

บทที่ 3

วิจารณ์ผลการทดลอง

3.1 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์ในรากโลกตะนงแดง

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบหาสารอินทรีย์ 5 ประเภท คือ แอลคาลอยด์ คาร์โบไฮเดรต-ไกลโคไซด์ แพลบวอนอยด์ ซาโปนิน และคูมาริน ในสิ่งสกัดด้วยเอทานอล จากการทดลองพบว่า น่าจะมีสารประเภทแอลคาลอยด์ปริมาณเล็กน้อย ดังตารางที่ 6 มีคาร์โบไฮเดรต-ไกลโคไซด์ ซึ่งมีส่วนที่เป็นสเตอรอยด์ด้วย ดังตารางที่ 7 แต่ไม่พบแพลบวอนอยด์ ซาโปนิน และคูมาริน ดังตารางที่ 8-10 ตามลำดับ

3.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.2.1 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านการกินของแมลงกินฝ้าย

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบความสามารถในการต่อต้านการกินของแมลงกินฝ้ายของสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ได้แก่ สิ่งสกัดด้วยเฮกเซน เอทานอล กลอโรฟอร์ม และน้ำ จากการทดสอบพบว่า สิ่งสกัดด้วยเฮกเซน เอทานอล กลอโรฟอร์ม และน้ำ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการกินของแมลงกินฝ้ายได้มาก คือ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกินอยู่ระหว่าง 85-100 โดยที่ปริมาณกำหนดของสิ่งสกัดที่ใช้ทดสอบครั้งละ 10, 20 และ 30 มิลลิกรัม ดังตารางที่ 11

3.2.2 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรีย

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบเพื่อหาความสามารถในการต่อต้านเชื้อรา Pythium ultimum, Helminthosporium teres และ Rhizoctonia solani และแบคทีเรีย Xanthramonas campestris ของสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน เอทานอล กลอโรฟอร์ม และน้ำ จากการทดสอบพบว่าสิ่งสกัดด้วยกลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ในการต่อต้าน(ยับยั้งการเจริญเติบโต) เชื้อรา Pythium ultimum และแบคทีเรีย Xanthramonas campestris คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 20 และ 28 ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่า สิ่งสกัดด้วยเอทานอล และน้ำมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย Xanthramonas campestris ด้วย คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 28 และ 37 ตามลำดับ ดังตารางที่ 12

3.3 การสกัดและการแยกสาร

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดรากโคกชะงวงแดง 2 วิธี คือ

วิธีที่ 1 สกัดรากโคกชะงวงแดงแห้งบดละเอียด ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ได้สิ่งสกัดด้วยเอทานอล คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 4.51 นำสิ่งสกัดด้วยเอทานอลมาสกัดต่อด้วยเฮกเซนและไคคลอโรมีเทน ได้สิ่งสกัดด้วยเฮกเซนและสิ่งสกัดด้วยไคคลอโรมีเทน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 0.31 และ 0.24 ตามลำดับ ดังแสดงในแผนภาพที่ 1

วิธีที่ 2 สกัดรากโคกชะงวงแดงแห้งบดละเอียด ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ได้สิ่งสกัดด้วยเฮกเซน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 0.25 นำกากที่เหลือมาสกัดต่อด้วยเอทานอล ได้สิ่งสกัดด้วยเอทานอล คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 1.67 นำสิ่งสกัดด้วยเอทานอลมาสกัดต่อคลอโรฟอร์ม : น้ำ (1 : 1) ได้สิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 0.55 เปอร์เซ็นต์ และสิ่งสกัดด้วยน้ำ 0.16 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในแผนภาพที่ 2

เมื่อทำการแยกสารที่สกัดด้วยวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแล้ว ผลปรากฏว่า เปอร์เซ็นต์ของสารต่าง ๆ ที่แยกได้จากสิ่งสกัดตามวิธีที่ 2 มากกว่าของวิธีที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 เปอร์เซ็นต์ของสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ โดยคอลัมน์-โครมาโทกราฟี

สาร	เปอร์เซ็นต์ของสารที่แยกได้	
	การสกัดวิธีที่ 1	การสกัดวิธีที่ 2
ก	0.18	0.21
ข	0.92	1.00
ค	0.31	1.21
ง	1.29	1.94
จ	1.23	1.50
ฉ	-	0.47
ช	0.18	1.69
ซ	ปริมาณน้อยมาก	0.03
ณ	ปริมาณน้อยมาก	0.03

3.4 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารที่แยกได้

3.4.1 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร ก

สาร ก เป็นผลึกรูปอัฐฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 85–87°C จากการแยกสิ่งสกัดด้วยเฮกเซนโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเฮกเซนร้อนหลาย ๆ ครั้ง R_f 0.77 (25% กลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) ให้ผลบวกกับ Liebermann-Burchardรีเอเจนต์ ได้สารละลายสีเขียว แสดงว่าเป็นสารประเภทสเตอรอยด์

อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแบบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ที่ 1740 cm^{-1} , ของ disubstituted vinyl ที่ 970 และ 960 cm^{-1} ของ trisubstituted vinyl ที่ 800 และ 790 cm^{-1} , และของโซ่ตรง (long chain) ที่ 725 cm^{-1} ข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร ก แสดงดังในตารางที่ 26

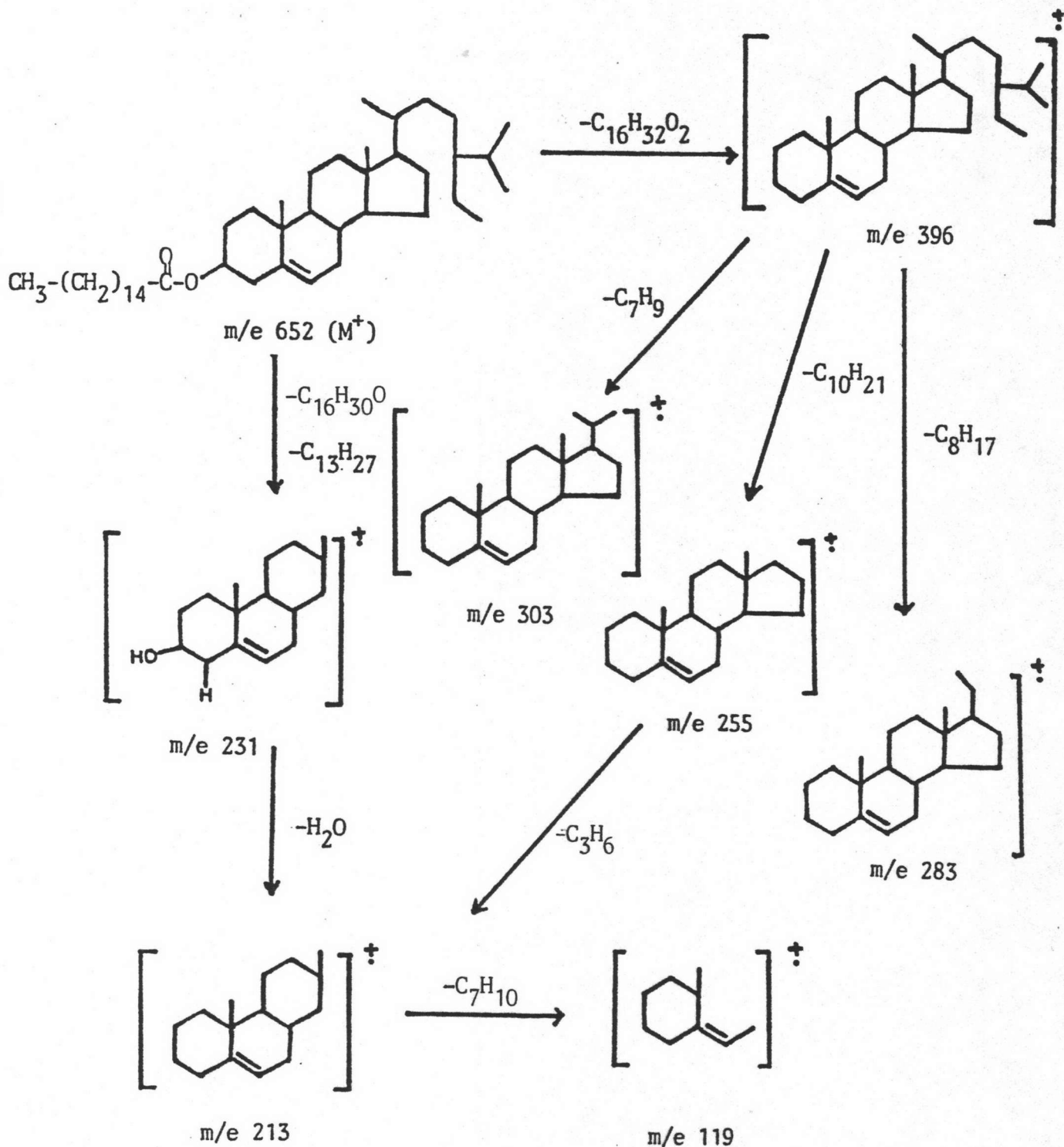
ตารางที่ 26 การแปลความหมายอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ก (44)

ความถี่ (cm^{-1})	ลักษณะแบนด์	การแปลความหมาย
2920, 2850	st	C-H ยึดของ CH_2 , CH_3
1740	st	C=O ยึดของเอสเทอร์
1465	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH_2 และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH_3
1385	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH_3
1200, 1180	m	C-O ยึด
970, 960	w	C-H งอนอกระนาบของ disubstituted vinyl
800, 790	w	C-H งอนอกระนาบของ trisubstituted vinyl
725	w	CH_2 โกลง (rocking) เมื่อมีหมู่เมทิลีนตั้งแต่ 4 หมู่ ขึ้นไป

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของสเตอรอยด์ที่ δ 0.69, 0.85, 0.87 และ 1.02 (18H, 6CH₃), 4.63 (H-3) และ 5.39 (H-6) ppm โดยที่ 0.69 และ 1.02 ppm เป็นสัญญาณของหมู่เมทิลที่ angular 2 หมู่ คือ C-18 และ C-19 ตามลำดับ ส่วนที่ 0.85 และ 0.87 ppm เป็นสัญญาณของหมู่เมทิลที่ side chain 4 หมู่ คือ C-21, 26, 27 และ 29 นอกจากนี้ปรากฏสัญญาณ triplet ที่ δ 2.27 ppm แสดงถึงโปรตอนที่คาร์บอนซึ่งต่อกับหมู่คาร์บอนิล และ singlet ที่มีความเข้มสูงที่ δ 1.26 ppm แสดงถึงการต่อกันของหมู่เมทิลี่นหลาย ๆ หมู่

แมสสเปกตรัม แสดงพีคของ molecular ion (M⁺) ที่ m/e 652 จากการคำนวณสำหรับ C₄₅H₈₀O₂ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 652.43 ปรากฏพีคที่แสดงถึง C₂₉-สเตอรอยด์ที่ m/e 396 (M⁺-256), 394, 381(396-CH₃), 303(396-C₇H₉), 255(396-C₁₀H₂₁), 213(396-C₁₀H₂₁-42) และ 119(396-C₂₀H₃₉-H₂O) แสดงว่า โมเลกุลของสาร ก เกิดการแตกตัวให้ส่วนที่เป็นกรดไขมัน น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 256 ตรงกับสูตรโมเลกุล C₁₆H₃₂O₂ (palmitic acid) ที่แตกตัวหลุดออกไปก่อน เหลือส่วนแอลกอฮอล์ที่เป็นสเตอรอยด์ ซึ่งจากการแตกตัวของส่วนที่เหลือนี้ คาดว่าเป็น β -sitosterol ดังนั้นจึงเสนอรูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร ก ดังแผนภาพที่ 3

แผนภาพที่ 3 รูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร ก (45)



คาร์บอน-13 เอเนมอาร์สเปกตรัมของสาร ก. ปรากฏสัญญาณคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลของเอสเทอร์ที่ ๘ 173.30 ppm ส่วนสัญญาณที่เหลือเป็นสัญญาณเนื่องมาจากคาร์บอนของสเตอรอยด์และกรดไขมัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบเคมีคัลชิฟท์ของสัญญาณเหล่านี้กับของ ethyl palmitate และ β -sitosteryl acetate ทั้งในตารางที่ 27

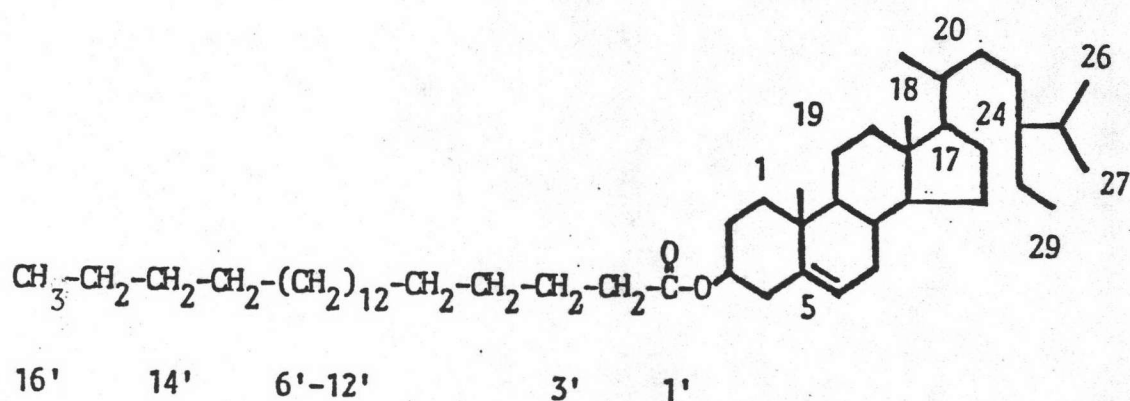
ตารางที่ 27 คาร์บอน-13 เอเนมอาร์เคมีคัลชิฟท์ของ สาร ก. , ethyl palmitate⁽⁴⁶⁾ และ β -sitosteryl acetate⁽⁴⁷⁾

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลชิฟท์ (ppm)		
	สาร ก	ethyl palmitate	β -sitosteryl acetate
1	37.05		37.1
2	27.84		27.8
3	73.68		74.1
4	38.19		38.2
5	139.77		139.8
6	122.59		122.7
7	31.90		32.0
8	31.90		32.0
9	50.06		50.2
10	36.62		36.6
11	21.07		21.0
12	39.76		39.8
13	42.36		42.3
14	56.72		56.7
15	24.32		24.3
16	28.28		28.3
17	56.07		56.1
18	11.86		11.9
19	19.34		19.3

ตารางที่ 27 (ต่อ)

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีกัลซีท์ (ppm)		
	สาร ก	ethyl palmitate	β -sitosteryl acetate
20	36.19		36.2
21	19.07		19.1
22	33.97		34.0
23	29.25		29.3
24	50.06		50.0
25	26.17		26.2
26	18.79		18.8
27	19.83		19.8
28	23.13		23.1
29	11.86		11.9
1'	173.30	173.3(COO-)	170.5(COO-)
2'	34.72	34.5	
3'	25.08	25.2	
4'	29.25	29.3	
5'	29.47*	29.5	
6'-12'	29.68	29.9	
13'	29.36*	29.5	
14'	31.90	32.1	
15'	22.69	22.8	
16'	14.14	14.1	

*สามารถสลับตำแหน่งกันได้

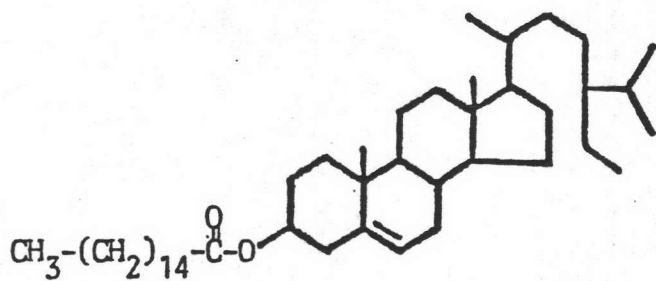
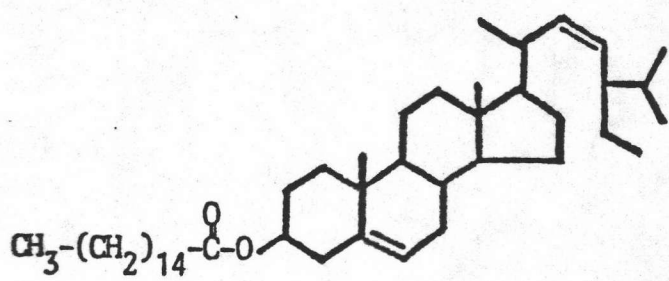


