บทที่ 2

การทดลอง

2.1.1 Thin layer chromatography (7)(15)

ใช้ Desaga spreader สำหรับทำ chromatoplates ในการเตรียม plate นั้นใช้ adsor-bent (Alumina G) 90 กรัม ต่อน้ำกลั่น 110 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน (1–2 นาที) เทใส่ spreader ที่ปรับให้ adsorbent มีความหนา 0.25 มิลลิเมตร จะได้ chromato-plates ขนาด 20 × 20 เซนติเมตร จำนวน 5 plates ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วจึง activate ด้วยการนำ plates ไปอบที่อุณหภูมิ 100–125° อีกครึ่งชั่วโมง เก็บไว้ใน desiccator ที่มี anhydrous calcium chloride บรรจุอยู่ เพื่อเตรียมไว้สำหรับใช้ในการทำ TLC ส่วนสารที่ใช้ในการทดลองนั้นใช้ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม ละลายในตัวทำละลายที่ละลายดีที่สุดแล้ว spot ห่างจากขอบล่าง 2 เซ็นติเมตร (starting line) แต่ละ spot ควรห่างกันอย่างน้อย 4 เซ็นติเมตร จาก spot ขึ้นไปทางด้านบน 15 เซ็นติเมตรเอา spatula ขีดเส้นเป็น solvent front เมื่อ spot แห้งแล้วจึงจุ่ม chromatoplates ลงใน tank ที่อิ่มตัวด้วยไอของ solvent เมื่อ solvent ซึมขึ้นไปถึง solvent front (ประมาณ 30 นาที) จึงยก plates ออกจาก tank ทำให้แห้งแล้ว spray ด้วย 2,7–Dichlorofluorescein solution (0.2 % 2,7– Dichlorofluoreseein ในเอททานอล) ซึ่งใช้เป็น de-tecting agent พอแห้งแล้วจะเห็น spots ของสารปรากฏขึ้นบน chroma-toplate ส่วนมากเรืองแสงใน ultraviolet light ทำให้มองเห็น spots ได้ชัด

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางของ spot ของสารที่เคลื่อนที่}}{\text{ระยะทาง solvent เคลื่อนที่}}$$

2.1.2 Column Chromatography[17]

ใช้ Aluminium Oxide Standardised for Column Chromatography ของบริษัท Riedel Dehaen Ag.,Seelze Hannover เป็น Adsorbent โดยใช้ Column แก้วที่มี Sintered glass ซึ่งปิดเปิด Column ด้วย Stop-cock ในการเตรียม Column ให้ปิด Column เติม Solvent ลงไปเล็กน้อย แล้วปล่อยให้ Solvent ไหลออกบ้างเพื่อไล่ฟองอากาศใน column ส่วนที่อยู่ใต้ sintered glass ออก แล้วจึงเติม solvent ลงไปอีกจนได้ระดับ $\frac{3}{4}$ ของ Column เติมทรายบริสุทธิ์ลงไปให้มีความหนาประมาณ $\frac{1}{2}$ เซ็นติเมตร เพื่อกันไม่ให้ Aluminium oxide ไหลออกมากับ Solvent และกันไม่ให้ Alumina เข้าไปอยู่ระหว่างข้อต่อของเครื่องแก้ว (Quick fit) ทำผิวหน้าของทรายให้เรียบแล้วจึงค่อย ๆ บรรจุ Aluminium oxide ลงไปให้ติดต่อกันจนได้ความยาวของ Column ที่ต้องการ ปรับผิวหน้าของ Aluminium oxide ให้เรียบแล้วเติมทรายบริสุทธิ์ลงไปให้หนาประมาณ $\frac{1}{2}$ เซ็นติเมตร เพื่อป้องกันมิให้ผิวหน้าของ Column ถูกกระทบกระเทือนหรือเป็นรอยในตอนที่เติมสารหรือ Solvent ลงไป

2.1.3 Liebermann-Burchard Reaction.(6)(9)

ละลายสารที่ต้องการทดสอบเล็กน้อยในคลอโรฟอร์ม 4–5 หยด ค่อย ๆ หยด Acetic anhydride ลงไป 1 หยด และกรดกำมะถันเข้มข้น 1 หยด แล้วเขย่า ถ้ามีสีเกิดขึ้น แสดงว่าสารนั้นเป็นสารประกอบพวก Steroids หรือ Triterpenoids

2.1.4 Infra-red Spectrum

Infra-red Spectrum ของสารต่าง ๆ หาได้จากเครื่อง Perkin-Elmer 421 Grating Infra-red Spectrophotometer โดยทำเป็น KBr-pellets ส่วนการตรวจลักษณะ Absorption peaks ของสารนั้นใช้วิธีเปรียบเทียบกับ Standard characteristics และ Absorption peaks ที่มีอยู่ใน Literatures (2)(3)(8)(16)

2.1.5 การหาจุดหลอมเหลว

การหาจุดหลอมเหลวใช้เครื่อง Fisher - Johns melting point apparatus

2.1.6 การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของธาตุต่าง ๆ

ส่งไปทำที่กองเคมี กรมวิทยาศาสตร์ กระทรวงอุตสาหกรรม

2.1.7 การทำสารให้แห้ง

ก่อนการวิเคราะห์หรือก่อนทำ Infra-red spectra ใช้ Abderhalden vacuum drying apparatus โดยมี Anhydrous phosphorous pentoxide เป็นตัวดูดความชื้น 12-18 ชั่วโมง

2.1.8 Solvent

ตลอดการทดลองนี้ solvent ที่ใช้ทุกชนิดนำมากลั่นใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง solvent ที่ใช้ในการตกผลึกต้องนำมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีในหนังสือ(23) ส่วน solvent ที่ใช้ในการแช่รากถั่วพูไม่ต้องกลั่น

2.2 การสกัด (Extraction)

2.2.1 การสกัดสารจากรากถั่วพูด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์

ใช้รากถั่วพูแห้งซึ่งบดละเอียดหนัก 10.00 ก.ก แช่ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 15 ลิตร 10 วัน กรองแล้วเอาไปกลั่นเอา solvent ออกจนเหลือปริมาตร 400 มิลลิลิตร จะได้ตะกอนสีเหลืองอ่อนปนอยู่กับสารละลายสีเหลืองคล้ำ กรองตะกอนออกล้างด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์หลาย ๆ ครั้งจะได้ตะกอนสีเหลืองอ่อน ๆ เอาตะกอนนี้ไปอบให้แห้งในเตาอบที่มีอุณหภูมิ 60° ส่วนสารละลายสีเหลืองคล้ำนำไประเหยบน water bath จะได้สารละลายข้นมีสีน้ำตาลดำ กากที่เหลือหลังจากแช่ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ครั้งแรกนำไปสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ตามวิธีเดิม 4 ครั้ง จนปิโตรเลียมอีเทอร์ที่แช่เกือบไม่มีสี รวมสารที่ได้จากการสกัดทั้งหมดมีตะกอนหนัก 3.8 กรัม (0.04 % โดยน้ำหนักของรากถั่วพูแห้ง) ส่วนสารละลายเอาไประเหยให้แห้งหนัก 38 กรัม (0.38 % โดยน้ำหนักของรากถั่วพูแห้ง)

ตารางที่ 1

ปริมาณของ Crude extract จากปิโตรเลียมอีเทอร์

ครั้งที่	น้ำหนักรากถั่วพูแห้งบดละเอียด (ก.ก)	จำนวนปิโตรเลียมอีเทอร์ (ลิตร)	น้ำหนักของตะกอน (กรัม)	น้ำหนักของสารละลายข้นเหนียว (กรัม)	%โดยน้ำหนักของตะกอน	%โดยน้ำหนักของสารละลายข้นเหนียว
1	10.00	15	3.8	38	0.04	0.38
2	20.00	35	7.9	73	0.04	0.36
3	25.00	42	10.1	92	0.04	0.37
4	25.00	40	11.0	94	0.04	0.38
5	30.00	50	11.2	119	0.04	0.37

2.3 การแยกสาร (Separation)

2.3.1 วิธีแยกสารจาก Crude extract ที่ได้จากการสกัดรากถั่วพูด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (ส่วนที่เป็นสารละลายข้นเหนียว)

นำ Crude extract ที่ได้จากการสกัดรากถั่วพูด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ หนัก 20 กรัม ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์จำนวน 200 มิลลิลิตร ผ่านสารละลายที่ได้ลงใน Column chromatography ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซ็นติเมตร ยาว 120 เซ็นติเมตร ใช้ Aluminium oxide 400 กรัม เป็น Adsorbent และใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลาย

Elute Column ด้วย ปิโตรเลียมอีเทอร์, 5 % อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์, 10 % อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์, 20 % อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์, 30 % อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์, 40 % อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์, 50 % อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์, 75 % อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์, อีเทอร์, คลอโรฟอร์ม และ เมทานอล ตามลำดับ รับ elute ครั้งละ 2 ลิตร แล้วนำ elute แต่ละครั้ง ไปกลั่นไล่ Solvent ออกจนเหลือสารละลายประมาณ 40 มิลลิลิตรตั้งไว้ให้ตกผลึก

ตารางที่ 2

การแยกสารออกจาก Crude Extract โดยวิธี Column Chromatography

ชนิดของ Eluent	จำนวน Fraction ครั้งละ 2 ลิตร	สารที่ได้และจุดหลอมเหลว	น้ำหนักของสาร (กรัม)
ปิโตรเลียมอีเทอร์	2	Semisolid สีเหลืองอ่อน	0.06
ปิโตรเลียมอีเทอร์	8	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	0.09
5 % อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์	2	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	0.03
5 % อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์	15	ผลึกรูปเข็มสีขาว mp. 132-145°	0.30
10% อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์	8	ผลึกรูปเข็มสีขาว mp. 146-152°	0.41
20% อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์	4	น้ำมันสีเหลือง	0.02
30% อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์	4	น้ำมันสีเหลือง	0.02
40% อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์	4	น้ำมันสีเหลือง	0.01
50% อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	น้ำมันสีเหลือง	0.01
75% อีเทอร์-ปิโตรเลียมอีเทอร์	3	น้ำมันสีเหลือง	0.05
อีเทอร์	4	น้ำมันสีเหลือง	0.11
คลอโรฟอร์ม	8	Semisolid	0.68
เมทานอล	11	Semisolid สีขาวปนอยู่ในน้ำมันสีเหลือง	1.12

2.3.2 วิธีแยกสาร จากตะกอนที่ได้โดยการละลายในตัวทำละลายผสม

นำตะกอนที่ได้จากการสกัดรากถั่วพูด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์จำนวน 3.0 กรัม ละลายด้วย ปิโตรเลียมอีเทอร์ จนไม่ละลายอีกต่อไป แล้วเอาตะกอนที่เหลือมาละลายในส่วนผสมของปิโตรเลียมอีเทอร์กับเบนซีน ด้วยอัตราส่วน 4 : 1 3 : 1 และ 2 : 1 ตามลำดับ ตั้งทิ้งค้างคืน ส่วนที่ละลายใน อัตราส่วน 2 : 1 จะตกผลึกออกมาเป็นเกล็ดมันวาว นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกใน เมทานอล จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวเป็นปุย ๆ

ตารางที่ 3

การแยกสารออกจากตะกอนโดยการละลายด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และส่วนผสมของปิโตรเลียมอีเทอร์ กับ เบนซีน

ชนิดของตัวทำละลาย	จำนวน Fraction ครั้งละ 150 มิลลิลิตร	สารที่ได้และจุดหลอมเหลว	น้ำหนักของสาร (กรัม)
ปิโตรเลียมอีเทอร์	15	ตะกอนผสมน้ำมัน	0.86
ปิโตรเลียมอีเทอร์ : เบนซีน			
4 : 1	3	ตะกอนวุ้น ๆ ผสมน้ำมัน	0.38
4 : 1	8	ตะกอนวุ้น ๆ	0.43
3 : 1	13	ตะกอนวุ้น ๆ	0.31
2 : 1	3	ตะกอนวุ้น ๆ มีผลึกเกล็ดเหลืองออนปน	0.12
2 : 1	16	ผลึกเป็นเกล็ดมันวาวมีตะกอนวุ้น ๆ ปนนิดหน่อย หลอมที่ 265° และเมื่อบริสุทธิ์มีจุดหลอมเหลว 276-277°	0.49

ตารางที่ 4

แผนภาพการสกัดและแยกสารออกจากรากถั่วพู

รากถั่วพูแห้งบดละเอียด

- ปิโตรเลียมอีเทอร์ Crude extract กรอง
  - ตะกอนเหลืองอ่อน ๆ
    - ละลายด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์และส่วนผสมของปิโตรเลียมอีเทอร์กับเบนซีน
      - ครั้งที่ 6 ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ต่อเบนซีน 2 : 1 (16 Fractions) ได้ผลึกเป็นเกล็ด เป็นมันวาวมีตะกอนวุ้น ๆ ปนนิดหน่อย หลอมเหลวที่ 265 ให้เป็นสาร B
      - ครั้งที่ 5 ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ต่อเบนซีน 2 : 1 (3 Fractions) ได้ตะกอนเป็นวุ้น ๆ มีผลึกเป็นเกล็ดปนอยู่ด้วยนิดหน่อย
      - ครั้งที่ 4 ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ต่อเบนซีน 3 : 1 (13 Fractions) ได้ตะกอนวุ้น ๆ
      - ครั้งที่ 3 ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ต่อเบนซีน 4 : 1 (8 Fractions) ได้ตะกอนวุ้น ๆ
      - ครั้งที่ 2 ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ต่อเบนซีน 4 : 1 (3 Fractions) ได้ตะกอนวุ้น ๆ ผสมน้ำมัน
      - ครั้งที่ 1 ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ (15Fractions) ได้ตะกอนผสมน้ำมัน
  - สารละลายสีน้ำตาลคล้ำ เอาไปเคี่ยวให้ข้นเหนียว แล้วเอาไปผ่าน Column จะได้สาร A และ C เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว

2.4 การทำให้สารบริสุทธิ์ (Purification)

2.4.1 วิธีทำสาร mp. 146-152° ให้บริสุทธิ์

นำสารที่มี mp. 146-152° มาทำ Thin layer chromatography (7)(15) โดยใช้ส่วนผสมของปิโตรเลียมอีเทอร์และอีเทอร์ในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน เป็น solvent จะพบว่ามีสาร 2 ชนิดปนกันอยู่ จึงนำเอาผลึกนี้มาตกผลึกใหม่โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ 12 ครั้ง จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวเป็นเงา mp. 165-168° ทดลองเอามาทำ Thin layer chromatography โดยใช้ solvent แบบข้างต้นพบว่ายังคงมี 2 ชนิดปนกันอยู่ เอาผลึกที่ได้นั้นมาละลายใน ปิโตรเลียมอีเทอร์ที่มี อีเทอร์ 5 % แล้วเอาผลึกนี้มาตกผลึกด้วย เมททานอล 2 ครั้ง จะได้ผลึก รูปเข็ม สีขาว mp. 166-8° และเอามาตกผลึกใหม่ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 3 ครั้งจะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวเป็นมัน mp. 167-168° คงที่ หนัก 0.03 กรัม (0.15 % จาก Crude extract) กำหนดให้เป็นสาร A

2.4.2 วิธีทำสารที่มีจุดหลอมเหลว 265° ให้บริสุทธิ์

นำสาร mp. 265° มาล้างด้วย เมททานอลเย็น ๆ จนตะกอนวุ้น ๆ สีเหลืองออนละลายหมด เหลือแต่ผลึกเป็นเกล็ด ๆ เป็นมันวาว เอามาตกผลึกด้วยเมททานอล 8 ครั้ง จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวเป็นปุยหลอมเหลวที่ 276-7° หนัก 0.07 กรัม (2.3 % จาก ตะกอนทั้งหมด) กำหนดให้เป็นสาร B

2.4.3 วิธีทำสาร mp. 132-145° ให้บริสุทธิ์

นำสารที่มี mp. 132-145° มาละลายด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ที่มีอีเทอร์ 5 % เอาที่เหลือมาตกผลึกซ้ำด้วยเอททานอลจะได้ผลึกเป็นแผ่นบาง ๆ สีขาว มี mp. 135-145° เอามาตกผลึกซ้ำด้วย ปิโตรเลียมอีเทอร์ 8 ครั้ง จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวมี mp. คงที่ที่ 136-7° หนัก 0.006 กรัม (0.03 % จาก Crude extract) กำหนดให้เป็นสาร C

2.5 การตรวจลักษณะของสารประกอบที่แยกออกมาได้

(Identification of Compounds)

2.5.1 การตรวจลักษณะของสาร A mp. 167-8°

2.5.1.1 Physical Properties and Colour Reaction ของสารA

ลักษณะของสาร A เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวเป็นเงามีจุดหลอมเหลว 167-8° ปรากฏว่าละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม อะซีโตน เบนซีน อีเทอร์ ละลายได้ในเมทานอลเล็กน้อย ไม่ละลายน้ำ ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์เมื่อร้อน ให้สีม่วงแดงแล้วเปลี่ยนเป็นม่วงน้ำเงิน และในที่สุดเป็นสีน้ำเงิน กับ Liebermann-Burchard Reagent[9] ไม่มีปฏิกริยากับ carbonyl reagents ต่าง ๆ ฟอกสีโบรมีนในคาร์บอนเทตตราคลอไรด์ และไม่ให้กาซไฮโดรเจนโบรไมด์ หา Rf(ตามวิธี 2.1.1) โดยใช้ส่วนผสมของปิโตรเลียมอีเทอร์ : อีเทอร์ (1 : 3)ได้ค่า Rf = 0.67 ใช้ ethyl acetate : H_2O(1:1) ได้ค่า Rf = 0.90 เมื่อนำไปตรวจหาธาตุต่าง ๆ โดยวิธี Lassaigne sodium decomposition Test[20] ปรากฏว่าไม่พบ ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฮาโลเจน ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์คาร์บอนและไฮโดรเจน ได้ผลดังนี้

C = 84.46 %

H = 11.66 %

จากการคำนวณจากสูตร $C_{29}H_{48}O$ ได้ C = 84.40 %, H = 11.72 %

Infra-red spectrum ของสาร A (รูปที่ 1 หน้า 25)

แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 5 หน้า 27

2.5.1.2 การตรวจหา Functional groups ของสารA

การตรวจหา Functional groups ตาม standard method ปรากฏว่าสารA ฟอกสีโบรมีนใน คาร์บอนเทตตราคลอไรด์ ไม่ให้กาซไฮโดรเจนโบรไมด์ ฟอกสี โปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนท ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2,4-dinitro-phynyl - hydrazine และไม่ Reduce Tollen's และ Fehling solutions ไม่เปลี่ยนสีสารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์

2.5.1.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร A (23)

Acetylation

นำสาร A mp.167-168° มา 180 มิลลิกรัมละลายใน Pyridine 2.5 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลม 50 มิลลิลิตร เติม acetic anhydride 2.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้ว Reflux 3 ชั่วโมง บน Water bath เมื่อสารละลายเย็นลงเทลงในน้ำเย็นที่มีน้ำแข็งอยู่ 50 มิลลิลิตรคนให้ทั่ว กรองตะกอนขาวออกล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่เย็นจนหมดกลิ่น Pyridine และ acetic acid ทำตะกอนให้แห้งจะได้ crude derivative ออกมา 185 มิลลิกรัม นำสารที่ได้ไปตกผลึกใน เอทธานอล 4 ครั้ง จนจุดหลอมเหลวคงที่ที่ 142-143° จะได้สารหนัก 95 มิลลิกรัม เป็นแผ่นสีขาว Infra-red spectrum ของ acetate ของสาร A ดังรูปที่ 2 หน้า 25 และ absorption peaks ของ IR. spectrum ของ acetate ของสาร A ดังตารางที่ 6 หน้า 18

ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์ คาร์บอนและ ไฮโดรเจน ได้ผลดังนี้

C = 81.40 %

H = 11.15 %

จากการคำนวณจากสูตร $C_{31}H_{50}O_2$ ได้ C = 81.93 % H= 11.01 %

2.5.2 การตรวจลักษณะของสาร B mp. 276-7°

2.5.2.1 Physical properties and colour reaction ของสาร B

ผลึกของสาร B เป็นรูปเข็มสีขาวเป็นปุย ๆ หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 276-7° ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม อะซีโตน เบนซีน อีเทอร์และเมทธานอลร้อน ไม่ละลายน้ำและปิโตรเลียมอีเทอร์ ทดลองทำ Liebermann - Burchard reaction(9) ได้สีม่วงแดง และเปลี่ยนเป็นม่วงน้ำเงิน ฟอกสีโบรมีนในคาร์บอนเทตตราคลอไรด์

หา Rf value โดยใช้ solvent ผสม n-butanol : acetic acid : H_2O 4 : 1 : 5 ได้ค่า Rf= 0.88 เมื่อนำไปหาธาตุต่างๆโดยวิธี Lassaigne sodium decomposition test ปรากฏว่าไม่พบไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และแฮโลเจน ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์คาร์บอนและไฮโดรเจนมีดังนี้

C = 76.92 %

H = 10.92 %

จากการคำนวณจากสูตร $C_{30}H_{48}O_3$ ได้ C = 78.90 %

H = 10.59 %

Infra-red spectrum ของสาร B (รูปที่ 3 หน้า 26)แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 7 หน้า 19

จากการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลของสาร B ได้ 456 ซึ่งเท่ากับน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณจากสูตร $C_{30}H_{48}O_3$

2.5.2.2 การตรวจหา Functional groups ของสาร B[20]

การตรวจหา Functional groups ตาม standard method ปรากฏว่าสาร B ฟอกสีโบรมีนในคาร์บอนเทตตราคลอไรด์ ไม่ให้กาซไฮโดรเจนโบรไมด์ ฟอกสีโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนทไม่ให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4 dinitro phynylhydrazine ไม่ Reduce Tollen's Reagent ,Fehling's Solution และ Benedict's solution และไม่เปลี่ยนสีสารละลาย เฟอร์ริคคลอไรด์

2.5.2.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร B

ก. Acetylation[23]

นำสาร B ซึ่งหลอมเหลวที่ 276-7° หนัก 240 มิลลิกรัม ละลายใน Pyridine 3.0 มิลลิลิตรในขวดก้นกลม 50 มิลลิลิตร เติม acetic anhydride 2.0 มิลลิลิตร เขย่าแล้ว Reflux 5 ชั่วโมง บน Water bath เมื่อสารละลายเย็นลง เทลงในน้ำเย็นที่มีน้ำแข็งอยู่ 50 มิลลิลิตรคนให้ทั่ว กรองตะกอนขาวออก ล้างด้วยน้ำกลั่นที่เย็นจนหมดกลิ่น Pyridine และ acetic acid ทำตะกอนให้แห้งจะได้ crude derivative ออกมา 260 มิลลิกรัม นำสารที่ได้ไปตกผลึกใน เอทธานอล 4 ครั้งจะได้ผลึกเป็นเกล็ดสีขาว หลอมที่ 271-2° หนัก 120 มิลลิกรัม IR. spectrum ของ acetate ของสาร B (รูปที่ 4 หน้า 26) แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 8 หน้า 20

ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ คาร์บอน และไฮโดรเจน ได้ผลดังนี้

C = 76.79 %

H = 10.14 %

จากการคำนวณจากสูตร $C_{32} H_{50} O_4$ ได้ดังนี้

C = 77.10 %

H = 10.04 %

ข. Methylation (23)

นำสารB mp. 276-277° หนัก 230 มิลลิกรัมละลายในอีเทอร์ 50 มิลลิลิตรในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร แช่ให้เย็น แล้วค่อย ๆ เติม diazomethane ซึ่งละลายอยู่ในอีเทอร์ที่เย็น เขย่าแรง ๆ เติมลงไปจนกระทั่งสีเหลืองถาวร แล้วเติมให้มากเกินพอจึงตั้งค้างคืนไว้ในอุณหภูมิห้อง ระเหยไล่อีเทอร์ออกให้หมดจะได้ตะกอนขาวหนัก 202 มิลลิกรัม ตกผลึกด้วยเมททานอล 3 ครั้งจะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลวคงที่ 223-224° หนัก 86 มิลลิกรัม

Infra-red spectrum ของ Methyl ester ของสารB (รูปที่ 5 หน้า 27) แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 9 หน้า21 ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์คาร์บอนและไฮโดรเจนได้ผลดังนี้

C = 80.02 %

H = 10.27 %

จากการคำนวณจากสูตร $C_{31}H_{50}O_3$ C = 79.15 %

H = 10.64 %

ค. Acetylation และ Methylation (23)

นำสาร B mp. 276-7° หนัก 200 มิลลิกรัม มาทำ Metylation ดังวิธีใน 2.5.2.3.ข จะได้รูปเข็มสีขาว mp.223-4° หนัก 80 มิลลิกรัม นำ Methyl betulinate ที่ได้มาทำ Acetylation ดังวิธีใน 2.5.2.3.ก ตกผลึกด้วยเมททานอลจะได้ผลึกลักษณะเป็นแท่งไม่มีสีmp. 202-3° หนัก 42 มิลลิกรัม ผลึกนี้จะ identical กับเมื่อนำสาร B มาทำ Acetylation ก่อนแล้วจึงทำ Methylation

Infra-red spectrum ของ Methyl-O-acetyl betulinate รูปที่ 6 หน้า 27 แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 10 หน้า 22

ง. Deacetylation of Methyl-O-acetyl betulinate

นำสารจาก 2.5.2.3 ค. มา Reflux กับ 5% alcoholic potassium hydroxide 12 ชั่วโมงจะได้ Methyl betulinate กลับคืนมาซึ่งเหมือนกับสารที่ได้จากข้อ 2.5.2.3 . ข.

2.5.3 การตรวจลักษณะของสาร C mp. 136-7°

2.5.3.1 Physical Properties and Colour Reaction ของสาร C

ลักษณะของสาร C เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวมีจุดหลอมเหลว 136-7° ละลายได้ในคลอโรฟอร์ม อะซีโตน เบนซีน อีเทอร์ ปิโตรเลียมอีเทอร์ร้อน เอททานอลร้อน เมททานอลร้อน แต่ไม่ละลายในน้ำ เมื่อให้ทำปฏิกริยากับ Liebermann-Burchard Reagent(9) ได้สีม่วงแดง แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน และเขียวตามลำดับ

ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจนได้ดังนี้

C = 82.58 %

H = 12.06 %

006319

Infra-red spectrum ของสาร C (รูปที่ 7 หน้า 28) แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 11 หน้า 23

คำนวณจากสูตร $C_{29}H_{50}O$ ได้ C = 84.05 % , H = 12.07 %

2.5.3.2 การตรวจหา Functional group ของสาร C(20)

การตรวจหา Functional group ตาม standard method ปรากฏว่าสาร C ฟอกสีโบรมีนในคาร์บอนเทตตราคลอไรด์ ไม่ให้กาซไฮโดรเจนโบรไมด์ ฟอกสีโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนทไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2,4-dinitrophenyl hydrazine และไม่ Reduce Tollen's reagent ,Fehling solution และ Benedict's solution ไม่เปลี่ยนสีสารละลายเฟอร์ริคคลอไรด์

i 18181417

2.5.3.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร C

Acetylation (23)

นำสาร C mp. 136-7° หนัก 200 มิลลิกรัมละลายใน pyridine 2.5 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร เติม Acetic anhydride 2.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งค้างคืนไว้ เทลงในน้ำผสมน้ำแข็ง 50 มิลลิลิตร คนให้ทั่วกรองตะกอนขาวออกล้างด้วยน้ำเย็นจนหมดกลิ่น Pyridine และ acetic acid ทำตะกอนให้แห้งจะได้ crude derivative 210 มิลลิกรัม แล้วนำไปตกผลึกด้วยเอทานอล 3 ครั้งจนได้จุดหลอมเหลวคงที่ที่ 130-131° หนัก 105 มิลลิกรัมเป็นแผ่นสีขาวใส

Infra-red spectrum ของ acetate ของสาร C ดังรูปที่ 8 หน้า 28 และ absorption peaks ดังตารางที่ 12 หน้า 24

ตารางที่ 5 (5)(8)(16)(18)

IR absorption peaks ของสาร A m.p 167-8°

Frequency(cm^{-1})	Band Type	Assignments
3,300	very broad	Stretching vibration of Polymeric OH
2920,2850	broad	CH stretching Vibration of $-CH_2-$
1445	broad	CH bending vibration of $-CH_2-$
1370	broad	$C-CH_3$ bending vibration
1050,1020	sharp	C-O stretching vibration
955,970	sharp	C-H out of plane bending vibration of trans disubstituted alkene RCH = CHR
835,795	one pair of band (weak)	CH out of plane bending vibration of $R_2C = CHR$ trisubstituted alkene

ตารางที่ 6 (5)(8)(16)(18)

IR. absorption peaks ของacetate ของสาร A m.p.142-143°

Frequency(cm^{-1})	Band Type	Assignments
2900	broad	CHstretching vibration of-CH_3 and $-CH_2-$
1720	sharp	C=O stretching vibration of ketone
1430-1460	broad	CH bending vib. of $-CH_2-$and-CH_3
1360	broad	C-CH_3 bending vibration(symmetrical)
1240,1255	sharp	C-O asymmetric stretching of acetate = C-O-C (so called acetate band)
1025	sharp	C-O stretching vibration of secondary alcohol.
955,970	sharp	CH out of plane of trans R-CH =CH-R

ตารางที่ 7 (5)(8)(16)(18)

IR absorption peaks ของสาร B mp. 276-7°

Frequency (Cm^{-1})	Band Type	Assignments
3,440	broad	Stretching vibration of polymeric O-H
3,000-2,800	broad	Chelation (Intramolecular) H-bond with C = O to a carboxylic acid dimer band
1680	sharp(strong)	C=O stretching vibration of ketone
1450,1465	sharp	CH bending vibration of $-CH_2-$ and $-CH_3$
1370	sharp	$C-CH_3$ bending vibration Gem-dimethyl group
1110	sharp	C-O symmetric stretching of secondary alcohol
1640,885	sharp	CH out of plane bending of $CR_1R_2 = CH_2$ and to the terminal methylene group

ตารางที่ 8 (5)(8)(16)(18)

IR absorption peaks ของ acetate ของสาร B mp. 271-2

Frequency(Cm^{-1})	Band Type	Assignments
3,000-2,800	broad	carboxylic acid dimer band
1600-1720	broad	C=O stretching vibration of ketone
1420-1460	weak	CH bending vibration of $-CH_2$ and $-CH_3$
1360	sharp	$C-CH_3$ bending vibration(symmetrical)
1235	very sharp	C-O asymmetric stretching of acetate = C-O-C (so called acetate band)
975	sharp	CH out of plane of trans R-CH=CH-R
875	sharp	CH out of plane bending vibration of $R_2C = CHR$

ตารางที่ 9 (5)(8)(16)(18)

IR absorption peaks ของ Methyl ester ของสาร B m.p 223-4°

Frequency(Cm^{-1})	Band Type	Assignments
3540	Sharp	Stretching vibration ofpolymeric O-H
3,000-2800	broad	Chelation (Intramolecular H-bond) with C=O
1700	sharp (strong)	C=O stretching vibration of ketone
1470-1450	sharp	CH bending vibration of $-CH_2-$ and $-CH_3$
1370	sharp	$C-CH_3$ bending vibration Gem-di-methyl group
1180-1160	sharp	asym. stretching of ester type $R-CO-OCH_3$
1100	sharp	C-O sym. stretching of secondary alcohol
1050	sharp	C-O stretching vibration of second-ary alcohol .
890-880	sharp	CH out of plane bending of $C\,R_1R_2 = CH_2$

ตารางที่ 10 (5)(8)(16)(18)

IR absorption peaks ของ Methyl-O-acetyl betulinate m.p.202-3°

Frequency(Cm^{-1})	Band Type	Assignments
3,000-2,800	broad	Chelation with C=O
1750-1730	sharp (strong)	C=O stretching vibration of ketone
1640	weak	CH out of plane bending of C R_1R_2= CH_2 and to the terminal methylene group
1470-1450	broad	CH bending vibration of-CH_2- and -CH_3
1380-1360	broad	C-CH_3 bending vibration Gem-dimethyl group
1235	strong and very sharp	C-O symmetric stretching of acetate=C-O-C (so called acetate band)
1185,1160, 1140	sharp	asym.stretching of ester type R-CO-OCH_3
890	sharp (strong)	CH out of plane bending of R_1R_2C = CH_2 and to the terminal methylene group

ตารางที่ 11 (5)(8)(16)(18)

IR. absorption peaks ของสาร C m.p. 136-7°

Frequency(Cm^{-1})	Band Type	Assignments
3350	very broad	Stretching vibration of Polymeric alcohol
2,980-2,810	sharp	CH stretching vibration of $-CH_2-$
1630	broad	C=CH stretching vibration
1450	broad Weak	$-CH_2-$ bending vibration
1375	broad weak	$C-CH_3$ bending vibration (symmetrical)
1050, 1020	sharp	C-O stretching vib. of 3B -OH
950	Weak	CH out of plane bending vibration of trans RCH = CHR
800	sharp	CH out of plane bending vibration of R_2C = CH.R

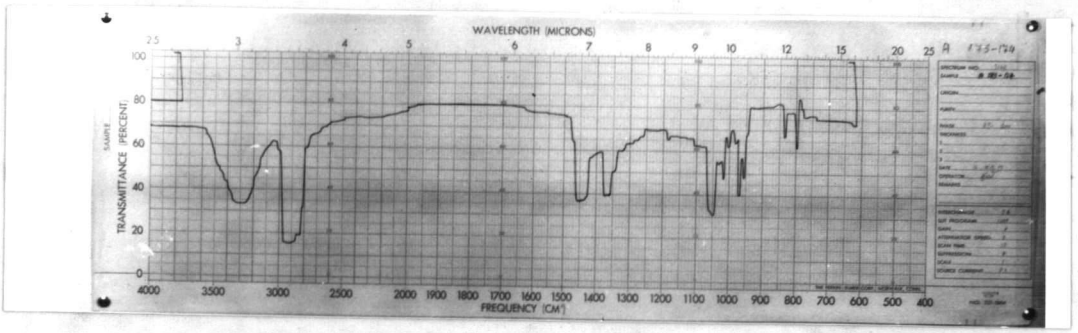
ตารางที่ 12 (5)(8)(16)(18)

IR. absorption peaks ของ acetate ของสาร C m.p.130-131°

Frequency(Cm^{-1})	Band Type	Assignments
3,000-2,800	broad	CH stretching vibration of $-CH_3$ and $-CH_2-$
1,720	sharp	C=O stretching vibration of ketone
1460,1430	sharp	CH bending vibration of $-CH_2-$, and $-CH_3$
1380-1360	sharp	$C-CH_3$ bending vibration (sym.)
1240	sharp	C-O symmetric stretching of acetate = C-O-C (so called acetate band)
1030	sharp	C-O stretching vibration
970,955	weak	CH out of plane of trans R-CH = CH-R

รูปที่ 1

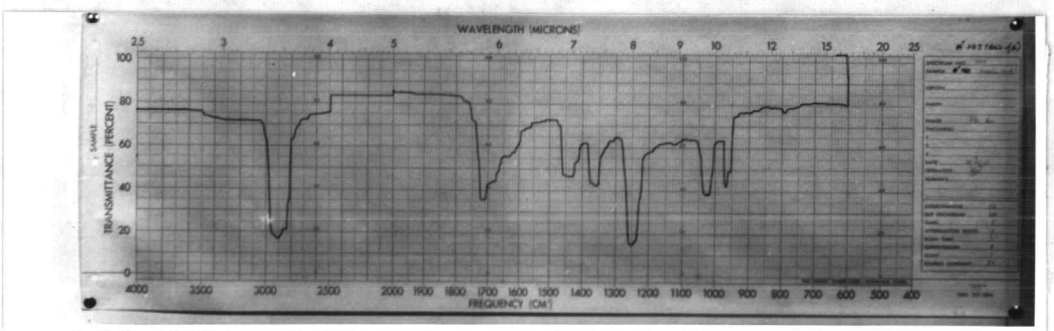
IR. spectrum ของสาร A



หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

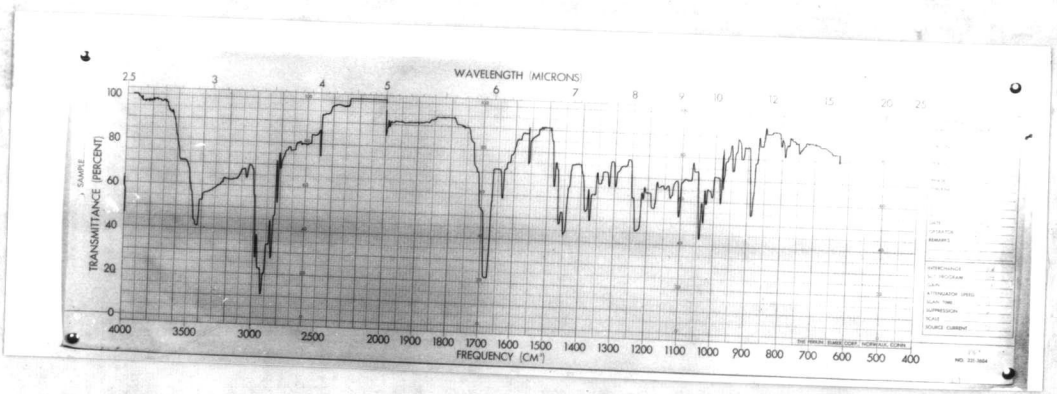
รูปที่ 2

IR. spectrum ของ Acetate ของสาร A



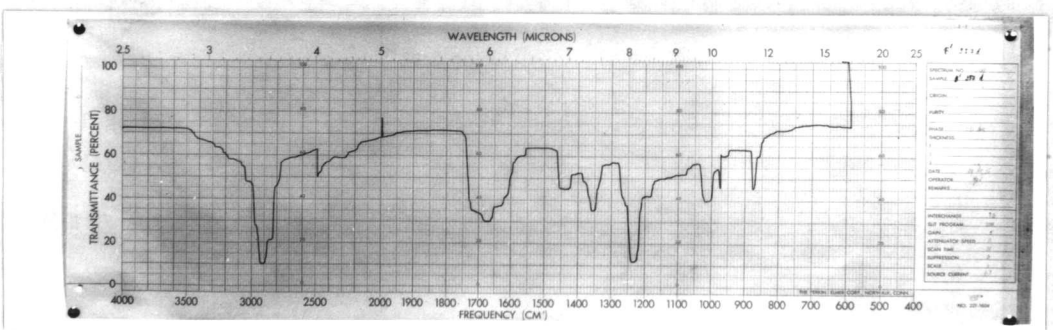
รูปที่ 3

IR.spectrum ของสาร B



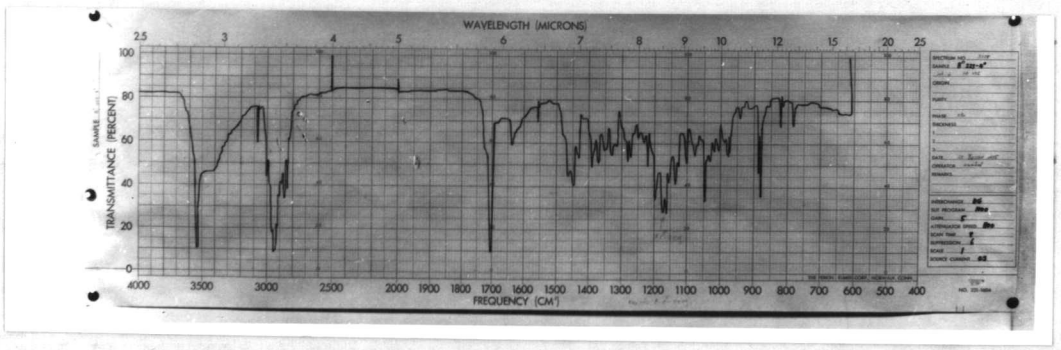
รูปที่ 4

IR. spectrum ของ Acetate ของสาร B



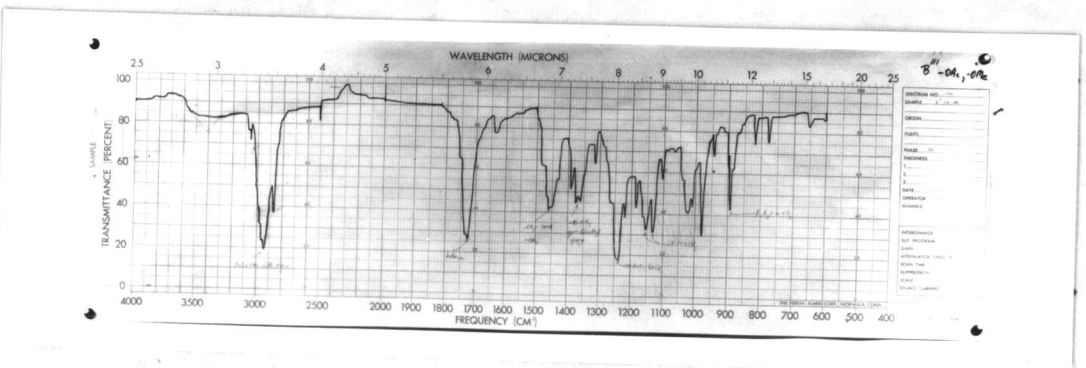
รูปที่ 5

IR. spectrum ของ Methyl ester ของสาร B



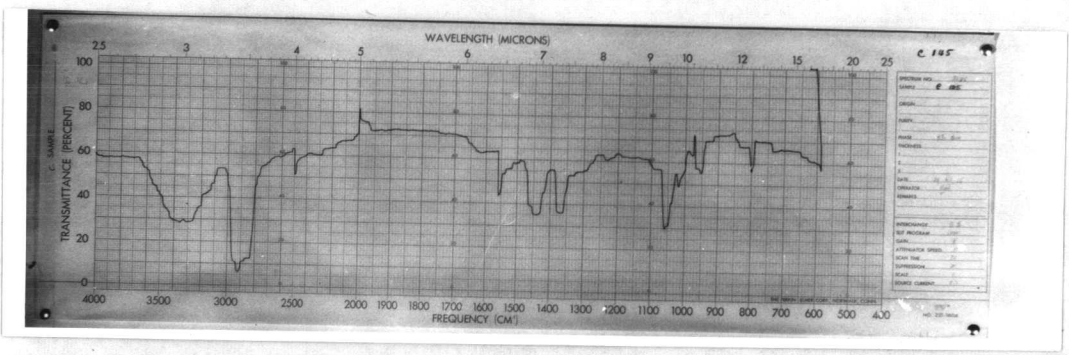
รูปที่ 6

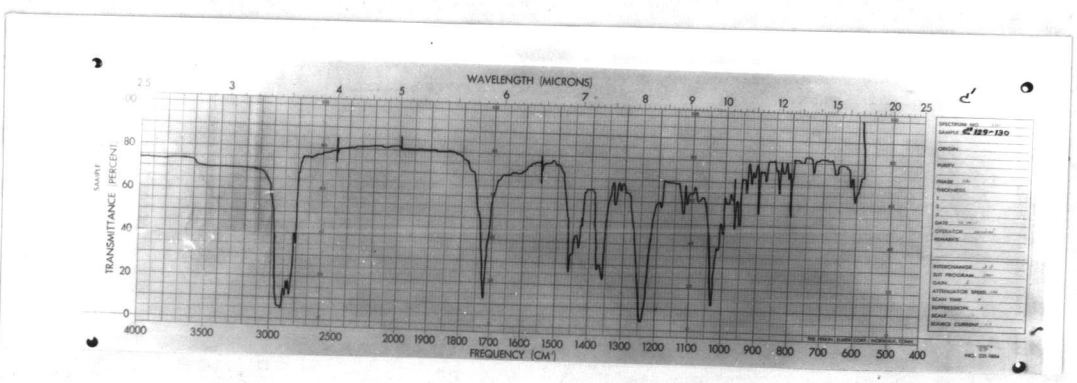
IR.spectrum ของ Methyl -O-acetyl ester ของสาร B



รูปที่ 7

IR.spectrum ของสาร C.



รูปที่ 8

IR.spectrum ของ Acetate ของสาร C.