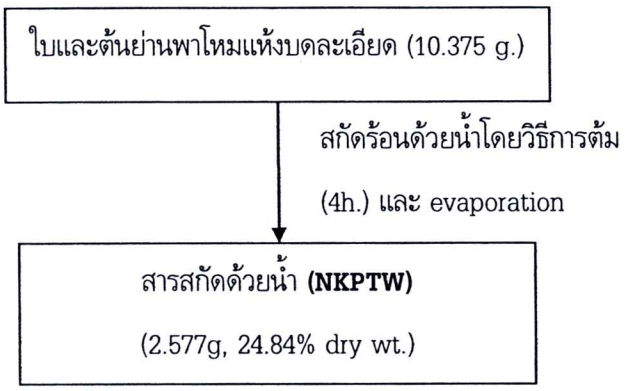
# ส่วนที่ 2

1.) วิธีการสกัดใบและต้นย่านพาโหมด้วยตัวทำละลายต่างๆ

2.) การแยกสารให้บริสุทธิ์จากสารสกัดย่านพาโหม

**II. การสกัดสมุนไพรย่านพาโหมด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ดังนี้**

**1. การสกัดสมุนไพรย่านพาโหมด้วยน้ำ โดยวิธีการต้ม (Scheme 10)**




**Scheme 10: การสกัดใบและต้นย่านพาโหมด้วยน้ำ โดยวิธีการต้ม**

1.1 นำใบและต้นย่านพาโหมแห้งบดละเอียดมาต้มกับน้ำเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางจนกระทั่งไม่มีกากติดมา

1.2 นำสารละลายน้ำที่กรองได้ไประเหยน้ำออกจนหมด โดยทั่วไปขั้นตอนนี้ใช้เวลานาน การเติม n-butanol หรือ ethanol ลงไปช่วยย่นระยะเวลาการระเหยน้ำให้เร็วขึ้น

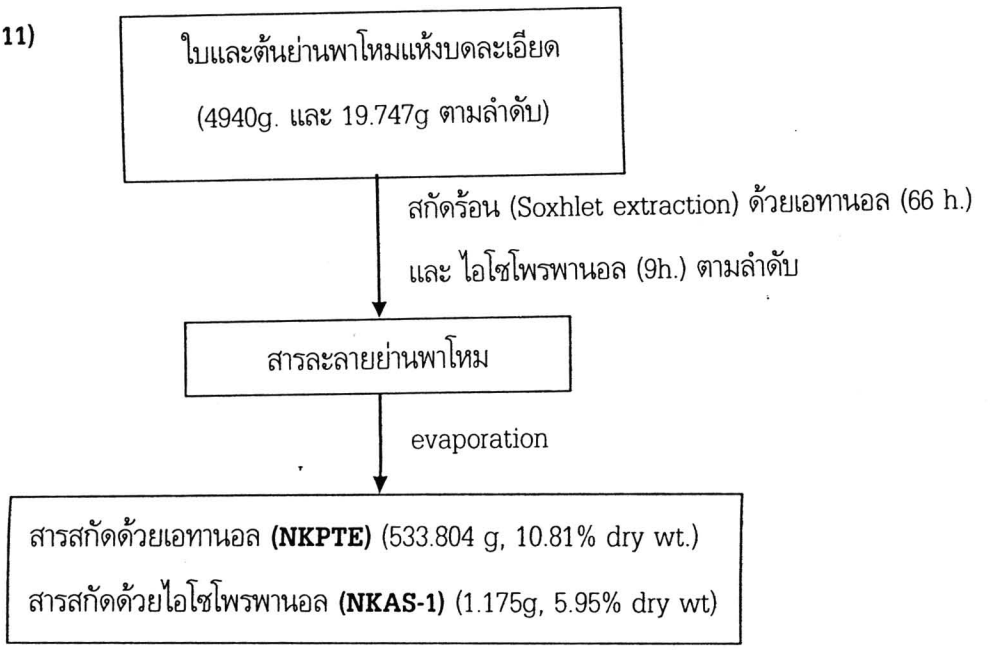
1.3 ชั่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดด้วยน้ำ **(NKPTW)** จากข้อที่ 1.2 และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตต่อน้ำหนักของย่านพาโหมแห้ง ดังแสดงผลการทดลองใน**ตารางที่ 10** (หน้า 26)

