

## 2.1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้

### 2.1.1 Column Chromatography<sup>4</sup>

ใช้ Aluminium oxide S Standardised for column chromatography ของบริษัท Riedel-De Haën Ag., Seelze Hannover เป็น adsorbent ส่วน column ที่ใช้เป็น column แกว ขนาดกว้างสม่ำเสมอ ปลายข้างหนึ่งเรียวยาวเล็ก ทอด้วยสายยางที่มี clip สำหรับเปิดปิด ก่อนบรรจุ alumina ใส่สำลีเล็กน้อยเพื่อ ป้องกัน alumina ไหลออกไปกับ solvent ใส่ solvent ลงไปประมาณ 2 ใน 3 ของ column แกว แล้วค่อย ๆ ใส่ adsorbent ลงไปตามปริมาณที่ต้องการ รอจน ผิว adsorbent ไม่ลดตัวลงอีก จึงเปิด clip ให้ solvent ไหลออก จนผิวหน้า ของ adsorbent เกือบแห้ง ปิด clip แล้วจึงเทสารที่ต้องการแยกลงไป

### 2.1.2 Thin Layer Chromatography<sup>5</sup> (TLC)

ใช้ Aluminium oxide DF for thin layer chromatography ของ บริษัท Riedel-De Haën Ag, Seelze-Hannover เป็น adsorbent การทำ chromatoplates ใช้ Desaga spreader เตรียมโดยใช้ alumina 50 gm ผสม กับน้ำกลั่น 44 mL. เขย่าให้เข้ากัน 1-2 นาที เทใส่ spreader ที่ปรับให้ adsorbent มีความหนา 0.25 mm จะได้ chromatoplate ขนาด 20x10 cm จำนวน 7 แผ่น ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที แล้วจึง activate โดยอบที่อุณหภูมิ 100 - 110° อีก 30 นาที เก็บไว้ใน desiccator เพื่อเตรียมไว้สำหรับทำ TLC

solvent system ที่ใช้มี 50% (V/V) ether-petroleum ether, 2% (W/V) methanol-chloroform

Detecting agent ที่ใช้คือ 2,7-dichlorofluorescein solution (0.2% in ethanol) ซึ่งเมื่อ spray ลงบน chromatoplates ที่ได้ถูก develop แล้ว รอให้แห้งนำไปผ่านแสง UV บริเวณที่มีสารจะเรืองแสง ทำให้เห็นเป็น spot ต่าง ๆ

### 2.1.3 Infra-red spectra<sup>8,11</sup>

เครื่องมือที่ใช้คือ Microspec ของ Beckmann Infrared Spectrophotometer Model 1325 Cat. no. 132501 Y และ Unicam SP 200 G ของบริษัท Unicam Instruments Limited, Cambridge สารที่จะหา IR-absorption ต้องนำไปทำเป็น KBr pellets ส่วนการตรวจลักษณะ Absorption peaks ของสารนั้น ใช้วิธีเปรียบเทียบกับ standard characteristic peaks ที่มีอยู่ใน Literature

### 2.1.4 การหาจุดหลอมเหลว (Melting point)

ใช้เครื่องมือของ Fisher-Johns melting point apparatus

### 2.1.5 การหา specific rotation [ $\alpha$ ]

ใช้เครื่องมือ polarimeter ของบริษัท Bellingham Stanley Limited, London Model D<sub>4</sub> serial no. 632494 นำสารที่ต้องการจะหา [ $\alpha$ ] ไปละลายใน chloroform แล้วบรรจุในหลอดยาว 2 dm

### 2.1.6 UV-spectra

เครื่องมือที่ใช้คือ Model 124 double beam grating spectrophotometer และ recorder model 56 ของบริษัท Perkin-Elmer

### 2.1.7 การวิเคราะห์หาธาตุต่าง ๆ

ส่งไปวิเคราะห์ที่ Australian Microanalytical Service ประเทศ  
ออสเตรเลีย

### 2.1.8 Alkaloid reagents

Phosphotungstic acid ใช้ phosphotungstic acid 5 gm ละลาย  
ในน้ำ 100 ml

Picric acid ใช้สารละลายอิ่มตัวของ picric acid ในน้ำ

Wagner's reagent ใช้ iodine 1.25 gm และ potassium iodide  
2.75 gm ละลายในน้ำ 5 ml จนละลายหมด แล้วทำให้เป็นสารละลาย  
100 ml.

Mayer's reagent ใช้ Mercuric chloride 1 gm ละลายในน้ำ  
100 ml แล้วค่อย ๆ เติมผลึก potassium iodide ที่ละลายจน  
ตะกอนที่เกิดขึ้นครั้งแรกละลายหมดพอดี

### 2.1.9. Solvent

Solvent ที่ใช้ในการค้นคว้าได้แก่ petroleum ether (b.p. 65 - 70°)  
benzene, chloroform, ether, alcohol, acetone etc. ถ้าหากไม่ใช่ชนิด  
reagent grade ให้นำเอาไปกลั่นก่อนเอาไปใช้ ส่วน reagent ที่ใช้ทดสอบนั้น  
เป็นชนิด analar ทั้งสิ้น

## 2.2 การสกัด (Extraction)

การสกัดเอาสารออกจากใบประยงค์ ได้ดำเนินการดังต่อไปนี้ นำเอาใบประยงค์ สดตากแดดให้แห้ง บดละเอียด แล้วนำไปสกัดโดยวิธีแช่สาร ในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้อง แช่ทิ้งไว้หลาย ๆ วัน และเขย่าขวดที่แช่สารเป็นบางครั้ง ตอนแรกแช่ด้วย petroleum ether 4 ครั้ง ๆ ละ 7 วัน เพื่อเอาสารที่ละลายในตัวทำละลายชนิดนี้ออกไปให้หมดก่อน แล้วนำเอาไปแช่ต่อด้วย ether 3 ครั้ง แช่ไว้นานครั้งละ 7 วัน กรองเอาสารละลายของ ether ไปกลั่นจนเหลือปริมาตร 200 - 300 ml และทำให้แห้งต่อไปโดยถ่ายจากขวดกลั่นใส่ในบีกเกอร์ตั้งอ่างไอน้ำ water bath ผลที่สุดได้สารมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวแก่ ประมาณ 5.1% โดยน้ำหนักจากใบประยงค์แห้ง 1.8 kg

การสกัดเอาสารจากใบประยงค์ได้กระทำหลายครั้ง ดังตารางที่ 1



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 การสกัดเอาสารจากใบประยงค์

น้ำหนักใบ ประยงค์สด ( kg )	น้ำหนักใบ ประยงค์แห้ง ( kg )	petroleum ether		ether		
		ปริมาณ solvent ( litre )	น้ำหนักของสารที่ สกัดออกมา ( gm )	ปริมาณ solvent ( litre )	น้ำหนักของสารที่ สกัดออกมา ( gm )	เปอร์เซ็นต์
6.8	1.8	36	105	24	92	5.1
5.0	1.2	18	65	12	65	5.4
6.5	1.7	36	92	30	80	4.7
7.2	2.0	32	98	30	84	4.2
9.4	3.2	48	120	36	128	4.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 2.3 การแยกสาร (Separation)

นำเอาสารที่ถูกสกัดออกมาด้วย ether ไปแยกออกเป็น fraction ต่าง ๆ ด้วยวิธี column chromatography ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ใช้สารที่สกัดด้วย ether หนัก 35 gm. ละลายใน ether 75 ml. ยานสารละลายนี้ลงใน column chromatography ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 cm. ยาว 56 cm ซึ่งมี standard aluminium oxide เป็น adsorbent จำนวน 650 gm แล้ว elute column ด้วยสารละลายผสมของ ether-petroleum ether ชนิด 1:3, 1:1 และ 3:1 โดยปริมาตร/ปริมาตร ตามลำดับ เก็บ eluate ครั้งละ 1000 ml. นำสารละลายที่ได้แต่ละ fraction ไปกลั่นเอาตัวทำละลายออกจนเหลือสารละลายในขวดกลั่นประมาณ 25 - 40 ml ถ่ายใส่ flask ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก แล้วรวมสารแต่ละ fraction เข้าเป็นพวก ๆ โดยใช้ TLC ผลที่สุดแยกสารได้ดังตารางที่ 2

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 การแยกสารจาก crude extract

Eluent	จำนวน fraction fraction ละ 1000 ml	ลักษณะของสารและจุดหลอมเหลว	น้ำหนัก (gm)
ether-petroleum ether 1 : 3	1 - 2 3 - 5	Amorphous สีขาว m.p. 83 - 5° น้ำมันสีเหลือง	0.10
ether-petroleum ether 1 : 1	6 - 7 8 - 9	ผลึกรูปเข็มเป็นแท่ง ๆ m.p. 87 - 9° น้ำมันสีเหลือง	0.054
	10 - 18 19 - 24	ผลึกรูปเข็ม m.p. 200 - 210° น้ำมันสีเหลือง	0.165
ether-petroleum ether 3 : 1	25 26 - 32 33 - 42	น้ำมันสีเหลือง ผลึกรูปเข็ม m.p. 160 - 6° น้ำมันสีเหลือง	0.240

หมายเหตุ จากตารางที่แสดง ปริมาณของสารที่ได้ และจำนวน fraction ที่มีสารออกมา ไม่ได้เป็นไปตามที่กล่าวในทุก column แต่เปลี่ยนแปลงไปตามขนาดของ column ที่ใช้ และปริมาณของสาร m.p. 200 - 210° กับสาร m.p. 160 - 6° และใช้วิธี TLC ติดตามสารใน fraction ต่าง ๆ และรวมเข้าเป็นพวกเดียวกันได้



## 2.4 การทำสารใหม่บริสุทธิ์ และลักษณะทั่วไปของสาร

### 2.4.1 Odoratine

จากสาร m.p. 200 - 110° น้ก 165 mg ซึ่งรวบรวมได้จากการ elute column ด้วย 1:1 ether-petroleum ether ใน fraction ที่ 10 ถึง 18 สารนี้เป็นผลึกรูปเข็มระรอน เมื่อสารละลายในขวดกลั่นเหลือประมาณ 30 - 50 ml ล้างน้ำมันที่ปนออกมาด้วย petroleum ether นำไปตกผลึกหลาย ๆ ครั้งด้วย benzene ได้ผลึกรูปเข็ม m.p. 218 - 9° น้ก 140 mg (0.4% โดยน้ำหนักจาก crude extract หรือ 0.02% จากน้ำหนักของใบประยงค์แห้ง) และเรียกชื่อสารนี้ว่า odoratine พบว่า

$$[\alpha]_D^{20} + 72.6^\circ \quad (c : 0.003, \text{chloroform})$$

$$R_f \quad 0.73 \quad (2\% \text{ methanol in chloroform})$$

Mol. wt. = 300 (Mass spectrum ของสารให้  $M^+$  ที่ 57, 85, 103, 131, 169, 199, 215, 300)

Analysis : Found C = 72.16% H = 8.14% N = 9.21%

Calculation from  $C_{18}H_{24}O_2N_2$  : C = 71.96% H = 8.05% N = 9.32%

IR-spectrum ให้  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  ตามรูปที่ 1 หน้า 12  
ตารางที่ 3 หน้า 13

UV-spectrum ให้  $\lambda_{\text{max}}$  283 nm (ethanol)  $\log \epsilon$  4.20  
ตามรูปที่ 2 หน้า 14

NMR-spectrum (ใน  $CDCl_3$ ) ตามรูปที่ 3 หน้า 15

ให้ peaks ของ protons ( $\delta$ ) ต่างๆดังต่อไปนี้

0.78 (3H, t,  $CH_3$ ) และ 1.40 (2H, q,  $CH_2$ ) สำหรับ  $CH_3CH_2$ - group;

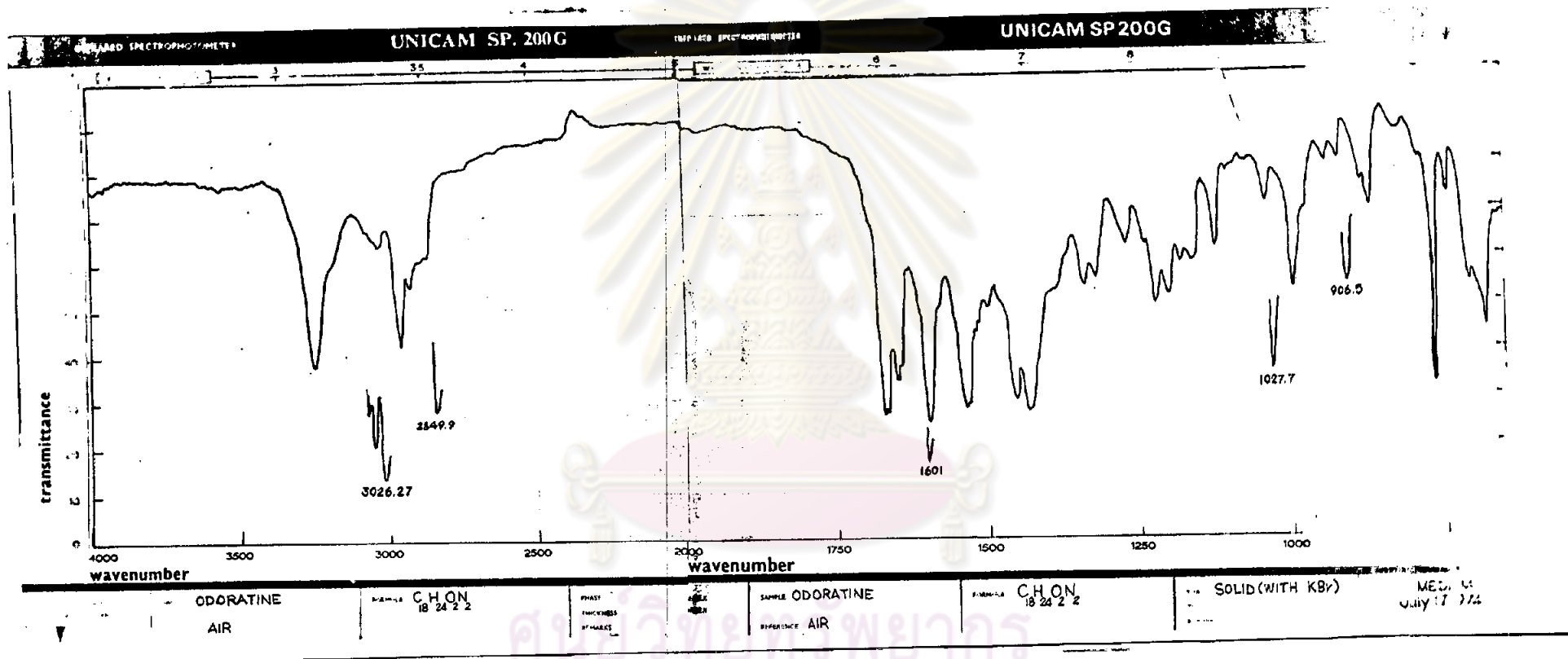
1.08 (3H, d,  $CH_3$ ) สำหรับ  $CH_3$ - group; , 2.05 (7H, m, 1H ที่ butyl



และ 6H ที่ pyrrolidine nucleus ); 3.06 ( 1H, m อยู่ที่ carbon ระหว่าง N-atoms ); 6.18 ( 1H, broad ( 6.0-6.25 ), NH ); 6.89 และ 7.65 ( 2H, d ของ carbon-carbon double bond ที่เป็น trans ) และ 7.29 ( 5H, m ของ aromatic nucleus )



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



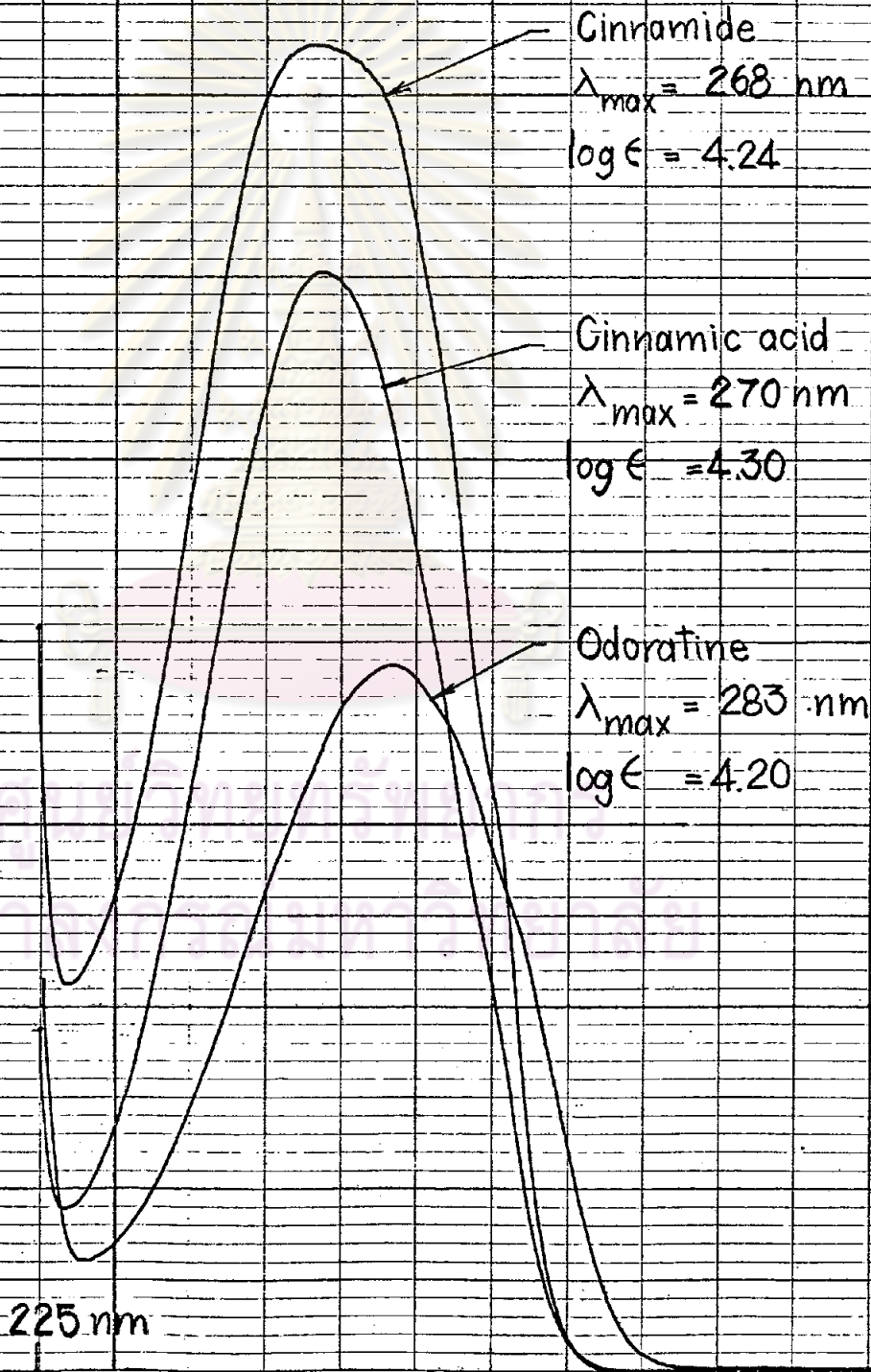
รูปที่ 1 IR-spectrum of Odoratine

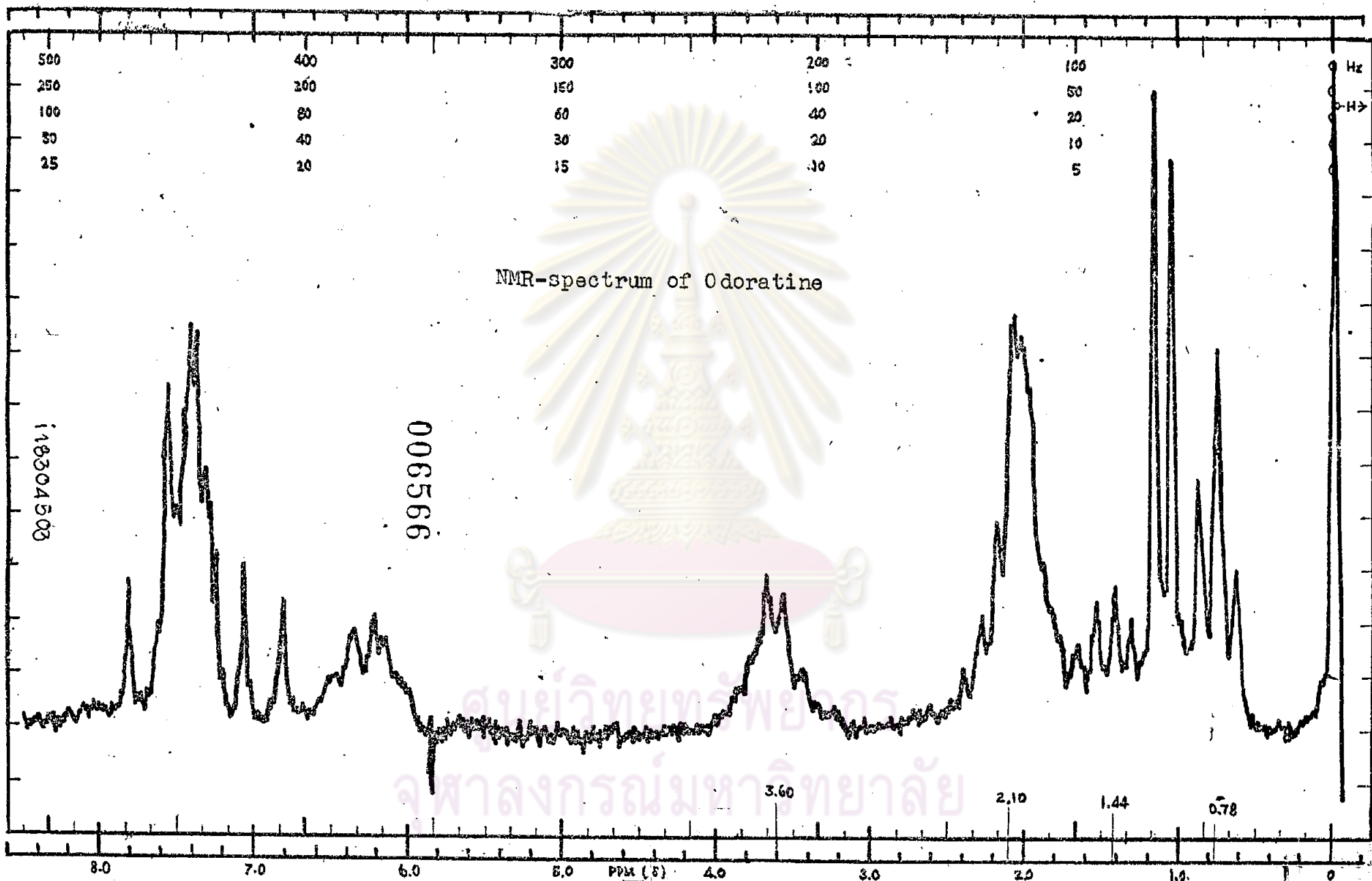
ตารางที่ 3

IR-absorption peaks ของ odoratine, m.p. 218 - 9°

Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Band type	Assignments
3245	sharp	-NH stretching vibration
3030	weak	-CH stretching vibration of C = 6
2980	sharp	-CH <sub>2</sub> & -CH <sub>3</sub> stretching vibration
1670	} sharp	2°-amide band I
1535		2°-amide band II
1320		2°-amide band III
1650	sharp	3°-amide
1600	} sharp	monosubstituted benzene
1535		
1450	sharp	C-CH <sub>3</sub> bending vibration (asymmetric)
1430	sharp	-CH <sub>2</sub> stretching vibration
1405	broad	-CH <sub>2</sub> adjacent with N
1335	weak	C-CH <sub>3</sub> bending vibration (symmetric)
1270	sharp	C-N stretching vibration
1200	} weak	C=C stretching vibration
1120		
1040		
995	sharp	C-H out of plane bending vibration of trans
870	sharp	C-H out of plane bending vibration of R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> C = CH <sub>2</sub>
765	} sharp	monosubstituted benzene
680		

UV-spectrum of Odoratine, Cinnamic acid and Cinnamide





SWEEP OFFSET (Hz): -----  
 SPECTRUM AMPLITUDE: -----  
 INTEGRAL AMPLITUDE: -----  
 SPINNING RATE (RPS): -----

MANUAL  SWEEP TIME (SEC): 30 250  
 SWEEP WIDTH (Hz): 25 10 5 20 4 500  
 FILTER: 1 2 3 4 5 6 7 8 ( 2 )  
 RF POWER LEVEL: ----- ( 35 )

AUTO  SAMPLE: -----  
 SOLVENT: CDCl<sub>3</sub>

REMARKS: -----

### 2.4.2 Odoratinol

จากสาร m.p. 160-6° หนัก 240 mg รวบรวมได้จากการ elute column ด้วย 3:1 ether-petroleum ether ใน fraction ที่ 26 ถึง 32 ตกผลึกเป็นรูปเข็มกรอง ล้างน้ำมันที่ปนมาด้วย petroleum ether นำไปตกผลึกหลาย ๆ ครั้ง ด้วยสารละลายผสมของ petroleum ether-benzene ในอัตราส่วน 1:1 ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว m.p. 166-8° หนัก 210 mg (0.6% โดยน้ำหนักจาก crude extract หรือ 0.03% จากน้ำหนักของใบประยงค์แห้ง) เรียกชื่อสารนี้ว่า odoratinol พบว่า

$$[\alpha]_D^{20} + 40.5^\circ \quad (c : 0.01, \text{chloroform})$$

$$R_f \quad 0.43 \quad (2\% \text{ methanol in chloroform})$$

$$\text{Mol. wt.} = 316 \quad (\text{Mass spectrum})$$

$$\text{Analysis : Found } C = 68.36\%, \quad H = 7.83\% \quad N = 9.04\%$$

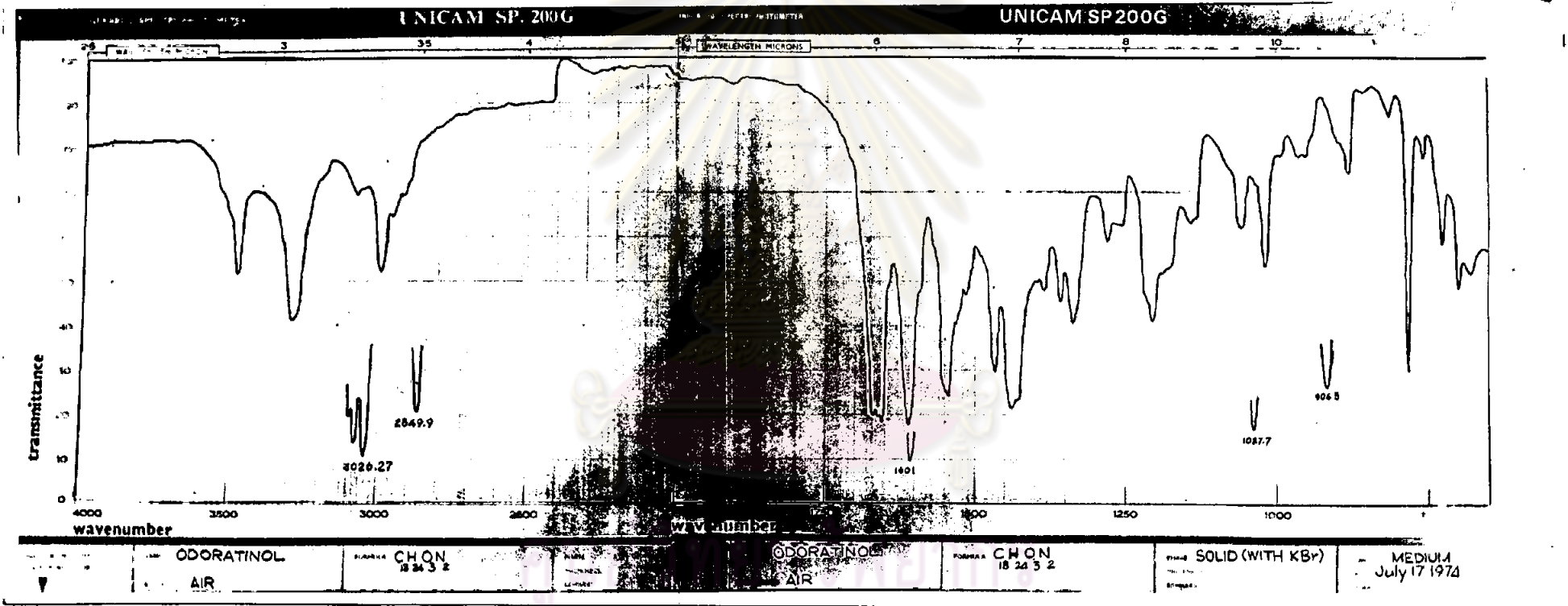
$$\text{Calculation from } C_{18}H_{24}O_3N_2 : C = 68.30\% \quad H = 7.64\% \quad N = 8.85\%$$

IR-spectrum ให้  $\checkmark$   $\begin{matrix} \text{KBr} \\ \text{max} \end{matrix}$  ตามรูปที่ 4 หน้า 17  
การวางที่ 4. หน้า 18

UV-spectrum ให้  $\lambda_{\text{max}}$  283 nm (ethanol)  $\log \epsilon$  4.23.  
ตามรูปที่ 5 หน้า 19

