



บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

พืชตัวอย่าง

เหง้าพญานาคราช 2.5 กิโลกรัม จากจังหวัดชุมพร ได้รับอนุเคราะห์จากหม่อมหลวงจากรุพันธ์ ทองแถม ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2536 และอีก 10 กิโลกรัม ซื้อจากร้านเจ้ากรมเปือยถนนจักรวรรดิ กรุงเทพมหานคร ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2537 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับพญานาคราช *Davallia solida* Sw. ที่กองพฤกษศาสตร์ และวัชพืช กรมวิชาการเกษตร บางเขน กรุงเทพมหานคร ซึ่งเก็บโดย J.F. Maxwell จากจังหวัดจันทบุรี ในปี ค.ศ. 1973 มีหมายเลขกำกับเป็น BK.: 48595 พบว่ามีลักษณะเหมือนกัน

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและวิเคราะห์สาร

1. เครื่องมือสกัดซอกซ์เลท (Soxhlet Extraction Apparatus) ขนาด 20 ลิตรของบริษัท Quickfit
2. เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น
3. UV-Visible Spectrophotometer รุ่น 240 ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น
4. เครื่องอบสารในสุญญากาศ ของบริษัท Gallenkamp ประเทศอังกฤษ
5. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Fisher-Johns Melting point Apparatus) ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR) model 1760X ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. Gas-Liquid Chromatography model GC-7AG ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น
8. Mass Spectrometer (MS) model JMS-DX-300 / JMA 2000 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น และ GC-MS MD 800 FISON Instrument จากประเทศอังกฤษ

9. Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) model AC-F200 ของบริษัท Bruker Spectro Spin ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ และ model JNMR-A500 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น

สารเคมี

1. ตัวทำละลาย (solvent) ตัวทำละลายที่ใช้ ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมทานอล เอทานอล แอซีโตน บิวทานอล เอทิลแอซีเตด และอีเทอร์ ตัวทำละลายที่ใช้ในคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้คอมเมอร์เชียลเกรด ซึ่งก่อนใช้ต้องทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ในการตกผลึก ใช้เกรดคุณภาพวิเคราะห์ (A.R. Grade)

2. ตัวดูดซับ

- ซิลิกาเจลชนิด 60G Art.7734 ของ บริษัท E.Merck Damstadt สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

- ซิลิกาเจลชนิด 60G Art.7731 และซิลิกาเจลชนิด 60G Art.7729 ของบริษัท E. Merck Damstadt สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว

- อลูมิเนียมออกไซด์ชนิด 90 Art.1097 ของบริษัท E. Merck Damstadt สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

- TLC plastic sheets silica gel 60G F₂₅₄ และ TLC aluminium sheets aluminium oxide 60G F₂₅₄ ของบริษัท E. Merck Damstadt สำหรับทำทินแลร์โครมาโทกราฟี

การทดสอบปฏิกิริยาเคมี

1. การทดสอบสเตอรอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์ (ทดสอบด้วยปฏิกิริยา Liebermann-Berchard) [22]

นำสารประมาณ 1 มิลลิกรัม ละลายในคลอโรฟอร์มจำนวนเล็กน้อย หยดแอซิติคแอนไฮไดรด์ 2-3 หยด เขย่า แล้วหยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 หยด สังเกตสีทันที และภายใน 1 ชั่วโมง ถ้าสีเปลี่ยนจาก ชมพู → ม่วง → น้ำเงิน → เขียว แสดงว่าสารนั้นเป็นสเตอรอยด์ แต่ถ้าเปลี่ยนสีจาก ชมพู → ม่วง แสดงว่า เป็นไตรเทอร์พีนอยด์

เทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง (รายละเอียดดูตามเอกสารอ้างอิง 23)

1. คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick Column Chromatography)

วิธีนี้ใช้ Sinter Glassเบอร์ 3 บรรจุซิลิกาเจลชนิด 60G Art.7729 และซิลิกาเจล ชนิด 60G Art.7731 สูง 5 เซนติเมตร รายละเอียดดูตามเอกสารอ้างอิง 23

2. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)

ใช้คอลัมน์แก้ว ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง และความยาวขนาดต่างๆ ที่เหมาะสมกับ สิ่งสกัดที่ต้องการแยก โดยใช้อัตราส่วนของสิ่งสกัดที่ต้องการแยกต่อตัวดูดซับประมาณ 15-30 เท่า โดยน้ำหนัก รายละเอียดอื่นๆ ดูตามเอกสารอ้างอิง 23

3. ทินแลร์โครมาโทกราฟี (Thin-Layer Chromatography)

ใช้โครมาโทเฟลทสำเร็จรูปแถมสารด้วยหลอดรูเล็ก (capillary tube) แล้ว develop ในขวดแก้ว หรือ tank ที่อิมตัวด้วยไอของตัวทำละลายที่เหมาะสม ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึง solvent front นำโครมาโทเฟลทไปตรวจหาตำแหน่งสาร โดยใช้ไอโอดีน หรือ แสง อัลตราไวโอเล็ต รายละเอียดดูตามเอกสารอ้างอิง 23

4. การกลั่น

การกลั่นมี 2 แบบ คือ การกลั่นแบบธรรมดา ใช้กับตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม แอซีโตน และการกลั่นแบบลดความดัน ใช้กับตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูง และมี취 เช่นเมทานอล เอทานอล บิวทานอล โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ แบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator) เพื่อป้องกันการสลายตัวของสาร ที่สกัดออกมา กับตัวทำละลายนั้น โดยตัวทำละลายจะเดือดที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเดือด

การสกัด

การสกัดได้ทดลอง 2 วิธี ดังนี้

1. การสกัดด้วยเมทานอล (ดังสรุปในแผนภาพที่ 2.1)

นำเหง้าพญานาคราช ตากแห้ง และบดให้ละเอียดหนัก 2.5 กิโลกรัม แช่ในเมทานอลจำนวน 24 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานานประมาณ 3 วัน กรองสารละลายที่ได้ แล้วนำสารละลายไปกลั่นแบบลดความดันเพื่อแยกเอาเมทานอลออกจนเกือบหมด แล้วระเหยต่อ บนอ่างน้ำเดือดให้แห้ง นำเมทานอลที่กลั่นแยกได้ มาแช่เหง้าพญานาคราชอีก ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง จนกระทั่งได้สารละลายที่ไม่มีสี หรือมีสีจางมาก จะได้สิ่งสกัดในเมทานอล ที่มีลักษณะแข็งเหนียว สีน้ำตาลแดง หนัก 188 กรัม (กากพืชที่เหลือนำไปสกัดต่อในข้อ 1.4)

1.1 การสกัดด้วยเฮกเซน 1 นำสิ่งสกัดในเมทานอล 188 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน จำนวน 200 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยการกวนบนอ่างน้ำเดือด กรอง นำสารละลายที่ได้ ไปกลั่น แยกเฮกเซนออก โดยการกลั่นแบบธรรมดา นำเฮกเซนที่ได้จากการกลั่นไปสกัดซ้ำอีกจนสารละลายที่ได้ไม่มีสี จะได้สิ่งสกัดของเฮกเซนมีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สีเขียวอมเหลืองหนัก 3.77 กรัม

1.2 การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 1 นำสิ่งสกัดในเมทานอล ที่เหลือหลังจากการสกัดด้วยเฮกเซน มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยวิธีเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซน จะได้สิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม มีลักษณะแข็งเหนียว สีน้ำตาลอมเหลือง หนัก 0.34 กรัม

1.3 การสกัดด้วยบิวทานอล นำสิ่งสกัดในเมทานอล ที่เหลือหลังจากสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มาสกัดด้วยบิวทานอลโดยวิธีการเดียวกับข้อ 1.1 แต่ใช้เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน ในการกลั่นแยกบิวทานอลออก จะได้สิ่งสกัดในบิวทานอลมีลักษณะแข็งเหนียวสีน้ำตาลแดง หนัก 39.65 กรัม

1.4 การสกัดด้วยเฮกเซน 2 กากแห้งพญานาคราชที่เหลือ หลังจากสกัดด้วยเมทานอลแล้ว นำไปแช่ในเฮกเซนจำนวน 10 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 วัน กรองสารละลายที่ได้ แล้วนำไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อแยกเอาเฮกเซนออก แล้วเอาเฮกเซนที่ได้จากการกลั่นไปแช่กากแห้งพญานาคราชอีก ทำซ้ำๆ จนกระทั่งได้สารละลายไม่มีสี จะได้สิ่งสกัดในเฮกเซน 2 มีลักษณะเป็นของแข็งคล้ายเทียนไข สีเหลืองอ่อนอมเขียว หนัก 5.37 กรัม

1.5 การสกัดด้วยเอทานอล นำกากแห้งพญานาคราชที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซน 2 ไปใส่ขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเอทานอลให้ท่วม รีฟลักซ์ประมาณ 6 ชั่วโมง กรองแยกเอาสารละลายที่ได้ไปกลั่นแบบลดความดัน ได้สิ่งสกัดในเอทานอลมีลักษณะเป็นของแข็ง ร่วนสีน้ำตาลอมส้ม หนัก 3.68 กรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดเหง้าพญานาคราชด้วยเมทานอล



2. การสกัดด้วยเฮกเซน (ดังสรุปในแผนภาพที่ 2.2)

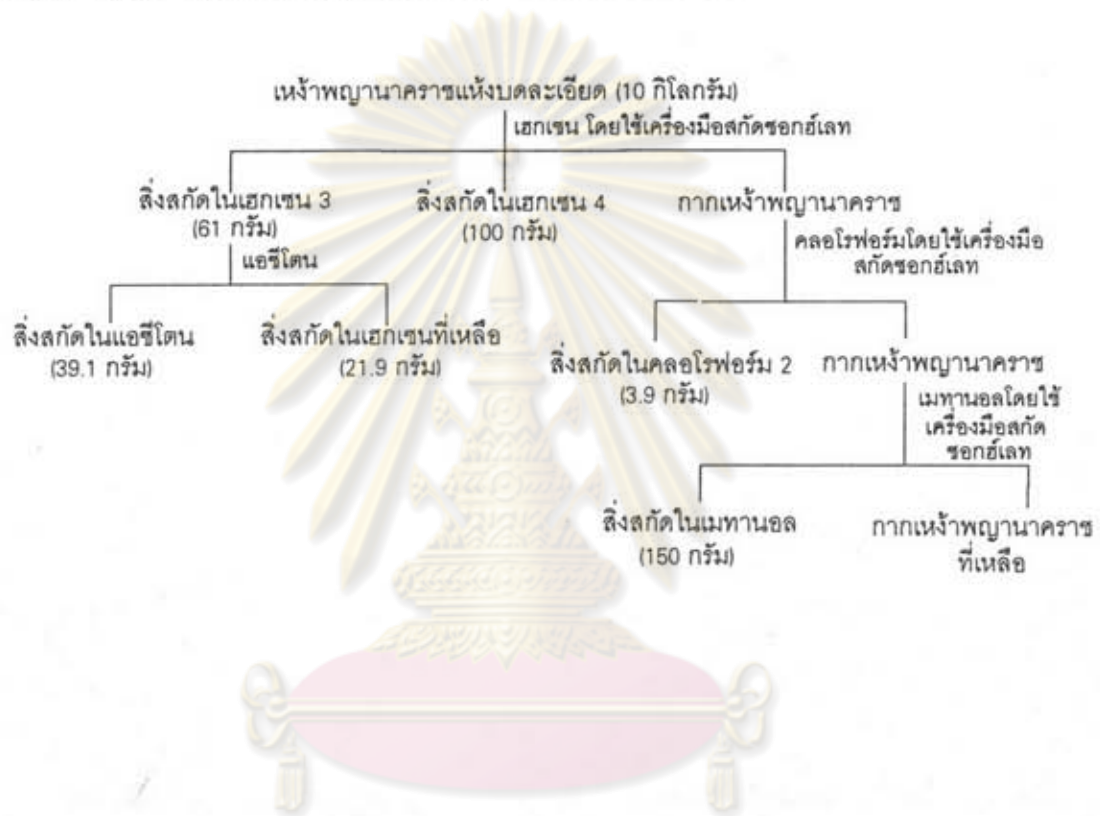
เนื่องจากการสกัดด้วยเมทานอลในหัวข้อ 1 มีสารบางส่วนไม่สามารถสกัดออกมาได้ จึงต้องใช้เฮกเซนสกัด รวม 2 ครั้ง เพื่อเป็นการประหยัดเวลา ดังนั้นจึงสกัดเหง้าพญานาคราชด้วยเฮกเซนโดยตรง โดยนำเหง้าพญานาคราชแห้ง บดละเอียดหนัก 10 กิโลกรัม มาสกัดด้วยเฮกเซนจำนวน 30 ลิตร โดยใช้เครื่องมือสกัดชอกซ์เลทขนาด 20 ลิตร กรองสารละลายที่ได้ แล้วนำสารละลายไปกลั่น เพื่อเอาเฮกเซนออกโดยวิธีกลั่นแบบธรรมดา เฮกเซนที่ได้จากการกลั่น นำไปใช้ในการสกัดเหง้าพญานาคราชที่เหลือ ทำเช่นนี้เรื่อยไปจนเสร็จ ได้สารสกัดในเฮกเซน มีลักษณะเป็นของเหลว เหนียวข้น สีเขียวแก่อมเหลือง หนัก 161 กรัม แบ่งสิ่งสกัดในเฮกเซนเป็น 2 ส่วน คือ สิ่งสกัดในเฮกเซน 3 หนัก 61 กรัม และสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 หนัก 100 กรัม

2.1 การสกัดด้วยแอสีโตน นำสิ่งสกัดในเฮกเซน 3 มา 61 กรัม สกัดด้วยแอสีโตนจำนวน 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยวิธีเดียวกับข้อ 1.1 จะได้สิ่งสกัดในแอสีโตนมีลักษณะ เป็นของเหลว เหนียวหนืด สีเขียวเข้มอมน้ำตาล หนัก 39.1 กรัม และเหลือสิ่งสกัดในเฮกเซน 5 ซึ่งไม่ละลายในแอสีโตนอีก 21.9 กรัม

2.2 การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2 นำกากที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซนในข้อ 2 มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยวิธีเดียวกับข้อ 2 จะได้สิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม มีลักษณะเป็นของแข็ง สีน้ำตาลอมเหลือง หนัก 3.9 กรัม

2.3 การสกัดด้วยเมทานอล นำกากที่เหลือจากการสกัดด้วยคลอโรฟอร์มมาสกัดต่อด้วยเมทานอล โดยวิธีเดียวกับข้อ 2 จะได้สิ่งสกัดในเมทานอลมีลักษณะแข็ง เหนียว สีน้ำตาลแดง หนัก 150 กรัม

แผนภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการสกัดเหง้าพญานาคราชด้วยเฮกเซน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การแยกสาร

