สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปฏิกิริยาจำลองของ Serine hydroxymethylase

นายอภิรักษ์ พันธุมชัย
นางสาวอรนุช วณิชประภาพร

วพ.
ด 259 ว
เลขหมู่ 2537
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี
b12553935

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พุทธศักราช 2537

Model Reaction for Serine Hydroxymethylase

Mr. Apiruk Puntumchai

Miss Oranoot Wanidprapaporn

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Chemistry

Faculty of Science

King Mongkut 's Institute of Technology Lardkrabang

1994

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ปฏิกิริยาจำลองของ Serine hydroxymethylase
โดย	นายอภิรักษ์ พันธุมชัย
	นางสาวอรนุช วณิชประภาพร
ภาควิชา	เคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ
	ผศ.ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อนุมัติให้นับโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

(ผศ.ดร.เผชิญชัย ไชยสิทธิ์) หัวหน้าภาควิชาเคมี

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(ผศ.ดร.มาลินี ชัยสุภกิจสินธ์) ประธานกรรมการ

(ดร.ศิริชัย หวังเจริญตระกูล) กรรมการ

(ผศ.ดร. สุนิตย์ สุขสำราญ) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ปฏิกิริยาจำลองของ Serine hydroxymethylase
นักศึกษา	นายอภิรักษ์ พันธุมชัย
	นางสาวอรนุช วณิชประภาพร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ
	ผศ.ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์
ภาควิชา	เคมี
พุทธศักราช	2537

บทคัดย่อ

ในสิ่งมีชีวิตการสลายตัวของ serine เป็น glycine และ formaldehyde เกิดขึ้นได้ด้วย serine hydroxymethylase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ต้องอาศัย pyridoxal phosphate กลไกของการเปลี่ยนแปลงนี้ได้มีผู้เสนอว่าเกิดผ่าน dipolar species แต่ยังไม่มีผู้ใดทำการพิสูจน์ว่าเป็นจริง โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษากลไกการสลายตัวของ β - hydroxy amino acid ว่าเกิดผ่าน dipolar species โดยการออกแบบปฏิกิริยาดักจับ dipolar species ที่เกิดขึ้นด้วย dipolarophile จากการทดลองพบว่า เมื่อให้ความร้อนแก่ส่วนผสมของ threonine, pyridoxal hydrochloride, alum โดยมี N-phenylmaleimide เป็น dipolarophile ใน acetate buffer pH 5.0 ที่ 100 °C นาน 110 นาที IR และ NMR spectrum ของ crude product ดูเหมือนจะได้ cycloadduct ที่คาดหวัง

Special Project Title	Model Reaction of Serine Hydroxymethylase
Names	Mr.Apiruk Puntumchai
	Miss Oranoot Wanidprapaporn
Special Project Advisor	Assistant Professor Dr.Sunit Suksamran
	Assistant Professor Dr.Theerawat Mongkolussawarut
Department	Chemistry
Academic Year	1994

ABSTRACT

Serine is split into glycine and formaldehyde by serine hydroxymethylase. The enzyme is dependent on pyridoxal phosphate. The accepted general mechanism for the transformation has been proposed via dipolar species. This special project is to prove that the non ezymetic splitting reactions of β-hydroxy amino acids proceed via dipolar intermediate by traping with dipolarophiles. When heating the mixture of threonin, pyridoxal hydrochloride, and N-phenylmaleimide (dipolarophile) in the present of alum at 100 $^{\circ}$C in acetate buffer pH 5 for 110 minutes, the crude product obtained seemed to give the expected cycloadduct by NMR and IR analysis.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จเรียบร้อยได้ด้วยดี ต้องขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สุนิตย์ สุขสำราญ และผศ.ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัศวรัตน์ ซึ่งกรุณาสละเวลาให้ความช่วยเหลือ แนะนำ แก้ไขโครงงานพิเศษ รวมทั้ง ผศ.ดร.มาลินี ชัยศุภกิจสินธ์ ประธานกรรมการ ดร.ศิริชัย หวังเจริญตระกูล และอ.ปัทมา ลีพหาวงศ์ กรรมการ ซึ่งกรุณาตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่าน ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จด้วยดี

อภิรักษ์ พันธุมชัย

อรนุช วณิชประภาพร

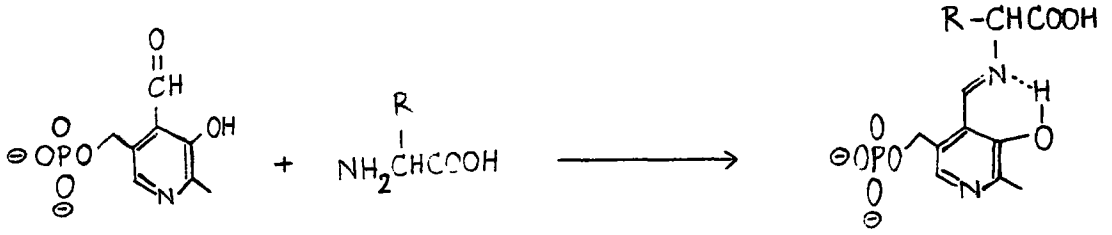
สารบัญ

บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทที่ 1 บทนำและทฤษฎี	1
บทที่ 2 การดำเนินการวิจัย	4
บทที่ 3 ผลการวิจัยและวิจารณ์	19
ภาคผนวก	
เอกสารอ้างอิง	

บทที่ 1

บทนำและทฤษฎี

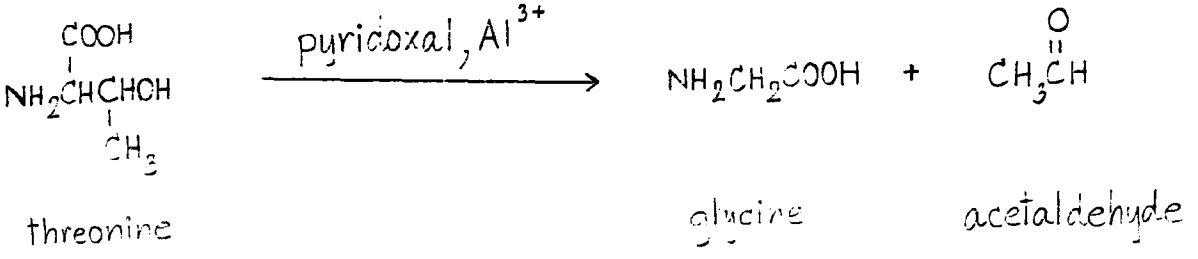
pyridoxal phosphate (1) เป็นคะตะลิสต์ในการเปลี่ยนแปลงของ α - amino acid (2) โดยทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนเกิดเป็น pyridoxal imine (3) ซึ่งมี H-bond ระหว่าง phenolic hydroxy ของหมู่ pyridoxyl กับ nitrogen ของ imine



(1) (2) (3)

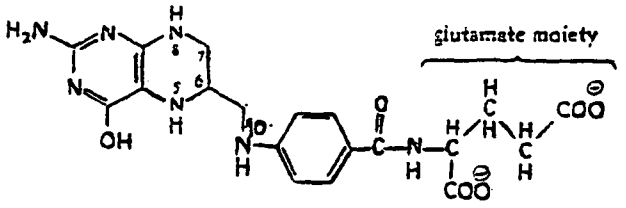
ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนโดยมี pyridoxal-P เป็นตัวช่วยนั้นเกิดได้หลายแบบ[1]คือ isomerisation หรือ racemisation, decarboxylation และ elimination ในกรณีที่กรดอะมิโนมีหมู่ hydroxy ที่ตำแหน่ง β เช่น serine (2,R=CH_2OH) หรือ threonine (2,R=$CH(CH_3)OH$) สามารถเกิดการขจัดออกของหมู่ R ได้ glycine และ acetaldehyde (เมื่อกรดอะมิโนเป็น threonine) หรือ glycine และ formaldehyde (เมื่อกรดอะมิโนเป็น serine)

จากการทดลองของ David E. Metzler[2] (1954) เมื่อนำ pyridoxal ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน โดยมี Al^{3+} เป็นคะตะลิสต์ ได้ผลิตภัณฑ์ดังนี้



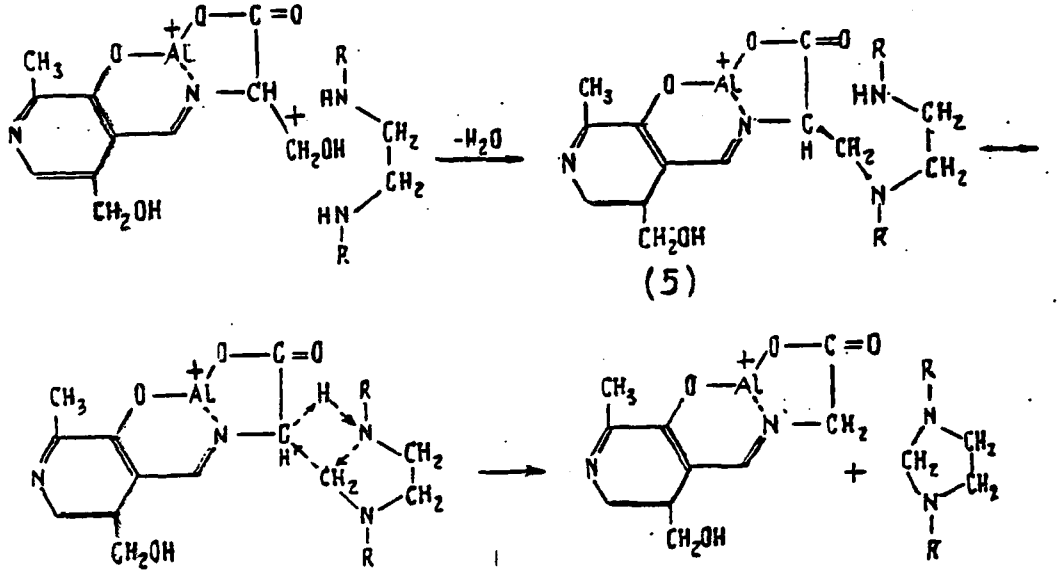
เมื่อสภาวะของปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.02 M. threonine, 0.01 M. pyridoxal, 0.002 M. alum ละลายใน 0.1 M. acetate buffer, pH 5.0 ให้ความร้อนที่ 100 °C ใช้เวลา 30 นาที พบว่า threonine 64 % เปลี่ยนไปเป็น glycine

จากการค้นพบของ Brode และ Jaenicke[3] (1960) การเปลี่ยนจาก serine ไปเป็น glycine และ formaldehyde เกิดขึ้นได้โดยมีเอนไซม์ serine hydroxymethylase ซึ่งเอนไซม์นี้ขึ้นอยู่กับ tetrahydrofolate (4) และ pyridoxal-P



(4)

Brode ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ serine โดยใช้ปฏิกิริยาจำลองที่เป็น non-enzymetic ซึ่งใช้ N, N'- diaryl ethylenediamine แทน tetrahydrofolic acid พบว่า serine เสถียรที่ pH 5.5 เมื่อมี pyridoxal-P หรือ N,N'-diaryl ethylenediamine ตัวใดตัวหนึ่งอยู่ด้วย แต่ถ้ามีสารประกอบทั้งสองนี้อยู่ด้วยกัน จะเกิดการแตกออกของพันธะ C-C ที่ตำแหน่ง α, β ใน (5) การสลายตัวของ serine นี้เกิดผ่าน intermediate ตัวหนึ่ง (Brode ไม่ได้ทำการแยกออกมา) ซึ่งอะตอมคาร์บอนที่ตำแหน่ง β เชื่อมอยู่กับหมู่อะมิโนหมู่ที่ 2 ของ N, N'- diaryl ethylenediamine ที่สภาวะนี้หรือต่อจากนี้ พันธะ C-C มีความเป็นขั้วเกิดขึ้นและแตกออกหลังจากการเกิด metal-pyridoxal complex ดังกลไกที่แสดงในรูปที่ 1



(5)

รูปที่ 1

รายละเอียดสภาวะการทดลองของ Brode เป็นดังนี้

1.7 ml. 0.2 M. amonium acetate buffer (pH 5.5)

0.1 ml. 0.1 M. pyridoxal hydrochloride solution

0.1 ml. 0.01 M.aluminium sulphate

0.1 ml. 0.1 M. serine solution

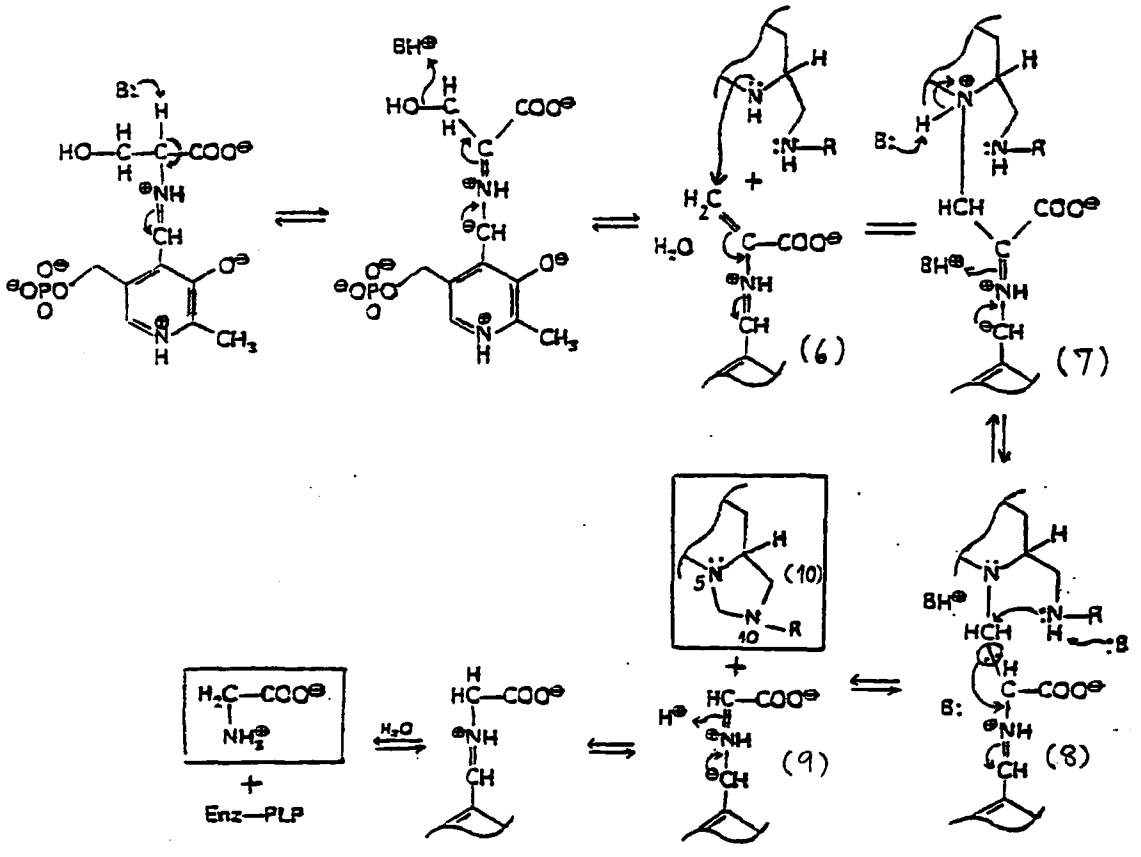
10 μM. N,N' - diaryl ethylenediamine

ทำการทดลองที่ 100 ^{o}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จะเห็นได้ว่าปฏิกิริยาของ Metzler ต่างกับของ Brode คือ การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิ

โนไม่ต้องใช้ N, N'-diaryl ethylenediamine

จากการค้นพบของ Walsh [4] (1979) พบว่าการเปลี่ยน L-serine ไปเป็น glycine จะเกิดได้ดีถ้าใช้ tetrahydrofolate เป็น cofactor โดย tetrahydrofolate จะรับหมู่ formaldehyde ไปจาก serine และเสนอกลไกดังรูปที่ 2



รูปที่ 2

ซึ่งจะเห็นว่าเกิด β - elimination ขจัดออกของน้ำให้ (6) จากนั้น nucleophile ที่ N-5 ของ tetrahydofolate จะเข้า attack ที่หมู่ methylene ใน (6) ให้ (7) ตามด้วยการ attack ของ N-10 ของ tetrahydrofolate และเกิดการแตกของพันธะ C-C ใน (8) ได้ N^5, N^{10}- methylene tetrahydrofolate (10) และ glycine ในขั้นตอนสุดท้าย

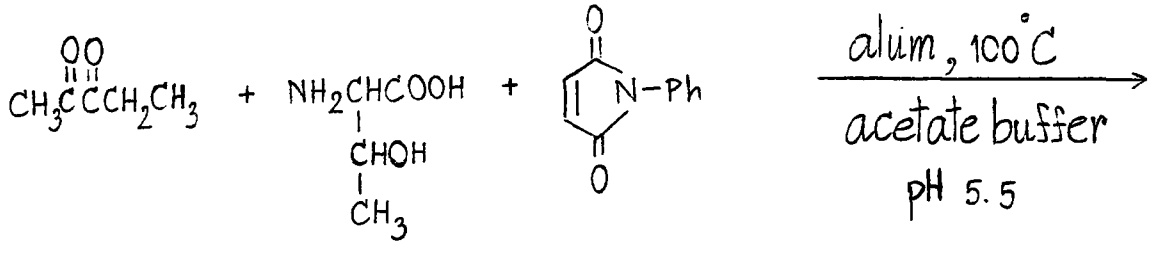
กลไกที่เสนอโดย Walsh เป็นกลไกที่ยอมรับกันโดยทั่วไปในทางชีวเคมี ซึ่งจะเห็นว่ามี dipolar species (9) เกิดขึ้นแต่ยังไม่เคยมีผู้ใดทำการพิสูจน์ว่ากลไกเกิดผ่าน dipolar intermediate จริง ดังนั้นในการวิจัยนี้จะเป็นการเสนอว่า ปฏิกิริยาการขจัดออกของหมู่ R ในกรดอะมิโน น่าจะเกิดผ่าน dipolar species โดยการออกแบบปฏิกิริยาดักจับ dipole ด้วย dipolarophile ชนิดต่าง ๆ เช่น N-phenylmaleimide

บทที่ 2
การดำเนินงานวิจัย

โครงงานพิเศษนี้เป็นการศึกษาการสลายพันธะ C-C ของกรดอะมิโนที่มีหมู่ OH ที่ตำแหน่ง β ว่าเกิดผ่าน dipolar species และทำการดักจับ intermediate นี้โดยออกแบบการทดลองดังต่อไปนี้