การไฮโดรไลส์ สาร ก ด้วย 10% methanolic KOH ในเบนซีน ได้ส่วนของแอลกอฮอล์ (สาร 1 ก) และกรด (สาร 2 ก)

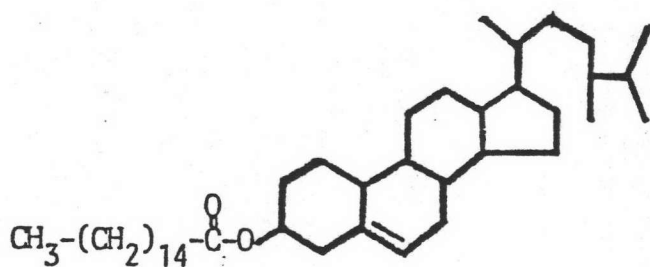
สาร 1 ก เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว $137\text{-}139^{\circ}\text{C}$ R_f 0.15 (25% กลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) ให้ผลบวกกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ ให้สารละลายสีเขียว อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1 ก เหมือนกับ authentic β -sitosterol และจากการวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟีของสาร 1 ก เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน สเตอรอยด์ สาร 1 ก ให้ค่า retention time เท่ากับ 13.69 (2.7%), 17.12 (3.97%), 18.19 (28.4%) และ 20.76 (59.6%) นาที ซึ่งตรงกับ retention time ของ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol

สาร 2 ก เป็นผลึกรูปอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว $63\text{-}65^{\circ}\text{C}$ อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแถบการดูดกลืนแสงของหมู่คาร์บอกซิล ที่ $3600\text{-}2500$ (O-H) และ 1710 (C=O) cm^{-1} จากการวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟีของสาร 2 ก เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดไขมัน สาร 2 ก ให้ค่า retention time เท่ากับ 3.25 ซึ่งตรงกับ retention time ของ palmitic acid

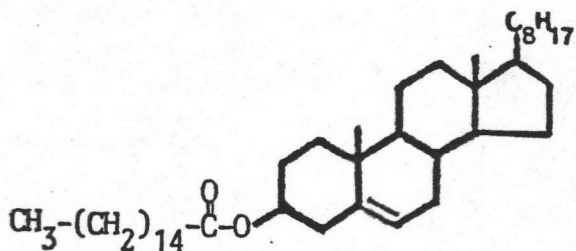
จากหลักฐานที่กล่าวมาแล้ว สรุปได้ว่า สาร ก เป็นของผสมของ β -sitosteryl palmitate, stigmasteryl palmitate, campesteryl palmitate และ cholesteryl palmitate

 β -sitosteryl palmitate

stigmasteryl palmitate



campesteryl palmitate



cholesteryl palmitate

3.4.2 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร ข

สาร ข เป็นผลึกรูปอัฐฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 74-76°C จากการแยกสิ่งสกัดด้วยเฮกเซนโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยเฮกเซน : ไคคลอโรมีเทน (19 : 1 และ 9 : 1) ในการสกัดวิธีที่ 1 และชะด้วยเฮกเซน : ไคคลอโรมีเทน (4 : 1) ในการสกัดวิธีที่ 2 ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยอะซิโตนร้อนหลาย ๆ ครั้ง R_f 0.13 (25% กลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) ให้ผลลบกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์, 5% $FeCl_3$, 2,4-DNP, $KMnO_4$ และ Br_2/CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแถบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของหมู่คาร์บอนิลที่ 3600-2500 และ 1710 cm^{-1} และของโซ่ตรง (long chain) ที่ 730 และ 720 cm^{-1} ข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร ข แสดงดังในตารางที่ 28

ตารางที่ 28 การแปลความหมายอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ข

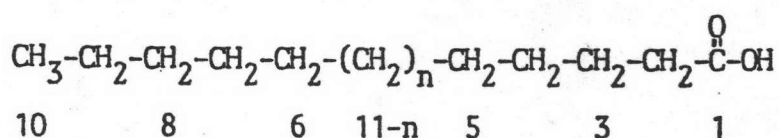
ความถี่ (ซม. ⁻¹)	ลักษณะแถบ	การแปลความหมาย
3600-2500	b	O-H ยืด
2920, 2850	st	C-H ยืดของ CH ₂ , CH ₃
1710	st	C=O ยืดของหมู่คาร์บอกซิล
1475, 1465	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH ₂ และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH ₃
1410	m	C-O-H งอในระนาบ
1300	m	C-O ยืด
940	w	O-H งอนอกระนาบ
730, 720	m	CH ₂ โกลงเมื่อมีหมู่เมทิลีนตั้งแต่ 4 หมู่ขึ้นไป

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณ triplet ที่ δ 0.88 และ 2.35 ppm โดยที่ δ 0.88 ppm เป็นสัญญาณของหมู่เมทิล ส่วนที่ δ 2.35 ppm เป็นสัญญาณ singlet โปรตอนเมทิลคาร์บอนที่ติดกับหมู่คาร์บอนิล ($R-CH_2-\overset{O}{\parallel}C-OH$) นอกจากนี้ปรากฏสัญญาณที่มีความเข้มสูงที่ δ 1.25 ppm แสดงถึงหมู่เมทิลีนต่อกันหลาย ๆ หมู่

จากที่กล่าวมาแล้ว สาร ข น่าจะเป็นสารประเภทกรดไขมัน ดังนั้นจึงเปรียบเทียบเคมีคัลซิฟของคาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัมของสาร ข กับ palmitic acid ซึ่งเป็นสารประเภทกรดไขมัน ดังแสดงในตารางที่ 29 พบว่าสอดคล้องกัน

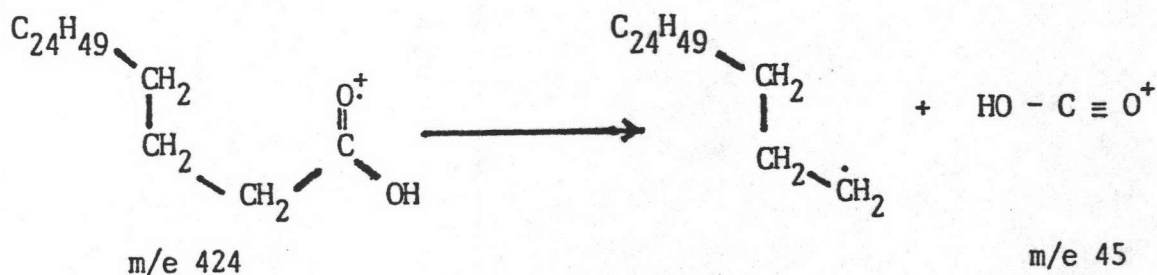
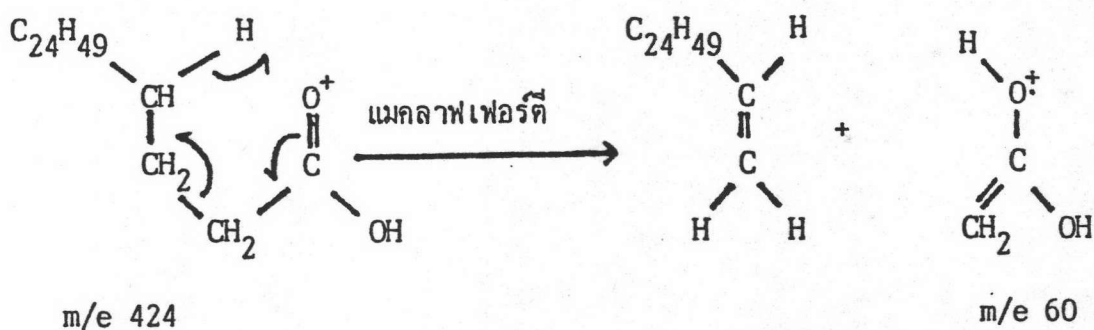
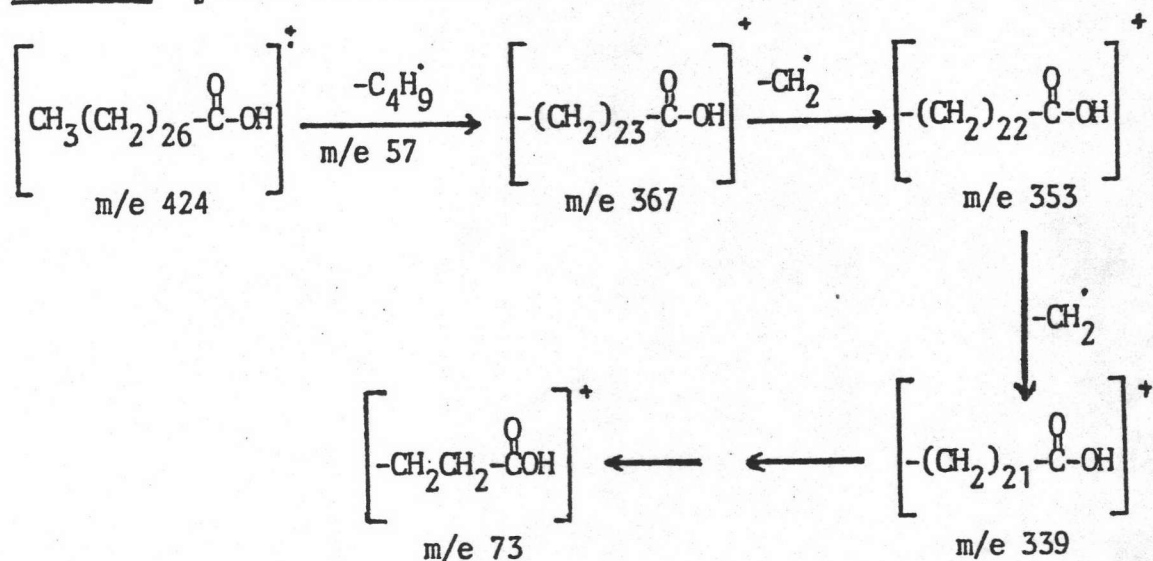
ตารางที่ 29 คาร์บอน-13 เอเนมอาร์เคมีอัลซีฟท์ ของสาร ข และ palmitic acid⁽⁴⁸⁾

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีอัลซีฟท์	
	สาร ข	palmitic acid
1	179.32	180.66
2	33.97	34.22
3	24.70	24.76
4	29.09	29.17
5	29.36	29.52
6	29.47	29.77
7	29.25	29.34
8	31.96	32.03
9	22.70	22.76
10	14.14	14.12
11-n	29.69	29.77



แมสสเปกตรัม ปรากฏ molecular ion (M^+) ที่ m/e 424 การคำนวณสำหรับ $C_{28}H_{56}O_2$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 424.26; m/e 410 การคำนวณสำหรับ $C_{27}H_{54}O_2$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 410.25; m/e 382 การคำนวณสำหรับ $C_{25}H_{50}O_2$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 382.33 และ m/e 368 การคำนวณสำหรับ $C_{24}H_{48}O_2$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 368.22 นอกจากนี้ปรากฏที่ m/e 367 ($424 - C_4H_9$), 353 ($367 - CH_2$), 339 ($367 - 2(CH_2)$), 325 ($367 - 3(CH_2)$), ..., 73 ($367 - 21(CH_2)$) และ m/e 60 ซึ่งเป็นลักษณะการแตกตัวของโซ่ตรง ดังนั้นจึงเสนอรูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร ข ดังแผนภาพที่ 4

แผนภาพที่ 4 รูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร ข



จากแผนภาพที่ 4 เป็นการแสดงรูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของกรดไขมันตรงที่มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{O}_2$ กรดไขมันตรงอื่นซึ่งเป็นของผสมของสาร ข เช่น $\text{C}_{27}\text{H}_{54}\text{O}_2$, $\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_2$ และ $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_2$ เป็นต้น ก็แสดงรูปแบบการแตกตัวเช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัมจะพบว่า สาร ข เป็นของผสมของกรดไขมันตรง

เพื่อยืนยันว่า สาร ข เป็นกรดไขมันตรง และเพื่อศึกษาองค์ประกอบของสาร ข ด้วย
แก๊สโครมาโทกราฟี จึงทำ Methylation สาร ข ด้วย methanol / boron trifluoride
ให้อยู่ในรูปของ methyl ester (สาร 1 ข)

สาร 1 ข เป็นผลิตภัณฑ์มาตรฐานสีขาว จุดหลอมเหลว $51-53^{\circ}\text{C}$ R_f 0.38 (25%
คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) อินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1 ข แสดงการดูดกลืนแสงของหมู่
คาร์บอนิลของเอสเทอร์ที่ 1740 ($\text{C}=\text{O}$ ยืด) และ 1160 ($\text{O}-\text{C}-\text{C}$ ยืดอย่างไม่มีสมมาตร)
 cm^{-1} และจากการวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟีของสาร 1 ข เปรียบเทียบกับสารละลาย
มาตรฐาน methyl ester ของกรดไขมันตรง สาร 1 ข ให้ค่า retention time เท่ากับ
 $1.4, 1.8, 2.06, 2.59, 3.25, 4.12, 5.26, 6.76, 8.70, 11.31, 14.65,$
 $18.98, 24.61$ และ 32.51 นาที จาก calibration curve พบว่า สาร ข เป็น
ของผสมของกรดไขมันตรง ซึ่งมีสูตรโมเลกุลดังนี้

$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	hexadecanoic acid	$\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_2$	pentadecanoic acid
$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$	heptadecanoic acid	$\text{C}_{27}\text{H}_{54}\text{O}_2$	heptaconsanoic acid
$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	octadecanoic acid	$\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{O}_2$	octacosanoic acid
$\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2$	nonadecanoic acid	$\text{C}_{30}\text{H}_{60}\text{O}_2$	triacontanoic acid
$\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{O}_2$	heneicosanoic acid	$\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_2$	dotriacontanoic acid
$\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$	dodecanoic acid	$\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{O}_2$	tritriacontanoic acid
$\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$	tetracosanoic acid	$\text{C}_{35}\text{H}_{70}\text{O}_2$	pentatriacontanoic acid

3.4.3 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร ก

สาร ก เป็นผลิตภัณฑ์แข็ง จุดหลอมเหลว $135-137^{\circ}\text{C}$ จากการแยกสิ่งสกปรกเฮกเซน
โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยเฮกเซน : ไคคลอโรมีเทน ($9 : 1$) ในการสกัดครั้งที่ 1
และเฮกเซน : ไคคลอโรมีเทน ($3 : 1$ และ $3 : 2$) ในการสกัดครั้งที่ 2 ทำให้บริสุทธิ์โดย
การตกผลึกด้วยเฮกเซนร้อนหลาย ๆ ครั้ง R_f 0.15 (25% คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) ให้
ผลบวกกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ให้สารละลายสีเขียว แสดงว่าเป็นสารประเภท
สเตอรอยด์

อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแผนกการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของแอลกอฮอล์ที่ 3600-3200 (O-H) และ 1060-1040 (C-O) cm^{-1} และของ trisubstituted vinyl ที่ 840 และ 800 cm^{-1}

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม แสดงสัญญาณของสเตอรอยด์ที่ δ 0.68-1.06 ppm เป็นสัญญาณของหมู่เมทิลที่ angular 2 หมู่ คือ C-18 และ C-19 และของหมู่เมทิลที่ side chain คือ C-21, 26, 27 และ 29 ที่ δ 1.54-2.31 ppm เป็นสัญญาณของหมู่เมทิลีน (CH_2) และหมู่เมทิลิก (CH) ของสเตอรอยด์ สัญญาณ multiplet ที่ δ 3.54 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนของหมู่ไฮดรอกซิล สัญญาณ doublet doublet ที่ 5.09 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนของ disubstituted vinyl (H-22 และ H-23) ส่วนสัญญาณที่ δ 5.37 ppm เป็นสัญญาณของโปรตอนของ trisubstituted vinyl (H-6)