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



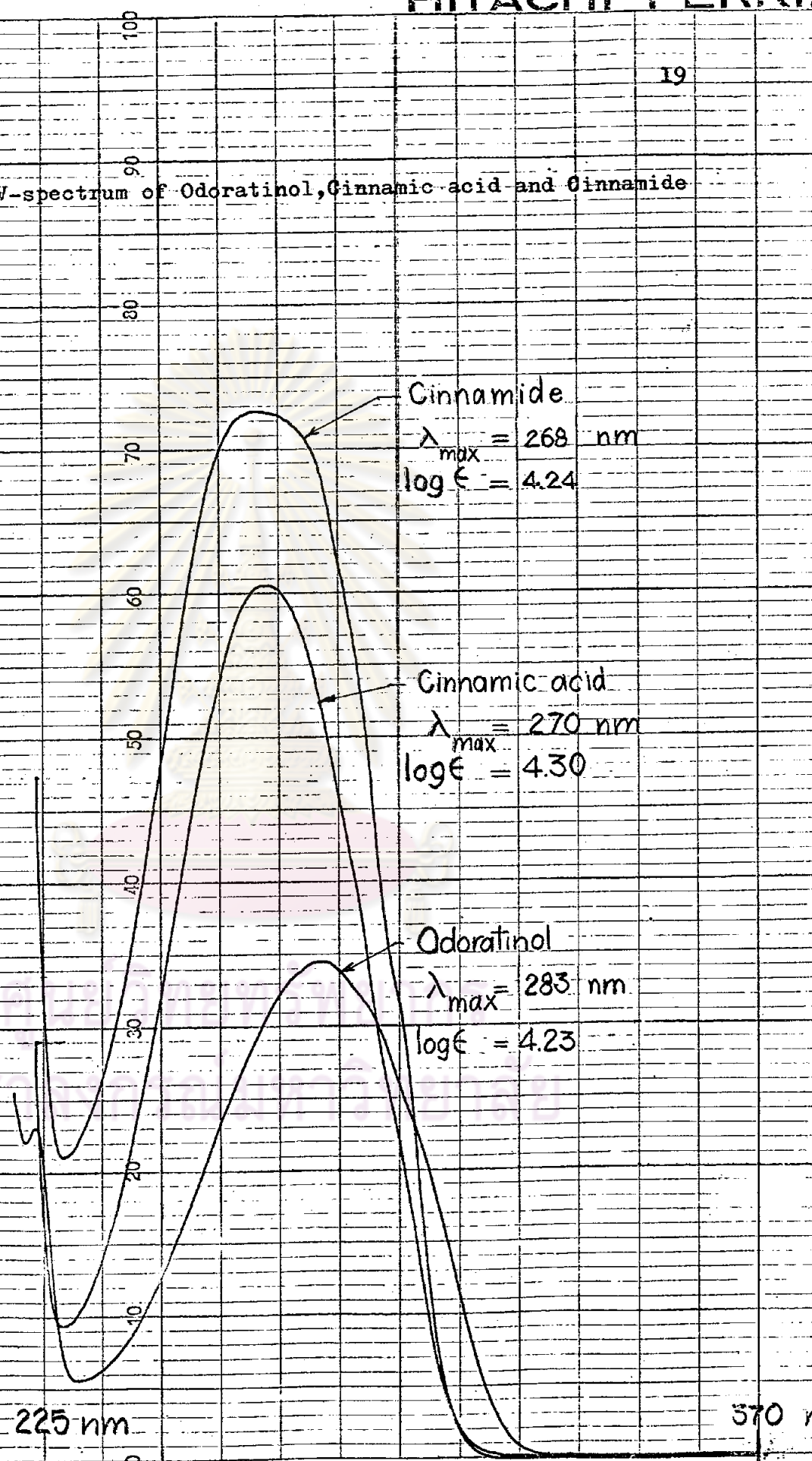


รูปที่ 4 IR-spectrum of Odoratinal

IR-absorption peaks of odoratinol, m.p. 166 - 8°

Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Band type	Assignments	
3480	sharp	O-H stretching vibration	
3295	sharp	-NH stretching vibration	
2995	sharp	CH <sub>2</sub> & CH <sub>3</sub> stretching vibration	
1655	}	2°-amide band I	
1542		2°-amide band II	
1340		2°-amide band III	
1650	sharp	3°-amide	
1610	}	monosubstituted benzene	
1542			
1465	sharp	C-CH <sub>3</sub> bending vibration (asymmetric)	
1440	sharp	-CH <sub>2</sub> stretching vibration	
1400	weak	-CH <sub>2</sub> adjacent with N	
1340	sharp	C-CH <sub>3</sub> bending vibration (symmetric)	
1280	sharp	C-N stretching vibration	
1209	sharp	}	
1140	weak		C-C stretching vibration
1060	sharp		
880	sharp	C-H out of plane bending of R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> C = CH <sub>2</sub>	
780	}	monosubstituted benzene	
700			

UV-spectrum of Odoratinol, Cinnamic acid and Cinnamide



## 2.5 การละลายของสาร odoratine และ Odoratinol

	<u>odoratine</u>	<u>odoratinol</u>
chloroform	ละลายดี	ละลายดี
acetone	ละลายดี	ละลายดี
ethanol	ละลายดี	ละลายดี
methanol	ละลายดี	ละลายดี
ether	ละลายไม่ดี	ละลายไม่ดี
petroleum ether	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย
Conc. $H_2SO_4$	ละลายทันที	ละลายทันที
Conc. HCl	ละลายทันที	ละลายทันที
6N HCl	ละลายช้า ๆ	ละลายช้า ๆ
$NaHCO_3$	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย
$H_2O$	ไม่ละลาย	ไม่ละลาย

## 2.6 การทดสอบ Nitrogeous function

### 2.6.1 Alkaloid reagents

	<u>odoratine</u>	<u>odoratinol</u>
phosphotungstic acid	positive	positive
picric acid	positive	positive
Mayer's reagent	positive	positive
Wagner's reagent	positive	positive

### 2.6.2 Primary aromatic amine

สารละลาย hydrochloride ของ odoratine กับ  $\text{NaNO}_2 + \text{HCl}$  ที่  $0^\circ$  coupling กับ  $\beta$ -naphthol ได้ตะกอนสีเหลือง เช่นเดียวกับกับ blank test แสดงว่า odoratine ไม่มี  $-\text{NH}_2$  group  
 ทำนองเดียวกันเมื่อทดสอบกับ odoratinol ก็ไม่เกิดปฏิกิริยา coupling ด้วย

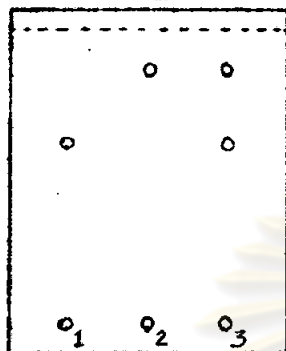
## 2.7 การเตรียม derivatives และปฏิกิริยา

### 2.7.1 LAH - reduction of Odoratine

ทำตามวิธีของ Nystrom & Brown ใช้  $\text{LiAlH}_4$  50 mg ใส่ในขวดกลั่นขนาด 250 ml ติดกับ reflux condenser ตอนบนของ condenser ติดกับ anhydrous  $\text{CaCl}_2$  tube เติม anhydrous ether 25 ml ลงในขวดกลั่น คนสารละลายด้วย magnetic stirrer ละลายสาร odoratine จำนวน 94 mg ใน dry ether 50 ml ใส่ใน separatory funnel แล้วหยดลงในขวดกลั่นอย่างช้า ๆ เมื่อหยดสารละลายหมดแล้ว คน reaction mixture ต่อไปอีก 1 ชั่วโมงหลังจากนั้น decompose reaction product ด้วย dil.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ประมาณ 150 ml จนกระทั่งสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น แยกเอาชั้น ether ออก ส่วนชั้นของน้ำเอาไป extract ด้วย ether เอา ether extract ที่ได้รวมกับ ether ที่แยกออกมาครั้งแรก แล้วนำ ether solution ไปล้างด้วยสารละลาย  $\text{NaHCO}_3$  และน้ำ ตามลำดับ นำสารละลายที่ล้างแล้วนี้ ทำให้แห้ง ด้วย anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  กรองระเหยเอา ether ออก ได้น้ำมันสีเหลือง เปลี่ยน solvent ที่จะตกผลึกหลายชนิด เช่น petroleum ether, acetone, ethanol, benzene, chloroform ก็ได้ product เป็นน้ำมันเช่นเดิม ไม่สามารถจะตกผลึกได้



เมื่อนำสารที่ไคไปทำ Thin layer chromatography เทียบกับสาร odoratine ปรากฏว่าสารที่ไคไม่เหมือนสารเดิม



1. เป็นสาร odoratine ไค  $R_f$ -value 0.6
  2. เป็นสารที่เตรียมไค  $R_f$ -value 0.84
  3. เป็น mixture ของ 1 + 2
- ใช้ 2% methanol in chloroform เป็น solvent

### 2.7.2 $H_2$ -reduction of Odoratine and Odoratinol

1) Reduction of Odoratine ไคใช้ conditions ต่าง ๆ สำหรับ reduction ดังต่อไปนี้

a) odoratine น้ก 95 mg ใส่ Pd/C ชนิด 10% ประมาณ 20 mg ลงไปเป็น catalyst แล้วละลายใน absolute ethanol 25 ml ทำการ hydrogenate ภายใต้ความดันบรรยากาศ ที่อุณหภูมิห้อง คนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งปริมาตรของก๊าซ  $H_2$  ที่ใช้ไปคงที่ คนไปอีก 1 ชั่วโมง กรองเอา catalyst ออก ระเหยให้แห้งโดยการลดความดันใน desiccator แล้วตกผลึกสารที่ไคด้วยสารละลายผสมของ ether-petroleum ether หลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว m.p. 110 - 2° และเมื่อนำไปหาธาตุต่าง ๆ โดยวิธี Lassaigne's test พบธาตุ N เรียกชื่อสารที่ไคนี้ว่า dihydroodoratine พบว่า

Mol. wt. = 302 (Mass spectrum)

Analysis : Found C = 71.50% H = 8.91% N = 9.26%

Calculation from  $C_{18}H_{26}O_2N_2$ : C = 71.48% H = 8.66% N = 9.26%

IR-spectrum ไค  $\checkmark$  KBr ตามตารางที่ 5 หน้า 25

รูปที่ 6 หน้า 24

UV-spectrum ของ dihydroodoratine ไม่แสดง maximum absorption peak.

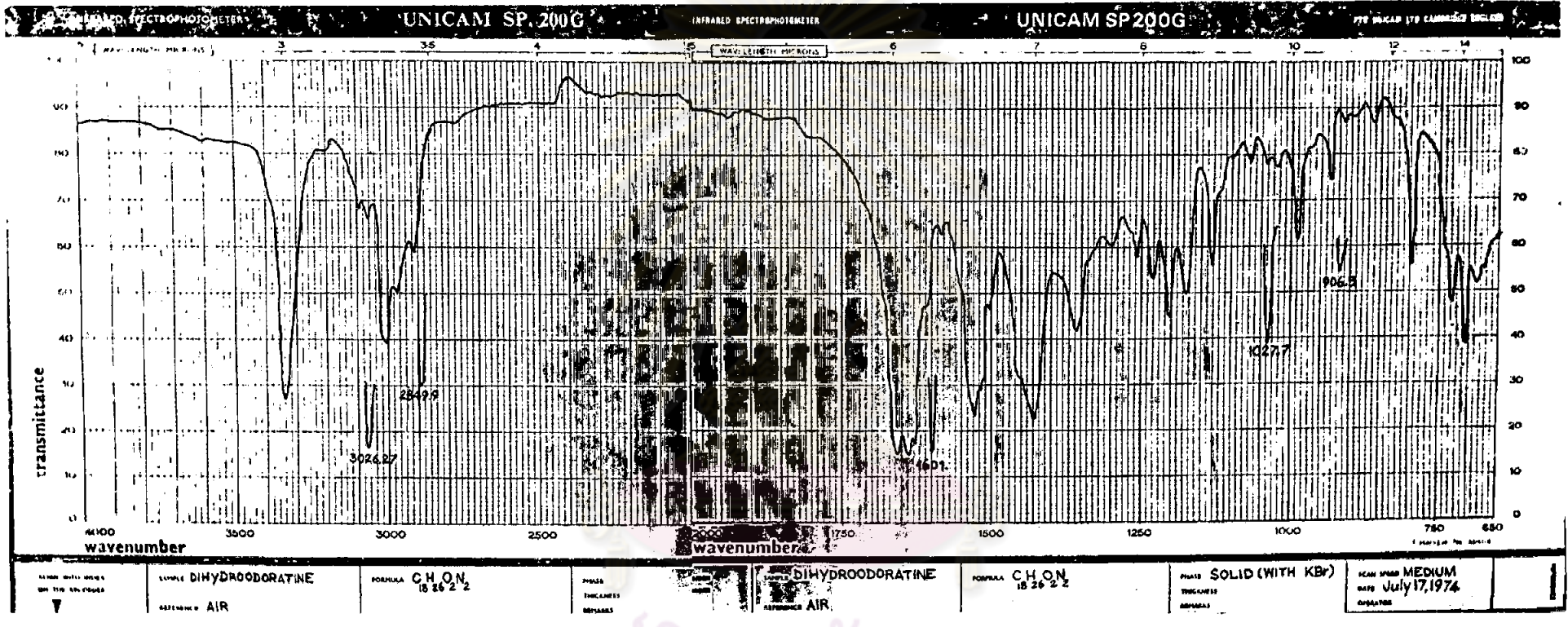


๒) odoratine หนัก 110 mg เติม  $PtO_2$  20 mg แล้วละลาย  
 ใน absolute ethanol 25 ml ผ่านก๊าซ  $H_2$  ภายใต้ความดัน 50 ปอนด์/ตร.นิ้ว  
 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรอง ทำให้แห้งเหมือนที่กล่าวมาแล้ว ได้ผลิตภัณฑ์ m.p.  $110-2^\circ$   
 ซึ่งเมื่อนำมา mixed melting point ทำ TLC และ IR-spectrum ปรากฏ  
 ว่า เป็นสารตัวเดียวกับ dihydroodoratine ทุกประการ

2) Odoratinol ได้ทำการ reduction ดังต่อไปนี้

สาร odoratinol 55 mg ใส่ Pd/C หนัก 10% ประมาณ 20 mg ลง  
 ไปเป็น catalyst แล้วละลายใน absolute ethanol 20 ml แล้วทำการ  
 hydrogenate ภายใต้ความดันบรรยากาศ เช่นเดียวกับสาร odoratine ที่กล่าวมา  
 แล้ว หลังจากระเหยเอา ethanol ออกไปจนหมด ได้ product ออกมาเป็นน้ำมัน  
 ไม่สามารถจะตกผลึกได้ แม้ว่าจะเปลี่ยนตัวทำละลายอื่น ๆ แล้วก็ตาม

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยาศาสตร์การ  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
 รูปที่ 6 IR-spectrum of Dihydroodoratine

ตารางที่ 5

IR-absorption peaks of dihydroodortine, m.p. 110 ± 2°

Frequency (cm <sup>-1</sup> )	band type	Assignments
3340	sharp	-NH stretching vibration
3010	sharp	CH <sub>2</sub> & CH <sub>3</sub> stretching vibration
1655	} sharp	2°-amide band I
1530		2°-amide band II
1300		2°-amide band III
1645	sharp	3°-amide
1585	broad	} monosubstituted benzene
1530	sharp	
1450	weak	C-CH <sub>3</sub> bending vibration (asymmetric)
1430	sharp	-CH <sub>2</sub> stretching vibration
1360	sharp	C-CH <sub>3</sub> bending vibration (symmetric)
1260	sharp	C-N stretching vibration
1200	} sharp	C-C stretching vibration
1175		
1130		
990	sharp	C-H out of plane bending vibration of trans
779	} sharp	monosubstituted benzene
705		