1.4 ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ Silica gel เป็น Supporting material โดยใช้ Mobile phase หลาย systems (หน้า 30)

1.5 นำสารสกัดด้วยน้ำไปทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดนก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

**2. การสกัดย่านพาโหมด้วยตัวทำละลายเอทานอลและไอโซโพรพานอลโดยวิธี Soxhlet extraction (Scheme 11)**




**Scheme 11: การสกัดใบและต้นย่านพาโหมด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอลด้วยวิธี Soxhlet extraction**

2.1 นำใบและต้นย่านพาโหมแห้งบดละเอียดจากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม มาสกัดร้อนด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอล โดยวิธี Soxhlet extraction เป็นเวลา 66 ชั่วโมง (วันละ 11 ชั่วโมง รวม 6 วัน) และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ

2.2 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 2.1 มาระเหยตัวทำละลายออกจนหมด

2.3 ชั่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอลจากข้อ 2.2 และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของย่านพาโหม ดังแสดงผลการทดลองใน**ตารางที่ 10** (หน้า 26)

2.4 ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบสารสกัดจากข้อ 2.2 เบื้องต้นด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็น supporting material และทดลองใช้ Mobile phase หลาย systems (หน้า 30)

2.5 นำสารสกัดด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอลไปทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดนก

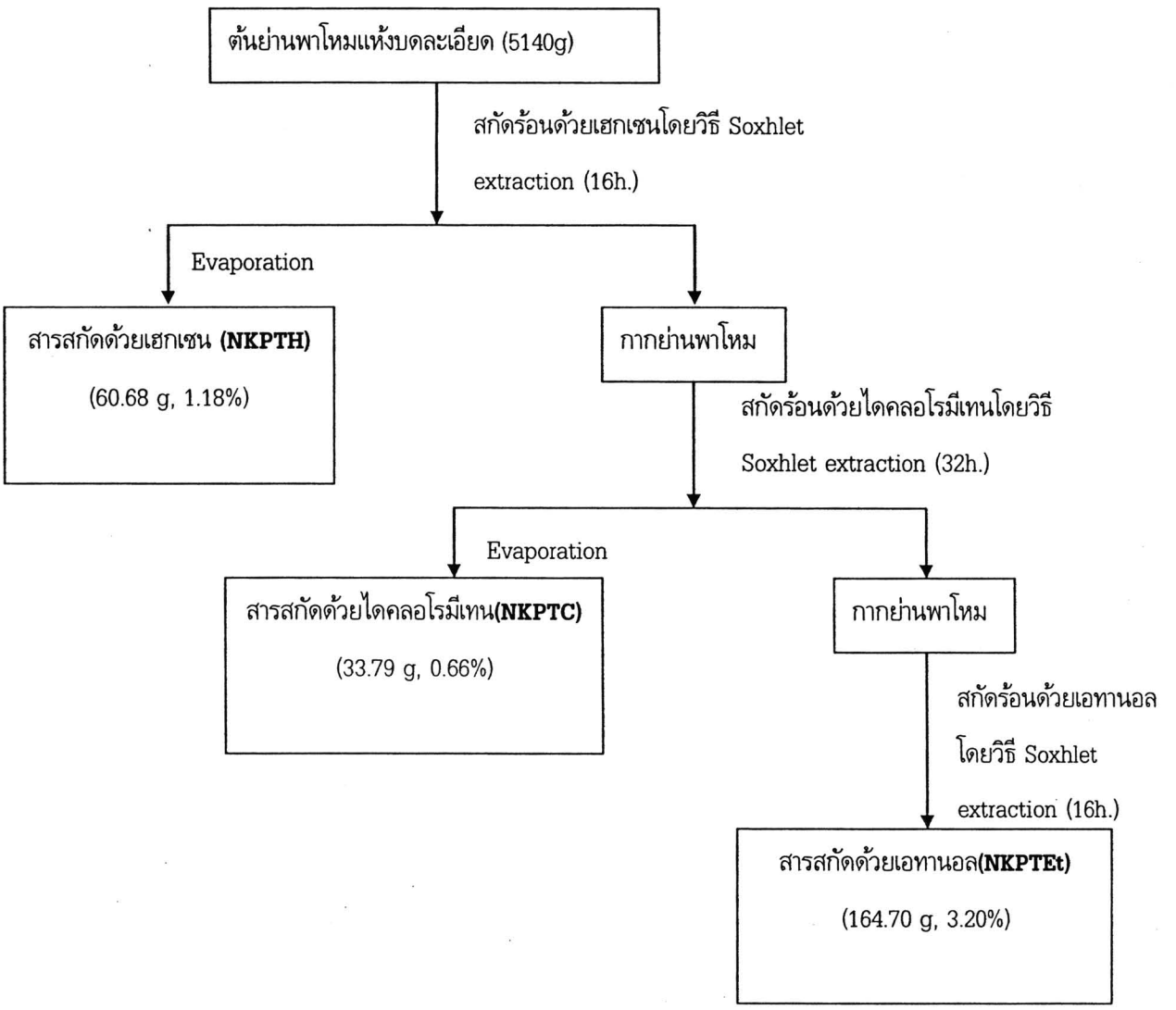
**ผลการทดลอง**

1. จากการสกัดใบและต้นย่านพาโหมแห้งบดละเอียดจากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม โดยการต้มกับน้ำ ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดต่อน้ำหนักพืชแห้งเท่ากับ 24.84% สารสกัดที่ได้มีลักษณะหนืดสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ **(NKPTW) (ตารางที่ 10)**
2. จากการสกัดใบและต้นย่านพาโหมแห้งบดละเอียดจากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และไอโซโพรพานอล โดยวิธี Soxhlet extraction ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัด **(NKPTE และ NKAS-1** ตามลำดับ) ต่อน้ำหนักพืชแห้งเท่ากับ 10.81% และ 5.95% ตามลำดับ สารสกัดทั้งสองมีลักษณะหนืด สีดำ ดังสรุปผลการทดลองใน**ตารางที่ 10**

**<u>ตารางที่ 10</u> : ลักษณะและเปอร์เซ็นต์ผลิตผลของสารสกัดด้วยน้ำ (NKPTW), เอทานอล (NKPTE) และไอโซโพรพานอล (NKAS-1) จากใบและต้นย่านพาโหม**

| รหัสสารสกัด | ลักษณะของสารสกัด | น้ำหนักพืชที่ใช้สกัด (กรัม) | น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม) | % ผลิตผลของสารสกัดต่อน้ำหนักพืชแห้ง |
|---|---|---|---|---|
| **NKPTW** | สารหนืดสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ | 10.375 | 2.577 | 24.84 |
| **NKPTE** | สารหนืดสีดำ | 4940 | 533.804 | 10.81 |
| **NKAS-1** | สารหนืดสีดำ | 19.747 | 1.175 | 5.95 |

**3. การสกัดต้นย่านพาโหมด้วยตัวทำละลายเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และ เอทานอล ตามลำดับ โดยวิธี Soxhlet extraction (Scheme 12)**




**Scheme 12: การสกัดต้นย่านพาโหมด้วยเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ตามลำดับ โดยวิธีSoxhlet extraction**

3.1 นำต้นย่านพาโหมแห้งบดละเอียดมาสกัดร้อนโดยเฮกเซนด้วยวิธี Soxhlet extraction เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.2 นำสารละลายเฮกเซนจากข้อ 3.1 มาระเหยตัวทำละลายเฮกเซนออกจนหมด ได้สารสกัดด้วยเฮกเซน **(NKPTH)**

3.3 ชั่งน้ำหนักและจดบันทึกลักษณะของสารสกัดด้วยเฮกเซนจากข้อ 3.2 คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของย่านพาโหม ดังแสดงใน**ตารางที่ 11** (หน้า 29)

3.4 นำกากย่านพาโหมที่ผ่านการสกัดด้วยเฮกเซนมาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน โดยวิธี Soxhlet extraction เป็นเวลา 32 ชั่วโมง (วันละ 8 ชั่วโมง รวมทั้งสิ้น 4 วัน)

3.5 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.4 มาระเหยเอาตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนออกจนหมด ได้สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน **(NKPTC)**

3.6 ชั่งน้ำหนักและจดบันทึกลักษณะของสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนที่ได้จากข้อ 3.5 และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลิตผลของสารสกัดต่อน้ำหนักแห้งของย่านพาโหม ดังแสดงผลการทดลองใน**ตารางที่ 11** (หน้า 29)

3.7 นำกากย่านพาโหมที่ผ่านการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธี Soxhlet extraction เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.8 นำสารละลายที่สกัดได้จากข้อ 3.7 มาระเหยตัวทำละลายเอทานอลออกจนหมด ได้สารสกัดด้วยเอทานอล **(NKPTEt)**

3.9 ชั่งน้ำหนักและจดบันทึกลักษณะของสารสกัดด้วยเอทานอลจากข้อ 3.8 และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของย่านพาโหม ดังแสดงผลการทดลองใน**ตารางที่ 11** (หน้า 29)

3.10ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดที่ได้เบื้องต้นด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ Mobile phase หลาย systems (หน้า 29)

3.11นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อไข้หวัดนก

**ผลการทดลอง**

**3.** ผลการสกัดต้นย่านพาโหมแห้งจากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ตามลำดับ โดยวิธี Soxhlet extraction ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลิตผลของสารสกัดต่อน้ำหนักแห้งของพืชเท่ากับ 1.18% , 0.66% และ 3.20% ตามลำดับ สารสกัดด้วยเฮกเซนมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ, สารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีลักษณะเป็นของแข็งกึ่งเหลวสีดำ และสารสกัดด้วยเอทานอลมีลักษณะเป็นของแข็งกึ่งเหลวสีดำ โดยสรุปผลของสารสกัดที่ได้ใน**ตารางที่ 11**

**ตารางที่ 11 : ลักษณะและเปอร์เซ็นต์ผลิตผลของสารสกัดด้วยเฮกเซน (NKPTH), ไดคลอโรมีเทน (NKPTC) และ เอทานอล (NKPTEt) จากต้นย่านพาโหม อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม**

| รหัสสารสกัด | ลักษณะของสารสกัด | น้ำหนักพืชที่ใช้สกัด (กรัม) | น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม) | % ผลิตผลต่อน้ำหนักพืชแห้ง |
|---|---|---|---|---|
| **NKPTH** | ของแข็งสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ | 5140 | 60.68 | 1.18 |
| **NKPTC** | ของแข็งกึ่งเหลวสีดำ | 5140 | 33.79 | 0.66 |
| **NKPTEt** | ของแข็งปนเหลวสีดำ | 5140 | 164.70 | 3.20 |

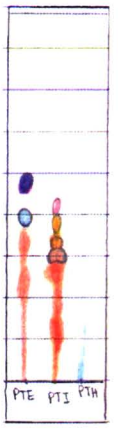
**ผลการแยกสารสกัดย่านพาโหมด้วยตัวทำละลายน้ำ, เอทานอลและไอโซโพรพานอล ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography**

1. การวิเคราะห์เบื้องต้นของสารสกัดด้วยน้ำต่างจากโครมาโตแกรมของสารสกัดย่านพาโหมด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอลโดยพบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอลจะมีสารที่มีขั้วต่ำถึงปานกลางมากกว่าสารสกัดย่านพาโหมด้วยน้ำ ในขณะเดียวกันสารสกัดย่านพาโหมด้วยน้ำประกอบด้วยสารที่มีขั้วสูงมากกว่าดังแสดง**ในรูป 5** และ **6**
2. Mobile phase system ที่ได้ทดลองใช้ในการวิเคราะห์ TLC ซึ่งมี silica gel เป็นตัว supporting material มีดังนี้

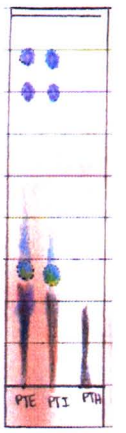
   - EtOAc : Hexane = 2:8 , 4:6
   - EtOAc : $CH_2Cl_2$ = 1:9 , 0.4 :9.6 , 0.5 : 9.5
   - EtOH : $CH_2Cl_2$ = 5:9.5 , 0.4:9.6
   - $CHCl_3$ : MeOH = 10:2

   พบว่า mobile phase ที่เหมาะสมที่สุดมีดังนี้

   ถ้าตรวจวิเคราะห์สารสกัดด้วยเอทานอลกับสารสกัดด้วยไอโซโพรพานอลคือ EtOAc : Hexane = 2:8 สารสกัดย่านพาโหมด้วยน้ำคือ $CHCl_3$ : MeOH = 10:2




UV $\lambda$ = 366 nm



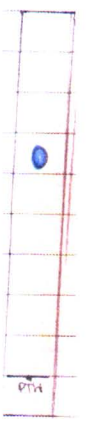

Spray ด้วย vanillin reagent

**รูปที่ 5: แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารสกัดย่านพาโหมด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอลจากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม**

PTE = สารสกัดด้วยเอทานอล, PTI = สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล, PTH = สารสกัดด้วยน้ำ

Mobile phase คือ EtOAc : Hexane = 2:8

UV $\lambda$ = 254 nm




Spray ด้วย vanillin reagent

**รูปที่ 6: แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารสกัดย่านพาโหมด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอลจาก อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ดังนี้**

PTH = สารสกัดด้วยน้ำ

Mobile phase คือ $CHCl_3$ : MeOH = 10:2

**1. การแยกสารให้บริสุทธิ์จากสารสกัดย่านพาโหม อ. นครชัยศรี ส่วนต้นและใบด้วยเอทานอลออกเป็นส่วนๆ**

1.1นำสารสกัดจากใบและต้นของย่านพาโหม อำเภอนครชัยศรีปริมาณ 50.0 กรัม

1.2นำมาแยกออกเป็นส่วนๆ โดย Vacuum Liquid Chromatography (VLC) ใช้ซิลิกาเจลหมายเลข 7736 หนัก 230 กรัม คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซ็นติเมตร

1.3ประกอบชุด Sintered glass funnel พร้อมขาตั้งและปั๊มดูดอากาศ

1.4นำซิลิกาเจลหมายเลข 7736 ปริมาณ 230 กรัม เทใส่ในคอลัมน์ให้มีความสูง 4 เซ็นติเมตร กดให้แน่นและปรับผิวหน้าให้เรียบและนำกระดาษกรองมาวางบนซิลิกาเจล

1.5เทตัวทำละลายเฮกเซนเพื่อเป็นการตรวจสอบการอัดตัวของซิลิกาเจล ถ้ามีรอยแตกก็ทำการกดให้แน่นต่อไป ถ้าไม่มีรอยแตกก็นำกระดาษกรองออก

1.6นำสารสกัดย่านพาโหมปริมาณ 50.0 กรัม มาละลายกับตัวทำละลายเล็กน้อยแล้วผสมกับซิลิกาเจลเล็กน้อย จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง

1.7นำสารสกัดย่านพาโหมที่ได้มาทำการบดให้ละเอียดและนำมาบรรจุลงใน sintered glass funnel ทำการกดให้แน่นก่อนนำซิลิกาเจลมาใส่บนผิวหน้าเล็กน้อย ทำการกดให้แน่นพร้อมทั้งปรับผิวหน้าให้เรียบและปิดด้วยกระดาษกรอง

1.8จากนั้นทำการใช้ตัวทำละลายในการชะ ดังนี้

| | |
|---|---|
| เฮกเซน | 3200 ml |
| 3% เอทิลอะซีเตท/เฮกเซน | 3800 ml |
| 5% เอทิลอะซีเตท/เฮกเซน | 2400 ml |
| 8% เอทิลอะซีเตท/เฮกเซน | 1200 ml |
| 10% เอทิลอะซีเตท/เฮกเซน | 1400 ml |
| 20% เอทิลอะซีเตท/เฮกเซน | 400 ml |
| 40% เอทิลอะซีเตท/เฮกเซน | 3400 ml |
| 60% เอทิลอะซีเตท/เฮกเซน | 2200 ml |
| 80% เอทิลอะซีเตท/เฮกเซน | 1800 ml |
| เอทิลอะซีเตท | 1000 ml |
| 4% เอทิลอะซีเตท/เอทานอล | 1800 ml |
| 10% เอทิลอะซีเตท/เอทานอล | 1200 ml |
| 20% เอทิลอะซีเตท/เอทานอล | 400 ml. |

| | |
|---|---|
| 40% เอทิลอะซีเตท/เอทานอล | 600 ml |
| 60% เอทิลอะซีเตท/เอทานอล | 200 ml |
| 80% เอทิลอะซีเตท/เอทานอล | 200 ml |
| เอทานอล | 200 ml |

1.9 ทำการรวมส่วนสกัดที่มี pattern ของ spot คล้ายกันบนแผ่น TLC โครมาโตแกรม ได้ 9 ส่วนสกัด (**NKPTE-1 - NKPTE-9**)

1.10 นำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยใช้เครื่อง evaporator และชั่งน้ำหนักของสาร **(ตารางที่ 12)**

1.11 จากการวิเคราะห์ (NKPTE-1 – NKPTE - 10) โดย TLC **(หน้า 34)** พบว่า ส่วนสกัดที่ 1 (**NKPTE-1**) (92 mg.) มาวิเคราะห์ด้วย TLC Chromatogram ที่สเปรย์ด้วย vanillin reagent พบ spot สีน้ำเงินจาง Spot เดียว จึงทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรโกปี ( IR, $^{1}$H NMR, $^{13}$C NMR และ MS ) สามารถระบุได้ว่าสารที่พบในส่วนสกัดที่ 1 **(NKPTE-1)** เป็นสารบริสุทธิ์

จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่า **NKPTE-2** เป็นสารบริสุทธิ์ จึงนำไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างของ **NKPTE-2** ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี

**ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและจุดหลอมเหลวของ NKPTE-1 และ NKPTE-2**

สารบริสุทธิ์ **(NKPTE-1)** เป็นของแข็งสีขาว (0.092 g, 0.184% dry weight) มีจุดหลอมเหลว 59-60 $^{o}$C พบว่าเมื่อทำการ spray ด้วย vanillin reagent ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงสี IR (KBr) $\nu_{max}$cm$^{-1}$: 2918, 2848, 1462, 1378, และ 720. $^{1}$H NMR ( $C_6D_6$, 400 MHz ) $\delta$ :0.91( t, 6H, J = 6.6 Hz , -$CH_3$ ) , 1.35 ( brs, 52H, -$CH_2$). $^{13}$C NMR ($C_6D_6$ ,100 MHz ) $\delta$ : 14.33 ( C-1 และ C-28), 23.09 ( C-2 และ C-27 ), 29.80 (C-3 และ C-26 ), 30.10 (C-4 และ C-25 ), 30.17 (C-5 ถึง C-24) EI-MS m/z ( % relative intensity ) : 394 ((M+H)$^{+}$, absent), 127(11.8), 113(15.7), 99(23.5), 85(62.7), 71(80.4), 57(100).

สารบริสุทธิ์ **(NKPTE-2)** เป็นของเหลวไม่มีสี (0.161 g, 0.322 % dry weight ) มีค่า $R_f$ = 0.74 ใช้ 20 % Ethyl acetate in hexane เป็น mobile phase ในการวิเคราะห์เบื้องต้นด้วย TLC พบว่าเมื่อทำการ spray ด้วย vanillin reagent จะเห็น spot เป็นสีน้ำเงินเข้ม IR (Neat) $\nu_{max}$cm$^{-1}$: 2922, 1600, 1445, 1382, และ 1108. $^{1}$H NMR ( $CDCl_3$, 400 MHz ) $\delta$ :1.53 ( s, 18H, H-2, H-8, H-13, H-19, H-24 , H-29, -$CH_3$ ), 1.61 ( s, 6H, H-1, H-30, -$CH_3$), 1.90-2.01 ( m , 20H, H-5 to H-6, H-10 to H-11, H-15 to H-16, H-20 to H-21, H-25 to H-26, -$CH_2$), 5.02-5.04 ( m , 6H, H-4, H-9, H-14, H-22, H-27, -CH). $^{13}$C NMR ($CDCl_3$ ,100 MHz ) $\delta$ : 15.97 ( C-13 และ

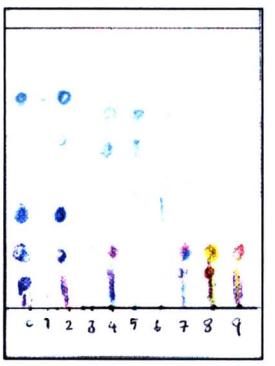
C-19 ), 16.01 (C-8 และ C-24), 17.64 (C-3 และ C-29), 25.63 ( C-1 and C-30), 26.68 (C-5 และ C-26), 26.78 (C-10 และ C-21), 28.27 (C-15 และ C-16), 39.72 (C-6 และ C- 25), 39.74 (C-11 และ C-21), 124.29 (C-14 และ C-17), 124.32 ( C-9 และ C-22), 124.43 (C-4 และ C-27), 131.19 (C-3 และ C-28), 134.87 (C-12 และ C-18), 135.08 ( C-7 และ C-23). EI-MS m/z (% relative intensity ) : 410$(M+H)^+$, 2.5, 341(38.8), 137(16.98), 121(15.28), 95(19.44), 69(100).

ผลการแยกสารจากสารสกัดย่านพาโหม โดยวิธี Vacuum Liquid Chromatography (VLC) นำส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์โดย TLC และรวมส่วนที่มี TLC pattern คล้ายกันได้ทั้งหมด 9 ส่วน (NKPTE – 1 – NKPTE – 9) ส่วนสกัด NKPTE – 1 ไม่สามารถ detect spot บน TLC Chromatogram ด้วย UV และ Vanillin reagent ได้ ดังแสดงใน **ตารางที่ 12**

**ตารางที่ 12: ลักษณะและน้ำหนักของส่วนสกัดที่ได้ (NKPTE-1 – NKPTE-9) จากสารสกัดย่านพาโหมด้วยเอทานอล**

| ส่วนที่ | สัญลักษณ์ | ลักษณะของสารที่ได้ | น้ำหนักของสารที่ใช้แยก (กรัม) | น้ำหนักสารที่ได้ (กรัม) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | NKPTE 1 | ของแข็งสีขาว | 50 | 0.092 |
| 2 | NKPTE 2 | ของเหลวไม่มีสี | 50 | 0.161 |
| 3 | NKPTE 3 | Oil สีเหลือง | 50 | 0.021 |
| 4 | NKPTE 4 | Oil สีเหลือง | 50 | 0.006 |
| 5 | NKPTE 5 | Oil สีเหลือง | 50 | 0.177 |
| 6 | NKPTE 6 | Oil สีเหลือง | 50 | 3.086 |
| 7 | NKPTE 7 | สารหนืดสีดำ | 50 | 7.021 |
| 8 | NKPTE 8 | สารหนืดสีดำ | 50 | 0.062 |
| 9 | NKPTE 9 | สารหนืดสีดำ | 50 | 8.049 |

ผลการวิเคราะห์ TLC ทั้ง 9 ส่วน (NKPTE-1 ถึง NKPTE-9) ของสารสกัดย่านพาโหมจากอำเภอนครชัยศรีส่วนลำต้นและใบโดยวิธี Vacuum Liquid Chromatography (VLC) ดังแสดงใน**รูปที่ 7**




**รูปที่ 7 ผลการวิเคราะห์ส่วนสกัดย่านพาโหมทั้ง 9 ส่วน (NKPTE 1 – NKPTE 9)**

C = สารสกัดจากย่านพาโหมส่วนต้นและใบ (จากอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม)

1 = สาร **NKPTE 1** 2 = สาร **NKPTE 2** 3 = สาร **NKPTE 3** 4 = สาร **NKPTE 4** 5 = สาร **NKPTE 5**

6 = สาร **NKPTE 6** 7 = สาร **NKPTE 7** 8 = สาร **NKPTE 8** 9 = สาร **NKPTE 9**

Mobile phase system คือ Hexane : Ethyl acetate 9:1

จากการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี ( IR, $^{1}$H NMR, $^{13}$C NMR และ MS ) และจุดหลอมเหลว ทำให้ทราบโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ **NKPTE 1** และ สารบริสุทธิ์ **NKPTE 2** (ไม่สามารถเปิดเผยโครงสร้างได้เนื่องจากกำลังดำเนินการจดสิทธิบัตร)