1. การทำปฏิกิริยาของ L-threonine, ethyl pyruvate, N-phenylmaleimide ใช้ alum เป็นคะตะลิสต์ reflux ในสารละลาย acetate buffer ผสมกับเอทานอล pH 5.5 และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C
2. การทำปฏิกิริยาของ DL-threonine, pyridoxal hydrochloride, N-phenylmaleimide ใช้ alumเป็นคะตะลิสต์ refluxในสารละลาย acetate buffer ผสมกับ ethanol มี pH 5.0 และกวนตลอดเวลาที่ 100 ^{o}C
3. การทำปฏิกิริยาของ pyridoxal hydrochloride, DL-threonine, β - nitrostyrene ใช้ alum เป็นคะตะลิสต์ โดย reflux ในสารละลาย acetate buffer ผสมกับ ethanol มี pH 5.0 และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C
4. การทำปฏิกิริยาของ pyridoxal hydrochloride, serine, N-phenylmaleimide, N, N' - diphenyl ethylenediamine ทำการ reflux ในสารละลาย methanol:น้ำ ในอัตราส่วน 50:3 และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C
5. การทำปฏิกิริยาของ pyridoxal hydrochloride, serine, N-phenylmaleimide, N, N' - diphenyl ethylenediamine ใช้ alum เป็นคะตะลิสต์ ทำการ reflux ในสารละลาย methanol:amonium acetate ที่มี pH 5.5 ในอัตราส่วน 50:3 และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง
6. การทำปฏิกิริยาของ ethyl pyruvate, serine, N-phenylmaleimide ทำการ reflux ใน N, N'-dimethyl formamide และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C
7. การทำปฏิกิริยาของ ninhydrin, serine, N-phenylmaleimide ในสารละลายน้ำ:methanol โดยไม่ต้องกวน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
8. การทำปฏิกิริยาของ phenyl glyoxal hydrate, serine, N-phenylmaleimide ทำการ reflux ใน N, N'- dimethyl formamide และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80 ^{o}C
9. การทำปฏิกิริยาของ benzaldehyde, serine, N-phenylmaleimide โดย reflux ใน glacial acetic และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 90 ^{o}C
10. การทำปฏิกิริยาของ pyridoxal hydrochloride, serine, N - phenylmaleimide, sodium acetate tri-hydrate โดย reflux ในสารละลายน้ำกับ methanol และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 70 ^{o}C
11. การทำปฏิกิริยาของ pyridoxal hydrochloride, serine, N - phenylmaleimide, sodium acetate tri-hydrate ใช้ alum เป็นคะตะลิสต์ โดย reflux ในสารละลายน้ำ:methanol และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C

<u>การทดลองที่ 1</u> การทำปฏิกิริยาของ L-threonine, ethyl pyruvate, N-phenylmaleimide ใช้ alum เป็นคะตะลิสต์โดย reflux ในสารละลาย acetate buffer ผสมกับเอทานอล ที่มี pH 5.5 และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 100 °C



(1) (2) (3)

ละลาย ethyl pyruvate (1) 1.05 g. (9.05 mmol) และ L-threonine (2) 2.13 g. (17.89 mmol) ผสมกับ N-phenylmaleimide 1.56 g. (9 mmol) กับ alum 0.87 g. (1.8 mmol) ทำการ reflux ในสารละลาย 0.1 M acetate buffer ผสมกับ ethanol ปริมาตรรวม 50 ml. มี pH 5.5 เริ่มต้นสารละลายมีสีเหลือง มีตะกอนขุ่นอยู่เล็กน้อย reflux ของผสมนี้เป็นเวลา 255 นาที ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ thin layer chromatography (chloroform:methanol = 6ml.:1 หยด) พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นที่ Rf = 0.5 ตั้งแต่ 30 นาทีแรก และมีปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่ง 255 นาที N-phenylmaleimide หมด จึงหยุดปฏิกิริยา ได้สารละลายใส สีเหลือง มีตะกอนสีเหลืองผสมอยู่ กรองตะกอนออก พบว่าได้ตะกอนหนัก 0.19 g. มีจุดหลอมเหลว 190 °C

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 1

1720 (C=O)

1500,1600 C=C (aromatic)

700,760 monosubstituted benzene

NMR ($CDCl_3$,δ) ดังแสดงในรูปที่ 2

นำสารละลายที่เหลือจากการกรอง ทำการสกัดด้วย chloroform 3 ครั้ง ๆ ละ 20 ml. และล้างชั้น chloroform ด้วยน้ำ 1 ครั้ง 10 ml. หลังจากนั้นดูดน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate นำชั้น chloroform ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้การลดความดัน ได้ของเหลวหนืดสีเหลืองส้ม มีน้ำหนัก 0.78 g. นำของเหลวหนืดสีเหลืองส้มที่ได้จากการสกัด มาแยกด้วยวิธี thin layer chromatography (SiO_2) (chloroform:hexane=1:1) แยกสารได้ 4 แถบ

แถบที่ 1 Rf = 0.5 ได้สารหนัก 0.27 g.

แถบที่ 2 Rf = 0.4 ได้สารหนัก 0.11 g.

แถบที่ 3 Rf = 0.3 ได้สารหนัก 0.11 g.

แถบที่ 4 Rf = 0.2 ได้สารหนัก 0.09 g.

แถบที่ 1

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 3

1720 (C=O)

1500,1600 C=C (aromatic)

700,760 monosubstituted benzene

NMR ($CDCl_3$,δ) ดังแสดงในรูปที่ 4

แถบที่ 2

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 5

3400 (N-H)

1720 (C=O)

1500,1600 C=C (aromatic)

700,750 monosubstituted benzene

NMR ($CDCl_3$,δ) ดังแสดงในรูปที่ 6

แถบที่ 3

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 7

3400 -3500 (O-H)

1720 (C=O)

1500,1600 C=C (aromatic)

700,760 monosubstituted benzene

NMR ($CDCl_3$,δ) ดังแสดงในรูปที่ 8

แถบที่ 4

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 9

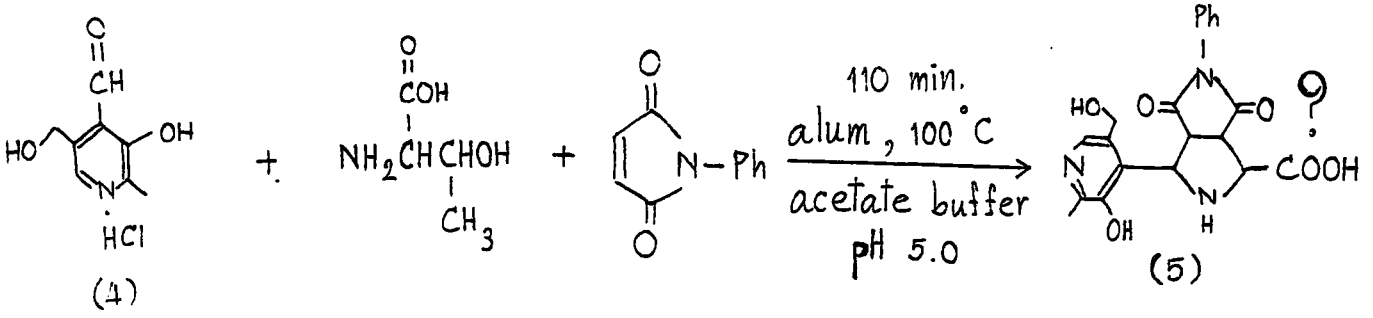
3400-3500 (O-H)

1720 (C=O)

1500,1600 C=C (aromatic)

NMR ($CDCl_3$,δ) ดังแสดงในรูปที่ 10

<u>การทดลองที่ 2</u> การทำปฏิกิริยาของ DL-threonine, pyridoxal hydrochloride, N-phenylmaleimide ใช้ alum เป็นคะตะลิสต์ โดย reflux ในสารละลาย acetate buffer ผสมกับ ethanol มี pH 5.0 และกวนอยู่ตลอดเวลา 100 °C



ละลาย pyridoxal hydrochloride (4) 0.236 g. (1 mmol) และ DL-threonine 0.434 g. (2 mmol) ผสมกับ N-phenylmaleimide 0.31 g. (2 mmol) กับ alum 0.171 g. (0.5 mmol) ทำการ reflux ในสารละลาย 0.1 M acetate buffer ผสมกับ ethanol ปริมาตรรวม 50 ml. มี pH 5.0 เริ่มต้นสารละลายมีสีเหลือง มีตะกอนขุ่นอยู่เล็กน้อย reflux ของผสมนี้เป็นเวลา 110 นาที ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ thin layer chromatography (chloroform:methanol = 6ml.: 1 หยด) พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นที่ Rf = 0.4 ตั้งแต่ 20 นาทีแรก และมีปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่ง 150 นาที N-phenylmaleimide หมด จึงหยุดปฏิกิริยา ได้สารละลายสีเหลืองส้ม มีตะกอนสีน้ำตาลแดงผสมอยู่ กรองตะกอนออก พบว่าได้ตะกอนหนัก 0.01 g. มีจุดหลอมเหลว 150 °C

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 11

3200-3500	(O-H)
1720	(C=O)
1500,1600	C=C (aromatic)
700,760	monosubstituted benzene

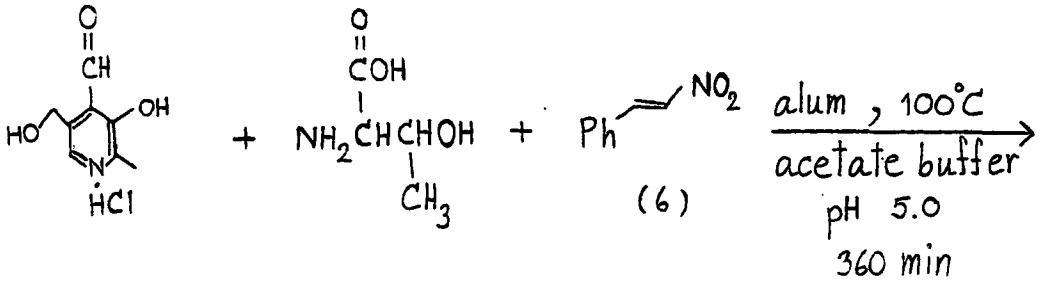
นำสารละลายที่เหลือจากการกรอง ทำการสกัดด้วย chloroform 3 ครั้ง ๆ ละ 20 ml. และล้างชั้น chloroform ด้วยน้ำ 1 ครั้ง 10 ml. หลังจากนั้นดูดน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate นำชั้น chloroform ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้การลดความดัน ได้ของแข็งสีเหลืองส้ม มีน้ำหนัก 0.05 g. จุดหลอมเหลว 90 °C

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 12

3200-3500	(O-H)
1720	(C=O)
1500,1600	C=C (aromatic)
700-760	monosubstituted benzene

NMR ($CDCl_3$,δ) ดังแสดงในรูปที่ 13

<u>การทดลองที่ 3</u> การทำปฏิกิริยาของ pyridoxal hydrochloride, DL-threonine, β - nitrostyrene ใช้ alum เป็นตะตะลิสต์โดย reflux ในสารละลาย acetate buffer ผสมกับ ethanol มี pH 5.0 และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 100 °C



ละลาย pyridoxal hydrochloride 0.62 g. (3 mmol) และ DL-threonine 0.73 g. (7 mmol) ผสมกับ nitrostyrene (6) 0.45 g. (3 mmol) กับ alum 0.29 g. (0.05 mmol) ทำการ reflux ในสารละลาย 0.1 M. acetate buffer ผสมกับ ethanol ปริมาตรรวม 50 ml. มี pH 5.0 เริ่มต้นสารละลายมีสีเหลืองใส reflux ของผสมนี้เป็นเวลา 360 นาที ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ thin layer chromatography (chloroform:methanol = 6ml.:1 หยด) พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นที่ Rf = 0.35 ตั้งแต่ 30 นาทีแรก สารละลายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเข้ม และมีปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่ง 360 นาที nitrostyrene หมด จึงหยุดปฏิกิริยา ได้สารละลายสีน้ำตาลแดง มีตะกอนสีดำเกาะที่ก้นขวด กรองตะกอนออก ตะกอนสีน้ำตาลแดงหนัก 0.15 g. มีจุดหลอมเหลว 195 °C IR (KBr,cm-1) ดังรูปที่ 14

3400 (O-H)

1720 (C=O)

นำสารละลายที่เหลือจากการกรอง ทำการสกัดด้วย chloroform 3ครั้ง ๆ ละ 20 ml และล้างชั้น chloroform ด้วยน้ำ 1 ครั้ง 10 ml. หลังจากนั้นดูดน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate นำชั้น chloroform ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้การลดความดัน ได้ของแข็งสีเหลืองส้ม มีน้ำหนัก 0.13 g. จุดหลอมเหลว 195 °C นำของแข็งสีเหลืองส้มที่ได้จากการสกัดมาแยกด้วยวิธี thinlayer chromatography (SiO_2) (chloroform:hexane=1:1) แยกสารได้ 3 แถบ

แถบที่ 1 Rf = 0.5 ได้สารหนัก 0.003 g.

แถบที่ 2 Rf = 0.4 ได้สารหนัก 0.007 g.

แถบที่ 3 Rf = 0.3 ได้สารหนัก 0.014 g.

แถบที่ 2

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 15

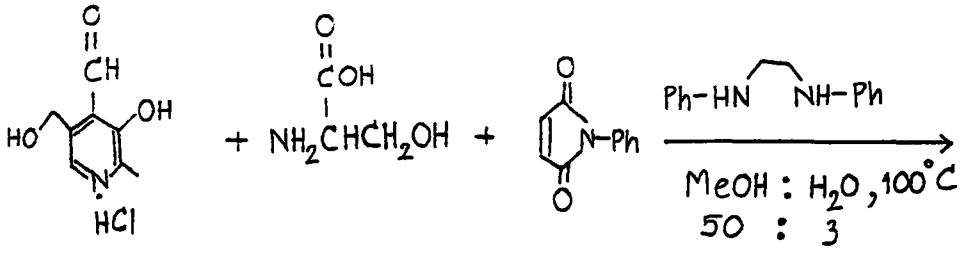
1720 (C=O)

แถบที่ 3

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 16

3400-3500 (O-H)

<u>การทดลองที่ 4</u> การทำปฏิกิริยาของ serine, pyridoxal hydrochloride, N-phenylmaleimide, N, N'-diphenyl ethylenediamine โดย reflux ในสารละลาย methanol:น้ำ (50:3) และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C

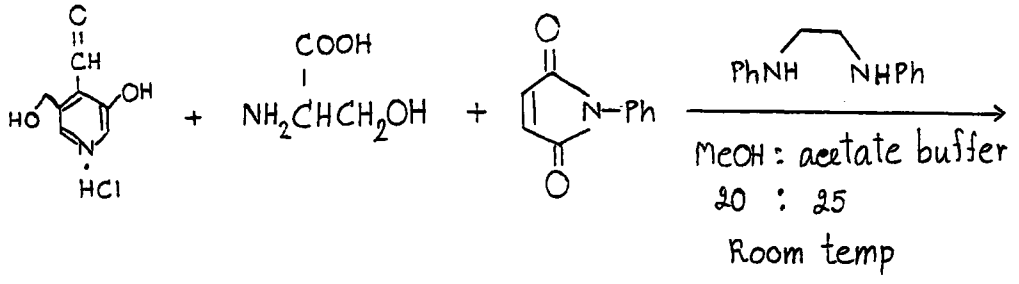


ละลาย pyridoxal hydrochloride 0.62 g. (3 mmol) และ serine 0.32 g.(3 mmol) ผสมกับ N-phenylmaleimide 0.53 g. (3 mmol) และ N, N'-diphenyl ethylenediamine 0.63 g. (1 mmol) ทำการ reflux ในสารละลาย methanol:น้ำ (50:3) ปริมาตรรวม 53 ml. เริ่มต้นสารละลายมีสีเหลืองเข้ม มีตะกอนสีขาว reflux ของผสมนี้เป็นเวลา 90 นาที ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ thin layer chromatography (chloroform:methanol = 6ml.:1 หยด) พบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มออกส้มน้ำตาล มีตะกอนสีขาวและเหลืองตกลงมา จนกระทั่ง 450 นาที ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ จึงหยุดปฏิกิริยา

จึงลองทำการผสม alum ลงไป โดยหยุดให้ความร้อนและยังคงกวนอยู่ตลอดเวลา ทิ้งปฏิกิริยานี้ไว้ 810 นาที ทำการตรวจสอบปฏิกิริยา ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ

จึงให้ความร้อนสารละลายดังกล่าวที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C ใช้เวลา 210 นาที พบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง ทำการตรวจสอบปฏิกิริยา ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆจึงหยุดปฏิกิริย

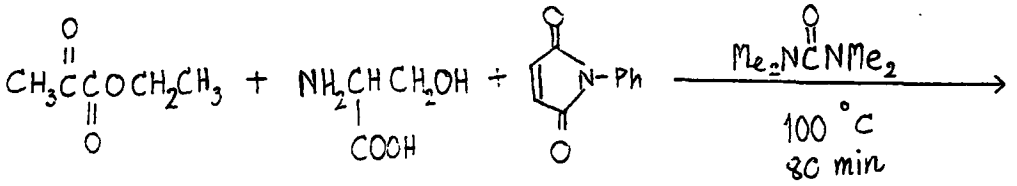
<u>การทดลองที่ 5</u> การทำปฏิกิริยาของ pyridoxal hydrochloride, serine, N-phenylmaleimide, N, N'-diphenyl ethylenediamine ใช้ alum เป็นคะตะลิสต์ ทำการ reflux ในสารละลาย amonium acetate ผสมกับ methanol มี pH 5.5 ในอัตราส่วน 25:20 และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง



ละลาย pyridoxal hydrochloride 0.31 g. (1.5 mmol) และ serine 0.16 g.(1.5 mmol) ผสมกับ N - phenylmaleimide 0.26 g. (1.5 mmol) N, N'-diphenyl ethylenediamine 0.324 g. (0.5 mmol) และ alum 0.072 g. (0.25 mmol) ทำการ reflux ในสารละลายmethanol:acetate buffer (20:25) ปริมาตรรวม 45 ml. เริ่มต้นสารละลายมีสีเหลืองขุ่น มีตะกอนสีขาว reflux ของผสมนี้เป็นเวลา 1110 นาที (ประมาณ 13 ชม.) ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ thin layer chromatography (chloroform:methanol = 6ml.:1 หยด) พบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มใส มีตะกอนสีน้ำตาลอ่อนเกิดขึ้นเล็กน้อย ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ

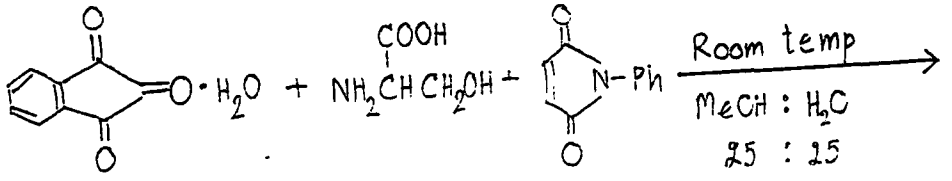
จึงให้ความร้อนสารละลายดังกล่าวที่อุณหภูมิ 90 ^{o}C ใช้เวลา 170 นาที พบว่าสารละลายยังคงเป็นสีส้ม มีของเหลวสีน้ำตาลเกาะข้างขวด ทำการตรวจสอบปฏิกิริยา ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆจึงหยุดปฏิกิริยา

<u>การทดลองที่ 6</u> การทำปฏิกิริยาของ ethyl pyruvate, serine, N-phenylmaleimide ทำการ reflux ใน N, N'- dimethyl formamide และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 100 °C



ละลาย ethyl pyruvate 0.232 g. (2 mmol) และ serine 0.21 g.(2 mmol) และ N - phenylmaleimide 0.346 g. (2 mmol) ใน N,N'-dimethyl formamide 50 ml. ที่มีอุณหภูมิ 100 °C reflux ของผสมนี้เป็นเวลา 80 นาที ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ thin layer chromatography (chloroform:methanol=6ml.:1 หยด) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ และสังเกตได้ว่า ethyl pyruvate หายไปตั้งแต่ตอนเริ่มต้นของปฏิกิริยา

<u>การทดลองที่ 7</u> การทำปฏิกิริยาของ ninhydrin, serine, N-phenylmaleimide ในสารละลายน้ำ: methanol โดยไม่ต้องกวน ที่อุณหภูมิห้อง



(7)

ละลาย ninhydrin (7) 0.35 g. (2 mmol) และ serine 0.21 g.(2 mmol) และ N-phenylmaleimide 0.346 g. (2 mmol) ในสารละลาย methanol:น้ำ (1:1) 50 ml. เริ่มต้นสารละลายมีสีเหลืองอ่อน ทิ้งไว้ 5 นาที เปลี่ยนเป็นสีม่วงดำ ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ thin layer chromatography (chloroform:methanol=6ml.:1 หยด) พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นที่ Rf = 0.3 ที่ 30 นาทีแรก หลังจากทิ้งไว้ 21 ชั่วโมง พบว่ามีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองตะกอนได้น้ำหนัก 0.23 g. ไม่สามารถหาจุดหลอมเหลวได้ ตะกอนไม่หลอม แต่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 250 ^{o}C

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 17

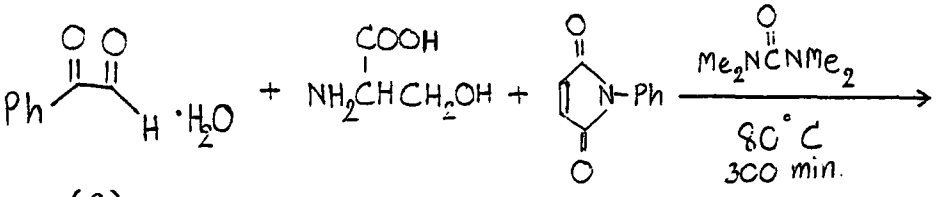
3400	(O-H)
1780	(C=O)
1500,1600	(C=C aromatic)

นำสารละลายที่เหลือจากการกรองทำการระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator เพื่อขจัด methanol หลังจากนั้นทำการสกัดด้วย chloroform 3ครั้ง ๆ ละ 20 ml และล้างชั้น chloroform ด้วยน้ำ 1 ครั้ง 10 ml. หลังจากนั้นดูดน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate นำชั้น chloroform ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้การลดความดัน ได้ของเหลวหนืดสีดำ หนัก 0.16 g. จุดหลอมเหลว 145 -155 ^{o}C

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 18

3400	(O-H)
1700	(C=O)
1500,1600	(C=C aromatic)

<u>การทดลองที่ 8</u> การทำปฏิกิริยาของ phenyl glyoxal hydrate, serine, N-phenylmaleimide ทำการ reflux ใน N, N'-dimethyl formamide และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80 °C



(8)

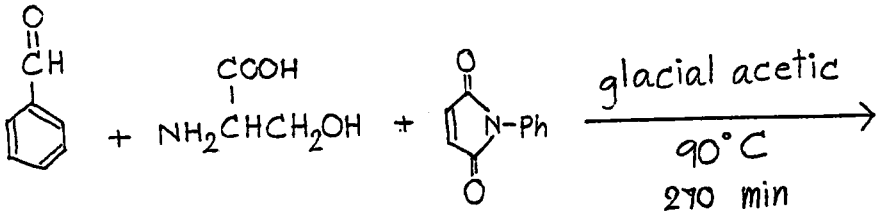
ละลาย phenyl glyoxal hydrate (8) 0.30 g. (2 mmol) และ serine 0.21 g.(2 mmol) และ N-phenylmaleimide 0.346 g. (2 mmol) ใน N, N' - dimethyl formamide 50 ml. ทำการ reflux เริ่มต้นสารละลายมีสีเหลืองอ่อน ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้ thin layer chromatography (chloroform:methanol = 6 ml.:1 หยด) ที่ 300 นาที phenyl glyoxal hydrate หมด จึงหยุดปฏิกิริยา สารละลายมีสีส้มแดง และมีตะกอนสีขาวเกิดขึ้น กรองตะกอนที่ได้ หนัก 0.034 g. มีจุดหลอมเหลว 250 °C จากการวิเคราะห์ ตะกอนนี้คือ serine

นำสารละลายที่เหลือจากการกรองเติมน้ำกลั่นลงไป 50 ml. หลังจากนั้นทำการสกัดด้วย chloroform 3ครั้ง ๆ ละ 20 ml และล้างชั้น chloroform ด้วยน้ำ 5 ครั้งๆ ละ 20 ml. หลังจากนั้นดูดน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate นำชั้น chloroform ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้การลดความดัน ทิ้งไว้ 3 วัน หยดน้ำลงไปเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดง ขูดตะกอนที่ได้ออกมา ล้างด้วย ether ตะกอนที่ได้หนัก 0.15 g. จุดหลอมเหลว 120-130 °C

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 19

3400	(O-H)
1720	(C=O)
1500,1600	(N-H)

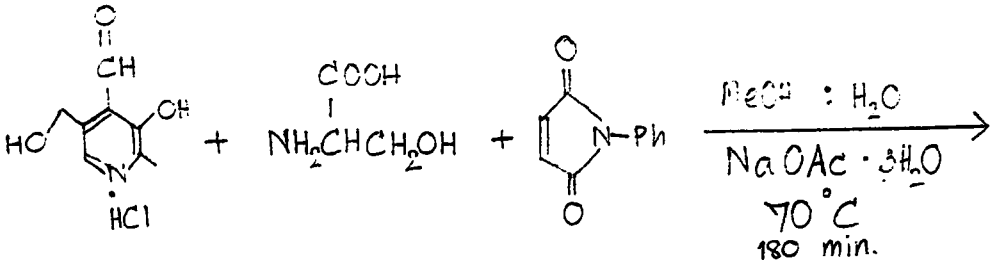
<u>การทดลองที่ 9</u> การทำปฏิกิริยาของ benzaldehyde, serine, N-phenylmaleimide โดย reflux ใน glacial acetic และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 90 °C



(9)

ละลาย serine 0.32 g. (3 mmol) และ N-phenylmaleimide 0.52 g. (3 mmol) ใน glacial acetic 50 ml. และเติม benzaldehyde (9) 0.32 g. (3 mmol) ทำการ reflux เริ่มต้นสารละลายมีสีเหลืองอ่อน ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ thin layer chromatography (chloroform : hexane = 1:1) พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นที่เวลา 60 นาทีแรก หยุดปฏิกิริยาที่ 270 นาที นำสารละลายเติมน้ำกลั่นลงไป 50 ml. หลังจากนั้นทำการสกัดด้วย chloroform 3 ครั้ง ๆ ละ 20 ml. และล้างชั้น chloroform ด้วยน้ำ 1 ครั้ง 20 ml. หลังจากนั้นดูดน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate นำชั้น chloroform ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้การลดความดัน ได้ตะกอนสีน้ำตาลแดง หนัก 0.09 g. ผลจาก IR spectrum ตะกอนนี้คือ N-phenylmaleimide ผสมกับ benzaldehyde

<u>การทดลองที่ 10</u> การทำปฏิกิริยาของ pyridoxal hydrochloride, serine, N - phenylmaleimide, sodium acetate trihydrate โดย reflux ในสารละลายน้ำกับ methanol และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 70 °C



ละลาย serine 0.157 g.(1.5 mmol), pyridoxal hydrochloride 0.305 g. (1.5mmol), N-phenylmaleimide 0.311 g. (1.8 mmol) และ sodium acetate trihydrate 0.204 g. (1.5 mmol) ในสารละลาย methanol:น้ำ (50:5) 55 ml. ทำการ reflux 180 นาที เริ่มต้นสารละลายมีสีเหลืองอ่อน มีตะกอนของ sodium acetate ละลายอยู่ ทำการวัดได้ pH = 7 หลัง reflux ได้ 15 นาที สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองขุ่น ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ thin layer chromatography (chloroform :hexane = 1.:1) พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นที่เวลา 15 นาทีแรก Rf = 0.4 หยุดปฏิกิริยาที่ 180 นาที และ N - phenylmaleimide หมด ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน มีตะกอนขาว กรองตะกอนได้น้ำหนัก 0.002 g. มีจุดหลอมเหลวสูงกว่า 285 °C (decomposed)

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 20

3450	(O-H)
1720	(C=O)
1500,1600	(C=C aromatic)

นำสารละลายข้างต้นระเหยเอา methanol ออก แล้วสกัดด้วย chloroform 3 ครั้ง ๆ ละ 20 ml. และล้างชั้น chloroform ด้วยน้ำ 1 ครั้ง 10 ml. หลังจากนั้นดูดน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate นำชั้น chloroform ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้การลดความดัน ได้ของเหลวหนืดสีเหลือง 0.18 g.

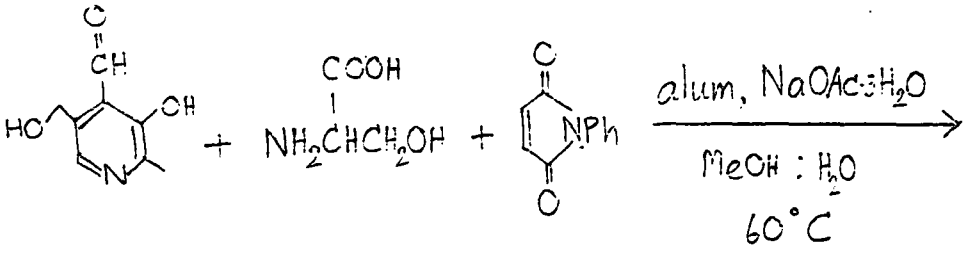
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 21

3200-3400	(O-H)
1720	(C=O)
1500,1600	(C=C aromatic)
700, 760	(monosubstituted benzene)

NMR ($CDCl_3$,δ) ดังแสดงในรูปที่ 22

การทดลองที่ 11 .การทำปฏิกิริยาของ pyridoxal hydrochloride, serine, N - phenylmaleimide, sodium acetate trihydrate ใช้ alum เป็นคะตะลิสต์ โดย reflux ในสารละลายน้ำกับ methanol และกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 60 °C



ละลาย serine 0.157 g.(1.5 mmol), pyridoxal hydrochloride 0.305 g. (1.5mmol), N-phenylmaleimide 0.311 g. (1.8 mmol) sodium acetate trihydrate 0.408 g. (3 mmol) และ aum 0.071 g. ในสารละลาย methanol:น้ำ (50:5) 55 ml. ทำการ reflux 120 นาที เริ่มต้นสารละลายมีสีเหลืองอ่อน วัด pH = 6.5 ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยใช้ thin layer chromatography (chloroform:hexane = 1.:1) พบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้นที่เวลา 5 นาทีแรก Rf = 0.4 หยุดปฏิกิริยาที่ 120 นาที และ N-phenylmaleimide หมด ได้สารละลายสีเหลืองอ่อน มีตะกอนขาว กรองตะกอนได้น้ำหนัก 0.07 g. จุดหลอมเหลวสูงกว่า 280 °C (decompose)

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 23

3450	(O-H)
1100-1200	(broad)
620,650	

นำสารละลายข้างต้นระเหยเอา methanol ออก แล้วสกัดด้วย chloroform 3 ครั้ง ๆ ละ 20 ml. และล้างชั้น chloroform ด้วยน้ำ 1 ครั้ง 10 ml. หลังจากนั้นดูดน้ำด้วย anhydrous sodium sulphate นำชั้น chloroform ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้การลดความดัน ได้ของเหลวหนืดสีเหลือง 0.20 g.

IR (KBr,cm-1) ดังแสดงในรูปที่ 22

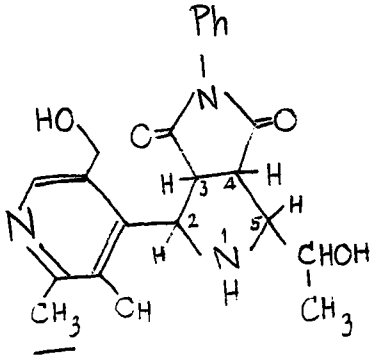
3200-3400	(O-H)
1720	(C=O)
1500,1600	(C=C aromatic)
700, 760	(monosubstituted benzene)

บทที่ 3

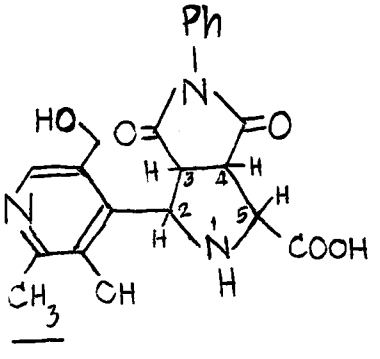
ผลการวิจัยและวิจารณ์

เมื่อต้มส่วนผสม ethyl pyruvate, threonine, N-phenylmaleimide และ alum (ดูการทดลองที่ 1) ใน acetate buffer pH 5.5 และมี ethanol เล็กน้อย (เพื่อใช้ละลาย N - phenylmaleimide) นาน 255 นาที พบว่ามีตะกอนสีเหลือง (จุดหลอมเหลว 210 °C) เกิดขึ้นและเมื่อ workup ปฏิกิริยาจะได้ของเหลวสีเหลือง โดยที่ IR (รูปที่ 1) และ NMR (รูปที่ 2) ของตะกอนสีเหลืองน่าจะเป็นสารที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ N-phenylmaleimide โดยที่ยังไม่ทราบโครงสร้างที่แน่นอน ส่วนของเหลวหนืดสีเหลืองนำมาแยกโดยใช้ preparative TLC (SiO_2, chloroform:hexane 1:1) พบว่า NMR ของ band ใหญ่ที่สุดเป็นดังรูปที่ 2 โครงสร้างที่แน่นอนของสารนี้ยังต้องอาศัยข้อมูลทาง Mass spectroscopy, C,H,N analysis ประกอบ

เมื่อต้มส่วนผสมระหว่าง pyridoxal hydrochloride, threonine, N-phenylmaleimide โดยมี alum อยู่ด้วยใน acetate buffer pH 5.0 นาน 110 นาที (การทดลองที่ 2) พบว่าให้สารของแข็งสีน้ำตาลซึ่งมีจุดหลอมเหลว 150 °C (กรองได้จากปฏิกิริยา) ในปริมาณ 0.012 g. และเมื่อ workup ส่วนที่ไม่ใช่ของแข็งจะให้ของเหลวหนืดสีน้ำตาล (0.052 g.) จากการวิเคราะห์ด้วย NMR ($CDCl_3$) (ดังรูป 13) พบว่าอาจเป็นสารประกอบ (10) หรือ (11)



(10)



(11)

อยู่ด้วย โดยสังเกตได้จาก δ 2.77 (S) ซึ่งอาจเป็น CH_3 ใน (10) หรือ (11) และ H (2), H(3), H(4), H(5) อาจอยู่ในช่วง δ 3-5 IR (KBr disc) พบหมู่คาร์บอนิลที่ประมาณ 1720 cm^{-1} และ broad O-H ที่ 2600-3600 cm^{-1} ส่วน IR ของของแข็งสีน้ำตาลพบว่าคล้ายกับสารที่ได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งอาจเกิดจากการ hydrolysis ของ N-phenylmaleimide ปฏิกิริยานี้ควรจะทำซ้ำเพื่อหาโครงสร้างที่แท้จริง

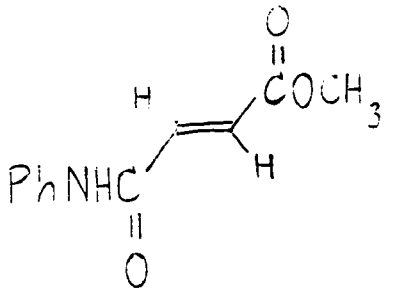
ด้วยเหตุที่ N - phenylmaeimide สามารถถูก hydrolysis ได้ในสภาวะของการทดลอง จึงลองเปลี่ยนตัวดักจับ dipole จาก N-phenylmaleimide เป็น β-nitrostyrene ดังนั้นเมื่อต้มส่วนผสมของ pyridoxal hydrochloride, threonine, nitrostyrene โดยมี alum อยู่ด้วย ใน acetate buffer ที่ pH 5.0 นาน 360 นาที (การทดลองที่ 3) พบว่าปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงและ IR (KBr disc) ไม่พบ peak ของ NO_2 แสดงว่าปฏิกิริยาอาจเกิดการ decompose ของ β-nitrostyrene ก่อนเข้าทำปฏิกิริยา

ในกรณีของ serine ปฏิกิริยาจำลองที่ออกแบบคือ ใช้ N,N'-diphenyl ethylenediamine เมื่อต้มส่วนผสมระหว่าง pyridoxal hydrochloride, serine, N-phenylmaleimide และ N, N'-diaryl ethylenediamine ใน methanol:น้ำ (50:3 โดยปริมาตร) (การทดลองที่ 4) นาน 415 นาที พบว่าไม่มีอะไรเปลี่ยนแปลง (จาก TLC) เมื่อใส่ alum ลงในส่วนผสมนี้ และกวนต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 810 นาที ก็ไม่พบอะไรเปลี่ยนแปลง (จาก TLC) จึงต้มส่วนผสมนี้อีก 210 นาที พบว่ายังมีสารตั้งต้นครบทุกตัว (จาก TLC)

เมื่อปรับ pH ของปฏิกิริยาข้างต้นให้เป็น 5.53 ด้วย acetate buffer (ดูการทดลองที่ 5) โดยกวนส่วนผสมนี้ที่อุณหภูมิห้องนาน 13 ชั่วโมง หรือ reflux นาน 170 นาที ปฏิกิริยาไม่มีอะไรเปลี่ยนแปลง

เมื่อลองปรับ pH ของปฏิกิริยาให้เป็นกรดเพื่อศึกษาว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ serine หรือไม่ พบว่าเมื่อ reflux ส่วนผสมระหว่าง benzaldehyde, serine, N - phenylmaleimide ใน glacial acetic นาน 270 นาที (การทดลองที่ 9) ปฏิกิริยายังไม่มีอะไรเปลี่ยนแปลง

เมื่อปรับ pH ของปฏิกิริยาเป็น 7 โดยต้มส่วนผสมระหว่าง pyridoxal hydrochloride, serine, N-phenylmaleimide และ sodium acetate trihydrate โดยมี methanol:น้ำ (50:5) เป็นตัวทำละลายนาน 180 นาที พบว่าเกิด hydrolysis ของ N-phenylmaleimide ซึ่ง NMR ($CDCl_3$) ดังรูปที่ 22 พบ δ10.5 (s, 1H) δ 6.5 (d, 1H, j = 14 Hz) δ 6.1 (d, 1H, j = 14 Hz) δ 3.8 (s, 3H, OCH_3) และน่าจะมีโครงสร้างเป็น (12)

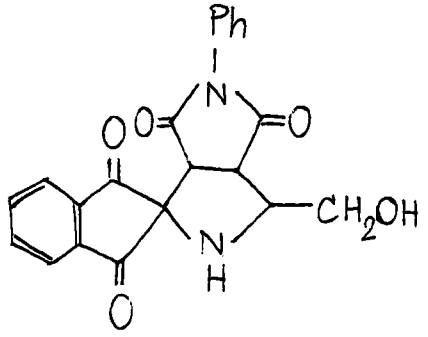


(12)

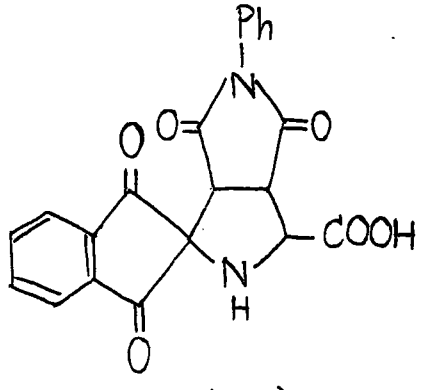
และเมื่อปรับ pH ของปฏิกิริยาเดียวกันนี้ให้เป็น 6.0-6.5 โดยใช้ sodium acetate trihydrate เพิ่มขึ้นอีกเท่าตัวและมี alum อยู่ด้วย (การทดลองที่ 11) ก็พบแต่ (12) ด้วยเช่นกัน

การปรับ pH ของปฏิกิริยาเป็น 7 ได้ทำในสภาวะต่าง ๆ อีก เช่น เมื่อต้ม ethyl pyrivate serine กับ N - phenylmaleimide ที่ 100 ^{o}C โดยมี N, N'-dimethyl formamide เป็นตัวทำละลาย นาน 80 นาที (การทดลองที่ 6) พบว่า ethyl pyruvate หายไปหมด ก่อนที่จะเข้าทำปฏิกิริยาอัน เนื่องจาก ethyl pyruvate มีจุดเดือดต่ำ จึงเปลี่ยนมาใช้ phenyl glyoxal hydrate แทน ethyl pyruvate แล้วต้มนาน 300 นาที (การทดลองที่ 8) พบว่าให้ตะกอนสีน้ำตาลแดง ซึ่งเกิดจากการ hydrolysis ของ N - phenylmaleimide กับได้ serine กลับคืนมา

อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ ninhydrin ซึ่งมีหมู่ carbonyl ที่ว่องไวกว่าของ phenyl glyoxal hydrate ทำปฏิกิริยากับ serine, N-phenylmaleimide ใน methanol:น้ำ (1:1) pH = 7 ที่อุณหภูมิห้องนาน 21 ชั่วโมง พบว่าได้ตะกอนสีขาว (จุดหลอมเหลวมากกว่า 250 ^{o}C) ตกลงมา (การทดลองที่ 7) ซึ่ง IR (KBr disc) พบ O-H ที่ 3420 cm^{-1} (broad) N-H ที่ 3280 cm^{-1} และ C=O ที่ 1780, 1730,1700 cm^{-1} แต่ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ด้วย NMR ได้ เนื่องจากยังหาตัวทำละลายไม่ได้ แต่คาดว่าสารตัวนี้น่าจะมีโครงสร้าง (13) ไม่ใช่ (14) เพราะไม่พบหมู่ carboxilic acid ใน IR spectrum

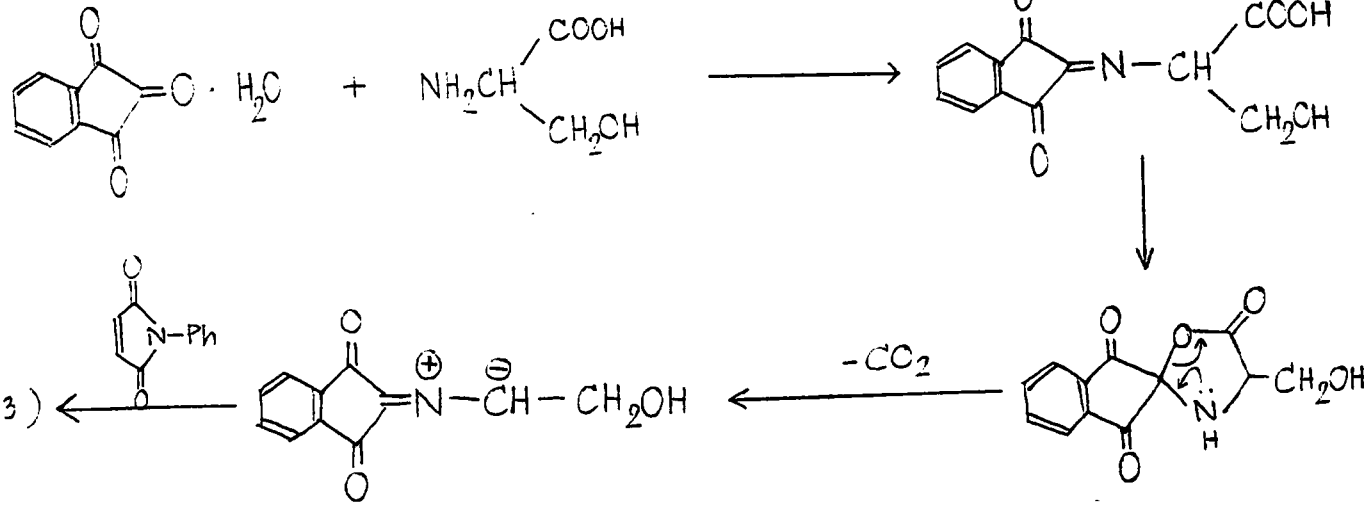


(13)

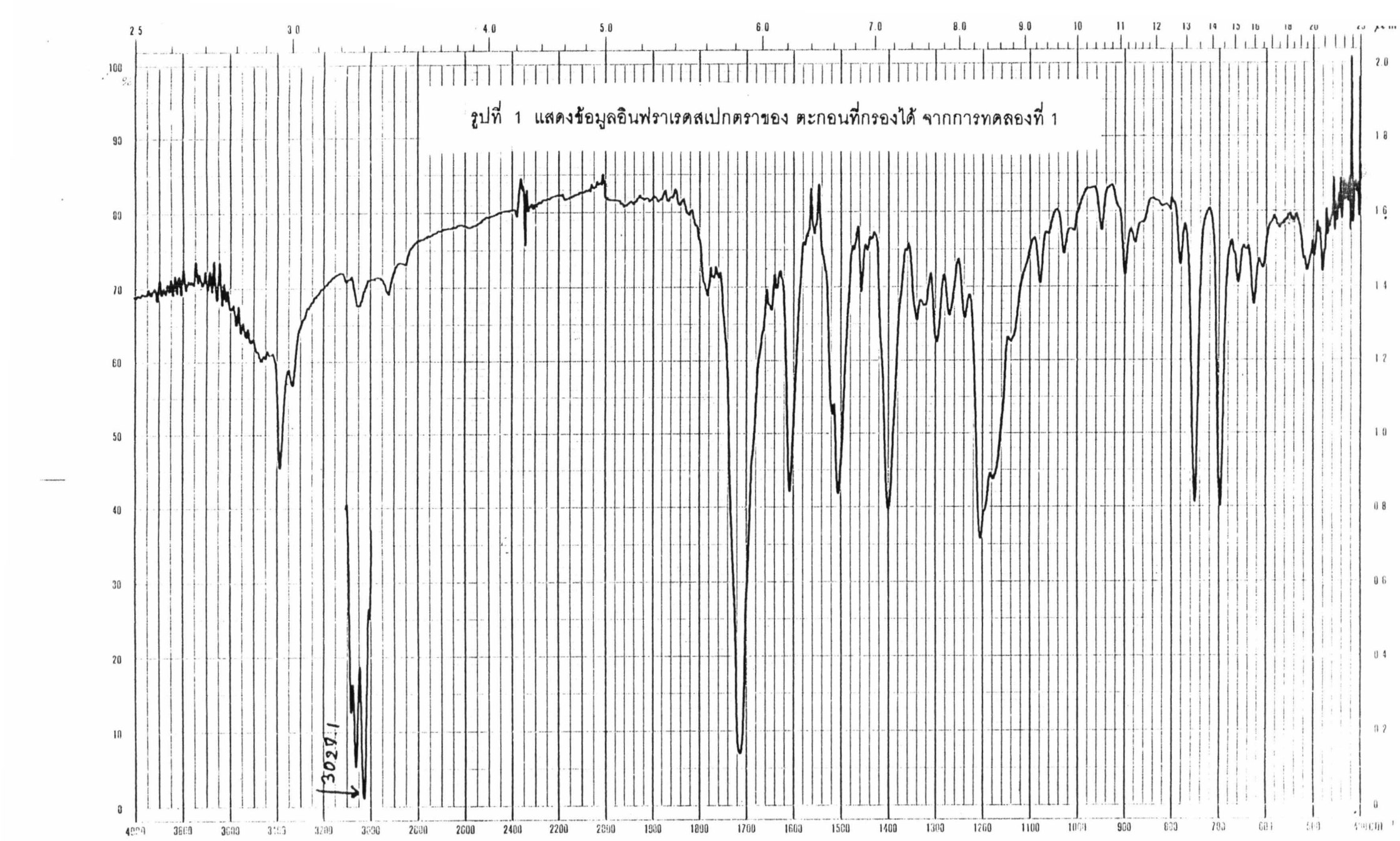


(14)

ถ้าสารสีขาวนี้มีโครงสร้าง (13) ก็ควรจะเกิดผ่านกลไก [5] ดังนี้

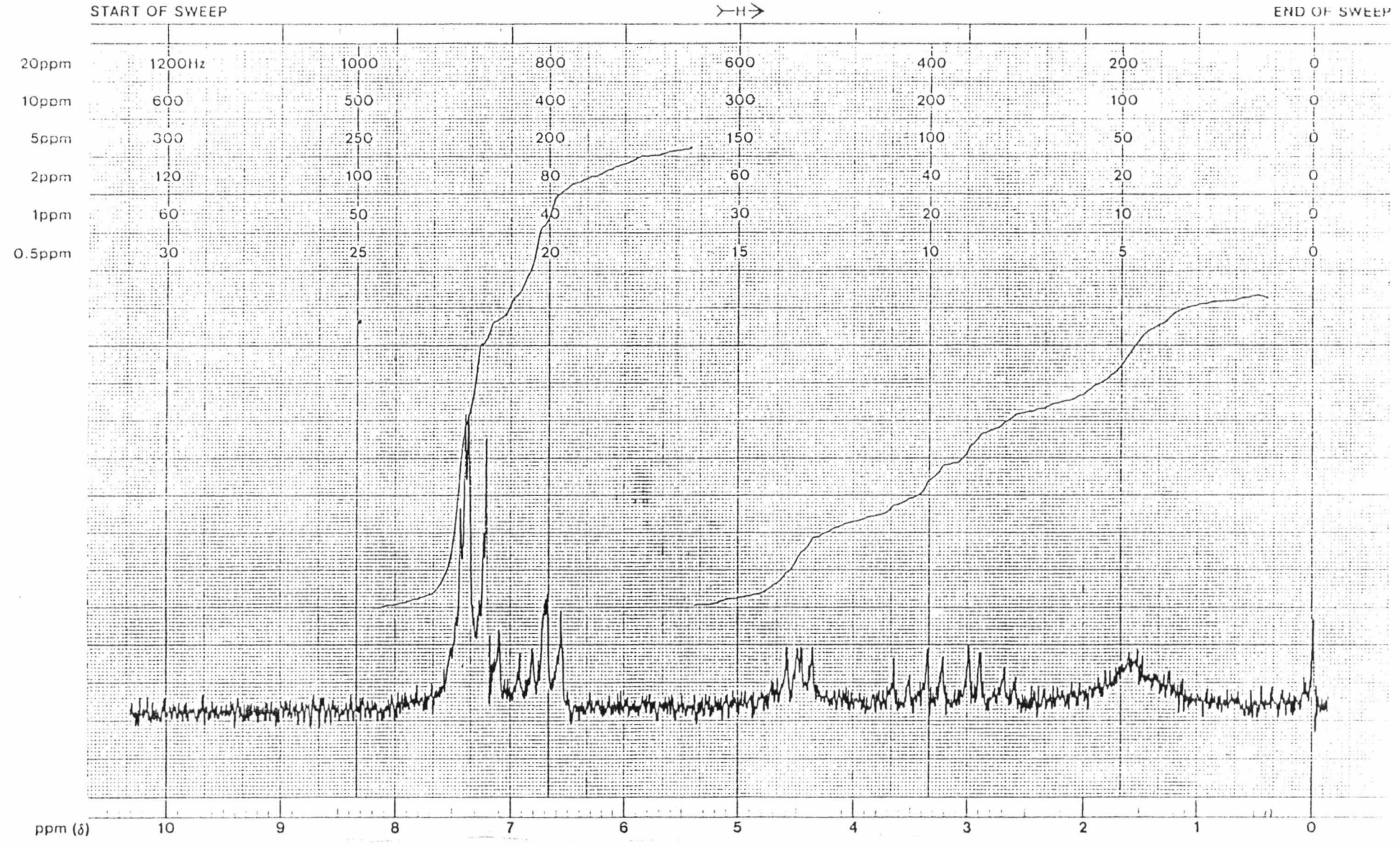


ภาคผนวก



รูปที่ 1 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ ตะกอนที่กรองได้ จากการทดลองที่ 1

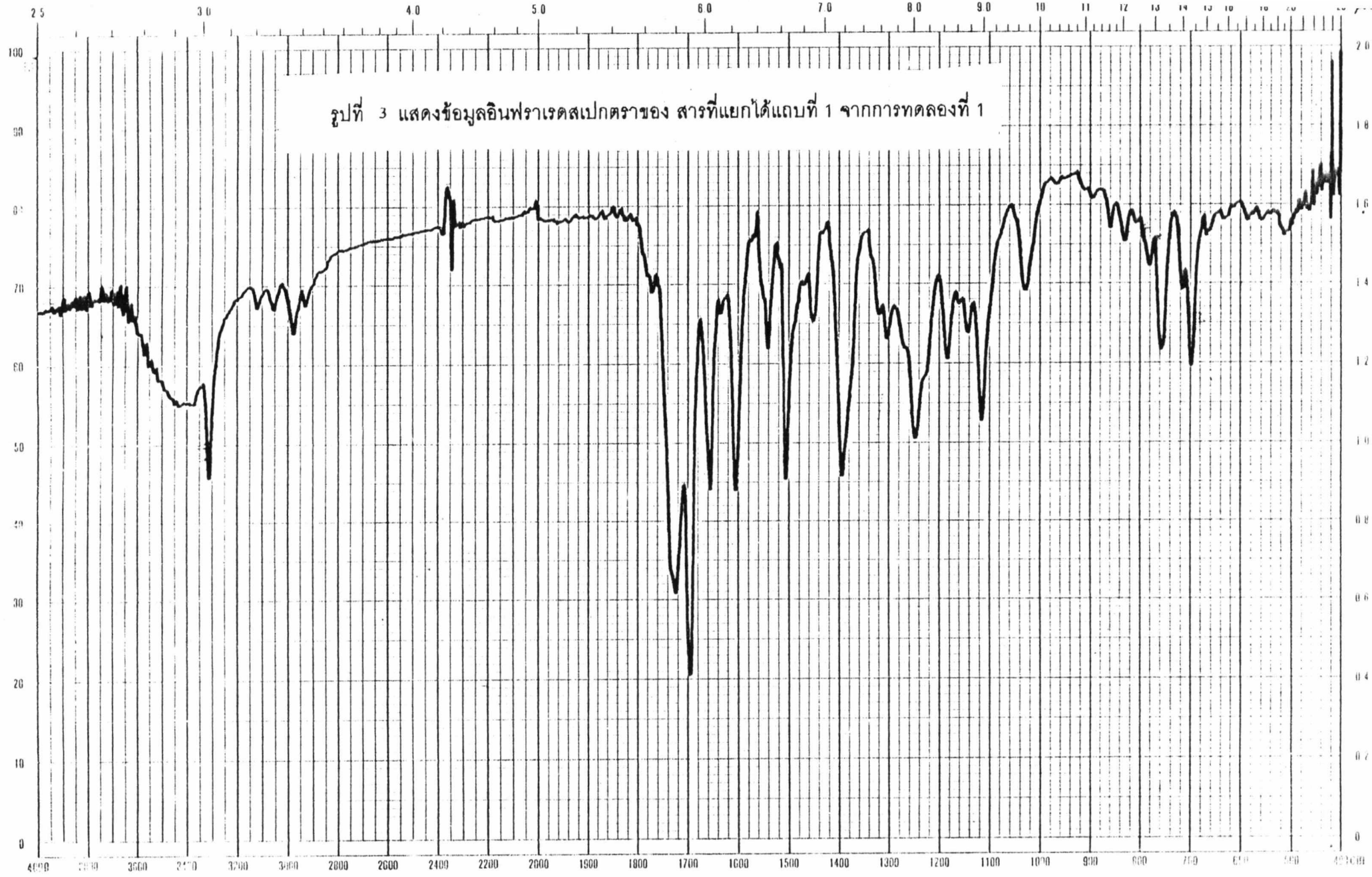
DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
2/3/38	SCAN		$A0_1N_L$ (DTPA)	KBr disc		
				CELL-LENGTH	SOLVENT	



รูปที่ 2 แสดงข้อมูลนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของ ตะกอนที่กรองได้

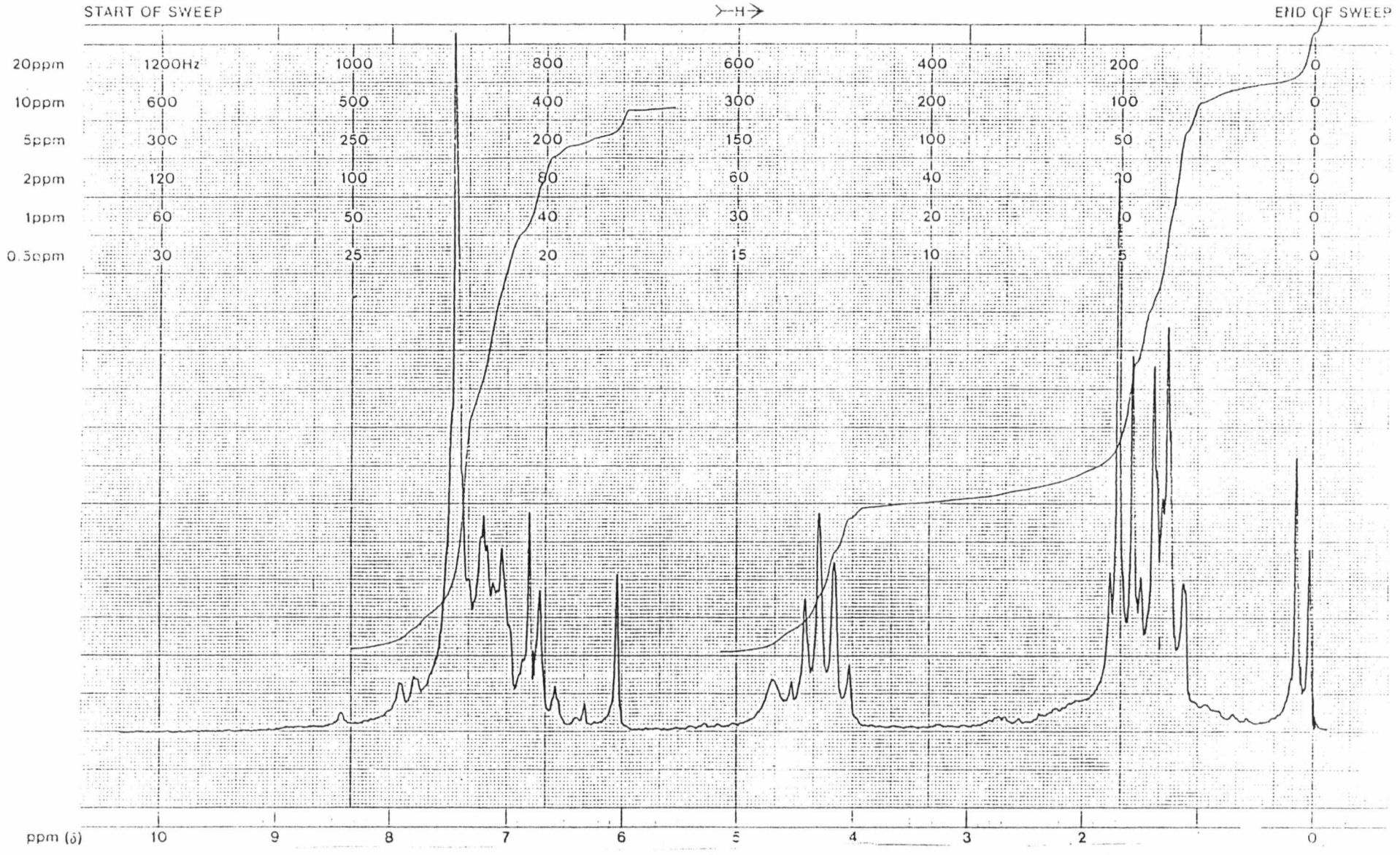
จากการทดลองที่ 1

รูปที่ 3 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ สารที่แยกได้แถบที่ 1 จากการทดลองที่ 1



DATE	MODE		SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
10/1/38	SPAN	—		~~(3)~~ (21)	KBr-Disc.		
					CELL LENGTH	SOLVENT	

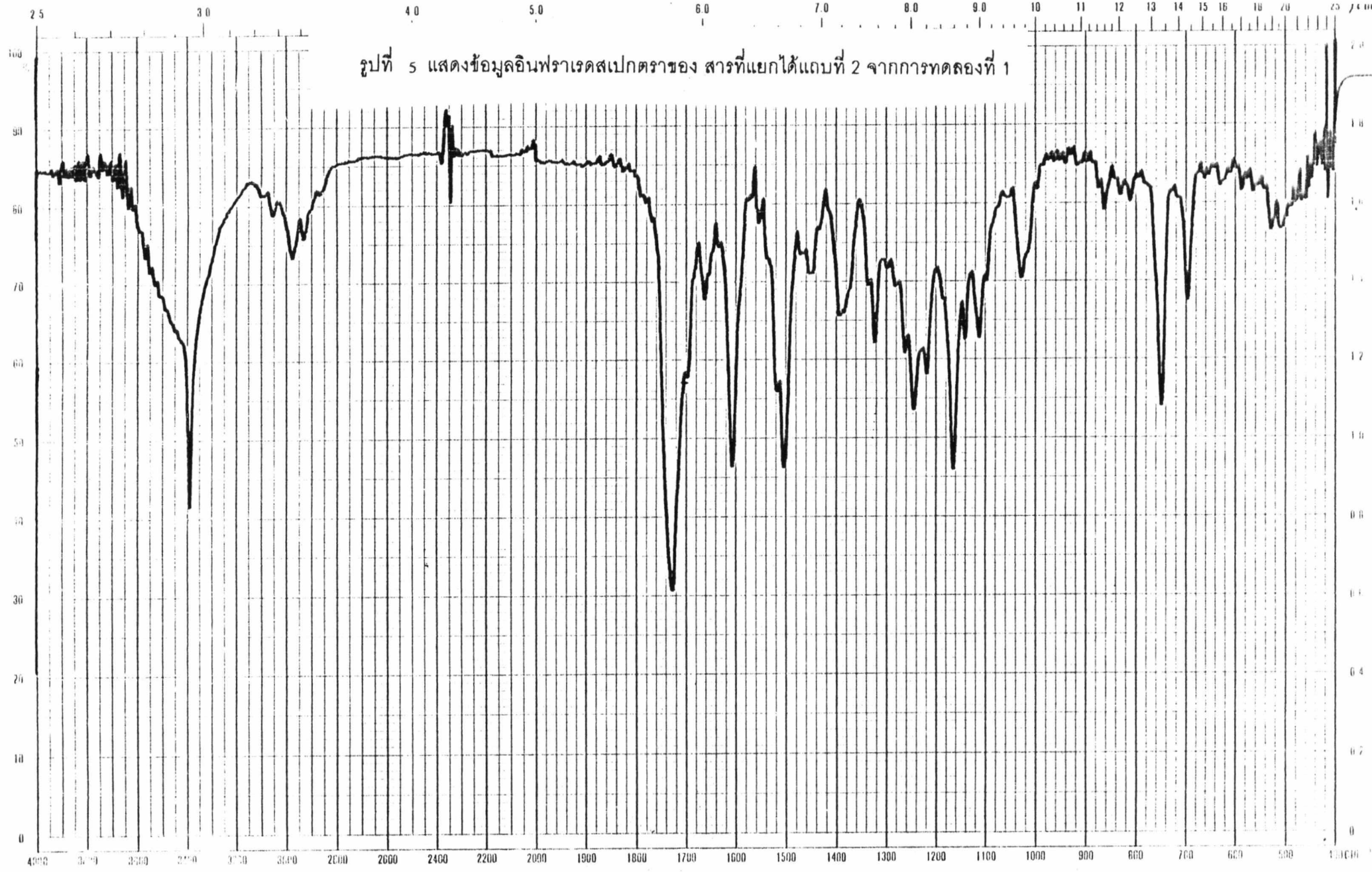
Jasco
JAPAN SPECTROSCOPIC CO.,LTD.
日本分光工業株式会社



รูปที่ 4 แสดงซ้อมูลนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของ สารที่แยกได้ แถบที่ 1

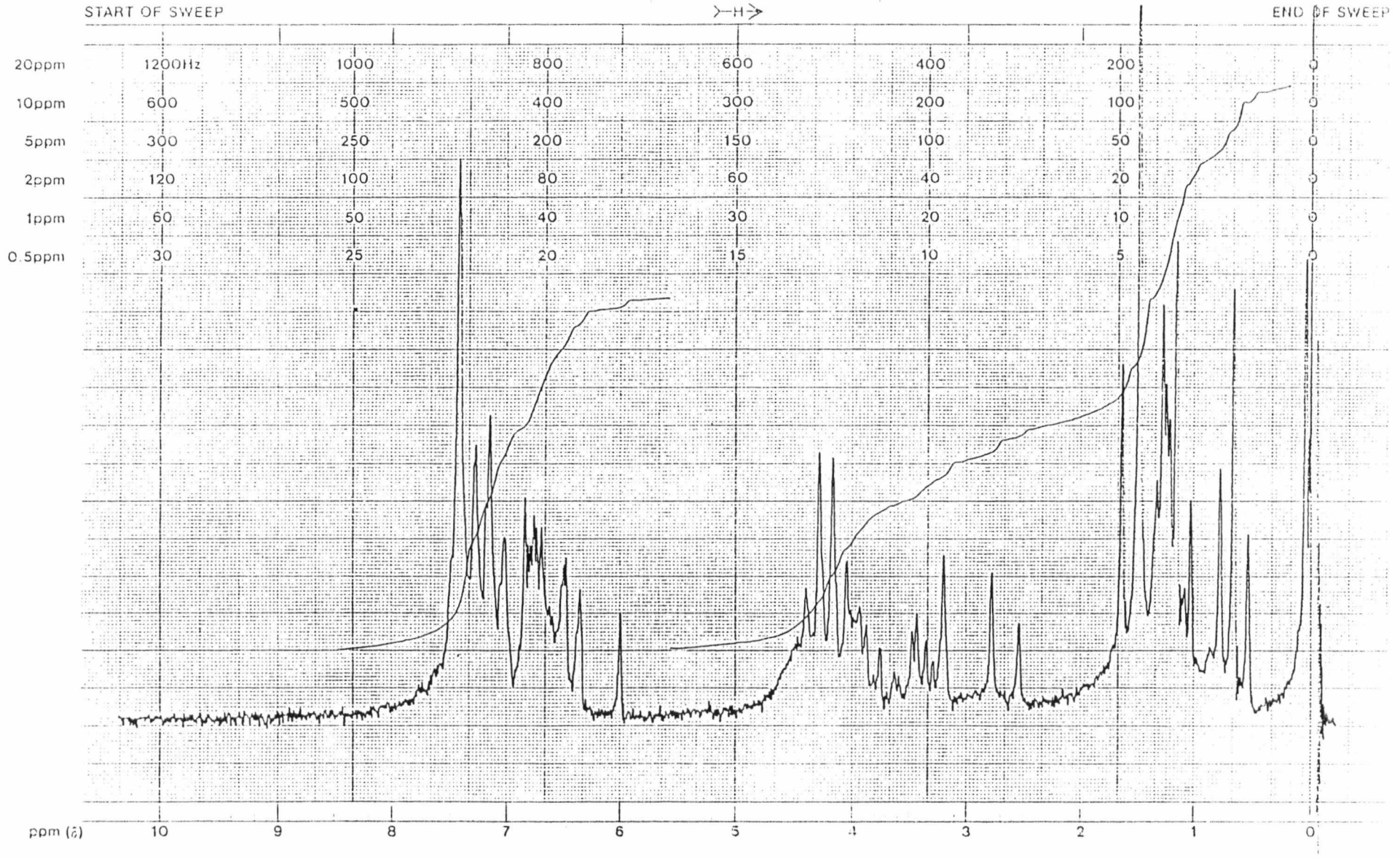
จากการทดลองที่ 1

รูปที่ 5 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ สารที่แยกได้แถบที่ 2 จากการทดลองที่ 1



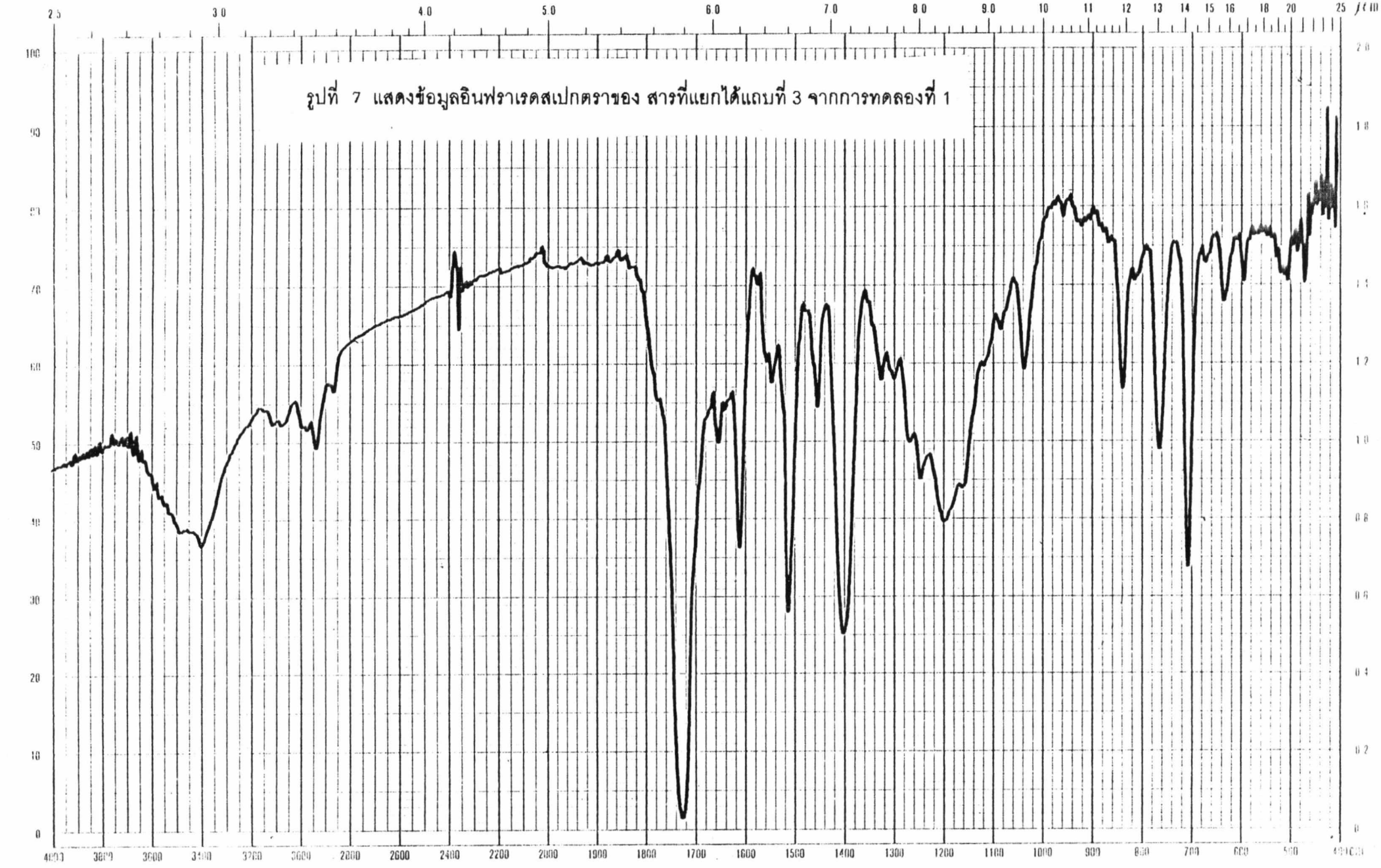
DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
19/1/95	SPAN		AO1 N7 band (3)	KBr-Disc.		
OPERATOR	WAVENUMBER	SLIT	CELL-LENGTH	SOLVENT		

Jasco
JAPAN SPECTROSCOPIC CO.,LTD
日本分光工業株式会社



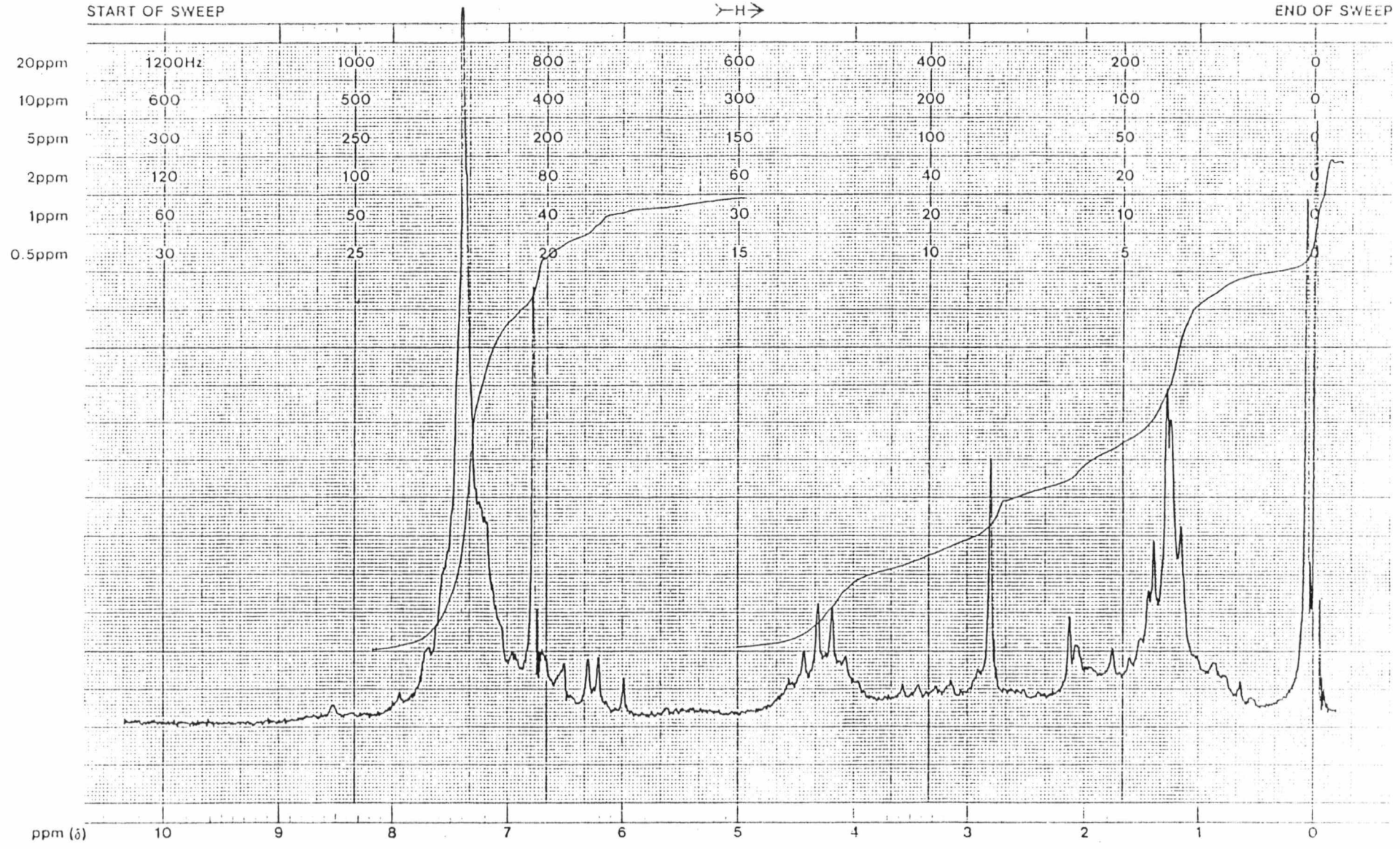
รูปที่ 6 แสดงข้อมูลนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของ สารที่แยกได้ แถบที่ 2

จากการทดลองที่ 1



DATE	MODE		SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
10/1 /58	SPAN	—	2	A01N9 (6)	KBr		

Jasco
JAPAN SPECTROSCOPIC CO.,LTD



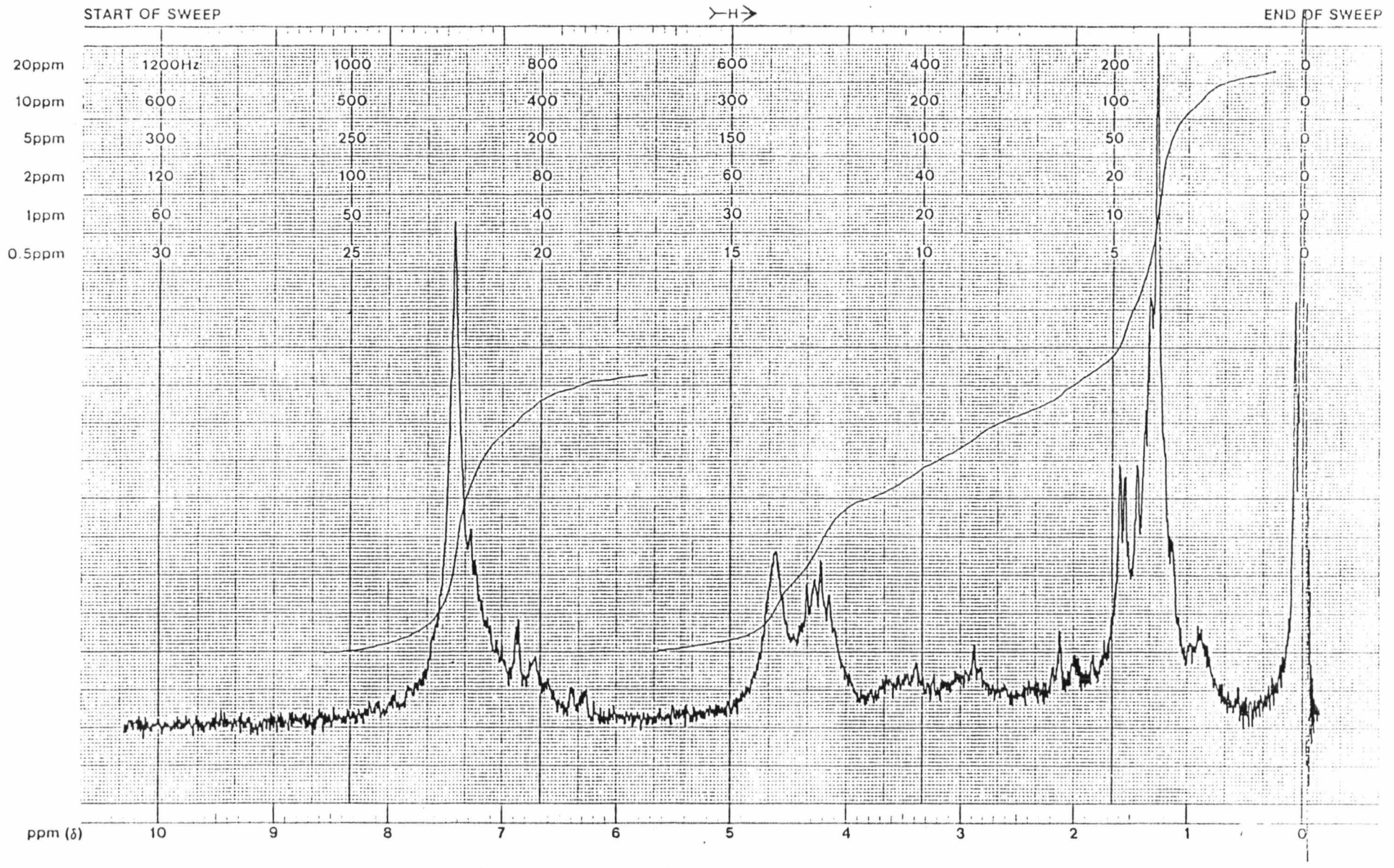
รูปที่ 8 แสดงข้อมูลนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของ สารที่แยกได้ แถบที่ 3

จากการทดลองที่ 1

รูปที่ 9 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ สารที่แยกได้แถบที่ 4 จากการทดลองที่ 1

DATE 10/1/75	MODE SPAN		SCAN SPEED	SAMPLE (5) A01 N7	SAMPLING METHOD KBr - Disc.	CONCENTRATION	REMARKS
					CELL LENGTH	SOLVENT	

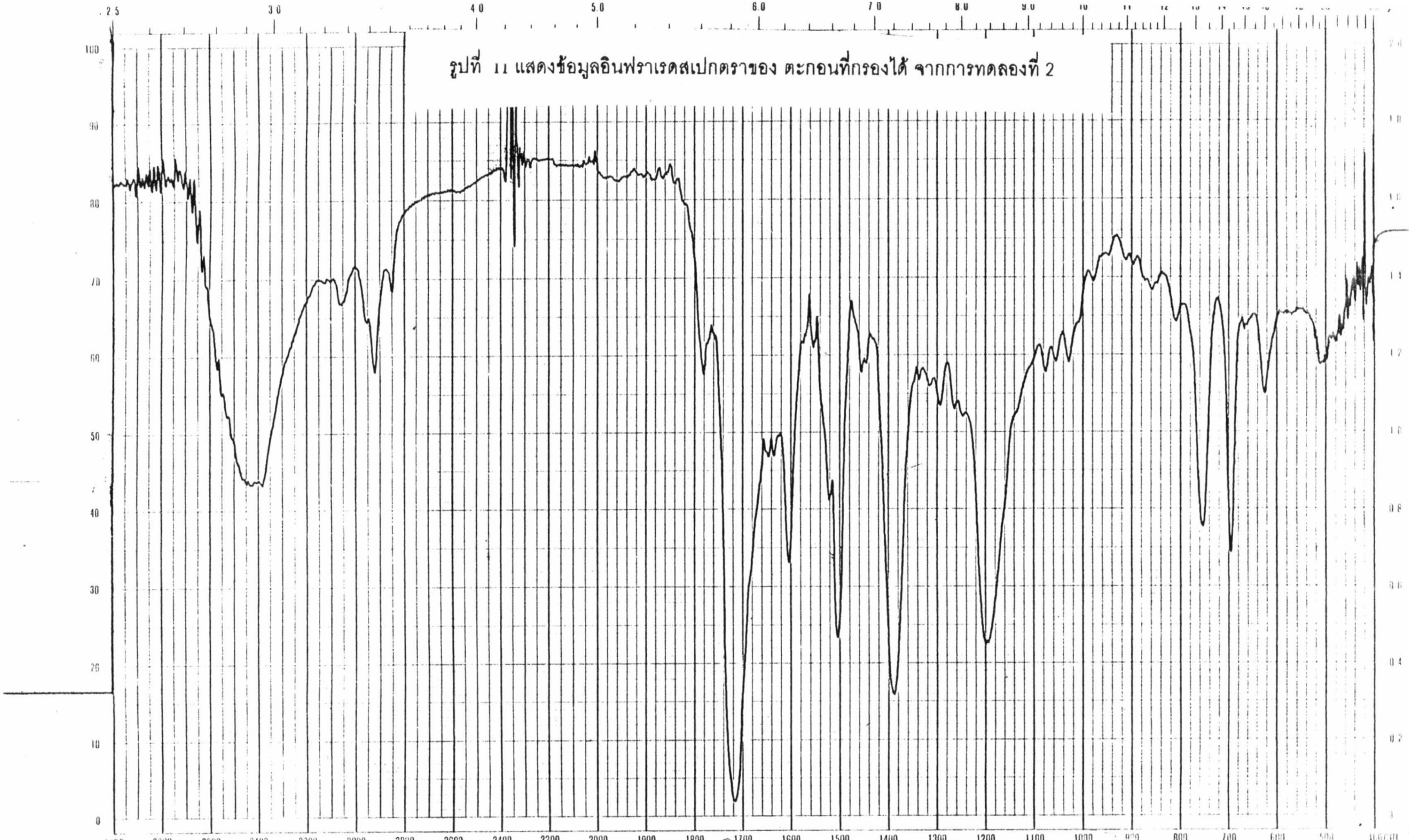
JASCO
JAPAN SPECTROSCOPIC CO.,LTD.



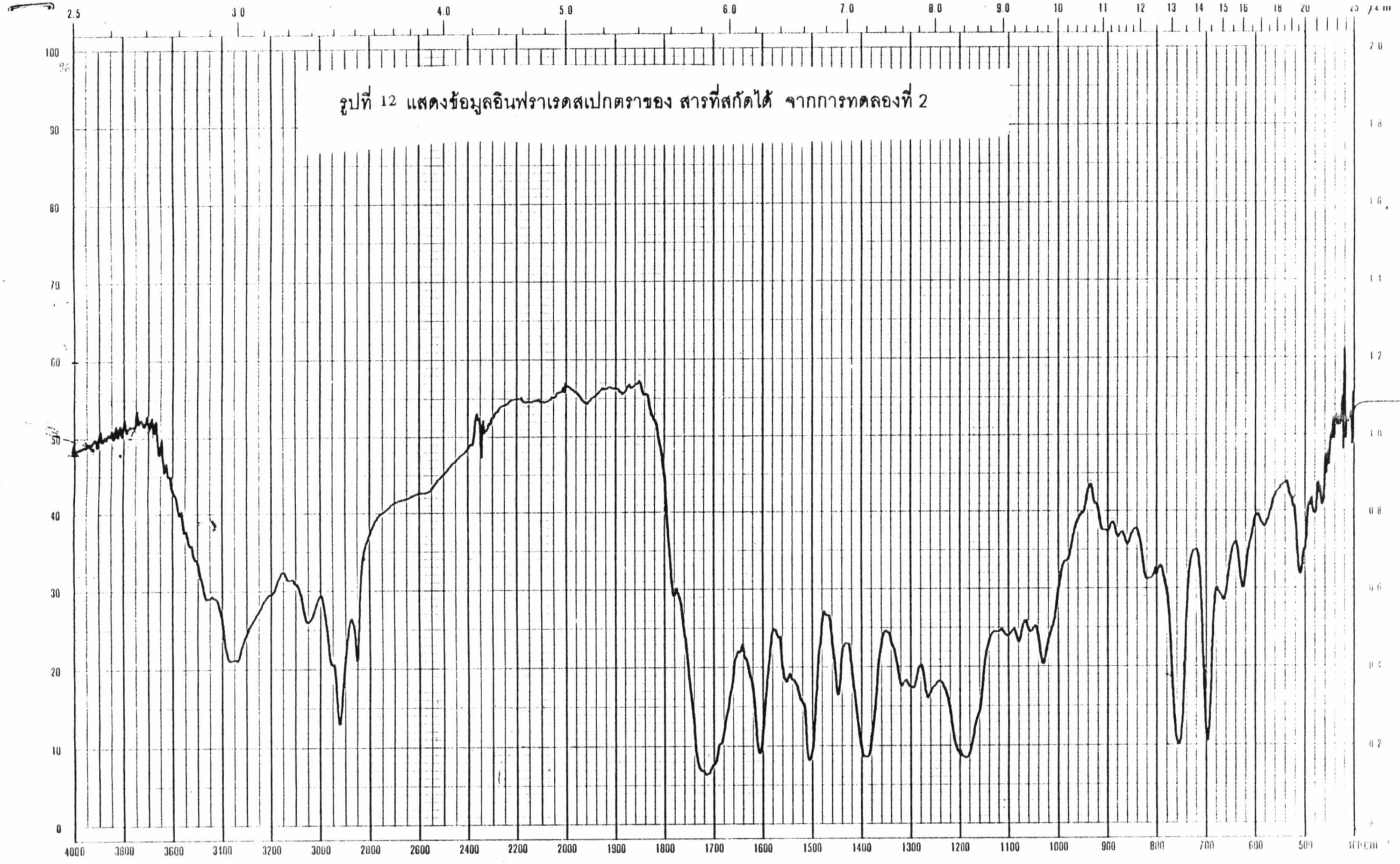
รูปที่ 10 แสดงข้อมูลนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของ สารที่แยกได้ แถบที่ 4

จากการทดลองที่ 1

รูปที่ 11 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ ตะกอนที่กรองได้ จากการทดลองที่ 2

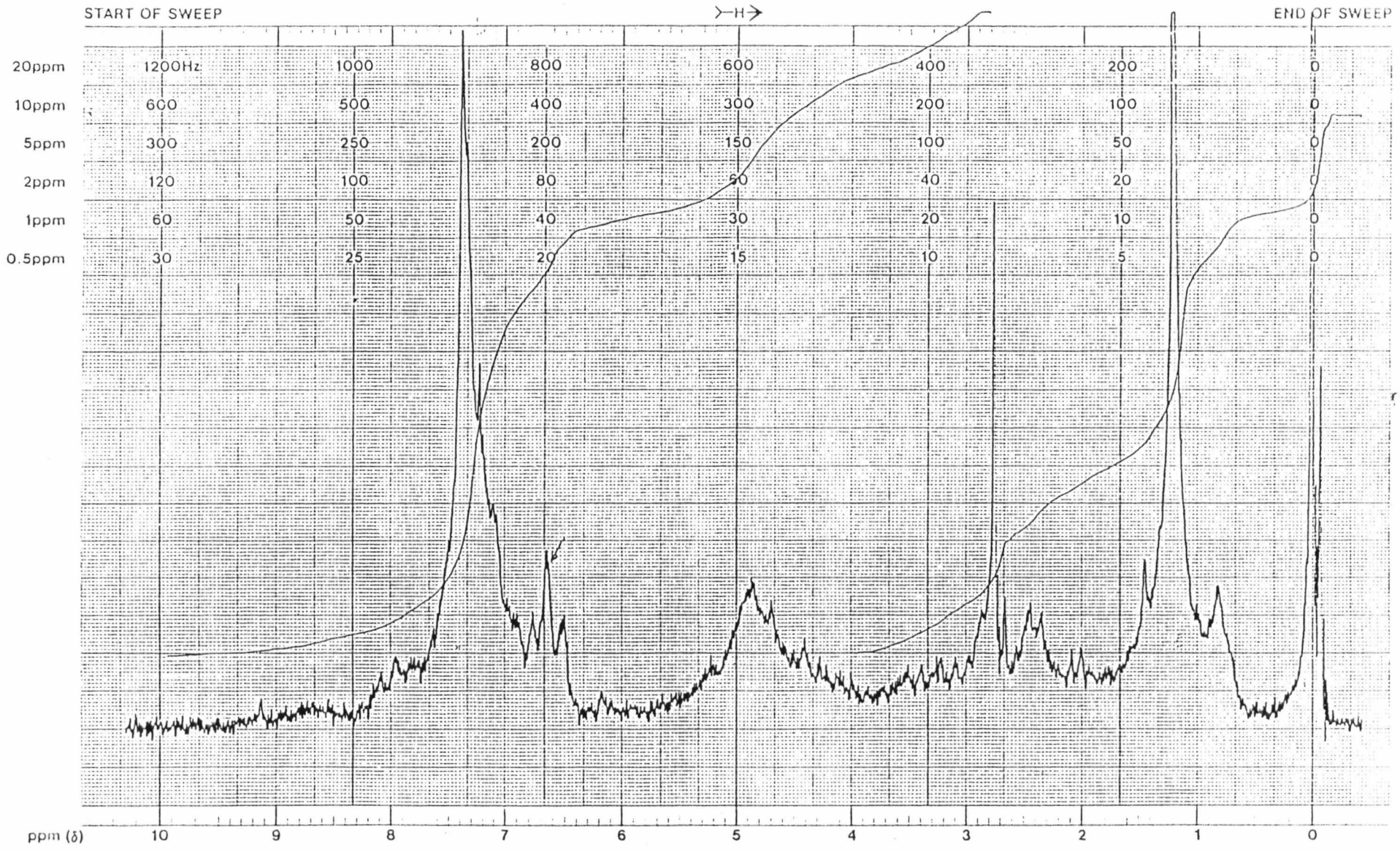


DATE	MODE		SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
29/11/64	SPAN	—		ตะกอนที่กรองได้ครั้งที่ 2	KBr - disk	—	
					CELL-LENGTH	SOLVENT	



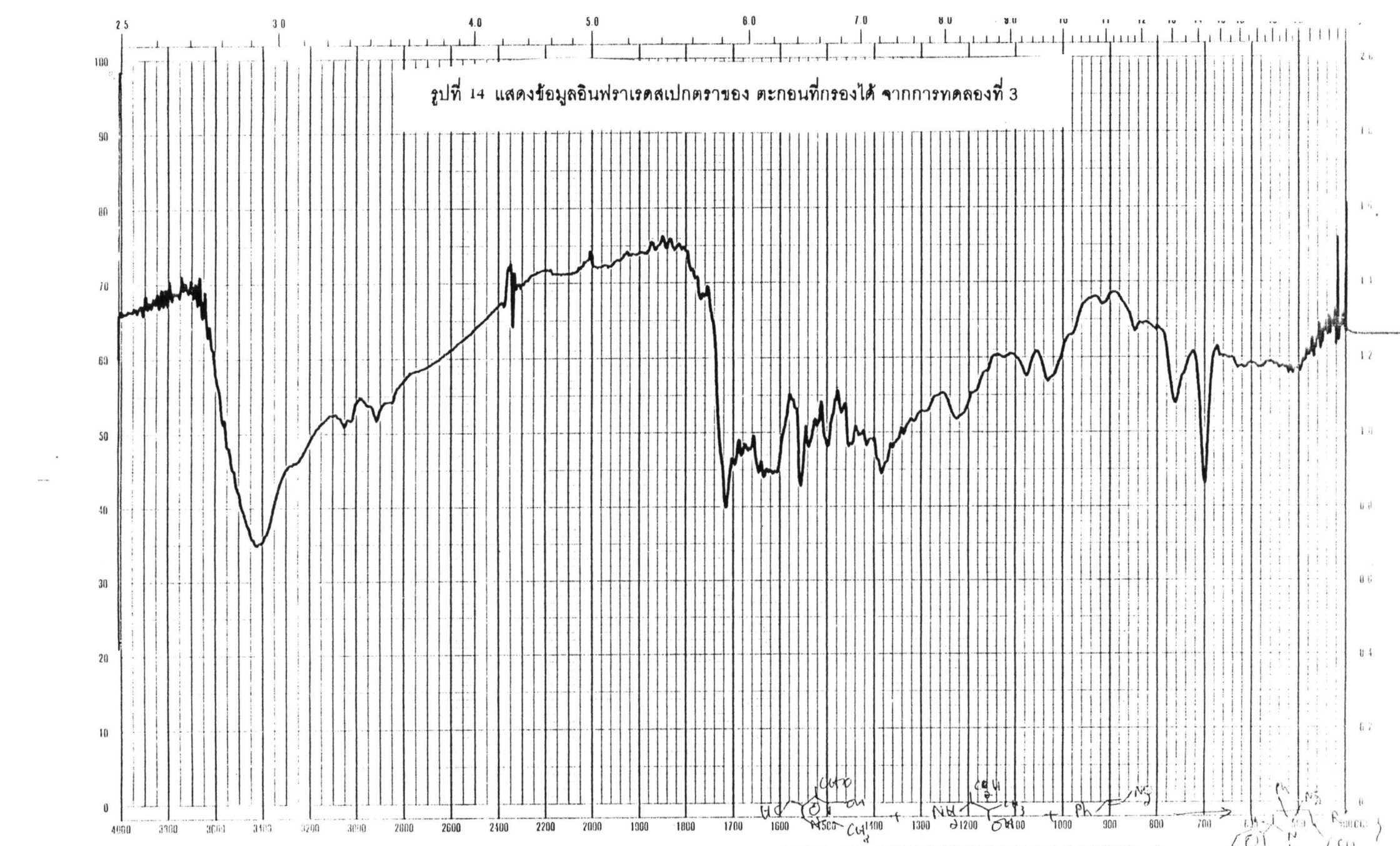
รูปที่ 12 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ สารที่สกัดได้ จากการทดลองที่ 2

DATE	MODE		SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
29/11/94	SPAN	—		ยาเกอเทไรจากการสกัด	KBr - disk		
					CELL LENGTH	SOLVENT	



รูปที่ 13 แสดงข้อมูลนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของ สารที่สกัดได้

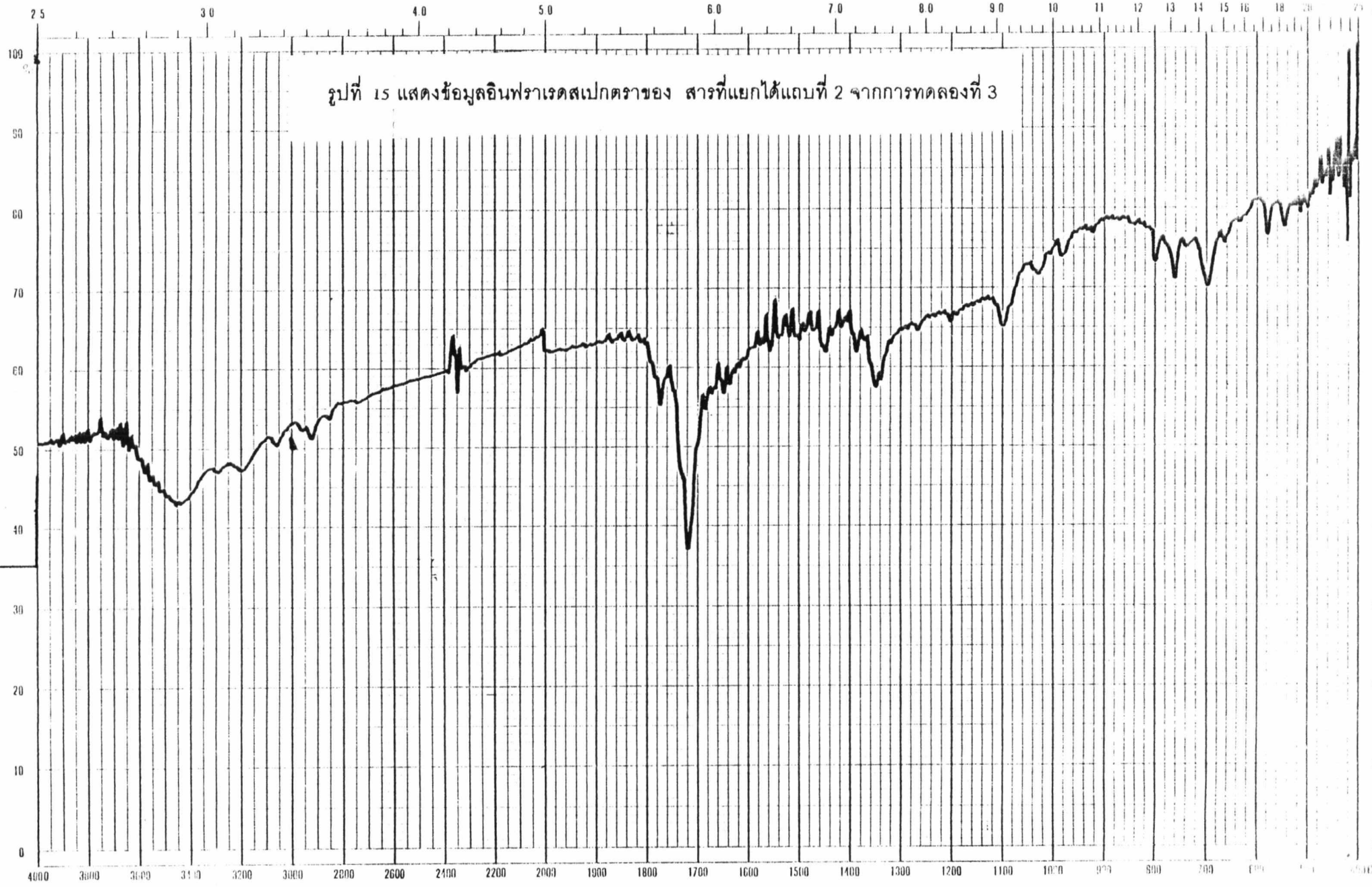
จากการทดลองที่ 2



DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
5/1/'18	SPAN		n503 brown ppt up.	KBr-Disc		
				CELL-LENGTH	SOLVENT	

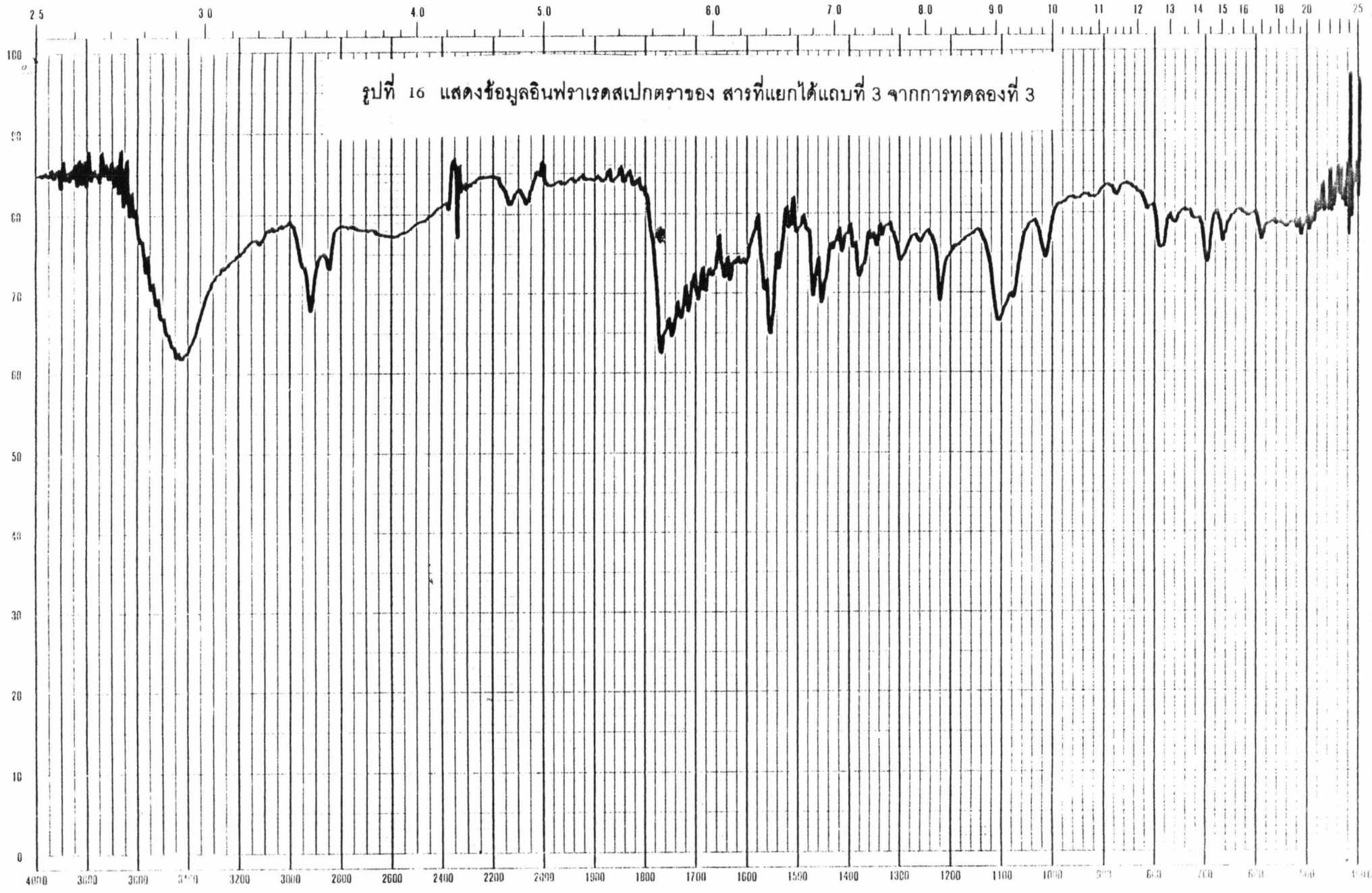
JASCO
JAPAN SPECTROSCOPIC CO.,LTD.
日本分光工業株式会社

รูปที่ 15 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ สารที่แยกได้แถบที่ 2 จากการทดลองที่ 3



DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
5/1/36	SPAN	2	AO_3N_1 (สารที่แยกได้)	CELL-LENGTH	SOLVENT	
OPERATOR	ABSCISSA	SLIT				

JASCO
JAPAN SPECTROSCOPIC CO.,LTD.
日本分光工業株式会社

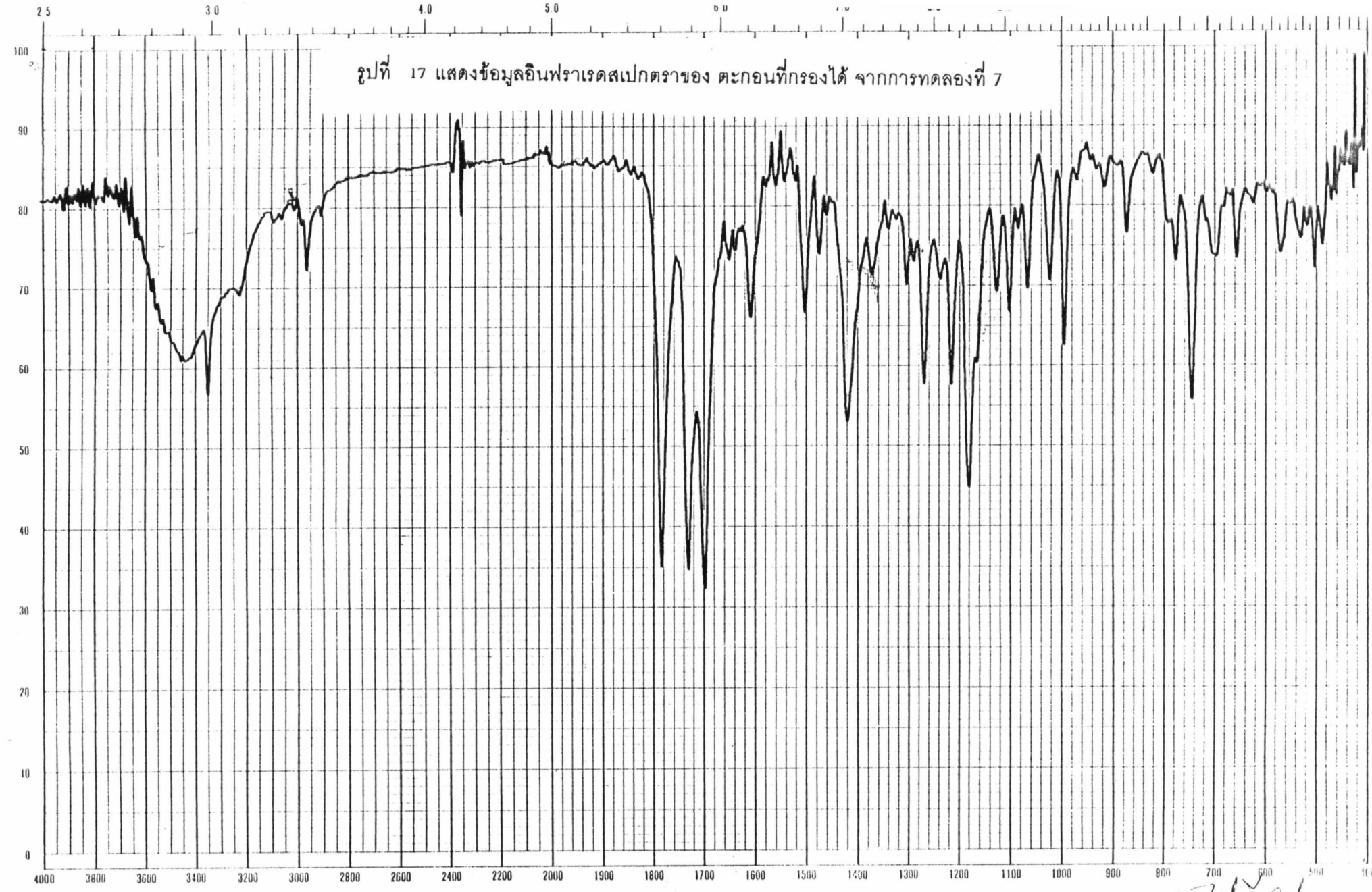


รูปที่ 16 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ สารที่แยกได้แถบที่ 3 จากการทดลองที่ 3

DATE	MODE		SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
	SPAN	—	2	AlO_3N_1 (สกัด)	CELL LENGTH	SOLVENT	

JASCO
JAPAN SPECTROSCOPIC CO.,LTD.

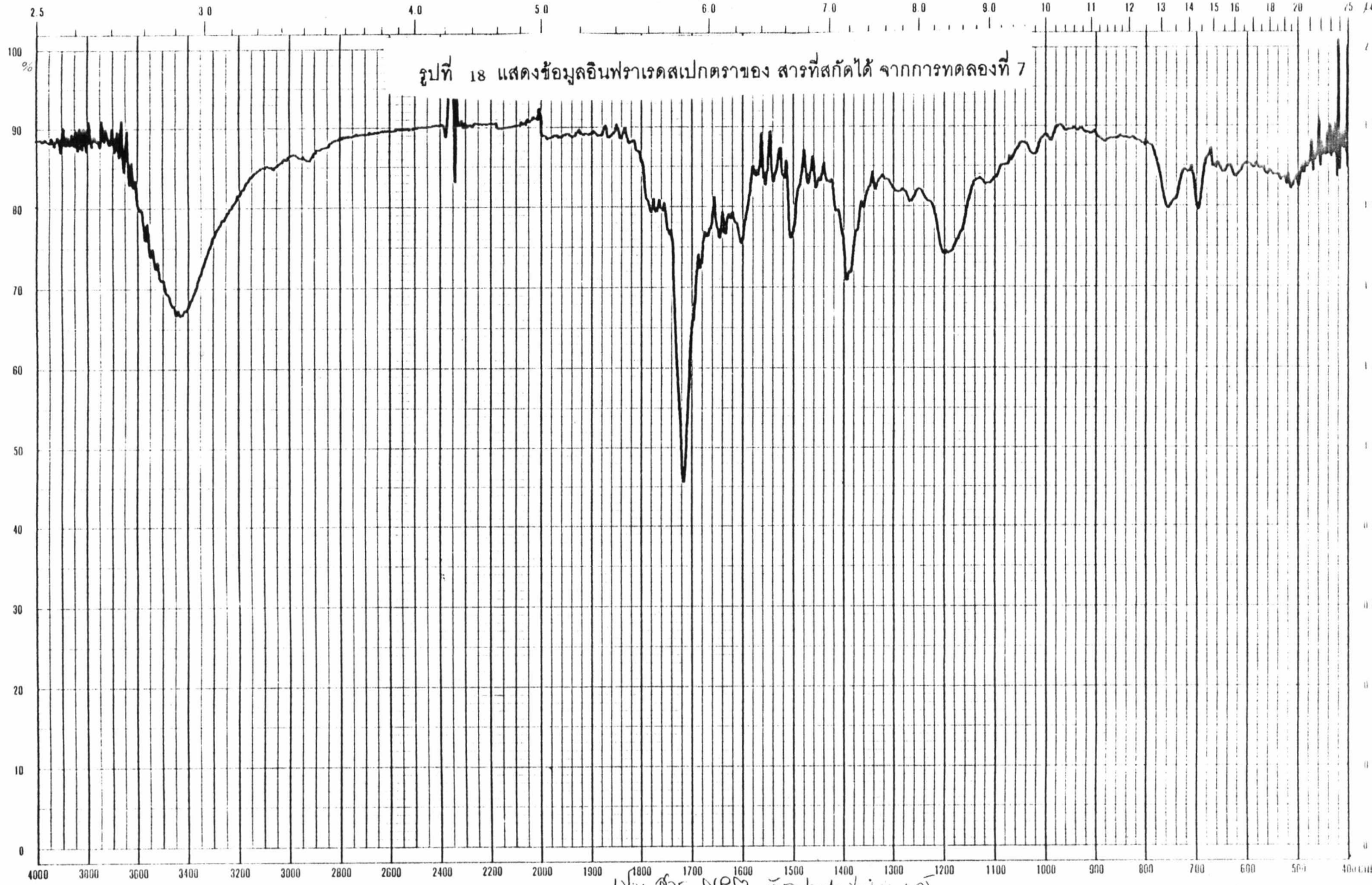
รูปที่ 17 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ ตะกอนที่กรองได้ จากการทดลองที่ 7



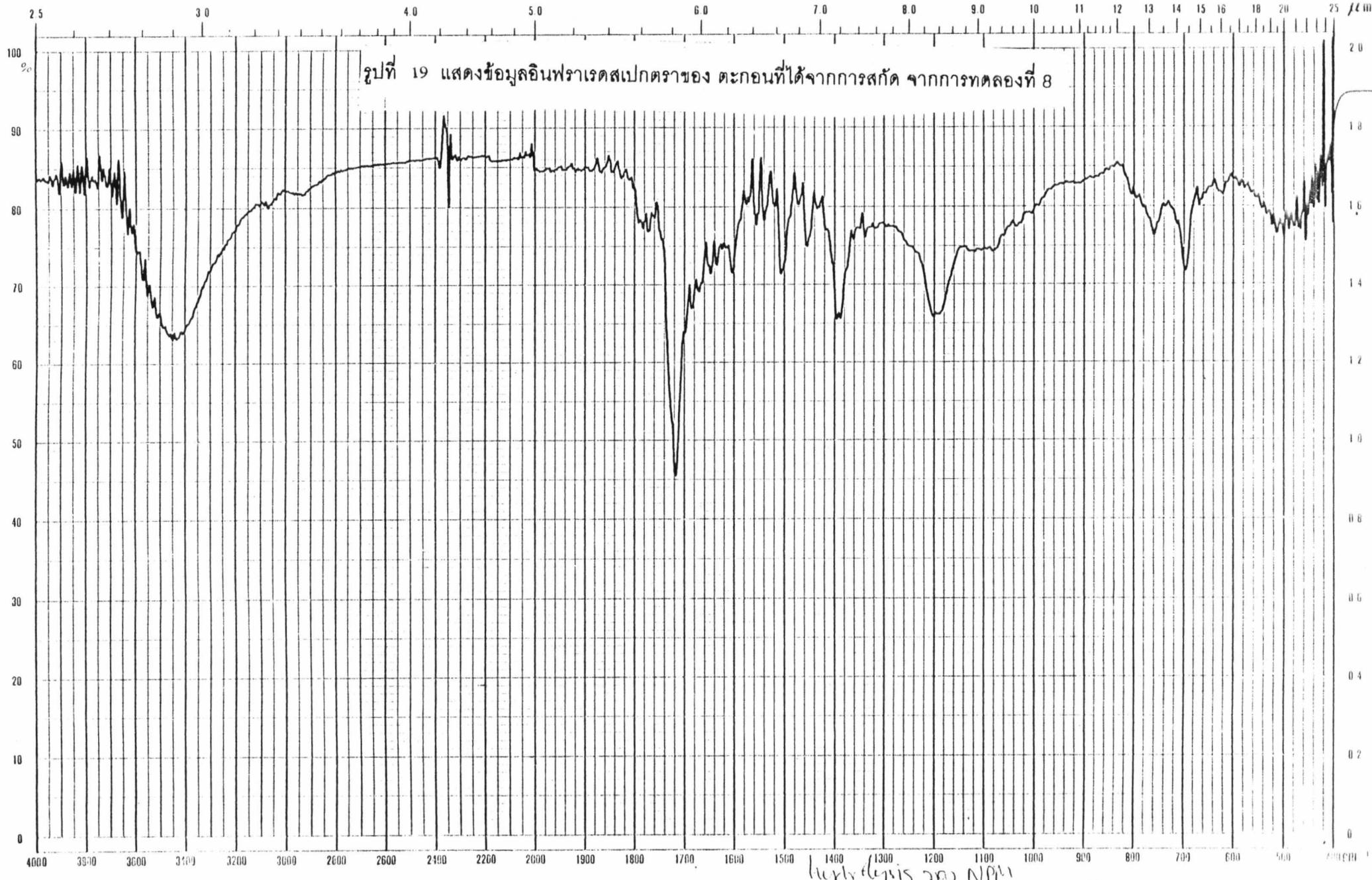
DATE	MODE		SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
	SPAN	—		AO_7N_1 (กรอง)	KBrDish		
OPERATOR	EXPANDER		SLIT		CELL-LENGTH	SOLVENT	

mp. 72องศา Calc compare

รูปที่ 18 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ สารที่สกัดได้ จากการทดลองที่ 7



DATE	MODE / SPAN		SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
					KBr disk.		

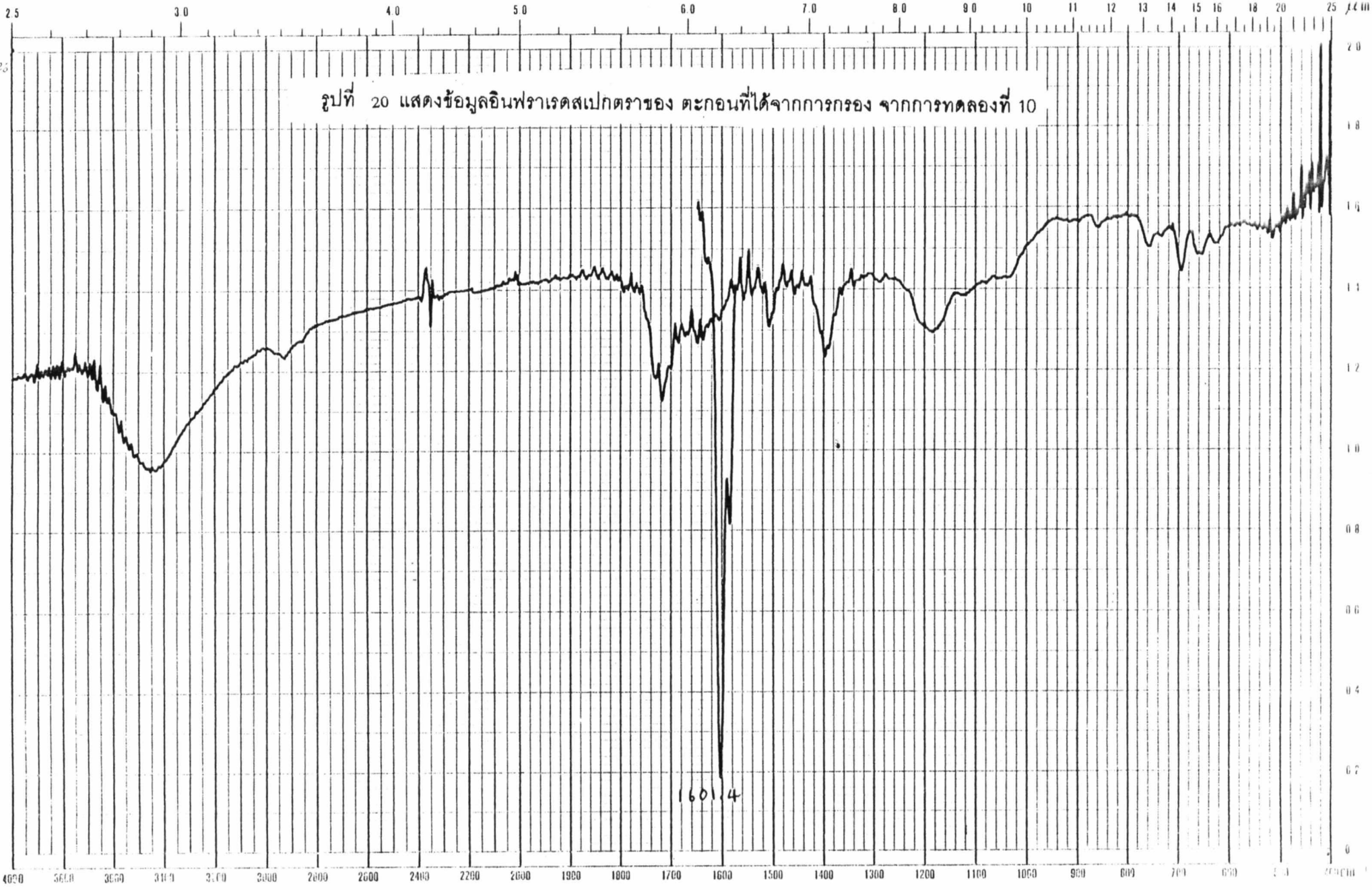


รูปที่ 19 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ ตะกอนที่ได้จากการสกัด จากการทดลองที่ 8

DATE	MODE		SCAN SPEED	SAMPLE เตม 8N 1	SAMPLING METHOD KBr-Disc	CONCENTRATION	REMARKS
	SCAN	—			CELL LENGTH	SOLVENT	

Hydrolysis ของ NPN

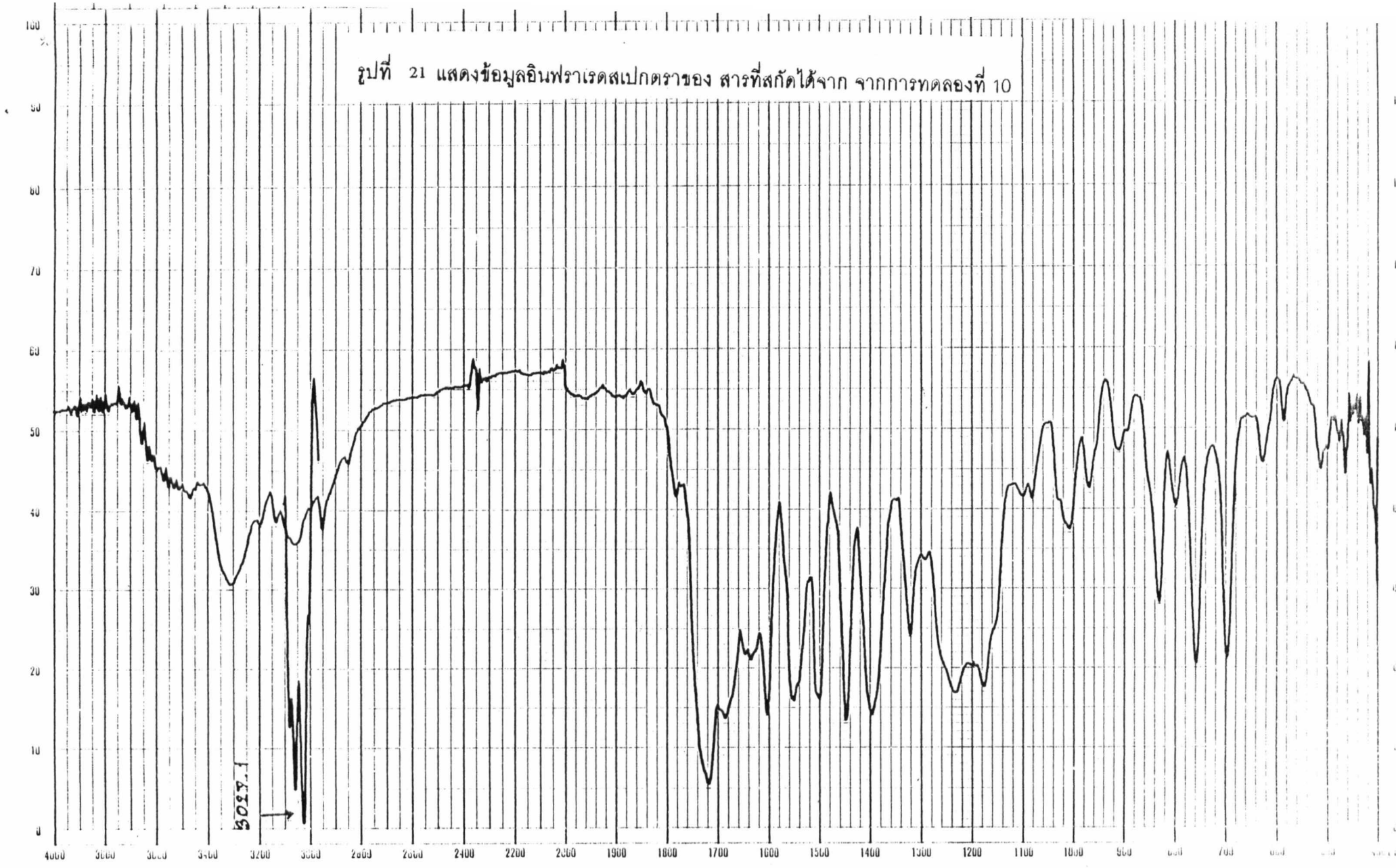
(ดูผลของ APAP) ที่ m.p. 190°



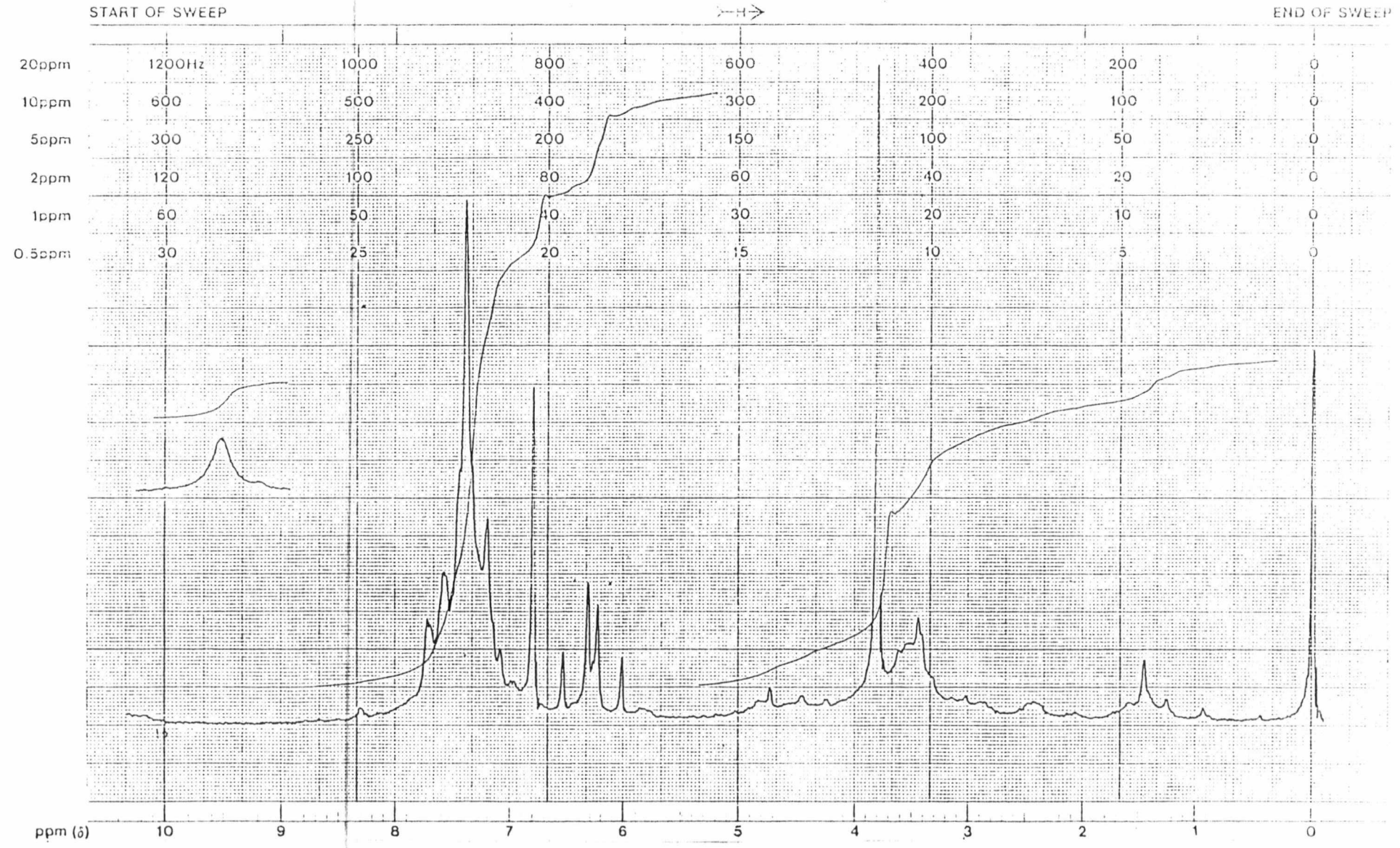
รูปที่ 20 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ ตะกอนที่ได้จากการกรอง จากการทดลองที่ 10

DATE	MODE		SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
23/2/39	SPAN			AO.N1 (DTDJ)	kBr disc		

รูปที่ 21 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตราของ สารที่สกัดได้จาก จากการทดลองที่ 10



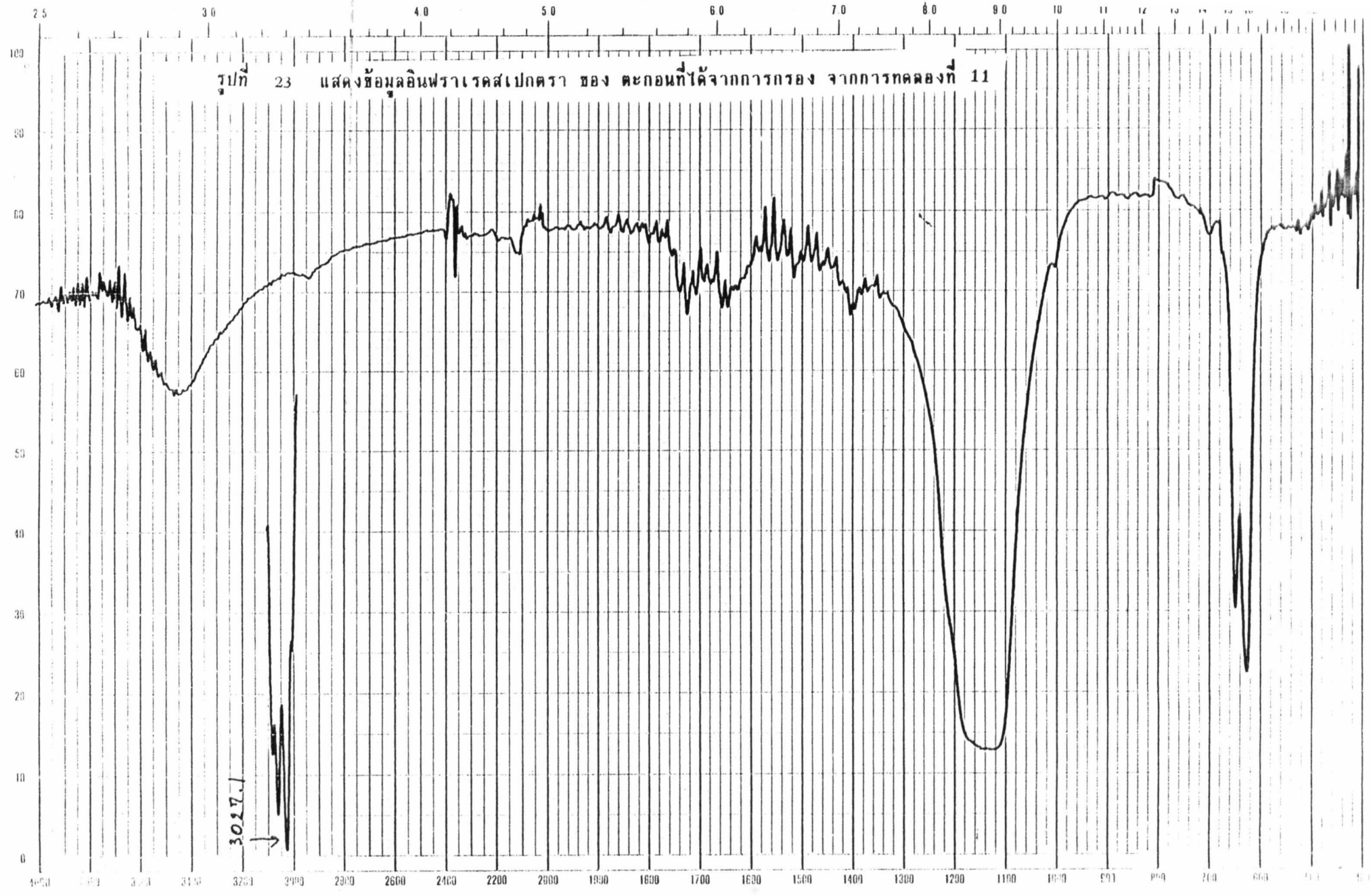
DATE	MODE		SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
27/2/38	SPAN	—		$AO_{10}N_1$	neat.		
OPERATOR	EXPANDER		SLIT	(ของเหลวสีเหลือง)	CELL-LENGTH	SOLVENT	



รูปที่ 22 แสดงข้อมูลนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของ สารที่สกัดได้

จากการทดลองที่ 10

รูปที่ 23 แสดงข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรา ของ ตะกอนที่ได้จากการกรอง จากการทดลองที่ 11



DATE	MODE	SCAN SPEED	SAMPLE	SAMPLING-METHOD	CONCENTRATION	REMARKS
27/2/36	SCAN		$AO_{11}N_1$ (ตัวอย่าง)	CELL LENGTH	SOLVENT	

เอกสารอ้างอิง

1. David,E.M.,Longenecker,J.B.and Esmond,E.S.,*J.Amer.Chem.Soc.*,**76**(1954),648.

2. David,E.M.,Longenecker,J.B.and Esmond,E.S.,*J.Amer.Chem.Soc.*,**76**(1954),639.

3. Egon,B.and Lothar,J.,*Biochem.Z.*,**332**(1960),259.

4. Walsh,C.,"Enzymetic Reaction Mechanisms" ,Freeman, San Francisco,1979.

5. Grigg,R.and S.Thianpatanagul,*J.Chem.Soc.Chem.Commun.*,(1984),180.

6. Grigg,R.,*Bull.Soc.Chim.Z.*,**93**(1984),593.

7. วิชัย ริ้วตระกูล, โกศัลย์ คูสำราญ, พิเชษฐ์ วิริยะจิตรา, สุรชัย นิมจิรวัฒน์ และ อภิชาติ สุขสำราญ, การประยุกต์ใช้สเปคโตรสโคปีในเคมีอินทรีย์ พิมพ์ครั้งที่ 2, หน้าที่ 54-225, นำอักษรการพิมพ์, กรุงเทพ, 2527.