

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

จุดหลอมเหลวของสารวัดด้วยเครื่อง Electrothermal melting point (Electrothermal 9100) ใช้หน่วยเป็นองศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$)

อินฟราเรดสเปกตรัม(Infrared spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง Perkin-Elmer FT-IR 783 โดยใช้ KBr มีหน่วยเป็น wave number (cm^{-1})

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม (Nuclear Magnetic Resonance spectrum) บันทึกด้วยเครื่อง FT-NMR 500 MHz Varian UNITY INOVA และ FT-NMR 300 MHz Bruker โดยใช้ Tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิง และใช้ตัวทำละลาย deuteriochloroform และ pentadeuteropyridine ในการเตรียมสารตัวอย่าง บอกตำแหน่งสัญญาณเรโซแนนซ์ (resonance signal) ด้วยสัญญาณของ chemical shift parameter, δ (ppm) และใช้สัญลักษณ์ *s* (singlet), *br* (broad), *d* (doublet), *t* (triplet), *dd* (doublet of doublet), *ddd* (doublet of doublet of doublet), *brd* (broad doublet), *brdd* (broad doublet of doublet), *tt* (triplet of triplet) และ *m* (multiplet)

วิธีดำเนินการ

การสกัด

นำกิ่งและต้นของอัครีทวาร (*Clerodendrum serratum*) ที่เก็บมาจากบริเวณใกล้โรงเรียนควนกาหลง จังหวัดสตูล มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตากให้แห้งน้ำหนัก 6.2 กิโลกรัม และสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล 4 ครั้ง ๆ ละ 23.5 ลิตร โดยแช่ไว้ที่อุณหภูมิห้องครั้งละ 7 วัน จากนั้นนำไปกรอง และนำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออกภายใต้เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน ได้ส่วนสกัดหยาบเมทานอลซึ่งมีลักษณะเป็นของหนืดสีน้ำตาลหนัก 379.43 กรัม

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

1. การศึกษาความสามารถในการละลายของส่วนสกัดหยาบเมทานอล โดยการนำส่วนสกัดหยาบเมทานอลมาเท้ามล็ดถั่วเขียวใส่ลงไป ในหลอดทดลองขนาดเล็กและเติมตัวทำละลายลงไปประมาณ 1 มิลลิลิตร ผลการทดสอบดังแสดงใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความสามารถในการละลายของส่วนสกัดหยาบเมทานอลในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	สภาพการละลาย	ลักษณะทางกายภาพ
Petroleum ether	+	สารละลายใสสีเหลืองอ่อน
CHCl_3	+	สารละลายใสสีเหลืองอ่อน
EtOAc	+	สารละลายใสสีเหลืองอ่อน
CH_3OH	++	สารละลายใสสีเหลืองอ่อนและมีตะกอนสีเหลือง
H_2O	++	สารละลายสีน้ำตาลอ่อน
10% HCl	++	สารละลายสีน้ำตาลอ่อน
10% NaOH	+++	สารละลายสีเหลืองเข้ม
10% NaHCO_3	+++	สารละลายสีน้ำตาลอ่อน

หมายเหตุ + ละลายได้เล็กน้อย
 ++ ละลายได้ดี
 +++ ละลายได้ดีมาก

จากผลการทดสอบความสามารถในการละลายพบว่าส่วนสกัดหยาบเมทานอลเป็นสารที่มีขี้ และมีความเป็นกรดอ่อน

2. การแยกสารให้บริสุทธิ์

นำส่วนสกัดหยาบเมทานอล 104.51 กรัม มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (quick column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวอยู่กับที่ และเริ่มชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตทต่อเฮกเซน เอทิลอะซิเตท เมทานอลต่อเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ (โดยเริ่มจากตัวทำละลายที่ไม่มีขี้ไปจนถึงตัวทำละลายที่มีขี้) รongรับสารละลายแต่ละส่วนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยปริมาตรของสารละลาย 40 มิลลิลิตร ตรวจสอบสารแต่ละส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) สามารถรวมส่วนที่มีลักษณะโครมาโทแกรมที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 17 ส่วน ดังแสดงใน ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากการนำส่วนสกัดขยายเมทานอลมาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว

ส่วนที่	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
1	0.0235	ของแข็งใสไม่มีสี
2	0.0080	ของแข็งใสไม่มีสี
3	0.0036	ของแข็งสีเหลือง
4	0.5937	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเหลือง
5	0.0590	ของเหลวหนืดสีเหลือง
6	0.0699	ของแข็งสีเหลือง
7	1.1185	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเหลือง
8	0.3905	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียว
9	0.3342	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียว
10	0.4227	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียว
11	1.2458	ของเหลวหนืดสีเขียว
12	0.6467	ของเหลวหนืดสีเขียว
13	2.8728	ของเหลวหนืดสีเขียว
14	4.5604	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียว
15	24.8728	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง
16	41.4955	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง
17	9.2434	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง

ส่วนที่ 1 เป็นของแข็งใสไม่มีสี (23.5 มิลลิกรัม) จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็นเฮกเซนจะเห็นจุดของสาร โดยการส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเห็นเป็นจุดสีม่วงมีค่าคงที่ของการเคลื่อนที่ (R_f) = 0.77 และเมื่อสเปรย์ด้วย 0.5% วานิลีนในกรดซัลฟูริก-เอทานอล (4:1) จะเห็นจุดของสารมีสีม่วงเข้มมีค่า R_f = 0.75 ซึ่งซ้อนทับกันกับจุดที่มองเห็นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต หลังจากที่ทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้าที่ 100°C ประมาณ 5 นาที เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยไม่เกิดการแยกของสารจึงไม่สนใจที่จะทำการศึกษาต่อ

ส่วนที่ 2 เป็นของแข็งใสไม่มีสี (8.0 มิลลิกรัม) จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็นเฮกเซนเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จะเห็นลักษณะของสารชัดเป็นแถบขาว

และเมื่อสเปรย์ด้วยวานิลินจะเห็นจุดสีม่วง 1 จุด มีค่า $R_f = 0.48$ ที่ซ้อนทับกันหลังจากที่ทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้า เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยและไม่เห็นการแยกของสารจึงไม่สนใจที่จะทำการศึกษาค่า

ส่วนที่ 3 เป็นของแข็งสีเหลือง (3.6 มิลลิกรัม) จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง โดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็นเฮกเซน เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเห็นลักษณะของสารยึกเป็นแถบขาว เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยและไม่เห็นการแยกของสารจึงไม่สนใจที่จะทำการศึกษาค่า

ส่วนที่ 4 เป็นของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเหลือง (593.7 มิลลิกรัม) จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางโดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็นเฮกเซนเมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จะเห็นจุดของสารที่ยึกเล็กน้อย 2 จุดที่แยกจากกัน มีค่า $R_f = 0.22$ และ 0.06 ตามลำดับ และเมื่อสเปรย์ด้วยวานิลินจะเห็นจุดสีม่วงที่ยึกเล็กน้อย 2 จุด จุดแรกมีค่า $R_f = 0.20$ และจุดที่สองจะเกิดขึ้นที่เดียวกันกับจุดที่เห็นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ค่า $R_f = 0.06$ หลังจากที่ทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้า นำส่วนที่ 4 ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวอยู่กับที่ และชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน และเอทิลอะซิเตต ตามลำดับ รongรับสารละลายแต่ละส่วนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยปริมาตรของสารละลาย 20 มิลลิลิตร ตรวจสอบแต่ละส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง และรวมส่วนที่มีลักษณะโครมาโทแกรมที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 8 ส่วนย่อย ดังแสดงใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงส่วนย่อยต่าง ๆ ที่แยกได้จากการนำส่วนที่ 4 มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
A1	0.9	ของเหลวหนืดใสไม่มีสี
A2	0.1	ของเหลวหนืดสีเหลือง
A3	371.2	ของเหลวสีเหลือง
A4	34.0	ของเหลวสีเหลือง
A5	67.2	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
A6	56.1	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
A7	13.8	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล
A8	14.6	ของแข็งปนกับของเหลวสีเหลือง

นำส่วนย่อย A3 ซึ่งเป็นของเหลวสีเหลือง (371.2 มิลลิกรัม) ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวอยู่กับที่ และชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตตต่อเฮกเซน และเอทิลอะซิเตตตามลำดับ รongรับสารละลายแต่ละส่วนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตรวจสอบแต่ละส่วน

ด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง และรวมส่วนที่มีลักษณะ โครมาโทแกรมที่เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ทั้งหมด 6 ส่วน ดังแสดงใน ตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากการนำส่วนย่อย A3 มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนที่	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
B1	193.1	ของเหลวสีเหลือง
B2	147.1	ของเหลวสีเหลือง
B3	1.0	ของเหลวหนืดสีเหลือง
B4	0.9	ของแข็งปนกับของเหลวสีเหลือง
B5	0.2	ของเหลวหนืดสีเหลือง
B6	1.0	ของเหลวหนืดสีเหลือง

นำส่วน B1 และ B2 มารวมกัน ซึ่งเป็นของเหลวสีเหลือง (304.2 มิลลิกรัม) มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทำการตกผลึกซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล ได้ของแข็งสีขาว หนัก 2.0 มิลลิกรัม จากข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม 500 MHz ตรงกับสารประกอบ CS-S3

สารประกอบ CS-S3

เป็นของแข็งสีขาว แสดงค่าสเปซฟิฟโรเทชัน ($[\alpha]_D^{30} +34.00^\circ$ ในคลอโรฟอร์ม เข้มข้น $1.00 \times 10^{-2} \text{ g/cm}^3$ มีค่า $R_f = 0.42$ (3% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน จำนวน 4 ครั้ง) มีจุดหลอมเหลว $199.0-202.0^\circ \text{ C}$ โดยมีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีดังต่อไปนี้

IR (KBr) ν (cm^{-1})	2937, 2863 (C-H stretching), 1709 (C=O stretching)
(รูปที่ 18)	
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) (δ ppm)	5.29 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 1H), 2.72 (ddd, $J = 15.5, 13.5$ และ 6.5 Hz , 1H), 2.40 (ddd, $J = 15.5, 5.5$ และ 3.5 Hz , 1H), 2.09 (ddd, $J = 13.5, 6.5$ และ 3.5 Hz , 1H), 2.07 (m, 1H), 1.86 (m, 1H), 1.78 (m, 1H), 1.70 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.46 (m, 1H), 1.44 (m, 1H), 1.38 (m, 1H), 1.35 (m, 1H), 1.34 (m, 1H), 1.30 (m, 1H), 1.26 (m, 1H), 1.24 (m, 1H), 1.23 (m, 2H), 1.21 (s, 3H), 1.07 (s, 6H), 0.98 (m, 1H), 0.89 (d, $J = 6.5 \text{ Hz}$, 3H), 0.83 (d, $J = 6.0 \text{ Hz}$, 3H), 0.81
(500 MHz)	
(รูปที่ 19)	

		(s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.77 (s, 3H)
¹³ C NMR (CDCl ₃) (δ ppm)		217.30, 147.41, 115.61, 59.59, 53.26, 51.99, 47.64,
(125 MHz)		42.80, 41.04, 39.30, 38.18, 36.75, 36.64, 36.07, 35.86,
(รูปที่ 20)		34.89, 30.77, 29.62, 28.18, 26.27, 25.53, 22.99, 22.57,
		22.10, 22.04, 21.64, 20.15, 16.95, 15.29, 13.98
DEPT 135 ⁰	CH ₃ :	25.53, 22.99, 22.10, 22.04, 21.64, 16.95, 15.29, 13.98
(รูปที่ 21)	CH ₂ :	36.64, 36.07, 35.86, 34.89, 29.62, 28.18, 26.27, 22.57,
		20.15
	CH :	115.61, 59.59, 53.26, 51.99, 41.04, 30.77

ส่วนที่ 5 และ 6 เป็นของเหลวหนืดสีเหลือง (59.0 และ 69.9 มิลลิกรัม) จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางโดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 4% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน จำนวน 6 ครั้ง เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จะเห็นจุดของสาร 2 จุด มีค่า R_f = 0.31 และ 0.25 ตามลำดับ และเมื่อสเปรย์ด้วยวานิลิน จะเห็นจุดสีม่วงของสาร 3 จุด มีค่า R_f = 0.42 0.37 และ 0.27 ตามลำดับ และเห็นเป็นแถบขีดของสารหลังจากที่ทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้า เนื่องจากสารมีปริมาณน้อยและเห็นจุดของสารไม่ชัดเจน และมีหลายจุดจึงไม่สนใจทำการศึกษต่อ

