บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

นำหญ้าค้อนกลอง (ทั้งต้น) มาทำการทดลอง หญ้าค้อนกลองจะขึ้นเป็นจำนวนมากในช่วงหลังจากที่ชาวนาเสร็จสิ้นการทำนาปีแล้วประมาณ 2 เดือนคือในราวเดือนมกราคม หญ้าค้อนกลองมีเลขนำดับคือ 085404-87-154 (กรมป่าไม้ ประเทศไทย) ได้มาจากแปลงทดลองกองพฤกษศาสตร์และวัชพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์ เก็บในเดือนมีนาคม

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

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

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 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ สำหรับวัดโปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรา สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัด เตรียมโดยละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$), สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์-ดี$_6$ (DMSO-d_6) หรือสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$) กับไดเมทิลซัลฟอกไซด์-ดี$_6$ (DMSO-d_6) โดยน้ำหนักของสารตัวอย่างที่ใช้วัดโปรตอนสเปกตราประมาณ 0.01-0.02 กรัม และประมาณ 0.02-0.05 กรัมสำหรับวัดคาร์บอนสเปกตรา 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 ซึ่งมีค่าความต่างศักย์ 70 โวลต์ กระแส 300 ไมโครแอมป์ อุณหภูมิ 180-220 องศาเซลเซียล และ model JMS-AX 500 สำหรับบันทึกแมสสเปกตรา

2.2.8 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น

2.3 <u>สารเคมี</u>

2.3.1 ตัวทำละลาย ใช้คอมเมอร์เชียลเกรด โดยนำมากลั่นก่อนใช้ทุกครั้ง เพื่อทำให้บริสุทธิ์ ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่เฮกเซน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เมทานอล เอทานอล แอซีโตน บิวทานอลและเอทิลแอซิเตต

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 สำหรับทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี และควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี.

2.4 การทดสอบทางปฏิกิริยาเคมี

2.4.1 การทดสอบสเตอรอยด์ และไตรเทอร์พีนอยด์ (ทดสอบด้วยปฏิกิริยา Liebermann-Burchard) (41)

ละลายสารประมาณ 1 มิลลิกรัม ในคลอโรฟอร์มจำนวนเล็กน้อย หยดแอซิติกแอนไฮไดรด์ 2-3 หยด เขย่า หยด conc.H_2SO_4 1 หยด โดยภายใน 1 ชั่วโมง ถ้าสีเปลี่ยนจาก ชมพู ----> ม่วง ----> น้ำเงิน ---->เขียว แสดงว่าเป็นสเตอรอยด์ แต่ถ้าเป็นไตรเทอร์พีนอยด์ สีจะเปลี่ยนจาก ชมพู ----> ม่วง

2.4.2 การทดสอบหาเฟลโวนอยด์ (Flavonoid) (42)

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-บิวทานอล ซึ่งอยู่ชั้นบน

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

2.4.3 การทดสอบหมู่คาร์บอนิล (43)

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

2.4.4 <u>การทดสอบความไม่อิ่มตัว</u> (43)

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 <u>การทดสอบหมู่ฟีนอล</u> (43)

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

2.5 <u>การเตรียมอนุพันธ์ของสารที่สกัดได้</u>

เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้ หรือเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่แทนที่บางหมู่ของสารบริสุทธิ์ให้ง่ายต่อการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร

2.5.1 <u>การเตรียมอนุพันธ์ของกรดอินทรีย์ โดยการทำ Methylation ด้วย diazomethane</u> (44)

ละลาย *N*-nitrosomethylurea 1.0 กรัม ในสารละลาย 40 %KOH 10 ซม.^{3} และไดเอทิลอีเทอร์ 15 ซม.^{3} ที่เย็น เมื่อละลายหมดแล้วนำไปกลั่นบนเครื่องอังน้ำให้ diazomethane ผ่านลงไปในสารตัวอย่างที่ละลายในคลอโรฟอร์ม 1 ซม.^{3} จนสารละลายมีสีเหลืองอย่างถาวร ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน สารละลายที่ได้คือ methyl ester ของกรดอินทรีย์นำสารละลายที่ได้ไปตรวจแยกด้วย แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทสโกปี

2.5.2 <u>การไฮโดรไลส์ไกลโคไซด์ด้วยกรด (acid hydrolysis of glycoside)</u>(42)

นำสารประกอบไกลโคไซด์ หนัก 0.20 กรัม มาเติม 10% HCl ในเอทานอล จำนวน 15 ซม^3 แล้วนำไปรีฟลักซ์บนเครื่องอังไอน้ำเป็นเวลา 10 ชม. ตรวจสอบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่โดยการทำทีแอลซี เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว นำสารละลายมากลั่นไล่ตัวทำละลายออกโดยการกลั่นลดความดัน จากนั้นนำสารที่ได้ไปแขวนลอยในน้ำแล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ได้ aglycone ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์ และ glycone ในชั้นน้ำ

การศึกษาส่วน aglycone

นำสารละลาย aglycone ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์มากำจัดน้ำออกด้วย anh. Na_2SO_4 กรอง ระเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทนผสมกับเฮกเซนได้ผลึกรูปเข็มสีขาว

การศึกษา glycone

หลังจากแยก aglycone ซึ่งได้จากการไฮโดรไลส์ด้วยกรดออกแล้ว เมื่อ neutralize ชั้นน้ำด้วยซิลเวอร์ไนเตรต กรองตะกอนสีขาวออก ได้สารละลายซึ่งเป็นส่วนของน้ำตาล นำสารละลายที่เหลือมากำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

นำสารละลาย ที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยเทคนิค Paper chromatography (45) เปรียบเทียบค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลที่พบมากในสารจำพวกไกลโคไซด์ คือ glucose, galactose, arabinose, xylose และ rhamnose ความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละตัวเป็น 0.5% มวลต่อปริมาตรของสารละลาย 10 % isopropanol ใช้กระดาษกรอง เบอร์ 1 เป็นเฟสไม่เคลื่อนที่ และใช้ BTPW (*n*-BuOH, toluene, pyridine และ น้ำกลั่น สัดส่วน 5:1:3:3 ผสมกันในกรวยแยกและไขส่วนล่างทิ้งไปนำส่วนบนมาใช้) เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ หยดสารละลายน้ำตาลผสมมาตรฐานจำนวน 3-5 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษ สำหรับสารตัวอย่าง ทำเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน การแยกได้ดีต้องใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำไปทำให้แห้ง แล้วสเปรย์ด้วย aniline hydrogen phathlate ละลาย aniline 9.2 มิลลิลิตร และ กรด phthalic 16 กรัม ใน n-BuOH 490 มิลลิลิตร, Et_2O 490 มิลลิลิตรและ น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร)นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 5 นาที จะเกิดสีขึ้นบนกระดาษเป็นจุด ๆ นำไปวัดค่า R_f นำค่าที่ได้ไปเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

2.5.3 การเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตของสารประกอบประเภทไกลโคไซด์ (42)

นำสารหนัก 0.12 กรัม มาละลายในพิริดีน 5 ซม.^{3} เติมแอซีติกแอนไฮไดรด์ 2.5 ซม.^{3} เขย่าให้เข้ากัน นำไปรีฟลักซ์บนเครื่องอังไอน้ำเป็นเวลา 6 ชม. ตรวจสอบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่ด้วย ทีแอลซี เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว เทสารที่ได้ลงในน้ำผสมน้ำแข็ง 30 ซม.^{3} จะได้ตะกอนสีขาว กรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดกลิ่นพิริดีน ทำ

ผสมน้ำแข็ง 30 ซม.^{3} จะได้ตะกอนสีขาว กรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดกลิ่นพิริดีน ทำให้ตะกอนแห้ง แล้วนำมาตกผลึกใหม่ด้วยตัวทำละลายผสมของเฮกเซนและคลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้งได้ของแข็งละเอียดสีขาว

2.6 เทคนิคต่างๆที่ใช้ในการทดลอง

2.6.1 ควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี(Quick Column Chromatography)(46)

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยกสารออกเป็นกลุ่มใหญ่ก่อน เพื่อความรวดเร็ว ซึ่งสามารถที่จะนำไปแยกเป็นสารกลุ่มย่อย ๆ ด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อไป

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

2.6.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) (47)

ขนาดของคอลัมน์แก้วที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่ต้องการแยก ถ้าปริมาณสารที่ต้องการแยกมีปริมาณมาก ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้ก็จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง และความยาวของคอลัมน์มากกว่าเมื่อใช้ปริมาณสารที่ต้องการแยกมีน้อย

วิธีเตรียม นำคอลัมน์แก้วมาอุดปลายด้านล่าง ซึ่งมีลักษณะเรียวเล็กด้วยสำลีที่สะอาด โดยใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ปลายด้านล่าง บรรจุตัวทำละลายลงไปครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ เปิดที่เปิดปิดด้านล่างของคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านเพื่อไล่ฟองอากาศ ผสมซิลิกาเจลชนิด 60 Art.7734 กับตัวทำละลาย คนให้เข้ากัน เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศ

พร้อมทั้งเคาะคอลัมน์ไปเบา ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลเรียงตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เมื่อบรรจุซิลิกาเจลเสร็จแล้วก็ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเหลือประมาณ 3 ซม. เหนือผิวหน้าซิลิกาเจล จึงปิดที่เปิดปิดด้านล่างของคอลัมน์ นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วน แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ช้า ๆ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปรับผิวหน้าให้เรียบ ฉีดล้างด้านในคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมในปริมาณเล็กน้อยจนชั้นของตัวทำละลายไม่มีสี จากนั้นปล่อยให้ระดับของสารละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจล แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารต่อไป

2.6.3 <u>ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี</u> (Thin Layer Chromatography)(48)

การเตรียมโครมาโทเพลท (chromatoplate) ใช้ซิลิกาเจลชนิด 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 ใช้ขวดแก้วสะอาดที่มีฝาปิดขนาดใหญ่พอใส่โครมาโทเพลทได้ จากนั้นนำกระดาษกรองมาใส่ลงในขวดแก้ว โดยให้กระดาษกรองทาบผิวด้านในขวด แล้วเติมตัวทำละลายลงในขวดให้สูงประมาณ 1 ซม. ปิดฝาขวดเพื่อให้ในขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

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 หรือแสงอัลตราไวโอเลต 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

2.6.4 <u>ถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี</u> (Activated Charcoal Column Chromatography)(59)

จุดประสงค์ในการเลือกใช้ถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี คือ ต้องการที่จะขจัดสีของคลอโรฟิลล์และเม็ดสีต่าง ๆ ซึ่งบดบังสารที่ต้องการวิเคราะห์ออก โดยชั่ง zelite ให้เป็น 3 เท่าของน้ำหนักสาร น้ำหนักของ activated charcoal จะเท่ากับ 1ใน 3 ของน้ำหนัก zelite นำ zelite ผสมกับ activated charcoal แล้วเติมตัวทำละลายที่ใช้ในการชะคอลัมน์ลงไปพอประมาณ นำไปกวนให้เข้ากัน บรรจุของผสมที่ได้ลงในคอลัมน์ซึ่งขั้นตอนในการบรรจุจะเหมือนกับคอลัมน์โครมาโทกราฟี

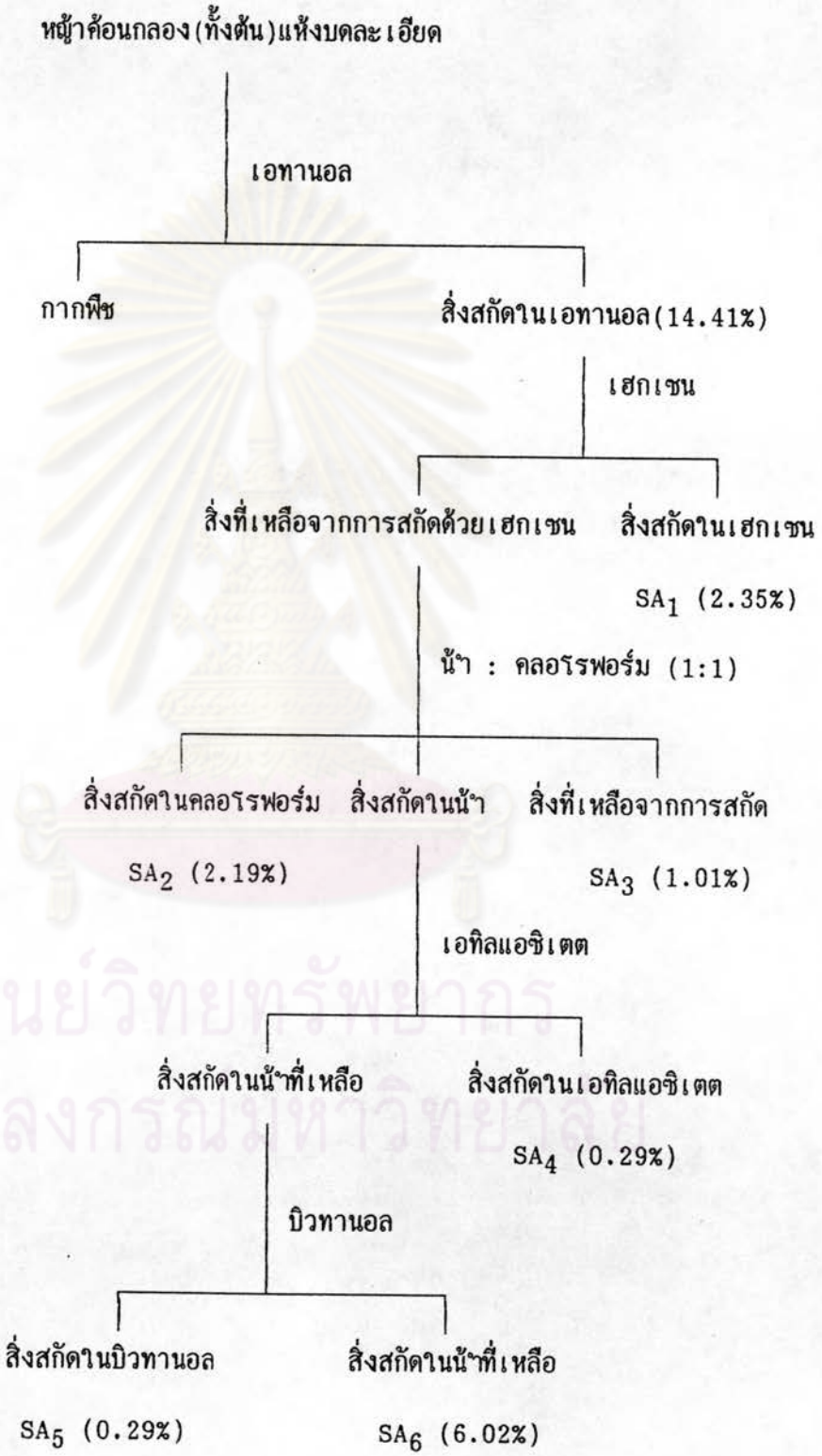
2.6.5 <u>การกลั่น</u>

การกลั่น เป็นการแยกตัวทำละลายที่มากเกินพอออกจากสารละลาย การกลั่นมี 2 แบบ ได้แก่ การกลั่นแบบธรรมดา และการกลั่นแบบลดความดัน โดยพิจารณาจากตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ ก็จะใช้การกลั่นแบบธรรมดา เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม แต่ถ้าตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูงและมีขั้ว ก็จะใช้การกลั่นแบบลดความดัน เช่น เมทานอล ทั้งนี้เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารที่สกัดออกมา โดยตัวทำละลายจะเดือดก่อนถึงจุดเดือด เพราะการกลั่นแบบลดความดันจะใช้ความร้อนต่ำกว่าการกลั่นแบบธรรมดา เมื่อตัวทำละลายเป็นชนิดเดียวกัน เครื่องมือที่ใช้ในการกลั่นแบบนี้ เรียกว่า เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaparator)

2.7 <u>การสกัด</u>

สกัดหญ้าค้อนกลองแห้งด้วยตัวทำละลายต่อไปนี้คือ เอทานอล, เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอทิลแอซิเตต และบิวทานอล ขั้นตอนการสกัดแสดงดังแผนภาพที่ 1.1

<u>แผนภาพที่</u> 1.1



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7.1 การสกัดด้วยเอทานอล

นำหญ้าค้อนกลอง (ทั้งต้น) ที่ตากแห้งและบดละเอียด หนัก 5.1 กก. มาสกัดด้วยเอทานอลจำนวน 30 ลิตรที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วนำสารละลายที่สกัดมากรองและกลั่นแยกเอทานอลออกจนเกือบหมด นำเอทานอลที่กลั่นแยกได้มาสกัดหญ้าค้อนกลองอีกทำเช่นนี้ซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายเอทานอลที่กรองได้ไม่มีสีจึงหยุดสกัด จะได้สิ่งสกัดในเอทานอล มีลักษณะเป็นสารสีน้ำตาลดำหนืดหนัก 735 กรัม (14.41 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก) จากนั้นจึงนำสิ่งสกัดดิบที่ได้นี้ไปสกัดด้วยเฮกเซนต่อไป

2.7.2 การสกัดด้วยเฮกเซน

นำสิ่งสกัดของหญ้าค้อนกลองที่สกัดได้จากเอทานอล มาสกัดต่อด้วยเฮกเซนจำนวน 3 ลิตร เช่นเดียวกับข้อ 2.7.1 จะได้สิ่งสกัดในเฮกเซน มีลักษณะเป็นของแข็งสีเขียวอม น้ำตาล หนัก 120 กรัม (2.35 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก)

2.7.3 การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม - น้ำ

นำสารที่เหลือจากการสกัดใน 2.7.2 มาละลายด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 500 ซม.^{3} ใส่ลงใน liquid - liquid extractor ซึ่งมีคลอโรฟอร์มจำนวน 500 ซม.^{3} จากนั้นเติมน้ำลงไปปริมาณ 1000 ซม.^{3} สกัดด้วยคลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้ง ครั้งละ 500 ซม.^{3} จนกระทั่งสารละลายในชั้นคลอโรฟอร์มไม่มีสี แยกสารละลายสองชั้นออกจากกัน

นำสารละลายในชั้นคลอโรฟอร์มมากรองผ่าน anh. Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำที่ปนออกมา จากนั้นกลั่นไล่คลอโรฟอร์มออกจากสารละลายโดยวิธีกลั่นแบบธรรมดา ได้สิ่งสกัดข้นสีดำหนัก 112 กรัม (2.19 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก) ซึ่งจะนำไปทำการแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

นำสารละลายในชั้นน้ำไปกลั่นไล่น้ำออกโดยวิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ได้สารที่สกัดด้วยน้ำสีน้ำตาลหนัก 350 กรัม (6.86 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก)

2.7.4 การสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต

นำสิ่งสกัดที่ได้ในน้ำ มาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตต จำนวน 500 ซม.^{3} เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากลั่นแยกเอทิลแอซิเตต สำหรับขั้นตอนในการสกัดซ้ำ ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.7.1 จะได้สิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้มหนัก 14.9 กรัม (0.29 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก)

2.7.5 การสกัดด้วยบิวทานอล

นำสิ่งสกัดที่เหลือจากข้อ 2.7.4 มาสกัดด้วยบิวทานอล จำนวน 500 ซม.^{3} เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากลั่นแยกบิวทานอล สำหรับขั้นตอนในการสกัดซ้ำทำเช่นเดียวกับข้อ 2.7.1 จะได้สิ่งสกัดในบิวทานอล มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลเข้มหนัก 20.05 กรัม (0.39 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก)

2.8 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.8.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว(50-51)

การเตรียมเมล็ดข้าว นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข23 (indicator plant) มาแช่ทิ้งไว้ 1 คืนเพื่อให้เมล็ดข้าวงอกส่วนรากออกมา เลือกเมล็ดข้าวที่มีความยาวของรากประมาณ 1-2 มิลลิเมตร

การเตรียมสารทดลอง นำสารที่จะทดสอบมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เตรียมสารละลายตามความเข้มข้นที่ต้องการ 3 ความเข้มข้น นำสารละลายที่ได้แต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซม. สูง 12 ซม.ซึ่งบรรจุด้วยเซลลูโลส (cellulose powder) 1.5 กรัม จากนั้นปิดหลอดแก้วด้วยกระดาษอลูมิเนียม นำไปอบในตู้อบแห้งสูญญากาศ (*vacuo* drier) เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปเหลือแต่สารที่สกัดได้จากหญ้าค้อนกลองอบอยู่ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดแก้วเหล่านี้ออกมาคน ให้สารที่สกัดจากหญ้าค้อนกลองคลุกเคล้ากับเซลลูโลส ให้เข้ากันดี แล้วเติมน้ำลงไปหลอดละ 4 ซม.^{3} นำเมล็ดข้าว กข23 ที่กำลังงอกมาปลูกลงในหลอด ๆ ละ 6 เมล็ด ปิดปากหลอดแก้วด้วยพลาสติกใสส่วนวิธีการเปรียบเทียบทำเช่นเดียวกัน แต่ไม่ใส่สารสกัดจากหญ้าค้อนกลอง ทุกกรรมวิธีทำซ้ำ 3 ครั้ง นำหลอดแก้วดังกล่าวนี้ไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ โดยมีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล ให้แสงตลอด

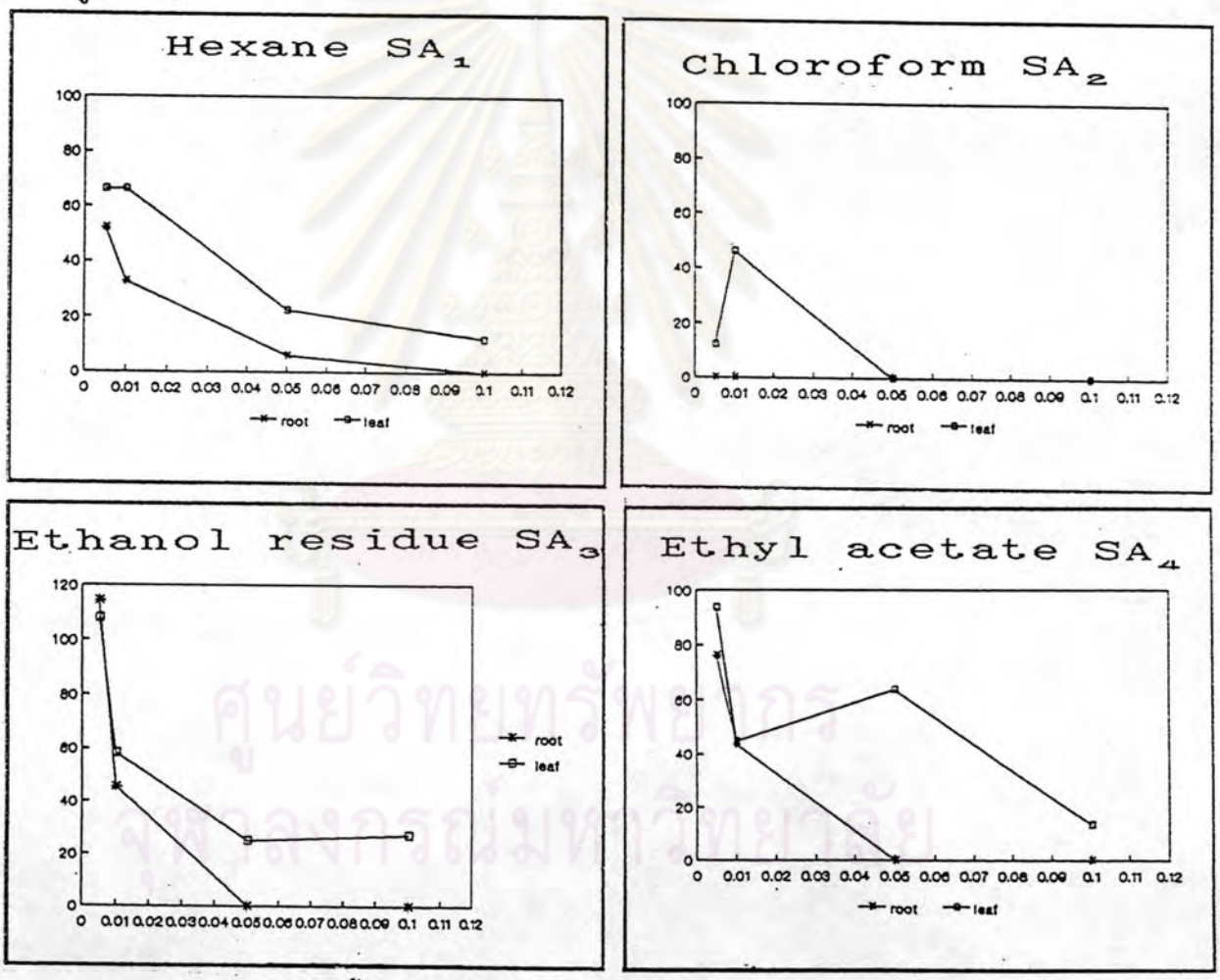
ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี ตามวิธีการในข้อ 2.7.3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี และวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม แสดงดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$SA_2 1$	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (7:3)	1- 3	ของแข็งสีน้ำตาลดำอ่อน	3.94
$SA_2 2$	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (2:3)และ(1:4)	4-10	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	10.12
$SA_2 3$	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (1:9)	11-18	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	0.57
$SA_2 4$	คลอโรฟอร์ม	19-25	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	6.45
$SA_2 5$	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (19:1)	26-42	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	10.51
$SA_2 6$	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (19:1)	43-54	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	26.28
$SA_2 7$	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (9:1)	55-72	ของแข็งสีขาวเทาปนของแข็งสีน้ำตาลดำ	3.84
$SA_2 8$	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (4:1)	73-86	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	1.05

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

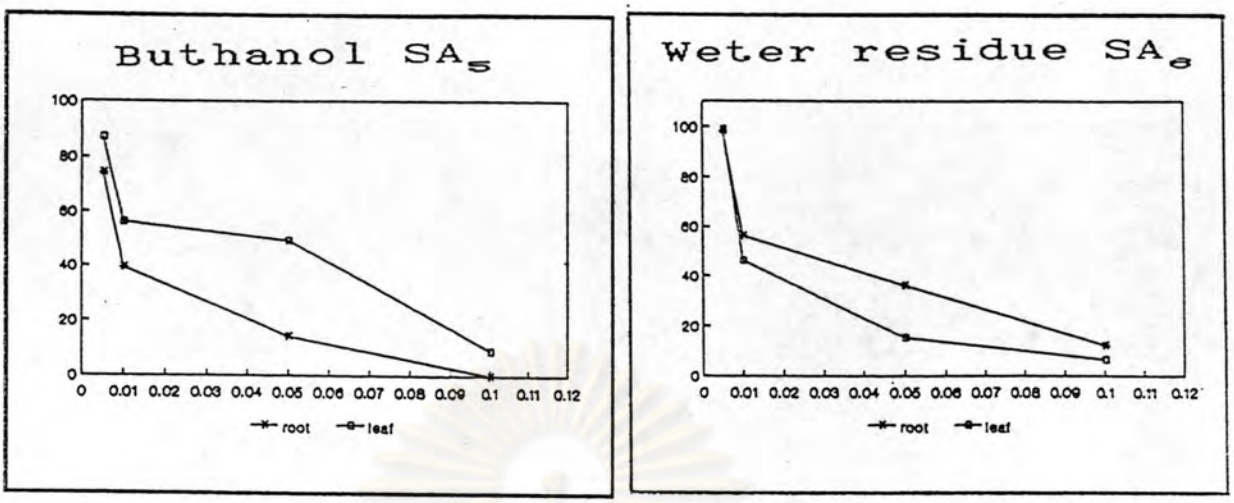
จากผลการทดสอบดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.1 พบว่า สิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม ที่ความเข้มข้น 0.01 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวมากที่สุด รองลงมาคือสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต, สิ่งสกัดในเอทานอลที่เหลือ, สิ่งสกัดในเฮกเซนและสิ่งสกัดในบิวทานอล ตามลำดับ จากนั้นนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ เปรียบเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อน เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังรูปที่ 2.1



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสิ่งสกัดจากหญ้าค้อนกลอง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.1 (ต่อ)

2.9 <u>การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในเฮกเซน</u>

2.9.1 <u>การแยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซน ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี</u>

นำสิ่งสกัดในเฮกเซน จากข้อ 2.7.2 มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยแบ่งมาทำ 50.03 กรัม ใช้ซิลิกาเจลหนัก 508.90 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามากคือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 800 ซม.^{3} นำแต่ละส่วนที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 ซม.^{3} จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วน(fraction)มาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟีตามวิธีการในข้อ 2.6.3 รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำส่วนที่มีสารซึ่งยังไม่บริสุทธิ์ไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ, วิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟีและวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซนแสดงดังตารางที่ 2.2

I17140158

ตารางที่ 2.2 แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$SA_1 1$	เฮกเซน	1 - 6	ของแข็งอสัณฐานสีขาว	8.11
$SA_1 2$	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (9:1)	7 - 12	น้ำมันสีเหลืองบนของแข็งสีขาว	3.85
$SA_1 3$	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (17:3)	13 - 16	น้ำมันสีเหลืองบนของแข็งสีขาว	2.22
$SA_1 4$	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (4:1)	17 - 19	น้ำมันสีส้มบนของแข็งสีขาว	2.13
$SA_1 5$	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (7:3)	20 - 22	น้ำมันสีแดงม่วงบนของแข็งใส รูปหกเหลี่ยม	3.71
$SA_1 6$	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)	23 - 28	น้ำมันสีเหลืองบนผลึกรูปเข็ม	4.73
$SA_1 7$	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1)	29 - 35	คราบของแข็งสีน้ำตาลบนดำ	1.07
$SA_1 8$	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3)	36 - 66	น้ำมันสีดำบนของแข็งสีเขียว	22.68
$SA_1 9$	ไดคลอโรมีเทน	67 - 70	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	4.39
$SA_1 10$	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	71 - 77	ของแข็งสีเขียวอมน้ำตาล	2.39
$SA_1 11$	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)	78 - 83	ของแข็งสีเขียวดำ	2.85

จากการแยกสารของสิ่งสกัดเฮกเซน โดยวิธีโครมาโทกราฟีพบว่าสามารถแยกสารออกมาได้ด้วยการทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกผลึกด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของหญ้าค้อนกลองที่ได้จากการผ่านคอลัมน์มีดังนี้

สาร 1 ได้จาก ส่วน $SA_1 1$ เมื่อใช้เฮกเซนเป็นตัวชะ นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย เอทิลแอซิเตตร้อน ได้ผลึกสีขาวมันวาว จุดหลอมเหลว 64.0-65.0 องศาเซลเซียล ละลายได้ดีใน เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน ละลายได้น้อยใน เมทานอล, เอทานอล, แอซิโตน และเอทิลแอซิเตต

สาร 2 ได้จาก ส่วน $SA_1 2$ เมื่อใช้ตัวชะผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 9:1 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย แอซิโตนร้อนได้ผลึก เป็นผงสีขาว จุดหลอมเหลว 65.0-66.0 องศาเซลเซียล ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม ละลายได้น้อยใน เฮกเซน, เมทานอล, เอทานอล, แอซิโตนและเอทิลแอซิเตต

สาร 3 ได้จาก ส่วน $SA_1 3$ เมื่อใช้ตัวชะผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 17:3 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย ไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ได้ผลึกเป็นผงสีขาว จุดหลอมเหลว 77.0-78.0 องศาเซลเซียล ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์มละลายได้น้อยใน เฮกเซน, เมทานอล, เอทานอล, แอซิโตนและเอทิลแอซิเตต

สาร 4 ได้จาก ส่วน $SA_1 4$ เมื่อใช้ตัวชะผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 4:1 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย ไดคลอโรมีเทนกับเอทิลแอซิเตต ได้ผลึกเป็นรูปเข็มสั้น ๆ ใสแววววาว จุดหลอมเหลว 278.0-280.0 องศาเซลเซียล ละลายได้ดีใน เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์มละลายได้น้อยใน เมทานอล, เอทานอล, แอซิโตน และเอทิลแอซิเตต

สาร 5 ได้จาก ส่วน $SA_1 5$ เมื่อใช้ตัวชะผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 7:3 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย ไดคลอโรมีเทนกับเฮกเซน ได้ของแข็งเป็นผงสีขาว จุดหลอมเหลว 77.0-78.0 องศาเซลเซียล ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์มละลายได้น้อยใน เฮกเซน, เมทานอล, เอทานอล, แอซิโตน และเอทิลแอซิเตต

สาร 6 ได้จาก ส่วน $SA_1 6$ เมื่อใช้ตัวชะผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 3:2 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย ไดคลอโรมีเทนกับเฮกเซน ได้ผลึกเป็นรูปเข็มสีขาวใส จุดหลอมเหลว 163.0-164.0 องศาเซลเซียล ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์มละลายได้น้อยใน เฮกเซน, เมทานอล, เอทานอล, แอซิโตน และเอทิลแอซิเตต

2.9.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำแต่ละส่วนที่แยกได้ ในข้อ 2.9.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ตามวิธีการในข้อ 2.8.1 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดเฮกเซน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

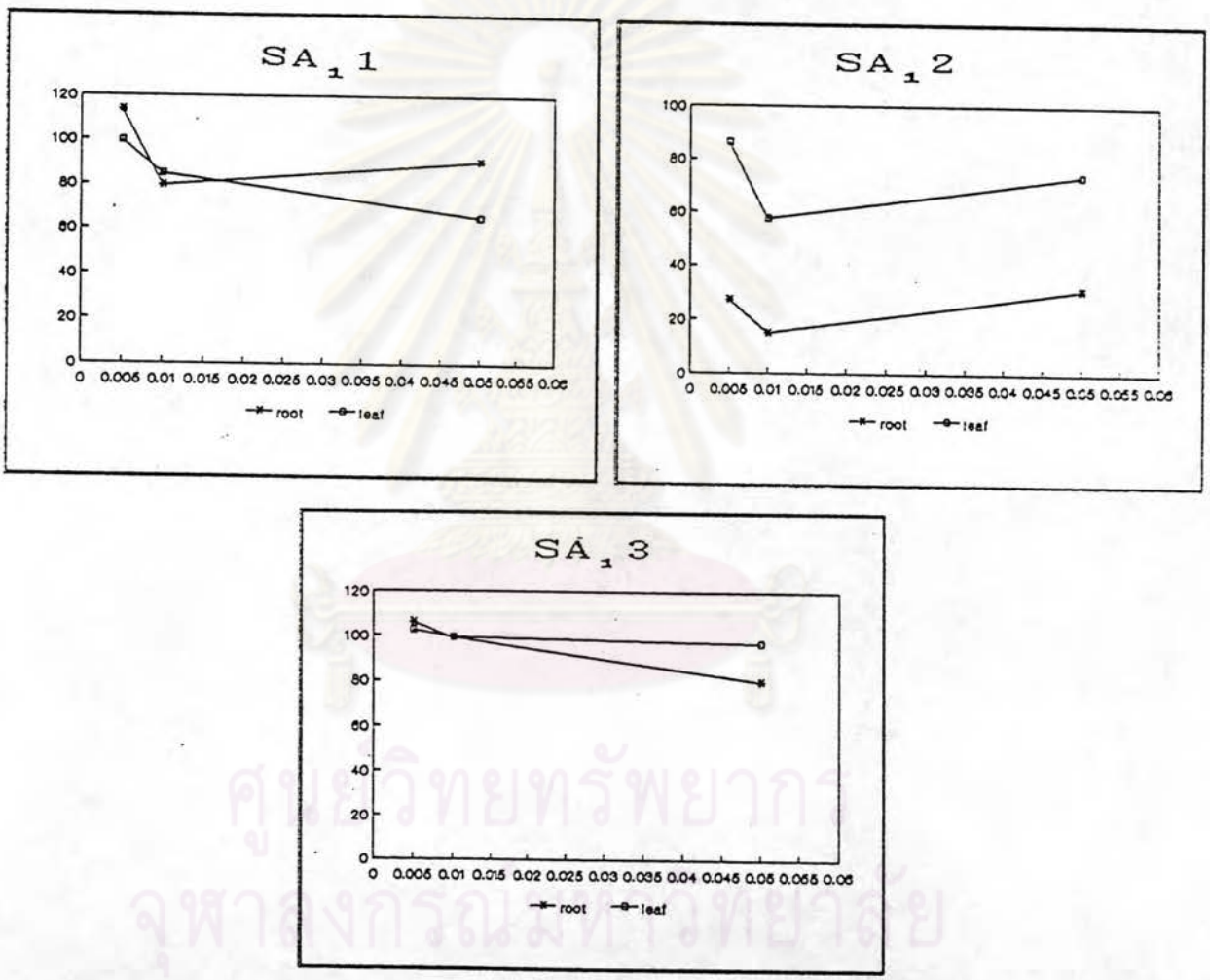
รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
		0.005	0.01	0.05
$SA_1 1$	ราก	113.59	79.34	90.53
	กาบใบ	99.45	84.62	65.10
$SA_1 2$	ราก	27.08	14.93	31.13
	กาบใบ	86.31	57.41	73.76
$SA_1 3$	ราก	106.02	99.01	80.20
	กาบใบ	102.55	99.25	97.11
$SA_1 4$	ราก	79.16	70.48	34.72
	กาบใบ	81.75	111.46	96.95

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
		0.005	0.01	0.05
$SA_1$5	ราก	97.92	29.51	27.77
	กาบใบ	96.53	46.87	49.42
$SA_1$6	ราก	81.21	23.42	14.23
	กาบใบ	92.21	52.14	42.1
$SA_1$7	ราก	21.87	3.13	0.00
	กาบใบ	0.00	0.00	0.00
$SA_1$8	ราก	0.00	0.00	0.00
	กาบใบ	0.00	0.00	0.00
$SA_1$9	ราก	0.00	2.69	0.00
	กาบใบ	0.00	7.98	0.00
$SA_1$10	ราก	116.26	85.02	89.06
	กาบใบ	74.20	83.05	76.17
$SA_1$11	ราก	77.96	79.12	57.65
	กาบใบ	110.16	96.04	87.91

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 2.3 พบว่าแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนแตกต่างกัน โดย $SA_1$8 ซึ่งมีองค์ประกอบ 1.66 % โดยน้ำหนักของหญ้าค้อนกลอง ที่ทุกความเข้มข้น (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวมากที่สุด รองลงมาคือ $SA_1$7 และ $SA_1$9 ซึ่งมีองค์ประกอบ 0.05 %, 0.21 % โดยน้ำหนักของหญ้าค้อนกลองบดแห้ง ตามลำดับ

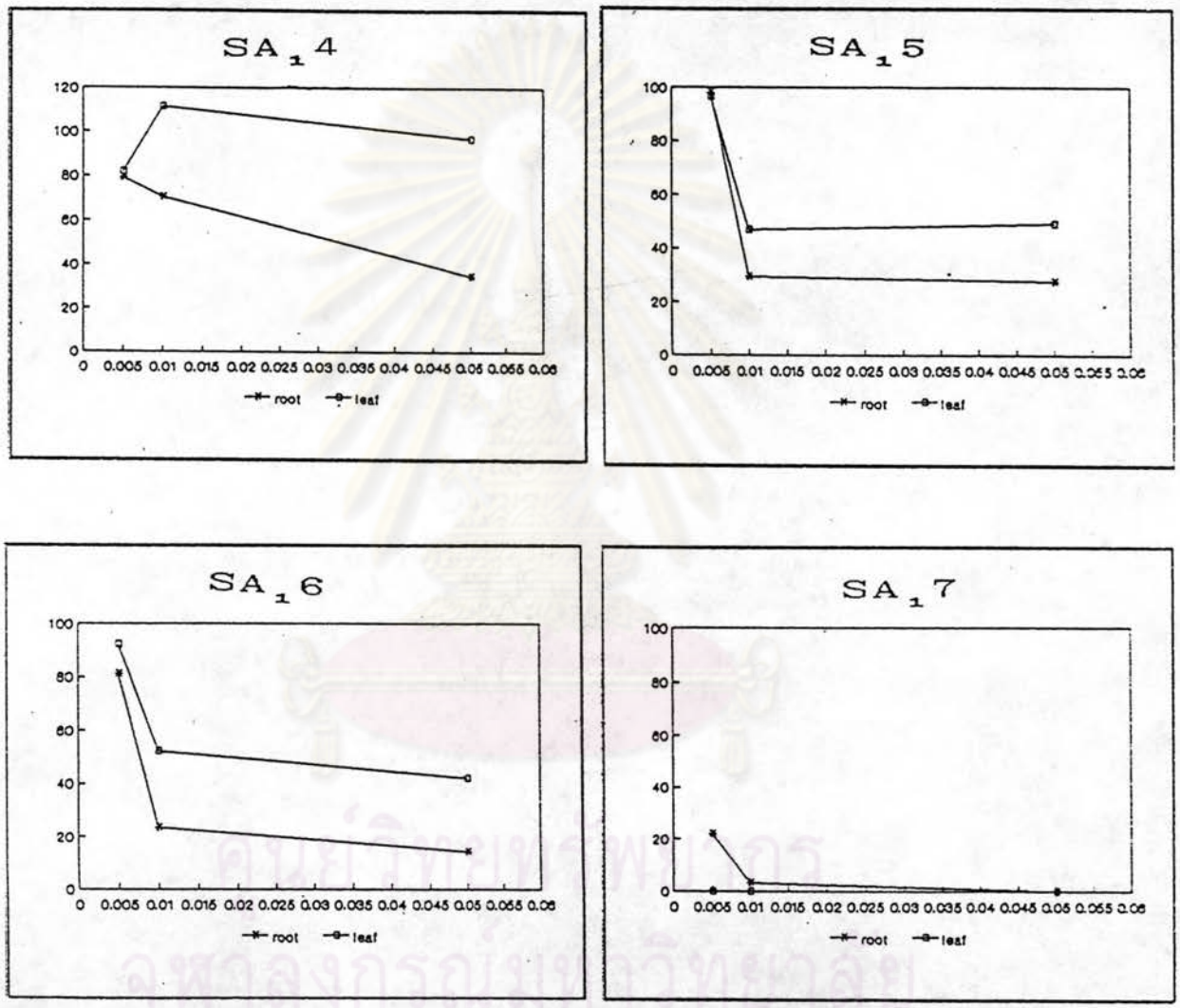
เมื่อนำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ใน
แต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดเฮกเซน มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์
ความยาวของรากและกาบใบ โดยเปรียบเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อน
เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดเฮกเซน โดยมีแกนตั้ง
เป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้
จากสิ่งสกัดเฮกเซน (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 2.2



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม)

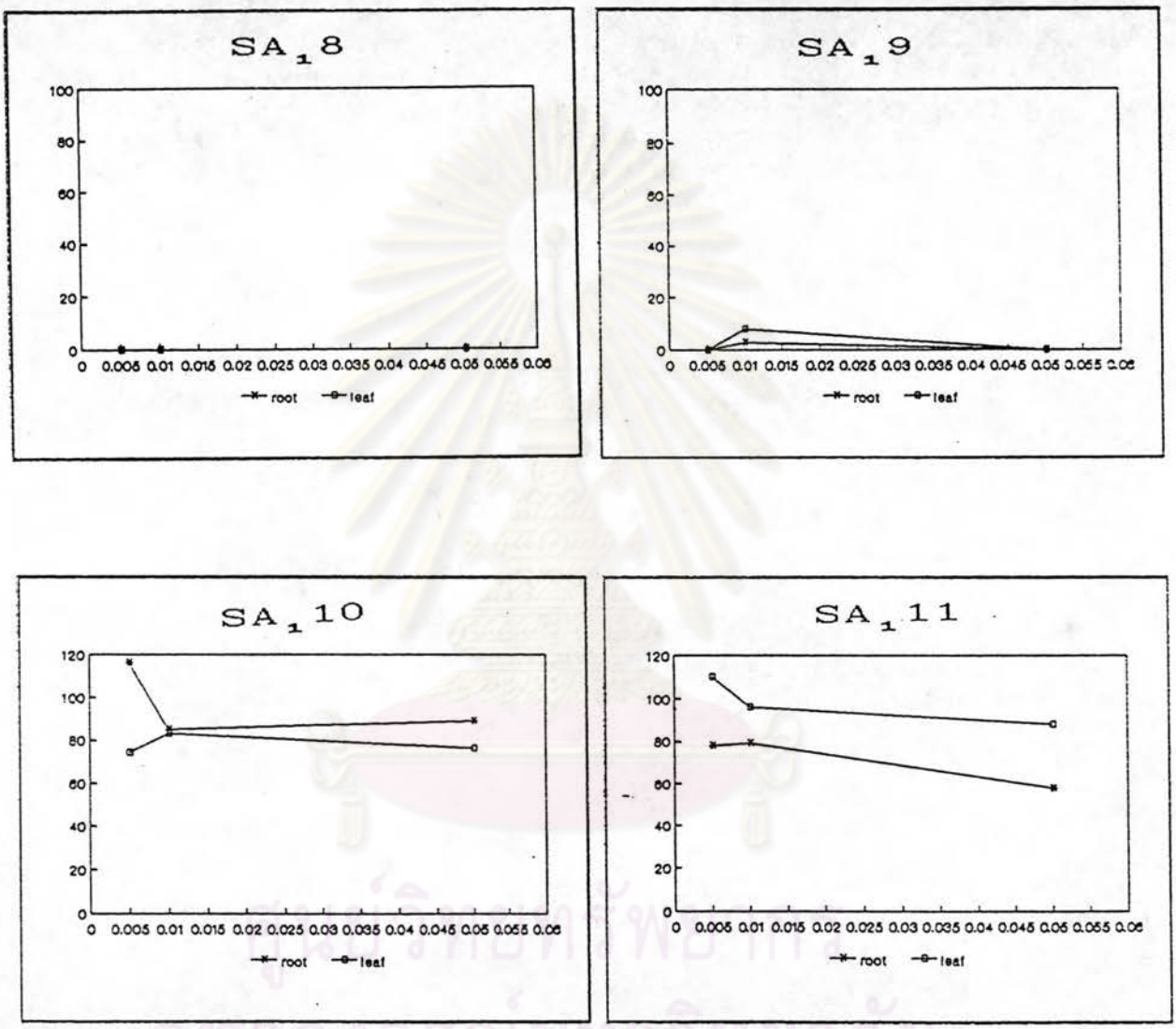
รูปที่ 2.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจาก
$SA_1 1$-$SA_1 11$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.2 (ต่อ)



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.2 (ต่อ)

2.9.3 <u>การแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น</u>

โดยเลือกพิจารณาในแต่ละส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงมาทำการแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ และวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังนี้

2.9.3.1 <u>การแยกสารของลำดับส่วนที่ 36-66 ($SA_1 8$) จากข้อ 2.9.1</u>

นำสารลำดับส่วนที่ 36-66 จากข้อ 2.9.1 ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีดำปนของแข็งสีเขียวหนัก 22.68 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 230 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 2.4

<u>ตารางที่</u> 2.4 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 36 -66 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:1)	1-5	คราบตะกอนสีน้ำตาลดำ	0.25
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1),(2:3) และ(3:7)	6-20	น้ำมันสีเขียวอมน้ำตาลปนผลึกสีเหลืองอ่อน	2.14
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:4)	21-35	ของแข็งสีเขียวอมน้ำตาล	4.27
ไดคลอโรมีเทน	36-48	คราบน้ำมันสีน้ำตาลดำ	0.21
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	49-65	ลักษณะเป็นแผ่นสีน้ำตาล	3.22
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:4)	66-73	ของแข็งสีน้ำตาลอมเขียว	2.17
เมทานอล	74-76	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	0.95

2.9.3.2 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 6-20 จากข้อ 2.9.3.1

นำสารลำดับส่วนที่ 6-20 จากข้อ 2.9.3.1 ลักษณะเป็นน้ำมันสีน้ำตาลบนของแข็งสีขาวหนัก 2.14 กรัม มาขจัดสีของคลอโรฟิลล์และเม็ดสีต่าง ๆ โดยใช้วิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งประกอบด้วย zelite หนัก 6.02 กรัม ผสมกับ activated charcoal หนัก 2.01 กรัมเป็นตัวดูดซับ ตามวิธีการในข้อ 2.6.4 จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 6-20 โดยวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
ไดคลอโรมีเทน	1-10	น้ำมันสีเหลืองใส	0.31
เมทานอล	11-25	ของแข็งสีขาวขุ่น	0.05

จากการแยกสารของสิ่งสกัดเฮกเซน โดยวิธีโครมาโทกราฟี พบว่าสามารถแยกสารออกมาได้ โดยได้จาก ส่วน $SA_1 8$ ออกมาเมื่อใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนนำมาแยกสารให้บริสุทธิ์โดยการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ ได้ผลึกเป็นของแข็งสีขาวอมเขียว ในช่วงของตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนสัดส่วน 1:1-3:7 หลังจากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟีจะได้ผลึกของแข็งเป็นก้อนกลม ๆ เล็ก ๆ ในช่วงของตัวทำละลายเมทานอล ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกใหม่โดยการใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลได้ผลึกสีขาวขุ่น (สาร 7) จุดหลอมเหลว 73.0 - 74.0 องศาเซลเซียล ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์ม ละลายได้น้อยใน เฮกเซน, เมทานอล เอทานอล, แอซิโตน และเอทิลแอซิเตต

2.9.3.3 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 28-35 ($SA_1$7)จากข้อ 2.9.1

นำสารลำดับส่วนที่ 28-35 จากข้อ 2.9.1 ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลดำหนัก 1.07 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 40 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 100 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 28-35 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)	1-21	น้ำมันสีดำบนของแข็งสีเขียว	0.21
ไดคลอโรมีเทน	22-35	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	0.07
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1) และ (11:9)	35-41	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	0.19
เมทานอล	42-52	ของแข็งสีน้ำตาล	0.027

2.9.3.4 การแยกสารของลำดับส่วนที่ 67-70 ($SA_1$9) จากข้อ 2.9.1

นำสารลำดับส่วนที่ 67-70 จากข้อ 2.9.1 ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลดำ 4.39 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 49.8 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 67-70 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีช้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1)	1-9	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	1.11
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4)	10-14	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	0.25
ไดคลอโรมีเทน	15-27	คราบสีน้ำตาลดำ	0.57
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	28-36	คราบสีเขียวดำ	0.05
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (4:1)	37-40	คราบสีเขียวอมน้ำตาล	1.12
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)และ(1:4)	30-45	คราบสีน้ำตาลดำ	0.34

2.10 การแยกสารของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม

2.10.1 การแยกสารของสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มหนัก 65 กรัม จากข้อ 2.7.3 มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจล หนัก 650 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามากคือ สารละลายผสม ระหว่างเฮกเซนกับคลอโรฟอร์ม คลอโรฟอร์ม สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายครั้งละ 800 ซม.^{3} นำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดาเพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 ซม.^{3} จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามี

องค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้วิธีทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี ตามวิธีการในข้อ 2.7.3 แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์-โครมาโทกราฟีและวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม แสดงดังตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$SA_2$1	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (7:3)	1- 3	ของแข็งสีน้ำตาลดำอ่อน	3.94
$SA_2$2	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (2:3)และ(1:4)	4-10	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	10.12
$SA_2$3	เฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (1:9)	11-18	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	0.57
$SA_2$4	คลอโรฟอร์ม	19-25	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	6.45
$SA_2$5	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (19:1)	26-42	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	10.51
$SA_2$6	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (19:1)	43-54	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	26.28
$SA_2$7	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (9:1)	55-72	ของแข็งสีขาวเทาปนของแข็งสีน้ำตาลดำ	3.84
$SA_2$8	คลอโรฟอร์ม:เมทานอล (4:1)	73-86	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	1.05

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.8 (ต่อ)

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$SA_2$9	คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (7:3)	87-90	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	1.25
$SA_2$10	คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (3:2)	91-100	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	2.17
$SA_2$11	คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (1:1)	101-112	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	3.27
$SA_2$12	คลอโรฟอร์ม: เมทานอล (3:2)	113-120	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	4.21
$SA_2$13	เมทานอล	121-135	ของแข็งสีน้ำตาลแดง	5.62

จากการแยกสารของสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มโดยวิธีโครมาโทกราฟีพบว่าสามารถแยกสารออกมาได้ โดยได้จากส่วน $SA_2$7 ออกมาเมื่อใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับเมทานอลในอัตราส่วน 9:1 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย เอทานอลร้อนปริมาณมาก ๆ ได้ผลึกเป็นของแข็งสีขาวนวล (สาร 9) จุดหลอมเหลว 240.0-242.0 องศาเซลเซียล ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน และคลอโรฟอร์มละลายได้น้อยใน เฮกเซน, เมทานอล เอทานอล, แอซิโตน และเอทิลแอซิเตต

2.10.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดยนำแต่ละส่วนที่แยกได้ในข้อ 2.10.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ตามวิธีการในข้อ 2.8.1 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 ผลการทดสอบความสามารถการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
		0.001	0.05	0.1
$SA_2$1	ราก	139.85	134.78	144.69
	กาบใบ	113.92	109.01	68.85
$SA_2$2	ราก	97.68	106.67	110.36
	กาบใบ	87.69	96.71	101.08
$SA_2$3	ราก	187.08	159.44	152.06
	กาบใบ	100.54	99.99	91.25
$SA_2$4	ราก	94.93	34.33	7.14
	กาบใบ	93.70	77.59	24.04
$SA_2$5	ราก	5.76	0.00	0.00
	กาบใบ	44.26	20.76	0.00
$SA_2$6	ราก	0.00	0.00	0.00
	กาบใบ	0.00	0.00	0.00
$SA_2$7	ราก	9.91	0.00	0.00
	กาบใบ	0.00	0.00	0.00
$SA_2$8	ราก	72.58	0.00	0.00
	กาบใบ	9.02	0.00	0.00
$SA_2$9	ราก	79.37	0.00	0.00
	กาบใบ	81.41	10.11	2.46

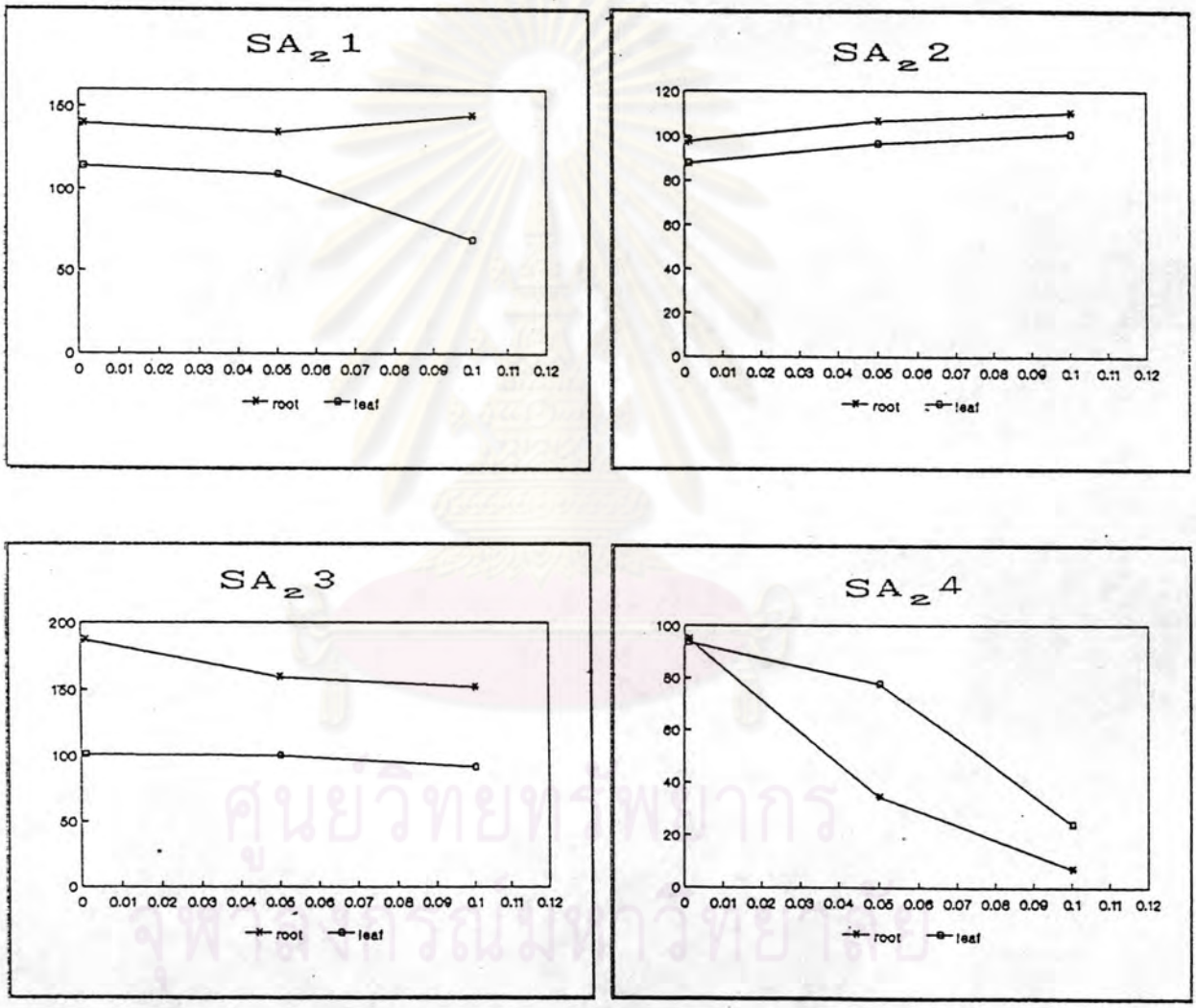
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.9 (ต่อ)

รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
		0.001	0.05	0.1
$SA_2$10	ราก	115.66	89.85	10.82
	กาบใบ	87.69	71.31	49.18
$SA_2$11	ราก	135.01	121.88	46.31
	กาบใบ	92.06	87.15	91.24
$SA_2$12	ราก	153.68	151.60	48.60
	กาบใบ	104.64	88.79	77.86
$SA_2$13	ราก	125.57	125.79	117.96
	กาบใบ	104.64	96.71	97.81

จากผลการทดสอบที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.9 พบว่าแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนแตกต่างกัน โดยพบว่า $SA_2$6 ซึ่งมีองค์ประกอบ 0.89 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก ทุกความเข้มข้นสามารถแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งรองลงมาคือ $SA_2$7, $SA_2$8 ,$SA_2$5 และ $SA_2$9 ตามลำดับ โดยมีองค์ประกอบ 0.13 %, 0.04 %, 0.02 % และ 0.04 % น้ำหนักโดยน้ำหนัก โดยเทียบที่ความเข้มข้น 0.001 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม

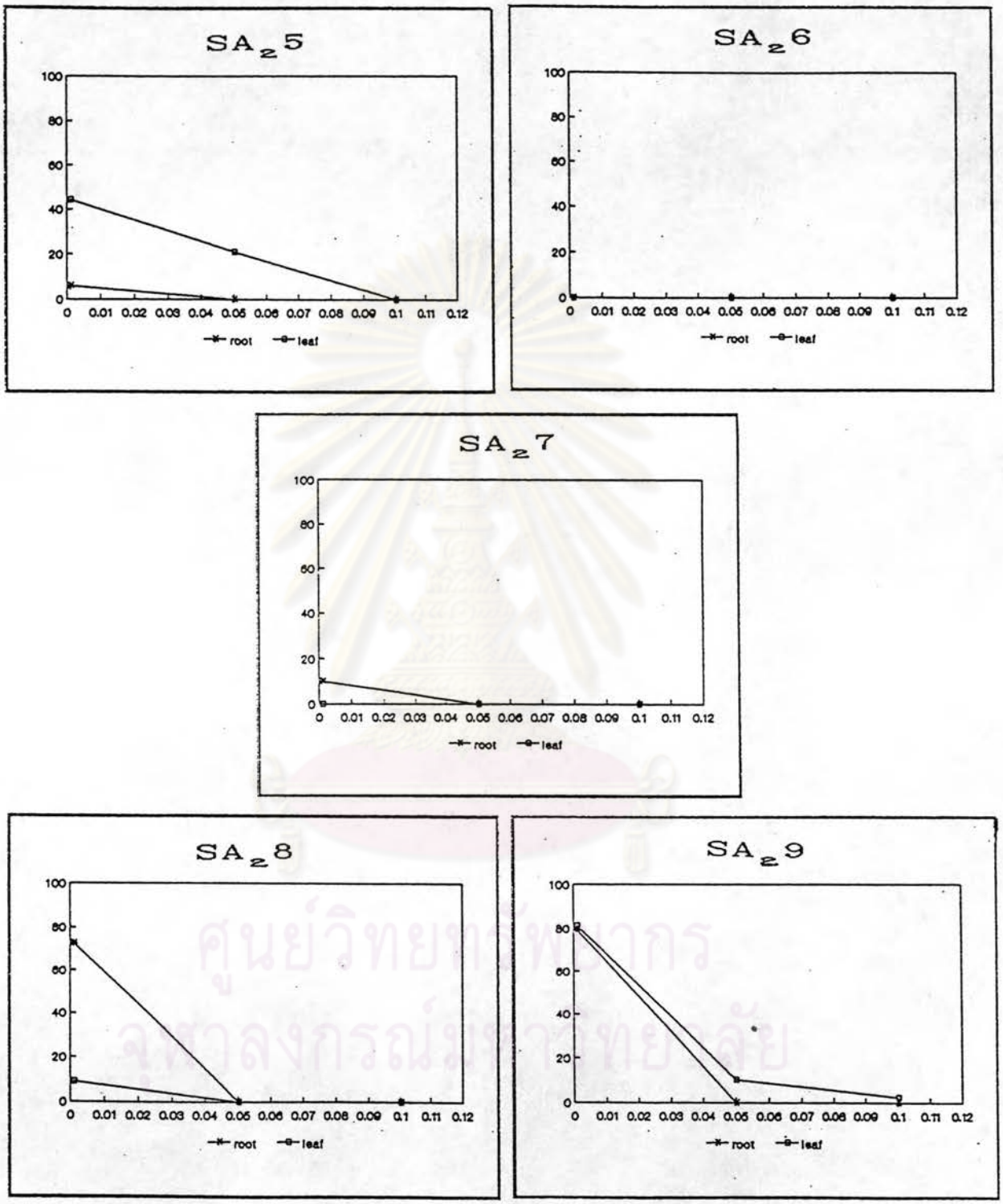
เมื่อนำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ โดยเปรียบเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อนเมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม โดยที่แกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์ม (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 2.3



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

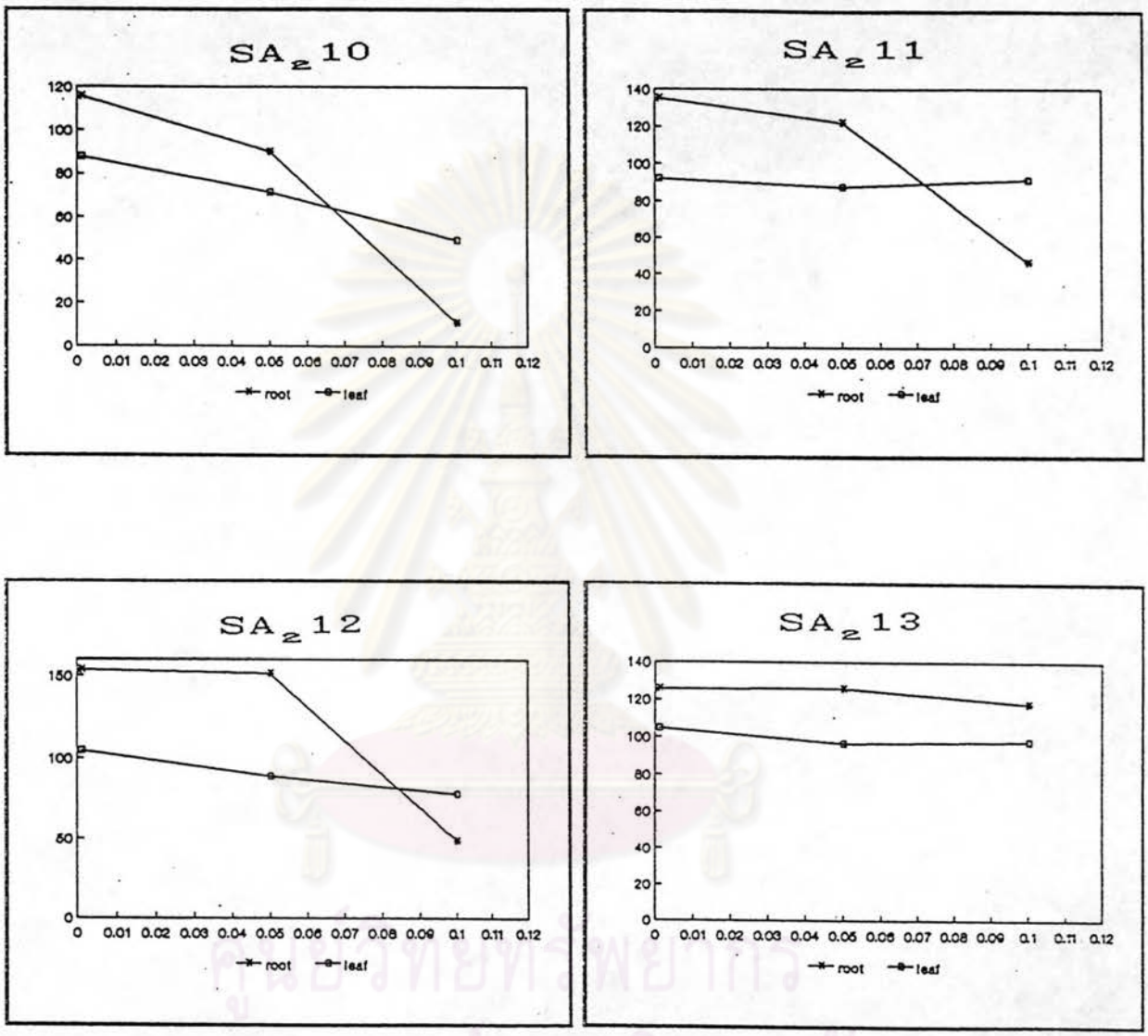
รูปที่ 2.3 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจาก $SA_2$1-$SA_2$13 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.3 (ต่อ)



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.3 (ต่อ)

2.10.3 การแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น

โดยเลือกพิจารณาในแต่ละส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ และวิธีถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังนี้

2.10.3.1 การแยกสารลำดับส่วนที่ 26-42 ($SA_2 5$) จากข้อ 2.10.1

นำสารลำดับส่วนที่ 26-42 จากข้อ 2.10.1 ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีดำปนของแข็งสีเขียวหนัก 10.51 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำโดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 150 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 100 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงไว้ในตังตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 26 - 42 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3)	1-15	น้ำมันสีน้ำตาลดำ	5.25
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:9)	15-29	น้ำมันสีน้ำตาลดำ	1.01
ไดคลอโรมีเทน	30-39	ผลึกสีเหลืองเป็นเกล็ดปนน้ำมันดำ	1.35
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	40-54	ลักษณะเป็นแผ่นสีน้ำตาล	0.25
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:4)	55-63	คาบของแข็งสีน้ำตาลอมดำ	1.15
เมทานอล	64-70	ของแข็งสีน้ำตาลแดง	0.35

จากการแยกสารของสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มโดยวิธีคลอลัมน์โครมาโทกราฟีช้า สามารถแยกสารออกมาจากลำดับส่วนที่ 30-39 ทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกผลึกด้วยเมทานอลร้อนผสมไดคลอโรมีเทนเล็กน้อย จะได้ผลึกสีเหลืองรูปเข็ม (สาร 9) จุดหลอมเหลว 240.0-242.0 องศาเซลเซียล ละลายได้ดีในเมทานอลร้อน ละลายได้น้อยใน ไดคลอมีเทน และเฮกเซน

2.10.3.2 การแยกสารลำดับส่วนที่ 43-54 ($SA_2 6$) จากข้อ 2.10.1

นำสารลำดับส่วนที่ 43-54 จากข้อ 2.10.1 ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันสีดำปนของแข็งสีเขียวหนัก 26.28 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีช้า โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 250 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารแสดงไว้ในดังตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 43 - 54 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีช้า

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3)	1-10	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	10.25
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:9)	11-29	น้ำมันสีเหลืองอมเขียวปนผลึกสีเหลืองอ่อน	2.14
ไดคลอโรมีเทน	30-39	ของแข็งสีเขียวอมน้ำตาล	0.35
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	40-65	ลักษณะเป็นแผ่นสีน้ำตาล	0.22
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:4)	66-73	ของแข็งสีน้ำตาลอมเขียว	3.15
เมทานอล	74-76	ของแข็งสีน้ำตาลแดง	0.35

จากการแยกสารของสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มโดยวิธีคลอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าสามารถแยกสารออกมา โดยได้จากการทำคลอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของ SA_26 ในช่วงตัวชะผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วน 1:9 ได้ของแข็งสีเหลืองรูปเข็ม ในสารละลายสีเหลืองดำ ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกใหม่ด้วยตัวทำละลาย ไดคลอโรมีเทน จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง (สาร 10) จุดหลอมเหลว 218.0-220.0 องศาเซลเซียล ละลายได้ดีในไดคลอมีเทน, คลอโรฟอร์ม ละลายได้น้อยใน เมทานอล และเฮกเซน

2.10.3.3 การแยกสารลำดับส่วนที่ 55-72 (SA_27)จากข้อ 2.10.1

นำสารลำดับส่วนที่ 55-72 จากข้อ 2.10.1 มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลดำ โดยแบ่งมาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีหนัก 5.01 กรัม และใช้ซิลิกาเจลหนัก 50.0 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 100 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.10.1 ผลการแยกสารได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.12

ตารางที่ 2.12 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 55 - 72 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:9)	1-12	น้ำมันสีเหลืองดำปนของแข็งสีเหลือง	0.31
ไดคลอโรมีเทน	13-25	คราบของแข็งสีดำ	0.02
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	26-31	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	0.12
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)	32-46	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	0.04
เมทานอล	47-50	ของแข็งสีน้ำตาลดำ	2.15

2.10.3.4 <u>การแยกสารลำดับส่วนที่ 73-90 ($SA_2 8$) จากข้อ 2.10.3.2</u>

นำสารลำดับส่วนที่ 73-90 จากข้อ 2.10.3.2 ลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลดำหนัก 2.25 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลหนัก 50 กรัมเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แล้วเก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 ซม.^{3} โดยเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.9.1 ผลการแยกสารได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.13

<u>ตารางที่</u> 2.13 ผลการแยกสารของลำดับส่วนที่ 73 - 90 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำ

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
ไดคลอโรมีเทน	1-10	น้ำมันสีดำปนของแข็งสีเหลือง	0.25
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (9:1)	11-15	คราบของแข็งสีดำ	0.01
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (3:2)	16-26	คราบของแข็งสีดำ	0.38
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (1:1)	27-29	คราบของแข็งสีน้ำตาลดำ	0.12
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (2:3)	30-35	คราบของแข็งสีน้ำตาลดำ	0.68

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.11 การแยกสารของสิ่งสกัดในเอทานอลที่เหลือ

2.11.1 การแยกสารของสิ่งสกัดในเอทานอลที่เหลือ วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

หลังจากนำสิ่งสกัดที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซน สกัดด้วยน้ำ: คลอโรฟอร์ม ตามข้อ 2.7.3 จะมีสิ่งสกัดที่เหลือ ซึ่งเป็นสิ่งสกัดในเอทานอลที่เหลือมีลักษณะเป็นของแข็งเหนียวสีน้ำตาลแดงหนัก 50 กรัม นำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจลหนัก 500.1 กรัมเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เรียงตามความมีขั้วน้อยไปหามากคือ ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 500 ซม.^{3} นำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 ซม.^{3} จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมี เหมือนกันหรือไม่โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟีตามวิธีการในข้อ 2.6.3 รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดใน เอทิลแอซิเตต แสดงดัง ตารางที่ 2.14

ตารางที่ 2.14 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเอทานอลที่เหลือ โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
SA_31	ไดคลอโรมีเทน	1-10	ของแข็งสีน้ำตาล	1.32
SA_32	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (9:1)และ(4:1)	11-19	น้ำมันสีน้ำตาลอมส้ม	11.42
SA_33	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (3:2)และ(1:1)	20-35	น้ำมันสีน้ำตาลแดง	12.26
SA_34	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (2:3)	36-46	น้ำมันสีน้ำตาล	13.26
SA_35	เมทานอล	47-55	น้ำมันสีน้ำตาลหนืด	3.75

2.11.2 <u>การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ</u>

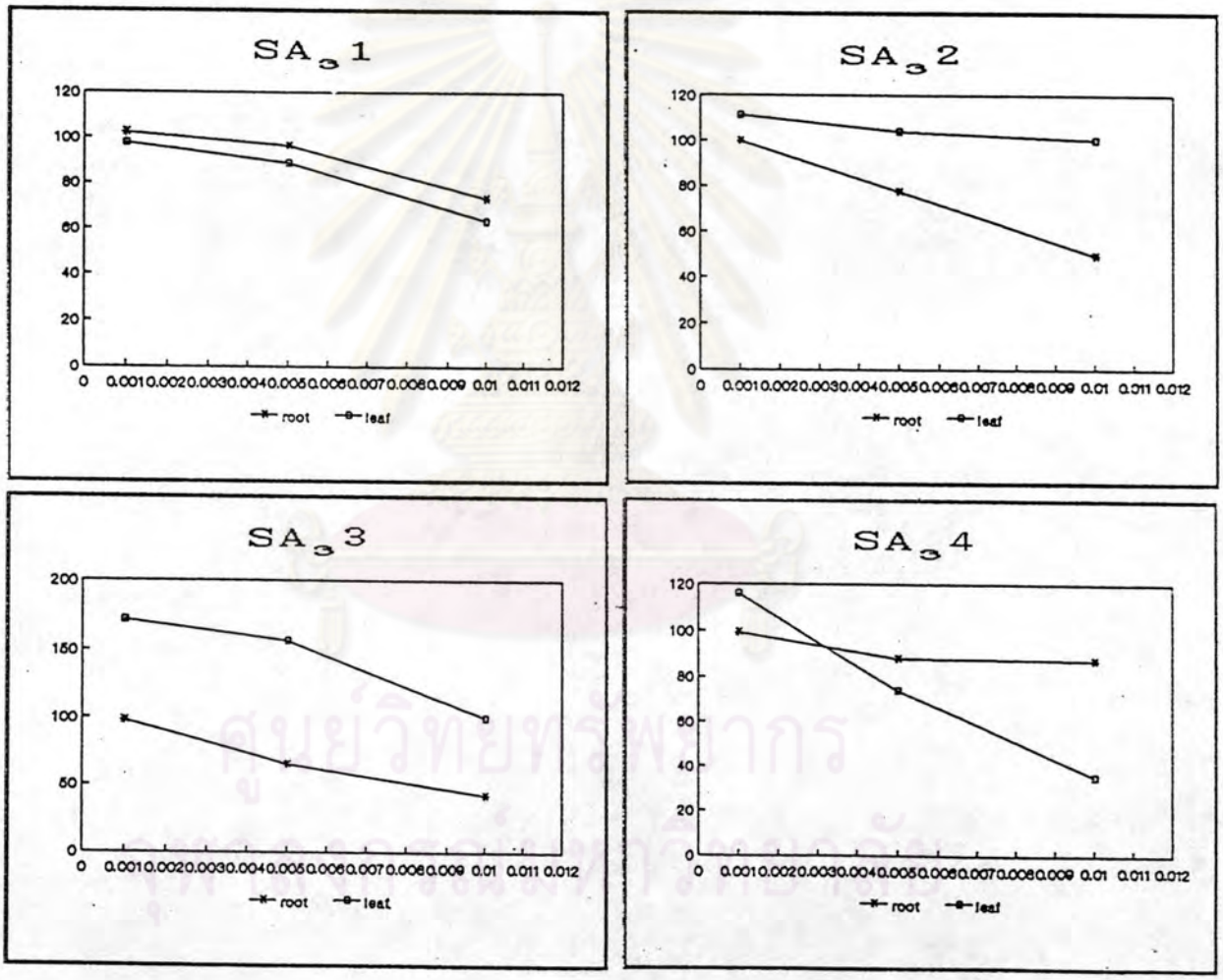
โดยนำแต่ละส่วนที่แยกได้ ในข้อ 2.11.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ตามวิธีการในข้อ 2.8.1 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2.15

<u>ตารางที่</u> 2.15 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทานอลที่เหลือ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รหัส	ส่วนของต้นข้าว	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
	ที่ศึกษา	0.001	0.005	0.010
$SA_3$1	ราก	102.27	96.39	73.21
	กาบใบ	97.56	88.84	63.47
$SA_3$2	ราก	99.93	77.47	49.39
	กาบใบ	111.12	104.12	100.36
$SA_3$3	ราก	97.69	65.16	42.21
	กาบใบ	171.63	156.43	99.83
$SA_3$4	ราก	99.36	88.11	87.35
	กาบใบ	115.98	73.86	35.26
$SA_3$5	ราก	104.42	89.45	69.12
	กาบใบ	93.25	87.56	56.23

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 2.15 นั้นพบว่า แต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทานอลที่เหลือ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนน้อยไม่ต่างกัน

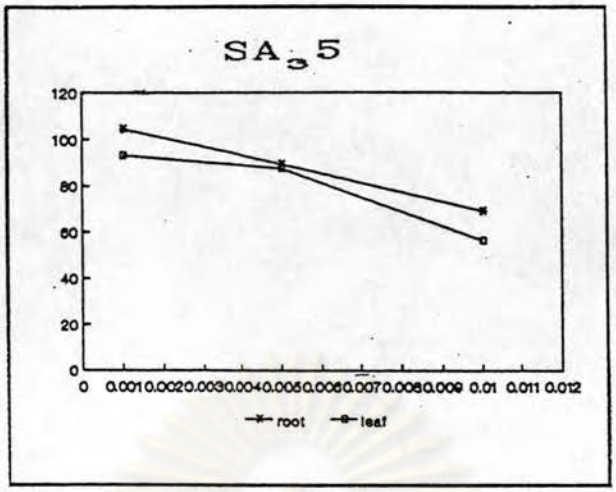
เมื่อนำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทานอลที่เหลือ มาสร้างกราฟแสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบโดยเปรียบเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อน เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทานอลที่เหลือ โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทานอลที่เหลือ (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 2.4



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.4 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจาก SA_31-SA_35 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.4 (ต่อ)

2.12 <u>การแยกสารของสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต</u>

2.12.1 <u>การแยกสารของสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต โดยวิธีควิคคอลัมน์-โครมาโทกราฟี</u>

หลังจากนำสิ่งสกัดในน้ำจากข้อ 2.7.3 มาสกัดด้วยเอทิลแอซิเตตตามวิธีการในข้อ 2.7.4 จะได้สิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตตหนัก 14.9 กรัม นำมาแยกด้วยวิธีควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้ซิลิกาเจลหนัก 350.0 กรัมเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวชะเรียงตามความมีขั้วน้อยไปหามากคือ สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสม ระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 500 ซม.^{3} นำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดาเพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 ซม.^{3} จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมี เหมือนกันหรือไม่โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี ตามวิธีการในข้อ 2.6.3 รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดใน เอทิลแอซิเตต แสดงไว้ในตารางที่ 2.16

ตารางที่ 2.16 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดเอทิลแอซิเตต โดยวิธีควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$SA_4$1	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1)	1-12	ของแข็งสีน้ำตาล	0.32
$SA_4$2	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3)และ(3:7)	13-29	น้ำมันสีน้ำตาลอมส้ม	0.42
$SA_4$3	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4)และ(1:9)	30-45	น้ำมันสีน้ำตาลแดง	1.26
$SA_4$4	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)	46-56	น้ำมันสีน้ำตาล	3.26
$SA_4$5	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)และ(4:1)	57-60	น้ำมันสีน้ำตาลหนืด	3.75
$SA_4$6	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (7:3)และ(3:2)	61-80	ตะกอนสีน้ำตาลอมดำ	3.60
$SA_4$7	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)และ(1:4)	81-100	ตะกอนสีน้ำตาล	2.73

2.12.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

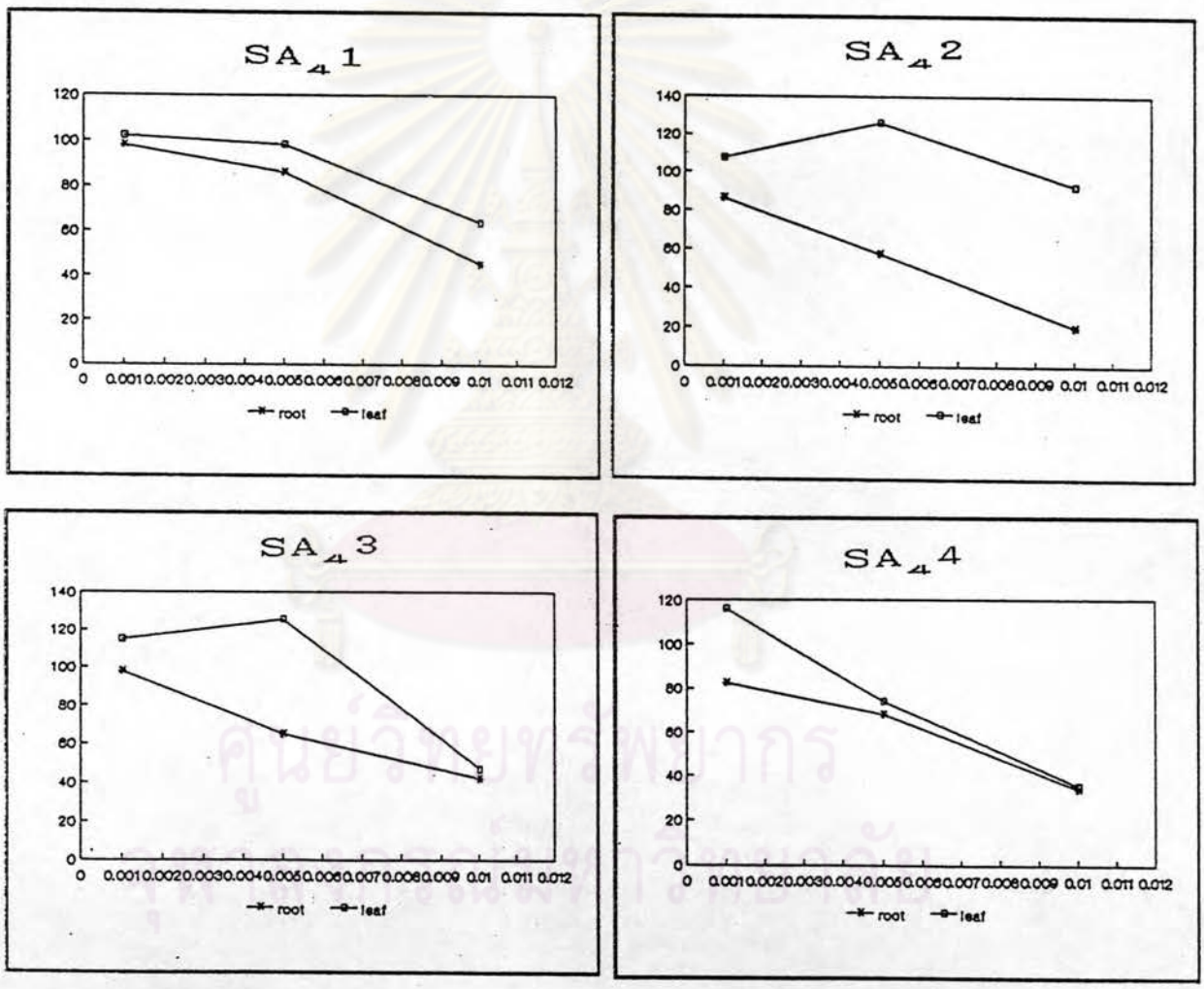
โดยนำแต่ละส่วนที่แยกได้ ในข้อ 2.12.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ตามวิธีการในข้อ 2.8.1 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2.17

ตารางที่ 2.17 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเอทิลแอซิเตต ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รหัส	ส่วนของต้นข้าว	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
	ที่ศึกษา	0.001	0.005	0.010
$SA_4$1	ราก	98.21	86.15	45.12
	กาบใบ	102.21	98.25	63.56
$SA_4$2	ราก	86.42	57.47	20.00
	กาบใบ	107.52	126.21	92.48
$SA_4$3	ราก	97.69	65.16	42.21
	กาบใบ	115.12	125.64	47.06
$SA_4$4	ราก	82.36	68.11	33.85
	กาบใบ	115.98	73.86	35.26
$SA_4$5	ราก	104.42	95.75	55.33
	กาบใบ	123.79	100.34	62.45
$SA_4$6	ราก	85.23	74.28	96.36
	กาบใบ	96.23	88.18	94.12
$SA_4$7	ราก	104.29	95.62	85.15
	กาบใบ	93.72	83.32	71.45

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 2.17 นั้นพบว่า แต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดเอทิลแอซิเตต มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนน้อยไม่ต่างกัน

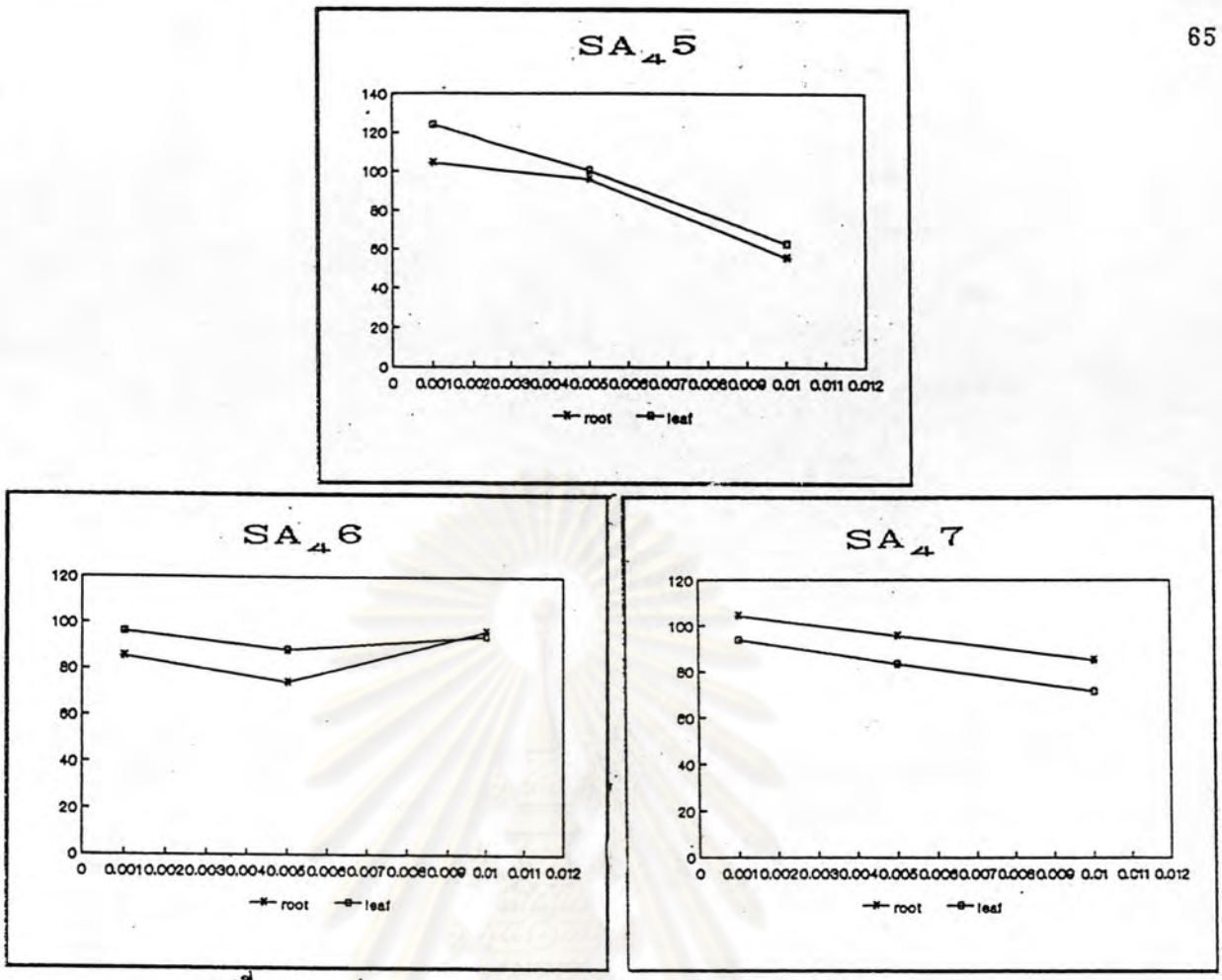
เมื่อนำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดเอทิลแอซิเตต มาสร้างกราฟแสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบโดยเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อน เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดเอทิลแอซิเตต โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดเอทิลแอซิเตต (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 2.5



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.5 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจาก $SA_4 1$-$SA_4 7$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



รูปที่ 2.5 (ต่อ)

แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัมะเซลลูโลส 1.5 กรัม)

2.13 <u>การแยกสารของสิ่งสกัดในบิวทานอล</u>

2.13.1 <u>การแยกสารของสิ่งสกัดในบิวทานอลโดยวิธีคิวคอลัมน์โครมาโทกราฟี</u>

หลังจากนำสิ่งสกัดที่เหลือจากข้อ 2.7.4 มาสกัดด้วยบิวทานอลตามวิธีการในข้อ 2.7.5 จะได้สิ่งสกัดบิวทานอลหนัก 20.05 กรัม นำมาแยกด้วยวิธีคิวคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ซิลิกาเจลหนัก 350.0 กรัมเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วน้อยไปหามากคือ สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสม ระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 500 ซม.^{3} นำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 ซม.^{3} จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมี เหมือนกันหรือไม่โดยใช้ทินแลเยอร์โครมาโทกราฟี ตามวิธีการในข้อ 2.6.3 รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดบิวทานอลแสดงไว้ใน ตารางที่ 2.18

ตารางที่ 2.18 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดบิวทานอล โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$SA_5$1	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1)	1-16	ของแข็งสีน้ำตาล	1.52
$SA_5$2	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3)และ(3:7)	17-25	น้ำมันสีน้ำตาลอมส้ม	1.32
$SA_5$3	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4)และ(1:9)	26-40	น้ำมันสีน้ำตาลแดง	2.26
$SA_5$4	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)	41-52	น้ำมันสีน้ำตาลปนของแข็งสีเหลือง	4.56
$SA_5$5	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)และ(4:1)	53-60	น้ำมันสีน้ำตาลหนืด	5.05
$SA_5$6	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (7:3)และ(3:2)	61-80	ตะกอนสีน้ำตาลอมดำ	4.12
$SA_5$7	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)และ(1:4)	81-100	ตะกอนสีน้ำตาล	1.25

จากการแยกสารของสิ่งสกัดในบิวทานอลโดยวิธีคลอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าสามารถแยกสารออกมาได้ โดยได้จากส่วน $SA_5$4 ออกมาเมื่อใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล ในอัตราส่วน 19:1 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย เมทานอลร้อนได้ผลึกสีเหลืองเป็นผง (สาร 11) จุดหลอมเหลว 278.0-280.0 องศาเซลเซียล (สลายตัว) ละลายได้ดีในเมทานอลร้อน ละลายได้น้อยใน ไดคลอโรมีเทน, คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน

2.13.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

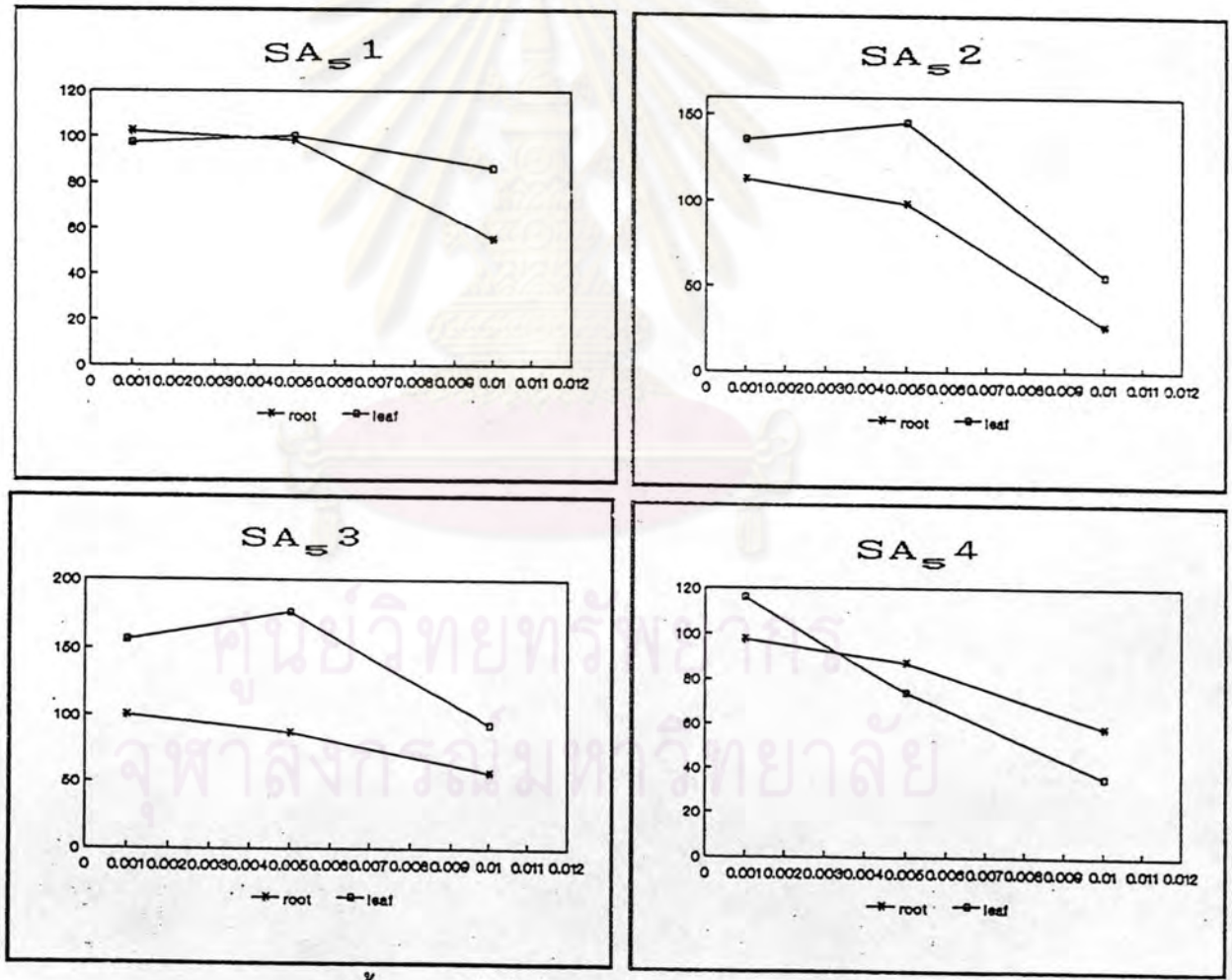
โดยแต่ละส่วนที่แยกได้ ในข้อ 2.13.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ตามวิธีการในข้อ 2.8.1 ผลการทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 2.19

ตารางที่ 2.19 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดบิวทานอล ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รหัส	ส่วนของต้นข้าว	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
	ที่ศึกษา	0.001	0.005	0.010
$SA_5$1	ราก	102.23	98.23	55.23
	กาบใบ	97.35	100.25	86.23
$SA_5$2	ราก	112.56	98.47	26.35
	กาบใบ	135.25	145.23	55.55
$SA_5$3	ราก	99.83	86.79	56.45
	กาบใบ	156.23	176.56	92.63
$SA_5$4	ราก	97.71	87.36	57.77
	กาบใบ	115.98	73.86	35.26
$SA_5$5	ราก	104.36	93.69	90.23
	กาบใบ	123.79	100.34	62.45
$SA_5$6	ราก	99.39	75.55	66.66
	กาบใบ	146.36	98.18	94.12
$SA_5$7	ราก	115.54	98.88	87.78
	กาบใบ	145.55	142.23	99.99

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 2.19 นั้นพบว่า แต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดบิวทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนน้อย ใกล้เคียงกัน

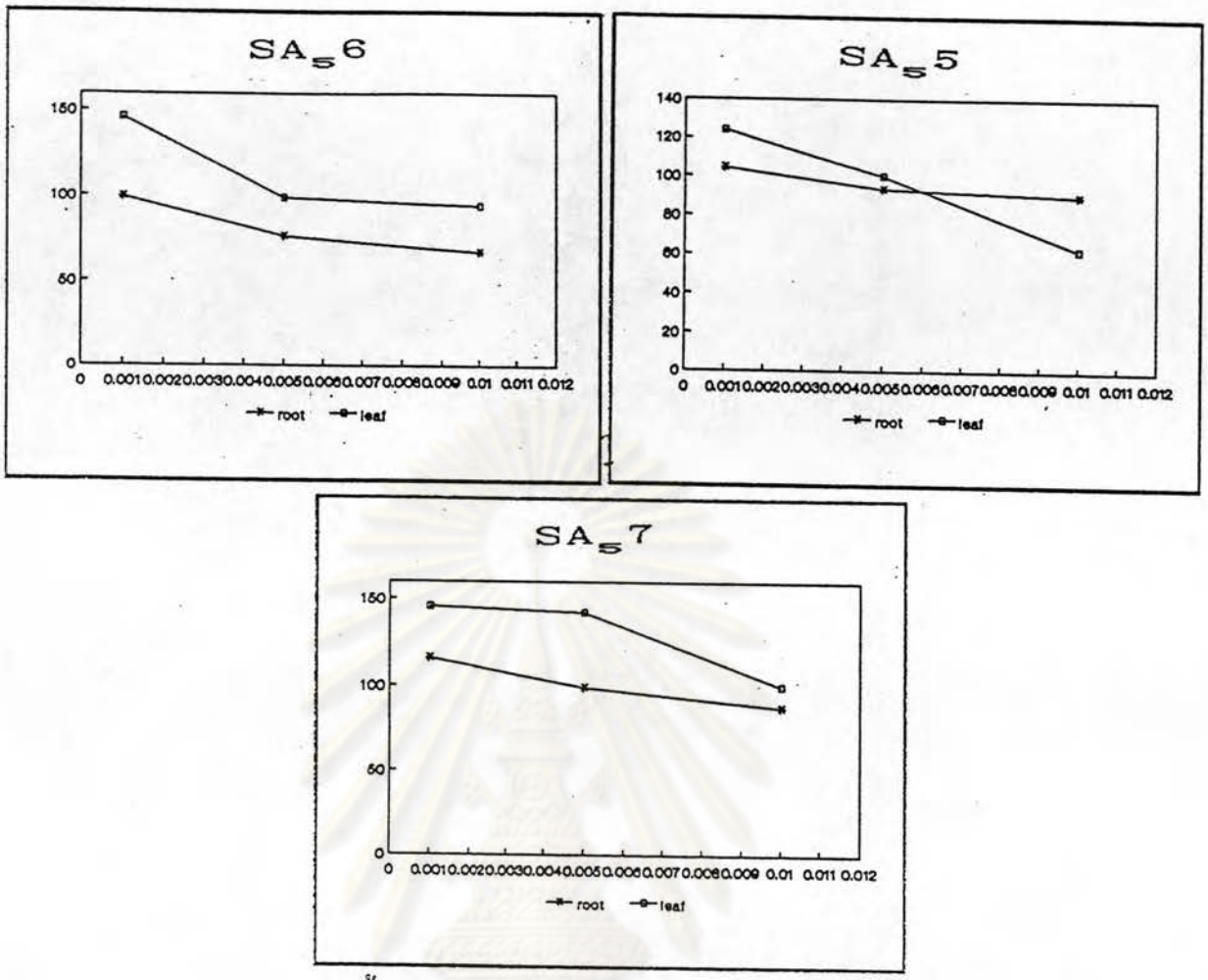
เมื่อนำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดบิวทานอล มาสร้างกราฟแสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบโดยเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อนเมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดบิวทานอล โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดบิวทานอล (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 2.6



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.6 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจาก $SA_5 1$-$SA_5 7$ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.6 (ต่อ)

2.14 <u>การแยกสารของสิ่งสกัดในน้ำที่เหลือ</u>

2.14.1 <u>การแยกสารของสิ่งสกัดในน้ำที่เหลือโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี</u>

หลังจากนำสิ่งสกัดที่เหลือจากข้อ 2.7.4 มาสกัดด้วยบิวทานอลตามวิธีการในข้อ 2.7.5 แล้วจะเหลือสิ่งสกัดในน้ำที่เหลือ 303 กรัมโดยแบ่งมา 80 กรัม นำมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟีใช้ซิลิกาเจลหนัก 600.00 กรัมเป็นตัวดูดซับ ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วน้อยไปหามากคือ สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสม ระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล เมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 800 ซม.^{3} นำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้ไปกลั่นแบบธรรมดา เพื่อไล่ตัวทำละลายออกให้เหลือปริมาตรประมาณ 10-15 ซม.^{3} จากนั้นนำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมี เหมือนกันหรือไม่โดยใช้ทินแลเยอร์-

โครมาโทกราฟี ตามวิธีการในข้อ 2.6.3 รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นโดยวิธีการตกผลึก ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในน้ำที่เหลือแสดงไว้ใน ตารางที่ 2.20

ตารางที่ 2.20 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดในน้ำที่เหลือ โดยวิธีคิวิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$SA_6$1	ไดคลอโรมีเทน	1-7	คราบสีเหลืองหนืด	3.56
	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (19:1)	8-12	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	4.25
$SA_6$2	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (19:1) และ (9:1)	13-27	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	19.36
$SA_6$3	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (9:1)และ(4:1)	28-45	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	14.22
$SA_6$4	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (4:1)	46-57	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	13.21
$SA_6$5	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (7:3)	58-61	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	12.32
$SA_6$6	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (3:2)	62-71	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	11.51
$SA_6$7	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (1:1),(2:3) และ (3:7)	72-93	น้ำมันสีน้ำตาลแดงหนืด	3.57
$SA_6$8	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล (1:4) และ เมทานอล	94-102	น้ำมันสีน้ำตาลขุ่นหนืด	2.19

2.14.2 <u>การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ</u>

โดยนำแต่ละส่วนที่แยกได้ในข้อ 2.14.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ตามวิธีการในข้อ 2.8.1 ผลการทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 2.21

<u>ตารางที่</u> 2.21 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในน้ำที่เหลือ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
		0.01	0.05	0.10
$SA_6$1	ราก	97.25	86.23	64.58
	กาบใบ	99.36	87.14	66.66
$SA_6$2	ราก	98.23	45.65	56.56
	กาบใบ	89.70	80.53	70.96
$SA_6$3	ราก	126.43	106.23	77.95
	กาบใบ	83.59	77.44	70.23
$SA_6$4	ราก	133.33	90.12	47.12
	กาบใบ	145.39	94.49	79.14
$SA_6$5	ราก	101.32	71.23	53.23
	กาบใบ	100.92	87.65	57.23
$SA_6$6	ราก	96.56	88.88	57.25
	กาบใบ	123.32	97.65	87.83

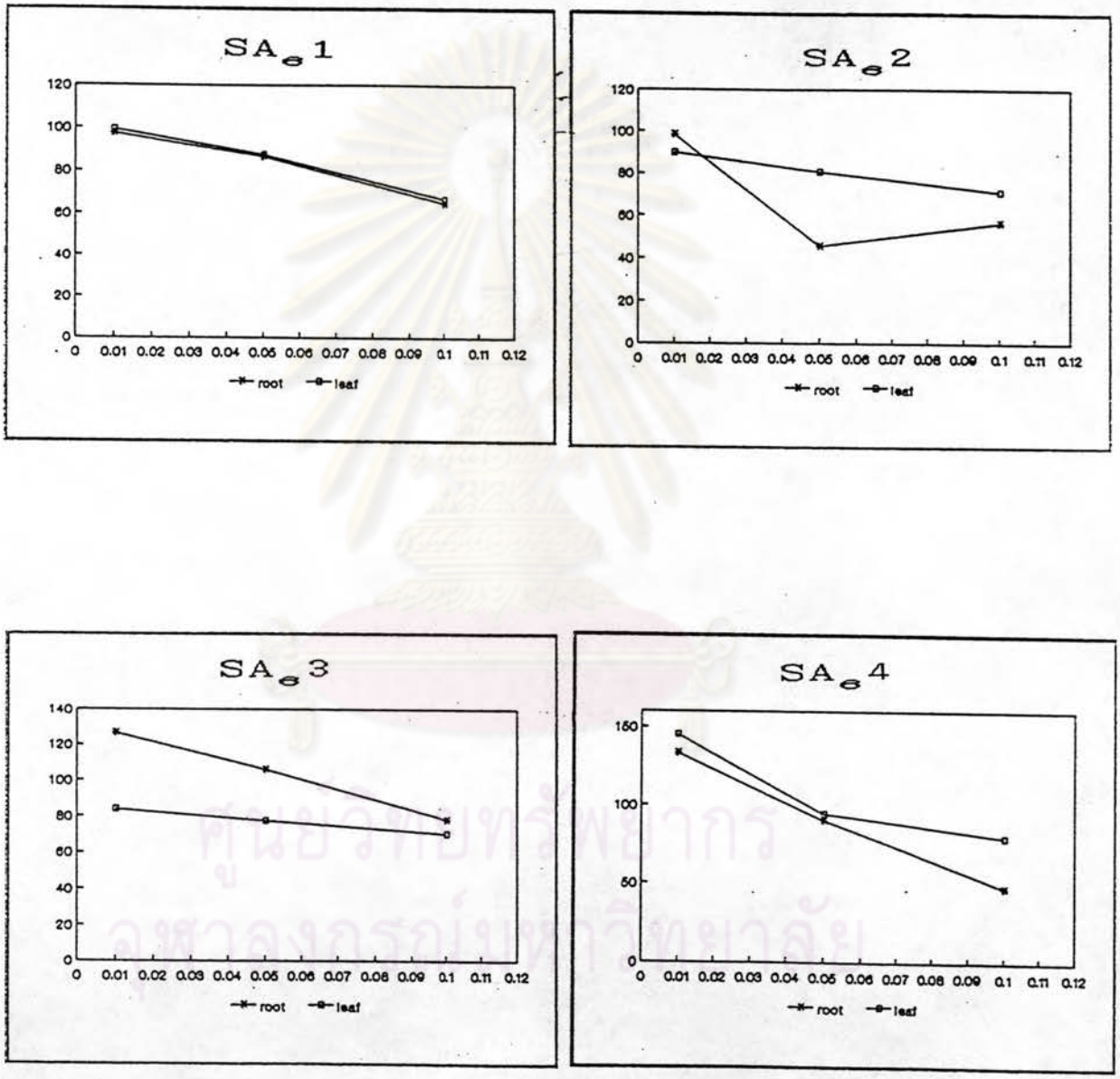
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.21 (ต่อ)

รหัส	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ		
		0.01	0.05	0.10
SA_67	ราก	105.45	99.68	69.36
	กาบใบ	98.36	87.12	77.40
SA_68	ราก	145.66	104.21	91.01
	กาบใบ	98.23	84.87	78.22

จากผลการทดสอบที่แสดงในตารางที่ 2.21 พบว่า ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในน้ำที่เหลือออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนได้น้อยไม่แตกต่างกัน

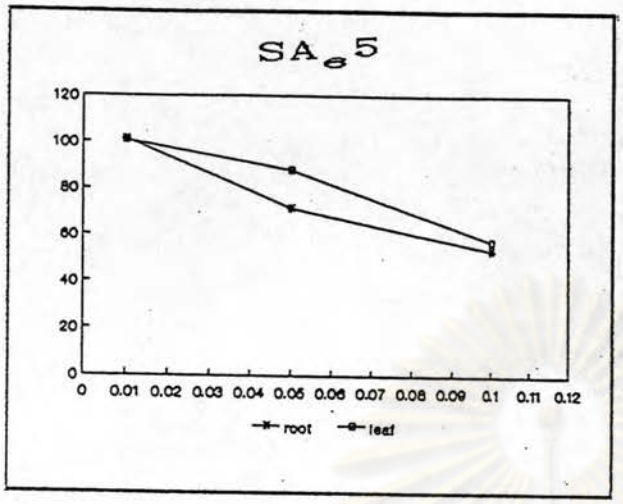
เมื่อนำผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ในแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในน้ำที่เหลือ มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ โดยเปรียบเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อน เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในเมทานอล โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของแต่ละส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในน้ำที่เหลือ (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังในรูปที่ 2.7

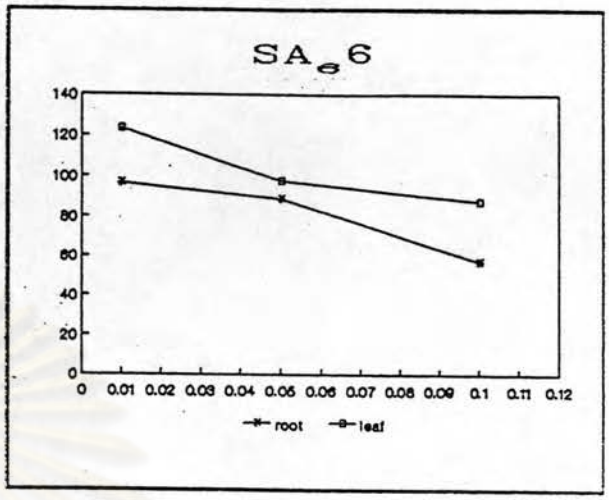


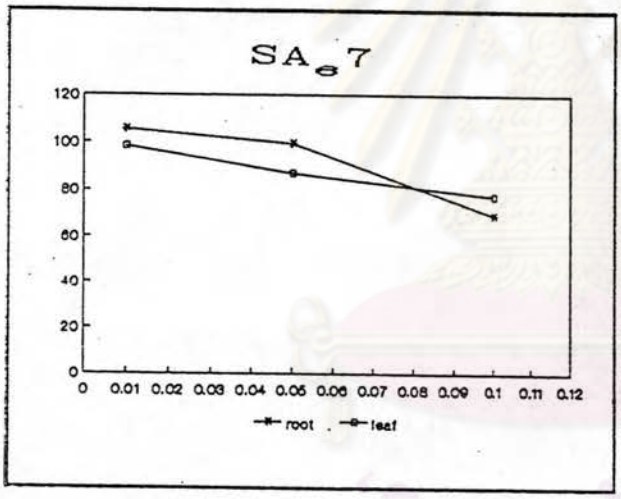
แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

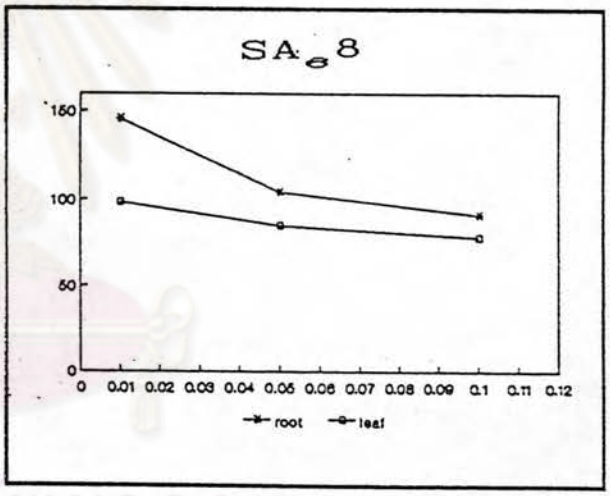
แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.7 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจาก SA_61-SA_68 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ









แกนตั้ง -เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน-ความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.7 (ต่อ)

2.15 <u>การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้</u>

2.15.1 <u>การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว</u>

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ของ <u>สาร 1</u>, <u>สาร 2</u>, <u>สาร 3</u>, <u>สาร 4</u>*, <u>สาร 5</u>, <u>สาร 6</u>, <u>สาร 7</u>, <u>สาร 8</u>, <u>สาร 9</u>, <u>สาร 10</u> และ <u>สาร 11</u> ตามวิธีการในหัวข้อ 2.8.1 แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 2.22

ตารางที่ 2.22 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อน ของ สาร 1, สาร 2, สาร 3, สาร 4, สาร 5, สาร 6, สาร 7, สาร 8, สาร 9, สาร 10 และ สาร 11

สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม: เซลลูโลส 1.5กรัม)	% ความยาว		% การยับยั้ง	
		ราก	กาบใบ	ราก	กาบใบ
สาร 1	0.001	139.02	147.56	0.00	0.00
	0.005	120.56	125.00	0.00	0.00
	0.01	111.12	122.98	0.00	0.00
สาร 2	0.001	78.21	99.21	21.79	0.79
	0.005	42.51	67.26	57.49	32.74
	0.01	26.77	45.32	73.23	54.68
สาร 3	0.001	126.42	98.42	0.00	1.58
	0.005	122.68	87.32	0.00	12.68
	0.01	99.61	54.23	0.39	45.77
สาร 5	0.001	131.23	97.87	0.00	2.13
	0.005	122.02	65.66	0.00	34.34
	0.01	100.79	55.54	0.00	44.46

* หมายเหตุ เนื่องจาก สาร 4 ที่แยกออกมาได้มีปริมาณน้อยมากจึงไม่สามารถนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.22 (ต่อ)

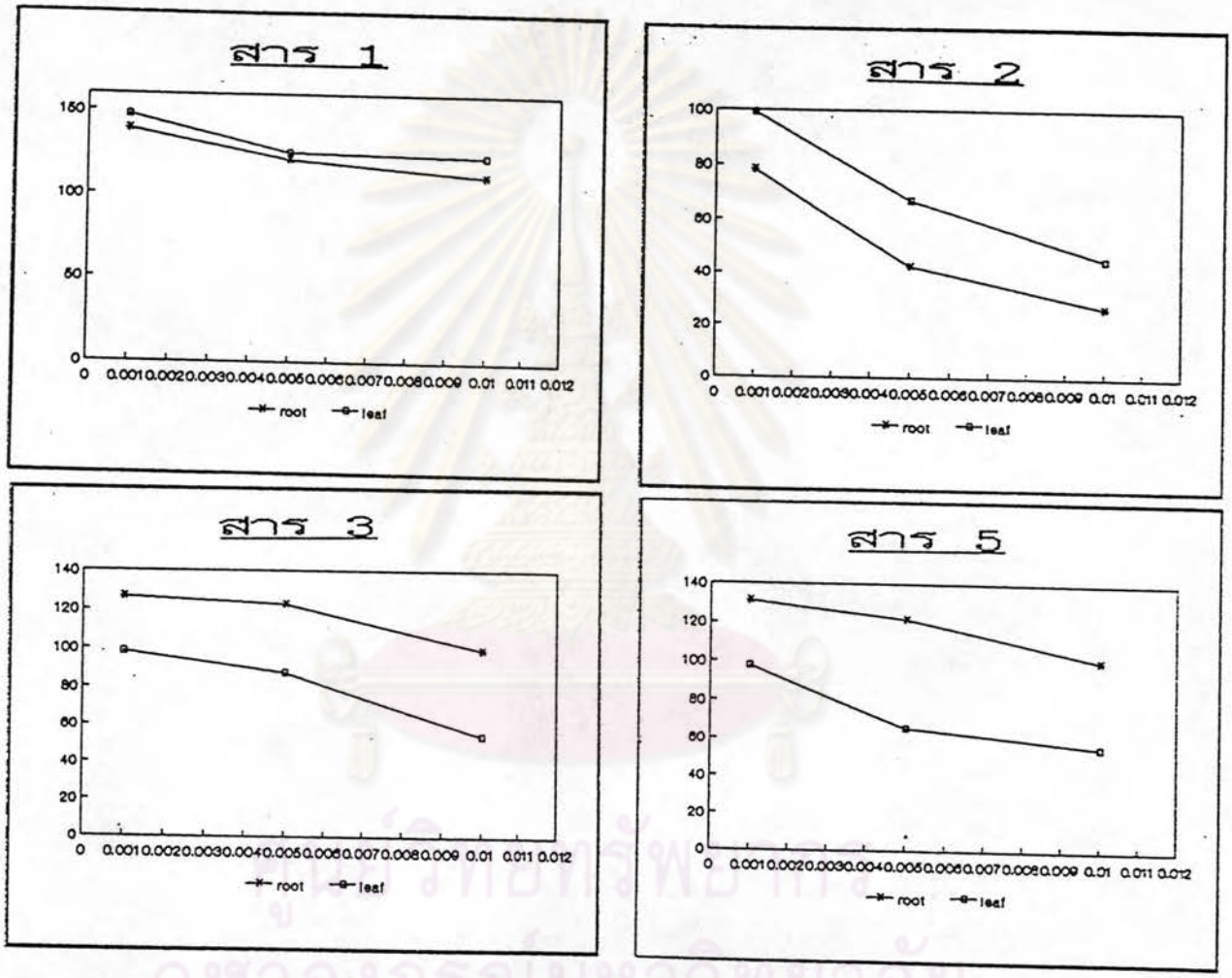
สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม: เซลลูโลส 1.5กรัม)	% ความยาว		% การยับยั้ง	
		ราก	กาบใบ	ราก	กาบใบ
สาร 6	0.005	121.21	100.35	0.00	0.00
	0.01	100.65	87.82	0.00	12.18
	0.05	68.21	54.21	31.79	45.79
สาร 7	0.001	23.06	34.17	76.94	65.83
	0.005	2.30	1.23	97.70	98.77
	0.01	0.00	0.00	100.00	100.00
สาร 8	0.001	68.51	99.56	31.49	0.44
	0.005	56.23	70.51	44.77	29.49
	0.01	40.23	42.13	59.77	57.87
สาร 9	0.0005	94.23	99.23	5.77	0.77
	0.001	82.75	87.69	17.25	12.31
	0.005	69.96	54.23	30.04	45.77
สาร 10	0.0005	97.89	111.20	2.11	0.00
	0.001	89.23	98.45	10.77	1.55
	0.005	79.56	80.21	20.44	19.79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.22 (ต่อ)

สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม: เซลลูโลส 1.5กรัม)	% ความยาว		% การยับยั้ง	
		ราก	กาบใบ	ราก	กาบใบ
สาร 11	0.0005	112.87	136.56	0.00	0.00
	0.001	93.54	89.93	6.45	10.07
	0.005	57.23	64.78	42.77	35.22

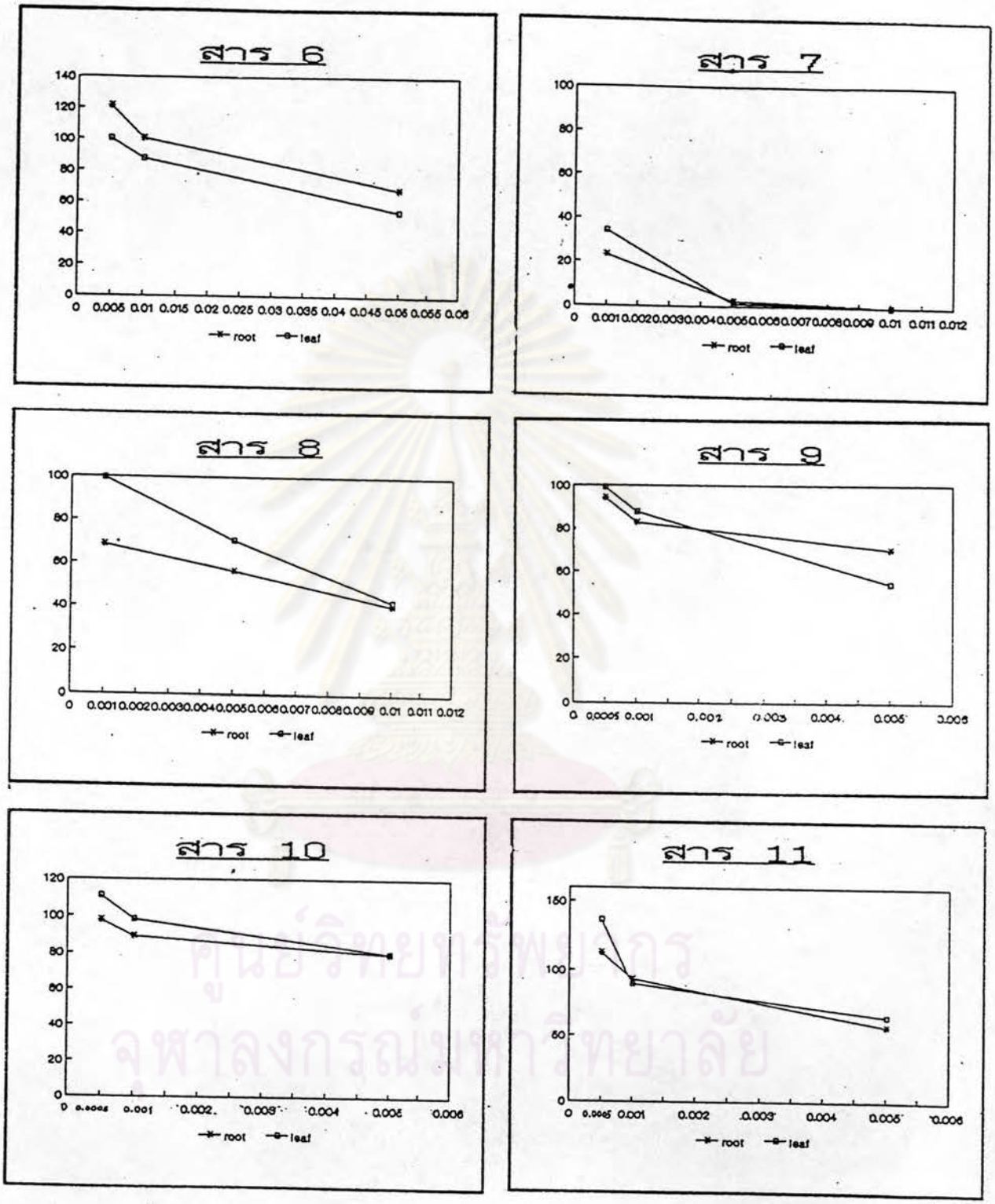
จากการทดสอบที่แสดงดังตารางที่ 2.22 พบว่า สารบริสุทธิ์แต่ละตัวแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนต่างกัน โดยพบว่า สาร 7 ซึ่งมีองค์ประกอบ 4.01×10^{-3} น้ำหนักโดยน้ำหนัก และความเข้มข้น 0.005 กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด รองลงมาคือ สาร 2, สาร 8, สาร 9, สาร 10 และ สาร 11 ซึ่งแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวอ่อนได้ไม่มากพอ ๆ กัน ซึ่งสามารถนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความยาวของราก และกาบใบ โดยเทียบกับความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าวอ่อนเมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของสารที่แยกได้ โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซ็นต์ความยาวของราก และกาบใบ ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสารที่แยกได้ (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังแสดงในรูปที่ 2.8



แกนตั้ง - เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน - ความเข้มข้นของสาร (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.8 กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับ สาร 1-สาร 11 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



แกนตั้ง - เปอร์เซ็นต์ความยาว

แกนนอน - ความเข้มข้นของสาร (กรัม: เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.8 (ต่อ)