

บทที่ 3

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการสกัดหัวกวาวควยเมทานอลโดยวิธี Continuous Soxhlet extractor โค้ดตะกอนขาวออกมา กรองเอาตะกอนที่ไคมีไปละลายในอีโพรแลนมีอีเทอร์หลาย ๆ ครั้ง แยกแต่ละส่วนที่ละลายในอีโพรแลนมีอีเทอร์ไปทำไฟวคเก็บไว้ให้ตกผลึก แล้วนำผลึกนั้นไปตกซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จะได้สาร A (mp. 164-165°C) ใน fraction แรก ๆ ส่วน fraction หลัง ๆ จะเป็นสาร B (mp. 82°C) ส่วนตะกอนที่เหลือซึ่งไม่ละลายในอีโพรแลนมีอีเทอร์นำเอาไปละลายในเบนซีน กรองเอาสารละลายไปทำไฟวค จะได้ผลึกเกิดขึ้น ตกผลึกนี้ในอะซีโตนหลาย ๆ ครั้ง ได้สาร C (mp. 93-94°C)

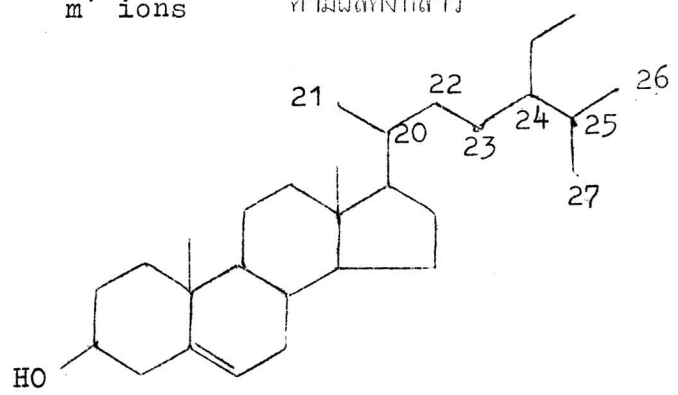
3.1 สาร A จุดหลอมเหลว 164 - 165°C

สาร A นี้ฟอสส์ไบรมันในคาร์บอนเตตระคลอไรด์ได้ และไม่มีไฮโดรเจนโบรไมด์เกิดขึ้น ไม่มีปฏิกิริยากับ carbonyl reagents ต่าง ๆ ให้สีกับ Liebermann Burchard reagent (สีแดงเปลี่ยนเป็นสีม่วง) มี Rf value เท่ากับ 0.73 (ตามวิธี 2.1.2) จากผลการวิเคราะห์ธาตุต่าง ๆ มี C = 84.37 %, H = 11.75 % สูตรที่คำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวนี้เป็น $C_{29}H_{48}O$ IR spectra แสดง characteristic ของ -OH (3400 cm^{-1}) C=C (1630 cm^{-1}), $-CH_2$ ($2950, 2850\text{ cm}^{-1}$) C-CH₃ (1375 cm^{-1}) C-O ($1050, 1020\text{ cm}^{-1}$ of B-OH) R-CH=C-R₂ ($830, 795\text{ cm}^{-1}$) เมื่อนำสาร A ไปทำ Acylation ได้ derivative ที่มี mp. 140-142°C C=81.90% H=11.02% สูตรจากการคำนวณเป็น $C_{31}H_{50}O_2$ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสาร A แล้วแสดงว่า Acetylation product นี้เป็น monoderivative ส่วน I.R. absorption ไม่มี character ของ -OH เหลืออยู่ แสดง C=O (1725 cm^{-1}) เคนซิก และ -OAc ($1240, 1255\text{ cm}^{-1}$) ส่วน RCH=CR₂ ยังคงเห็น จากการทำ Jones oxidation ของ A ได้ ketone ที่มี mp. 120-22°C แสดง C=O (1760 cm^{-1}) ทา C=84.59% H= 11.48 % คำนวณสูตรได้ $C_{29}H_{46}O$ ซึ่งแสดงว่า A เป็น 2^{ry} alcohol และเมื่อนำ A ไปทำ hydrogenation โดยใช้ Adam's catalyst ได้สารที่มี mp. 140-1°C (24) ไม่มี I.R. absorption peak ของ C=C เหลืออยู่ แต่ปรากฏว่า I.R. spectrum ของสารนี้ identical

กับของ Stigmastanol ผลการวิเคราะห์ของ C = 83.65%, H = 12.45% สูตรเป็น $C_{29}H_{52}O$ ซึ่งจากสูตรนี้แสดงว่ามี two olefinic bonds จาก experimental results ดังกล่าวมานับสนับสนุนสาร A ว่าจะคงเป็น sterol ชนิดหนึ่ง และมี δ -skeleton เหมือน stigmastanol อย่างแน่นอน -OH จะคงอยู่ที่ C_3 เหมือนกับ stigmastanol หรือ β -sitosterol และจาก N.M.R. spectrum (หน้า 26) แสดงว่าสาร A นี้เหมือนกับ stigmastanol มากที่สุด กล่าวคือ Olefinic bond อันหนึ่งอยู่ใน ring B ที่ตำแหน่งเดียวกับ stigmastanol ส่วนตำแหน่งของ olefinic bond อีกอันหนึ่งหาได้จาก Mass spectrum analysis ผลจาก Mass spectra ของสาร A ปรากฏว่าเป็น mixture ของ steroids สองชนิดที่มีสูตรเป็น $C_{29}H_{48}O$ และ $C_{29}H_{50}O$ สาร A ส่วนมากเป็นสูตรแรกมี MW 412 ส่วนสูตรหลังนั้นเป็น β -sitosterol(I) แต่อย่างไรก็ตามพวก ring A, B, C, และ D เป็น nucleus ของ steroid ส่วน side chain มี m^+ ion 43 (isopropyl gr.) อยู่ด้วยทั้งสูตร I และ C = C bond จะคงอยู่ที่ side chain นี้ จากการเอา Acetate ของ A ไปทำ Mass spectra analysis เพื่อ confirm สูตรโครงสร้าง ได้ maximum m^+ ion ที่ 454 แสดงว่า Acetate มี M.W. 454 สูตร $C_{31}H_{50}O_2$ ส่วน base peak (m^+) อยู่ที่ 394 และมี peak อื่น ๆ ที่ 351, 2/3, 282 และ 255 peak 255 นี้เป็น strong peak ซึ่งเป็น ring nucleus ของ steroid ดังรูป III (แสดงที่ m^+ fraction ใน Mass spectrum ของ Acetate) และมีเล็กน้อยอยู่ที่ 29 นั่นคือ m^+ ที่ 454 ($C_{31}H_{50}O_2$) นั้น loss m/e ไป 60 (acetic acid) ให้ m^+ ที่ 394 แล้ว loss m/e ต่าง ๆ ใดดังนี้

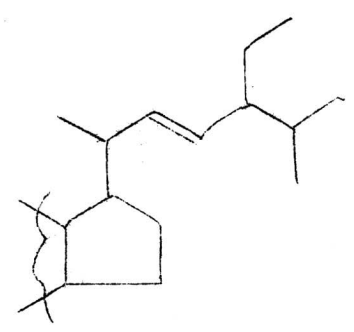
43 (isopropyl gr.)	m^+	351
111	"	283
112	"	282
139	"	255

ณตำแหน่งของ C = C ที่ side - chain จะต้องมี C₂₃ ดังรูป III จึงจะได้ m⁺ ions ตามผลลัพท์กล่าว



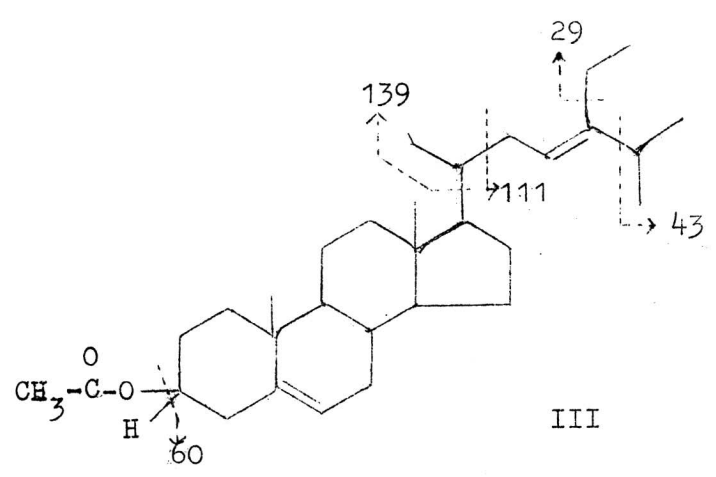
I

(β-sitosterol)



II

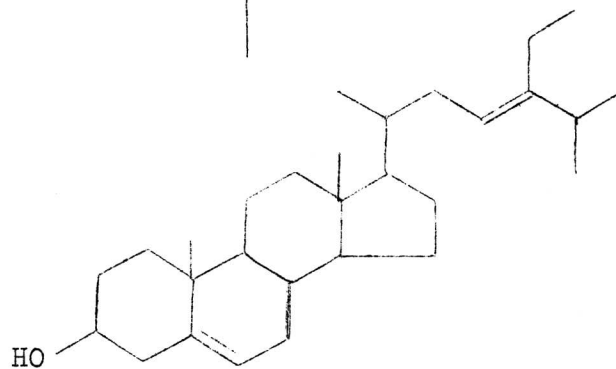
(stigmasterol)



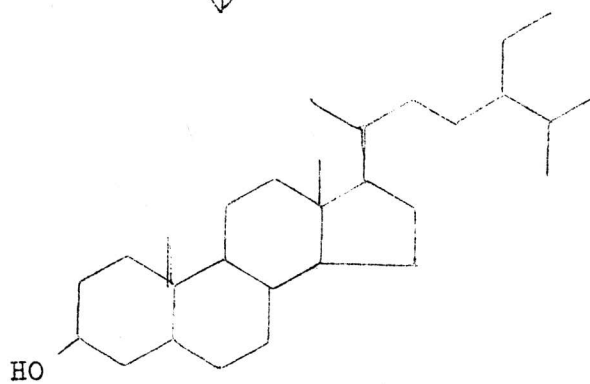
III

C₃₁H₅₀O₂ ; MW 454

นั่นคือ สาร A เป็น isomer ของ stigmasterol(II) โดยต่างกันที่ตำแหน่งของ C = C bond ที่ side - chain ซึ่ง C = C bond ของ Stigmasterol นั้นอยู่ที่ C₂₂ และในปี 1970 Tomita, Uomori และ Shionogi ได้พบว่าสาร A เป็น intermediate ในปฏิกิริยา biosynthesis ของ stigmasterol ซึ่งสรุปผลการทดลองสาร A ดังนี้

Acetate
(VI)Ketone
(VII)

สาร A (IV)



Stigmastanol

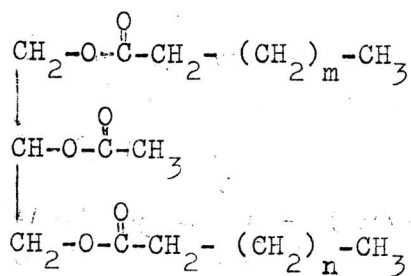
(V)

3.2 สาร B จุดหลอมเหลว 82°

จาก Chemical reactions พบว่าสาร B เป็น saturated alcohol ให้ I.R. absorption peaks ของ OH (3400 cm^{-1}) นอกนั้นเป็น saturated hydrocarbon peaks ($730, 720\text{ cm}^{-1}$) ส่วน N.M.R. spectrum มี strong peak 8.75 T เท่านั้นและ Mass spectra ปรากฏว่าเป็น mixture ของ straight chain alcohols สองชนิด มีสูตรเป็น $\text{C}_{29}\text{H}_{60}\text{O}$ (424) และ $\text{C}_{31}\text{H}_{64}\text{O}$ (452) ซึ่ง mass (m^+ ions) ที่ loss H_2O (18) และ CH_2 (14) ของ $\text{C}_{29}\text{H}_{60}\text{O}$ มี m^+ ions 424, 396, 382, 368, 354, 340. และ $\text{C}_{31}\text{H}_{64}\text{O}$ มี m^+ ions เป็น 452, 434, 420, 406, 392, 378, เรื่อย ๆ ไป

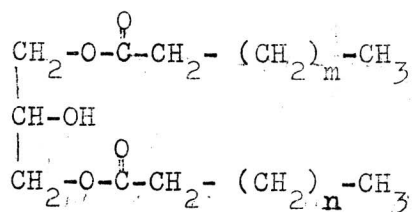
3.3 สาร C จุดหลอมเหลว 93-94°

สาร C ละลายใน organic solvents เช่น คลอโรฟอร์ม เบนซีน หรือ อะซิโตนได้ไม่ค่อยดี ต้องใช้ solvent เป็นจำนวนมากและร้อนจึงละลายได้ดี ไม่ให้สีกับ steroid reagent ไม่พอกสีโบรมีนและไม่ทำปฏิกิริยากับพวก carbonyl reagents ต่าง ๆ นอกจากให้ไฮโดรเจนซัลไฟด์กับโลหะโซเดียมในสารละลายคาร์บอนเตตระคลอไรด์แห้ง พบว่า C = 72.80%, H = 11.54% สูตรคำนวณได้เป็น $\text{C}_{31}\text{H}_{59}\text{O}_5$ I.R. absorption peaks ที่สำคัญแสดง -OH ($3590 - 3095\text{ cm}^{-1}$), C=O ($1280, 1215, 1200\text{ cm}^{-1}$) เมื่อ นำเขาไปทำ acylation ได้ acetyl derivative มี mp. 64°, C = 71.60% H = 11.04% คำนวณสูตรได้เป็น $\text{C}_{33}\text{H}_{61}\text{O}_6$ ส่วน I.R. spectrum ไม่มี -OH เหลืออยู่ กลับได้ C = O bond ($1320 - 1190\text{ cm}^{-1}$) ที่ strong and broad ช้นกว่าสารตั้งต้น ผลจาก N.M.R. spectrum ของ Acetate บอกให้ทราบถึงชนิดของ protons ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในโมเลกุล แสดงว่าเป็น Glyceride มีสูตรเป็น VIII ในเมื่อ $m + n \approx 22$



$$m+n \approx 22$$

VIII



$$m+n \approx 22$$

IX

อนุมานจาก experimental results และ spectral data ที่กล่าวมานั้น สาร C ควรจะมีสูตรโครงสร้างเป็น IX หรือ $C_{31}H_{59}O_5$ (C=72.81 %, H=11.54 %) ซึ่ง confirm โดยการเอาไปทำ saponification glycerol และ sodium salt ของ fatty acids เกิดขึ้น glycerol ที่ได้จากปฏิกิริยานั้น identical กับ authentic glycerol ทุกประการ

จากผลการวิจัยส่วนที่เป็น insoluble portion ของ methanol extraction ที่ปล่อยทิ้งไว้ได้เย็นจากหัวกวาวที่ปนละเอียดได้ chemical compounds พบ β -Sitosterol(1) isomer ของ stigmasterol ได้แก่ 5,23-Stigmastadien-3 β -ol (IV) straight chain alcohols $C_{29}H_{60}O$ and $C_{31}H_{64}O$ และ Glyceride (IX) ซึ่งเป็นส่วนที่ยังไม่มีผู้ใดทำการวิจัยไว้มาก่อน เพราะที่แล้ว ๆ มานั่งไปหาสารตัว ที่เป็น Female hormone ทั้งสิ้น ประโยชน์ที่ได้จากการค้นคว้าใน part นี้ ก็คือทำให้ทราบ chemical constituents ที่ธรรมชาติสร้างขึ้น และความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบต่างๆ ที่เกิดขึ้นนั้น การที่พบสาร IV นั้นแสดงว่าเป็น intermediate ของ Stigmasterol และ β -Sitosterol ตามที่ Tomito และผู้ร่วมงานได้ใช้ C^{14} demonstrate เมื่อเร็ว ๆ นี้ (24)

ส่วน soluble portion ของ methanol extraction ซึ่งให้ oestrogenic properties แสดงว่ามี miroestrol (7) ยังไม่ได้กระทำต่อไป จะต้องมีสารประกอบอื่น ๆ มีลักษณะคล้ายคลึงกับ miroestrol ที่พบแล้ว และเป็นการสมควรอย่างยิ่งที่นำศึกษา เพราะจะทำให้ทราบสารประกอบต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในทางการศึกษา และนำมาใช้กับมนุษยชาติได้