

บทที่ 3

วิธีการที่ใช้ในการศึกษา

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. ชุดทำปฏิกิริยาเคมี: Quickfit
2. เครื่องกลั่นความดันต่ำ (Rotary evaporator): Buchi
3. ชุดให้แสงอัลตราไวโอเล็ต: LVP; Chromato-Vue Cabinet Model C-65
4. TLC Aluminium Sheets Silica gel 60 F254: Merck
5. Nuclear Magnetic Resonance: Brand/Model : Bruker /Avance 400
6. Mass Spectrometry: Applied biosystem API 400
7. Atomic absorption spectrometer:
8. Filter paper No.1:Whatman

สารเคมี

- | 1. สุราขาว 40 ดีกรี | ยี่ห้อเสือดาว | บริษัทในเครือบริษัทไทยเบฟเวอเรจ จำกัด |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| 2. Potassium permanganate AR grade | | บริษัท Carlo erba |
| 3. Nicotinic acid | AR grade | บริษัท Merck |
| 4. Nicotine | AR grade | บริษัท Merck |
| 5. Acetone | AR grade | บริษัท Merck |
| 6. Dichloromethane | AR grade | บริษัท Lab-scan |
| 7. Chloroform | AR grade | บริษัท Merck |
| 8. Ethyl acetate | AR grade | บริษัท Merck |
| 9. Hexane | AR grade | บริษัท Merck |
| 10. Methanol | AR grade | บริษัท Merck |
| 11. Silica gel 60 GF 254 | Thin-layer chromatography | บริษัท Merck |

วิธีการดำเนินการวิจัย

1.เทคนิคทั่วไป

1.1 Thin-layer chromatography (TLC)

ใช้ในการตรวจสอบสารที่สกัดและสังเคราะห์ได้และความสมบูรณ์ของปฏิกิริยาการสังเคราะห์โดยใช้ Silica gel GF 254 เป็นวัสดุภาคคงที่และใช้วัสดุภาคเคลื่อนที่ดังนี้

- | | |
|--|---|
| 1. การสกัด nicotine จากใบยาสูบ | Methanol : Dichloromethane (8:2) |
| 2. การแยกสารสกัดโดยวิธี Column chromatography | Methanol : Dichloromethane (8:2) |
| 3. การแยกสารสกัดโดยวิธี Column chromatography ครั้งที่ 2 | Methanol : Dichloromethane (2:8) |
| 4. การสังเคราะห์ nicotinic acid จาก nicotine | Methanol : Dichloromethane (8:2) และ Methanol : Dichloromethane (2:8) |

1.2 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

ใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ของสารในขั้นตอนการสกัด nicotine และ ขั้นตอนการสังเคราะห์ nicotinic acid จาก nicotine โดยใช้หลักการของ ^1H NMR

การตรวจเอกลักษณ์ของสารในขั้นตอนการสกัด nicotine ใช้ DMSO_d_6 เป็นตัวทำละลาย

ตรวจเอกลักษณ์ของสารในขั้นตอนการสังเคราะห์ nicotinic acid จาก nicotine ใช้ D_2O เป็นตัวทำละลาย

1.3 Mass Spectrometry (MS)

Mass Spectrometry (MS) แบบ Ion source ชนิด APCI (atmospheric pressure chemical ionization) ใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ของสารในขั้นตอนการสังเคราะห์ nicotinic acid จาก nicotine โดยพ่นด้วย N_2

1.4 ทดสอบความเป็นกรดต่าง

ใช้ในการตรวจเอกลักษณ์ของสารผลิตภัณฑ์ได้ในขั้นตอนการสังเคราะห์ nicotinic acid โดยใช้กระดาษลิตมัส

2. การสกัด nicotine จากใบยาสูบ

2.1 การสกัด nicotine จากใบยาสูบ 1 kg.

วิธีทดลอง

ชั่งใบยาสูบ 1 kg. นำไปหมักในสุรชาขาว 40 ดีกรี ปริมาณ 5,040 ml. (8 ขวด ขวดละ 630 ml.) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาบีบคั้นเอาสารละลายออกจากกากให้ได้มากที่สุดโดยใช้ผ้าขาวบางและนำไปกรองด้วยสำลี โดยได้สารสกัดปริมาณ 3.6 ลิตร นำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นจนเหลือสารสกัดปริมาณ 1.8 ลิตร

นำสารสกัด 1.8 ลิตร มาสกัดด้วย Ethyl acetate ปริมาตร 1000 ml. แบ่งเติม 2 ครั้ง ครั้งละ 500 ml. โดยครั้งแรกเติม Ethyl acetate 500 ml. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 วัน จากนั้นแยกชั้น Ethyl acetate กับชั้นน้ำออกจากกัน นำชั้นน้ำมาเติม Ethyl acetate 500 ml. เป็นครั้งที่สอง เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2 วัน จากนั้นแยกชั้น Ethyl acetate กับชั้นน้ำออกจากกันอีกครั้ง รวมได้สารสกัดที่อยู่ในชั้น Ethyl acetate 700 ml. จากนั้นนำไประเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ

นำสารสกัดมาแยกให้ได้ nicotine บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column chromatography โดยใช้ Silica gel เป็นวัสดุภาคคงที่ และ Methanol และ Dichloromethane อัตราส่วน 8:2 โดยปริมาตร เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ ตรวจเอกลักษณ์ของสารสกัดโดยใช้เทคนิค TLC เทียบกับสารมาตรฐานของ nicotine จากนั้นเก็บ fraction ที่มี nicotine และนำมาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น ได้ปริมาณ nicotine 84 mg.

2.2 การสกัด nicotine จากใบยาสูบ 5 kg.

วิธีทดลอง

ชั่งใบยาสูบ 5 kg. นำไปหมักในสุรชาขาว 40 ดีกรี ปริมาณ 23,750 ml. (38 ขวด ขวดละ 625 ml.) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาบีบคั้นเอาสารละลายออกจากกากให้ได้มากที่สุดโดยใช้ผ้าขาวบางและนำไปกรองด้วยสำลี โดยได้สารสกัดปริมาณ 19 ลิตร นำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นจนเหลือสารสกัดปริมาณ 2.75 ลิตร

นำสารสกัด 2.75 ลิตร มาสกัดด้วย Ethyl acetate ปริมาตร 3000 ml. แบ่งเติม 3 ครั้ง ครั้งละ 1000 ml. โดยครั้งแรกเติม Ethyl acetate 1,000 ml. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 วัน จากนั้นแยกชั้น Ethyl acetate กับชั้นน้ำออกจากกัน นำชั้นน้ำมาเติม Ethyl acetate 1,000 ml. เป็นครั้งที่สอง เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 2 วัน จากนั้นแยกชั้น Ethyl acetate กับชั้นน้ำออกจากกันอีกครั้ง นำชั้นน้ำมาเติม Ethyl acetate อีก 1,000 ml. เป็นครั้งที่สาม แยกชั้น Ethyl acetate ออก ในขั้นตอนนี้ได้นำสารสกัดในชั้น Ethyl acetate มาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น จนได้ปริมาณสารสกัด (crude extract) 50.5 g.

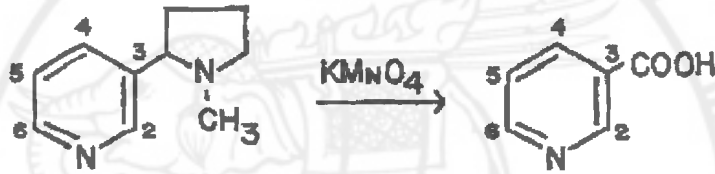
นำ crude extract 50.5 g. มาแยกให้ได้ nicotine บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Column chromatography โดยใช้ Silica gel เป็นวัสดุภาคคงที่ และ Methanol และ Dichloromethane อัตราส่วน 8:2 โดยปริมาตร เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ เนื่องจาก crude extract ที่ได้มีปริมาณมาก ทำให้มีข้อจำกัดทางด้านขนาดของ Column ที่ใช้ เนื่องจาก Column ขนาดใหญ่ที่สุดที่มี คือ เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 cm. ยาว 55 cm. จึงทำการแบ่ง crude extract เป็นสองส่วน ส่วนละ 25 g. เพื่อแบ่งไปผ่าน Column chromatography สองครั้ง

ซึ่งใช้อัตราส่วน Silica gel ต่อ crude extract เท่ากับ 1 : 10 ดังนั้นจึงใช้ Silica gel 250 g. วิธี Pack column ใช้วิธี wet method

ทำการ run column พร้อมกับตรวจเอกลักษณ์ของสารสกัดโดยใช้เทคนิค TLC เทียบกับสารมาตรฐานของ nicotine จากนั้นเก็บ fraction ที่มี nicotine และนำมาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น รวมได้ปริมาณ nicotine จากการผ่าน column ทั้งสองครั้งเท่ากับ 9.493 g. ลักษณะของสารที่ได้ เป็นของเหลวข้นหนืด สีน้ำตาลเข้ม พบว่าในขั้นตอนนี้มีสารตะกอนสีขาวเกิดขึ้น คาดว่าอาจจะเป็นตะกอนของ silica gel ซึ่งละลายลงมาพร้อมกับวัฏภาคเคลื่อนที่ เนื่องจาก methanol ละลาย silica gel ได้ จึงนำสารที่ได้มาผ่าน Column chromatography ใหม่อีกครั้ง โดยเปลี่ยนวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น Methanol ต่อ Dichloromethane อัตราส่วน 2:8 เพื่อป้องกันซิลิกาเจลละลายออกมาพร้อมกับสารสกัด จากนั้นเก็บ fraction ที่มี nicotine และนำมาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น ได้ปริมาณ nicotine 1.242 g.

3. การสังเคราะห์ nicotinic acid

ปฏิกิริยาที่ต้องการ



รูปที่ 3-4 แสดงปฏิกิริยาที่ต้องการในการสังเคราะห์ nicotinic acid

วิธีการทดลอง

นำ nicotine 1.242 g. ที่ได้จากการผ่าน Column chromatography มาละลายในน้ำ 50 ml. เติม Potassium permanganase (KMnO_4) 10.009 g. (โดยใช้อัตราส่วนโดยโมล nicotine: Potassium permanganase (KMnO_4) = 1:8 เหมือนวรรณกรรมซึ่งจากน้ำหนักข้างต้นได้อัตราส่วนโดยโมล=1:8.26, mole of nicotine=10.009/158=0.0633 และ mole of KMnO_4 =1.242/162=0.00767) ที่ละลายในน้ำ 50 ml ลงไปนำไป reflux 16 ชั่วโมง ตั้งปฏิกิริยาบน water bath อุณหภูมิ 80-90 °C (ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย TLC) เมื่อครบ 16 ชั่วโมง ได้ส่วนของตะกอนสีน้ำตาลและส่วนของสารละลายใส หลังจากนั้น นำมากรองด้วยกระดาษกรอง

นำส่วนของสารละลายใสมาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำเพื่อเอาน้ำออก ได้ตะกอนสีขาวปนเหลือง นำมาสกัดต่อด้วย acetone นำตะกอนมาสกัดด้วย methanol อีกครั้ง ได้ตะกอนสีขาว 3.178 g. และสารละลายในชั้น methanol นำสารละลายในชั้น methanol มาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ ได้สารที่มีลักษณะของแข็งสีขาวนำไปผ่าน column ขนาดเล็กเพื่อกรองเอาสิ่งเจือปนออก โดยใช้ Methanol ต่อ Dichloromethane อัตราส่วน 2:8 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ นำสารละลายที่ผ่าน column แล้วมาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำจนแห้ง ได้ตะกอนสีขาวหนัก 330 mg. นำสารที่ได้มาตรวจเอกลักษณ์ด้วยเทคนิค proton nuclear magnetic resonance, atomic absorption spectrophotometry, mass spectrometry และทดสอบความเป็นกรดต่าง