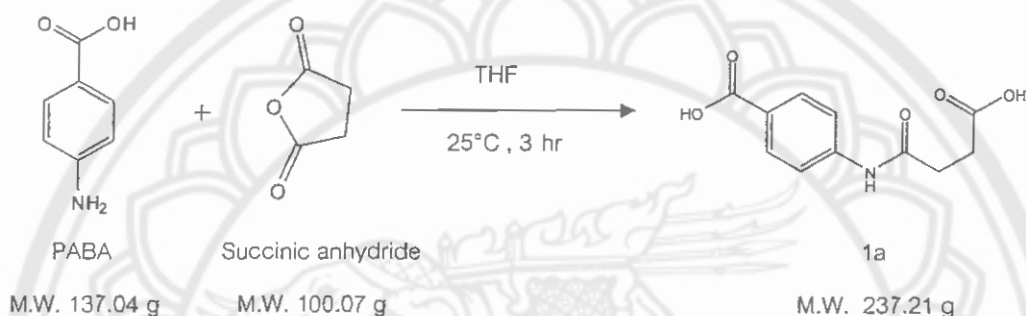


บทที่ 2

วิธีการที่ใช้ในการศึกษา

1. การสังเคราะห์สารกลุ่ม Imide derivatives

1.1) การสังเคราะห์สาร 1a



การคำนวณ

ใช้ PABA 200 mg คิดเป็น $\frac{200 \text{ mg}}{137.1 \text{ mg}} = 1.46 \text{ mmol}$ ทำปฏิกิริยากับ succinic anhydride

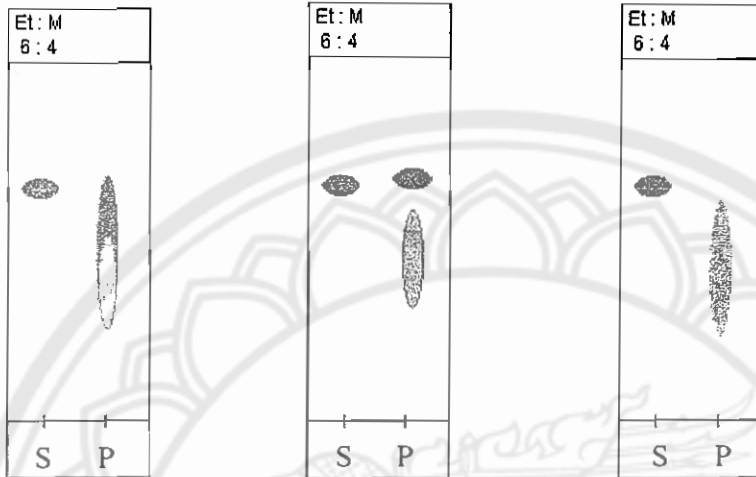
ในอัตราส่วน 1:1 เนื่องจาก succinic anhydride ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับน้ำจึง ทำปฏิกิริยาในอัตราส่วน 1 : 1.2 ดังนั้น succinic anhydride = $1.2 \times 1.46 = 1.752 \text{ mmol}$ คิดเป็น $1.752 \times 100.1 = 175.38 \text{ mg} = 0.1754$

วิธีการทดลอง

ชั่ง PABA 150 mg เติม solvent Tetrahydrofuran (THF) คนด้วย magnetic stirrer ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม succinic anhydride 0.1754 g คนต่อเป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบด้วย TLC เพื่อติดตามการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วนำสารที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง evaporator จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์โดย column chromatography โดย mobile phase ที่ใช้คือ ethyl acetate : methanol (6 : 4) แล้วนำสารที่ได้ไปทำการ recrystallization โดยใช้ methanol และ ethyl acetate เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองเพื่อเก็บผลึก หลังจากนั้นนำผลึกที่ได้ ไปทำการ dry เพื่อให้ผลึกแห้งสนิท แล้วจึงนำผลึกที่ได้ไปทดสอบด้วย TLC ดูว่าผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์หรือไม่ หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการ recrystallization ซ้ำ แล้วจึงนำผลึกที่บริสุทธิ์แล้วไปทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย $^1\text{H NMR}$

ผลการทดสอบด้วย TLC

การติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทำได้โดยการนำส่วน filtrate ที่อยู่ระหว่างการทำปฏิกิริยาไปจุดบน TLC plate และทำการ run TLC โดย mobile phase ที่ใช้คือ ethyl acetate : methanol (6:4) ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ใช้เวลา 4 ชั่วโมง



ที่เวลา 1 ชม. 30 นาที

ที่เวลา 2 ชม.

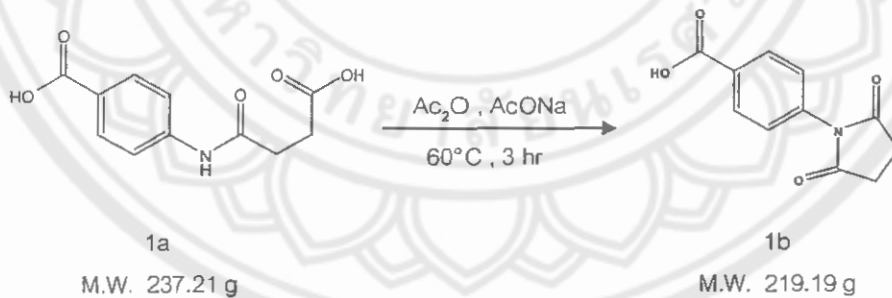
ที่เวลา 4 ชม.

หมายเหตุ : S คือ สารตั้งต้น (PABA)

P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (1a)

1.2) การสังเคราะห์สาร 1b

ปฏิกิริยา



การคำนวณ

ใช้ 1a จำนวน 143 mg = $\frac{143 \text{ mg}}{237 \text{ mg}}$ = 0.603 mmol ทำปฏิกิริยาโดยใช้ acetic anhydride

กับ sodium acetate ในจำนวนโมลที่เท่ากัน (equimolecular) จะได้ Acetic anhydride 0.603 mmol ×

102.1 g = 61.60 mg = 0.0569 ml (excess) และจะได้ Sodium acetate 0.603 mmol × 82.03 g = 49.46

mg

วิธีการทดลอง

ซึ่ง สาร 1a มา 143 mg เติม THF 10 ml และ เติม Ac_2O (acetic anhydride) excess หลังจาก นั้นเติม AcONa (sodium acetate) 61 mg ตั้งชุด reflux แล้วนำไป heat ที่ 60°C และ stir บน hotplate ตั้งทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง นำสารที่ทำปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วไประเหยเพื่อเอา solvent ออก นำไป run column chromatography เพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ โดยใช้ mobile phase ethyl acetate : methanol (6 : 4) เพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ แยก fraction ที่บริสุทธิ์ไว้แล้วทำการ evaporation เอา solvent ให้หมด แล้วนำสารที่ได้ไปทำการ recrystallization โดยละลายด้วย methanol ให้ใช้ methanol ในปริมาณน้อยที่สุดในการละลาย ซึ่งในตอนละลายอาจนำไปคนใน water bath เพื่อให้สารละลายได้ดียิ่งขึ้น หลังจากนั้น หยด ethyl acetate จนสังเกตว่าสารละลาย เกิดขุ่น หรือเริ่ม เห็นผลึก ให้หยุดเติม ethyl acetate แล้ว ปิดปาก round bottom flask ด้วย paraffin แล้วนำไปแช่ตู้เย็น รอให้สารตกผลึกออกมา ให้มากที่สุด นำไปกรองเพื่อเก็บผลึก หลังจากนั้นนำผลึกที่ได้ ไปทำการ dry เพื่อให้ผลึกแห้งสนิท แล้วจึงนำผลึกไปทดสอบด้วย TLC ดูว่าผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์หรือไม่ หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการ recrystallization ซ้ำ แล้วจึงนำผลึกที่บริสุทธิ์แล้วไปทำการ run NMR เพื่อวิเคราะห์โครงสร้าง

ผลการทดสอบด้วย TLC

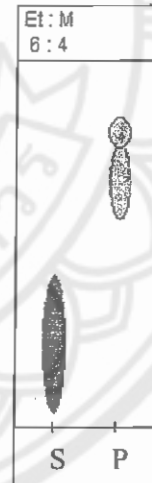
การติดตามปฏิกิริยาด้วย TLC ทำได้โดยการนำส่วน filtrate ที่อยู่ระหว่างการทำปฏิกิริยาไปจุดบน TLC plate และทำการ run TLC โดย mobile phase ที่ใช้คือ ethyl acetate : methanol (6:4) ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ใช้เวลา 3 ชั่วโมง



ที่เวลา 45 นาที



ที่เวลา 1 ชม. 30 นาที

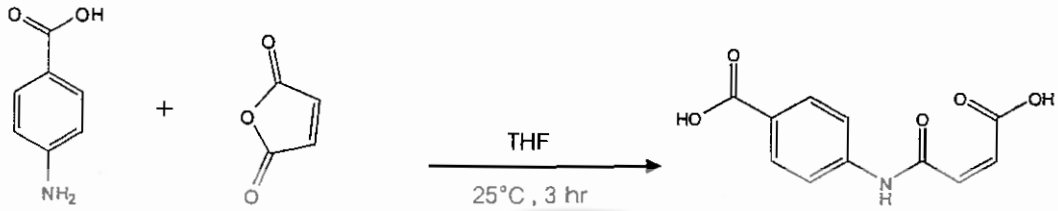


ที่เวลา 3 ชม.

หมายเหตุ : S คือ สารตั้งต้น (1a)

P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น(1b)

1.3) การสังเคราะห์สาร 2a



PABA	Maleic anhydride	2a
M.W. 137.04 g	M.W. 98.06 g	M.W. 235.19 g

การคำนวณ

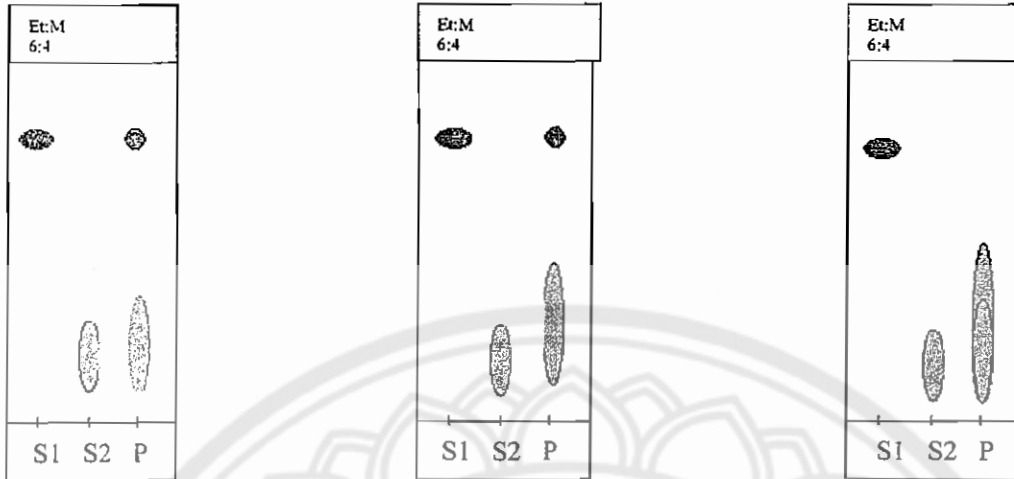
ใช้ PABA 200 mg คิดเป็น $\frac{200 \text{ mg}}{137.1 \text{ g}} = 1.46 \text{ mmol}$ ทำปฏิกิริยากับ maleic anhydride ในอัตราส่วน 1:1 เนื่องจาก succinic anhydride ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับน้ำจึง ทำปฏิกิริยาในอัตราส่วน 1 : 1.2 ดังนั้น maleic anhydride = $1.2 \times 1.46 = 1.752 \text{ mmol}$ คิดเป็น $1.752 \times 98.06 = 172.55 \text{ mg} = 0.172 \text{ g}$

วิธีการทดลอง

ซึ่ง PABA 200 mg เติม THF 10 ml คนด้วย magnetic stirrer แล้วเติม maleic anhydride 0.172 g ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบด้วย TLC เพื่อติดตามการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วนำสารที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง evaporator จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์โดย column chromatography โดย mobile phase ที่ใช้คือ ethyl acetate : methanol (6 : 4) แล้วนำสารที่ได้ไปทำการ recrystallization โดยใช้ methanol และ ethyl acetate เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองเพื่อเก็บผลึก หลังจากนั้นนำผลึกที่ได้ไปทำการ dry เพื่อให้ผลึกแห้งสนิท แล้วจึงนำผลึกที่ได้ไปทดสอบด้วย TLC ดูว่าผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์หรือไม่ หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการ recrystallization ซ้ำ แล้วจึงนำผลึกที่บริสุทธิ์แล้วไปทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ¹H NMR

ผลการทดสอบด้วย TLC

การติดตามการปฏิกิริยาทำได้โดยการนำส่วน filtrate ที่อยู่ระหว่างการทำปฏิกิริยาไปจุดบน TLC plate และทำการ run TLC โดยใช้ mobile phase ethyl acetate : methanol (6:4) ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ใช้เวลา 3 ชั่วโมง



ที่เวลา 15 นาที

ที่เวลา 45 นาที

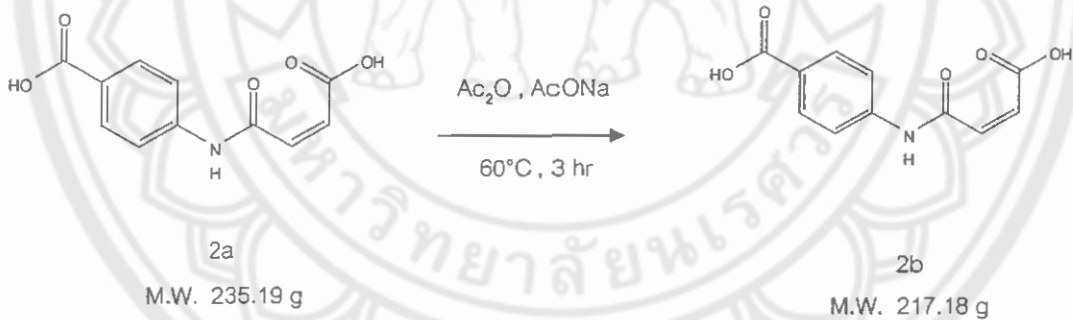
ที่เวลา 3 ชม.

หมายเหตุ : S1 คือ สารตั้งต้น (PABA)

S2 คือ สารตั้งต้น (Maleic anhydride)

P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (2a)

1.4) การสังเคราะห์สาร 2b



การคำนวณ

ซึ่ง 2a จำนวน 100 mg = $\frac{100 \text{ mg}}{235.05 \text{ g}} = 0.425 \text{ mmol}$ ทำปฏิกิริยาโดยใช้ Acetic anhydride กับ sodium acetate ในจำนวนโมลที่เท่ากัน (equimolecular) จะได้ Acetic anhydride 0.425 mmol $\times 102.1 \text{ g} = 43.44 \text{ mg}$ และจะได้ Sodium acetate 0.425 mmol $\times 82.03 \text{ g} = 34.86 \text{ mg}$

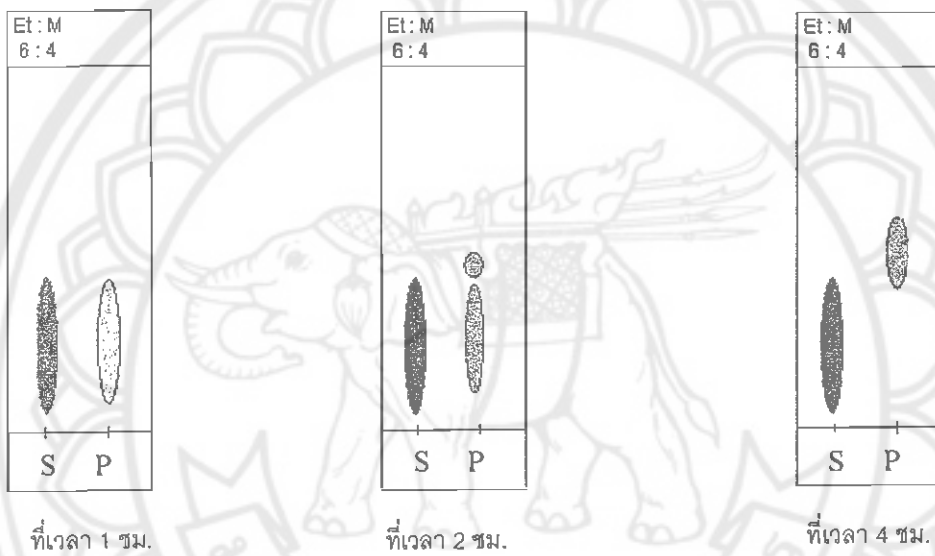
วิธีการทดลอง

ซึ่งสาร 2a มาจำนวน 100 mg เติม solvent THF 10 ml และ เติม Ac₂O(acetic anhydride) excess หลังจากนั้นเติม AcONa (sodium acetate) 34.86 mg ตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารที่ทำปฏิกิริยาลิ้นสุดแล้วไประเหยเพื่อเอาตัวทำละลายออก จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์โดย column chromatography โดย mobile phase ที่ใช้คือ ethyl acetate : methanol (6 : 4) แล้วนำสารที่ได้ไปทำการ

recrystallization โดยใช้ methanol และ ethyl acetate เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองเพื่อเก็บผลึก หลังจากนั้นนำผลึกที่ได้ ไปทำการ dry เพื่อให้ผลึกแห้งสนิท แล้วจึงนำผลึกที่ได้ไปทดสอบด้วย TLC ดูว่าผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์หรือไม่ หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการ recrystallization ซ้ำ แล้วจึงนำผลึกที่บริสุทธิ์แล้วไปทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย $^1\text{H NMR}$

ผลการทดสอบด้วย TLC

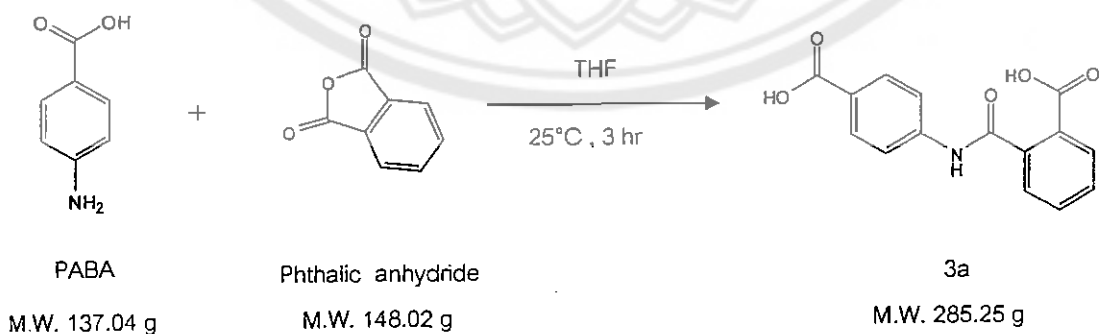
การติดตามการปฏิกิริยาทำได้โดยการนำส่วน filtrate ที่อยู่ระหว่างการทำปฏิกิริยาไปจุดบน TLC plate และทำการ run TLC โดยใช้ mobile phase ethyl acetate : methanol (6:4) ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ใช้เวลา 4 ชั่วโมง



หมายเหตุ : S คือ สารตั้งต้น (2a)

P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (2b)

1.5) การสังเคราะห์สาร 3a



การคำนวณ

ใช้ PABA 200 mg คิดเป็น $\frac{150 \text{ mg}}{137.1 \text{ g}} = 1.09 \text{ mmol}$ ทำปฏิกิริยากับ phthalic anhydride ในอัตราส่วน 1:1 เนื่องจาก phthalic anhydride ไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับน้ำจึงทำปฏิกิริยาในอัตราส่วน 1 : 1.2 ดังนั้น จะได้ phthalic anhydride = $1.2 \times 1.09 = 1.308 \text{ mmol}$ คิดเป็น $1.308 \times 148.02 = 193.61 \text{ mg} = 0.193 \text{ g}$

วิธีการทดลอง

ซึ่ง PABA 200 mg เติม THF 10 ml คนด้วย magnetic stirrer แล้วเติม phthalic anhydride 0.193 g ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นทดสอบด้วย TLC เพื่อติดตามการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วนำสารที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง evaporator จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์โดย column chromatography โดย mobile phase ที่ใช้คือ ethyl acetate : methanol (6 : 4) แล้วนำสารที่ได้ไปทำการ recrystallization โดยใช้ methanol และ ethyl acetate เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองเพื่อเก็บผลึก หลังจากนั้นนำผลึกที่ได้ไปทำการ dry เพื่อให้ผลึกแห้งสนิท แล้วจึงนำผลึกที่ได้ไปทดสอบด้วย TLC ดูว่าผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์หรือไม่ หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการ recrystallization ซ้ำ แล้วจึงนำผลึกที่บริสุทธิ์แล้วไปทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย $^1\text{H NMR}$

ผลการทดลอง

การติดตามการปฏิกิริยาทำได้โดยการนำส่วน filtrate ที่อยู่ระหว่างการทำปฏิกิริยาไปจุดบน TLC plate และทำการ run TLC โดยใช้ mobile phase ethyl acetate : methanol (6:4) ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ใช้เวลา 1 ชั่วโมง 35 นาที



ที่เวลา 20 นาที



ที่เวลา 40 นาที



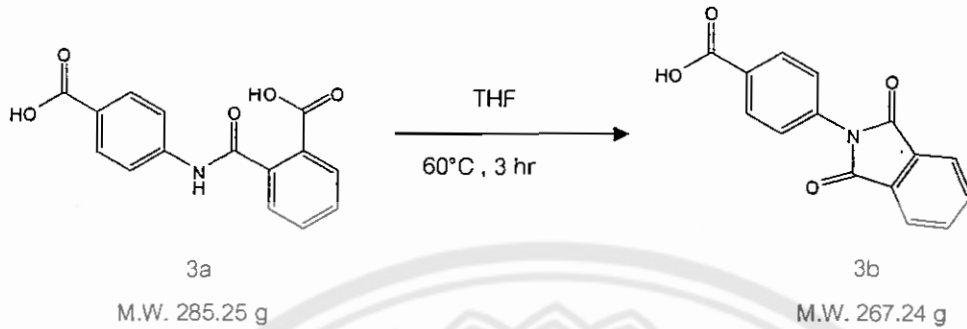
ที่เวลา 1 ชม. 35 นาที

หมายเหตุ : S1 คือ สารตั้งต้น (PABA)

S2 คือ สารตั้งต้น (Phthalate anhydride)

P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (3a)

1.6) การสังเคราะห์สาร 3b

การคำนวณ

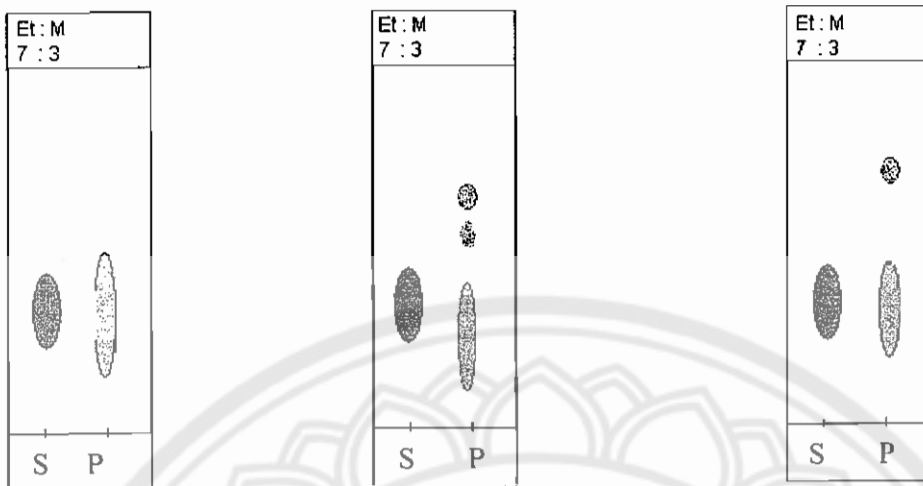
ซึ่ง 3a จำนวน 231 mg = $\frac{231 \text{ mg}}{285.25 \text{ g}} = 0.810 \text{ mmol}$ ทำปฏิกิริยาโดยใช้ acetic anhydride กับ sodium acetate ในจำนวนโมลที่เท่ากัน (equimolecular) จะได้ acetic anhydride $0.810 \text{ mmol} \times 102.1 \text{ g} = 82.701 \text{ mg}$ และจะได้ sodium acetate $0.810 \text{ mmol} \times 82.03 \text{ g} = 66.444 \text{ mg}$

วิธีการทดลอง

ซึ่งสาร 2a มา 100 mg เติม solvent THF 10 ml และ เติม AcO₂ (acetic anhydride) excess หลังจากนั้นเติม AcONa (sodium acetate) 34.86 mg ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลานาน 22 ชั่วโมง หลังจากนั้นทดสอบด้วย TLC เพื่อติดตามการเกิดปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วนำสารที่ได้ไประเหยตัว ทำละลายออกโดยใช้เครื่อง evaporator จากนั้นทำสารให้บริสุทธิ์โดย column chromatography โดยใช้ mobile phase ที่ใช้คือ ethyl acetate : methanol (6 : 4) แล้วนำสารที่ได้ไปทำการ recrystallization โดยใช้ methanol และ ethyl acetate เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองเพื่อเก็บผลึก หลังจากนั้นนำผลึกที่ได้ ไปทำการ dry เพื่อให้ผลึกแห้งสนิท แล้วจึงนำผลึกที่ได้ไปทดสอบด้วย TLC ดูว่าผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์หรือไม่ หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการ recrystallization ซ้ำ แล้วจึงนำผลึกที่บริสุทธิ์แล้วไปทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ¹H NMR

ผลการทดสอบ TLC

การติดตามการเกิดปฏิกิริยาทำได้โดยการนำส่วน filtrate ที่อยู่ระหว่างการทำปฏิกิริยาไปจุดบน TLC plate และทำการ run TLC โดยใช้ mobile phase ethyl acetate : methanol (7:3) ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ใช้เวลา 22 ชั่วโมง



ที่เวลา 50 นาที

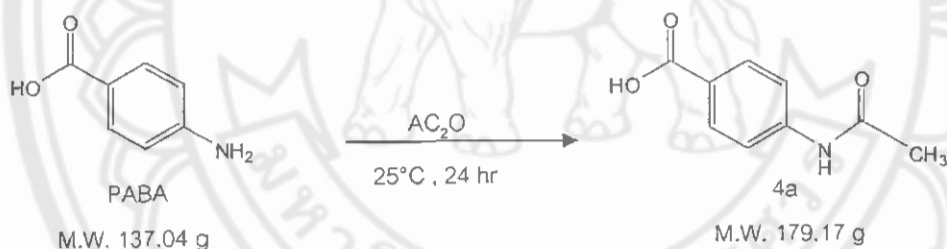
ที่เวลา 1 ชม. 20 นาที

ที่เวลา 22 ชม.

หมายเหตุ : S คือ สารตั้งต้น (3a)

P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (3b)

2. การสังเคราะห์สารกลุ่ม amide derivative (4a)

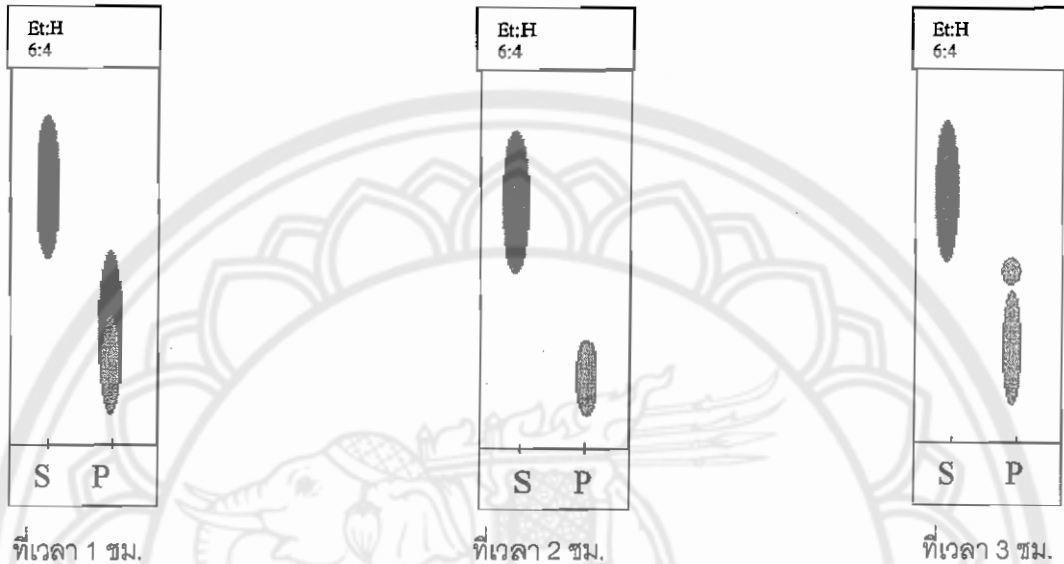


วิธีทดลอง

ซึ่ง PABA 300 mg เติม solvent THF 10 ml และเติม acetic anhydride แล้วทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง นำสารที่ทำปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วไประเหยเพื่อเอา solvent ออก นำไป run column chromatography เพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ โดยใช้ mobile phase ethyl acetate : hexane (2 : 8) เพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ แยก fraction ที่บริสุทธิ์ไว้แล้วทำการระเหยตัวทำละลายออก แล้วนำสารที่ได้ไปทำการ recrystallization โดยใช้ hexane และ diethyl ether เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปกรองเพื่อเก็บผลึก หลังจากนั้นนำผลึกที่ได้ ไปทำการ dry เพื่อให้ผลึกแห้งสนิท แล้วจึงนำผลึกที่ได้ไปทดสอบด้วย TLC ดูว่าผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์หรือไม่ หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการ recrystallization ซ้ำ แล้วจึงนำผลึกที่บริสุทธิ์แล้วไปทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย $^1\text{H NMR}$

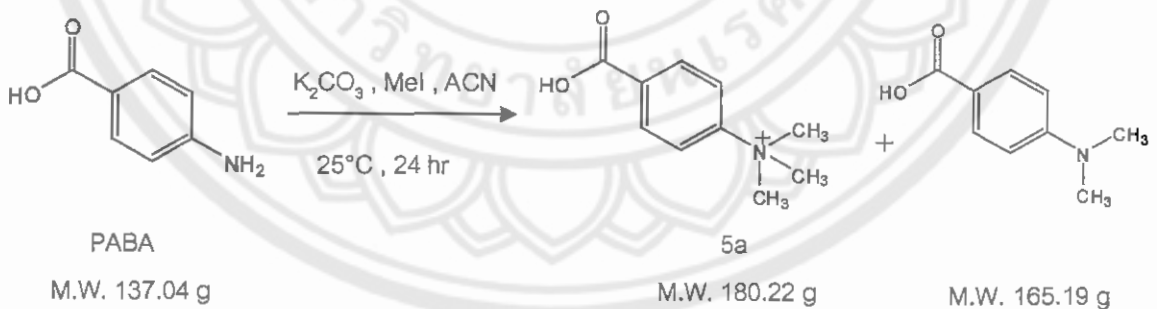
ผลการทดสอบ TLC

การติดตามการเกิดปฏิกิริยาทำได้โดยการนำส่วน filtrate ที่อยู่ระหว่างการทำปฏิกิริยาไปจุดบน TLC plate และทำการ run TLC โดยใช้ mobile phase ethyl acetate : hexane (6:4) ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ใช้เวลา 3 ชั่วโมง



หมายเหตุ : S คือ สารตั้งต้น (PABA)
P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (4a)

3. การสังเคราะห์สารกลุ่ม Amine derivative (5a)



วิธีทดลอง

ซึ่ง PABA 300 mg เติม solvent acetonitrile (ACN) 15 ml และเติม K_2CO_3 1 g แล้ว ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม methyl iodide (MeI) ทำปฏิกิริยาต่อเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยการตรวจสอบด้วย TLC เป็นระยะ ๆ เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด นำสารที่ได้ทั้งหมดไปกรองเอา K_2CO_3 ออก แล้วนำส่วน filtrate ไประเหยเอา solvent ออก ซึ่งในส่วนของ filtrate นี้จะยังคงมี K_2CO_3 ปนอยู่ ดังนั้นจะทำการ extraction โดยใช้ dichloromethane และ น้ำเป็นตัวแยกสกัดเอาสารผลิตภัณฑ์ ออกมาโดยสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในชั้นของ dichloromethane แล้วจึงนำไป run column chromatography เพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ โดยใช้ mobile phase ethyl acetate : hexane (2 : 8) เพื่อแยก

การคำนวณ

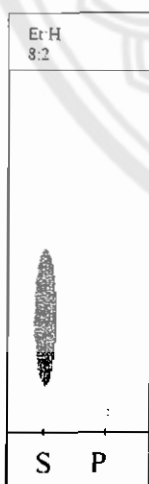
methylamine 35 g ในน้ำ 100 ml ดังนั้น ในน้ำ 1 ml จะมี methylamine 350 mg succinic anhydride 1:1 แต่ให้ excess เพื่อป้องกัน การทำปฏิกิริยากับน้ำโดยให้ 1.2 เท่าซึ่ง 350 mg methylamine มีค่าเท่ากับ 11.27 mmol ดังนั้นใช้ maleic anhydride เท่ากับ $11.27 \times 1.2 \times 98.06 \text{ g} = 1.326 \text{ g}$ (ซึ่งจริง 1.5 g)

วิธีทดลอง

ซึ่ง maleic anhydride มา 1.5 g ใส่ round bottom flask เติม solvent THF 10 ml เติม Methylamine 1 ml นำไปตั้งขูด reflux แล้ว heat ที่ 60°C Test TLC ที่ 30 นาทีและ 1, 2 และ 3 ชั่วโมง หรือ จนกว่า สารที่ได้ไม่มีสารตั้งต้นเหลืออยู่ (ประมาณ 24 ชั่วโมง) สารที่ทำปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วไประเหยเพื่อเอา solvent ออก โดยใช้เครื่อง evaporator นำ ส่วนที่ทำการ ระเหย sovent ออกแล้ว ไป run column chromatography เพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ ทำการ recrystallization โดยละลายด้วย methanol ให้ใช้ methanol ในปริมาณน้อยที่สุดในการละลาย ซึ่งในตอนละลายอาจนำไปคนใน water bath เพื่อให้สารละลาย ได้ดียิ่งขึ้น หลังจากนั้น หยด diethyl ether จนสังเกตว่า สารละลาย เกิดขุ่น หรือเริ่ม เห็นผลึก ให้หยุดเติม diethyl ether แล้ว ปิดปาก round bottom flask ด้วย paraffin แล้วนำไปแช่ตู้เย็น รอให้สารตกผลึกออกมา ให้มากที่สุด นำไปกรองเพื่อเก็บผลึก หลังจากนั้นนำผลึกที่ได้ ไปทำการ dry เพื่อให้ผลึกแห้งสนิท แล้วจึงนำผลึกไป ทดสอบด้วย TLC ดูว่าผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์หรือไม่ หากสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการ recrystallization ซ้ำ แล้วจึงนำผลึกที่บริสุทธิ์แล้วไปทำการ run NMR เพื่อวิเคราะห์โครงสร้าง

ผลการทดสอบ

การติดตามการเกิดปฏิกิริยาทำได้โดยการนำส่วน filtrate ที่อยู่ระหว่างการทำปฏิกิริยาไปจุดบน TLC plate และทำการ run TLC โดยใช้ mobile phase ethyl acetate : methanol (8:2) ซึ่งพบว่าปฏิกิริยาเกิด สมบูรณ์ใช้เวลา 24 ชั่วโมง



ที่เวลา 2 ชม.



ที่เวลา 3 ชม.



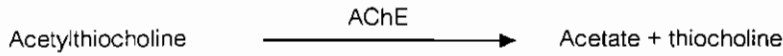
ที่เวลา 24 ชม.

หมายเหตุ: S คือ สารตั้งต้น (maleic anhydride)

P คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (6a)

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง AChE

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารที่สังเคราะห์ได้จะทำการทดสอบด้วยวิธี modified Ellman's method โดยมีหลักการ ดังนี้



เครื่องมือ

- Biorad microplate reader model 3550 UV

สารเคมี

- 5,5' Dithiobis-[2-nitrobenzoic acid] or Ellman's reagent (Sigma)
- Acetylthiocholine iodide (sigma)
- Acetylcholinesterase type VI-S from electric eel-lyophilized powder (Sigma)

ขั้นตอนการวิเคราะห์

เติมสารเคมีลงใน 96 well plates (แต่ละหลุมทำซ้ำ 3 ครั้ง) จนได้ปริมาตรสุดท้าย 250 μl ดังนี้

- Acetylthiocholine iodide	25	μl
- Ellman's reagent	125	μl
- Buffer	50	μl
- Sample	25	μl

วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่ความยาวคลื่นที่ 405 nm ทุก 5 วินาทีเป็นเวลา 2 นาที

การคำนวณร้อยละการยับยั้ง AChE

นำค่าความชันจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปกับเวลา มาคำนวณร้อยละของการยับยั้ง AChE ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Mean Slope blank} - \text{Mean slope sample}}{\text{Mean Slope blank}} \times 100$$