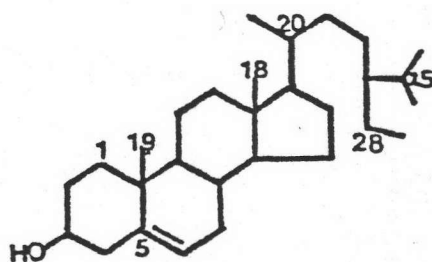
คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณสอดคล้องกับสัญญาณของ คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตราของ β -sitosterol และ stigmasterol ทั้งตาราง ที่ 30

ตารางที่ 30 คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีกัลซิท์ของ สาร ก , β -sitosterol⁽⁴⁷⁾
และ stigmasterol⁽⁴⁷⁾

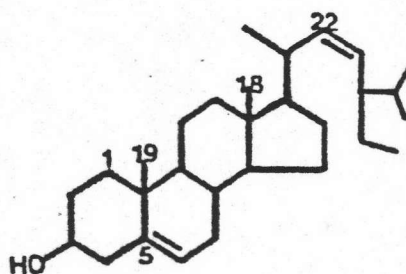
ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีกัลซิท์ (ppm)		
	สาร ก	β -sitosterol	stigmasterol
1	37.27	37.1	37.4
2	31.69	31.8	31.7
3	71.78	71.9	71.8
4	42.31	42.4	42.4
5	140.79	140.9	140.0
6	121.67	121.8	121.7
7	31.91	32.0	31.9
8	31.91	32.0	31.9
9	50.16	50.3	50.3
10	36.51	36.6	36.6
11	21.12	21.1	21.1
12	39.81	39.9	39.8
13	42.31	42.4	42.4
14	56.83	56.8	57.0
15	24.32	24.3	24.4
16	29.20	28.2	28.9
17	56.12	56.2	56.0
18	12.03	11.9	12.2
19	19.39	19.4	19.4
20	36.18, 40.46	36.2	40.5
21	19.01, 21.12	19.1	21.1
22	33.97, 138.30	34.0	138.4
23	28.27, 129.31	29.3	129.4

ตารางที่ 30 (ต่อ)

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลชิฟท์ (ppm)		
	สาร ก	β -sitosterol	stigmasterol
24	51.24	50.3	51.3
25	26.16, 31.91	26.2	31.9
26	18.79, 19.01	18.8	19.0
27	19.82, 21.13	19.8	21.1
28	23.13, 25.41	23.1	25.4
29	11.86, 12.02	11.9	12.0



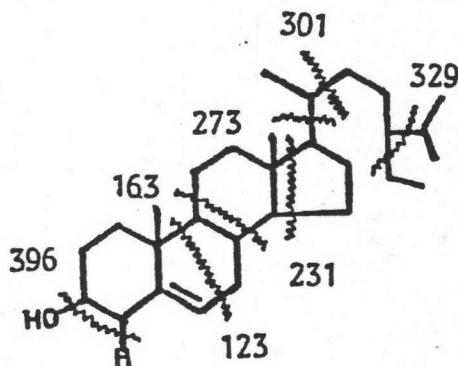
β -sitosterol



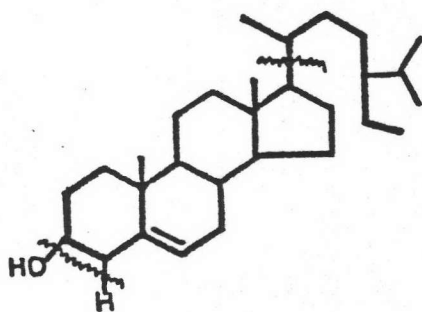
stigmasterol

แมสสเปกตรัม ปรากฏ molecular ion (M^+) ที่ m/e 414 ซึ่งการคำนวณ
 สำหรับ $C_{29}H_{50}O$ ได้น้ำหนักโมเลกุล = 414.28; m/e 412 การคำนวณสำหรับ $C_{29}H_{48}O$
 ได้น้ำหนักโมเลกุล = 412.28; m/e 400 การคำนวณสำหรับ $C_{28}H_{48}O$ ได้น้ำหนักโมเลกุล
 = 400.27 นอกจากนี้ปรากฏที่ m/e 396($414-H_2O$), 394($412-H_2O$), 382($400-H_2O$),
 329, 273($414-C_{10}H_{21}$), 271($412-C_{10}H_{21}$), 255, 231($414-C_{10}H_{21}-42$), 163,
 123 และ 119 เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัมจะพบว่า สาร ก น่าจะเป็นของผสมของสเตอรอยด์
 ซึ่งได้แก่ campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol⁽⁴⁵⁾

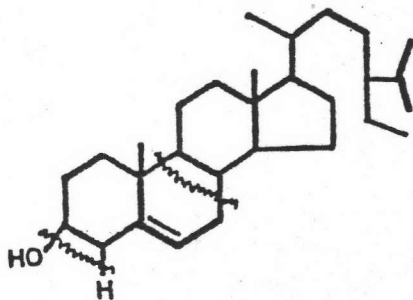
รูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของ β -sitosterol ซึ่งปรากฏที่ m/e 396, 329, 273, 255, 231, 163, 123 และ 119



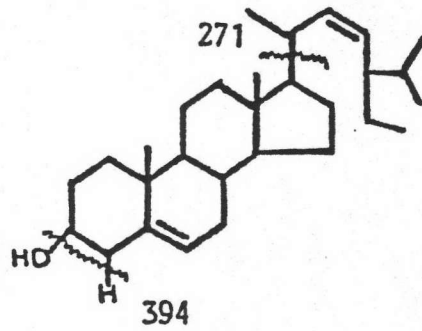
สำหรับที่ m/e 255 ได้จาก $414 - C_{10}H_{21} - H_2O$ ดังนี้



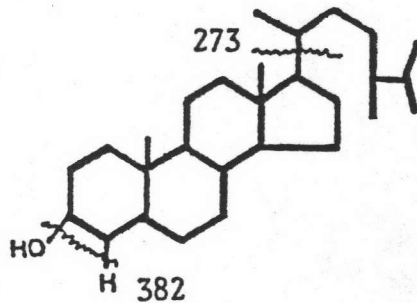
และที่ m/e 119 ได้จากการแตกตัวดังนี้



รูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของ stigmasterol ซึ่งปรากฏที่ m/e 394 และ 271

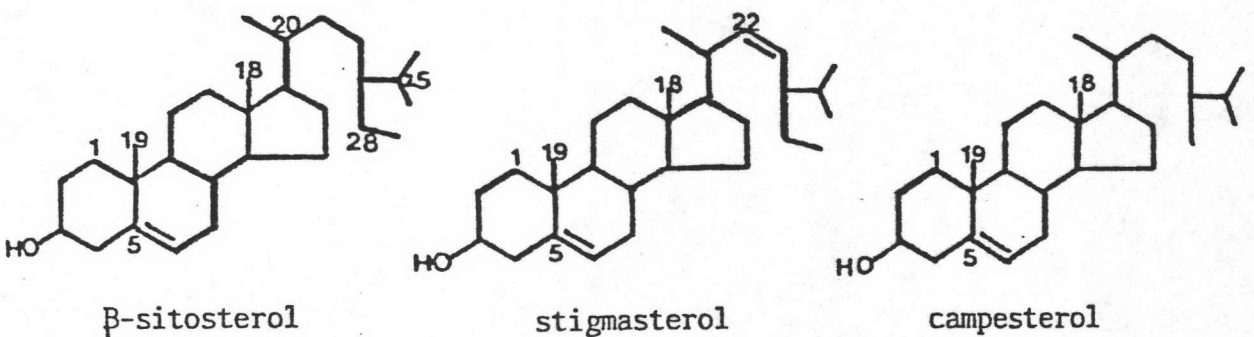


รูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของ campesterol ซึ่งปรากฏที่ m/e 382 และ 273



วิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟี เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยล์ พบว่าสาร ก ให้ค่า retention time เท่ากับ 17.00 (3%), 18.16 (41%) และ 20.66 (56%) นาที ซึ่งตรงกับ retention time ของ campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol ตามลำดับ

จากหลักฐานที่กล่าวมา สรุปได้ว่า สาร ก เป็นของผสมของ campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol



3.4.4 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร ง

สาร ง เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 298–300°C จากการแยกสิ่งสกัดด้วยเฮกเซนโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไคลโลโรมีเทน (9:1 และ 4:1) ในการสกัดวิธีที่ 1 และชะด้วยเฮกเซน:ไคลโลโรมีเทน (3:1 และ 3:2) ในการสกัดวิธีที่ 2 ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอลหลาย ๆ ครั้ง R_f 0.69 (25% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม) ให้ผลบวกกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ ได้สารละลายสีชมพูม่วง แสดงว่า สาร ง เป็นสารประเภทไตรเทอร์ปีน

อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแบนด์การดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของหมู่คาร์บอกซิล ที่ 3500–2500 (O-H) และ 1690 (C=O) cm^{-1} ของหมู่อะเซทิลที่ 1740 (C=O) และ 1240 (C-O) cm^{-1} ของหมู่ gem-dimethyl ที่ 1375 cm^{-1} และของ trisubstituted vinyl ที่ 820 และ 800 cm^{-1} ข้อมูลการดูดกลืนของสาร ง แสดงดังในตารางที่ 31

ตารางที่ 31 การแปลความหมายอินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร ง

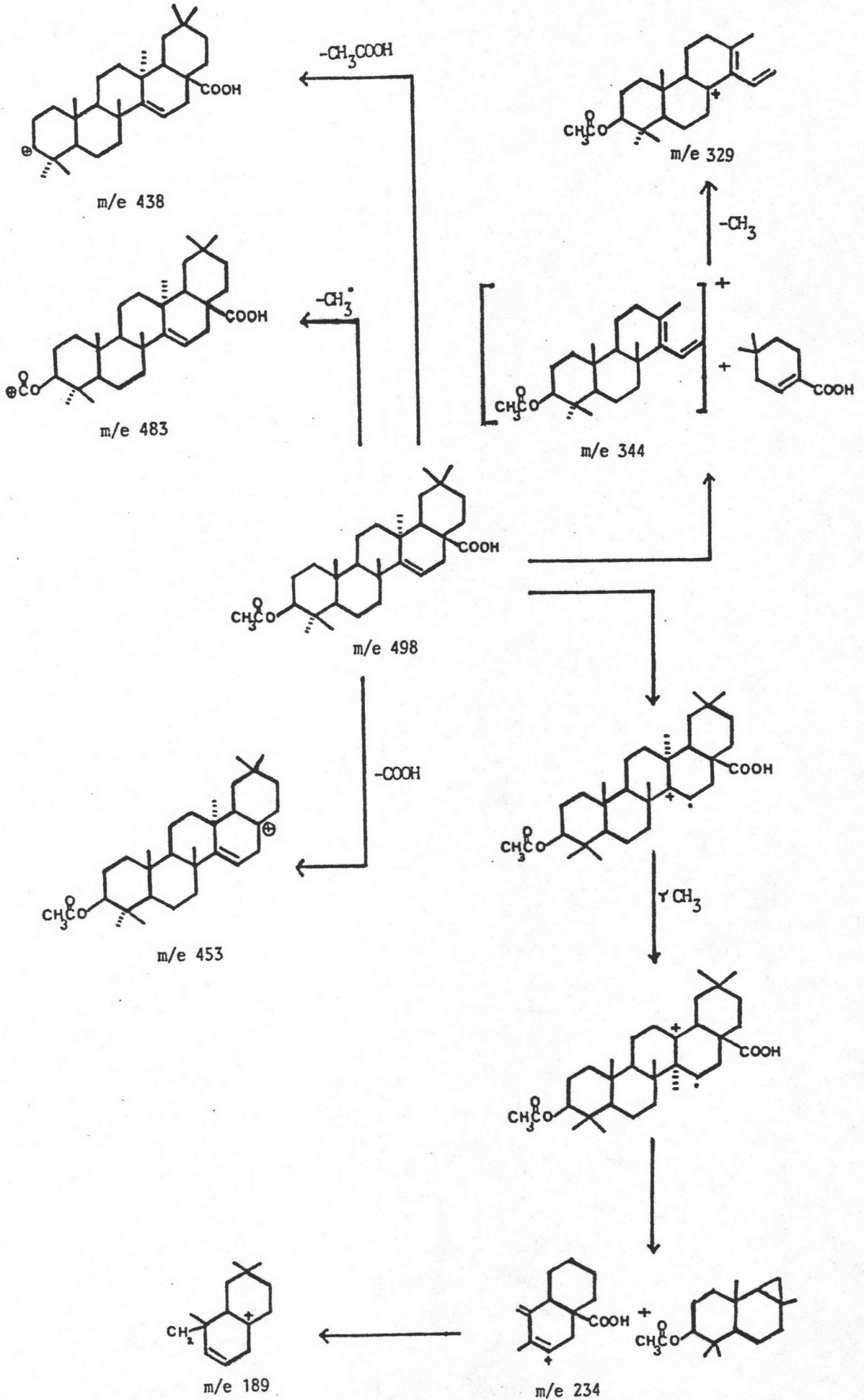
ความถี่ (cm^{-1})	ลักษณะแบนด์	การแปลความหมาย
3500–2500	b	O-H ยืด
3050	w	C-H ยืดของอัลคีน
2950, 2880	st	C-H ยืดของ CH_2 , CH_3
1740	st	C=O ยืดของเอสเทอร์
1690	st	C=O ยืดของหมู่คาร์บอกซิล
1480–1460	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH_2 และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH_3
1375	m,d	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH_3 (gem-dimethyl)
1300	m	C-O ยืดของกรด
1240	st	C-O ยืดของอะซิเตต
820, 800	w	C-H งอนอกระนาบของ trisubstituted vinyl

โปรตอนเอมเอมอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณที่ δ 0.89-0.96 ppm (21H, 7CH₃) ที่ δ 2.31 ppm (3H) แสดงถึงโปรตอนของหมู่เมทิลของ acetoxy group (CH₃-COO) ที่ δ 4.47 ppm (1H, H-3) และที่ δ 5.53 ppm (1H) แสดงถึงโปรตอนของหมู่โพลีทีนที่ C-14 ซึ่งเป็น trisubstituted vinyl

แมสสเปกตรัม ไม่ปรากฏพีคของ molecular ion (M⁺) แต่ปรากฏ M⁺-COOH ที่ m/e 453 ซึ่งเป็น base peak ด้วย ฉะนั้นน้ำหนักโมเลกุลของสาร ง เท่ากับ 498 จากการวิเคราะห์ธาตุ พบ C 76.92%, H 10.10% ได้สูตรโมเลกุลเป็น C₃₂H₅₀O₄ น้ำหนักโมเลกุล = 498.78 จากการคำนวณมี C 77.11%, H 10.04%

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัมยังพบพีคที่ m/e 483 (M⁺-CH₃), 438 (M⁺-HOAc), 344, 329, 234 และ 189 จากการศึกษามแมสสเปกโตรสโคปีของ pentacyclitriterpene โดย H.Budzikiewicz และ C.Djerassi⁽⁴⁹⁾ ทำให้เป็นแนวทางในการเสนอการแตกตัวของสาร ง ดังแสดงรูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ ในแผนภาพที่ 5

แผนภาพที่ 5 รูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร ง



จากการแตกตัวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า สาร ง มีโครงสร้างเป็น taraxerane-14-ene ซึ่งมีหมู่ acetoxy และหมู่คาร์บอกซิล เมื่อเปรียบเทียบกับจุทลอมเทลาวและอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ง กับรายงานของ 3 α -acetoxytaraxer-14-en-28 β -oic acid หรือ acetyl aleuritolic acid⁽⁸⁾ พบว่าเหมือนกัน สารนี้พบครั้งแรกจากเปลือกของต้นมะยาว (Aleurites montana) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ในรูปของ triterpene acid ก็คือ aleuritolic acid

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิลที่ 6 184.19(COOH) และ 171.89(COCH₃) การแปลความหมายของสัญญาณในแต่ละเคมีคัลชิฟท์ โดยเปรียบเทียบกับรายงานคาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีคัลชิฟท์ของ acetyl aleuritolic acid ซึ่งศึกษาโดย Roshan C. Carpenter และคณะ⁽⁵⁰⁾ พบว่าสอดคล้องกัน ดังแสดงในตารางที่ 32 จะเห็นว่า จากออพเรโซแนนท์ แสดง singlet ของ quaternary คาร์บอน 9 อะตอม ที่ 6 30.17, 38.19, 38.57, 38.78, 39.87, 52.22, 161.33 (C-14), 171.89 และ 184.19 ppm

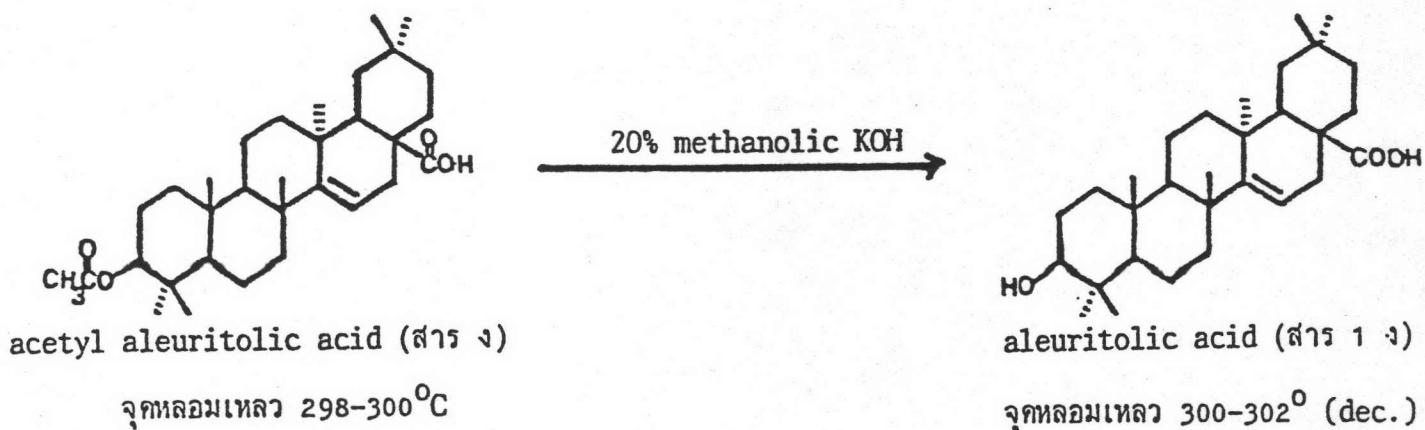
ตารางที่ 32 คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีคัลชิฟท์ของสาร ง และ acetyl aleuritolic acid⁽⁵⁰⁾

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลชิฟท์ (ppm)	
	สาร ง	Acetyl aleuritolic acid
1	36.24 (s)	37.4
2	23.29	23.4
3	81.80	80.8
4	38.57	37.6
5	56.45	55.6
6	19.55	18.7
7	34.56	35.3
8	39.87 (s)	39.0
9	49.94	49.0

ตารางที่ 32 (ต่อ)

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีกัลซีฟท์ (ppm)	
	สาร ง	Acetyl aleuritolic acid
10	38.19 (s)	37.3
11	18.20	17.3
12	31.63	31.2
13	35.75 (s)	37.9
14	161.33 (s)	160.5
15	117.72	116.8
16	29.57	30.6
17	52.22 (s)	51.5
18	42.31	41.3
19	41.66	40.7
20	30.17 (s)	29.3
21	34.18	33.6
22	32.288	31.8
23	27.03	27.9
24	17.44	16.6
25	16.46	15.7
26	28.82	28.6
27	24.32	26.2
28	184.19 (s)	184.4
29	32.77	33.3
30	22.15	22.4
C-O-CO- <u>Me</u>	22.15	} ไม่มีรายงาน
C-O- <u>CO</u> -Me	171.89 (s)	

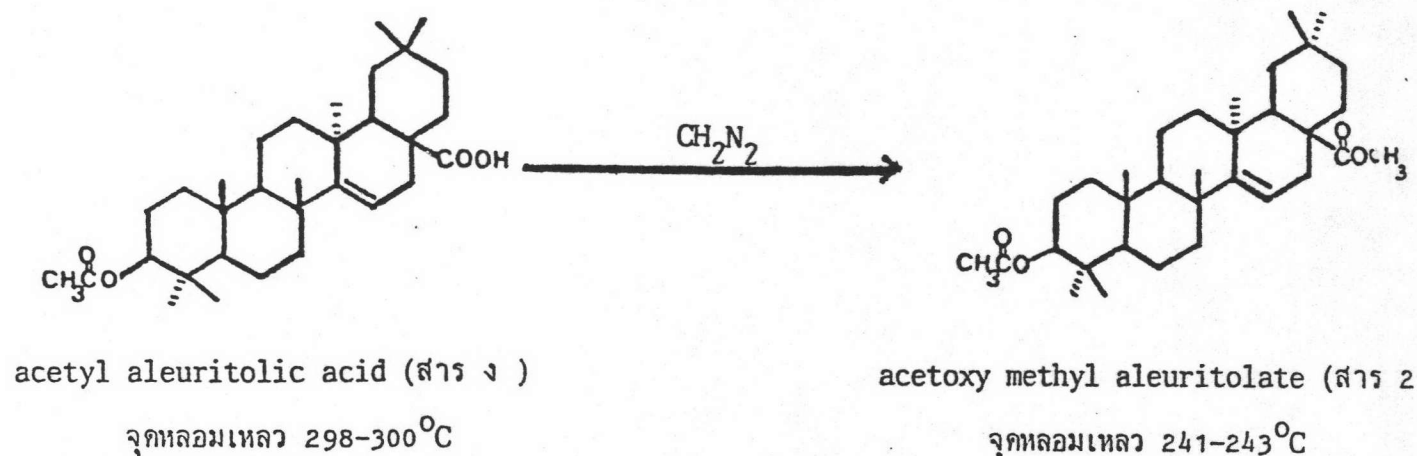
การไฮโดรไลส์ สาร ง คั่วย 20% methanolic KOH ในเบนซีน ได้ triterpene acid (สาร 1 ง)



สาร 1 ง เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 300-302°C (dec.) R_f 0.475 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม) ให้ผลบวกกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ ได้สารละลายสีชมพูม่วง อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแบนด์การดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของหมู่คาร์บอกซิลที่ 3400 (O-H) และ 1690 (C=O) cm^{-1} และลักษณะของ trisubstituted vinyl ที่ 820 และ 800 cm^{-1}

เมื่อเปรียบเทียบจุดหลอมเหลวและอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1 ง กับรายงานของ aleuritolic acid⁽⁸⁾ พบว่าเหมือนกัน

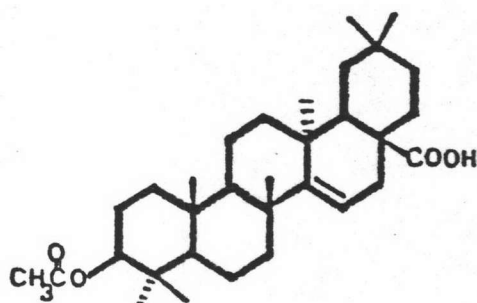
Methylation สาร ง คั่วย diazomethane ได้ methyl ester (สาร 2 ง)



สาร 2 ง เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว $241-243^{\circ}\text{C}$ R_f 0.73 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม) ให้ผลบวกกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ ให้สารละลายสีชมพูม่วง อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแบบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของอะซิเตตที่ 1725 ($\text{C}=\text{O}$) และ 1240 ($\text{C}-\text{O}$) cm^{-1} และลักษณะของ trisubstituted vinyl ที่ 820 และ 800 cm^{-1}

จุดหลอมเหลวและอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 2 ง เหมือนกับรายงานของ acetoxy methyl aleuritolate⁽⁸⁾ ทุกประการ

จากข้อมูลต่างๆ ที่กล่าวมานี้ สรุปได้ว่า สาร 2 ง คือ Acetyl aleuritolic acid ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



3.4.5 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร จ

สาร จ เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว $184-185^{\circ}\text{C}$ จากการแยกสิ่งสกัดด้วยเฮกเซนโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (4:1) ในการสกัดวิธีที่ 1 และชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1) ในการสกัดวิธีที่ 2 ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เฮกเซนหลาย ๆ ครั้ง R_f 0.74 (5% MeOH- CHCl_3) ให้ผลลบกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ และ 5% FeCl_3 ให้ผลบวกกับ 2,4-DNP, KMnO_4 และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแบบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของคาร์บอนิลไม่อิ่มตัว ที่ตำแหน่ง α, β ที่ 1670 และ 1170 cm^{-1} , ของอะโรแมติกที่ 1630 , 1595 , 1510 และ 1460 cm^{-1} , ของอีเทอร์ที่ 1240 และ 1095 cm^{-1} และของหมู่ gem-

dimethyl ที่ 1395 และ 1375 cm^{-1} ข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร จ แสดงดัง
ตารางที่ 33

ตารางที่ 33 การแปลความหมายอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร จ

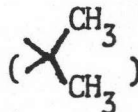
ความถี่	ลักษณะแบนด์	การแปลความหมาย
3100	w	C-H ยืดของอะโรแมติก
3020	w	C-H ยืดของอัลคีน
2980, 2840	w	C-H ยืดของ CH_2 , CH_3
2000 - 1680	summation	C-H งอของอะโรแมติก
1670	st	C=O ยืดของคาร์บอนิลไม่อิ่มตัวที่ตำแหน่ง α , β
1630, 1595, 1510, 1460	st	C=C ยืดของอะโรแมติก
1480	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH_2 และ อย่างไม่มีสมมาตรของ CH_3
1395, 1375	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH_3
1240	st	C-O-C ยืดอย่างไม่มีสมมาตร
1170	st	C-CO-C งอ
1095	st	C-O-C ยืดอย่างมีสมมาตร
900, 850	m	C-H งอของอะโรแมติก
830	m	C-H งอกนอกระนาบของ trisubstituted vinyl

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของ molecular ion (M^+) ที่ m/e 326 สอดคล้องกับข้อมูลจากการวิเคราะห์ธาตุ ซึ่งพบ C 73.47%, H 6.74% ได้สูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{22}O_4$ น้ำหนักโมเลกุล = 326.16 จากการคำนวณมี C 73.62%, H 6.75% และจำนวนความไม่อิ่มตัว (วงแหวน + พันธะคู่) ให้เท่ากับ 10

อัลตราไวโอเลตสเปกตรัม ให้ λ_{max} ที่ 213 nm, (ϵ 5.48×10^4) และ shoulder ที่ 234 nm (ϵ 4.19×10^4) แสดงถึง α , β -unsaturated ketone ส่วน λ_{max} ที่ 256 และ 403 nm (ϵ 4.53×10^4 และ 3.41×10^4 ตามลำดับ) เกิดจากอะโรแมติก (51)

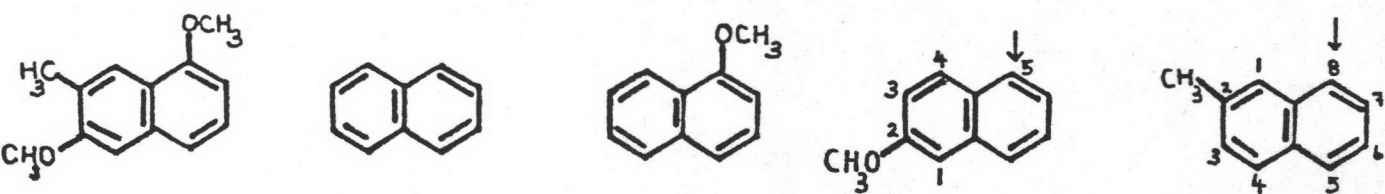
โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของ 22 โปรตอน ซึ่งประกอบด้วยโปรตอนของหมู่เมทิล 3 หมู่ หมู่เมทอกซี 3 หมู่ โปรตอนของอัลคีนและอะโรแมติก 4 โปรตอน โดยสัญญาณที่ δ 1.56 ppm (s, 6H) เป็นสัญญาณของ gem-dimethyl และที่ δ 2.36 ppm (s, 6H) เป็นสัญญาณของหมู่เมทิลที่ต่อกับส่วนที่ค่อนข้างโพลาร์ ซึ่งอาจเป็นอัลคีนหรืออะโรแมติก ส่วนสัญญาณเมทอกซี ปรากฏที่ δ 3.96 ppm (s, 3H) และ 4.02 ppm (s, 6H) โดยเมทอกซีซึ่งให้สัญญาณที่ 3.96 ppm ต่อกับส่วนโพลาร์น้อยกว่าเมทอกซีที่ 4.02 ppm ซึ่งเป็นเมทอกซี 2 หมู่ที่มีสิ่งแวดล้อมคล้ายกัน ส่วนโปรตอนอีก 4 อะตอม ปรากฏสัญญาณที่ δ 6.74 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.32 (s, 1H) และ 8.04 (s, 1H) ppm เป็นโปรตอนของอัลคีนและอะโรแมติก

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ปรากฏ 19 สัญญาณของ 20 คาร์บอน แสดงว่ามี equivalent คาร์บอน 1 คู่ จากผลการทำออฟเรโซแนนซ์พบว่า มี quaternary คาร์บอน 10 อะตอม ซึ่งปรากฏสัญญาณ singlet ที่ δ 49.5, 199.3, 147.4, 130.74, 142.61, 157.8, 127.15, 114.32, 154.93 และ 119.20 ppm มีเมธิลคาร์บอน (methinic carbon) 4 อะตอม ซึ่งปรากฏสัญญาณ doublet ที่ δ 99.01, 110.2, 123.37 และ 100.55 ppm มีเมทิลคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งปรากฏสัญญาณ double quartet ที่ δ 16.65 ppm เป็นสัญญาณของ gem-dimethyl และ quartet ที่ δ 28.33 ppm เป็นสัญญาณของหมู่เมทิลที่ต่อกับส่วนที่ค่อนข้างโพลาร์ สัญญาณที่เหลือเป็น quartet ที่ δ 55.09, 55.36 และ 55.47 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของเมทอกซีคาร์บอน 3 หมู่ สัญญาณ singlet ที่ δ 199.32 ppm แสดงถึงสัญญาณของคาร์บอนิล และ

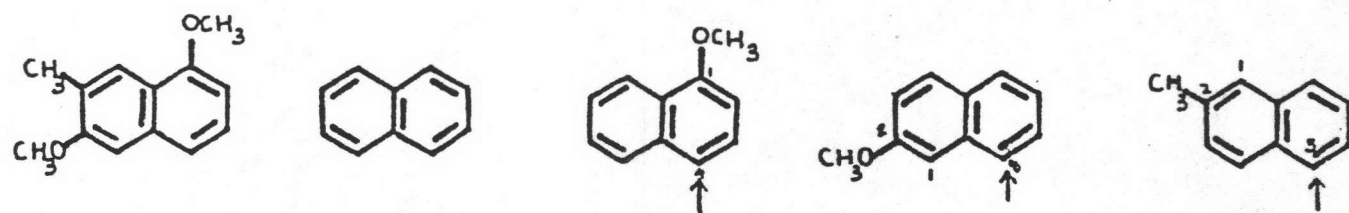
สัญญาณ singlet ที่ δ 49.5 ppm แสดงถึง quaternary คาร์บอน ()
ของหมู่ gem-dimethyl

จากหลักฐานต่าง ๆ สาร จ น่าจะเป็นสารประเภทโพลีไซคลิกอะโรแมติก ซึ่ง
คาดว่าจะมีส่วนที่เป็นแนพธาซีน เมื่อเปรียบเทียบกับคาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัมของ
สาร จ กับเคมีคัลชิฟท์ที่ได้จากการคำนวณโดยวิธี Substituent Chemical Shift
(SCS)^(52,53) ของหมู่เมธิลและหมู่เมธอกซีบนแนพธาซีนริง พบว่าค่าเคมีคัลชิฟท์ของสาร
ประกอบ 7-methyl-1,6-dimethoxy naphthalene ส่วนใหญ่ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จาก
สาร จ

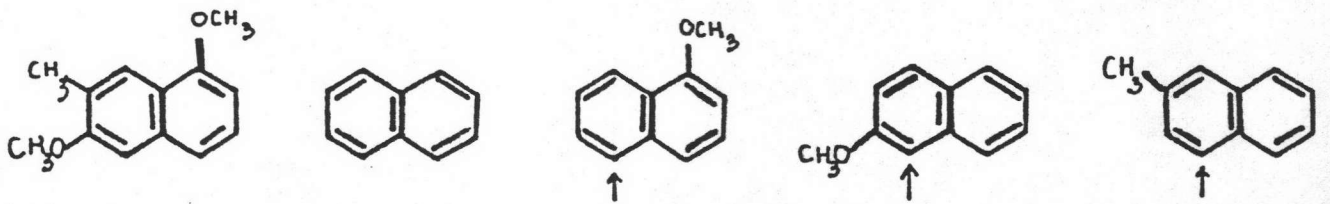
การคำนวณคาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีคัลชิฟท์ของสารประกอบ 7-methyl-1,6-dimethoxy
naphthalene



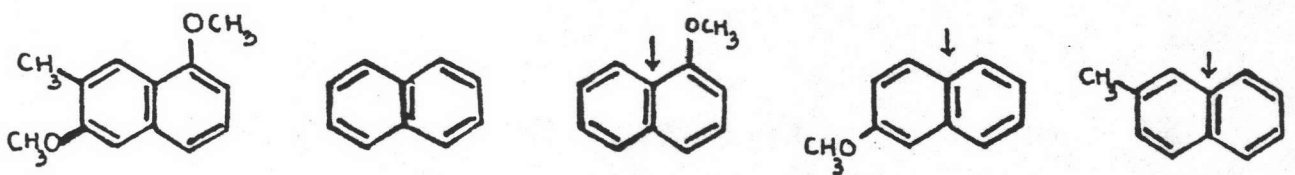
$$\begin{aligned}\delta_{C-1} &= \delta_{C-1(\text{unsubstituted})} + \delta_{1-\text{OCH}_3} + \delta_{2-\text{OCH}_3} \text{ ที่มีผลต่อ C-5} + \delta_{2-\text{CH}_3} \text{ ที่มีผลต่อ C-8} \\ &= 127.7 + 27.6 - 0.1 - 0.6 \\ &= 154.6\end{aligned}$$



$$\begin{aligned}\delta_{C-4} &= \delta_{C-4(\text{unsubstituted})} + \delta_{1-\text{OCH}_3} \text{ ที่มีผลต่อ C-4} + \delta_{2-\text{OCH}_3} \text{ ที่มีผลต่อ C-8} \\ &\quad + \delta_{2-\text{CH}_3} \text{ ที่มีผลต่อ C-5} \\ &= 127.7 - 7.6 - 1.0 - 0.2 \\ &= 118.9\end{aligned}$$



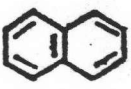
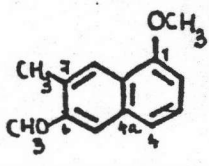
$$\begin{aligned} \delta_{C-5} &= \delta_{C-5(\text{unsubstituted})} - \delta_{1-\text{OCH}_3} \text{ ที่มีผลต่อ C-5} + \delta_{2-\text{OCH}_3} \text{ ที่มีผลต่อ C-1} \\ &\quad \delta_{2-\text{CH}_3} \text{ ที่มีผลต่อ C-4} \\ &= 127.7 - 0.4 - 22.0 - 0.1 \\ &= 105.2 \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} \delta_{C-8a} &= \delta_{C-8a(\text{unsubstituted})} + \delta_{1-\text{OCH}_3} \text{ ที่มีผลต่อ C-8a} + \delta_{2-\text{OCH}_3} \\ &\quad \text{ที่มีผลต่อ C-4a} + \delta_{2-\text{CH}_3} \text{ ที่มีผลต่อ C-8a} \\ &= 153.4 - 7.9 - 4.4 + 0.2 \\ &= 121.3 \end{aligned}$$

สำหรับ เคมีคัลซิฟของคาร์บอนตำแหน่งอื่น ๆ จำนวนเช่นเดียวกัน ผลการคำนวณ
แสดงดังตารางที่ 34

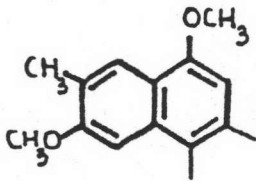
ตารางที่ 34 คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีคัลชิฟท์ของสารประกอบ 7-methyl-1, 6-dimethoxy naphthalene กับสาร จ

ตำแหน่ง คาร์บอน	^{13}C -SCS (ppm)			เคมีคัลชิฟท์ (ppm)		
	1-OCH ₃	2-OCH ₃	2-CH ₃			สาร จ *
1	+ 27.6	- 22.0	- 1.0	127.7	154.6	154.93
2	- 22.0	+ 31.9	+ 9.6	125.6	101.5	100.55
3	+ 0.1	- 6.9	+ 2.3	125.6	125.6	119.20
4	- 7.6	+ 1.6	- 0.1	127.7	118.9	130.74
5	- 0.4	- 0.1	- 0.2	127.7	105.2	110.20
6	+ 0.6	- 2.2	- 0.8	125.6	160.4	157.80
7	- 0.6	+ 0.7	+ 0.1	125.6	127.7	127.15
8	- 5.8	- 1.0	- 0.6	127.7	122.5	123.37
4a	+ 1.0	- 4.4	- 1.8	133.4	133.8	130.77
8a	- 7.9	+ 1.2	+ 0.2	133.4	121.3	114.32

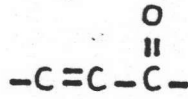
* เพื่อความสะดวกในการเปรียบเทียบตำแหน่งคาร์บอน กำหนดตำแหน่งของสาร จ ตามตำแหน่งของแนพธาลีน

จากตารางที่ 34 เมื่อเปรียบเทียบการคำนวณ Substituent Chemical Shift ของ 7-methyl-1, 6-dimethoxy naphthalene กับสาร จ จะเห็นว่า 8 ใน 10 คาร์บอน ของสาร จ สอดคล้องกับสารประกอบ 7-methyl-1,6-dimethoxy naphthalene ยกเว้นที่ตำแหน่งที่ 3 และที่ 4 ของแนพธาลีนเท่านั้น จึงคาดว่า สาร จ มีส่วนหนึ่งของสูตรโครงสร้างเป็น 7-methyl-1,6-dimethoxy naphthalene ที่มีจุดต่อกับส่วนอื่นที่ตำแหน่งที่ 3 และที่ 4 ของแนพธาลีน

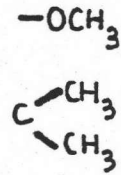
จากข้อมูลต่าง ๆ สรุปได้ว่า โมเลกุลของสาร จ ประกอบด้วย substituted naphthalene (1), α , β -unsaturated ketone (2), หมู่เมทอกซี 1 หมู่ และ หมู่ gem-dimethyl 1 หมู่ (3)



(1)



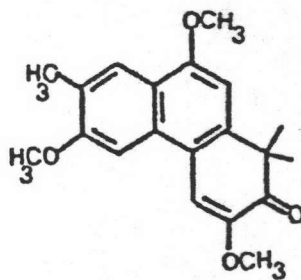
(2)



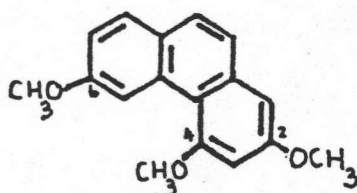
(3)

เพื่อให้จำนวนความไม่อิ่มตัวมีค่าเท่ากับ 10 ตามที่คำนวณจากสูตรโมเลกุล $C_{20}H_{22}O_4$ ส่วนของ substituted naphthalene ต้องต่อกับ α , β -unsaturated ketone และหมู่ gem-dimethyl เป็น cyclohexenone ring เนื่องจากค่าคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์ - เคมีคัลซิฟของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 คำนวณได้ต่ำกว่าค่าที่คำนวณได้ แต่เคมีคัลซิฟของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ไซฟิเคชันสูงกว่า ดังนั้นคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ควรจะต่อกับพันธะคู่ที่คอนจูเกตกับคาร์บอนิล และคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ต่อกับหมู่ gem-dimethyl

ดังนั้นจึงเสนอสูตรโครงสร้างของสาร จ เป็น 1,1,7-trimethyl-3,6,9-trimethoxy-2-phenanthrenone

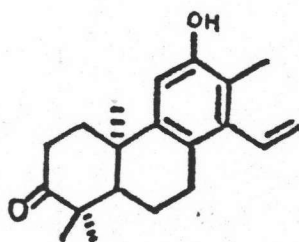


เมื่อเปรียบเทียบคาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัมของสาร จ กับสารประกอบ 2,4,6-trimethoxy phenanthrene⁽⁵⁴⁾ พบว่า เคมีคัลซิฟท์ของ C-6 ของสาร จ มีค่าใกล้เคียงกับเคมีคัลซิฟท์ของ C-6 ของ 2,4,6-trimethoxy phenanthrene คือ 157.8 และ 158.2 ppm ตามลำดับ ส่วนเคมีคัลซิฟท์ของ 6-OMe ของสาร จ ปรากฏที่ δ 55.09 ppm, ของ 2,4,6-trimethoxy phenanthrene ปรากฏที่ δ 55.1 ppm นอกจากนี้เคมีคัลซิฟท์ของ C-5 ของสารทั้งสองยังมีค่าใกล้เคียงกันคือ เคมีคัลซิฟท์ของ C-5 ของสาร จ ปรากฏที่ δ 110.20 ppm, ของ 2,4,6-trimethoxy phenanthrene ปรากฏที่ δ 109.7 ppm จะเห็นได้ว่า ค่าเคมีคัลซิฟท์ที่กล่าวมาแล้วมีค่าใกล้เคียงกัน แต่สำหรับเคมีคัลซิฟท์ของ C-8 ของ สาร จ จะปรากฏสัญญาณไฮฟิลด์กว่า คือปรากฏที่ δ 123.37 ppm และของ 2,4,6-trimethoxy phenanthrene ปรากฏที่ δ 129.3 ppm เนื่องจากสาร จ ได้รับอิทธิพลจากหมู่เมธิลและหมู่เมธอกซี ดังตารางที่ 34



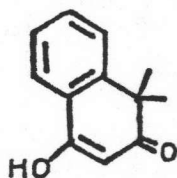
2,4,6-trimethoxy phenanthrene

A. Craveiro และคณะ⁽⁵⁵⁾ พบ 1,1,7,4a-tetramethyl-6-hydroxy-3,4,4a,9,10, 10a-hexahydro-8-ethenyl-2-phenanthrenone จากต้น Croton sonderianus ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ให้สัญญาณ singlet ของ quaternary คาร์บอนของหมู่ gem-dimethyl ที่ δ 47.6 ppm สำหรับ สาร จ ให้สัญญาณของ quaternary คาร์บอนของหมู่ gem-dimethyl ที่ 49.5 ppm ซึ่งควานฟิลด์กว่า เนื่องจากถูกชิลด์จาก ring B



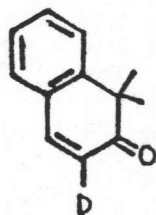
1,1,7,4a-tetramethyl-6-hydroxy-3,4,4a,9,10,10a-hexahydro-8-ethenyl
-2-phenanthrenone

D.R. Buckle และคณะ⁽⁵⁶⁾ ได้ทำการสังเคราะห์สารประกอบ 1,1-dimethyl-4-hydroxy-3-nitro-2-naphthalene โดยผ่าน 1,1-dimethyl-4-hydroxy-2-phenanthrenone ซึ่งสารประกอบ 1,1-dimethyl-4-hydroxy-2-phenanthrenone แสดงโปรตอนเอนเอมอาร์เคมีคัลซิฟท์ของหมู่ gem-dimethyl เป็นพีค singlet ที่ δ 1.46 ppm และเคมีคัลซิฟท์ของ H-5 ที่ δ 8.00 ppm



1,1-dimethyl-4-hydroxy-2-naphthalenone

นอกจากนี้ มีรายงานโปรตอนเอนเอมอาร์เคมีคัลซิฟท์ของ 1,1-dimethyl-2-oxo-3-deuterio-1,2-dihydronaphthalene ให้สัญญาณ singlet พีคของหมู่ gem-dimethyl ที่ δ 1.48 ppm⁽⁵⁷⁾



1,1-dimethyl-2-oxo-3-deuterio-1,2-dihydronaphthalene

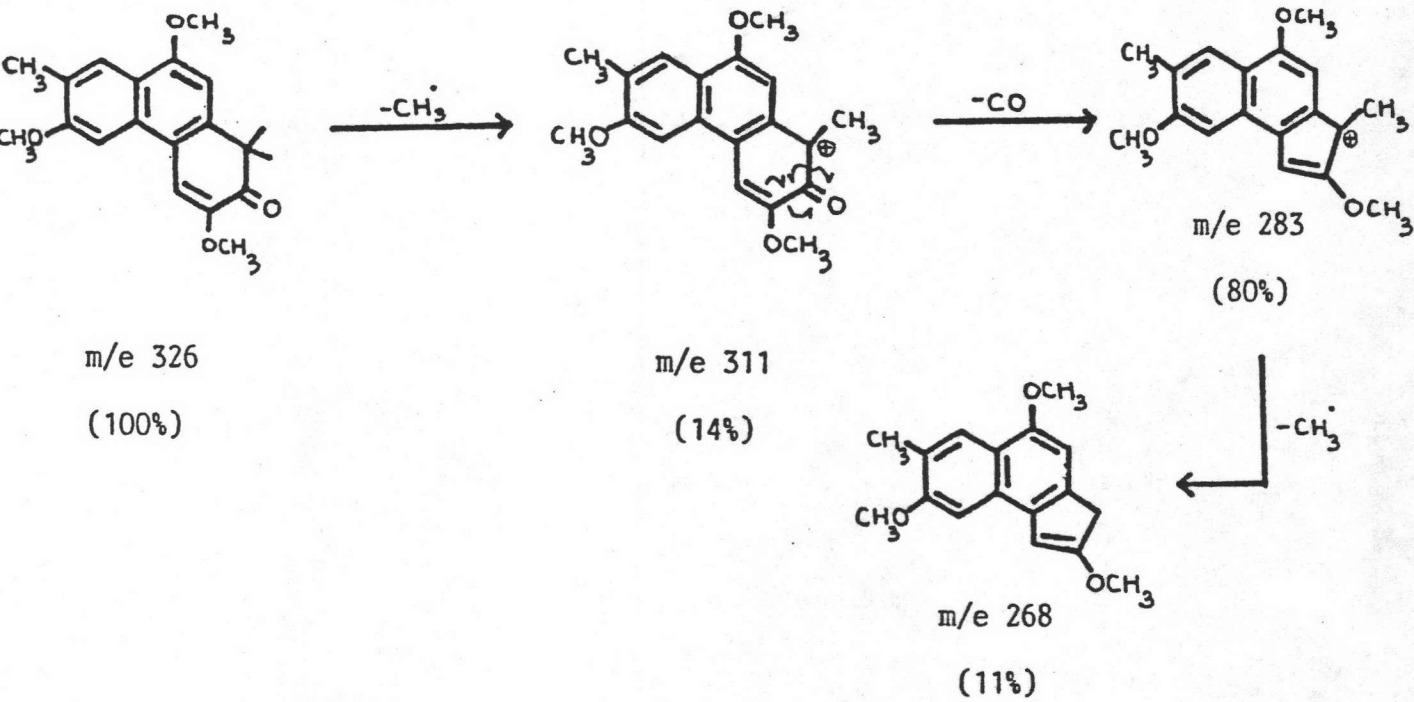
จากหลักฐานที่กล่าวมาข้างต้น เป็นแนวทางในการกำหนดตำแหน่งของคาร์บอนและโปรตอนที่มีเคมีคัลซิฟท์ต่าง ๆ ในคาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม และโปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม ดังแสดงในตารางที่ 35

ตารางที่ 35 คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์และโปรตอนเอนเอมอาร์เคมีคัลชิฟท์ของสาร จ

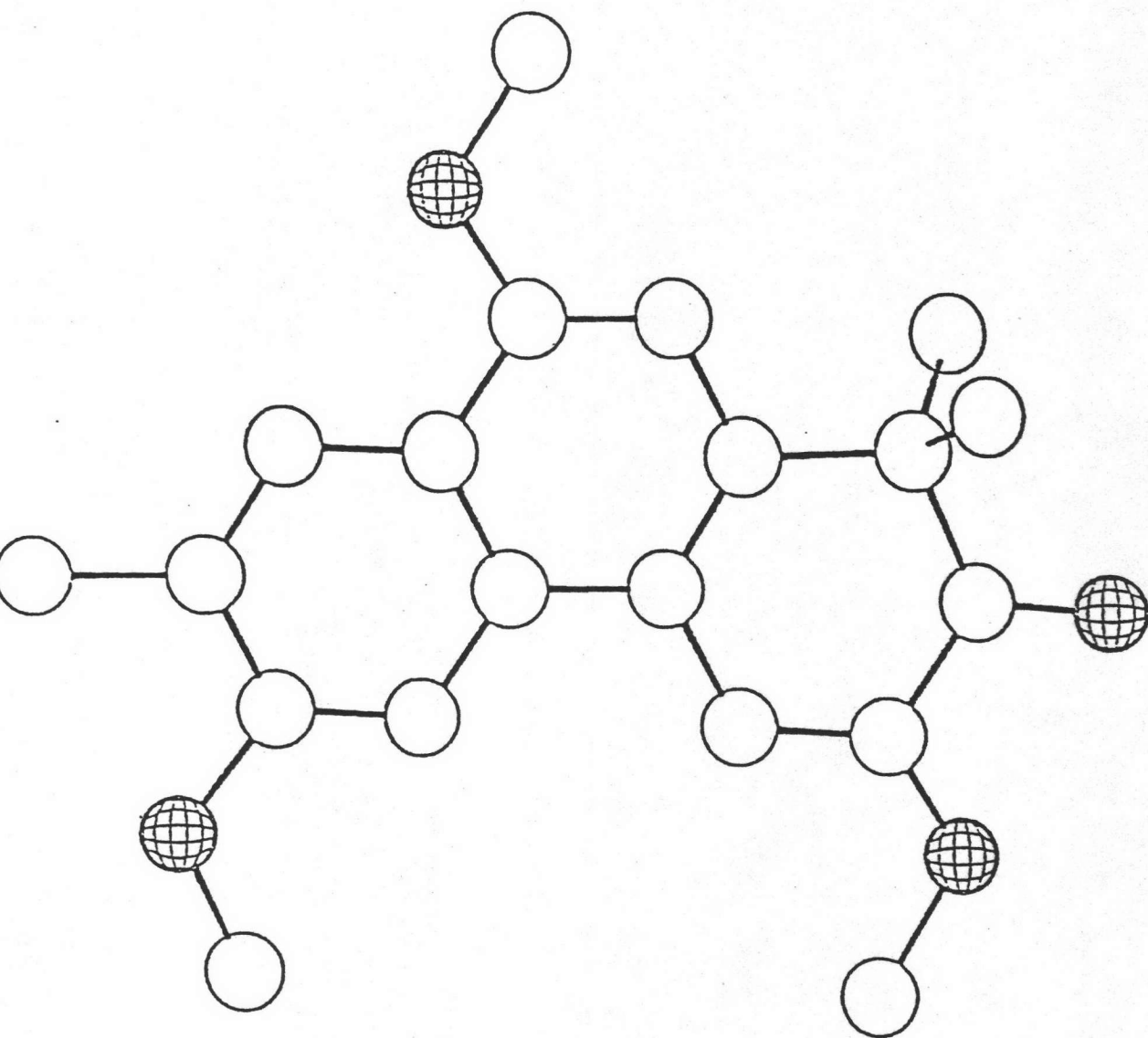
ตำแหน่งคาร์บอน	คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์		โปรตอนเอนเอมอาร์ เคมีคัลชิฟท์
	เคมีคัลชิฟท์	ออฟเรโซแนนท์	
1	49.5	s	
2	199.32	s	
3	147.42	s	
4	99.01	d	6.74 (s, 1H)
4a	130.74	s	
5a	142.61	s	
5	110.20	d	7.28 (s, 1H)
6	157.8	s	
7	127.15	s	
8	123.37	d	8.04 (s, 1H)
9a	114.32	s	
9	154.93	s	
10	100.65	d	7.32 (s, 1H)
10a	119.20	s	
11	} 16.65	dq	1.56 (s, 6H)
12			
13	55.47	q	3.96 (s, 3H)
14	55.09	q	4.02 (s, 3H)
15	28.33	q	2.36 (s, 3H)
16	55.36	q	4.02 (s, 3H)

Efraim Njau⁽⁵⁸⁾ ทำการศึกษา electron impact ของ 4a-methyl-4,4a-dihydro-phenanthren-2-one และสารประกอบ phenanthrenone อื่น ๆ พบว่า โดยปกติแมสสเปกตรัมของสารประกอบประเภท phenanthrenone จะให้ (M-R'), (M-28) และ (M-R'-28) ซึ่งพีคที่ (M-28) อาจเป็นการแตกตัวของ CO หรือ ethylene จากการศึกษานี้ทำให้เป็นแนวทางในการเสนอการแตกตัวของสาร จ ดังแสดงรูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ ในแผนภาพที่ 6

แผนภาพที่ 6 รูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร จ

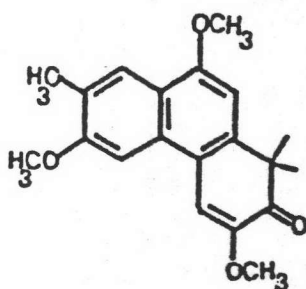


สูตรโครงสร้างของสาร จ ถูกยืนยันว่าเป็น 1,1,7-trimethyl-3,6,9-trimethoxy-2-phenanthrenone โดยผลจากการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างด้วย X-Ray Crystallography โดย Prof. Dr. Jon Clardy แห่งมหาวิทยาลัย Cornell ประเทศสหรัฐอเมริกา ดังแสดงในรูปต่อไปนี้



สูตรโครงสร้างโดย X-ray crystallography ของสาร จ

จากหลักฐานที่กล่าวมาแล้ว สรุปได้ว่า สาร จ คือ 1,1,7-trimethyl-3,6,9-trimethoxy-2-phenanthrene ซึ่งจากการศึกษาข้อมูลของสูตรโครงสร้างที่เสนอนี้ รวมทั้งอนุพันธ์ใกล้เคียงกับสูตรนี้คือ เปลี่ยนหมู่เมทอกซีเป็นหมู่ไฮดรอกซิลหรืออะซิเตต แม้กระทั่งสูตรโครงสร้างหลัก 1,1,-dimethyl-2-phenanthrene พบว่า ไม่มีรายงานสูตรโครงสร้างดังกล่าวมาก่อน จึงตั้งชื่อสาร จ 1,1,7-trimethyl-3,6,9-trimethoxy-2-phenanthrene ว่า Trigonostemone :-



3.4.6 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของ สาร จ

สาร จ เป็นผลึกรูปแผ่นสีขาว จุดหลอมเหลว $199-200^{\circ}\text{C}$ จากการแยกสิ่งสกักด้วยเฮกเซนโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไคคลอโรมีเทน (4:1) ในการสกัดวิธีที่ 1 และชะด้วยเฮกเซน:ไคคลอโรมีเทน (1:1) ในการสกัดวิธีที่ 2 ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเมทานอล-คลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้ง R_F 0.14 (คลอโรฟอร์ม) ให้ผลบวกกับ 2,4-DNP และ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ได้สารละลายสีเขียว แสดงว่า สาร จ เป็นสารประเภทสเตอรอยด์ที่มีหมู่คาร์บอนิลของอัลดีไฮด์หรือคีโตน

อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแบนด์การดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของคีโตนที่ 1705 , 1260 และ 1240 cm^{-1} แสดงว่า สาร จ เป็นสเตอรอยด์คีโตน ข้อมูลการดูดกลืนของสาร จ แสดงดังในตารางที่ 36

ตารางที่ 36 การแปลความหมายอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร จ

ความถี่ (cm^{-1})	ลักษณะแบนด์	การแปลความหมาย
2950, 2860	st	C-H ยึดของ CH_2 , CH_3
1705	st, b	C=O ยึดของหมู่คีโตน (keto group)
1480	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH_2 และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH_3
1420	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ $-\text{CH}_2\text{CO}$
1380	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH_3
1260, 1240	m	C-C-C ยึดและงอของ $\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$

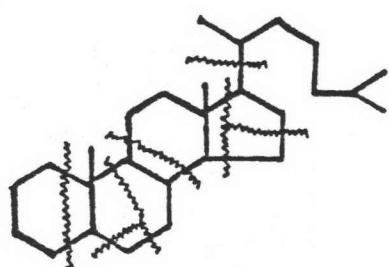
โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณที่ δ 0.69, 0.78, 0.85 และ 0.96 (18H, 6CH₃), 1.19-1.56 (23H) และ 2.01-2.65 (7H) ppm โดยที่ 0.69 และ 0.96 ppm เป็นสัญญาณของหมู่เมธิลที่ angular 2 หมู่ คือ C-18 และ C-19 ตามลำดับ ส่วนที่ δ 0.78, 0.85 ppm เป็นสัญญาณของหมู่เมธิลที่ side chain 4 หมู่ คือ C-21, 26, 27 และ 29 ที่ δ 2.01-2.65 ppm เป็นสัญญาณของหมู่ active methylene 3 หมู่ คือ C-2, 4 และ 7 รวมทั้งหมู่ active methylene 1 หมู่ ซึ่งเป็นโปรตอนของ C-5 ส่วนสัญญาณของโปรตอนที่เหลือปรากฏที่ δ 1.19-1.56 ppm

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของ molecular ion ที่ m/e 428 สอดคล้องกับข้อมูลจากการวิเคราะห์ธาตุ ซึ่งพบ C 81.14%, H 11.29% ได้สูตรโมเลกุลเป็น C₂₉H₄₈O₂ น้ำหนักโมเลกุล = 428.70 จากการคำนวณมี C 73.62%, H 6.75%

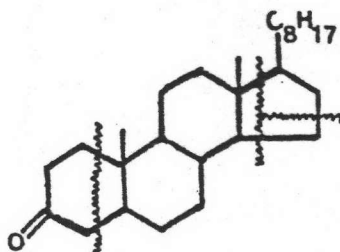
เมื่อพิจารณาแมสสเปกตรัม พบว่า สาร จ มีรูปแบบการแตกตัวเหมือนกับ C₂₉-สเตอรอยด์ โดยปรากฏพีคที่ m/e 287 (M⁺-C₁₀H₂₁), 260 (M⁺-C₁₂H₂₄), 245 (M⁺-C₁₀H₂₁-42), 231, 177, 137, 109 และ 69

จากการเปรียบเทียบจุลลอมเหลว อินฟราเรดสเปกตรัม โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม และ แมสสเปกตรัมของสาร จ กับรายงานของ 5 α -stigmastane-3,6-dione⁽⁵⁹⁾ ซึ่งเป็น C₂₉-dioxo-สเตอรอยด์ พบว่าเหมือนกัน ดังนั้นสาร จ น่าจะเป็น 5 α -stigmastane-3,6-dione

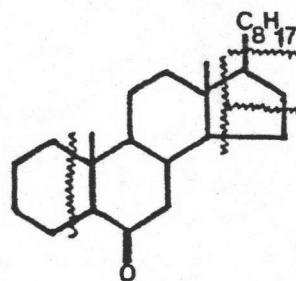
H.Budzikiewicz และ C.Djerassi⁽⁶⁰⁾ ได้ศึกษาแมสสเปกโตรเมตซ์ของ สเตอรอยด์คีโตน และแสดงลักษณะเฉพาะของการแตกตัวของสเตอรอยด์ และสเตอรอยด์ที่มีหมู่คีโตน (keto group) ที่ตำแหน่ง 3 และ 6 ดังนี้ :-



สเตอรอยด์
(cholestane)



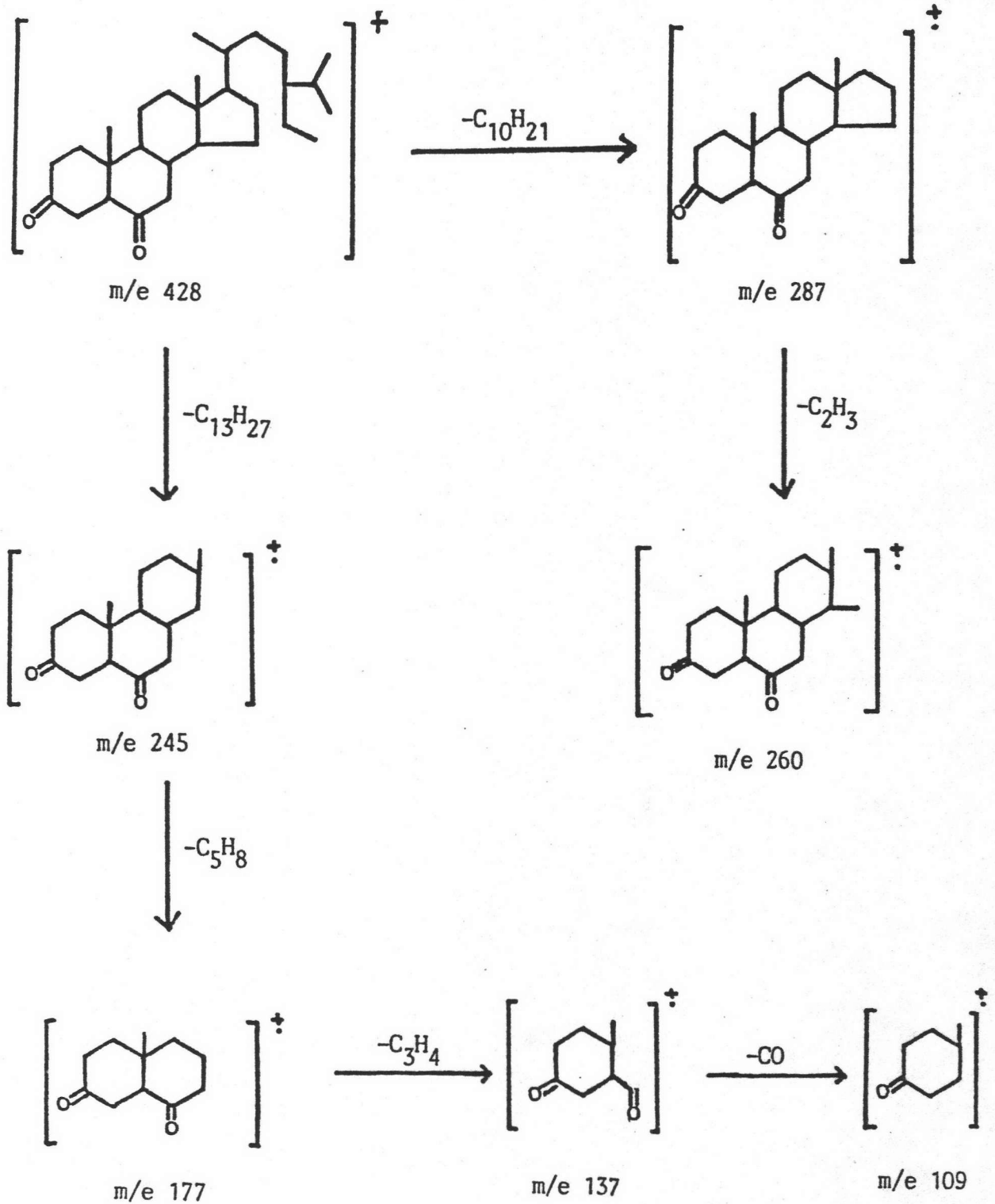
3-keto สเตอรอยด์
(cholestan-3-one)



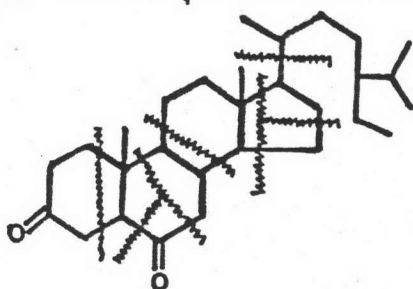
6-keto สเตอรอยด์
(cholestan-6-one)

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น เป็นแนวทางในการเสนอการแตกตัวของสาร จ
 ดังแสดงรูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ ในแผนภาพที่ 7

แผนภาพที่ 7 รูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร จ



จากแผนภาพที่ 7 สามารถสรุปแบบการแตกตัวของสาร $\mathbf{จ}$ ดังนี้



คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม ปรากฏ 27 สัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 29 คาร์บอน โดยที่ความเข้มของสัญญาณที่ 6 11.97 และ 38.03 ppm สูงเป็นสองเท่าของสัญญาณอื่น การแปลความหมายของสัญญาณในแต่ละ เคมีคัลซิฟท์ ทำโดยการเปรียบเทียบกับคาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีคัลซิฟท์ของ homo-androstane-3,6-dione และ β -sitosterol ดังแสดงในตารางที่ 37 จะเห็นว่าจากออฟเรโซแนนซ์ แสดง singlet ของ 4 quaternary คาร์บอน ที่ 6 41.22, 42.96, 209.17 และ 211.33 ppm ซึ่งสอดคล้องกับสัญญาณของ C-10, C-13, C-3 และ C-6 ตามลำดับ

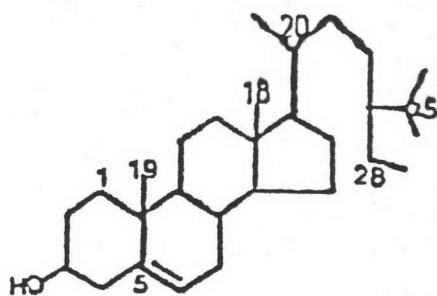
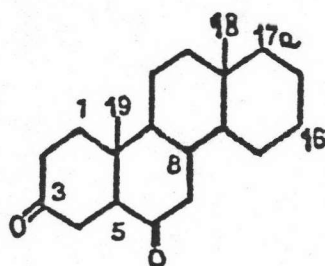
ตารางที่ 37 คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีคัลซิฟท์ของสาร $\mathbf{จ}$, homo-androstane-3,6-dione⁽⁶¹⁾ และ β -sitosterol⁽⁴⁶⁾

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลซิฟท์ (ppm)		
	สาร $\mathbf{จ}$	homo-androstane-3,6-dione ⁶¹	β -sitosterol ⁴⁶
1	38.03	38.00	37.3
2	37.38	37.30	31.8
3	209.17*(s)	ไม่มีรายงาน	71.9
4	37.00	36.87	42.4
5	57.47	57.16	140.9
6	211.33*(s)	ไม่มีรายงาน	121.8
7	45.77	45.77	32.0
8	38.03	38.26	32.0
9	53.47	53.64	50.3
10	41.22(s)	40.89	36.6

ตารางที่ 37 (ต่อ)

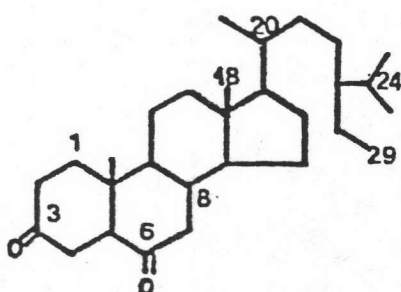
ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลซิฟท์ (ppm)		
	สาร ฉ	homo-androstane-3,6-dione ⁶¹	β -sitosterol ⁴⁶
11	21.66	20.98	21.1
12	39.33	41.90	39.9
13	42.96(s)	33.97	42.4
14	56.44	51.49	56.8
15	23.99	24.07	24.3
16	28.00	26.94	28.2
17	55.96	21.28	56.2
18	11.97	16.86	11.9
19	12.56	12.46	19.4
20	36.02		36.2
21	18.96		19.1
22	33.80		34.0
23	29.09		29.3
24	46.59		50.3
25	26.00		26.2
26	18.69		18.8
27	19.77		19.8
28	23.02		23.1
29	11.97		11.9

* สามารถสลับตำแหน่งกันได้

 β -sitosterol

homo-androstane-3,6-dione

จากข้อมูลต่าง ๆ ที่กล่าวมานี้ สรุปได้ว่า สาร จ ก็คือ 5 α -stigmastane-3,6-dione



3.4.7 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของสาร ช

สาร ช เป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน จุดหลอมเหลว 184-185°C จากการแยกสิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (4:1) ในการสกัดวิธีที่ 1 และจากการแยกสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1) ในการสกัดวิธีที่ 2 ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอลหลาย ๆ ครั้ง R_f 0.088 (คลอโรฟอร์ม) ให้ผลกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์, 5% $FeCl_3$ และ 2,4-DNP

อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแบนด์การดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของแอลกอฮอล์ที่ 3500-3200, 1220 และ 660 cm^{-1} ของแลคโตนที่ 1710, 1200 และ 1150, ของอะโรแมติกที่ 1620, 1565, 1500 และ 1470 cm^{-1} และของอีเธอร์ที่ 1445, 1270, 1120 และ 1020 cm^{-1} ข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร ช แสดงทั้งในตารางที่ 38

ตารางที่ 38 การแปลความหมายอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ช

ความถี่ (cm^{-1})	ลักษณะแบนด์	การแปลความหมาย
3500-3200	st	O-H ยืดของแอลกอฮอล์
3040	m	C-H ยืดของอัลคีนและอะโรแมติก
2000-1650	summation	C-H งอของอะโรแมติก
1710	st,b	C=O ยืดของแอลโคโน
1620, 1565, 1500, 1470	st	C=C ยืดของอะโรแมติก
1445	st	C-H งอของอีเธอร์
1400	m	C-H งอของอัลคีน
1360	st	O-H งอในระนาบ
1270, 1120, 1020	st	C-O-C ยืดของอีเธอร์
1220	m	C-O ยืดของแอลกอฮอล์
1200, 1150	st	C-O ยืดของแอลโคโน
930, 850	m	C-H งอของอะโรแมติก
665	m	C-C งอนอกระนาบ
660	m	O-H งอนอกระนาบ

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของ molecular ion ที่ m/e 222 สอดคล้องกับ ข้อมูลจากการวิเคราะห์ธาตุ ซึ่งพบ C 59.76%, H 4.51% ได้สูตรโมเลกุลเป็น $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$ น้ำหนักโมเลกุล = 222.16 จากการคำนวณมี C 59.46%, H 4.50% และจำนวนความไม่อิ่มตัว (วงแหวน + พันธะคู่) ได้เท่ากับ 7

อัลตราไวโอเล็ตสเปกตรัม ให้ λ_{max} ที่ 242 nm (ϵ 1.48×10^4) และ 318 nm (ϵ 6.76×10^4) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของคูมาริน⁽⁵¹⁾ จึงทำการทดสอบคูมารินโดยเทคนิค เปเปอร์โครมาโทกราฟี พบจุดสีเหลืองบนกระดาษที่ทำทดสอบ มีค่า R_f ใกล้เคียงกับ สารละลายมาตรฐานคูมาริน⁽³⁹⁾

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณที่ δ 3.89 (3H, S, OCH₃), 3.92 (3H, S, OCH₃), 6.21 (H-3), 6.31 (H-8), 6.44 (OH) และ 7.95 (H-4) ppm

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนทั้งหมด 11 สัญญาณที่ δ 56.02, 60.78, 91.3, 103.4, 110.4, 132.4, 139.4, 147.0, 151.7, 156.5 และ 161.2 ppm โดยที่ δ 56.02 และ 60.78 เป็นสัญญาณของคาร์บอนหมู่เมทอกซี เนื่องจากสาร ซ เป็นสารประเภทคูมารินที่มีหมู่แทนที่ (substituted coumarin) ดังนั้นการแปลความหมายของสัญญาณในแต่ละเคมีคัลชิฟต์ ทำโดยอาศัยการคำนวณ Substituent Chemical Shift (SCS) ของคูมารินที่ไม่มีหมู่แทนที่ (unsubstituted coumarin)

การคำนวณคาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีคัลชิฟต์ของคูมารินที่มีหมู่แทนที่ มีหลักการดังนี้:-

เมื่อโปรตอนของคูมารินที่ไม่มีหมู่แทนที่ ถูกแทนที่ด้วย -OH หรือ -OCH₃ ค่าคาร์บอนเคมีคัลชิฟต์จะควานฟีลด์ลงประมาณ 30 ppm ในขณะที่คาร์บอนที่ตำแหน่งออร์โธกับหมู่แทนที่จะอัฟฟีลด์ ประมาณ 11-15 ppm และตำแหน่งพาราจะอัฟฟีลด์ประมาณ 7-10 ppm ส่วนตำแหน่งเมตาจะควานฟีลด์ประมาณ 0.3-2.3 ppm^(62,63)

ตัวอย่างเช่น การคำนวณคาร์บอนเคมีคัลชิฟต์ของ C-5, C-7 และ C-9 ของ 5-hydroxy-6,7-dimethoxy coumarin

$$\begin{aligned}\delta_{C-5} &= \delta_{C-5(\text{unsubstituted})} + SCS_{5-OH} + SCS_{\text{ออร์โธ, 6-OCH}_3} + SCS_{\text{เมตา, 7-OCH}_3} \\ &= 127.9 + 30 - 13 - 1 \\ &= 145.9\end{aligned}$$

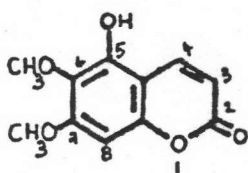
$$\begin{aligned}\delta_{C-7} &= \delta_{C-7(\text{unsubstituted})} + SCS_{7-OCH_3} + SCS_{\text{ออร์โธ, 6-OCH}_3} + SCS_{\text{เมตา, 5-OH}} \\ &= 131.7 + 30.9 - 13 + 1 \\ &= 151.6\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \delta_{C-9} &= \delta_{C-9(\text{unsubstituted})} + SCS_{\text{เมตา},5\text{-OH}} + SCS_{\text{พารา},6\text{-OCH}_3} + SCS_{\text{เมตา},7\text{-OCH}_3} \\
 &= 153.8 + 1.9 - 8.5 + 1 \\
 &= 159.4
 \end{aligned}$$

สำหรับเคมีคัลซิฟท์ของคาร์บอนตำแหน่งอื่น ๆ จำนวนเช่นเดียวกัน ผลการคำนวณแสดงดังในตารางที่ 39

ตารางที่ 39 คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีคัลซิฟท์ของสาร ข ที่ได้จากสเปกตรัมและการคำนวณ

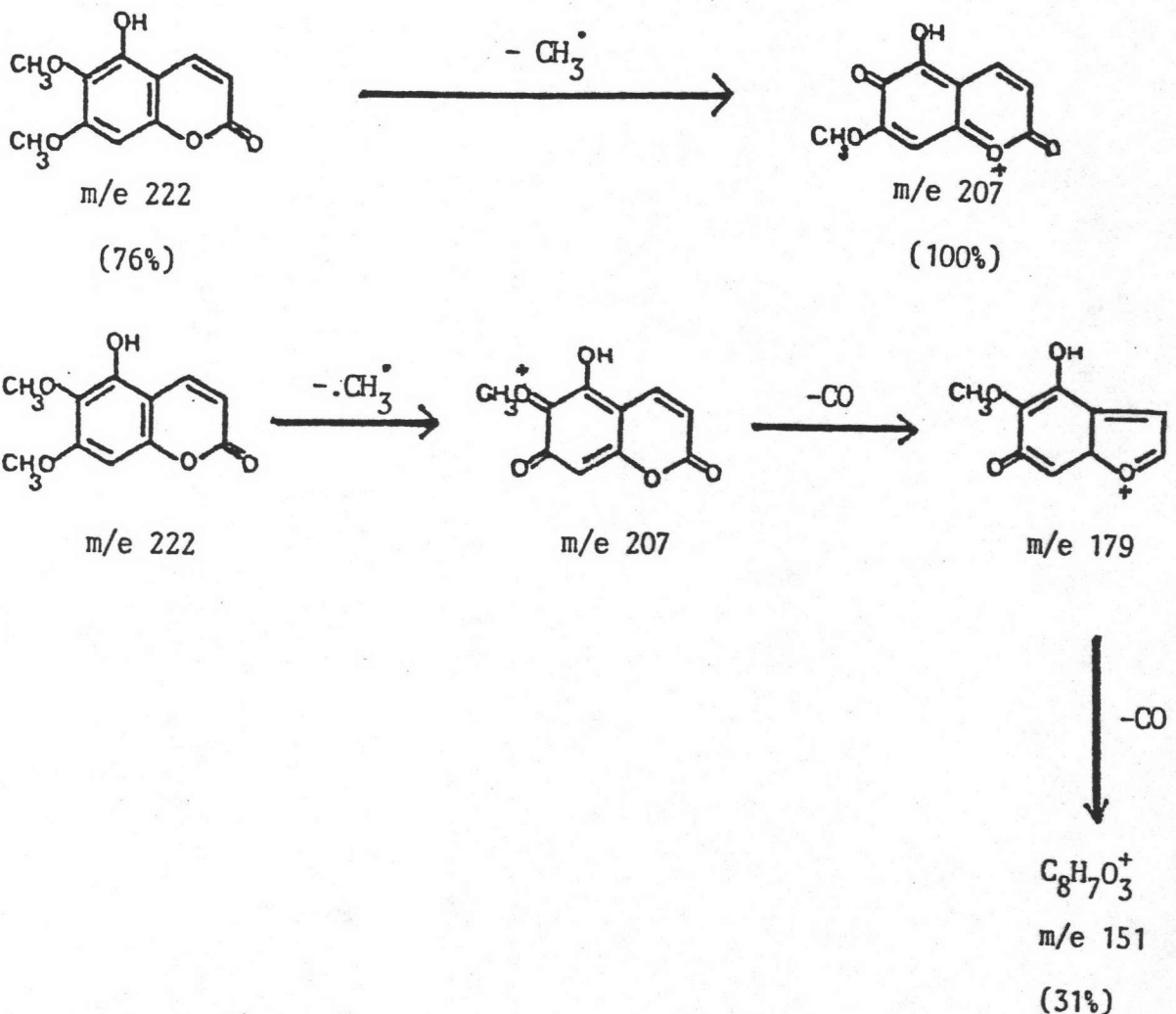
ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลซิฟท์ (ppm)		
	observed	calculated	unsubstituted coumarin
2	161.2	160.4	160.4
3	110.4	116	116.4
4	139.4	143	143.4
5	147.0	145.9	127.9
6	132.4	130.1	124.3
7	151.7	151.6	131.7
8	91.3	96.0	116.5
9	156.5	159.4	153.8
10	103.4	100.2	118.7



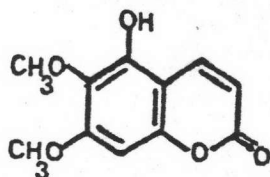
แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของ molecular ion (M^+) ที่ m/e 222 นอก
จากนี้พบพีคที่ m/e 207(100%), 179(16%) และ 151(31%)

มีรายงานการแตกตัวของสารประเภทเมธอกซีคูมาริน (methoxy coumarin)⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾
พบว่าส่วนใหญ่จะแตกตัวให้ CO และเมธิลเรดิคัล (methyl radical) หลุด โดยอาจเกิดขึ้น
พร้อมกันหรือเกิดขึ้นใดอันหนึ่งก่อนก็ได้ทั้งนี้ขึ้นกับโครงสร้าง โดยปกติการให้เมธิลเรดิคัลหลุดก่อน
จะได้ quinonoid structure ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เสถียร ดังนั้นสาร ข จึงแตกตัวให้
เมธิลเรดิคัลที่ C-7 หลุดก่อน ได้ m/e 207 เป็น p-quinonoid structure และเป็น
base peak ดังแสดงในแผนภาพที่ 8 ซึ่งแสดงรูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร ข

แผนภาพที่ 8 รูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร ข



จากการเปรียบเทียบจุลหอยหลอด, อัลตราไวโอเลตสเปกตรัม, โปรตอนเอ็น-เอมอาร์สเปกตรัม และแมสสเปกตรัมของสาร ซ กับ 5-hydroxy-6,7-dimethoxy coumarin หรือ tomentin ซึ่งพบในต้น Prunus tomentosa⁽⁶⁷⁾ มีชื่อไทยว่า นูกันพบว่าเหมือนกัน ดังนั้น สาร ซ ก็คือ 5-hydroxy-6,7-dimethoxy coumarin ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้:-



3.4.8 การตรวจหาสูตรโครงสร้างของ สาร ซ

สาร ซ จุลหอยหลอด 108-110°C จากการแยกสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1) ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเมทานอล-คลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้ง R_f 0.57 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม) ให้ผลลบกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ จากการวิเคราะห์ธาตุพบว่า มี C, H, O และ N

อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแถบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของ unsubstituted amide ที่ตำแหน่ง 3400-3200 และ 1520 cm^{-1} และของ long chain ที่ 710 cm^{-1} ข้อมูลการดูดกลืนแสงของสาร ซ แสดงดังในตารางที่ 40

ตารางที่ 40 การแปลความหมายอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ซ

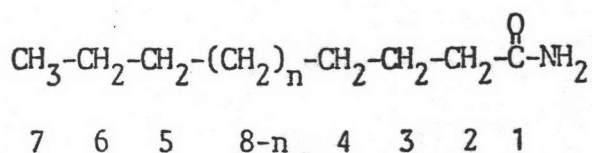
ความถี่ (cm^{-1})	ลักษณะแถบ	การแปลความหมาย
3400-3300	d, m	N-H ยืด
2900-2840	st	C-H ยืดของ CH_2 , CH_3
1660	st	C=O ยืด
1520	m	N-H งอในระนาบ
1460	m	C-H งออย่างสมมาตรของ CH_2 และอย่างไม่สมมาตรของ CH_3
710	w	CH_2 โกลง เมื่อมีหมู่เมทิลตั้งแต่ 4 หมู่ขึ้นไป

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม ปรากฏ doublet ที่ δ 7.5 ppm แสดงถึงโปรตอนบนไนโตรเจนของ unsubstituted amide triplet ที่ δ 4.1 ppm แสดงถึง โปรตอนบนคาร์บอนที่ต่อกับหมู่เอไมด์ ปรากฏสัญญาณ sharp singlet ที่มีความเข้มสูงที่ δ 1.25 ppm แสดงถึงโปรตอนของหมู่เมทิลที่ต่อกันหลาย ๆ หมู่ และ triplet ที่ δ 0.87 ppm แสดงถึงโปรตอนของหมู่เมทิล ลักษณะการเกิดสัญญาณของอินฟราเรด และโปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม แสดงว่า สาร ข เป็น long chain unsubstituted amide

เพื่อยืนยันว่า สาร ข เป็น long chain unsubstituted amide จึงทำการเปรียบเทียบคาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีคัลชิฟท์ของสาร ข กับ octanamide ซึ่งเป็น long chain unsubstituted amide ดังแสดงในตารางที่ 41 พบว่าสอดคล้องกัน

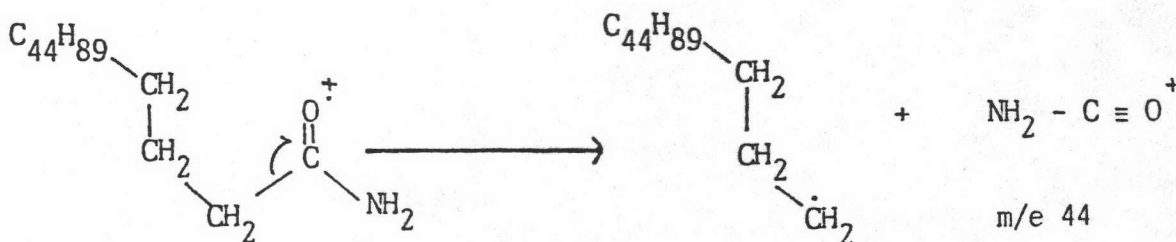
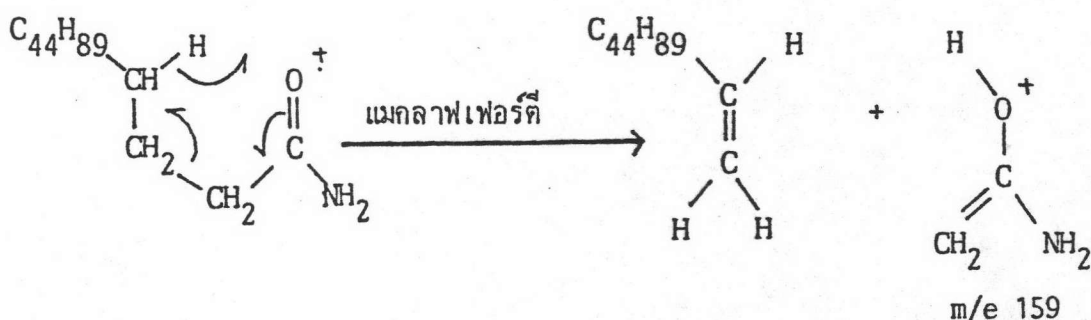
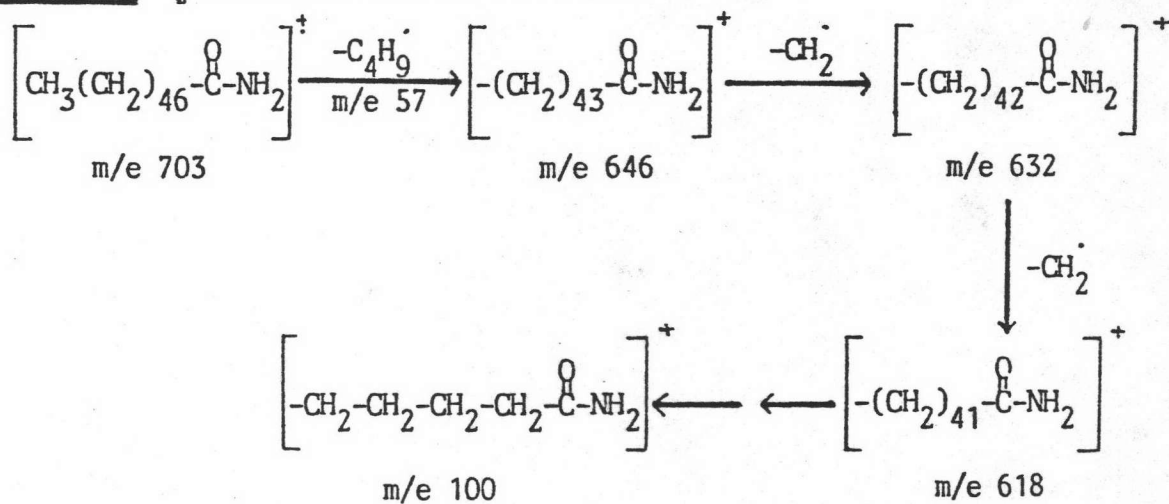
ตารางที่ 41 คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์เคมีคัลชิฟท์ของสาร ข และ octanamide (46)

ตำแหน่งคาร์บอน	เคมีคัลชิฟท์	
	สาร ข	octanamide
1	170.59	175.0
2	35.40	35.5
3	25.68	25.5
4	28.87	28.8
5	31.42	31.5
6	22.27	22.3
7	13.90	14.0
8-n	29.20	29.1



แมสสเปกตรัม ปรากฏ molecular ion (M^+) ที่ m/e 703 การคำนวณสำหรับ $C_{48}H_{97}NO$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 703.48, m/e 689 การคำนวณสำหรับ $C_{47}H_{95}NO$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 689.47; m/e 675 การคำนวณสำหรับ $C_{46}H_{93}NO$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 675.46; m/e 661 การคำนวณสำหรับ $C_{45}H_{91}NO$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 661.45 และ m/e 647 การคำนวณสำหรับ $C_{44}H_{89}NO$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 647.44 นอกจากนี้ปรากฏที่ที่แสดงการแตกตัวให้หมู่เอไมด์หลุด ให้นักฟิชที่ m/e 659 ($703-CONH_2$), 645 ($689-CONH_2$), 631 ($675-CONH_2$), 617 ($661-CONH_2$) และ 603 ($647-CONH_2$) ปรากฏที่ที่แสดงลักษณะการแตกตัวของโซ่ตรง ที่ m/e 646 ($703-C_4H_9$), 632 ($646-CH_2$), 618 ($646-2(CH_2)$), 654 ($646-3(CH_2)$),... และ 100 ($646-39(CH_2)$) เสนอรูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร ช ดังแผนภาพที่ 9

แผนภาพที่ 9 รูปแบบการแตกตัวที่อาจเป็นไปได้ของสาร ช



จากหลักฐานทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า สาร ซ เป็นของผสมของ long chain unsubstituted amides ที่มีสูตรโมเลกุล ดังนี้:-

$C_{44}H_{89}NO$ tetratetracontamide

$C_{45}H_{91}NO$ pentatetracontamide

$C_{46}H_{93}NO$ hexatetracontamide

$C_{47}H_{95}NO$ heptatetracontamide

$C_{48}H_{97}NO$ octatetracontamide

3.4.9 การตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสาร ฅ

สาร ฅ จากการแยกสิ่งสกัดด้วยไคคลอโรมีเทนโดยคอลัมน์โกรีมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยไคคลอโรมีเทนในการสกัดวิธีที่ 1 และจากการแยกสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มโดยคอลัมน์โกรีมาโทกราฟี ซึ่งชะด้วยไคคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1) ในการสกัดวิธีที่ 2 ได้ของผสมประกอบด้วยสาร ฅ และ สาร ซ แยกสาร ซ ออกโดยการไฮโดรไลส์ สารผสมด้วย 10% methanolic KOH ได้สาร ฅ ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยเมทานอล-คลอโรฟอร์ม ได้ผลึกรูปอัฐฐานสีขาว R_f 0.06 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม) ให้ผลบวกกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ ได้สารละลายสีเขียว แสดงว่า สาร ฅ เป็นสารประเภทสเตอรอยด์

อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงแถบการดูดกลืนแสง ซึ่งเป็นลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิลที่ 3410 cm^{-1} และของ glycosidic linkage ที่ $1020-1065 \text{ cm}^{-1}$ ข้อมูลการดูดกลืนของแสง สาร ฅ แสดงดังในตารางที่ 42

ตารางที่ 42 การแปลความหมายอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร ๗

ความถี่ (cm^{-1})	ลักษณะแบนด์	การแปลความหมาย
3410	st	O-H ยืด
2940, 2850	st	C-H ยืดของ CH_2 , CH_3
1620	w	C=C ยืด
1475	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH_2 และอย่างไม่มีสมมาตรของ CH_3
1370	m	C-H งออย่างมีสมมาตรของ CH_3
1065-1020	st	C-O ยืด
800	w	C-H งอนอกระนาบของ trisubstituted vinyl

โปรตอนเอ็นเอมอาร์สเปกตรัม แสดงสัญญาณโปรตอนของสเตอรอยด์ที่ δ 0.68-1.25 (m) และ 5.35 (H-6) ppm สัญญาณโปรตอนของน้ำตาลที่ δ 3.41-3.78 (m) และ 4.40 (d, $J = 7$ Hz, anomeric โปรตอน)

คาร์บอน-13 เอ็นเอมอาร์สเปกตรัม แสดงสัญญาณของคาร์บอน sp^2 ที่ δ 140.31 (C-5) และ 121.29 (C-6) ppm และสัญญาณของคาร์บอน 6 อะตอมที่ต่อกับออกซิเจนของน้ำตาลที่ δ 100.98 (C₁), 73.46 (C₂), 70.21 (C₃), 61.38 (C₄) 56.34 (C₅) และ 55.53 (C₆) ppm สัญญาณที่เหลือซึ่งอยู่ระหว่าง 49.73-11.70 ppm เป็นของสเตอรอยด์

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคที่ m/e 414 การคำนวณสำหรับ $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 414.28; m/e 412 การคำนวณสำหรับ $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 412.28 และ m/e 400 การคำนวณสำหรับ $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$ ให้น้ำหนักโมเลกุล = 400.27 พีคที่แสดงถึงการแตกตัวของสเตอรอยด์ได้แก่ 396 ($414-\text{H}_2\text{O}$), 394 ($412-\text{H}_2\text{O}$), 382 ($414-\text{C}_{10}\text{H}_{21}-\text{H}_2\text{O}$), 253 ($412-\text{C}_{10}\text{H}_{21}-\text{H}_2\text{O}$) และ 213 ($414-\text{C}_{10}\text{H}_{21}-42$) จากการแตกตัวของสาร ๗ แสดงให้เห็นว่าสาร ๗ เป็นไกลโคไซด์ ซึ่งมีสเตอรอยด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 414, 412 และ 400

การไฮโดรไลส์ สาร ๗ ด้วย 10% HCl ในเอทานอล และสกัดด้วยอีเทอร์ ให้ aglycone เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 134-136°C R_f 0.15 (25% คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) ให้สารละลายสีเดียวกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ แสดงว่าเป็นสเตอรอยด์ อินฟราเรดสเปกตรัมเหมือนกับของ authentic β -sitosterol และจากการวิเคราะห์แก๊สโครมาโทกราฟีของ aglycone เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ aglycone ให้ retention time เท่ากับ 19.50 (10%) 20.96 (12%) และ 23.90 (77%) นาที ซึ่งตรงกับ retention time ของ campesterol, stigmasterol และ β -sitosterol ส่วนชิ้นน้ำจากการไฮโดรไลส์ สาร ๗ เมื่อนำมาทำเปเปอร์โครมาโทกราฟีแบบ descending เทียบกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาล พบว่ามีค่า R_f เท่ากับของน้ำตาล glucose ($R_f=0.58$, ตัวทำละลาย : 1-บิวทานอล:เบนซีน:ฟริคีน:น้ำ ในอัตราส่วน 5:1:3:3 โดยปริมาตร) แสดงว่า น้ำตาลที่ติดอยู่กับสเตอรอยด์เป็นน้ำตาล glucose

จากข้อมูลดังกล่าว สรุปได้ว่า สาร ๗ เป็นของผสมของ β -sitosteryl-3-O-glucopyranoside, stigmasteryl-3-O-glucopyranoside และ campesteryl-3-O-glucopyranoside

3.5 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

การทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อรา Pythium ultimum, Helminthosporium teres, Rhizoctonia solani และเชื้อแบคทีเรีย Xanthromonas campestris ของสาร ก, สาร ข, สาร ง และ สาร ช พบว่า จากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตที่แสดงในตารางที่ 24 สารที่น่าสนใจคือ สาร ช ซึ่งแสดงฤทธิ์การต่อต้านเชื้อรา Rhizoctonia solani และเชื้อแบคทีเรีย Xanthromonas campestris คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 66 และ 71 ตามลำดับ มีรายงานฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อราของสารประกอบ 6,7-dimethoxy coumarin ซึ่งเป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับสาร ช คือ 5-hydroxy-6,7-dimethoxy coumarin สารประกอบ 6,7-dimethoxy coumarin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา Phytophthora citrophthora, Verticillium dahliae, Penicillium digitatum, Penicillium italicum, Collectotrichum gloeosporioides, Diplodia natalensis และ Hendersonula toruloidea จากสูตรโครงสร้างที่คล้ายกันของสารทั้งสอง ทำให้คาดว่า สาร ช น่าจะมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราดังกล่าวด้วย ซึ่งถ้าเป็นเช่นนั้นก็จะ เป็นแนวทางในการนำสาร ช มาทำเป็น herbicide, fungicide หรือเป็นส่วนผสมของสารที่ทนต่อแสงอัลตราไวโอเล็ต และความร้อนเช่น ส่วนผสมในสีต่าง ๆ

มีรายงานว่า acetyl aleuritic acid มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง P-388 กวดย % T/C 158 และ 128 กวดยปริมาณจำกัด 1.0 และ 1.4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม¹⁰

* ทำการทดสอบโดย Dr.H.D. Miles ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัย Mississippi State ประเทศสหรัฐอเมริกา