตกผลึกออกมาก่อน เมื่อกรองเอา myricyl alcohol ออกไปหมดแล้ว ตั้งทิ้งไว้ aglaiol จะตกผลึกออกมา ที่เหลือก็จะเป็นน้ำมันสีเหลืองกับ amorphous สีขาว ส่วนของ aglaiol ที่ตกผลึกออกมาก็นำมาตกผลึกใหม่หลายๆ ครั้งด้วย petroleum ether จนได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 110-2 °C (0.250 กรัม (0.8 % จาก crude extract))

ในการทำ aglaiol ใหม่บริสุทธิ์ โดยการนำมาตกผลึกหลายๆ ครั้งด้วย petrol. ether นั้นต้องเสียเวลามาก ดังนั้นจึงนำ aglaiol ไปเตรียมเป็น acetate¹⁴ โดยละลาย aglaiol ใน pyridine และใส่ acetic anhydride ลงไป ตั้งทิ้งไว้ ชั่วโมง เกล่งในน้ำเย็น กรองเอาสารสีขาวออก ทำให้แห้ง แล้วจึงนำมาตกผลึกใหม่ด้วย petroleum ether ได้ acetate m.p. 161-2 °C นำ acetate ที่ได้นี้ไป hydrolysis ด้วยสารละลาย alcoholic KOH ก็จะได้ aglaiol กลับมา แล้วจึงนำ aglaiol ที่ได้นี้ไปตกผลึกใหม่ด้วย petroleum ether

2.4.2 Aglaiondiol

เมื่อ elute column ด้วย 75 % ether-petroleum ether ได้ Aglaiondiol ออกมาพร้อมกับน้ำมันสีเหลืองและ amorphous สีขาวเล็กน้อย นำผลรวมของ fraction เหล่านี้มาตกผลึกใน ether-petroleum ether (1:2) aglaiondiol ตกผลึกออกมาเป็นรูปเข็ม กรองเอาผลึกออกและนำมาตกผลึกใหม่อีก 2-3 ครั้งจนได้ผลึกรูป

เข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 125-7 °C หนัก 0.180 กรัม (0.6% โดยน้ำหนักจาก crude extract)

2.4.3 Aglatriol

ได้จาก fraction ที่ elute ด้วย chloroform ร่วมกับส่วนที่สกัด column ด้วย acetone aglatriol ตกผลึกออกมาเป็นรูปเข็มสีขาว จึงแยกออกจากน้ำมันสีเหลืองได้ นำผลึกที่ได้ทั้งหมดมาตกผลึกใหม่โดยใช้ methanol จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 165-7 °C หนัก 0.12 กรัม (0.4% โดยน้ำหนักจาก crude extract)

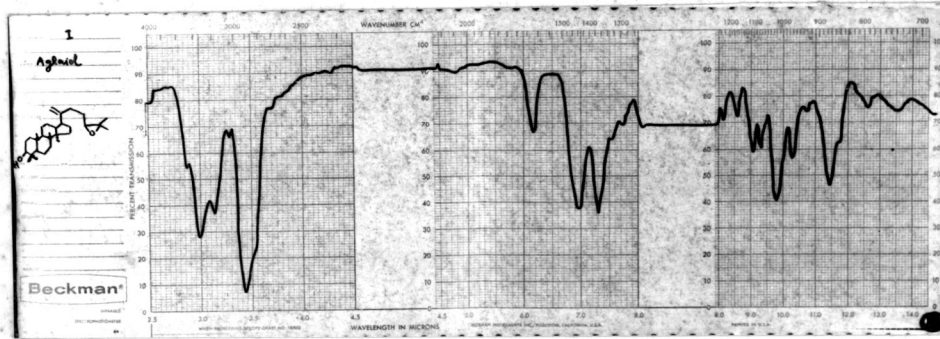
2.5 การศึกษาสมบัติทางเคมีและปฏิกิริยาเคมี

นำสารที่บริสุทธิ์ที่สำคัญ 3 ตัวคือ aglaiol, aglaiondiol และ aglatriol ไปวิเคราะห์หารากต่างๆ ทำ spectra ทดลองปฏิกิริยาและเตรียมอนุพันธ์ เพื่อยืนยันว่าสารที่สกัดออกมาได้นั้นมีสูตรโครงสร้างตามที่เสนอไว้แล้ว

2.5.1 Aglaiol


สารนี้เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 110-2 °C ละลายได้ดีใน org. solvent ต่างๆ ให้ color test กับ Liebermann-Burchard reagent ฟอกสี Br_2 in CCl_4 และ KMnO_4 solution¹⁵ ซึ่งแสดงถึง unsaturation ทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride in pyridine ให้ acetate ไม่ให้สีกับ ferric chloride¹⁶ แสดงว่ามี OH-group ชนิด alcoholic group

เพื่อหา specific rotation, $[\alpha]_D^{25}$ ใน chloroform ได้ $[\alpha]_D^{25} = +47.4$
(0.29247/25 กรัม/ม.ล. , CHCl_3)

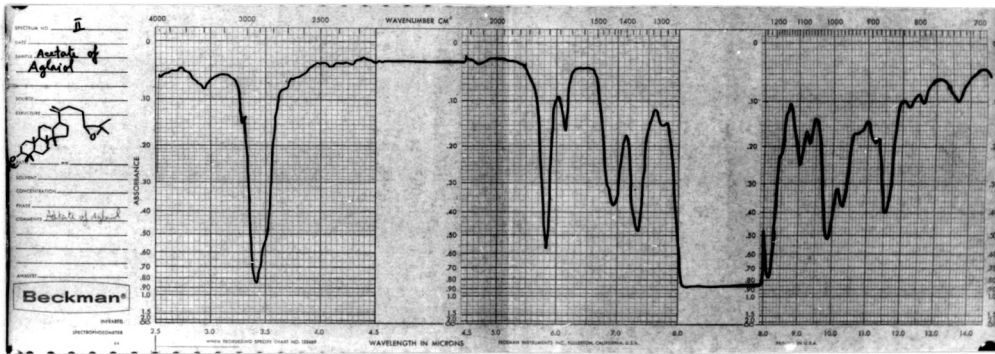


รูปที่ 1 IR-spectrum ของ Aglaiol

แสดง absorption peak ดังนี้

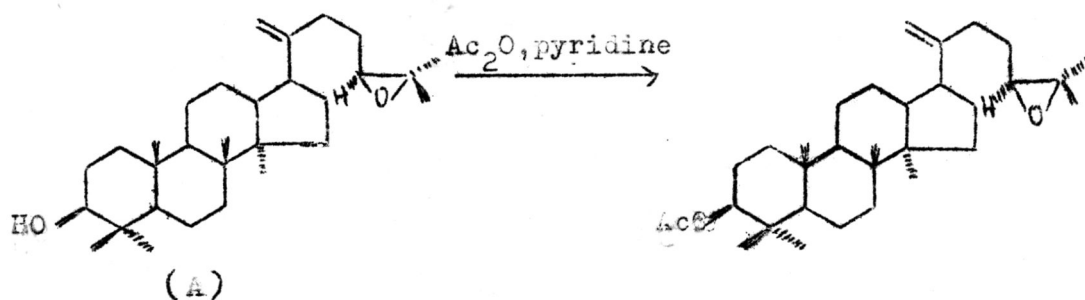
<u>Group</u>	<u>Band (cm⁻¹)</u>
-OH	3120-3500 (very broad)
$R_2R_1C=CH_2$	3080
	1640
	890
	1260
	880
	810
	760
$^1-CH-, -CH_2-, \text{ and } -CH_3$	2960
	2860
	1460
	1390

เมื่อนำ aglaiol มาทำ acetylation โดยใช้ acetic anhydride ใน pyridine จะได้ acetate เป็นผลึกรูปเข็ม มีจุดหลอมเหลว 161-2 และ IR-absorption ที่เพิ่มขึ้นคือ band ที่ 1735, 1210 และ 1030 cm^{-1} ซึ่งตรงกับ $\text{R}-\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}-\text{CH}_3$ ส่วน band ที่ 3120-3500 cm^{-1} และ 1050 cm^{-1} ของ alc. -OH หายไปและมี specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = +55.8$ (0.53136/25 กรัม/ม.ล. , CHCl_3)



รูปที่ 2 IR-spectrum ของ Acetate ของ Aglaiol

จาก IR-spectra และการทดลองต่างๆ ยืนยันว่าสารที่มีจุดหลอมเหลว 110-2 ที่แยกออกมาได้นี้คือ aglaiol (lit., m.p. 113-4) มีสูตรโครงสร้างเป็น (A) ซึ่งใช้เป็นสารสำหรับ confirm สูตรโครงสร้างของ aglaiondiol และ aglatriol
ต่อไป



Aglaiol, $C_{30}H_{50}O_2$, m.p. 110-2

Acetate of Aglaiol, $C_{32}H_{52}O_3$,
m.p. 161-2

2.5.1.1 Hydration of Aglaiol

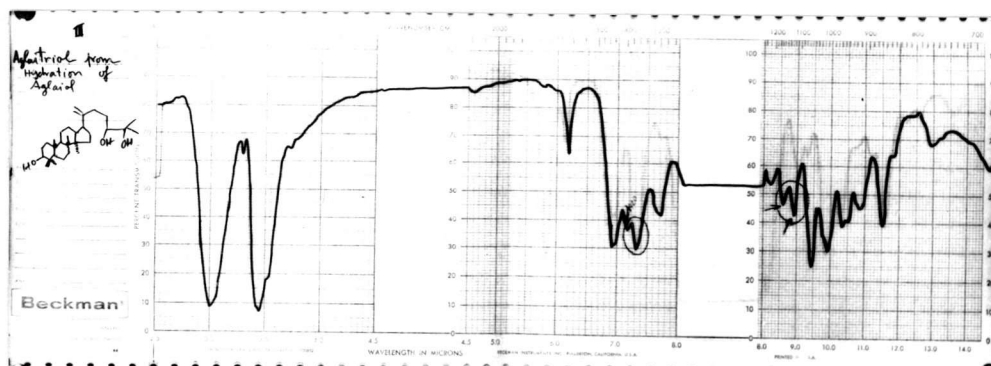
2.5.1.1.1 โดยใช้ aqueous acetone/ H_2SO_4 aglaiol หนัก 300 ม.ก. ละลายใน acetone 5 ม.ล. ใส่สารละลายของกรดกำมะถันเข้มข้น 1 หยดในน้ำ 5 ม.ล. ลงไป เขย่าอย่างแรงให้สารละลายเข้ากัน ใช้ magnetic stirrer คนประมาณ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วทิ้งไว้อีก 22 ช.ม. สกัดผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย ether แยกสารประกอบออกจากกันด้วย column chromatography โดยใช้ aluminium oxide 15 กรัมเป็น adsorbent elute ด้วย petroleum ether, 10% ether-petroleum, ether และ acetone ได้ aglaiol ส่วนที่ไม่ถูก hydrated ออกมา 100 ม.ก. (ออกมาใน 10% ether-petroleum ether) ได้สาร m.p. 182-3 ออกมากับ fraction ของ acetone หนัก 100 ม.ก.

2.5.1.1.2 โดยใช้ aqueous dioxane/ $HClO_4$ aglaiol หนัก 100 ม.ก. ละลายใน dioxane 10 ม.ล. ใส่สารละลาย 1 หยดของ 6N. $HClO_4$ ในน้ำ 5 ม.ล. ลงไป เขย่าให้เข้ากันแล้ว reflux บน water bath ประมาณ 10 นาที ทำให้เย็น เติลงในน้ำเย็น แล้วจึงสกัดด้วย ether ต่อจากนั้นก็ทำตามวิธี 2.5.1.1.1 ได้สารผลิตภัณฑ์เพิ่มสีขาว m.p. 182-3 หนัก 75 ม.ก. มี specific rotation, $[\alpha]_D^{25}$

= + 41.5 (0.08132/25 กรัม/ม.ล., CHCl₃)

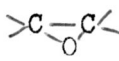
ตารางที่ 2 การแยก Hydrated product ของ Aglaiol

eluent	จำนวน fraction fraction ละ 50 ม.ล.	สารที่ได้
petroleum ether	2
10% ether- petroleum ether	3	aglaiol
ether	2
acetone	3
	2	aglaitriol
	1



รูปที่ 3 IR-spectrum ของสารจุดหลอมเหลว 182-3
ที่ได้จาก Hydration of Aglaiol

แสดง absorption peaks ดังนี้

<u>Group</u>	<u>Band(cm⁻¹)</u>
-OH	3120-3600 (very broad)
R ₁ R ₂ C=CH ₂	3090 1640 890
	absent
-CH-, -CH -, and -CH	2980, 2960 2880 1460 1390

IR-spectrum ของสารที่ได้มี major peaks เกือบทั้งหมดเหมือนกับ IR-
ของ aglatriol ที่สกัดได้จากธรรมชาติ(รูปที่ 8 หน้า 22) มีเพียง 2 แห่งที่ต่าง
กันคือ

1. peak ที่ 1390 cm⁻¹ ของ aglatriol ที่ได้จากธรรมชาติเป็น singlet
แต่ที่ได้จาก hydration ของ aglaiol เป็น doublet คือ peak 1420cm⁻¹(weak)
split จาก 1390cm⁻¹

2. peak ที่ประมาณ 1190 cm⁻¹ ของ aglaiol จากธรรมชาติมี intensi-
ตสูงกว่า peak ที่ประมาณ 1150 cm⁻¹ แต่สารที่ได้จากปฏิกิริยา hydration of
aglatriol นี้แสดงกลับกัน

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเตรียม triacetate ของสารที่ได้จาก hydration of
aglatriol เพื่อเปรียบเทียบกับ triacetate ของสารที่ได้จาก aglatriol จากธรรมชาติ

2.5.1.2 Triacetate¹⁴ of Aglatriol from Hydration of Aglaiol

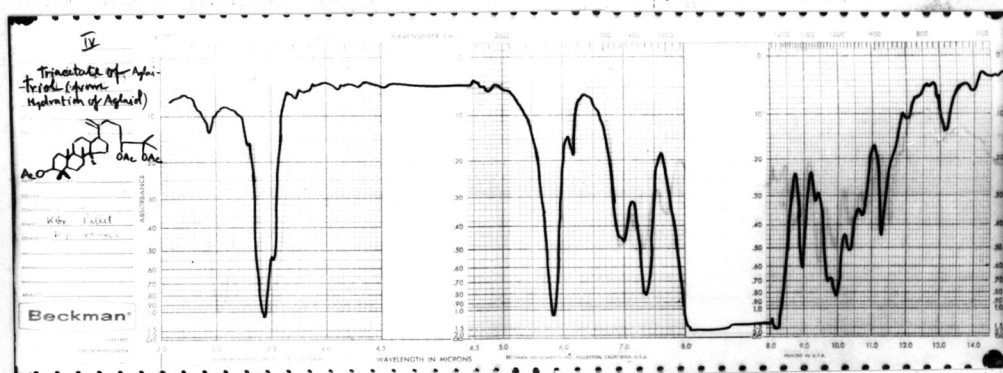
สารที่มีจุดหลอมเหลว 482-3 นมก. 70 ม.ก. ละลายใน pyridine ม.ล. เติม acetic anhydride 3 ม.ล. เขย่าให้เข้ากัน reflux บน water bath 6-8 ช.ม. ทำให้เย็นแล้วเทลงในน้ำซึ่งผสมน้ำ 50 ม.ล. กรองและล้างตะกอนสีขาวที่ได้ด้วยน้ำเย็นหลายครั้ง นำตะกอนที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60-70 ละลายตะกอนที่แห้งนี้ด้วย petroleum ether ประมาณ 5 ม.ล. ผ่านสารละลายที่เคลือบ ใน column chromatography ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 cm. ใช้ alumina 510 กรัมเป็น adsorbent elute column ด้วย petroleum ether, 10% ether-petroleum ether และ 50% ether-petroleum ether โดยเก็บ fraction ละ 50 ม.ล.

ตารางที่ 3

การแยก Triacetate ของสารที่ได้จาก Hydration of Aglatriol

eluent	จำนวน fraction fraction ละ 50 ม.ล.	สารที่ได้
petroleum ether	4
10 % ether- petroleum ether	8	Triacetate, p. 164-6
50 % ether- petroleum ether	4	diacetate
ether	4

แต่จะ fraction เมื่อทำ TLC เทียบกับ triacetate และ diacetate ของ aglatriol ที่ได้จากธรรมชาติ ปรากฏว่าสารที่ออกมาถึง 10 % ether-petroleum ether มี Rf-value เท่ากับ triacetate ของ aglatriol ที่ได้จากธรรมชาติ จึงนำสารที่ได้นั้นมาตกผลึกใหม่ใน petroleum ether ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 164-6 °C หนัก 20 ม.ก.



รูปที่ 4 IR-spectrum of Triacetate of Aglatriol from Hydration of Aglatriol

แสดง absorption ดังนี้

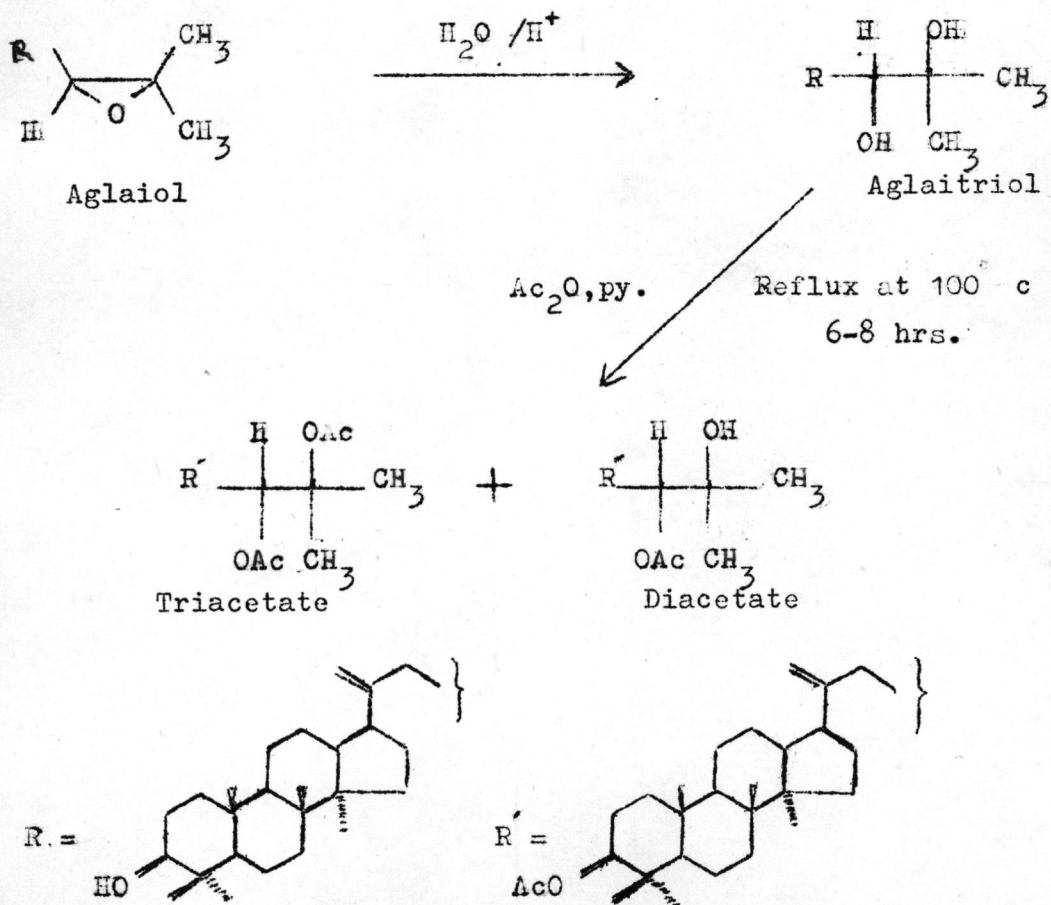
<u>Group</u>	<u>Band (cm⁻¹)</u>
-OH	absent
$R_1R_2C=CH_2$	3100
	1650
	905
$R-O-\overset{\overset{O}{ }}{C}-CH_3$	1735
	1260
	1025

002046

<u>Group</u>	<u>Band (cm⁻¹)</u>
-CH-, -CH ₂ -, and -CH ₃	2990, 2970
	2890
	1460
	1380

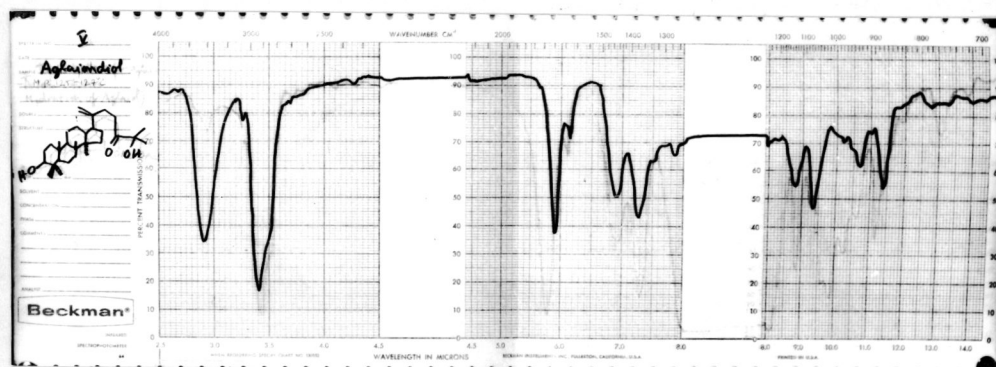
เมื่อเปรียบเทียบ IR-spectrum ของ triacetate นี้กับ triacetate ที่ได้
จาก aglatriol จากธรรมชาติ ที่มีจุดหลอมเหลว 163-4 แล้วปรากฏว่าเหมือน
กันและทำการ mixed m.p. ไม่ลดลง

รวมปฏิกิริยาที่ได้จาก 2.5.1 ทั้งหมดดังนี้



2.5.2 Aglaiondiol

สารนี้เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 125-7 ละลายได้ใน ether, chloroform, benzene, methanol, ethanol และ acetone ละลายได้บ้างใน petroleum ether ที่ร้อน ไม่ละลายน้ำ ให้ color test กับ Liebermann-Burchard reagent ฟอกสี Br_2 in CCl_4 และ KMnO_4 solution แสดงว่ามี unsaturation ทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride in pyridine ให้ acetate เกิดขึ้นและไม่ให้สีกับ ferric chloride แสดงว่า -OH เป็น alcoholic group ทำเป็น 2,4-dinitrophenylhydrazone ได้¹⁷ แสดงว่ามี $-\text{C}=\text{O}$ ในโมเลกุล มี specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = +97.3$ (0.37226/25 กรัม/น.ล., CHCl_3)



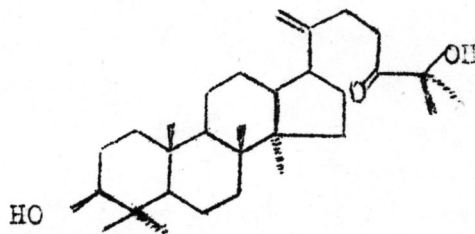
รูปที่ 5 IR-spectrum of Aglaiondiol

แสดง absorption peaks ดังนี้

Group	Band (cm^{-1})
-OH	3200-3600 (very broad)
$\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$	3080
	1640
	890

Group	Band (cm ⁻¹)
$\overset{\text{O}}{\parallel}$ -C- (carbonyl)	1715
-CH-, -CH ₂ -, and -CH ₃	2960
	2860
	1460
	1390

จากคุณสมบัติและปฏิกิริยาทางเคมีรวมทั้ง IR-spectrum ของสารที่สกัดออกมา
ได้นี้เหมือนกับที่กล่าวไว้ใน literature และเสนอสูตรโครงสร้างเป็น



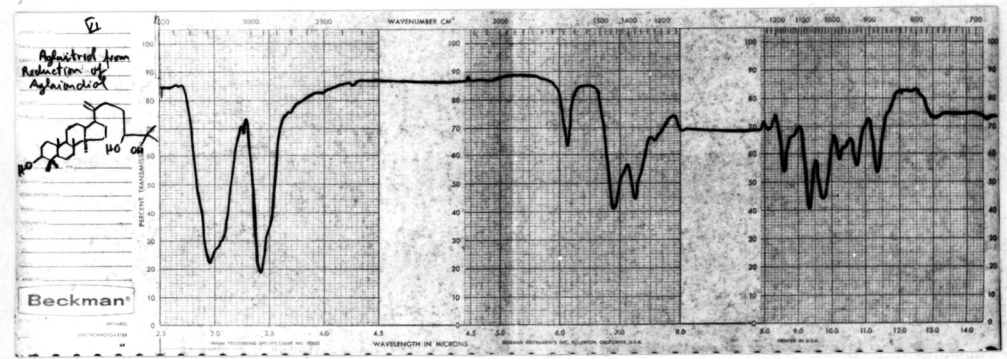
2.5.2.1 Reduction of Aglaiondiol

ทำตามวิธีของ Nystom & Brown^{3, 12}

ใช้ LiAlH₄ 5 กรัมใน anhydrous ether 100 ม.ล. ผสมกันในขวดก้นกลม
ขนาด 250 ม.ล. ตั้งอยู่กับ condenser ซึ่งตอนบนมี anhydrous calcium chloride
tube ติดอยู่ อีกข้างหนึ่งของคอขวดมี separatory funnel ขนาด 50 ม.ล. บรรจุ
สาร m.p. 125-7 300 ม.ก. ละลายใน anhydrous ether 10 ม.ล. ค่อยๆ
หยดสารละลายของ aglaiondiol ลงไปในขวดก้นกลมซึ่งมี magnetic stirrer
กวนสารละลายอยู่ตลอดเวลา เมื่อหยดสารละลายหมดแล้วก็กวนต่อไปอีก 4-5 ช.ม.
นำสารละลายในขวดก้นกลมที่ได้ไป decompose ด้วยสารละลายกรดกำมะถันเจือจาง
ได้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น เอาชั้นบนซึ่งเป็นชั้นของ ether ออก เอาชั้นน้ำไปสกัด
ด้วย ether อีก 2 ครั้งๆ ละ 100 ม.ล. รวม ether solution ทั้งหมดแล้วล้างด้วย

สารละลายเจือจางของ NaHCO_3 และนำตามลำดับ

นำ ether solution ที่ล้างด้วยน้ำแล้วไปทำให้แห้งจากน้ำด้วย anhydrous Na_2SO_4 กรองเอา Na_2SO_4 ออก นำสารละลาย ether ที่ได้ไประเหยเอา ether ออกจนหมดจะเหลือของแข็งสีขาว เมื่อนำไปตกผลึกใน methanol ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 200 ม.ก. มีจุดหลอมเหลว 175-7, $[\alpha]_D^{25} = +50.5$ (0.10400/25 กรัม/ม.ล., CHCl_3)



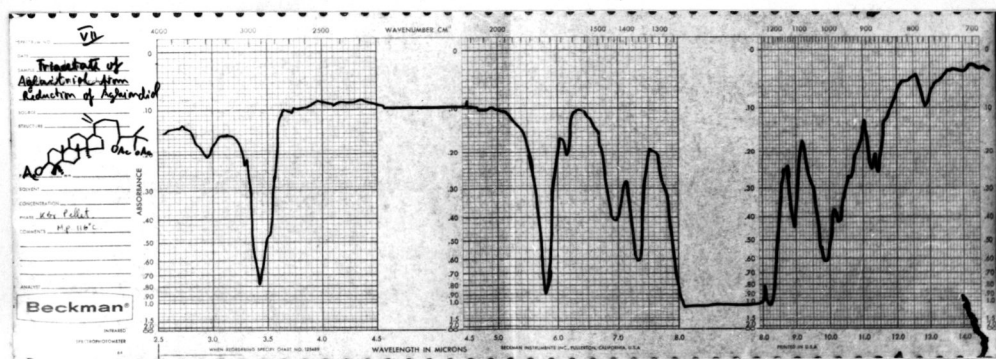
รูปที่ 6 IR-spectrum ของสารที่ได้จาก Reduction ของ Aglaiondiol

แสดง absorption peaks ดังนี้

Group	Band(cm^{-1})
-OH	3120-3700 (very broad)
$\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$	3090
	1645
	895
$\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{-}$ (carbonyl)	absent
$\text{-}\overset{ }{\text{C}}\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-}$, and -CH_3	2980, 2960, 2890
	1460, 1395

เมื่อเปรียบ IR-spectrum ของสารที่ได้จาก reduction ของ aglaiondiol กับ aglatriol ที่สกัดได้จากธรรมชาติปรากฏว่าเหมือนกัน (รูปที่ 8 หน้า 22)

2.5.2.2 Triacetate of Aglatriol from Reduction of Aglatriol
นำ aglatriol จุกหลอมเหลว 175-7 ที่ได้จาก reduction ของ aglaiondiol หนัก 70 ม.ก. ละลายใน pyridine 5 ม.ล. เติม acetic anhydride 3 ม.ล. เขย่าให้เข้ากันและ reflux ใน water bath ประมาณ 6-8 ชั่วโมง และทำการทดลองต่อไปตามวิธีของ 2.5.1.2 โคนลิคสีขาวมีจุกหลอมเหลว 114-6 ออกมาใน fraction ของ petroleum ether และใน 10 % ether - petroleum ether มี Rf-value เท่ากับ triacetate ของ aglatriol ที่ได้จากธรรมชาติ โคนสารหนัก 25 ม.ก.



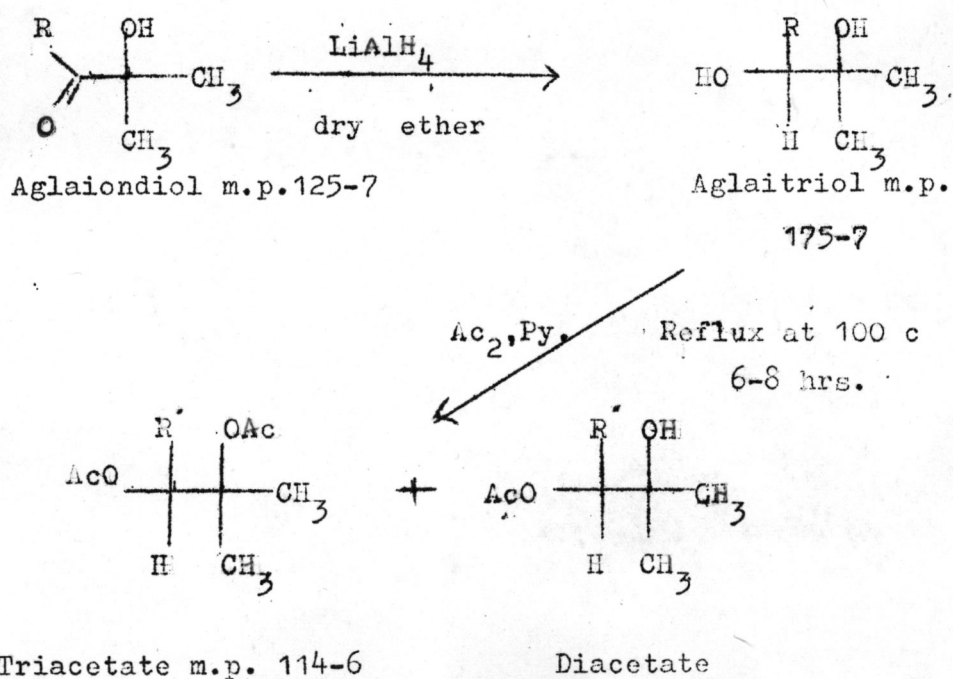
รูปที่ 7 IR-spectrum Triacetate ของ Aglatriol ที่ได้จาก Reduction of Aglaiondiol

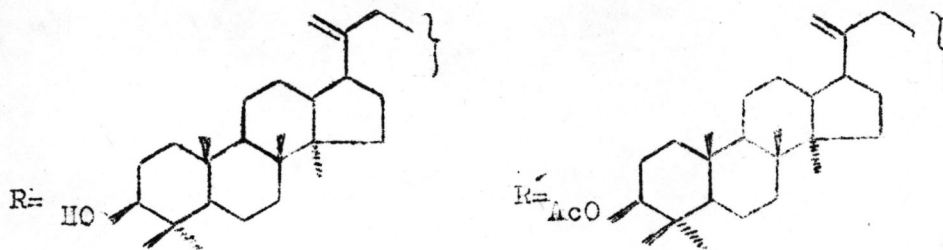
แสดง absorption peaks ดังนี้



<u>Group</u>	<u>Band (cm⁻¹)</u>
-OH	absent
R ₁ R ₂ C=CH ₂	3090 1650 890
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{O}-\text{C}-\text{CH}_3 \end{array}$	1740, 1250, 1030
$\begin{array}{c} \\ -\text{CH}-, -\text{CH}_2-, \text{ and } -\text{CH}_3 \end{array}$	2970, 2870 1460, 1380

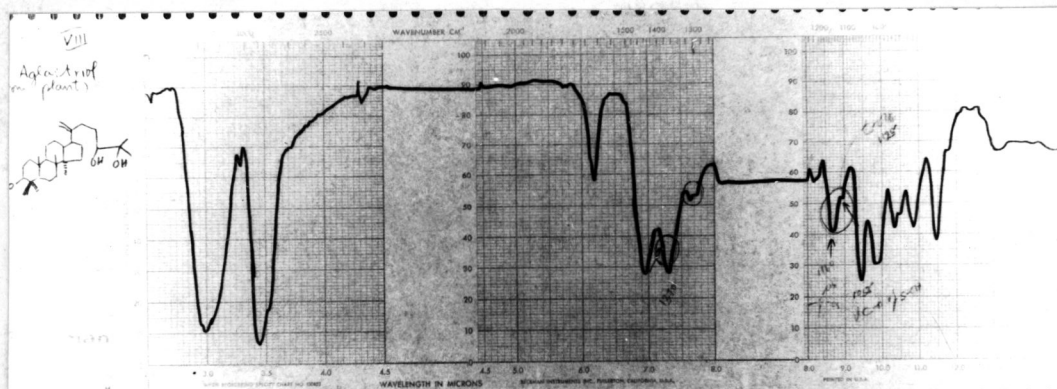
เมื่อเปรียบเทียบ IR-spectrum ของ triacetate m.p. 114-6 นี้กับ triacetate m.p. 116-8 ที่ได้จาก aglatriol จากธรรมชาติแล้วปรากฏว่า absorption peaks เหมือนกันทั้งหมดและทำการ mixed m.p. ไม่ลดลง ปฏิกริยาเคมีของ aglaiondiol ที่ทำการทดลองมีดังนี้





2.5.3 Aglaitriol

สารนี้เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 165-7 ละลายได้ใน CHCl_3 , acetone, benzene หรือ methanol และ ethanol ละลายได้เล็กน้อยใน ether ไม่ละลายใน petroleum ether และน้ำ ให้ color test กับ Liebermann-Burchard reagent, ฟอกสี Br_2 in CCl_4 และ KMnO_4 solution แสดงว่ามี unsaturation ทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride ใน pyridine ให้ acetate ไม่ให้สีกับ ferric chloride แสดงว่ามี alcoholic-OH group ไม่เกิดปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine มี specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = +46.6$ (0.12603/25 กรัม/ม.ล., CHCl_3)



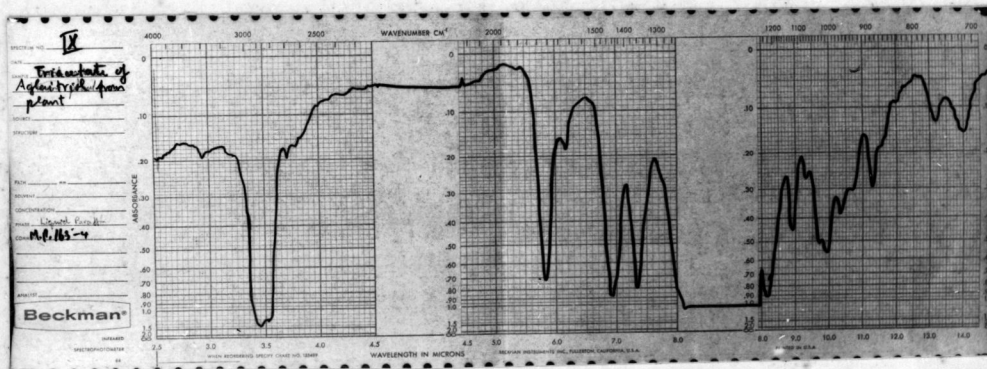
รูปที่ 8 IR-spectrum ของ Aglaitriol จากธรรมชาติ

แสดง absorption peaks ดังนี้

<u>Group</u>	<u>Band (cm⁻¹)</u>
-OH	3120-3700 (very broad)
R ₁ R ₂ C=CH ₂	3100
	1640
	890
¹ -CH-, ¹ -CH ₂ , and -CH ₃	2980, 2960
	2890
	1470, 1460
	1390

2.5.3.1 Acetylation¹⁴ of Aglatriol (from plant) นำ

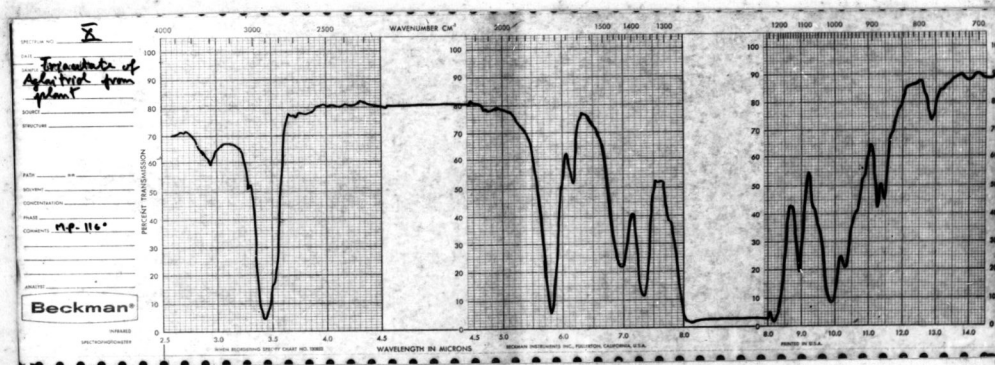
aglatriol จุดหลอมเหลว 165-7 หนัก 100 ม.ก. ละลายใน pyridine 5 ม.ล. ใส่ acetic anhydride 3 ม.ล. แล้วทำตามวิธี 2.5.1.2 ได้ triacetate ออกมา 2 ตัว มี Rf-value เท่ากัน นำมาตกผลึกใน petroleum ether ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 163-4 ตกผลึกออกมาก่อน ส่วนที่เหลือใน mother liquor ปล่อยให้สารละลายเกือบแห้งได้ผลึกรูปแผ่นบางๆ ล้างผลึกด้วย petroleum ether หากจุดหลอมเหลวได้ 116-8



รูปที่ 9 IR-spectrum ของ Triacetate ของ Aglaitriol
จากธรรมชาติ ตัวที่มีจุดหลอมเหลว 163-4

แสดง absorption peaks ดังนี้

<u>Group</u>	<u>Band (cm⁻¹)</u>
-OH	absent
$R_1R_2C=CH_2$	3100
	1650
$\begin{array}{c} O \\ \\ R-O-C-CH_3 \end{array}$	905 (singlet)
	1735
	1260
	1025
$-CH-, -CH_2-, \text{ and } -CH_3$	2970
	2890
	1480, 1450
	1380



รูปที่ 10 IR-spectrum ของ Triacetate ของ Aglatriol
จากธรรมชาติ ตัวที่มีจุดหลอมเหลว 116-8

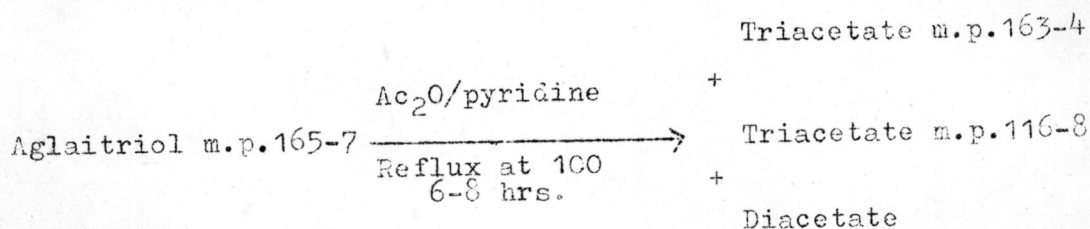
แสดง absorption peaks ดังนี้

<u>Group</u>	<u>Band (cm⁻¹)</u>
-OH	absent
R ₁ R ₂ -C=CH ₂	3090
	1650
	905 } doublet
	890 }
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R-O-C-CH}_3 \end{array}$	1735
	1250, 1030
-CH-, -CH ₂ -, and -CH ₃	3000, 2970
	2870
	1475, 1460
	1395, 1380

เมื่อเปรียบเทียบ IR-spectrum ของ triacetate ทั้ง 2 ตัวพบว่า major peaks ส่วนใหญ่เหมือนกัน แต่มี 2 peak ที่ต่างกันคือ

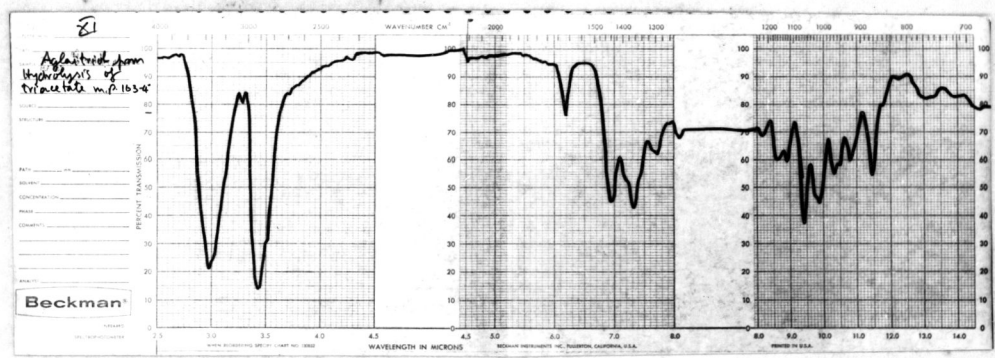
1 triacetate m.p. 163-4 มี peak ที่ 1100 cm^{-1} แต่ใน triacetate m.p. 116-8 peak ที่ 1100 cm^{-1} ไม่แสดงออกมา

2 triacetate m.p. 163-4 มี peak ที่ 905 cm^{-1} เป็น singlet แต่ใน triacetate m.p. 116-8 เป็น doublet ที่ 890 cm^{-1} และ 905 cm^{-1}



2.5.3.2 Hydrolysis¹⁹ of triacetate m.p. 163-4

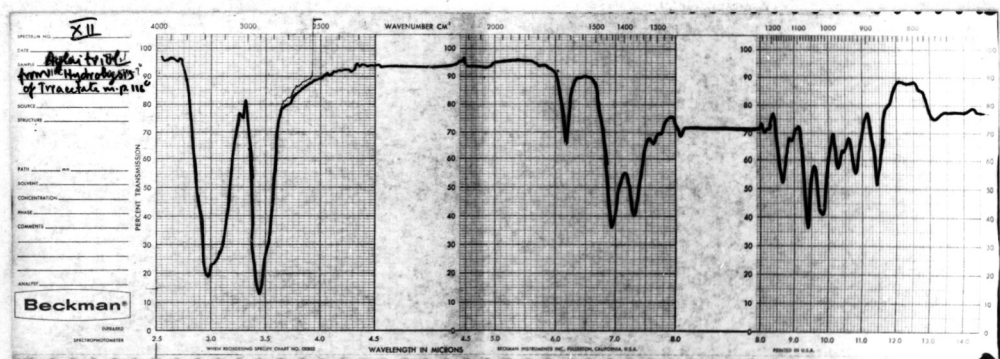
triacetate m.p. 163-4 หนัก 30 ม.ก. ละลายใน methanol 10 ม.ล. ใส่สารละลาย 10 % KOH 5 ม.ล. เขย่าให้เข้ากัน แล้ว reflux ใน water bath ประมาณ 1 ช.ม. ทำให้เย็น แล้วเทลงในน้ำเย็น 25 ม.ล. สกัดด้วย ether 3 ครั้งๆ ละ 75 ม.ล. รวม ether extract ทั้งหมด ระเหยให้แห้งได้ตะกอนสีขาว เมื่อนำไปตกผลึกใหม่ใน methanol ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 176-8 หนัก 23 ม.ก.



รูปที่ 11 IR-spectrum ของ Aglaetriol ที่ได้จาก Hydrolysis ของ Triacetate m.p. 163-4

เมื่อเปรียบเทียบ IR-spectrum ของสารที่ได้จาก hydrolysis นี้กับของ aglaetriol m.p. 182-3 (ที่ได้จาก aglaiol) ปรากฏว่าเหมือนกัน

2.5.3.3 Hydrolysis¹⁹ of triacetate m.p. 116-8 ใช้ triacetate m.p. 116-8 หนัก 30 ม.ก. แล้วทำตามวิธีของ 2.5.3.2 ได้ ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว 175-7 หนัก 24 ม.ก.



รูปที่ 12 IR-spectrum ของ Aglaetriol ที่ได้จาก Hydrolysis ของ Triacetate m.p. 116-8

เมื่อเปรียบเทียบ IR-spectra ของสารที่ได้จาก hydrolysis นี้กับ aglatriol ที่ได้จาก reduction ของ aglaiondiol แล้วปรากฏว่าเหมือนกัน

แต่เมื่อเปรียบเทียบ IR-spectra ของของสารที่ได้จาก hydrolysis triacetate คั่วที่มีจุดหลอมเหลวสูง (2.5.3.2) กับ hydrolysis triacetate คั่วที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ (2.5.3.3) จะต่างกันเล็กน้อยคือ

1. สารที่ได้จาก hydrolysis triacetate m.p. 163-4 มี peak ที่ 1390 cm^{-1} เป็น doublet มี peak เล็กๆ ที่ 1420 cm^{-1} แยกออกมา แต่ของสารที่ได้จาก hydrolysis triacetate m.p. 116-8 เป็น singlet

2. peak ที่ประมาณ 1190 cm^{-1} ของสารที่ได้จาก hydrolysis triacetate คั่วที่มีจุดหลอมเหลวสูงมี intensity น้อยกว่า peak ที่ประมาณ 1150 cm^{-1} แต่ของสารที่ได้จาก hydrolysis triacetate คั่วที่มีจุดหลอมเหลวกลับตรงกันข้าม