ส่วนที่ 7 เป็นของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเหลือง (1.1185 กรัม) จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางโดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 10% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน จำนวน 7 ครั้ง เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตไม่เห็นจุดของสาร แต่เมื่อสเปรย์ด้วยวานิลินจะเห็นจุดสีม่วงของสาร 4 จุด มีค่า R_f = 0.69 0.48 0.38 และ 0.33 ตามลำดับ หลังจากที่ทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้า นำส่วนที่ 7 ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ครั้ง และทำการตกผลึกซ้ำด้วยไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล ได้ผลึกใสไม่มีสี หนัก 34.3 มิลลิกรัม จากข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม 500 MHz ตรงกับสารประกอบ CS-S1 (spinasterol) โดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากวารสาร (Kojima, H.; *et al.*, 1990)

สารประกอบ CS-S1

เป็นผลึกใสไม่มีสี แสดงค่าสเปซฟิสิกโรเทชัน ($[\alpha]_D^{30} +10.91^{\circ}$ ในคลอโรฟอร์ม เข้มข้น 1.10×10^{-2} g/cm³ มีค่า R_f = 0.34 (30% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน) มีจุดหลอมเหลว 156.5-159.5⁰ ซ โดยมีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีดังต่อไปนี้

IR (KBr) V (cm ⁻¹)	3454 (O-H stretching), 2945, 2871 (C-H stretching)
(รูปที่ 2)	

¹ H NMR (CDCl ₃) (δ ppm)	5.16 (dd, J = 15.0 และ 8.5 Hz, 1H), 5.16 (d, J = 6.5 Hz,
---	--

(500 MHz)		1H), 5.03 (<i>dd</i> , $J = 15.0$ และ 8.5 Hz, 1H), 3.61 (<i>tt</i> , $J =$
(รูปที่ 3)		11.0 และ 4.5 Hz, 1H), 2.03 (<i>m</i> , 1H), 1.80 (<i>m</i> , 1H), 1.79
		(<i>m</i> , 2H), 1.74 (<i>m</i> , 2H), 1.70 (<i>m</i> , 1H), 1.64 (<i>m</i> , 1H), 1.59
		(<i>m</i> , 1H), 1.53 (<i>m</i> , 1H), 1.52 (<i>m</i> , 1H), 1.44 (<i>m</i> , 1H), 1.37
		(<i>m</i> , 1H), 1.36 (<i>m</i> , 1H), 1.34 (<i>m</i> , 2H), 1.30 (<i>m</i> , 1H), 1.25
		(<i>m</i> , 2H), 1.24 (<i>m</i> , 1H), 1.22 (<i>m</i> , 1H), 1.06 (<i>m</i> , 1H), 1.03
		(<i>d</i> , $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.85 (<i>d</i> , $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.80 (<i>d</i> ,
		$J = 6.0$ Hz, 3H), 0.81 (<i>t</i> , $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.80 (<i>s</i> , 3H),
		0.55 (<i>s</i> , 3H)
¹³ C NMR (CDCl ₃) (δ ppm)		139.55, 138.17, 129.39, 117.44, 71.05, 55.84, 55.10,
(125 MHz)		51.23, 49.40, 43.26, 40.84, 40.22, 39.42, 37.96, 37.11,
(รูปที่ 4)		34.19, 31.86, 31.45, 29.61, 28.51, 25.39, 23.00, 21.52,
		21.36, 21.10, 18.97, 13.04, 12.25, 12.03
DEPT 135 ⁰	CH ₃ :	21.36, 21.10, 18.97, 13.04, 12.25, 12.03
(รูปที่ 5)	CH ₂ :	39.42, 37.96, 37.11, 31.45, 29.61, 28.51, 25.39, 23.00,
		21.52
	CH :	138.17, 129.39, 117.44, 71.05, 55.84, 55.10, 51.23,
		49.40, 40.84, 40.22, 31.86

ส่วนที่ 8 และ 9 เป็นของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียว (390.5 และ 334.2 มิลลิกรัม) จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางโดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 4% อะซิโตนในเฮกเซน เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเห็นจุดของสารที่ยึดเล็กน้อย และมีสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วยวานิลิน มีค่า $R_f = 0.25$ และยังมีจุดของสารที่เห็นเป็นสีม่วงเมื่อสเปรย์ด้วยวานิลินเพียงอย่างเดียวมีค่า $R_f = 0.39$ และนอกจากนี้ยังมีแถบยึดของสารหลังจากที่ทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้า นำส่วนที่ 8 และ 9 มารวมกัน (724.7 มิลลิกรัม) และตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล ได้ผลึกรูปเข็มใสไม่มีสี หนัก 33.0 มิลลิกรัม มีค่า $R_f = 0.35$ (20% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน 3 ครั้ง) ซึ่งเป็นสารตัวเดียวกันกับที่ได้จากส่วนที่ 7 คือ CS-S1 และส่วนที่เป็น mother liquor (691.7 มิลลิกรัม) นำไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวอยู่กับที่ และชะด้วย 20% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน และเพิ่มขั้วจนถึง 100% เอทิลอะซิเตท และ 25% เมทานอลในเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ รวบรวมสารละลายแต่ละส่วนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยปริมาตรของสารละลาย 10 มิลลิลิตร ตรวจสอบสารแต่ละส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางสามารถรวมส่วนที่มีลักษณะของโครมาโทแกรมที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 16 ส่วนย่อย ดังแสดงใน ตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงส่วนย่อยต่าง ๆ ที่แยกได้จากการนำ mother liquor ของ ส่วนที่ 8 และ 9 มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
C1	0.3	ของเหลวหนืดสีขาว
C2	18.8	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
C3	28.6	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลอ่อน
C4	22.0	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียวปนเหลือง
C5	40.7	ของแข็งสีเขียวอ่อน
C6	22.1	ของแข็งสีเขียวอ่อน
C7	36.7	ของแข็งสีเขียวอ่อน
C8	11.5	ของแข็งสีเขียวเข้ม
C9	13.5	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียวปนเหลือง
C10	21.4	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียวปนเหลือง
C11	4.9	ของเหลวหนืดสีเขียว
C12	14.6	ของเหลวหนืดสีเขียว
C13	12.9	ของเหลวหนืดสีเขียว
C14	32.1	ของเหลวหนืดสีเขียว
C15	48.0	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม
C16	58.6	ของเหลวหนืดสีเขียวเข้ม

เนื่องจากสารที่ได้ใน ตารางที่ 6 มีปริมาณน้อย แต่จากลักษณะโครมาโทแกรมพบว่า มีจุดสารหลายจุดสาร จึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อ

ส่วนที่ 10 เป็นของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียว (422.7 มิลลิกรัม) จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางโดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 10% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน จำนวน 7 ครั้ง เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต พบจุดของสารมีค่า $R_f = 0.15$ และ 0.07 และจากสารสองจุดดังกล่าวเมื่อสเปรย์ด้วยวานิลินก็จะเห็นเป็นสีม่วงด้วย และมีจุดของสารที่มีค่า $R_f = 0.33$ ที่เกิดเป็นสีม่วงกับวานิลินเพียงอย่างเดียวหลังจากที่ทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้า เนื่องจากสารมีปริมาณน้อย และไม่เห็นการแยกของสารจึงไม่สนใจทำการศึกษาต่อ

ส่วนที่ 11-13 เป็นของหนืดสีเขียว จากผลการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางโดยใช้ตัวเคลื่อนที่เป็น 10% เมทานอลในไคลคลอโรมีเทน เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะไม่เห็นการแยกของสารนั้นคือ จะปรากฏเป็นแถบยัด ทั้งนี้เนื่องจากสารในส่วนนี้มีสภาพขี้ผึ้ง จึงไม่สนใจทำการศึกษาต่อ

ส่วนที่ 14 มีลักษณะเป็นของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียว (4.56 กรัม) นำไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวอยู่กับที่ และชะคอลัมน์ด้วยคลอโรฟอร์ม อะซิโตนต่อคลอโรฟอร์ม อะซิโตน เมทานอลต่ออะซิโตน และเมทานอล ตามลำดับ รวบรวมสารละลายแต่ละส่วนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยปริมาตรของสารละลาย 30 มิลลิลิตร ตรวจสอบสารแต่ละส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางสามารถรวมส่วนที่มีลักษณะของโครมาโทแกรมที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 15 ส่วนย่อย ดังแสดงใน ตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงส่วนย่อยต่าง ๆ ที่แยกได้จากการนำ ส่วนที่ 14 มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
D1	0.4	ของแข็งสีขาว
D2	0.3	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง
D3	0.7	ของเหลวหนืดสีเหลือง
D4	0.4	ของแข็งสีขาว
D5	4.6	ของแข็งสีขาว
D6	0.3	ของแข็งสีขาว
D7	4.1	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
D8	18.6	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีขาว
D9	2.6	ของแข็งสีขาว
D10	11.9	ของแข็งสีขาว
D11	19.2	ของแข็งสีขาว
D12	7.5	ของแข็งสีขาวปนเหลือง
D13	1.0	ของแข็งสีขาว
D14	2.7	ของแข็งสีขาว
D15	13.0	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีน้ำตาล

นำส่วนย่อย D5 ซึ่งเป็นของแข็งสีขาว (4.6 มิลลิกรัม) ไปตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล ได้ของแข็งสีขาวหนัก 1.6 มิลลิกรัม เป็นสารตัวเดียวกันกับที่ได้จากส่วนที่ 7 คือ CS-S1

นำส่วนย่อย D8 ซึ่งเป็นของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีขาว (18.6 มิลลิกรัม) ไปตกผลึกด้วย คลอโรฟอร์มต่ออะซิโตน ได้ของแข็งเป็นเกล็ดเล็ก ๆ สีขาว หนัก 12.5 มิลลิกรัม มีค่า $R_f = 0.12$ (40% อะซิโตนในคลอโรฟอร์ม จำนวน 4 ครั้ง) จากข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ตรงกับสารประกอบ CS-S4

สารประกอบ CS-S4

เป็นของแข็งสีขาว แสดงค่าสเปซฟิฟิโรเทชัน ($[\alpha]_D^{29} -90.00^{\circ}$ ในคลอโรฟอร์ม เข้มข้น 1.00×10^{-2} g/cm³ มีค่า $R_f = 0.12$ (40% อะซิโตนในคลอโรฟอร์ม จำนวน 4 ครั้ง) มีจุดหลอม-เหลว 262.4-262.7^o ซ โดยมีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีดังต่อไปนี้

IR (KBr) ν (cm ⁻¹)	3410 (O-H stretching), 2945, 2871 (C-H stretching)
(รูปที่ 10)	
¹ H NMR (pyridine-d ₅ +CDCl ₃) (δ ppm)	5.12 (<i>dd</i> , J = 15.5 และ 9.0 Hz, 1H), 5.17 (<i>brd</i> , J = 2.5 Hz, 1H), 5.07 (<i>dd</i> , J = 15.5 และ 9.0 Hz, 1H), 4.93 (<i>d</i> , J = 8.0 Hz, 1H), 4.48 (<i>brd</i> , J = 12.0 Hz, 1H), 4.31 (<i>brdd</i> , J = 12.0 และ 5.5 Hz, 1H), 4.18 (<i>t</i> , J = 8.5 Hz, 1H), 4.13 (<i>t</i> , J = 8.5 Hz, 1H), 3.90 (<i>m</i> , 1H), 3.87 (<i>m</i> , 1H), 3.84 (<i>m</i> , 1H), 2.06 (<i>m</i> , 1H), 2.00 (<i>m</i> , 1H), 1.97 (<i>m</i> , 2H), 1.94 (<i>m</i> , 1H), 1.82 (<i>m</i> , 1H), 1.79 (<i>m</i> , 1H), 1.70 (<i>m</i> , 1H), 1.69 (<i>m</i> , 1H), 1.60 (<i>m</i> , 1H), 1.57 (<i>m</i> , 1H), 1.56 (<i>m</i> , 2H), 1.55 (<i>m</i> , 2H), 1.43 (<i>m</i> , 1H), 1.32 (<i>m</i> , 1H), 1.30 (<i>m</i> , 2H), 1.28 (<i>m</i> , 1H), 1.22 (<i>m</i> , 1H), 1.08 (<i>d</i> , J = 6.5 Hz, 3H), 0.94 (<i>m</i> , 1H), 0.91 (<i>d</i> , J = 6.5 Hz, 3H), 0.88 (<i>t</i> , J = 7.5 Hz, 3H), 0.88 (<i>d</i> , J = 7.0 Hz, 3H), 0.72 (<i>s</i> , 3H), 0.58 (<i>s</i> , 3H)
(500 MHz)	
(รูปที่ 11)	
¹³ C NMR (pyridine-d ₅ +CDCl ₃) (δ ppm)	137.29, 136.42, 127.42, 115.62, 99.91, 76.05, 75.90, 75.03, 72.80, 69.43, 60.61, 53.84, 53.10, 49.27, 47.37, 41.26, 38.94, 37.97, 37.44, 35.13, 32.40, 32.33, 29.96, 27.77, 27.69, 26.68, 23.50, 21.12, 19.52, 19.46, 19.17, 17.05, 10.91, 10.36, 10.09
(125 MHz)	
(รูปที่ 12)	
DEPT 135 ^o	CH ₃ : 19.46, 19.17, 17.05, 10.91, 10.36, 10.09
(รูปที่ 13)	CH ₂ : 60.61, 37.44, 35.13, 32.40, 27.77, 27.69, 26.68, 23.50, 21.12, 19.52
	CH : 136.42, 127.42, 115.62, 99.91, 76.05, 75.90, 75.05,

72.80, 69.43, 53.84, 53.01, 49.27, 47.37, 38.94, 37.97,
29.96

ส่วนย่อย D1-D4 และส่วนย่อย D6 D7 และ D9 สารมีปริมาณน้อยจึงไม่สนใจทำการศึกษาค่าต่อ

ส่วนย่อย D10 และ D12-D15 สารมีปริมาณน้อยและมีสารเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก จึงไม่สนใจทำการศึกษาค่าต่อ

ส่วนย่อย D11 เป็นของแข็งสีขาว (19.2 มิลลิกรัม) จากลักษณะ โครมาโทแกรมบนโครมาโทกราฟี แผ่นบางมีสารสองจุดที่ติดกัน ไม่มีระบบใดที่จะแยกได้ทั้งนอร์มอเนฟสและรีเวิสเฟส จึงไม่สนใจทำการศึกษาค่าต่อ

ส่วนที่ 15 ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง (24.87 กรัม) นำไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวอยู่กับที่ อะคอลัมน์ด้วยเอทิลอะซิเตท และเพิ่มความเข้มข้นด้วยเมทานอลจนถึง 100% เมทานอล ตามลำดับ รวบรวมสารละลายแต่ละส่วนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยปริมาตรของสารละลาย 30 มิลลิลิตร ตรวจสอบสารแต่ละส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางสามารถรวมส่วนที่มีลักษณะของโครมาโทแกรมที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 15 ส่วนย่อย ดังแสดงใน ตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงส่วนย่อยต่าง ๆ ที่แยกได้จากการนำส่วนที่ 15 มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
E1	3.0	ของเหลวหนืดสีเหลือง
E2	71.5	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียว
E3	62.4	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียว
E4	27.3	ของเหลวหนืดสีเขียวอมน้ำตาล
E5	104.0	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียวอมน้ำตาล
E6	77.3	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียวอมน้ำตาล
E7	287.3	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีน้ำตาล
E8	2050.3	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีน้ำตาลปนเหลือง
E9	1359.7	ของเหลวหนืดสีน้ำตาลปนเหลือง
E10	4554.2	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
E11	4978.8	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ส่วนย่อย	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
E12	1504.6	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
E13	1832.4	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
E14	2681.0	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
E15	545.6	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล

นำส่วนย่อย E3 ซึ่งมีของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเขียว (62.4 มิลลิกรัม) มาแยกเอาของแข็งออกได้ของแข็งเป็นเกล็ดเล็ก ๆ สีขาว หนัก 20.1 มิลลิกรัม ซึ่งเมื่อตรวจสอบบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง และเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ พบว่าเป็นสารตัวเดียวกันกับที่ได้จากการตกผลึกของ ส่วนที่ 8 และ 9 นั่นคือ CS-S1

นำส่วนย่อย E7 ซึ่งเป็นของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีน้ำตาล (287.3 มิลลิกรัม) มาแยกเอาของแข็งออกจากของเหลว จะได้ของแข็งเป็นเกล็ดเล็ก ๆ สีขาวเป็นมันวาว หนัก 30.0 มิลลิกรัม ซึ่งเมื่อตรวจสอบบนโครมาโทกราฟีแผ่นบาง และเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพ พบว่าเป็นสารตัวเดียวกันกับที่ได้จาก ส่วนที่ 14 นั่นคือ CS-S4 และนำส่วนของสารละลายไปรวมกับส่วนย่อย E8 E9 และ E10 (น้ำหนักรวม = 7.1214 กรัม) และนำไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวอยู่กับที่ และชะคอลัมน์ด้วยไดคลอโรมีเทน และเพิ่มความเข้มข้นด้วยเมทานอลจนถึง 100% เมทานอล ตามลำดับ รวบรวมสารละลายแต่ละส่วนที่ออกจากคอลัมน์ด้วยปริมาตรของสารละลาย 20 มิลลิลิตร ตรวจสอบสารแต่ละส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบางสามารถรวมส่วนที่มีลักษณะของโครมาโทแกรมที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด 14 ส่วน ดังแสดงใน ตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากการนำสารละลายของส่วนย่อย E7 รวมกับส่วนย่อยของ E8 E9 และ E10 มาทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ส่วนที่	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ลักษณะทางกายภาพ
G1	2.8	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
G2	1.8	ของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน
G3	0.7	ของแข็งสีขาว
G4	10.0	ของแข็งสีเขียว
G5	56.8	ของเหลวหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล
G6	137.7	ของเหลวหนืดสีเหลือง
G7	334.1	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเหลืองอมน้ำตาล
G8	485.6	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเหลืองอมน้ำตาล
G9	440.3	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเหลืองอมน้ำตาล
G10	535.0	ของแข็งผสมอยู่กับของเหลวสีเหลืองอมน้ำตาล
G11	514.5	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
G12	1517.2	ของเหลวหนืดสีน้ำตาล
G13	931.3	ของเหลวหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล
G14	930.9	ของเหลวหนืดสีเหลืองอมน้ำตาล