### 2.7.3 Hydrochloride derivatives of Odoratine and Odoratinol

ละลาย odoratine 50 mg ใน chloroform 10 ml แล้วผ่านก๊าซ HCl ลงไปมากเกินพอ ได้สารละลายใส ตั้งทิ้งไว้ค้างคืนไม่มีผลึกเกิดขึ้น เอาไประเหยให้แห้งโดยการลดความดันใน desiccator ได้ผลึกรูปเข็มปนกับน้ำมัน พยายามล้างน้ำมันเพื่อแยกเอาผลึกรูปเข็มออก แต่ไม่สามารถจะหาผลึกรูปเข็มให้บริสุทธิ์ได้ จะมีคราบน้ำมันเกาะติดอยู่เสมอ

ละลาย odoratinol 50 mg ด้วย 6N HCl 5 - 7 ml อุณหภูมิร้อนบน water bath ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน นำเอาไปทำให้แห้งโดยการลดความดันใน desiccator เมื่อสารละลายเกือบแห้ง ได้ผลึกรูปเข็มปนกับน้ำมัน เช่นเดียวกันกับ odoratine และไม่สามารถตกผลึกให้บริสุทธิ์ได้

### 2.7.4 Acetylation of Odoratine

ผสม odoratine 100 mg , anhydrous pyridine 2 ml และ acetic anhydride 2 ml ลงในขวดก้นกลมขนาด 25 ml ปิดด้วย reflux condenser แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ปฏิกิริยาดำเนินไปที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เสร็จละลายที่ได้ลงในน้ำเย็นจัด คนให้ทั่ว ปรากฏว่าไม่มีตะกอนเกิดขึ้น แม้ว่าเอาสารละลายไปแช่เย็นจัด เอาสารละลายที่ได้ไประเหยให้แห้งโดยการลดความดัน จะได้น้ำมันสีเหลืองเกิดขึ้น ไม่สามารถจะหาให้บริสุทธิ์ได้

### 2.7.5 Picrate of Odoratine and Odoratinol

ละลาย odoratine 30 mg ใน ethanol 5 ml แล้วเติมสารละลายอิ่มตัวของ picric acid จะได้ตะกอนสีเหลือง เอาตะกอนที่ได้ละลายในน้ำร้อนกรอง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก แต่ไม่มีผลึกเกิดขึ้น ทำให้แห้ง แล้วตกผลึกใน ethanol ได้

ผลึกรูปเข็ม m.p. 118 - 120° ซึ่งเหมือนกับของ picric acid (m.p. 120 - 2°)  
แสดงว่าเตรียม picrate ของ odoratine ไม่ได้

ทำนองเดียวกัน odoratinol ก็เตรียม picrate ไม่ได้เช่นกัน

### 2.7.6 เตรียม N-oxide ของ Odoratine

ใช้ odoratine 100 mg ละลายใน gla. CH<sub>3</sub>COOH 6 ml เติม  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 ml reflux ที่อุณหภูมิ 70 - 5° เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลับให้เหลือ  
3 ml เติมน้ำ 0.5 ml กลับให้เหลือ 2 ml แล้ว neutralize ด้วย Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
plux แล้วสกัดด้วย chloroform กลับเอา chloroform ออก นำเอา residue  
ตกผลึกใน nitrobenzene สารไม่ตกผลึก แต่เป็นน้ำมันติดเป็นคราบที่ข้างขวด ใส่  
benzene ใสสารละลายใส่ ตั้งทิ้งไว้ ไม่ตกผลึกอีก ทำให้แห้ง แล้วละลายสารที่ได้ใน  
ether ค่อย ๆ หยด petroleum ether ลงไป ใสสารละลายขุ่น ตั้งทิ้งไว้ได้  
ของแข็งสีขาวปนกับน้ำมัน พยายามล้างน้ำมันที่ปนอยู่ด้วย petroleum ether หรือ  
ether แต่ไม่ไ้ผล พอใส่ benzene ลงไปใหม่ สารนั้นละลายได้เหมือนเดิม และ  
ไม่สามารถตกผลึกแยกของแข็งนั้นออกมาได้

### 2.7.7 เตรียม Glycol ของ Odoratine

ใช้ odoratine 100 mg ละลายใน absolute ethanol 10 ml  
ค่อย ๆ หยดสารละลาย KMnO<sub>4</sub> 1% ลงไป ปรากฏว่า odoratine พอกสี KMnO<sub>4</sub>  
(เมื่อเทียบกับ blank) ใช้สารละลาย KMnO<sub>4</sub> ไปประมาณ 6 ml สารละลาย  
ที่ได้ นำไปสกัดติดต่อกัน (Continuous extraction) ด้วย ether ประมาณ  
2 ชั่วโมง กลับเอา ether ออกให้เหลือประมาณ 25 ml ตั้งทิ้งไว้ให้จืด ใสตะกอน  
สีขาว m.p. 165 - 185° ตกผลึกใหม่อีกครั้งด้วยสารละลายผสมของ ether-petroleum  
ether ใสสาร m.p. 175 - 185° ซึ่งเมื่อนำไปทำ IR และ TLC เทียบกับสาร

odoratine ปรากฏว่ามีลักษณะเหมือนสารเคมิตุกประการ

### 2.7.8 Sublimation ของสาร Odoratine และ Odoratinol

ใช้ odoratine 100 mg. ทำ sublimation ที่ความดันประมาณ 2-4 mm สารเริ่มหลอมที่อุณหภูมิ 180 - 210° ใต้สารที่ระเหิดออกมาประมาณ 25 mg ทา m.p. ใต้ 190 - 200° สารที่เหลือในหลอดทดลองใน acetone ทา m.p. ใต้ 210 - 4° ใต้ประมาณ 34 mg เมื่อนำสารที่เกิดขึ้นทั้งสองตัวไปทำ TLC เทียบกับ odoratine ปรากฏว่าได้ R<sub>f</sub> ใกล้เคียงกันมากทั้งสามสาร

ในทำนองเดียวกัน odoratinol 100 mg ทำ sublimation เหมือน odoratine สารเริ่มหลอมที่ 120 - 140° สารที่ระเหิดออกมามีลักษณะแข็งและเหนียว ใต้ประมาณ 10 mg ทา m.p. ไม้ไ้ สารส่วนมากไม่ระเหิดออกมา ทดลองสกัดสารที่ไม่ระเหิดนั้นด้วย ether-acetone ใต้สารหนัก 35 mg , m.p. 148 -154° เมื่อทำ TLC เทียบกับสารตั้งต้น ปรากฏว่าเป็นสารตัวเดียวกัน

### 2.7.9 Alkali Hydrolysis of Odoratine

การเตรียมสารละลาย KOH KOH 5 gm ละลายในน้ำ 5 ml แล้วเติม methanol 25 ml

ครั้งที่ I สาร odoratine 100 mg ละลายใน absolute methanol 5 ml แล้วเติมสารละลาย KOH ประมาณ 10 ml reflux ใน water bath 1 ชั่วโมง แล้วสกัดติดต่อกัน (Continuous extraction) ด้วย ether กลั่นเอา ether ออก ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสีขาว ทดลองสกัดด้วย ether-methanol จะได้ผลึก รูปเข็ม m.p. 175 - 195° ทดลองซ้ำอีกครั้ง จะได้สาร m.p. 185 - 195° ส่วนชั้น aqueous solution นำไปทำให้เป็นกรดด้วย 6N. HCl แล้วสกัดติดต่อกัน (Continuous extraction) ด้วย ether กลั่นเอา ether



ออก ค้างไว้ให้ตกผลึก ได้สาร m.p. 170 -190° ตกผลึกใหม่อีกครั้ง ได้ผลึกรูป  
เข็ม m.p. 185 -195°

สารที่แยกออกมาได้ทั้งสองครั้งนี้ปรากฏว่าเป็น odoratine โดยการเปรียบเทียบ IR และ R<sub>f</sub>

ครั้งที่ II สาร odoratine 120 mg ละลายใน absolute methanol 5 ml  
เติมสารละลาย KOH ประมาณ 12 ml reflux บน water bath 6 ชั่วโมง ทำ  
ให้แห้งโดยการลดความดัน เติมน้ำลงไป 25 ml กรองเอาตะกอนสีเหลืองที่ไม่ละลายน้ำ  
ออก ตกผลึกใน chloroform-ether ได้ตะกอนสีขาวปนกับสารละลายสีเหลือง กรอง  
เอาตะกอนที่ได้มาตกผลึกใน methanol-ether ได้ผลึกรูปเข็ม m.p. 190 - 207°  
จาก IR-spectrum และ R<sub>f</sub> แสดงว่าเป็นสารเคม

ส่วนชั้น aqueous solution เอาไปทำตามวิธีครั้งที่ I ไม่มีสารแยกออก  
มาเลย

ครั้งที่ III สาร odoratine 120 mg ละลายใน absolute methanol 5 ml  
เติมสารละลาย KOH ประมาณ 12 ml ใช้เวลา reflux นานถึง 12 ชั่วโมง  
แล้วทำตามวิธีครั้งที่ I ได้สารแยกออกมาจากการสกัดครั้งแรก และครั้งหลัง มี m.p.  
200 - 8° เท่ากัน และปรากฏว่าเป็นสารตั้งคั้นนั่นเอง

การทำ hydrolysis สารในค่าง โดยใช้เวลาแตกต่างกันไป แต่ก็ไม่เกิด  
hydrolysis แสดงว่า odoratine ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยค่างได้ยาก

#### 2.7.10 Alkali Hydrolysis of Dihydroodoratine

สาร dihydroodoratine 32 mg ละลายใน absolute methanol 3 ml.  
เติมสารละลาย KOH 30% ประมาณ 2 - 3 ml reflux บน water bath 2 - 3  
ชั่วโมง แล้วแยกเอาสารออกตามวิธีครั้งที่ I ที่ hydrolysis of odoratine ปรากฏ  
ว่า dihydroodoratine ไม่ถูก hydrolysis

### 2.7.11 Oxidation of Odoratin

สาร odoratin 70 mg เติม  $\text{KMnO}_4$  200 mg. น้ำ 10 ml reflux บน water bath 4 ชั่วโมง กรองเอาสารที่ได้ทำให้เป็นกรดด้วย 6N.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  แล้วเอาไปสกัดติดต่อกัน (Continuous extraction) ด้วย ether กลั่นเอา ether ออกให้หมด ตั้งทิ้งไว้ ได้ผลึกมี m.p.  $113 - 6^\circ$  ปรากฏว่าสารที่ได้เป็น benzoic acid โดยการทำ IR และ mixed melting point

ตะกอน  $\text{MnO}_2$  ที่ได้เอาไปต้มกับ chloroform กรอง ระเหยให้หมด ตั้งทิ้งไว้ ให้ตกผลึก ได้สารเดิม m.p.  $218 - 9^\circ$  ที่ยังไม่ถูก oxidise เหลืออยู่ด้วย

### 2.7.12 Ozonolysis<sup>10</sup> of odoratin and dihydroodoratin

สาร odoratin 80 mg ละลายใน absolute methanol 20 ml ผ่าน ozone ลงไปจนมากเกินพอที่อุณหภูมิเย็นจัด (ใช้ dry ice ปนกับ acetone) เอาสารที่ได้ไปทำ catalytic reduction โดยมี  $\text{Pd/CaCO}_3$  เป็น catalyst ภายใต้ความดัน 30 ปอนด์/ตร.นิ้ว ประมาณ 2 ชั่วโมง กรอง แล้วกลั่น benzaldehyde จะระเหยออกมากับ methanol ซึ่งได้กลั่นโดยเฉพาะทำให้ทราบได้ง่าย และทำ 2,4-dinitrophenylhydrozone เปรียบเทียบกับ benzaldehyde ตัวอย่าง ส่วนน้ำมันสีเหลืองที่ได้นี้ จาก NMR spectrum ไม่มี aromatic function เหลือเลย

สำหรับ dihydroodoratin (80 mg) นำไปทำ ozonolysis เหมือนกับ odoratin ที่กล่าวมาแล้ว ไม่มี benzaldehyde เกิดขึ้น ได้สารเดิม (m.p.  $110 - 2^\circ$ ) กลับคืนมา

### 2.7.13 Acid hydrolysis of Odoratine and Odoratinol.

#### 1) Odoratine.

ครั้งที่ I สาร odoratine 500 mg ละลายใน 6N HCl 20 ml reflux ใน water bat. 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งไม่มีสารเค็มเหลือ (ทำ TLC เปรียบเทียบ) เอาสารที่ได้ไปทำให้เย็นจัดทิ้งค้างคืนไว้ในตู้แช่แข็ง. จะเกิดตะกอนสีขาวปนกับน้ำมันสีเหลืองติดอยู่ที่ก้นภาชนะ กรองแยกสารละลายไวต่างหาก ละลายตะกอนสีขาวที่ปนอยู่กับน้ำมันสีเหลืองด้วย ether แล้วทำให้ตกผลึกได้สารหนัก 87 mg m.p. 125-32° พบว่าสารนี้เป็น cinnamic acid โดยการเปรียบเทียบ IR และ mixed melting point สำหรับสารละลายที่กรองไคนั้นนำไปสกัดติดต่อกัน (Continuous extraction) ด้วย ether 4 ชั่วโมง แยกเอาชั้น ether ออกล้างน้ำ ทำให้แห้งด้วย anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  กลับให้แห้ง ใต้อากาศประมาณ 70 mg เมื่อนำไป run IR เปรียบเทียบกับสาร known ปรากฏว่าเป็น 2-Methylbutanoic acid และกรคนั้น form salt กับ Brucine ได้.

สารละลายที่สกัดด้วย ether แล้วทำให้เป็นค่างด้วย NaOH แล้วนำไปสกัดติดต่อกัน (Continuous extraction) ด้วย ether อีกครั้งหนึ่ง นำเอา ether ที่สกัดได้ทำตามวิธีดังกล่าวข้างบน จะได้น้ำมันสีเหลืองหนัก 36 mg ซึ่งเมื่อนำไป run IR ปรากฏว่าสารที่ได้เป็น amine

ครั้งที่ II สาร odoratine 300 mg ละลายใน conc. HCl 2-3 ml เติมน้ำ 5 ml แล้ว reflux ใน water bath จนกระทั่งไม่มีสารเค็มเหลือ (ทำ TLC เปรียบเทียบ) แล้วทำตามวิธีดังกล่าวข้างบน ปรากฏว่าได้

cinnamic acid	49 mg
2-methylbutanoic acid	90 mg
และ amine	50 mg

## 2) Odoratinol

สาร odoratinol 480 mg ละลายใน 6N HCl 10 ml กรองสารละลายใสมาก สักคึกคอกัน (Continuous extraction) ด้วย ether แยกเอาชั้น ether ออก ล้างน้ำ ทำให้แห้งด้วย anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  กลับในขวดจะได้ 2-methyl-2-hydroxybutanoic acid หนัก 50 mg สำหรับตะกอนที่กรองได้เป็นสารเดิมที่ไม่ถูก hydrolyse

สารละลายที่สักคึกด้วย ether แล้ว ทำให้เป็นกลางด้วย NaOH แล้วทำตามวิธีเดียวกันกับ odoratine จะได้ amine หนัก 120 mg



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย