หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

นำรากของถอบแถบน้ำจากจังหวัดสมุทรสาครมาทำการทดลอง โดยเก็บรากสดในเดือนเมษายนสำหรับแยกเพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย ส่วนรากแห้งเก็บในเดือนธันวาคมซึ่งนำมาสกัดด้วยเมทานอลและวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของรากต่อไป

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

2.2.1 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น

2.2.2 Fisher Johns Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.3 Infrared Spectrophotometer model 781 ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตราของสาร โดยผสมกับโพทัสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นเม็ดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. หนาประมาณ 1 มม.

2.2.4 Mass Spectrometer model JMS-DX 300 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่นและ model JMS-AX 500 สำหรับบันทึกแมสสเปกตรา

2.2.5 Gas-Liquid Chromatography model GC-7AG ของประเทศญี่ปุ่น บริษัท Shimudzu สำหรับบันทึกแก๊สโครมาโทแกรม

2.2.6 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer model JNM-FX 90Q ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น สำหรับวัดโปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกรีโซแนนซ์สเปกตรา สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$) ใช้ tetramethylsilane (TMS) เป็น internal standard ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ใช้สำหรับวัดคาร์บอนสเปกตราประมาณ 0.12 -0.25 โมลาร์ และประมาณ 0.01-0.05โมลาร์ สำหรับการวัดโปรตอนสเปกตรา อุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจวัดประมาณ 25-30 องศาเซลเซียล

2.2.7 High Performance Liquid Chromatography model 803 C ของบริษัท Gilson ใช้ UV detector

2.3 สารเคมี

2.3.1 ตัวทำละลาย ใช้คอมเมอร์เชียลเกรดโดยนำมากลั่นก่อนใช้ทุกครั้ง ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เมทานอล เอทานอล แอซีโตน บิวทานอล เอทิลแอซีเตต และไดเอทิลอีเทอร์

2.3.2 รีเอเจนต์ ที่ใช้สำหรับทดสอบทางปฏิกิริยาเคมีดังนี้ 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$, Br_2 ใน CCl_4 , แอซีติกแอนไฮไดรด์ ตามดวย H_2SO_4 (conc.)

2.3.3 ตัวดูดซับ ใช้ ซิลิกาเจลชนิด 60 Art 7734 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟีและซิลิกาเจลชนิด 60G Art 7731 สำหรับทินแลร์โครมาโทกราฟี และควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.4 การทดสอบทางปฏิกิริยาเคมี

2.4.1 การทดสอบสเตอรอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์ (การทดสอบด้วยปฏิกิริยา Liebermann-Burchard) (40)

ละลายสารประมาณ 1 มก. ในคลอโรฟอร์มจำนวนเล็กน้อย หยดแอซีติกแอนไฮไดรด์ 2-3 หยด เขย่า หยด H_2SO_4 (conc.) 1 หยด สังเกตสีทันทีและภายใน 1 ชม. ถ้าสีเปลี่ยนจาก ชมพู ---> ม่วง ---> น้ำเงิน ---> เขียว แสดงว่าเป็นสเตอรอยด์ ถ้าเป็นไตรเทอร์พีนอยด์สีจะเปลี่ยนจาก ชมพู ---> ม่วง

2.4.2 การทดสอบหมู่คาร์บอนิล (41)

นำสารประมาณ 1 มก. มาละลายในเอทานอล 0.5 ซม^3 เติม 2,4-DNP 0.5 ซม^3 เขย่าแรงๆ ถ้าเป็นสารที่มีหมู่คาร์บอนิลจะได้ตะกอนสีเหลือง

2.4.3 การทดสอบความไม่อิ่มตัว (41)

นำสารประมาณ 1 มก. มาละลายใน CCl_4 0.5 ซม^3 เติมสารละลาย 3%Br_2 ใน CCl_4 ทีละหยดขย่าทุกครั้งถ้าสีของ Br_2 จางหายไปและไม่มีแก๊สไฮโดรเจนโบรไมด์เกิดขึ้น (ตรวจสอบโดยใช้กระดาษลิตมัสสีน้ำเงินชื้น) แสดงว่าสารมีความไม่อิ่มตัว

2.4.4 การทดสอบหมู่ฟีนอล (41)

นำสารประมาณ 1 มก. มาละลายในเอทานอล หรือน้ำ หรือคลอโรฟอร์ม หยดสารละลาย 5% $FeCl_3$ ทีละหยด เขย่า ถ้าเป็นสารประเภทฟีนอลจะได้สารละลายสีชมพูแดง ม่วง หรือ เขียว

2.5 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดสม่ำเสมอเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 ซม. ยาว 120 ซม. อัตราส่วนตัวดูดซับ (adsorbent) ต่อสารที่ต้องการแยกประมาณ 30:1 โดยน้ำหนัก

วิธีเตรียม นำคอลัมน์แก้วมาอุดปลายด้านล่างซึ่งมีลักษณะเรียวเล็กด้วยสำลีที่สะอาดใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ที่ปลายด้านล่าง บรรจุตัวทำละลายลงไปประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ เปิดที่เปิดปิดด้านล่างให้ตัวทำละลายไหลออกช้า ๆ เพื่อไล่ฟองอากาศ ผสมซิลิกาเจลชนิด 60 Art 7734 กับตัวทำละลายเขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงในคอลัมน์ เคาะคอลัมน์เบา ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลลงไปในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เปิดให้ตัวทำละลายไหลออกจากคอลัมน์ช้า ๆ ในขณะบรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์จนกระทั่งซิลิกาเจลหมด จากนั้นปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเหลือประมาณ 5 ซม. เหนือผิวหน้าซิลิกาเจลจึงปิดที่เปิดปิดด้านล่างคอลัมน์ นำสิ่งที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วนแล้วบรรจุลงในคอลัมน์ช้า ๆ โดยไม่ให้มีฟองอากาศและให้ผิวเรียบ ฉีดล้างด้านในคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมในปริมาณเล็กน้อย เมื่อระดับของสารละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจลแล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารต่อไป

ในกรณีที่ใช้ florisil เป็นตัวดูดซับจะต้องทำการเตรียมคอลัมน์และทำการแยกสารในห้องปรับอากาศ เพื่อป้องกันการแยกตัวของตัวดูดซับออกเป็นช่องในคอลัมน์ ซึ่งถ้าเกิดการแยกดังกล่าวจะทำให้ประสิทธิภาพในการแยกสารลดลง

2.5.2 ควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Quick Column Chromatography)

การแยกสารโดยวิธีนี้นิยมใช้แยกสารออกเป็นกลุ่มใหญ่ก่อนเพื่อความรวดเร็วในการแยกสารเป็นกลุ่มย่อยต่อไปด้วยวิธีที่เหมาะสม

การเตรียมใช้ sintered glass เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 ซม. เป็นคอลัมน์ นำ sintered glass วางลงบนขวดดูดซึ่งต่อกับปั๊มน้ำโดยมีขอบยางรองรับบรรจุซิลิกาเจลชนิด 60G Art 7731 เป็นตัวดูดซับลงใน sintered glass ให้สูงประมาณ 4 ซม. ระหว่างบรรจุซิลิกาเจลต้องกดให้แน่นและเกลี่ยผิวหน้าให้เรียบ จากนั้นเทตัวทำละลายลงบนผิวหน้าซิลิกาเจลเปิดปั๊มน้ำเพื่อให้ตัวทำละลายไหลผ่านลงขวดดูดซึ่งจะทำให้ซิลิกาเจลอัดตัวแน่นยิ่งขึ้น นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากัน บรรจุลงในคอลัมน์แล้วกดผิวหน้าให้เรียบชะคอลัมน์ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารครั้งละเท่า ๆ กัน

2.5.3 ทินแลร์โครมาโทกราฟี

การเตรียมโครมาโทเพลท (chromatoplate) ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 G Art 7731 กับน้ำผสมกันในอัตราส่วน 1:2 เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงใน Desaga spreader ที่ปรับความหนา 0.25 มม. เคลือบลงบนกระจกขนาด 5x20 ซม. หรือ 20x20 ซม. ซึ่งล้างสะอาดด้วยน้ำและเช็ดด้วยแอซีโตนจะได้โครมาโทเพลท ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียล เป็นเวลาประมาณ 1 ชม.

การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วสะอาดที่มีฝาปิดขนาดใหญ่พอใส่โครมาโทเพลทได้ ใส่กระดาษกรองให้ทาบผิวด้านในขวด เติมตัวทำละลายลงในขวดให้สูงประมาณ 1 ซม. ปิดฝาขวดเอียงขวดให้ตัวทำละลายเปียกกระดาษกรองให้ทั่วทั้งแผ่น เพื่อให้ในขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

การแต้มสาร ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 0.05 ซม. แต้มสารที่ต้องการตรวจสอบลงบนโครมาโทเพลท โดยให้จุดเริ่มต้นห่างกันไม่น้อยกว่า 1 ซม. ด้านบนชิด solvent front ไว้ เมื่อจุดที่แต้มสารแห้งสนิทแล้วจึงนำไป develop

การ develop จุ่มโครมาโทเพลทที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิดฝาทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึงชิด solvent front จึงเอาโครมาโทเพลทออกจากขวดแก้ว ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง นำไปตรวจหาตำแหน่งของสาร

การตรวจหาตำแหน่งของสาร ทำได้โดยการใช้ไอโอดีน กรดซัลฟูลิกเข้มข้น 25% หรือแสงอุลตราไวโอเลต การใช้ไอโอดีนเป็นตัวตรวจสอบทำได้โดยการนำโครมาโทเพลทที่ develop แล้วใส่ในขวดที่มีเกล็ดไอโอดีน ปิดปากขวดให้สนิท ปล่อยจนกระทั่งบริเวณที่มีสารเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้น สำหรับการใช้กรดซัลฟูลิกเข้มข้น 25% ทำได้โดยการพ่นลงบนโครมาโทเพลทที่ develop แล้ว ทิ้งจนแห้ง นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียล ประมาณ 10 นาที บริเวณที่มีสารจะเห็นเป็นจุดสีชัดเจน

2.5.4 การกลั่น

การกลั่นเป็นการแยกตัวทำละลายที่มากเกินพอออกจากสารละลาย การกลั่นมี 2 แบบ คือการกลั่นธรรมดา และการกลั่นลดความดัน การกลั่นธรรมดาใช้กับตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เช่น เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน ส่วนการกลั่นลดความดันใช้กับตัวทำละลายที่มีขั้วและจุดเดือดสูง เช่น เมทานอล เพื่อให้ตัวทำละลายเดือดก่อนถึงจุดเดือด หรือใช้ในการกลั่นตัวทำละลายออกจากสารละลายที่สลายตัวง่ายเมื่อถูกความร้อน เพราะการกลั่นลดความดันจะใช้ความร้อนต่ำกว่าการกลั่นแบบธรรมดาเมื่อตัวทำละลายเป็นชนิดเดียวกัน เครื่องมือที่ใช้ในการกลั่นแบบนี้เรียกว่า เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

2.5.5 การกลั่นไอน้ำ (Hydrosteam Distillation) (42)

การกลั่นไอน้ำเป็นวิธีหนึ่งในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ทำได้ง่าย และสารจะได้รับความร้อนไม่สูงมากนัก เป็นการป้องกันสารสลายตัวทางหนึ่ง

เครื่องกลั่นไอน้ำทำด้วยโลหะสเตนเลส มีความจุประมาณ 25 ลูกบาศ์กเดซิเมตร จุพืชสดได้ประมาณ 3 กก. ส่วนภายในมีตะแกรงเจาะเป็นรูใช้สำหรับรองพืชสด ส่วนที่เหลือใต้ตะแกรงใช้ใส่น้ำในการกลั่นไอน้ำ เมื่อบรรจุพืชเสร็จปิดฝา ฝาเครื่องกลั่นจะมีท่อต่อออกมาสำหรับเป็นทางให้ไอน้ำผ่านเครื่องควบแน่นกลายเป็นของเหลวซึ่งประกอบด้วยน้ำกับน้ำมันหอมระเหยลงสู่ภาชนะรองรับ

2.6 การสกัด

ทำการสกัดส่วนต่าง ๆ ของถอบแถบน้ำโดยแยกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

2.6.1 การสกัดรากสดและใบสดของถอบแถบน้ำ

ทำการสกัดรากสดและใบสดของถอบแถบน้ำดังนี้

นำรากสดถอบแถบน้ำที่หั่นละเอียดหนัก 350 กรัม มาใส่ในเครื่องปั่นครั้งละ 100 กรัม เติมคลอโรฟอร์ม 200 ซม.^{3} เปิดเครื่องปั่นนาน 5 นาที จากนั้นเติมเมทานอล 200 ซม.^{3} และน้ำกลั่น 100 ซม.^{3} แล้วเปิดเครื่องปั่นต่ออีก 1 นาที ของผสมที่ได้จากการปั่นนำมากรองแยกกากรากออก สารละลายที่ได้จะแยกตัวเป็น 2 ชั้นซึ่งสามารถนำมาแยกออกจากกันโดยใช้กรวยแยกได้สารละลายคลอโรฟอร์ม และสารละลายเมทานอล-น้ำ นำสารละลายที่ได้ไปกลั่นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนจะได้สิ่งสกัดจากรากสดด้วยคลอโรฟอร์ม และสิ่งสกัดจากรากสดด้วยเมทานอล-น้ำตามลำดับ ซึ่งจะนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

สำหรับใบสดของถอบแถบน้ำทำการสกัดเช่นเดียวกัน

2.6.2 การสกัดรากแห้ง ใบแห้งและลำต้นแห้งของถอบแถบน้ำ

ทำการสกัดรากแห้ง ใบแห้งและลำต้นแห้งของถอบแถบน้ำดังนี้

สกัดรากแห้งด้วยตัวทำละลายต่อไปนี้ตามลำดับ คือ เมทานอล และคลอโรฟอร์ม-น้ำ ขั้นตอนการสกัดแสดงดังแผนภาพที่ 1

2.6.2.1 การสกัดด้วยเมทานอล

นำรากถอบแถบน้ำที่ตากแห้งและบดละเอียดหนัก 13 กก. มาสกัดด้วยเมทานอลจำนวน 30 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยนำรากแห้งใส่ถุงผ้าผูกปากให้แน่นเพื่อกันเศษรากปนในสารละลาย นำถุงผ้าใส่ในโหลแก้วเทเมทานอลลงไปให้ท่วมถุงผ้า ปิดฝาโหลแก้วทิ้งไว้ประมาณ 2 วันจึงกรอง นำสารละลายที่กรองได้ซึ่งมีสีน้ำตาลมากลั่น

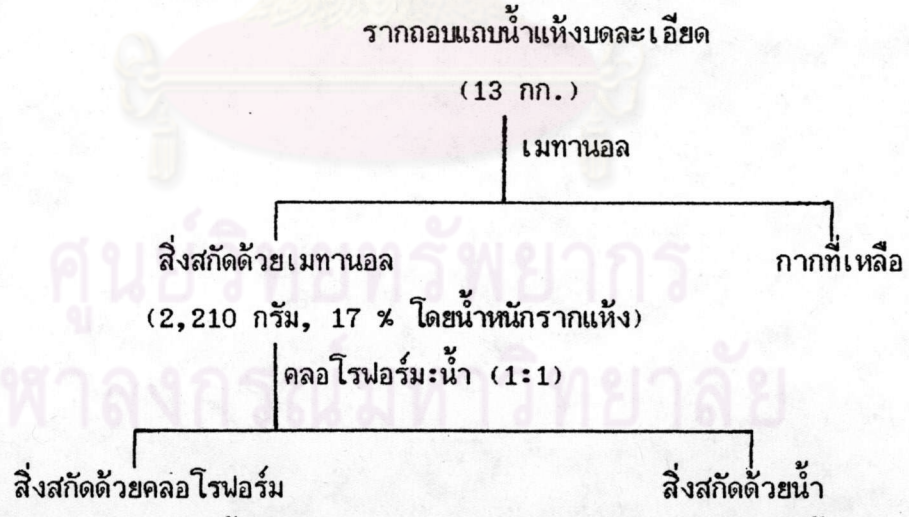
เอาเมทานอลออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน นำเมทานอลที่ได้ไปสกัดรากแห้งซ้ำอีก ทำเช่นนี้ทั้งหมด 6 ครั้ง สิ่งสกัดที่ได้มีลักษณะเหนียวข้นสีน้ำตาลหนัก 2,210 กรัม (17.0 % โดยน้ำหนักรากแห้ง) ซึ่งจะนำไปสกัดแยกส่วนต่อด้วยคลอโรฟอร์ม-น้ำ

2.6.2.2 <u>การสกัดแยกส่วนด้วยคลอโรฟอร์ม-น้ำ</u> (1:1 โดยปริมาตร)

นำสิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอลตามวิธีข้อ 2.6.2.1 มาละลายด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 500 ซม.^{3} ใส่ลงใน liquid-liquid extractor ซึ่งมีคลอโรฟอร์มบรรจุอยู่ 500 ซม.^{3} จากนั้นเติมน้ำลงใน liquid-liquid extractor ปริมาณ 1000 ซม.^{3} สกัดด้วยคลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้งครั้งละ 700 ซม.^{3} จนกระทั่งสารละลายในชั้นคลอโรฟอร์มไม่มีสี นำสารละลายที่สกัดได้ไปกรองผ่าน anhydrous Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำที่ปนมาออก จากนั้นกลั่นไล่คลอโรฟอร์มออกจากสารละลายโดยวิธีกลั่นธรรมดา ได้สิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเหนียวข้นสีน้ำตาล หนัก 186 กรัม (1.43 % โดยน้ำหนักรากแห้ง) ซึ่งจะนำไปทำการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

ส่วนสิ่งสกัดที่ได้ในชั้นน้ำมีลักษณะเหนียวข้นสีน้ำตาลหลังจากไล่น้ำออกหนัก 1619.2 กรัม (12.45 % โดยน้ำหนักรากแห้ง)

<u>แผนภาพที่</u> 1 ขั้นตอนการสกัดรากแห้งของถอบแถบน้ำ



สำหรับใบแห้งและลำต้นแห้งของถอบแถบน้ำทำการสกัดเช่นเดียวกัน สิ่งสกัดต่าง ๆ ที่ได้จะนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

2.7 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.7.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

การเตรียมเมล็ดข้าว นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข.25 มาแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้เมล็ดข้าวงอกส่วนรากออกมา สำหรับเมล็ดข้าวที่ใช้ทดลองต้องมีความยาวของราก 1-2 มม.

การเตรียมสารทดลอง นำสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น คลอโรฟอร์ม น้ำ และเมทานอล มาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเตรียมสารละลายตามความเข้มข้นที่ต้องการ 3 ความเข้มข้น นำสารละลายที่ได้แต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 ซม. ที่มีผงเซลลูโลสบรรจุอยู่จำนวน 1.5 กรัม โดยใส่ความเข้มข้นละ 3 หลอด ส่วนหลอดที่ใช้เป็นมาตรฐานจะบรรจุเฉพาะผงเซลลูโลสจำนวน 3 หลอด ปิดปากหลอดแก้วด้วยกระดาษอะลูมิเนียม แล้วนำหลอดทั้งหมดไปอบในตู้อบเป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปให้หมด จากนั้นนำมาคนให้สารกระจายอยู่ทั่วไปในผงเซลลูโลส เติมน้ำลงในหลอด ๆ ละ 4 ซม.^{3} นำเมล็ดข้าวที่งอกมาปลูกลงหลอดละ 6 เมล็ด ปิดปากหลอดด้วยพลาสติกใสนำไปใส่ในตู้เพาะชำที่มีแสงไฟเปิดตลอดเวลา อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 7 วัน จึงวัดผล

การวัดผล นำต้นข้าวออกจากหลอดแก้ว ล้างด้วยน้ำให้สะอาดนำมาวัดความยาวของรากและความยาวของกาบใบของเมล็ดข้าวซึ่งจะได้เป็นค่าเฉลี่ยของเมล็ดข้าว 18 เมล็ด ใน 1 ความเข้มข้น เปรียบเทียบกับความยาวเฉลี่ยของรากและใบของเมล็ดข้าวที่งอกในหลอดที่บรรจุเฉพาะผงเซลลูโลสซึ่งใช้เป็นความยาวมาตรฐานเท่ากับ 100 % ถ้าความยาวของรากและใบใกล้เคียงกับความยาวมาตรฐาน แสดงว่าสิ่งสกัดนั้นไม่มีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว แต่ถ้าความยาวแตกต่างกันแสดงว่าสิ่งสกัดนั้นมีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวของสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวของสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ส่วนของพืช	สิ่งสกัด	ปริมาณสาร (กรัม)	ความยาว (%)		การยับยั้งการเจริญของต้นข้าว	
			ราก	กาบใบ	ราก (%)	กาบใบ (%)
รากแห้ง	1. คลอโรฟอร์ม	0.01	8.59	49.09	91.41	50.91
	(TRC)	0.05	0.00	17.92	100.00	82.08
		0.1	0.00	0.00	100.00	100.00
	2. น้ำ (TRH)	0.01	74.31	88.58	25.69	11.42
		0.05	11.18	63.81	88.82	36.19
		0.1	5.80	56.39	94.20	43.61
	3. ไม่ละลายในคลอโรฟอร์มและน้ำ (TR)	0.01	58.65	49.89	41.35	50.11
		0.05	17.56	45.09	82.44	54.91
		0.1	8.12	69.06	91.88	30.94
ใบสด	1. เมทานอล	0.01	92.98	83.84	7.02	16.16
	(LDT-1)	0.05	58.98	62.09	41.02	37.91
		0.1	6.86	52.30	93.14	47.70
	2. คลอโรฟอร์ม	0.01	50.26	78.19	49.74	21.81
	(LDT-2)	0.05	0.00	37.21	100.00	62.79
		0.1	0.00	9.70	100.00	90.30

2.7.2 การศึกษาความเป็นพิษกับปลา

การเตรียมปลา นำปลาหางนกยูงขนาดความยาว 2 ซม. ใส่ในถ้วยที่มีน้ำ 200 ซม.^{3} ถ้วยละ 7 ตัว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชม. เพื่อให้ปลาปรับตัว

นำสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น เมทานอล คลอโรฟอร์มและน้ำมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมเตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นตามต้องการ 3 ความเข้มข้น ใส่สารละลายลงในจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 4x4 ซม. อยู่ 1 แผ่น ใส่ความเข้มข้นละ 3 จาน ส่วนที่ใช้เป็นมาตรฐานคือกระดาษกรองชนิดและขนาดเดียวกัน ปล่อยทิ้งไว้ 1 คืนเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกหมด จากนั้นตัดกระดาษกรองใน

แต่ละจานให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปใส่ลงในถ้วยเลี้ยงปลาที่เตรียมไว้ บันทึกจำนวนปลาที่ตาย เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม. ผลการทดสอบความเป็นพิษกับปลาของสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบความเป็นพิษกับปลาของสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

ส่วนของพืช	สิ่งสกัด	ปริมาณ (กรัมในน้ำ 200 ซม.^{3})	จำนวนปลาที่ตาย (%)
รากแห้ง	1. คลอโรฟอร์ม(TRC)	0.01	100
		0.1	100
		0.3	100
	2. น้ำ (TRH)	0.1	100
		0.5	100
		1.0	100
	3. ไม่ละลายในน้ำและ	0.1	100
	คลอโรฟอร์ม (TR)	0.5	100
		1.0	100
ใบแห้ง	1. คลอโรฟอร์ม(TLC)	0.01	0
		0.05	0
		0.1	0
	2. น้ำ (TLH)	0.1	5
		0.5	5
		1.0	5
ต้นแห้ง	1. คลอโรฟอร์ม(TSC)	0.1	5
		0.5	55
		1.0	77
	2. น้ำ (TSH)	0.01	0
		0.05	0
		0.1	4
	3. ไม่ละลายในน้ำและ	0.01	0
	คลอโรฟอร์ม (TS)	0.1	0
		1.0	100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย

วิธีที่ใช้ทดสอบคือ paper disc method ผู้ทำการทดสอบคือ Prof. Dr. D.H. Miles ที่ Mississippi State University การเตรียมอาหารที่ใช้เพาะเชื้อ (Commercial Culture Media; Potato-Dextrose Agar) ทำตามวิธีที่กำหนดอยู่บนภาชนะที่บรรจุ นำมานึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) เป็นเวลา 20 นาที รินอาหารเพาะเชื้อใส่จานเพาะเชื้อ ทำการเพาะเชื้อ เมื่อเชื้อเจริญเติบโตออกจากที่เพาะเชื้อจนเข้าใกล้ treatment disc สังเกตและบันทึกบริเวณที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อราที่ใช้สำหรับการทดสอบเบื้องต้นคือ Pythium ultimum, Rhizoctonia solani และ Pyrenophora Teres ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ Xanthramonas campestrous

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียเบื้องต้น

ส่วนของพืช	สิ่งสกัด	ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์			
		PU	RS	PT	XC
รากสด	1. เมทานอล(DRT-1)	-	-	-	-
	2. คลอโรฟอร์ม (DRT-2)	+	+	-	-
รากแห้ง	1. น้ำ (TRH)	+/-	-	-	-
ใบสด	1. เมทานอล(LDT-1)	-	-	-	-
	2. คลอโรฟอร์ม (LDT-2)	+	+	-	-

PU = Pythium ultimum RS = Rhizoctonia solani

PT = Pyrenophora Teres XC = Xanthramonas campestrous

เครื่องหมาย - คือ ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโต

เครื่องหมาย + คือ มีผลยับยั้งการเจริญเติบโต

2.7.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อแมลง

วิธีที่ใช้ทดสอบคือ leaf dipping method ทำการทดสอบกับหนอนใยผัก (Third Instar Diamondback Moth Larvae) โดยนับจำนวนการตายเมื่อเวลาผ่านไป 72 ชม. หนอน 40 ตัวต่อการทดลอง 1 ครั้ง ทำการทดลอง 3 ครั้งสำหรับสิ่งสกัด 1 ชนิด

วิธีเตรียมสารมาตรฐาน (control) ผสมเอทิลแอซีเตต 8 ซม.^{3} กับน้ำ 92 ซม.^{3} เติม triton X-100 จำนวน 0.04 ซม.^{3} และ sticker จำนวน 0.04 ซม.^{3}

วิธีเตรียมสารทดสอบ นำสิ่งสกัดที่ต้องการทดสอบมาละลายด้วยเอทิลแอซีเตต 8 ซม.^{3} จากนั้นเติมน้ำจนได้ปริมาตร 100 ซม.^{3} เติม triton X-100 จำนวน 0.04 ซม.^{3} และ sticker จำนวน 0.04 ซม.^{3}

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อแมลง แสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อหนอนใยผัก

ส่วนของพืช	สิ่งสกัด	ความเข้มข้นที่ใช้ (มก./ซม.^{3})	% การตายของหนอนใยผัก			
			ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย
รากแห้ง	1. คลอโรฟอร์ม (TRC)	31.6	100	100	100	100
	2. น้ำ (TRH)	43.6	0	2.5	0	0.8
ใบสด	1. เมทานอล (LDT-1)	46.4	0	0	2.5	0.8
	2. คลอโรฟอร์ม (LDT-2)	16.0	0	0	2.5	0.8

ทำการทดสอบที่ภาควิชากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.8 การแยกสารของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจากรากถอบแถบน้ำ

นำสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มหนัก 186 กรัม จากข้อ 2.6.2.2 มาแยกด้วยควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยแบ่งทำ 2 ครั้ง หนัก 124 กรัม และ 62 กรัม ตามลำดับซึ่งใช้ซิลิกาเจลหนัก 3720 กรัม และ 1860 กรัมตามลำดับเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามาก คือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายครั้งละ 800 ซม.^{3} และ 500 ซม.^{3} ตามลำดับ นำแต่ละส่วนที่ได้

ไปกลั่นธรรมดาเพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10 ซม.^{3} นำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้ทินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธีการข้อ 2.5.3 รวมส่วนที่ให้ผลเหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการตกผลึกและการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม แสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน	1-4	น้ำมันสีเหลืองส้มปนกับของแข็งสีเหลือง	4.06
	5-6	คราบน้ำมันสีเหลืองส้ม	0.08
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน(4:1)	7-8	น้ำมันสีเหลืองส้มปนของแข็งสีขาวปริมาณเล็กน้อย	2.43
	9-10	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน	3.15
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน(2:3)	11	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาว	5.39
	12-13	น้ำมันสีน้ำตาลเข้มปนผลึกรูปเข็ม	16.06
	14-15	น้ำมันสีน้ำตาลเข้มปนผลึกรูปเข็ม	10.82
	16-21	น้ำมันสีน้ำตาลเข้มปนผลึกรูปเข็ม	17.79
ไดคลอโรมีเทน	22	น้ำมันสีเขียวอมดำปนของแข็ง	6.80
	23-31	น้ำมันสีดำแข็ง	18.72
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล(19:1)	32-33	น้ำมันสีดำแข็ง	12.43
	34-36	น้ำมันสีดำแข็ง	19.73
เมทานอล	37-38	คราบของแข็งสีดำ	38.82
	39-41	คราบของแข็งสีน้ำตาล	20.60
	42-46	คราบของแข็งสีน้ำตาลอ่อน	7.84

2.8.1 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 7-8 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารลำดับส่วนที่ 7-8 จากข้อ 2.8 ลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองส้มมีของแข็งสีขาวปนอยู่เล็กน้อยหนัก 2.43 กรัม มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 72.5 กรัมเป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยรับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 50 ซม.^{3} และเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8

ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 7-8 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี แสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 7-8 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน	1-6	คราบน้ำมันสีเหลืองอ่อน	0.04
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน(9:1)	7-12	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาวปริมาณเล็กน้อย	0.12
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน(4:1)	13-14	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	0.47
	15-20	น้ำมันสีเหลือง	0.60
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน(3:2) และ (1:7)	21-38	น้ำมันสีเหลือง	0.38
ไดคลอโรมีเทน และ ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล(19:1)	39-53	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	0.50
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล(9:1)	54-60	น้ำมันสีเหลืองออกส้ม	0.18
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล(3:2)	61-66	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.05
เมทานอล	67-72	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.03

2.8.2 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 11 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารลำดับส่วนที่ 11 จากข้อ 2.8 ลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลมีของแข็งสีขาวปนอยู่เล็กน้อยหนัก 5.39 กรัม มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 161.7 กรัมเป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยรับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 100 ซม.^{3} และเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8

ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 11 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี แสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 11 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(9:1)	1-6	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.06
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(4:1)	7-14	น้ำมันสีเหลือง	0.55
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(7:3)	15-28	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาวปริมาณน้อย	0.41
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:1)	29-38	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	1.60
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:3)	39-46	น้ำมันเหลืองปนของแข็งเล็กน้อย	0.92
ไดคลอโรมีเทน	47-54	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.63
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(49:1)	55-60	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	0.57
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(19:1)	61-67	น้ำมันสีเหลืองส้ม	0.38
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(3:2)	68-83	คราบน้ำมันสีเหลืองเข้ม	0.09
เมทานอล	78-83	คราบน้ำมันสีเหลืองเข้ม	0.02

2.8.3 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 12-13 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารลำดับส่วนที่ 12-13 จากข้อ 2.8 ลักษณะเป็นคราบน้ำมันสีน้ำตาลเข้มมีผลึกรูปเข็มปน หนัก 16.06 กรัม มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 483 กรัมเป็นตัวดูดซับแล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยรับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 500 ซม.^{3} และเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8

ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 12-13 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแสดงในตารางที่ 18

i17801261

ตารางที่ 18 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 12-13 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(7:3)	1-2	คราบน้ำมันปนของแข็งเล็กน้อย	0.12
	3-6	น้ำมันสีน้ำตาลแดง	0.57
	7	น้ำมันเหลืองปนของแข็งเล็กน้อย	0.40
	8	น้ำมันเหลืองปนของแข็งเล็กน้อย	0.84
	9	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาวปริมาณมาก	1.23
	10-14	คราบน้ำมันสีแดงอ่อนๆปนของแข็งสีขาว	2.38
	15-19	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.38
	20-28	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งรูปเข็ม	1.02
	29-41	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีเหลืองปริมาณน้อย	0.61
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(3:2)	42-55	คราบของแข็งปนน้ำมันสีเหลือง	1.17
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:1)	56-75	คราบของแข็งปนน้ำมันสีเหลือง	1.85
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(2:3)	76-81	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.24
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:4)	82-99	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.50
ไดคลอโรมีเทน	100-118	น้ำมันสีเหลืองมีฝ้าติดก้นขวด	0.07
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(49:1)	119-120	คราบน้ำมันสีดำ	1.22
	121-137	คราบน้ำมันสีน้ำตาล	0.20
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(19:1)	138-143	คราบน้ำมันสีน้ำตาล	0.17
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(9:1)	144-161	คราบน้ำมันสีน้ำตาล	0.45
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(4:1)	162-177	คราบสีน้ำตาล	0.22
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(3:2)	178-190	คราบสีน้ำตาลดำ	0.25
เมทานอล	191-220	คราบสีน้ำตาลดำ	0.25

2.8.4 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 14-15 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารลำดับส่วนที่ 14-15 จากข้อ 2.8 ลักษณะเป็นคราบน้ำมันสีน้ำตาลเข้ม ปนกับผลึกรูปเข็มปริมาณมากหนัก 10.82 กรัม มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 324.6 กรัมเป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยรับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 300 ซม.^{3} และเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8

ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 14-15 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแสดงในตารางที่ 19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 14-15 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:1)	1-9	น้ำมันสีเหลือง	0.07
	10-11	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	0.08
	12-17	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	1.17
	18-19	น้ำมันสีเหลือง	0.07
	20-21	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาวปริมาณเล็กน้อย	0.23
	22-25	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันเหลือง	0.92
	26-30	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.32
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(2:3)	31-35	น้ำมันเหลืองปนของแข็งสีเหลือง	0.49
	36-43	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีเหลืองปริมาณน้อย	1.29
	44	คราบของแข็งปนน้ำมันสีเหลือง	0.14
	45-49	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำมันเหลือง	0.51
	50-68	คราบน้ำมันสีน้ำตาล	1.04
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:4)	69-107	น้ำมันสีน้ำตาล	0.53
ไดคลอโรมีเทน	108-109	คราบน้ำมันสีเหลืองดำ	0.05
ไดคลอโรมีเทน	110-120	คราบน้ำมันสีดำ	0.32
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(49:1)	121-122	น้ำมันสีดำ	1.52
	123-131	คราบสีน้ำตาล	0.28
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(19:1)	132-153	คราบสีน้ำตาล	0.51
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(9:1)	154-183	คราบสีน้ำตาลดำ	0.21
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(4:1)	184-188	คราบสีน้ำตาล	0.01
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(3:2)	189-198	คราบสีน้ำตาลดำ	0.06
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(4:1)	199-210	คราบสีน้ำตาลดำ	0.10
เมทานอล	211-240	คราบสีน้ำตาลดำ	0.26

2.8.5 <u>การแยกสารของลำดับส่วนที่ 16-21 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี</u>

นำสารลำดับส่วนที่ 16-21 จากข้อ 2.8 ลักษณะเป็นคราบน้ำมันสีน้ำตาลเข้ม ปนกับผลึกรูปเข็มปริมาณมากหนัก 17.79 กรัม มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 534.0 กรัมเป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยรับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 500 ซม.^{3} และเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8

ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 16-21 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแสดงในตารางที่ 20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 16-21 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:1)	1-8	น้ำมันสีเหลือง	0.05
	9-10	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	0.02
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(2:3)	11-13	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	0.02
	14-15	น้ำมันสีเหลือง	0.05
	16-21	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว รูปเข็ม	1.54
	22-24	น้ำมันเหลือง	0.92
	25-26	คราบน้ำมันสีเหลืองเขียว	0.20
	27-29	น้ำมันเหลืองปนของแข็งเล็กน้อย	0.27
	30-31	น้ำมันสีเหลือง	0.22
	32-46	น้ำมันสีเหลืองเขียวอมดำปนของแข็งปริมาณน้อย	3.77
	47-61	ของแข็งสีขาวปนน้ำมันเหลือง	1.27
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(3:7)	62-79	คราบน้ำมันสีเหลืองปนของแข็ง	0.31
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:4)	80-96	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.29
ไดคลอโรมีเทน	97-125	น้ำมันสีเหลืองเขียวปนของแข็ง	1.35
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(49:1)	126-127	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	4.02
	128-132	คราบน้ำมันสีน้ำตาลแดง	0.45
	133-139	คราบน้ำมันสีน้ำตาลแดง	0.10
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(19:1)	140-141	คราบน้ำมันสีน้ำตาลแดง	0.15
	142-154	คราบน้ำมันสีน้ำตาลแดง	0.30
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(9:1)	155-191	คราบน้ำมันสีน้ำตาลแดง	0.47
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(3:2)	192-211	คราบน้ำมันสีน้ำตาลแดง	0.23
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(3:7)	212-229	คราบน้ำมันสีน้ำตาลแดง	0.30
เมทานอล	230-244	คราบน้ำมันสีน้ำตาลแดง	0.11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8.5.1 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 126-127 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 16-21 จากดวิดคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารลำดับส่วนที่ 126-127 จากข้อ 2.8.5 ลักษณะเป็นน้ำมันสีดำปนกับของแข็งสีเหลือง หนัก 4.02 กรัม มาทำการแยกซ้ำโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 121.0 กรัมเป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายโดยรับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 200 ซม.^{3} และเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8

ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 126-127 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 16-21 จากดวิดคอลัมน์โครมาโทกราฟีแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 126-127 จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 16-21 จากดวิดคอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน(1:1)	1-13	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.04
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน(2:3)	14-18	คราบน้ำมันสีดำ	0.06
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน(3:7)	19-27	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.97
	28-36	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.30
	37-42	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.05
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน(1:4)	43-45	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.01
	46-56	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.08
เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน(1:9)	57-66	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.14
	67-72	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.15
	73-76	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.08
	77-88	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.28
ไดคลอโรมีเทน	89-114	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.62
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล(49:1)	115-116	น้ำมันสีดำหนืด	0.75
	117-131	น้ำมันสีน้ำตาลดำ	0.28
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล(19:1)	132-140	น้ำมันสีน้ำตาลดำ	0.05
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล(4:1)	141-154	น้ำมันสีน้ำตาลดำ	0.12
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล(3:2)	155-184	น้ำมันสีน้ำตาล	0.01

2.8.6 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 22 จากควิดคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารลำดับส่วนที่ 22 จากควิดคอลัมน์โครมาโทกราฟีข้อ 2.8 ลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวอมดำปนของแข็งหนัก 6.8 กรัม มาละลายด้วยเมทานอลจะได้สารละลายสีน้ำตาลกับของแข็งสีเหลืองปนกับก้อนสีน้ำตาลหนืด รินสารละลายสีน้ำตาลออกจากนั้นนำส่วนที่เหลือมาคนด้วยเฮกเซน จะได้สารละลายสีน้ำตาลผสมกับของแข็งสีเหลือง กรองแยกของแข็งสีเหลืองออกล้างด้วยเฮกเซน แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล

2.9 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารในสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มจากรากถอบแถบน้ำ

2.9.1 การทำสาร ก ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ก เป็นของแข็งอสัณฐานสีเหลือง จากลำดับส่วนที่ 1-4 ซึ่งชะด้วยเฮกเซนในการทำควิดคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 15) โดยของแข็งอสัณฐานสีเหลืองจะแยกตัวออกจากสารละลายเมื่อปริมาณของเฮกเซนถูกกลั่นออกจนเหลือปริมาตรประมาณ 20 ซม.^{3} กรองเอาสารละลายออก แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทนหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปรอมบิกสีเหลืองหนัก 2.6 กรัม (0.02 % ของน้ำหนักรากแห้ง) จุดหลอมเหลว 114-116 องศาเซลเซียล Rf 0.52 (เฮกเซน) ละลายได้บ้างใน คลอโรฟอร์ม และไดคลอโรมีเทน ไม่ละลายใน เมทานอล เอทานอล อีเทอร์และน้ำ

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 1380 (S-S) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 12

แมสสเปกตรัม พบพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ m/e 256 นอกจากนี้พบพีคที่ m/e 64, 96, 128, 160 และ 192 ดังแสดงในรูปที่ 13

ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, Br_2 ใน CCl_4, 5%$FeCl_3$ และ 2,4-DNP

2.9.2 การทำสาร ข ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ข เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองจากลำดับส่วนที่ 13-14 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน (4:1) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 7-8 (ตารางที่ 16) นำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอลหลาย ๆ ครั้ง จะได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาวหนัก 0.02 กรัม (1.54×10^{-4} % ของน้ำหนักรากแห้ง) จุดหลอมเหลว 70-72 องศาเซลเซียล Rf 0.9 (ไดคลอโรมีเทน) ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยใน เอทานอล เมทานอล และเฮกเซน ให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 2920,2850 (C-H), 1740 (C=O), 1180 (C-O), และ 730,720 ($(-CH_2-)_n$, $n \geq 4$) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 14

จากการทดสอบ Liebermann-Burchard และข้อมูลทางอินฟราเรดแสดงถึง สาร ข น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์เอสเทอร์ จึงนำ สาร ข มาไฮโดรไลส์

การไฮโดรไลส์ สาร ข ด้วยด่าง (43)

ละลาย สาร ข 20 มิลลิกรัมในไดคลอโรมีเทน 2 ซม.^{3} เติมสารละลาย 10 % KOH ในเมทิลแอลกอฮอล์ 5 ซม.^{3} เขย่าให้เข้ากัน รีฟลักซ์บนอ่างน้ำเดือดประมาณ 2 ชม. ตรวจสอบว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์หรือไม่โดยทำทินเลร์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และไดคลอโรมีเทนเป็น developing solvent ทำให้เย็นเทลงในน้ำกลั่น 8 ซม.^{3} คนให้ทั่วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดด่าง ตะกอนที่ได้เป็นตะกอนของแอลกอฮอล์ (สาร 1ข) ส่วนที่ละลายในน้ำเป็นเกลือโพทัสเซียมของกรด เมื่อนำไปทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟุริกเจือจางแล้วนำไปสกัดด้วยอีเทอร์ ระเหยอีเทอร์ออกให้แห้งจะได้ตะกอนของกรด

สาร 1ข เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 73-74 องศาเซลเซียล ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard แสดงว่า สาร 1ข ไม่ใช่สารประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ เมื่อทำทินเลร์โครมาโทกราฟีพบว่า สาร 1ข มีค่า Rf เท่ากับแอลกอฮอล์โซ่ตรง

จึงทำการยืนยันโครงสร้างของ สาร 1ข ด้วยการทำแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 300 องศาเซลเซียล และการไหลของ N_2 50 ซม.^{3}/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรงที่มีจำนวนคาร์บอน 14, 16, 18, 20 และ 22 ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 15 สร้างกราฟการเทียบมาตรฐานของ log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรงจะได้กราฟเป็นเส้นตรง ดังในรูปที่ 16 เมื่อนำค่า log retention time ของ สาร 1ข มาอ่านเทียบจากกราฟจะทำให้ทราบจำนวนคาร์บอนของ สาร 1ข ได้ ดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง และของ สาร 1ข กับจำนวนคาร์บอน

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน	ปริมาณสาร (%)
tetradecanol	0.94	-0.027	14	
hexadecanol	1.28	0.107	16	
octadecanol	1.87	0.272	18	
eicosanol	2.92	0.465	20	
docosanol	4.72	0.674	22	
สาร 1ข	1.41	0.149	16	0.75
	2.08	0.318	18	3.89
	3.25	0.512	-	2.41
	4.15	0.618	22	0.90
	5.19	0.715	23	20.84
	6.79	0.832	-	2.68
	8.21	0.914	-	9.18
	8.54	0.932	-	12.10
	11.26	1.052	27	4.19
	13.56	1.132	28	43.06

จากการไฮโดรไลส์ สาร ข เมื่อนำส่วนที่ละลายน้ำซึ่งเป็นเกลือโพทัสเซียมของกรดมาทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟุริกเจือจาง แล้วนำไปสกัดด้วยอีเทอร์ เมื่อระเหยอีเทอร์ออกจนแห้งปรากฏว่าเหลือสารอยู่ปริมาณน้อยมากจึงไม่สามารถนำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของส่วนกรดได้ และทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้าง สาร ข ได้ทั้งหมด จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมาแสดงว่า สาร ข เป็นสารประกอบเอสเทอร์โดยมีส่วนที่มาจากแอลกอฮอล์เป็นแอลกอฮอล์โซ่ตรง และส่วนที่มาจากกรดเป็นสารประเภทสเตอรอยด์

2.9.3 การทำสาร ค ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ค เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองจากลำดับส่วนที่ 47-60 ซึ่งชะด้วยไดคลอโรมีเทนและไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(49:1) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 11 (ตารางที่ 17) นำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอลหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาวหนัก 0.2 กรัม (1.54×10^{-3} % ของน้ำหนักรากแห้ง) จุดหลอมเหลว 65-66 องศาเซลเซียล Rf 0.20(ไดคลอโรมีเทน) ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทนและอีเทอร์ ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน เอทานอล เมทานอลและแอซีโตน ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, 5% $FeCl_3$, 2,4-DNP และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3300-2500 (O-H), 2920,2850 (C-H), 1700 (C=O), 1410 (C-O), 1300 (O-H) และ 730,720 ($(-CH_2-)_n, n \geq 4$) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 17

ข้อมูลทางอินฟราเรดสเปกตรัมและผลการทดสอบทางเคมีแสดงว่า สาร ค น่าจะเป็นกรดไขมันตรง และเพื่อศึกษาองค์ประกอบใน สาร ค จึงเตรียมอนุพันธ์ methyl ester ด้วย diazomethane

Methylation สาร ค ด้วย diazomethane (44)

ละลาย N-nitrosomethylurea หนัก 1 กรัม ในสารละลาย 40% KOH 10 ซม.^{3} ในไดเอทิลอีเทอร์ 15 ซม.^{3} ที่เย็นจนละลายหมดนำไปกลั่นบนเครื่องอังน้ำให้ diazomethane ผ่านลงไปใน สาร ค หนัก 0.01 กรัมที่ละลายในคลอโรฟอร์ม 1 ซม.^{3} จนสารละลายมีสีเหลืองอย่างถาวร ปิดฝาเขย่าให้เข้ากันสารละลายที่ได้นี้คืออนุพันธ์ methyl ester ของกรดให้เป็น สาร 1ค สำหรับกรดมาตรฐานนำมาเตรียมอนุพันธ์ด้วยวิธีเดียวกับ สาร ค

วิเคราะห์ สาร 1ค โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียล และการไหลของ N_2 50 ซม.^{3}/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน methyl ester ของกรดไขมันตรงที่มีจำนวนคาร์บอน 26,27,28,30,32 และ 34 ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 18 สร้างกราฟการเทียบมาตรฐานของ log retention time กับจำนวนคาร์บอนของ methyl ester ของกรดไขมันตรงมาตรฐานดังในรูปที่ 19 จากกราฟการเทียบมาตรฐานและค่า log retention time ของ methyl ester ของ สาร 1ค ทำให้สามารถนำไปหาจำนวนคาร์บอนของ สาร ค ได้ ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐาน methyl ester ของกรดไขตรง และของ สาร 1ค กับจำนวนคาร์บอนของ สาร ค

สาร	retention time(นาที)	log retention time	จำนวน C ของส่วนกรด	ปริมาณสาร (%)
methyl hexacosanoate	7.68	0.885	26	
methyl heptacosanoate	12.78	1.107	27	
methyl octacosanoate	13.54	1.132	28	
methyl triacontanoate	21.94	1.341	30	
methyl dotriacontanoate	37.34	1.572	32	
methyl tetratriacontanoate	63.88	1.805	34	
สาร 1ค	1.92	0.283	20	1.15
	2.43	0.386	21	0.21
	2.96	0.471	22	3.39
	3.75	0.574	23	2.65
	4.69	0.671	24	46.77
	6.08	0.784	25	10.09
	7.78	0.891	26	24.35
	10.23	1.010	27	5.55
	13.26	1.123	28	5.83

2.9.4 การทำสาร ง ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ง เป็นของแข็งรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลืองจากลำดับส่วนที่ 9-14 และ 12-17 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (7:3) และ (1:1) ตามลำดับในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีลำดับส่วนที่ 12-13 (ตารางที่ 18) และลำดับส่วนที่ 14-15 (ตารางที่ 19) ตามลำดับ แยกน้ำมันออกโดยคนด้วยเฮกเซน กรองเอาน้ำมันที่ละลายออกแล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอลหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 1.16 กรัม (8.92×10^{-3} % ของน้ำหนักรากแห้ง) แต่จุดหลอมเหลวของ สาร ง นี้ช่วงกว้างจาก 207-212 องศาเซลเซียล ถึงแม้จะแสดงตำแหน่งสารจุดเดียวเมื่อทำทินแลร์โครมาโทกราฟีมีค่า Rf 0.4 (ไดคลอโรมีเทน) ก็ตาม สาร ง ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม และไดเอทิลอีเทอร์

แต่ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน เมทานอล และเอทานอล ให้สารละลายสีม่วงเมื่อทดสอบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และฟอกจางสีของ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) ของ สาร ง นี้มีการดูดกลืนความถี่ที่เด่นชัดในตำแหน่ง 3350 (O-H) และ 1640 (C=C) ซม.$^{-1}$

จากอินฟราเรดสเปกตรัมปรากฏสัญญาณของหมู่ O-H ดังนั้นจึงทำสารนี้ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตซึ่งตกผลึกได้ง่าย แล้วไฮโดรไลส์กลับเป็น สาร ง ดังต่อไปนี้

Acetylation สาร ง (45)

นำ สาร ง 310 มก. มาละลายในพิริดีน 5 ซม.^{3} เติมแอซีติกแอนไฮไดรด์ 10 ซม.^{3} แล้วนำไปรีฟลักซ์บนอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 ชม. เทของผสมที่ได้ลงในน้ำผสมน้ำแข็ง 25 ซม.^{3} คนให้เข้ากันจะได้ตะกอนสีขาวตกออกมา นำไปกรองและล้างตะกอนด้วยน้ำเย็นหลาย ๆ ครั้งจนหมดกลิ่นพิริดีน นำตะกอนที่ได้ไปทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยมีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและชะคอลัมน์ด้วยไดคลอโรมีเทน จะได้สารซึ่งเป็นของแข็งสีขาวออกมาในลำดับส่วน 2-4 ตกผลึกสารที่ได้ด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล 2 ครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มสีขาวจุดหลอมเหลว 216-7 องศาเซลเซียล จำนวน 320 มก. Rf 0.74 (ไดคลอโรมีเทน) ให้เป็น สาร 1ง

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) ของ สาร 1ง แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3060 (=C-H), 1735 (C=O), 1640 (C=C), 1240 (C-O ของแอซีเตต) และ 880 (C-H สั่นแบบงอนอกระนาบของ $=CH_2$) ดังรูปที่ 20

จากข้อมูลทางอินฟราเรดสเปกตรัมและผลการทดสอบปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และการทดสอบกับ Br_2 ใน CCl_4 แสดงถึง สาร ง น่าจะเป็นสารประเภทไตรเทอร์พีนอยด์ที่ไม่อิ่มตัว และจากการเตรียมเป็นอนุพันธ์แอซีเตตได้ สาร 1ง ซึ่งมีสมบัติใกล้เคียงกับ lupeyl acetate จึงนำ สาร 1ง มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2 %, อุณหภูมิคอลัมน์ 260 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียล, และการไหลของ N_2 45 ซม.^{3}/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานคือ lupeyl acetate ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังในรูปที่ 21 และแสดง retention time เปรียบเทียบกับ lupeyl acetate ดังตารางที่ 24

การไฮโดรไลส์ สาร 1ง ด้วยด่าง

นำ สาร 1ง 230 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 57.5 ซม.^{3} เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.15 กรัม เขย่าให้เข้ากัน รีฟลักซ์บนอ่างน้ำเดือดประมาณ 30 นาที นำไประเหยเอาเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนสุญญากาศจนแห้ง จะมีคราบสีขาวติดอยู่ ละลายสารสีขาวด้วยอีเทอร์และล้างด้วยน้ำจนหมดด่าง กำจัดน้ำออกโดยเขย่าชั้นอีเทอร์กับ anhydrous Na_2SO_4 กรองแล้วนำไประเหยเอาอีเทอร์ออกจนเหลือคราบสีขาว นำมา

ละลายด้วยเฮกเซนแล้วกรองผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี มีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ล้างคอลัมน์ด้วยไดคลอโรมีเทน ตกผลึกสารที่ได้ด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล 2 ครั้ง จะได้ของแข็งรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 212-214 องศาเซลเซียล Rf 0.4 (ไดคลอโรมีเทน) กำหนดเป็นสาร 2ง

อินฟราเรดสเปกตรัมของ สาร 2ง (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600 -3100 (O-H), 3080 (C=C-H), 2940-2860 (C-H), 1640 (C=C), 1380 (C-H ของ gem-dimethyl), 1040,1010 (C-O ของวง) และ 880 (C=C-H) ดังรูปที่ 22

นำ สาร 2ง ซึ่งได้จากไฮโดรไลส์มาทำการวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (สภาวะที่ใช้เช่นเดียวกับ สาร 1ง) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน คือ lupeol ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 23 และแสดง retention time ของสารละลายมาตรฐาน lupeol เปรียบเทียบกับ สาร 2ง ดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ค่า retention time ของสารละลายมาตรฐาน lupeyl acetate และ lupeol กับ สาร 1ง และ สาร 2ง จากแก๊สโครมาโทแกรม

สาร	retention time (นาที)	log retention time
lupeyl acetate	32.9	1.517
สาร 1ง	33.27	1.522
lupeol	26.22	1.419
สาร 2ง	26.32	1.420

จากโครมาโทแกรมที่แสดงในตารางที่ 24 แสดงถึง สาร 2ง คือ lupeol

2.9.5 การทำ สาร จ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร จ เป็นของแข็งรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลืองจากลำดับส่วนที่ 22-28, 22-29 และ 16-21 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (7:3), (1:1) และ (2:3) ตามลำดับ ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีลำดับส่วนที่ 12-13 (ตารางที่ 18), 14-15 (ตารางที่ 19) และ 16-21 (ตารางที่ 20) ตามลำดับ นำมาตกผลึกด้วยเฮกเซนหลาย ๆ ครั้งได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 2.8 กรัม (0.022 % ของน้ำหนักรากแห้ง) จุดหลอมเหลว 147-149 องศาเซลเซียล Rf 0.25 (ไดคลอโรมีเทน) ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน อีเทอร์ เอทานอล เมทานอล แอซีโตน และเอทิลแอซีเตต ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-3200 (O-H), 2940,2860 (C-H), 1640 (C=C), 1460,1380 (C-H), 1060-1040 (C-O), 970,960 (disubstituted vinyl) และ 840,800 (trisubstitutedvinyl) ซม.$^{-1}$ ดังแสดงในรูปที่ 24

จากการทดสอบปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม แสดงถึง สาร จ น่าจะเป็นสารประเภทสเตอรอยด์ จึงนำ สาร จ มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2 %, อุณหภูมิคอลัมน์ 260 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 300 องศาเซลเซียล และการไหลของ N_2 45 ซม.^{3}/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ ได้แก่ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังในรูปที่ 25 และแสดง retention time ของ สาร จ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์และ สาร จ จากแก๊สโครมาโทแกรม

สาร	retention time (นาที)	log retention time	พื้นที่ใต้พีค	ปริมาณสาร (%)
cholesterol	15.62	1.19		
campesterol	19.68	1.29		
stigmasterol	21.08	1.32		
β-sitosterol	23.95	1.38		
สาร จ	20.09	1.30	31321	2.13
	21.09	1.32	1042377	70.94
	24.06	1.38	395741	26.93

จากโครมาโทแกรม สาร จ ประกอบด้วย 2.13 % campesterol, 70.94 % stigmasterol และ 26.93 % β-sitosterol

2.9.6 การทำ สาร ฉ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ฉ เป็นของแข็งสีขาวอสัณฐานในน้ำมันสีเหลืองจากลำดับส่วนที่ 10-11 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 14-15 (ตารางที่ 19) นำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล 2 ครั้งได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 0.03 กรัม (2.3×10^{-4} % ของน้ำหนักรากแห้ง) จุดหลอมเหลว 73-4 องศา

เซลเซียล Rf 0.28 (ไดคลอโรมีเทน) ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน เมทานอล และเอทานอล ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard 2,4-DNP, Br_2 ใน CCl_4 และ 5% $FeCl_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-3100 (O-H), 2920,2850 (C-H), 1470 (C-H), 1060 (C-O) และ 720,730 ($(-CH_2-)_n, n\geq 4$) ซม.$^{-1}$ ดังแสดงในรูปที่ 26

จากอินฟราเรดสเปกตรัมและผลการทดสอบกับรีเอเจนต์ต่าง ๆ แสดงว่า สาร ฉ น่าจะเป็นสารประเภทแอลกอฮอล์โซ่ตรง จึงนำ สาร ฉ มาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2 %, อุณหภูมิคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 300 องศาเซลเซียล และการไหลของ N_2 50 ซม.^{3}/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรงที่มีจำนวนคาร์บอน 16, 18, 20 และ 22 ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 27 สร้างกราฟการเทียบมาตรฐานของ log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง ดังในรูปที่ 28 จากกราฟการเทียบมาตรฐาน และค่า log retention time ของ สาร ฉ ทำให้สามารถหาจำนวนคาร์บอนของ สาร ฉ ได้ ดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง และของ สาร ฉ กับจำนวนคาร์บอน

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน	ปริมาณสาร (%)
hexadecanol	1.30	0.114	16	
octadecanol	1.90	0.279	18	
eicosanol	2.91	0.464	20	
docosanol	4.68	0.670	22	
สาร ฉ	3.81	0.581	21	2.09
	4.85	0.686	22	1.91
	6.16	0.790	23	43.71
	7.95	0.900	24	9.05
	10.20	1.009	25	14.08
	12.91	1.111	26	29.15

2.9.7 การทำ สาร ช ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ช เป็นของแข็งในน้ำมันสีเหลืองจากลำดับส่วนที่ 32-61 และ 97-125 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3) และ (3:7) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 16-21 (ตารางที่ 20) แยกน้ำมันออกโดยคนด้วยเฮกเซนกรองแยกของแข็งแล้วนำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอลหลายครั้ง ได้ผลึกเป็นแท่งสีครีม หนัก 0.26 กรัม จุดหลอมเหลว 158-166 องศาเซลเซียล จากจุดหลอมเหลวที่ได้มีลักษณะกว้างแสดงว่าสารไม่บริสุทธิ์ จึงทำทินแลร์โครมาโทกราฟีตรวจสอบพบว่าปรากฏจุดสารขึ้น 1 จุด แต่มีลักษณะเป็นรูปวงรียาวแสดงว่าสารที่ปนกันอยู่มีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกัน และเนื่องจากสารมีปริมาณน้อย การทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกจึงไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงทำการแยกสารด้วย preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-121 C, ตัวทำละลายที่ใช้พาสารคือ 40% เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 6 ซม.^{3}/นาที, ความดัน 6 บาร์) ได้โครมาโทแกรมดังรูป 29 ซึ่งจะได้สารจากพีคที่ 3 Rt = 22.1-50 นาที นำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล 2 ครั้ง ได้ผลึกเป็นแท่งสีขาว หนัก 0.18 กรัม (1.38×10^{-3} % ของน้ำหนักรากแห้ง) จุดหลอมเหลว 163-165 องศาเซลเซียล Rf 0.8 (2% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน) ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน เมทานอล และเอทานอล ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และ 5% $FeCl_3$ แสดงว่า สาร ช ไม่ใช่สารประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์และไม่ใช่สารประกอบฟีนอล เมื่อทดสอบกับ Br_2 ใน CCl_4 สามารถฟอกจางสีได้ และได้ตะกอนเหลืองเมื่อทดสอบกับ 2,4-DNP แสดงว่า สาร ช เป็นสารประเภทไม่อิ่มตัวและมีหมู่คาร์บอนิลอยู่ในโมเลกุลตามลำดับ

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3080,3005 (=C-H), 2920 (C-H), 2850 (O-CH_3), 1670 (C=O), 1610,1520 (C=C) , 1460, 1380 (C-H), 1240 (=C-O-C), 910 (R-CH=CH_2), 870 (C-H ของแอโรแมติกที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 1, 2, 4 และ 5), 800 (C-H ของแอโรแมติกที่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง 1,2, 3 และ 4) ดังรูป 30

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 1.74 (3H, s, CH_3), 3.30 (1H, q), 2.90 (1H, d), 3.77 (3H, s, OCH_3), 3.75 (3H, s, OCH_3), 3.88 (1H, s), 4.13 (1H, d), 4.58 (1H, q), 4.91 (1H, s), 4.91 (1H, s), 5.04 (1H, s), 5.20 (1H, t), 6.42 (1H, s), 6.47 (1H, d), 6.76 (1H, s), 7.81 (1H, d) ดังรูป 31

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ , $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 23 สัญญาณที่ δ 188.85 (C=O), 167.34, 157.91, 149.52, 147.46, 143.88, 143.07, 129.91, 113.33, 112.95, 112.46, 110.57, 104.93, 104.82, 100.98, 87.81, 72.26, 66.25, 56.34 (OCH_3), 55.79 (OCH_3), 44.58, 31.25, 17.11 (CH_3) ppm ดังรูปที่ 32

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ m/e 394 (23.3 %) นอกจากนี้พบพีคที่ 192 (100.0 %), 191 (23.27 %), 177 (13.38 %), 193 (12.83 %), 106, 121, 134, 149 และ 161 ดังรูป 33

2.9.8 <u>การทำ สาร ช ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง</u>

<u>สาร ช</u> เป็นของแข็งรูปเข็มสีเหลืองในน้ำมันสีเหลืองจากลำดับส่วนที่ 31-35 และ 45-49 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 14-15 (ตารางที่ 19) แยกน้ำมันออกโดยคนด้วยเฮกเซนกรองแยกของแข็ง แล้วนำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอลหลายครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง หนัก 0.12 กรัม จุดหลอมเหลว 201 องศาเซลเซียล (จุดสลายตัว) ทำทินแลร์โครมาโทกราฟีตรวจสอบพบว่าปรากฏจุดสารเป็นแถบยาว (ไดคลอโรมีเทน) แสดงว่าสารที่ปนกันอยู่มีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกัน และเนื่องจากสารมีปริมาณน้อย การทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกจึงไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงทำการแยกสารด้วย preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-121 C, ตัวทำละลายที่ใช้พาสารคือ 25 % เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 9 ซม.^{3}/นาที, ความดัน 10 บาร์) ได้โครมาโทแกรมดังรูป 34 ซึ่งจะได้สารจากพีคที่ 2 ในช่วงที่ Rt = 6.8-8.2 นาที นำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง หนัก 0.03 กรัม (2.31×10^{-4} % ของน้ำหนักรากแห้ง) จุดหลอมเหลว 213 องศาเซลเซียล (จุดสลายตัว) Rf 0.56 (ไดคลอโรมีเทน) ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน เมทานอล และเอทานอล ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard แสดงว่า <u>สาร ช</u> ไม่ใช่สารประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-3300 (O-H), 3120, 3010 (=C-H), 2950, 2870 (C-H), 2850 (O-CH_3), 1670 (C=O), 1620,1590, 1520 (C=C), 1460,1380 (C-H), 1410,800 (R-CH=CH-R), 1205 (C-O), 1050 (=C-O-C) ดังรูป 35

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 1.46 (6H, s, $2CH_3$), 3.85 (3H, s,OCH_3), 3.93 (3H, s, OCH_3), 4.97 (2H, s), 5.58 (1H, d), 6.26 (1H, s), 6.61 (1H, d), 6.52 (1H, s), 8.24 (1H, s) และ 12.98 (1H, s) ดังรูป 36

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ , $CDCl_3$) ปรากฏ 22 สัญญาณของ 23 คาร์บอนที่ δ 179.27 (C=O), 162.32, 159.31, 156.84, 150.82, 149.20, 146.25, 144.13, 127.73, 114.36, 110.78, 109.88, 109.66, 105.96, 101.07, 100.63, 100.52, 78.11, 64.76, 56.38 (OCH_3), 55.92 (OCH_3), 28.20 ($2CH_3$) ppm ดังรูปที่ 37

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ m/e 408 (85.07%) นอกจากนี้พบพีคที่ 393 (100%), 394 (24.66), 409 (22.67%), 197 (19.52%) และ 44 (8.11%) ดังรูป 38

2.9.9 การทำ สาร ฌ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ฌ เป็นของแข็งรูปเข็มสีเหลืองในน้ำมันสีดำจากลำดับส่วนที่ 19-114 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน (3:7), (1:4), (1:9) และ ไดคลอโรมีเทนในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 126-127 (ตารางที่ 21) แยกน้ำมันออกโดยคนด้วยเฮกเซน กรองแยกของแข็งแล้วนำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอลหลายครั้งได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง และจากของแข็งสีเหลืองที่แยกได้จากลำดับส่วนที่ 22 จากควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ข้อ 2.8.6 รวมกันได้สารหนัก 0.31 กรัม จุดหลอมเหลว 209 องศาเซลเซียล (จุดสลายตัว) ทำทินแลร์โครมาโทกราฟีตรวจสอบพบว่าปรากฏจุดสารเป็นแถบยาว (ไดคลอโรมีเทน) แสดงว่ามีสารปนกันอยู่หลายตัว จึงทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอลหลาย ๆ ครั้ง แต่ไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ การทำสารให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกจึงไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงทำการแยกสารด้วย preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-121 C, ตัวทำละลายที่ใช้พาสารคือ 25% เฮกเซน-คลอโรฟอร์ม, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 9 ซม.^{3}/นาที, ความดัน 10 บาร์) ได้โครมาโทแกรมดังรูป 39 ซึ่งจะได้สารจากพีคที่ 1 ช่วง Rt = 10-13.2 นาที นำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองทำทินแลร์โครมาโทกราฟีตรวจสอบพบว่าปรากฏจุดสารหลายจุดต่อกัน (ไดคลอโรมีเทน) แสดงว่ายังมีสารปนกันอยู่หลายตัว ดังนั้นจึงทำการแยกสารด้วย preparative HPLC อีกครั้ง (คอลัมน์ Si 83-121 C, ตัวทำละลายที่ใช้พาสารคือ 2% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม, อัตราการไหลของตัวทำละลาย 8 ซม.^{3} ต่อนาที, ความดัน 12 บาร์) ได้โครมาโทแกรมดังรูป 40 ซึ่งจะได้สารจากพีคที่ 1 ช่วง Rt =

10.7-11.5 นาที นำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองทำทินแลร์โครมาโทกราฟีตรวจสอบพบว่าปรากฏจุดสาร 2 จุดซ้อนกัน Rf 0.68 และ 0.73 (1% เมทานอล-ไดคลอโรมีเทน) จากการลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารเท่าที่ลองดูได้แก่ บิวทานอล อีเทอร์ แอซีโตไนติล สารละลายผสมของเมทานอลกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน และสารละลายผสมของเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน พบว่าไม่มีระบบใดเหมาะสม จึงไม่สามารถจะแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ ผลึกรูปเข็มสีเหลืองที่แยกได้จากการทำ preparative HPLC ครั้งที่ 2 มีปริมาณ 0.1 กรัม (7.69×10^{-4} % ของน้ำหนักรากแห้ง) จุดหลอมเหลว 222 องศาเซลเซียล (จุดสลายตัว) ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน เมทานอล และเอทานอล ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard แสดงว่า สาร ณ ไม่ใช่สารประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3120, 3010 (=C-H), 2950, 2870 (C-H), 2850 (O-CH_3), 1740 (C=O), 1640 (C=O), 1620,1590,1520 (C=C), 1460,1380 (C-H), 1410,800 (R-CH=CH-R), 1205 (C-O), 1050 (=C-O-C) ดังรูป 41

เนื่องจากสารไม่บริสุทธิ์โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัมที่ได้จึงปรากฏสัญญาณที่ปนกันของสารแต่ละชนิดซึ่งเห็นได้จากค่าความเข้มที่แตกต่างกัน จากการคาดคะเนตำแหน่งของสัญญาณที่ปรากฏและความเข้ม คาดว่าสัญญาณที่ระบุค่าต่อไปนี้เป็นสัญญาณของสารตัวเดียวกัน โดยโปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 1.80 (3H, s, CH_3), 3.86 (3H, s,OCH_3), 3.95 (3H, s, OCH_3), 3.51 (1H, s), 3.18 (1H, s), 4.98 (3H, t), 5.13 (1H, s), 5.40 (1H, t), 6.52 (1H, s), 6.90 (1H, d), 8.10 (1H, d) และ 8.42 (1H, s) ดังรูป 42

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏ 23 สัญญาณของ 23 คาร์บอนที่ δ 174.06 (C=O), 164.69, 155.96, 152.12, 148.81, 146.16, 143.88, 142.85, 127.63, 118.80, 112.95, 112.84, 111.38, 110.46, 110.02, 108.51, 100.27, 87.87, 64.68, 56.23 (OCH_3), 55.79 (OCH_3), 31.36, 17.11 (CH_3) ppm ดังรูปที่ 43

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ m/e 406 และ 392 (100.00%) นอกจากนี้พบพีคที่ 393 (26.29%), 377 (17.48%), 189 (9.85%) และ 345 (9.83%) ดังรูป 44

