



2.1 การสกัด (Extraction)

ใช้รากหนอนตายนอกที่ตากให้แห้ง และบดให้ละเอียดแล้วประมาณ 3 กิโลกรัม มา extract โดย Soxhlet apparatus ใช้ ethyl alcohol (b.p 78 - 80) ประมาณ 30 ลิตร เป็นตัวทำละลาย สกัดเป็นเวลาประมาณ 50 ชั่วโมง นำสิ่งที่สกัดได้มารอง แล้วลั่นเอาตัวทำละลายออกจนเกือบแห้ง จึงนำไปกลั่นไลตัวทำละลายให้หมดด้วยเครื่อง Rotary evaporator จะได้ crude product มีลักษณะเป็น semi-solid สีน้ำตาลเข้มหนัก 336 กรัม (11.2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของหนอนตายนอกที่แห้งและบดละเอียดแล้ว)

2.2 การแยกสาร (Separation)

นำ crude product ที่ได้จากการสกัดรากหนอนตายนอกด้วย ethyl alcohol ซึ่งไลตัวทำละลายออกหมดแล้วด้วย Rotary evaporator หนัก 336 กรัม มาสกัดด้วยกรดเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้กรดเกลือทั้งหมดประมาณ 2 ลิตร และเหลือ solid สีน้ำตาลอ่อนซึ่งไม่ละลายในกรดเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ล้างด้วยน้ำจนหมดกรดแล้วทำ solid ให้แห้งใน desicator โดยใช้ anhydrous CaCl_2 เป็นตัวดูดน้ำ จะได้ solid หนัก 134.40 กรัม (4.46 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของรากหนอนตายนอกที่แห้งและบดให้ละเอียดแล้ว) ส่วนที่ละลายในกรดเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์นำไประเหยไลน้ำออกให้หมดโดย Rotary evaporator จะได้อย่างเห็นยวสีน้ำตาล หนัก 190 กรัม (6.33 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของรากหนอนตายนอกที่แห้งและบดให้ละเอียดแล้ว)

2.2.1 การวิเคราะห์สารส่วนที่ละลายในกรดเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์

เอา crude product ส่วนที่ละลายในกรดเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ มา 0.50 กรัม วิเคราะห์หาองค์ประกอบของธาตุต่าง ๆ โดยวิธี Lassaigne's Test¹⁴ พบว่ามีธาตุไนโตรเจน คาร์บอน ไฮโดรเจน และ ออกซิเจน เมื่อนำ crude product ส่วนนี้มาทดสอบด้วย reagents¹⁵ ต่าง ๆ จะได้ ผลดังนี้

<u>2,4 - Dinitrophenylhydrazine</u>	จะได้ตะกอนชั้นสีเหลืองเข้มเกิดขึ้นทันที
<u>Tollen's reagent</u>	ให้ Ag - mirror
<u>Fehling's solution</u>	ได้ positive test ตะกอนแดงของ Cu_2O
Sodium metal ใน dry benzene	มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

แสดงว่าจะต้องมีสารพวก hydroxyaldehyde และ hydroxyketone และ crude product ส่วนนี้ละลายน้ำได้มาก ฉะนั้น hydroxyaldehyde หรือ hydroxyketone ควรจะเป็นพวกน้ำตาล ketose และ aldose หลายชนิดปนกันอยู่

นำ crude product มาอีก 20 มิลลิกรัม ละลายในกรดเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ 25 มิลลิตร แล้วแบ่งสารละลายมาทดสอบกับ reagents ต่อไปนี้

นำสารละลายมา 1 มิลลิตร เติม acetic acid ที่เจือจาง 0.5 มิลลิตร เติม phosphotungstic acid 2 มิลลิกรัม จะได้ตะกอนชั้นเกิดขึ้นทันที

นำสารละลายมา 1 มิลลิลิตร เติม Acetic acid เจือจาง 0.5 มิลลิลิตร เติม silicotungstic acid 2 มิลลิกรัม จะโคตะกอนสีน้ำตาลอ่อน

นำสารละลายมา 1 มิลลิลิตร เติม Picric acid 2 มิลลิกรัม โคตะกอนสีเหลืองเข้มเกิดขึ้น

นำสารละลายมา 1 มิลลิลิตร เติม Mayer's reagent 3 หยด โคตะกอนสีน้ำตาล

จากการวิเคราะห์หาธาตุพบว่ามีไนโตรเจน และจากผลที่ได้จากการทดสอบกับ reagents ต่าง ๆ ก็กล่าวได้ว่าใน crude product ส่วนที่ละลายในกรดเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ นั้นจะต้องมีสารพวก alkaloidal bases อยู่ด้วย

2.2.2 การแยก crude alkaloidal bases

นำ crude product ที่ได้จากการสกัดด้วยกรดเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้แห้งแล้วมา 100 กรัม ละลายด้วยกรดเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์จำนวน 150 มิลลิลิตร นำสารละลายนี้ไปมาสกัดด้วย ether ครั้งละ 200 มิลลิลิตร หลาย ๆ ครั้ง เพื่อสกัดเอาสารอินทรีย์ที่ละลายใน ether ออกให้หมด ใช้ ether ทั้งหมด 2 ลิตร ส่วน acidic solution ที่แยกได้นำมารองทำสารละลายที่กรองได้ให้เป็นคางควยสารละลายอัมโมเนีย 28 เปอร์เซ็นต์ แล้วสกัดด้วย ether หลาย ๆ ครั้ง ใช้ ether ทั้งหมดประมาณ 1.5 ลิตร แล้วนำ ethereal solution ที่ได้ไปเชยกับ 5 % sodium hydroxide หลาย ๆ ครั้ง เพื่อกำจัดสารประกอบที่มีสีออกให้หมด แล้วจึงล้างด้วยน้ำอีกครั้งหนึ่ง นำ ethereal solution ที่ปราศจากน้ำที่ทำให้แห้งด้วย anhydrous Potassium carbonate ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงกรองเอา Potassium carbonate ออก นำสารละลายที่ได้ไปกลั่นได้ ether ออกให้หมดจะได้

ยางเหนียว ๆ สีนํ้าตาลหนัก 130 มิลลิกรัม นำมาเติม methyl alcohol 10 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ กรองเอาตะกอนออก แล้วทำให้แห้งจะได้ solid หนัก 110 มิลลิกรัม solid นี้เมื่อตั้งทิ้งไว้จะเป็นยางเหนียว ๆ ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบด้วย reagents ต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบ alkaloidal bases ปรากฏว่าให้ positive test นํ้าหนักของ crude alkaloidal bases ที่ได้คือเป็น 0.006 เปอร์เซ็นต์โดยนํ้าหนักของรากหนอนตายอยากที่แห้ง และบคให้ละเอียดแล้ว

2.2.3 การแยกสารจาก solid ที่ได้จากการนำ crude product สกัดด้วยกรดเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์

นำ solid ที่เหลือจากการนำ crude product มาสกัดด้วยกรดเกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ทำให้แห้งแล้วหนัก 40 กรัม ละลายใน benzene จนละลายหมดใช้ benzene ทั้งหมด 500 มิลลิลิตร ปรากฏว่าเมื่อตั้งทิ้งไว้สารละลายจะแยกเป็นสองชั้น ชั้นล่างเป็นนํ้ามัน ซึ่งเมื่อแยกออกไปแล้วนำไปกลั่นได้ benzene ออกใหม่หมดจะได้นํ้ามันเหนียว ๆ สีนํ้าตาลหนัก 18 กรัม (2 เปอร์เซ็นต์ โดยนํ้าหนักของรากหนอนตายอยากที่ตากแห้งและบคให้ละเอียดแล้ว) ส่วนนํ้ามันซึ่งละลายใน benzene นำไปผ่านใน column chromatography ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 เซนติเมตร ยาว 100 เซนติเมตร ใช้ standard neutral alumina (500 กรัม) เป็น adsorbent ซึ่ง pack โดย wet packing method แล้ว elute column ด้วย benzene แบ่งรองรับ eluant fraction ละ 1 ลิตร แล้วกลั่นเอาตัวนํ้าละลายออกผลของการ elute column chromatography แสดงไว้ในตารางที่ 1

การแยกสารจาก solid ด้วย Column Chromatography

Eluant	Number of 1 litre fractions collected	m. p of compounds, °C	Weight of Compounds (grams)	Remark
Benzene	1	น้ำมันสีแดง	2.30	
	2 - 3	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	2.00	
	4 - 5	น้ำมันสีเหลือง	1.50	
	6 - 7	สารสีเหลือง m.p 199 - 202°	0.186	สาร ก.
		เกาะรอบ ๆ ขางชวก		
	8	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	1.80	
	9 - 29	ผลึกรูปเข็มสีแสง m.p 222 - 8° (d)	0.14	สาร ข.
	30 - 34	ผลึกรูปเข็มสีเหลือง m.p 210 - 14° (d)	0.02	สาร ค.
	35 - 39	Semi solid สีเหลือง	0.55	
	40 - 44	ผลึกรูปเข็มสีแดง m.p 240 - 44	0.01	สาร ง.
	45 - 52	น้ำมันสีเหลือง	0.45	

จะเห็นว่าสารแต่ละชนิดที่ตกผลึกออกมามีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นจึงต้องนำรากนอนคายออกที่ตากให้แห้งและบดให้ละเอียด นำมาสกัดด้วย ethyl alcohol จำนวนมาก แล้วแยกสารต่าง ๆ ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว เื่อรวบรวมให้มีปริมาณมากพอที่จะทำให้นิรสุทธและวิเคราะห์ต่อไป

2.3 การทำให้บริสุทธิ์ (Purification)

2.3.1 การทำให้สาร ก. บริสุทธิ์

สารก. ทำใหบริสุทธิ์หนัก 1.425 กรัม ซึ่งจะเป็น amorphous crystal เกาะอยู่รอบ ๆ ขวด เมื่อ benzene ที่ใช้เป็น eluant ระเหยไปเกือบ ๆ แท่งมี m.p. 199 - 203° นำมาละลายใน benzene จนสารละลายหมดพอดี ใช้ benzene ทั้งหมด 20 มิลลิลิตร นำไปผ่านใน column chromatography ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ยาว 25 เซนติเมตร ใช้ standard neutral alumina เป็น adsorbent และ elute column ด้วย benzene รวบรวม eluant fraction ละ 500 มิลลิลิตร ระเหยได้ solvent ออกจนเกือบแห้ง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น สาร ก. จะตกผลึกออกเป็นรูปเข็มเขาสีเหลือง รวมสารทั้งหมดที่ได้จากการ elute column chromatography นำมาตกผลึกใหม่อีกหลาย ๆ ครั้งใน benzene / petroleum ether (3 : 1) จะได้สารบริสุทธิ์เป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน มีจุดหลอมเหลวคงที่ 203 - 4° หนัก 0.950 กรัม

2.3.2 การทำให้สาร ข. บริสุทธิ์

สาร ข. ก่อนทำใหบริสุทธิ์ หนัก 1 กรัม ซึ่งได้จากการ elute column chromatography ด้วย benzene ซึ่งจะตกผลึกออกมาเป็นรูปเข็มสีส้ม ในขณะที่ solvent ยังไม่แห้ง มีจุดหลอมเหลวและสลายตัวที่อุณหภูมิ 222 - 6° นำมาตกผลึกหลาย ๆ ครั้ง ใน ethyl alcohol จะได้ผลึกรูปเข็มสีแสดมีจุดหลอมเหลวและสลายตัวที่อุณหภูมิคงที่ 229 - 30° หนัก 0.83 กรัม

2.3.3 การทำให้สาร ค. บริสุทธิ์

สาร ค. ก่อนทำให้บริสุทธิ์หนัก 0.125 กรัม ซึ่งได้จากการ elute column chromatography ด้วย benzene ใน fraction หลาย ๆ ครั้ง ซึ่งจะตกผลึกออกมาเป็นรูปเข็มสีเหลือง ในขณะที่ solvent ยังไม่แห้งมีจุดหลอมเหลวและสลายตัวที่อุณหภูมิ 210 - 14 เมื่อนำมา ตกผลึกหลาย ๆ ครั้งใน ethyl alcohol ในที่สุดจะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองเป็นมันวาว มีจุดหลอมเหลวและสลายตัวครั้งที่ อุณหภูมิ 215 - 6 หนัก 0.095 กรัม

2.3.4 การทำให้สาร ง. บริสุทธิ์

สาร ง. ก่อนทำให้บริสุทธิ์หนัก 0.12 กรัม ซึ่งได้จากการ elute column chromatography ใน fraction เกือบสุดท้าย จะตกผลึกเป็นรูปเข็มสีแดง เมื่อ solvent เกือบ ๆ แห้ง มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 240 - 44 เมื่อนำมา ตกผลึกใน benzene หลาย ๆ ครั้ง ในที่สุดจะได้ผลึกรูปเข็มเป็นมันวาวสีแดง มีจุดหลอมเหลวครั้งที่ อุณหภูมิ 244 - 5 หนัก 0.09 กรัม

ตารางที่ 2

เปอร์เซ็นต์ของสารที่แยกจาก Column Chromatography

Compounds (สาร)	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของ crude product
สาร ก. m.p 203 - 4	0.185
สาร ข. m.p 229 - 30 (d)	0.139
สาร ค. m.p 215 - 6 (d)	0.020
สาร ง. m.p 244 - 5	0.010

2.4 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร ก.

2.4.1 การตรวจหาคะสมบัติทางกายภาพ

สาร ก. เป็นของแข็งไม่มีสีเหลืองอ่อน มีจุดหลอมเหลว 203 - 4 ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายได้ใน organic solvent แทบทุกชนิด แต่ละลายได้มากน้อยต่างกัน ละลายได้ดีมากใน acetone และละลายใน petroleum ether ใต้น้อยมาก และเมื่อนำไปตรวจหาธาตุโดยวิธี Lassaigne's¹⁴ Test ปรากฏว่าไม่มีธาตุอื่นนอกจากคาร์บอนและไฮโดรเจน ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของธาตุพบว่ามี

$$C = 65.87 \%, \quad H = 4.72 \%, \quad O = 29.41 \%$$

$$-O-CH_3 = 29.06 \%$$

น้ำหนักโมเลกุลจาก experimental analysis = 294

Infra - red spectrum ของสาร ก. (รูปที่ 1 หน้า 28)

แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 3 (หน้า 21)

2.4.2 การตรวจหา functional group

ตรวจหา functional group ตาม standard⁵ method พบว่ามี Phenolic - OH group ฟูอกสี bromine และสารละลาย potassium permanganate และละลายใน 5 % sodium hydroxide ได้สารละลายสีแสด

ตรวจ Carbonyl group นำสาร ก. มา 0.1 มิลลิกรัม ละลายใน ethyl alcohol 1 มิลลิลิตร เติม 2,4 Dinitrophenyl - hydrazine 2 - 3 หยด จะโคตะกอนสีเหลืองแสด

ปฏิกิริยากับ Fehling's solution นำสาร ก. มา 0.1 มิลลิกรัม
เติม Fehling's solution 1 มิลลิลิตร นำไปอุ่นจะได้ตะกอนแดง ของ
Cuprous oxide

ปฏิกิริยากับ Tollen's reagent นำสาร ก. มา 0.1 มิลลิกรัม
เติม Tollen's reagent 2 มิลลิลิตร จะได้ silver mirror

ปฏิกิริยา กับ Schiff's reagent นำสาร ก. มา 0.1 มิลลิกรัม
เติม Schiff's reagent 4 - 5 หยด เขย่าปรากฏว่าไม่เปลี่ยนสี

ตรวจ Flavone¹⁷ นำสาร ก. มา 0.1 มิลลิกรัม ละลายใน
ethyl alcohol จำนวนเล็กน้อย เติมแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ 2 ชิ้น และ
หยดกรดเกลือเข้มข้น 2 หยด อุ่น จะได้สารละลายสีแดง

ปฏิกิริยากับกรดไนตริกเข้มข้น¹⁸ นำสาร ก. มา 0.1 มิลลิกรัม
ละลายในกรดไนตริกเข้มข้น 2 - 3 หยด เขย่าจะได้สารละลายสีส้ม

ปฏิกิริยากับกรดซัลฟูริกเข้มข้น¹⁰ นำสาร ก. มา 0.1 มิลลิกรัม
เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 2 - 3 หยด เขย่าจะได้สารละลายสีม่วงเข้ม

ปฏิกิริยากับกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น¹⁰ นำสาร ก. มา 0.1 มิลลิกรัม
เติมกรดเปอร์คลอริกเข้มข้น 2 - 3 หยด เขย่าจะได้สารละลายสีม่วงแดง

ตรวจ 3 - hydroxyflavanone^{8, 10} นำสาร ก. มา 0.1
มิลลิกรัม ละลายในกรดเกลือ เติม sodium acetate 2 มิลลิกรัม แล้ว
เติม acetic anhydride 2 - 3 หยด อุ่นจะได้สารละลายสีม่วง และ
เมื่อนำสาร ก. จำนวนเล็กน้อยละลายในกรดเกลือ เติมสังกะสีชิ้นเล็ก ๆ
2 ชิ้น นำไปอุ่นจะได้สารละลายสีม่วง และสาร ก. เมื่อนำปฏิกิริยา กับ
กรดเกลือเข้มข้นแล้วอุ่นจะได้สารละลายสีม่วง



2.4.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์

2.4.3.1 Acetylation ของสาร ก.⁵

ใช้สาร ก. หนัก 150 มิลลิกรัม ละลายใน anhydrous pyridine 5 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร เติม acetic anhydride ลงไป 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เทลงในน้ำแข็งปนน้ำ 50 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว กรอง acetylated product ล้างด้วยน้ำจนหมด pyridine ทำตะกอนให้แห้งจะได้สารหนัก 115 มิลลิกรัม แล้วเอาไปสกัดใน ethyl alcohol หลาย ๆ ครั้ง ผลที่สุดจะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองเป็นมันวาว จุดหลอมเหลวคงที่ที่อุณหภูมิ 194 - 5 °C หนัก 80 มิลลิกรัม

ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจนพบว่า

$$C = 63.50 \%, \quad H = 4.52 \%, \quad O = 31.98 \%$$

Infra - red spectrum ของ acetate ของสาร ก. แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 4 (หน้า 22)

Acetate ของสาร ก. เมื่อนำมาทดสอบ color reaction และทำปฏิกิริยากับ reagents ต่าง ๆ ปรากฏว่า ไม่ละลายใน 5% sodium hydroxide ไม่เปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย Ferric chloride ส่วนปฏิกิริยาอื่น ๆ เหมือนกับสาร ก. ทุกประการ

2.4.3.2 Methylation ของสาร ก.¹⁶

ใช้สาร ก. 150 มิลลิกรัม ละลายใน dry acetone 25 มิลลิลิตร เติม dimethyl sulfate ที่ก่ด้นให้บริสุทธิ์ 1.5 กรัม และ anhydrous potassium carbonate 15 กรัม นำไป reflux นาน

10 ชั่วโมง กรอง ขณะที่สารละลายยังอุ่นอยู่ ใช้ dry acetone จำนวน 25 มิลลิลิตร เขย่ากับตะกอนที่อยู่ในขวด เพื่อล้างเอา organic material ออกให้หมด ทำเช่นนี้ 2 - 3 ครั้ง นำเอาสารละลายที่ได้ทั้งหมดไปกลั่นไล่ solvent ออกให้หมด จะได้ solid สีเหลืองหนัก 130 มิลลิกรัม นำสารที่ได้ไปตกผลึกด้วย ethyl alcohol 5 ครั้ง ผลที่สุดจะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนเป็นมันวาว มีจุดหลอมเหลวคงที่ที่อุณหภูมิ 181-2° หนัก 105 มิลลิกรัม

ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจน พบว่า มี

$$C = 62.94 \% \quad H = 5.03 \% \quad O = 33.03 \%$$

$$\frac{-OCH}{3} = 36.07 \% \quad C_{10}H_{11}O_3$$

Infra - red spectrum ของ Methylated product ของสาร ก. แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 5 (หน้า 33)

Methylated product ของสาร ก. เมื่อนำมาทดสอบ color reaction และนำปฏิกิริยากับ reagents ต่าง ๆ ปรากฏว่าไม่ละลายใน 5 % sodium hydroxide ไม่เปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย Ferric chloride ส่วนปฏิกิริยาอื่น ๆ เหมือนกับสาร ก. ทุกประการ

2.4.3.3 2,4 - Dinitrophenylhydrozone⁵ ของสาร ก.

ใช้สาร ก. 100 มิลลิกรัม มาละลายใน ethyl alcohol 15 มิลลิลิตร เติม 2,4 - Dinitrophenylhydrazine reagent ที่ ละน้อยจนเกิดตะกอนอย่างสมบูรณ์ แล้วเติมให้มากเกินพอเล็กน้อย กิ่งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรอง 2,4 - Dinitrophenylhydrozone ล้างด้วย ethyl alcohol หลาย ๆ ครั้ง ทำให้แห้งใน desiccator โดยใช้

anhydrous CaCl_2 ถูกความชื้น จนน้ำหนักของสารคงที่หนัก 110 มิลลิกรัม นำมา ตกผลึกหลาย ๆ ครั้งใน ethyl alcohol ผลที่สุดได้ amorphous crystal สีแสดมีจุดหลอมเหลวและละลายที่อุณหภูมิ 248 - 50

2,4 - Dinitrophenylhydrazone ของสาร ก. ละลายได้ใน 5 % sodium hydroxide เปลี่ยนสี สารละลาย Ferric chloride และปฏิกิริยาให้สีกับ reagents ต่าง ๆ ยังคงคล้ายกับสาร ก.

2.4.3.4. Degradation

Hydrolysis สาร ก. ด้วย 30 % sodium hydroxide

ละลายสาร ก. 250 มิลลิกรัมใน ethyl alcohol 20 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำและอุณหภูมิละลายหมด เติม 30 % sodium hydroxide 50 มิลลิลิตร นำไป reflux นาน 4 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็น แล้วเอาไปทำให้เป็นกรกด้วยกรกเกลือ เข้มข้น 6 N จนสารละลายมีฤทธิ์เป็นกรกสกัดด้วย ether ครั้งละ 50 มิลลิลิตร 4 ครั้ง ทำ ether extract ให้แห้งด้วย anhydrous sodium sulfate กรองเอา ethereal solution มาเติม 25 sodium bicarbonate พรอมทั้งคนจนกระทั่งไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น สกัดด้วย ether ครั้งละ 50 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ทำให้แห้งด้วย anhydrous sodium sulfate ระเหย ether ออกให้หมดจะได้อะไหล่ของเหลวสีน้ำตาลแดง เมื่อนำมาทดสอบด้วย reagents ต่าง ๆ ปรากฏว่า เปลี่ยนสีสารละลาย Ferric chloride และให้ตะกอนเหลืองกับ 2, 4 - Dinitrophenylhydrazine ของเหลวสีน้ำตาลแดงนี้ไม่สามารถที่จะทำให้บริสุทธิ์ได้ ส่วน aqueous solution ที่มีเกลือ sodium ของกรกอินทรีย์ละลายอยู่นั้น นำมาทำให้เป็นกรกด้วยกรกเกลือ เข้มข้น 6 N แล้วสกัดด้วย ether ครั้งละ

25 มิลลิลิตร 4 ครั้ง ทำ ether extract ให้แห้ง ระเหย ether ออกให้หมดจะโคของเหลวสีแดง ซึ่งไม่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ แต่เมื่อนำมาทดสอบกับ reagents ต่าง ๆ ปรากฏว่าเปลี่ยนสีสารละลาย Ferric chloride และให้ก๊าซ carbon dioxide กับสารละลาย 5 % Sodium bicarbonate

2.4.3.5 Oxidation 7, 15

Oxidation สาร ก. ด้วย hydrogen peroxide

ละลายสาร ก. 100 มิลลิกรัม ด้วย 20 % sodium hydroxide 4 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลมขนาด 50 มิลลิลิตร เติม ethyl alcohol 10 มิลลิลิตร เขย่าจนกระทั่งสารละลายหมด เติม hydrogen peroxide เขมข้น 100 volume 3 มิลลิลิตร เขย่า ปิดจุกขวด แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 ° นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้เป็นกรดด้วยกรดเกลือ เขมข้น 6 N และสกัดด้วย ether ครั้งละ 25 มิลลิลิตร 4 ครั้ง ทำ ether extract ให้แห้งด้วย anhydrous sodium sulfate ระเหย ether ออกให้หมด จะได้น้ำมันสีน้ำตาล ซึ่งไม่สามารถ identify ได้

2.5 การวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสาร ข.

2.5.1 การตรวจหาคุณสมบัติทางกายภาพ

สาร ข. เป็นผลึกรูปเข็มสีแดง มีจุดหลอมเหลวและสลายตัวที่ อุณหภูมิ 229 - 30 (d) ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ทั้งใน benzene และ ethyl alcohol ที่ร้อน ละลายใน acetone, chloroform และ ether ได้บ้างเล็กน้อย และเมื่อนำไปตรวจหาธาตุโดยวิธี Lassaigne's Test¹⁴ ปรากฏว่าไม่มีธาตุอื่นนอกจากคาร์บอนและไฮโดรเจน ผลของการวิเคราะห์ หาเปอร์เซ็นต์ของธาตุพบว่ามี

C = 61.15 %, H = 3.98 %, O = 34.87 %

- O - CH = 24.10 %

น้ำหนักโมเลกุลจาก experimental analysis = 319
 Infra - red spectrum ของสาร ข. (รูปที่ 3 หน้า 29)
 แสดง absorplion peaks ดังตารางที่ 6 (หน้า 24)

2.5.2 การตรวจหา functional group

เมื่อนำสาร ข. มาทำปฏิกิริยากับ reagents⁵ เพื่อตรวจหา functional group ตามวิธีใน 2.4.2 โดยลดังต่อไปนี้

Liebermann - Burchard Reaction^{19,20} จะได้สารละลายเปลี่ยนจากสีแสดไปเป็นม่วง แลวกักแดง

<u>Ferric chloride solution</u>	ได้สารละลายสีเขียวเข้ม
<u>Tollen's reagent</u>	ได้ silver mirror
<u>Fehling's Solution</u>	ได้ตะกอนแดงของ Cu ₂ O
<u>Schiff's reagent</u>	ไม่เปลี่ยนสี
<u>2,4 Dinitrophenylhydrazine</u>	ได้ตะกอนสีเหลืองแสด

สาร ข. ละลายได้ดีใน 5 % sodium hydroxide ออกจางสีสารละลาย Potassium permanganate น้ำโบรมีน และโบรมีนในคาร์บอนเตตระคลอไรด์ จากผลที่ได้ สาร ข. จะต้องมี phenolic OH. มี carbonyl group และมี reducing property

2.5.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์

2.5.3.1 Acetylation ของสาร ข. ⁵

ใช้สาร ข. 150 มิลลิกรัม นำมา acetylated ตามวิธีใน
2.4.3.1 ได้ acetylated product หนัก 109 มิลลิกรัม นำไปตก
ผลึกหลาย ๆ ครั้งใน ethyl alcohol ผลที่สุดจะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง
จุดหลอมเหลวครั้งที่อุณหภูมิ 190 - 1 ° หนัก 79 มิลลิกรัม

ผลการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจนพบว่า

$$C = 64.16 \% , H = 5.47 \% , O = 30.98 \%$$

Infra - red spectrum ของ acetate ของสาร ข. (รูปที่ 4 หน้า 29)
แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 7 (หน้า 25)

acetate ของสาร ข. เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับ reagents ต่าง ๆ
ปรากฏว่าไม่ละลายใน 5 % sodium hydroxide และไม่เปลี่ยนแปลงสีของสาร
ละลาย Ferric chloride ส่วนปฏิกิริยาอื่น ๆ คล้ายกับสาร ข.

2.5.3.2 Methylation ของสาร ข. ¹⁶

ใช้สาร ข. 150 มิลลิกรัม นำมา methylated ตามวิธีในหัวข้อ
2.4.3.2 ได้ Methylated product 135 มิลลิกรัม นำมาตกผลึกหลาย ๆ
ครั้งใน ethyl alcohol ผลที่สุดจะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนเป็นมันวาว มี
จุดหลอมเหลวครั้งที่อุณหภูมิ 178 - 9 ° หนัก 105 มิลลิกรัม

ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอน และไฮโดรเจนพบว่า

$$C = 62.00 \% \quad H = 4.73 \% \quad O = 33.27 \%$$

$$-O-\underset{3}{CH} = 34.59 \%$$

Infra - red Spectrum ของ Methylated product ของสาร ข.
(รูปที่ 2 หน้า 30) แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 8 (หน้า 26)

Methylated product ของสาร ข. เมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับ reagents ดัง ๆ ปรากฏว่า ไม่ละลายใน 5 % sodium hydroxide และไม่ละลายในเบสที่สารละลาย Ferric chloride ส่วนปฏิกิริยาอื่น ๆ คล้าย - สาร 1.

2.5.3.3 2,4-Dinitrophenylhydrazone⁵ ของสาร ข.

สาร ข. 100 มิลลิกรัมมาทำเป็น 2,4 - Dinitrophenyl - hydrazone ตามวิธีในหัวข้อ 2.4.3.3 ได้สารเป็น amorphous crystal หนัก 104 มิลลิกรัม นำไปตกผลึกหลาย ๆ ครั้ง ใน ethyl alcohol/ethyl acetate (6:1) จนได้สารเป็น amorphous crystal สีแดง มีจุดหลอมเหลวคงที่ที่อุณหภูมิ 250 - 1° หนัก 86 มิลลิกรัม

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของคาร์บอนและไฮโดรเจนพบว่า

$$C = 53.16 \% \quad H = 4.62 \% \quad O = 31.45 \%$$

$$N = 10.77 \%$$

Infra - red spectrum ของ 2,4 - Dinitrophenylhydrazone
(รูปที่ 9 หน้า 30) แสดง absorption peaks ดังตารางที่ 9 (หน้า 27)

Infra - red spectra ของสารต่าง ๆ ทำโดยวิธี Nujol และ KBr - pellets ส่วนการตรวจลักษณะ absorption peaks ของสารนั้น ใช้วิธีเปรียบเทียบกับ Standard characteristics และ absorption peaks ที่มีอยู่ใน Literatures^{11,12,13} ปรากฏผลดังต่อไปนี้

3

IR. absorption peaks 200-4000 m.p. 203-4

Group	Band, cm ⁻¹
- OH stretching vibration	3400
stretching vibration of α, β unsaturated ketone -CH = CH - CO -	1650
stretching vibration -HC = CH- adjacent to = C = O	1405
-HC = CH - stretching vibration of phenyl	1590, 1500, 1440
-CH in plane bending vibration of phenyl	1060, 1010
=CH asymmetric stretching vibration	3050
-CH ₃ symmetric stretching vibration of -OCH ₃	2985, 2900, 2950, 2850
-CH ₃ symmetric stretching vibration	2820
=C-O-C symmetric vibration of aromatic -OCH ₃	1030, 1045
phenolic -OH stretching vibration	1210
stretching vibration of secondary -OH	1100
=C-O-C- antisymmetric stretching vibration	1160, 1260
out of plane bending band of substituted phenyl	875, 840, 825, 800, 790, 770

ตารางที่ 4

IR. absorption peaks ของ Acetate ของสาร n.m.p. 194-5

Group	Band, cm^{-1}
presence of -OH stretching vibration (intramolecular H-bonding)	1200, 3400
stretching vibration of α, β unsaturated ketone -HC=CH-CO	1635
-HC=CH- stretching vibration adjacent to -C=O	1400
-C-O- stretching vibration of acetate	1230
C=O stretching vibration of ester	1760
symmetric bending acetoxy methyl group	1360
-HC=CH- stretching vibration of phenyl	1610, 1500, 1440
-CH in plane bending vibration of phenyl	1070, 1010
=CH asymmetric stretching vibration	3100
-CH ₃ symmetric stretching vibration	2980, 2935, 2900 2850, 2822
=C-O-C symmetric vibration of aromatic -OCH ₃	1035, 1048
stretching vibration of secondary-OH	1095
=C-O-C- antisymmetric stretching vibration	1150, 1250
=C-O asymmetric stretching vibration	1250
out of plane bending band of substituted phenyl	872, 842, 810, 793, 760

ตารางที่ 5

II. absorption peaks of methylated product ของสาร n.m.p 181-2

Group	Band, cm^{-1}
presence of -OH stretching vibration	3400
stretching vibration of, α, β unsaturated ketone -HC=CH -CO-	1640
-HC=CH- stretching vibration adjacent to -C=O	1402
-HC=CH- stretching vibration of phenyl	1610, 1500, 1450
-CH in plane bending vibration of phenyl	1055, 1015
=CH asymmetric stretching vibration	3080
-CH ₃ symmetric stretching vibration of -OCH ₃	2995, 2980, 2920, 2845, 2820
=C-O-C symmetric vibration of aromatic -OCH ₃	1032, 1055,
stretching vibration of secondary -OH	1096
=C-O-C- antisymmetric stretching vibration	1159, 1252
=C-O asymmetric stretching vibration of =C-O-C	1240
out of plane bending band of substituted phenyl	871, 850, 828, 801, 790, 760

177796

IR. absorption peaks 177796. m.p. 229 - 30° (d)

Group	Band, cm ⁻¹
-OH stretching vibration	3340
stretching vibration of phenolic -OH	1195, 1260
-CO stretching vibration of phenol	1090
-C=O stretching vibration	1725
=CH asymmetric stretching vibration	3020
-CH ₃ symmetric stretching vibration of -OCH ₃	2980, 2949, 2920, 2840, 2810
=C-O-C symmetric stretching vibration	1030, 1020
-C-O-C- antisymmetric stretching vibration	1150
=C-O-C antisymmetric stretching vibration	1240
-CH in plane bending vibration of phenyl	1062, 1010
-C=C- stretching vibration	1650, 1590, 1570, 1490
-CH bending vibration	1390, 1290
out of plane bending of substituted phenyl	860, 825, 810, 790, 780, 760

ตารางที่ 7

IR. absorption peaks ของ Acetate ของสาร พ. m.p. 190-1

Group	Band, cm^{-1}
presence of -OH stretching vibration	3400-3490
-C-O stretching vibration of acetate	1230
-C=O stretching vibration of ester	1753
symmetric bending acetoxy methyl group	1350
-C-O-C stretching of acetoxy group	1230, 1020
-C=O stretching vibration of ketone is overlaid by -C=O of ester	1753
=CH asymmetric stretching vibration	3095
-CH ₃ symmetric stretching vibration of -OCH ₃	2955, 2920, 2850, 2840
-CH stretching vibration of aromatic -OCH ₃	2850
=C-O-C symmetric stretching vibration	1032, 1020
=C-O-C antisymmetric stretching vibration	1250
-C-O-C antisymmetric stretching vibration	1140
-CH bending vibration	1400, 1310, 1070, 1010
-C=C- stretching vibration	1630, 1610, 1560, 1500
out of plane bending of substituted phenyl	872, 840, 810, 800, 793, 762

ตารางที่ 8

IR Absorption peaks of Methylated product 20131711. n.p 178-9

Group	Band, cm^{-1}
presence of -OH stretching vibration	3420
-C=O stretching vibration	1725
=CH asymmetric stretching vibration	3080
-CH ₃ symmetric stretching vibration of -OCH ₃	2960, 2910, 2835, 2820
-C-O-C- antisymmetric stretching vibration	1148
=C-O-C symmetric stretching vibration	1015
=C-O-C antisymmetric stretching vibration	1248
-CH in plane bending vibration of phenyl	1058, 1015
-C=C- stretching vibration	1640, 1607, 1569, 1510
-CH bending vibration	1402, 1300
out of plane bending of substituted phenyl	870, 830, 800, 790, 788, 760

ตารางที่ 9

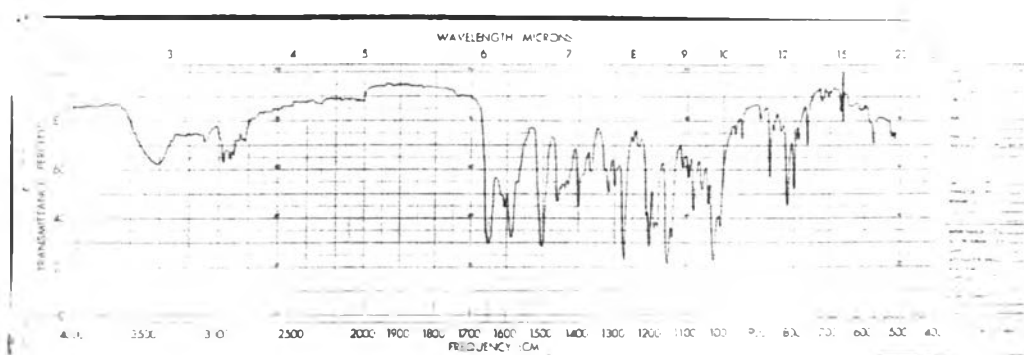
IR. absorption peaks 2,4-Dinitrophenylhydrazones 1037198.2.250-1

Group	Band, cm^{-1}
Disappearance of -C=O stretching vibration 1725 cm^{-1}	
-NH stretching vibration	3240, 1580
-OH stretching vibration	3440
-C-NO_2 asymmetric stretching vibration	1555, 1345
-C-N stretching vibration	870
-CHO bending vibration	610
=CH asymmetric stretching vibration	3080
-CH_3 stretching vibration of -OCH_3	3000, 2920, 2880, 2820
=C-O-C symmetric stretching vibration	1040, 1020
=C-O-C antisymmetric stretching vibration	1260
-C-O-C- antisymmetric stretching vibration	1155
-CH in plane bending vibration of phenyl	1070, 1010
-C=C- stretching vibration	1645
out of plane bending vibration of substituted	830, 820, 790, 780, 740

รูปที่ 1

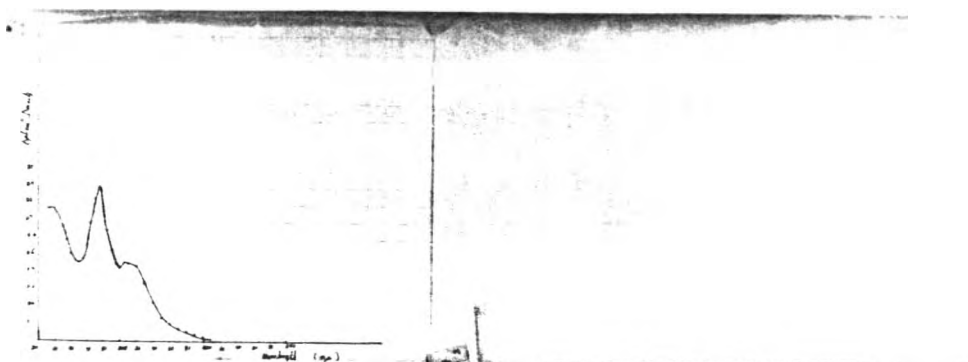


Infra - red Spectrum ของสาร ก.



รูปที่ 2

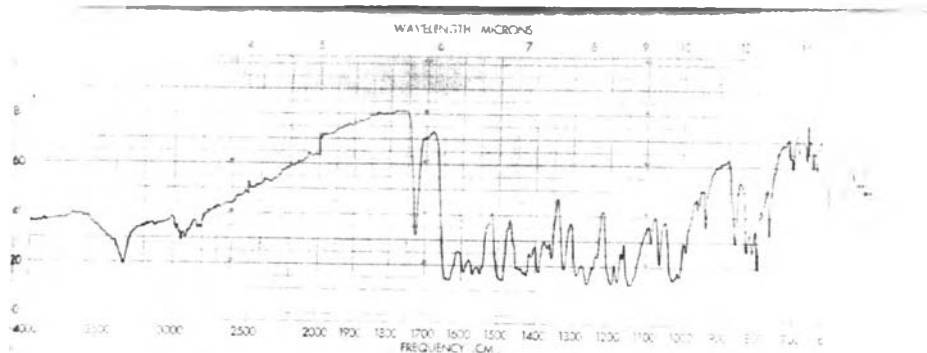
Ultra - violet Spectrum ของสาร ก.





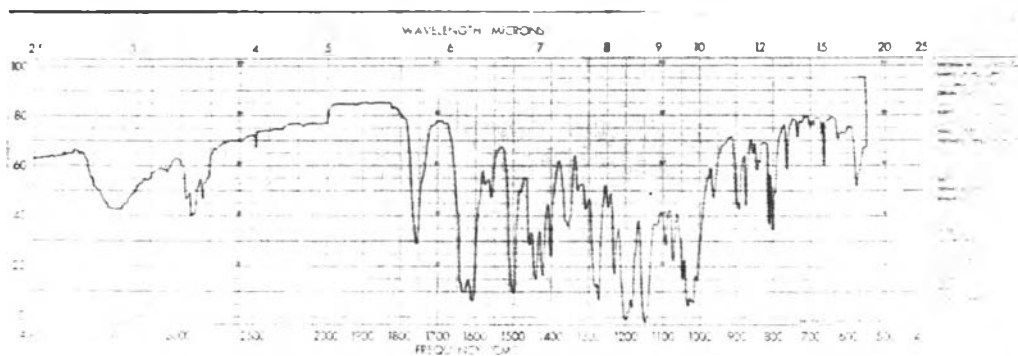
รูปที่ 3

Infra - red Spectrum ของสาร ก.



รูปที่ 4

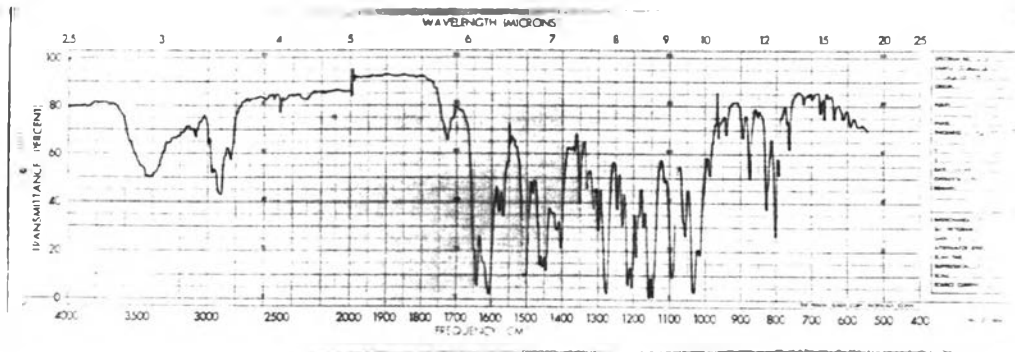
Infra - red Spectrum ของ Acetate ของสาร ข.





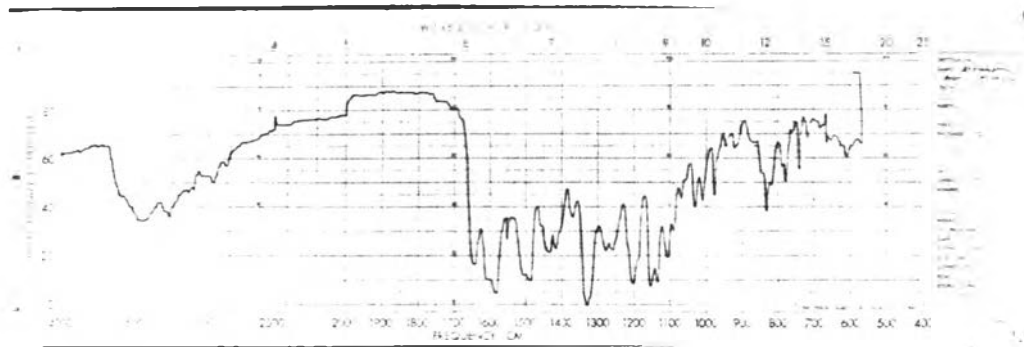
รูปที่ 5

Infra - red Spectrum ของ methyl derivative ของสาร ข.



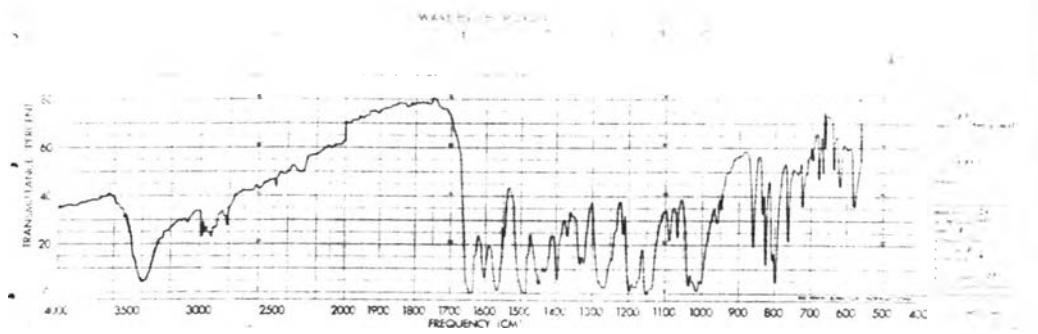
รูปที่ 6

Infra - red Spectrum ของ 2,4-Dinitrophenylhydrazone ของสาร ข.



รูปที่ 7

Infra - red Spectrum ของสาร ก.



รูปที่ 8

Infra - red Spectrum ของสาร ง.