1. การแยกสารสิ่งสกัดในเฮกเซน 1

นำสิ่งสกัดในเฮกเซน 1 จากข้อ 1.1 หน้า 26 หน้า 3.77 กรัม ละลายด้วยเฮกเซน จำนวนเล็กน้อยผสมกับบอรัมเนียมออกไซด์จนรวน บรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ที่มีบอรัมเนียมออกไซด์ชนิด 90 Art. 1097 บรรจุอยู่แล้ว 113 กรัม ชะด้วยตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้ เฮกเซน เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม-เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไล่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วนำไประเหยบนอ่างน้ำเดือด จนเหลือปริมาตร 20-30 ลูกบาศก์เซนติเมตร หลังจากนั้นตรวจสอบองค์ประกอบของสารละลาย ด้วยวิธีทินแลร์ โครมาโทกราฟี รวมแต่ละส่วนที่มีองค์ประกอบเหมือนกันเข้าด้วยกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน 1 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-2	ของแข็งเหนียวสีน้ำตาล	1.70
25% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	3-5	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.17
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	6-8	ของแข็งคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีเหลือง	0.08
75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	9-10	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.03
คลอโรฟอร์ม	11-16	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.01
1% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	17-20	คราบสีเหลืองเข้ม	น้อยมาก
2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	21	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	22	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	23	คราบสีน้ำตาลปนเหลือง	น้อยมาก
20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	24	คราบสีน้ำตาลปนเหลือง	น้อยมาก
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	25	คราบสีน้ำตาลอ่อน	น้อยมาก
75% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	26	คราบสีน้ำตาลอ่อน	น้อยมาก
เมทานอล	27	คราบสีน้ำตาล	น้อยมาก

2. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน 2

นำสิ่งสกัดในเฮกเซน 2 จากข้อ 1.4 หน้า 26 หน้า 5.37 กรัม ละลายด้วยเฮกเซน จำนวนเล็กน้อย ผสมกับบอลูมิเนียมออกไซด์จนร่วน บรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ที่มีบอลูมิเนียมออกไซด์ชนิด 90 Art. 1097 บรรจุอยู่แล้ว 150 กรัมชะด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสอบองค์ประกอบของสารละลาย รวมแต่ละส่วนที่เหมือนกันเช่นเดียวกับข้อ 1 ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน 2 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-3	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลืองอ่อน	1.32
5% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	4-9	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	10-11	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
15% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	12-17	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีเหลือง	น้อยมาก
20% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	18-19	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
25% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	20-21	คราบสีขาว	น้อยมาก
30% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	22	คราบสีขาว	น้อยมาก
40% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	23-24	คราบสีขาว	น้อยมาก
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	25-27	คราบสีขาว	น้อยมาก
60% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	28-29	คราบสีขาว	น้อยมาก
70% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	30-31	คราบสีขาว	น้อยมาก
75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	32-35	คราบสีขาว	น้อยมาก
80% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	36-41	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
คลอโรฟอร์ม	42-50	คราบสีเหลือง	น้อยมาก
2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	51-55	คราบสีเหลืองเข้ม	น้อยมาก
5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	56-58	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก

3. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4

นำสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 จากข้อ 2 หน้า 27 หน้า 100 กรัม มาแยกโดยใช้คอลัมน์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร บรรจุลูมิเนียมออกไซด์ 1,500 กรัม ไซโคลลัมน์ด้วยตัว ทำละลายต่างๆ ตามสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ ครั้งละ 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสอบองค์ประกอบของสารละลาย รวมแต่ละส่วนที่เหมือนกันเช่นเดียวกับ ข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-10	ผลึกแผ่นสีเหลืองสีขาวในน้ำมันสีเหลืองอ่อน	5.74
เฮกเซน	11-13	ของแข็งสีขาวเล็กน้อยในน้ำมันสีเหลือง	น้อยมาก
เฮกเซน	14-26	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีเหลือง	2.41
เฮกเซน	27-60	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีเหลือง	3.20
10-20% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	61-98	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีเหลือง	5.37
30-50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	99-134	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีเหลือง	11.51
คลอโรฟอร์ม	135-150	น้ำมันสีส้มปนของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไข	2.77
2-5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	151-161	ของแข็งสีน้ำตาลปนน้ำมันสีส้ม	1.36

3.1 การแยกสารจากลำดับส่วนที่ 14-26 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดใน
เฮกเซน 4

นำสารจากลำดับส่วนที่ 14-26 ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไข ปนน้ำมันสีเหลือง หนัก 2.41 กรัม มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ โดยใช้คอลัมน์ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร บรรจุลูมิเนียมออกไซด์หนัก 70 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัว ทำละลายต่างๆ ตามสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ ครั้งละ 50 ลูกบาศก์ เซนติเมตร ตรวจสอบองค์ประกอบของสารละลาย รวมแต่ละส่วนที่เหมือนกันเช่นเดียวกับ ข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ผลการแยกสารจากลำดับส่วนที่ 14-26 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดใน
เฮกเซน 4 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-11	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
25% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	12-13	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำ มันสีเหลือง	0.124
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	14	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำ มันสีเหลือง	0.111
คลอโรฟอร์ม	15-19	คราบสีเหลืองเข้ม	น้อยมาก
30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	20-21	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.511
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	22-24	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การแยกสารจากลำดับส่วนที่ 27-60 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดใน
เฮกเซน 4

นำสารจากลำดับส่วนที่ 27-60 ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไข
ปนน้ำมันสีเหลืองหนัก 3.20 กรัม มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าน
ศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร บรรจุลูมิเนียมออกไซด์หนัก 96 กรัม ๕๕ คอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย
ต่างๆ ตามสภาพแห้งจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ ครั้งละ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร
ตรวจสอบองค์ประกอบของสารละลาย รวมแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ผลการแยกสารจากลำดับส่วนที่ 27-60 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดใน
เฮกเซน 4 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-5	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	6-9	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไข	1.08
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	10-11	คราบสีเหลือง	น้อยมาก
คลอโรฟอร์ม	12-15	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	16	คราบสีขาว	น้อยมาก

3.3 การแยกสารจากลำดับส่วนที่ 61-98 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดใน
เฮกเซน 4

สารจากลำดับส่วนที่ 61-98 ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวคล้าย เทียนไขใน
น้ำมันสีเหลืองหนัก 5.37 กรัม มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง
4.5 เซนติเมตร บรรจุลูมิเนียมออกไซด์หนัก 150 กรัม ๕๕ คอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่างๆ
ตามสภาพแห้งจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสอบ
องค์ประกอบของสารละลาย รวมแต่ละส่วนเช่นเดียวกับ ข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ผลการแยกสารจากลำดับส่วนที่ 61-98 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดใน
เฮกเซน 4 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-12	คราบสีเหลือง	น้อยมาก
10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	13-15	คราบสีขาว	น้อยมาก
20% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	16-21	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขใน น้ำมันสีเหลือง	0.45
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	22-28	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขใน น้ำมันสีเหลือง	3.50
คลอโรฟอร์ม	29-32	คราบสีขาว	น้อยมาก
คลอโรฟอร์ม	33-35	คราบสีเหลือง	น้อยมาก
30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	36-40	คราบสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก

3.4 การแยกสารจากลำดับส่วนที่ 99-134 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีสิ่งสกัดใน
เฮกเซน 4

นำสารจากลำดับส่วนที่ 99-134 ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว คล้ายเทียนไขใน
น้ำมันสีเหลืองหนัก 11.51 กรัม มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าน
ศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร บรรจุลูมิเนียมออกไซด์หนัก 230 กรัม ะคอลัมน์ด้วย ตัวทำละลาย
ต่างๆ ตามสภาพขั้ว จากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ ครั้งละ 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร
ตรวจสอบองค์ประกอบของสารละลาย รวมแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.7 ผลการแยกสารจากลำดับส่วนที่ 99-134 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดใน
เฮกเซน 4 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-3	คราบสีขาว	น้อยมาก
25% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	4-7	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขใน น้ำมันสีเหลือง	1.28
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	8	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขใน น้ำมันสีเหลือง	0.55
75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	9-11	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขใน น้ำมันสีเหลือง	1.23
คลอโรฟอร์ม	12	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไข	0.32
คลอโรฟอร์ม	13	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไข	0.03
คลอโรฟอร์ม	14	คราบสีขาว	น้อยมาก
คลอโรฟอร์ม	15	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไข	0.09
คลอโรฟอร์ม	16	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไข	0.21
10-50%เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	17-23	คราบสีขาว	น้อยมาก

