

บทที่ 2

การทดลอง2.1 เครื่องมือและวิธีการที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 Column Chromatography ใช้ Aluminium oxide-S-neutrol active for chromatography กับ Standardised aluminium oxide-S for column chromatography ของ Riedel-de Haen AG. Seelze-Hannover เยอรมัน โดยเอามาอบที่ $120 - 125^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงใช้เป็น Adsorbent ใช้ Column แก้วที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. และ 1.5 ซม. มีสายยางคอที่ปลายแก้วพร้อมทั้งที่หนีบสำหรับปิดและเปิด Column เติม Solvent เล็กน้อยแล้วเปิดให้ Solvent ออกมาบ้างเพื่อไล่ฟองอากาศ แล้วจึงเติม Solvent ลงไปอีกจนไคร่ระดับ 3 ใน 4 ของ Column ใส่สารละลายไปให้นอนก้น Column หนาประมาณครึ่งเซนติเมตร เพื่อกันไม่ให้ Aluminium oxide ไหลออกมากับ Solvent แล้วจึงค่อย ๆ เท Aluminium oxide ที่อบไว้ตามกำหนดลงไปจนได้ความยาวของ Aluminium oxide ตามที่ต้องการคือใช้สารหนัก 1 กรัม ต่อ Aluminium oxide หนัก 20 กรัม ปรับผิวหน้าของ Aluminium oxide ให้เรียบ ปล่อยให้ Solvent ไหลผ่าน Aluminium oxide ออกจาก Column ให้เหลือเล็กน้อย คือสูงจากผิวหน้าของ Aluminium oxide ประมาณ 1 - 2 ซม. จึงค่อย ๆ เติสารที่เตรียมไว้ลงไปให้เต็มใน Column แล้ว Elute ด้วย Solvent ต่าง ๆ จาก Polarity ต่ำไปหาสูง เก็บ Fraction ต่าง ๆ ในปริมาณที่เท่ากันไว้ เพื่อศึกษาว่าได้สารอะไรแยกออกมาบ้าง ในแต่ละ Fraction

2.1.2 Thin Layer Chromatography (15) ใช้ Aluminium oxide D. for thin layer chromatography ของบริษัท Riedel-de Haen G. Seelze Hannover No. 31166 ทำในเยอรมันตะวันตก เป็น Adsorbent ในการทำ Chromatoplate ใช้ Desaga Spreader ของ Desaga Heidelberg เยอรมันตะวันตก ใช้ Aluminium

oxide D. 75 กรัมค่อนน้ำ 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 - 2 นาที เทใส่ Spreader ที่ปรับให้ Adsorbent หนา 0.50 ม.ม. จะได้ Chromatoplate ขนาด 20 x 20 ซม. จำนวน 5 plates สำหรับทำ Preparative T.L.C. scale แดกาทำ T.L.C. plates สำหรับวิเคราะห์หรือยังและหา R_f value ใช้ความหนาของ plate 0.25 ม.ม. โดยใช้ Aluminium oxide D. 40 กรัมค่อนน้ำ 40 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้ plate นี้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาครึ่ง ชั่วโมง แล้วจึงเอาไป Activated โดยอบที่อุณหภูมิ 120 - 125 °C อีก 1 ชั่วโมง เก็บไว้ใน Desiccator ที่มี anhydrous calcium chloride บรรจุอยู่ เพื่อนำไปใช้ต่อไป

ในการทำ Preparative separation ใช้ Capillary tube สำหรับ Applied sample ลงบน plate โดย Spot ให้สูงจากขอบล่างของ plate 2 ซม. จากจุดที่ Applied sample วัดขึ้นไปอีก 15 ซม. ชีคเส้นสำหรับบอกเขต Solvent front เมื่อ Spot แห้งดีแล้ว นำ plate นี้ไปใส่ใน T.L.C. chromatank ของ Shandon ซึ่งมี Solvent ที่ใช้เป็น Equilibrium อยู่แล้ว โดยให้ส่วนล่างของ plate คือกานที่ Applied sample จุ่มอยู่ใน Solvent ปล่อยให้ Solvent ซึมผ่านขึ้นไปจนถึง Solvent front เอา plate ออกทำให้แห้งแล้วนำไปส่องกับ Ultraviolet light จะได้ Spot ที่เรืองแสงเป็นสีน้ำเงิน (Blue) แยกออกจากกัน เกิดขาด เลือกเอา Spot ที่มีค่า R_f value เท่ากันไว้ด้วยกัน

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางของ Spot ของสารที่เคลื่อนที่}}{\text{ระยะทาง Solvent front}}$$

2.1.3 Liebermann-Burchard reaction (2,16) ละลายสารที่คงการทดสอบ จำนวนเล็กน้อยใน Chloroform 4 - 5 หยด แล้วค่อย ๆ เติม Acetic anhydride ลงไปหนึ่งหยด และเติม Conc. sulphuric acid หนึ่งหยดแล้วเขย่า ถ้ามีสีเกิดขึ้นก็แสดงว่าสารนั้นเป็นพวก Steroids หรือ Triterpenoid

2.1.4. ตรวจหา Functional group (17) ตาม Standard method คือถ้าต้องการตรวจสอบ Carbonyl group ก็เอาสารที่ต้องการตรวจสอบจำนวนเล็กน้อยละลายใน Ethanol หนึ่งมิลลิลิตรแล้วเติม 2,4 - dinitrophenylhydrazine reagent ถ้ามีตะกอนเหลืองเกิดขึ้นก็แสดงว่าสารนั้นมี Carbonyl group (ยกเว้น Carbonyl ของ ester หรือ Lactone จะไม่เกิดตะกอนเหลือง) หรือเมื่อนำไป heat แล้วมีตะกอนเหลืองเกิดขึ้นก็แสดงว่าสารนั้นมี Carbonyl group

การตรวจหาว่าสารเรามี Unsaturated group หรือไม่ก็โดยการฟอกสี Bromine in carbon tetrachloride ถ้ามันฟอกสีจางลงและไม่มีแก๊ส Hydrogen bromide เกิดขึ้น หรือว่ามันฟอกสีสารละลายคางทับทิม ก็แสดงว่าสารนั้นมี Unsaturated group

2.1.5 Ultraviolet lamp ใช้ของ Desagar Uvis ที่ 366 nm. ของ Heidelberg เขอร์มันตะวันตก

2.1.6 Ultraviolet spectrum ใช้เครื่อง Perkin-Elmer 124 Double Beam Spectrophotometer 400 - 200 μm ใช้ Chloroform และ Ethanol เป็น Solvents

2.1.7 Infrared spectrum ใช้เครื่อง Perkin-Elmer 421 Grating Infrared Spectrophotometer ที่มี Frequency 400 - 4,000 cm^{-1} และเครื่อง Beckmann infrared spectrophotometer ที่มี Frequency 700 - 4,000 cm^{-1} โดยทำเป็น KBr - pellets และ Nujol mull

N.M.R. spectrum ส่งไปทำที่มหาวิทยาลัยมหิดล โดยใช้ Chloroform เป็น Solvent

2.1.8. การหาจุดหลอมเหลว ใช้เครื่อง Fisher - Johns melting point apparatus

2.1.9. การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของธาตุ ส่งไปทำที่กรมวิทยาศาสตร์
กระทรวงอุตสาหกรรม โดยใช้วิธี Rapid Combustion ของIngram

2.1.10. การทำสารให้แห้ง ก่อนทำการวิเคราะห์หรือก่อนทำ U.V, I.R,
และ N.M.R. spectra และ Mass spectrum ต้องทำสารให้แห้งโดยใช้
Abderhalden vacuum drying apparatus โดยมี Anhydrous
phosphorous pentoxide เป็นตัวดูดความชื้นเป็นเวลา 12 - 18 ชั่วโมง

2.1.11. Solvent ที่ใช้ในการทดลอง Solvent ที่ใช้เกือบทุกชนิดต้องนำมา
กลั่นใหม่หมดทุกครั้ง ส่วน Light petroleum ether ใช้ชนิด bp. 60°C.

2.1.12. การ Identify ทั้งหมด Confirm โดยการทำให้ Mixed
melting point, Comparison of U.V, I.R, และ N.M.R. spectra และเตรียม
Derivatives

2.2 การสกัด (Extraction)

2.2.1. การสกัดใบแก้วแห้งด้วย Chloroform

นำใบแก้วสดที่เก็บจากบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 6.5 กิโล-
กรัม นำมาตากแดดให้แห้งเป็นเวลา 10 วัน แล้วบดให้ละเอียดได้หนัก 2.5 กิโล-
กรัม จากนั้นนำไปใส่ในขวดคอกว้าง เติม Chloroform ที่ใช้สกัดลงไปแช่จนท่วม
สาร จำนวน 8.00 ลิตร ปิดฝาขวดเขย่าเป็นระยะ ๆ ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรอง
เอา Chloroform ที่ใช้สกัดออกมากลั่นเอา Chloroform ออกแล้วเอา Chloro-
form เติมลงไปในช่วงที่มีใบแก้วแช่ทิ้งไว้อีก และเอาออกมากลั่นเอาสารที่สกัดได้
ออกมาเช่นเดียวกัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง จะได้สารที่มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวเหนียว
หนักทั้งหมดหนัก 225 กรัม (9% โดยน้ำหนักของใบแก้วแห้งและ 3.46% โดยน้ำหนัก
ของใบแก้วสด)

ตารางที่ 1

การสกัดใบแก้วแห้งด้วย Chloroform

ครั้งที่	น้ำหนักใบแก้ว แห้งบดละเอียด (ก.ก.)	จำนวนของ คลอโรฟอร์ม (ลิตร)	น้ำหนักของน้ำ มันสีเขียวเหนียว หนัก (กรัม)	% โดยน้ำหนัก ของใบแก้วแห้ง	% โดยน้ำ หนักของ ใบแก้วสด
1	2.50	8.00	128	5.12	1.97
2	2.37	8.00	68	2.72	1.05
3	2.30	8.00	29	1.16	0.44
รวม 3 ครั้ง	2.50	24.00	225	9.00	3.46

2.3 การแยกสาร (Separation)

2.3.1 วิธีแยกสารจาก Crude น้ำมันสีเขียวเข้มเหนียวหนัก

นำ Crude น้ำมันสีเขียวเข้มเหนียวหนัก 225 กรัม มาละลายด้วย Solvent ต่าง ๆ คือเริ่มจาก Petroleum ether; Ether; และ Ethyl acetate ตามลำดับ ดังนี้คือ

2.3.1.1. เอา Crude น้ำมันสีเขียวเข้มเหนียวหนัก 225 กรัม ละลายด้วย Petroleum ether จำนวน 7 ครั้ง โดยใช้ Solvent ครั้งละ 300 มิลลิลิตร ละลาย Crude ได้ 90 กรัม มีลักษณะเป็นยางสีเขียวเข้มปนดำ เหนียวหนักรวมกับน้ำมัน (ไม่เคี้ยวต่อ) และเหลือ Crude ที่ไม่ละลายอีก 130 กรัม

2.3.1.2 เตา Crude 130 กรัมซึ่งไม่ละลายใน Petroleum ether นำมาละลายต่อใน Ether จำนวน 12 ครั้ง โดยใช้ Ether ครั้งละ 200 มิลลิลิตร ละลาย Crude ได้ 105 กรัม มีลักษณะเป็นยางแข็งสีขาวเกือบดำปนกับ Solid. และเหลือ Crude ที่ไม่ละลายใน Ether 22 กรัม มีลักษณะเป็นผงแข็งสีขาวปนขาวนวล

2.3.1.3 เตา Crude ที่เป็นผงแข็งขาว 22 กรัมซึ่งไม่ละลายใน Ether นั้น นำมาละลายต่อไปอีกใน Ethyl acetate จำนวน 7 ครั้ง ใช้ Ethyl acetate ครั้งละ 300 มิลลิลิตร แล้วกรองให้ได้ Solution ที่ใส นำเอาไประเหยได้ Solvent ออกให้เหลือพอดี จะได้ Solution ใสสีเหลืองแกมเขียว ปรากฏว่าละลาย Crude ได้ 20 กรัม ส่วนที่ไม่ละลายอีก 0.5 กรัม เป็นผงสีขาวนวล (ไม่ได้นำมาต่อ)

ตารางที่ 2

การละลายของ Crude ของใบแก้วใน Solvent ต่าง ๆ

Solvent ที่ใช้ละลาย	Crude ที่ใช้ละลาย (กรัม)	Crude ที่ละลายได้ (กรัม)	Crude ที่ไม่ละลาย (กรัม)	จำนวนครั้งที่ละลาย	จำนวน Solvent ที่ใช้ (ลิตร)	% ของ Crude ที่ละลาย
Petroleum ether	225	90	130	7	2.1	40.00
Ether	130	105	22	12	2.4	80.77
Ethyl acetate	22	20	0.5	7	2.1	90.90

2.3.2. วิธีแยกสารจาก Crude ที่ละลายใน Ether ข้อ 2.3.1.2

นำเอา Crude ที่ละลายได้ใน Ether 105 กรัม มาล้างด้วย 5% Sodium hydroxide solution และระเหยเอา Ether ออกไปให้แห้ง เอา residue ที่ได้นี้ไปแยกด้วย Column Chromatography ซึ่งใช้ Neutral alumina เป็น adsorbent ตามวิธีข้อ 2.1.1 โดยใช้ residue 10 กรัม เก็บ Eluent fraction ละ 500 มิลลิลิตร กลับเอา Solvent ออกให้เหลือ ประมาณ 25 - 30 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ ผลปรากฏดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3

การแยกสารจาก Crude ที่ละลายใน Ether

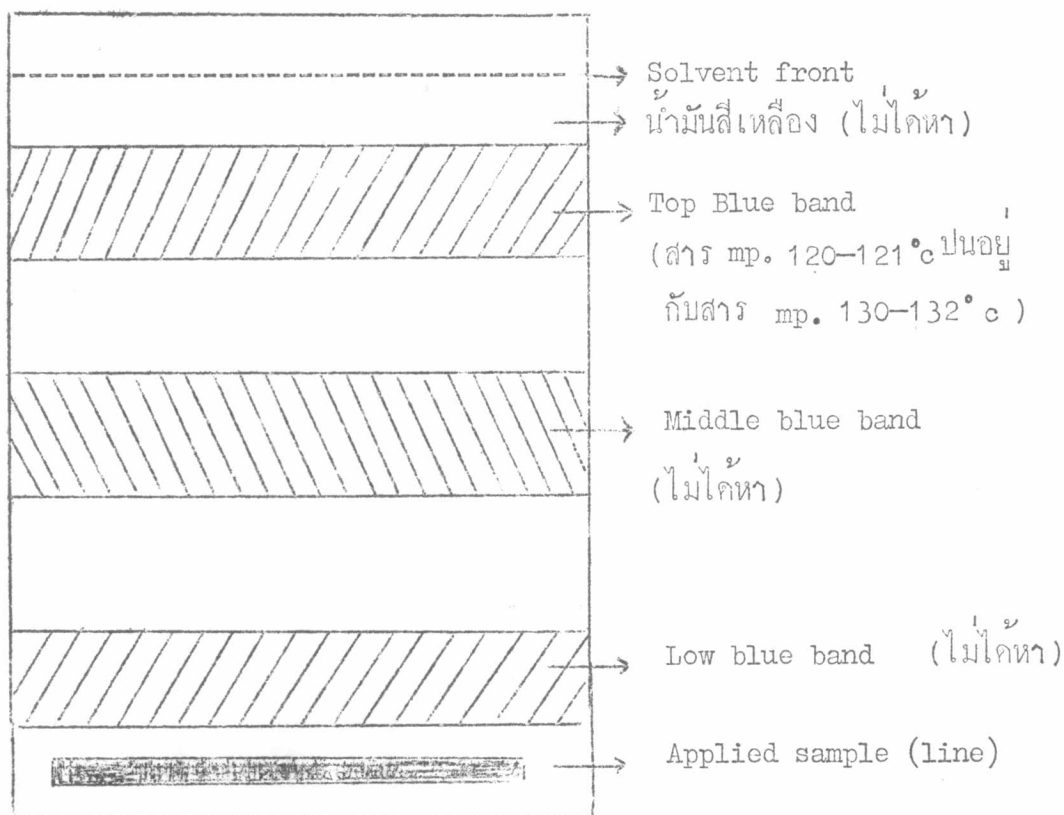
Eluant	Fraction	ลักษณะ	หมายเหตุ
Petroleum ether	1	Solid อยู่ในน้ำมันสีเหลืองอ่อน	น้อยมาก
"	2 - 5	น้ำมันสีเหลืองไม่มีผลึก	
10% Benzene ใน - Petroleum ether	1 - 5	น้ำมันสีเหลืองเข้มไม่มีผลึก	
25% Benzene ใน - Petroleum ether	1 - 10	น้ำมันสีเหลืองเข้มไม่มีผลึก	
50% Benzene ใน - Petroleum ether	1 - 2	น้ำมันสีเหลืองไม่มีผลึก	
"	3 - 9	โค Amorphous สีขาวมี mp. 84 - 85°C ให้เป็นสาร ก	ไม่ให้สีกับ Liebermann - Burchard - test
"	10 - 15	น้ำมันสีเหลืองอ่อนไม่มีผลึก	
Benzene	1 - 5	น้ำมันสีเหลืองเข้มไม่มีผลึก	

2.3.3 วิธีแยกสารจาก Crude ที่ละลายใน Ethyl acetate ข้อ 2.3.1.3

นำเอา Crude ที่ละลายได้ใน Ethyl acetate จำนวน 20 กรัม ซึ่ง เป็น Solution ไประเหยเอา Solvent ออกจนเหลือปริมาณ 40 - 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 - 2 วัน จะมีผลึกรูปเข็มรวมกันอยู่เป็นกลุ่มคล้ายดอกกระถินสีเหลืองอ่อนปนกับน้ำมัน มีจุดหลอมเหลว $115 - 120^{\circ}\text{C}$ แต่ผลึกที่โคนทำให้บริสุทธิ์ได้ยากมาก เมื่อนำมาตกผลึกซ้ำกันหลายครั้งใน Ethyl acetate ผสม n-hexane ก็ยังไม่ได้สารที่บริสุทธิ์ จากการตรวจสอบด้วย T.L.C. ยังให้ Spot หลาย Spot อยู่ จึงได้เปลี่ยนวิธีแยกสารใน Fraction นี้ใหม่ โดยการนำเอา Solution ของ Crude ที่ละลายใน Ethyl acetate มาทำให้เข้มข้นมากขึ้น แล้วนำไปแยกด้วย T.L.C. ใช้ plate หนา 0.50 มม. เพื่อทำ preparative scale เลือกเอาสารที่มี R_f value เท่ากันไว้รวมกัน โดยใช้ Aluminium oxide D. เป็น Adsorbent และ Ethyl acetate เป็น Solvent ตามวิธีข้อ 2.1.2 หน้า 3 เมื่อนำไปส่องแสง U.V. จะได้ band ที่เรืองแสงเป็นสีน้ำเงิน ดัง Chromatogram ของ Thick layer plate ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4