2.10 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

2.10.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

ทำการทดสอบดังวิธีในหัวข้อที่ 2.7.1 สารที่นำมาทดสอบคือ สาร ก ถึง สาร ฌ ยกเว้น สาร ข ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว แสดงดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวของสารที่แยกได้

สาร	ปริมาณสาร (กรัม)	ความยาว (%)		การยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว	
		ราก	กาบใบ	ราก (%)	กาบใบ (%)
สาร ก	0.001	98.23	96.09	1.77	3.91
	0.005	97.87	101.67	2.13	0
	0.01	93.09	93.30	6.91	6.70
สาร ค	0.001	0.75	39.57	99.25	60.43
	0.002	0.56	31.29	99.44	68.71
	0.01	0	30.98	100.00	69.02
สาร ง	0.001	95.33	103.22	4.67	0
	0.005	88.60	98.39	11.40	1.61
	0.01	88.46	99.36	11.54	0.64
สาร จ	0.00005	73.52	90.34	26.48	9.66
	0.0001	76.83	92.84	23.17	7.16
	0.001	ไม่งอก	ไม่งอก	100.00	100.00
	0.003	ไม่งอก	ไม่งอก	100.00	100.00
	0.01	ไม่งอก	ไม่งอก	100.00	100.00

ต่อ ตารางที่ 27 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าวของสารที่แยกได้

สาร	ปริมาณสาร (กรัม)	ความยาว (%)		การยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว	
		ราก	กาบใบ	ราก (%)	กาบใบ (%)
สาร ฉ	0.001	99.24	110.34	0.76	0
	0.005	89.36	103.63	10.64	0
	0.01	94.33	90.73	5.67	9.27
สาร ช	0.0005	0.94	52.15	99.06	47.85
	0.001	0.56	49.69	99.44	50.31
	0.005	1.13	32.52	98.87	67.48
สาร ช	0.0002	0	49.08	100.00	50.92
	0.001	0	33.44	100.00	66.56
สาร ฌ	0.0003	0.38	37.42	99.62	62.58
	0.001	0	42.33	100.00	57.67
	0.002	0	40.49	100.00	59.51

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.10.2 การศึกษาความเป็นพิษกับปลา

ทำการทดสอบดังวิธีในหัวข้อ 2.7.2 สารที่นำมาทดสอบคือ สาร ก สาร ง สาร จ สาร ฉ สาร ช และ สาร ฌ ผลการทดสอบความเป็นพิษกับปลาแสดงในตารางที่ 28

ตารางที่ 28 ผลการทดสอบความเป็นพิษกับปลาของสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

สาร	ปริมาณ (กรัมในน้ำ 200 ซม.^{3})	จำนวนปลาที่ตาย (%)	ความเป็นพิษกับปลา(%)
สาร ก	0.001	0	0
	0.006	0	0
	0.02	0	0
สาร ง	0.001	0	0
	0.005	0	0
	0.01	0	0
สาร จ	0.001	0	0
	0.003	0	0
	0.01	0	0
สาร ฉ	0.0002	0	0
	0.0009	0	0
	0.004	0	0
สาร ช	0.0005	0	0
	0.001	100	100
	0.005	100	100
สาร ฌ	0.0003	0	0
	0.001	0	0
	0.002	0	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

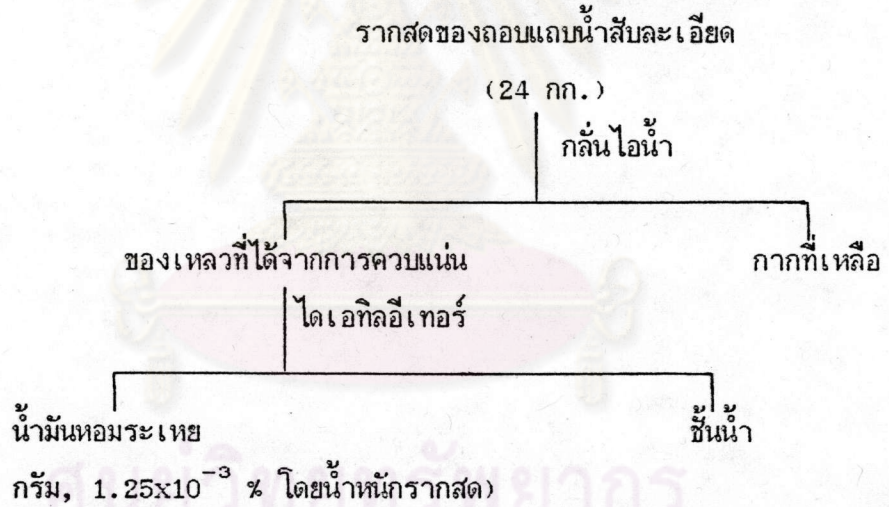
2.11 น้ำมันหอมระเหยจากรากถอบแถบน้ำ

รากสดของถอบแถบน้ำมีกลิ่นแรงมากเป็นที่น่าสนใจ ดังนั้นจึงนำรากสดมาสกัดน้ำมันหอมระเหยและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหย ดังขั้นตอนต่อไปนี้

2.11.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากสดของถอบแถบน้ำ

นำรากสดหนัก 24 กก. มากลั่นไอน้ำครั้งละ 3 กก. กลั่นนานประมาณ 2 ชม. ตามวิธีในข้อ 2.5.5 ของเหลวที่ได้จากการควบแน่นมีลักษณะเป็นฝ้าขาวๆลอยปนอยู่ในชั้นน้ำ แยกฝ้าขาวๆออกจากชั้นน้ำโดยสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ที่กลั่นใหม่ ๆ จากนั้นนำชั้นไดเอทิลอีเทอร์มาทำให้แห้งด้วย anhydrous Na_2SO_4 และระเหยไดเอทิลอีเทอร์ออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียล จะได้น้ำมันหอมระเหย 3 กรัม คิดเป็น 1.25×10^{-3} % ของน้ำหนักรากสด ซึ่งจะนำไปทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ขั้นตอนการสกัดแสดงดังแผนภาพที่ 2

แผนภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากรากสดของถอบแถบน้ำ



2.11.2 การหาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย

นำน้ำมันหอมระเหยหนัก 3 กรัม จากข้อ 2.11.1 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งมี florisil หนักประมาณ 60 กรัมเป็นตัวดูดซับตามวิธีการในข้อ 2.5.1 แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปมาก คือ เฮกเซนใช้ลำดับส่วนที่ 1-6 5%ไดเอทิลอีเทอร์-เฮกเซนใช้ลำดับส่วนที่ 7-12 20%ไดเอทิลอีเทอร์-เฮกเซนใช้ลำดับส่วนที่ 13-18 ไดเอทิลอีเทอร์ใช้ชะลำดับส่วนที่ 19-24 เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 500 ซม.^{3} นำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้ไปกลั่นลดความดันที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล เพื่อไล่ตัวทำละลายออกจนเหลือปริมาตรประมาณ 10 ซม.^{3} นำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้ทินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธีการข้อ 2.5.3 รวมส่วน

ที่ให้ผลเหมือนกันเข้าด้วยกัน ซึ่งจะทำการรวมสารเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังแสดงในตารางที่ 29

ตารางที่ 29 ผลการรวมสาร 4 กลุ่มใหญ่ ๆ จากการทำทินแลร์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะของสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน	1-6	น้ำมันไม่มีสี กลิ่นเหม็น	0.58
เฮกเซน:ไดเอทิลอีเทอร์(19:1)	7-15	น้ำมันไม่มีสี กลิ่นหอม	0.54
เฮกเซน:ไดเอทิลอีเทอร์(4:1)	16-20	น้ำมันสีเหลือง กลิ่นหอม	0.77
ไดเอทิลอีเทอร์	21-24	น้ำมันสีเหลือง กลิ่นหอม	0.61

นำลำดับส่วน 1-6, 7-15, 16-20, และ 21-24 ที่ได้จากมาทำการแยกโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ ใช้คอลัมน์ SE-30, อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียลที่ 1 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 4 องศาเซลเซียลต่อนาที จนถึง 250 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 280 องศาเซลเซียล ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังรูป 45, 46, 47 และ 48 ตามลำดับ จากนั้นมาแยกสารและตรวจหาสูตรโครงสร้างโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (คอลัมน์ SE-30, อุณหภูมิคอลัมน์ 50 องศาเซลเซียลที่ 1 นาทีแล้วเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 4 องศาเซลเซียลต่อนาที จนถึง 250 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิinjection 280 องศาเซลเซียล) ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังรูป 49, 50, 51 และ 52

ผลการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโตรมิเตอร์แสดงในตารางที่ 30

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 30 ผลการวิเคราะห์ของน้ำมันหอมระเหยจากรากสดของถอบแถบน้ำ

ลำดับส่วนที่	สารที่แยกได้	แมสสเปกตรัม (m/e) (5 พีคจากความเข้มข้นสูงไปต่ำ)	รูปที่	%ของแต่ละลำดับส่วน
1-6	1. cyclohexane	56,84,41,55,69	53	0.46
	2. $C_{10}H_{14}$	119,134,43,57,91	55	0.30
	3. $C_{11}H_{24}$	57,43,119,71,41	57	0.56
	4. $C_{10}H_{8}$	128,127,129,51,64	59	0.86
	5. dodecane	57,43,71,85,41	61	1.11
	6. $C_{13}H_{28}$	57,43,71,85,41	63	0.13
	7. copaene	161,105,119,93,91	65	0.56
	8. $C_{14}H_{30}$	57,43,71,85,41	67	4.27
	9. alpha-caryophyllene	93,80,121,41,89	68	1.51
7-15	1. ethyl acetate	43,45,61,73,44	70	0.93
	2.	49,46,59,69,108	72	7.66
	3.	52,73,49,63,74	73	3.02
	4.	52,73,49,63,51	74	2.38
	5.	91,79,49,108,77	75	4.07
	6. phenyl acetonitrile	117,90,116,91,89	76	5.62
	7.	71,49,111,93,46	78	8.37
	8.	49,62,46,61,81	79	6.42
	9.	109,49,123,46,82	80	1.18
16-20	1.	49,52,63,51,38	81	17.67
21-24	1.	49,52,63,51,38	81	6.82

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย