

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์	บริษัท
- Gas chromatography-mass spectrometer รุ่น GC – MS - QP 2000a	Shimadzu Japan
- Infrared spectrophotometer รุ่น 510 FT-IR spectrometer Nicolet	
- Nuclear magnetic resonance spectra รุ่น R-1500 spectrometer(^1H -NMR, 60MHz)	Hitachi
- เครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำ	Büchi rotavapour
- เครื่องหั่นทศนิยม 4 ตำแหน่ง	Percica 205 A
- เครื่องบด (blender)	National
- หม้ออึ่ง (autocave)	

หมายเหตุ สภาพของเครื่อง GC-MS ที่ใช้มีดังนี้

Ion source:	Ionization method	EI
	Ionization voltage	70 eV.
	Temperature	250 °C.
	Analyzer	Hyperbolic quadrupole
Sample inlet:	Split time	0.50 min
	Carrier gas	He 0.8 kg/cm ²
Column:	Type	DB-1 (100% Dimethylpolysiloxane)J&W 122-1032
	Length	30 m.
	ID	0.25 mm.
	Film thickness	0.25 μm .
Temperature (°C):	Injector	240
	Detector	280
	Initial temp.	120
	Initial time	3 min.
	Rate	15 °C / min.
	Final temp.	240
	Final time	10 min.

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัท
- Ethanol 95%	โรงงานอยุธยา
- Acetic anhydride	Merck Germany
- Acetone	J.T. Baker
- Benzaldehyde	-
- Benzoyl peroxide	Merck Germany
- <i>p</i> – Cresol	-
- Dichloromethane	Solvay
- Ethyl-magnesium bromide (3 M.)	Fluka
- Hexane	Merck Germany
- 4-Hydroxybenzaldehyde	Merck Germany
- Methanol	E – Merck Germany
- Chloroform	Merck Germany
- Ethyl acetate	-
- N – bromosuccinamide	-
- Diethyl ether dry ด้วย sodium wire	Merck Germany
- Silica gel 60 for column	Merck Germany
- Silica gel 60 G for TLC	Merck Germany
- sodium sulfate anhydrous	Carlo Erba Reagenti
- Sodium hydrogen carbonate	-
- Sulfuric acid	Fluka
- Potassium carbonate	-
- Magnesium sulfate	-
- Nitrogen gas	-
- Dry ice	-
- ผงวุ้น (Agar)	บิกเบน
- มันฝรั่ง	
- ข้าว	
- เชื้อรา <i>Cladosporium cladosporioides</i>	

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียมสาร 1-ethylbenzyl acetate ⁽¹⁸⁾

นำ EtMgBr (20 ml ; 0.06 mol.) ใน dry ether (3 ml.) ใส่ลงในขวดก้นกลม ที่มี N₂ (g) อุณหภูมิ -15 °C ถึง -5 °C และเติม benzaldehyde (6.17 g ; 0.058 mol.) ใน dry ether (3.3 ml) ลงไป ห้ามไม่ให้อุณหภูมิเกิน -5 °C คนตลอดเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วเทสารละลายที่ได้ลงในน้ำแข็งทุบ (26 g.) หลังจากนั้นเติมสารละลาย 15% H₂ SO₄ (9.8 ml) แยกเอาชั้นน้ำ และ ether ออกจากกันโดยกรวยแยก เติม Potassium carbonate 0.3 g เพื่อกำจัดน้ำออกจาก ether ก่อน กรองเอา K₂CO₃ และระเหย solvent ออก จะได้ สาร (42) (5.98 g; 75.8%) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ TLC (silica 60 G) และ column chromatography (silica 60 for column) โดยใช้ developing solvent คือ hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 80:20 นำสารที่แยกได้ มาระเหยเอา solvent ออกและนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค IR, NMR และ GC/MS (ดูรูปที่ 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 และตารางที่ 2.1) ได้สาร (42) 5.98 g

$$\begin{aligned} \text{คิดเป็น \%yield} &= \frac{\text{น้ำหนักที่ได้จริง} \times 100}{\text{น้ำหนักที่คำนวณได้จากทฤษฎี}} = \frac{\text{น้ำหนักที่ได้จริง} \times 100}{\text{จำนวนโมลของสารตั้งต้น} \times \text{มวลโมเลกุลสารผลิตภัณฑ์}} \\ &= 75.8\% \end{aligned}$$

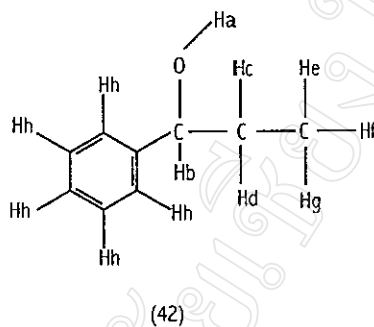
นำสาร (42) มา (5.98 g ; 0.044 mol.) และ pyridine (16 ml) ใส่ลงใน erlenmeyer flask แล้วปิดจุก และใส่ acetic anhydride (16 ml.) หยดลงไป (ใช้เวลาเติม acetic anhydride 15 นาที) คนตลอดเวลาใช้เวลาในการคนประมาณ 6-8 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ มาเทลงบนน้ำแข็ง 50 g เติมน้ำลงไป 80 ml. และเติม CH₂Cl₂ 50 ml. ก่อนแยกเอาชั้น CH₂Cl₂ ออกมา ล้างด้วยน้ำ, 5% H₂SO₄ และ สารละลายอิ่มตัวของ NaHCO₃ หลาย ๆ ครั้ง และตามด้วยน้ำจนเป็นกลาง นำสารละลายของ CH₂Cl₂ มาทำให้แห้ง โดยใช้ MgSO₄ และ กรองเอา MgSO₄ ออก หลังจากนั้นระเหยเอา CH₂Cl₂ ออกที่ความดันต่ำ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มา ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้เทคนิค TLC (silica 60 G) เทียบกับสารตั้งต้น และเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวดูดซับคือ silica 60 for column และใช้ developing solvent คือ hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 80 : 20 ติดตามผลโดยใช้ TLC นำสารที่แยกได้ 7.02 g. (89.6%) มาทำการวิเคราะห์โดย IR, NMR และ GC / MS ได้ผลดังรูปที่ 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 และตารางที่ 2.2 สารที่ได้คือ สาร (38)

หมายเหตุ

ร้อยละของผลผลิตของสาร (38) เมื่อเทียบกับจากสารตั้งต้น benzaldehyde

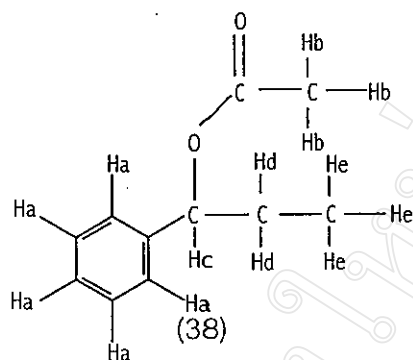
จะได้ % yield total = 68.0 %

ตารางที่ 2.1 แสดงผลการวิเคราะห์สาร (42)

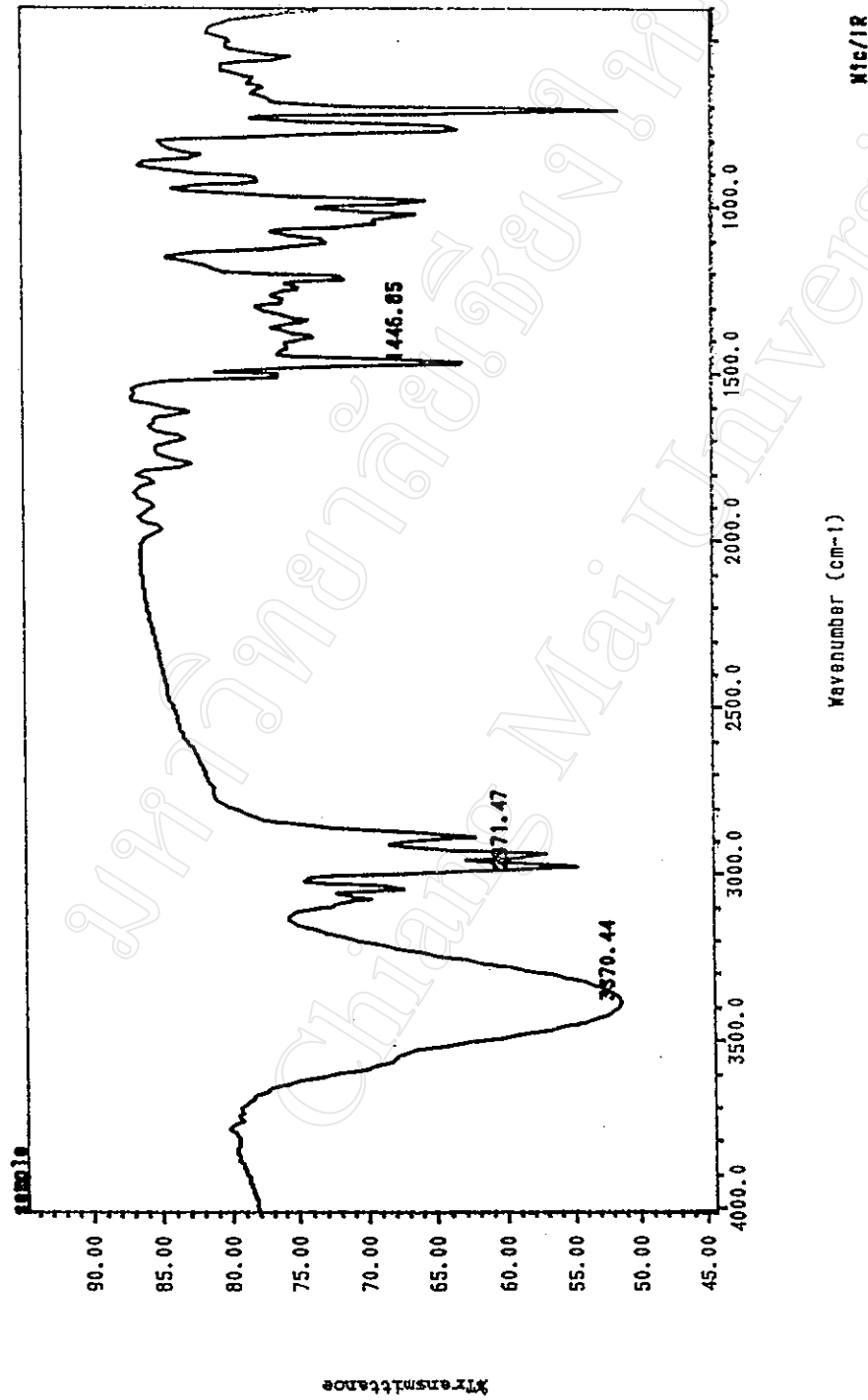


IR ($\bar{\nu}_{\max}$)	3370 cm^{-1}	, O-H stretching
Neat	2971 cm^{-1}	, C-H stretching
NaCl cell	1446 cm^{-1}	, aromatic C=C stretching
NMR (ppm.)	7.305-7.920	, m มี 5H, Hh.
ใน CDCl_3	0.762-1.299	, m มี 3H, He, Hf, Hg
TMS เป็น	1.650-1.885	, m มี 2H, Hc, Hd
internal	2.383	, s มี 1H, Ha
reference	3.398	, m มี 1H, Hb
MS ,m/z	136(10.3%) $[\text{M}]^+$, 118(1.08%) $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 107(100%),	
(Intensity 70 eV.)	79(100%), 77(89.7%), 51(46.5%), 39(2504%)	

ตารางที่ 2.2 แสดงผลการวิเคราะห์สาร (38)



IR ($\bar{\nu}_{Max}$)	2939 cm^{-1} , C-H stretching
Neat	1731 cm^{-1} , O=C-O stretching
NaCl cell	1350 cm^{-1} , C-H bending
	1250 cm^{-1} , C-O stretching
NMR(ppm.)	7.2 - 7.7 , s มี 5 H , Ha
ใน CDCl_3	5.4 - 5.8 , m มี 1 H , Hc
มีTMSเป็น	2.0 - 2.2 , s มี 3 H , Hb
internal	1.4 - 2.0 , m มี 2 H , Hd
reference	0.6 - 1.0 , t มี 3 H , He
MS , m/z	178(7.57%)[M] ⁺ , 149(16.8%)[M-C ₂ H ₅] ⁺ , 136(30.8%),
(intensity	117(42.2%), 107(85.9%), 91(42.2%), 77(32.4%),
70 eV.)	51(23.8%), 43(100%)



รูปที่ 2.1 แสดง IR-spectrum ของสาร(42)

** ACQUISITION COMMENT **

Sample : BENZALDEHYDE +EtMgBr
(2)
Solvent : CDCl₃
Conc. : -
Refer. : TMS
Tube D. : 5 mm.
Operator: S.KANJANAWONG
Date : 24/2/2000
Memo : YUJ

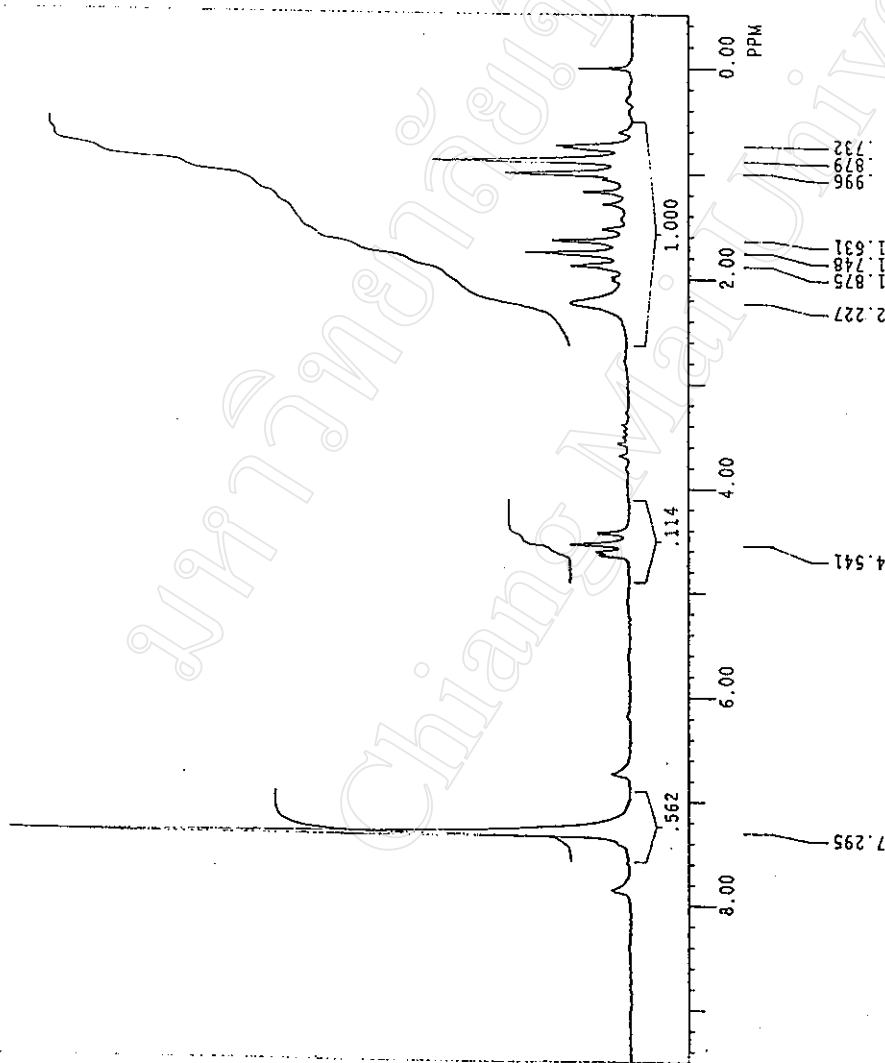
** ACQUISITION PARAMETER **

Acquis. mode : Normal
Spectrum width : 20 ppm
No. of acquis. : 8
Pulse interval : 5.0 sec
Data point : 4 k point

Pulse width 90 : 20 micro sec

** PROCESSING PARAMETER **

Proce.data point: 4 k point
Display range : 10.00 ppm
Display gain : 1.00
Gain mode : Normal

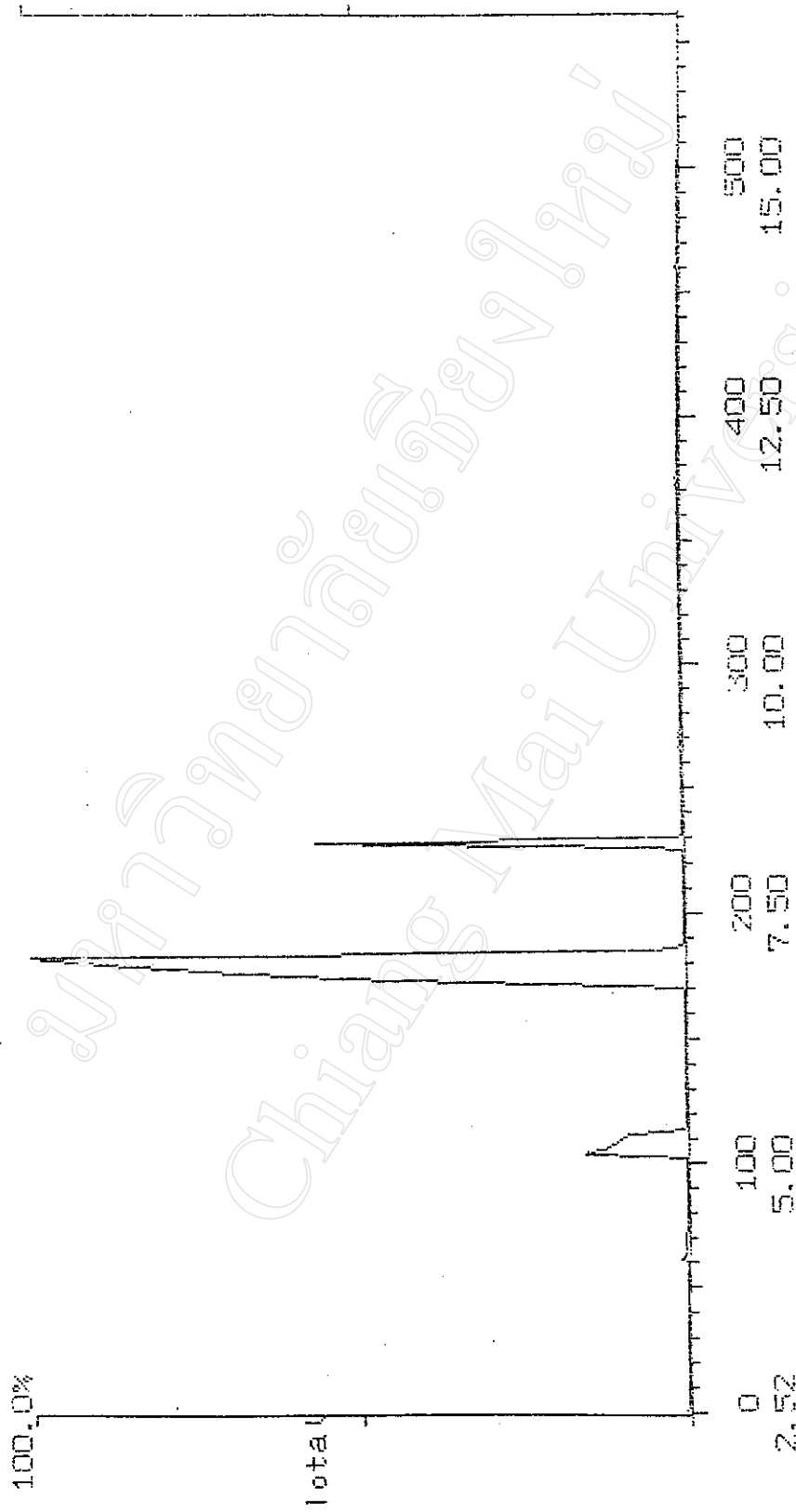


[HIJACHI R-1500]

รูปที่ 2.2 แสดง ¹H-NMR ของสาร(42) ใน CDCl₃ มี TMS เป็น internal reference

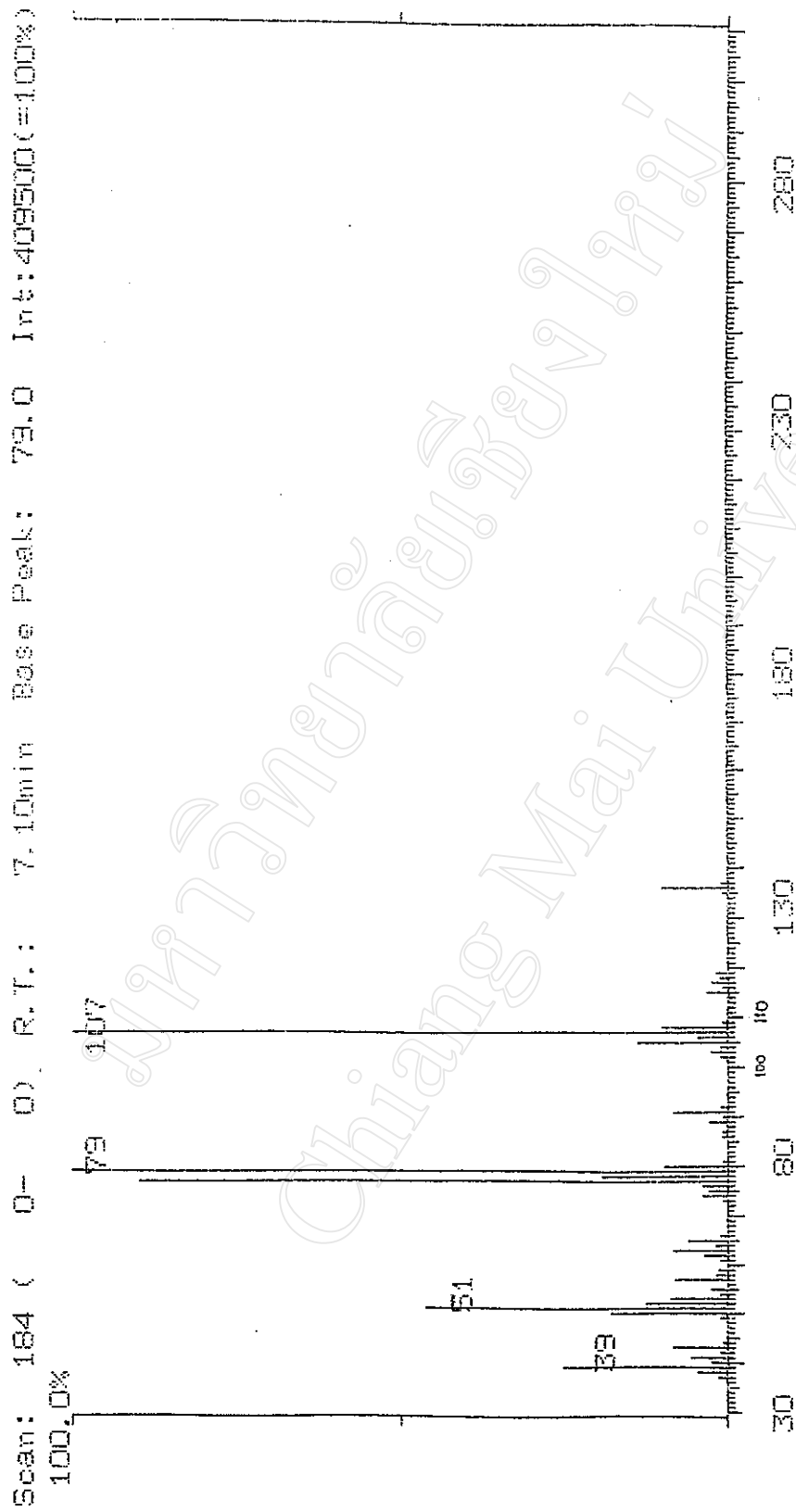
Chromatogram File: FEB025.02 96-02-25 10:39
 Comment: benzaldehyde + EtMgBr

Scan: 1 to 503 Int: 2322553(=100%)

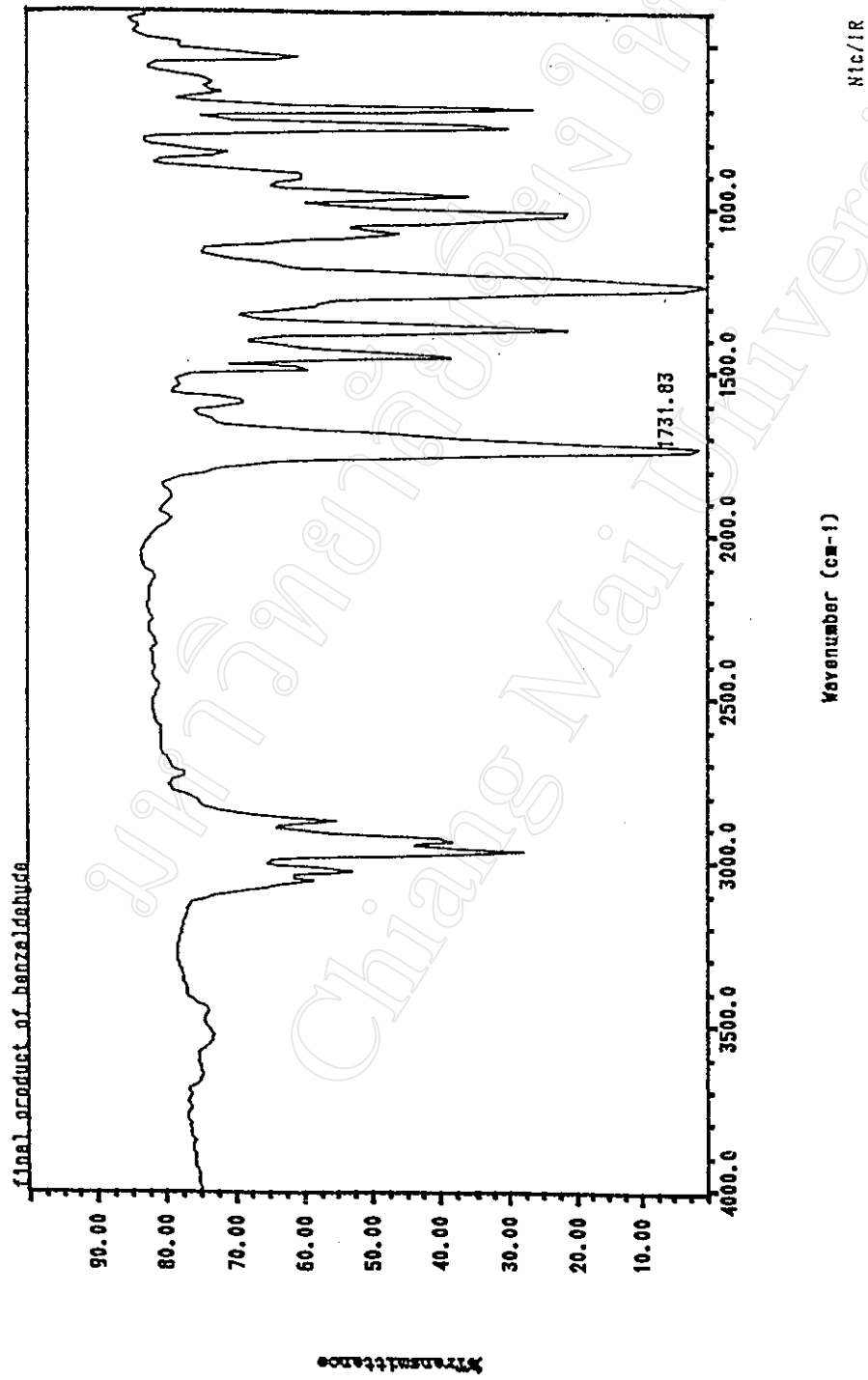


รูปที่ 2.3 แสดงโครมาโตแกรมของสาร(42)

Mass Spectrum File: FEB025.02 95-02-25 10:39
 Comment: benzaldehyde + EtMgBr



รูปที่ 2.4 แสดงแมสสเปกตรัมของสาร(42)



รูปที่ 2.5 แสดง IR-spectrum ของสาร(38)

** ACQUISITION COMMENT **

Sample : FINAL OF BENZALDEHYD

E

Solvent : CDCl₃

Conc. : -

Refer. : -

Tube D. : 5 mm

Operator: S.ARAMRUENG

Date : 14/12/2000

Memo : YUI

** ACQUISITION PARAMETER **

Acquis. mode : Normal

Spectrum width : 20 ppm

No. of acquis. : 8

Pulse interval : 5.0 sec

Data point : 4 k point

Pulse width 90 : 20 micro sec

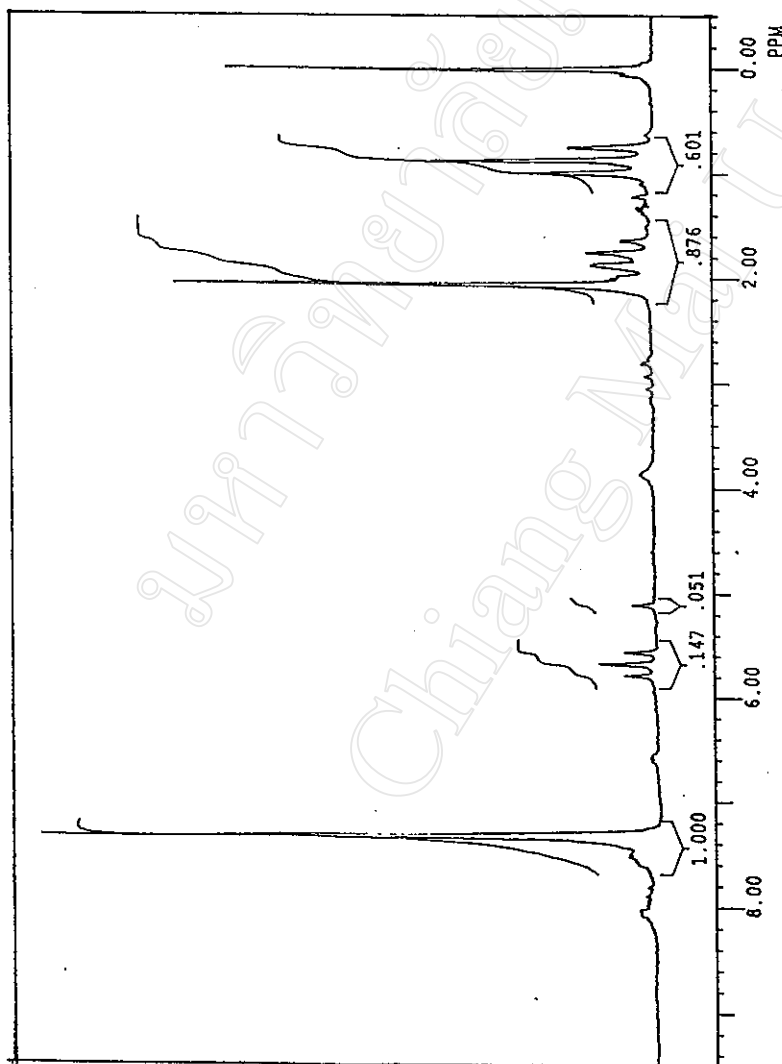
** PROCESSING PARAMETER **

Proce.data point: 4 k point

Display range : 10.00 ppm

Display gain : 1.00

Gain mode : Normal

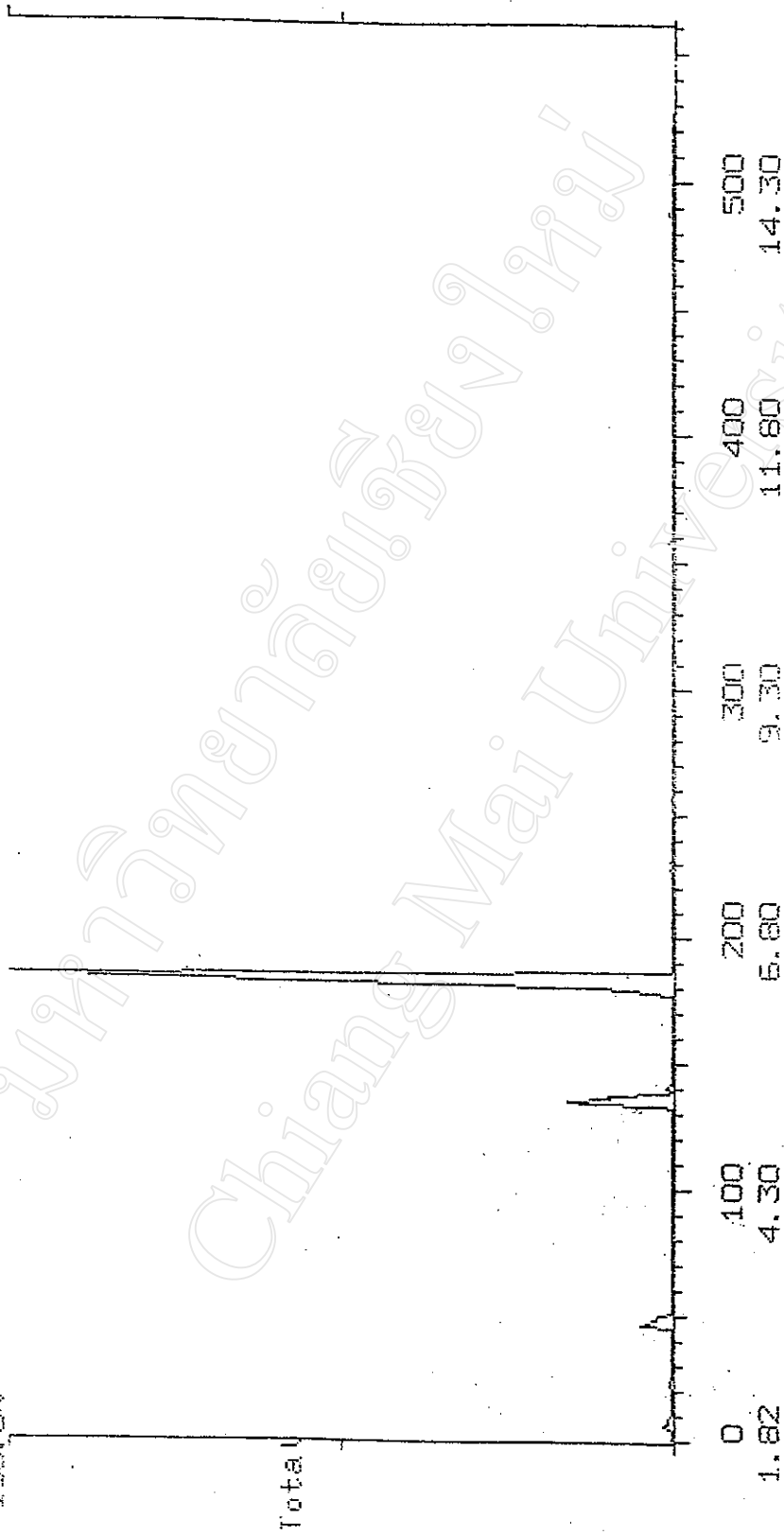


HITACHI R-1500

รูปที่ 2.6 แสดง ¹H-NMR ของสาร(38) ใน CDCl₃ มี TMS เป็น internal reference

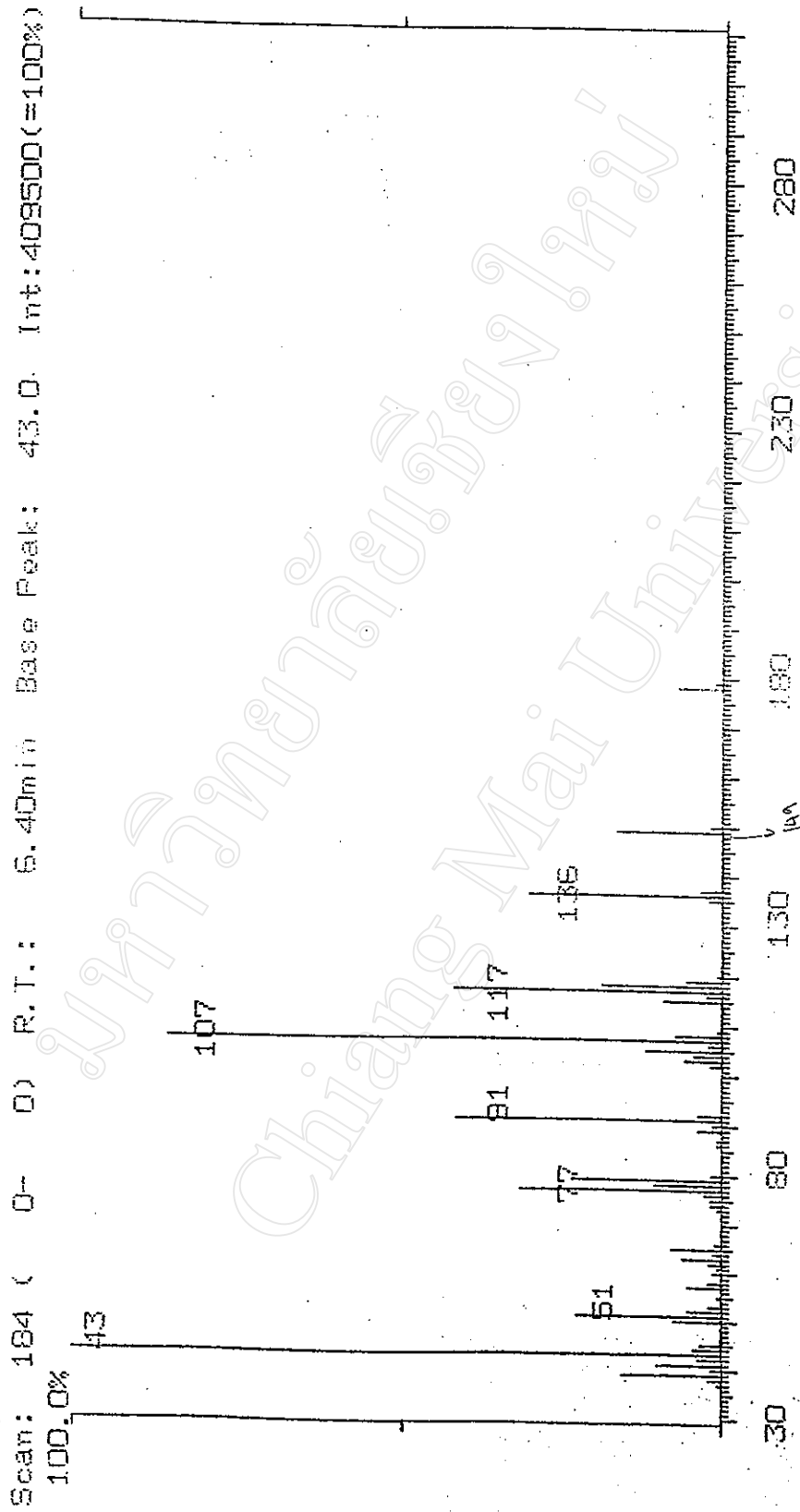
Chromatogram File: APRIL3.01 96-04-03 11:05
 Comment: fraction 10-13

Scan: 1 to 527 Int: 2433030(=100%)
 100.0%



รูปที่ 2.7 แสดงโครมาโตแกรมของสาร(38)

Mass Spectrum File: APRIL3.01 96-04-03 11:05
 Comment: fraction 10-13



รูปที่ 2.8 แสดงแมสสเปกตรัมของสาร(38)

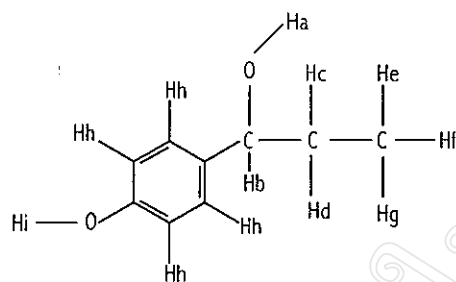
2.3.2 การเตรียมสาร 1'-acetoxy-4-propylbenzyl acetate (35)⁽¹⁸⁾

นำ EtMgBr (25 ml ; 0.075 mol.) ใน dry ether (4 ml.) มาทำให้เย็นโดยควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ไม่เกิน -5°C . เติม 4 – hydroxy benzaldehyde (4.25 g. ; 0.035 mol.) ใน dry ether (2 ml.) ลงไปใน Grignard reagent คนให้เข้ากันเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนเทสารละลายที่ได้บนน้ำแข็งบด เติมสารละลาย 15% H_2SO_4 16 ml. และคนให้ทั่วเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาแยกชั้นน้ำและ ether ออกจากกัน นำชั้น ether มาใส่ K_2CO_3 0.5 g เพื่อดูดน้ำและกรองเอา K_2CO_3 ออก นำสารละลายมาระเหย solvent ออก จากนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ column chromatography (silica gel 60 for column) และติดตามสารที่ต้องการโดยใช้ TLC (silica gel 60 G) ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้คือ hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 80 : 20 นำสารที่แยกได้แต่ละส่วนที่มีค่า R_f เดียวกันมารวมไว้ด้วยกัน ซึ่งได้แก่ได้สาร (43) 0.48 g. (9.02%) ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์โดย IR, NMR และ GC / MS (ดูรูปที่ 2.9, 2.10, 2.11, 2.12 และตารางที่ 2.3) หลังจากนั้นนำสาร (43) ที่ได้ (0.48 g ; 0.0032 mol.) ซึ่งอยู่ใน pyridine (2.3 ml.) มาเติมด้วย acetic anhydride (2.3 ml.) คนตลอดเวลานาน 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาเติมน้ำแข็งบด 10 g. และเติมน้ำ 10 ml. นำสารละลายที่ได้มาละลายด้วยไดคลอโรมีเทนโดยเขย่าในกรวยแยก แยกเอาชั้น CH_2Cl_2 ออกและล้างด้วยน้ำ, 5% H_2SO_4 และสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO_3 และน้ำ ทำการกำจัดน้ำออกโดยใช้ MgSO_4 และกรอง จากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกโดยใช้ TLC (silica 60 G) และ column chromatography (silica 60 for column) โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ hexane : ethyl อัตราส่วน 80 : 20 และติดตามสารที่ต้องการโดยใช้ TLC (SiO_2) นำผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ มาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค IR, NMR, GC / MS (ดูรูปที่ 2.13, 2.14, 2.15, 2.16 และตารางที่ 2.4) ได้สาร (35) = 0.68 g. (90.0% ; 0.0029 mol.)

หมายเหตุ

% yield ของสาร (35) เมื่อเทียบจากสารตั้งต้น 4 – hydroxy benzaldehyde เทียบได้จาก % yield total = 8.23 %

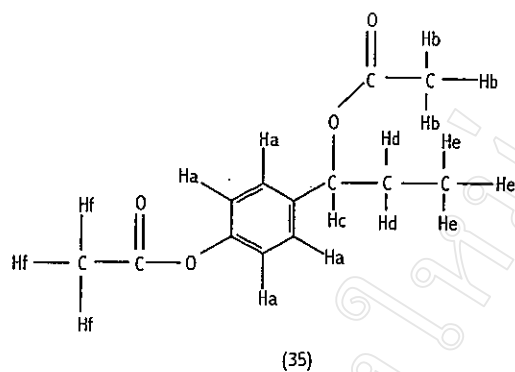
ตารางที่ 2.3 แสดงผลการวิเคราะห์สาร (43)



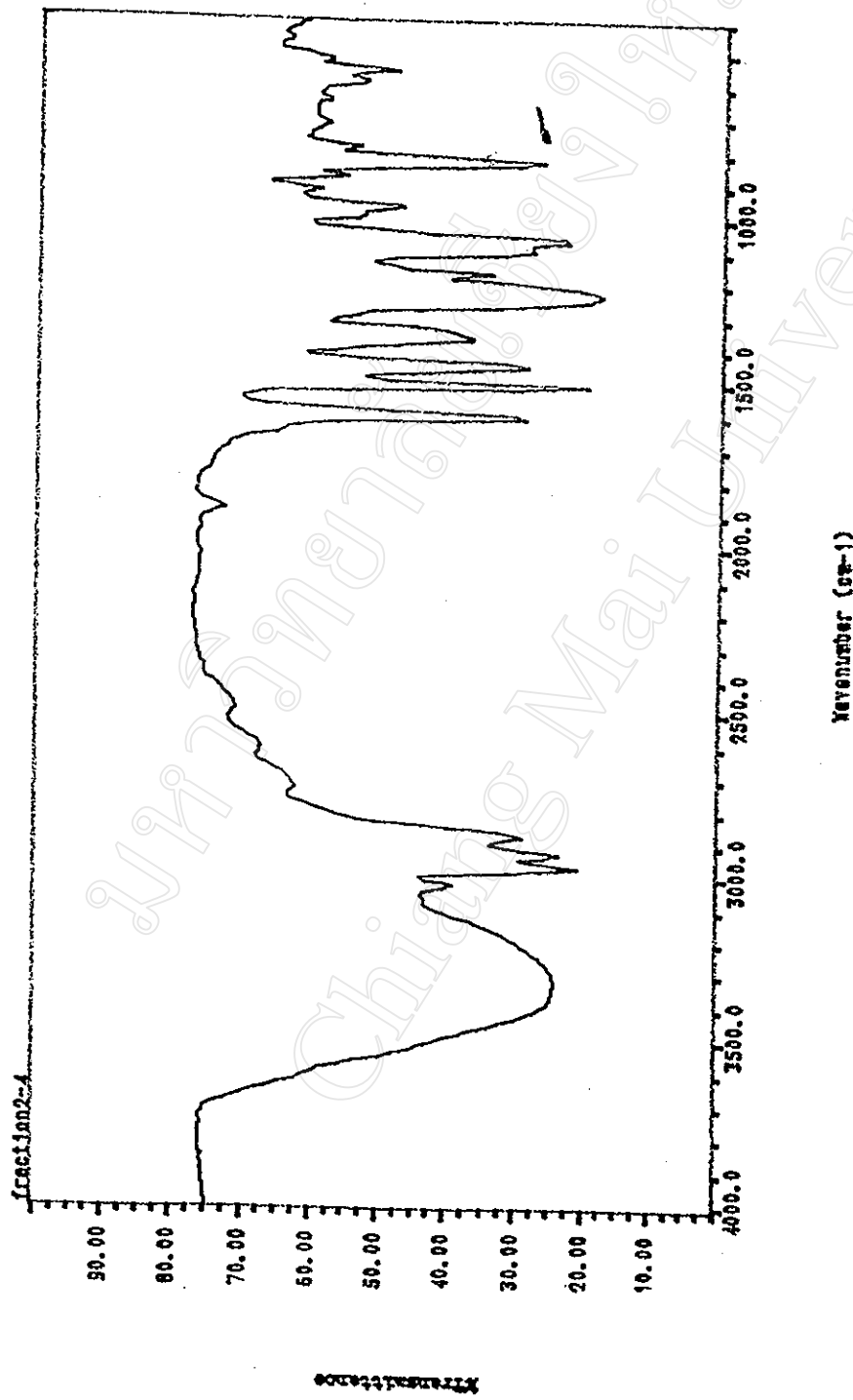
(43)

IR ($\bar{\nu}_{Max}$)	3300 cm^{-1} , O-H stretching
Neat	2970 cm^{-1} , C-H stretching
NaCl cell	1600 cm^{-1} , C=C stretching
	1500 cm^{-1} , aromatic C=C stretching
	1230 cm^{-1} , C-O stretching
NMR (ppm.)	6.260 – 7.246, m มี 4H, Hh
ใน CDCl_3	4.912, m มี 3H, Ha, Hi และ Hb
มี TMS เป็น internal	3.35 – 3.69, m มี 2H, Hc และ Hd
reference	1.064 – 1.299, m มี 3H, He และ Hf และ Hg
MS, m/z	152 (8.65%) $[\text{M}]^+$, 123 (100%) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$, 95
(intensity 70 eV.)	(49.7%), 77(42.2%), 65(38.9%), 39(53.5%)

ตารางที่ 2.4 แสดงผลการวิเคราะห์สาร (35)



IR ($\bar{\nu}_{Max}$) Neat NaCl cell	2971 cm^{-1} , C-H stretching 1753 cm^{-1} , O=C-O stretching 1500 cm^{-1} , aromatic C=C stretching 1370 cm^{-1} , C-H bending 1200 cm^{-1} , C-O stretching
NMR (ppm.) ใน CDCl_3 มี TMS เป็น internal reference	6.982 – 7.422 , q มี 4 H , Ha 2.285 – 3.00 , m มี 1 H , Hc 2.285 , s มี 3 H , Hf 2.061 , s มี 3 H , Hb 1.660 – 1.875 , m มี 2 H , Hd 0.762 – 0.996 , t มี 3 H , He
MS , m/z (intensity 70 eV.)	236(2.17%)[M] ⁺ , 194(19.56%)[M-CH ₂ CO] ⁺ , 165 (23.91%), 123(69.02%), 43(100%)



Wavenumber (cm⁻¹)

Transmittance (%)

รูปที่ 2.9 แสดง IR-spectrum ของสาร(43)

** ACQUISITION COMMENT **

Sample : 4H + EtHgBr

Solvent : CD300

Conc. : -

Refer. : TMS

Tube D. : 5 mm

Operator: S.ARAMRUENG

Date : 7/2/2000

Memo : YUI

** ACQUISITION PARAMETER **

Acquis. mode : Normal

Spectrum width : 20 ppm

No. of acquis. : 8

Pulse interval : 5.0 sec

Data point : 4 k point

Pulse width 90 : 20 micro sec

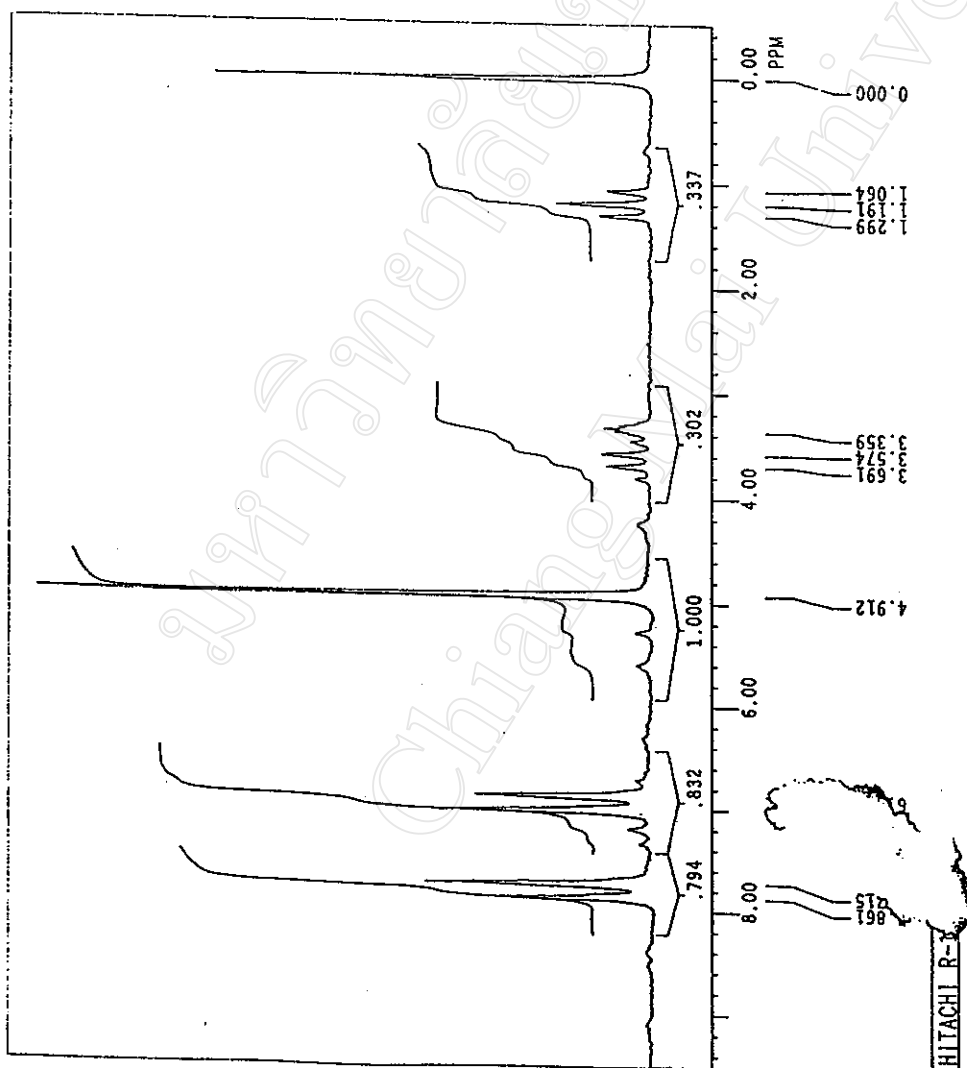
** PROCESSING PARAMETER **

Proce. data point: 4 k point

Display range : 10.00 ppm

Display gain : 1.00

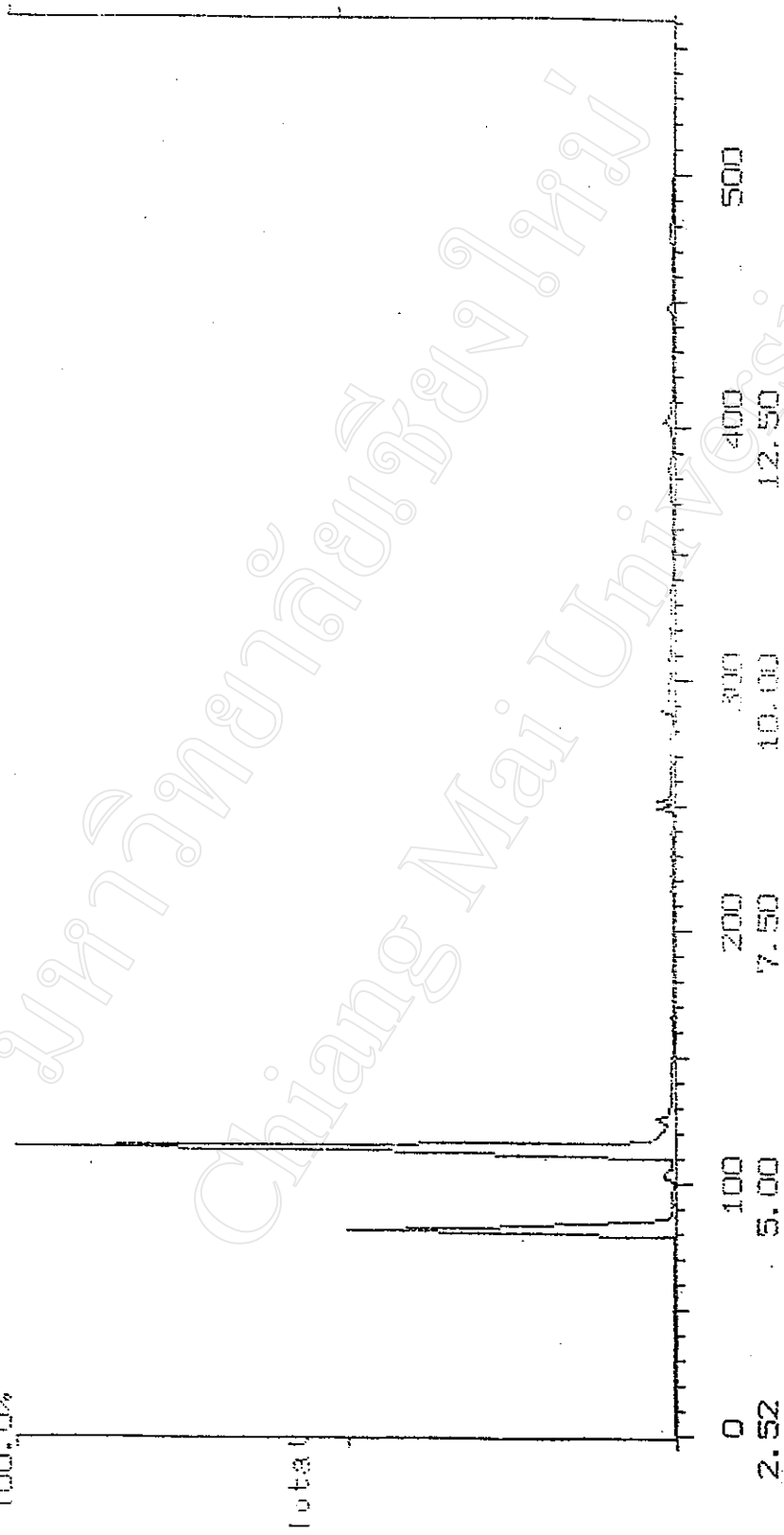
Gain mode : Normal



รูปที่ 2.10 แสดง ¹H-NMR ของสาร(43) ใน CDCl₃ มี TMS เป็น internal reference

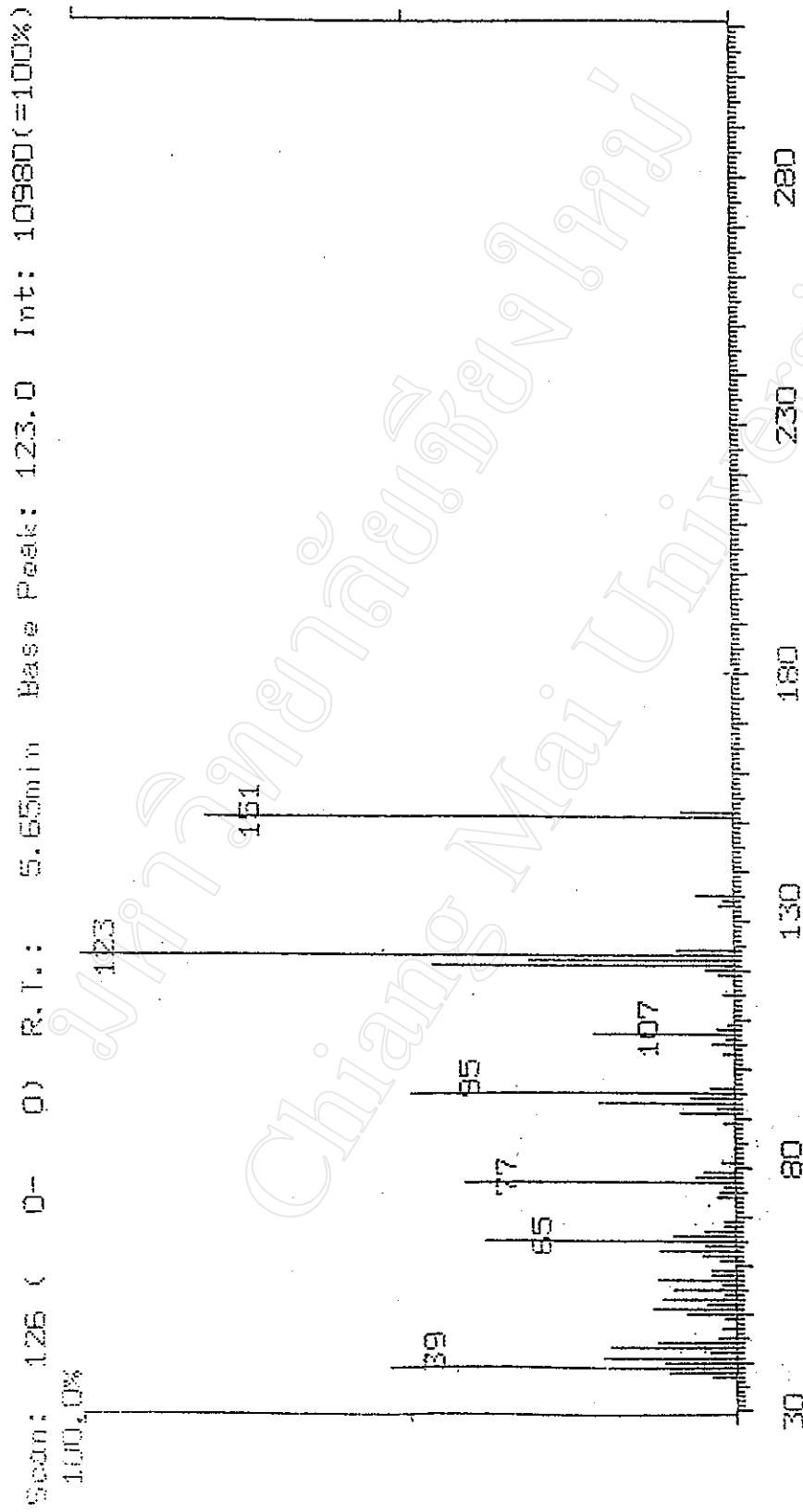
Chromatogram File: MAR10 .03 9/5-03-10 14:16
 Comment: 4H + EtMgBr

Scan: 1 to 499 Int: 2890649(=100%)
 100.0%

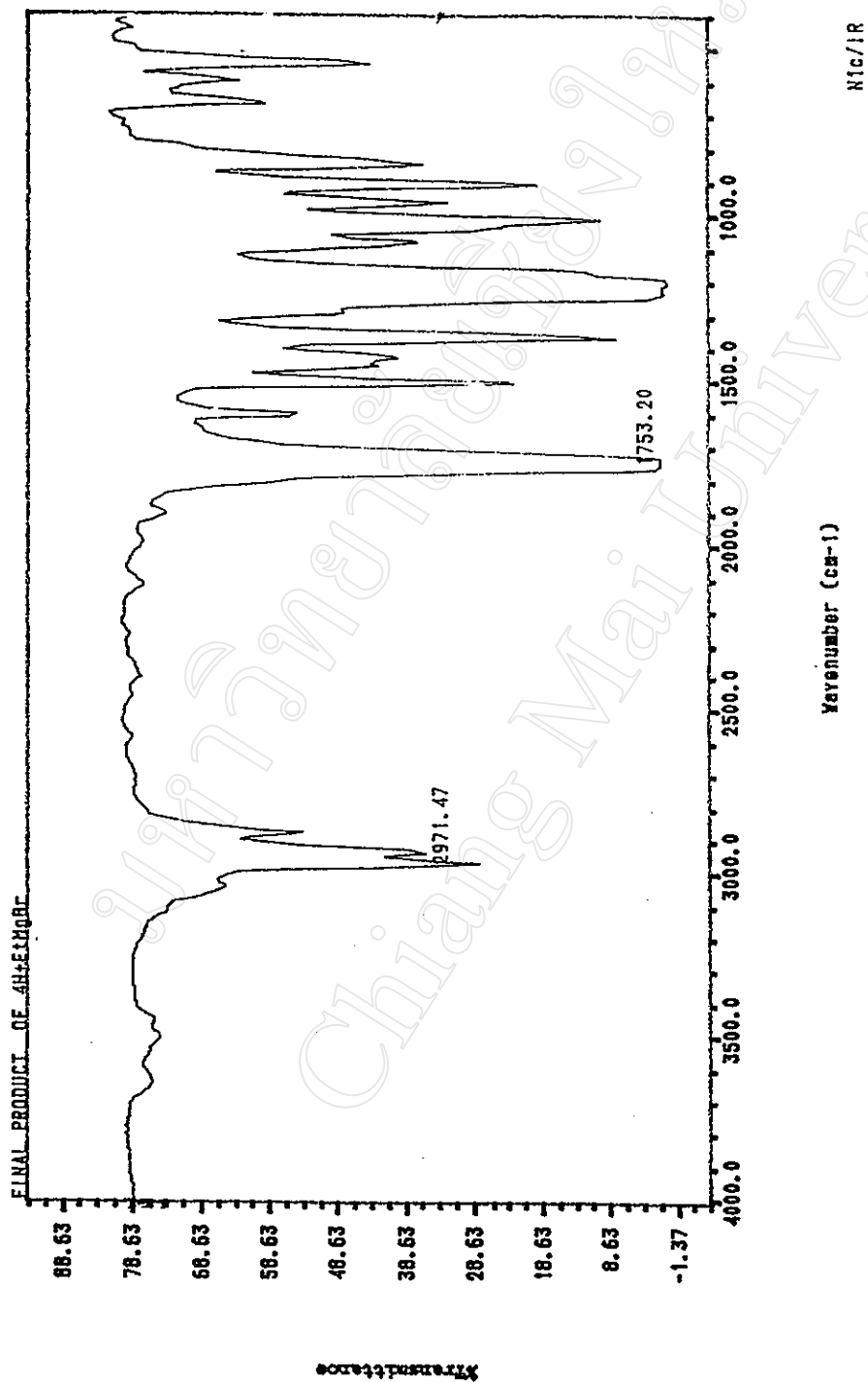


รูปที่ 2.11 แสดงโครมาโตแกรมของสาร(43)

Mass Spectrum File: MARI0 .03 05-03-10 14:16
 Comment: 4H + EtMgBr



รูปที่ 2.12 แสดงแมสสเปกตรัมของสาร(43)



รูปที่ 2.13 แสดง IR-spectrum ของสาร(35)

** ACQUISITION COMMENT **

Sample : Final product of 4H
+EtMgBr
Solvent : CDCl₃
Conc. : ~
Refer. : TMS
Tube D. : 5 mm.
Operator: S.KANJANAWONG
Date : 24/2/2000
Memo : YUI

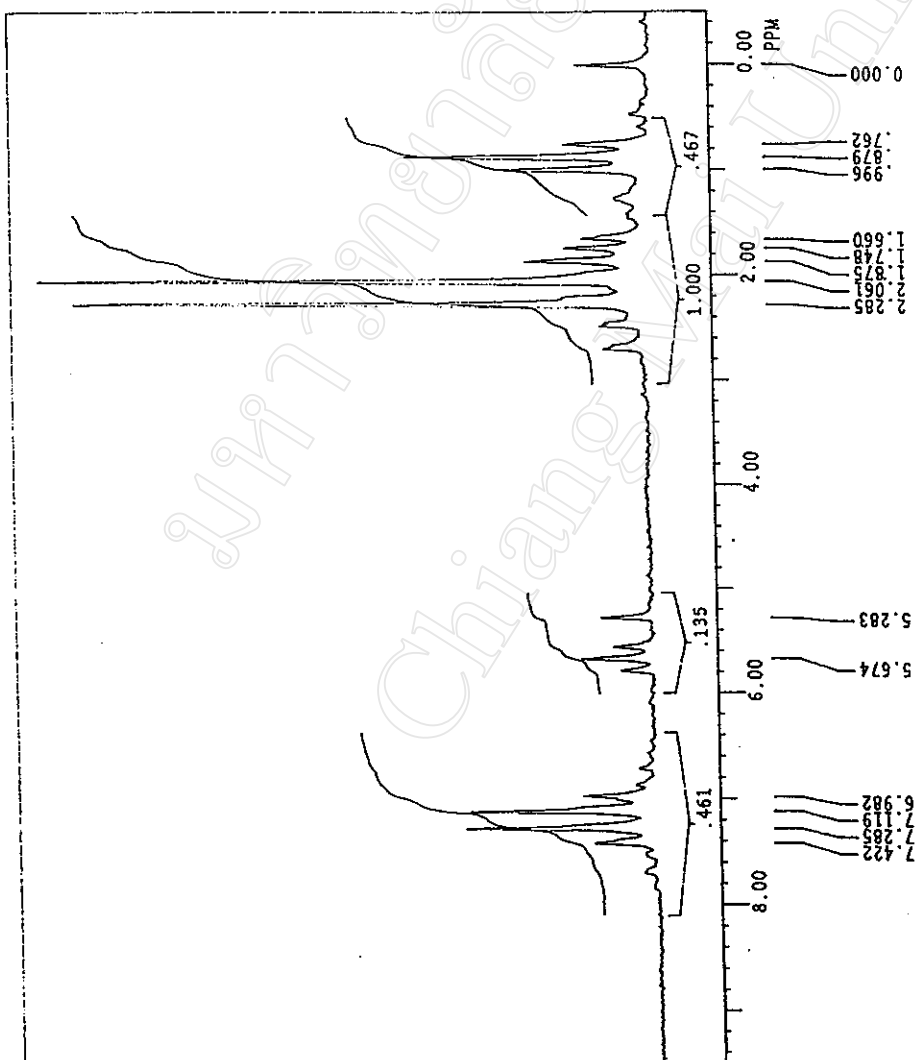
** ACQUISITION PARAMETER **

Acquis. mode : Normal
Spectrum width : 20 ppm
No. of acquis. : 8
Pulse interval : 5.0 sec
Data point : 4 k point

Pulse width 90 : 20 micro sec

** PROCESSING PARAMETER **

Proc. data point: 4 k point
Display range : 10.00 ppm
Display gain : 1.00
Gain mode : Normal

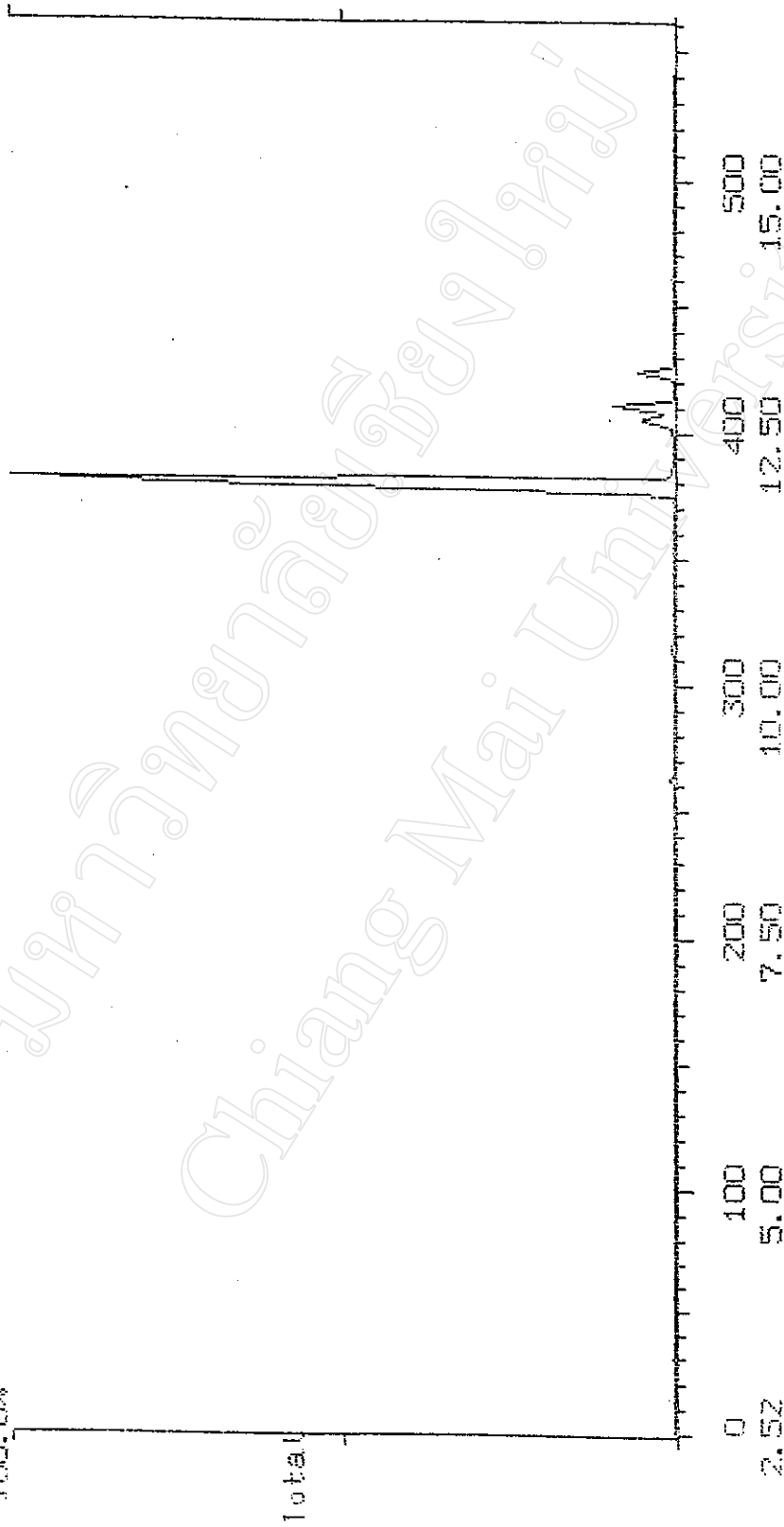


รูปที่ 2.14 แสดง ¹H- NMR ของสาร(35) ใน CDCl₃ มี TMS เป็น internal reference

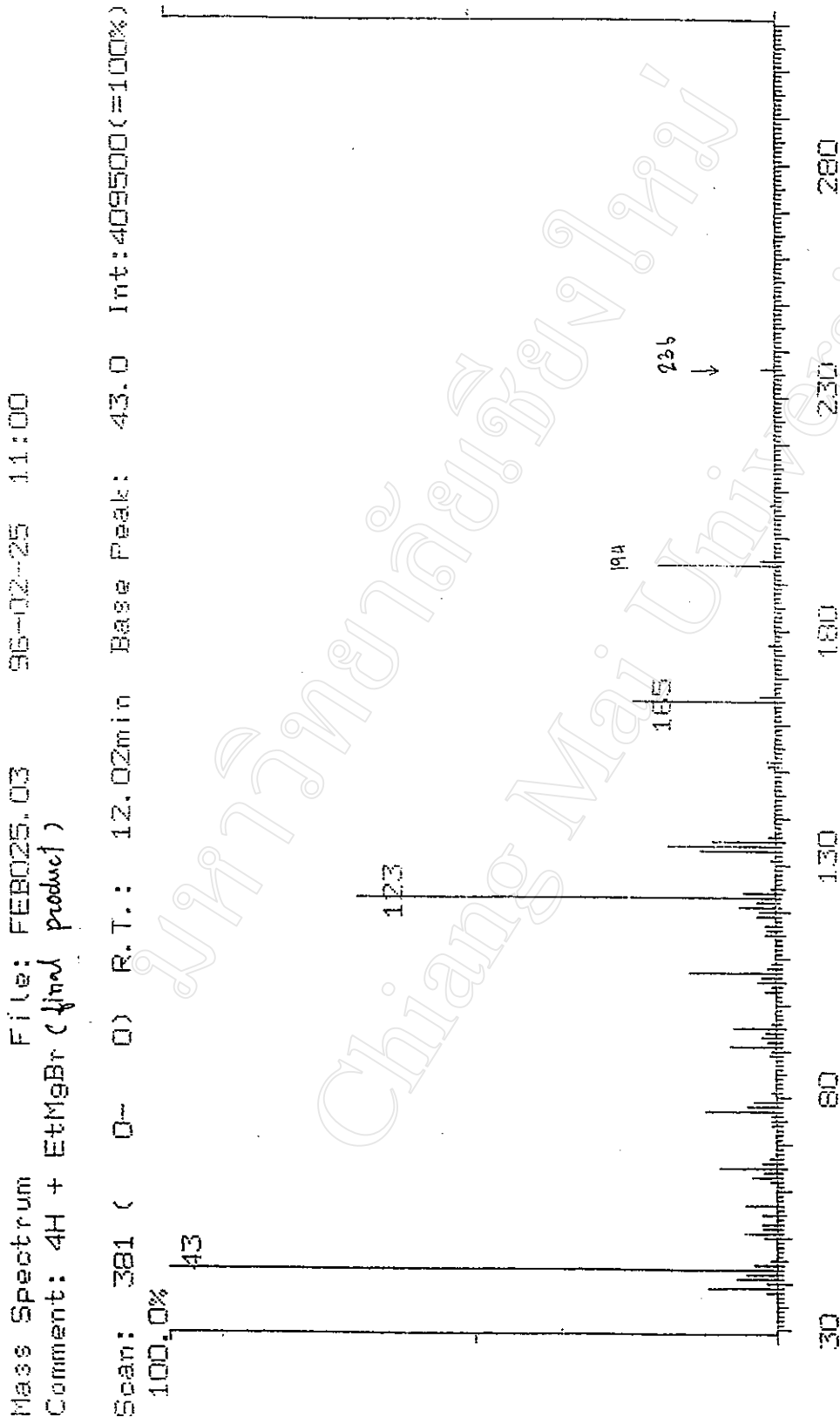
Chromatogram File: FEB025.03 96-02-25 11:00
 Comment: 4H + EtMgBr (final product)

Scan: 1 to 541 Int: 1754696 (=100%)

100.0%



รูปที่ 2.15 แสดงโครมาโตแกรมของสาร(35)

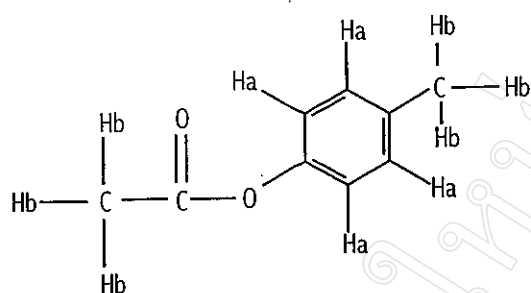


รูปที่ 2.16 แสดงแมสสเปกตรัมของสาร(35)

2.3.3 การเตรียมสาร 4-propylbenzyl acetate (40)^(17,18,42)

นำ *p*-cresol (2.36 g. ; 0.022 mol.) และ pyridine (8 ml.) ใส่ลงใน erlenmeyer flask เติม acetic anhydride (8 ml.) หยดลงไป (ใช้เวลาเติม 15 นาที) คนตลอดเวลาเป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเทลงบนน้ำแข็งละเอียด 25 g. และเติมน้ำลงไป 40 ml. และล้างด้วย CH_2Cl_2 โดยเขย่าในกรวยแยกก่อนแยกสารละลายชั้น CH_2Cl_2 ออกและล้างด้วยน้ำ, 5% H_2SO_4 และสารละลายอิ่มตัวของ NaHCO_3 หลาย ๆ ครั้งและตามด้วยน้ำจนเป็นกลาง นำสารละลาย ของ CH_2Cl_2 ที่ได้มาทำการกำจัดน้ำโดยใช้ MgSO_4 และกรอง จากนั้นระเหยเอา CH_2Cl_2 ออกภายใต้ความดันต่ำ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาแยกโดยใช้ TLC (silica gel 60 G) และ column chromatography (silica 60 for column) โดยใช้ developing solvent คือ hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 80 : 20 ได้สาร (44) 2.15 g. (65.15%) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค IR, NMR และ GC/MS (ดูรูปที่ 2.17, 2.18, 2.19, 2.20 และตารางที่ 2.5) หลังจากนั้นนำสาร (44) (6.0 g. ; 0.040 mol.) ใส่ลงในขวดก้นกลมที่ต่ออยู่กับ reflux condenser เติม N-bromosuccinamide (6.44 g. ; 0.0362 mol.), benzoyl peroxide (0.0536 g.) และ CCl_4 (24.0 ml.) ลงไป ให้ความร้อนและทำการ reflux สารละลายเป็นเวลา 6 – 8 ชั่วโมง จะเกิดตะกอนขึ้น นำตะกอนที่ได้มากรองและล้างด้วย CCl_4 ร้อน ครั้งละ 5 ml. 2 ครั้ง นำสารละลายมาทำการระเหยเอาตัวทำละลายออก นำสารที่ได้มาทำ Grignard reaction ต่อไปโดยใช้ EtMgBr (12 ml. ; 0.034 mol.) ใน ether (4 ml.) เติมน้ำในขวดก้นกลมขนาด 100 ml. เติมสาร (45) (6.23 g. ; 0.027 mol.) ใน ether (2 ml.) ลงในขวดก้นกลม ห้ามไม่ให้อุณหภูมิเกิน -5°C . คนตลอดเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเทบนน้ำแข็งทุบ เติมสารละลาย 15% H_2SO_4 (16 ml.) จากนั้นแยกชั้นน้ำ และ ether ออกจากกันโดยใช้กรวยแยก เติม K_2CO_3 0.5 g เพื่อกำจัดน้ำออกจาก ether กรองเอา K_2CO_3 ออก แล้วทำการระเหยเอาตัวทำละลายออก นำสารที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ column chromatography และใช้ solvent คือ hexane : ethyl acetate อัตราส่วน 80:20 นำสารที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออก นำไปวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค IR, NMR และ GC/MS (ดูรูปที่ 2.21, 2.22, 2.23, 2.24 และตารางที่ 2.6) จะได้สาร (40)หนัก 4.29 g. (60.25 % เทียบจากสาร (44); 0.024 mol.)

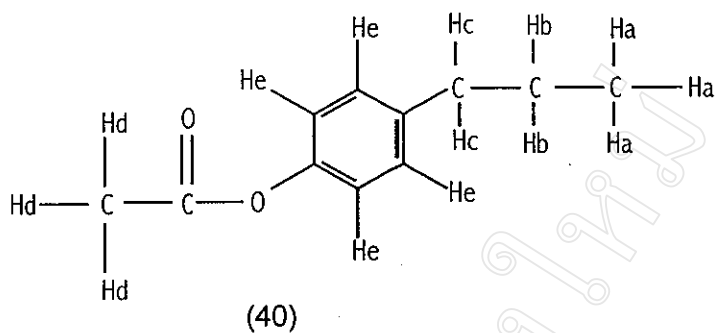
ตารางที่ 2.5 แสดงผลการวิเคราะห์สาร (44)



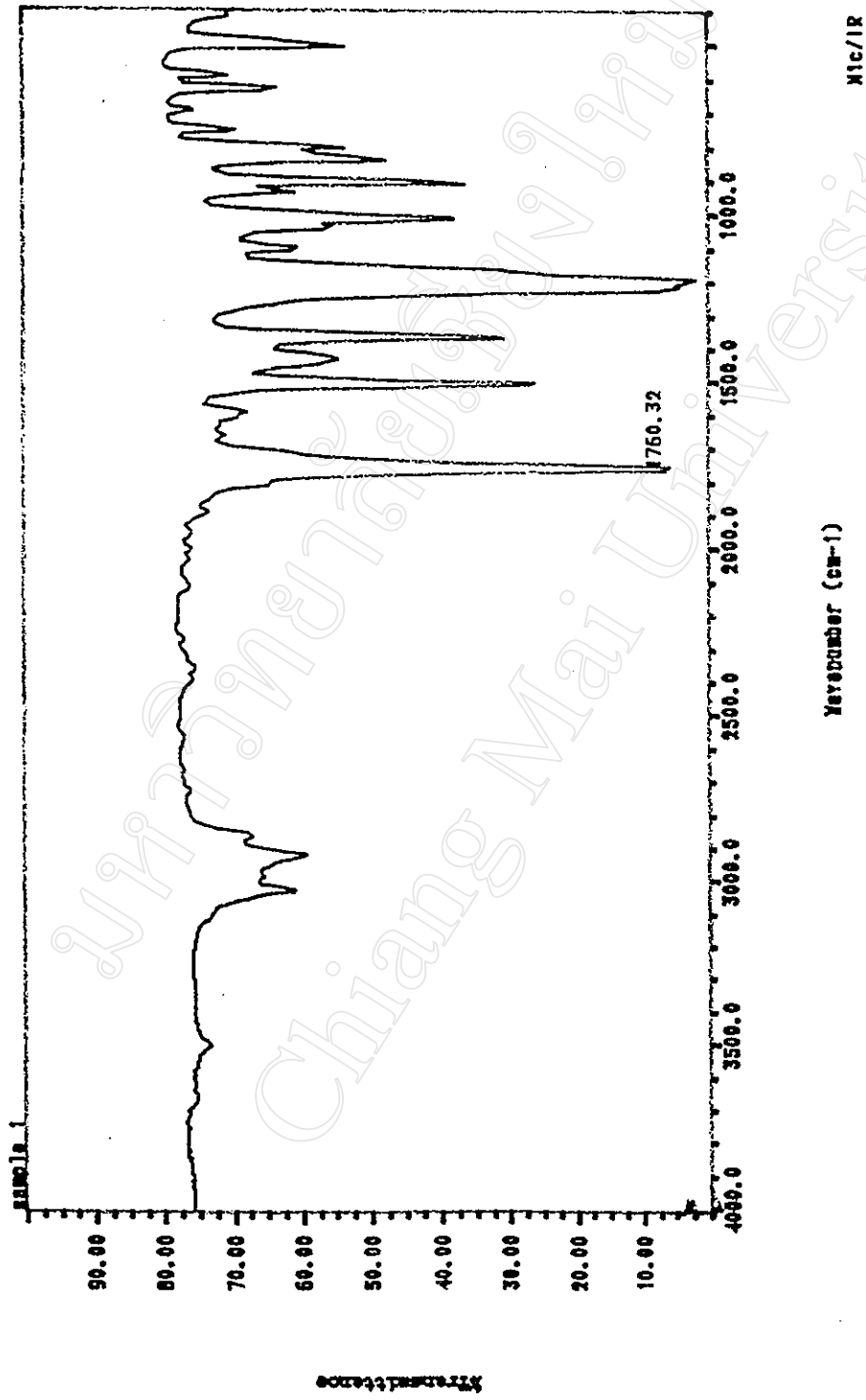
(44)

IR ($\bar{\nu}_{Max}$)	2950 cm^{-1} , C-H stretching
Neat	1760 cm^{-1} , O=C-O stretching
NaCl cell	1500 cm^{-1} , aromatic C=C stretching
	1375 cm^{-1} , C-H bending
	1200 cm^{-1} , C-O stretching
NMR (ppm.)	6.875 – 7.256 , มี 4H , Ha
ใน CDCl_3	2.256-2.329 , มี 6H , Hb
มี TMS เป็น internal reference	
MS	150(14.0%)[M] ⁺ , 107(100%)[M-CH ₃ CO] ⁺ , 90
(relative intensity)	(22.7%), 77 (74.6%), 51(43.2%), 43(100%)

ตารางที่ 2.6 แสดงผลการวิเคราะห์สาร (40)



IR ($\bar{\nu}_{Max}$)	2950 cm^{-1} , C-H stretching
Neat	1760 cm^{-1} , O=C-O stretching
NaCl cell	1500 cm^{-1} , aromatic C=C stretching
	1375 cm^{-1} , C-H bending
	1200 cm^{-1} , C-O stretching
NMR (ppm.)	6.64 – 7.10 , 4H , He
ใน CDCl_3	2.00 – 2.60 , 5H , Hc และ Hd
มี TMS เป็น internal	1.00 – 1.40 , 2H , Hb
reference	0.60 – 1.00 , 3H , Ha + impurity
MS , m/z	178(14.3%)[M] ⁺ , 149(24.4%)[M-CH ₂ CO] ⁺ , 136
(intensity 70 ev.)	(41.3%)[M-CH ₃ CO] ⁺ , 117(47.1%), 107(100%), 91(38.2%), 77(24.0%), 43(73.8%)



รูปที่ 2.17 แสดง IR-spectrum ของสาร(44)

** ACQUISITION COMMENT **

Sample : SAMPLE 1

Solvent : CDCl₃
 Conc. : -
 Refer. : TMS
 Tube D. : 5 mm
 Operator: S.ARAMRUENG
 Date : 18/11/1999
 Memo : YUI

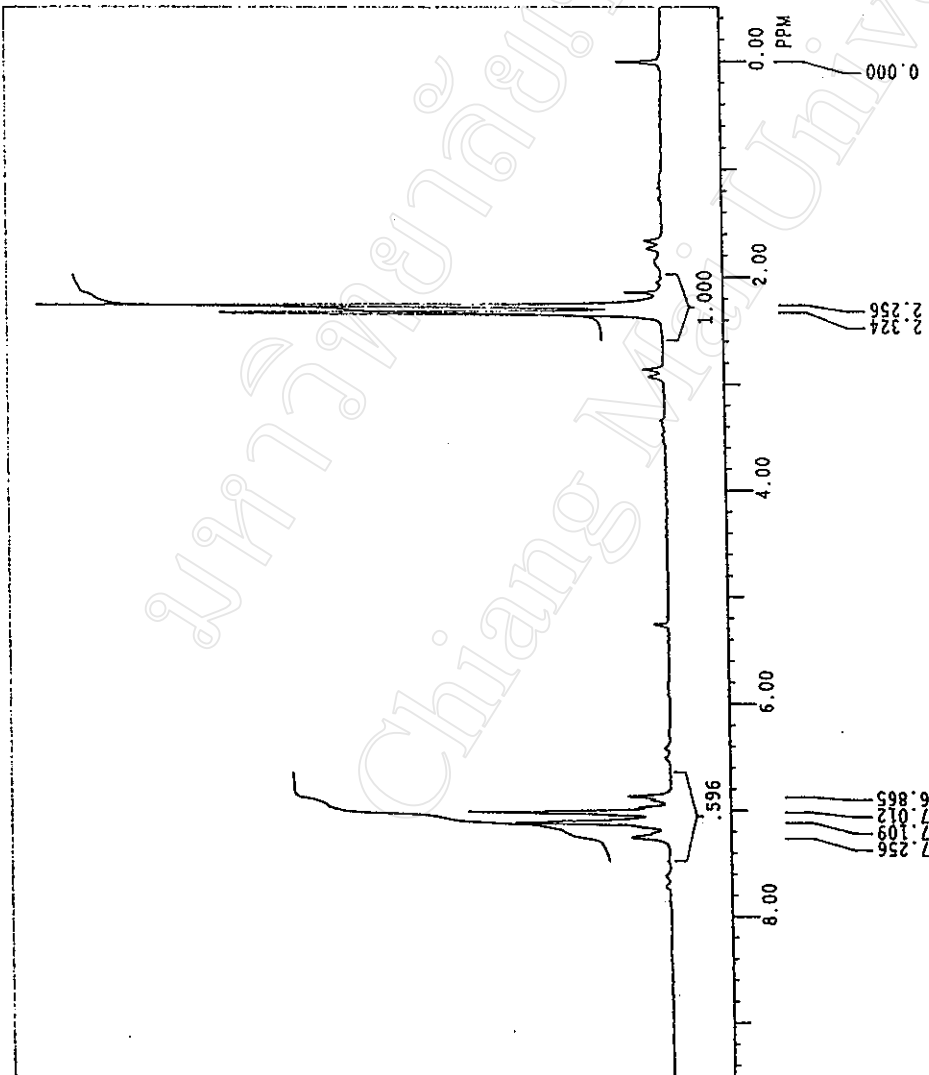
** ACQUISITION PARAMETER **

Acquis. mode : Normal
 Spectrum width : 20 ppm
 No. of acquis. : 8
 Pulse interval : 5.0 sec
 Data point : 4 k point

Pulse width 90 : 20 micro sec

** PROCESSING PARAMETER **

Proc. data point: 4 k point
 Display range : 10.00 ppm
 Display gain : 1.00
 Gain mode : Normal



รูปที่ 2.18 แสดง ¹H-NMR ของสาร(44) ใน CDCl₃ มี TMS เป็น internal reference

Chromatogram File: MAR10_02 05-03-10 12:59
Comment: p-resol, acetylated

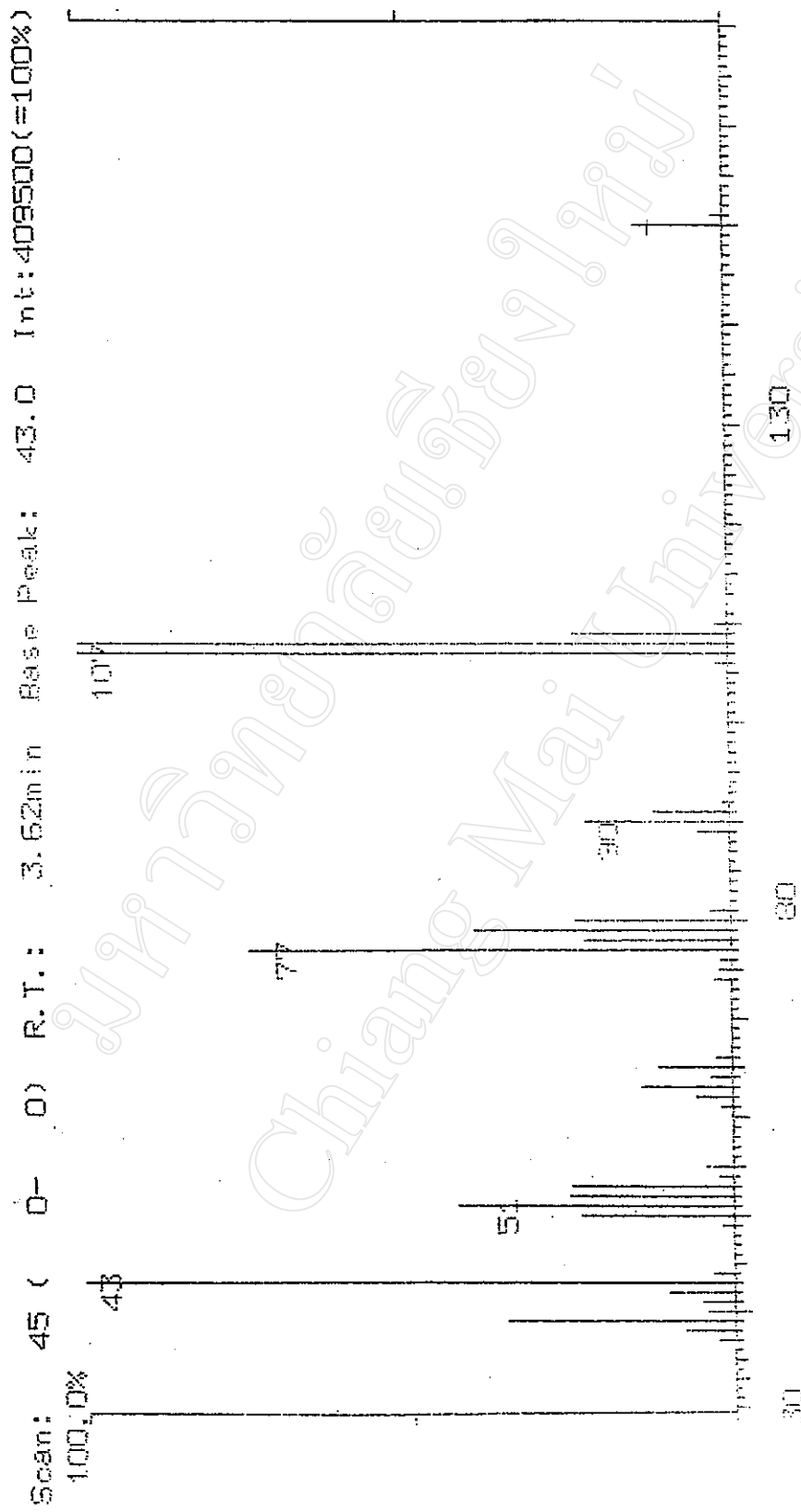
Scan: 1 to 383 Int: 3237332 (=100%)

100.0%

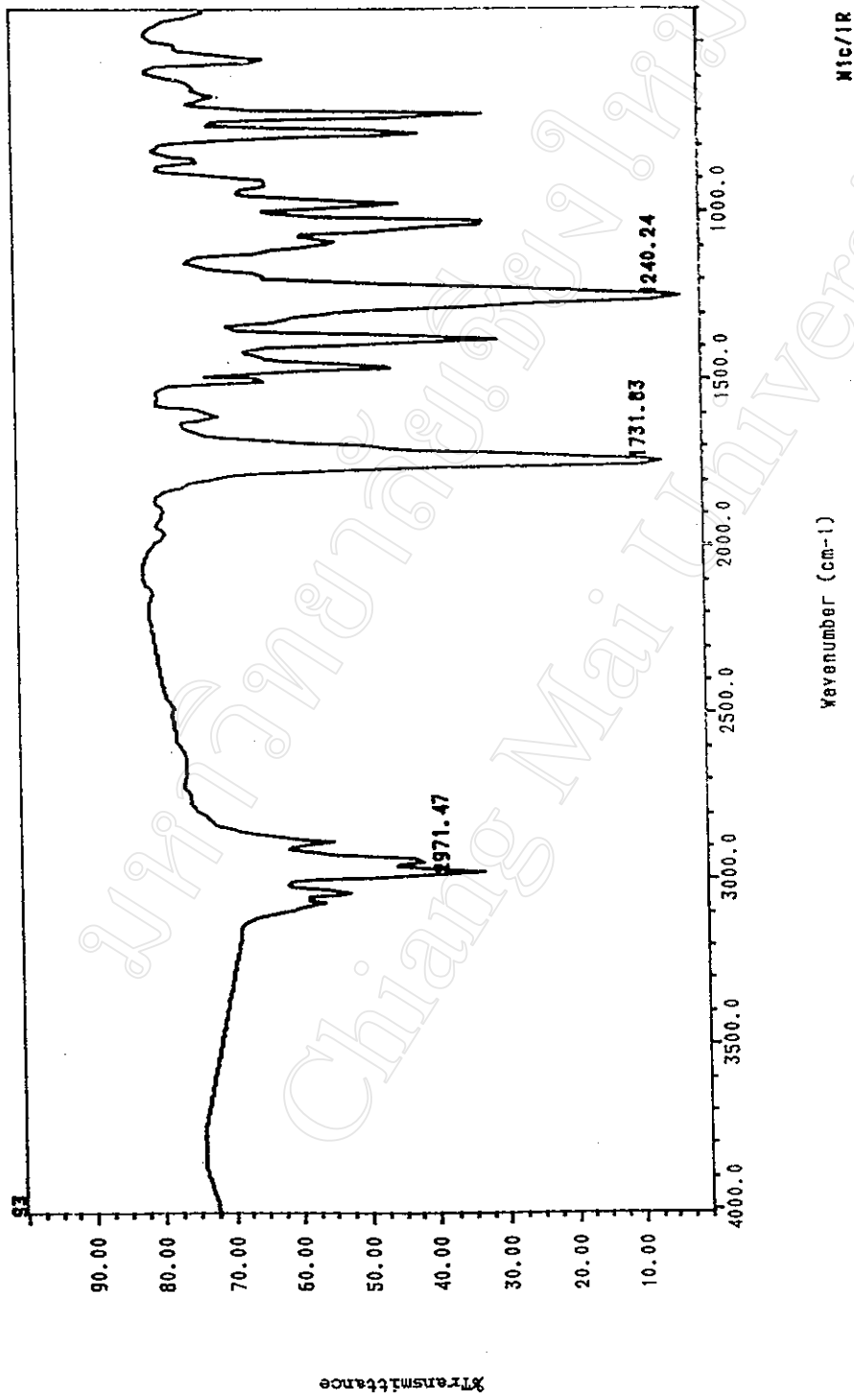


รูปที่ 2.19 แสดงโครมาโตแกรมของสาร(44)

Mass Spectrum File: MAR10 .02 9/6-03-10 13:55
 Comment: p-cresol, acetylated



รูปที่ 2.20 แสดงแมสสเปกตรัมของสาร(44)



รูปที่ 2.21 แสดง IR-spectrum ของสาร(40)

** ACQUISITION COMMENT **

Sample : S3 FRACTION

Solvent : CDCl₃

Conc. : ~

Refer. : TMS

Tube D. : 5 mm

Operator: S. ARAMRUENG

Date : 7/2/2000

Memo : YUJ

** ACQUISITION PARAMETER **

Acquis. mode : Normal

Spectrum width : 20 ppm

No. of acquis. : 8

Pulse interval : 5.0 sec

Data point : 4 k point

Pulse width 90 : 20 micro sec

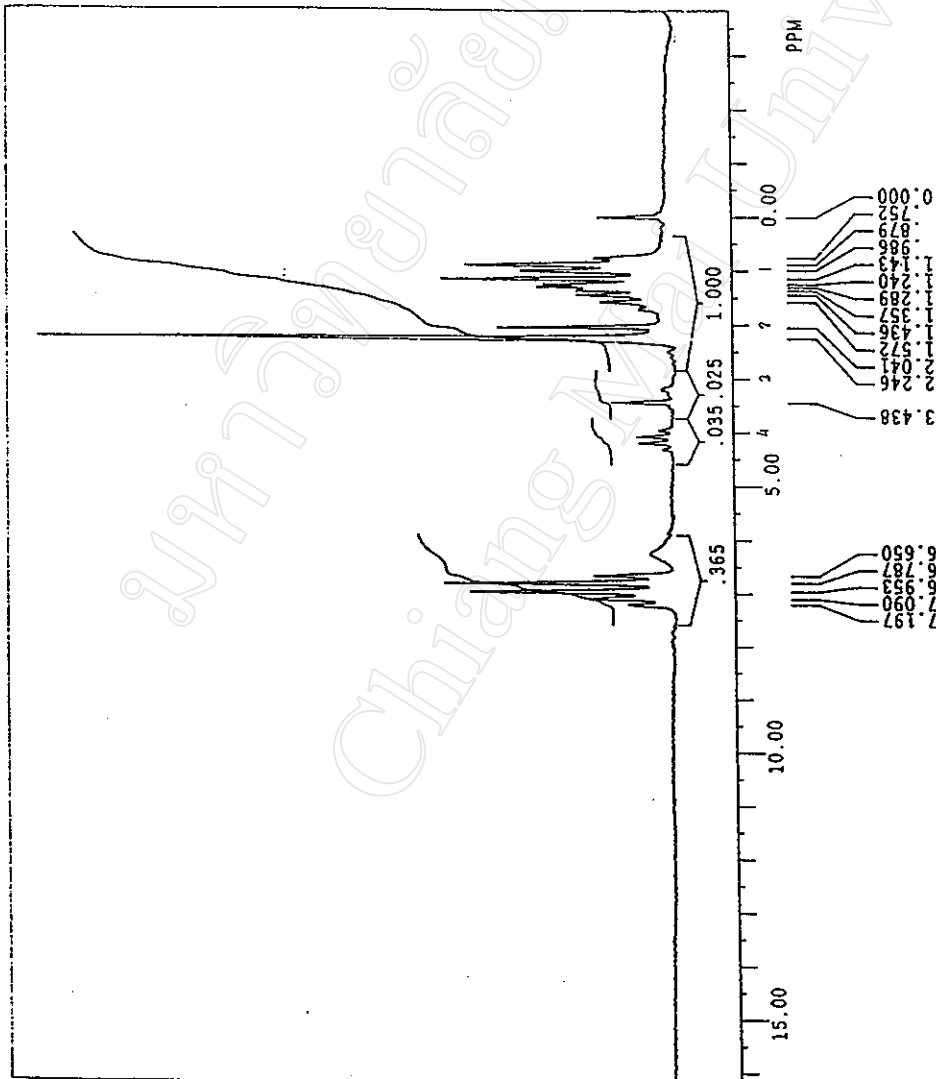
** PROCESSING PARAMETER **

Proc. data point: 4 k point

Display range : 20.00 ppm

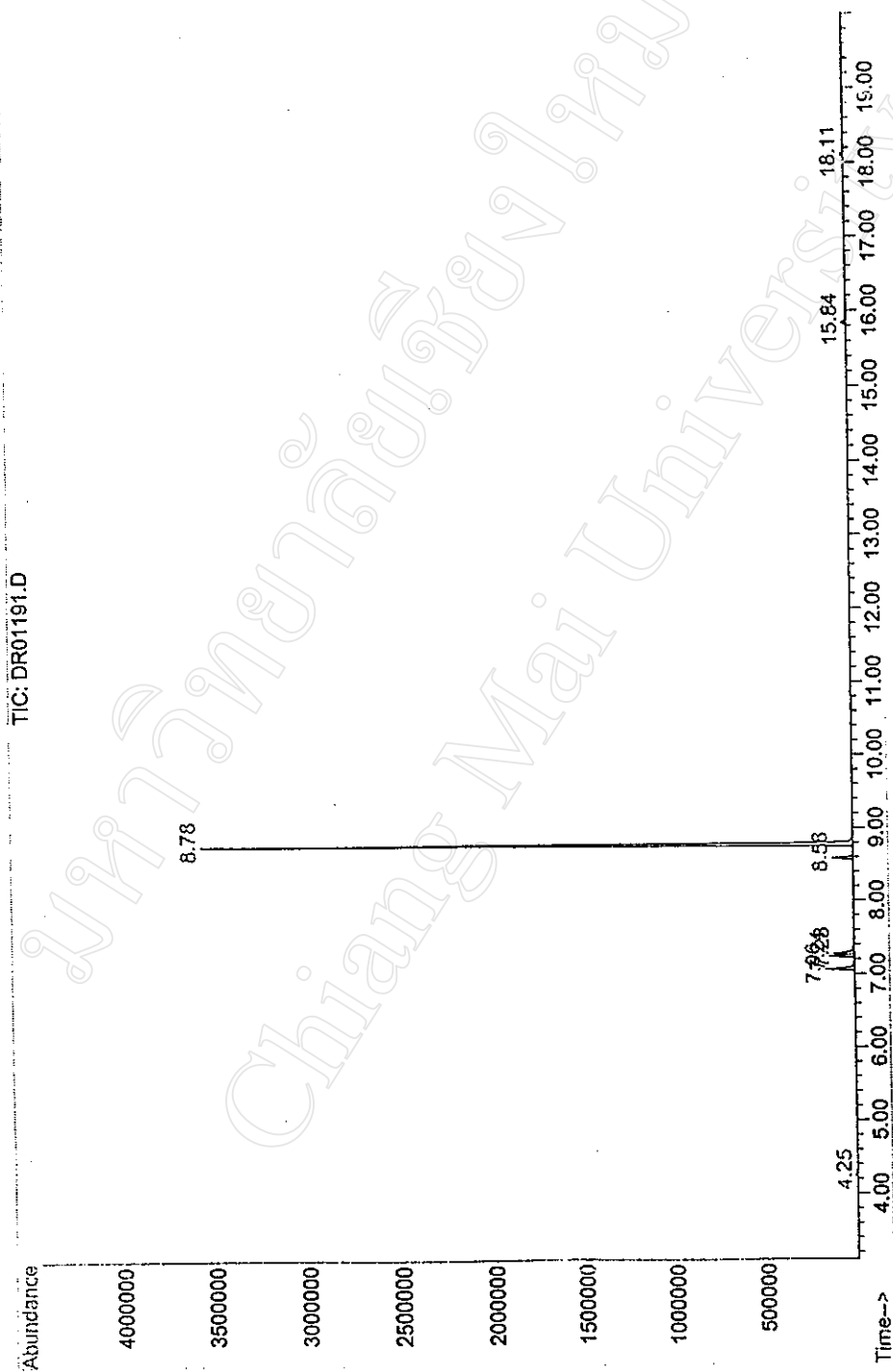
Display gain : 1.00

Gain mode : Normal

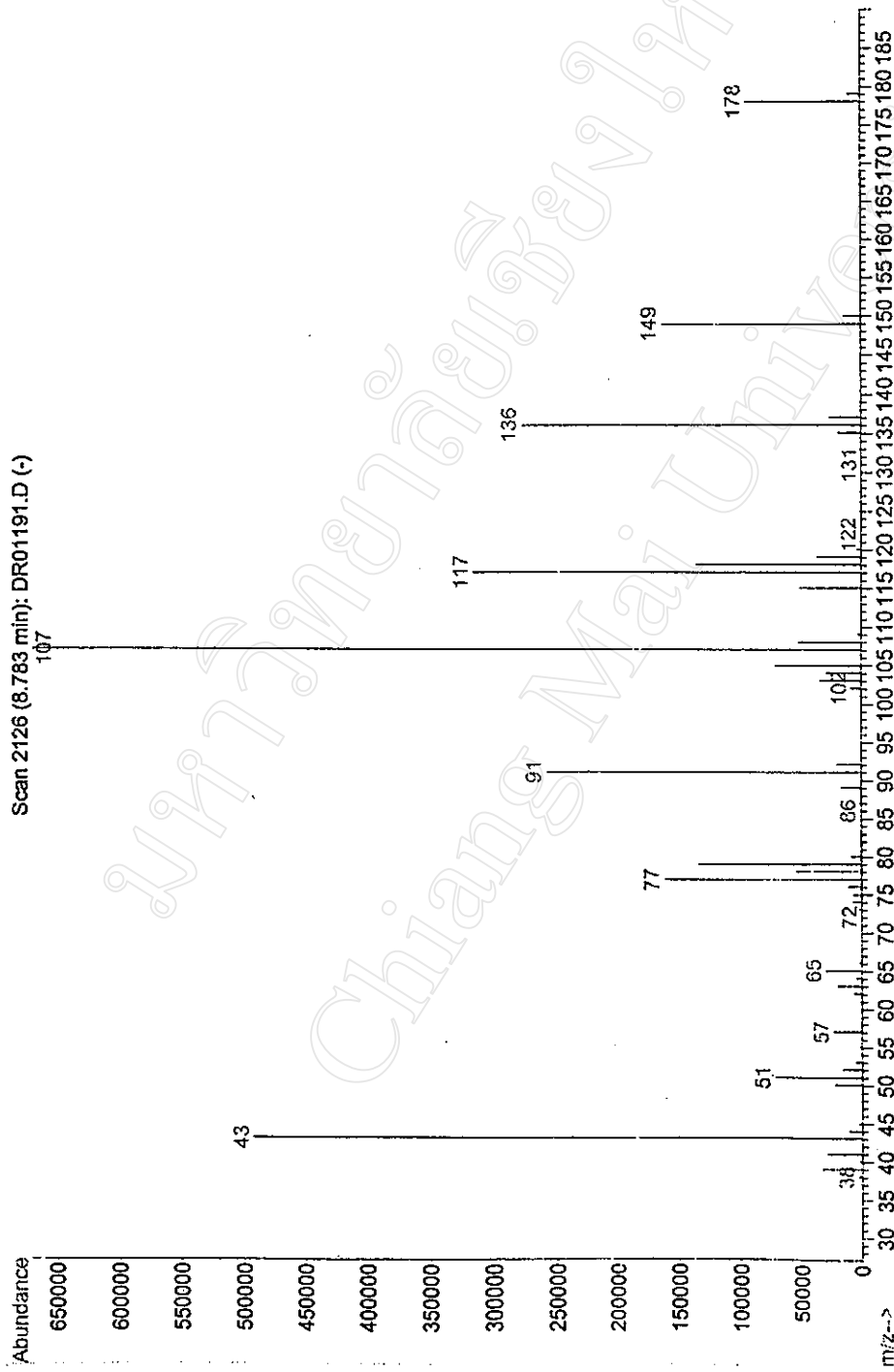


รูปที่ 2.22 แสดง ¹H- NMR ของสาร(40) ใน CDCl₃ มี TMS เป็น internal reference

File : C:\HPCHEM\1\DATA\DR01191.D
Operator : Pisan
Acquired : 19 Sep 2001 10:36 using AcqMethod WARM
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: S3
Misc Info : 70(2) 10 240(6) 250:1
Vial Number: 1



รูปที่ 2.23 แสดงโครมาโตแกรมของสาร(40)

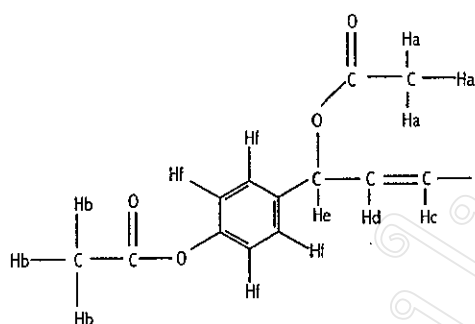


รูปที่ 2.24 แสดงแมสสเปกตรัมของสาร(40)

2.3.4 การสกัดสาร 1'-acetoxychavicol acetate (5) จากข้าว⁽¹²⁾

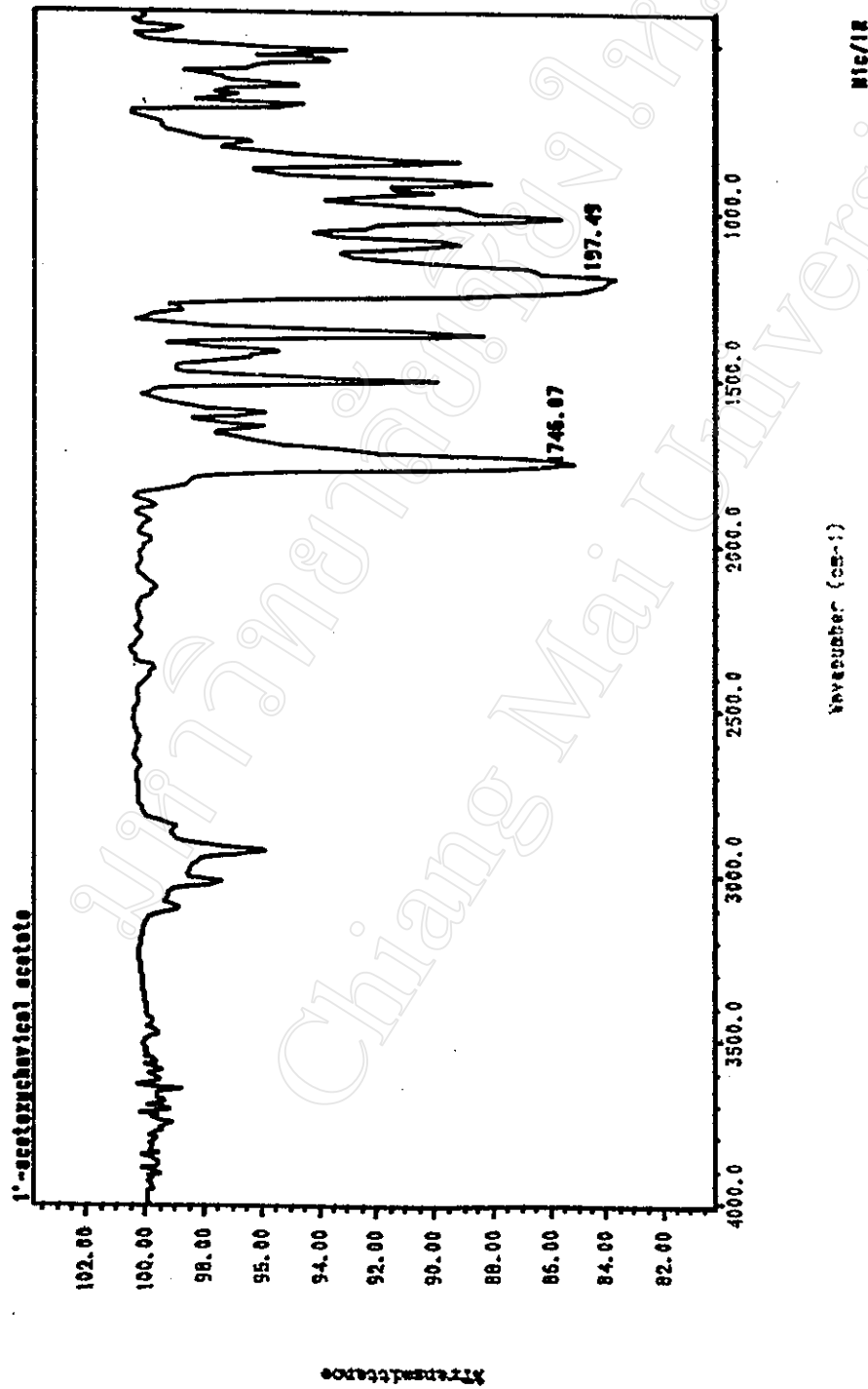
นำข้าว(เจ้าสด)มาล้างให้สะอาด ทิ้งไว้พอหมาด ๆ ก่อนนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปตากลมให้แห้งแล้วจึงนำไปบดให้ละเอียด นำข้าวที่บดแล้ว (5 kg.) ไปแช่ในสารโคคลอโรมีเทนเติมจนท่วม แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมารองโดยใช้กระดาษกรอง (Whatman No.1) นำกากที่ได้ไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มารวมกันและระเหยเอาตัวทำละลายออกจนเกือบแห้งเติม sodium sulfate anhydrous เพื่อกำจัดน้ำ กรองด้วยกระดาษกรองแล้วนำไประเหยจนแห้ง เรียกส่วนสกัดที่ได้นี้ว่าส่วนสกัดหยาบ จะได้ส่วนสกัดหยาบ 82.45g. (1.65%) นำส่วนสกัดหยาบที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ column chromatography (silica gel 60 G) ที่มีระบบตัวทำละลายคือ hexane : ethyl acetate : methanol อัตราส่วน 60 : 40 : 1 แล้วนำสารละลายแต่ละส่วนที่แยกได้มาทำ TLC-bioassay และฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ใช้เวลาบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง พบว่ามีส่วนของสารละลายสีเหลืองส่วนหนึ่งสามารถต้านเชื้อราได้เป็นแถบกว้างที่ $R_f = 0.64 - 0.73$ ชูดเอาสารละลายสีเหลืองที่สามารถต้านเชื้อราได้มาสกัดด้วย MeOH : $CHCl_3$ อัตราส่วน 1 : 1 และทำให้แห้งด้วย $MgSO_4$ แล้วจึงระเหยเอาตัวทำละลายออกจนหมด นำส่วนของสารละลายสีเหลืองที่แยกได้มาแช่ในสารละลายผสมระหว่างเฮกเซนและไดคลอโรมีเทน (อัตราส่วน 1 : 1) ให้ปริมาณของสารละลายผสมเพียงเล็กน้อย นำส่วนของสารละลายที่แยกได้ไปแช่ที่อุณหภูมิ $0^{\circ}C$. เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ พบว่าจะเกิดผลึกขึ้น นำผลึกที่ได้มารองแยกผลึกออกมาโดยใช้กระดาษกรอง นำผลึกที่ได้มาผึ่งให้แห้ง จะได้ผลึกหนัก 2.13 g. (0.043%) พบว่าผลึกที่ได้มีค่า melting point อยู่ในช่วง $68 - 71^{\circ}C$. จากนั้นจึงนำผลึกที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย IR, NMR และ GC / MS. ได้ผลดังรูปที่ 2.25, 2.26, 2.27, 2.28 และตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 แสดงผลการวิเคราะห์สาร 1' - acetoxychavicol acetate (5)



(5)

IR ($\bar{\nu}_{Max}$) Neat NaCl cell	2970 cm^{-1} , C-H stretching 1746 cm^{-1} , O=C-O stretching 1650 cm^{-1} , C=C stretching 1350 cm^{-1} , C-H bending 1197 cm^{-1} , C-O stretching
NMR (ppm.) (Acetone - d_6)	7.0 – 7.6 , q มี 4 H , Hf 5.7 – 6.4 , m มี 2 H , He และ Hd 5.0 – 5.5 , m มี 2 H , Hc 2.2 – 2.4 , s มี 3 H , Hb 2.0 – 2.2 , s มี 3 H , Ha
MS , m/z (intensity 70 ev.)	234 $[M]^+$, 192(50.8%) $[M-CH_2CO]^+$, 150(93.5%) $[M-2CH_2CO]^+$, 132(100%) , 121 (35.1%) , 43(100%)



รูปที่ 2.25 แสดง IR-spectrum ของสาร(5)

** ACQUISITION COMMENT **

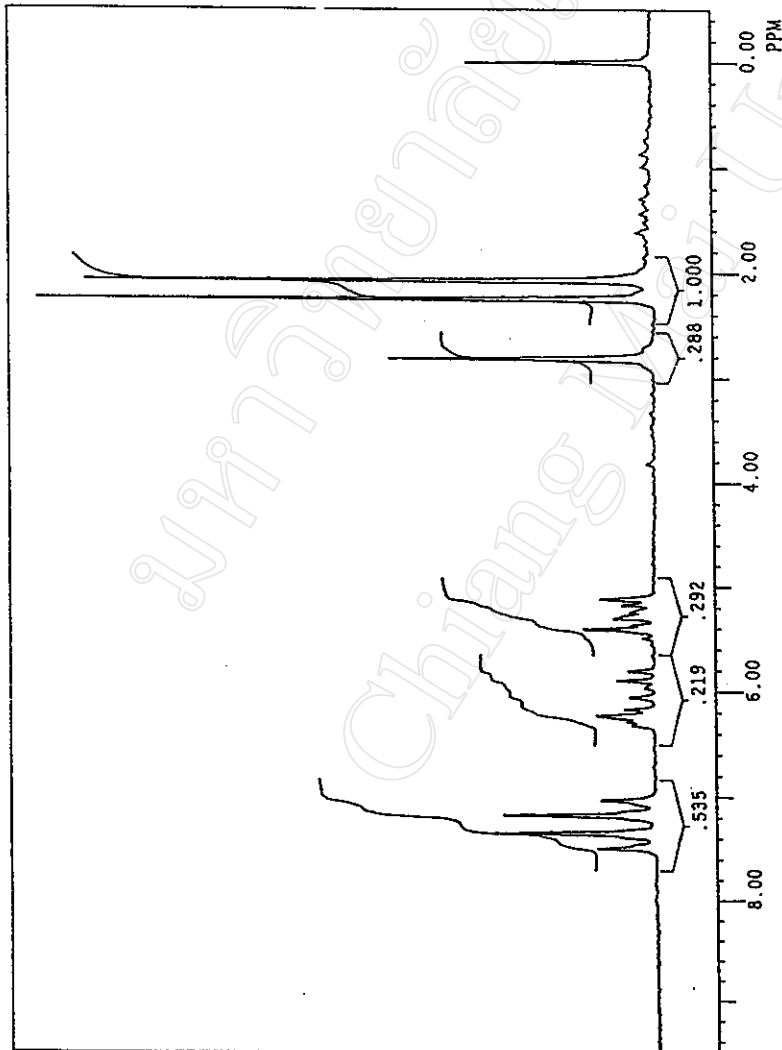
Sample : 1"-ACETOXYCHAVICAL A
 CETATE
 Solvent : ACETONE-D6
 Conc. : -
 Refer. : -
 Tube D. : 5 mm
 Operator: S.ARAMRUENG
 Date : 12/9/2000
 Memo : YU1

** ACQUISITION PARAMETER **

Acquis. mode : Normal
 Spectrum width : 20 ppm
 No. of acquis. : 8
 Pulse Interval : 5.0 sec
 Data point : 4 k point
 Pulse width 90 : 20 micro sec

** PROCESSING PARAMETER **

Proce.data point: 4 k point
 Display range : 10.00 ppm
 Display gain : 1.00
 Gain mode : Normal



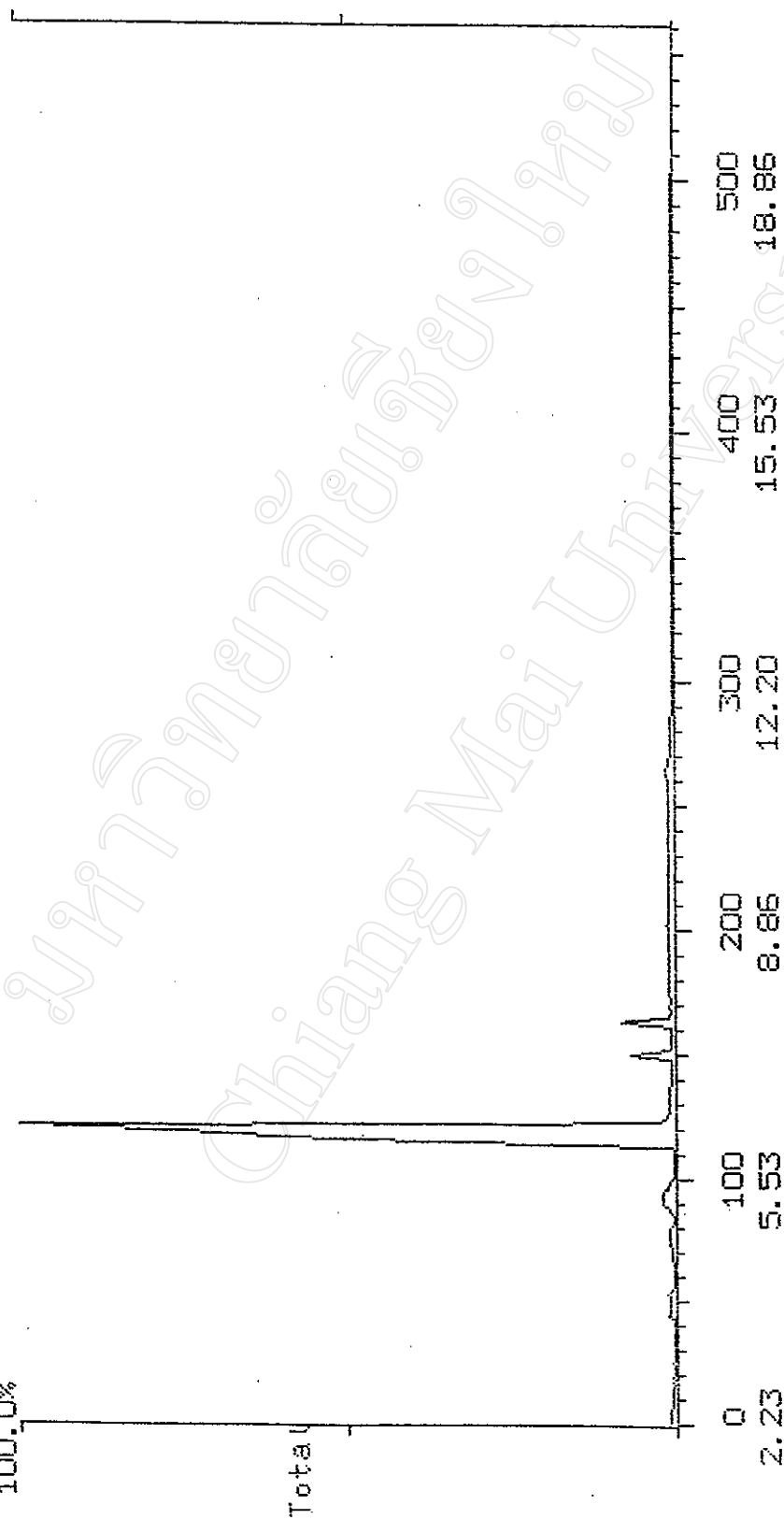
HITACHI R-1500

รูปที่ 2.26 แสดง ¹H- NMR ของสาร(5) ใน CDCl₃ มี TMS เป็น internal reference

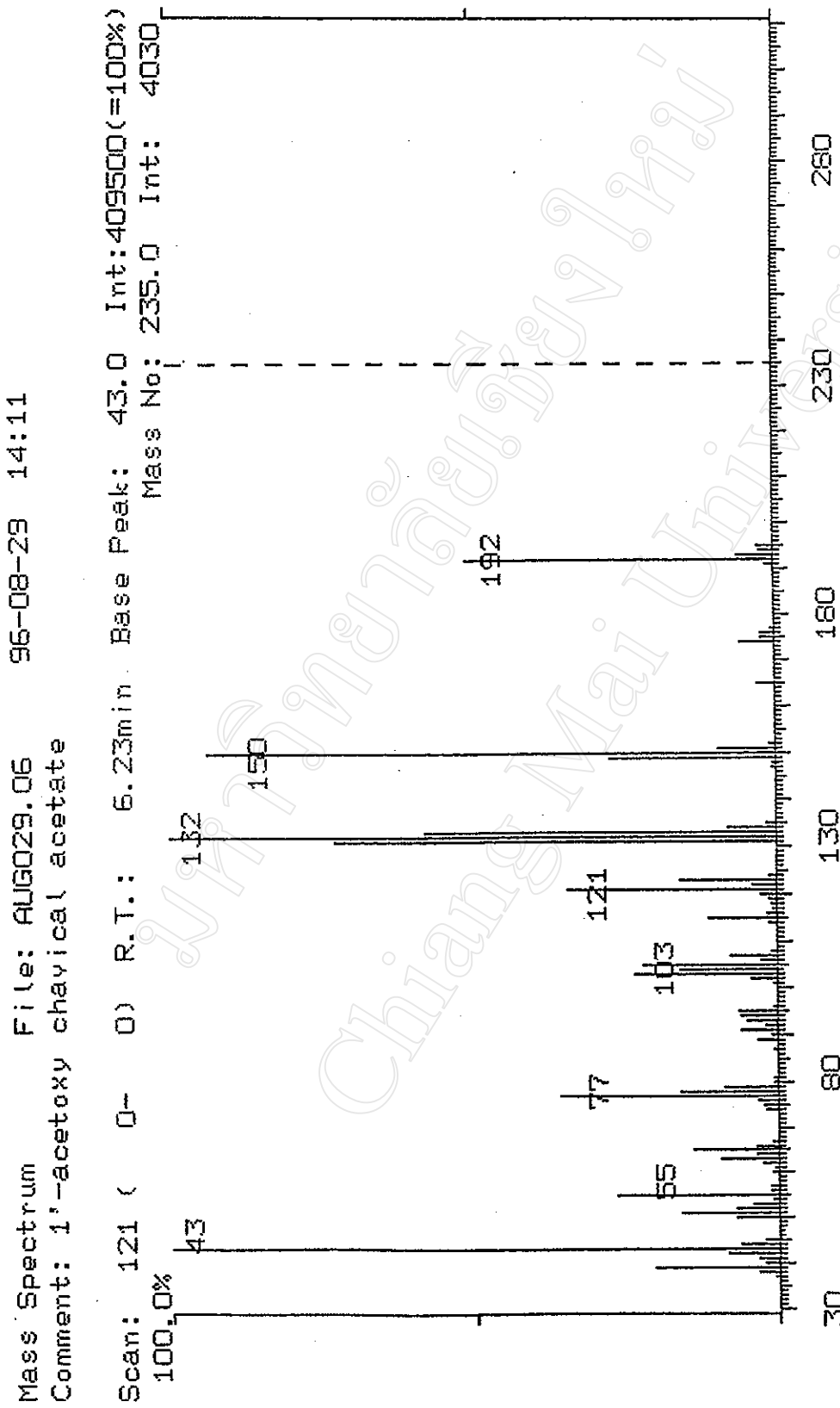
Chromatogram File: AUG029.06 96-08-29 14:11
 Comment: 1'-acetoxy chavicol acetate

Scan: 1 to 503 Int: 3925617(=100%)

100.0%



รูปที่ 2.27 แสดงโครมาโตแกรมของสาร(5)



รูปที่ 2.28 แสดงแมสสเปกตรัมของสาร(5)

2.3.5 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา (PDA)⁽¹²⁾

น้ำมันฝรั่ง (200 g.) มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปต้มกับน้ำกลั่น (500 ml.) จนเดือด พอเนื้อมันสุก (บีบแตกได้) ก็นำมากรองเอาเนื้อมันออก นำสารละลายที่ได้มาเติม กลูโคสและผงวุ้น (17 g.) ลงไป คนจนละลายปรับปริมาตรน้ำให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นำอาหารที่เตรียมใส่ลงในขวดที่ทำความสะอาดแล้ว ปิดปากขวดด้วยจุกสำลีแล้วหุ้มจุกขวดด้วยกระดาษรัดปากขวดให้แน่นด้วยยางรัด นำขวดอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดัน 15 Psi. อุณหภูมิ 121 °C. นาน 20 นาที ปลอຍให้เย็นแล้วนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อรา เมื่อจะใช้ให้นำมาอุ่นให้หลอม แล้วจึงเทลงในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 15 – 20 มล. ต่อหนึ่งจาน แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

2.3.6 การทดสอบฤทธิ์ ด้านเชื้อรา โดยวิธี Agar Overlay Technique⁽³⁹⁾

1. การเตรียมเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*

เพาะเชื้อราที่ต้องการทดสอบให้มีอายุ 5 วัน โดยเกลี่ยบนจานอาหารให้กระจายทั่วจาน

2. การเตรียมสารละลายของสาร (5), (35), (38), (39)*, (40) และ (41)*

เตรียมสารละลาย ของสารที่จะทดสอบแต่ละสารให้มีความเข้มข้น ดังนี้

10^5 ppm. , 10^4 ppm. , 10^3 ppm. , 10^2 ppm , 10 ppm. โดยใช้ตัวทำละลายคือ acetone.

* เป็นสารที่สั่งซื้อได้จากบริษัท ฟลักก้า

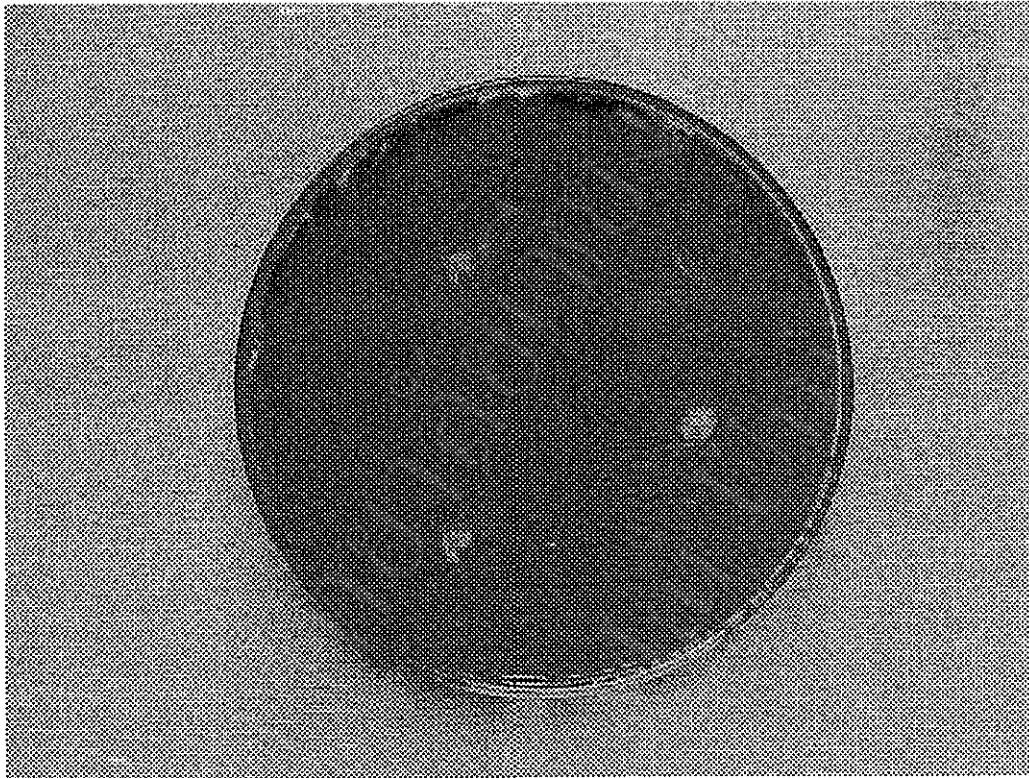
3. การทดสอบฤทธิ์ ด้านเชื้อรา

ทำการเจาะรู (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1 cm.) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จานละ 3 รู หยดสารละลาย 1 μ l. ลงไปในรูที่ทำการเจาะไว้ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C. เป็นเวลา 3 – 4 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดวงใสรอบหยดสาร

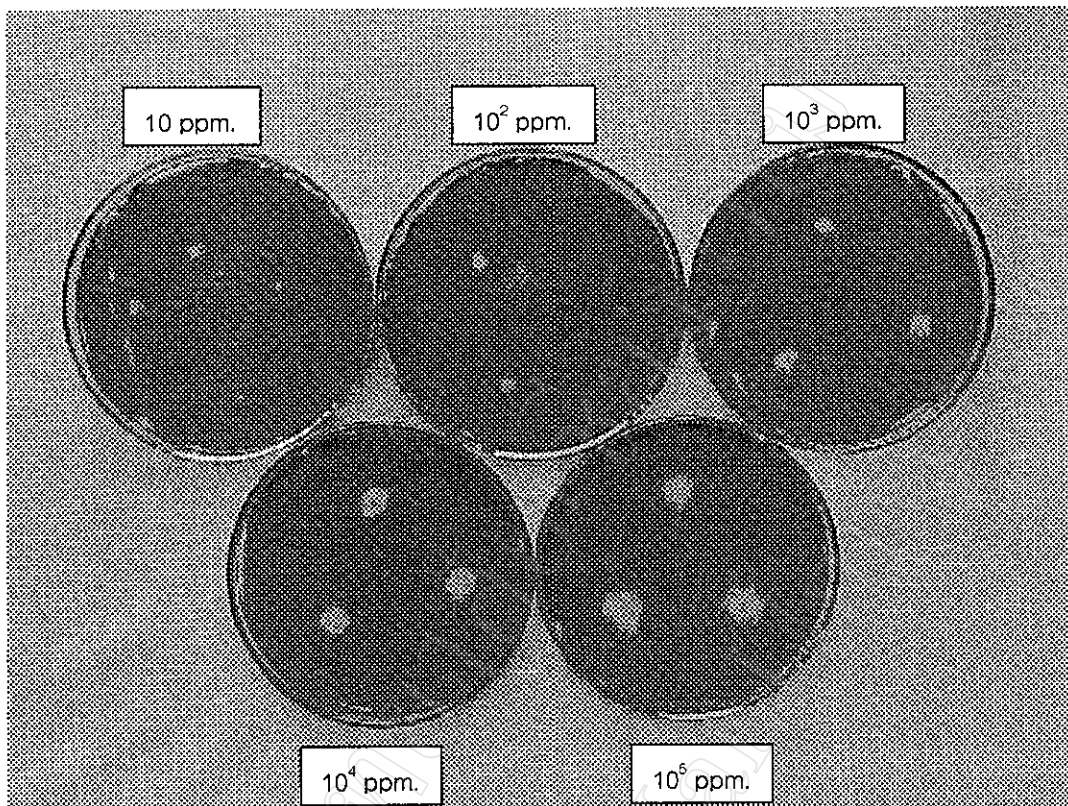
หมายเหตุ การเตรียมสาร 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10 ppm. ทำได้โดย

1. ชั่งสาร 0.100 g. เติมน้ำ 1 ml. จะได้สาร 10^5 ppm. (ขวดที่ 1)
2. นำสารจากขวดที่ 1 มา 0.1 ml. เติมน้ำ 0.9 ml. จะได้ 10^4 ppm. (ขวดที่ 2)
3. ทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จะได้สารที่มีความเข้มข้น 10^3 , 10^2 และ 10 ppm. ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 2.29 และ 2.30 (ตัวอย่างบางส่วน) และตารางที่ 2.8 ซึ่งแสดงผลทั้งหมดของสารต่างๆ 6 สาร โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง



รูปที่ 2.29 แสดงวงใสบริเวณที่เกิดการต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ของสาร (35) ที่ความเข้มข้น 10^5 ppm.



รูปที่ 2.30 แสดงวงโคจรบริเวณที่เกิดการต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ของสาร 1'-acetoxychavicol acetate (5) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

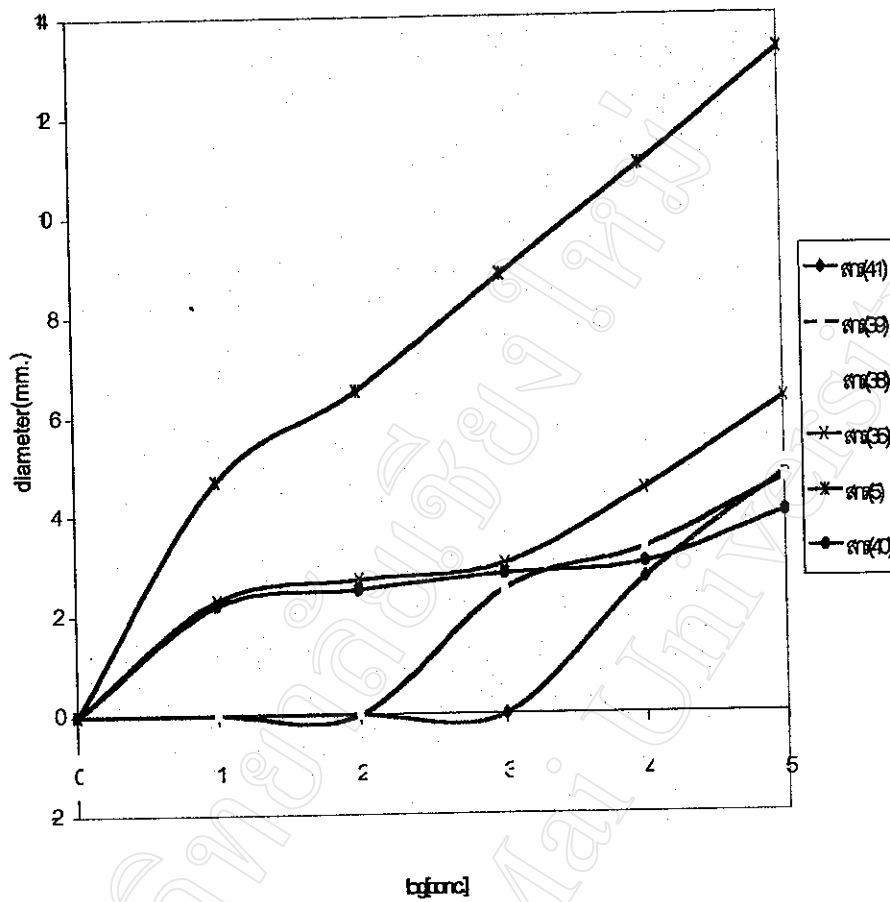
ตารางที่ 2.8 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*
โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น

สาร	ความเข้มข้น (ppm.)	ครั้งที่ 1 (mm.)	ครั้งที่ 2 (mm.)	ครั้งที่ 3 (mm.)	เฉลี่ย (mm.)
Propylbenzene (41)	10	0	0	0	0
	10^2	0	0	0	0
	10^3	0	0	0	0
	10^4	3.0	2.5	2.5	2.7
	10^5	3.0	4.5	5	4.8
Allylbenzene (39)	10	0	0	0	0
	10^2	0	0	0	0
	10^3	2.5	2.5	2.5	2.5
	10^4	4.0	3.0	3.0	3.3
	10^5	5.0	4.0	5.0	4.7
1-Ethylbenzyl acetate (38)	10	2.0	2.5	2.5	2.3
	10^2	3.5	2.0	2.0	2.5
	10^3	3.5	3.5	3.5	3.5
	10^4	5.0	4.0	3.0	4.0
	10^5	5.0	5.5	4.5	5.0
1'-Acetoxy-4-propylbenzyl acetate (35)	10	2.5	2.5	2.0	2.3
	10^2	2.5	2.5	3.0	2.7
	10^3	3.0	3.0	3.0	3.0
	10^4	4.5	4.0	5.0	4.5
	10^5	6.0	6.5	6.5	6.3
1'-Acetoxychavicol acetate (5)	10	5.0	4.0	5.0	4.7
	10^2	5.0	7.5	7.0	6.5
	10^3	9.0	8.5	9.0	8.8
	10^4	11.0	12.0	10.0	11.0
	10^5	16.0	12.0	12.0	13.3
Acetone	0	0	0	0	0

ตารางที่ 2.8(ต่อ) แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides*
โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น

สาร	ความเข้มข้น (ppm.)	รูที่ 1 (mm.)	รูที่ 2 (mm.)	รูที่ 3 (mm.)	เฉลี่ย (mm.)
4-Propylbenzyl acetate (40)	10	2.5	2.0	2.0	2.2
	10^2	2.5	2.5	2.5	2.5
	10^3	3.0	2.5	3.0	2.8
	10^4	3.5	3.0	3.0	3.0
	10^5	5.0	3.5	3.5	4.0

นำผลที่ได้จากตารางไปสร้างกราฟระหว่าง log concentration (ppm.) และเส้นผ่าศูนย์กลาง (mm.) ของบริเวณที่มีการต่อต้านเชื้อราได้กราฟดังรูปที่ 2.31



รูปที่ 2.31 กราฟแสดงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใยที่เกิดจากฤทธิ์การต้านเชื้อรา (หน่วย mm.) ของสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ($\log [\text{สาร}]$)