Preparative scale ของสารที่ละลายใน Ethyl acetate



จากการนำ plate ไปส่องกับ U.V. lamp พบว่ามี band ที่เรืองแสงเป็นสีน้ำเงินอยู่ 3 bands ซึ่งแยกกันเด็ดขาด ดังตารางที่ 4 ในการทดลองนี้ได้เลือกเอาเฉพาะ band ที่อยู่บนสุด (Top band) เท่านั้น ขูด band บนสุดรวมกันเข้าทั้งหมด นำเอา ส่วนที่ขูดออกมาได้ (มี Aluminium oxide-D. ปนกับสารซึ่งให้ Blue band กับแสง U.V.) ทั้งหมดไปสกัดอีกครั้งหนึ่งด้วย Soxhlet apparatus โดยใช้ Ethyl acetate เป็น Solvent เป็นเวลา 3 วัน แล้วเอา Solution ที่ได้จากการสกัดนี้ไปกรองให้ ใสสะอาด นำเอาส่วนที่กรองได้ไประเหยเอา Ethyl acetate ออกจนเหลือ ประมาณ 30 - 40 มิลลิลิตร เปิดปากขวดแล้วครอบขวดนี้ด้วยปีกเกอร์ ในวันต่อมาจะมีผลึกรูปเหลี่ยมและบางรับติดกันขวด กรองเอาผลึกส่วนนี้ออกได้ mp. 130 - 132°C

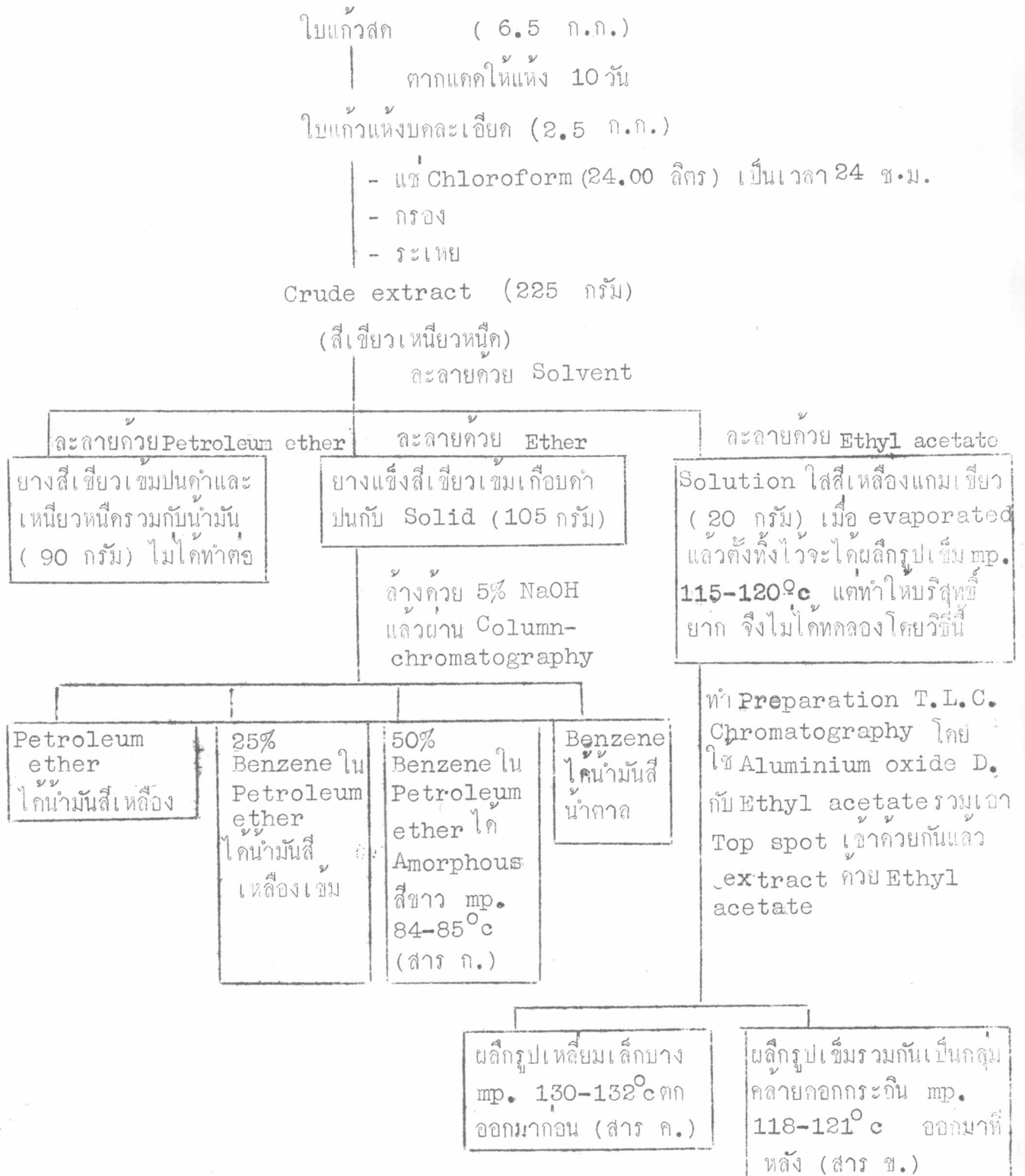
หนัก 3.6 กรัม (1.6% โดยน้ำหนัก ของ Crude ทั้งหมด) จากนั้นนำผลึกส่วนนี้ไปทำให้บริสุทธิ์และศึกษาต่อไป

นำเอา mother liquor ที่เหลือจากการกรองเอาผลึกรูปเหลี่ยม mp. 130 - 132° c ออกไปแล้วนั้น ไประเหย solvent ออกให้หมดกว่าเค็ม แล้วตั้งทิ้งไว้ในวันต่อมาจะมีผลึกรูปเข็มรวมกันเป็นกลุ่มคล้ายดอกกระดิ่งเกิดขึ้น และผลึกรูปเหลี่ยมเล็กบาง mp. 130 - 132° c เกิดอยู่เล็กน้อย โดยผลึกทั้งสองนี้แยกกันเกิด และมีลักษณะต่างกัน จึงได้แยกเอาผลึกรูปเข็มทั้งหมดออกจากผลึกรูปเหลี่ยมเล็กได้ นำเอาผลึกรูปเข็มที่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายดอกกระดิ่งนี้ มาตกผลึกใหม่ใน Ethyl acetate / n-hexane ปรากฏว่าได้ผลึกรูปเข็มรวมกันเป็นกลุ่มอย่างเดี่ยวไม่มีผลึกอื่นปนเลย นำไปหาจุดหลอมเหลวได้ 118 - 121° c หนัก 1.62 กรัม (0.72% ของน้ำหนัก Crude ทั้งหมด) จึงได้นำผลึกรูปเข็มนี้ไปทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติต่อไป

เมื่อนำเอาผลึกรูปเหลี่ยมเล็ก mp. 130 - 132° c กับผลึกรูปเข็ม mp. 118 - 121° c ไปทำ T.L.C. ปรากฏว่ามีค่า R_F value ต่างกัน จึงเป็นสารต่างชนิดกัน แต่จากการนำเอาผลึกรูปเข็ม mp. 118 - 121° c กับผลึกรูปเข็ม mp. 115 - 120° c ที่แยกได้จาก Crude ใน Ethyl acetate ในคอนตันมาทำ T.L.C. ได้ R_F value เท่ากัน แสดงว่าเป็นสารตัวเดียวกัน

ตารางที่ 5

แผนภาพการสกัดและแยกสารออกจากใบแก้ว



2.4 การทำสารให้บริสุทธิ์ (Purification)

2.4.1 วิธีทำสารจุดหลอมเหลว 84 - 85 °c ให้บริสุทธิ์

นำสารจุดหลอมเหลว 84 - 85 °c ที่ได้จาก Eluted column คอย 50% Benzene - Petroleum ether ใน Fraction 3 - 9 ตกผลึกออกมาเป็น Amorphous จากการทำ T.L.C. พบว่ามีน้ำมันเท่านั้นที่เป็น impurity จึงนำสาร m.p. 84 - 85 °c หนัก 0.786 กรัม ตกผลึกซ้ำหลาย ๆ ครั้งใน petroleum ether ในที่สุดจะได้ Amorphous สีขาวจุดหลอมเหลวคงที่ที่ 85 - 86 °c หนัก 0.695 กรัม (0.3% ของ Crude extract) และเมื่อทำ T.L.C. มันให้ Spot เดียวเท่านั้น แสดงว่าสารนี้บริสุทธิ์ จึงกำหนดให้เป็นสาร ก.

2.4.2 วิธีทำสารจุดหลอมเหลว 118 - 121 °c ให้บริสุทธิ์

นำสารจุดหลอมเหลว 118 - 121 °c จำนวน 1.62 กรัม ตกผลึกซ้ำหลาย ๆ ครั้งใน Ethyl acetate / n-hexane ที่กลิ่นใหม่ จะได้น้ำมันรูปเข็มสีขาว รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายคอกกระฉิน มีจุดหลอมเหลวคงที่ที่ 120 - 121 °c หนัก 1.02 กรัม (0.45% ของ Crude extract) เมื่อทำ T.L.C. โดยใช้ Aluminium oxide D. เป็น Adsorbent และ Ethyl acetate เป็น Solvent ปรากฏว่าได้ Spot เดียวเท่านั้น แสดงว่าสารนี้บริสุทธิ์ จึงกำหนดให้เป็นสาร ข.

2.4.3 วิธีทำสารจุดหลอมเหลว 130 - 132 °c ให้บริสุทธิ์

นำสารจุดหลอมเหลว 130 - 132 °c จำนวน 3.6 กรัม มาตกผลึกใหม่ซ้ำกันหลาย ๆ ครั้งใน Ethyl acetate หรือ Ethyl acetate ผสม n-hexane เล็กน้อย จะได้น้ำมันรูปเข็มเล็กสีขาวนวล จุดหลอมเหลวคงที่ที่ 131 - 132 °c หนัก 3.46 กรัม (1.1% ของ Crude extract) จากการทำ T.L.C. โดยใช้ Solvent ผสมของ Ethanol:Acetic acid:H₂O = 100 : 5 : 40 ปรากฏว่าให้ Spot เดียว แสดงว่าสารนี้บริสุทธิ์ จึงกำหนดให้เป็นสาร ค.

2.5 การตรวจลักษณะของสารประกอบที่แยกออกมาได้

(Identification of Compounds)

2.5.1 การตรวจลักษณะของสาร ก. mp. 85 - 86°c

2.5.1.1 Physical properties and colour reaction ของสาร ก. mp. 85 - 86°c

สาร ก. เป็น Amorphous solid สีขาวมี mp. 85 - 86°c ปรากฏว่าละลายได้ใน Chloroform; Ether; Benzene, และ Methanol ไม่ละลายน้ำและไม่ให้สีกับ Liebermann-Burchard reaction เมื่อนำไปตรวจหาธาตุโดยวิธี Lassaigne sodium decomposition test⁽¹⁷⁾ ปรากฏว่าไม่พบธาตุ Nitrogen Sulphur และ Halogen ผลของการวิเคราะห์หา Carbon และ Hydrogen มี

$$C = 83.12\% ; \quad H = 11.96\%$$

สำหรับ Infrared spectrum ของสาร ก. ดังรูปที่ 1 หน้า 22 และ Absorption peaks ของสาร ก. ดังตารางที่ 6 หน้า 22

2.5.1.2 การตรวจหา Functional group ของสาร ก.

การตรวจหา Functional group ตาม Standard method⁽¹⁷⁾ ปรากฏว่าสาร ก. ไม่พอกสี Bromine in carbon tetrachloride ไม่พอกสี สารละลาย $KMnO_4$ ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2, 4 - dinitrophenylhydrazine ให้ฟองแก๊ส Hydrogen กับโลหะ Sodium จาก I.R absorption peaks แสดงว่ามี peak ของ primary alcohol ไม่มี Aromatic ring และไม่มี Olefinic bond ด้วย ดังนั้นสารนี้จึงควรจะเป็น Aliphatic saturated alcohol

001935

2.5.1.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร ก. Acetyl derivative (17)

นำเอาสาร ก. mp. $85 - 86^{\circ}\text{C}$ จำนวน 150 มิลลิกรัม ละลายใน Pyridine 3 มิลลิกรัม ในขวดก้นกลม 25 มิลลิกรัม แล้วเติม Acetic anhydride ที่ redistilled 5 มิลลิกรัม เขย่าแล้ว reflux บน Water bath 4 ชั่วโมง ปล่อยให้สารละลายเย็นลง นำไปเทลงในน้ำเย็นประมาณ 50 มิลลิกรัม คนให้ทั่วจะมีตะกอนขาวเกิดขึ้น (เช่นให้สารละลายเป็นจึกจะเกิดตะกอนสมบูรณ์ขึ้น) กรองตะกอนขาวออก ล้างตะกอนขาวด้วยน้ำกลั่นจนหมดกลิ่น Pyridine และ Acetic acid อบตะกอนให้แห้งจะได้ Crude derivative ออกมา 165 มิลลิกรัม นำสารที่ได้ไปตกผลึกใหม่หลาย ๆ ครั้งใน Petroleum ether จนได้จุดหลอมเหลวคงที่ที่ $72 - 73^{\circ}\text{C}$ หนัก 115 มิลลิกรัม (Percentage yield = 74.60%) Acetyl derivative ที่ได้นี้ไม่พอกสี Bromine in carbon tetrachloride และไม่พอกสีสารละลาย KMnO_4 ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ Carbon และ Hydrogen ได้

$$\text{C} = 80.10\% \quad \text{H} = 13.12\%$$

สำหรับ Infrared spectrum ของ Acetate ของสาร ก. ดังรูปที่ 2 หน้า 23 และ Absorption peaks ของ Acetate ของสาร ก. ดังตารางที่ 7 หน้า 23

2.5.2 การตรวจลักษณะของสาร ข. จุดหลอมเหลว $120 - 121^{\circ}\text{C}$

2.5.2.1 Physical properties and colour reaction ของสาร ข.

ลักษณะของสาร ข. เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวรวมกันอยู่เป็นกระจุกคล้ายดอกกระถิน มีจุดหลอมเหลว $120 - 121^{\circ}\text{C}$ เมื่อปล่อยให้ถูกแสงสว่างนาน ๆ ผลึกจะกลายเป็นสีเหลืองอ่อน ปรากฏว่าละลายได้ดีใน Chloroform, Ethanol Acetone, Benzene และ Ethyl acetate ละลายได้น้อยใน n-hexane และ Petroleum ether แต่ไม่ละลายในน้ำ ไม่ให้สีกับ Liebermann-Burchard reagent เมื่อนำไปหาธาตุต่าง ๆ โดยวิธี Lassaigne sodium decomposition

test⁽¹⁷⁾ ปรากฏว่าไม่พบธาตุ Nitrogen; Sulphur และ Halogen ผลของการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของ Carbon และ Hydrogen ได้

C = 69.53%; H = 5.66%; และ OCH₃ = 12.37%

สำหรับ Absorption peaks ของสาร ข. ดังตารางที่ 8 หน้า 24 ส่วน Infrared spectrum ดังรูปที่ 3 หน้า 24 Ultraviolet spectrum ดังรูปที่ 9 หน้า 34 และ N.M.R. spectrum ดังรูปที่ 14 หน้า 39

2.5.2.2 การตรวจหา Functional group ของสาร ข.

การตรวจหา Functional group ตาม Standard method⁽¹⁷⁾ ปรากฏว่าสาร ข. ฟอกสี Bromine in carbon tetrachloride ไม่ให้เกิด Hydrogen bromide ฟอกสีสารละลาย KMnO₄ กับโลหะ Sodium ไม่ให้พองแก๊ส Hydrogen ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2, 4 - dinitrophenylhydrazine ละลายได้ใน 5% sodium hydroxid solution ที่อุณหภูมิห้อง ไม่ Reduce Tollen's reagent และ Fehling solution.

2.5.2.3. การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร ข.

2.5.2.3.1 Methyl ether (ring open) ของสาร ข.⁽¹⁴⁾

นำสาร ข. 165 มิลลิกรัม ละลายใน Absolute methanol 25 มิลลิลิตร และนำ 15 มิลลิลิตร ในขวดแก้วกลม 50 มิลลิลิตร แล้ว heat ด้วยการเติม Sulphuric acid เข้มข้น 1.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (เขย่าและอุ่นอยู่บน Water bath ตลอดเวลา) จากนั้นเอา Reaction mixture เพลงในน้ำเย็น 200 มิลลิลิตร แล้ว Extracted ด้วย Chloroform เมื่อนำ Chloroform extract ไประเหยจะได้อ Crude product หนัก 195 มิลลิกรัม เอา product ที่ได้นี้ไปละลายใน Benzene จำนวนเล็กน้อย แล้วนำไปผ่าน Column Chromatography โดยใช้



Aluminium oxide 10 กรัม ตามวิธีข้อ 2.1. Eluted ด้วย light petroleum ether/ benzine (1:1) และ benzene จะได้ Methyl ether ของสาร ข.หนัก 115 มิลลิกรัมใน fraction ที่ eluted ด้วย benzene นำมาตกผลึกซ้ำหลาย ๆ ครั้งใน light petroleum ether ผสม benzene จะได้ผลึกรูป prism สีขาวหนัก 85 มิลลิกรัม (Percentage yield = 45.83%) จุดหลอมเหลว 153 - 154 °c จากการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ Carbon และ Hydrogen ได้



สำหรับ Infrared spectrum ของ Methyl ether ของสาร ข. คังรูปที่ 4 หน้า 26 Absorption peaks คังตารางที่ 9 หน้า 26 และ Ultraviolet spectrum คังรูปที่ 10 หน้า 35

Methyl ether ของสาร ข.นี้ พอกสี Bromine in carbon tetrachloride ได้แต่ไม่ให้เกิด Hydrogen bromide พอกสีสารละลาย $KMnO_4$ กับโลหะ Sodium จะไม่ให้เกิด Hydrogen ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2,4 - dinitrophenylhydrazine ไม่ Reduce Tollen's reagent และ Fehling solution เหมือนสารตั้งต้น

2.5.2.3.2 Hydration ของสาร ข. (Ring open to be diol) (18)

สาร ข. 180 มิลลิกรัม ละลายใน Acetone 5 มิลลิลิตร และน้ำ 5 มิลลิลิตร ในขวดกลม 50 มิลลิลิตร แล้วหยด Sulphuric acid เข้มข้น 3 - 4 หยด (ขณะหยดเขย่าขวดสาร) จากนั้นก็เขย่า solution mixture นี้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนได้ Homogeneous solution แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 23 ชั่วโมง แล้วนำไปสกัดด้วย Ether เตา Ether extract ไประเหยให้แห้ง แล้วเอา Crude product ที่ได้ละลายใน Ethyl acetate

ตั้งทิ้งไว้จะมีผลึกรูปเหลี่ยมเล็กเกิดขึ้น นำมาตกผลึกซ้ำใน Ethyl acetate ผสม n-hexane เล็กน้อย จะได้ผลึกรูปเหลี่ยมเล็กมีจุดหลอมเหลว $130 - 132^{\circ}\text{C}$ หนัก 46 มิลลิกรัม (Percentage yield = 23.88 %) จากการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ Carbon และ Hydrogen ได้

$$\text{C} = 64.83\% ; \quad \text{H} = 5.42\%$$

สำหรับ Infrared spectrum ของ Hydrate ของสาร ข. ดังรูปที่ 5 หน้า 28 Absorption peaks ของ Hydrate ของสาร ข. ดังตารางที่ 10 หน้า 28 และ Ultraviolet spectrum ดังรูปที่ 11 หน้า 36 จากการเปรียบเทียบ I R. spectra ระหว่างสารนี้กับสาร ค. (หน้า 30) ปรากฏ Identical กัน และเมื่อทำ mixed melting point ของสารทั้งสองนี้ melting point ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม หลอมเหลวที่ $130 - 132^{\circ}\text{C}$

2.5.3 การตรวจลักษณะของสาร ค. จุดหลอมเหลว $131 - 132^{\circ}\text{C}$

2.5.3.1 Physical properties and colour reaction ของสาร ค.

ลักษณะของสาร ค. เป็นผลึกรูปเหลี่ยมเล็กสีขาวนวล มีจุดหลอมเหลว $131 - 132^{\circ}\text{C}$ ปรากฏว่าละลายได้ดีใน Chloroform, acetone, benzene ละลายได้ใน Ethanol และ Ethyl acetate เมื่อร้อนละลายได้เล็กน้อยใน Petroleum ether และ hexane ไม่ละลายน้ำ ไม่ให้สีกับ Liebermann - Burchard reagent เมื่อนำไปตรวจหาธาตุต่าง ๆ โดยวิธี Lassaigne sodium decomposition test (17) ปรากฏว่าไม่พบ Nitrogen, Sulphure และ Halogen จากการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของธาตุนี้

$$\text{C} = 65.89\% ; \quad \text{H} = 5.95\%$$

สำหรับ Infrared spectrum ของสาร ค. ดังรูปที่ 6 และ 7 หน้า 30 ส่วน Absorption peaks ของสาร ค. ดังตารางที่ 11 หน้า 31 ส่วน Ultraviolet

spectrum ของสาร ค. คังรูปที่ 12 หน้า 37 และ N.M.R. spectrum ของสาร ค. คังรูปที่ 15 และ 16 หน้า 40; 41 เมื่อทำ mixed melting point ของสารนี้กับ hydration product ของสาร ข. melting ไม่เปลี่ยนแปลง

2.5.3.2 การตรวจหา Functional group ของสาร ค.

การตรวจหา Functional group ของสาร ค. ตาม Standard method (17) ปรากฏว่าสาร ค. นี้ให้แก๊ส Hydrogen กับโลหะ Sodium เกิด ester กับ Acetic anhydride และ Benzoyl Chloride สาร ค. ฟอกสี Bromine in carbon tetrachloride และไม่ให้แก๊ส hydrogen bromide ฟอกสีสารละลาย $KMnO_4$ ไม่ให้ตะกอนเหลืองกับ 2,4 - dinitrophenylhydrazine ไม่ Reduce Tollen's reagent และ Fehling solution

2.5.3.3 การสังเคราะห์อนุพันธ์ของสาร ค.

จากการตรวจ IR. absorption peaks และจากการตรวจหา Functional group พบว่าสาร ค. มี — OH group จึงสังเคราะห์อนุพันธ์ โดยการทำ Acetylation (17)

นำสาร ค. จุกหลอมเหลว $131 - 132^{\circ}C$ จำนวน 150 มิลลิกรัมละลายใน Pyridine redistilled 3 มิลลิลิตร ในขวดก้นกลม 25 มิลลิลิตร เติม Acetic anhydride redistilled 5 มิลลิลิตร เขย่าแล้ว Reflux บน Water bath เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลง เทลงในน้ำป่นน้ำแข็งประมาณ 50 มิลลิลิตร แขน้ำเย็นนี้ในน้ำแข็งอีกทีหนึ่ง คนสารละลายให้ทั่วจะได้ตะกอนขาวเกิดขึ้น แล้วกรองตะกอนขาวออก ล้างตะกอนขาวด้วยน้ำกลั่นที่เป็นจักจนหมดกลั่น Pyridine และ Acetic acid อบให้ตะกอนแห้งจะได้ Crude derivative หนัก 168 มิลลิกรัม นำสารที่ได้ไปตกผลึกซ้ำหลาย ๆ ครั้งใน Ethyl acetate ผสม n-hexane เล็กน้อย จะได้ผลึกรูปเหลี่ยมสีขาวนวลจุกหลอมเหลว $133 - 134^{\circ}C$

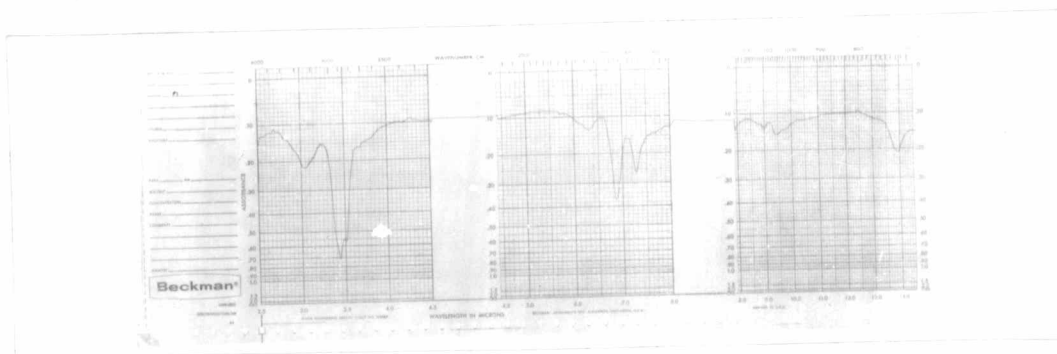
หนัก 110 มิลลิกรัม (Percentage yield = 56.22%) ผลการวิเคราะห์หา
เปอร์เซ็นต์ของธาตุมี

C = 62.96% ; H = 5.30%

สำหรับ Infrared spectrum ของ acetate ของสาร ค. ดังรูปที่ 8 หน้า 32
Absorption peaks ของ acetate ของสาร ค. ดังตารางที่ 12 หน้า 32
และ Ultraviolet spectrum ของ acetate ของสาร ค. ดังรูปที่ 13
หน้า 38

รูปที่ 1

IR. Spectrum ของสาร ก.



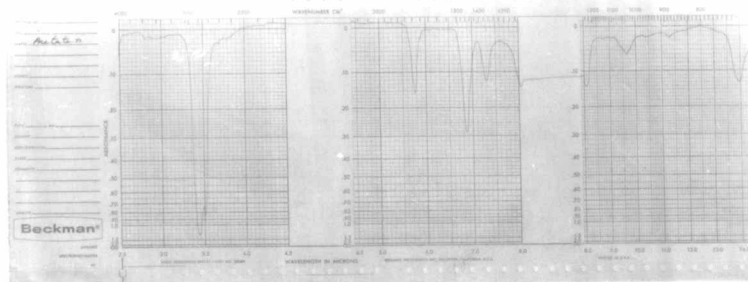
ตารางที่ 6 (19)

INFRARED ABSORPTION PEAKS ของสาร ก. m.p. 85-86°C

Frequency (cm ⁻¹)	Band Type.	Assignments
3400-3200	Very broad	Stretching vibration of polymeric OH
2905, 2835	Sharp	C-H stretching vibration of -CH ₂ -
1460	Very sharp	C-H bending vibration of -CH ₂ -; -CH ₃
1368	Sharp	C-CH ₃ symmetrical bending vibration
1050	Broad	C-O stretching vibration of primary alcohol
720	Sharp	-CH ₂ rocking vibration or (CH ₂) _n

รูปที่ 2

IR. Spectrum ของ acetate ของสาร ก.



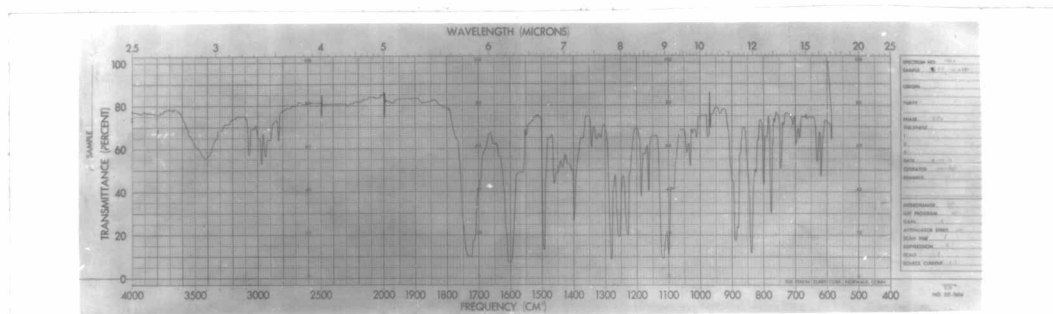
ตารางที่ 7 (19)

INFRARED ABSORPTION PEAKS ของ ACETATE ของสาร ก. m.p. 72-73°C

Frequency (cm^{-1})	Band Type	Assignments.
2905, 2835	Sharp	C-H stretching vibration of $-\text{CH}_2-$
1745	Very sharp	Stretching vibration of normal saturated ester
1465	Very sharp	C-H bending vibration of $-\text{CH}_2-$; $-\text{CH}_3$
1368	Sharp	C- CH_3 symmetrical bending vibration
1240, 1040	Sharp	C-O asymmetrical stretching vibration of acetate = C-O-C (so called "acetate" band)
720	Sharp	$-\text{CH}_2$ rocking vibration or $(\text{CH}_2)_n$

รูปที่ 3

IR. Spectrum ของสาร ข.



ตารางที่ 8 (19)

INFRARED ABSORPTION PEAKS ของสาร ข. m.p. 120-121°C

Frequency (cm^{-1})	Band Type	Assignment
3080-3075	Broad (medium)	C-H stretching vibration of $-\text{CH}=\text{CH}-$ in aromatic ring
2970, 2940, 2830	Sharp	C-H stretching vibration of $-\text{CH}_2-$; $-\text{CH}_3$
1745 - 1735	Broad (Strong)	Ester stretching vibration of α, β - unsaturated of δ -lactones
1600, 1495, 1460	Sharp (Strong)	C-C multiple bond stretching vibration of unsaturated and aromatic system

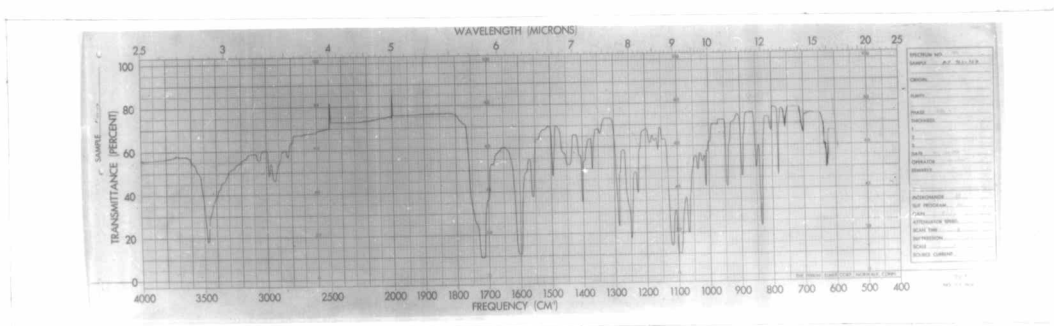
(19)
ตารางที่ 8 (ต่อ)

INFRARED ABSORPTION PEAKS ของสาร พ. m.p. 120-121°C

Frequency (cm^{-1})	Band Type	Assignment
1400	Very sharp (Strong)	C-H bending vibration of $=\text{CH}_2$; $=\text{CH}-$
1345, 1285, 1260 1230, 1045, 1010	Very sharp Sharp	C-O asymmetric stretching vibration of acetate $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$; and epoxide system. (1260 cm^{-1})
1188, 1165	Very sharp	Asymmetric stretching vibra- tion of ester type $\text{R}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_3$
1120, 1100	Sharp	C-O stretching of secondary alcohol
975, 969	Broad	C-H out of plane bending vibration of trans $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$
890	Sharp	C-H out of plane bending vibration of gem. $\text{R}_1\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$ and to the terminal methylene group
840, 800	Sharp (Strong)	C-H out of plane bending vibration of alkene trisub- stituted type $\text{R}_2\text{C}=\text{CH}\cdot\text{R}$ (two adjacent H-atom)
780	Very sharp	C-H out of plane bending vibration of aromatic sub- stituted type, $\text{C}=\text{C}$ (Three adjacent H-atom)
745, 710	Sharp	$-\text{CH}_2$ rocking vibration

รูปที่ 4

IR. Spectrum ของ methyl ether ของสาร ข.



ตารางที่ 9 (19)

INFRARED ABSORPTION PEAKS ของ METHYL ETHER ของสาร ข. m.p. 153-154°C

Frequency (cm^{-1})	Band Type	Assignment
3470	Sharp (medium)	O-H stretching vibration of intramolecular H-bonded single bridge compounds
3060	Broad	C-H stretching vibration of -C = CH- in aromaticity
2980, 2940, 2830	Broad	C-H stretching vibration of -CH ₂ -; -CH ₃
1745 - 1735	Broad	Ester stretching vibration of α, β unsaturated δ - lactone

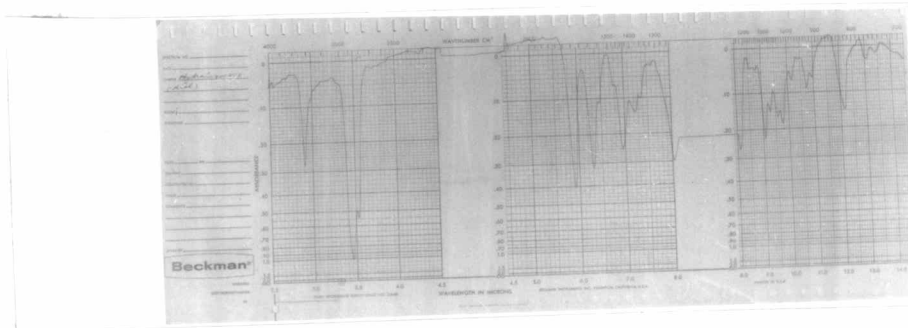
ตารางที่ 9⁽¹⁹⁾ (ต่อ)

INFRARED ABSORPTION PEAKS ของ METHYL ETHER ของสาร T m.p. 153-154°C

Frequency (cm^{-1})	Band Type	Assignment
1600, 1495, 1445	Sharp	C-C multiple bond stretching vibration of unsaturated and aromatic system.
1560	Sharp	Ketone stretching vibration of enolic
1400	Very sharp	C-H bending vibration of = CH_2 , = CH-
1370	Very sharp	C- CH_3 symmetrical bending vibration
1345, 1285, 1250 1010	Sharp	C-O asymmetrical stretching vibration of acetate=C-O-C
1185, 1175, 1160	Broad	Asymmetric stretching of ester type R-CO-O- CH_3
1120, 1100	Broad	C-O stretching of secondary alcohol
945	Very sharp	C-H out of plane bending vibration of trans R-CH = CH - R
895	Very sharp	C-H bending vibration of gem. $\text{R}_1\text{R}_2\text{C} = \text{CH}_2$
850, 835, 800	Sharp	C-H out of plane bending vibration of alkene trisubstituted typed $\text{R}_2\text{C} = \text{CHR}$.
780, 760	Very sharp	C-H out of plane bending vibration of aromatic substitute typed C=C(CH)
750	Very sharp	- CH_2 rocking vibration

รูปที่ 5

IR. Spectrum ของ hydrate ของสาร ๗.



ตารางที่ 10 (19)

INFRARED ABSORPTION PEAKS ของ HYDRATE ของสาร ๗. m.p. 130-132°C

Frequency (cm^{-1})	Band Type	Assignment
3475-3495	Broad	O-H stretching vibration inter-molecular H-bonded single bridge compounds.
2960, 2930 2900, 2830	Broad	C-H stretching vibration of α, β unsaturated δ -lactone
1600, 1495, 1460	Sharp	C-C multiple bond stretching vibration of unsaturated and aromatic system
1555 - 1560	Broad	Ketom stretching vibration of enolic
1430-1440	Broad	C-H bending vibration of $-\text{CH}_2$; $-\text{CH}_3$
1400	Sharp	C-H bending vibration of $=\text{CH}_2$; $=\text{CH}-$

(19)
 ตารางที่ 10 (ต่อ)

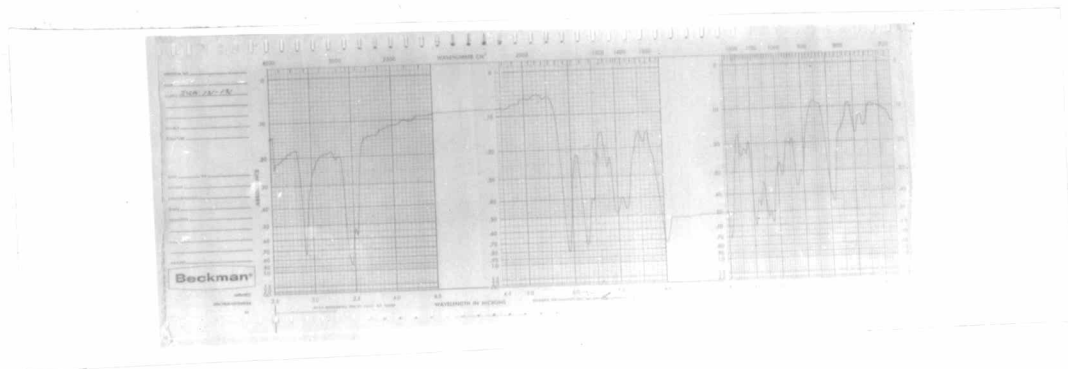
INFRARED ABSORPTION PEAKS ของ HYDRATE ของสาร พ. m.p. 130-132°C

Frequency (cm^{-1})	Band Type	
1280, 1260, 1245 1038, 1015	Sharp	C-O asymmetric stretching of acetate = C - O - C
1185, 1160	Sharp	Asymmetric stretching of ester type R-CO-O-CH ₃
1120, 1095, 1016	Sharp	C-O stretching vibration of secondary alcohol
995, 969, 945 925	Sharp	C-H out of plane bending vibration of trans R-CH=CH-R
835, 800	Very sharp	C-H out of plane bending vibration of alkene trisubstituted type R ₂ C = CH.R (two adjacent H-atoms)
780, 760	Very sharp (Strong)	C-H out of plane bending vibration of aromatic substituted type C=C(CH) (three adjacent H-atoms)
700	Broad	-CH ₂ rocking vibration

รูปที่ 6

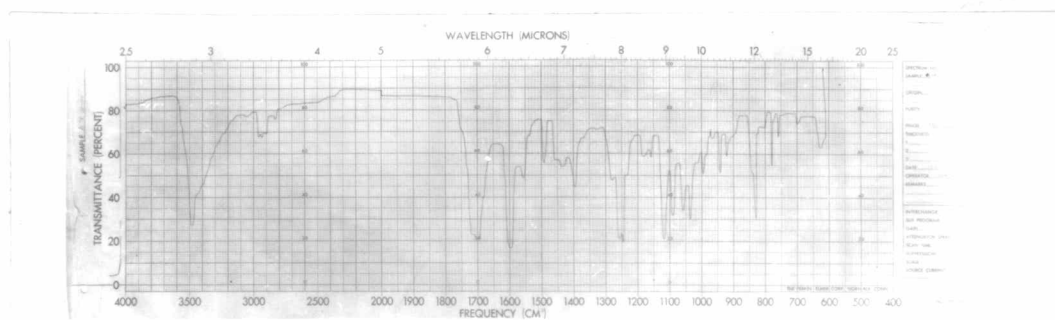
IR. Spectrum ของสาร ค. (Beckmann spect)

(ดูเปรียบเทียบกับ IR. Spectrum ของ hydration ของสาร ข.)



รูปที่ 7

IR. Spectrum ของสาร ค. (Perkin-Elmer 421 spect)



ตารางที่ 11 (19)

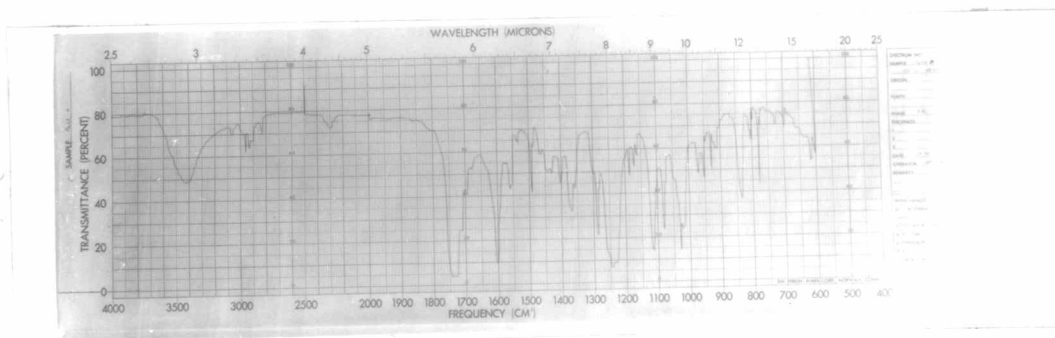


INFRARED ABSORPTION PEAKS ของสาร ค. m.p. 131-132°C

Frequency (cm^{-1})	Band Type	Assignment
3475 - 3495	Broad	O-H stretching vibration intermolecular H-bonded single bridge compounds
2960, 2930, 2900 2830	Broad	C-H stretching vibration of $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$.
1700 - 1740	Broad	Ester stretching vibration of α, β -unsaturated δ -lactone
1600, 1495, 1460	Sharp	C-C multiple bond stretching vibration of unsaturated and aromatic system.
1555-1560	Broad	Ketone stretching vibration of enolic
1430-1440	Broad	C-H bending vibration of $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$
1400	Sharp	C-H bending vibration of $=\text{CH}_2$, $=\text{CH}-$
1280, 1260, 1245 1038, 1015	Sharp	C-O asymmetric stretching of acetated $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$
1185, 1160	Sharp	Asymmetric stretching of ester type $\text{R}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_3$
1120, 1095, 1060	Sharp	C-O stretching of Secondary alcohol
995, 969, 945 925	Sharp	C-H out of plane bending vibration of trans $\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}$
835, 800	Very sharp	C-H out of plane bending of alkene trisubstituted type $\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$ (two adjacent H-atoms)
780, 760	Very sharp (Strong)	C-H out of plane bending vibration of aromatic substituted type $\text{C}=\text{C}$ (CH) (three adjacent H-atoms)
700	Broad	$-\text{CH}$ rocking vibration

รูปที่ 8

IR. Spectrum ของ acetate ของสาร ก.



ตารางที่ 12 (19)

INFRARED ABSORPTION PEAKS ของ ACETATE ของสาร ก. m.p. 133-134°C

Frequency (cm ⁻¹)	Band Type	Assignment
2960, 2930 2830	Sharp	C-H stretching vibration of -CH ₂ -, CH ₃
1725 - 1745	Broad	Ester stretching vibration of α,β-unsaturated δ - lactone
1600, 1495, 1465	Sharp	C-C multiple bond stretching vibration of unsaturated and aromatic system
1560, 1535	Broad	Ketone stretching vibration of enolic
1445, 1430	Broad (Weak)	C-H bending vibration of -CH ₂ -, -CH ₃
1400	Sharp	C-H bending vibration of =CH ₂ , =CH-

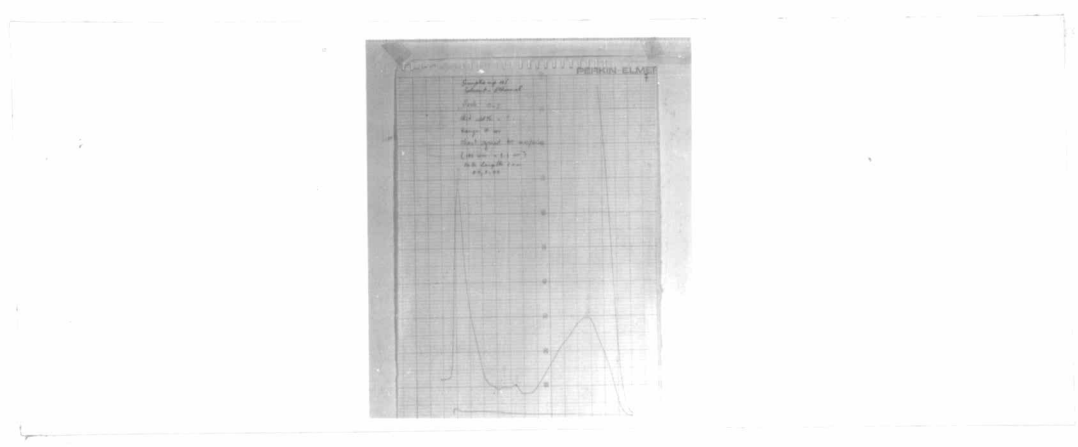
(19)
ตารางที่ 12 (ต่อ)

INFRARED ABSORPTION PEAKS ของ ACETATE ของสาร มี m.p. 133-134°C

Frequency (cm^{-1})	Band Type	Assignment
1370, 1360	Broad	C-CH ₃ symmetrical bending vibration
1288, 1030	Very sharp	} C-O asymmetrical stretching of acetate =C-O-C (so called acetate band)
1245, 1025	Broad	
1188, 1175, 1165	Very sharp	Asymmetrical stretching of ester type R-CO-O-CH ₃
1115, 1085	Very sharp	C-O stretching of secondary alcohol
975, 950, 925 915	Very sharp	C-H out of plane bending vibration of trans R-CH=CH-R
835, 800	Sharp	C-H out of plane bending vibration of alkene trisubstituted type R ₂ C=CHR (two adjacent H-atoms)
780	Very sharp (Strong)	C-H out of plane bending vibration of aromatic substituted type C=C(CH) (three adjacent H-atoms)
725, 700	Sharp	-CH ₂ rocking vibration

รูปที่ 9

U.V. Spectrum ของสาร ข. ใน ethanol



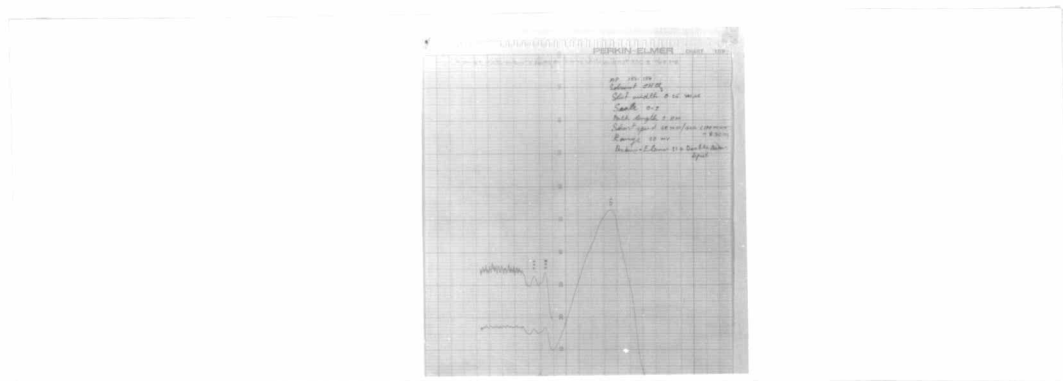
คำนวณหาค่า ϵ ได้ดังนี้

- ที่ λ_{max} 246 โคน $\log \epsilon$ 3.66
- ที่ λ_{max} 256 โคน $\log \epsilon$ 3.70
- ที่ λ_{max} 322 โคน $\log \epsilon$ 4.18

แสดงว่าสารนี้มี Coumarin chromophore

รูปที่ 10

U.V. Spectrum ของ methyl ether ของสาร ข.ใน chloroform



คำนวณค่า ϵ ได้ดังนี้

ที่ λ_{\max} 248 ได้ $\log \epsilon$ 3.77

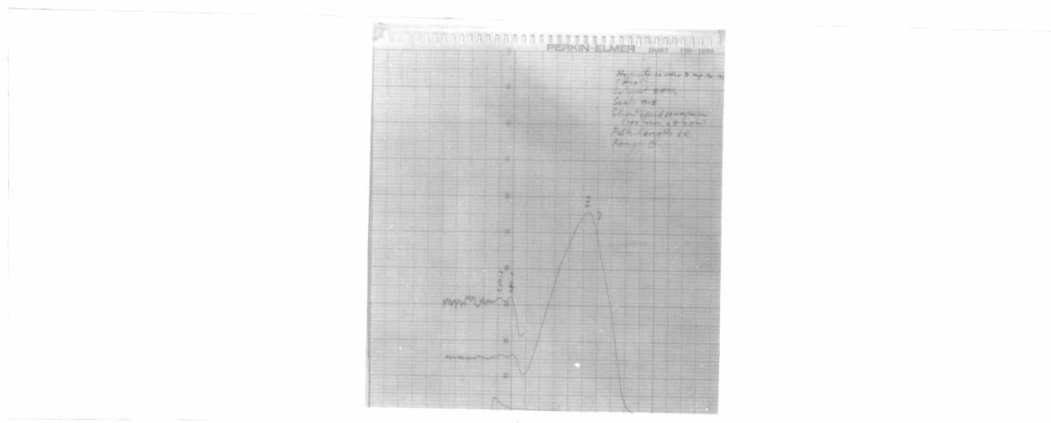
ที่ λ_{\max} 258 ได้ $\log \epsilon$ 3.80

ที่ λ_{\max} 322 ได้ $\log \epsilon$ 4.13

แสดงว่าสารนี้มี Coumarin chromophore

รูปที่ 11

U.V. Spectrum ของ hydrate ของสาร ข.โน chloroform

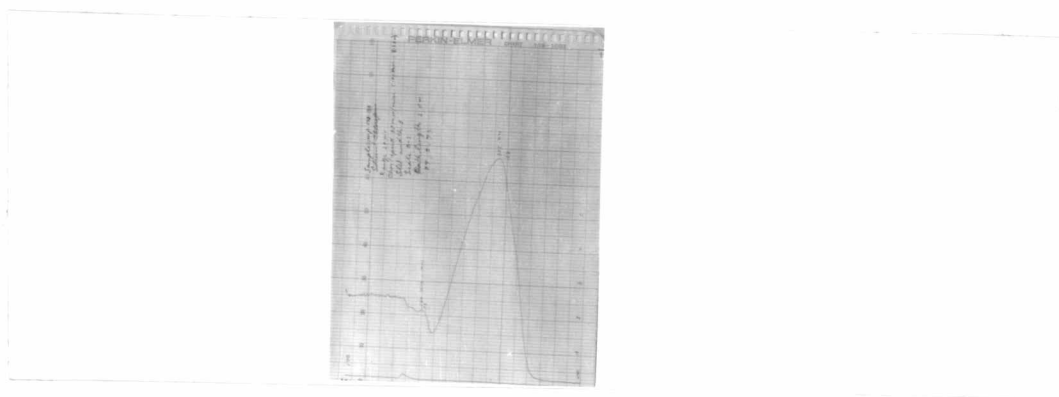


ค่าความหนาแน่น	ϵ	ค่า λ_{max}	ค่า $\log \epsilon$
ที่ λ_{max} 248	ได้	3.67	
ที่ λ_{max} 258	ได้	3.69	
ที่ λ_{max} 322	ได้	4.17	

แสดงว่าสารนี้มี Coumarin chromophore

รูปที่ 12

U,V. Spectrum ของสาร ค. ใน chloroform

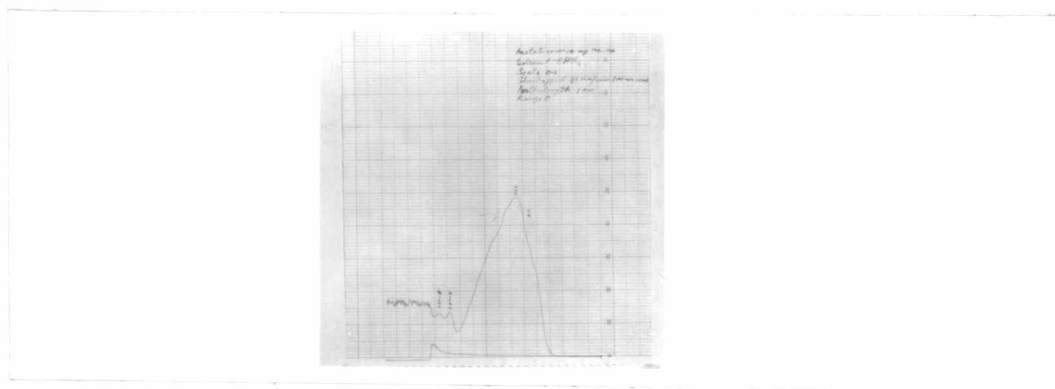
คำนวณหาค่า ϵ ได้ดังนี้

ที่ λ max	248	ได้ $\log \epsilon$	3.79
ที่ λ max	250	ได้ $\log \epsilon$	3.81
ที่ λ max	322	ได้ $\log \epsilon$	4.22

แสดงว่าสารนี้มี Coumarin chromophore

รูปที่ 13

U.V. Spectrum ของ acetate ของสาร ค. ใน chloroform



คำนวณหาค่า E ได้ดังนี้

ที่ λ max 243 ได้ $\log E$ 3.27

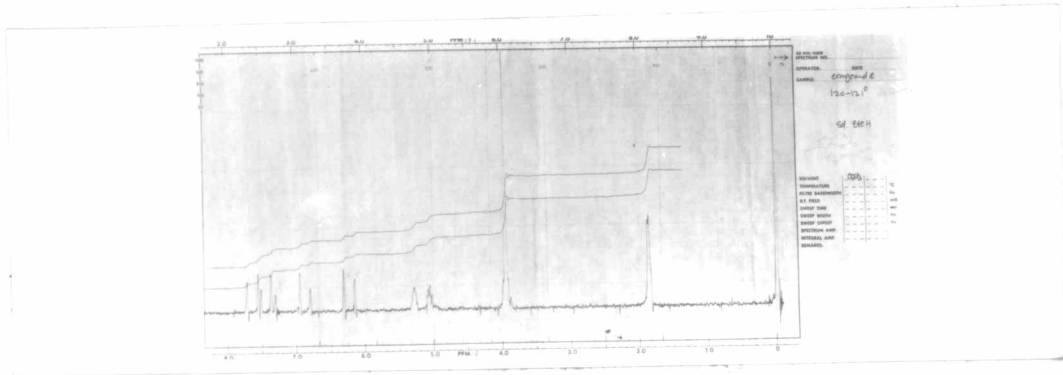
ที่ λ max 258 ได้ $\log E$ 3.32

ที่ λ max 322 ได้ $\log E$ 4.16

แสดงว่าสารนี้มี Coumarin chromophore

รูปที่ 14

N.M.R. Spectrum ของสาร พ. m.p. 120-121°C

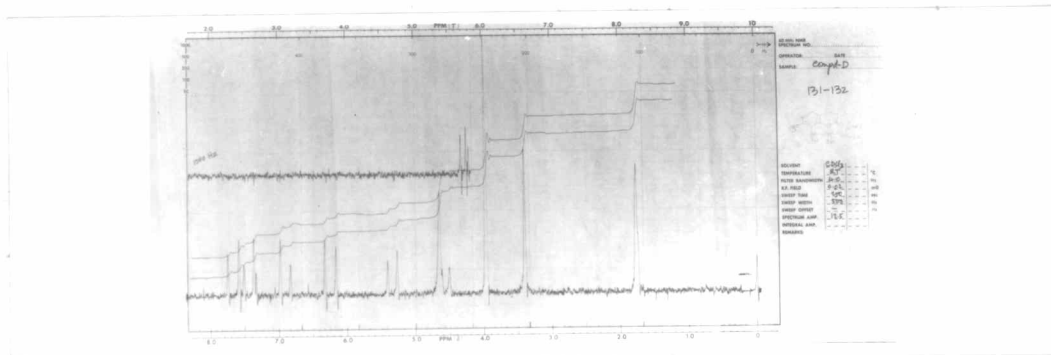


จากการคำนวณหา Proton ทั้งหมดได้ 14H. มี N.M.R. signal ของ protons ต่าง ๆ ดังนี้

3H ที่ δ	1.80	เป็นชนิด $-\text{CH}_3$
5H ที่ δ	3.95 (singlet)	เป็นชนิด $-\text{OCH}_3$; $-\text{CH}-\text{CH}-$
2H ที่ δ	5.12 (multiplet)	เป็นชนิด $=\text{CH}_2$
1H ที่ δ	6.25 (doublet)	เป็น proton ของ aromatic
1H ที่ δ	6.85 (doublet)	" " " "
1H ที่ δ	7.41 (doublet)	" " " "
1H ที่ δ	7.60 (doublet)	" " " "

รูปที่ 15

N.M.R. Spectrum ของสาร ก. m.p. 131 - 132°C

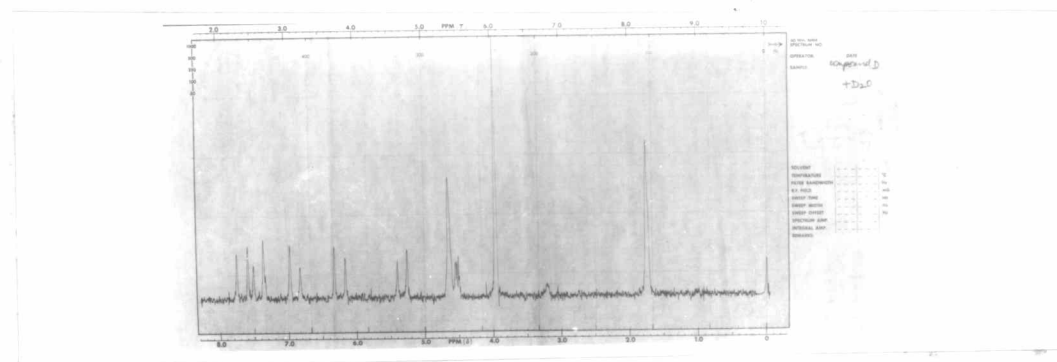


จากการคำนวณ Proton ทั้งหมดได้ 16H. มี N.M.R. signal ของ protons ต่าง ๆ ดังนี้.-

3H	ที่	δ	1.75	เป็นซิกนัล	-CH ₃
2H	ที่	δ	3.40	(singlet)	เป็นซิกนัล -OH.
3H	ที่	δ	3.99	(singlet)	เป็นซิกนัล -OCH ₃
3H	ที่	δ	4.55	(multiplet)	เป็นซิกนัล = CH ₂ และ -CH-
1H	ที่	δ	5.35	(doublet)	เป็นซิกนัล -CH-
1H	ที่	δ	6.20	(doublet)	เป็น proton ของ aromatic
1H	ที่	δ	6.89	(doublet)	" " " "
1H	ที่	δ	7.45	(doublet)	" " " "
1H	ที่	δ	7.68	(doublet)	" " " "

รูปที่ 16

N.M.R. Spectrum ของสาร ค.ม.ป. 1131-132°C



เนื่องจากสาร ค.นี้มี -OH อยู่ข้างจึงทำ N.M.R. ใน $CDCl_3$ ซึ่งเกิด exchange ระหว่าง proton ของ -OH กับ deuterium ใน solvent ปรากฏว่า 2H ของ -OH ในสาร ค. ถูกแทนที่ด้วย deuterium หมด N.M.R. signal ของ -OH ไม่ปรากฏที่ δ 3.40 ส่วน N.M.R. signal ของ proton ทั่วอื่น ๆ นั้นยังอยู่ที่ตำแหน่งเดิม