ส่วนย่อยที่เหลือที่ได้จากการนำส่วนที่ 15 ไปทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ไม่สนใจทำการศึกษาต่อ เนื่องจากลักษณะ โครมาโทแกรมไม่เห็นการแยกของสาร มีลักษณะเป็นทางยาวทั้งในระบบบนอร์มอเฟส และรีเวิร์สเฟส

ส่วนที่ 16 เป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดง (41.49 กรัม) นำไปตกผลึกด้วยเมทานอลต่อเอทิลอะซิเตท ได้ผลึกใสไม่มีสี หนัก 1.8170 กรัม จากข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ตรงกันกับสารประกอบ CS-S2

สารประกอบ CS-S2

เป็นผลึกใสไม่มีสี แสดงค่าสเปซฟิฟิโรเทชัน ($[\alpha]_D^{28} +78.37^\circ$ ในพิริดีน เข้มข้น 2.50×10^{-2} g/cm³ มีจุดหลอมเหลว 175.2-176.9^o ซ โดยมีข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีดังต่อไปนี้

IR (KBr) ν (cm ⁻¹)	3373 (O-H stretching), 2930 (C-H stretching), 1071
(รูปที่ 29)	(C-O stretching)
¹ H NMR (pyridine-d ₅) (δ ppm)	5.94 (<i>d</i> , J = 4.0 Hz, 1H), 4.78 (<i>t</i> , J = 8.0 Hz, 1H), 4.67
(500 MHz)	(<i>d</i> , J = 8.0 Hz, 1H), 4.46 (<i>ddd</i> , J = 9.5, 4.5 และ 2.5 Hz,
(รูปที่ 30)	1H), 4.39 (<i>t</i> , J = 9.5 Hz, 1H), 4.28 (<i>dd</i> , J = 12.0 และ
	2.5 Hz, 1H), 4.24 (<i>td</i> , J = 8.0 และ 4.0 Hz, 1H), 4.14
	(<i>dd</i> , J = 12.0 และ 4.5 Hz, 1H), 4.13 (<i>d</i> , J = 12.0 Hz,
	1H), 4.07 (<i>s</i> , 2H), 4.05 (<i>d</i> , J = 12.0 Hz, 1H)
¹³ C NMR (pyridine-d ₅) (δ ppm)	103.35, 91.31, 82.03, 78.25, 73.09, 72.67, 72.63, 70.98,
(125 MHz)	69.40, 62.90, 60.25, 60.12
(รูปที่ 31)	
DEPT 135 ^o	CH ₂ : 62.90, 60.25, 60.12
(รูปที่ 32)	CH : 91.31, 82.03, 78.25, 73.09, 72.67, 72.63, 70.98, 69.40

นำผลึก CS-S2 ที่ได้จากส่วนที่ 16 น้ำหนัก 25.0 มิลลิกรัม ไปเตรียมอนุพันธ์โดยการทำ acetylation ใน acetic anhydride และ pyridine ได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา acetylation เป็นของเหลวหนืดใสไม่มีสี หนัก 55.8 มิลลิกรัม จากข้อมูลทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัม ตรงกันกับสารประกอบ octaacetate ของซูโครส

ส่วนที่ 17 เป็นของหนืดสีน้ำตาลแดง (9.24 กรัม) จากการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแผ่นบาง ทั้งในระบบนอร์มอเฟส และรีเวสเฟส ไม่เห็นการแยกของสารจึงไม่สนใจทำการศึกษาต่อ