บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

นำงาขาวร้อยเอ็ด(ทั้งต้น)มาทำการทดลอง โดยเริ่มปลูกงาขาวร้อยเอ็ดในราว เดือนเมษายน เมื่ออายุครบ 2 เดือน จึงทำการเก็บเกี่ยวได้ หลังจากนั้นจึงนำมาตากแห้งแล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของงาขาวร้อยเอ็ดต่อไป

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

2.2.1 Elemental Analyzer model 240C ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และออกซิเจน

2.2.2 Fisher Johns Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับหาจุดหลอมเหลว

2.2.3 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer model AC-F 200 ของบริษัท Bruker ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ สำหรับวัดโปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกรีโซแนนซ์สเปกตรา สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัด เตรียมโดยละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$), สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์-ดี$_6$ (DMSO-d_6) หรือสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$) กับไดเมทิลซัลฟอกไซด์-ดี$_6$ (DMSO-d_6) โดยความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ใช้วัดโปรตอนสเปกตราประมาณ 0.01-0.05 โมลาร์ และประมาณ 0.12-0.25 โมลาร์สำหรับวัดคาร์บอนสเปกตรา อุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจวัดประมาณ 25-30 องศาเซลเซียล

2.2.4 Gas-Liquid Chromatography model GC-7AG ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น สำหรับบันทึกแก๊สโครมาโทแกรม

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

2.2.6 Infrared Spectrophotometer model 781 ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับวัดอินฟราเรดสเปกตราของสาร สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยผสมกับโปตัสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นเม็ด (Pellet) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. หนาประมาณ 1 มม.

2.2.7 Mass Spectrometer model JMS-DX 300 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้ electro impact source ซึ่งมีความต่างศักย์ 70 โวลต์ กระแส 300 ไมโครแอมป์ อุณหภูมิ 180-220 องศาเซลเซียล และ model JMS-AX 500 สำหรับบันทึกแมสสเปกตรา

2.2.8 เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น

2.3 <u>สารเคมี</u>

2.3.1 ตัวทำละลาย ใช้คอมเมอร์เชียลเกรด โดยนำมากลั่นก่อนใช้ทุกครั้งเพื่อทำให้บริสุทธิ์ ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่เฮกเซน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เมทานอล เอทานอล แอซีโตน และเอทิลแอซิเตต

2.3.2 รีเอเจนต์ ที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาเคมี มีดังนี้ 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$, Br_2ใน CCl_4

2.3.3 ตัวดูดซับ ใช้ซิลิกาเจล ชนิด 60 Art.7734 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt, อลูมิเนียมออกไซด์ ชนิด 90 Art.1076 ของบริษัท E. Merck, Darmstadt และ zelite no. 15011 ของบริษัท The British Drug Houses กับ activated charcoal สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี และซิลิกาเจล ชนิด 60G Art.7731 สำหรับทินแลร์

โครมาโทกราฟี และควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.4 การทดสอบทางปฏิกิริยาเคมี

2.4.1 การทดสอบสเตอรอยด์ และไตรเทอร์พีนอยด์ (ทดสอบด้วยปฏิกิริยา Liebermann-Burchard) (40)

ละลายสารประมาณ 1 มก. ในคลอโรฟอร์มจำนวนเล็กน้อย หยดแอซิติก-แอนไฮไดรด์ 2-3 หยด เขย่า หยด conc.H_2SO_4 1 หยด โดยภายใน 1 ชม. ถ้าสีเปลี่ยนจาก ชมพู ---> ม่วง ---> น้ำเงิน ---> เขียว แสดงว่าเป็นสเตอรอยด์ แต่ถ้าเป็นไตรเทอร์พีนอยด์ สีจะเปลี่ยนจาก ชมพู --->ม่วง

2.4.2 การทดสอบหาเฟลโวนอยด์ (Flavonoid) (41)

ละลายสารประมาณ 2 มก. ในเมทานอลจำนวน 5 ซม.^{3} แบ่งออกเป็น 2 หลอด แล้วนำมาทดสอบดังนี้

Cyanidin test นำหลอดที่ 1 มาเติม conc.HCl 0.5 ซม.^{3} จากนั้นเติมแมกนีเซียม 1-2 แผ่น สังเกตสีที่เปลี่ยนไป โดย flavone จะให้สีส้มถึงแดง, flavonol ให้สีแดงถึงแดงเลือดนก และ flavonone ให้สีแดงเลือดนกถึงม่วงแดง แต่ถ้าเป็น chalcone และ aurone ไม่ให้สีกับวิธีทดสอบนี้ ขั้นต่อมาเติมน้ำ 2 ซม.^{3} และ 1-บิวทานอล 1 ซม.^{3} เขย่าแรง ๆ ทิ้งไว้ให้แยกชั้น โดยสังเกตสีในชั้นน้ำและชั้น 1-บิวทานอล ถ้ามีไกลโคไซด์ของเฟลโวนอยด์จะให้สีในชั้นน้ำซึ่งอยู่ชั้นล่าง แต่ถ้าเป็นเฟลโวนอยด์อิสระจะให้สีในชั้น 1-บิวทานอลซึ่งอยู่ชั้นบน

Leucoanthocyanin test นำหลอดที่ 2 มาเติม conc.HCl 0.5 ซม.^{3} อุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที สังเกตสี ถ้ามีเฟลโวนอยด์จะให้สีม่วงแดง

2.4.3 การทดสอบหมู่คาร์บอนิล (42)

นำสารประมาณ 1 มก. มาละลายในเอทานอล 0.5 ซม.^{3} เติม 2,4-DNP 0.5 ซม.^{3} เขย่าแรง ๆ ถ้าเป็นสารที่มีหมู่คาร์บอนิลอยู่ในโมเลกุลจะได้ตะกอนสีเหลือง

2.4.4 การทดสอบความไม่อิ่มตัว (42)

นำสารประมาณ 1 มก. มาละลายใน CCl_4 0.5 ซม.^{3} เติมสารละลาย 3% Br_2 ใน CCl_4 ทีละหยด เขย่าทุกครั้ง ถ้าสารที่มีพันธะที่ไม่อิ่มตัวอยู่ในโมเลกุล สีของ Br_2 จะจางหายไป และไม่มีแก๊สไฮโดรเจนโบรไมด์เกิดขึ้น

2.4.5 การทดสอบหมู่ฟีนอล (42)

นำสารประมาณ 1 มก. มาละลายในเอทานอล, น้ำ หรือคลอโรฟอร์ม หยดสารละลาย 5% $FeCl_3$ ทีละหยด เขย่า ถ้าเป็นสารประกอบประเภทฟีนอล จะได้สารละลายสีชมพูแดง ม่วง หรือเขียว

2.5 เทคนิคต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 ควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Quick Column Chromatography) (43)

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยกสารออกเป็นกลุ่มใหญ่ก่อน เพื่อความรวดเร็ว ซึ่งสามารถที่จะนำไปแยกเป็นสารกลุ่มย่อย ๆ ด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อไป

การเตรียมใช้ sintered glass เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 ซม. เป็นคอลัมน์ โดยนำ sintered glass วางลงบนขวดดูดซึ่งต่อกับปั๊มน้ำ โดยมีขอบยางรองรับอยู่ บรรจุซิลิกาเจล ชนิด 60G Art.7731 ซึ่งใช้เป็นตัวดูดซับลงใน sintered glass สูงประมาณ 4 ซม. ระหว่างบรรจุซิลิกาเจล ต้องเปิดปั๊มน้ำ แล้วเทตัวทำละลายลงบนผิวหน้าซิลิกาเจล เพื่อให้ตัวทำละลายไหลผ่านลงขวดดูดซึ่งจะทำให้ซิลิกาเจลอัดตัวกันแน่นยิ่งขึ้น นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากัน ทำให้เป็นผงละเอียดโดยนำมาบดด้วย motar และกรองอีกครั้งหนึ่ง ก่อนจะบรรจุสิ่งสกัดลงในคอลัมน์ ให้รองผิวหน้าซิลิกาเจลด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ที่ตัดเป็นแฉกก่อน จากนั้นจึงบรรจุสิ่งสกัดลงในคอลัมน์แล้วกดผิวหน้าให้เรียบ ชะคอลัมน์ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกสารครั้งละเท่า ๆ กัน

2.5.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) (44)

ขนาดของคอลัมน์แก้วที่ใช้ ขึ้นอยู่กับ ปริมาณสารที่ต้องการแยก ถ้าปริมาณสารที่ต้องการแยกมีปริมาณมาก ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้ก็จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของคอลัมน์มากกว่าเมื่อใช้ปริมาณสารที่ต้องการแยกมีน้อย

วิธีเตรียม นำคอลัมน์แก้วมาอุดปลายด้านล่าง ซึ่งมีลักษณะเรียวเล็กด้วยสำลีที่สะอาด โดยใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ปลายด้านล่าง บรรจุตัวทำละลายลงไปครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ เปิดที่เปิดปิดด้านล่างของคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านเพื่อไล่ฟองอากาศ ผสมซิลิกาเจลชนิด 60 Art.7734 กับตัวทำละลาย คนให้เข้ากัน เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศในคอลัมน์ระหว่างบรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ ต้องเปิดคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งเคาะคอลัมน์ไปเบา ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลเรียงตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เมื่อบรรจุซิลิกาเจลเสร็จแล้วก็ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเหลือประมาณ 3 ซม. เหนือผิวหน้าซิลิกาเจล จึงปิดที่เปิดปิดด้านล่างของคอลัมน์ นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วน แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ช้า ๆ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปรับผิวหน้าให้เรียบ ฉีดล้างด้านในคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นปล่อยให้ระดับของสารละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจล แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารต่อไป

2.5.3 ทินแลร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) (45)

การเตรียมโครมาโทเพลท (chromatoplate) ใช้ซิลิกาเจล ชนิด 60G Art.7731 ผสมกับน้ำ ในอัตราส่วน 1:2 เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทลงใน desaga spreader ที่ปรับความหนา 0.25 มม. เคลือบลงบนกระจกขนาด 5 x 20 ซม.^{2} หรือ 20 x 20 ซม.^{2} ที่เช็ดด้วยแอซิโตนสะอาดแล้ว เมื่อได้โครมาโทเพลทแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปอบในตู้อบ อุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียล เป็นเวลาประมาณ 2-3 ชม.

การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วสะอาดที่มีฝาปิด ขนาดใหญ่พอใส่โครมาโทเพลทได้ จากนั้นนำกระดาษกรองมาใส่ลงในขวดแก้ว โดยให้กระดาษกรองทาบผิวด้านในขวด แล้วเติมตัวทำละลายลงในขวดให้สูงประมาณ 1 ซม. ปิดฝาขวด เพื่อให้ในขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

การแต้มสาร ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์-กลางไม่เกิน 0.05 ซม. แต้มสารที่ต้องการตรวจสอบลงบนโครมาโทเพลท โดยให้จุดเริ่มต้นห่างกันไม่น้อยกว่า 1 ซม. และห่างจากขอบล่างประมาณ 2 ซม. ด้านบนขีด solvent front ไว้ รอจนกว่าจุดที่แต้มสารแห้งสนิท จึงนำไป develop

การ develop จุ่มโครมาโทเพลทที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิดฝา ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึงขีด solvent front แล้วจึงนำโครมาโทเพลทออกจากขวดแก้ว โดยปล่อยทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยไปจนหมด จึงนำไปตรวจสอบหาตำแหน่งของสารต่อไป

การตรวจหาตำแหน่งของสาร โดยสามารถใช้ ไอโอดีน, 25% H_2SO_4 หรือแสงอัตราไวโอเลต การใช้ไอโอดีนเป็นตัวตรวจสอบ ทำได้โดย นำโครมาโทเพลทที่ develop แล้วใส่ในขวดที่มีเกล็ดไอโอดีน ปิดฝาขวดให้สนิท ปล่อยจนกระทั่งบริเวณที่มีสารเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้น สำหรับการใช้ 25% H_2SO_4 ทำได้โดย พ่น 25% H_2SO_4 ลงบนโครมาโทเพลทที่ develop แล้ว ทิ้งไว้จนแห้ง นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียล ประมาณ 5-10 นาที พบว่าบริเวณที่มีสารจะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลดำชัดเจน

2.5.4 <u>ถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี</u> (Activated Charcoal Column Chromatography)

จุดประสงค์ในการเลือกใช้ถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี คือต้องการที่จะขจัดสีของคลอโรฟิลล์และเม็ดสีต่าง ๆ ซึ่งบดบังสารที่ต้องการวิเคราะห์ออก โดยชั่ง zelite ให้เป็น 3 เท่าของน้ำหนักสาร และน้ำหนักของ activated charcoal จะเท่ากับ 1ใน 3 ของน้ำหนัก zelite จากนั้นนำ zelite ผสมกับ activated charcoal แล้วเติมตัวทำ-ละลายที่ใช้ในการชะคอลัมน์ลงไปพอประมาณ นำไปกวนให้เข้ากัน จากนั้นก็บรรจุลงในคอลัมน์ ซึ่งขั้นตอนในการบรรจุจะเหมือนกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.5.5 <u>การกลั่น</u>

การกลั่น เป็นการแยกตัวทำละลายที่มากเกินพอออกจากสารละลาย การกลั่นมี 2 แบบ ได้แก่ การกลั่นแบบธรรมดา และการกลั่นแบบลดความดัน โดยพิจารณาจากตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ ก็จะใช้การกลั่นแบบธรรมดา เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม แต่ถ้า

ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูงและมีขั้ว ก็จะใช้การกลั่นแบบลดความดัน เช่น เมทานอล ทั้งนี้เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารที่สกัดออกมา โดยตัวทำละลายจะเดือดก่อนถึงจุดเดือด เพราะการกลั่นแบบลดความดันจะใช้ความร้อนต่ำกว่าการกลั่นแบบธรรมดา เมื่อตัวทำละลายเป็นชนิดเดียวกัน เครื่องมือที่ใช้ในการกลั่นแบบนี้ เรียกว่า เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaparator)

2.6 การสกัด

ทำการสกัดงาขาวร้อยเอ็ดแห้งด้วยตัวทำละลายต่อไปนี้ คือ เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม เมทานอล และเอทิลแอซิเตต ตามลำดับ ขั้นตอนการสกัดแสดงดังแผนภาพที่ 1

2.6.1 การสกัดด้วยเฮกเซน

นำงาขาวร้อยเอ็ด (ทั้งต้น) ที่ตากแห้งและบดละเอียด หนัก 4.9 กก. มาสกัดด้วยเฮกเซนจำนวน 30 ลิตรที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากรองและกลั่นแยกเฮกเซนออกจนเกือบหมด นำเฮกเซนที่กลั่นแยกได้มาสกัดงาขาวร้อยเอ็ดอีก ทำเช่นนี้ซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายเฮกเซนที่กรองได้ไม่มีสีจึงหยุดสกัด จะได้สิ่งสกัดในเฮกเซน มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืดข้นหนัก 138.72 กรัม (2.83 % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จากนั้นจึงนำไปแยกหาสารโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

2.6.2 การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

นำงาขาวร้อยเอ็ดที่สกัดด้วยเฮกเซนแล้ว มาสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์ม จำนวน 30 ลิตร เช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 จะได้สิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม มีลักษณะเป็นของแข็งสีเขียวอมน้ำตาล หนัก 65.78 กรัม (1.34 % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง)

2.6.3 การสกัดด้วยเมทานอล

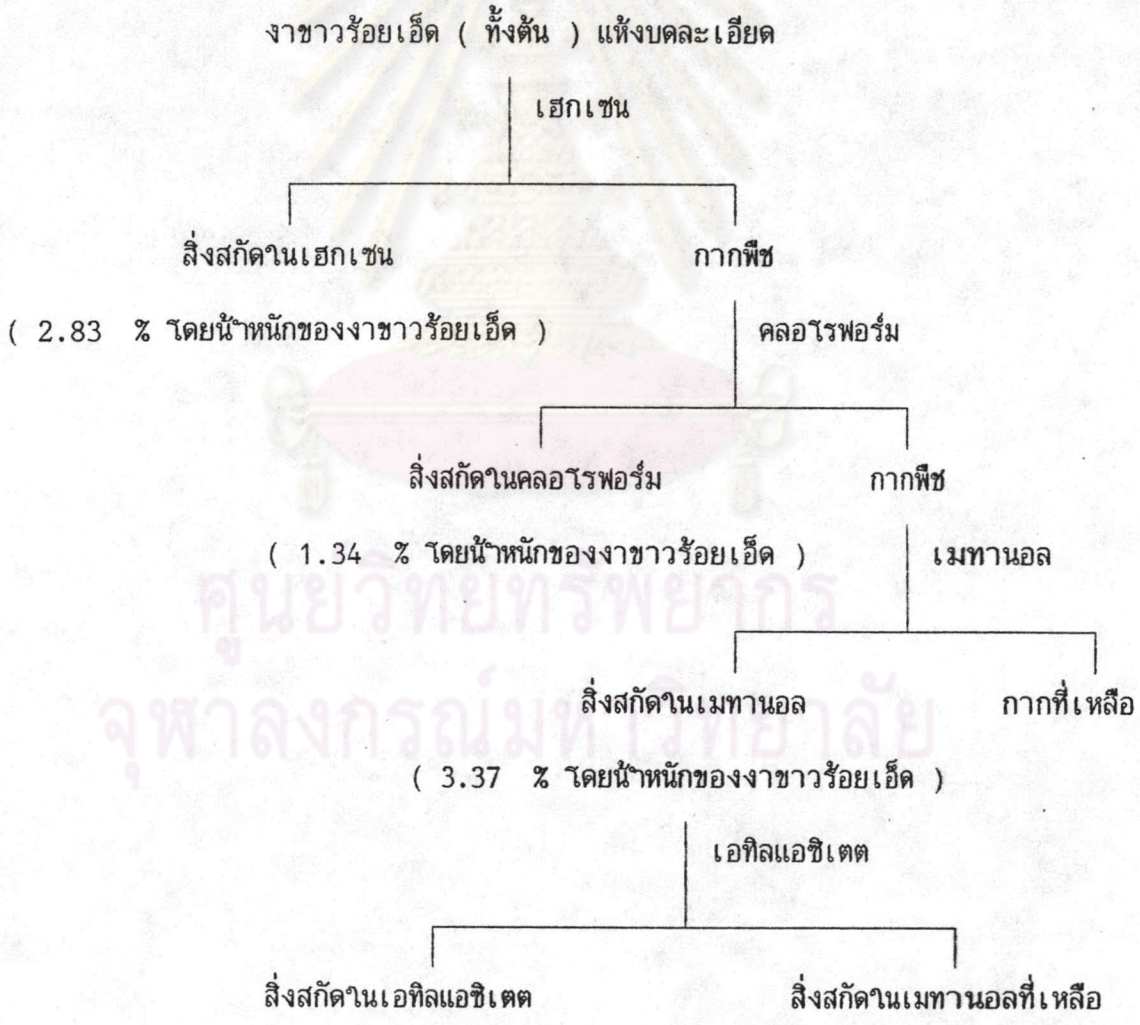
นำงาขาวร้อยเอ็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มแล้ว มาสกัดต่อด้วยเมทานอลจำนวน 30 ลิตร เช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 โดยช่วงของการกลั่นแยกเมทานอลนั้นจะใช้วิธีการกลั่นแบบลดความดัน จะได้สิ่งสกัดในเมทานอล มีลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลอมดำข้นหนัก 150.14 กรัม

(3.06 % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง)

2.6.4 การสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต

นำสิ่งสกัดที่ได้ในเมทานอล มาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต จำนวน 500 ซม.^{3} เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากลั่นแยกเอทิลแอซิเตต สำหรับขั้นตอนในการสกัดซ้ำ ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.6.1 จะได้สิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต มีลักษณะเป็นของแข็งสีเขียวอมเหลืองหนัก 14.99 กรัม (0.31 % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง)

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง



2.7 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.7.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว (46-47)

การเตรียมเมล็ดข้าว นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข 23 (indicator plant) มาแช่ทิ้งไว้ประมาณ 2 คืน เพื่อให้เมล็ดข้าวงอกส่วนรากออกมา สำหรับเมล็ดข้าวที่ใช้ในการทดลองจะมีความยาวของราก ประมาณ 1-2 มม.

การเตรียมสารทดลอง นำสารที่จะมาทดสอบ ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เตรียมสารละลายตามความเข้มข้นที่ต้องการ 3 ความเข้มข้น นำสารละลายที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดแก้วเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซม. สูง 12 ซม. ซึ่งบรรจุด้วยเซลลูโลส (cellulose powder) จำนวน 1.5 กรัม จากนั้นปิดหลอดแก้วด้วยกระดาษอลูมิเนียม นำไปอบในตู้อบแห้งสูญญากาศ (vacuum drier) เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปเหลือแต่สารที่สกัดได้จากต้นงา อบอยู่ประมาณ 1 วัน จากนั้นนำหลอดแก้วเหล่านี้ออกมาคนเพื่อให้สารที่สกัดจากต้นงาคลุกเคล้ากับเซลลูโลส เติมน้ำลงไปหลอดละ 4 ซม.^{3} นำเมล็ดข้าวตัวอย่างที่เตรียมได้มาปลูกลงในหลอดแก้ว หลอดละ 6 เมล็ด ปิดฝาหลอดแก้วด้วยพลาสติกใส ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบทำเช่นเดียวกันแต่ไม่ใส่สารที่สกัดจากงาขาวร้อยเอ็ด ทุกกรรมวิธีทำซ้ำ 3 ครั้ง นำหลอดแก้วดังกล่าวนี้ไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิโดยตั้งอุณหภูมิไว้ประมาณ 30 องศาเซลเซียล ให้แสงตลอด 24 ซม. เป็นเวลา 7 วัน จึงวัดผล

การวัดผล นำต้นข้าวมาล้างให้สะอาด เพื่อวัดความยาวของรากและความยาวของกาบใบที่ 2 ของต้นข้าวอ่อน ซึ่งจะได้เป็นค่าเฉลี่ยของเมล็ดข้าว 18 เมล็ด ใน 1 ความเข้มข้น เปรียบเทียบกับความยาวเฉลี่ยของรากและกาบใบที่ 2 ของต้นข้าวที่งอกในหลอดที่บรรจุเฉพาะเซลลูโลสซึ่งใช้เป็นความยาวมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 100 % ถ้าความยาวของรากและกาบใบที่ 2 ใกล้เคียงกับความยาวมาตรฐาน แสดงว่าสิ่งสกัดนั้นไม่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว แต่ถ้าความยาวแตกต่างกับความยาวมาตรฐาน แสดงว่าสิ่งสกัดนั้นมีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว

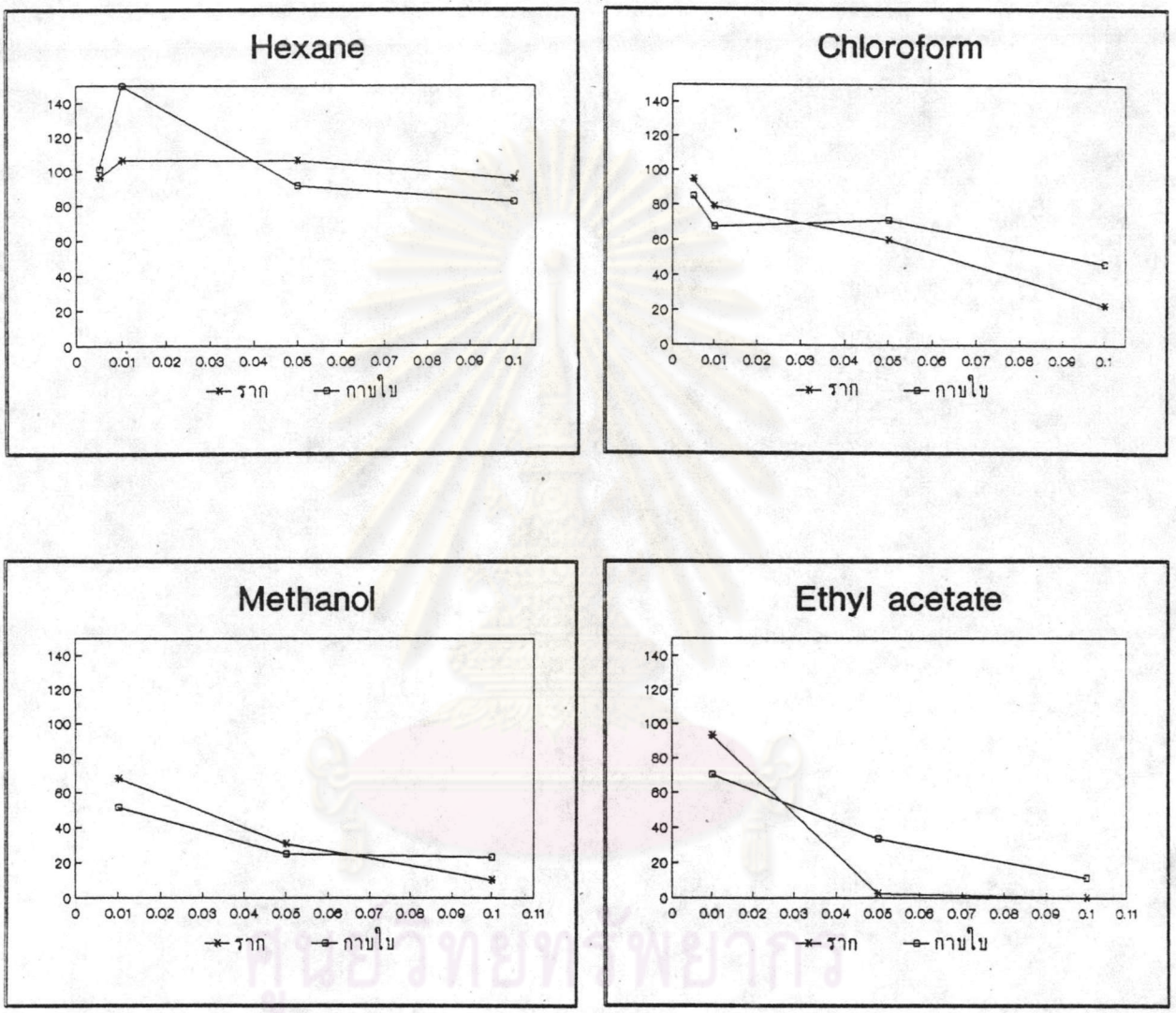
ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ของสิ่งสกัดจากงาขาวร้อยเอ็ด แสดงดังตารางที่ 4

I17003143

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ของสิ่งสกัดจากต้นงาขาวร้อยเอ็ด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รหัส	สิ่งสกัด	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ			
			0.005	0.01	0.05	0.10
S_1	เฮกเซน	ราก	95.70	105.87	105.63	95.31
		กาบใบ	100.73	149.64	91.11	82.16
S_2	คลอโรฟอร์ม	ราก	94.68	79.04	60.21	22.36
		กาบใบ	84.74	67.46	71.15	46.45
S_3	เมทานอล	ราก	-	67.99	30.49	10.00
		กาบใบ	-	51.17	24.71	22.97
S_4	เอทิลแอซิเตต	ราก	-	93.01	2.27	0.00
		กาบใบ	-	70.42	33.29	11.14

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 4 พบว่า สิ่งสกัดจากเอทิลแอซิเตต ซึ่งมีองค์ประกอบ 0.31% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง และความเข้มข้น 0.10 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวมากที่สุด รองลงมาคือสิ่งสกัดจากเมทานอล, สิ่งสกัดจากคลอโรฟอร์ม และสิ่งสกัดจากเฮกเซน ตามลำดับ จากนั้นนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ โดยเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อน เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 12



แกนตั้ง - เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน - ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสิ่งสกัดจากต้นงาขาวร้อยเอ็ด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

2.7.2 <u>การศึกษาความเป็นพิษต่อปลา</u> (46-47)

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

การเตรียมสารทดลอง นำสารที่จะทดสอบ มาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยเตรียมสารละลายตามความเข้มข้นที่ต้องการ 3 ความเข้มข้น ใส่สารละลายลงในจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาด 4 x 4 ซม.^{2} โดยที่ 1 ความเข้มข้นจะใส่ในจานเพาะเชื้อ 3 จาน ส่วนที่ใช้เป็นมาตรฐานจะไม่ใส่สารที่ทดสอบ จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ 1 คืนเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปหมดก่อน แล้วจึงนำไปใส่ในถ้วยเลี้ยงปลาที่จัดเตรียมไว้ โดยตัดกระดาษกรองในจานเพาะเชื้อให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ บันทึกจำนวนปลาที่ตายเมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 5

<u>ตารางที่ 5</u> ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อปลาของสิ่งสกัดจากต้นงาขาวร้อยเอ็ด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รหัส	สิ่งสกัด	เปอร์เซ็นต์จำนวนปลาที่ตายที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
		0.01	0.05	0.10
S_1	เฮกเซน	0.00	0.00	14.28
S_2	คลอโรฟอร์ม	14.28	14.28	14.28
S_3	เมทานอล	0.00	0.00	28.57
S_4	เอทิลแอซิเตต	0.00	14.28	14.28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8 การแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซน

2.8.1 การแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสิ่งสกัดในเฮกเซน จากข้อ 2.6.1 มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยแบ่งทำ 2 ครั้ง ๆ ละ 35.72 กรัม และ 50.03 กรัม ตามลำดับ ใช้ซิลิกาเจลหนัก 420.10 กรัม และ 508.90 กรัม ตามลำดับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามากคือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 800 ซม.^{3} ในการทำครั้งที่ 1 และ 1000 ซม.^{3} ในการทำครั้งที่ 2 นำแต่ละส่วนที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 ซม.^{3} จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วน (fraction) มาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่โดยใช้ทินแลร์โครมาโทกราฟี ตามวิธีการในข้อ 2.5.3 รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ, วิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟีและวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซนแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$S_1 1$	เฮกเซน	1-14	ของแข็งอสัณฐานสีขาว	1.23
$S_1 2$	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 9:1	15-26	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	1.68
$S_1 3$	"	27-33	น้ำมันสีส้มปนของแข็งสีขาว	0.25
$S_1 4$	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 4:1	34-36	น้ำมันสีส้มปนของแข็งสีขาว	2.67

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$S_1$5	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 3:2	37-47	น้ำมันสีเหลือง	54.94
$S_1$6	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 1:1	48-59	น้ำมันสีเหลืองปนผลึกรูปเข็ม	3.56
$S_1$7	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 2:3	60-69	น้ำมันสีน้ำตาลอมส้มปนผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน	0.59
$S_1$8	ไดคลอโรมีเทน	70-102	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	4.20
$S_1$9	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 9:1	103-104	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	2.07
		105-108	น้ำมันสีเขียวเข้ม	3.44
$S_1$10	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 3:2	109-118	น้ำมันสีเขียวอ่อน	0.92
		119-121	น้ำมันสีเขียวอ่อน	2.69
	เมทานอล	122-131	น้ำมันสีเขียวขุ่น	1.49

2.8.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำแต่ละส่วนที่แยกได้ ในข้อ 2.8.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ตามวิธีการในข้อ 2.7.1 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ					
		0.001	0.005	0.01	0.02	0.05	0.10
$S_1$1	ราก	-	-	142.18	-	126.22	122.40
	กาบใบ	-	-	177.27	-	206.45	223.34
$S_1$2	ราก	-	124.33	133.34	-	116.61	-
	กาบใบ	-	224.20	219.59	-	210.02	-
$S_1$3	ราก	-	144.92	141.15	-	142.66	-
	กาบใบ	-	221.63	206.94	-	188.39	-
$S_1$4	ราก	-	135.81	131.62	-	148.66	137.41
	กาบใบ	-	220.27	216.52	-	204.18	224.50
$S_1$5	ราก	-	113.74	144.92	-	122.73	119.60
	กาบใบ	-	209.83	217.01	-	223.15	208.48
$S_1$6	ราก	-	128.61	87.88	-	34.52	3.32
	กาบใบ	-	208.67	167.87	-	163.45	89.07
$S_1$7	ราก	-	142.02	101.39	-	83.06	64.52
	กาบใบ	-	185.81	173.34	-	166.15	154.54
$S_1$8	ราก	-	115.34	106.21	-	61.95	18.33
	กาบใบ	-	182.06	153.75	-	168.92	148.40

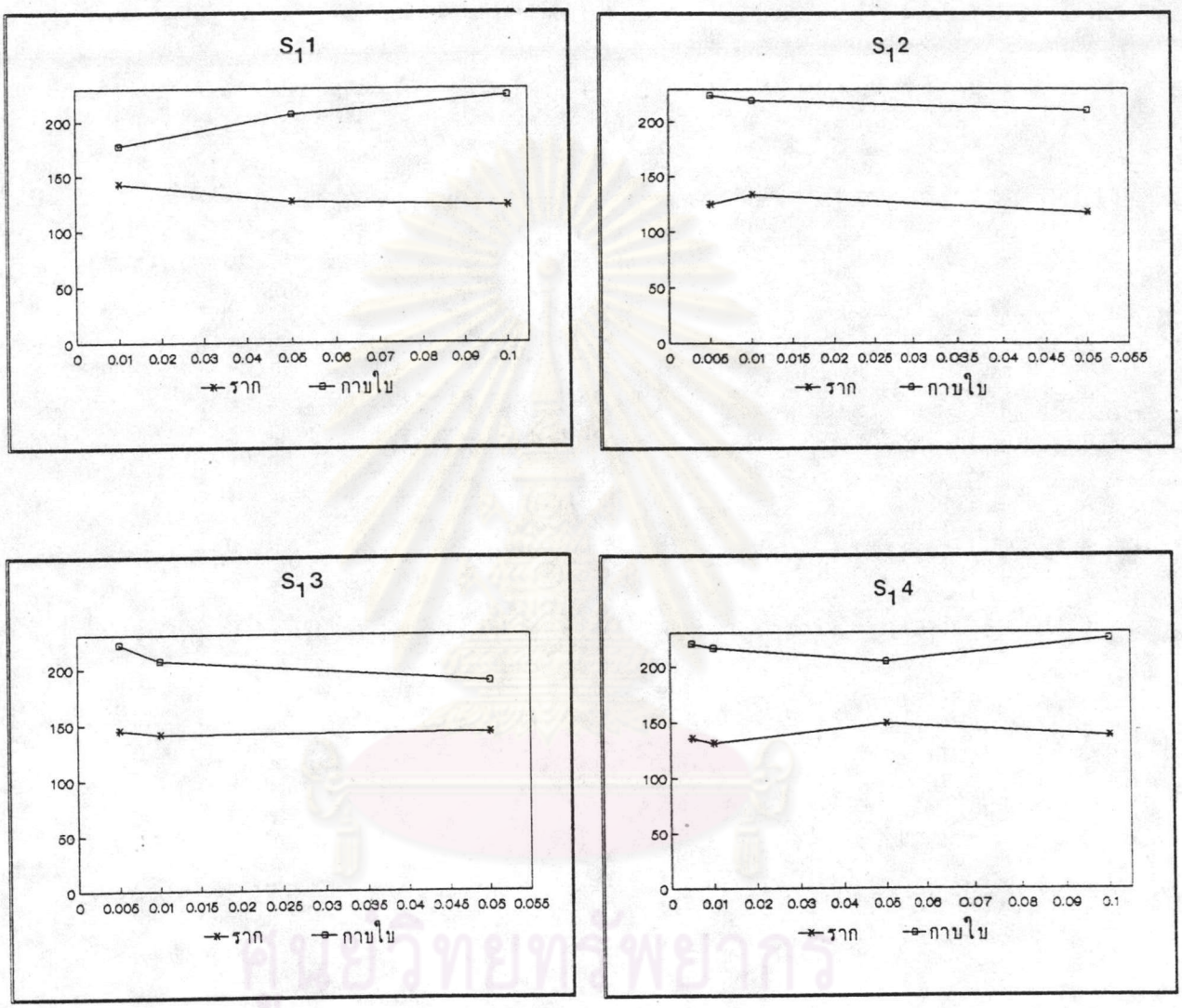
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ					
		0.001	0.005	0.01	0.02	0.05	0.10
$S_1$9	ราก	100.87	99.77	89.13	83.98	-	-
	กาบใบ	98.44	-	91.93	88.82	-	-
$S_1$10	ราก	102.34	100.00	99.77	95.07	-	-
	กาบใบ	93.48	96.09	92.25	88.99	-	-

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 7 พบว่าแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนแตกต่างกัน โดยพบว่า $S_1$9 ซึ่งมีองค์ประกอบ 1.82×10^{-1}% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง และความเข้มข้น 0.02 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวมากที่สุด รองลงมาคือ $S_1$6, $S_1$8 และ $S_1$7 ซึ่งมีองค์ประกอบ 1.17×10^{-1}%, 1.39×10^{-1}%, 1.95×10^{-2}% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง ตามลำดับ โดยพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 0.10 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม

จากนั้นนำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน มาสร้างกราฟซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ โดยเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อน เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน โดยมีแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซน (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 13

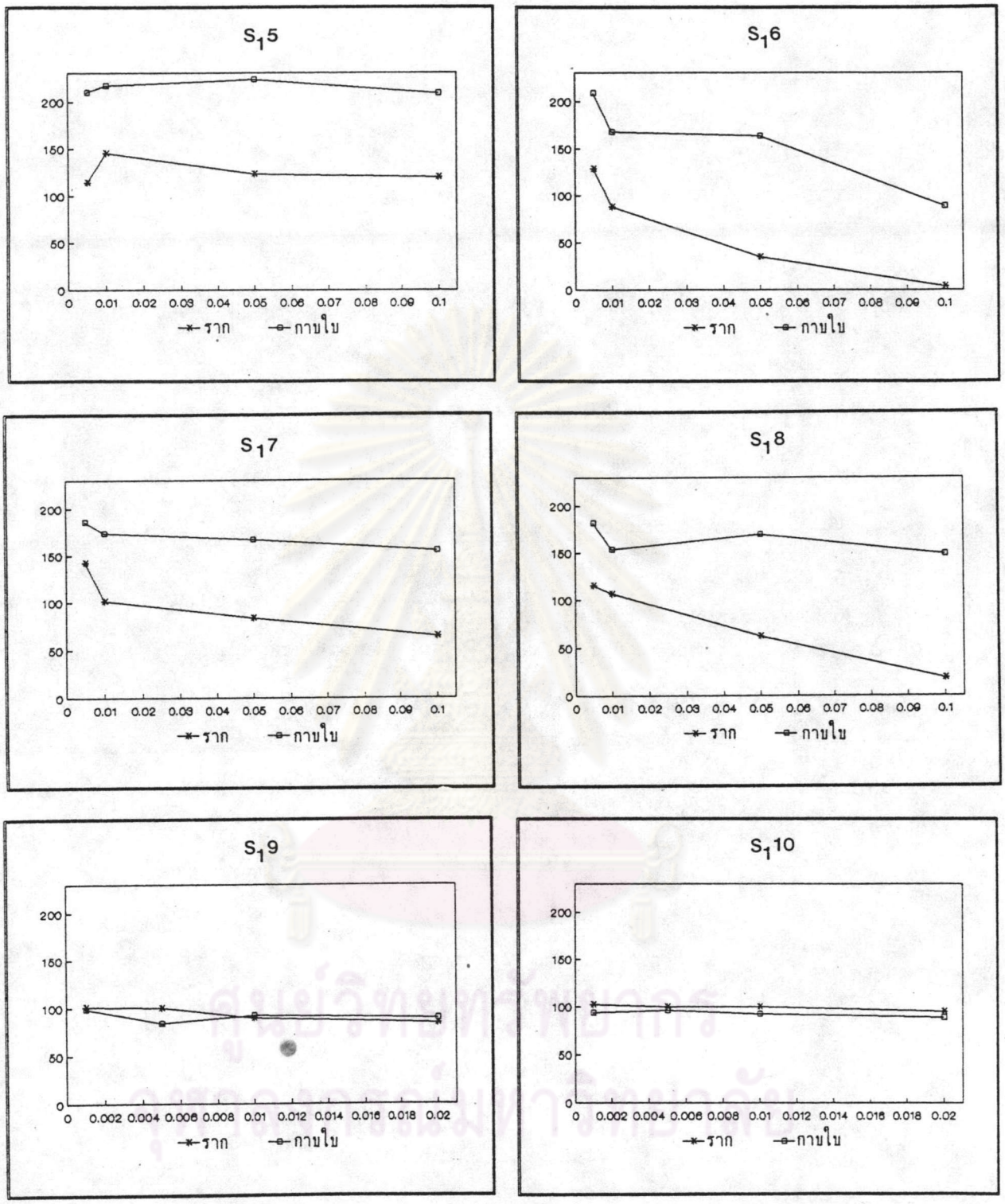


แกนตั้ง – เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน – ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 13 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของราก และกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจาก $S_1$1-$S_1$10ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แกนตั้ง – เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน – ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 13 (ต่อ)

2.8.3 การแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

โดยเลือกพิจารณาในแต่ละส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงมาทำการแยกสาร ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ และวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังนี้

2.8.3.1 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 70-102 ($S_1$8) จากข้อ 2.8.1

นำสารลำดับส่วนที่ 70-102 จากข้อ 2.8.1 ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวอมน้ำตาลหนัก 4.20 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 80.45 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 70-102 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1)	1-8	คราบตะกอนสีเหลืองอมส้ม	0.04
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1),(2:3) และ(3:7)	9-40	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาลปนผลึกสีเหลืองอ่อนแวววาว	1.89
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4)	41-55	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	0.48
	56	น้ำมันสีเขียวอมเหลือง	0.47
ไดคลอโรมีเทน	57-58	คราบน้ำมันสีเขียวอ่อน	0.03
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	59-60	น้ำมันสีน้ำตาลมีลักษณะเป็นเม็ดกลม	0.38

ตารางที่ 8 (ต่อ)

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:4)	61-63	น้ำมันสีเหลืองอมเขียวปนของแข็งสีเหลือง	0.02
เมทานอล	64-66	น้ำมันสีเหลืองขุ่น	0.08

2.8.3.2 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 103-104 ($S_1$9)จากข้อ 2.8.1

นำสารลำดับส่วนที่ 103-104 จากข้อ 2.8.1 ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวอมน้ำตาลหนัก 2.07 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 41.00 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 100 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 103-104 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:9)	1-32	ของแข็งสีขาวอมเหลือง	0.06
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)และ(13:2)	33-52	น้ำมันสีเขียวปนของแข็งสีขาว	0.52
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)และ(11:9)	53-68	น้ำมันสีน้ำตาลอมเหลือง	0.32

2.8.3.3 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 33-52 จากข้อ 2.8.3.2

นำสารลำดับส่วนที่ 33-52 จากข้อ 2.8.3.2 ลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวปนของแข็งสีขาวหนัก 0.52 กรัม มาขจัดสีของคลอโรฟิลล์และเม็ดสีต่าง ๆ โดยใช้วิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งประกอบด้วย zelite หนัก 6.40 กรัม ผสมกับ activated charcoal หนัก 1.99 กรัมเป็นตัวดูดซับ ตามวิธีการในข้อ 2.5.4 จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 33-52 โดยวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3)	1-3	ของแข็งสีขาว	0.24
ไดคลอโรมีเทน	4-8	คราบน้ำมันสีเขียวอมดำ	0.03
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	9-12	คราบน้ำมันสีเขียว	0.02
	13-15	คราบน้ำมันสีเหลืองอมเขียว	0.02
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)และ(1:4)	16-22	คราบน้ำมันสีเหลือง	0.01

2.8.3.4 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 105-108 ($S_1$9)จากข้อ 2.8.1

นำสารลำดับส่วนที่ 105-108 จากข้อ 2.8.1 ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวข้นหนัก 3.44 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 63.78 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการแยกสารของสารตัวอย่างส่วนที่ 105-108 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	สารตัวอย่างส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4)	1-4	น้ำมันสีเหลืองปนของแข็งสีขาว	0.15
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:9)	5-6	น้ำมันสีเหลือง	0.35
	7-17	น้ำมันสีเขียวปนผลึกสีเหลืองอ่อน	0.68
ไดคลอโรมีเทน	18-21	น้ำมันสีเขียวข้น	0.08
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)	22-24	น้ำมันสีเขียวข้น	1.44
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	25-26	น้ำมันสีเขียวอมเหลือง	0.22
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (4:1)	27-29	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	0.12
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)และ(1:4)	30-33	น้ำมันสีเหลืองขุ่น	0.24

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9 การแยกสารของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม

2.9.1 การแยกสารของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มหนัก 65.78 กรัม จากข้อ 2.6.2 มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยแบ่งมาเท่ากับ 37.22 กรัม ซึ่งใช้ซิลิกาเจล หนัก 473.00 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามากคือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับคลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายครั้งละ 800 ซม.^{3} นำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดาเพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 ซม.^{3} จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีทินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธีการในข้อ 2.5.3 รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกันแล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ, วิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟีและวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มแสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$S_2$1	เฮกเซน เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (9:1)และ(4:1)	1-35	น้ำมันสีน้ำตาลหนืด	1.76
$S_2$2	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (4:1)และ(3:1)	36-50	น้ำมันสีส้มอมน้ำตาลปนของแข็งสีขาว	2.10
$S_2$3	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (3:1)	51-58	น้ำมันสีน้ำตาลปนผลึกรูปเข็มสีขาว	2.46

ตารางที่ 12 (ต่อ)

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
S_24	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (7:3)(3:2)และ(11:9)	59-100	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	1.34
S_25	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (11:9)	101-120	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	0.62
S_26	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (11:9)และ(1:1)	121-136	น้ำมันสีเขียวอมเหลือง	0.61
S_27	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (9:11)และ(2:3)	137-163	น้ำมันสีเขียวอมเหลือง	0.55
S_28	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (3:7)และ(1:4)	164-199	น้ำมันสีเขียวปนของแข็งสีขาว	0.59
S_29	คลอโรฟอร์ม	200-204	น้ำมันสีเขียวอมดำ	16.45
S_210	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล	205-209	น้ำมันสีเขียวอมดำ	1.55
S_211	(19:1)	210-218	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	1.12
S_212	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (9:1)และ(17:3)	219-230	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีน้ำตาล	1.80
S_213	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (4:1),(2:3)และ(1:4)	231-252	น้ำมันสีน้ำตาลหนืด	2.76

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9.2 <u>การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ</u>

โดยนำแต่ละส่วนที่แยกได้ในข้อ 2.9.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ตามวิธีการในข้อ 2.7.1 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 13

<u>ตารางที่ 13</u> ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ					
		0.001	0.005	0.01	0.02	0.05	0.10
$S_2$1	ราก	105.16	108.75	119.29	-	99.53	-
	กาบใบ	88.35	89.32	83.77	-	91.93	-
$S_2$2	ราก	91.17	-	75.61	-	60.67	66.92
	กาบใบ	106.45	-	100.73	-	106.28	96.97
$S_2$3	ราก	-	85.53	92.03	-	82.01	70.53
	กาบใบ	-	94.36	92.89	-	87.47	67.07
$S_2$4	ราก	108.29	121.09	126.74	119.08	-	-
	กาบใบ	141.80	98.29	86.05	83.62	-	-
$S_2$5	ราก	102.66	115.64	131.98	120.34	-	-
	กาบใบ	102.69	106.10	145.71	88.35	-	-
$S_2$6	ราก	90.47	67.28	70.71	-	29.94	-
	กาบใบ	102.69	96.18	87.85	-	84.91	-

ตารางที่ 13 (ต่อ)

รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ					
		0.001	0.005	0.01	0.02	0.05	0.10
$S_2$7	ราก	93.12	73.74	66.46	-	10.86	-
	กาบใบ	102.37	88.82	79.22	-	74.00	-
$S_2$8	ราก	97.27	90.63	63.49	48.94	-	-
	กาบใบ	101.23	82.80	83.77	67.13	-	-
$S_2$9	ราก	-	85.61	81.55	-	73.03	89.29
	กาบใบ	-	102.69	100.35	-	87.67	83.12
$S_2$10	ราก	-	87.35	74.97	-	85.31	76.55
	กาบใบ	-	93.72	93.22	-	82.48	82.30
$S_2$11	ราก	91.00	65.98	50.19	-	9.83	-
	กาบใบ	81.01	68.60	63.23	-	4.08	-

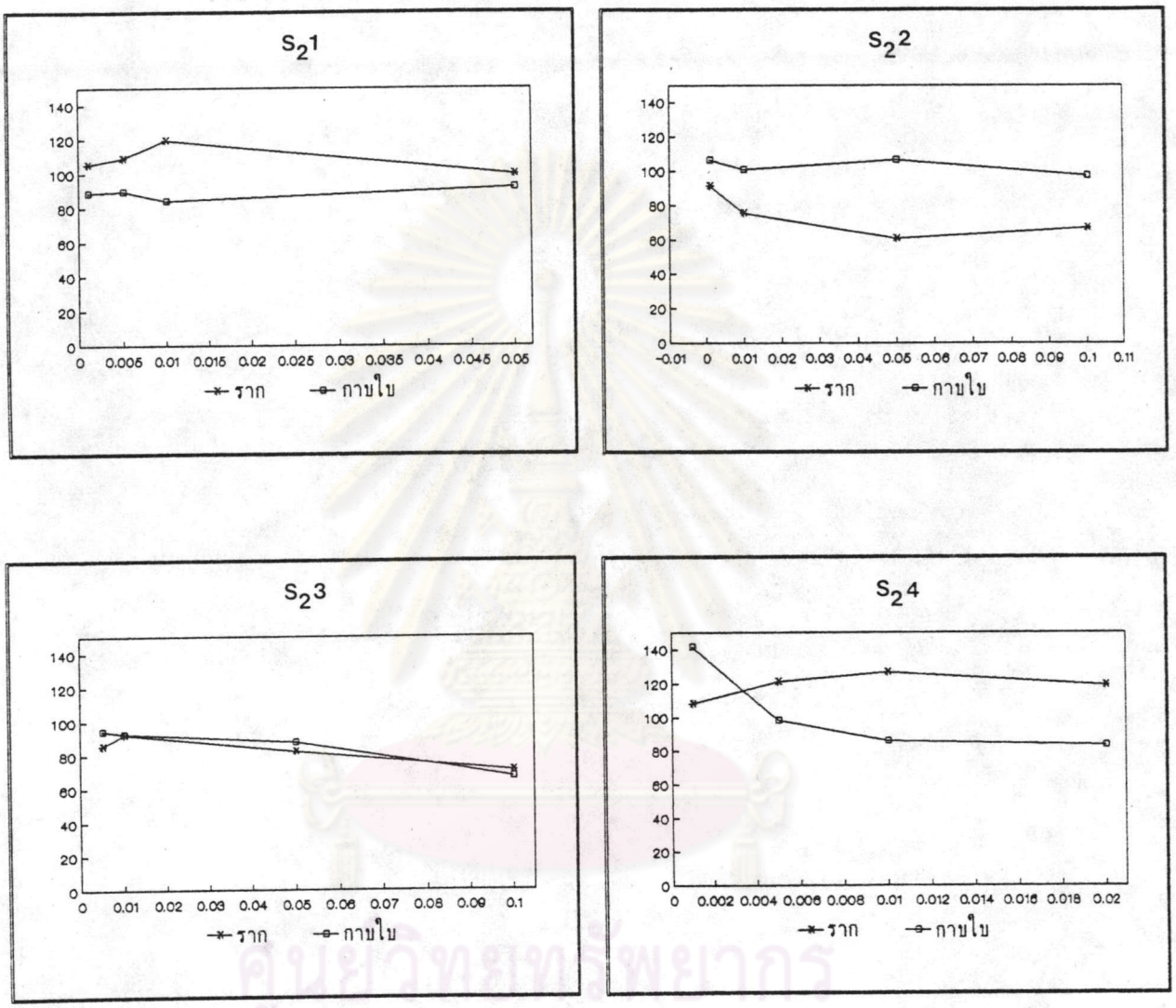
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 (ต่อ)

รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ							
		0.001	0.005	0.0087	0.01	0.0175	0.02	0.05	0.10
$S_2$12	ราก	-	-	91.24	-	69.98	-	42.60	20.25
	กาบใบ	-	-	78.05	-	67.63	-	52.96	44.01
$S_2$13	ราก	91.64	109.15	-	115.72	-	108.13	-	-
	กาบใบ	88.99	88.35	-	78.08	-	65.95	-	-

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 13 พบว่าแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนแตกต่างกัน โดยพบว่า $S_2$11 ซึ่งมีองค์ประกอบ 4.04×10^{-2}% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง และความเข้มข้น 0.05 กรัม:เซลลูโลส 1.5 แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือ $S_2$12 มีองค์ประกอบ 6.49×10^{-2}% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง และความเข้มข้น 0.10 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม, $S_2$8 มีองค์ประกอบ 2.13×10^{-2}% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง และความเข้มข้น 0.02 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม, $S_2$7 และ $S_2$6 ที่มีองค์ประกอบ 1.98×10^{-2}% และ 2.20×10^{-2}% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง ตามลำดับ โดยพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 0.05 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม

จากนั้นนำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ โดยเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อน เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม โดยที่แกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 14

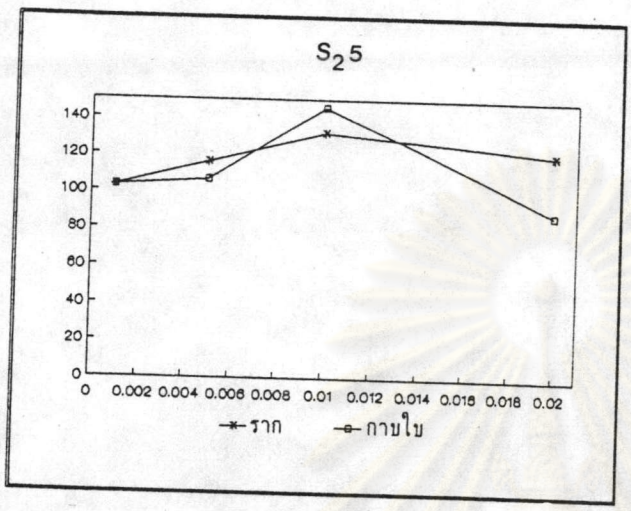


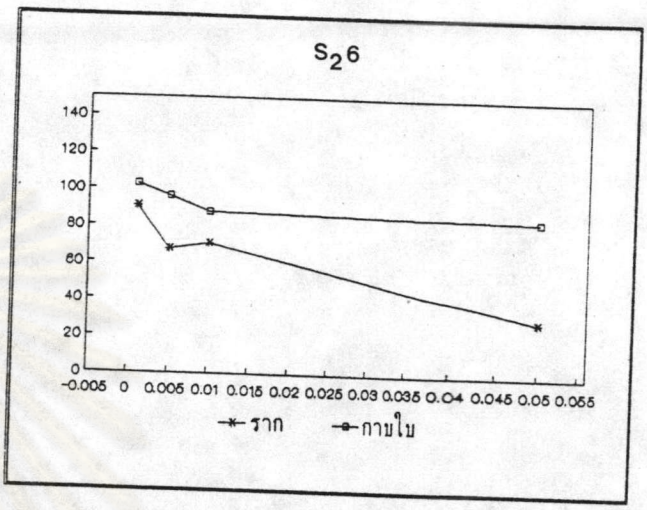
แกนตั้ง – เปอร์เซ็นต์ความยาว

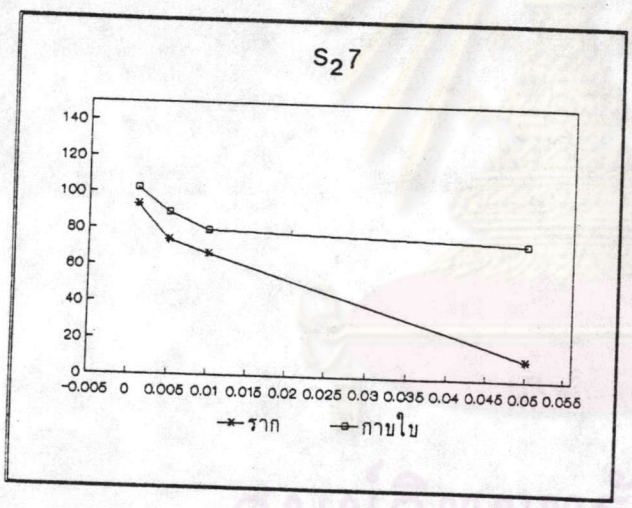
แกนนอน – ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

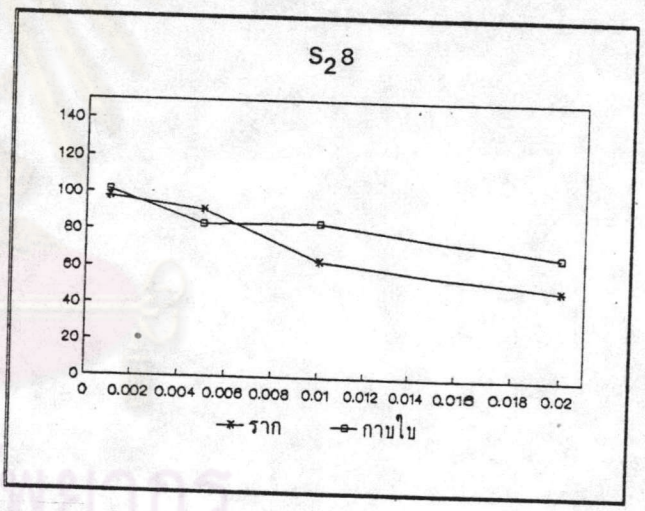
รูปที่ 14 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของราก และกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจาก $S_2$1-$S_2$13 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





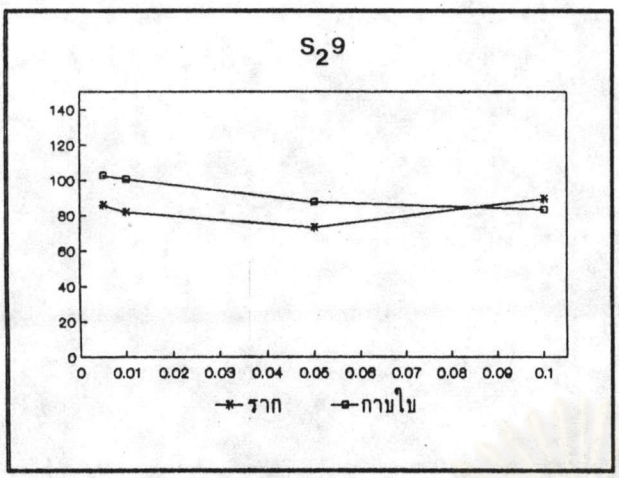


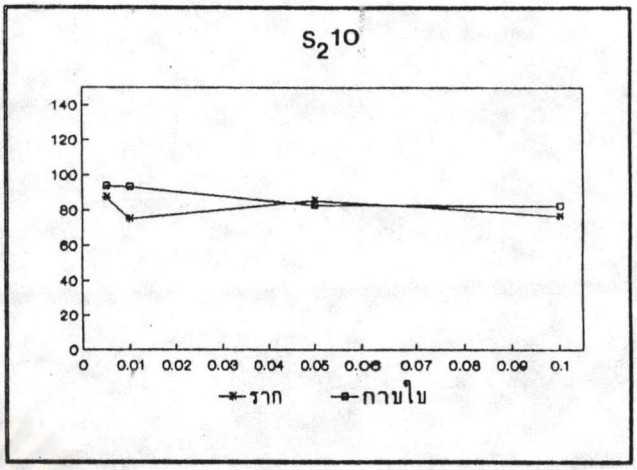


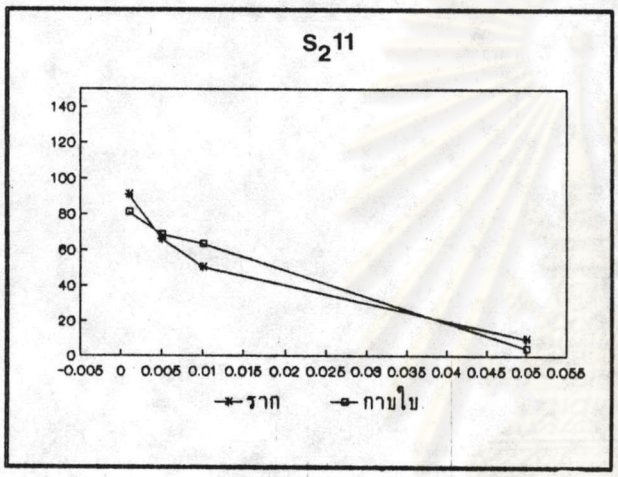
แกนตั้ง - เปอร์เซ็นต์ความยาว

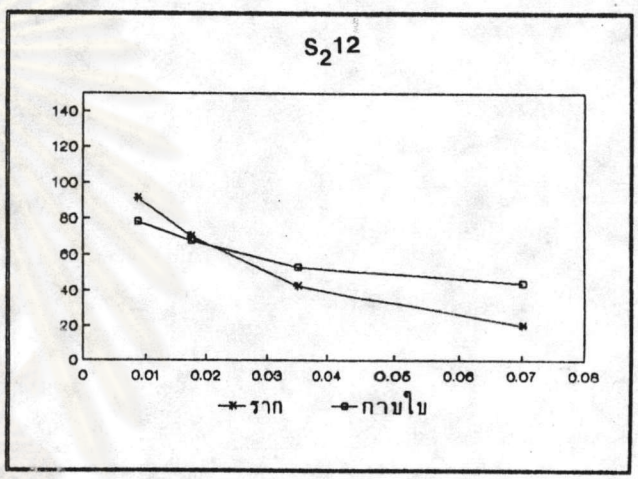
แกนนอน - ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

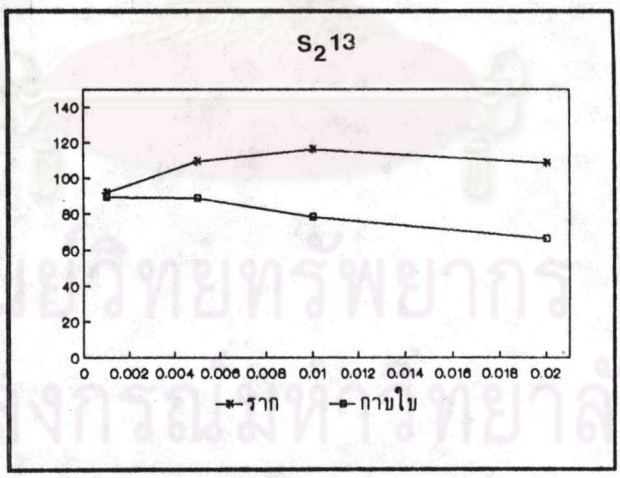
รูปที่ 14 (ต่อ)











แกนตั้ง – เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน – ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 14 (ต่อ)

2.9.3 การแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

โดยเลือกพิจารณาในแต่ละส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ และวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังนี้

2.9.3.1 การแยกสารลำดับส่วนที่ 164-199 ($S_2$8) จากข้อ 2.9.1

นำสารลำดับส่วนที่ 164-199 จากข้อ 2.9.1 มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวปนของแข็งสีขาวหนัก 0.59 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโท-กราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 12.99 กรัม เป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 100 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 164-199 โดยวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:7)	1-8	คราบของแข็งสีขาว	0.001
ไดคลอโรมีเทน และ ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (99:1)	9-12	ของแข็งสีขาว	0.290
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (99:1)	13-14	น้ำมันสีเขียวข้น	0.040
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)และ(9:1)	15-18	น้ำมันสีเหลือง	0.030

2.9.3.2 การแยกสารลำดับส่วนที่ 200-204 ($S_2$9) จากข้อ 2.9.1

นำสารลำดับส่วนที่ 200-204 จากข้อ 2.9.1 มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวอมดำ โดยแบ่งมาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีหนัก 3.35 กรัม และใช้อลูมินา NO. 1076 หนัก 36.71 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 100 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 200-204 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
ไดคลอโรมีเทน	1-25	ของแข็งสีเขียวอมน้ำตาล	0.28
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)และ(9:1)	26-52	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	0.35
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (17:3),(4:1)และเมทานอล	53-91	ของแข็งสีขาวอมเขียว	1.59

2.9.3.3 การแยกสารลำดับส่วนที่ 53-91 จากข้อ 2.9.3.2

นำสารลำดับส่วนที่ 53-91 จากข้อ 2.9.3.2 ลักษณะเป็นของแข็งสีขาวอมเขียว มาทำการแยกด้วยวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี เพื่อขจัดสีของคลอโรฟิลล์และเม็ดสีต่าง ๆ โดยแบ่งทำ 2 ครั้ง ๆ ละ 0.59 กรัม และ 1.00 กรัม ตามลำดับ โดยครั้งที่ 1 ใช้ zelite หนัก 5.90 กรัม ผสมกับ activated charcoal หนัก 2.10 กรัม ส่วนครั้งที่ 2 ใช้ zelite หนัก 11.30 กรัม ผสมกับ activated charcoal

หนัก 4.05 กรัม ตามวิธีการในข้อ 2.5.4 จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 53-91 โดยวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน	1-2	ของแข็งสีขาว	0.19
(1:4)	3-7	คราบสีขาว	0.06
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน	8-13	คราบสีขาว	0.08
ไดคลอโรมีเทน	14-17	ของแข็งสีขาวอมเหลือง	0.14
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล	18-20	ของแข็งสีขาว	0.05
(9:1)			
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล	21-27	คราบสีขาว	0.03
(4:1)และ(3:2)			

2.9.3.4 การแยกสารลำดับส่วนที่ 210-218 ($S_2$11) จากข้อ 2.9.1

นำสารลำดับส่วนที่ 210-218 จากข้อ 2.9.1 มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวอมน้ำตาลหนัก 0.92 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 62.21 กรัม เป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 210-218 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
ไดคลอโรมีเทน	1-7	คราบตะกอนสีเขียวอมน้ำตาล	0.02
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)	8-11	คราบตะกอนสีเขียว	0.05
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)และ(4:1)	12-15	แผ่นของแข็งสีน้ำตาล	0.41
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (7:3)	16-17	ตะกอนสีเขียวอมดำ	0.05
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)และ(1:4)	18-26	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาล	0.15

2.9.3.5 การแยกสารลำดับส่วนที่ 219-230 ($S_2$12) จากข้อ 2.9.1

นำสารลำดับส่วนที่ 219-230 จากข้อ 2.9.1 ลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลเข้มหนัก 1.80 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 74.94 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 219-230 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:17)	1-2	น้ำมันสีน้ำตาลหนืด	0.09
	3-5	คราบสีขาว	0.01
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:17) และ ไดคลอโรมีเทน	6-9	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	0.01
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)	10-12	น้ำมันสีเขียวขุ่น	0.02
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	13-16	น้ำมันสีเขียวอ่อน	0.14
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (4:1)	17-20	น้ำมันสีเขียวอมเหลือง	0.77
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (7:3)และ(1:1)	21-24	น้ำมันสีน้ำตาลขุ่น	0.06
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)และ(1:4)	25-32	น้ำมันสีน้ำตาลอมเขียว	0.55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.10 การแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอล

2.10.1 การแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอล โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

หลังจากนำสิ่งสกัดในเมทานอล จากข้อ 2.6.3 มาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต ตามวิธีการในข้อ 2.6.4 จะได้สิ่งสกัดในเมทานอลที่เหลือหนัก 150.14 กรัม นำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยแบ่งสิ่งสกัดในเมทานอลมาเท่ากับ 49.98 กรัม ซึ่งใช้ซิลิกาเจลหนัก 850.00 กรัมเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วน้อยไปหามากคือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 800 ซม.^{3} นำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 ซม.^{3} จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่โดยใช้ทินเลร์โครมาโทกราฟี ตามวิธีการในข้อ 2.5.3 รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีการตกผลึก, หรือการใช้ high performance liquid chromatography ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอล แสดงดังตารางที่ 19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอล โดยวิธีควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
S_31	ไดคลอโรมีเทน	1-7	คราบสีเหลืองอมเขียว	0.07
	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)	8-12	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีขาวหนืด	2.25
S_32	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)และ(9:1)	13-27	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีเหลือง	9.52
S_33	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)และ(4:1)	28-45	น้ำมันสีน้ำตาลหนืดปนของแข็งสีเหลือง	25.77
S_34	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (4:1)	46-57	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	3.71
S_35	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (7:3)	58-61	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	2.50
S_36	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (3:2)	62-71	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	2.69
S_37	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1),(2:3) และ (3:7)	72-93	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	0.29
S_38	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:4) และ เมทานอล	94-102	น้ำมันสีน้ำตาลขุ่นหนืด	1.19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.10.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดยนำแต่ละส่วนที่แยกได้ ในข้อ 2.10.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ตามวิธีการในข้อ 2.7.1 ผลการทดสอบแสดงดังตาราง ที่ 20

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเมทานอล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

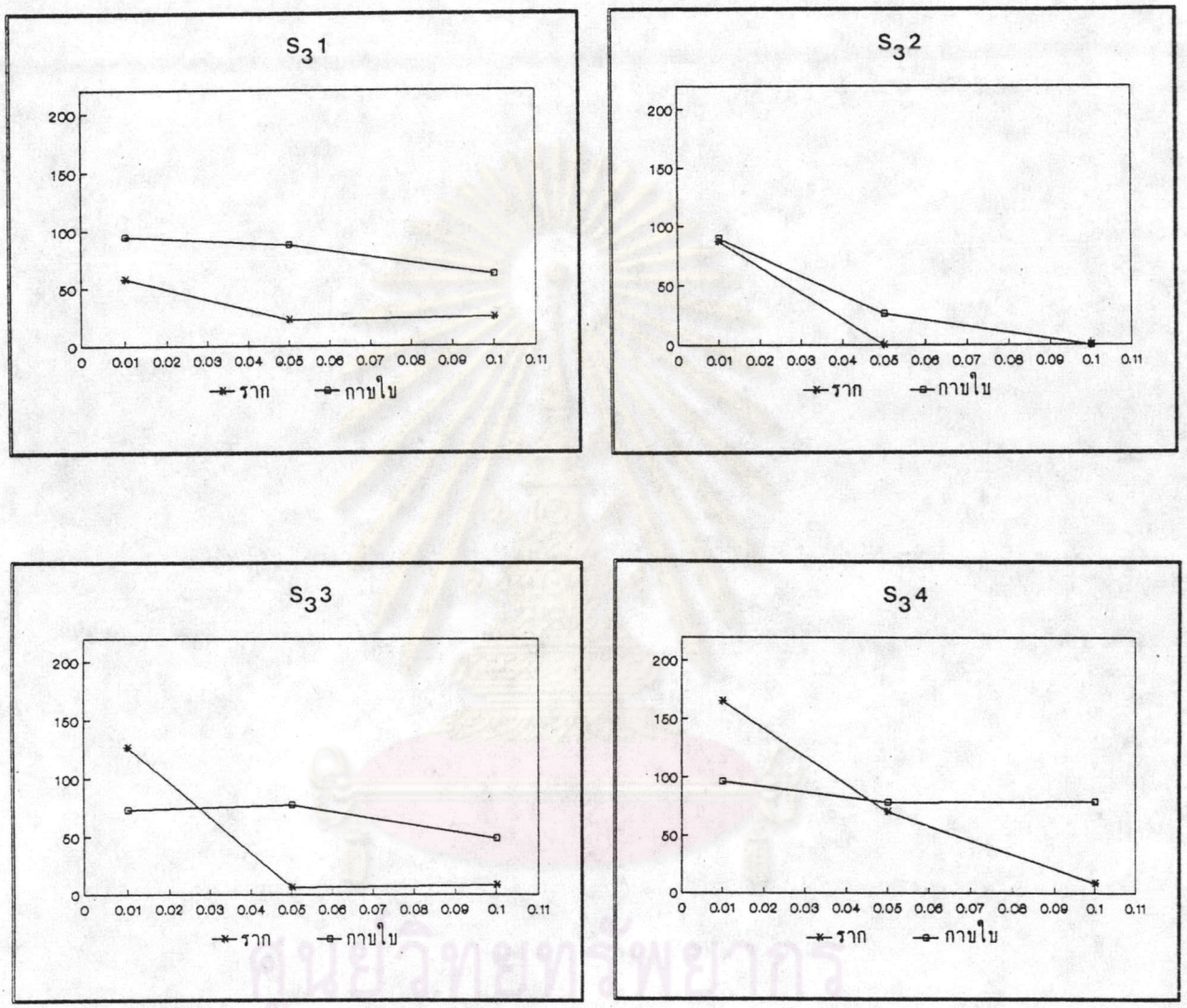
รหัส	ส่วนของต้นข้าว ที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
		0.01	0.05	0.10
$S_3$1	ราก	57.64	22.24	24.64
	กาบใบ	94.35	87.37	61.79
$S_3$2	ราก	86.97	0.00	0.00
	กาบใบ	89.70	25.91	0.00
$S_3$3	ราก	126.43	6.28	7.95
	กาบใบ	73.00	77.30	48.47
$S_3$4	ราก	165.25	70.05	8.32
	กาบใบ	96.32	78.22	79.14
$S_3$5	ราก	145.29	75.60	34.38
	กาบใบ	100.92	77.30	77.61
$S_3$6	ราก	120.33	123.66	40.11
	กาบใบ	114.42	79.75	65.64

ตารางที่ 20 (ต่อ)

รหัส	ส่วนของต้นข้าว	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
	ที่ศึกษา	0.01	0.05	0.10
S_37	ราก	138.82	111.64	47.13
	กาบใบ	125.15	87.12	45.40
S_38	ราก	145.66	209.98	211.27
	กาบใบ	104.29	94.79	78.22

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 20 พบว่า ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเมทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนแตกต่างกัน โดยพบว่า S_32 ซึ่งมีองค์ประกอบ $5.84x10^{-1}$% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือ S_33 และ S_34 ซึ่งมีองค์ประกอบ 1.58% และ $2.29x10^{-1}$% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง ตามลำดับ โดยจะพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 0.10 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม

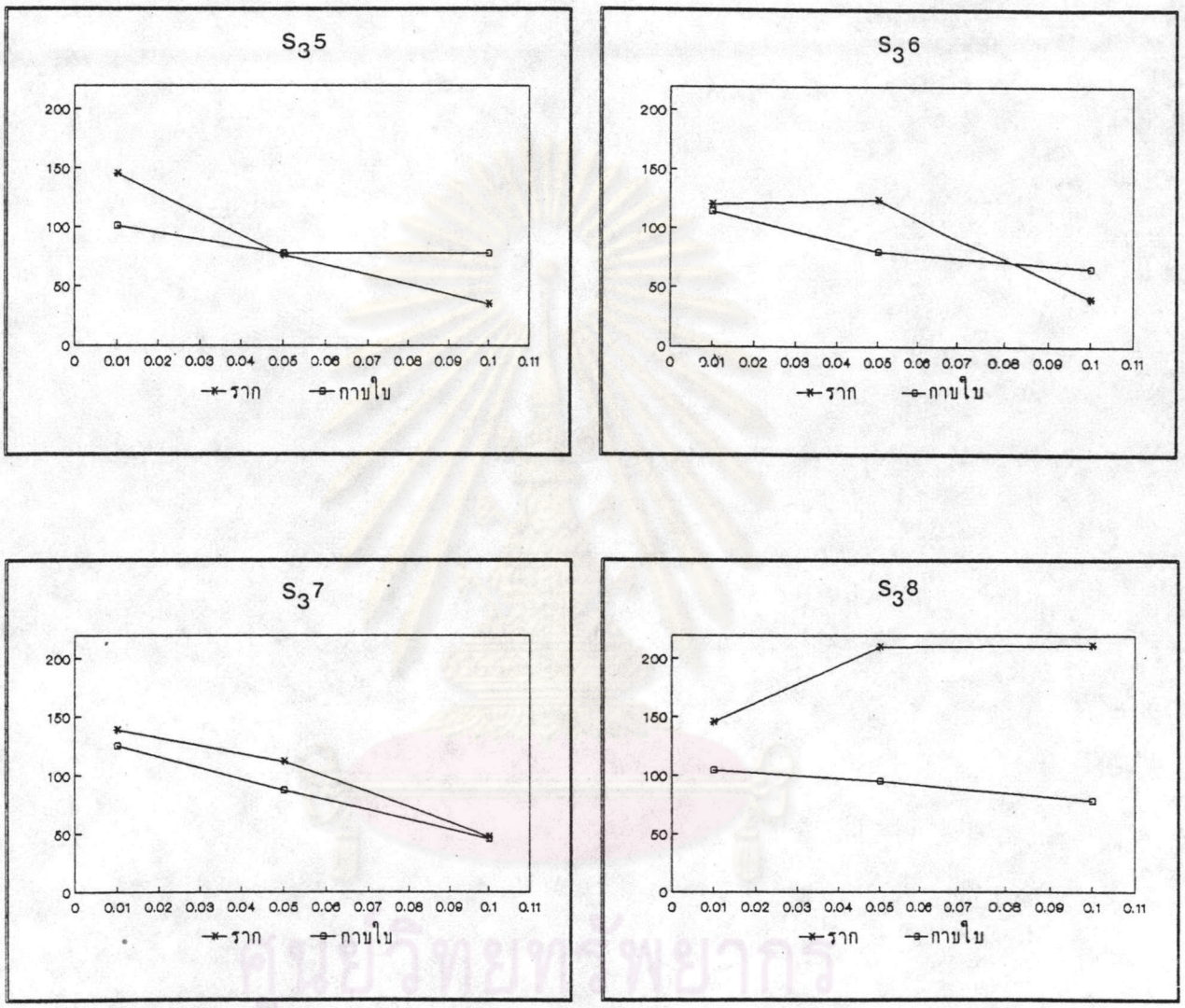
จากนั้นนำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเมทานอล มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ โดยเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อน เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเมทานอล โดยที่แกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเมทานอล (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 15



แกนตั้ง - เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน - ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 15 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของราก และกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจาก $S_3 1$-$S_3 8$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



แกนตั้ง – เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน – ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 15 (ต่อ)

2.10.3 การแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

โดยเลือกพิจารณาในแต่ละส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง มาทำการแยกด้วยวิธี high performance liquid chromatography

2.10.3.1 การแยกสารลำดับส่วนที่ 28-45 ($S_3$3) จากข้อ 2.10.1

นำสารลำดับส่วนที่ 28-45 จากข้อ 2.10.1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองปนน้ำมันสีน้ำตาลหนักหนัก 4.00 กรัม มากรองแยกของแข็งสีเหลืองออก แล้วจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยวิธี preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-121 C, ตัวทำละลายที่ใช้ในการพาสารคือ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (4:1), อัตราการไหลของตัวทำละลาย 16.50 ซม.^{3}/นาที, ความดัน 25 บาร์)

2.11 การแยกสารของสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต

2.11.1 การแยกสารของสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตตหนัก 14.99 กรัม จากข้อ 2.6.4 มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยแบ่งมาทำ 2 ครั้ง ๆ ละ 6.69 กรัม และ 8.03 กรัม ซึ่งใช้อลูมินา NO.1076 หนัก 81.42 กรัม และใช้ซิลิกาเจล หนัก 79.88 กรัม ตามลำดับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วน้อยไปหามากคือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 150 ซม.^{3} นำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดาเพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-20 ซม.^{3} จากนั้นนำสารละลายที่ได้แต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีทินแลร์โครมาโทกราฟี ตามวิธีการในข้อ 2.5.3 รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ และวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต แสดงดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
S_41	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1)	1-9	น้ำมันสีน้ำตาลใส	0.23
S_42	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3)และ(3:7)	10-19	น้ำมันสีน้ำตาลอมส้มปนผลึกรูปเข็ม	0.28
S_43	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4)และ(1:9)	20-42	น้ำมันสีเขียวเข้มอมน้ำตาล	0.11
S_44	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)	43-52	น้ำมันสีน้ำตาล	5.26
S_45	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)และ(4:1)	53-59	น้ำมันสีน้ำตาลหนืด	1.15
S_46	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (7:3)และ(3:2)	60-75	น้ำมันสีน้ำตาลอมดำ	0.60
S_47	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)และ(1:4)	76-90	ตะกอนสีน้ำตาล	2.37

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.11.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดยนำแต่ละส่วนที่แยกได้ ในข้อ 2.11.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ตามวิธีการในข้อ 2.7.1 ผลการทดสอบแสดงดังตาราง ที่ 22

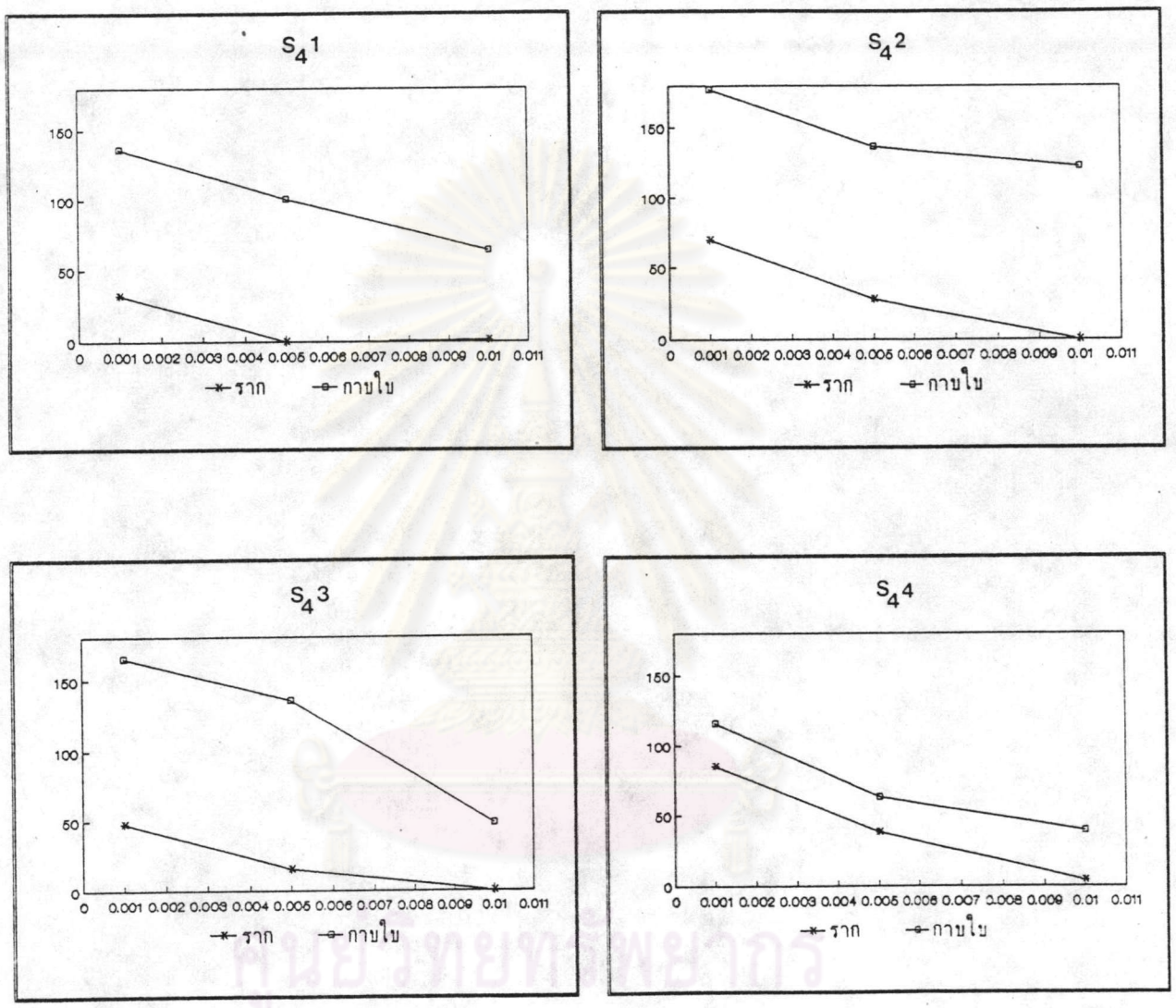
ตารางที่ 22 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รหัส	ส่วนของต้นข้าว	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
	ที่ศึกษา	0.001	0.005	0.010
S_41	ราก	31.87	0.00	0.88
	กาบใบ	136.43	100.77	63.56
S_42	ราก	69.67	27.47	0.00
	กาบใบ	177.52	136.43	122.48
S_43	ราก	47.69	15.16	0.00
	กาบใบ	165.12	135.64	48.06
S_44	ราก	85.26	38.11	3.85
	กาบใบ	115.98	62.83	39.41
S_45	ราก	94.42	75.83	6.11
	กาบใบ	123.79	100.74	62.08
S_46	ราก	91.50	104.78	96.41
	กาบใบ	98.14	108.18	104.83
S_47	ราก	94.29	95.62	82.07
	กาบใบ	103.72	93.32	91.45

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 22 นั้นพบว่า แต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนแตกต่างกัน โดยพบว่า S_44 ซึ่งมีองค์ประกอบ $1.09x10^{-1}$% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือ S_45, S_43 และ S_41 ที่มีองค์ประกอบ $2.39x10^{-2}$%, $2.29x10^{-3}$% และ $4.78x10^{-3}$% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง ตามลำดับ โดยจะพิจารณาที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 0.01 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม

จากนั้นนำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต มาสร้างกราฟแสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบโดยเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อน เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 16

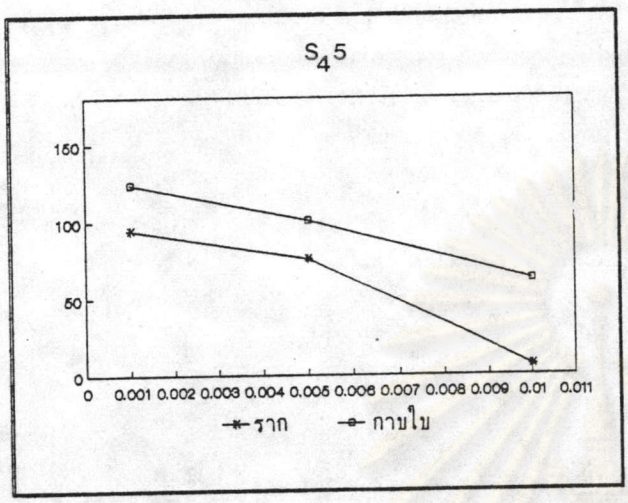
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

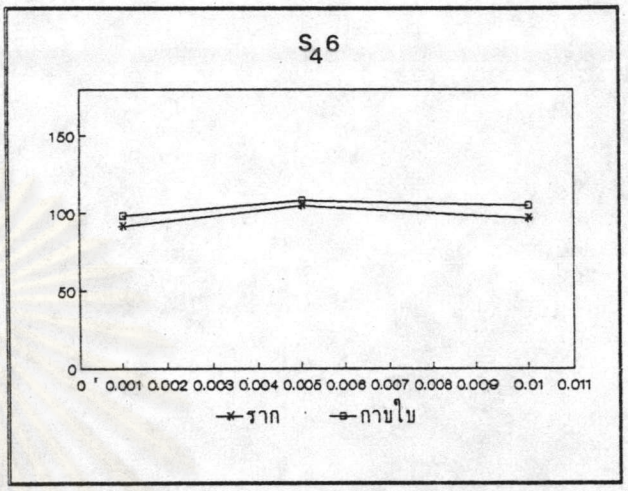


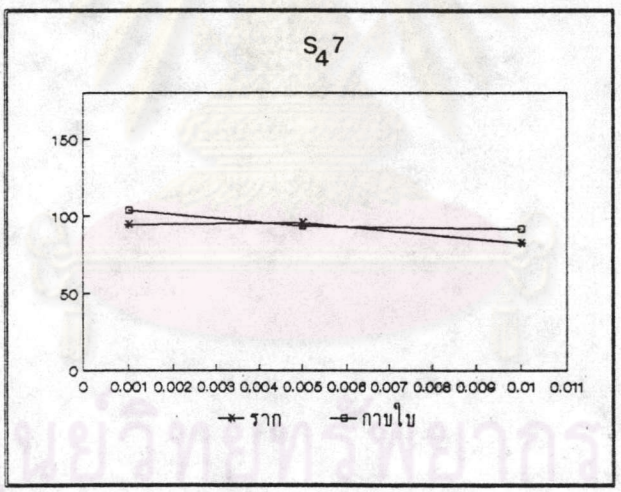
แกนตั้ง - เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน - ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 16 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของราก และกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจาก $S_4$1-$S_4$7 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ







แกนตั้ง – เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน – ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 16 (ต่อ)

2.12 การทำสารให้บริสุทธิ์ และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารในสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม และเอทิลแอซิเตต จากต้นงาขาวร้อยเอ็ด

2.12.1 การทำสาร ก ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ก มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว ได้จากลำดับส่วนที่ 1-14 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 6) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน และเมื่อนำ สาร ก มาตกผลึกด้วยแอซิโตน-เฮกเซน จะได้แผ่นผลึกแววาวสีขาวหนัก 1.23 กรัม (4.10×10^{-2} %โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 65-67 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.94 [เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (9:1)] สาร ก ละลายได้ดีในเฮกเซน แต่ละลายได้เล็กน้อยในไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, 2,4 DNP, 5% $FeCl_3$ และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 2920,2860 (C-H), 1480-1470, 1375 (C-H bending), 730-720 ($(-CH_2-)_n$ $n \geq 4$) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 17

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 0.83 (t,CH_3), 1.30 (s,CH_2) และ 1.65 (s,CH_2) ppm ดังในรูปที่ 18

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ δ 14.0, 23.0, 28.0, 29.0 และ 32.0 ppm ดังในรูปที่ 19

จากการทดสอบรีเอเจนต์ต่าง ๆ และข้อมูลทางสเปกตรัม พบว่า สาร ก น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง ดังนั้นจึงนำ สาร ก มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิของคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียล และการไหลของ N_2 50 มิลลิลิตร/นาที) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอน 27, 28, 29, 30, 31, 32 และ 33 ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังในรูปที่ 20 จากนั้นจึงสร้างกราฟการเทียบมาตรฐานระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐาน

ไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง ได้กราฟเส้นตรง ดังในรูปที่ 21 เมื่อนำค่า log retention time ของ สาร ก มาอ่านเทียบกับกราฟ ก็จะสามารถหาจำนวนคาร์บอนของ สาร ก ได้ ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงและ สาร ก กับจำนวนคาร์บอน

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน	ปริมาณสาร (%)
heptacosane (C_{27})	8.13	0.91	27	0.31
octacosane (C_{28})	10.43	1.02	28	0.87
nonacosane (C_{29})	13.32	1.12	29	24.18
triacontane (C_{30})	17.28	1.24	30	9.17
hentriacontane (C_{31})	22.45	1.35	31	50.14
dotriacontane (C_{32})	29.12	1.46	32	8.41
tritriacontane (C_{33})	37.85	1.58	33	6.92
สาร ก	13.51	1.13	29	1.98
	17.36	1.24	30	1.03
	22.36	1.35	31	26.12
	29.30	1.46	32	7.34
	38.16	1.58	33	62.63
	45.44	1.66	34	0.88

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.12.2 การทำสาร ข ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ข มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวอยู่ในน้ำมันสีเหลือง ซึ่งได้จากลำดับส่วนที่ 15-26 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 6) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน (9:1) และเมื่อนำ สาร ข มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล จะได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 0.06 กรัม (2.10×10^{-3} % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 80-81 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.90 [เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (9:1)] สาร ข ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทนและคลอโรฟอร์ม แต่จะละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน, เมทานอลและเอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับ 5% $FeCl_3$ และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 2920, 2840 (C-H), 1730 (C=O), 1450 (CH_2), 1170 (C-O) และ 730-720 ($(-CH_2-)_n$ $n \geq 4$) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 22

จากการทดสอบรีเอเจนต์ต่าง ๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่า สาร ข น่าจะเป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์โซ่ตรง ดังนั้นจึงนำ สาร ข มาไฮโดรไลส์

การไฮโดรไลส์สาร ข ด้วยด่าง (41)

นำ สาร ข มา 0.03 กรัม เติมสารละลาย 5% NaOH ในเอทานอล 10 ซม.^{3} เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำมารีฟลักซ์บนอ่างน้ำเดือดประมาณ 5-7 ชั่วโมง โดยตรวจสอบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่ โดยการทำทินแลร์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และไดคลอโรมีเทนเป็น developing solvent เมื่อเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์แล้วจึงนำสารละลายมากำจัดตัวทำละลายออก โดยวิธีการกลั่นแบบลดความดัน นำสารละลายที่ได้ไปแขวนลอยในน้ำ แล้วสกัดส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ส่วนที่เป็นเกลือโซเดียมของกรดก็ยังคงละลายอยู่ในน้ำ

การศึกษาส่วนของแอลกอฮอล์

นำสารละลายแอลกอฮอล์ที่ได้ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์ มากำจัดน้ำด้วย anh. Na_2SO_4 นำไประเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก จากนั้นจึงนำมาตกผลึกด้วยเฮกเซนได้ของแข็งอสัณฐานสีขาว (สาร 1ข)

สาร 1ข มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 75-76 องศาเซลเซียล ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard แสดงว่า สาร 1ข ไม่ใช่สารประกอบประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ และเมื่อทำทินแลร์โครมาโทกราฟี พบว่า สาร 1ข มีค่า R_f เท่ากับแอลกอฮอล์โซ่ตรงที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

ดังนั้นจึงทำการยืนยันโครงสร้างของ สาร 1ข ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิของคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียล และการไหลของ N_2 50 มิลลิลิตร/นาที) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอน 28, 29, 30, 31 และ 32 ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 23 จากนั้นจึงสร้างกราฟการเทียบมาตรฐานระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง ดังในรูปที่ 24 เมื่อนำค่า log retention time ของ สาร 1ข มาอ่านเทียบกับกราฟ ก็จะสามารถหาจำนวนคาร์บอนของ สาร 1ข ได้ ดังแสดงในตารางที่ 24

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง และ สาร 1ข กับจำนวนคาร์บอน

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน	ปริมาณสาร (%)
octacosanol	7.26	0.86	28	2.89
nonacosanol	9.47	0.98	29	1.26
triacontanol	11.84	1.07	30	24.12
hentriacontanol	15.37	1.19	31	7.35
dotriacontanol	19.81	1.30	32	64.38
สาร 1ข	7.14	0.85	28	1.21
	9.26	0.97	29	0.53
	11.44	1.06	30	32.15
	15.39	1.19	31	3.38
	19.29	1.29	32	60.03
	25.56	1.41	34	0.15
	33.59	1.53	35	2.54

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาส่วนของกรด

เมื่อนำชั้นน้ำมาทำให้เป็นกรดด้วย dil.HCl แล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์หลาย ๆ ครั้ง นำชั้นอีเทอร์มาทำให้แห้งด้วย anh.Na_2SO_4 จากนั้นจึงกรอง แล้วจึงนำไประเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ปรากฏว่าเหลือสารอยู่ปริมาณน้อยมาก จึงไม่สามารถนำไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของส่วนกรดได้ และทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของ สาร ข ได้ทั้งหมด

2.12.3 การทำสาร ค ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ค มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวอยู่ในน้ำมันสีส้ม จากลำดับส่วนที่ 34-36 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 6) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (4:1) และจากลำดับส่วนที่ 36-50 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 12) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (4:1) และ (3:1) และเมื่อนำ สาร ค มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล จะได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 0.03 กรัม (1.05×10^{-3} % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 81-82 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.49 [เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (9:1)] สาร ค ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทนและคลอโรฟอร์ม แต่ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน, เมทานอล และเอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบ 5% $FeCl_3$ และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3500-3100 (O-H), 2910,2840 (C-H), 1460 (CH_2), 1050 (C-O) และ 730-720 ($(-CH_2-)_n$ $n \geq 4$) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 25

จากการทดสอบรีเอเจนต์ต่าง ๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่า สาร ค น่าจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์ไซ่ตรง ดังนั้นจึงนำ สาร ค มาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียล และการไหลของ N_2 50 มิลลิลิตร/นาที) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์ไซ่ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอน 34, 35 และ 36 ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังในรูปที่ 26 จากนั้นจึงสร้างกราฟการเทียบมาตรฐานระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์ไซ่ตรง ดังในรูปที่ 27 เมื่อนำค่า log retention time ของ สาร ค มาอ่านเทียบกับกราฟ ซึ่งจะทำให้ทราบจำนวนคาร์บอนของ สาร ค ได้ ดังแสดงในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง และ สาร ค กับจำนวนคาร์บอน

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน	ปริมาณสาร (%)
tetratriacontanol	22.10	1.34	34	38.33
pentatriacontanol	28.84	1.46	35	27.28
heptatriacontanol	37.47	1.57	36	33.85
สาร ค	5.15	0.71	28	3.37
	8.10	0.91	30	3.08
	13.19	1.12	32	25.29
	17.54	1.24	33	7.39
	22.10	1.34	34	60.87

2.12.4 การทำสาร ง ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ง มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาวอยู่ในน้ำมันสีเหลือง จากลำดับส่วนที่ 48-52 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 6) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1) นอกจากนี้ยังได้จากลำดับส่วนที่ 51-58 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 12) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (3:1) และจากลำดับส่วนที่ 10-19 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 21) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3) และ (3:7) ซึ่งเมื่อนำ สาร ง มาตกผลึกด้วยเฮกเซน จะได้ผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 0.80 กรัม (2.7×10^{-2} % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 140-143 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.67 [เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)] สาร ง จะละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน, คลอโรฟอร์ม, อีเทอร์, เมทานอล, เอทานอล, แอซิโตนและเอทิลแอซิเตต แต่จะละลาย

ได้เล็กน้อยในเฮกเซน นอกจากนี้ยังให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-3300 (O-H), 2980-2940 (=C-H), 1650-1640 (C=C), 1460 (CH_2), 1380 (CH_3), 1060 -1050 (C-O), 970,960 (disubstituted vinyl) และ 840,800 (trisubstituted vinyl) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 28

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ,$CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 0.50-2.50 (m,CH_2,CH_3 และ CH), 3.65 (m,CH_2-X), 5.00-5.30 (m,-CH=CH-) และ 5.50 (d, C=CH-) ppm ดังในรูปที่ 29

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ,$CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของ 37 คาร์บอนที่ δ 11.78, 11.90, 11.97, 12.18, 18.60, 18.70, 18.91, 18.96, 19.33, 21.00, 21.15, 24.22, 24.29, 25.34, 28.16, 28.85, 31.55, 31.81, 33.86, 36.42, 37.17, 39.59, 40.43, 42.12, 42.20, 45.74, 50.05, 51.16, 55.86, 55.98, 56.68, 56.79, 71.71, 121.63, 129.18, 138.24 และ 140.67 ppm ดังในรูปที่ 30

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) จะปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ CH_2 ที่ δ 18.91, 18.96, 21.00, 21.15, 24.22, 24.29, 31.55, 37.17, 39.59, 42.12 และ 42.20 ppm

ปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ δ 11.78, 11.90, 11.97, 12.18, 18.60, 18.70, 19.33, 25.34, 28.16, 28.85, 31.81, 36.42, 40.43, 45.74, 50.05, 51.16, 55.86, 55.98, 56.68, 56.79, 71.71, 121.63, 129.18 และ 132.24 ppm ดังในรูปที่ 31

จากการทดสอบปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัมและเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม พบว่า สาร ง น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์ ดังนั้นจึงนำ สาร ง มาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 260 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียล และการไหลของ N_2 50

มิลลิลิตร/นาที) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ ได้แก่ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังในรูปที่ 32 ซึ่งสามารถเปรียบเทียบค่า retention time ระหว่างสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ กับ สาร ง ได้ ดังแสดงในตารางที่ 26

ตารางที่ 26 ค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ และ สาร ง จากแก๊สโครมาโทแกรม

สาร	retention time (นาที)	log retention time	พื้นที่ใต้พีค	ปริมาณสาร (%)
cholesterol	14.81	1.17	245908	23.59
campesterol	18.61	1.27	184578	17.71
stigmasterol	20.01	1.30	217605	20.88
β-sitosterol	22.54	1.35	394184	37.82
สาร ง	18.78	1.27	76612	9.77
	19.75	1.30	427786	54.54
	22.65	1.35	280001	35.69

จากโครมาโทแกรม สาร ง ประกอบด้วย 9.77 % campesterol, 35.69 % β-sitosterol และ 54.54 % stigmasterol

2.12.5 การทำสาร จ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร จ มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนอยู่ในน้ำมันสีน้ำตาลอมส้ม ได้จากลำดับส่วนที่ 60-69 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 6) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3) นอกจากนี้ยังได้จากลำดับส่วนที่ 9-40 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 70-102 (ตารางที่ 8) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1),(2:3), และ (3:7) ตามลำดับ และจากลำดับส่วนที่ 7-17 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 105-108 (ตารางที่ 11) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:9) และเมื่อนำ สาร จ มาตกผลึกด้วยเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนหนัก 0.30 กรัม ($9.9x10^{-3}$ % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 120-121 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.93 [เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)] สาร จ จะละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทนและคลอโรฟอร์ม แต่จะละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน นอกจากนี้ยังให้สารละลายสีม่วงแดงกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 แต่ในทางกลับกันจะให้ผลลบเมื่อทดสอบกับ Cyanidin test, Leucoanthocyanin test, 5%$FeCl_3$ และ 2,4 DNP แสดงว่า สาร จ น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไตรเทอร์พีนอยด์และไม่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3070 (C-H), 2960-2820 (C-H), 1600,1490,1440 (C=C), 1250,1020 (C-O), 720 (=C-H out of plane) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 33

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ δ 3.02 (2H,m,CH), 3.85 (2H,dd,CH_2), 4.23 (2H,dd,CH_2), 4.72 (2H,d,CH), 5.94 (2H,s,CH_2), 6.79, 6.84 (6H,m,CH) ppm ดังในรูปที่ 34

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ,$CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของ 10 คาร์บอนที่ δ 54.24, 71.61, 85.69, 100.99, 106.41, 108.09, 109.26, 134.99, 147.01 และ 147.88 ppm ดังในรูปที่ 35

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ δ 54.24, 85.69,106.41, 108.09 และ 109.26 ppm ดังในรูปที่ 36

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) จะปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ CH_2 ที่ δ 71.61 และ 100.99 ppm ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ CH และ CH_3 ที่ δ 54.24, 85.69, 106.41, 108.09 และ 109.26 ppm ดังในรูปที่ 37

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ M/E 354 (52.05 %) นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 149 (100.00 %), 135 (48.64 %), 161 (53.41 %), 203 (24.14 %), 122, และ 150 ดังในรูปที่ 38

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของธาตุ ปรากฏผลดังนี้ %C = 67.04 และ %H = 5.30 ซึ่งนำไปสู่การหาสูตรโมเลกุลต่อไป

2.12.6 <u>การทำสาร ฉ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง</u>

<u>สาร ฉ</u> มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีเหลืองอยู่ในน้ำมันสีเขียว ได้จากลำดับส่วนที่ 1-3 ในการทำถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 33-52 (ตารางที่ 10) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3) นอกจากนี้ยังได้จากลำดับส่วนที่ 9-12 ในการทำถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 196-199 (ตารางที่ 14) ซึ่งถูกชะด้วยไดคลอโรมีเทน และไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (99:1) และจากลำดับส่วนที่ 1-2 ในการทำถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 53-91 (ตารางที่ 16) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4) จากนั้นเมื่อนำมาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล จะได้ของแข็งอสัณฐานสีขาวหนัก 0.51 กรัม (1.7×10^{-2}% โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 236-239 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.89 [ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)] <u>สาร ฉ</u> ละลายได้ดีในเมทานอลและเอทานอล แต่จะละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม นอกจากนี้ยังให้สารละลายสีม่วงกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 แต่จะให้ผลลบกับ 5% $FeCl_3$ และ 2,4-DNP แสดงว่า <u>สาร ฉ</u> น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไตรเทอร์พีนอยด์และไม่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3500-3200 (O-H), 2990-2880 (C-H), 1690 (C=O), 1450 (CH_2), 1375,1385 (CH_2), 1050 (C-O) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 39

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$+DMSO) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 0.59-2.18 (m,CH_3, CH_2 และ CH) และ 5.13 (2H,d,CH=CH) ppm ดังในรูปที่ 40

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$+DMSO) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 27 สัญญาณที่ δ 15.15, 15.59, 16.77, 18.00, 20.95, 23.22, 23.90, 26.82, 27.67, 27.98, 30.36, 32.70, 36.44, 38.34, 38.54, 38.71, 39.11, 40.97, 41.70, 47.16, 52.41, 54.90, 77.70, 77.84, 124.89, 138.01 และ 179.44 (C=O) ppm ดังในรูปที่ 41

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$+DMSO) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ δ 27.98, 39.11, 47.16, 52.41, 54.90, 77.70, 77.84 และ 124.89 ppm ดังในรูปที่ 42

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ,$CDCl_3$+DMSO) ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ CH_2 ที่ δ 18.00, 23.90, 26.86, 27.67, 30.36, 32.70, 36.44, และ 38.34 ppm
ปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ δ 15.15, 15.59, 16.77, 20.95, 23.22, 27.98, 39.11, 47.16, 52.41, 54.90, 77.70, 77.84 และ 124.89 ppm ดังในรูปที่ 43

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ M/E 456 (0.15 %) นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 248 (100.00 %), 133 (31.81 %), 203 (41.36 %), 207 (23.68 %), 300 และ 456 ดังในรูปที่ 44

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของธาตุ ปรากฏผลดังนี้ %C = 77.24 และ %H = 10.62 ซึ่งนำไปสู่การหาสูตรโมเลกุลต่อไป

2.12.7 การทำสาร ช ให้บริสุทธิ์และการหาสูตรโครงสร้าง

สาร ช มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวอยู่ในน้ำมันสีเหลือง ได้จากลำดับส่วนที่ 1-4 ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีของลำดับส่วนที่ 105-108 (ตารางที่ 11) ซึ่งถูกชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4) และเมื่อนำ สาร ช มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล ได้ผลึกอสัณฐานสีขาว หนัก 0.06 กรัม (2.10×10^{-3} % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 82-84 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.02 [เฮกเซน: ไดคลอโรมีเทน (9:1)] สาร ช จะละลายได้เล็กน้อยในไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม แต่ไม่ละลายในเมทานอล, เอทานอลและแอซิโตน นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา 5%$FeCl_3$, และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3500-3200 (O-H), 2940,2880 (C-H), 1710 (C=O), 1450 (CH_2), 1300 (O-H), 900-1100 (C-O) และ 730,720 ($(-CH_2-)_n$ $n \geq 4$) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 45

จากผลการทดสอบรีเอเจนต์ต่าง ๆ และ ข้อมูลทางอินฟราเรดสเปกตรัม แสดงว่า สาร ช น่าจะเป็นสารประกอบประเภทกรดไซ่ตรง ซึ่งในการศึกษาหาองค์ประกอบนั้นสามารถทำได้โดยการเตรียมเป็นอนุพันธ์ methyl ester โดยใช้ BF_3/MeOH

การทำ Methylation ด้วย BF_3/MeOH (48)

นำ สาร ช มา 0.01 กรัม เติม boron trifluoride ในเมทานอล 10 ซม.^{3} แล้วจึงนำมา reflux บน oil bath เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาแล้ว ทำให้เย็นลงโดยการแช่น้ำแข็ง จากนั้นจึงเติม $NaHCO_3$ ที่อิ่มตัวลงไป 15 ซม.^{3} เพื่อทำลาย boron trifluoride ขั้นตอนสุดท้ายนำมาสกัดด้วยอีเทอร์ 3 ครั้ง ๆ ละ 15 ซม.^{3} เมื่อสกัดเสร็จแล้วให้นำชั้นอีเทอร์ที่อยู่ส่วนบนมากำจัดน้ำออก โดยเติม anh. $MgSO_4$ จากนั้นจึงนำไปกลั่นลดความดัน ซึ่งจะได้ methyl ester ของกรด เป็นของแข็งสีขาว (สาร 1ช) ส่วนกรดมาตรฐานก็นำมาเตรียมอนุพันธ์ด้วยวิธีเดียวกัน

จากนั้นจึงทำการยืนยันโครงสร้างของ สาร 1ช ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียล, อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียล และการไหลของ N_2 50 มิลลิลิตร/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน

methyl ester ของกรดไขตรงที่มีจำนวนคาร์บอน 12, 16 และ 18 ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังในรูปที่ 46 จากนั้นจึงสร้างกราฟการเทียบมาตรฐานระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของ methyl ester ของกรดไขตรงมาตรฐาน ดังในรูปที่ 47 และจากกราฟการเทียบมาตรฐานและค่า log retention time ของ methyl ester ของ สาร 1ช ทำให้สามารถนำไปหาจำนวนคาร์บอนของ สาร ช ได้ ดังแสดงในตารางที่ 27

ตารางที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐาน methyl ester ของกรดไขตรง และของ สาร 1ช กับจำนวนคาร์บอนของ สาร ช

สาร	retention time(นาที)	log retention time	จำนวน C ของส่วนกรด	ปริมาณสาร (%)
methyl dodecanoate	1.76	0.24	12	63.35
methyl hexadecosanoate	3.79	0.58	16	35.09
methyl octadecosanoate	5.89	0.77	18	1.56
สาร 1ช	1.73	0.24	12	40.60
	3.72	0.57	16	18.97
	4.53	0.66	17	0.42
	5.89	0.77	18	0.19
	7.68	0.89	20	3.29
	10.00	1.00	21	6.12
	13.12	1.12	22	18.22
	17.28	1.23	24	12.19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.13 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารในสิ่งสกัดด้วยเมทานอลจากต้นงาขาวร้อยเอ็ด

2.13.1 การทำสาร ฌ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ฌ มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวอยู่ในน้ำมันสีน้ำตาลหนืด จากลำดับส่วนที่ 8-12 ในการทำวิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 19) ซึ่งถูกชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(19:1) และเมื่อนำ สาร ฌ มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล จะได้ผลึกรูปสี่เหลี่ยม หนัก 0.58 กรัม ($3.6x10^{-2}$ % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 196-199 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.09 [ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)] สาร ฌ จะละลายได้เล็กน้อยในไดคลอโรมีเทนและคลอโรฟอร์ม และไม่ละลายในเมทานอล, เอทานอลและแอซิโตน นอกจากนี้ยังให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-DNP แสดงว่า สาร ฌ น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตอรอยด์และมีหมู่คาร์บอนิลอยู่ในโมเลกุล

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3400-3300 (O-H), 2940 (CH_3), 2960 (CH_2), 1730 (C=O), 1445 (CH_2), 1380 (CH_3) และ 1060,1070,1090 (C-O) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 48

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ,DMSO) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 3.13 (3H,s,CH_3), 2.52-2.81 (H,m,CH), 3.78 (3H,s,CH_3), 3.84-3.94 (m,-OH), 4.34-4.50 (m,CH_2,CH) และ 5.13 (2H,d,CH=CH) ppm ดังในรูปที่ 49

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 10 สัญญาณที่ δ 22.99, 41.53, 43.57, 50.18, 52.17, 66.24, 73.11, 78.38, 169.80 และ 172.55 ppm ดังในรูปที่ 50

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ,DMSO) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ δ 41.53, 43.57, 73.11, 78.18 และ 78.38 ppm ดังในรูปที่ 51

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ CH_2 ที่ δ 66.24 ppm ปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ δ 22.99, 41.53, 43.57, 50.18, 52.17, 73.11 และ 78.38 ppm ดังในรูปที่ 52

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ M/E 248 (0.06 %) นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 199 (100.00 %), 43 (78.12 %), 85 (33.21 %), 97 (33.50 %), 125(29.96 %), 139 (87.27 %) และ 157 (67.91 %) ดังในรูปที่ 53

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของธาตุ ปรากฏผลดังนี้ %C = 57.04 และ %H = 6.27 ซึ่งนำไปสู่การหาสูตรโมเลกุลต่อไป

2.13.2 <u>การทำสาร ญ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง</u>

<u>สาร ญ</u> มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีเหลืองอยู่ในน้ำมันสีน้ำตาล ได้จากลำดับส่วนที่ 13-27 ในการทำควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 19) ซึ่งถูกชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1) และ (9:1) และเมื่อนำ <u>สาร ญ</u> มาตกผลึกด้วยเฮกเซน-ไดคลอโรมีเทน จะได้ผลึกเป็นแผ่นแวววาวสีเหลืองนวลหนัก 0.14 กรัม (8.6×10^{-3} % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 89-91 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.95 [เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)] <u>สาร ญ</u> ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม แต่จะไม่ละลายในเมทานอล, เอทานอลและแอซิโตน นอกจากนี้ยังให้สารละลายสีม่วงแดงกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และฟอกจางสี Br_2ใน CCl_4 แต่ในทางกลับกันจะให้ผลลบกับ 5% $FeCl_3$, 2,4-DNP, Cyanidin test และ Leucoanthocyonin test แสดงว่า <u>สาร ญ</u> น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไตรเทอร์พีนอยด์และไม่อิ่มตัว

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 2990-2890 (C-H), 1600,1490,1500 (C=C), 1450 (CH_2) และ 1250 (C-O) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 54

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 2.86 (H,m,CH), 3.23 (H,q,CH), 3.57 (2H,m,CH_2), 3.89 (2H,m,CH_2), 4.30 (H,d,CH), 5.45 (H,s,CH), 5.94 (4H,d,CH_2), 6.45 (H,dd,CH), 6.57 (H,d,CH), 6.68 (H,d,CH), 6.87 (3H,m,CH) ppm ดังในรูปที่ 55

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 19 สัญญาณที่ δ 52.72, 53.25, 69.83, 71.25, 87.03, 100.18, 101.07, 101.22, 106.54,106.94, 108.01, 108.18, 109.00, 119.64, 134.45, 142.69, 147.35, 148.01 และ 151.85 ppm ดังในรูปที่ 56

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ δ 52.72, 53.25, 87.03, 100.18, 106.54, 106.94, 108.01, 108.18, 109.00 และ 119.64 ppm ดังในรูปที่ 57

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ CH_2 ที่ δ 69.83, 71.25, 101.07 และ 101.22 ppm ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ CH และ CH_3 ที่ δ 52.72, 53.25, 87.03, 100.18, 106.54, 106.94, 108.01, 108.18, 109.00 และ 119.64 ppm ดังในรูปที่ 58

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ M/E 370 (4.70 %) นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 135 (100.00 %), 138 (25.34 %), 203 (13.70 %) และ 233 (9.93 %) ดังในรูปที่ 59

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบของธาตุ ปรากฏผลดังนี้ %C = 64.27 และ %H = 4.87 ซึ่งนำไปสู่การหาสูตรโมเลกุลต่อไป

2.13.3 การทำสาร ฒ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ฒ มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีเหลืองอยู่ในน้ำมันสีน้ำตาลหนืด ได้จากลำดับส่วนที่ 28-45 ในการทำคริคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ตารางที่ 19) ซึ่งถูกชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1) และ (4:1) และเมื่อนำ สาร ฒ มาตกผลึกด้วยเอทานอลจะได้ของแข็งอสัณฐานสีเหลืองอมเขียวหนัก 0.035 กรัม (2.17×10^{-3} % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 235-238 องศาเซลเซียล จากจุดหลอมเหลวที่ได้มีลักษณะกว้าง แสดงว่า สาร ฒ อาจจะไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงทำทินแลร์โครมาโทกราฟีตรวจสอบ พบว่ามีจุดสารขึ้น 1 จุด แต่มีลักษณะเป็นวงรี แสดงว่า สารที่บนอยู่มีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกับ สาร ฒ และเนื่องจาก สาร ฒ มีปริมาณน้อยและมีลักษณะเป็นผงละเอียด การทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟีหรือการตกผลึกซ้ำจึงไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงทำการแยกโดยใช้วิธี preparative HPLC (คอลัมน์ Si 83-121 C, ตัวทำละลายที่ใช้ในการพาสารคือ คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (4:1), อัตราการไหลของตัวทำละลาย 16.50 ซม.^{3}/นาที, ความดัน 25 บาร์) จะได้โครมาโทแกรม ดังในรูปที่ 60 โดยสารที่ได้นั้นเกิดจากการทำซ้ำทั้งหมด 29 ครั้ง จากนั้นนำมาตกผลึกด้วย คลอโรฟอร์ม-เมทานอล ได้ของแข็งอสัณฐานสีเหลืองหนัก 0.03 กรัม (1.86×10^{-3} % โดยน้ำหนักของงาขาวร้อยเอ็ดแห้ง) จุดหลอมเหลว 216-220 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.03 [ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (7:3)] สามารถละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม แต่จะละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน, เมทานอลและเอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard และ 5% $FeCl_3$ แสดงว่า สาร ฒ ไม่ใช่สารประกอบประเภทสเตอรอยด์หรือไตรเทอร์พีนอยด์ และไม่ใช่สารประกอบประเภทฟีนอล แต่เมื่อทดสอบกับ Br_2ใน CCl_4 สามารถฟอกจางสีได้ และยังให้ตะกอนสีเหลืองกับ 2,4-DNP แสดงว่า สาร ฒ เป็นสารประกอบประเภทไม่อิ่มตัวและมีหมู่คาร์บอนิลในโมเลกุล

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3000-3500 (O-H), 2900,2950 (C-H), 1690 (C=O), 1600,1500 และ 1450 (C=C),1050-1090 (C-O) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 61

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 3.98 (2H,s,CH_2), 4.98-5.33 (m,-OH), 6.87 (H,s,CH), 6.92 (2H,d,CH), 7.43 (2H,d,CH), 8.41 (H,s,CH) และ 13.23 (1H,s,OH) ppm ดังในรูปที่ 62

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 17 สัญญาณที่ δ 56.61, 91.02, 100.83, 102.76, 104.94, 114.80, 121.51, 128.17, 145.83, 149.87, 151.75, 152.65, 158.57, 161.98, 162.53, 163.50 และ 182.19 ppm ดังในรูปที่ 63

DEPT-90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณของ CH ที่ δ 91.02, 102.76, 114.80, 128.17, 145.83 และ 149.87 ppm ดังในรูปที่ 64

DEPT-135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณด้านบน (up phase) ของ CH และ CH_3 ที่ δ 56.61, 91.02, 102.76, 114.80, 128.17, 145.83 และ 149.87 ppm

ปรากฏสัญญาณด้านล่าง (down phase) ของ CH_2 ที่ δ 100.83 ppm ดังในรูปที่ 65

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) โดยพบว่า M/E จะปรากฏสัญญาณที่ 372 นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 270, 298, 316 และ 330 ดังในรูปที่ 66

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.14 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

2.14.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ของ สาร ก, สาร ข, สาร ค, สาร ง, สาร จ, สาร ฉ, สาร ช, สาร ฌ, สาร ญ และ สาร ฒ ตามวิธีการในข้อ 2.7.1 แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 28

ตารางที่ 28 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ของ สาร ก, สาร ข, สาร ค, สาร ง, สาร จ, สาร ฉ, สาร ช, สาร ฌ, สาร ญ, และ สาร ฒ

สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)	% ความยาว		% การยับยั้ง	
		ราก	กาบใบ	ราก	กาบใบ
สาร ก	0.005	141.11	156.11	0.00	0.00
	0.01	136.11	136.65	0.00	0.00
	0.05	106.50	131.22	0.00	0.00
สาร ข	0.0005	54.09	98.76	45.91	1.24
	0.001	29.51	38.43	70.49	61.57
	0.005	16.39	25.21	83.61	74.79
สาร ค	0.0005	442.62	77.68	0.00	22.32
	0.001	291.80	73.97	0.00	26.03
	0.005	296.72	45.87	0.00	54.13

ตารางที่ 28 (ต่อ)

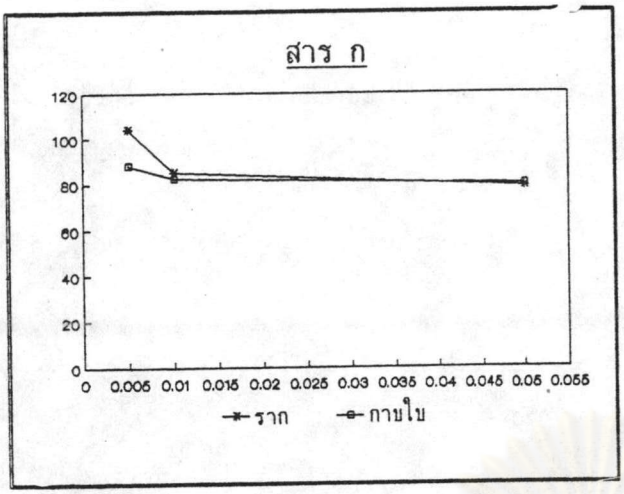
สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)	% ความยาว		% การยับยั้ง	
		ราก	กาบใบ	ราก	กาบใบ
สาร ง	0.005	0.00	61.98	100.00	38.02
	0.01	0.00	44.21	100.00	55.79
	0.05	0.00	26.03	100.00	73.97
สาร จ	0.005	68.85	47.11	31.15	52.89
	0.01	0.00	0.00	100.00	100.00
	0.05	0.00	0.00	100.00	100.00
สาร ฉ	0.005	103.94	88.08	0.00	11.92
	0.01	85.08	82.45	14.92	17.55
	0.05	78.56	79.80	21.44	20.20
สาร ช	0.0005	102.19	113.57	0.00	0.00
	0.001	26.23	31.82	73.77	68.18
	0.005	4.92	9.50	95.08	90.50
สาร ฌ	0.005	121.61	104.30	0.00	0.00
	0.01	105.48	96.03	0.00	3.97
	0.05	65.52	58.61	34.48	41.39

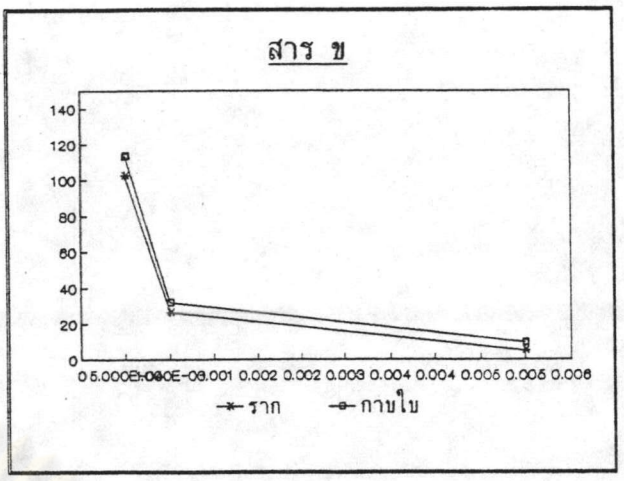
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

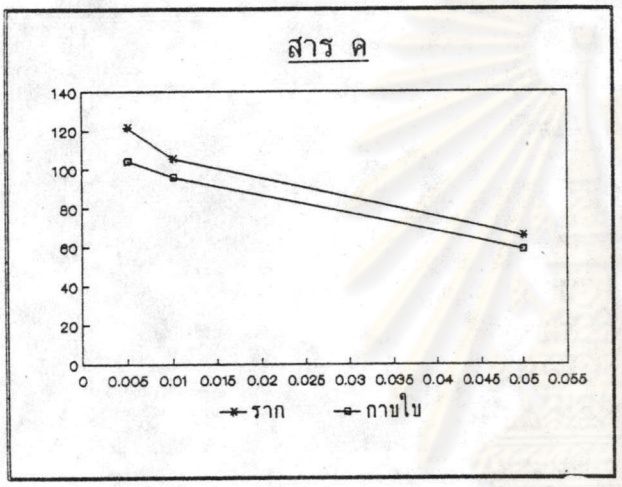
ตารางที่ 28 (ต่อ)

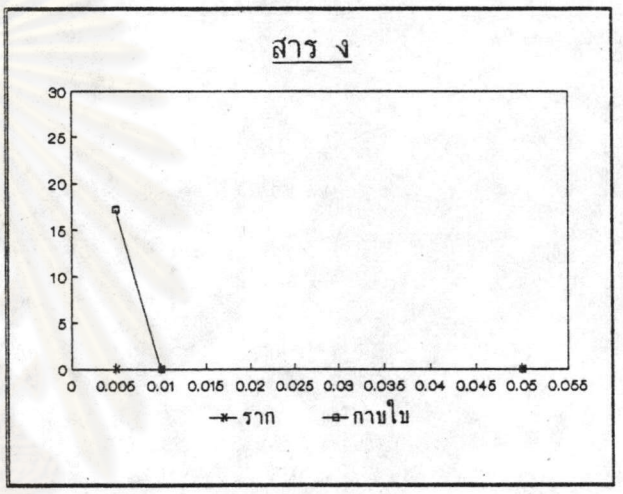
สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)	% ความยาว		% การยับยั้ง	
		ราก	กาบใบ	ราก	กาบใบ
สาร ญ	0.005	0.00	17.22	100.00	82.78
	0.01	0.00	0.00	100.00	100.00
	0.05	0.00	0.00	100.00	100.00
สาร ฒ	0.0005	103.00	89.73	47.00	60.27
	0.001	111.49	93.71	0.00	6.29
	0.005	80.45	41.72	19.55	58.28

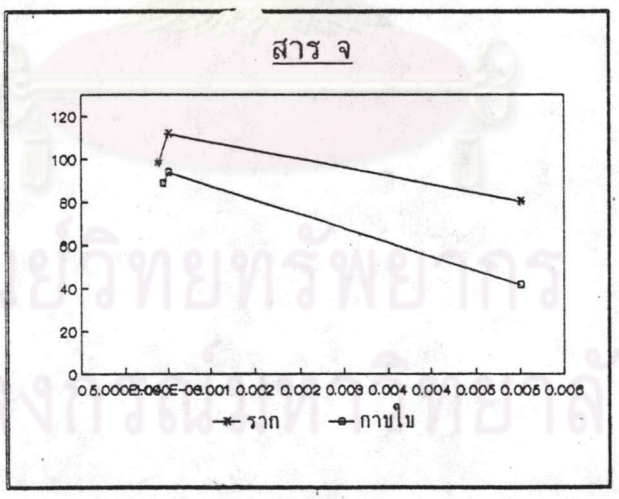
จากผลการทดสอบที่แสดงดังตารางที่ 28 พบว่า สารบริสุทธิ์แต่ละตัวแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนแตกต่างกัน โดยพบว่า สาร ญ ซึ่งมีองค์ประกอบ 8.60×10^{-3}% โดยน้ำหนักต้นงาแห้ง และความเข้มข้น 0.005 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือ สาร จ, สาร ง, สาร ช และ สาร ข ซึ่งสามารถนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของราก และกาบใบ โดยเทียบกับความยาวของราก และกาบใบของต้นข้าวอ่อนเมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของสารที่แยกได้ โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของราก และกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสารที่แยกได้ (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังแสดงในรูปที่ 67







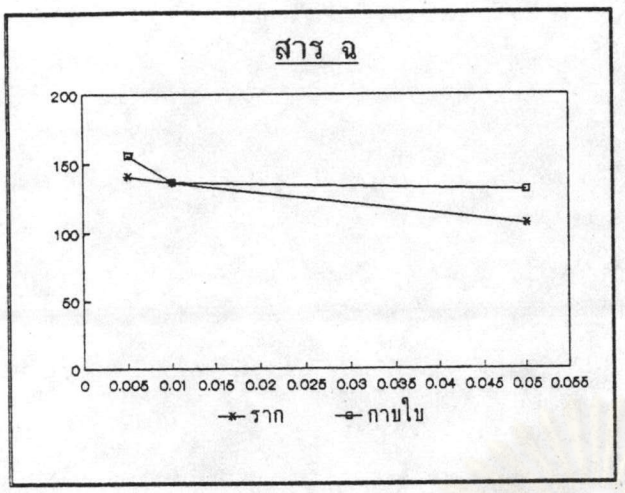


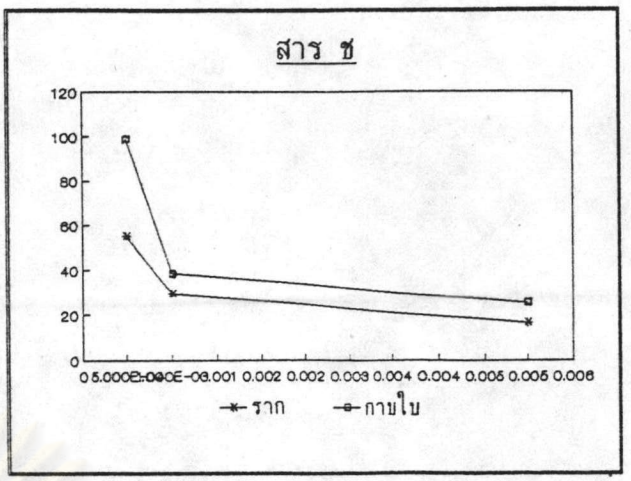


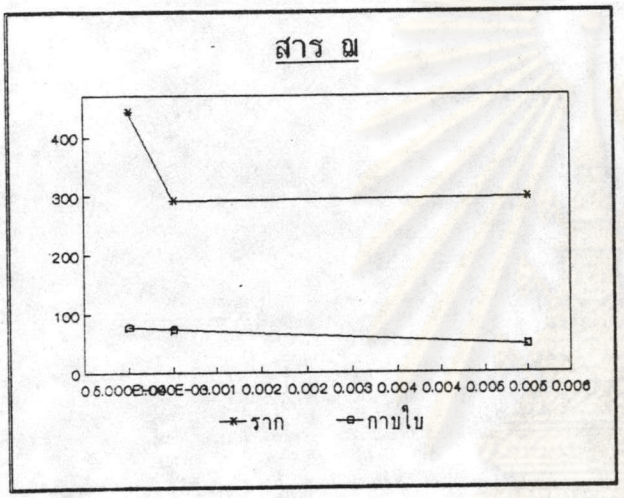
แกนตั้ง - เปอร์เซ็นต์ความยาว

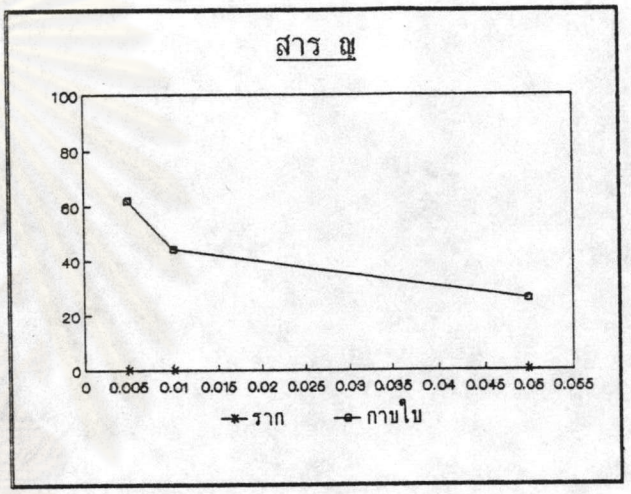
แกนนอน - ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

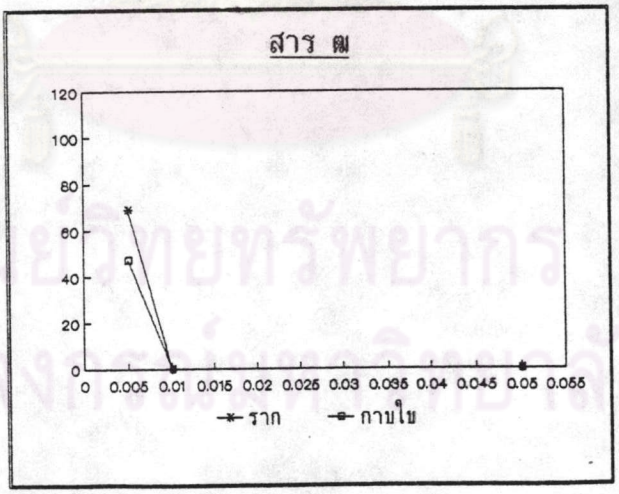
รูปที่ 67 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับ สาร ก-สาร ฌ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ











แกนตั้ง – เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน – ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 67 (ต่อ)

นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโต ของต้นข้าวอ่อน ของสารละลายมาตรฐานกรดไขมันตรง อันได้แก่ lauric acid, palmitic acid และ stearic acid เพื่อใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบระหว่างจำนวนคาร์บอน กับการเจริญเติบโตของต้นข้าว ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 29

ตารางที่ 29 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ของกรดไขมันตรงมาตรฐาน และพืชตัวอย่าง

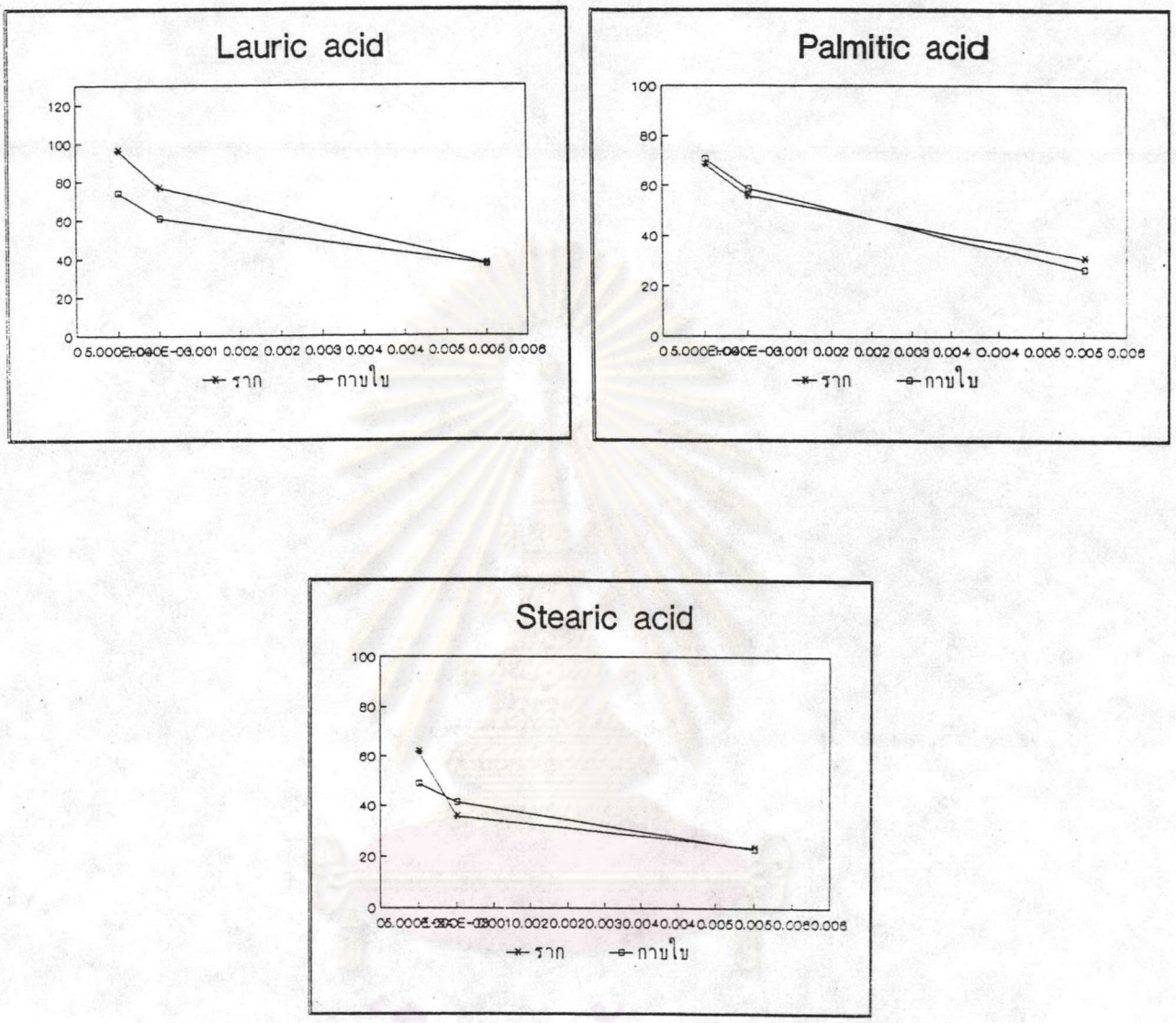
สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)	% ความยาว		% การยับยั้ง	
		ราก	กาบใบ	ราก	กาบใบ
Lauric acid	0.0005	96.07	73.83	3.93	26.17
	0.001	76.75	60.75	23.25	39.25
	0.005	37.43	37.03	62.57	62.97
Palmitic acid	0.0005	68.43	70.73	31.57	29.27
	0.001	55.76	58.54	44.24	41.46
	0.005	31.00	26.61	69.00	73.39
Stearic acid	0.0005	61.81	48.78	38.19	51.21
	0.001	35.73	41.24	64.27	58.76
	0.005	23.44	22.84	77.56	77.16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 29 (ต่อ)

สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)	% ความยาว		% การยับยั้ง	
		ราก	กาบใบ	ราก	กาบใบ
รากโลดทะนงแดง	0.0005	58.60	68.96	41.40	31.04
(C_{16}-C_{35})	0.001	47.26	54.98	52.74	45.02
	0.005	23.06	34.36	76.94	65.64
โกงกางใบเล็ก	0.0005	74.48	82.71	25.52	17.29
(C_{21}-C_{36})	0.001	56.71	65.85	43.29	34.15
	0.005	35.72	38.58	64.28	61.42
ผักปอดนา	0.0005	83.93	95.34	16.07	4.66
(C_{29}-C_{33})	0.001	71.08	94.46	28.92	5.54
	0.005	66.73	86.25	33.27	13.75
ต้นงา	0.0005	102.19	113.57	0.00	0.00
(C_{12}-C_{24})	0.001	26.23	31.82	73.77	68.18
	0.005	4.92	9.50	95.98	91.50

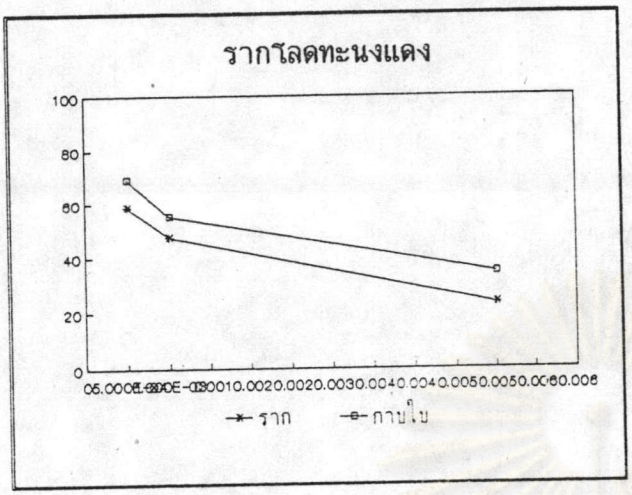
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

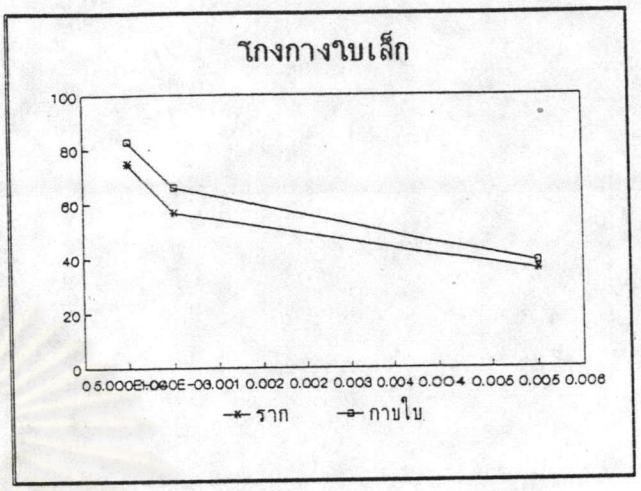


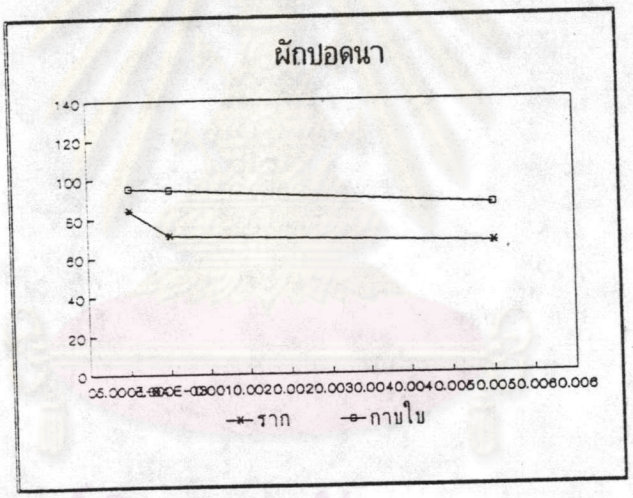
แกนตั้ง – เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน – ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 68 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว ของกรดโซ่ตรง มาตรฐาน และพืชตัวอย่าง







แกนตั้ง – เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน – ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 68 (ต่อ)