3.5 การแยกสารจากลำดับส่วนที่ 135-150 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดใน
เฮกเซน 4

นำสารจากลำดับส่วนที่ 135-150 ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีส้มปนของแข็งสีขาว
คล้ายเทียนไขหนัก 2.77 กรัม มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง
3 เซนติเมตร บรรจุลูมิเนียมออกไซด์หนัก 80 กรัม ละเอียดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามสภาพ
ซั้ว จากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ ครั้งละ 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสอบ
องค์ประกอบของสารละลาย รวมแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 ผลการแยกสารจากลำดับส่วนที่ 135-150 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัด
ในเฮกเซน 4 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี



ตารางที่ 2.8 ผลการแยกสารจากลำดับส่วนที่ 135-150 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัด
ในเฮกเซน 4 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-2	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขใน น้ำมันสีเหลือง	0.12
25-75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	3-7	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขใน น้ำมันสีเหลือง	0.72
คลอโรฟอร์ม	8-10	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขใน น้ำมันสีเหลืองอ่อน	0.33
10-25% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	11-18	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขใน น้ำมันสีเหลืองปนน้ำตาล	0.33

3.6 การแยกสารจากลำดับส่วนที่ 151-161 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของ
สิ่งสกัดในเฮกเซน 4

นำสารจากลำดับส่วนที่ 151-161 ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลปนน้ำมัน
สีส้มหนัก 1.36 กรัมมาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ โดยใช้คอลัมน์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5
เซนติเมตร บรรจุลูมิเนียมออกไซด์หนัก 40 กรัม สะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่างๆตามสภาพขึ้น
จากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ ครั้งละ 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสอบ
องค์ประกอบของสารละลาย รวมแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 ผลการแยกสารจากลำดับส่วนที่ 151-161 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัด
ในเฮกเซน 4 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	1-5	คราบสีขาว	น้อยมาก
75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	6	คราบน้ำมันสีเหลือง	น้อยมาก
คลอโรฟอร์ม	7	คราบสีน้ำตาล	น้อยมาก
5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	8	ของแข็งสีน้ำตาล	0.52
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	9	คราบสีน้ำตาล	น้อยมาก

4. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน 5

นำสิ่งสกัดในเฮกเซน 5 จากข้อ 2.1 หน้า 27 หนัก 21.9 กรัม มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลสูง 5 เซนติเมตร ะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ที่มีสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 500 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน 5 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-4	ผลึกรูปสี่เหลี่ยมสีขาวใสในน้ำมันสีเหลืองอ่อน	3.47
5% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	5	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลืองอ่อน	0.02
10-15% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	6-7	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีเหลือง	0.87
20-25% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	8-9	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีเหลือง	0.90
30-35% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	10-11	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีส้มอ่อน	0.75
40% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	12	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีส้มอ่อน	1.16
50-60% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	13-14	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีส้มอ่อน	1.98
70-75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	15-16	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีส้มอ่อน	1.64
80-85% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	17-18	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีส้มอ่อน	2.07
คลอโรฟอร์ม	19-20	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีส้มอ่อน	0.79

ตารางที่ 2.10 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน 5 ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (ต่อ)

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	21	ของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไขในน้ำมันสีเหลืองปนน้ำตาล	0.23
5-20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	22-24	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล	2.62
25-50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	25-27	คราบสีน้ำตาลอ่อน	น้อยมาก

5. การแยกสารจากสิ่งสกัดในแอสีโตน

นำสิ่งสกัดในแอสีโตน จากข้อ 2.1 หน้า 27 น้หนัก 39.1 กรัม มาแยก โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจล 780 กรัม ะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 1,000 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในแอสีโตน ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-2	ผลึกรูปสี่เหลี่ยมสีขาวใสในน้ำมันสีเหลือง	10.12
10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	3-4	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	0.80
20% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	5-9	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาวคล้ายเทียนไข	1.6
30-50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	10-13	น้ำมันสีส้มปนของแข็งสีขาว	10.19
75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	14	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว	3.23
75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	15	น้ำมันสีน้ำตาลเข้มปนของแข็งสีขาว	40.88

ตารางที่ 2.11 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในแอซีโตน ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ต่อ)

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
คลอโรฟอร์ม	16	น้ำมันสีเขียวเข้มอมน้ำตาลปน ของแข็งสีขาว	19.74
คลอโรฟอร์ม	17-18	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	1.69
10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	19	น้ำมันสีเขียวเข้ม	14090
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	20-22	น้ำมันสีน้ำตาล	1.40

5.1 การแยกสารลำดับส่วนที่ 16 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดใน
แอซีโตน

นำสารจากลำดับส่วนที่ 16 ซึ่งมีลักษณะ เป็นน้ำมัน สีเขียวเข้มอมน้ำตาลปน
ของแข็งหนัก 19.74 กรัม มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง
4.5 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจล 400 กรัม ซะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามสภาพขั้ว จาก
น้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ ครั้งละ 250 ลูกบาศก์เซนติเมตรรวมแต่ละส่วน เช่นเดียว
กับข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.12

ตารางที่ 2.12 ผลการแยกสารจากลำดับส่วนที่ 16 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดใน
แอซีโตน ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
คลอโรฟอร์ม	1	คราบสีเหลือง	น้อยมาก
คลอโรฟอร์ม	2	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว คล้ายเทียนไข	6.29
คลอโรฟอร์ม	3	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว คล้ายเทียนไข	2.07
คลอโรฟอร์ม	4-5	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	1.70
1% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	6-7	น้ำมันสีเขียวเข้มปนน้ำตาล	6.82
10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	8-9	คราบสีน้ำตาล	น้อยมาก

6. การแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม

นำสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม 1 จากข้อ 1.2 หน้า 26 รวมกับสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม 2 จากข้อ 2.2 หน้า 28 หนัก 4.24 กรัม มาแยกโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจล 85 กรัม ๕๕ คอลัมน์ ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามสภาพขั้ว จากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตรวจสอบองค์ประกอบ ของสารละลาย รวมแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.13

ตารางที่ 2.13 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	1-11	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว	0.04
60% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	12-15	คราบสีขาว	น้อยมาก
70-80% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	16-23	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อนปนของแข็งสีขาว	0.02
คลอโรฟอร์ม	24-25	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อนปนของแข็งสีขาว	0.01
1% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	26-32	คราบสีขาว	น้อยมาก
2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	33-37	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว	0.11
2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	38-39	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว	0.39
2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	40-44	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว	0.10
2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	45-71	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว	น้อยมาก
3-4% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	72-79	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว	น้อยมาก
5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	80-93	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว	0.10
10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	94-128	คราบสีเหลือง	น้อยมาก
20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	129-135	คราบสีเขียวเข้ม	น้อยมาก
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	136-140	คราบสีเหลืองปนน้ำตาล	น้อยมาก
เมทานอล	141-143	คราบสีน้ำตาล	น้อยมาก

7. การแยกสารจากสิ่งสกัดในบิวทานอล

นำสิ่งสกัดในบิวทานอลจากข้อ 1.3 หน้า 26 หน้า 39.65 กรัม มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจล สูง 5 เซนติเมตร ๒๕๐ มิลลิเมตร ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามสภาพขั้ว จากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 800 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บแต่ละส่วน เช่นเดียวกับ ข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.14

ตารางที่ 2.14 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในบิวทานอลด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
50-75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน	1-2	คราบน้ำมันสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
คลอโรฟอร์ม	3-4	คราบน้ำมันสีเหลืองอ่อน	4.56
5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	5-6	คราบน้ำมันสีส้ม	น้อยมาก
10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	7-8	น้ำมันสีส้มปนของแข็งสีขาว	0.36
10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	9-10	น้ำมันสีแดงอ่อน	2.84
15% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	11-16	น้ำมันสีแดงเข้ม	7.58
20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	17-23	น้ำมันสีน้ำตาลแดงปนของแข็งสีเหลือง	6.71
25-30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	24-31	ของแข็งสีน้ำตาลแดง	16.80
40-50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	32-35	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม	2.65

8. การแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอล

นำสิ่งสกัดในเมทานอลจากข้อ 2.3 หน้า 28 หน้า 75 กรัม มาแยกโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 เซนติเมตร บรรจุซิลิกาเจลสูง 5 เซนติเมตร ๒๕๐ มิลลิเมตร ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ตามสภาพขั้วจากน้อยไปมาก เก็บสารละลายจากคอลัมน์ครั้งละ 800 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 1 หน้า 29 ดังตารางที่ 2.15

ตารางที่ 2.16 ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดในเมทานอลด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนัก (กรัม)
คลอโรฟอร์ม	1-3	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	1.34
2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	4-7	น้ำมันสีเขียวเข้มปนของแข็ง	5.49
10% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	8-12	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีน้ำตาล	4.85
20-40% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	13-22	น้ำมันสีน้ำตาลเหนียวหนืด	18.63
50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	23-26	น้ำมันสีน้ำตาลดำเหนียว	17.96
60-70% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม	27-29	น้ำมันสีน้ำตาลดำเหนียวปนของแข็ง	4.15
เมทานอล	30	ของแข็งสีน้ำตาลเป็นแผ่นแข็ง	5.64

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทำสารให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

1. การทำสาร 1 และสาร 2 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 1 และสาร 2 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 1-3 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสิ่งสกัดในเฮกเซน 2 (ตารางที่ 2.1) ลำดับส่วนที่ 1-10 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.2) ลำดับส่วนที่ 1-5 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสิ่งสกัดในเฮกเซน 5 (ตารางที่ 2.10) และลำดับส่วนที่ 1-2 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในแอสีโตน (ตารางที่ 2.11) TLC มีเพียง 1 จุด

1.1 การทำสาร 1 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 1 ตกผลึกด้วยเฮกเซน จะได้ผลึกรูปสี่เหลี่ยมแบน วาว สีขาว น้ำหนัก 5.57 กรัม จุดหลอมเหลว 230-234 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เฮกเซน ละลายได้บ้างในแอสีโตน เอทิลแอสีเตต ไม่ละลายในเมทานอล ค่า R_f เป็น 0.84 (อลูมิเนียมออกไซด์ : 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3023 (w), 2937, 2868 (s), 1661 (w), 1470 (m), 1382 (m) และ 798 (m) (รูปที่ 3)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 5.16 (1H, brd), 2.09-1.93 (2H, m), 1.86-1.75 (2H, m), 1.70-1.59 (3H, m), 1.57 (3H, dd, $J=1.6, 1.8$ Hz), 1.58-0.99 (15H, m), 0.97 (3H, s), 0.92 (3H, s), 0.91 (3H, s), 0.89 (3H, s), 0.87 (3H, d, $J=6.7$ Hz), 0.83 (3H, d, $J=6.7$ Hz), และ 0.77 (3H, s) (รูปที่ 4-6)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 15.65, 16.09, 16.36, 17.51, 17.92, 18.28, 19.93, 20.60, 20.67, 21.95, 22.89, 27.21, 28.42, 28.46, 29.14, 30.77, 35.21, 35.69, 37.63, 38.45, 38.75, 39.08, 40.21, 42.78, 49.37, 51.78, 57.19, 60.10, 120.30 และ 144.31 (รูปที่ 7)

DEPT-90 (δ , ppm) ปรากฏสัญญาณ ของ CH ที่ 30.77, 49.37, 51.78, 57.19, 60.10 และ 120.30 (รูปที่ 8)

DEPT-135 (δ , ppm) ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ 15.65, 16.09, 16.36, 17.92, 20.60, 20.67, 21.95, 22.89, 30.77, 49.37, 51.78, 57.19, 60.10 และ 120.30 ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 17.51, 18.28, 19.93, 27.21, 28.42, 28.46, 29.14, 35.21, 35.69 และ 38.75 (รูปที่ 9)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 410 นอกจากนี้ ยังพบชิ้นส่วนของ การแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญ m/z (% relative intensity) ดังนี้ 395 (20.3) , 367 (4.9) , 340 (1.8) , 325 (9.5) , 205 (11.7) , 203 (14.1) , 191 (40.1) , 189 (12.9) และ 175 (16.6) (รูปที่ 17)

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิคอลัมน์ 260 °C , อุณหภูมิ เครื่องฉีด 290 °C , อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 45 มิลลิลิตรต่อนาที) พบว่าสาร 1 มีค่า retention time (นาที) เป็น 20.47 รูปที่ 18) ซึ่งแยกสาร 1 ด้วยการตกผลึกด้วยเฮกเซน หลายๆ ครั้ง ออกจากสารผสม (สาร 2+ สาร 6+ สาร 1) ที่มีค่า retention time (รูปที่ 18) ดังแสดงในตารางที่ 2.16

ตารางที่ 2.16 retention time และพื้นที่ใต้พีคจากแก๊สโครมาโทแกรม ของสารผสม (สาร 2+ สาร 6+ สาร 1)

retention time (นาที)	พื้นที่ใต้พีค	%
15.09	21388	4.25
17.44	76660	15.24
20.20	426356	84.76

1.2 การทำสาร 2 ให้บริสุทธิ์ และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 2 ได้จากการนำเอาสารที่เหลือจากการตกผลึกแยกสาร 1 ออกไป แล้วมาตกผลึกด้วยเมทานอลผสมคลอโรฟอร์ม จะได้ผลึกรูปเข็มขาว สีขาว หนัก 13 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 165-170 °C ละลายได้ดีในเฮกเซน คลอโรฟอร์ม แอซีโตน เอทิลแอซีเตต ไม่ละลายในเมทานอล ค่า R_f เป็น 0.84 (อลูมิเนียมออกไซด์ : 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 2941 , 2869 (s) , 1636 (w) , 1471 , 1381 (m) และ 815 (w) (รูปที่ 19)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 5.28 (1H, ddd, $J=5.1, 2.4, 2.4$ Hz) , 2.06 (1H, m) , 1.89 (1H, m) , 1.83 (1H, m) , 1.76-1.10 (21H, m) , 1.05 (3H, s) , 0.97 (1H, m) , 0.89 (3H, d, $J=6.7$ Hz) , 0.88 (3H, s) , 0.84 (3H, s) , 0.83 (3H, d, $J=6.7$ Hz) , 0.82 (3H, s) , 0.76 (3H, s) และ 0.73 (3H, s) (รูปที่ 20-22)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (^{13}C) ปรากฏสัญญาณที่ chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 151.69 , 115.61 , 59.68 , 52.03 , 44.87 , 42.97 , 42.44 , 41.50 , 39.99 , 38.06 , 37.69 , 36.78 , 36.75 , 36.20 , 33.64 , 32.80 , 30.79 , 29.30 , 28.23 , 25.05 , 22.99 , 22.14 , 21.68 , 20.15 , 19.56 , 19.52 , 17.89 , 15.84 , 15.43 และ 14.00 (รูปที่ 23-24)

DEPT-90 (δ , ppm) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 115.61, 59.68 , 52.03 , 44.87 , 39.99 และ 30.79 (รูปที่ 25)

DEPT-135 (δ , ppm) ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ 115.61, 59.68 , 52.03 , 44.87 , 39.99 , 32.80 , 30.79 , 25.05 , 22.99 , 22.14 , 21.68 , 15.84 , 15.43 และ 14.00 ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 42.44 , 41.50 , 36.78 , 36.20 , 29.30 , 28.23 , 20.15 , 19.56 , 19.52 และ 17.89 (รูปที่ 26)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 410 นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของ การแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญ m/z (% relative intensity) ดังนี้ 395 (43.9) , 367 (6.1) , 257 (2138) , 243 (100) , 231 (20.1) , 217(7.3) , 205 (26.8) และ 191 (71.9) (รูปที่ 39)

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิคอลัมน์ 260 $^{\circ}\text{C}$, อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 $^{\circ}\text{C}$, อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 45 มิลลิลิตรต่อนาที) พบว่าสาร 2 มีค่า retention time (นาที) เป็น 14.73 (รูปที่ 40) ซึ่งแยกสาร 2 ด้วยการตกผลึกสารผสม (สาร 2+ สาร 6+ สาร 1) (รูปที่ 40) ด้วยเฮกเซน เพื่อแยกสาร 1 ออกจนหมด และตกผลึกสารที่เหลือด้วย เมทานอลผสมคลอโรฟอร์มหลายๆครั้ง

2. การทำสาร 3 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 3 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 12-17 ซึ่งชะด้วย 15% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน 2 (ตารางที่ 2.2) ลำดับส่วนที่ 12-14 ซึ่งชะด้วย 25-50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 14-26 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.4) ลำดับส่วนที่ 6-9 ซึ่งชะด้วย 10% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 27-60 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.5) ลำดับส่วนที่ 16-21 ซึ่งชะด้วย 20% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 61-98 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.6) ลำดับส่วนที่ 12 ซึ่งชะด้วย คลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 99-134 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.7) ลำดับส่วนที่ 3-7 ซึ่งชะด้วย 25-75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 135-150 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.8) ลำดับส่วนที่ 8

ซึ่งชะด้วย 5% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 151-161 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.9) ลำดับส่วนที่ 6-7 ซึ่งชะด้วย 10-15% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน และลำดับส่วนที่ 15-24 ซึ่งชะด้วย 70% คลอโรฟอร์มในเฮกเซนถึง 20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน 5 (ตารางที่ 2.10) ลำดับส่วนที่ 5-9 ซึ่งชะด้วย 20% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในแอสีโตน (ตารางที่ 2.11) ลำดับส่วนที่ 1-23 ซึ่งชะด้วย 50-80% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม (ตารางที่ 2.13) ลำดับส่วนที่ 1-7 ซึ่งชะด้วยคลอโรฟอร์ม และ 2% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเมทานอล (ตารางที่ 2.15) ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเมทานอล จะได้ของแข็งสีขาวหนัก 5.28 กรัม จุดหลอมเหลว 80-82 °C ละลายได้ดีในเฮกเซนร้อน คลอโรฟอร์มร้อน ไม่ละลายในแอสีโตน เอทิลแอซีเตต และเมทานอล ค่า R_f เป็น 0.76 (ซิลิกาเจล: คลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm⁻¹) ดังนี้ 2918 , 2850 (s) , 1736 (s) , 1464 (m) , 1173 (m) และ 721 (m) (รูปที่ 41)

แมสสเปกตรัม ดังรูปที่ 42

3. การทำสาร 4 ให้บริสุทธิ์และข้อมูล ทางสเปกโทรสโกปี

สาร 4 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 20-21 ซึ่งชะด้วย 30% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 14-26 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.4) ลำดับส่วนที่ 6-7 ซึ่งชะด้วย 10-15% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน และลำดับส่วนที่ 8-9 ซึ่งชะด้วย 20-25% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสิ่งสกัดในเฮกเซน 5 (ตารางที่ 2.10) ลำดับส่วนที่ 2 ซึ่งชะด้วยคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 16 จากสิ่งสกัดในแอสีโตน (ตารางที่ 2.12) ตกผลึกด้วยเฮกเซน จะได้ผลึกรูปเข็มขาว สีขาว หนัก 20 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 280-281 °C (สลายตัว) ละลายได้บ้างในคลอโรฟอร์มร้อน ไม่ละลายในเฮกเซน แอสีโตน เอทิลแอซีเตต ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) อีเทอร์ และเมทานอล ค่า R_f เป็น 0.16 (อลูมิเนียมออกไซด์: 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm⁻¹) ดังนี้ 3600-3200 (w), 2945, 2868 (s), 1621 (w), 1462, 1378 (m), 1085 (m) และ 1018 (s) (รูปที่ 43)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) ปรากฏสัญญาณ ที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 7.71-7.69 (dd, J=3.4, 3.4 Hz) , 7.53-7.04 (dd=3.4, 3.4 Hz) , 4.93 (s) , 4.23-4.11 (m) ,



3.81-3.79 (dd, $J=3.3, 3.3$ Hz) , 2.99-2.96 (dd, $J=7.0, 7.3$ Hz) , 2.42-2.37 (m) , 2.04 (s) , 1.98-1.90 (m) , 1.89-1.86 (dd, $J=4.0, 4.0$ Hz) และ 1.73-0.69 (m) (รูปที่ 44)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 132.47 , 130.86 , 128.80 , 100.95 , 75.70 , 72.16 , 68.17 , 56.19 , 56.14 และ 54.30-10.96 (รูปที่ 45)

แมสสเปกตรัม ดังรูปที่ 46 .

4. การทำสาร 5 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 5 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 3-5 ซึ่งชะด้วย 25% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน 1 (ตารางที่ 2.1) ลำดับส่วนที่ 22-28 ซึ่งชะด้วย 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ ของลำดับส่วนที่ 61-98 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.6) ลำดับส่วนที่ 10-13 ซึ่งชะด้วย 30-50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเอซีโตน (ตารางที่ 2.11) ตกผลึกด้วยเอทิลเอซีเตต ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว น้หนัก 384.2 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว $224-225$ °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เอซีโตน เอทิลเอซีเตต ละลายได้บ้างในเฮกเซน เมทานอลร้อน TLC มีเพียง 1 จุด ค่า R_f เป็น 0.46 (ซิลิกาเจล: 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3623 (m), 2919, 2864 (s), 1737, 1636 (w), 1456, 1385 (m), 1226, 1168 (m), 1002 (m) และ 841, 815 (w) (รูปที่ 47)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 5.39-5.37 (dd, $J=3.0, 3.0$ Hz) , 5.34-5.32 (m) , 4.38-4.33 (m) , 2.47-2.36 (m) , 2.19-2.10 (m) , 2.04 (s) , 1.92-1.81 (m) และ 1.77-0.92 (m) (รูปที่ 48)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 151.59, 144.73, 116.97, 115.11, 74.36, 73.94, 59.5, 56.8, 54.72, 51.38, 48.10, 44.83, และ 43.15-12.82 (รูปที่ 49) .

แมสสเปกตรัม .ดังรูปที่ 50

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิคอลัมน์ 260 °C , อุณหภูมิเครื่องฉีด 290 °C , อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 45 มิลลิตรต่อนาที) ดังรูปที่ 51

เตรียมอนุพันธ์ของสาร 5 เป็นอนุพันธ์เอซีเตตโดยนำสาร 5 มา 50 มิลลิกรัมรีฟรักซ์กับ เอซีติกแอนไฮไดรด์ โดยใช้พริดีนเป็นตัวทำละลาย ในเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น เทของผสมลงในน้ำผสมน้ำแข็งกรองแยกของแข็ง แล้วนำของแข็งละลายในคลอโรฟอร์ม จะได้สารละลาย

สีน้ำตาลปนเหลือง ผ่านสารละลายที่ได้ไปในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล อย่างรวดเร็ว จนได้สารละลายใส นำมาตกผลึกด้วยเอทิลเอซีเตต จะได้ผลึกเป็นแผ่นแบนขาว สีขาว หน้า 10 มิลลิกรัม (กำหนดให้เป็น สาร 5g) จุดหลอมเหลว 190-192^oC ละลายได้ดีใน คลอโรฟอร์ม แอซีโตน เอทิลเอซีเตต ละลายได้บ้างในเฮกเซน เมทานอลร้อน TLC มีเพียง 1 จุด ค่า R_f เป็น 0.51 (ซิลิกาเจล : 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm⁻¹) ดังนี้ 2930 , 2867 (s) , 1471 , 1457 (m) , 1387 , 1365 (s) , 1245 (s) , 1031 (m) , 948 (m) และ 845 (w) (รูปที่ 52)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 5.35-5.15 (m) , 2.50 (m) , 2.00(s) และ 1.66-0.79 (m) (รูปที่ 53)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 170.58 , 151.59 , 144.73 , 116.97 , 115.11 , 74.36 , 73.94 , 59.50 , 56.80 , 54.72 , 51.38 , 48.10 , 44.83 และ 43.15-12.82 (รูปที่ 54)

แก๊สโครมาโทแกรม(ใช้คอลัมน์และภาวะของเครื่องเช่นเดียวกับการวิเคราะห์สาร 5) ดังรูปที่ 55

5. การทำสาร 6 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 6 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 14 ซึ่งชะด้วย 75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในแอซีโตน (ตารางที่ 2.11) ตกผลึกด้วยเอทิลเอซีเตต ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว หน้า 25 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 210-212^oC ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เฮกเซน ละลายได้บ้างในแอซีโตน เอทิลเอซีเตต ไม่ละลายในเมทานอล ค่า R_f เป็น 0.84 (อลูมิเนียมออกไซด์: 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm⁻¹) ดังนี้ 3002(w), 2939, 2868 (s), 1739, 1694, 1643 (w), 1452, 1382 (m), 1174 (m), 1030, 994, 972 (m), 804 (m), 684 (m) และ 580 (w) (รูปที่ 56)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl₃) ปรากฏสัญญาณที่ chemical shift (δ,ppm) ดังนี้ 5.16 (2H, dd, J=1.22, 1.22 Hz) , 2.25-2.20 (1H, m) , 2.08-2.03 (1H, m) , 2.02-1.97 (1H, m) , 1.87, 1.85 (AB quatet, 1H) , 1.82-1.62 (6H, m) , 1.57 (3H, dd, J= 1.83 , 1.53 Hz) , 1.51-1.23 (12H, m) , 1.14 (3H, s) , 1.03 (3H, s) , 0.97 (3H, s) , 0.91 (3H, d, J=6.7 Hz) , 0.90 (3H, s) , 0.88 (3H, d, J= 6.7 Hz) และ 0.73 (3H, s) (รูปที่ 57-58)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 16.11, 17.48, 17.90, 18.35, 19.73, 20.72, 21.19, 22.11, 22.16, 22.79, 27.18, 27.99, 29.09, 29.85, 34.80, 35.41, 37.04, 37.74, 38.40, 38.80, 38.89, 40.57, 45.29, 49.36, 57.09, 63.67, 117.71, 120.33, 144.26 และ 159.89 (รูปที่ 59)

DEPT-90 (δ, ppm) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 29.09, 49.36, 57.09, 63.67, 117.71 และ 120.33 (รูปที่ 60)

DEPT-135 (δ, ppm) ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ 16.11, 17.90, 19.73, 20.72, 21.19, 22.11, 22.16, 22.79, 29.09, 49.36, 57.09, 63.67, 117.71 และ 120.33 ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 17.48, 18.35, 27.18, 27.99, 29.85, 34.80, 35.41, 37.04 และ 38.89 (รูปที่ 61)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 408 นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วน ของการแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญ m/z (% relative intensity) ดังนี้ 393 (52.8) , 365 (8.5) , 257 (5.6) , 243 (3.9) , 203 (9.2) และ 175 (15.7) (รูปที่ 69)

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิคอลัมน์ 260°C , อุณหภูมิเครื่องฉีด 290°C , อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 45 มิลลิลิตรต่อนาที) พบว่าสาร 6 มีค่า retention time (นาที) เป็น 17.82 (รูปที่ 70)

6. การทำสาร 7 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 7 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 15 ซึ่งชะด้วย 75%คลอโรฟอร์มในเฮกเซนในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเอซีโตน(ตารางที่ 2.11)ตกผลึกด้วยเมทานอลจะได้ของแข็งอสังฐานสีขาว หนัก 10 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว $180-184^\circ\text{C}$ ละลายได้ดี ในคลอโรฟอร์ม เอซีโตน เอทิลแอลกอฮอล์ ไม่ละลายในเฮกเซน เมทานอล ค่า R_f เป็น 0.26 (ซิลิกาเจล: 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3600-3200 (m), 2929, 2868 (s), 1639 (w), 1469, 1378 (m) และ 1039 (m) (รูปที่ 71)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 5.28 (1H,ddd,J=5.4,2.1,2.1 Hz) , 3.38 (1H,d,J=10.68 Hz) , 3.13 (1H,d,J=10.7 Hz) , 2.06 (1H,d,J=14.34 Hz) , 1.88 (2H,d,J=13.12 Hz) , 1.84-1.77 (2H , m) , 1.66-1.10 (21H,m) , 1.07 (3H,s) , 0.96 (1H,t) , 0.86 (3H,d,J=6.7 Hz) , 0.82 (3H,s) , 0.80 (3H,d,J=6.7 Hz) ,0.79 (3H,s) , 0.73 (3H,s) และ 0.71 (3H,s) (รูปที่ 72-73)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 13.97, 15.42, 15.90, 17.48, 17.85, 18.82, 19.45, 20.12, 22.11, 22.99, 25.59, 28.20, 29.22, 30.77, 35.59, 36.15, 36.74, 36.74, 37.69, 37.84, 38.20, 38.47, 39.88, 41.00, 42.94, 51.99, 59.66, 71.85, 115.85 และ 151.29 (รูปที่ 74-75)

DEPT-90 (δ, ppm) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 30.77, 38.47, 39.88, 51.99 , 59.66 และ 115.85 (รูปที่ 76-77)

DEPT-135 (δ, ppm) ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ 13.97, 15.42, 15.90, 17.48, 22.11, 22.99, 25.59, 30.77, 38.47, 39.88, 51.99, 59.61 และ 115.85 ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 17.85, 18.82, 19.45, 20.12, 28.20, 29.22, 35.59, 36.15, 36.74, 41.00 และ 71.85 (รูปที่ 76-77)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 426 นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของการแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญ m/z (% relative intensity) ดังนี้ 411 (92.6) , 395 (1.7) , 393 (5.6) , 383 (0.6) , 273 (19.7) , 259 (30.5) , 247 (5.6) , 217 (5.6) , 205 (13.2) และ 191 (10.1) (รูปที่ 86)

7. การทำสาร 8 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 8 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 3 - 5 ซึ่งชะด้วย 25% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสิ่งสกัดในเฮกเซน 1 (ตารางที่ 2.1) เป็นน้ำมันสีเหลืองหนัก 10 มิลลิกรัม ละลายได้ดีในเฮกเซน คลอโรฟอร์มไม่ละลายในเมทานอล ค่า R_f เป็น 0.8(ซิลิกาเจล: 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (NaCl) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 2926, 2855 (s), 1744 (s), 1465 (m), 1172 (m) และ 723 (m) (รูปที่ 87)

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1, อุณหภูมิคอลัมน์ 240 °C อุณหภูมิเครื่องฉีด 280 °C อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 45 มิลลิลิตรต่อนาที) พบว่าสาร 8 มีค่า retention time (นาที) (รูปที่ 88) ดังนี้ 0.94 , 1.32 , 1.44 , 1.83 , 2.07 , 2.48 , 3.04 , 3.74 , 4.08 , 4.47 , 4.70 , 5.43 , 6.48 , 8.33 , 13.13 และ 22.58

8. การทำสาร 9 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 9 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 9-10 ซึ่งชะด้วย 75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ของสิ่งสกัดในเฮกเซน 1 (ตารางที่ 2.1) ลำดับส่วนที่ 9-11ซึ่งชะด้วย 75% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ ของลำดับส่วน ที่ 99-134 จากสิ่งสกัดใน เฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.7) ลำดับส่วนที่ 8-10 ซึ่งชะด้วยคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 135-150 จากสิ่งสกัดใน เฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.8) ลำดับส่วนที่ 4-5 ซึ่งชะด้วยคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ ของลำดับส่วนที่ 16 จากสิ่งสกัดในเอซีโตน (ตารางที่ 2.12) ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเฮกเซน จะได้ผลึกรูปเข็ม สีขาว หนัก 5 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 220-235 °C ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ละลายได้บ้างในเฮกเซน เอซีโตน เอทิลเอซีเตต ไม่ละลายในเมทานอล TLC มีเพียง 1 จุด ค่า R_f เป็น 0.2 (ซิลิกาเจล: 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3600-3200 (m), 2946, 2860 (s), 1639 (w), 1461, 1377 (m), 1047, 1026 (m) และ 889 (m) (รูปที่ 89)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 4.70 , 4.64 , 3.72 , 3.25 , 2.15 (s) และ 1.66-0.69 (m) (รูปที่ 90)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 152.00 , 109.00 , 68.06 และ 56.14-13.98 (รูปที่ 91)

แมสสเปกตรัม ดังรูปที่ 92

แก๊สโครมาโทแกรม (ใช้คอลัมน์และภาวะของเครื่องเช่นเดียวกับ สาร 5) ดังรูปที่ 93

9. การทำสาร 10 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 10 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 12-16 ซึ่งชะด้วยคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเฮกเซน 1 (ตารางที่ 2.1) ลำดับส่วนที่ 11-18 ซึ่งชะด้วย 10-25% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของลำดับส่วนที่ 135-150 จากสิ่งสกัดในเฮกเซน 4 (ตารางที่ 2.8) ลำดับส่วนที่ 17-18ซึ่งชะด้วยคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของสิ่งสกัดในเอซีโตน (ตารางที่ 2.11) ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสมเฮกเซน จะได้ผลึกรูปเข็มขาว สีขาว หนัก 36 มิลลิกรัม จุดหลอมเหลว 140-142 °C ละลายได้ดีในเฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอซีโตน และเอทิลเอซีเตต ไม่ละลายในเมทานอล ค่า R_f เป็น 0.04 (ซิลิกาเจล: 50% คลอโรฟอร์มในเฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3600-3200(m), 2935, 2867(s), 1642(w), 1464, 1381(m), 1060(m), 960(w) และ 802(w) (รูปที่ 94)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 0.68-2.28 (m) , 3.50 (1H,m) , 5.09 (1H,m) และ 5.36 (2H,d) (รูปที่ 95)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (CDCl_3) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ , ppm) ดังนี้ 11.78-56.78 , 71.73 , 121.63 , 129.20 , 138.23 และ 140.68 (รูปที่ 96)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 414 , 412 และ 400 นอกจากนี้ยังพบชิ้นส่วนของ การแตกมวล (mass fragmentation) ที่สำคัญ m/z (% relative intensity) ดังนี้ 396 (26.0) , 394 (12.1) , 382 (15.6) , 329 (32.1) , 327 (4.3) , 273 (24.3) , 255 (38.2) และ 213 (39.1) (รูปที่ 97)

แก๊สโครมาโทแกรม (คอลัมน์ OV-1 อุณหภูมิคอลัมน์ 260°C อุณหภูมิเครื่องฉีด 290°C อัตราการไหลของแก๊สไนโตรเจน 45 มิลลิลิตรต่อนาที) โดยเปรียบเทียบกับสาร 10 กับสเตอรอยด์มาตรฐาน ได้แก่ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol พบว่าสเตอรอยด์มาตรฐานมีค่า retention time (นาทีก) เป็น 12.18, 15.88, 16.93 และ 19.03 (รูปที่ 98) ส่วน retention time ของสาร 10 แสดงในตารางที่ 2.17

ตารางที่ 2.17 retention time และพื้นที่ใต้พีคจากแก๊สโครมาโทแกรมของสาร 10

retention time (นาทีก)	พื้นที่ใต้พีค	เปอร์เซ็นต์ (%)
16.02	60945	10.78
16.94	209874	37.13
19.22	294348	52.08

10. การทำสาร 11 ให้บริสุทธิ์และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี

สาร 11 แยกได้จากลำดับส่วนที่ 17-23 ซึ่งชะด้วย 20% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี แบบรวดเร็ว ของสิ่งสกัดในบิวทานอล (ตารางที่ 2.14) สิ่งสกัดในเอทานอล ลำดับส่วนที่ 27-29 ซึ่งชะด้วย 60-70% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ของสิ่งสกัดในเมทานอล (ตารางที่ 2.15) ตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มผสม เมทานอลร้อน จะได้ของแข็งอสัณฐาน สีเหลือง หนัก 1.64 กรัม จุดหลอมเหลว $280-281^\circ\text{C}$ (สลายตัว) ละลายได้ดีใน DMSO ละลายได้บ้างในเอทานอลร้อน ไม่ละลายในเฮกเซน คลอโรฟอร์ม แอซีโตน อีเทอร์ และเอทิลแอซีเตต ค่า R_f เป็น 0.2 (ซิลิกาเจล: 50% เมทานอลในคลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) พบการดูดกลืนที่ความถี่ (cm^{-1}) ดังนี้ 3266 (s), 2927 (m), 1648 (s), 1615 (s), 1488 (s), 1424 (s), 1297 (s), 1251 (s), 1189 (m), 1131 (m), 1100 (s), 1037 (s), 982 (s), 917 (w), 831 (w), 809 (m) และ 799 (m) (รูปที่ 99)

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO-d_6) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 13.79 (OH,s), 7.38 (1H,s), 6.86 (1H,s), 6.38 (1H,s), 4.63 (1H,d,J= 9.76 Hz) และ 4.09-3.09 (m) (รูปที่ 100)

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (DMSO-d_6) ปรากฏสัญญาณที่ค่า chemical shift (δ, ppm) ดังนี้ 179.01, 163.77, 161.74, 156.17, 154.31, 150.84, 143.79, 111.50, 107.87, 107.55, 102.49, 101.25, 93.27, 81.53, 78.95, 73.06, 70.60, 70.23 และ 61.46 (รูปที่ 101)

DEPT-90 (δ, ppm) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ 107.87, 102.49, 93.27, 81.53, 78.95, 73.06, 70.60 และ 70.23 (รูปที่ 102)

DEPT-135 (δ, ppm) ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ 107.87, 102.49, 93.27, 81.53, 78.95, 73.06, 70.60 และ 70.23 ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ CH_2 ที่ 61.46 (รูปที่ 103)

แมสสเปกตรัม พบไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 422 ดังรูปที่ 114

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย