

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

เหง้าว่านพระฉิม ฐ็ือจากร้านขายยาเวชพงค์โฮสถ ตัวอย่างพืชเก็บไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลข 050151

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

2.2.1 NMR Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Bruker AC 200 MHz. Fourier Transform NMR Spectrometer โดยัใช้เตตระเมทิลซิลเลน (TMS) เป็นสารอ้างอิง (reference) วัดค่าเคมีคัลชิฟท์เป็น พีพีเอ็ม (ppm)

2.2.2 IR Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Perkin-Elmer Model IR 1760 สารที่เป็นของแข็งเตรียมโดย ผสมโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) แล้วอัดให้เป็นแผ่น สำหรับสารที่เป็นของเหลว ทำโดยัใช้แผ่นโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

2.2.3 MS Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Jeol Mass Spectrometer Model JMS-DX-300/JMA 2000 ที่ 70 อีเล็กตรอนโวลต์

2.2.4 GLC Spectra บันทึกด้วยเครื่อง Shimadzu Gas-Liquid Chromatograph Model GC-7 AG

2.2.5 Melting Point บันทึกโดยัใช้เครื่อง Fisher-John

2.3 สารเคมี

2.3.1 ตัวทาละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, แอซีโตน และ เมทานอล สารเคมีที่ใช้ถ้าเป็นชนิดคอมเมอร์เชียลเกรด ต้องนามากล้นก่อนัใช้ทุกครั้ง

2.3.2 สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้ได้แก่ ซิลิกาเจล Art.7731 สำหรับทำคอลลัมน์-โครมาโทกราฟี

2.4 วิธีการทดลอง

ตั้งแต่หัวข้อ 2.4.1-2.4.3 ดูตามเอกสารอ้างอิง (32)

2.4.1 ควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.4.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.4.3 ทินเลอร์โครมาโทกราฟี

2.5 การสกัด

นำเหง้าว่านพระนิม ที่แห้งและบดละเอียดหนัก 10 กิโลกรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆดังนี้

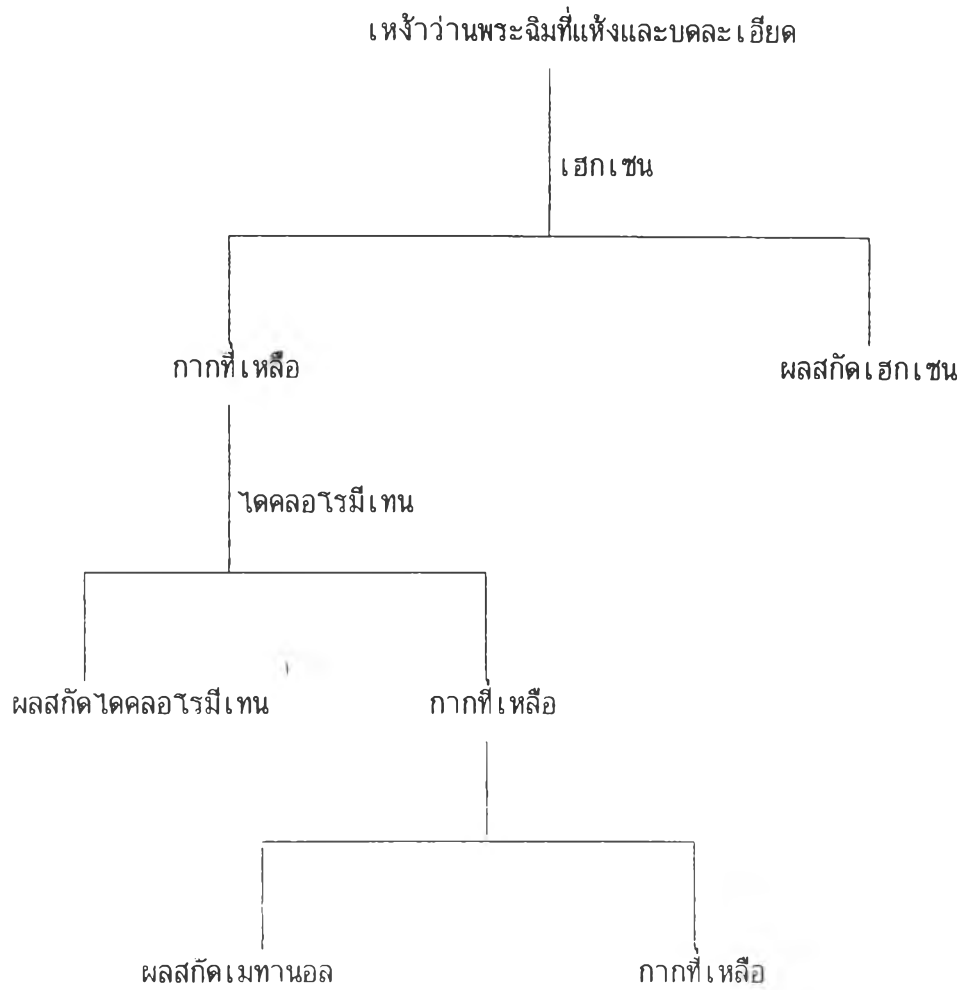
2.5.1 นำเหง้าว่านพระนิมมาสกัดด้วยเฮกเซน โดยแช่ในเฮกเซนประมาณ 3 วัน กรองนำสารละลายที่ได้มากลั่นแยกเอาเฮกเซนออกโดยทำการกลั่นแบบธรรมดา นำเฮกเซนที่กลั่นได้นี้กลับไปแช่ครั้งต่อไปอีก ทำเช่นนี้ 4-5 ครั้ง จนสารละลายไม่มีสี นำสารที่ได้เทใส่ปิอกเกอร์นำไประเหยให้แห้งบนอ่างน้ำเดือด จากการสกัดด้วยเฮกเซน จะได้ผลสกัดมีลักษณะชันเหนียวสีน้ำตาลแดงหนัก 162 กรัม

2.5.2 นำกากที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซน ไปสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทน โดยทำเช่นเดียวกับ ข้อ 2.5.1 จะได้ผลสกัดมีลักษณะชันเหนียวสีน้ำตาลแดงหนัก 267 กรัม

2.5.3 นำกากที่เหลือจากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ไปสกัดต่อด้วยเมทานอล โดยทำเช่นเดียวกับ ข้อ 2.5.1 แต่นำสารละลายที่ได้มากลั่นแยกเอาเมทานอลโดยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ได้ผลสกัดมีลักษณะชันเหนียวสีน้ำตาลดำหนัก 340 กรัม

ผลการสกัดทั้งหมดสรุปได้ตามแผนภาพที่ 1 หน้า 20

แผนภาพที่ 1 แสดงการสกัดเหง้าว่านพระฉิมที่แห้งและบดละเอียด



2.6 การแยกสารจากเหง้าพระนิม

2.6.1 การแยกสารจากผลสกัดเฮกเซน

นำผลสกัดเฮกเซนหนัก 50 กรัม มาทำการแยกโดยใช้วิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับหนัก 300 กรัม ใช้ตัวทำละลายชะคอลัมน์ตามอัตราส่วนต่างๆกัน โดยเริ่มจาก เฮกเซน, เฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน, ไดคลอโรมีเทน-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ชะครั้งละ 800 ซม³ นำไปกลั่นแบบธรรมดาเพื่อแยกตัวทำละลายออก จนเหลือสารละลายประมาณ 50 ซม³ เทใส่ขวดรูปกรวย ตรวจสอบด้วยทินเนอร์โครมาโทกราฟี รวมขวดที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน นำไประเหยบนอ่างน้ำเดือด และตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก

ตารางที่ 5 ผลของการแยกสารในผลสกัดเฮกเซน



ตัวชะ	อัตราส่วนโดยปริมาตร	ขวดลำดับที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน		1:2	น้ำมันสีขาว
		3-11	ผลึกสีขาวในน้ำมันสีเหลือง
เฮกเซน:ไดคลอ- โรมีเทน	19:1	12-13	ผลึกสีขาวในน้ำมันสีเหลือง
	19:1	14-18	ผลึกสีขาววาว ในน้ำมันสีเหลือง
		19-23	ของแข็งอัดฐานในน้ำมันสีเหลือง
	9:1	24-33	น้ำมันสีเหลือง
	3:1	34-37	ผลึกละเอียดสีขาวในน้ำมันสีเหลือง
		38-40	ผลึกรูปสี่เหลี่ยมใสแบนในน้ำมันสี- เหลือง
		41-44	ผลึกรูปเข็มในน้ำมันสีเหลือง

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ตัวชะ	อัตราส่วนโดยปริมาตร	ขนาดลำดับที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน	1:1	45-50	ผลึกใสรูปสามเหลี่ยมหน้าจั่ว ในน้ำมันสีเหลือง
		51-58	น้ำมันสีเหลือง
	1:3	59-60	น้ำมันสีเหลือง
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน	1:3	61-64	ผลึกสีขาวในน้ำมันสีเหลือง
		65-72	น้ำมันสีน้ำตาล
ไดคลอโรมีเทน		73-82	น้ำมันสีน้ำตาล
ไดคลอโรมีเทน:	19:1	83-91	น้ำมันสีน้ำตาลไหม้
เมทานอล	9:1	92-95	น้ำมันสีเหลือง
	1:1	96-99	สารละลายสีน้ำตาล
	1:3	100-103	สารละลายสีเหลือง
เมทานอล		104-110	สารละลายสีเหลือง

2.6.2 การแยกสารจากสิ่งสกัดในไดคลอโรมีเทน

นำผลสกัดไดคลอโรมีเทน 50 กรัม มาแยกโดยวิธีควิคคอล์มน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล 300 กรัม ชะคอล์มน์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่างๆกัน และเก็บแต่ละส่วนเหมือนหัวข้อ 2.6.1

ตารางที่ 6 ผลของการแยกสารจากผลสกัดไคโคลอโรมีเทน

ตัวชะ	อัตราส่วนโดยปริมาตร	ช่วงลำดับที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน		1-9	น้ำมันไม่มีสี
		10-15	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน:ไคโคลอ- โรมีเทน	19:1	16-20	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
		21-27	น้ำมันสีเหลืองเข้ม
	9:1	28-35	ผลึกสีขาววาวในน้ำมันสีเหลือง
		36-37	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
	3:1	38-41	ผลึกสีขาวในน้ำมันสีเหลือง
		42-44	น้ำมันสีเหลือง
		45-51	ผลึกสีขาวเป็นเม็ดในน้ำมันสี- เหลือง
เฮกเซน:ไคโคลอ- โรมีเทน	1:1	52-53	ผลึกละเอียดขาวสีเทาในน้ำมันสี- เหลือง
		54-57	ผลึกสีขาวรูปสามเหลี่ยมหน้าจั่ว ในน้ำมันสีเหลือง
		58-60	น้ำมันสีน้ำตาลแดง
		61-65	สารคล้ายขุ่นลอยอยู่ในน้ำมันสี- น้ำตาลแดง
	1:3	66-76	น้ำมันสีน้ำตาลแดง
ไคโคลอโรมีเทน		77-83	น้ำมันสีน้ำตาล

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ตัวชะ	อัตราส่วนโดยปริมาตร	ขนาดลำดับที่	ลักษณะของสาร
ไตรโคลอโรมีเทน:	9:1	84-89	น้ำมันสีน้ำตาลดำ
เมทานอล	3:1	90-95	น้ำมันสีน้ำตาล
	1:1	96-99	น้ำมันสีน้ำตาลแดง
	1:3	100-103	สารละลายสีน้ำตาลอ่อน
เมทานอล		104-108	สารละลายสีเหลือง

2.6.3 การแยกสารจากผลสกัดเมทานอล

นำผลสกัดเมทานอล 50 กรัม มาแยกโดยวิธีคอลลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจล 300 กรัม ชะคอลลัมน์ด้วยตัวทำละลายตามอัตราส่วนต่างๆกันและเก็บแต่ละส่วนเหมือนหัวข้อ 2.6.1

ตารางที่ 7 ผลการแยกสารจากผลสกัดเมทานอล

ตัวชะ	อัตราส่วนโดยปริมาตร	ขนาดลำดับที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน		1-7	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
เฮกเซน:ไตรโคลอ-	19:1	8-14	น้ำมันสีเหลืองอ่อน
โรมีเทน	9:1	15-18	น้ำมันสีเหลืองส้ม

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ตัวชะ	อัตราส่วนโดยปริมาตร	ขนาดลำดับที่	ลักษณะของสาร	
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน	3:1	19-22	ผลึกเป็นแผ่นสีขาววาวในน้ำมันสีเหลือง	
		23-29	ผลึกรูปเข็มปนกับของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	
		30-32	น้ำมันสีเหลือง	
		33-44	น้ำมันสีเหลือง เข้ม	
ไดคลอโรมีเทน	1:1	45-58	สารละลายสีน้ำตาลมีคราบสีขาวที่ก้นขวด	
		59-69	สารละลายสีน้ำตาลมีคราบสีขาวที่ก้นขวด	
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล	19:1	70-75	สารละลายสีน้ำตาล	
เมทานอล		76-79	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล	
		80-82	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล	
เมทานอล		9:1	83-88	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล
		3:1	89-94	น้ำมันสีน้ำตาล
		1:1	95-99	น้ำมันสีน้ำตาล
เมทานอล	1:3	100-103	สารละลายสีน้ำตาล	
		104-108	สารละลายสีน้ำตาล	

2.6.4 การแยกสารที่ได้จากควิคคอลลัมน์โครมาโทกราฟีในขนาดลำดับที่ 19-23

นำสารในขนาดลำดับที่ 19-23 ซึ่งมีผลึกรูปเข็มบนกับของแข็งอัสฐานสีขาว ในน้ำมันสีเหลืองหนัก 0.20 กรัม มาทำคอลลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ โดยใช้ซิลิกาเจล Art.7734 เป็นตัวดูดซับ (อัตราส่วน 1:20) โดยใช้คอลลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 cm. ละเอียดด้วยตัวทาละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเฮกเซนในอัตราส่วน (โดยปริมาตร) 1:19, 1:9, 4:1, 3:1, 1:1, 1:3, ไดคลอโรมีเทน, และไดคลอโรมีเทน:เมทานอล เท่ากับ 1:19 เก็บสารละลายที่ได้จากการชะไว้ในขวดรูปกรวยครึ่งละประมาณ 50 cm³ นำแต่ละขวดไประเหยตัวทาละลายออกจนเกือบแห้งบนเครื่องอังน้ำ ตรวจสอบสารที่แยกได้ในแต่ละขวดว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่โดยใช้ที่แอลซี ขนาดที่ให้ทีนเลอร์โครมาโทแกรมเหมือนกันนำมารวมกัน ผลการแยกสารแสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การแยกสารประกอบในขนาดลำดับที่ 19-23 โดยคอลลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ตัวชะ	อัตราส่วนโดยปริมาตร	ขนาดลำดับที่	ลักษณะของสาร
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน	1:19	1-6	คราบสีขาว
	9:1	7-8	คราบสีขาว
	4:1	9-11	คราบสีขาว
	3:1	11-14	คราบสีขาว
	1:1	15-19	ของแข็งอัสฐานสีขาว
	1:3	20-23	ผลึกรูปเข็มบนกับของแข็งอัสฐานสีขาว
ไดคลอโรมีเทน		24-29	ผลึกรูปเข็มสีขาว
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล	1:19	30-34	คราบสีขาว

2.7 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร

2.7.1 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร 1 เป็นของแข็งอัสฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง ได้จากขวดลำดับที่ 3-11 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน (ผลสกัดเฮกเซน) นำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยเฮกเซน จะได้ของแข็งอัสฐานสีขาวหนัก 0.11 กรัม (0.068 % ของผลสกัดเฮกเซน) จุดหลอมเหลว 62-63 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹) 2920, 2849 (s), 1737 (s), 1474 (m), 1173 (m), 730, 721 (m) (รูปที่ 3)

นำสาร 1 หนัก 0.09 กรัม มาทำการแยกสลายด้วยน้ำ โดยเติม 5 % NaOH ในเอทานอล 10 cm³ แล้วรีฟลักซ์บนเครื่องอังน้ำเป็นเวลา 10 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์หรือไม่โดยทำทีแอลซี เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วนำสารละลายมากำจัดตัวทำละลายออกโดยการกลั่นลดความดัน นำสารที่ได้ไปแขวนลอยในน้ำแล้วสกัดส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ส่วนที่เป็นเกลือของกรดยังคงละลายอยู่ในชั้นน้ำ

นำสารละลายแอลกอฮอล์ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์มากำจัดน้ำด้วย anh. Na₂SO₄ นำไประเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยเฮกเซน ได้ผงละเอียดสีขาวหนัก 0.03 กรัม (33.3 % ของสารที่นำมาแยกสลายด้วยน้ำ) จุดหลอมเหลว 78.0-80.0 °C ให้ชื่อว่า สาร 1ก

IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹) 3500-3200 (m), 2920, 2850 (s), 1470, 1465 (m), 1060 (m), 730, 720 (m) (รูปที่ 4)

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 0.93 (t), 1.25 (s), 1.56 (s), 3.67 (t) (รูปที่ 5)

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคซีแอลซี ทำโดยปรับภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ ดังนี้คือ คอลัมน์เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 mm. ยาว 2 m. บรรจุ 2% ov-1 บน cw

80/100 mesh อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 °C อุณหภูมิคอลัมน์ 250 °C อุณหภูมิอุปกรณ์ตรวจวัด 290 °C ใช้น้ำ N₂ เป็นแก๊สพาหะ อัตราการไหลของ N₂ 50 ml/min อัตราการไหลของ H₂ 50 ml/min อัตราการไหลของอากาศ 500 ml/min ใช้น้ำ FID เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด

น้ำแอลกอฮอล์อิมิตัวไซตรงยาว คือ tetradecanol (C₁₄H₂₉OH) , hexadecanol (C₁₆H₃₃OH), octadecanol (C₁₈H₃₇OH), eicosanol (C₂₀H₄₁OH) และ decosanol (C₂₂H₄₅OH) มาผสมกัน ละลายในคลอโรฟอร์ม แล้วฉีดเข้าเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 0.87, 1.17, 1.72 , 2.66 และ 4.29 นาที

น้ำแอลกอฮอล์ที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำมาละลายในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายนี้เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ภายใต้ภาวะดังกล่าว พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 21.22 และ 34.83 นาที

นำชั้นน้ำมาทำให้เป็นกรดด้วย dil. HCl แล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์หลายๆ ครั้ง นำชั้นอีเทอร์มากำจัดน้ำออกด้วย anhydrous Na₂SO₄ กรอง แล้วนำไประเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยเฮกเซน ได้ผงละเอียดสีขาวหนัก 0.03 กรัม (33.3 % ของสารที่นำมาแยกสลายด้วยน้ำ) จุดหลอมเหลว 80-82 °C ให้ชื่อว่าสาร 1 ข

IR (KBr) max (cm⁻¹) 3300-2500(m), 2920, 2860 (s), 1734 (s), 1473, 1466 (s), 1435, 1305 (m), 930 (w), 730, 720 (m) (รูปที่ 8)

เตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดที่ได้จากการแยกสลายด้วยน้ำของสาร 1 และ ของกรดคาร์บอกซิลิกไซตรงยาวมาตรฐาน โดยเตรียม diazomethane จากปฏิกิริยาระหว่าง N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine กับ KOH โดยผสมอีเทอร์ 30 cm³ กับ 40 % KOH 5 cm³ ในขวดกลั่นที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง เติมน้ำ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 2 กรัม ลงไปอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งเขย่า แล้วนำไปกลั่นบนเครื่องอังไอน้ำ จะได้สารละลายสีเหลืองของ diazomethane ในอีเทอร์ กลั่นออกมาจากของผสม ผ่าน diazomethane นี้ลงในสารละลายของกรดคาร์บอกซิลิกไซตรงในอีเทอร์ จนได้สารละลายสีเหลืองอย่างถาวร ทดสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาด้วย TLC

น้ำหนักพันธะเมทิลเอสเทอร์ของสาร 1x มาวิเคราะห์ด้วย จีแอลซี โดยนำตัวอย่างเช่นเดียวกับสาร 1ก พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 1.40, 1.71, 2.09, 2.63, 3.30, 4.23, 5.36, 6.96, 8.94, 11.69, 15.13, 25.49 นาที และสำหรับเมทิลเอสเทอร์ของคาร์บอกซิลิกใช้ตรงยาวมาตรฐานได้แก่ henicosanoic acid ($C_{20}H_{41}COOH$), doicosanoic acid ($C_{21}H_{43}COOH$), tetracosanoic acid ($C_{23}H_{47}COOH$), pentacosanoic acid ($C_{24}H_{49}COOH$), heptacosanoic acid ($C_{26}H_{53}COOH$), octacosanoic acid ($C_{27}H_{55}COOH$), triacontanoic acid ($C_{29}H_{59}COOH$), hentriacontanoic acid ($C_{30}H_{61}COOH$), tritriacontanoic acid ($C_{32}H_{65}COOH$), tetratriacontanoic acid ($C_{33}H_{67}COOH$) พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 3.31, 4.22, 5.35, 6.85, 8.80, 11.44, 14.82, 19.36, 25.09, 32.89 นาที

2.7.2 การทำสาร 2 ให้บริสุทธิ์และการหาสูตรโครงสร้าง

สาร 2 เป็นของแข็งมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวนวลไม่มีกลิ่น ได้จาก ขวดลำดับที่ 14-23 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (9:1) (ผลสกัดไดคลอโรมีเทน), จาก ขวดลำดับที่ 20-22 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:1) (ผลสกัดเมทานอล) น้ำของแข็ง มาตกผลึกด้วยเฮกเซนได้สารเป็นของแข็งละเอียดเบา สีขาววาวหนัก 0.383 กรัม (0.004 % ของเหง้าว่านพระนิมแห่ง) จุดหลอมเหลว $81-84^{\circ}C$ ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล มีค่า R_f เท่ากับ 0.5 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3600-3200 (w), 2910, 2849 (s), 1473, 1463 (w), 1062 (w), 731, 720 (w) (รูปที่ 11)

1H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 0.93(t), 1.25 (s), 1.56 (s) , 3.67 (t) (รูปที่ 12)

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 14.06(q), 22.62(t), 25.70(t), 29.4(t), 29.66(t), 31.89(t), 32.8(t), 63.0(t) (รูปที่ 13)

วิเคราะห์สาร 2 ด้วยเทคนิคจีแอลซี โดยใช้ภาวะเดียวกับสาร 1ก พบว่า สาร 2 ให้ค่า retention time 20.65 , 34.23 นาที

2.7.3 การทำสาร 3 ให้บริสุทธิ์และการหาสูตรโครงสร้าง

สาร 3 เป็นของแข็งมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวในน้ำมันสีเหลือง ได้จาก ขนาดลำดับที่ 36-37 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:1) (ผลสกัดเฮกเซน), ขนาดลำดับที่ 46-52 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:1) (ผลสกัดไดคลอโรมีเทน), ขนาดลำดับที่ 23-26 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:1) (ผลสกัดเมทานอล) นำของแข็งมาตกผลึกด้วยเฮกเซน ได้สารเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.45 กรัม (0.005 % ของเหง้าว่านพระ-ฉิมแห้ง) จุดหลอมเหลว 70-71°C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเมทานอล ค่า R_f เท่ากับ 0.65 (ซิลิกาเจล/เมทานอล:คลอโรฟอร์ม เท่ากับ 1:49)

IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}) 3455 (m), 2919, 2850 (s), 1712 (s), 1640 (m), 1600, 1520, 1440 (m), 1473, 1385, 1365 (m), 1280, 1126 (m), 1210 (s), 1029 (m), 1184 (s), 985(m), 845, 826 (m), 720 (m) (รูปที่ 15)

MS m/e 642, 628, 614, 194, 85, 71, 57, 43 (รูปที่ 16)

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 0.88 (t,3H), 1.25 (s,2H), 1.63 (s,2H), 3.93 (s,3H), 4.19 (t,2H), 5.84 (s,1H), 6.29 (d,1H), 6.90 (d,1H), 7.04 (s,1H), 7.08 (d,1H), 7.60 (d,1H) (รูปที่ 17)

^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) 14.12-31.95, 55.93, 64.63, 109.33, 114.74, 115.68, 123.04, 127.07, 144.65, 146.79, 147.94, 167.40 (รูปที่ 18)

DEPT-135 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) (รูปที่ 19)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , CH ที่ 14.12, 55.92, 109.34, 114.74, 115.69, 123.04, 144.65

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 22.7, 26.02, 28.80, 29.58, 29.64, 29.73, 31.95, 64.63

DEPT-90 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) (รูปที่ 20)

ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 109.34 , 114.74 , 115.69 , 123.04 , 144.65

นําสาร 3 มาทำการแยกสลายด้วยน้ำโดยใช้วิธีเดียวกับการแยกสลายน้ำของสาร 1 สำหรับส่วนของแอลกอฮอล์ให้ชื่อว่า สาร 3ก

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3600-3200 (w) , 2910 , 2849 (s) , 1473 , 1463 (w) , 1062 (w) , 731 , 720 (w) (รูปที่ 21)

นำมาวิเคราะห์ด้วยจีแอลซี โดยใช้ภาวะของเครื่องเช่นเดียวกับที่วิเคราะห์สาร 1ก พบว่าสาร 3ก ให้ค่า retention time เท่ากับ 34.24 นาที

สำหรับส่วนของกรดให้ชื่อว่าสาร 3ข

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3450 (s), 3020 (w), 2950 (s), 1690, 1667 (s), 1620 (s), 1600, 1518, 1474 (s), 1467 (m), 1435, 1285(s), 1200 (s), 1030 (m), 1165 (s), 940 (m), 850, 820 (m) (รูปที่ 23)

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 3.94 (s,3H) , 5.35 (s,br), 7.11 , 7.06 , 6.93 (s,d,d,3H) (รูปที่ 24)

2.7.4 การทําสาร 4 ให้บริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้าง

สาร 4 เป็นของแข็งรูปเหลี่ยมใสไม่มีสีปนอยู่กับน้ำมันสีเหลืองได้จากขดลำดับที่ 37-40 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:1) (ตารางที่ 2) , ขดลำดับที่ 52-53 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1) (ตารางที่ 3) น้ำของแข็งมาตกผลึกนเฮกเซน ได้ผลึกรูปเหลี่ยมแบนใสไม่มีสีหนัก 0.16 กรัม (0.002 % ของเหง้าว่านพระจิม) สลายตัวที่ 238-240 $^{\circ}\text{C}$ ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล ค่า R_f เท่ากับ 0.61 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}) 2921, 2848 (m), 1762 (s), 1677, 1654 (m), 1443, 1389 (m), 1222, 1070 (m) (รูปที่ 25)

MS m/e 314, 176 (รูปที่ 30)

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 0.73, 0.87, 0.97 (s, 9H), 2.05 (s, 3H), 2.64 (d, 1H), 3.74 (s, 1H), 5.47 (d, 1H) (รูปที่ 26)

^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) 8.65, 14.99, 18.45, 20.87, 21.91, 33.49, 33.51, 34.13, 39.89, 41.41, 41.52, 51.84, 53.50, 54.46, 61.17, 104.07, 125.16, 145.07, 147.48, 170.59 (รูปที่ 27)

DEPT-135 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) (รูปที่ 28)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , CH ที่ 8.65, 15.00, 21.92, 33.48, 51.84, 53.50, 54.46, 104.08

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 18.45, 20.87, 34.14, 39.88, 41.52

DEPT-90 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) (รูปที่ 29)

ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 51.84, 53.50, 54.46, 104.08

2.7.5 การทำสาร 5 ให้บริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้าง

สาร 5 เป็นของแข็งรูปเข็มสีขาววาวในน้ำมันสีเหลือง ได้จากขดลำดับที่ 41-44 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:1) (ผลสกัดเฮกเซน), จากขดลำดับที่ 27-29 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:1) (ผลสกัดเมทานอล) นำของแข็งมาตกผลึกด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ได้ผลึกรูปเข็มสีขาววาวหนัก 0.4 กรัม (0.004 % ของเหง้าว่านพระนิมแห่ง) จุดหลอมเหลว $136-138^\circ\text{C}$ ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน ค่า R_f เท่ากับ 0.46 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}) 3500-3200 (m), 2952, 2852 (s),

1640 (w), 1460, 1380 (m), 1060 (m), 970, 960 (w), 800 (w) (รูปที่ 33)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 0.68-2.31 (m) , 3.55 (m) , 5.09 (dd) , 5.37 (d) (รูปที่ 34)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 11.85-56.83 , 71.78 , 121.67 , 129.29 , 138.30 , 140.73 (รูปที่ 35)

นำสาร 5 มาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี โดยมีสภาวะของเครื่องดังนี้ คอลัมน์ 2 % ov-1 บน CW 80/100 mesh อุณหภูมิเครื่องฉีด 300°C อุณหภูมิคอลัมน์ 290°C อุณหภูมิของอุปรกรณ์ตรวจวัด 300°C ใช้ N_2 เป็นแก๊สพาหะ อัตราการไหลของอากาศ 500 ml/min ใช้ FID เป็นอุปรกรณ์ตรวจวัด

นำสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ซึ่งได้แก่ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol ฉีดเข้าเครื่อง พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 14.01 , 17.74 , 18.81 , 21.48 นาที

นำสาร 5 มาละลายในคลอโรฟอร์ม และฉีดเข้าเครื่องภายใต้สภาวะเดียวกับ สารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 14.48 , 18.78 , 21.24 นาที

2.7.6 การทำสาร 6 ให้บริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้าง

สาร 6 เป็นของแข็งรูปสี่เหลี่ยมแบนใสไม่มีสี บนอยู่ในน้ำมันสีเหลือง ได้จาก ขวดลำดับที่ 46-50 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1)(ผลสกัดเฮกเซน), จากขวดลำดับที่ 55-57 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1)(ผลสกัดไดคลอโรมีเทน) นำของแข็งมา ตกลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน ได้ผลึกรูปสี่เหลี่ยมแบนใสไม่มีสี ละลายตัวที่ $235-238^\circ\text{C}$ (0.003 % ของเหง้าว่านพระนิมแห่ง) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเมทานอล ค่า R_f เท่ากับ 0.49 (ซิลิกาเจล/คลอโรฟอร์ม)

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3015, 2930, 2866 (s), 1778 (s), 1684 (m), 1459, 1392 (m), 1259, 1052, 1011 (m), 966, 880 (m), 836,

810 (m), 750, 745 (m) (รูปที่ 37)

MS m/e 330 , 301 (รูปที่ 42)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 0.83 , 0.87 , 0.97 (s,9H) ,
2.10 (s,3H) , 2.3 (s,br,1H) , 3.70 (s,1H) , 4.06 (s,br,1H) (รูปที่ 38)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 8.66, 15.34, 18.36, 20.80, 21.84,
33.40, 33.47, 35.52, 39.03, 39.14, 41.23, 47.90, 53.38, 55.23, 60.92,
66.02, 85.15, 130.17, 148.65, 169.56 (รูปที่ 39)

DEPT-135 $^{13}\text{C NMR}$ δ (ppm) (รูปที่ 40)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , CH ที่ 8.66 , 15.34 ,
21.84 , 33.47, 47.90 , 53.38 , 55.24 , 60.92

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 18.36 , 20.80 ,
35.52, 39.04, 41.23

DEPT-90 $^{13}\text{C NMR}$ δ (ppm) (รูปที่ 41)

ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 47.90 , 53.38 , 55.24 , 60.92

2.7.7 การทำสาร 7 ให้บริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้าง

สาร 7 เป็นของแข็งมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล ได้จาก
ขวดลำดับที่ 79 ซึ่งชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)(ผลสกัดเมทานอล) น้ำของแข็งมา
ตกผลึกใหม่ในตัวทำละลายผสมระหว่าง ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ได้ผงละเอียดสีขาวหนัก
0.004 กรัม (0.001% ของผลสกัดเมทานอล) สลายตัวที่ 250°C ละลายได้บ้างในคลอโรฟอร์ม
เมทานอล ค่า R_f เท่ากับ 0.22 (ซิลิกาเจล/เมทานอล:คลอโรฟอร์ม เท่ากับ 1:9)

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3600-3200 (s) , 2934 , 2880 (s) ,
1640 (w), 1462, 1380, 1368 (m), 1250, 1160 (m), 1070 (s), 1020 (s),
890 (w) (รูปที่ 45)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 0.72-2.44 (m) , 3.4-3.8 (m),

4-4.7 (m) , 5.14 (m) , 5.38 (m) (รูปที่ 46)

^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) 12.03-42.66 , 50.6 , 56.4 ,
57.11, 62.14 , 70.64 , 73.94 , 76.88 , 101.32 , 122.39 , 129.66 ,
138.69, 140.75 (รูปที่ 47)

2.7.8 การทาสาร 8 ให้บริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้าง

สาร 8 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว หนักน้ำมันสีเหลือง ได้จากขบวนการที่ 19-23 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (19:1) (ผลสกัดเฮกเซน) แล้วนำมาทำโครมาโทกราฟีจากขบวนการที่ 24-29 (ตารางที่ 5) ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว หนัก 0.009 กรัม (0.006 % ของผลสกัดเฮกเซน) จุดหลอมเหลว $85-87^\circ\text{C}$ ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3378 (m), 2963, 1710, 1662 (w),
1455 (m), 1376 (m), 1029 (m) (รูปที่ 48)

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 0.75 (s,3H), 0.80 (s,3H), 0.85 (d,3H), 0.87 (s,3H), 0.94 (s,3H), 1.00 (s,3H), 1.60 (s,3H), 1.68 (s,2H),
3.24 (dd, J 4,10 Hz, 1H), 5.09 (t,1H) (รูปที่ 49)

^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) 15.54, 15.62, 17.68, 18.92, 20.15,
21.53, 24.47, 24.76, 25.75, 27.94, 28.05, 28.15, 29.76, 30.90, 35.25,
35.41, 35.87, 37.26, 38.93, 44.1, 49.63, 50.02, 50.95, 78.98, 125.20,
130.85, 133.54, 134.02 (รูปที่ 50)

DEPT-135 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ ppm (รูปที่ 51)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , CH ที่ 15.54, 15.62,
17.68, 18.92, 20.15, 24.47, 25.75, 28.15, 35.87, 49.63, 50.96, 78.98,
125.21 ppm

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 18.94, 21.53,

24.76, 27.67, 27.94, 28.05, 29.76, 30.90, 35.25, 35.42 ppm

DEPT-90 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ ppm (รูปที่ 52)

ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 35.87, 49.63, 50.96, 78.98, 125.21 ppm

2.7.9 การทาสาร 9 ให้บริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้าง

สาร 9 เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวบนอยู่ในน้ำมันสีเหลือง ได้จากขบวนการที่ 61-63 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:3) (ผลสกัดเฮกเซน) นำของแข็งมาตกผลึกในตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ได้ของแข็งอสัณฐานสีขาว มีจุดหลอมเหลว 191-192 $^{\circ}\text{C}$ (0.07 % ของผลสกัดเฮกเซน) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเมทานอล

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3332 (s) , 3070 , 2968 , 2866 (s) , 1472 , 1377 , (m) , 1287 , 1050 (m) , 971 (m) (รูปที่ 53)

MS m/e 424 , 406 , 391 (รูปที่ 58)

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 0.32 (d, J= 4.13 Hz, 1H), 0.547 (d, J= 4.13Hz, 1H), 0.803 (s), 0.85 (d), 0.878 (s), 0.96 (s), 1.31(s), 1.0-2.2 (m) , 3.28 (q) , 5.59 (t) (รูปที่ 54)

^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) 14.00, 18.09, 18.28, 19.30, 19.97, 21.11, 25.44, 26.01, 28.07, 29.87, 29.89, 29.96, 30.36, 31.96, 32.78, 35.57, 36.38, 39.04, 40.48, 45.29, 47.09, 47.98, 48.81, 52.00, 70.76, 78.33, 125.61, 139.33 (รูปที่ 55)

DEPT-135 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ ppm (รูปที่ 56)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , CH ที่ 14.0, 18.09, 18.28, 19.30, 25.44, 29.87, 29.89, 36.39, 47.09, 47.98, 52.00, 78.84, 125.61, 139.33 ppm

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 21.11, 26.01,

26.43, 28.07, 29.96, 30.36, 31.96, 32.78, 35.57, 39.04 ppm

DEPT-90 ^{13}C NMR (CDCl_3) δ ppm (รูปที่ 57)

ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 36.39, 47.09, 47.98, 52.00, 78.84, 125.61, 139.33 ppm

2.7.10 การทำสาร 10 ให้บริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้าง

สาร 10 เป็นของแข็งมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาลดำ ได้จากขวดลำดับที่ 81-82 ซึ่งชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1) , ขวดลำดับที่ 83-84 ซึ่งชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)(ผลสกัดเมทานอล) หนัก 0.9 กรัม(0.26% ของผลสกัดเมทานอล) มีจุดหลอมเหลว $248-250^\circ\text{C}$ ละลายได้บ้างในคลอโรฟอร์ม เมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน

IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3470 (s) ,1745 (m) ,1611 (m) , 1484 (m) ,1411 (m) , 1356 (m) ,1080 (m) , 1034 (m) (รูปที่ 62)

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 2.58 (s) , 3.44-3.62 (m) ,3.92 (s) 4.02 (s) , 4.12 (s) , 4.75 (t) , 5.13 (d) , 5.27 (d) , 5.34 (s, br,) , 5.64 (s, br) , 7.36 (s) , 7.74 (s) (รูปที่ 63)

^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm) 39.62 , 56.69 , 60.51 , 60.76 , 61.35 , 61.80 , 69.55 , 72.3 , 73.3 , 76.59 , 77.19 , 78.89 , 101.62 , 107.62 , 112.13 , 112.44 , 112.72 , 113.62 , 141.09 , 141.15 , 142.08 , 152.01 , 154.39 ,158.16 , 158.34 (รูปที่ 64)

DEPT-135 ^{13}C NMR ($\text{DMSO-d}_6 + \text{CDCl}_3$) δ ppm (รูปที่ 65)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH_3 , OCH_3 , CH ที่ 39.63,56.69, 61.35, 61.80, 69.55, 73.3, 76.59, 77.19, 101.62, 107.62 ppm

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2OH , OCH_2 ที่ 56.69, 60.51, 72.3 ppm

DEPT-90 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 + CDCl_3) δ ppm (รูปที่ 66)
ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 69.55, 73.3, 76.59, 77.19, 101.62,
107.62, 112.44 ppm