บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. โรตาเวเปอร์ (Rotavapor) ของบริษัท Buchi, Switzerland
2. เครื่องหาจุดหลอมเหลวของบริษัท Fisher-Johns, U.S.A.
3. เครื่องอบสารให้แห้ง
4. Infrared spectrophotometer Perkin-Elmer Model, 780 spectrophotometer ของ U.S.A.
5. Nuclear Magnetic Resonance spectrometer แบบ JNM-FX 90 Q ของบริษัท Jeol, Japan ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. X-ray Fluorescence Spectrometer ใช้เครื่อง Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometer with Si (Li) Detector Link System, Model EDXRF XR-200
7. Amino Acid Analyzer Model 835-50 ของบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น
8. Mass Spectrometer Model DX-300 ของบริษัท Jeol ของญี่ปุ่น
9. Elemental Analyzer ใช้เครื่อง Elemental Analyzer Model 240C ของบริษัท Perkin Elmer, U.S.A.
10. Gas chromatograph แบบ GC-R1 A ของบริษัท Shimadzu, Japan

2.2 สารเคมี

ตัวทำละลาย เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, เอทานอล, เอทิลอะซีเตต, อะซีโตน, อีเทอร์

อะลูมินา Alumina oxide 90 standardised for Chromatographic adsorption analysis acc. to Brockmann, Art. 1097, Merck Aluminium oxide G (Type E) for thin layer chromatography, Art. 1090, Merk.

รีเอเจนต์ Dragendorff's reagent, Kraut's reagent, Marme's reagent, Mayer's reagent, Valser's reagent, Wagner's reagent, Ferric chloride reagent, Benedict's reagent

ซิลิกาเจล Silica gel 60 for column chromatography Art. 7734, E. Merck Damstadt, Silica gel 60 G for thin-layer chromatography, Art. 7731, E. Merck Damstadt

2.3 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ตลอดการทดลอง

2.3.1 Column Chromatography

ก. ใช้ Aluminium Oxide 90 Art. 1097 (70-230 mesh ASTM) Standardised for Chromatography ของบริษัท E. Merck, Damstadt เป็น adsorbent ในอัตราส่วนระหว่าง Aluminium Oxide ต่อสารที่ต้องการจะแยกเท่ากับ 20 ต่อ 1 วิธีเตรียมคอลัมน์ทำได้ดังนี้ ใช้สำลีหรือใยแก้วที่สะอาดอุดที่ปลายตีบของคอลัมน์ซึ่งปิดเปิดคอลัมน์โดยใช้ clip หรือ stop-cook ขณะที่คอลัมน์ปิดอยู่ให้บรรจุ solvent ที่ต้องการใช้ลงไปเกือบเต็มแล้วปล่อยให้ solvent ไหลออกเสียบ้างเพื่อไล่ฟองอากาศ เมื่อฟองอากาศหมดแล้วจึงปิดคอลัมน์และเติม solvent ลงไปอีกจนได้ระดับสูงประมาณ $\frac{2}{3}$ ของคอลัมน์แล้วค่อย ๆ บรรจุ Aluminium oxide ลงไปให้ติดต่อกันจนหมด เปิดคอลัมน์ให้ solvent ไหลออก จนระดับของ Aluminium oxide ไม่ลดลงต่อไป ตลอดการทดลองต้องระวังไม่ให้ solvent แห้งไปจากผิวหน้าของ Alumina เมื่อต้องการจะใช้คอลัมน์ต้องปล่อยให้ระดับของ solvent ลดลงจนเกือบแห้ง จึงค่อย ๆ เทสารที่ต้องการจะแยกลงไป จึงใช้ solvent ที่เป็นตัวทำละลายสารนั้นจำนวนน้อย ๆ ล้างผิวภายในคอลัมน์ให้สะอาด แล้วจึง elute หรือ develop คอลัมน์ด้วย solvent ที่ต้องการ ซึ่งการบรรจุแบบนี้เป็นการบรรจุแบบแห้ง โดยการเทตัวดูดซับลงในคอลัมน์ที่มีตัวทำละลายอยู่ตามปริมาณที่ต้องการ

ข. ใช้ Silica gel 60 Art. 7734 (70-230 mesh ASTM) สำหรับ column chromatography ของบริษัท E. Merck Damstadt เป็นตัวดูดซับ ส่วนคอลัมน์ที่ใช้เป็นคอลัมน์แก้วขนาดกว้างสม่ำเสมอกัน การบรรจุ Silica gel ทำแบบเปียกคือ ใส่ตัวทำละลายลงไป 2 ใน 3 ของคอลัมน์ ใส่ตัวทำละลายลงใน Silica gel ตามปริมาณที่ต้องการ

014412

(ใช้อัตราส่วนสารที่ต้องการแยกต่อปริมาณตัวดูดซับเป็น (1:25) คนจนได้สารเป็น slurry ที่ไม่มีฟองอากาศ แล้วค่อย ๆ ใส่ตัวดูดซับลงไปจนหมด รอจนผิวของตัวดูดซับไม่หดตัวลงอีก จึงเปิด clip ให้ตัวทำละลายไหลออกไปจนผิวหน้าของตัวดูดซับเกือบแห้ง ปิด clip แล้วจึงเทสารที่ต้องการแยกลงไป ส่วนอื่น ๆ ใช้เทคนิคเดียวกัน

2.3.2 ธินแลร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

2.3.2.1 การเตรียมแผนกระจกเคลือบตัวดูดซับ ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 G 7731 เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) โดยผสมซิลิกาเจล 30 กรัมต่อน้ำกลั่น 60 กรัม ในขวดรูปกรวยขนาด150 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดี เทใส่ Desaga Spreader ที่ปรับให้มีความหนา 0.25 มิลลิเมตร เคลือบลงบนแผ่นแก้วขนาด20×20 เซนติเมตร ซึ่งล้างสะอาดด้วยน้ำและเช็ดด้วยอะซีโตนจะได้ chromatoplates 5 แผ่น ปล่อยให้แห้งแล้ว activated ในตู้อบอุณหภูมิ 105 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง

2.3.2.2 การแต้มสาร ใช้หลอดแคปปิลลารีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 0.5 มิลลิเมตร แต้มสารละลายที่ต้องการทดสอบลงบน chromatoplate ห่างจากขอบล่างประมาณ 2 เซนติเมตร แต่ละจุดห่างกันประมาณ 1.5 เซนติเมตร ด้านบนชิด solvent front ห่างจากขอบบนประมาณ 2 เซนติเมตร หลังจากจุดที่แต้มสารละลายแห้งจึงนำไป develop ต่อไป

2.3.2.3 การ develop จุ่มแผ่นกระจกที่แต้มสารซึ่งแห้งแล้วลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายที่จะใช้ develop ปิดฝาขวดให้แน่น ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นมาจนถึง solvent front แล้วจึงนำเอาแผ่นกระจกออกจากขวดแล้วปล่อยให้ตัวทำละลายบนแผ่นกระจกระเหยจนแห้ง

2.3.2.4 การตรวจหาตำแหน่งของสาร นำแผ่นกระจกที่ develop แล้วใส่ในขวดแก้วบรรจุเกล็ดไอโอดีน ปิดฝาขวดให้แน่น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งสารที่แยกได้เกิด reversible complex มีสีน้ำตาลกับไอโอดีนแล้วจึงเอากระจกออก ใช้ดินสอวงรอบจุดที่แยกไว้และวาดรูปการแยกเพื่อเป็นหลักฐานในการเปรียบเทียบ หรือใช้วิธีตรวจสอบตำแหน่งของสารโดยแสงอุลตราไวโอเลต แล้วนำไปหาค่า Rf หรือนำไปเปรียบเทียบกับสารที่ทราบแล้วต่อไป

2.3.3 quick column chromatography

บรรจุ Silica gel ลงในคอลัมน์ แล้วใช้บีกเกอร์กดผิวหน้าให้แน่นและเรียบ นำ Silica gel ที่เคลือบด้วยสารที่จะแยกเทลงบนผิวหน้าเกลี่ยให้สม่ำเสมอ แล้วทำผิวหน้าให้แน่นและเรียบ ตัดกระดาษกรองที่ขนาดพอดีกับคอลัมน์เป็น 8 แฉก นำมาปิดผิวหน้าไว้เพื่อป้องกันการรบกวนความเรียบของผิวหน้า elute คอลัมน์ด้วย solvent ต่าง ๆ

วิธีเคลือบ Silica gel กับสารที่ต้องการจะแยก ทำได้โดยนำสิ่งที่ต้องการมาละลายในตัวทำละลายที่ละลายได้ดีที่สุด เติม Silica gel ลงไปคนคลุกเคล้าให้ทั่ว แล้วระเหยตัวทำละลายออกให้หมดจนแห้ง

2.3.4 เปเปอร์โครมาโตกราฟี (Paper chormatography) (PC.)

ใช้วิธีการนี้วิเคราะห์หาน้ำตาลและกรดอะมิโนโดยดำเนินการปฏิบัติดังต่อไปนี้

ก. การวิเคราะห์หาน้ำตาล

ใช้ดินสอลากเส้นให้ขนานขอบด้านกว้างของกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1) ขนาด 9×44 เซนติเมตร จากขอบบนเข้ามา 5 เซนติเมตร ทำเครื่องหมายตำแหน่งทีละจุด สารบนเส้นแต่ละจุดห่างกัน 4 เซนติเมตร เตรียมสารละลายของน้ำตาลมาตรฐานโดยผสม glucose, galactose, arabinose, xylose และ rhamnose อย่างละ 0.5% โดยน้ำหนักใน 10% isopropanol เพื่อป้องกัน bacteria จุดสารละลายน้ำตาลมาตรฐานเปรียบเทียบกับสาร นำไปใส่ในถังแก้วทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ยาว 48 เซนติเมตร ซึ่งอิ่มตัวด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง 1-บิวทานอล : เบนซีน : ไพริดีน : น้ำ (BBPW) ในอัตราส่วน (5:1:3:3) โดยปริมาตร ดำเนินการทำแบบ descending ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมออกนอกกระดาษทิ้งไว้ 18-24 ชั่วโมง เอาออกมาทำให้แห้งแล้วพ่นด้วยสารละลาย aniline hydrogen phthalate นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 5 นาที ตำแหน่งที่มีน้ำตาลจะเป็นสีน้ำตาล น้ำตาลแดง หรือน้ำตาลเข้ม

ข. การวิเคราะห์กรดอะมิโน ใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 21×28 เซนติเมตร ใช้ดินสอลากเส้นห่างจากขอบ 2 เซนติเมตร ขนานกับด้านยาว ทำเครื่องหมายบนตำแหน่งที่จะจุดสารบนเส้น แต่ละจุดห่างกัน 3 เซนติเมตร ม้วน

กระดาษเป็นรูปทรงกระบอก เย็บต่อปลายทั้ง 2 ข้าง นำไปแช่ถังแก้วทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร สูง 32 เซนติเมตร ซึ่งมีสารละลาย acetonitrile : 0.1 M ammonium acetate (pH 7) 7:3 อยู่สูง 1 เซนติเมตร ดำเนินการทำแบบ ascending ปล่อยจนตัวทำละลายซึมจนถึงระดับต่ำกว่าขอบบน 1 เซนติเมตร เอาออกมาทำให้แห้ง พ่นด้วย 0.1% ninhydrin ใน acetone นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 2-3 นาที ตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนจะปรากฏเป็นสีม่วง

2.3.5 รีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบสารเบื้องต้น

1. Liebermann-Burchard Test

การทดสอบนี้สามารถใช้ทดสอบ steroid หรือ triterpenoid compounds โดยการนำสารที่ต้องการทดสอบ 1-2 มิลลิกรัม เติมคลอโรฟอร์ม 0.5 ลูกบาศก์-เซนติเมตร หยด acetic anhydride ลงไป 2 หยด หลังจากนั้นหยดกรดซัลฟุริกเข้มข้นตามลงไปอีก 2 หยด ถ้าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีอื่นมาเป็นสีเขียว, น้ำตาลแกมเขียว แสดงว่าสารที่นำมาทดสอบเป็นสารจำพวก steroid แต่ถ้าสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีอื่นมาเป็นสีแดงหรือสีม่วงแดงในที่สุด แสดงว่าสารที่นำมาทดสอบเป็นสารพวก triterpenoid

2. สารละลาย $KMnO_4$

นำสารที่ต้องการทดสอบมาหยดสารละลาย 0.3% $KMnO_4$ ลงไปทีละหยดช้า ๆ เขย่าถ้าสีของสารละลาย $KMnO_4$ จางหายไป ให้หยดลงไปจน $KMnO_4$ ไม่ถูกฟอกจางสี นับจำนวนหยดไว้ ถ้าสารฟอกสี $KMnO_4$ ได้เกิน 3 หยดแสดงว่ามี unsaturation

3. สารละลาย Br_2 in CCl_4

นำสารที่ต้องการทดสอบมาหยดสารละลาย 3% Br_2 ใน CCl_4 ทีละหยด เขย่าถ้าสีของโบรมีนจางหายไปทุกครั้งที่หยดลงไปและไม่มีก๊าซ HBr เกิดขึ้น (โดยใช้กระดาษลิตมัสอังที่ปากหลอด แสดงว่ามี unsaturation

4. สารละลายเฟอริกคลอไรด์

นำสารที่ต้องการทดสอบมาละลายด้วยเอทานอลหรือคลอโรฟอร์มจนละลายหมดแล้วหยดสารละลาย $FeCl_3$ (ในน้ำหรือคลอโรฟอร์ม) ลงไปทีละหยด ถ้าสีเปลี่ยนไปแสดงว่ามี phenolic group ส่วนมากจะเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือม่วง แต่ phenolic

หรือ enolic compounds บางตัวให้สีชมพูหรือเขียวอ่อนก็มี

5. สารละลายเบเนดิกส์

ประกอบด้วยสารละลาย $CuSO_4$ และ Citrate ion ในสารละลายที่เป็นด่าง ใส่สารละลายเบเนดิกส์ลงในหลอดทดลอง เติมสารที่ต้องการทดสอบ 2-3 หยด แล้วอุ่นบน water bath 5 นาที ถ้าเกิดตะกอนสีน้ำตาลแดง แสดงว่ามีน้ำตาลซึ่งเป็น reducing sugar

6. สารละลาย aniline hydrogen phthalate

ซึ่งเตรียมได้จากการละลาย phthalic acid 16 กรัม ใน aniline 9.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร n-butanol 490 ลูกบาศก์เซนติเมตร ether 490 ลูกบาศก์เซนติเมตร และน้ำ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใช้กับการวิเคราะห์น้ำตาล โดยวิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟี

7. Mayer's reagent

ละลาย mercuric chloride 1.36 กรัม ในน้ำกลั่น 60 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลายของ potassium iodide 5 กรัม ในน้ำกลั่น 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วจึงเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

8. Valser's reagent

ละลาย mercuric iodide 14 กรัม ในสารละลายของ potassium iodide 10 กรัม ในน้ำกลั่น 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

9. Wagner's reagent

ละลาย cadmium iodide 10 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติม iodine 1.27 กรัม ลงในสารละลายที่เตรียมได้จากสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

10. Marme's reagent

ละลาย cadmium iodide 10 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลายของ potassium iodide 5 กรัม ในน้ำกลั่น 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

11. Kraut's reagent

ละลาย bismuth nitrate 8 กรัม ในกรดไนตริกเข้มข้น 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลายของ potassium iodide 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 ลูกบาศก์-เซนติเมตร

12. Dragendorff's reagent

ละลาย bismuth nitrate 8 กรัม ในกรดไนตริกเข้มข้น 12 ลูกบาศก์เซนติเมตร เทสารละลายที่เตรียมได้ลงในสารละลาย potassium iodide 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

รีเอเจนต์ที่ใช้ทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

1. Ferric chloride reagent
2. Kedd's reagent

2.4 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทสารเคมี

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบสารอินทรีย์ 5 ประเภทคือ อัลคาลอยด์ (alkaloids), คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycoside), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), ซาโปนิน (saponin) และคูมาริน (coumarins) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

2.4.1 การทดสอบอัลคาลอยด์

2.4.1.1 การทดสอบอัลคาลอยด์เบื้องต้น (Preliminary alkaloid test นำสิ่งสกัดมา 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ในชามกระเบื้องแล้วระเหยบนอ่างน้ำเดือดจนเกือบแห้ง เติม 2M HCl 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มและกวน 10 นาที กรอง รินสาร-ละลายในหลอดทดลอง 6 หลอด ๆ ละ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (สารละลายที่เหลือเก็บไว้ทดสอบในขั้นที่ 2) นำไปทดสอบกับรีเอเจนต์ดังต่อไปนี้คือ Mayer's, Valser's, Wagenr's, Dragendorff's, Kraut's และ Marme's reagent อย่างละ 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตสีและปริมาณตะกอน Mayer's และ Valser's จะให้ตะกอนขาว Dragendorff's ให้ตะกอนสีส้ม Wagner's, Kraut's และ Marme's ให้ตะกอนสีน้ำตาลถ้าสารนั้นมีอัลคาลอยด์

2.4.1.2 การทดสอบอัลคาลอยด์เพื่อความแน่นอน (Confirmed alkaloid test) นำสารละลายที่เหลือจากข้อ 2.4.1.1 ทำให้เป็นด่างด้วย 28% NH_4OH รินสารละลายทั้งหมดลงในกรวยแยก สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง ๆ ละ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร รวมชั้นคลอโรฟอร์มเข้าด้วยกัน แล้วระเหยให้งวดบนอ่างน้ำเดือด (ชั้นน้ำเก็บไว้ทดสอบขั้นที่ 3) เติม 2M HCl ประมาณ 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มและกวน 5 นาที กรองแล้วแบ่งสารละลายเป็น 6 หลอด เพื่อทดสอบเช่นเดียวกับ 2.4.1.1

2.4.1.3 การทดสอบ Quarternary และ/หรือ Amine oxide base นำสารละลายที่เป็นชั้นน้ำจากข้อ 2.4.1.2 มาทำให้เป็นกรดด้วย 2M HCl กรองแล้วแบ่งสารละลายเป็น 6 หลอด เพื่อทดสอบเช่นเดียวกับ 2.4.1.1 และ 2.4.1.2 ผลการทดสอบแสดงไว้ในตารางที่ 8

2.4.2 การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

2.4.2.1 นำสิ่งสกัดมา 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติม 10% lead acetate 40 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มให้เดือดเบา ๆ 15 นาที ทำให้เย็นแล้วกรอง

2.4.2.2 สกัดสารละลายที่กรองได้ด้วยคลอโรฟอร์ม 3 ครั้ง ๆ ละ 30, 20 และ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ รวมชั้นคลอโรฟอร์มทั้ง 3 ครั้งเข้าด้วยกัน เขย่ากับ anh. Na_2SO_4 กรองแล้วนำไประเหยจนเหลือปริมาตรประมาณ 1/10 ของปริมาตรเดิม ทำให้เย็นแบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด เพื่อนำไปทดสอบหาองค์ประกอบของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ดังนี้

ทดสอบส่วนที่เป็นสเตอรอยด์ (Liebermann-Burchard reaction) นำสารละลายคลอโรฟอร์มในหลอดที่ 1 มาระเหยจนเกือบแห้ง ทำให้เย็นแล้วหยด acetic anhydride 3 หยด เขย่าแล้วค่อย ๆ หยด H_2SO_4 เข้มข้นลงไปตามข้าง ๆ หลอด 1 หยด สังเกตการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นทันทีและภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง สีจะเปลี่ยนจาก สีกุหลาบ--→ แดง--→ม่วง--→น้ำเงิน--→เขียว (การเปลี่ยนสีนี้อาจแตกต่างกันบ้างแล้วแต่ชนิดของสาร) ถ้ามีสเตอรอยด์

ทดสอบส่วนที่เป็น lactone, butenolide (kedde raction) ระเหยสารละลายคลอโรฟอร์มในหลอดที่สองจนเกือบแห้ง หยด kedde's reagent ลงไป 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลาย 1M NaOH 2-3 หยด ถ้าได้สีน้ำเงินหรือม่วงแดงแสดงว่ามี

unsaturated lactone ring

ทดสอบส่วนที่เป็น deoxy sugar (Keller-Killiani reaction) เติมสารละลาย $FeCl_3$ 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในสารละลายคลอโรฟอร์มในหลอดที่สาม เขย่าให้เข้ากันแล้วค่อย ๆ ริน H_2SO_4 เข้มข้น ไปตามข้าง ๆ หลอดประมาณ 1-2 ลูกบาศก์เซนติเมตร จะปรากฏสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นและสารละลายชั้นบนเป็นสีเขียวอ่อน

การทดสอบต้องได้ positive test ทั้งสามปฏิกิริยาจึงแสดงว่ามีคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 5

2.4.3 การทดสอบฟลาโวนอยด์

นำสิ่งสกัดมา 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ระเหยบนอ่างน้ำเดือด สกัดไขมันออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์หลาย ๆ ครั้ง จนปิโตรเลียมอีเทอร์ไม่มีสีแล้วจึงนำของแข็งที่ปราศจากไขมันนั้นมาละลายใน 80% เอทานอล 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด ให้หลอดที่ 1 เป็น blank control นำมาทดสอบดังนี้

cyanidin test นำหลอดที่ 2 มาเติม HCl เข้มข้น 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วเติมแมกนีเซียม 1-2 แผ่น สังเกตการเปลี่ยนสี เติมน้ำ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร และ 1-octanol 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าแรง ๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น สังเกตสีในชั้น 1-octanol และชั้นน้ำ ถ้าสีในชั้น 1-octanol เปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีแดงแสดงว่าเป็นฟลาโวน (flavone) ถ้าเป็นสีแดงเลือดนกแสดงว่าเป็นฟลาโวนอล (flavonol) และถ้าเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงแสดงว่าเป็นฟลาโวโนน (flavonone)

Leucoanthocyanin test นำหลอดที่ 3 มาเติม HCl เข้มข้น 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุ่นบนอ่างน้ำเดือด 5 นาที สังเกตสี ถ้าได้สีม่วงแดงแสดงว่ามี leucoanthocyanin ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4

2.4.4 การทดสอบซาโปนิน

2.4.4.1 การทดสอบฟอง ชั่งพืชแห้งที่บดละเอียด 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วต้มบนอ่างน้ำเดือด 5 นาที กรองขณะร้อน ปล่อยให้เย็นแล้วเขย่าสารละลายที่ใส่อย่างแรง 1 นาที สังเกตผลนาน 30 นาที

เติมกรดซัลฟุริกเจือจางลงไป 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้ม 5 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วเขย่าแรง ๆ 1 นาที บันทึกผล (ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบลักษณะฟองกับสารที่มีซาโปนิน)

2.4.4.2 <u>การทดสอบสี</u> (Liebermann-Burchard test)

นำสิ่งสกัดมา 2.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมกรดซัลฟุริกเจือจาง 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าให้เข้ากันต้มบนอ่างน้ำเดือด 15 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 15 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำชั้นคลอโรฟอร์มมาเติม anh. Na_2SO_4 จำนวนเล็กน้อย กรองสารละลายคลอโรฟอร์มลงในชามกระเบื้อง ระเหยให้งวดบนอ่างน้ำเดือดปล่อยให้เย็นแล้วเติมอะซีติกแอนไฮไดรด์ 3 หยด เขย่าให้เข้ากันดี แล้วค่อย ๆ หยด H_2SO_4 เข้มข้น ลงข้างผนังชามกระเบื้อง เพื่อให้สารละลายทั้งสองผสมกันช้า ๆ

สังเกตสีที่เปลี่ยนทันทีและสังเกตจนครบหนึ่งชั่วโมง แต่ถ้ามี steroidal sapogenin จะให้สีน้ำเงินหรือเขียวแกมน้ำเงิน แต่ถ้ามี triterpenoidal sapogenin จะให้สีแดง ชมพู หรือม่วง ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 6

2.4.5 <u>การทดสอบคูมาริน</u>

นำพืชแห้งที่บดละเอียด 3 กรัม ใส่ลงในขวดคอแคบขนาด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทำพืชให้ชื้นด้วยน้ำกลั่น

คลุมปากขวดด้วยกระดาษกรองวงกลม ซึ่งทำให้ชื้นด้วยสารละลาย 1M NaOH คลุมปากขวดอีกชั้นหนึ่งด้วยแผ่นอะลูมเนียมบาง ๆ นำไปตั้งบนอ่างน้ำร้อน 30 นาที

นำกระดาษกรองไปวางใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตและสังเกตการเรืองแสงเป็นวงกลมที่เกิดขึ้น เมื่อฉายแสงอุลตราไวโอเล็ตนานประมาณ 10 นาที แสดงว่ามีคูมารินและอนุพันธ์ของคูมาริน ผลการทดลองแสดงไว้ในตาราง 7

2.4.6 <u>การทดสอบ reducing sugar</u> นำสิ่งสกัดที่ต้องการทดสอบมาละลายน้ำแล้วกรองใส่หลอดทดลอง นำไปทดสอบกับ Benedict's reagent 2 หยด แล้วอุ่นบนอ่างน้ำเดือด ถ้าเกิดตะกอนสีแดงอิฐ แสดงว่าในสิ่งสกัดน่าจะมี reducing sugar

2.4.7. ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทของสารเคมี แสดงไว้ในตารางที่ 4 - 8

ตารางที่ 4

ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาฟลาโวนอยด์ในสิ่งสกัดของเอทานอล

การทดสอบ	ผลที่สังเกตเห็น
cyanidin	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
leucoanthocyanin	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

จากผลการทดสอบในตารางที่ 4 แสดงว่าไม่มีฟลาโวนอยด์ในสิ่งสกัดของเอทานอล

ตารางที่ 5

ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ในสิ่งสกัดของเอทานอล

ปฏิกิริยา	ผลที่สังเกตเห็น
Liebermann-Burchard reaction	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว → สีน้ำตาล
Kedde reaction	ได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน มีตะกอนขาว
Keller-Kiliani reaction	ปรากฏว่ามีสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลาย และชั้นบนมีสีเขียวอ่อน

จากผลการทดลองในตารางที่ 5 แสดงว่ามีสารจำพวก steroid และ deoxy sugar

ตารางที่ 6

ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาซาโปนินในสิ่งสกัดของเอทานอล

ปฏิกิริยา	ผลที่สังเกตเห็น
การทดสอบฟอง	มีฟองปานกลาง
Liebermann-Burchard test	สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว → น้ำตาล

จากผลการทดสอบในตารางที่ 6 แสดงว่าในสิ่งสกัดของเอทานอลมี steroid และอาจมีส่วนที่ทำให้เกิดฟอง

ตารางที่ 7

ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคูมารินในสิ่งสกัดของเอทานอล

ปฏิกิริยา	ผลที่สังเกตเห็น
Coumarins test	ไม่เห็นมีการเปลี่ยนแปลง

จากผลการทดลองในตารางที่ 7 แสดงว่าไม่มีคูมารินในสิ่งสกัดของเอทานอล

ตารางที่ 8

ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาอัลคาลอยด์ในสิ่งสกัดของเอทานอล

Reagents	Preliminary test	Confirmed test	Quarternary/amine oxide test
Mayer's	-	+	-
Valser's	-	-	-
Wagner's	-	-	-
Dragendorff's	-	-	-
Kraut's	+	-	-
Marme's	+	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง สารละลายขุ่นเล็กน้อย

++ หมายถึง สารละลายขุ่นอย่างเห็นได้ชัด

+++ หมายถึง มีตะกอนหนักตกลงมา

ผลการทดสอบด้วย Dragendorff's reagent เชื่อถือได้มากกว่ารีเอเจนต์อื่น ๆ ดังนั้น จากผลการทดลองในตารางที่ 8 แสดงว่า ไม่มีอัลคาลอยด์ในสิ่งสกัดของเอทานอล

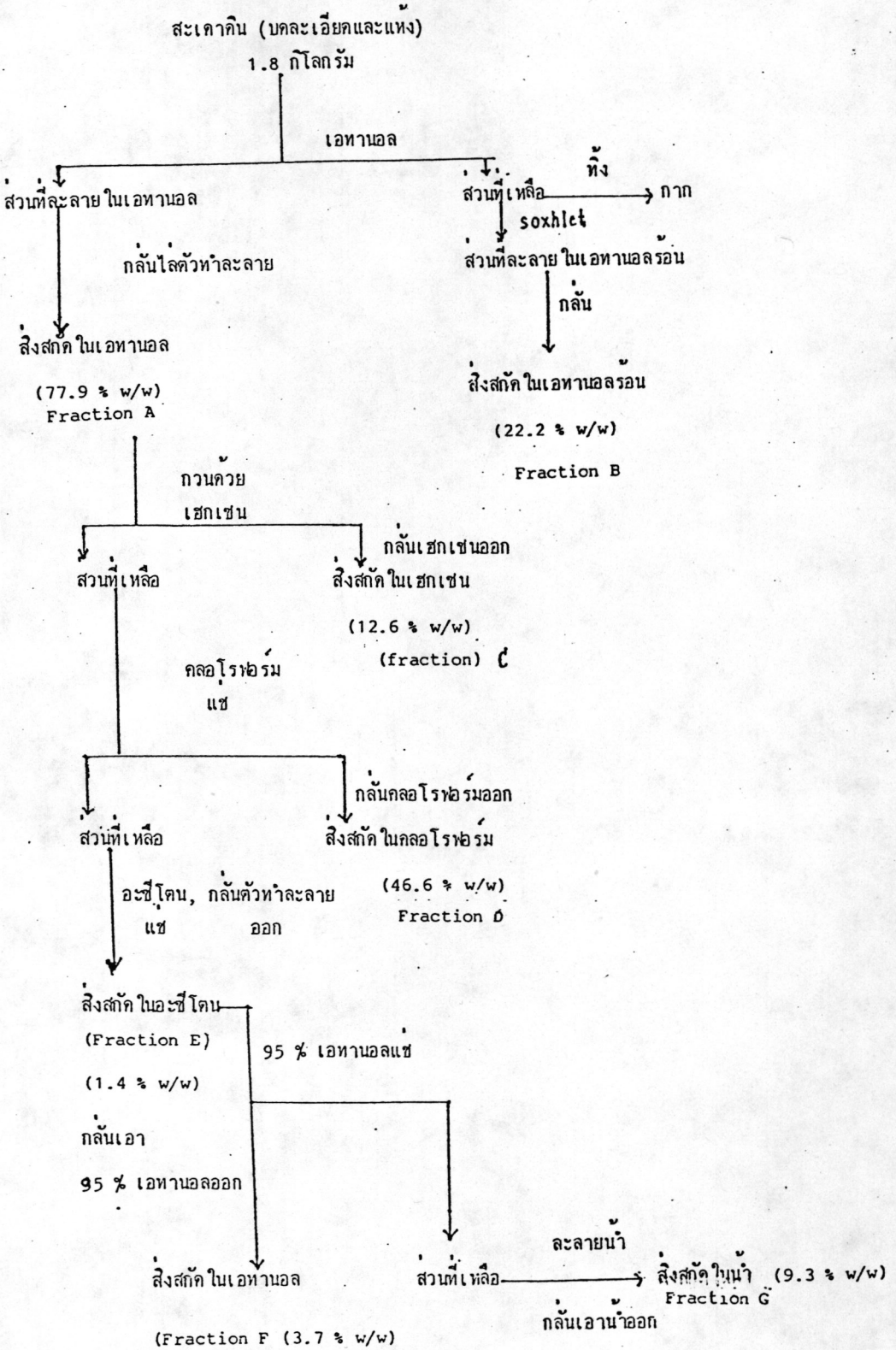
2.5 การสกัด (Extraction)

นำสะเดาดินที่ตากแห้งและบดละเอียด 1.8 กิโลกรัม มาสกัดด้วยเอทานอล โดยแช่ไว้ในตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องครั้งละ 3 วัน ทำซ้ำ ๆ กัน 7 ครั้ง ทำสารละลายที่ได้จากการสกัดไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นลดความดันเพื่อระเหยไล่ตัวทำละลายออก จะได้สิ่งสกัดในเอทานอลหนัก 210 g (77.9 % w/w) นำส่วนที่เหลือไปสกัดต่อด้วย soxhlet จนกระทั่งไม่มีสารออกมากับตัวทำละลายอีก จึงนำสารละลายที่ได้จาก soxhlet ไปกลั่นเอาตัวทำละลายออกเราจะได้สิ่งสกัดเอทานอลร้อนหนัก 60 g (22.2 % w/w)

นำสิ่งสกัดในเอทานอลไปกวนด้วยเฮกเซนจะได้สารที่ละลายได้ในเฮกเซน กลั่นเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องกลั่นธรรมดา ทำจนไม่มีสารออกมาในตัวทำละลายอีก จะได้สิ่งสกัดในเฮกเซนหนัก 34 g (12.6 % w/w) ส่วนที่เหลือนำไปสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์มจะได้ส่วนที่เหลือและสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มหนัก 133.34 g (46.6 % w/w) จากนั้นเอาส่วนที่เหลือจากสกัดเอาสิ่งสกัดในคลอโรฟอร์มออกไปมากวนต่อด้วยอะซีโตน ในที่สุดจะได้สิ่งสกัดในอะซีโตน 3.33 g (1.4 % w/w) สิ่งที่เหลือจากไม่ละลายในอะซีโตนจะนำมากวนต่อใน 95 % เอทานอลจะนำไปละลายน้ำ จะได้สิ่งสกัดในน้ำ 25g (9.3 % w/w)

การสกัดละเดาดินด้วยเอทานอลจะได้นำไปกวนได้สิ่งสกัด 5 ชนิดคือ Fraction C, D, E, F, G ซึ่งจะได้แยกหาสารทุก Fraction ซึ่งผลการสกัดที่กล่าวมานี้ดูให้ง่ายขึ้นจากตารางที่ 9

ขั้นตอนการสกัดสะเดาดิน แผนภาพที่ 1



เอา EtOH แช่สะเดาดิน 1.8 kg ได้ Crude แล้วกวนโดย solvent ต่าง ๆ เรียงตามโพลาริตี จะได้ Crude ต่าง ๆ ซึ่งมีสีและ น.น. ตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงสิ่งสกัดต่าง ๆ ของสะเดาดิน

ครั้งที่ 1

Solvent, Fraction	สีของ Crude ที่ได้	น.น.ที่ได้(g) จากต้นไม้แห้ง 1.8 kg	%
EtOH, A	สีเขียวดำเข้ม	210	77.9
n-Hexane, C	สีเขียวดำ	34	12.6
$CHCl_3$, D	สีน้ำตาลดำ	133.34	46.6
$CH_3-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$, E	สีน้ำตาลแดง	3.33	1.4
EtOH, F	สีเหลือง	10	3.7
น้ำ , G	น้ำตาลเข้ม	25	9.3

ครั้งที่ 2 (Fraction B)

สิ่งสกัดในเอทานอลร้อน 60 g ซึ่งได้จากเอากากสะเดาดินที่แช่ด้วยเอทานอล 7 ครั้ง มาเข้า soxhlet ซึ่งจะสกัดเอาสารออกมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ จึงได้สิ่งสกัดในเอทานอลร้อนดังกล่าว (22.2 % w/w)

2.6 การแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

2.6.1 <u>การแยกสิ่งสกัดที่ละลายในเฮกเซน</u> (ด้วยวิธี column chromatography)

โดยใช้เทคนิคการแยกแบบ column chromatography โดยละลายส่วนที่ละลายได้ในเฮกเซนด้วยเฮกเซนจำนวนน้อยที่สุดโดยใช้สิ่งสกัดของเฮกเซนหนัก 34 g ใส่สารละลายนี้ลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 cm^3 สูง 1.2 เมตร ซึ่งมี Alumina 90, Art, 1097ของบริษัท E Merck Darmstadt หนัก 700 g เป็นตัวดูดซับ elute คอลัมน์โดยใช้เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน ชนิด 2%, 5%, 8%, 10%,13%, 18%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80%, โดยปริมาตรและ 100% คลอโรฟอร์ม, เมทานอล-คลอโรฟอร์ม ชนิด 5%, 10%, 40%, 50%, 60%, 80%,โดยปริมาตรเมทานอลตามลำดับเก็บelute ครั้งละ 1000 ลูกบาศก์เซนติเมตร กลั่นไล่ตัวทำละลายจนเหลือสารละลายประมาณ 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บไว้ในขวดรูปกรวยขนาด 50 cm^3 ในการทดสอบว่าสิ่งที่แยกได้ในขวดใดมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่นั้นได้ใช้เทคนิคทางธินแลร์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดโดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมและใช้ไอโอดีนเป็นตัวทำให้เกิดสี ขวดที่ให้จำนวนจุดของสารเท่ากัน ได้นำมารวมเข้าด้วยกัน ดังในตารางที่ 10 ซึ่งแสดงผลการแยกสิ่งสกัดของสิ่งสกัดเฮกเซนโดยวิธี column chromatography เมื่อใช้ Alumina เป็นตัวดูดซับ

ตารางที่ 10

ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดดิบในเฮกเซนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ (eluent)	ลำดับส่วนที่ (fraction)	ลักษณะสารที่แยกได้	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-4	สารสีขาว	0.2
2% $CHCl_3$	5-7	สารสีขาวปนเหลือง	0.1
5% $CHCl_3$	8-10	สารสีเหลือง	0.15
8% $CHCl_3$	11-13	สารสีเหลือง	0.12
10% $CHCl_3$	14-15	สารสีเหลือง	0.03
13% $CHCl_3$	15-16	สารสีเหลือง	0.04
18% $CHCl_3$	17-18	สารสีเหลือง	0.07
20% $CHCl_3$	19-20	สารสีขาวเป็นผลึกปนน้ำมัน	0.3
30% $CHCl_3$	21-29	สารสีขาวเป็นผลึกปนน้ำมัน	0.08
40% $CHCl_3$	30-40	สารสีขาวปนกับน้ำมัน	0.4
60% $CHCl_3$	41-61	สารสีขาวปนน้ำมัน	0.07
80% $CHCl_3$	62-67	สารสีเหลืองปนน้ำมัน	0.01
$CHCl_3$	68-70	สารสีเหลืองปนน้ำมัน	0.02
5% MeOH	71-75	สารสีเหลืองปนน้ำมัน	0.04
10/ MeOH	76-86	สารสีเหลืองปนน้ำมัน	0.03
40% MeOH	87-93	สารสีเหลืองปนน้ำมัน	0.02
50% MeOH	94-95	สารสีเหลืองปนน้ำมัน	0.03
60% MeOH	96-98	สารสีเหลืองปนน้ำมัน	0.05
80% MeOH	99-109	สารสีเหลืองปนน้ำมัน	0.04
MeOH	110-122	สารสีเหลืองปนน้ำมัน	0.05

2.6.2 การแยกสิ่งสกัดที่ละลายในคลอโรฟอร์ม (ด้วยวิธี column chromatography)

ใช้เทคนิคการแยกแบบ (column chromatography) โดยละลายส่วนที่ละลายได้ในคลอโรฟอร์มด้วยคลอโรฟอร์มจำนวนน้อยที่สุด โดยใช้สิ่งสกัดของคลอโรฟอร์มหนัก 133.34 g ผ่านสารละลายนี้ลงในคอลัมน์ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 cm^3 สูง 1.2 เมตร ซึ่งมี Alumina 90, , Art. 1097 ของบริษัท E. Merck Darmstadt หนัก 2408 g เป็นตัวดูดซับ elute คอลัมน์ โดยใช้เฮกเซน, คลอโรฟอร์ม-เฮกเซนชนิด 5%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80% โดยปริมาตร 100% คลอโรฟอร์ม เมทานอล-คลอโรฟอร์ม 5%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80% โดยปริมาตร และ 100% เมทานอลตามลำดับ เก็บ elute ครั้งละ 1000 ลูกบาศก์เซนติเมตร กลั่นไล่ตัวทำละลายจนเหลือสารละลาย 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บไว้ในขวดรูปกรวยขนาด 50 cm^3 ในการทดสอบว่าสิ่งที่แยกได้ในขวดใดมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่นั้น ได้ใช้เทคนิคทางธินแล์โครมาโตกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูด โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมและไอโอดีนเป็นตัวทำให้เกิดสี นำสารละลายในขวดที่ให้จำนวนจุดของสารเท่ากันได้นำมารวมเข้าด้วยกัน ดังในตารางที่ 11 ซึ่งแสดงผลการแยกสิ่งสกัดของคลอโรฟอร์มซึ่งได้จากสิ่งสกัดเอทานอลของสะเดาดิน โดยใช้ Alumina oxide เป็นตัวดูดซับ

ตารางที่ 11

ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดคิบในคลอโรฟอร์มด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ (eluent)	ลำดับส่วนที่ (fraction)	ลักษณะสารที่แยกได้	น้ำหนัก (กรัม)
เฮกเซน	1-4	สารใสไม่มีสี	0.01
5% $CHCl_3$	5-6	สารเหนียวสีขาว	0.2
10% $CHCl_3$	7-9	สารสีขาว	0.3
20% $CHCl_3$	10-11	คราบสีเหลือง	0.001
40% $CHCl_3$	12-13	สารเหนียวสีเหลือง	0.1
60% $CHCl_3$	14-16	สารเหนียวสีเหลือง	0.08
80% $CHCl_3$	17-36	สารขาวน้ำมันน้ำตาล	0.3
$CHCl_3$	37-44	สารสีน้ำตาลอ่อน	2
5% MeOH	45-58	สารสีเขียว	0.3
10/ MeOH	59-69	สารเขียวอ่อนผลึกขาว	0.15
20% MeOH	70-98	สารขาวน้ำตาล	0.1
40% MeOH	99-111	สารเหนียวขาวเขียว	0.2
60% MeOH	112-131	สารเหนียวขาวเขียว	0.1
80% MeOH	132-134	สารเหนียวขาวเขียว	0.04
MeOH	135-157	สารเหนียวสีน้ำตาล	0.02

2.6.3 การแยกสิ่งสกัดที่ละลายได้ในอะซีโตน (ด้วยวิธี column chromatography)

ใช้เทคนิคการแยกแบบ column chromatography โดยนำสิ่งสกัดในอะซีโตนมาละลายด้วยอะซีโตนจำนวนเล็กน้อย โดยใช้สิ่งสกัดในอะซีโตนหนัก 3.33 g ผ่านสารละลายนี้ลงในคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm^3 สูง 50 cm^3 ซึ่งมี Silica gel 60 Art. 7734 ของบริษัท E. merck Darmstadt หนัก 55 g เป็นตัวดูดซับ elute คอลัมน์ด้วย n-hexane คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน ชนิด 5% , 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 90%, โดยปริมาตร 100% คลอโรฟอร์ม เมทานอล-คลอโรฟอร์ม 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, โดยปริมาตร และ 100% เมทานอล ตามลำดับ เก็บ elute ครั้งละ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร กลั่นไล่ตัวทำละลายจนเหลือสารละลาย 20 ลูกบาศก์เซนติเมตร เก็บไว้ในขวดรูปกรวยขนาด 50 cm^3 ในการทดสอบว่าสิ่งที่แยกได้ในขวดใดมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่นั้นได้ใช้เทคนิคทางธินแลร์โครมาโตกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมและไอโอดีนเป็นตัวทำให้เกิดสี นำสารละลายในขวดที่ให้จำนวนจุดของสารเท่ากันนำมารวมเข้าด้วยกัน ดังในตารางที่ 12 ซึ่งแสดงผลการแยกสิ่งสกัดของอะซีโตนซึ่งได้จากสิ่งสกัดเอทานอลของสะเดาดินโดยใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ

ตารางที่ 12

ผลการแยกสารจากสิ่งสกัดดิบในอะซีโตนด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

ตัวทำละลายที่ใช้ชะคอลัมน์ (eluent)	ลำดับส่วนที่ (fraction)	ลักษณะสารที่แยกได้	น้ำหนัก (กรัม)
h-hexane	1-4	สารสีเหลือง	0.08
5% $CHCl_3$	5	สารสีเหลือง	0.07
10% $CHCl_3$	6	สารสีเหลือง	0.01
20% $CHCl_3$	7	สารสีเหลือง	0.02
30% $CHCl_3$	8	สารสีเหลือง	0.03
40% $CHCl_3$	9	สารสีเหลือง	0.03
50% $CHCl_3$	10	สารสีเหลือง	0.04
60% $CHCl_3$	11	สารสีเหลือง	0.01
70% $CHCl_3$	12-14	สารเขียวอ่อนมีผลึกขาว	0.02
90% $CHCl_3$	15-16	สารเขียวอ่อนมีผลึกขาว	0.03
$CHCL_3$	17-19	สารเขียวอ่อนมีผลึกขาว	0.02
5% MeOH	20-22	สารเขียวอ่อนมีผลึกขาว	0.01
10% MeOH	23-31	สารเหนียวมีผลึกปน	0.04
20% MeOH	32-36	สารเหนียวมีผลึกปน	0.01
30% MeOH	37-44	สารเหนียวมีผลึกปน	0.03
40% MeOH	45-48	สารสีเหลือง	0.04
50% MeOH	49-56	สารสีเหลืองเข้ม	0.03
60% MeOH	56-57	สารสีเหลืองเข้ม	0.02
MeOH	58-65	สารสีเหลืองเข้ม	0.1

เกษตรศาสตร์

2.6.4 การศึกษาสิ่งสกัดในชั้นเอทานอล

Part EtOH ที่ได้จากกการกวน crude สะเดาดินด้วย EtOH ใน part นี้ได้ตะกอนสีเหลืองปนอยู่ใน solution มากมายจึงกรองเอาตะกอนซึ่งเมื่อถูกอากาศจะถูก oxidized จากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลอาจเป็นพวก phenolic compound หรือพวกที่ oxidized ได้ง่าย ซึ่งถ้าสนใจก็ควรจะได้ทำต่อไป

2.6.5 การศึกษาสิ่งสกัดในชั้นน้ำ

ได้จากการนำสิ่งสกัดในเอทานอลมาสกัดต่อด้วยเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, อะซีโตน 95% เอทานอล, น้ำ ตามลำดับ จะได้สิ่งสกัดในชั้นน้ำสีเหลืองอ่อน 25 g (9.3% w/w) นำสิ่งสกัดในชั้นน้ำมาศึกษาดังต่อไปนี้

2.6.5.1 การศึกษาน้ำตาล

นำสิ่งสกัดในชั้นน้ำส่วนหนึ่งมาละลายน้ำจะได้สารละลายสีเหลืองอ่อนปนอยู่กับตะกอนขาว กรองเอาตะกอนขาวออกจะได้สารละลายใสสีเหลืองอ่อน แบ่งสารละลายใสสีเหลืองอ่อนมาศึกษาต่อดังนี้

การศึกษาน้ำตาลใช้ HPLC

นำ crude น้ำที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าเมื่อใช้ glucose, arabinose, xylose, sucrose, maltose, rhamnose เป็น standard พบว่าไม่มีน้ำตาลในสะเดาดินเลย ซึ่งอาจเกิดจากเตรียม solution จางไปก็ได้ ควรทำซ้ำเพื่อความแน่ใจ

2.6.5.2 การศึกษากรดอะมิโน

นำสารละลายใสสีเหลืองอ่อนที่เหลือจากหัวข้อการศึกษาน้ำตาลนำมาศึกษาหากรดอะมิโนดังนี้

2.1 การศึกษาเบื้องต้นโดยใช้สารละลาย ninhydrin

นำสารละลายใสสีเหลืองอ่อนที่เหลือจากหัวข้อการศึกษาน้ำตาลมาปรับ pH ให้เป็นกลางแล้วนำมาทดสอบกับสารละลาย ninhydrin พบว่าได้สารละลายสีชมพูม่วง แสดงว่าสิ่งที่สกัดได้ในชั้นน้ำมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบอยู่

2.2 วิเคราะห์ชนิดของกรดอะมิโนโดยใช้ Amino acid Analyzer (AAA)

นำสารละลายใสสีเหลืองอ่อนไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง AAA พบว่ามี Glutamic acid มากที่สุด รองลงมาคือ phenylalanine, G-NH_2 butyric, Valine, Alanine ฯลฯ ซึ่งความเข้มข้นแสดงในตาราง

ตารางที่ 13 Amino Acid จากส่วนสกัดด้วยน้ำของสะเดาดิน

n mole amino acid/ml sample

กรดอะมิโน	ความเข้มข้น	กรดอะมิโน	ความเข้มข้น
Aspartic	30.58	Tyrosine	56.50
Threonine	35.00	phenylalanine	149.99
Serine	25.33	G-NH_2 butyric	131.41
Glutamic acid	315.40	Ethanolamine	-
Glycine	46.83	Ammonia	a lot
Alanine	92.41	Ornithine	18.25
Valine	103.75	Lysine	11.00
Isoleucine	25.83	Arginine	32.58
Leucine	43.41	Proline (440)	75.91

พบว่ามี Glutamic acid มากที่สุด รองไปก็ phenylalanine G-NH_2 butyric ส่วนตัวอื่น ๆ ปรากฏดังตาราง ส่วนที่มีมากเป็น Amino Acid ที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์

3. การศึกษาชนิดของธาตุในสิ่งสกัดด้วยน้ำ

นำสิ่งสกัดในชั้นน้ำที่เหนียวข้นจำนวนหนึ่งไปวิเคราะห์ด้วย X-ray Fluorescence analysis โดยใช้เครื่อง Energy Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometer Model EDXRF XR-200

พบว่ามีธาตุ Potassium (K) Chloride (Cl) = KCl เป็นจำนวนมากในสิ่งสกัดด้วยน้ำ ซึ่งถ้าเราเอาสิ่งสกัดด้วยน้ำละลายน้ำจะได้สารละลายใสสีเหลืองอ่อนมีตะกอนขาว ซึ่งถ้ากรองจะเป็นตะกอนขาวติดกระดาษกรองมากมาย ซึ่งตะกอนขาวนี้เองคือ KCl เป็นส่วนใหญ่

นอกจากมีธาตุ K, Cl แล้วยังพบว่ามีธาตุกำมะถัน (S) และเหล็ก (Fe) จำนวนเล็กน้อย

2.7 การทำให้สารบริสุทธิ์และพิสูจน์สูตรโครงสร้าง

2.7.1 การทำให้สาร wax บริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้าง

สาร 1-3 ข ได้จากของแข็งสีขาวในน้ำมันใสไม่มีสี fraction ที่ 1-3 ของการแยกสารโดย column chromatography โดยใช้ solvent n-hexane ของสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน ดังในตารางที่ 10 การแยกเอาผลึกของแข็งสีขาวออกทำได้โดยใช้ ethyl acetate คนกับสารใน fraction ที่ 1-3 ข ethyl acetate ละลายน้ำมันได้ กรองเอาน้ำมันออกทำหลายครั้งแล้วนำสิ่งที่กรองไว้ไปตกผลึกด้วย ethyl acetate หลายครั้ง ตรวจความบริสุทธิ์ของสาร 1-3 ข. โดยการทำ TLC ใช้ n-hexane เป็นตัวทำละลายใช้ siliga gel เป็นตัวดูดซับใช้ n-hexane เป็น developing solvent พบว่าสารยังไม่บริสุทธิ์ มีอย่างน้อย 3 จุดจึงนำไปทำการแยก column chromatography ขนาดเล็กซ้ำโดยใช้ SiO_2 เป็นตัวดูดซับอัตราส่วน 30:1 โดยใช้ bulate ขนาด 50 cm^2 เป็นคอลัมน์และใช้สาร 1-3 ข จำนวน 400 mg เก็บ elute ครั้งละ 10 ml ใช้ system ในการelute เช่นเดียวกับการทำคอลัมน์ใหญ่พบว่าสาร 1-3 ข ที่ได้บริสุทธิ์มากขึ้น จึงนำมาตกผลึกซ้ำอีกครั้งด้วย ethyl acetate ตรวจ TLC จะได้จุดเดียวใน n-hexane แสดงว่าสารบริสุทธิ์ นำสารที่ได้ไปอบให้แห้ง แล้วนำมาหา mp พบว่า mp = 66 - 68 ^{o}C นำไปวิเคราะห์ IR, GC, MS ตามลำดับพบว่าจาก IR เป็นสารพวกไฮโดรคาร์บอนและจาก GC แสดงว่ามี long chain hydrocarbon ปนอยู่ 10 ชนิด และ MS ยืนยันว่าเป็น mixture ของ long chain hydrocarbon

จากการทดลองยืนยันด้วย IR พบว่าเป็น long chain hydrocarbon

ดูจากรูป IR หน้า 69

แสดง C-H-stretching ที่ 2,860, 2920 cm^{-1} แสดง C-H-bending ที่ 1,470, 1,375 cm^{-1}, C-H- rocking of - $(CH_2)_n$ - n > 4 ที่ 720, 730 cm^{-1}

และจาก GC เพื่อ plot กราฟจำนวนคาร์บอนกับ log retention time โดยมีสาร ที่มีจำนวนเท่ากับคาร์บอน 24,28,30และ32 ได้กราฟเป็นเส้นตรง เมื่อนำสาร 1-3 ข บริสุทธิ์ไปวิเคราะห์GC พบว่าจากค่า log retention time มีไฮโดรคาร์บอน 10 ชนิดคือ $C_{25}H_{52}$-$C_{34}H_{70}$ ตามลำดับ

$C_{25}H_{52}$ คือ pentacosane มีสูตรโครงสร้าง CH_3-$(CH_2)_{23}$-CH_3

$C_{26}H_{54}$ คือ hexacosane มีสูตรโครงสร้าง CH_3-$(CH_2)_{24}$-CH_3

$C_{27}H_{56}$ คือ heptacosane มีสูตรโครงสร้าง CH_3-$(CH_2)_{25}$-CH_3

$C_{28}H_{58}$ คือ octacosane มีสูตรโครงสร้าง CH_3-$(CH_2)_{26}$-CH_3

$C_{29}H_{60}$ คือ nonacosane มีสูตรโครงสร้าง CH_3-$(CH_2)_{27}$-CH_3

$C_{30}H_{62}$ คือ triacontane มีสูตรโครงสร้าง CH_3-$(CH_2)_{28}$-CH_3

$C_{31}H_{64}$ คือ hentriacontane มีสูตรโครงสร้าง CH_3-$(CH_2)_{29}$-CH_3

$C_{32}H_{66}$ คือ dotriacontane มีสูตรโครงสร้าง CH_3-$(CH_2)_{30}$-CH_3

$C_{33}H_{68}$ คือ tritriacantane มีสูตรโครงสร้าง CH_3-$(CH_2)_{31}$-CH_3

$C_{34}H_{70}$ คือ tetratriacontane มีสูตรโครงสร้าง CH_3-$(CH_2)_{32}$-CH_3

โดยมี hentriacontane มากที่สุด, tritriacontane, nonacosane, dotriacontane, triacontane, octacosane, heptacosane รองลงมาตามลำดับ ส่วน pentacosane, hexacosane, tetratriacontane มีจำนวนน้อย

2.7.2 การทำให้สาร steroids บริสุทธิ์และหาสูตรโครงสร้าง

สาร 20 ข ได้จากของแข็งรูปเข็มสีขาวในน้ำมันเขียวดำ fraction ที่ 20 ของการแยกสารโดย Column chromatography โดยใช้ solvent 20% $CHCl_3$-hexane ของสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน ดังในตารางที่ 10 การแยกเอาผลึกของแข็งรูปเข็มสีขาวออกทำได้โดยใช้เฮกเซนคนกับสารใน fraction ที่ 20 เฮกเซนจะละลายน้ำมันเขียวดำได้ แล้วกรองเอาน้ำมันเขียวดำออกทำหลาย ๆ ครั้ง จนได้ผลึกรูปเข็มที่มีน้ำมันเจือปนน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ จากนั้นตรวจความบริสุทธิ์ของสาร 20 ข โดยการทำ TLC ใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและใช้ CH_2Cl_2 เป็น developing solvent พบว่าสารยังไม่บริสุทธิ์ จึงนำไปตกผลึกใน $CHCl_3$ MeOH, 1:6 2 ครั้ง จึงทดสอบโดยใช้ TLC system เดิม พบว่าได้สารจุดเดียวกลม แสดงว่าสารบริสุทธิ์ จึงนำไปอบให้แห้ง แล้วจึงนำมาหาจุดหลอมเหลวได้ค่า = 166 - 168 ^{o}C

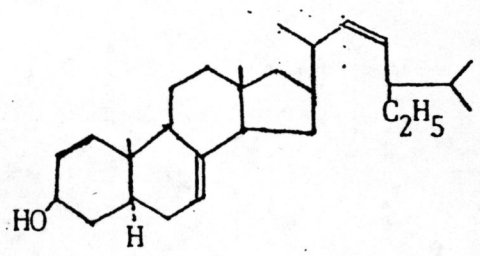
นำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปทดสอบ Liebermann-Burehard reaction ปรากฏว่าจะเปลี่ยนจากสารละลายใสไม่มีสีเป็นสีเขียวดำ แสดงว่า สาร 20 ข เป็นพวก steroid นำสารบริสุทธิ์ 20 ข ไปทดสอบการละลายพบว่าละลายได้ดีใน ethyl acetate และ $CHCl_3$

จากคุณสมบัติที่กล่าวมาจะเห็นว่า 20 ข อาจเป็น stigmasterol จึงต้องทดสอบโดยนำ standard stigmasterol และ 20 ข มา spot เทียบกันใน system ที่ใช้กับการทดสอบความบริสุทธิ์ของ 20 ข. พบว่าทั้ง stigmasterol และสารบริสุทธิ์ 20 ข. ขึ้นจุดเดียวกลมมี Rf เท่ากัน

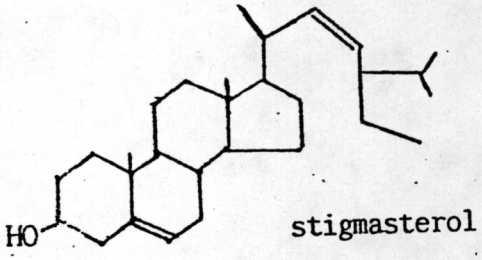
จึงสรุปได้ว่า 20 ข อาจเป็น stigmasterol หรือตัวอื่นที่ใกล้เคียงกันมากเพื่อพิสูจน์ความจริงดังกล่าวจึงนำสารบริสุทธิ์ 20 ข นำไปวิเคราะห์ด้วย IR, ^{13}C NMR, ^{1}H NMR, MS เพื่อยืนยันสูตรโครงสร้างเทียบกับ standard IR, ^{13}C NMR, ^{1}H NMR, MS, GC ของ stigmasterol & α-spinasterol จากการทดลองจะเห็นว่าสาร 20 ข. กับ stigmasterol

นั้นต่างกันที่ลักษณะผลึกที่ต่างกันจนเห็นได้ชัด

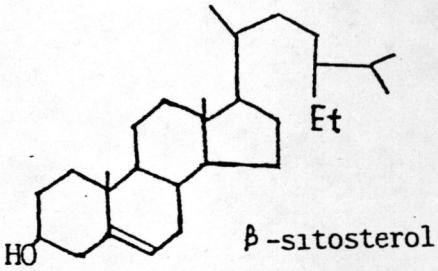
จาก IR พบว่าให้ spectrum เหมือนกับ α -spinasterol ทุกประการคือ C-O stretching vibration of 3β -OH ที่ 1,050, 1,020 cm^{-1} มี peak singlet ที่ 940 cm^{-1} และ peak doublet ที่ 850, 830 cm^{-1} เป็นลักษณะเฉพาะตัวของ α-spinasterol ที่ทำให้ต่างจาก sterol 29 อะตอมตัวอื่น ๆ มี O-H stretching ที่ 3,440 cm^{-1}, C-H stretching vibration ที่ 2,950, 2,870 และมีพันธะคู่ C = C stretching 1,640; 1,565 cm^{-1} และมี 1,107; 973 cm^{-1} เป็น out of plane bending 1,450; 1,385 cm^{-1} ไป็น C-H bending of CH_2, CH_3 α-spinaterol (β -sitosterol, stigmasterol) เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกันดังรูป จึงมีคุณสมบัติใกล้เคียงกันมาก)



α-spinasterol



stigmasterol



β -sitosterol

จาก IR ทราบว่าสาร 20 ข กับ stigmasterol เป็นสารคนละตัวกัน ลองวิเคราะห์ด้วย TLC โดยใช้ระบบเดิมพบว่าเมื่อ spot stigmasterol เป็นจุดแรก stigmasterol + สาร 20 ข เป็นจุดที่ 2 สาร 20 ข เป็นจุดที่ 3 จะพบว่าจุดตรงกลาง 1 จุดทับกันไม่สนิทเบี้ยวออกเล็กน้อย แสดงว่า สาร 20 ข

ไม่ใช่ stigmasterol จริง ๆ แต่เป็นสารอื่นที่มีค่า Rf ใกล้เคียงกันมาก

เพื่อยืนยันโครงสร้างว่าเป็น α -spinasterol แน่นอน จึงนำสารบริสุทธิ์ 20 ข ไปวิเคราะห์ด้วย ^{1}H NMR ดังแสดงในรูปที่ 16 หน้า 80 จากรูปพบว่ามีสัญญาณ multiplet ในช่วง 0.038 - 1.613 ppm ซึ่งมีความเข้มมาก แสดงว่าจะมีสารพวก steroid และมีสัญญาณ 5.157, 5.090, 5.032 ppm แสดงถึงมีโปรตอนที่ต่อกับคาร์บอนที่มีพันธะคู่อย่างน้อย 2 พันธะคู่ ค่าที่ได้สอดคล้องกับ standard ^{1}H NMR α-spinasterol รูปที่ 17 หน้า 79

จาก ^{13}C NMR spectrum รูปที่ 20 หน้า 83 สารนี้ให้สัญญาณคาร์บอน -13 ประมาณ 29 คาร์บอนและสัญญาณที่ได้นี้แสดงลักษณะของ 20 ข ว่าจะเป็น steroid ที่มีพันธะคู่ 2 พันธะคู่ ซึ่งแสดงสัญญาณที่ 139.55 138.199 ppm และ 129.477, 117.504 ppm ซึ่งคาร์บอนที่ต่อกับหมู่ OH จะมีค่า 70.987 ppm ส่วนคาร์บอนที่เหลือจะอยู่ในช่วง 12.08 - 55.908 ppm จากค่าที่ได้เปรียบเทียบกับ standard พบว่าเหมือนกับ α -spinasterol ทุกประการ

จาก Mass spectrum รูปที่ 24 หน้า 87 และข้อมูล MS m/e พบว่า สาร 20 ข มี M^{+} = 412 เป็น main และมี M^{+} = 414 เล็กน้อย แสดงถึงเป็นพวก sterol ประเภทที่มี C 29 อะตอมคงเป็น Δ^{7}-stigmastenol ซึ่งมักเกิดปนกับ α-spinasterol เสมอในธรรมชาติ

เพื่อยืนยันว่าสารเป็น α-spinasterol ไม่ใช่ stigmasterol หรือ β -sitosterol โดยการทำ gas chromatography เทียบกับ standard stigmasterol, β- sitosterol จากการวิเคราะห์ด้วย GC พบว่าสาร 20 ข มี peak ขึ้น 2 peak แสดงว่ามีสาร 2 ชนิดปนกันอยู่ซึ่งเครื่องมืออื่นตรวจสอบไม่ได้ จากการเทียบกับ standard พบว่า peak เล็ก ๆ

1 peak แสดงว่าเป็น stigmasterol ส่วน peak ใหญ่ main peak ก็คือ α-spinasterol นั่นเอง โดยดูจาก retention time ไม่ตรงกับ sterol อื่น ๆ ที่มี 29 อะตอม

สรุปสาร 20 ข มีสาร 3 ชนิดคือ α-spinasterol มีจำนวนมาก รองลงมาคือ stigmasterol และ Δ^7-stigmastenol (ทราบได้จาก α-spinasterol ต้องมี Δ^7-stigmastenol ปนอยู่ด้วยเสมอตรวจสอบได้จาก M.S. ที่มี M^+ 414, 412 $M^+ = 414$ หมายถึง Δ^7-stigmastenol ส่วน $M^+ = 412$ หมายถึง stigmasterol, α-spinasterol ซึ่งเป็น Isomer กันสูตรโมเลกุลเท่ากัน

2.7.3 การทำให้สาร triterpenoid บริสุทธิ์

สาร 19 ก. เป็นของแข็งสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาล fraction ที่ 19 ของการแยกสารโดย column chromatography โดยใช้ solvent 80% $CHCl_3$-hexane ของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ดังในตารางที่ 11 การแยกของแข็งสีขาวออกทำโดยใช้ ethyl acetate คนกับสารใน fraction ที่ 19 แล้วกรองเอาน้ำมันออกจะได้ของแข็งสีขาว นำมาตกผลึกด้วย MeOH : $CHCl_3$ (1:1) 2 ครั้ง ทดสอบความบริสุทธิ์ด้วย TLC ใช้คลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลายใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและสารละลายผสมระหว่าง n-hexane- $CHCl_3$ (1:1) เป็น developing solvent ได้ผลึกสีขาวรูปเข็ม สลายตัวที่อุณหภูมิ > 310 นำสาร 19 ก ที่บริสุทธิ์ไปทดสอบ Liebermann-Burchard reaction ปรากฏว่าจะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นสีม่วงแดง แสดงว่าสาร 19 ก เป็น พวก triterpenoid นำสารบริสุทธิ์ 19 ก ไปทดสอบการละลายพบว่าละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม ในเมทานอลละลายได้เมื่อร้อนแต่เย็นไม่ละลาย

การวิเคราะห์สารที่แยกออกมาได้

ผลการวิเคราะห์ธาตุ พบว่า C=76.56 % H=10.47 %

ผลจากการคำนวณได้สูตรโมเลกุล $C_{32}H_{52}O_4$

พบ C=76.8% H=10.4 %

จากสูตรโมเลกุลและการทดสอบปฏิกิริยา Liebermann-Burchard ได้ว่าสาร 19 ก เป็นพวก triterpenoid ที่มีสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{52}O_4$

เพื่อความแน่นอนจึงส่งสารไปวิเคราะห์ด้วย IR, MS , ^{1}H NMR จาก IR spectrum ของ 19 ก ν_{max}^{KBr} (cm^{-1}) พบว่ามีลักษณะเด่นคือ มี $\overset{O}{\overset{\|}{C}}$ ที่ 1,695 cm^{-1} เป็น sharp absorption band, 1,415, 1,385 cm^{-1} เป็น medium absorption band ของ C-H bending vibration of $-CH_2-$,CH_3- ที่ 1,010, 1,050 cm^{-1} เป็น sharp absorption band ของ C-O-stretching vibration ของ 3β-OH นอกจากนี้ที่ 3,500-3,420 cm^{-1} ยังแสดง O-H stretching vibration และ 2,970-2,940 cm^{-1} เป็น broad absorption band แสดง C-H stretching vibration จาก IR บอกว่า $C_{32}H_{52}O_4$ ซึ่งเป็น triterpenoid compound MW = 500 จะมี OH ต่อที่ตำแหน่ง 3 และมี $\overset{O}{\overset{\|}{C}}$ อย่างน้อย 1 หมู่ และไม่มี part น้ำตาล ดังรูปที่ 25 หน้า 89

จาก Mass spectrum สาร 19 ก พบว่ามี m/e สูงสุดเป็น 411 และ m/e ที่สำคัญอื่น ๆ คือ m/e 454, 411, 412, 393, 205, 135, 107, 109, 43

จาก Mass spectrum ให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่าสาร 19 ก ตัวนี้ $\overset{O}{\overset{\|}{C}}$ จะอยู่ในรูป $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$ ($\overset{O}{\overset{\|}{C}}$ ของ ketone) ซึ่งทราบได้จาก m/e 454 ซึ่งเสียหมู่ $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$(43) ไปแล้ว ได้ m/e 411 ดังรูปที่ 26 หน้า 90

จาก ^{1}H NMR spectrum (TMS) แสดง peak สำคัญหลาย peak คือ δ 0.31-2.17ppm เป็น broad multiplet ซึ่งมีลักษณะซับซ้อน แสดงว่ามีหมู่ CH_3, CH_2, CH ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของพวก steroid หรือ triterpenoid นอกจากนี้ที่ δ เท่ากับ 3.78 ppm แสดงว่ามีหมู่ C-CH-OH

จากข้อมูลทั้งหมดทำให้สรุปได้ว่าสาร 19 ก อาจเป็น triterpenoid compound ที่มีหมู่ $\overset{O}{\overset{\|}{C}}-CH_3$ (ketone) มี MW 500 มีสูตรโมเลกุล $C_{32}H_{52}O_4$ และมีหมู่ OH หลายหมู่ ดูจาก broad absorption band

2.7.4 การทำให้สาร glycoside บริสุทธิ์

สาร 60 ก, 50 ก ได้จากของแข็งรูปเข็มสีขาวในน้ำมันเหลือง fraction ที่ 60, 50 ของการแยกสารโดย column chromatography โดยใช้ solvent 5%, 10% MeOH-$CHCl_3$ ของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ดังในตารางที่ 11 การแยกเอาผลึกของแข็งรูปเข็มสีขาวออกทำได้โดย fraction 50 ก ใช้ ethyl acetate คนกับสารใน fraction ที่ 50 ก ethyl acetate จะละลายน้ำมันได้ แล้วกรองเอาน้ำมันเหลืองออกทำหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งผลึกของแข็งสีขาวบริสุทธิ์มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยกำจัดน้ำมันออกไป โดยตรวจความบริสุทธิ์ของสาร glycoside 50 ก โดยใช้ TLC โดยใช้ $CHCl_3$: MeOH, 1:1 เป็นตัวทำละลาย ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับและใช้ 20% MeOH-$CHCl_3$ เป็น developing solvent พบว่าสารยังไม่บริสุทธิ์จึงนำไปตกผลึกใน $CHCl_3$: MeOH, 1 ครั้ง จึงทดสอบโดยใช้ TLC ระบบเดิม ปรากฏว่าได้สารจุดเดียวกลม แสดงว่าสารบริสุทธิ์ จึงนำไปอบให้แห้งแล้วจึงนำมาหาจุดหลอมเหลวได้ 292 - 294 °C

ส่วนการแยกเอาผลึกของแข็งรูปเข็มสีขาวออกทำได้โดยถ้าเป็น fraction 60 ก ใช้ MeOH ล้างน้ำมันให้หมดจากผลึก ทดสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ TLC ระบบเดียวกับ 50 ก ; ซึ่งสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงนำไปตกผลึกใน MeOH : $CHCl_3$, 1:1 1 ครั้ง จะได้สารบริสุทธิ์ใน TLC เป็นจุดเดียวกลม นำไปอบให้แห้งแล้วจึงนำมาหาจุดหลอมเหลวได้ 276 - 278 °C

การตรวจลักษณะของสารประกอบที่แยกออกมาได้ (Identification of COmpounds)

การตรวจลักษณะของสาร glycoside mp 276 - 278 ^{o}C

Physical Propertics และปฏิกิริยาการให้สีของสาร glycoside
ลักษณะสารเป็นผลึกรูปเข็มสีขาวเป็นเงามีจุดหลอมเหลว 276 - 278 ^{o}C
ละลายได้ดีใน MeOH : $CHCl_3$, 1:1 เมื่อร้อน ไม่ละลายใน $CHCl_3$, MeOH
เมื่อทดสอบกับ Liebermann-Burchard Reagent จากสารละลายใสไม่มีสี
จะได้สีส้ม ซึ่งแสดงว่าอาจเป็น triterpenoid ก็ได้

ผลการวิเคราะห์ธาตุ พบ C=67.08 %, H=9.47 %, O=23.4 %

ผลจากการคำนวณได้สูตรโมเลกุล $C_{31}H_{52}O_8$
ซึ่งคำนวณการวิเคราะห์ธาตุจากสูตรได้ C=67.39%, H=9.42%, O=23.19 %
จากสูตรโมเลกุลที่คำนวณได้น่าจะมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเนื่องจากมี O มากผิดปกติ
เพื่อให้ทราบสูตรโครงสร้างและรูปร่างโมเลกุลของสารแน่นอนขึ้นกว่าจึงส่งสารไป
วิเคราะห์ด้วย IR, Ms, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR

จาก IR spectrum ของ 60 ก $\overset{KBr}{\underset{max}{}}$ (cm^{-1}) พบว่าสารตัวนี้มี
ลักษณะเด่นคือมี $\overset{O}{\overset{\|}{C}}$ ที่ 1,700 cm^{-1}, C-O broad absorption band
1,040 cm^{-1} ซึ่งแสดงลักษณะว่าสาร 60 ก, 50 ก เป็น glycoside
ที่มีน้ำตาลเป็นส่วนหนึ่ง และมี strong absorption band ของ
หมู่ OH ของน้ำตาล และ ส่วน aglycone ที่ 3,300 - 3560 cm^{-1}
strong absorption band ของ C-H stretching ที่ 2,940 cm^{-1}
ดังรูปที่ 29 หน้า 94

จาก Mass spectrum แสดง m/e สูงสุดเป็น 413 และ
m/e อื่นที่สำคัญดังนี้ m/e 456, 438, 431, 420, 414, 405, 396, 395, 377
ดังรูปที่ 30 หน้า 95

จาก ^{1}H NMR spectrum ($DMSO_{d6}$: $CDCl_3$) แสดง peak สำคัญหลาย peak จาก δ 0.288 -2.284ppm แสดง board multiplet peak ของพวก C-H ต่าง ๆ ที่ต่อกับ ring หรือ side chain ส่วน C-OH ที่ δ 4.44ppm -C-CH-OH ที่ δ 3.89ppm ส่วน δ 3.47ppm เป็น -OH , δ 2.702ppm เป็น -C-CH-CO-R ดังรูปที่ 31 หน้า 97

จาก ^{13}C NMR spectrum ($DMSO_6$: $CDCl_3$) จาก spectrum มีอย่างน้อย 30 carbons ของสารที่เป็น glycoside จาก $\overset{O}{\overset{\|}{C}}$ ที่แสดงชัดเจนใน IR 1700 cm^{-1} แสดงชัดว่าเป็น $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}$ ของ Ketone (2 14.08 ppm) และแสดง glycoside โดยดูจาก C-O มีหลายชนิดซึ่งเป็นลักษณะของพวก glycoside คือที่ δ 76.66, 73.69 69.57, 67.49, 64.33, 62.542 ppm ซึ่งคาดว่าเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งจะได้สูตรโมเลกุลคร่าว ๆ คือ $C_{31}H_{52}O_8$ มีน้ำตาล glucose $C_6H_{12}O_6$ มาเกาะส่วน aglycone เป็น $C_{25}H_{40}O_2$ ซึ่งเพื่อความแนนอนควรลองเตรียมอนุพันธ์ของสาร 60 ก โดยการ Acetylation และ hydrolyse สาร 60 ก เพื่อดู part น้ำตาลว่าเป็นน้ำตาลอะไรโดยส่งน้ำตาลที่ hydrolysed ส่งไปตรวจด้วย paper chromatography และ HPLC แต่สาร 60 ก มีน้อย จึงไม่ได้ทำ การเตรียมอนุพันธ์และ hydrolyse เพื่อจะส่งไปวิเคราะห์ด้วย ซึ่งมีเหลือจะได้ทำที่หลังเพื่อให้ข้อมูลดูดีขึ้น ซึ่งจากทั้ง data ทั้งหมดคาดว่าเป็นสารพวก terpene glycoside มีน้ำตาลอย่างน้อย 1 ตัวเป็นองค์ประกอบ

นำสารบริสุทธิ์ทั้ง 60 ก และ 50 ก มาทำ TLC โดยใช้ระบบเดิมคือ 20% MeOH-$CHCl_3$ เปรียบเทียบดูว่าจะเป็นสารตัวเดียวกันหรือไม่ ปรากฏว่า 60 ก และ 50 ก ทำ 3 system ได้ Rf เท่ากันตลอด และเป็นจุดกลมจุดเดียว น่าจะเป็นสารตัวเดียวกัน แต่จุดหลอมเหลวต่างกัน อาจเป็นเพราะสาร 60 ก ยังไม่บริสุทธิ์ จึงทำให้ mp. ต่างกันไปบ้าง นำสาร 60 ก 50 ก ไปวิเคราะห์ด้วย IR และ ^1H NMR พบว่าได้ spectrum เหมือนกันทุกประการ

จึงสรุปว่า 60 ก และ 50 ก เป็นสารตัวเดียวกัน