บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาการสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดาได้รับความสนใจที่จะทำวิจัยเป็นอย่างมาก เนื่องจากอะซาไดแรคทินเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการไล่แมลง และ ยับยั้งการกินอาหารของแมลง ซึ่งในอนาคตอาจใช้ทดแทนยาฆ่าแมลงชนิดอื่นที่มีอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม แต่การศึกษาการสกัดอะซาไดแรคทินมิใช่ทำได้ง่าย จึงมีผู้สนใจที่พยายามหาทางที่จะพัฒนาวิธีการสกัด เพื่อนำอะซาไดแรคทินออกจากเมล็ดสะเดาให้มาก และบริสุทธิ์ที่สุด นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ยังได้ค้นพบอะซาไดแรคทินชนิดอื่น ๆ (A-K) แต่ที่มีการขายตามท้องตลาด จะเป็นอะซาไดแรคทินชนิด A ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน มีความบริสุทธิ์ 95 เปอร์เซ็นต์

จากที่ได้กล่าว ในปัจจุบันอะซาไดแรคทินยังได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยอย่างมาก ในปี 2539 (ม.ค.-พ.ค.) มีผู้จดสิทธิบัตรในสหรัฐอเมริกาเรื่อง การสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดาเกือบ 10 ฉบับ ส่วนประเทศอื่น ๆ แม้ในประเทศไทยก็ให้ความสนใจ เช่นกัน

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดาให้มีปริมาณมากและหาวิธีที่จะทำให้อะซาไดแรคทินมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

เนื่องจากอะซาไดแรคทินเป็นสารที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายมากมาย เช่น เมทธานอล, เอทธานอล, คลอโรฟอร์ม เอทธิลอะซิเตต และไดคลอโรมีเทน ดังนั้น การสกัดจึงเป็นการสกัดที่เอาสารไม่ต้องการออกให้ได้อะซาไดแรคทินเพียงชนิดเดียว ซึ่งการสกัดจำเป็นต้องอาศัยการละลายของตัวทำละลายเป็นตัวพาสารที่ต้องการและไม่ต้องการออกจากกัน

การศึกษาการสกัดในงานวิจัยนี้จะสกัดสารสกัดสะเดาจากเมล็ดสะเดา 2 วิธี โดยวิธีแรกจะเป็นการสกัดโดยวิธี soxhlet ขนาดใหญ่ แล้วแยกสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดสะเดาโดยอาศัยความสมดุลย์ของการกระจายตัวของตัวทำละลายระหว่างเฟส โดยให้ตัวทำละลายละลายสารอะซาไดแรคทินและสารชนิดอื่น และตัวทำละลายอีกชนิดละลายในสารที่ไม่ต้องการ แล้ว

ทำการแยกอะซาไดแรคทินออกจากสารสกัดสะเดาโดยวิธีคอลัมน์ซึ่งใช้ซิลิกา เจล(silica gel) เป็นตัวดูดซับ โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวชะ เก็บลำดับส่วนของคอลัมน์ในเครื่อง HPLC เพื่อแยกเอาสารที่บริสุทธิ์ อีกวิธีหนึ่งเป็นการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายร่วมเป็นตัวสกัด แล้วแยกสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดสะเดา โดยอาศัยความสมดุลย์ของตัวทำละลายระหว่างเฟสเช่นเดียวกับวิธีแรก แล้วทำการแยกอะซาไดแรคทินออกจากสารสกัดสะเดาโดยวิธีคอลัมน์ ซึ่งใช้เซฟาเดกซ์เป็นตัวดูดซับ โดยใช้สารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทธานอลเป็นตัวชะ เก็บลำดับส่วนของคอลัมน์ในเครื่อง HPLC เพื่อแยกเอาสารที่บริสุทธิ์

การศึกษาปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะซาไดแรคทินตัวหนึ่งด้วยไลเปส 2 ชนิด ได้แก่ ไรโซพัส และ แคนดิดา โดยการศึกษาการบ่มของเอนไซม์ที่อุณหภูมิเหมาะสมกับเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ ได้แก่ 1 ชั่วโมง , 4 ชั่วโมง , และ 24 ชั่วโมง แล้วดูผลการทดลองเทียบกับสารละลายอะซาไดแรคทินที่ไม่มีเอนไซม์ (control)

4.1.การสกัดอะซาไดแรคทินออกจากเมล็ดสะเดา วิธีที่ 1

การสกัดแยกอะซาไดแรคทินออกจากเมล็ดสะเดาวิธีนี้เป็นการใช้ Soxhlet ขนาดใหญ่เป็นเครื่องมือในการสกัด

4.1.1. ขั้นตอนการสกัดอะซาไดแรคทินออกจากเมล็ดสะเดาโดยใช้ Soxhlet ขนาดใหญ่

นำเมล็ดสะเดาบด จากการเตรียมเมล็ดตามวิธี 3.4.1 4 กิโลกรัม มาทำการทดลองตามวิธี 3.4.2.1 โดยใช้เฮกเซนเป็นตัวทำละลาย สกัดโดยวิธี soxhlet เป็นเวลา 48 ช.ม. ได้สารละลายจากเฮกเซนที่ได้เป็นสีเขียวออกเหลือง แล้วกลั่นแยกเอาเฮกเซนออกจนเกือบหมด โดยวิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน น้ำมันที่สกัดได้เป็นสีเหลืองออก เขียวหนัก 2.43 กก. คิดเป็น 60.75 % น้ำหนักของสารสกัด วิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามวิธี 3.3.5-3.3.7 ไม่พบอะซาไดแรคทิน

4.1.2. การสกัดสารด้วยเมทธานอล

นำกากเมล็ดสะเดาที่ผ่านการเอาน้ำมันออกด้วยเฮกเซน แล้วสกัดด้วยเมทธานอลตามวิธี 3.4.2.2 กรองเอาเมทธานอลที่สกัดได้ แล้วระเหยเมทธานอลออกจนแห้ง ได้สารสกัดสีน้ำตาลเหนียวเข้มออกเขียว หนัก 725 กรัม คิดเป็น 18.13 % ของน้ำหนักสะเดาเริ่มต้น นำสารสกัดเมทธานอลที่ได้นี้วิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทินตามวิธี 3.3.5-3.3.7 ประกอบด้วยอะซาไดแรคทิน 2.38 %

4.1.3 การสกัดแยกสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดสะเดาโดยอาศัยความสมดุลย์ของการกระจายตัวของตัวทำละลายระหว่างเฟส

ละลายสารสกัด 4.1.2 ข้างต้น 15 กรัม ด้วยเมทธานอล 95 %ในกรวยแยก เติมเฮกเซน แล้วสกัดแยกออกจากชั้นเฮกเซน สกัดด้วยเฮกเซนอีก 3 ครั้ง นำสารละลายเมทธานอลแต่ละครั้งทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธี 3.3.3 จนกระทั่งสารละลายเมทธานอลไม่มีจุดของอะซาไดแรคทิน จึงหยุดสกัด ไขชั้นสารละลายเมทธานอลมากลั่นลดความดันระเหยตัวทำละลายที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ได้สารที่สกัดด้วยเมทธานอล มีลักษณะเหนียวสีน้ำตาลออกเขียว 2.23 กรัม คิดเป็น 2.69 % ของน้ำหนักสะเดาเริ่มต้น, 14.87% ของน้ำหนักสารสกัด นำสารสกัดนี้มาวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามวิธี 3.3.5-3.3.7 ประกอบด้วย 7.46 % อะซาไดแรคทิน

สารสกัดสะเดาเมทธานอลที่สกัดได้ข้างต้น 15 กรัม ละลายด้วยเอทธิลอะซิเตต สกัดในกรวยแยก สกัดด้วยน้ำ 4 ครั้ง นำชั้นเอทธิลอะซิเตต มากำจัดน้ำออก โดยเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส แล้วระเหยเอทธิลอะซิเตต ได้สารสกัดสีเขียวเข้มเหนียว หนัก 8.85 กรัมคิดเป็น 1.59% ของน้ำหนักสะเดาเริ่มต้น และ 59% ของน้ำหนักสารสกัด แล้ววิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทินได้ 10.46 %

ตารางที่ 4 แสดงผลการสกัดเมล็ดสะเดา จากน้ำหนักเมล็ดสะเดา 4.0 กิโลกรัม

สารที่ใช้สกัด	น้ำหนักเริ่มต้น	ลักษณะสาร	น้ำหนักที่ได้ (กรัม)	%น้ำหนัก	%อะซาไดแรคทิน
เฮกเซน	4.0 ก.ก.	น้ำมันเหลืองออกเขียว	2430	60.75	-
เมทธานอล	2.43 ก.ก.	เหนียวสีน้ำตาลออกเขียวเข้ม	725	18.12	2.38
เมทธานอล-เฮกเซน	15 กรัม	เหนียวสีน้ำตาลออกเขียวเข้ม	2.23	2.71	7.46
น้ำ-เอทธิลอะซิเตต	15 กรัม	เหนียวสีเขียวเข้ม	8.85	1.60	10.46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 ผลการทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟีนแต่ละขั้นของการสกัด

S = สารมาตรฐานอะซาไดแรคทิน

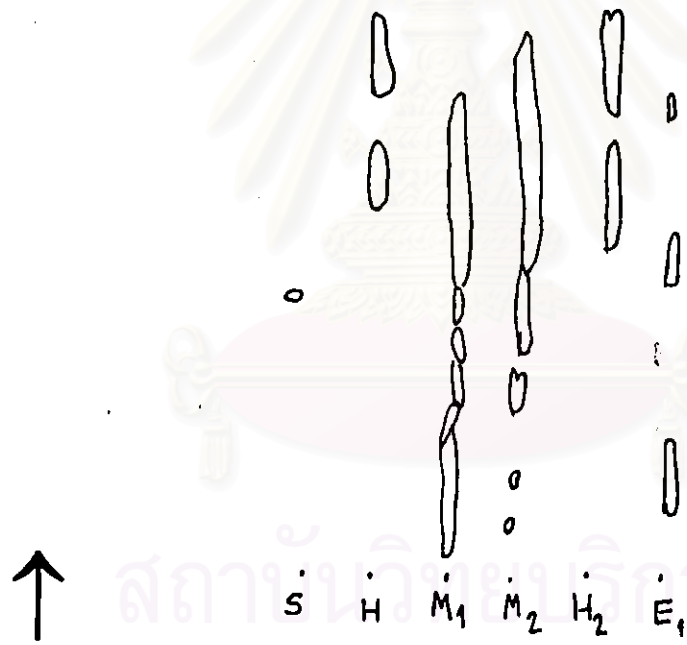
H = สารสกัดขั้นเฮกเซน

M_1 = สารสกัดขั้นเมทธานอลจากกากเมล็ดสะเดา

M_2 = สารสกัดขั้นเมทธานอลจากการสกัดกับเฮกเซน

H_2 = สารสกัดขั้นเฮกเซนจากการสกัดกับเมทธานอล

E_1 = สารสกัดขั้นเอทธิลอะซิเตต



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.4 การแยกสาร

4.1.4.1. การแยกสารของสารสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต-เฮกเซน

นำสารสกัดด้วยเอทธิลอะซิเทต จากข้อ 4.1.3 10 กรัม มาแยกด้วยควิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งมีซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับตามวิธีในข้อ 3.3.1 แล้วชะคอลัมน์ด้วยสารละลายผสมระหว่างเอทธิลอะซิเตตกับเฮกเซนในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 200 มิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละส่วน (fraction)มาทดสอบว่ามีอะซาไดแรคทินหรือไม่ โดยใช้ทินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธี 3.3.3 ผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 7 รวมสารที่มีจุดระยะทางที่เท่ากันเข้าด้วยกัน นำไปกลั่นไล่ตัวทำละลาย ได้สารสกัดสีเขียวเข้มมีลักษณะเหนียวข้นหนัก 8.2 กรัม คิดเป็น % ของน้ำหนักสะเดาเริ่มต้น, 82% ของน้ำหนักสารสกัด แล้วทดสอบหาปริมาณอะซาไดแรคทินตามวิธีข้อ 3.3.5-3.3.7 ได้11.56 %

4.1.4.2. การแยกสารอื่นออกจากสารสกัดสะเดาในระบบคอลัมน์

การแยกสารสกัดสะเดาแบบคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซิลิกาเจลหนัก 150 กรัม เป็นตัวดูดซับ นำสารสกัด (โดยที่ได้ในข้อ .4.1.4.1)ข้างต้น 15 กรัม และทำการวิจัยตามวิธี 3.3.2 โดยการละลายในโทลูอีนลงในคอลัมน์ แล้วชะคอลัมน์ด้วยสารละลายตัวพา(สารละลายผสมระหว่างเมทธานอลในโทลูอีน 2 % ถึง 9 % เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน ตรวจหาอะซาไดแรคทินซึ่งมีพีคโครมาโทมาแกรมเหมือนกัน ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ผลการทดสอบบนแผ่นทินแลร์โครมาโทกราฟีของการแยกสารสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต-เฮกเซน ตามข้อ 4.1.4.1 ตามลำดับส่วน

S = สารมาตรฐานอะซาไดแรคทิน

E_1 = สารสกัดเอทธิลอะซิเตตลำดับส่วนที่ 1

E_2 = สารสกัดเอทธิลอะซิเตตลำดับส่วนที่ 2

E_3 = สารสกัดเอทธิลอะซิเตตลำดับส่วนที่ 3-5

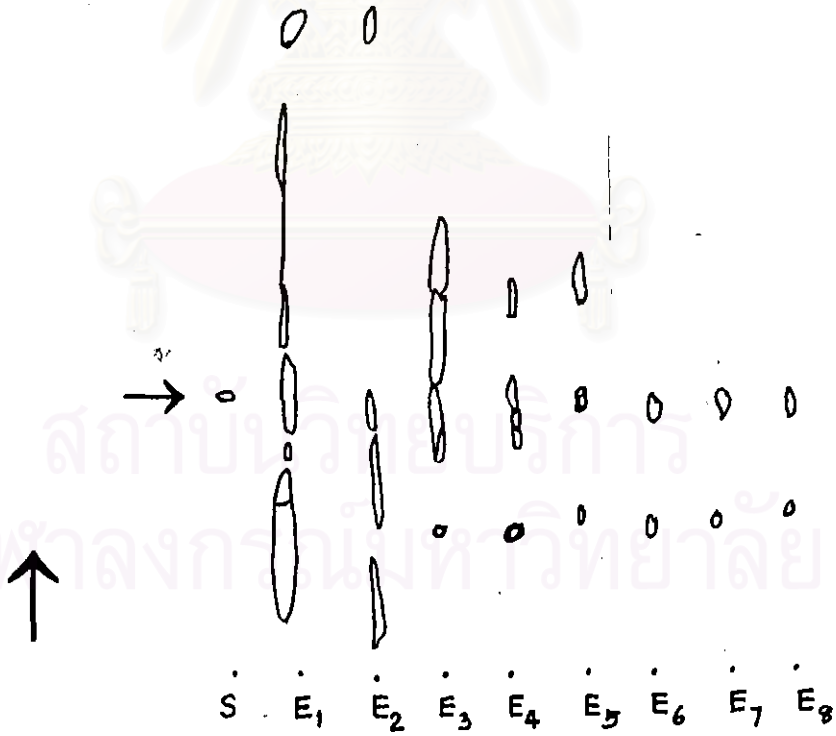
E_4 = สารสกัดเอทธิลอะซิเตตลำดับส่วนที่ 6-8

E_5 = สารสกัดเอทธิลอะซิเตตลำดับส่วนที่ 9-10

E_6 = สารสกัดเอทธิลอะซิเตตลำดับส่วนที่ 11-13

E_7 = สารสกัดเอทธิลอะซิเตตลำดับส่วนที่ 14-17

E_8 = สารสกัดเอทธิลอะซิเตตลำดับส่วนที่ 18-36



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลการแยกสารสกัดเมทธานอล-โทโลอีน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ข้อ 4.1.4.2)

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	สีของสารละลาย	ลักษณะสารหลังระเหย	น้ำหนักสาร
โทลูอีน	1-40	ใสไม่มีสี	ใสไม่มีสี	0.0023
2% เมทธานอล-โทลูอีน	41-101	เหลืองเข้ม	สารเหนียวสีเขียวเข้ม	2.12
2% เมทธานอล-โทลูอีน	102-159	เหลือง	สารเหนียวสีเขียวเข้ม	1.08
3%-5% เมทธานอล-โทลูอีน	160-334	เหลืองอ่อน	ของแข็งกากฟองสีเขียว	1.13
6% เมทธานอล-โทลูอีน	335-392	เหลืองจาง	ของแข็งกากฟองสีเขียวอ่อน	0.63
7%-9% เมทธานอล-โทลูอีน	392-522	เหลืองใส	ของแข็งสีน้ำตาลออกเขียว	1.44

จากการแยกสารโดยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีตามวิธี 3.3.2 พบว่าสารสกัดลำดับส่วนที่ 160-334 มีพีคของอะซาไดแรคทินที่ชัดเจน และปริมาณอะซาไดแรคทินมากกว่าที่ลำดับส่วนอื่น ๆคือ 15.12 %อะซาไดแรคทิน คิดเป็น 0.21% ของน้ำหนักสะเดาเริ่มต้น, 16.14% ของน้ำหนักสารสกัด จึงนำลำดับส่วนนี้มาทำอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์ต่อไป

4.1.5. การแยกสารให้บริสุทธิ์โดยวิธี HPLC (High Perfermance Liquid Chromatography)

การแยกสารให้บริสุทธิ์นี้ จะนำส่วนที่เก็บสารจากการเก็บลำดับส่วนจากคอลัมน์ด้วยวิธีที่พบว่ามีอะซาไดแรคทิน(ลำดับส่วนที่ 160-334) มาเก็บลำดับส่วน จากเครื่อง HPLC 2 ครั้ง เนื่องจากการแยกอะซาไดแรคทินที่บริสุทธิ์เพียงครั้งเดียวไม่สามารถแยกอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์ได้เนื่องจากมีสารอื่นที่มีระยะเวลาในการออกจากเครื่อง (retention time) ใกล้เคียงกันมาก

4.1.5.1. การเก็บลำดับส่วนโดยวิธี HPLC ครั้งที่ 1

นำสารที่เก็บลำดับส่วนจากคอลัมน์ด้วยวิธี 4.1.4.2 (ลำดับส่วนที่ 160-334) ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งกากฟองสีเขียวมา 0.2 กรัม ละลายด้วยเมทธานอล 5.0 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร แล้วผ่าน Sep-pak C-18 Cartridge ฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC (preparative column) แล้วเก็บลำดับส่วนโดยวิธี HPLC สภาวะที่ใช้เป็นดังข้อ 3.3.8 เก็บลำดับส่วนละ 20 มิลลิลิตร ต่อหลอดทดลองการทดลองนี้จะเก็บลำดับส่วนสารโดยวิธี HPLC 2 ครั้ง เนื่องจากการแยกอะชาไดแรคทินที่บริสุทธิ์เพียงครั้งเดียวไม่สามารถแยกอะชาไดแรคทินให้บริสุทธิ์ได้เนื่องจากมีสารอื่นที่มีระยะเวลาในการออกจากเครื่อง [retention time]ใกล้เคียงกันมาก ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงผลการแยกสารลำดับส่วนที่ 160-334 (ข้อ 4.1.4.2)โดยวิธี HPLC

ลำดับส่วนที่	สีของสารละลาย	ลักษณะสารหลังระเหย	น้ำหนักสาร
1-2	ใส	ใส	-
3-11	เหลืองเข้ม	เหนียวสีเหลืองเข้ม	0.2540
12-20	เหลืองอ่อน	สารเหนียวสีเหลือง	0.0263
21-38	ใส	ผงสีเหลือง	0.0188
39-58	ใส	ผงสีเหลืองนวล	0.0181
59-71	ใส	ผงสีเหลือง	0.0042
72-146	ใส	ใส	0.0021

จากการแยกลำดับส่วนของสารข้อ4.2.4.2 (ส่วนที่ 160-334) โดยวิธี HPLC (Preparative column) นำแต่ละส่วนที่เก็บ มาหาอะซาไดแรคทิน โดยเทียบกับสารมาตรฐานอะซาไดแรคทิน พบว่า ลำดับส่วนที่ 39-58 มีพีคของอะซาไดแรคทินเอ (ที่ระยะเวลาที่สารออกที่ 10) จึงนำลำดับส่วนที่ 39-58 ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ความดันสูญญากาศที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส สารที่ได้มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองนวล น้ำหนัก 0.0181 กรัม คิดเป็น 0.019 %ของน้ำหนักสะเดาเริ่มต้น, 9.05% ของน้ำหนักสารสกัด และหาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามวิธีข้อ 3.3.5-3.3.7 ได้อะซาไดแรคทิน 75.70 %

จากการทำอะซาไดแรคทินให้บริสุทธิ์ โดยการเก็บสารละลายลำดับส่วนจากเครื่อง HPLC พบว่าการเก็บลำดับส่วนในครั้งแรก สารยังไม่บริสุทธิ์พอ โดยดูจากโครมาโทแกรม จึงต้องนำสารที่ได้มาเก็บลำดับส่วนอีกครั้งหนึ่ง เพื่อทำให้สารบริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

4.1.5.2 การเก็บลำดับส่วนโดย HPLC ครั้งที่ 2

นำสาร ซึ่งได้จากการทดลองตามวิธีข้อ4.1.5.1 (ส่วนที่ 39-58) ซึ่งมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองนวล หนัก 0.05 กรัม ละลายด้วยเมทธานอล 5.0 มิลลิลิตร แล้วฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC (Preparative Column) โดยใช้สภาวะของเครื่องตามข้อ 3.3.8 เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เป็นลำดับส่วน 20 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง แล้วนำสารละลายในแต่ละขวดมาวิเคราะห์หาอะซาไดแรคทิน ตามวิธีข้อ 3.3.5-3.3.7 ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 7 และ 8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงผลการแยกลำดับส่วนที่ 39-58 (4.1.5.1) โดยวิธี HPLC

ลำดับส่วนที่	สีของสารละลาย	ลักษณะสารหลังระเหย	น้ำหนักสาร
1	ใส	ใส	-
2	เหลืองอ่อน	ผงสีเหลืองนวล	0.0037
3-7	ใส	ผงสีขาว	0.0009
8-10	ใส	ผงสีขาว	0.0018
11-47	ใส	ผงสีขาว	0.0033
48-52	ใส	ผงสีขาว	0.0082
53-78	ใส	ผงสีขาว	0.0087
79-84	ใส	ผงสีขาว	0.0106
85-91	ใส	ผงสีขาว	0.0034
92-173	ใส	ผงสีขาว	0.0002

ตารางที่ 8 แสดงการวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์โดย HPLC

ลำดับส่วนที่	ระยะเวลาที่สารบริสุทธิ์ออกจากเครื่อง (Retention time)
48-52	5.1 นาที
79-84	10.0 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเก็บรวมสารละลาย จะรวบรวมจากพีคของโครมาโทแกรมที่มีลักษณะคล้ายกัน แล้วจึงระเหยเอาตัวทำละลายออก ที่ความดันสูญญากาศ อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่ามีพีคของสารบริสุทธิ์อยู่ 2 ลำดับส่วนคือ ลำดับส่วนที่ 48-52และ ลำดับส่วนที่ 79-84 นำสารทั้ง 2 ลำดับส่วนที่ได้ มาวิเคราะห์เพื่อหาอะซาไดแรคทินเอ โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทิน เอ เปรียบเทียบกับลำดับส่วนทั้ง 2 เพื่อเทียบระยะเวลาที่สารออกจากเครื่อง HPLC กับระยะเวลาที่อะซาไดแรคทินมาตรฐานออกจากเครื่อง จากพีคของโครมาโทแกรมของ HPLC พบว่า ลำดับส่วนที่ 79-84 น่าจะเป็นสารอะซาไดแรคทิน เนื่องจากมีระยะเวลาที่สารออกจากเครื่อง HPLC (Retention time) เดียวกับอะซาไดแรคทินมาตรฐานคือที่ 10 นาที ดังภาพที่ 2 (ภาคผนวก) และสารสกัดหลังจากระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้ว มีลักษณะเป็นผงสีขาวหนัก 0.0106 กรัม คิดเป็น 4.0 $X10^{-3}$ % ของน้ำหนักสะเดาเริ่มต้น, และ 21.2% ของน้ำหนักสารสกัด เมื่อทดสอบการหาปริมาณอะซาไดแรคทิน ตามการทดลองที่ 3.3.5-3.3.7 ได้อะซาไดแรคทิน 95.43 %

นอกจากนี้ยังมีลำดับส่วนที่น่าสนใจอีก 1 ลำดับส่วน คือ ลำดับส่วนที่ 48-52 มีระยะเวลาที่สารออกจากเครื่อง HPLC เป็น 5.1 ดังภาพที่ 2 (ภาคผนวก) ลำดับส่วนนี้ มีพีคของโครมาโทแกรมที่บริสุทธิ์ จึงนำไปหาโครงสร้างโดยวิธี NMR (Nuclear Magnetic Resenance)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

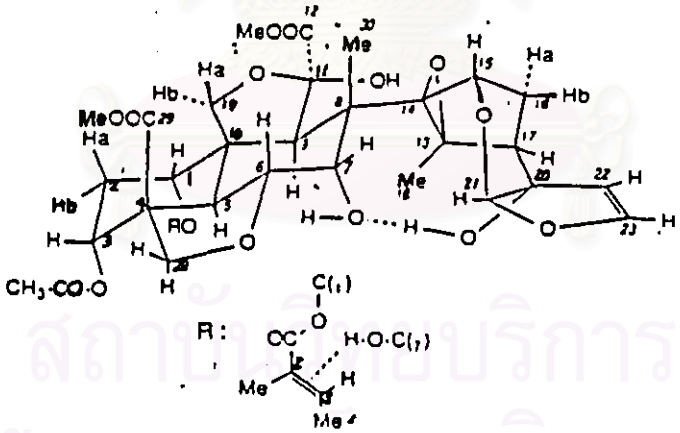
ผลการวิเคราะห์โครงสร้างอะซาไดแรคทินด้วยเครื่อง NMR แสดงโดยการเปรียบเทียบระหว่างอะซาไดแรคทิน(Bilton et al.,1987) กับสารที่ได้จากการเก็บลำดับส่วนที่ 79-84 โดยHPLCซึ่งปรากฏที่ retention time =10.3 นาทีแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้าง อะซาไดแรคทินโดย NMR

ตำแหน่ง H-atom	อะซาไดแรคทินเอ	สารในลำดับส่วนที่ 79-84
1	4.78(dd,3.4,2.7)	4.76-4.79(m)
2a	2.36(ddd,16.8,2.7,2.4)	2.37(t)
2b	2.20(ddd,16.8,3.4,3.0)	2.25(t)
3	5.49(dd,3.0,2.4)	5.51(dd)
5	3.34(d,12.4)	3.34(s)
6	4.57(dd,12.4,3.0)	4.53(dd)
7	4.68(d,3.0)	4.68(d)
9	3.28(s)	3.32(s)
15	4.64(d,3.7)	4.62(t)
16a	1.69(ddd,13.4,5.4,3.7)	1.72(ddd)
16b	1.28(d,13.4)	1.285(d)
17	2.32(d,5.4)	2.33(d)
18	1.97(s)	1.99(s)
19a	3.74(d,9.7)	3.76(d)
19b	4.14(d,9.7)	4.15(d)
21	5.62(s,)	5.645(s)
22	5.00(d,3.0)	5.05(d)
23	6.41(d,3.0)	6.45(d)
28a	3.76(d,9.1)	3.76(d)
28b	4.03(d,9.1)	4.08(d)
30	1.73(s)	1.75(s)

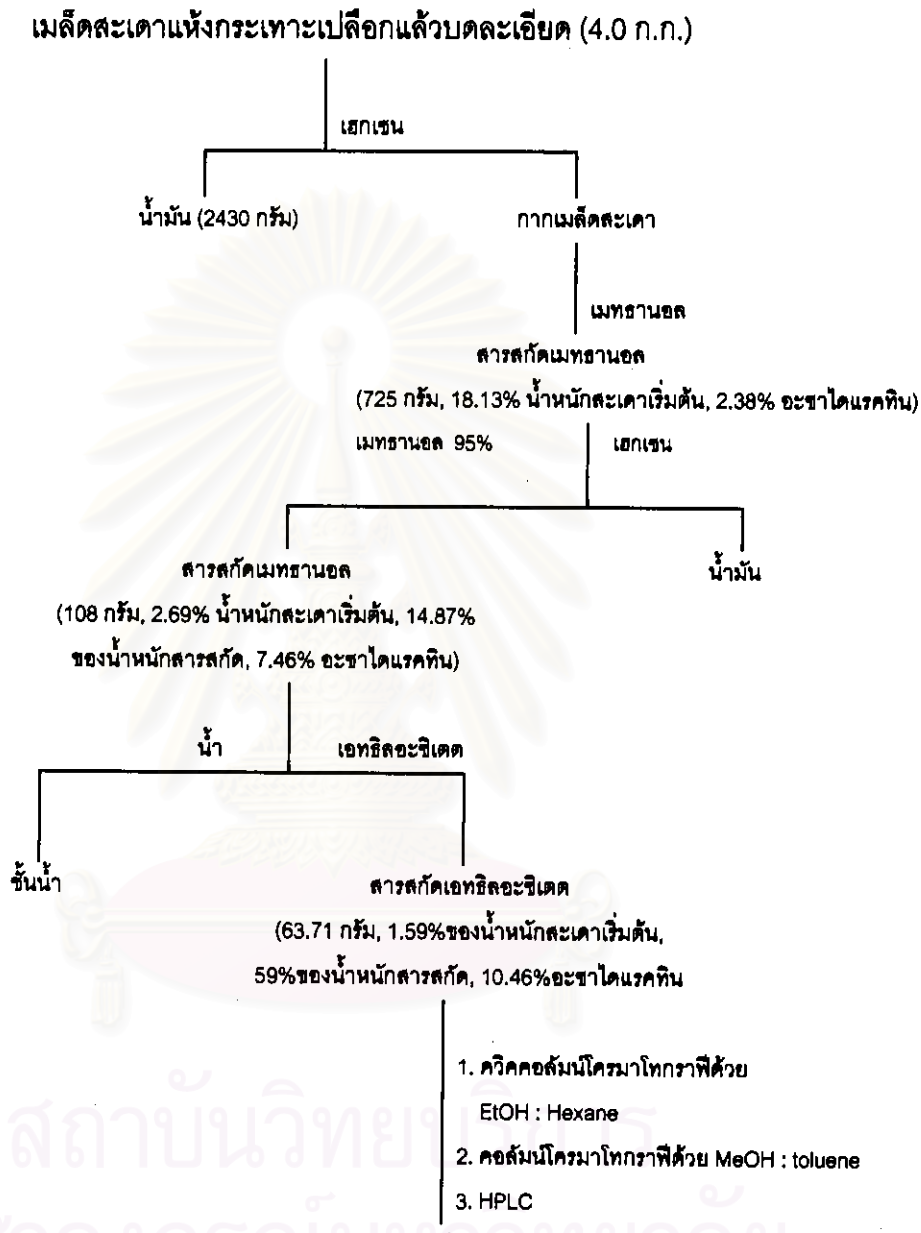
(ตารางที่ 9 ต่อ)

ตำแหน่งH-atom	อะซาไดแรคทินเอ	สารในลำดับที่ 79-84
12-Ome	3.65(s)	3.665(s)
29-Ome	3.77(s)	3.78(s)
3-Oac	1.91(s)	1.915(s)
3'	6.91(qq,7.0,1.3)	6.93(qq)
4'-Me	1.75(dq,7.0,1.0)	1.77(d)
5'-Me	1.83(dq,1.3,1.0)	1.79(d)
7'-OH	2.73(br,s)	2.77(br,s)
11-OH	4.94(s)	5.015(s)
20-OH	2.75(br,s)	2.815(br,s)



โครงสร้างอะซาไดแรคทินเอ (Bilton, et al .,1987)

แผนภาพที่ 1 การสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดา วิธีที่ 1



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การสกัดแยกอะซาไดแรคทินออกจากเมล็ดสะเดา วิธีที่ 2

4.2.1 การสกัดด้วยตัวทำละลายร่วม (Co-extraction)

ชั่งเมล็ดสะเดาบดที่เตรียมแล้ว หนัก 603 กรัม มาสกัดด้วยเอทธานอลและเฮกเซน แล้วให้ความร้อนโดยแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง นำสารละลายที่สกัดได้มากรอง ได้สารละลายสีเขียวออกน้ำตาล และทดสอบหาปริมาณอะซาไดแรคทินตามวิธีข้อ 3.3.5-3.3.7 ได้ 0.7 เปอร์เซ็นต์ สารละลายที่สกัดได้มากลั่นไล่เฮกเซน-เอทธานอลออกจนเกือบหมด โดยวิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส สุดท้ายได้สารสกัดด้วยเฮกเซน-เอทธานอล มีลักษณะสีน้ำตาลเหนียวข้น หนัก 156 กรัม คิดเป็น 25.87 % ของน้ำหนักสารสกัด

นำสารสกัดข้างต้น น้ำหนัก 156 กรัม มาสกัดด้วยเฮกเซน ได้ตะกอนของแข็งสีขาวกระจายในชั้นเฮกเซน กรองเอาแต่ตะกอน ได้ตะกอนของแข็งสีขาวหนัก 32.13 กรัม คิดเป็น 5.33 % ของน้ำหนักเมล็ดสะเดาเริ่มต้น และ 20.60 % นำตะกอนของแข็งที่สกัดได้มาทดสอบหาปริมาณอะซาไดแรคทินตามวิธีข้อ 3.3.5-3.3.7 มีอะซาไดแรคทิน 14.80 %

4.2.2 การสกัดแยกสารไม่บริสุทธิ์ออกจากสารสกัดสะเดา โดยอาศัยความสมดุลย์ของการกระจายตัวของตัวทำละลายระหว่างเฟส

ละลายของแข็งที่สกัดได้ข้างต้น 15 กรัม ด้วยเมทธานอล 95% ทำการสกัดในกรวยแยก(separatory funnel) ด้วยเฮกเซน 4 ครั้ง นำขั้นสารละลายเมทธานอลมากลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดเมทธานอลมีสีเขียวเข้มออกน้ำตาล หนัก 10.7 กรัม คิดเป็น 3.80 % ของน้ำหนักเมล็ดสะเดาเริ่มต้น และ 71.33 % ของน้ำหนักสารสกัด มีอะซาไดแรคทิน 23.67%

สารสกัดสะเดาเมทธานอลที่สกัดได้ข้างต้น 15 กรัม ละลายด้วยเอทธิลอะซิเตต สกัดในกรวยแยก สกัดด้วยน้ำ 4 ครั้ง นำชั้นเอทธิลอะซิเตตมากำจัดน้ำออก โดยเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส แล้วระเหยเอทธิลอะซิเตตเป็นของแข็งกากฟ่องสีเขียวอ่อนหนัก 9.5 กรัม คิดเป็น 2.41% ของน้ำหนักเมล็ดสะเดาเริ่มต้น และ 63.33 % ของน้ำหนักสารสกัด แล้ววิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทินได้ 27.14 %

ตารางที่ 10 แสดงผลการสกัดเมล็ดสะเดาวิธีที่ 2

สารที่ใช้สกัด	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	ลักษณะสาร	น้ำหนักที่ได้ (กรัม)	%น้ำหนักแห้ง	%อะซาไดแรคทิน
เฮกเซน-เอทธานอล	603	เหนียวข้น สีน้ำตาล	156	25.87	0.70
เฮกเซน	156	ของแข็ง สีขาว	32.13	5.33	14.80
เมทธานอล-เฮกเซน	15	เหนียว สีเขียวเข้ม	10.7	3.80	23.97
เอทธิลอะซิเตต-น้ำ	15	กากฟอง สีเขียว	9.5	2.41	27.14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.3 การแยกสิ่งสกปรกออกจากสารสกัดสะเดาในระบบคอลัมน์

ในการแยกสิ่งสกปรกออกจากสารสกัดสะเดาจะผ่านคอลัมน์ ซึ่งมีเซฟาเดกซ์ (Sephadex LH-20) เป็นสารดูดซับในคอลัมน์โครมาโทกราฟี และทำการทดลองตามวิธี 3.5.4 โดยชั่งสารสกัดสะเดาที่ได้จากการสกัดตามวิธีข้อ 4.2.2 ข้างต้น 5.0 กรัม ละลายด้วยสารละลายตัวพาระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทธานอลในอัตราส่วน 50 % ในปริมาณน้อยที่สุด บรรจุสารสกัดนี้ลงในคอลัมน์ ให้อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วเก็บลำดับส่วน ลำดับส่วนละ 15 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าในช่วงขะคอลัมน์จะสามารถแยกแถบสีของสารได้เป็น 4 แถบจากล่างขึ้นบนคอลัมน์ คือ สีดำ สีเขียว สีเหลือง และใสไม่มีสี หลังจากที่เก็บลำดับส่วนแล้ว ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงการเก็บลำดับส่วนของสารโดยใช้เซฟาเดกซ์เป็นตัวดูดซับจากน้ำหนักสารเริ่มต้น 5.0 กรัม

ลำดับส่วนที่	ลักษณะสารก่อนระเหย	ลักษณะสารหลังระเหย	น้ำหนักสาร (กรัม)	%อะซาไดแรคทิน
1-3	เหลือง	เหลืองเข้มออกดำ	1.0115	-
4-8	ดำ	ดำออกน้ำตาล	2.3113	-
9-12	เขียว	เขียว	0.0490	-
13-18	เหลือง	เหลืองเข้ม	0.1078	27.48
19-114	ใส	เหลืองใส	0.0194	39.87
115-212	ใส	เหลืองใส	0.0023	-

จากลำดับส่วนของสารละลายที่เก็บได้ในแต่ละหลอด นำสารละลายในแต่ละหลอดมาวิเคราะห์หาอะซาไดแรคทิน โดยเครื่อง HPLC (Analytical Column) โดยการเก็บรวมลำดับส่วนจากโครมาโทแกรมที่มีลักษณะคล้ายกัน และแถบสีที่แยกออก จากผลการทดลองพบว่าลำดับส่วนที่ 13-18 และ 19-114 มีสารอะซาไดแรคทินอยู่ แถบสีเขียวซึ่งเป็นลำดับส่วนที่ 6-11 ซึ่งเป็นแถบของคลอโรฟิลไม่มีอะซาไดแรคทินอยู่ ส่วนแถบอื่น ๆ ก็ไม่ปรากฏว่ามีอะซาไดแรคทินอยู่ ระเหยตัวทำละลายในแต่ละส่วนอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ที่ความดันสูญญากาศ แล้วนำลำดับส่วนของสารละลายที่ 13-18 และ19-114 มาวิเคราะห์หาปริมาณอะซาไดแรคทิน จากผลการทดลองสารละลายลำดับส่วนที่ 13-18 มีปริมาณอะซาไดแรคทิน 27.48 % คิดเป็น 0.005%ของน้ำหนักเมล็ดสะเดาเริ่มต้น น้ำหนัก 0.1078 กรัม และ 2.16% ของน้ำหนักสารสกัด และลำดับส่วนที่ 19-114 มีปริมาณอะซาไดแรคทิน 39.87 % คิดเป็น 0.01% ของน้ำหนักเมล็ดสะเดาเริ่มต้น น้ำหนัก 0.0194 กรัม และ 0.388 % ของน้ำหนักสารสกัด

4.2.4 การแยกสารที่บริสุทธิ์

นำสารจากการทดลองข้อ 3.1.3 ซึ่งได้จากการเก็บลำดับส่วนของสารสกัดในลำดับส่วนที่ 13-18 และ 19-114 มารวมกันแล้ว ระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันสูญญากาศที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส นำสารที่ได้ 0.2 กรัม (ที่ได้จากการเก็บลำดับส่วนในเซฟาเดกซ์คอลัมน์ 2 ครั้ง) ละลายด้วยเมทธานอล 5.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแยกด้วยเครื่อง HPLC สภาวะที่ใช้เป็นดังข้อ 3.3.8 ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงการแยกสารให้บริสุทธิ์ โดยวิธี เก็บลำดับส่วนจากเครื่อง HPLC ซึ่งมีสารละลายอะซิโตไนตริล 30% เป็นตัวพา

ลำดับส่วนที่	สีของสารละลาย	ลักษณะของสารหลังระเหย	น้ำหนักของสาร (กรัม)
1	ใส	ใส	-
2-3	เหลืองอ่อน	ผงสีเหลืองนวล	0.0411
4-53	ใส	ผงสีขาว	0.0192
54-60	ใส	ผงสีขาว	0.0226
61-75	ใส	ผงสีขาว	0.0202
76	ใส	ผงสีขาว	0.0113
77-84	ใส	ผงสีขาว	0.0061
85-89	ใส	ผงสีขาว	0.0043
90-93	ใส	ผงสีขาว	0.0024
94	ใส	ผงสีขาว	0.0016
95-123	ใส	ผงสีขาว	0.0019
124-176	ใส	ใส	0.0007

จากผลการแยกสารให้บริสุทธิ์ โดยการเก็บลำดับส่วนจากเครื่อง HPLC พบว่ามีสารที่น่าสนใจอยู่ 2 ลำดับส่วน คือ ลำดับส่วนที่ 54-60 และ 85-89 สารที่เก็บลำดับส่วนเหล่านี้ เมื่อนำมาวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์โดยเครื่อง HPLC (analytical column) โดยใช้สารละลายตัวพาเป็นอะซิโตไนตริล 40% โดยใช้สภาวะ ดังวิธีข้อ 3.3.4 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงการวิเคราะห์หาสารบริสุทธิ์ โดย HPLC

ลำดับส่วนที่	ระยะเวลาที่สารบริสุทธิ์ออกจากเครื่อง (Retention time)
54-60	10.3 นาที
85-89	13.9 นาที

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานอะซาไดแรคทินเอ เข้าเครื่อง HPLC พบว่า ระยะเวลาที่สารออกจากเครื่อง (Retention time) เป็น 10.3 นาที (ภาพที่ 20 ของภาคผนวก) ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกับสารบริสุทธิ์ที่ผ่านการเก็บลำดับส่วนแล้ว ดังนั้น สารที่เก็บลำดับส่วนจากเครื่อง HPLC ดังการทดลองที่ 4.2.4 ในลำดับส่วนที่ 54-60 น่าจะเป็นสารอะซาไดแรคทินเอ นำสารที่คาดว่าน่าจะเป็นสารอะซาไดแรคทินเอมาวิเคราะห์หาปริมาณ อะซาไดแรคทินเอ โดยวิธีตามการทดลองที่ 3.3.5-3.3.7 หาน้ำหนักของสารได้ 0.0226 กรัม คิดเป็น11.3 % ของน้ำหนักสารสกัด 6.9×10^{-3} % ของน้ำหนักเมล็ดสะเดาเริ่มต้น และได้อะซาไดแรคทิน 96.49 %

ส่วนสารที่เก็บลำดับส่วนจากเครื่อง HPLC ดังการทดลองที่ 4.2.4 ที่น่าสนใจอีก 1 ลำดับส่วน คือ ลำดับส่วนที่ 85-89 ล้วนแต่เป็นสารที่บริสุทธิ์ สังเกตจากโครมาโทแกรมที่ออกจากเครื่อง HPLC ดังภาพที่ 21 (ภาคผนวก) พบว่า สารนี้ไม่ใช่สารอะซาไดแรคทินเอ เนื่องจากระยะเวลาที่สารนี้ออกจากเครื่อง HPLC (Retention time) ไม่ตรงกับระยะเวลาที่สารละลายอะซาไดแรคทิน เอ ออกจากเครื่อง (Retention time =10) แต่สารลำดับส่วนก็เป็นสารบริสุทธิ์ ซึ่งได้เป็นผงสีขาวเช่นกัน จึงน่าจะมีการพิสูจน์ว่าเป็นสารชนิดใดต่อไป

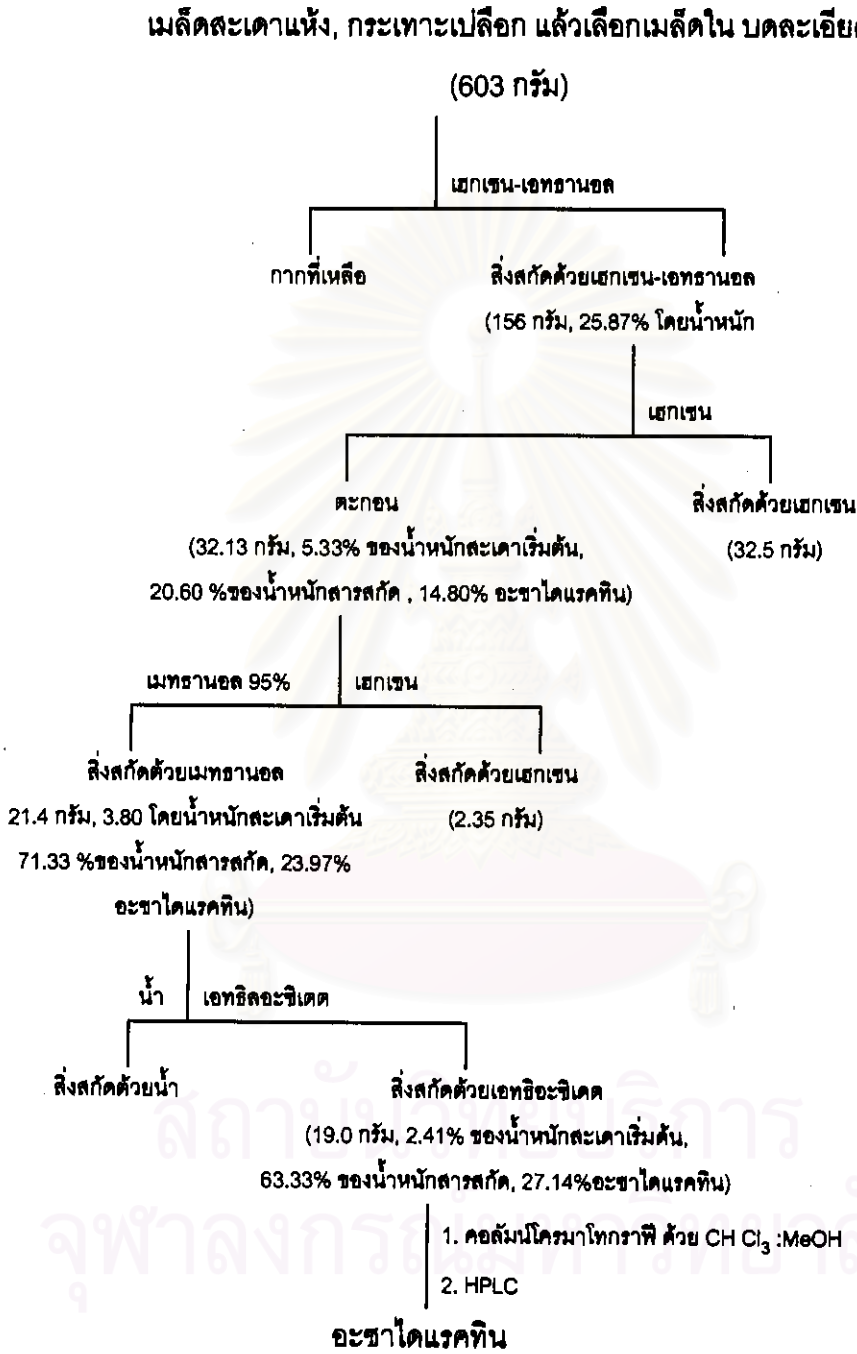
4.2.5 การยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

การยืนยันโครงสร้างที่แน่นอนของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการสกัดสารสกัดสะเดา สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ หาโครงสร้างโดยหลักการทางสเปคโตรสโคปี (Spectroscopy) โดยวิธี NMR (Nuclear Magnetic Resonance) การทดลองโดยการนำสารที่เก็บลำดับส่วนจากการทดลองที่ 4.2.4 ในลำดับส่วนที่ 54-60(ภาพที่ 20ของภาคผนวก) และ 85-89(ภาพที่ 21ของภาคผนวก) มาวิเคราะห์หาโครงสร้างทาง H-NMR

ผลการวิเคราะห์โครงสร้างอะซาไดแรคทินด้วยเครื่อง NMR แสดงโดยการเปรียบเทียบระหว่างอะซาไดแรคทิน(Bilton et al.,1987) กับสารที่ได้จากการเก็บลำดับส่วนที่ 54-60 โดยHPLC ซึ่งปรากฏที่ retention time =10.3 นาทีแสดงดังตารางที่ 9 และภาพที่ 22-30ของภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>แผนภาพที่</u> 2 ขั้นตอนการสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดา วิธีที่ 2



4.3. การศึกษาปฏิกิริยาของอะซาไดแรคทินตัวหนึ่งกับเอนไซม์ไลเปส

การศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสซึ่งใช้ 2 ชนิดคือ ไลเปส (Candida lipase) และไลเปสไรโซพัส (Rhizopus lipase) โดยจะให้ไลเปสแต่ละชนิดทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับอะซาไดแรคทินตัวหนึ่ง ซึ่งมี retention time = 14 (HPLC) เพื่อศึกษาว่าผลผลิตที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงไปจากอะซาไดแรคทินที่เป็นสารเริ่มต้นหรือไม่

การทดลองได้มีการเตรียมสารละลายเอนไซม์แต่ละชนิด และเตรียมสารละลายอะซาไดแรคทินดังการทดลองตามวิธีข้อ 3.6.1

4.3.1 การทดลอง

งานวิจัยเพื่อการศึกษาปฏิกิริยาของไลเพสนี้ มีการดำเนินการทดลอง ดังข้อ 3.6.1 โดยเตรียมสารละลายดังนี้

4.3.1.1. สารละลายอะซาไดแรคทินกับ blank (ไม่ใช้เอนไซม์)

นำสารละลายอะซาไดแรคทิน(ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร ในเอทธานอล 25% :ซึ่งได้จากการเตรียมในข้อ 3.6.1.5) 50 ไมโครลิตร ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์โปตัสเซียมฟอสเฟต pH 7.7, 50 มิลลิโมลลาร์ 0.55 มิลลิลิตร เติมน้ำ 10 ไมโครลิตร แทนไลเปสไรโซพัส เป็นสารละลายblankสำหรับไลเปส ไรโซพัส

สำหรับสารละลาย blank ที่ใช้เปรียบเทียบในไลเปส แคนดิดา เตรียมได้ในทำนองเดียวกับวิธีข้างต้น แต่เปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์โปตัสเซียมฟอสเฟต pH 7.2 , 50 มิลลิโมลาร์ 0.55 มิลลิลิตร แทนบัฟเฟอร์ pH7.7

4.3.1.2 สารละลายอะซาไดแรคทินกับไลเปส ไรโซพัส

ละลายสารละลายอะซาไดแรคทินที่เตรียมได้จากการทดลอง 3.6.1.5 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์โปตัสเซียมฟอสเฟต pH 7.7 50 มิลลิโมลาร์ , 0.55 มิลลิลิตร เติมไลเปส ไรโซพัสที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1.2 10 ไมโครลิตร แล้วบ่มเอนไซม์ทันที

4.3.1.3 สารละลายอะซาไดแรคทินกับไลเปส แคนดิดา

ละลายสารละลายอะซาไดแรคทินที่เตรียมได้จากการทดลอง 3.6.1.5 ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์โปตัสเซียมฟอสเฟต pH 7.2 50 มิลลิโมลาร์ , ปริมาณ 0.55 มิลลิลิตร เติมไลเปส แคนดิดาที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.1.4 10 ไมโครลิตร แล้วบ่มเอนไซม์ทันที

4.3.1.4 การบ่มเอนไซม์

นำสารละลายอะซาไดแรคทินกับ blank (4.3.1.1) สารละลายอะซาไดแรคทินกับไลเปส ไรโซพัส (4.3.1.2) สารละลายอะซาไดแรคทินกับไลเปส แคนดิดา (4.3.1.3) มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ช.ม. , 4 ช.ม. และ 24 ช.ม. แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยเอทธิลอะซิเตตอีก 3 ครั้ง นำสารสกัดเอทธิลอะซิเตตที่ระเหยตัวทำละลายแล้วมาละลายด้วยอะซิโตไนตริลซึ่งเป็นสารละลายตัวพาในเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะการทดลองเครื่องดังในข้อ 3.3.5.1 ผลการทดลองเป็นดังรูป 4-12(ภาคผนวก) และตารางที่ 14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 แสดงการเปลี่ยนแปลงจากโครมาโทแกรม HPLC เมื่อบ่มไลเปสในสารละลายอะซาไดแรคทิน

ระยะเวลาการบ่ม	อะซาไดแรคทินที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์		
	ไม่มีเอนไซม์	ไลเปส ไรโซพัส	ไลเปส แคนดิดา
1 ช.ม.	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง	ไม่เปลี่ยนแปลง
4 ช.ม.	ไม่เปลี่ยนแปลง	ที่ R.T = 8.1 เป็นพีคที่เพิ่มจากเดิม	ที่ R.T = 8.4 เป็นพีคเล็กเพิ่มจากเดิม
24 ช.ม.	ที่ R.T = 7.8 เป็นพีคที่เพิ่มจากเดิม	ที่ R.T = 8.3 เป็นพีคที่เพิ่มจากเดิมและพื้นที่ใต้พีคเพิ่มขึ้นจากการบ่ม 4 ช.ม	ที่ R.T = 8.3 เป็นพีคที่เพิ่มจากเดิมและพื้นที่ใต้พีคเพิ่มขึ้นจากการบ่ม 4 ช.ม.

หมายเหตุ : R.T. = retention time จากโครมาโทแกรม HPLC

จากตารางที่ 14 (ภาพที่31-39) แสดงให้เห็นว่าสารละลายอะซาไดแรคทินที่ไม่มีเอนไซม์ (blank) เมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโดยพิจารณาจากพีคโครมาโทแกรม HPLC พบว่าในการบ่ม 1 ชั่วโมง(ภาพที่31ของภาคผนวก) มีพีคอะซาไดแรคทิน (retention time = 14.2) และ ในการบ่ม 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 32ของภาคผนวก) (มีพีคอะซาไดแรคทิน (retention time =14.3) และพื้นที่ใต้พีคเป็น 282,105 และ 298,296 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าบ่มของblankในชั่วโมงที่ 1 และ 4 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ในชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่ 33ของภาคผนวก) พบว่ามีพีคอะซาไดแรคทินที่ retention time = 13.8 ซึ่งประมาณ 14 และมีพื้นที่ใต้พีคเป็น 260,719 และมีพีคที่ retention time = 7.8 (ประมาณ 8) เพิ่มอีก 1 พีค ซึ่งมีพื้นที่ใต้พีคเป็น 762,22 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า น่าจะมีสารใหม่เกิดขึ้น

การทำปฏิกิริยาอะซาไดแรคทินด้วย ไลเปส ไรโซพัส เมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงจากโครมาโทแกรม HPLC พบว่า ในการบ่ม 1 ช.ม. แรก (ภาพที่ 34 ของภาคผนวก)มีพีคอะซาไดแรคทินที่ retention time=14 เพียงพีคเดียว และพื้นที่ใต้พีค=373,009 แสดงว่าการบ่ม 1 ช.ม. แรก นี้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อบ่มสารละลายในชั่วโมงที่ 4 (ภาคที่ 35 ของภาคผนวก)พบว่ามีพีคอะซาไดแรคทินที่ retention time = 14.3 (ประมาณ 14) ซึ่งมีพื้นที่ใต้พีค= 347,555 และมีพีคเพิ่มมาอีก 1 พีค ที่ retention time = 8.1 (ประมาณ 8) มีพื้นที่ใต้พีค = 79,246 ซึ่งแสดงว่าน่าจะมีสารใหม่เกิดขึ้น เมื่อบ่มเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 24 (ภาพที่36 ของภาคผนวก) มีพีคอะซาไดแรคทินที่มี retention time = 14.7 (ประมาณ 14) มีพื้นที่ใต้พีค=356,533 และมีพีคที่ retention time = 8.3 (ประมาณ8) เกิดเพิ่มขึ้นอีก 1 พีค พื้นที่ใต้พีค=214,085 แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งอาจเป็นสารเดิมจากการบ่มเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 4 และพื้นที่ใต้พีคของสารที่เกิดขึ้นนี้มีเพิ่มมากกว่าเดิมที่บ่มในชั่วโมงที่ 4

การทำปฏิกิริยาอะซาไดแรคทินด้วย ไลเปส แคนดิดา เมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงจากโครมาโทแกรม HPLC พบว่า ในการบ่ม 1 ช.ม. แรก (ภาพที่ 37 ของภาคผนวก) มีพีคอะซาไดแรคทินที่ retention time= 14.3 เพียงพีคเดียว และพื้นที่ใต้พีค = 304,715 แสดงว่าการบ่ม 1 ช.ม. แรก นี้ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อบ่มสารละลายในชั่วโมงที่ 4 (ภาพที่ 38 ของภาคผนวก) พบว่ามีพีคอะซาไดแรคทินที่ retention time= 14.5 (ประมาณ 14) ซึ่งมีพื้นที่ใต้พีค = 263,430 และมีพีคเพิ่มมาอีก 1 พีค ที่ retention time = 8.1 (ประมาณ 8) มีพื้นที่ใต้พีค = 6,936 ซึ่งแสดงว่าน่าจะมีสารใหม่เกิดขึ้นบ้าง เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 39 ของภาคผนวก) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงโดยมีพีคอะซาไดแรคทินที่ retention time = 14.4 (ประมาณ 14) มีพื้นที่ใต้พีค = 279,527 และมีพีคเพิ่มที่ retention time = 8.3 (ประมาณ 8) มีพื้นที่ใต้พีค = 38,951 ซึ่งอาจเป็นสารเดิมจากการบ่มในชั่วโมงที่ 4 และเมื่อเวลาเพิ่มเป็น 24 ชั่วโมง สารนี้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น

จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงสารใหม่ของสารอะซาไดแรคทิน สามารถเกิดได้ทั้งในสภาวะที่มีเอนไซม์และไม่มีเอนไซม์ จึงวิเคราะห์ว่า สารใหม่ที่เกิดขึ้นอาจเกิดการสลายตัวของอะซาไดแรคทินเป็นสารใหม่อาจเนื่องจากมีน้ำเป็นตัวทำละลายที่สลายตัวได้ง่าย และไลเปสอาจมีผลในการเปลี่ยนแปลงสารเนื่องจากสังเกตจากในcontrol.ในการบ่มชั่วโมง ที่ 4 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อมีเอนไซม์การบ่มในชั่วโมง ที่ 4 เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารใหม่ แต่ไลเปส ไรโซพัสอาจเป็นเอนไซม์ที่ดีกว่าไลเปส แคนดิดา เนื่องจากพีคของไรโซพัส ไลเปสมีการเปลี่ยนแปลงที่มากกว่าโดยดูจากพื้นที่ใต้พีคที่เกิดขึ้น การวิเคราะห์เพื่อหาโครงสร้างสารและปริมาณสารใหม่ที่เกิดขึ้น ตลอดจนการหาวิธีแยกสารเพื่อหาความบริสุทธิ์ของสารใหม่ไม่สามารถทำได้เพราะไม่มีสารมาตรฐานในการทำกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณและสารไม่มีมากพอที่จะทำเนื่องจากในขั้นตอนการสกัดอะซาไดแรคทินจากเมล็ดสะเดาทำได้ยาก และสารมีปริมาณน้อยมาก ไม่พอที่จะวิเคราะห์ทดลองต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย