บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

น้ำผักบอดนาที่ขึ้นอยู่ในแปลงทดลองของกองวัชพืช กรมวิชาการเกษตร บางเขน กรุงเทพฯ มาทำการทดลอง โดยเก็บในเดือนธันวาคม หลังจากการเก็บเกี่ยวข้าวแล้วเมื่อปล่อยที่นาทิ้งไว้จะมีพืชชนิดนี้เกิดขึ้นมากมาย จากนั้นนำผักบอดนาสดที่ได้ไปตากแห้ง สกัดด้วยเอทานอล นำสิ่งสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและหาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์สาร

2.2.1 เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Tokyo Rikakikai ประเทศญี่ปุ่น สำหรับกลั่นตัวทำละลายที่มากเกินพอ

2.2.2 Fisher Johns Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับหาจุดหลอมเหลวของสาร

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

2.2.4 Gas Chromatograph model GC - 7AG ของบริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น สำหรับบันทึกแก๊สโครมาโทแกรม

2.2.5 High Performance Liquid Chromatograph model 803C UV Detector ของบริษัท Gilson ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับแยกสารออกจากกันในปริมาณน้อย ๆ และบันทึกลิควิดโครมาโทแกรม

2.2.6 Mass Spectrometer model JMS-DX 300 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่นและ model JMS-AX 500 สำหรับบันทึกแมสสเปกตรัม

2.2.7 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer model AC-F 200 ของบริษัท Bruker ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ สำหรับวัดโปรตอนและคาร์บอน-นิวเคลียร์แมกเนติกรีโซแนนซ์สเปกตรัม สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$) หรือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์-ดี6 (DMSO-D_6)

2.2.8 CHNO Analyzer model 240C. ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับหาเปอร์เซ็นต์ของธาตุที่เป็นองค์ประกอบของสาร

2.3 สารเคมี

2.3.1 ตัวทำละลาย ใช้คอมเมอร์เชียลเกรด โดยนำมาทำให้บริสุทธิ์ก่อนด้วยการกลั่น ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เมทานอล เอทานอล อีเทอร์ แอซีโตน เอทิลแอซีเตต บิวทานอล และน้ำ

2.3.2 รีเอเจนต์ ที่ใช้ทดสอบทางปฏิกิริยาเคมีได้แก่ Liebermann-Burchard, 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$, Br_2 ใน CCl_4

2.3.3 รีเอเจนต์ ที่ใช้เตรียมอนุพันธ์ ได้แก่ KOH, acetic anhydride, conc H_2SO_4, conc HCl, N-N-dimethyl-N-nitrosoguidanidine

2.3.4 ตัวดูดซับ ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 Art 7734 ของบริษัท E. Merck Darmstadt สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟี และซิลิกาเจลชนิด 60G Art 7731 ของบริษัท E. Merck Darmstadt สำหรับทินแลร์โครมาโทกราฟีและควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.4 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

2.4.1 ควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Quick Column Chromatography)(62)

วิธีนี้มักจะใช้ในการแยกสารออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ก่อนตามความมีขั้วของสารเพื่อความรวดเร็ว แล้วจึงนำสารกลุ่มใหญ่นั้นไปแยกให้ได้สารที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อไป

วิธีเตรียม ใช้ sintered glass เบอร์ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 ซม. เป็นคอลัมน์ นำ sintered glass วางลงบนขวดดูด (suction flask) ซึ่งต่อกับปั๊มน้ำโดยมีจุกยางรองรับ เปิดปั๊มน้ำ บรรจุซิลิกาเจลชนิด 60G Art 7731 ซึ่งใช้เป็นตัวดูดซับลงใน sintered glass ให้สูงประมาณ 4 ซม. ระหว่างบรรจุซิลิกาเจลต้องกดให้แน่นและเกลี่ยผิวหน้าให้เรียบ จากนั้นเทตัวทำละลายลงบนผิวหน้าซิลิกาเจลเพื่อให้ตัวทำละลายไหลผ่านลงขวดดูด ซึ่งจะทำให้ซิลิกาเจลอัดตัวแน่นยิ่งขึ้น นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วนบดให้ละเอียด บรรจุลงในคอลัมน์แล้วกดผิวหน้าให้เรียบ ปิดผิวหน้าด้วยกระดาษกรอง ชะคอลัมน์ที่เตรียมเรียบร้อยแล้วด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารครั้งละเท่า ๆ กัน

2.4.2 <u>คอลัมน์โครมาโทกราฟี</u> (Column Chromatography) (63)

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 ซม. ยาว 120 ซม. อัตราส่วนตัวดูดซับ (absorbent) ต่อสารที่ต้องการแยกประมาณ 20 : 1 โดยน้ำหนัก

วิธีเตรียม นำคอลัมน์แก้วมาอุดปลายด้านล่างด้วยสำลีที่สะอาดจำนวนเล็กน้อย ใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ที่ปลายด้านล่าง แล้วบรรจุตัวทำละลายลงไปประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ เปิด stopcock ให้ตัวทำละลายไหลออกจากคอลัมน์ช้า ๆ เพื่อไล่ฟองอากาศและป้องกันไม่ให้สำลีลอย จากนั้นผสมซิลิกาเจลชนิด 60 Art 7734 กับตัวทำละลายคนให้เข้ากันแล้วนำไปบรรจุลงในคอลัมน์ค่อย ๆ บรรจุซิลิกาเจลนั้นลงไปให้ติดต่อและสม่ำเสมอกัน พร้อมทั้งเปิดคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ และคอยปรับให้ผิวหน้าเรียบโดยเคาะคอลัมน์เบา ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลลงไปในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลจนหมด ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเหลือประมาณ 5 ซม. เหนือผิวซิลิกาเจลจึงปิด stopcock นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลาให้เข้ากันจนร่วนแล้วบรรจุลงในคอลัมน์ช้า ๆ โดยไม่ให้มีฟองอากาศและให้ผิวหน้าเรียบ ล้างผิวภายในคอลัมน์ให้สะอาดด้วยตัวทำละลายเดิม แล้วปล่อยให้ระดับของตัวทำละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจลอีกครั้ง แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกสารต่อไป

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

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซม. ยาว 55 ซม. อัตราส่วนของตัวดูดซับ (adsorbent) ต่อสารที่ต้องการแยกประมาณ 10:1 โดยน้ำหนัก

วิธีเตรียมคอลัมน์ใช้วิธีเดียวกับข้อ 2.4.2 แต่ใช้ตัวดูดซับแตกต่างกันคือ ใช้celite: activated charcoal ในอัตราส่วน 3:1 แทนซิลิกาเจล ผสมตัวดูดซับกับตัวทำละลายที่ต้องการเริ่มต้นชะคอลัมน์ คนด้วยเครื่องคนแม่เหล็กเป็นเวลา 15 นาที นำไปบรรจุในคอลัมน์ตามวิธีเดียวกับข้อ 2.4.2 แล้วจึงชะ (elute) คอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ใช้แยกสารต่อไป

2.4.4 <u>ทินแลร์โครมาโทกราฟี</u> (Thin-layer Chromatography) (64)

การเตรียมโครมาโทเพลท (chromatoplate) ผสมซิลิกาเจลชนิด 60G Art 7731 กับน้ำ ในอัตราส่วน 1 : 2 (ซิลิกาเจล 25 กรัม : น้ำ 50 กรัม) ในขวดปากกว้าง เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดี เทลงใน Desaga Spreader ที่ปรับความหนา 0.25 มม. เรียงกระจกขนาด 5 x 20 หรือ 20 x 20 ซม. บนรางขนาด 110 x 20 ซม. เช็ดกระจกด้วยแอซีโตน เคลือบซิลิกาเจลลงบนกระจกก็จะได้โครมาโทเพลท ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1/2 ซม. แล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 105 - 110 องศาเซลเซียล ประมาณ 1 ชม.

การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วสะอาดที่มีฝาปิดสนิทขนาดพอเหมาะที่จะใส่โครมาโทเพลทได้ ใส่กระดาษกรองให้ทาบผิวด้านในขวด เติมตัวทำละลายที่จะใช้ develop ลงในขวดให้สูงประมาณ 1 ซม. ปิดฝาขวดเอียงขวดให้ตัวทำละลายเปียกกระดาษกรองให้ทั่วแผ่น ทิ้งไว้ 1/2 ซม. เพื่อให้ในขวดอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

การแต้มสาร ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 0.05 ซม. แต้มสารที่ต้องการทดสอบลงบนโครมาโทเพลท โดยให้จุดเริ่มต้นห่างจากขอบล่างและขอบข้างประมาณ 1 ซม. สารแต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 1 ซม. ด้านบนชิด solvent front ที่ต้องการไว้ ปล่อยให้จุดของสารละลายที่แต้มแห้งสนิท แล้วจึงนำไปทำการ develop

การ develop จุ่มโครมาโทเพลทที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิดฝาทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึงขีด solvent front จึงเอาโครมาโทเพลทออกจากขวดแก้ว ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง นำไปตรวจหาตำแหน่งของสาร

การตรวจหาตำแหน่งของสาร ทำได้โดยการใช้ไอโอดีน กรดซัลฟูลิกเข้มข้น 25 % หรือแสงอุลตราไวโอเลต การใช้ไอโอดีนเป็นตัวตรวจสอบทำได้โดยการนำโครมาโทเพลทที่ develop แล้วใส่ในขวดที่มีเกล็ดไอโอดีน ปิดฝาขวดให้สนิท ปล่อยจนกระทั่งบริเวณที่มีสารเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้น สำหรับการใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 % ทำได้โดยการพ่นลงบน

โครมาริทเพลทที่ develop แล้ว ทิ้งจนแห้งนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 100 - 110 องศาเซลเซียล ประมาณ 10 นาที บริเวณที่มีสารจะเห็นเป็นจุดสีต่าง ๆ ชัดเจน

2.4.5 การกลั่น

การกลั่นใช้ในการแยกตัวทำละลายที่มากเกินพอออกจากสารละลาย การกลั่นมี 2 แบบ คือ การกลั่นธรรมดาและการกลั่นลดความดัน การกลั่นธรรมดาใช้กับตัวทำละลายที่มีจุดต่ำ เช่น เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม เป็นต้น ส่วนการกลั่นลดความดันใช้กับตัวทำละลายที่มีขั้วและจุดเดือดสูง เช่น เมทานอล เพื่อให้ตัวทำละลายเดือดก่อนถึงจุดเดือด มักใช้ในการกลั่นตัวทำละลายออกจากสารละลายที่สลายตัวง่ายเมื่อถูกความร้อน เพราะการกลั่นลดความดันจะใช้ความร้อนต่ำกว่าการกลั่นแบบธรรมดาเมื่อตัวทำละลายเป็นชนิดเดียวกัน เครื่องมือที่ใช้ในการกลั่นแบบนี้เรียกว่า เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator)

2.5 การทดสอบทางปฏิกิริยาเคมี

2.5.1 การทดสอบสเตอรอยด์และไตรเทอร์พีนอยด์ (65)

การทดสอบนี้สามารถใช้ทดสอบสารประกอบสเตอรอยด์ หรือ ไตรเทอร์พีนอยด์ โดยนำสารที่ต้องการทดสอบมา 1-2 มก. เติมคลอโรฟอร์ม 0.5 ซม.^{3} หยด acetic anhydride ลงไป 2 หยด หลังจากนั้นหยดกรดซัลฟุริกเข้มข้นตามลงไปอีก 2 หยด ถ้าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีอื่นมาเป็นสีเขียว หรือสีเขียวแกมน้ำเงิน แสดงว่าสารที่นำมาทดสอบเป็นสารจำพวกสเตอรอยด์ แต่ถ้าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีอื่นมาเป็นสีแดงหรือม่วงแดงแสดงว่าสารที่นำมาทดสอบเป็นสารจำพวก ไตรเทอร์พีนอยด์

2.5.2 การทดสอบหมู่คาร์บอนิล (66)

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

การเตรียมสารละลาย 2,4-DNP (2,4-dinitrophenylhydrazine) ละลาย 2,4-DNP 3 กรัม ใน conc H_2SO_4 15 ซม.^{3} เทสารละลายที่ได้ลงในสารละลายผสมของน้ำ 20 ซม.^{3} และ 95% เอทานอล 70 ซม.^{3} คนอย่างสม่ำเสมอจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน กรองเอาตะกอนออก นำสารละลายที่กรองได้มาใช้ในการทดสอบ

2.5.3 การทดสอบหมู่ฟีนอล (66)

นำสารประมาณ 1 มก. มาละลายในเอทานอล หรือน้ำ หรือคลอโรฟอร์ม หยดสารละลาย 5% $FeCl_3$ ทีละหยดเขย่า ถ้าเป็นสารประกอบฟีนอลจะได้สารละลายสีชมพูแดง ม่วง หรือ เขียว

2.5.4 การทดสอบความไม่อิ่มตัว(66)

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

2.6 วิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.6.1 การศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรีย (Antifungal and Antibacterial Studies)(67)

ใช้วิธี paper disc method ในการทดสอบ โดยเตรียมอาหารที่ใช้เพาะเชื้อ (commercial culture media ; potato - dextrose agar) ตามวิธีทำที่กำหนดอยู่บนภาชนะบรรจุ นำมาอบที่ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที แล้วริน culture media ใส่ในจานเพาะเชื้อ ทำการเพาะเชื้อ เมื่อเชื้อเจริญเติบโตออกจากที่เพาะเชื้อเข้าใกล้ treatment disc สังเกตและบันทึกบริเวณที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ เชื้อราที่ใช้สำหรับการทดสอบเบื้องต้นคือ Pythium ultimum, Rhizoctonia solani, Pyrenophora teres ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ Xanthramonas compestrous

2.6.2 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว (68-70)

การเตรียมเมล็ดข้าว นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข.23 มาแช่ทิ้งไว้ 2 คืน เพื่อให้เมล็ดข้าวงอกส่วนรากออกมา เลือกเมล็ดข้าวที่ความยาวของราก 1 - 2 มม. มาทำการทดลอง

การเตรียมสารทดลอง นำสารที่ต้องการทดสอบมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เตรียมสารละลายตามความเข้มข้นที่ต้องการ 3 ความเข้มข้น นำสารละลายที่ได้แต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซม. ที่มีผงเซลลูโลสบรรจุอยู่จำนวน 1.5 กรัม โดยใส่ความเข้มข้นละ 3 หลอด ส่วนหลอดที่ใช้เป็นมาตรฐานจะบรรจุเฉพาะผงเซลลูโลส

จำนวน 3 หลอด ปิดปากหลอดแก้วด้วยกระดาษอะลูมิเนียม แล้วนำหลอดทั้งหมดไปอบในตู้อบ เป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปหมด จากนั้นคนให้สารกระจายอยู่ทั่วไปในผงเซลลูโลส เติมน้ำลงในหลอด ๆ ละ 4 ซม.^{3} นำเมล็ดข้าวที่เลือกไว้มาปลูกลงหลอด ๆ ละ 6 เมล็ด ปิดปากหลอดแก้วด้วยพลาสติกใส นำไปใส่ในตู้เพาะชำที่มีไฟเปิดตลอดเวลา อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 7 วันจึงวัดผล

การวัดผล นำต้นข้าวออกจากหลอดแก้ว ล้างด้วยน้ำให้สะอาดนำมาวัดความยาวของรากและความยาวของกาบใบของเมล็ดข้าว ซึ่งจะได้เป็นค่าเฉลี่ยของเมล็ดข้าว 18 เมล็ด ใน 1 ความเข้มข้น เปรียบเทียบกับความยาวเฉลี่ยของรากและกาบใบของเมล็ดข้าวที่งอกในหลอดที่บรรจุเฉพาะผงเซลลูโลสซึ่งใช้เป็นความยาวมาตรฐานเท่ากับ 100 % ถ้าความยาวของรากและกาบใบใกล้เคียงกับความยาวมาตรฐาน แสดงว่าสิ่งสกัดนั้นไม่มีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว แต่ถ้าแตกต่างกันแสดงว่าสิ่งสกัดนั้นมีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว

2.6.3 <u>การศึกษาความเป็นพิษกับปลา</u> (68-70)

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

นำสารที่ต้องการทดสอบมาละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เตรียมเป็นสารละลายความเข้มข้นตามต้องการ 3 ความเข้มข้น ใส่สารละลายลงในจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ขนาด 4 x 4 ซม. อยู่ 1 แผ่น ความเข้มข้นละ 3 จาน ส่วนที่เป็นมาตรฐานคือกระดาษกรองชนิดและขนาดเบอร์เดียวกัน ปล่อยทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกหมด จากนั้นตัดกระดาษกรองในแต่ละจานให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปใส่ถ้วยเลี้ยงปลาที่เตรียมไว้ บันทึกจำนวนปลาที่ตายเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7 การสกัด

2.7.1 การสกัดวิธีที่ 1 สกัดด้วยตัวทำละลายเรียงตามลำดับดังนี้ เอทานอล คลอโร-ฟอร์ม-น้ำ

การสกัดด้วยเอทานอล นำผักบอดนา (ทั้งต้น) ที่ตากแห้งแล้วบดละเอียดหนัก 4.17 กก. มาสกัดด้วยเอทานอลจำนวน 20 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากรองแล้วกลั่นแยกเอาเอทานอลออกจนเกือบหมด โดยวิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน นำเอทานอลที่กลั่นได้ไปสกัดผักบอดนาซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายเอทานอลที่กรองได้ไม่มีสีจึงหยุดสกัด สุดท้ายจะได้สิ่งที่สกัดด้วยเอทานอลเหนียวข้นสีเขียวเข้มหนัก 958.5 กรัม คิดเป็น 22.98 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจะนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นต่อไป

การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม - น้ำ นำสารที่สกัดด้วยเอทานอลมาละลายด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 500 ซม.^{3} ใส่ลงใน liquid - liquid extractor ซึ่งมีคลอโรฟอร์มจำนวน 500 ซม.^{3} จากนั้นเติมน้ำลงใน liquid - liquid extractor ปริมาณ 1000 ซม.^{3} สกัดด้วยคลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้ง ครั้งละ 500 ซม.^{3} จนกระทั่งสารละลายในชั้นคลอโรฟอร์มไม่มีสี แยกสารละลายสองชั้นออกจากกัน

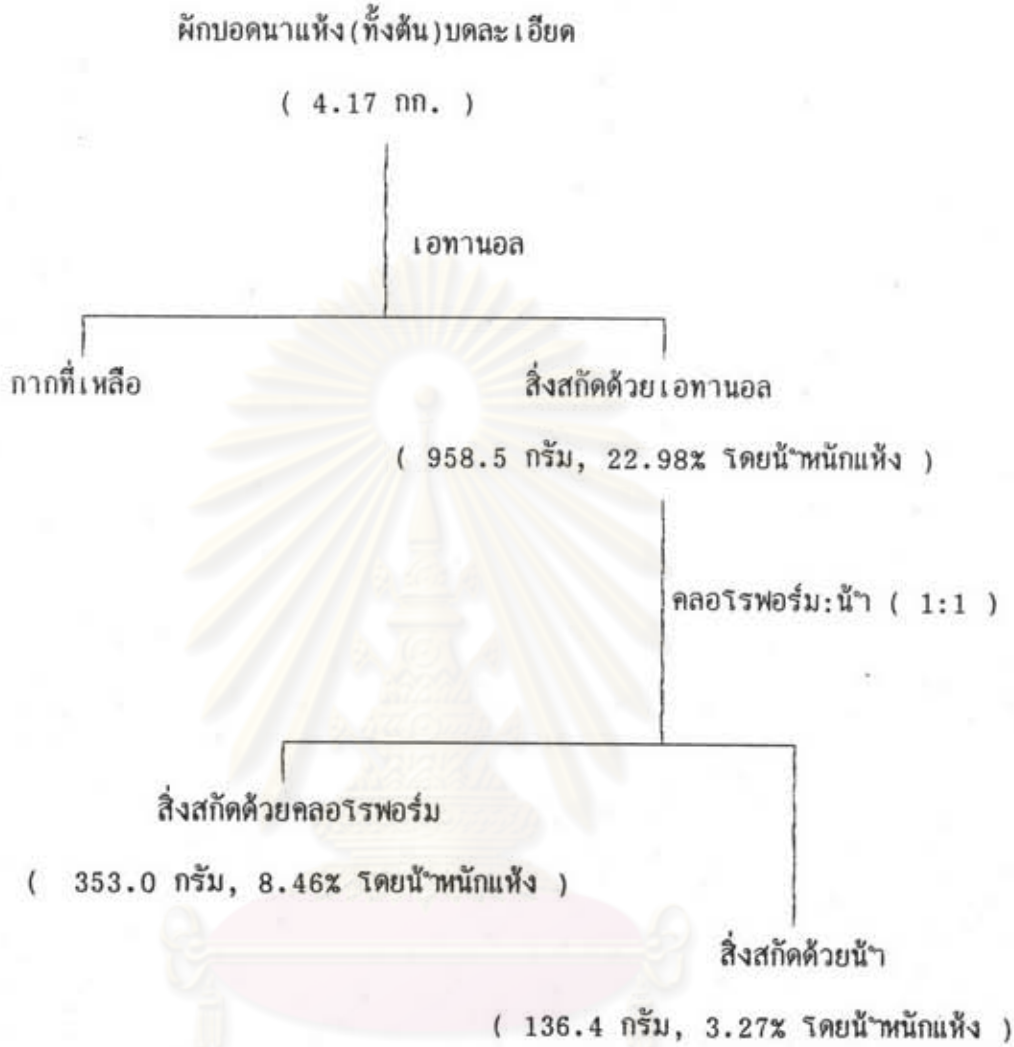
นำสารละลายในชั้นคลอโรฟอร์มมากรองผ่าน anhydrous Na_2SO_4 เพื่อกำจัดน้ำที่ปนออกมา จากนั้นกลั่นไล่คลอโรฟอร์มออกจากสารละลายโดยวิธีกลั่นแบบธรรมดา ได้สิ่งสกัดข้นสีเขียวเข้ม หนัก 353.0 กรัม คิดเป็น 8.46 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจะนำไปทำการแยกสารโดยคริคคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

นำสารละลายในชั้นน้ำไปกลั่นไล่น้ำออกโดยวิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน ได้สารที่สกัดด้วยน้ำสีน้ำตาลหนัก 136.4 กรัม คิดเป็น 3.27 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17168339

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดผักบอดนาวิธีที่ 1



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7.1.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดวิธีที่ 1

2.7.1.1.1 การทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรีย

นำสิ่งสกัดแต่ละชนิดไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียตามวิธีข้อ 2.6.1 ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียของสิ่งสกัดจากผักบอดนา (การสกัดวิธีที่ 1)

สิ่งสกัด	ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์			
	Pyth	Rhi	Pyr	Xan
เอทานอล	+	–	–	–
คลอโรฟอร์ม	+	–	–	–
น้ำ	+	+	+	–

Pyth = Pythium ultimum Rhi = Rhizoctonia solani

Pyr = Pyrenophora Teres Xan = Xanthramonas campestrous

เครื่องหมาย - คือ ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโต

เครื่องหมาย + คือ มีผลยับยั้งการเจริญเติบโต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

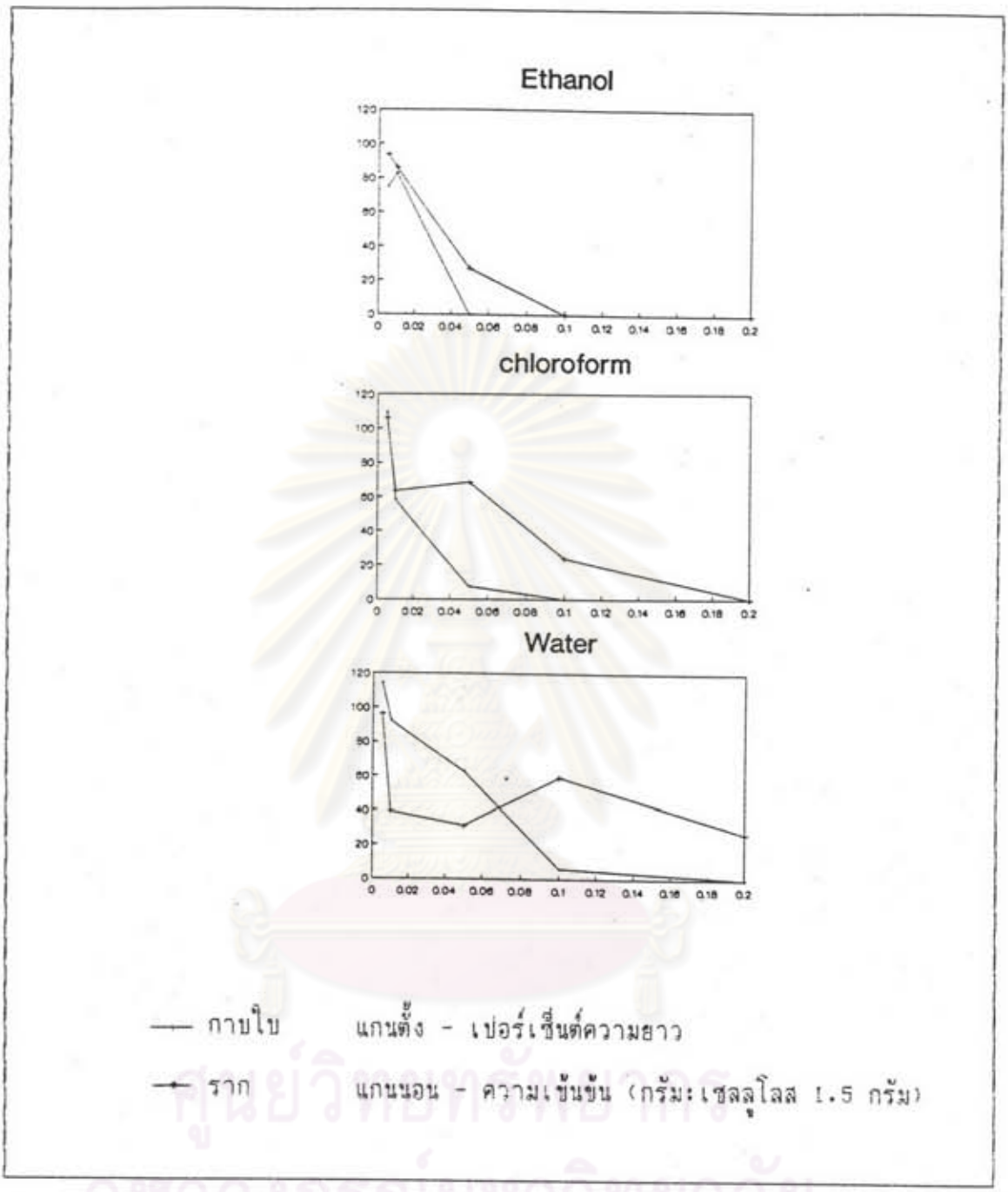
2.7.1.1.2 <u>การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวและความเป็นพิษกับปลา</u>

นำสิ่งสกัดแต่ละชนิดไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวตามวิธีข้อ 2.6.2 ได้ผลดังตารางที่ 8 และรูปที่ 10

<u>ตารางที่ 8</u> ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวของสิ่งสกัดจากผักปอดนา (การสกัดวิธีที่ 1)

สิ่งสกัด	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม)				
		0.005	0.01	0.05	0.1	0.2
เอทานอล	ราก	74.60	82.79	0.00	0.00	0.00
	กาบใบ	93.56	86.03	26.60	0.00	0.00
คลอโรฟอร์ม	ราก	109.39	58.16	7.56	0.00	0.00
	กาบใบ	106.06	63.46	68.52	23.79	0.00
น้ำ	ราก	114.03	92.16	62.64	6.03	0.00
	กาบใบ	96.16	39.29	31.18	59.10	26.74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



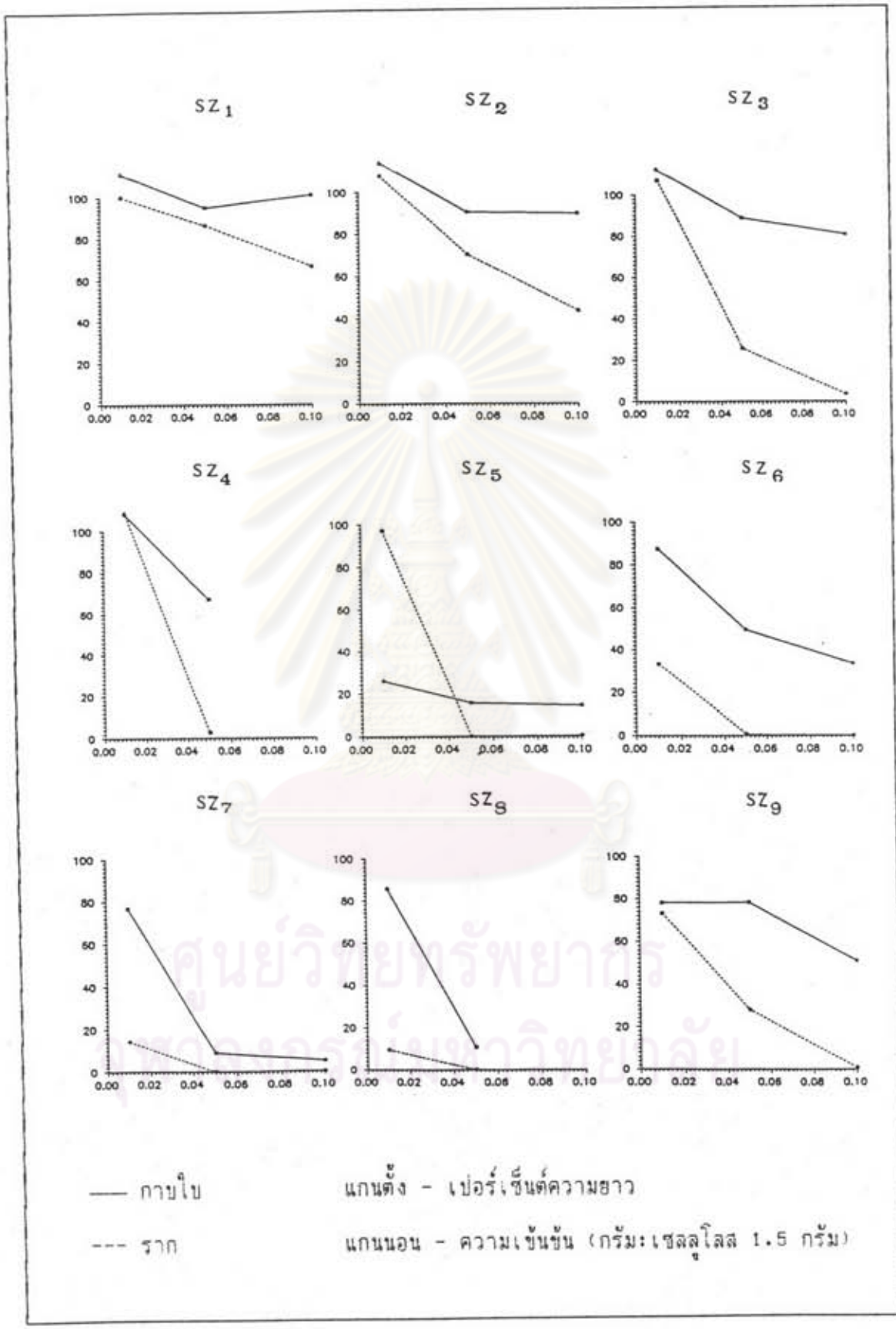
รูปที่ 10 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบข้าวเมื่อได้รับสิ่งสกัดจากผักปอดนา (การสกัดวิธีที่ 1)

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่า สิ่งสกัดคลอโรฟอร์มมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว และเป็นสิ่งสกัดที่มีสารอินทรีย์มากที่สุด จึงนำสิ่งสกัดของผักปอดนาในคลอโรฟอร์มมา 50 กรัม ทำควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ชะด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามาก จากนั้นนำสารได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับต้นข้าวตามวิธีข้อ 2.6.2 ได้ผลดังตารางที่ 9 และรูปที่ 11 และการแสดงความเป็นพิษกับปลาตามวิธีข้อ 2.6.3 ได้ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวของสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม

รหัส	ตัวทำละลาย	ลำดับที่	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม)		
				0.01	0.05	0.10
SZ_1	เฮกเซน	1-4	ราก	100.04	86.21	66.19
			กาบใบ	111.44	94.89	101.00
SZ_2	เฮกเซน ,	5-24	ราก	107.75	70.16	43.54
	10%ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน		กาบใบ	114.22	90.22	89.67
SZ_3	20%ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	25-32	ราก	107.10	25.69	3.47
			กาบใบ	112.44	88.67	80.89
SZ_4	20%ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	33-37	ราก	109.30	2.63	-
			กาบใบ	108.33	67.17	-
SZ_5	30%ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	38-59	ราก	97.12	0	0.43
			กาบใบ	25.78	15.42	14.22
SZ_6	40-75%ไดคลอโรมีเทน:	60-	ราก	33.23	0.48	0
	เฮกเซน	108	กาบใบ	87.45	49.44	33.33
SZ_7	75%ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	109-	ราก	14.26	0	0
		121	กาบใบ	76.67	9.0	5.0
SZ_8	85%ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	122-	ราก	9.51	0	-
		134	กาบใบ	85.67	10.81	-
SZ_9	เมทานอล	135-	ราก	73.18	27.88	0.69
		137	กาบใบ	78.11	78.22	50.89

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบข้าวเมื่อได้รับสาร SZ_1-SZ_9 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความเป็นพิษกับปลาของสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย	ลำดับที่	เปอร์เซ็นต์การตายของปลาที่ความเข้มข้น**ต่าง ๆ					
			0.005	0.01	0.03	0.05	0.1	0.5
SZ_1	เฮกเซน	1-4	-	0	0	-	-	-
SZ_2	เฮกเซน , 10%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	5-24	-	5	-	0	-	100
SZ_3	20%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	25-32	-	0	-	0	0	-
SZ_4	20%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	33-37	0	15	-	-	-	-
SZ_5	30%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	38-59	-	0	-	0	14	-
SZ_6	40-75%ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	60-108	4	0	-	-	-	-
SZ_7	75%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	109-121	-	5	-	100	100	-
SZ_8	85%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	122-137	-	7	-	7	7	-

**กรัมต่อน้ำ 200 ซม.^{3}

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของต้นข้าวและความเป็นพิษกับปลา ของส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี สามารถสรุปฤทธิ์ทางชีวภาพของแต่ละส่วนได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้จากสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม

รหัส	ตัวทำละลาย	ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของต้นข้าว	ความเป็นพิษกับปลา
SZ_1	เฮกเซน	–	–
SZ_2	เฮกเซน, 10% ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	–	+
SZ_3	20% ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	+	–
SZ_4	20% ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	+	+
SZ_5	30% ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	–	+
SZ_6	40-75% ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	++	–
SZ_7	75% ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	+++	+++
SZ_8	85% ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	++	+
SZ_9	เมทานอล	+	*

+ มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

– ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

* ไม่มีรายงาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.7.2 <u>การสกัดวิธีที่ 2</u> สกัดด้วยตัวทำละลายตามลำดับต่อไปนี้คือ เอทานอล เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน

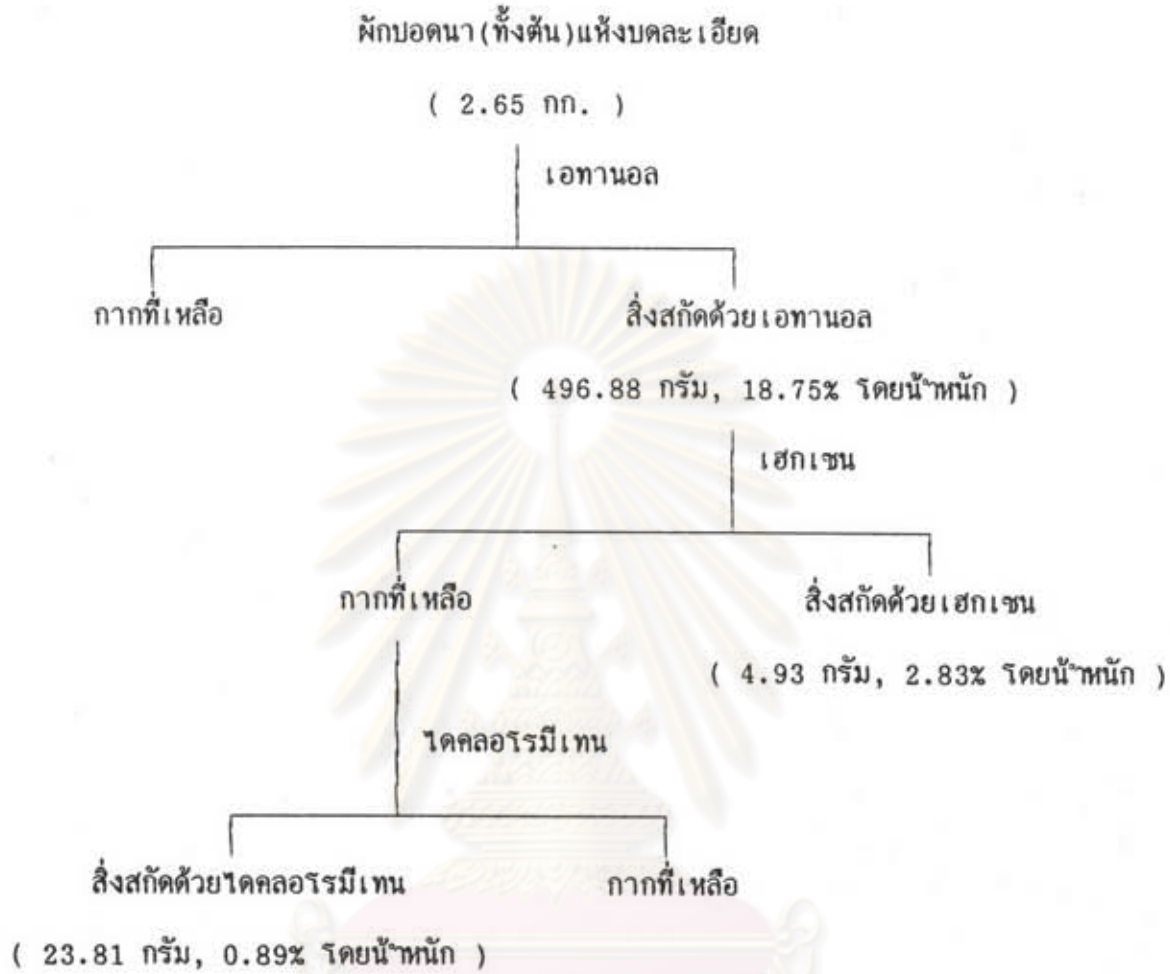
<u>การสกัดด้วยเอทานอล</u> นำผักบอดนาที่ตากแห้งและบดละเอียดแล้วหนัก 2.65 กก. มาสกัดด้วยเอทานอลจำนวน 20 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำสารละลายที่สกัดได้มากรองและกลั่นไล่เอทานอลออกจนเกือบหมด โดยวิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน นำเอาเอทานอลที่กลั่นได้ไปสกัดผักบอดนาซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายเอทานอลที่กรองได้ไม่มีสีจึงหยุดสกัด สุดท้ายได้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลเหนียวข้นสีเขียวหนัก 496.88 กรัม คิดเป็น 18.75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ต่อไป

<u>การสกัดด้วยเฮกเซน</u> นำสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของผักบอดนามาสกัดด้วยเฮกเซนครั้งละ 500 ซม.^{3} โดยการกวนแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น กรอง นำสารละลายที่กรองได้ไปกลั่นไล่เอาเฮกเซนออกโดยวิธีกลั่นแบบธรรมดา นำเฮกเซนที่กลั่นได้ไปสกัดซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายเฮกเซนที่กรองได้ไม่มีสีจึงหยุดสกัด ได้สิ่งสกัดด้วยเฮกเซนเหนียวข้นสีเขียวเข้มหนัก 74.93 กรัม คิดเป็น 2.83 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจะนำไปทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

<u>การสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน</u> นำสิ่งสกัดด้วยเอทานอลที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซน มาสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทนครั้งละ 500 ซม.^{3} โดยกรรมวิธีเช่นเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซน สุดท้ายได้สิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนเหนียวข้นสีเขียวเข้มหนัก 23.81 กรัม คิดเป็น 23.81 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจะนำไปทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดผักบอดนาวิธีที่ 2



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

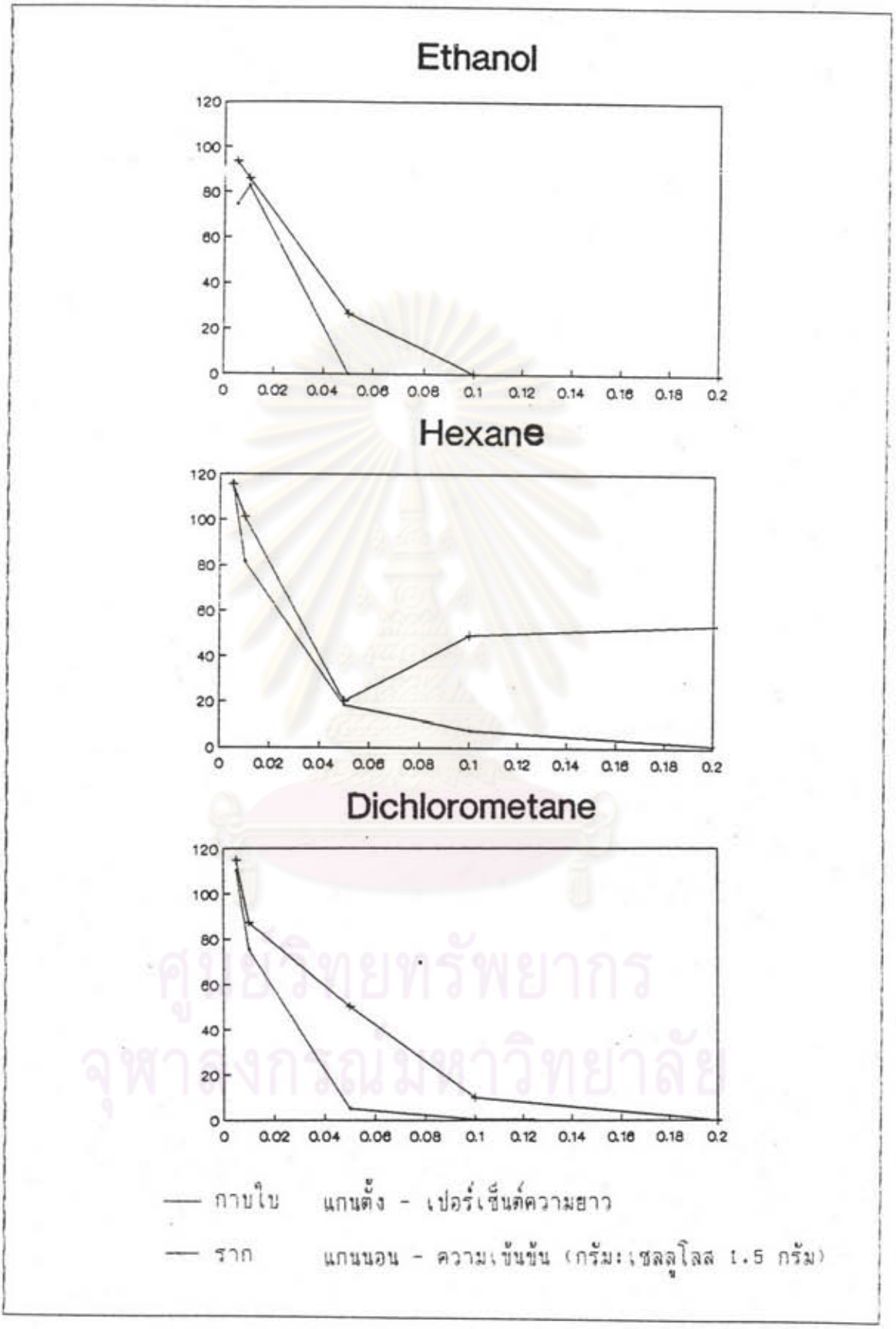
2.7.2.1 <u>การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวของสิ่งสกัดวิธีที่ 2</u>

นำสิ่งสกัดแต่ละชนิดไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ได้ผลดังตารางที่ 12 และรูปที่ 12

<u>ตารางที่ 12</u> ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวของสิ่งสกัดจากผักปอดนา (การสกัดวิธีที่ 2)

สิ่งสกัด	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม)				
		0.005	0.01	0.05	0.1	0.2
เอทานอล	ราก	74.60	82.79	0.00	0.00	0.00
	กาบใบ	93.56	86.03	26.60	0.00	0.00
เฮกเซน	ราก	116.55	81.56	18.35	7.48	1.02
	กาบใบ	115.65	101.23	20.00	49.22	53.47
ไดคลอโรมีเทน	ราก	110.09	75.56	5.05	0.27	0.00
	กาบใบ	114.87	87.36	50.19	10.04	0.00

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบข้าวเมื่อได้รับสิ่งสกัดจากผักบอดนา (การสกัดวิธีที่ 2)

2.8 การแยกสาร

2.8.1 การแยกสารของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (การสกัดวิธีที่ 1)

นำสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 50.12 กรัม จากข้อ 2.7.1 มาแยกด้วยควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งมีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ตามวิธีในข้อ 2.4.2 แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามากคือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล และเมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 1 ลิตร นำแต่ละส่วน (fraction) ที่เก็บได้ไปกลั่นไล่ตัวทำละลายออกจนเหลือปริมาตร 10 -20 ซม.^{3} นำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้ทินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธีข้อ 2.4.4 รวมสารที่เหมือนกันเข้าด้วยกันแล้วทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการตกผลึก

ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มแสดงในตารางที่ 13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

(การสกัดวิธีที่ 1)

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน	1-5	ผลึกแผ่นเล็กๆ บนของแข็งสีขาวนวล	0.36
10%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	9-14	ของแข็งอสัณฐานสีเหลืองนวล	0.11
20%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	15-18	ของแข็งอสัณฐานสีขาวปนน้ำมัน	1.65
	19-22	ของแข็งเป็นไขสีเหลืองนวล	0.24
	23-27	ของแข็งเป็นไขสีเหลือง	0.10
30%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	28-31	ของแข็งอสัณฐานสีขาวปนเหลือง	0.38
	32-35	ของแข็งอสัณฐานสีขาวปนน้ำมันสีเหลือง	1.57
	36-39	ของแข็งอสัณฐานสีขาวปนน้ำมัน	0.39
40%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	40-54	ผลึกรูปเข็มสีขาวปนน้ำมันสีเหลือง	1.13
	55-58	ผลึกรูปเข็มสีขาวปนน้ำมันสีเหลือง	0.65
50%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	59-64	น้ำมันสีเขียวปนของแข็งสีขาว	0.30
75%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	65-78	ของแข็งสีเขียวปนดำ	15.61
	79-103	ของแข็งสีเขียวปนดำ	0.80
85%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	104-116	ของแข็งสีเขียวปนดำ	0.61
ไดคลอโรมีเทน	117-129	ของแข็งสีน้ำตาล	0.46
	130-145	ตะกอนของแข็งสีน้ำตาลปนดำ	0.47
20%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	146-153	ตะกอนของแข็งสีน้ำตาล	5.53
50%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	154-162	คราบสีน้ำตาล	3.04
เมทานอล	163-170	คราบสีน้ำตาล	8.56

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8.1.1 การแยกสารโดยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำของสิ่งสกัดคลอโรฟอร์มส่วนที่ 65-78

สารลำดับส่วนที่ 65-78 จากตารางที่ 13 ในข้อ 2.8.1 ลักษณะเป็นของแข็งสีเขียวเข้มหนัก 15.61 กรัม เมื่อเปรียบเทียบจากทีแอลซีและตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ พบว่าส่วนนี้คือ SZ_7 ในตารางที่ 8 ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อข้าวและต่อปลาพบว่าส่วนนี้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด นำมาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 400 กรัมเป็นตัวดูดซับ ใช้คอลัมน์ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 ซม. ยาว 120 ซม. แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายและเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 แต่รับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 500 ซม.^{3} รวมสารแต่ละส่วนด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธีการข้อ 2.4.4

ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการแยกสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มลำดับส่วนที่ 65-78 (SZ_7) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

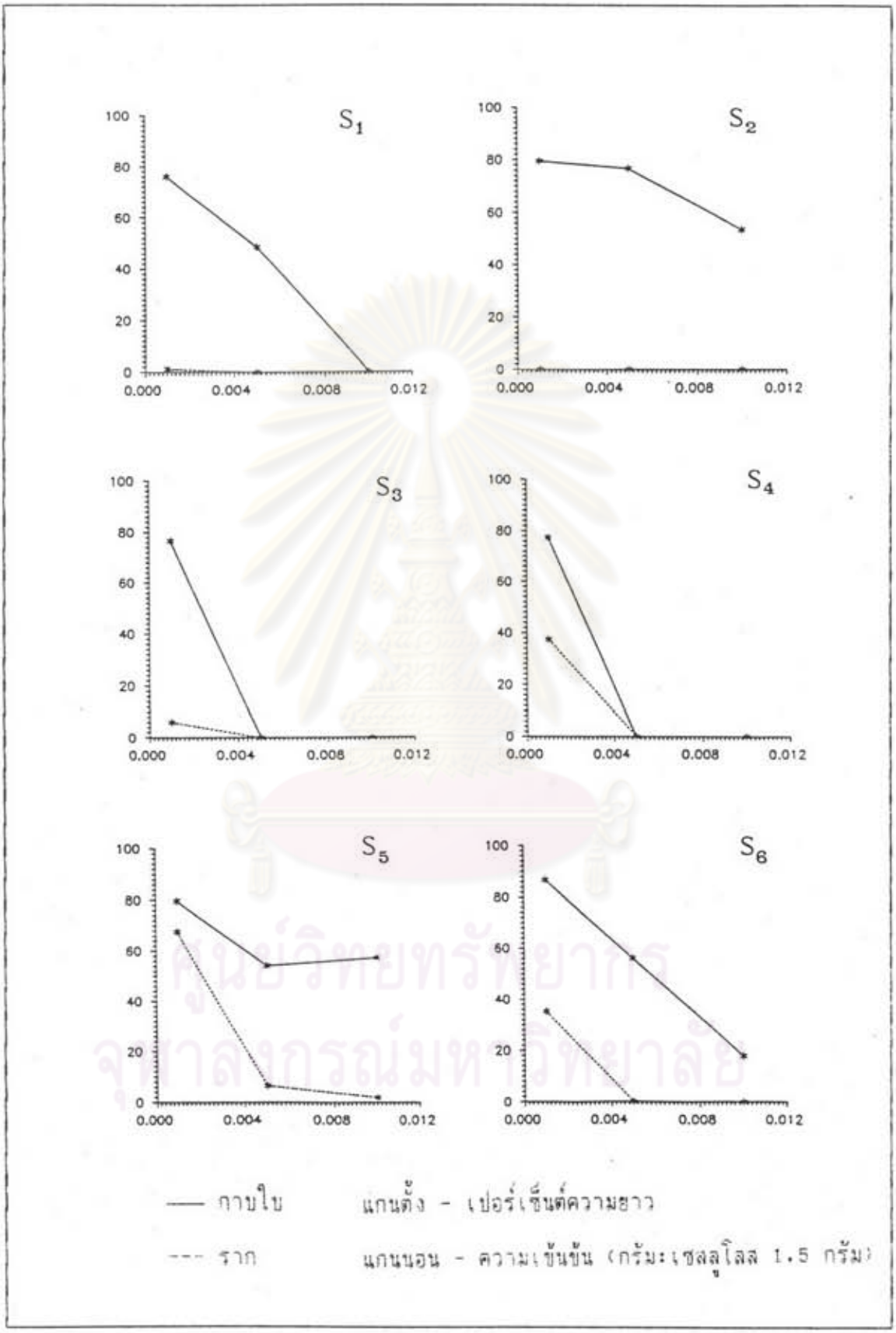
ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
ไดคลอโรมีเทน	1-116	สารเหนียวสีเขียวเข้ม	2.48
5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	117-120	ของแข็งที่เขียวอมดำ	3.32
5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	121-123	ของแข็งสีเหลืองปนดำ	0.93
5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	124-128	ของแข็งสีเหลืองปนเขียว	2.94
5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	129-145	ของแข็งสีเขียวอมดำ	1.10
10-100%เมทานอล: ไดคลอโรมีเทน	146-217	ของแข็งสีดำปนคราบสีน้ำตาล	4.82

นำสารที่แยกได้จาก ข้อ 2.8.1.1 โดยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวตามวิธีข้อ 2.6.2 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 15 และรูปที่ 13

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวของสารส่วนที่ 65-78 (SZ_7) ที่แยกได้จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบซ้ำ

รหัส	ตัวทำละลาย	ลำดับที่	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เบอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม)		
				0.001	0.005	0.01
S_1	ไดคลอโรมีเทน	1-116	ราก	1.23	0	0
			กาบใบ	75.99	48.63	0
S_2	5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	117-120	ราก	0	0	0
			กาบใบ	79.33	76.59	53.32
S_3	5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	121-123	ราก	5.99	0	0
			กาบใบ	76.59	0	0
S_4	5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	124-128	ราก	37.33	0	0
			กาบใบ	77.20	0	0
S_5	5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	129-145	ราก	67.59	6.45	1.84
			กาบใบ	79.63	54.10	57.14
S_6	10-90%เมทานอล: ไดคลอโรมีเทน, เมทานอล	146-217	ราก	35.33	0	0
			กาบใบ	86.67	56.23	17.93

ดูจากความยาวของรากและกาบใบข้าวเมื่อเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้รับสารจากผักบอดนา พบว่าทุกส่วนที่แยกได้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว



รูปที่ 13 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบข้าวเมื่อได้รับสาร S_1-S_6 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

2.8.1.2 การแยกสารโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography

นำสารส่วนที่ 124-128 (S_4)ลักษณะเป็นของแข็งสีขาวปนเขียวมา 0.15 กรัม นำมาละลายด้วยไดคลอโรมีเทนในปริมาตรน้อยที่สุด จากนั้นนำไปแยกด้วยเครื่อง HPLC

สภาวะที่ใช้ คือ คอลัมน์ : Dynamax 60 A Silica, 21.4 x 200 มม.

วัฏภาคเคลื่อนที่ : เมทานอลผสมไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 1:49

อัตราการไหล : 10 มม./ วินาที

ความดัน : 7 บาร์

ความไว : 0.02

เครื่องตรวจวัด : UV Detector Model 112

ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร

Injcetion Volume : 2 ซม.^{3}

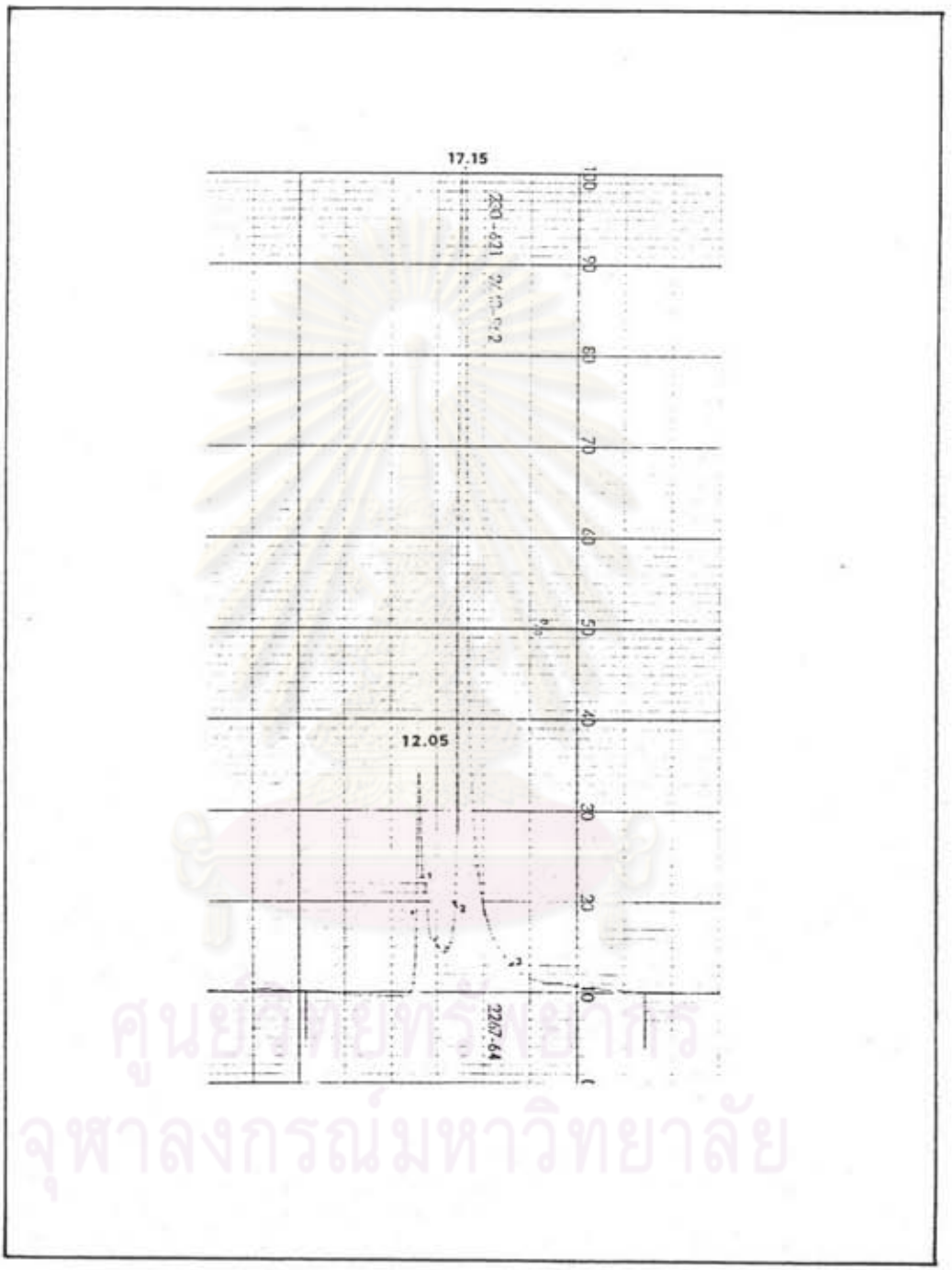
ทำซ้ำอีก 5 ครั้ง แล้วนำมารวมกันโดยดูจากโครมาโทแกรมสามารถแยกส่วนที่ 124-128 ได้เป็น 3 ส่วนย่อย ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 124-128 (S_4) โดย HPLC

ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
2%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	1	ของแข็งสีขาวมีสีเขียวปนเล็กน้อย	0.025
2%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	2	ของแข็งสีขาวมีสีเขียวปนเล็กน้อย	0.020
2%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	3	ของแข็งสีเขียวเข้ม	0.065

โครมาโทแกรมของการทำ HPLC แสดงดังรูปที่ 14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 โครมาโทแกรมของ S_4 จากการทำ HPLC

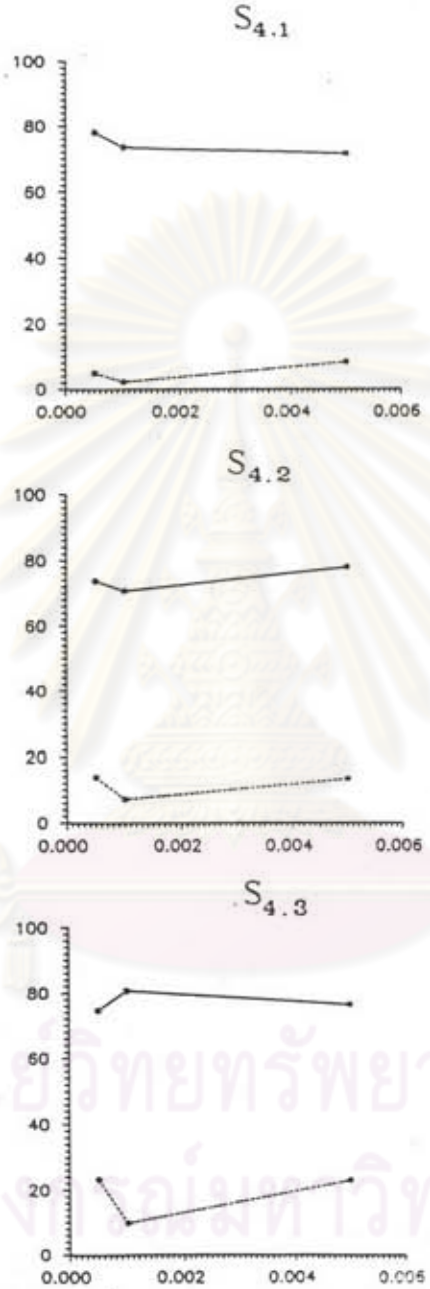
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำสารที่แยกได้จากข้อ 2.8.1.2 โดยการทำ HPLC มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวตามวิธีข้อ 2.6.2 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 17 และรูปที่ 15

ตารางที่ 17 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวของสารส่วนที่ 124-128 (S_4) ที่แยกได้จาก HPLC

รหัส	ตัวทำละลาย	ลำดับที่	ส่วนของต้นข้าวที่ศึกษา	เปอร์เซ็นต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม)		
				0.0005	0.001	0.005
$S_{4.1}$	2%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	1	ราก	4.85	2.14	8.16
			กาบใบ	77.95	73.41	71.60
$S_{4.2}$	2%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	2	ราก	13.79	7.18	13.39
			กาบใบ	73.72	70.69	77.95
$S_{4.3}$	2%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	3	ราก	23.11	9.71	22.91
			กาบใบ	74.62	80.66	76.44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



—— กาบใบ แกนตั้ง - เปอร์เซ็นต์ความยาว

--- ราก แกนนอน - ความเข้มข้น (กรัม:เซลลูโลล 1.5 กรัม)

รูปที่ 15 กราฟแสดงเบอร์เซ็นต์ความยาวของรากและกาบใบข้าวเมื่อได้รับสารที่แยกได้จาก HPLC

2.8.2 การแยกสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 2)

นำสิ่งสกัดเฮกเซน 50.97 กรัม จากข้อ 2.7.2 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีซิลิกาเจลหนักประมาณ 800 กรัม เป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายและเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1

ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 2) แสดงดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลการแยกสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 2) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน	1-16	ของแข็งสีขาวเป็นมันวาว	0.66
10%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	17-25	ของแข็งอสัณฐานสีเหลืองนวล	0.70
	26-31	ของแข็งอสัณฐานสีขาวบนน้ำมัน	3.19
20%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	32-45	น้ำมันสีเหลือง	3.70
	46-52	ของแข็งเป็นไขสีเหลืองนวล	0.08
40%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	53-60	ของแข็งอสัณฐานสีขาวปนเหลือง	1.35
	61-66	ของแข็งอสัณฐานสีขาวบนน้ำมันสีเหลือง	1.46
40-60%ไดคลอโรมีเทน: เฮกเซน	62-73	ผลึกรูปเข็มสีขาวบนน้ำมันสีเหลือง	1.84
60%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	74-81	ของแข็งสีแดงปนเขียว	0.40
80%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	82-90	ของแข็งสีเขียวบนน้ำมันสีเขียว	1.17
	91-103	ของแข็งสีเขียวเข้ม	2.27

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
ไดคลอโรมีเทน	104-117	ของแข็งสีเขียวเข้ม	2.20
10%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	118-120	ของแข็งสีเขียวปนดำ	15.65
	121-128	ของแข็งสีเขียวปนดำ	4.23
20%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	129-137	ของแข็งสีเขียวปนน้ำตาล	1.15
40%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	138-145	ของแข็งสีเขียวปนน้ำตาล	5.58
80%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	146-165	ของแข็งสีน้ำตาล	7.11

2.8.2.1 การทำโครมาโทกราฟีซ้ำของสิ่งสกัดในเฮกเซนส่วนที่ 121-128

นำสารลำดับส่วนที่ 121-128 จากตารางที่ 18 ในข้อ 2.8.2 ลักษณะเป็นของแข็งสีเขียวเข้ม หนัก 4.23 กรัม ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นพบว่าส่วนนี้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 55 กรัม เป็นตัวดูดซับ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซม. ยาว 60 ซม. แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายและเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 แต่รับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 150 ซม.^{3} รวมสารแต่ละส่วนด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธีการข้อ 2.4.4

ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ผลการแยกสิ่งสกัดในเฮกเซนลำดับส่วนที่ 121-128 โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
80%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	1-8	ของแข็งสีเหลืองอมเขียว	0.08
ไดคลอโรมีเทน	9-14	ของแข็งสีขาวปนเขียว	0.05
5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	15-19	ของแข็งสีเขียวปนน้ำตาล	0.19
5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	20-27	ของแข็งสีเขียวอ่อน	0.56
10%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	28-35	ของแข็งสีดำปนคราบสีน้ำตาล	0.09
20%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	36-47	ของแข็งสีเขียวอ่อนปนดำ	0.63
30%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	48-61	ของแข็งสีเขียวปนดำ	0.35
40%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	62-68	ของแข็งสีเขียวปนดำ	0.54
50%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	69-84	ของแข็งสีเขียวปนดำ	0.18

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8.3 การแยกสิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (การสกัดวิธีที่ 2)

นำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน 23.81 กรัม จากข้อ 2.7.2 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีซิลิกาเจลหนักประมาณ 500 กรัม เป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายและเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1

ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (การสกัดวิธีที่ 2)แสดงดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (การสกัดวิธีที่ 2) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
50%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	1-10	ของแข็งอสัณฐานสีขาวบนน้ำมันสีเหลือง	0.29
75%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน	11-14	น้ำมันสีเหลือง	0.04
ไดคลอโรมีเทน	15-19	ผลึกรูปเข็มสีขาวบนน้ำมันสีเหลือง	0.19
5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	20-21	ของแข็งสีเขียวปนดำ	7.26
	22-24	ของแข็งสีเขียวปนดำ	3.11
	25-36	ของแข็งสีเหลืองปนเขียว	4.30
10%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	37-41	ของแข็งสีเขียวปนน้ำตาล	1.96
20%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	42-45	ของแข็งสีเขียวปนน้ำตาล	2.01
30%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	46-52	ของแข็งและคราบสีน้ำตาล	2.77
40%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	53-62	ของแข็งสีน้ำตาล	1.84
50-60%เมทานอล: ไดคลอโรมีเทน	63-72	คราบสีน้ำตาล	1.17
80%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน ,เมทานอล	73-84	ของแข็งสีน้ำตาล	4.48

2.8.3.1 การทำโครมาโทกราฟีซ้ำของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนส่วนที่ 22-24

นำสารลำดับส่วนที่ 22-24 จากตารางที่ 20 ในข้อ 2.8.3 ลักษณะเป็นของแข็งสีเขียวเข้ม หนัก 3.11 กรัม ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นพบว่าส่วนนี้แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด มาทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 55 กรัมเป็นตัวดูดซับ ใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซม. ยาว 60 ซม. แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายและเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 แต่รับสารละลายที่ชะได้ครั้งละ 200 ซม.^{3} รวมสารแต่ละส่วนด้วยทินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธีการข้อ 2.4.4

ผลการแยกสารแสดงดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ผลการแยกสิ่งสกัดในไดคลอโรมีเทนลำดับส่วนที่ 22-24 โดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
ไดคลอโรมีเทน	1-10	ของแข็งสีเหลืองปนเขียว	0.04
5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	11-15	ของแข็งสีเหลืองปนน้ำตาล	0.06
5%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	16-17	ของแข็งสีเขียวเข้ม	1.20
10%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	18-26	ของแข็งสีเขียวปนน้ำตาล	0.16
20%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	27-29	ของแข็งสีน้ำตาล	0.20
40%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	30-37	ของแข็งสีน้ำตาล	0.27
60%เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน	38-45	ของแข็งสีน้ำตาล	0.34

2.9 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

2.9.1 การทำสาร ก ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ก เป็นของแข็งสีขาวมันวาว จาก SZ_1 หรือส่วนที่ 1-3 ตารางที่ 13 ซึ่งชะด้วยเฮกเซนในสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม (การสกัดวิธีที่ 1) และจากส่วนที่ 1-9 ตารางที่ 18 ซึ่งชะด้วยเฮกเซนในสิ่งสกัดเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 2) ทำการแยกเอาน้ำมันสีขาวออกโดยการตกผลึกด้วยแอซีโตนร้อนหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปอสัญฐานสีขาวหนัก 0.29 กรัม (0.049% ของน้ำหนักแห้ง) และหนัก 0.35 กรัม (0.019% ของน้ำหนักแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 1 และ วิธีที่ 2 ตามลำดับ จุดหลอมเหลว 64-65 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.86 (80% คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) ละลายได้ดีในเฮกเซนและคลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยในแอซีโตนและเอทิลแอซีเตต ให้ผลลบกับบปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, Br_2 ใน CCl_4, 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 2930, 2850, 1480, 1470, 730, 720 ซม.$^{-1}$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 0.88 (t), 1.25(s) ppm

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ 14.12, 22.70, 29.36, 29.74, 31.96 ppm

การวิเคราะห์สาร ก โดยเทคนิคจีแอลซี (gas-liquid chromatography) ทำได้โดยปรับสภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ดังนี้คือใช้คอลัมน์ OV-1 2% อุณหภูมิเครื่องฉีด (injector temperature) 300 องศาเซลเซียล อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature) 250 องศาเซลเซียล ใช้ N_2 เป็นแก๊สพาหะ (carrier gas) อัตราการไหลของ N_2 (N_2 - flow rate) 50 ซม.^{3}/นาที ใช้ FID (flame ionization detector) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด ปริมาณสารที่ฉีด (injection volume) 1 ไมโครลิตร

ละลายสาร ก ในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายของสาร ก เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 7.48, 9.68, 12.68, 16.28, 21.31, 27.45, 35.58 นาที

น้ำไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงคือ nonacosane ($C_{29}H_{60}$), triacotane ($C_{30}H_{62}$) hentriacontane ($C_{31}H_{64}$), dotriacotane ($C_{32}H_{66}$) มาละลายในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีภายใต้สภาวะเดียวกับสาร ก พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 12.63, 16.29, 21.73, 27.53 นาที ตามลำดับ

2.9.2 การทำสาร ข ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ข เป็นผงละเอียดสีขาวบนไขสีเหลืองจาก SZ_2 หรือส่วนที่ 15-18 ตารางที่ 13 ซึ่งชะด้วย 10%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ในสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม (การสกัดวิธีที่ 1) และจากส่วนที่ 17-31 ตารางที่ 18 ซึ่งชะด้วย 10%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ในสิ่งสกัดเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 2) ตกผลึกด้วย ไดคลอโรมีเทนกับเฮกเซน กรองแล้วนำของแข็งที่ได้ไปตกผลึกใหม่หลาย ๆ ครั้ง ได้สารที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.22 กรัม (0.037% ของน้ำหนักแห้ง) และหนัก 0.31 กรัม (0.012% ของน้ำหนักแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ตามลำดับ จุดหลอมเหลว 85-86 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.73 (80%คลอโรฟอร์ม:เฮกเซน) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตต เฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, Br_2 ใน CCl_4, 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-2500, 2900, 1850, 1470, 1465, 1410, 1300, 730, 720 ซม.$^{-1}$

จากข้อมูลทางสเปกโทสโคปีและผลการทดสอบทางเคมี แสดงว่าสาร ข น่าจะเป็นของผสมของกรดโซ่ตรง และเพื่อศึกษาองค์ประกอบในสาร ข จึงเตรียมอนุพันธ์ methyl ester ของสาร ข ด้วย diazomethane

การเตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของสาร ข ด้วย diazomethane (71)

ในการเตรียม diazomethane ทำได้โดยผสม อีเทอร์ 50 ซม.^{3} กับ 40%KOH$_{(aq)}$ 15 ซม.^{3} ในขวดกลั่นที่แช่อยู่ในน้ำแข็ง เติม N-N'-dimethyl-N-nitrosoquidanidine 5 กรัม ลงไปช้า ๆ แล้วเขย่า จากนั้นนำไปกลั่นบนเครื่องอังน้ำจะได้สารละลายdiazomethane ในอีเทอร์สีเหลืองกลั่นออกจากของผสม ผ่าน diazomethane นี้ลงไปในสาร ข 0.03 กรัม ที่ละลายในคลอโรฟอร์ม จนสารละลายเป็นสีเหลืองอย่างถาวร ทดสอบว่าเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์หรือไม่ด้วยทีแอลซี จากนั้นผ่าน diazomethane ลงไปในสารละลายของกรดคาร์บอกซิลิกโซ่ตรงมาตรฐาน จนสารละลายมีสีเหลืองอย่างถาวร

นำอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของสาร ข มาวิเคราะห์ด้วยจีแอลซีภายใต้สภาวะดังนี้ ใช้คอลัมน์ OV-1 อุณหภูมิเครื่องฉีด (injector temperature) 290 องศาเซลเซียล อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature) 250 องศาเซลเซียล ใช้ N_2 เป็นแก๊สพาหะ (carrier gas) อัตราการไหลของ N_2 (N_2 - flow rate) 50 ซม.^{3}/นาที ใช้ FID (flame ionization detector) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด ปริมาณสารที่ฉีด (injection volume) 1 ไมโครลิตร ได้ retention time เท่ากับ 11.28, 15.82, 20.55, 26.08, 34.22 นาที และเมื่อวิเคราะห์อนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ของกรดคาร์บอกซิลิกโซ่ตรง-มาตรฐานที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 29, 30, 31 ได้ retention time เท่ากับ 11.86, 15.43, 20.19 นาที ตามลำดับ

2.9.3 การทำสาร ค ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ค เป็นผงละเอียดสีขาวแววววาวปนน้ำมันสีเหลืองจาก SZ_4 หรือส่วนที่ 32-35 ตารางที่ 13 ซึ่งชะด้วย 30% ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ในสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม(การสกัดวิธีที่ 1) และจากส่วนที่ 53-66 ตารางที่ 18 ซึ่งชะด้วย 40% ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ในสิ่งสกัดเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 2) ตกผลึกด้วย ไดคลอโรมีเทนกับเฮกเซน กรองแล้วนำของแข็งที่ได้ไปตกผลึกใหม่หลาย ๆ ครั้ง ได้สารที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.41 กรัม (0.069% ของน้ำหนักแห้ง) และหนัก 0.48 กรัม (0.027% ของน้ำหนักแห้ง)จากการสกัดวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ตามลำดับ จุดหลอมเหลว 80-81 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.60 (คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน ละลายได้บ้างใน เอทิลแอ-

ซีเตต เฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล ให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, Br_2 ใน CCl_4, 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3350-2700, 2930, 2850, 1480, 1470, 1050, 730, 720 ซม.$^{-1}$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 0.93 (t), 1.25(s), 1.73(t), 3.67(t) ppm

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ 14.12, 22.69, 25.72, 29.42, 29.69, 31.92, 32.80, 63.10 ppm

การวิเคราะห์สาร ค โดยเทคนิคจีแอลซี (gas-liquid chromatography) ทำได้โดยปรับสภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ดังนี้คือใช้คอลัมน์ OV-1 2% อุณหภูมิเครื่องฉีด (injector temperature) 250 องศาเซลเซียล อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature) 300 องศาเซลเซียล ใช้ N_2 เป็นแก๊สพาหะ (carrier gas) อัตราการไหลของ N_2 (N_2 - flow rate) 50 ซม.^{3}/นาที ใช้ FID (flame ionization detector) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด ปริมาณสารที่ฉีด (injection volume) 1 ไมโครลิตร ละลายสาร ค ในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายของสาร ค เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 10.08, 12.67, 17.10, 21.57, 28.70, 36.70 นาที

น้ำแอลกอฮอล์โซ่ตรงคือ hexacosanol ($C_{26}H_{53}OH$), octacosanol ($C_{28}H_{57}OH$), triacotanol ($C_{30}H_{61}OH$) มาละลายในคลอโรฟอร์มฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีภายใต้สภาวะเดียวกับสาร ค พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 7.85, 13.18, 21.53 นาที ตามลำดับ

การเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตของสาร ค

นำสาร ค หนัก 0.094 กรัม มาละลายในพิริดีน 5 ซม.^{3} เติมแอซีติกแอนไฮไดรด์ 2.5 ซม.^{3} เขย่าให้เข้ากัน นำไปรีฟลักซ์บนเครื่องอังน้ำเป็นเวลา 6 ช.ม. ตรวจสอบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่ด้วย ทีแอลซี เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว เทสารที่ได้ลงในน้ำผสมน้ำแข็ง

30 ซม.^{3} จะได้ตะกอนสีขาว กรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดพิริดีน ทำให้ตะกอนแห้ง แล้วนำมาตกผลึกในตัวทำละลายเฮกเซนและคลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้ง ได้ของแข็งละเอียดสีขาวหนัก 0.040 กรัม จุดหลอมเหลว 58-59 องศาเซลเซียล

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 2950, 2850, 1735, 1465, 1360, 1240, 1040, 730, 720 ซม.$^{-1}$

2.9.4 <u>การทำสาร ง ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง</u>

<u>สาร ง</u> เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลืองจาก SZ_5 หรือส่วนที่ 40-54 ตารางที่ 13 ซึ่งชะด้วย 40%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ในสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม (การสกัดวิธีที่ 1) และจากส่วนที่ 62-73 ตารางที่ 18 ซึ่งชะด้วย 40%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ในสิ่งสกัดเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 2) ตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทนกับเฮกเซน กรองแล้วนำของแข็งที่ได้ไปตกผลึกใหม่หลาย ๆ ครั้ง ได้สารที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 0.63 กรัม (0.063%ของน้ำหนักแห้ง) และหนัก 0.55 กรัม (0.031% ของน้ำหนักแห้ง) มีค่า R_f เท่ากับ 0.35 (คลอโรฟอร์ม) จุดหลอมเหลว 144-145 องศาเซลเซียลละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทนละลายได้บ้างใน เอทิลแอซีเตต เฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard, Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลลบกับ 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-3100, 2940, 2860, 1640, 1460, 1380, 1060-1040, 970, 960 (disubstituted vinyl), 840, 800 (trisubstituted vinyl) ซม.$^{-1}$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 0.68-2.32, 3.52, 5.09, 5.35 ppm

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ 11.86-56.83, 71.75, 121.66, 129.24, 138.28, 140.71 ppm

จากผลการทดสอบปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม และข้อมูลเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม แสดงถึงสาร ง น่าจะเป็นสารประเภทสเตอรอยด์ จึงนำสารมาวิเคราะห์โดยเทคนิคจีแอลซี (gas-liquid chromatography) ทำได้โดยปรับสภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ดังนี้คือใช้คอลัมน์ OV-1 2% อุณหภูมิเครื่องฉีด (injector temperature) 290 องศาเซลเซียล อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature) 260 องศาเซลเซียล ใช้ N_2 เป็นแก๊สพาหะ (carrier gas) อัตราการไหลของ N_2 (N_2 - flow rate) 50 ซม.^{3}/นาที ใช้ FID (flame ionization detector) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด ปริมาณสารที่ฉีด (injection volume) 1 ไมโครลิตร ละลายสาร ง ในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายของสาร ง เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 19.69, 20.71, 23.61 นาที

ละลายสเตอรอยด์ที่ใช้เป็นมาตรฐาน คือ cholesterol, campesterol, β-sitosterol, stigmasterol ด้วยคลอโรฟอร์มฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีภายใต้สภาวะเดียวกับสาร ง พบว่ามี ค่า retention time เท่ากับ 15.46, 19.36, 20.72, 23.59 นาที ตามลำดับ

การเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตของสาร ง

นำสาร ง หนัก 0.124 กรัม มาเตรียมอนุพันธ์แอซีเตต ตามวิธีในหัวข้อ 2.9.3 ได้ของแข็งสีขาว ตกผลึกด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้ง ได้ของแข็งเป็นแผ่นมันวาว หนัก 0.103 กรัม จุดหลอมเหลว 136-140 องศาเซลเซียล

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 2940-2860, 1730, 1460, 1380, 1370, 1250, 1040, 970, 960 (disubstituted vinyl), 800 (trisubstituted vinyl) ซม.$^{-1}$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 0.68-2.32, 4.55, 5.09, 5.35 ppm

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ 11.86-56.83, 74.75, 121.66, 129.24, 138.28, 140.71, 170.52 ppm

2.9.5 การทำสาร จ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร จ เป็นผงละเอียดสีขาวแยกจากน้ำมันสีเขียวจาก SZ_6 หรือส่วนที่ 59-64 ตารางที่ 13 ซึ่งชะด้วย 50%ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน ในสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม (การสกัดวิธีที่ 1) และจากส่วนที่ 104-117 ตารางที่ 18 ซึ่งชะด้วยไดคลอโรมีเทน ในสิ่งสกัดเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 2) ทำการตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล กรองแล้วนำของแข็งที่ได้ไปตกผลึกใหม่หลาย ๆ ครั้ง ได้สารที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.032 กรัม (5.40×10^{-3}% ของน้ำหนักแห้ง) และหนัก 0.053 กรัม (2.00×10^{-3}% ของน้ำหนักแห้ง) จุดหลอมเหลว247-250 องศาเซลเซียล (จุดสลายตัว) มีค่า R_f เท่ากับ 0.22 (10%เมทานอล:คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในเมทานอล ละลายได้บ้างในเอทิลแอซีเตต เฮกเซน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน ให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard , Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลลบกับ 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3410, 2940, 2850, 1620, 1475, 1370, 1065-1020, 800 ซม.$^{-1}$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO+$CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 0.7-2.4, 3.4-3.8, 4-4.8, 5.14, 5.38 ppm

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO+$CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ 12.03-42.69, 50.6, 56.4, 57.1, 62.14, 70.64, 73.95, 76.87, 101.32, 122.38, 129.64, 138.69, 140.74 ppm

แมสสเปกตรัม ปรากฏสัญญาณที่ (m/e) 414, 412, 400, 396, 364, 382, 329, 327, 273, 255, 213

การแยกสลายด้วยน้ำของสาร จ

นำสาร จ หนัก 0.027 กรัม มาเติม 10% HCl ในเอทานอล จำนวน 15 ซม.^{3} แล้วนำไปรีฟักซ์บนเครื่องอังน้ำเป็นเวลา 10 ช.ม. ตรวจสอบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์หรือไม่ โดยการทำทีแอลซีเมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว นำสารละลายมากลั่นตัวทำละลายออกโดยการกลั่นลดความดัน จากนั้นนำสารที่ได้ไปแขวนลอยในน้ำแล้วสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ได้ aglycone ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์ และน้ำตาลในชั้นน้ำ

การศึกษาส่วน aglycone

นำสารละลาย aglycone ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์มาทำจัดน้ำด้วย anh. Na_2SO_4 กรอง ระเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยเฮกเซนได้ผลึกรูปเข็มสีขาว (สาร จ1) หนัก 0.01 กรัม จุดหลอมเหลว 144-145 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.35 (คลอโรฟอร์ม) ความสามารถในการละลายคือ ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน และ คลอโรฟอร์ม ละลายได้เล็กน้อยในเมทานอล และ เฮกเซน ให้สารละลายสีเขียวกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลลบกับ 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3650-3100, 2940, 2860, 1640, 1460, 1380, 1060-1040, 970, 960 (disubstituted vinyl), 840, 800 (trisubstituted vinyl) ซม.$^{-1}$

จากผลการทดสอบปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม แสดงถึงสาร จ1 น่าจะเป็นสารประเภทสเตอรอยด์ จึงนำสารมาวิเคราะห์โดยเทคนิคจีแอลซี (gas-liquid chromatography) ทำได้โดยปรับสภาวะของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี ดังนี้คือใช้คอลัมน์ OV-1 2% อุณหภูมิเครื่องฉีด (injector temperature) 290 องศาเซลเซียล อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature) 260 องศาเซลเซียล ใช้ N_2 เป็นแก๊สพาหะ (carrier gas) อัตราการไหลของ N_2 (N_2 - flow rate) 50 ซม.^{3}/นาที ใช้ FID (flame ionization detector) เป็นอุปกรณ์ตรวจวัด ปริมาณสารที่ฉีด (injection volume) 1 ไมโครลิตร

ละลายสาร จ1 ในคลอโรฟอร์ม ฉีดสารละลายของสาร จ1 เข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 17.98, 20.47 นาที

ละลายสเตอรอยด์ที่ใช้เป็นมาตรฐาน คือ cholesterol, campesterol, β-sitosterol, stigmasterol ด้วยคลอโรฟอร์มฉีดสารละลายดังกล่าวเข้าไปในเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีภายใต้สภาวะเดียวกับสาร จ1 พบว่ามี ค่า retention time เท่ากับ 13.79, 16.96, 18.06, 20.62 นาที ตามลำดับ

การศึกษาชั้นน้ำตาล

หลักจากแยก aglycone ซึ่งได้จากการไฮโดรไลส์ด้วยกรดออกแล้ว ทำการ neutrallize ชั้นน้ำด้วยซิลเวอร์ไนเตรต กรองตะกอนสีขาวออก ได้สารสะลายใสซึ่งเป็นส่วนของน้ำตาล (สาร จ2) นำสารละลายที่เหลือมากำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน

นำสารละลาย (สาร จ2) ที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยเทคนิค HPLC โดยปรับสภาวะของเครื่องดังนี้ ใช้คอลัมน์ Supelco-NH_2 อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature) 25 องศาเซลเซียล วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) acetonitrile: น้ำในอัตราส่วน 85 : 15 อัตราการไหล (flow rate) 1.8 ซม.^{3}/นาที อุปกรณ์ตรวจวัดใช้ refractive index detector ฉีด สาร จ2 เข้าไปในเครื่อง HPLC พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 4.89 นาที เมื่อฉีดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานคือ glucose และ rhamnose เข้าไปในเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะเดียวกัน พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 3.01,4.88 นาที

2.9.6 การทำสาร ฉ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ฉ เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวจาก $S_{4.1}$ หรือส่วนที่ 1 ตารางที่ 16 ซึ่งชะด้วย 2% เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน ในสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม (การสกัดวิธีที่ 1) โดย HPLC และจากส่วนที่ 16-17 ตารางที่ 21 ซึ่งชะด้วย 5% เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน ในสิ่งสกัดไดคลอโร-มีเทน (การสกัดวิธีที่ 2) ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยกำจัดคลอโรฟิลล์และเม็ดสีต่าง ๆ ออกไปด้วยการทำ ถ่านกัมมันต์คอลัมน์โครมาโทกราฟีตามวิธีข้อ 2.4.3 สามารถแยกสารที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 0.14 กรัม (0.023 % ของน้ำหนักแห้ง)และ 0.23 กรัม (8.67x 10^{-3}%ของน้ำหนักแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จุดหลอมเหลว 250 องศาเซล-เซียล (สลายตัว) มีค่า R_f เท่ากับ 0.81 (20% เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน) ละลายได้ดีในเมทานอล ละลายได้บ้างในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม เฮกเซน ให้สารละลายสีแดงกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ให้ผลบวก กับ Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลลบกับ 5% $FeCl_3$, 2,4-DNP

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3550-2500, 2950, 2850, 1690, 1450, 1380, 1240, 1180, 1030, 890 ซม.$^{-1}$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 4.69, 4.55, 4.30, 2.51, 1.64(s), 1.51-1.07, 0.92(s), 0.86(s), 0.72(s), 0.65(s) ppm

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ 177.28, 150.36, 109.67, 76.85, 55.46, 54.95, 49.99, 48.59, 46.66, 42.05, 40.80, 40.38, 38.54, 38.30, 37.65, 36.77, 36.39, 33.97, 29.25, 28.14, 27.19, 25.14, 20.51, 18.99, 18.02, 15.99, 15.83, 15.78, 14.43 ppm

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO)

ปรากฏสัญญาณขึ้น (up phase) ของ $\underline{C}H$, $\underline{C}H_3$ ที่ 76.85, 54.45, 49.99, 48.59, 46.66, 37.65, 28.14, 18.99, 15.99, 15.83, 15.78, 14.43 ppm

ปรากฏสัญญาณลง (down phase) ของ $\underline{C}H_2$ ที่ 109.67, 38.54, 36.36, 33.97, 31.77, 30.16, 29.25, 27.16, 25.14, 20.51, 18.02 ppm

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณของ $\underline{C}H$ ที่ 76.85, 54.59, 49.99, 48.59, 46.66, 37.77

แมสสเปกตรัม ปรากฏสัญญาณที่ (m/e) 456(M^+), 439(base peak), 423, 411, 248, 207, 203, 189

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของธาตุพบว่า %C=75.42, %H=10.64 ,%O=13.94

2.9.7 <u>การทำสาร ข ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง</u>

<u>สาร ข</u> เป็นผงละเอียดสีขาวจาก SZ_8 หรือส่วนที่ 79-116 ตารางที่ 13 ซึ่งชะด้วย 85% ไดคลอโรมีเทน:เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน ในสิ่งสกัดคลอโรฟอร์ม (การสกัดวิธีที่ 1) และจากส่วนที่ 25-36 ตารางที่ 20 ซึ่งชะด้วย 5% เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน ในสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน (การสกัดวิธีที่ 2) ทำการแยกสารให้บริสุทธิ์โดยกำจัดคลอโรฟิลล์และเม็ดสีต่าง ๆ

ออกไปด้วยการทำแถบกัมมันต์คอลัมน์โครมาริทกราฟีตามวิธีข้อ 2.4.3 สามารถแยกสารที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.12 กรัม (0.020% ของน้ำหนักแห้ง)และ 0.27 กรัม (0.010 % ของน้ำหนักแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จุดหลอมเหลว 200-202 องศาเซลเซียล มีค่า R_f เท่ากับ 0.49 (20% เมทานอล:ไดคลอโรมีเทน) ละลายได้ดีในเมทานอล ละลายได้บ้างในไดคลอโรมีเทน เฮกเซน ให้สารละลายสีแดงกับปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ให้ผลบวก กับ Br_2 ใน CCl_4 ให้ผลลบ กับ 5% $FeCl_3$, 2,4-DNP

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3700-3100, 1740, 1640, 1460, 1380, 1365, 1100-950 ซม.$^{-1}$

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ 5.21, 5.06, 4.97, 4.83, 4.50, 4.13, 3.32, 3.14, 2.21-0.72 ppm

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, DMSO) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ 175.24, 143.46, 137.65, 124.93, 105.89, 94.07, 87.79, 77.79, 72.73, 72.30, 71.02, 69.55, 67.67, 65.10, 60.70, 55.02, 52.38, 47.09, 45.95, 42.05, 35.70, 36.23, 32.70, 30.32, 27.70, 25.51, 23.38, 23.18, 21.03, 17.62, 16.52, 16.18, 15.36, 15.22 ppm

แมสสเปกตรัม ปรากฏสัญญาณที่ (m/e) 774, 723, 624, 543, 439, 391, 307, 248, 154 (base peak)

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของธาตุพบว่า %C=57.53, %H=7.72, %O=34.79

<u>การแยกสลายด้วยน้ำของสาร ช</u>

นำ<u>สาร ช</u> 0.048 กรัม มาทำการแยกสลายด้วยน้ำตามวิธีข้อ 2.9.5 ได้ aglycone ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์และน้ำตาลในชั้นน้ำ

<u>การศึกษาส่วน aglycone</u>

นำสารละลาย aglycone ในชั้นไดเอทิลอีเทอร์มาทำจัดน้ำด้วย anh. Na_2SO_4 กรอง ระเหยไดเอทิลอีเทอร์ออก ตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทนกับเฮกเซน ได้ของแข็งเป็นผงละเอียดสีขาว (<u>สาร ช1</u>) จุดหลอมเหลว 219-220 องศาเซลเซียล หนัก 0.010 กรัม ผลการวิเคราะห์ธาตุพบว่า %C = 77.47, %H = 10.55, %O = 11.98

การศึกษาชั้นน้ำตาล

หลักจากแยก aglycone ซึ่งได้จากการไฮโดรไลส์ด้วยกรดออกแล้ว ทำการ neutrallize ชั้นน้ำด้วยซิลเวอร์ไนเตรต กรองตะกอนสีขาวออก ได้สารสะลายใสซึ่งเป็นส่วนของน้ำตาล(สาร ช2) นำสารละลายที่เหลือมากำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน

นำสารละลาย (สาร ช2) ที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยเทคนิค HPLC โดยปรับสภาวะของเครื่องดังนี้ ใช้คอลัมน์ Supelco-NH_2 อุณหภูมิคอลัมน์ (column temperature) 25 องศาเซลเซียล วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) acetonitrile: น้ำในอัตราส่วน 85 : 15 อัตราการไหล (flow rate) 1.8 ซม.^{3}/นาที อุปกรณ์ตรวจวัดใช้ refractive index detector ฉีด สาร ช2 เข้าไปในเครื่อง HPLC พบว่าให้โครมาโทแกรม 2 พีค มีค่า retention time เท่ากับ 5.02, 6.12 นาที เมื่อฉีดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานคือ glucose และ rhamnose เข้าไปในเครื่อง HPLC ภายใต้สภาวะเดียวกัน พบว่ามีค่า retention time เท่ากับ 5.51 ,6.14 นาที

การเตรียมอนุพันธ์แอซีเตตของสาร ช

นำสาร ช หนัก 0.067 กรัม มาเตรียมอนุพันธ์แอซีเตต ตามวิธีในหัวข้อ 2.9.3 ได้ของแข็งสีขาว ตกผลึกด้วยเฮกเซนและคลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้ง ได้ของแข็งเป็นผงละเอียดสีขาวหนัก 0.045 กรัม จุดหลอมเหลว 138-140 องศาเซลเซียล

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-3300, 1940, 1840, 1750, 1460, 1040, 900 ซม.$^{-1}$

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ 175.23, 170.56, 170.42, 170.20, 170.03, 169.40, 168.91, 143.88,137.15, 124.93, 103.26, 90.53, 90.08, 78.24, 78.07, 77.91, 77.86, 77.01, 76.52, 69.93, 98.02, 63.24, 61.54, 55.47, 48.10, 47.57, 42.00, 41.65, 36.67, 36.60, 32.97, 30.57, 28.05, 27.74, 27.71, 25.83, 25.77, 23.40, 21.26, 21.11, 20.58, 20.43, 20.20, 18.13, 17.00, 16.89, 16.35, 16.31, 15.41, 15.26 ppm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.10 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่แยกได้

2.10.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของต้นข้าว

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของต้นข้าวของ สาร ก, สารข , สาร ค, สาร ง, สาร จ, สาร ฉ และ สาร ช ตามวิธีข้อ 2.6.2 ได้ผลดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวของสาร ก, สาร ข, สาร ค, สาร ง, สาร จ, สาร ฉ และ สาร ช

สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม*)	% ความยาว		% การยับยั้ง	
		ราก	กาบใบ	ราก	กาบใบ
สาร ก	0.0001	92.07	86.09	7.93	0
	0.0005	126.94	111.92	0	0
	0.001	122.32	109.93	0	0
	0.005	104.05	112.91	0	0
สาร ข	0.0005	109.90	97.91	0	2.09
	0.001	110.39	101.49	0	0
	0.005	111.36	102.38	0	0
สาร ค	0.0001	134.50	98.68	0	1.32
	0.0005	148.89	82.45	0	17.55
	0.001	133.39	96.69	0	3.31
	0.005	111.43	58.94	0	41.06

ตารางที่ 25 (ต่อ)

สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม*)	% ความยาว		% การยับยั้ง	
		ราก	กาบใบ	ราก	กาบใบ
สาร ง	0.0001	145.94	93.38	0	6.62
	0.0005	127.31	107.28	0	0
	0.001	119.00	102.98	0	0
	0.005	123.99	106.95	0	0
	0.01	93.45	58.99	6.55	41.01
สาร จ	0.0005	108.60	97.92	0	2.05
	0.001	113.15	89.58	0	10.42
	0.005	68.51	89.29	31.49	10.71
สาร ฉ	0.01	94.94	102.87	5.06	0
สาร ช	0.001	107.81	113.41	0	0
	0.005	101.88	99.96	0	0.04
	0.01	107.03	129.25	0	0
	0.05	120.56	97.39	0	2.61

* กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย