บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับการวัดสมบัติทางกายภาพของสาร

2.1.1 เครื่องมือสกัดสาร (Soxhlet extraction apparatus)

2.1.2 เครื่องระเหยสูญญากาศ (Rotatory vacuum evaporator)

2.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และออกซิเจน ด้วยเครื่องElemental Analyzer model 240C ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.4 การวัดอินฟราเรดสเปกตรา บันทึกด้วยเครื่อง Infrared Spectrophotometer model 781 ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยผสมกับโปตัสเซียมโบรไมด์ (KBr) อัดเป็นเม็ด (Pellet) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. หนาประมาณ 1 มม.

2.1.5 การวัดแมสสเปกตรา บันทึกด้วยเครื่อง Mass Spectrometer model JNM-DX 300 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น ใช้ electro impact source voltage 70 โวลต์ current 300 ไมโครแอมป์ อุณหภูมิ 180 - 220^{o} C

2.1.6 การวัดโปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกรีโซแนนซ์สเปกตรา บันทึกด้วยเครื่อง Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer model JNM-FX 90Q ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น สารตัวอย่างที่ใช้ตรวจวัดเตรียมโดยละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$) หรือสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม-ดี กับ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์-ดี$_6$ ($DMSO-d_6$) ใช้ Tetramethylsilane (TMS) เป็น internal standard ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างที่ใช้สำหรับการวัดคาร์บอนสเปกตราประมาณ 0.12 - 0.25 โมลาร์ และประมาณ 0.01 - 0.05 โมลาร์ สำหรับการวัดโปรตอนสเปกตรา อุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจวัดประมาณ 25 - 30^{o} C

2.1.7 การวัดแก๊สโครมาโทแกรม บันทึกด้วยเครื่อง Gas Chromatograph model GC-RIA ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

2.1.8 การวัดอัลตราไวโอเลตสเปกตรา บันทึกด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer model UV-240 ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่นใช้ quartz cell หนา 10 มม. อุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจวัดประมาณ 37 $\pm$ 0.4^{o} C

2.1.9 การวิเคราะห์น้ำตาล บันทึกด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatograph model LC - 3A ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่นใช้ Refractive Index Detector

2.1.10 การวิเคราะห์ธาตุที่เป็นอนินทรีย์เชิงคุณภาพ บันทึกด้วยเครื่อง Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometer model XR-200 ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น ใช้ Si(Li) Detector

2.1.11 การวิเคราะห์ธาตุที่เป็นอนินทรีย์เชิงปริมาณ บันทึกด้วยเครื่อง Atomic Absorption Flame Emission Spectrophotometer model AA-650 ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

2.1.12 การวัดจุดหลอมเหลวใช้เครื่อง Fisher John Melting Point Apparatus

2.2 สารเคมี

2.2.1 ตัวทำละลาย ใช้คอมเมอร์เชียลเกรด โดยนำมาทำให้บริสุทธิ์ก่อนใช้ด้วยการกลั่น ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม ไดคลอโรมีเทน เมทานอล เอทานอล อีเธอร์ อะซีโตน เอธิลอะซีเตต บิวทานอล เบนซีน และ น้ำ

2.2.2 รีเอเจนต์ รีเอเจนต์ที่ใช้ทดสอบประเภทสารอินทรีย์เคมีต่าง ๆ ได้แก่ แอลคาลอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แฟลบโวนอยส์ ซาโปนิน และ คูมาริน คือ Mayer's, Valser's, Wagner's, Dragendorff's, Kraut's และ Marme's reagent เตรียมโดยอาศัยวิธีตาม Phytochemical Screening Technique[39]

รีเอเจนต์สำหรับ Colour tests ที่ใช้การวิจัยนี้เช่น 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$, Br_2 ใน CCl_4, $KMnO_4$, Benedict's solution และอื่น ๆ ทำการเตรียมและทดลองตามตำรา Practical Organic Chemistry[40] และ Systematic Identification of Organic Compound[41]

2.2.3 สารเคมีอื่น ๆ ได้แก่ ซิลิกาเจลชนิด 60 Mesh 7734 และ 60 G 7731 ชนิดมาตรฐานของบริษัท G.Merck Darmstadt สำหรับคอลัมน์โครมาโทกราฟีและธินแลร์-โครมาโทกราฟี ตามลำดับ

2.3 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

2.3.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี

ใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 ซม. ยาว 150 ซม. อัตราส่วนของตัวดูดซับ (adsorbent) ต่อสารที่ต้องการแยกประมาณ 15:1 โดยน้ำหนัก

วิธีเตรียม นำคอลัมน์แก้วมาอุดปลายด้านล่างด้วยสำลีที่สะอาดจำนวนเล็กน้อย ใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ที่ปลายด้านล่าง แล้วบรรจุตัวทำละลายลงไปประมาณครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ ปล่อยให้ตัวทำละลายไหลออกช้า ๆ เพื่อไล่ฟองอากาศ และไม่ให้สำลีลอยผสมซิลิกาเจลชนิด 60 Mesh 7734 กับตัวทำละลายคนให้เข้ากันแล้วเทลงในคอลัมน์ ค่อย ๆ บรรจุซิลิกาเจลลงไปให้ติดต่อกันพร้อมทั้งเปิดคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลออกอย่างช้า ๆ และคอยปรับให้ผิวหน้าเรียบสม่ำเสมอ เคาะคอลัมน์เบา ๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลลงไปในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ จนกระทั่งบรรจุซิลิกาเจลจนหมด ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเกือบแห้งจึงปิดคอลัมน์ นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากัน บรรจุลงในคอลัมน์ช้า ๆ โดยไม่ให้มีฟองอากาศและให้ผิวหน้าเรียบ เมื่อระดับของสารละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจลแล้ว จึงใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกันจำนวนเล็กน้อย ล้างผิวภายในคอลัมน์ให้สะอาดแล้วปล่อยให้ระดับของตัวทำละลายลดลง จนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจลอีกครั้ง แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารต่อไป

2.3.2 ธินแลร์โครมาโทกราฟี

การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดที่มีฝาปิดสนิทขนาดพอเหมาะ ซึ่งสามารถใช้แผ่นกระจกเคลือบตัวดูดซับได้อย่างสะดวก วางกระดาษกรองให้ทาบผิวด้านในของขวดแก้ว เติมตัวทำละลายในขวดให้สูงประมาณ 1 ซม. ปิดฝาขวด ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมเปียกกระดาษกรองทั้งแผ่น เพื่อให้ในขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

การเตรียมโครมาโทเพลท (chromatoplate) ผสมซิลิกาเจลชนิด 60 G 7731 กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2 ในขวดปากกว้างที่มีความสูงตามต้องการ เขย่าให้เข้ากันเป็นอย่างดี เทลงใน Desaga Spreader ที่ปรับให้หนา 0.25 มม. เคลือบลงบนแผ่นแก้วขนาด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5 × 20 ซม. หรือ 20 × 20 ซม. ซึ่งล้างสะอาดด้วยน้ำและเช็ดด้วยอะซีโตน จะได้โครมาโทเพลท ปล่อยให้แห้งแล้ว activated ในตู้อบที่อุณหภูมิ 105°C ประมาณ 1 ชั่วโมง

การแต้มสาร ใช้หลอดคะปิลลารี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 0.05 ซม. แต้มสารที่ต้องการทดสอบลงบนโครมาโทเพลท โดยให้จุดเริ่มต้นห่างจากขอบล่างและขอบข้างประมาณ 1 ซม. สารแต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 1 ซม. ด้านบนขีด solvent front ไว้ ปล่อยให้จุดของสารละลายที่แต้มไว้แห้งสนิท แล้วจึงนำไป develop ต่อไป

การ develop จุ่มโครมาโทเพลทที่แต้มสารแล้วลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิดฝาทิ้งให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึงขีด solvent front จึงเอาออกจากขวดแก้ว ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง

การตรวจหาตำแหน่งของสาร ทำได้โดยใช้ไอโอดีน กรดซัลฟุริกเข้มข้น 25% หรือแสงอัลตราไวโอเลต การใช้ไอโอดีนเป็นรีเอเจนต์ในการตรวจหาสาร ทำได้โดยนำโครมาโทเพลทที่ develop แล้วใส่ลงในขวดที่บรรจุเกล็ดไอโอดีน ปิดฝาขวดให้สนิท ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งบริเวณที่มีสารเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้น สำหรับการใช้กรดซัลฟุริกเข้มข้น 25% เป็นรีเอเจนต์ในการตรวจหาสาร ทำได้โดยการพ่นลงบนโครมาโทเพลทที่ develop แล้ว ทิ้งไว้ให้แห้ง เมื่อนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 – 110°C ประมาณ 10 นาที บริเวณที่มีสารจนเห็นเป็นจุดสีต่าง ๆ อย่างชัดเจน

2.3.3 การกลั่น

การกลั่น เป็นการแยกตัวทำละลายที่มากเกินพอออกจากสารละลาย การกลั่นมี 2 แบบ ขึ้นกับจุดเดือดของตัวทำละลายที่จะกลั่น คือ การกลั่นแบบธรรมดา ใช้กับตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เป็นต้น การกลั่นลดความดันใช้กับตัวทำละลายที่มีขั้วและมีจุดเดือดสูง เช่น เมทานอล เพื่อให้ตัวทำละลายเดือดก่อนถึงจุดเดือด และช่วยป้องกันการสลายตัวของสารที่สกัดออกมาได้ เครื่องมือที่ใช้เรียกว่า เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator)

2.4 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาประเภทของสารอินทรีย์

นำรากโลดทะนงแดงที่แห้งบดละเอียด 100 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอล 500 ซม.^{3} โดยรีฟลักซ์บนอ่างน้ำเดือดเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง ปล่อยให้แห้ง กรองแล้วนำสารละลายมาทำให้งวด จนเหลือปริมาตร 50 ซม.^{3} ได้สิ่งสกัดในเอทานอล ซึ่งจะนำไปทดสอบสารอินทรีย์ 5 ประเภท คือ แอลคาลอยด์ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แฟลบโวนอยด์ ซาโปนิน และคูมาริน โดยอาศัยวิธีตาม Phytochemical Screening Technique(39)

2.4.1 การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแอลคาลอยด์

ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแอลคาลอยด์ แสดงไว้ในตารางที่ 6 พบว่า รากโลดทะนงแดงอาจจะมีแอลคาลอยด์

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแอลคาลอยด์

รีเอเจนต์	การทดสอบแอลคาลอยด์เบื้องต้น	การทดสอบแอลคาลอยด์เพื่อความแน่นอน	การทดสอบ quarternary และ/หรือ amine oxide base
Mayer's	+	+	+
Valser's	+	+	+
Wagner's	+	-	-
Dragendroff's	+++	-	-
Kraut's	++	-	-
Marme's	-	-	-

หมายเหตุ - ไม่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลง

\+ สารละลายขุ่นเล็กน้อย

++ สารละลายขุ่นอย่างเห็นได้ชัด

+++ สารละลายขุ่นอย่างเห็นได้ชัดและมีตะกอนหนักตกลงมา

2.4.2 การทดสอบเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ แสดงไว้ในตารางที่ 7 พบว่ารากโลดทะนงแดงอาจจะมีคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

ปฏิกิริยา	ผลที่สังเกตเห็น
ก. ทดสอบสเตอรอยด์	ได้สารละลายสีม่วง
ข. ทดสอบแลคโตนและบิวทีโนลีด (Kedde's reagent)	ได้สารละลายสีเหลือง
ค. ทดสอบน้ำตาลดีออกซี	ได้วงแหวนสีน้ำตาลและสารละลายชั้นบนสีเขียวอ่อน

2.4.3 การทดสอบเพื่อหาแฟลบโวนอยด์

ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแฟลบโวนอยด์ แสดงไว้ในตารางที่ 8 พบว่าไม่มีสารประเภทแฟลบโวนอยด์ในรากโลดทะนงแดง

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาแฟลบโวนอยด์

ปฏิกิริยา	ผลที่สังเกตเห็น
ก. Cyanidin test	ชั้น octyl alcohol ใสไม่มีสี ชั้นน้ำมีตะกอนสีชา
ข. Leucoanthocyanin test	ได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน

2.4.4 การทดสอบเพื่อหาซาโปนิน

ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาซาโปนิน แสดงไว้ในตารางที่ 9 พบว่าไม่มีสารประเภทซาโปนินในรากโลดทะนงแดง

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาซาโปนิน

ปฏิกิริยา	ผลที่สังเกตเห็น
การทดสอบฟอง	ไม่เกิดฟอง
Liebermann-Burchard test	ได้สารละลายสีเขียว

2.4.5 การทดสอบเพื่อหาคูมาริน

ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคูมาริน แสดงไว้ในตารางที่ 10 พบว่าไม่มีสารประเภทคูมารินในรากโลดทะนงแดง

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาคูมาริน

ปฏิกิริยา	ผลที่สังเกตเห็น
Coumarins test	ไม่ปรากฏการเรืองแสง

2.5 การสกัด

ทำการสกัดรากโลดทะนงแดงด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ 2 วิธี ดังต่อไปนี้

2.5.1 สกัดด้วยตัวทำละลายต่อไปนี้ตามลำดับคือ เอทานอล เฮกเซน และไดคลอโรมีเทน ขั้นตอนการสกัดแสดงดังแผนภาพที่ 1

2.5.1.1 การสกัดด้วยเอทานอล

นำรากโลดทะนงแดงที่ตากแห้งและบดละเอียดแล้ว หนัก 16.3 กก. มาสกัดด้วยเอทานอลจำนวน 36 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ กรองแล้วกลั่นไล่เอทานอลออกจากสารละลาย โดยวิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน นำเอทานอลที่กลั่นได้ไปสกัดรากโลดทะนงแดงซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายเอทานอลที่กรองได้ไม่มีสีจึงหยุดสกัด ได้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลเหนียวข้นสีน้ำตาล หนัก 734.8 กรัม (4.51% โดยน้ำหนักรากแห้ง) ซึ่งจะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ต่อไป

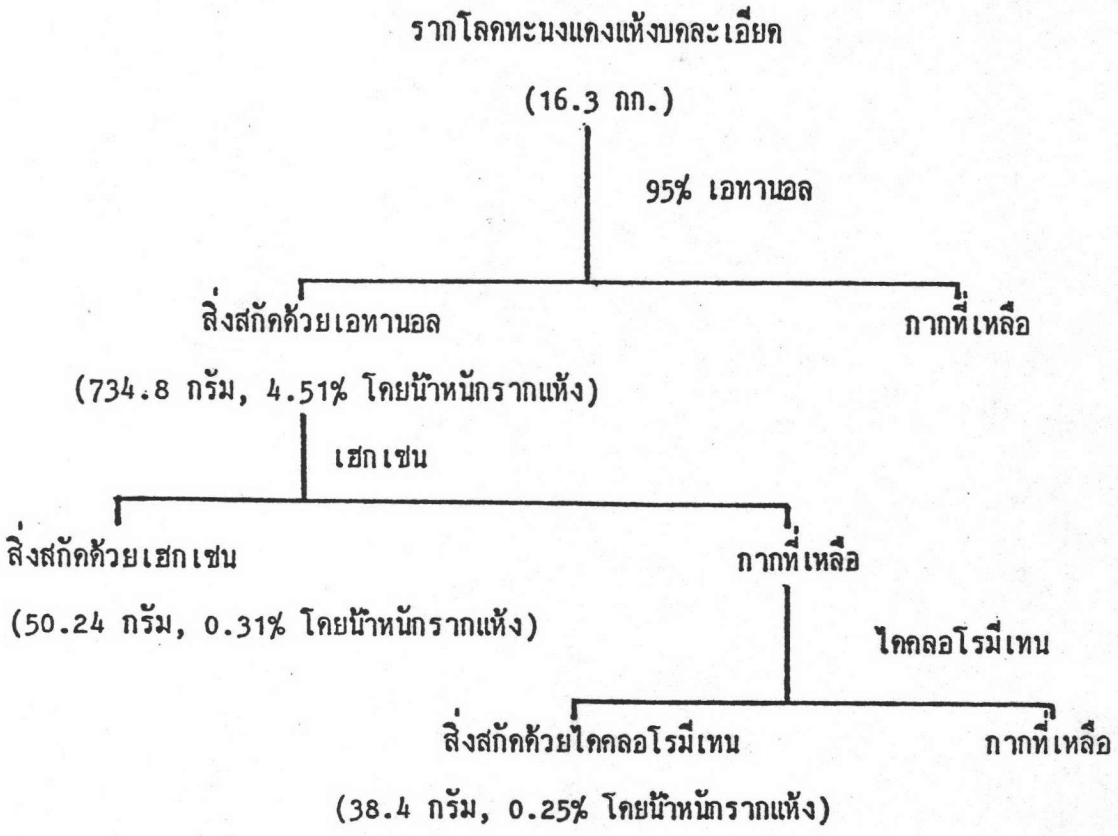
2.5.1.2 การสกัดด้วยเฮกเซน

นำสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของรากโลดทะนงแดง หนัก 734.8 กรัม มาสกัดด้วยเฮกเซนครั้งละ 1 ลิตร โดยการกวนแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น กรอง นำสารละลายที่กรองได้ไปกลั่นแยกเอาเฮกเซนออกโดยวิธีกลั่นธรรมดา นำเฮกเซนที่กลั่นได้ไปใช้สกัดซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายในเฮกเซนที่กรองได้ไม่มีสี จึงหยุดสกัด ได้สิ่งสกัดด้วยเฮกเซนเหนียวข้นสีน้ำตาลแดง หนัก 50.34 กรัม (0.31% โดยน้ำหนักรากแห้ง) ซึ่งจะนำไปทำการแยกโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

2.5.1.3 การสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน

นำสิ่งสกัดด้วยเอทานอลที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซน มาสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทนครั้งละ 500 ซม.^{3} โดยการกวนแล้วตั้งทิ้งไว้เช่นเดียวกับ 2.5.1.2 ได้สิ่งสกัดในไดคลอโรมีเทนเหนียวข้นสีน้ำตาลแดง หนัก 38.41 กรัม (0.25% โดยน้ำหนักรากแห้ง) ซึ่งจะนำไปทำการแยกสารโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

แผนภาพที่ 1 ขั้นตอนการสกัดรากโลดทะนงแดง (วิธีที่ 1)



2.5.2 สกัดด้วยตัวทำละลายต่อไปนี้ตามลำดับคือ เฮกเซน เอทานอล และคลอโรฟอร์ม-น้ำ ขั้นตอนการสกัดแสดงดังแผนภาพที่ 2

2.5.2.1 การสกัดด้วยเฮกเซน

นำรากโลดทะนงแดงที่ตากแห้งและบดละเอียด หนัก 32 กก. มาสกัดด้วยเฮกเซน 30 ลิตร เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ แล้วนำสารละลายที่สกัดได้มากรองและกลั่นแยกเฮกเซนจนเกือบหมด นำเฮกเซนที่กลั่นได้มาสกัดรากโลดทะนงแดงแห้งอีก ทำเช่นนี้ซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายเฮกเซนที่กรองได้ไม่มีสี จึงหยุดสกัด ได้สิ่งสกัดในเฮกเซนเหนียวข้นสีน้ำตาลแดง หนัก 80 กรัม (0.25% โดยน้ำหนักรากแห้ง) ซึ่งจะนำไปทำการแยกสารโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

2.5.2.2 การสกัดด้วยเอทานอล

นำรากโลดทะนงแดงส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนแล้วมาสกัดด้วยเอทานอล จำนวน 30 ลิตร เช่นเดียวกับข้อ 2.5.2.1 ได้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลเหนียวข้นสีน้ำตาล หนัก 534.4 กรัม (1.67% โดยน้ำหนักรากแห้ง)

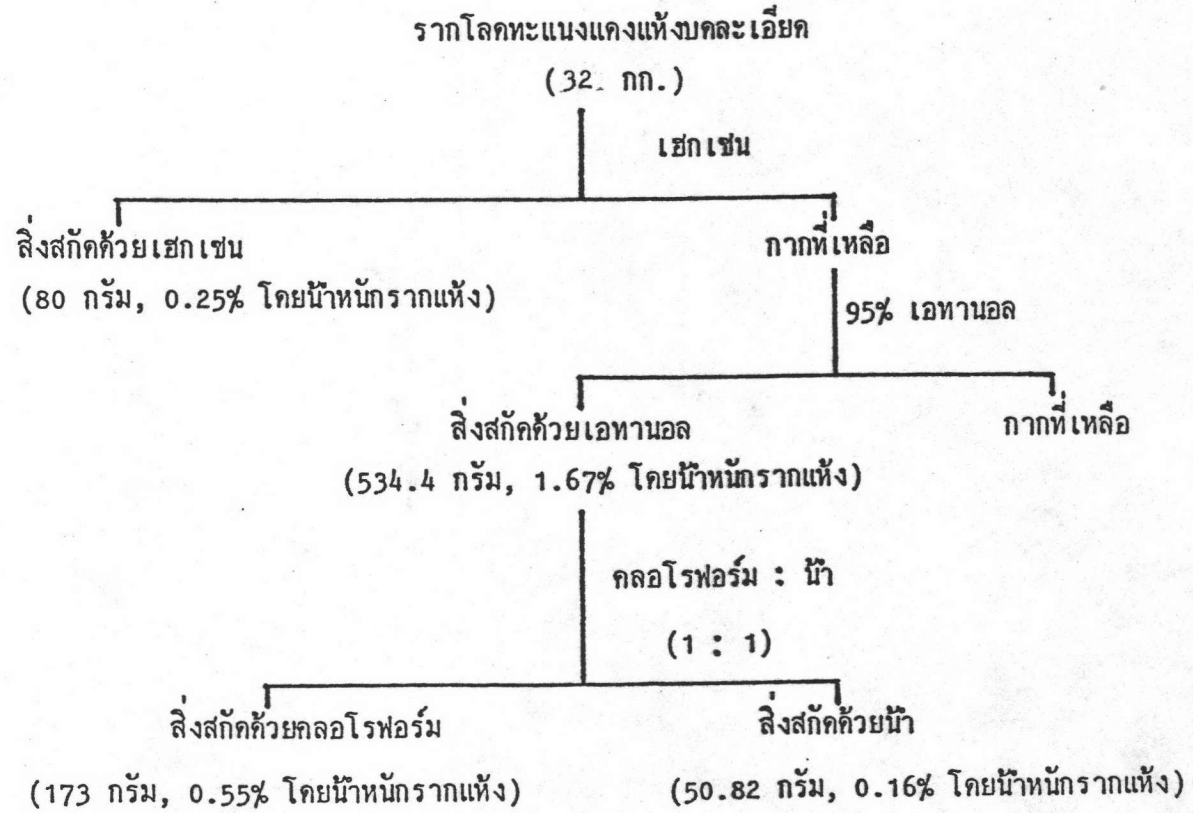
2.5.2.3 การสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม-น้ำ

นำสารที่สกัดด้วยเอทานอลมาละลายด้วยคลอโรฟอร์มจำนวน 500 ซม.^{3} ใส่ลงใน liquid-liquid extractor ซึ่งมีคลอโรฟอร์มจำนวน 500 ซม.^{3} หลังจากนั้นเติมน้ำลงใน liquid-liquid extractor สกัดด้วยคลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้ง ครั้งละ 500 ซม.^{3} จนกระทั่งสารละลายในชั้นคลอโรฟอร์มไม่มีสี แยกสารละลายสองชั้นออกจากกัน แล้วดำเนินการดังต่อไปนี้

2.5.2.3.1 นำสารละลายในชั้นคลอโรฟอร์มไปกลั่นไล่คลอโรฟอร์มออกจากสารละลายโดยวิธีกลั่นธรรมดา ได้สิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มเหนียวข้นสีน้ำตาลเหลือง หนัก 173 กรัม (0.55% โดยน้ำหนักรากแห้ง) ซึ่งจะนำไปทำการแยกสารโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

2.5.2.3.2 นำสารละลายในชั้นน้ำไปกลั่นไล่น้ำออกจากสารละลายโดยวิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน ได้สารที่สกัดด้วยน้ำ หนัก 50.8 กรัม (0.16% โดยน้ำหนักรากแห้ง) ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์หากรดอะมิโน, น้ำตาล และธาตุต่อไป

แผนภาพที่ 2 ขั้นตอนการสกัดรากโลดทะนงแดง (วิธีที่ 2)



2.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ*

2.6.1 การศึกษาความสามารถในการต่อต้านการกินของแมลงกินฝ้าย (Boll Weevil Antifeedant Studies) โดยวิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Hedin (1966)

การเตรียมอาหารสำหรับแมลงกินฝ้าย เตรียมแท่งวุ้น (agar plug) โดยนำวุ้น 3 กรัม และเมล็ดฝ้ายที่ถูกทำให้เย็นและแห้ง 3 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 100 ซม^3 โดยใช้ความร้อนช่วยแล้วปล่อยทิ้งไว้จนแข็งตัวเป็นวุ้น (gelation) แท่งวุ้นนี้จะถูกตัดเป็นแท่งแต่ละแท่งมีความยาว 3.5 ซม.

นำสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ เช่นเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และน้ำ มาชั่งน้ำหนักบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 4 × 4 ซม. โดยจุ่มกระดาษลงในสิ่งสกัดแล้วทำให้แห้ง ชั่งกระดาษเพื่อหาความเข้มข้นของสิ่งสกัดซึ่งจะนำไปทดสอบ ส่วนกระดาษที่ใช้เป็นมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบเตรียมโดยใช้กระดาษชนิดและขนาดเดียวกัน จุ่มลงในตัวทำละลายที่ใช้สกัดแล้วปล่อยให้แห้ง นำกระดาษไปหุ้มรอบแท่งวุ้นที่ปลายหนึ่งและพันยึดติดด้วยเทป ปลายอีกด้านจะถูกปิดด้วยจุกคอร์กและวางลงในจานเพาะเชื้อ โดยให้ด้านที่มีกระดาษหุ้มอยู่ติดกับจานเพาะเชื้อ เพื่อว่าแมลงกินฝ้ายสามารถกินอาหารได้โดยการเจาะกระดาษเข้าไปเท่านั้น

การทดสอบการกินของแมลงกินฝ้าย นำแมลงกินฝ้ายที่เกิดใหม่ ๆ จำนวน 20 ตัว ปล่อยในจานเพาะเชื้อขนาด 14 × 2 ซม. การทดลองจะทำในที่มีอุณหภูมิ 80^{o}F เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจึงนำกระดาษแต่ละแผ่นมาบันรูที่ถูกเจาะโดยแมลงกินฝ้าย

การรายงานความสามารถในการต่อต้านการกินของแมลงกินฝ้าย อยู่ในรูปของ % T/C

$$\% \text{ T/C} = \frac{\text{จำนวนรูบนกระดาษที่จุ่มสารที่จะทดสอบ}}{\text{จำนวนรูบนกระดาษที่ใช้เป็นตัวควบคุม}} \times 100$$

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - (\% \text{ T/C})$$

โดยที่ % T/C = 0 หมายถึง มีความสามารถในการต่อต้านทั้งหมด

% T/C > 100 หมายถึง มีความสามารถในการเลี้ยงแมลงกินฝ้าย

---

* ทำการทดสอบโดย Dr.H.D. Miles ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัย Mississippi State ประเทศสหรัฐอเมริกา

ผลการทดสอบความสามารถในการต่อต้านการกินของแมลงกินฝ้ายเบื้องต้นของสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบความสามารถในการต่อต้านการกินของแมลงกินฝ้ายเบื้องต้นของสิ่งสกัดต่าง ๆ

สิ่งสกัด	ปริมาณที่ใช้ทดสอบ	% T/C	% การยับยั้งของการกินของแมลงกินฝ้าย
เฮกเซน	10	2	98
	20	2	98
	30	0	100
เอทานอล	10	8	92
	20	2	98
	30	0	100
คลอโรฟอร์ม	10	5	95
	20	0	100
	30	0	100
น้ำ	10	15	85
	20	33	97
	30	3	97

2.6.2 การศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรีย (Antifungal and Antibacterial Studies)

วิธีที่ใช้ศึกษาคือ paper disc method โดยเตรียมอาหารที่ใช้เพาะเชื้อ (Commercial culture media; Potato-Dextrose agar) ตามวิธีทำที่กำหนดอยู่บนภาชนะที่บรรจุ นำมาอบที่ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที แล้วริน culture media ใส่ในจานเพาะเชื้อ เมื่อเชื้อราเจริญเติบโตออกจากที่เพาะเชื้อจนเข้าใกล้ treatment discs บริเวณที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อราจะถูกสังเกตและบันทึก เชื้อราที่ใช้สำหรับทดสอบคือ Pythium ultimum, Helminthosporium teres และ Rhizoetonia solani เชื้อ

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ Xanthramonas campestrous

ผลการทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรีย แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรียเบื้องต้น

สิ่งสกัด	% การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย			
	P	H	R	XC
เฮกเซน	-	-	-	-
เอทานอล	-	-	-	28
คลอโรฟอร์ม	20	-	-	28
น้ำ	-	-	-	37

P = Pythium ultimum

R = Rhizoctonia solani

H = Helminthosporium teres

XC = Xanthramonas campestrous

2.7 การแยกสาร

2.7.1 การแยกสารของสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน

2.7.1.1 นำสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน 50.24 กรัม จากข้อ 2.5.2.1 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีซิลิกาเจลหนักประมาณ 700 กรัม เป็นตัวดูดซับตามวิธีการในข้อ 2.3.1 แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามาก คือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล และเมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาครั้งละ 1 ลิตร นำแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้ไปกลั่นไล่ตัวทำละลายจนเหลือปริมาตร 10-20 ซม.^{3} นำสารละลายแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบเคมีเหมือนกันหรือไม่ โดยใช้ธินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธีการข้อ 2.3.2 รวมส่วนที่ให้ผลเหมือนกันเข้าด้วยกัน แล้วทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการตกผลึก

ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 1) แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 1) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะของสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน	1-3	น้ำมันสีขาว	0.09
	4-7	น้ำมันสีเหลือง	0.21
	8-17	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	1.94
	18-26	น้ำมันสีเหลือง	0.07
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน	27-29	น้ำมันสีเหลือง	0.12
19:1	30-34	น้ำมันสีแดง	0.08
	35-37	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.54
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน	38-42	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	4.8
9:1	43-45	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเขียว	1.02
	46-47	ของแข็งอสัณฐานสีขาวปนผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลืองส้ม	1.83
	48-52	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลืองส้ม	0.68
	53-58	ผลึกรูปเข็มสีขาวสองชนิดปนกันในน้ำมันสีเหลือง	0.25
	59-74	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.78
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน	75-90	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลืองส้ม	0.54
4:1	91-96	น้ำมันสีเหลือง	0.06
	97-110	ผลึกรูปเข็มสีเขียวในน้ำมันสีเหลือง	0.24
	111-114	ผลึกรูปเข็มสีเขียวปนกับผลึกรูปแบนสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.20
	115-117	น้ำมันสีเหลือง	0.02

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะของสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 7:3	118-134	น้ำมันสีเหลือง	0.61
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 3:2	135-153	น้ำมันสีเหลือง	0.83
เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน 1:1	154-194	น้ำมันสีเหลืองแกมเขียว	2.67
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 1:3	195-218	น้ำมันสีเหลือง	1.06
ไดคลอโรมีเทน	219-233	น้ำมันสีเหลือง	0.73
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 3:1	234-256	น้ำมันสีน้ำตาล	4.85
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 1:1	257-276	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	2.39
เมทานอล	277-338	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	5.72

2.7.1.2 นำสิ่งสกัดเฮกเซน 80 กรัม จากข้อ 2.5.2.1 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีซิลิกาเจลหนักประมาณ 800 กรัม เป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายและเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.7.1.1

ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 2) แสดงดังในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการแยกสารของสิ่งกสัดด้วยเฮกเซน (การสกัดวิธีที่ 2) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะของสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน	1-2	น้ำมันสีขาว	0.12
	3-7	น้ำมันสีเหลือง	0.33
	8-23	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	2.61
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 49:1	24-25	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.27
	26-28	น้ำมันสีเหลือง	0.09
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 19:1	29-45	น้ำมันสีเหลืองเข้ม	0.28
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 9:1	46-64	น้ำมันสีแดง	0.11
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 57:1	65-70	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีแดง	2.15
	71-81	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองส้ม	4.19
	82-96	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองน้ำตาล	1.05
	97-102	น้ำมันสีเขียว	0.09
	103-108	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเขียว	1.51
	109-133	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	1.03
เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน 3:1	134-157	น้ำมันสีเหลือง	0.26
	158	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลืองส้ม	0.05
เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน 3:2	159-167	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลืองส้ม	2.18
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 1:1	168-169	น้ำมันสีเหลือง	0.02
	170-176	ผลึกรูปเข็มสีเขียวในน้ำมันสีเหลือง	2.05
	177-186	ผลึกรูปแผ่นสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.90
	187-201	ผลึกรูปแผ่นสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.06
	202-212	น้ำมันสีเหลือง	0.57
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 1:3	213-222	น้ำมันสีเหลือง	0.43
ไดคลอโรมีเทน	223-230	น้ำมันสีน้ำตาล	1.18
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 1:1	231-153	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	4.54
เมทานอล	254-260	น้ำมันสีน้ำตาลเข้ม	0.95

2.7.2 การแยกสารของสิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน

นำสิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 38.41 กรัม จากข้อ 2.5.1.3 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีซิลิกาเจลหนักประมาณ 800 กรัม เป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายและเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.7.1.1

ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (การสกัดวิธีที่ 1) แสดงดังในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (การสกัดวิธีที่ 1) โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะของสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน	1-3	น้ำมันสีเหลือง	0.02
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 19:1	4-12	น้ำมันสีเหลือง	0.10
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 9:1	13-44	น้ำมันสีเหลือง	0.54
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 4:1	45-50	น้ำมันสีเหลือง	0.09
	51-54	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.15
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 3:2	55-57	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.04
	58-67	น้ำมันสีเหลืองส้ม	0.09
เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน 2:3	68-73	น้ำมันสีเหลืองส้ม	0.22
	74-81	ผลึกรูปเข็มสีเขียวในน้ำมันสีเหลือง	0.21
	82-89	น้ำมันสีเหลืองเขียว	0.32
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 1:4	90	น้ำมันสีเหลืองเขียว	0.01
	91-105	ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนในน้ำมันสีเหลือง	0.33
ไดคลอโรมีเทน	106-107	ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนในน้ำมันสีเหลือง	0.02
	108	ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนปนของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.02

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะของสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
	109-113	ของแข็งสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.12
	114	น้ำมันสีเหลือง	6.70
ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล 19:1	115-148	สารละลายสีเหลืองชา มีฝ้าติดก้นขวด	8.58
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 9:1	149-160	สารละลายสีเหลืองชา มีฝ้าติดก้นขวด	1.38
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 3:1	161-182	สารละลายสีเหลืองชา มีฝ้าติดก้นขวด	0.93
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 3:2	183-193	สารละลายสีเหลืองชา มีฝ้าติดก้นขวด	0.38
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 2:3	194-210	สารละลายสีเหลืองชา มีฝ้าติดก้นขวด	0.46
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 1:4	211-219	สารละลายสีเหลืองชา มีฝ้าติดก้นขวด	0.42
เมทานอล	220-234	สารละลายสีเหลืองชา มีฝ้าติดก้นขวด	0.16

2.7.3 <u>การแยกสารของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม</u>

นำสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 80 กรัม จากข้อ 2.5.2.3.1 มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งมีซิลิกาเจลหนัก 700 กรัม เป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย และเก็บแต่ละส่วนเช่นเดียวกับข้อ 2.7.1.1

ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (การสกัดวิธีที่ 2) แสดงดังในตารางที่ 16

I17409986

ตารางที่ 16 ผลการแยกสารของสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (การสกัดวิธีที่ 2) โดยคอลัมน์-โครมาโทกราฟี

ตัวทำละลาย (อัตราส่วนโดยปริมาตร)	ลำดับส่วนที่	ลักษณะของสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
เฮกเซน	1-12	น้ำมันสีเหลือง	0.835
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 9:1	13-17	น้ำมันสีเหลือง	0.15
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 4:1	18-19	น้ำมันสีเหลือง	0.17
	20-36	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	2.95
	37-39	น้ำมันสีแดง	0.23
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 3:2	40-42	ของแข็งอสัณฐานสีขาวปริมาณเล็กน้อยในน้ำมันสีส้มแดง	0.26
	43-47	น้ำมันสีส้ม	0.45
	48	น้ำมันสีเหลืองส้ม	0.18
	49-51	น้ำมันสีน้ำตาลเหลือง	0.49
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 2:3	52	น้ำมันสีน้ำตาลเหลือง	0.13
	53	ผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	0.09
	54-62	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง	2.75
	63-64	ของแข็งอสัณฐานสีขาวปริมาณเล็กน้อยปนกับผลึกรูปเข็มสีเขียวในน้ำมันสีเหลืองส้ม	0.62
	65-70	ผลึกรูปเข็มสีเขียวในน้ำมันสีเหลืองส้ม	0.91
	71-74	น้ำมันสีส้มแดง	0.47
	75-83	น้ำมันสีเหลืองส้ม	0.85
	84	น้ำมันสีเหลืองส้ม	0.11
เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน 1:4	85-90	ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนในน้ำมันสีเหลืองส้ม	0.91
	91-118	ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อนในน้ำมันสีเหลือง	2.82
	119-128	น้ำมันสีน้ำตาล	0.25
ไดคลอโรมีเทน	129-146	น้ำมันสีน้ำตาล	1.23
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 19:1	147-149	น้ำมันสีน้ำตาล	2.57
	150-152	ของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาลเหลือง	4.25
	153-165	น้ำมันสีน้ำตาล	2.08
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 9:1	166-187	น้ำมันสีน้ำตาลเหนียวข้น	0.23
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 7:3	188-199	น้ำมันสีน้ำตาลเหนียวข้น	0.15
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล 1:1	200-213	น้ำมันสีน้ำตาล	0.19
เมทานอล	214-230	น้ำมันสีน้ำตาล	0.06

2.8 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารในสิ่งสกัดด้วยเฮกเซน

2.8.1 การทำสาร ก ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ก เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง จากส่วนที่ 8-17 ซึ่งชะด้วยเฮกเซนในการสกัดวิธีที่ 1 (ตารางที่ 13) และจากส่วนที่ 8-23 ซึ่งชะด้วยเฮกเซนในการสกัดวิธีที่ 2 (ตารางที่ 14) แยกน้ำมันออกโดยตนด้วยเฮกเซน กรองเอาน้ำมันที่ละลายออก แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยเฮกเซนร้อนหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาวหนัก 0.03 กรัม (0.18% ของน้ำหนักรากแห้ง) และ 0.21 กรัม (0.66% ของน้ำหนักรากแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จุดหลอมเหลว 85-87°C R_f 0.77 (25% คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) ละลายได้ดีในเบนซีน ไดคลอโรมีเทน อีเธอร์ และ เอธิลอะซีเตต ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน เอทานอล เมทานอล และอะซีโตน ให้สารละลายสีเขียวกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 2920, 2850 (C-H), 1740 (C=O), 1200, 1180 (C-O) และ 725 ($(-CH_2-CH_2-CH_2-)_n$) $ซม^{-1}$ ดังในรูปที่ 1

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 0.69-1.02 (21H, m, $7CH_3$), 2.27 (2H, t, H-31), 4.63 (1H, m, H-3) และ 5.29 (1H, t, H-6) ppm ดังในรูปที่ 2

คาร์บอน -13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 37 สัญญาณที่ δ 173.30 (C=O), 139.77 (C-5), 122.59 (C-6), 73.68 (C-3) และ 56.72 (C-14) ppm ดังในรูปที่ 3

แมสสเปกตรัม พบพีคของ molecular ion (M^+) ที่ m/e 652 (การคำนวณสำหรับ $C_{45}H_{80}O_2$: MW = 652.43) และ 638 (การคำนวณสำหรับ $C_{44}H_{78}O_2$: MW = 638.42) นอกจากนี้พบพีคที่ m/e 396 (652-$C_{16}H_{32}O_2$), 382(638-$C_{16}H_{32}O_2$) 381(396-CH_3), 255(396-$C_{10}H_{21}$), 213(396-$C_{10}H_{21}$-42) และ 119(396-$C_{20}H_{39}$-H_2O) ดังในรูปที่ 4

จากการทดสอบ Liebermann Burchard และข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้น แสดงถึงสาร ก น่าจะเป็นสารประเภทเอสเทอร์ซึ่งมีส่วนหนึ่งเป็นสเตอรอยด์ จึงนำสาร ก มาไฮโดรไลส์

การไฮโดรไลส์ สาร ก ด้วยด่าง

นำสาร ก 50 มิลลิกรัม ละลายด้วยเบนซีน 2-3 ซม.^{3} และ 10% methanolic KOH 10 ซม.^{3} เขย่าให้เข้ากัน รีฟลักซ์บนอ่างน้ำเดือดประมาณ 5 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์หรือไม่ โดยทำธินแลร์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และสารละลายผสมระหว่างเฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (1.3 โดยปริมาตร) เป็น developing solvent ทำให้เย็นเทลงในน้ำกลั่น 15 ซม.^{3} คนให้ทั่วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดด่าง ทำตะกอนให้แห้ง ตะกอนที่ได้เป็นตะกอนของแอลกอฮอล์ (สาร 1 ก) ส่วนที่ละลายในน้ำเป็นเกลือโพทัสเซียมของกรด เมื่อนำไปทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟุริกเจือจาง แล้วนำไปสกัดด้วยอีเธอร์ นำชั้นอีเธอร์ไประเหยให้แห้ง จะได้ตะกอนของกรด (สาร 2 ก)

สาร 1 ก เป็นของแข็งรูปเข็มสีขาว นำมาตกผลึกเฮกเซนร้อนหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งได้ผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 137-139^{o}C

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600–3200 (O-H), 1640 (C=C) และ 840 (trisubstituted vinyl) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 5

จากการเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของสาร 1 ก กับ β-sitosterol พบว่า เป็นสารประเภทเดียวกัน จึงนำมาทดสอบ Liebermann-Burchard ให้สารละลายสีเขียว ดังนั้น สาร 1 ก น่าจะเป็นสารประเภทสเตอรอยด์ จึงนำไปวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 260^{o}C , อุณหภูมิ injection 290^{o}C และการไหลของ N_2 48 ซม.^{3}/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยส์ได้แก่ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังแสดงในรูปที่ 6 และแสดง retention time ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยส์ สาร ก และ สาร 1 ก ดังในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยส์, สาร ก และ สาร 1 ก จากแก๊สโครมาโทแกรม

สาร	retention time (นาที)	log retention time
cholesterol	13.43	1.13
campesterol	17.10	1.23
stigmasterol	18.47	1.27
β-sitosterol	21.0	1.32
สาร ก	5.79	0.76
	6.56	0.82
	7.57	0.88
	8.31	0.92
สาร 1 ก	5.32	0.73
	8.44	0.93
	13.69	1.14
	17.12	1.23
	18.19	1.26
	20.76	1.32

จากโครมาโทแกรม ส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ซึ่งได้จากการไฮโดรไลส์สาร ก ประกอบด้วย cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol โดยมีปริมาณของ β-sitosterol มากที่สุด

สาร 2 ก เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว นำมาตกผลึกด้วยอะซีโตนร้อนหลาย ๆ ครั้ง ทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยธินแลร์โครมาโทกราฟี ได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 63-65°C

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-2500 (O-H), 1710 (C=O) และ 730 ($(CH_2-CH_2-CH_2)_n$) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 7

นำไปวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 220°C, อุณหภูมิ injection 280°C และการไหลของ N_2 45 ซม^3/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดไขตรง (long chain acid) ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 12, 14 และ 16 ตามลำดับ ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังในรูปที่ 8 และแสดง retention time ของสารละลายมาตรฐานกรดไขตรง และของสาร 2 ก ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานกรดไขตรง และสาร 2 ก จากแก๊สโครมาโทแกรม

สาร	retention time (นาที)	log retention time
dodecanoic acid (C_{12})	1.04	0.017
myristic acid (C_{14})	2.04	0.309
palmitic acid (C_{16})	3.30	0.518
stearic acid (C_{18})	5.05	0.703
สาร 2 ก	3.25	0.512

จากโครมาโทแกรม คาดว่าสาร 2 ก เป็น palmitic acid จึงยืนยันโดยการผสมสาร 2 ก กับ palmitic acid ในอัตราส่วน 1:1 แล้วทำการวิเคราะห์โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังในรูปที่ 8 พบพีคที่ retention time เท่ากับ 3.34

2.8.2 การทำสาร ข ให้บริสุทธิ์ และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ข เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลือง จากส่วนที่ 25-42 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (19:1 และ 9:1) ในการสกัดวิธีที่ 1 (ตารางที่ 13) และจากส่วนที่ 71-81 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน (4:1) ในการสกัดวิธีที่ 2 (ตารางที่ 14) กรองแยกเอาน้ำมันออก แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยอะซีโตนร้อนหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาว หนัก 0.15 กรัม (0.92% ของน้ำหนักรากแห้ง) และ 0.32 กรัม (1.0% ของน้ำหนักรากแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จุดหลอมเหลว 74-

,-76 ^{o}C R_f 0.13 (25% คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทนและอีเธอร์ ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน เอทานอล เมทานอล อะซีโตน และเอธิลอะซีเตต ให้ผลลบกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์, 5% $FeCl_3$, 2,4-DNP, $KMnO_4$ และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-2500 (O-H), 2920 , 2850 (C-H), 1710 (C=O), 1410 (C-O), 1300 (O-H) และ 730, 720 ($(-CH_2-CH_2-CH_2-)_n$) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 9

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ , $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 0.88 (3H, CH_3), 1.25 (51H, s) และ 2.35 (2H, t, H-2) ppm ดังในรูปที่ 10

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ , $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 11 สัญญาณที่ δ 179.32 (C=O), 33.97, 31.96, 29.67, 29.47, 29.36, 29.25, 29.09, 24.7, 22.7, 14.14 (CH_3) ppm ดังในรูปที่ 11

แมสสเปกตรัม พบพีคของ molecular ion (M^+) ที่ m/e 424 (การคำนวณสำหรับ $C_{28}H_{56}O_2$: MW = 424.26), 410 (การคำนวณสำหรับ $C_{27}H_{54}O_2$: MW = 410.25), 382 (การคำนวณสำหรับ $C_{25}H_{50}O_2$: MW = 382.33) และ 368 (การคำนวณสำหรับ $C_{24}H_{48}O_2$: MW = 368.22) ดังในรูปที่ 12

จากข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้น แสดงว่า สาร ข เป็นของผสมของกรดโซ่ตรง เพื่อยืนยันว่าสาร ข เป็นกรดโซ่ตรง และเพื่อศึกษาองค์ประกอบในสาร ข จึงเตรียมอนุพันธ์ methyl ester ด้วยเมทานอล / boron trifluoride

Methylation สาร ข ด้วยเมทานอล / boron trifluoride[42]

นำสาร ข 100 มิลลิกรัม เติม 0.5 โมลาร์ NaOH ในเมทานอล 3 ซม.^{3} นำไปอุ่นบนอ่างน้ำเดือด จนกระทั่งสารละลายหมด จึงเติม 12.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) BF_3 ในเมทานอล อุ่นประมาณ 2 นาที ตรวจสอบดูว่าปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์หรือไม่โดยใช้ธินแลร์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ และเฮกเซน:คลอโรฟอร์ม (1:3 โดยปริมาตร) เป็น developing solvent ทำลาย BF_3 ที่เหลือด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว แล้วจึงสกัดสารที่ต้องการด้วยอีเธอร์ นำชั้นอีเธอร์ไประเหยให้แห้ง จะได้ตะกอน methyl ester ของสาร ข (สาร 1 ข)

<u>สาร 1 ข</u> เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว นำมาตกผลึกด้วยเฮกเซนร้อนหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 51-53^{o}C R_f 0.38 (25% คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 1745 (C=O) และ 730, 720 ($(-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-)_n$) ดังในรูปที่ 13

วิเคราะห์สาร 1 ข โดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 220^{o}C , อุณหภูมิ injection 290^{o}C และการไหลของ N_2 45 ซม^3/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน methyl ester ของกรดไขมันตรงที่มีจำนวนคาร์บอน 12, 14, 16 และ 18 ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 14 สร้าง calibration curve ของ log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐาน methyl ester ของกรดไขมันตรง ดังในรูปที่ 15 จาก calibration curve และ retention time ของสารละลายมาตรฐาน methyl ester ของกรดไขมันตรง และของสาร 1 ข ทำให้สามารถนำไปหาจำนวนคาร์บอนของสาร ข ได้ ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐาน methyl ester ของกรดไขมันตรง และของสาร 1 ข กับจำนวนคาร์บอนของสาร ข

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอนของส่วนเป็นกรด
methyl dodecanoate	0.78	- 0.108	12
methyl myristate	1.01	0.004	14
methyl palmitate	1.42	0.152	16
methyl stearate	2.10	0.322	18
สาร 1 ข	1.40	0.146	16
	1.80	0.255	17
	2.06	0.315	18
	2.59	0.413	19
	3.25	0.512	21
	4.12	0.615	22
	5.26	0.721	24
	6.76	0.829	25
	8.70	0.939	27
	11.31	1.053	28
	14.65	1.165	30
	18.98	1.278	32
	24.61	1.391	33
	32.15	1.507	35

2.8.3 การทำสาร ค ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ค เป็นของแข็งรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลือง จากส่วนที่ 48-52 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (19:1 และ 9:1) ในการสกัดวิธีที่ 1 (ตารางที่ 13) และจากส่วนที่ 103-108 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (4:1) ในการสกัดวิธีที่ 2 (ตารางที่ 14) แยกน้ำมันออกโดยคนด้วยเฮกเซน กรองเอาน้ำมันที่ละลายออก แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยเฮกเซนร้อนหลาย ๆ ครั้ง ได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาว หนัก 0.05 กรัม (0.31% ของน้ำหนักรากแห้ง) และ 0.39 กรัม (1.21% ของน้ำหนักรากแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จุดหลอมเหลว 135-137°C R_f 0.15 (25% คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) ละลายได้ดีในเบนซีน ไดคลอโรมีเทน อีเธอร์ เอทานอล เมทานอล อะซีโตน และเอธิลอะซีเตต ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ให้สารละลายสีเขียวกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3600-3200 (O-H), 2950, 2850 (C-H), 1640 (C=C), 1460, 1380 (C-H), 1060-1040 (C-O), 970, 960 (disubstituted vinyl) และ 840, 800 (trisubstituted vinyl) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 16

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 0.68-1.06 (m), 1.54-2.31 (m), 3.54 (m, OH), 5.09 (dd, disubstituted vinyl), 5.37 (trisubstituted vinyl)

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 32 สัญญาณ แสดงสัญญาณที่ δ 140.39, 138.30, 129.31, 121.67, 71.78 และ 56.83 ppm ดังในรูปที่ 18

แมสสเปกตรัม พบพีคของ molecular ion ที่ m/e 414 (การคำนวณสำหรับ $C_{29}H_{50}O$: MW = 414.28), 412 (การคำนวณสำหรับ $C_{29}H_{48}O$: MW = 412.28) และ 400 (การคำนวณสำหรับ $C_{28}H_{48}O$: MW = 400.27) นอกจากนี้พบพีคที่ m/e 396, 394, 382, 328, 303, 273, 271, 255, 231, 163, 123 และ 119 ดังในรูปที่ 19

จากการทดสอบ Liebermann-Burchard และข้อมูลทางสเปกโตรสโคปีข้างต้นแสดงถึง สาร ค น่าจะเป็นของผสมของสเตอรอยส์ จึงนำสาร ค มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 260°C, อุณหภูมิ injection

290°C และการไหลของ N_2 48 ซม^3/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยส์ซึ่งได้แก่ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol ได้แก๊สโครมาโทกราฟี ดังในรูปที่ 20 และแสดง retention time เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยส์ ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยส์ และสาร ค จากแก๊สโครมาโทแกรม

สาร	retention time (นาที)	log retention time	พื้นที่ใต้พีค
cholesterol	13.41	1.13	
campesterol	17.04	1.23	
stigmasterol	18.37	1.26	
β-sitosterol	20.91	1.32	
	17.00	1.23	52569
	18.16	1.26	688473
	20.66	1.31	936258

จากโครมาโทแกรม สาร ค ประกอบด้วย 3% campesterol, 41% stigmasterol และ 56% β-sitosterol

2.8.4 การทำสาร ง ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ง เป็นของแข็งรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีเหลือง จากส่วนที่ 59-74 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (9:1 และ 4:1) ในการสกัดวิธีที่ 1 (ตารางที่ 13) และจากส่วนที่ 159-167 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:1 และ 3:2) ในการสกัดวิธีที่ 2 (ตารางที่ 14) แยกสารออกโดยตกด้วยเฮกเซน กรองเอาน้ำมันที่ละลายออก แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอลหลาย ๆ ครั้ง ทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยธินแลร์โครมาโทกราฟี ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว หนัก 0.21 กรัม (1.29% ของน้ำหนักรากแห้ง) และ 0.62 กรัม (1.94% ของน้ำหนักรากแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จุด

หลอมเหลว 298-300°C R_f 0.69 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน อีเธอร์ เอทานอล เมทานอล อะซีโตน และ เอธิลอะซีเตต ละลายได้เล็กน้อยในเบนซีน และไม่ละลายในเฮกเซน ให้สารละลายสีชมพูม่วงกับ Liebermann - Burchard รีเอเจนต์

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3500-2500 (O-H), 3050 (=C-H), 1740(C=O), 1690 (C=O), 1375 (gem-dimethyl), 1240 (C-O) และ 820, 800 (trisubstituted vinyl) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 21

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 0.89-0.96 (21 H, m, $7CH_3$) 1.14-2.03 (23 H, m), 2.31 (3H, s, $COCH_3$) 4.47 (1H, t, H-3) และ 5.53 (1H, t, H-14) ดังในรูปที่ 22

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณที่ δ 184.19 (C=O) 171.89 (C=O), 161.33 (C-14), 117.72 (C-15), 81.80, 56.45 และ 52.22 ppm ดังในรูปที่ 23

แมสสเปกตรัม พบพีคที่ m/e 453(M^+-CH_3), 438(M^+-HOAc), 344, 329, 234 และ 189 การแตกตัวนี้เป็นลักษณะเฉพาะของ taraxerane-14-ene ดังในรูปที่ 24

การวิเคราะห์ธาตุ พบ C 76.92%, H 10.10% การคำนวณสำหรับ $C_{32}H_{50}O_4$: MW = 498.78 ได้ C 77.11%, H 10.04%

จากการทดสอบ Liebermann-Burchard และข้อมูลทางสเปกโตรสโคปี แสดงว่าสาร ง เป็นไตรเทอร์ปีนประเภท taraxerane-14-ene ที่มีหมู่คาร์บอซิลและหมู่อะเซตธิล ซึ่งจากการเปรียบเทียบจุดหลอมเหลว อินฟราเรดสเปกตรัม และคาร์บอน-13 เอนเอมอาร์-สเปกตรัม กับ 3α- acetoxytaraxer-14-en-28β-oic acid หรือ acetyl aleuritolic acid พบว่าเหมือนกัน

<u>การไฮโดรไลส์ สาร ง</u>

ละลายสาร ง 50 มิลลิกรัม ด้วยคลอโรฟอร์มในขวดก้นกลมขนาด 25 ซม.^{3} เติมเบนซีน 2-3 ซม.^{3} และ 20% methanolic KOH 10 ซม.^{3} เขย่าให้เข้ากัน รีฟลักซ์บนอ่างน้ำเดือด 10 ชั่วโมง ตรวจสอบปฏิกิริยาว่าเกิดสมบูรณ์หรือไม่ โดยทำธินแลร์โครมาโท-

กราฟีเทียบกับสารตั้งต้น หลังจากปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ เทสารละลายลงในน้ำกลั่น 10 ซม.^{3} ทำให้เป็นกรดด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง สกัดสารที่ไฮโดรไลส์ซึ่งเป็นส่วนของแอลกอฮอล์ด้วยคลอโรฟอร์ม ทำสารให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล หลาย ๆ ครั้ง ได้สาร 1 ง

สาร 1 ง เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 300-302°C (dec.) R_f 0.475 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3400 (O-H), 1690 (C=O) และ 820 (trisubstituted vinyl) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 25

Methylation สาร ง ด้วย diazomethane[40]

ละลายสาร ง 50 มิลลิกรัม ในแอนไฮดรัสอีเธอร์ ทำให้เย็นเทลงในอ่างน้ำแข็ง และเติมสารละลาย ethereal ของ diazomethane จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจาง และเติม diazomethane ให้มากเกินพอ โดยสังเกตสีเหลืองของสารละลายยังคงอยู่ชั่วครู่ ตรวจสอบความสมบูรณ์ของปฏิกิริยา โดยทำธินแลร์โครมาโทกราฟีเทียบกับสารตั้งต้น หลังจากเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ระเหยตัวทำละลาย ได้ของแข็งสีขาว ทำสารให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอล หลาย ๆ ครั้ง ได้สาร 2 ง

สาร 2 ง เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว จุดหลอมเหลว 241-243°C R_f 0.74 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม)

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 1725 (C=O), 1240 (C-O) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 26

2.8.5 การทำสาร จ ให้บริสุทธิ์ และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร จ เป็นของแข็งรูปเข็มสีเขียว จากส่วนที่ 97-110 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน : ไดคลอโรมีเทน (4:1) ในการสกัดวิธีที่ 1 (ตารางที่ 13) และจากส่วนที่ 170-176 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1) ในการสกัดวิธีที่ 2 (ตารางที่ 14) แยกน้ำมันออกโดยคนด้วยเฮกเซน กรองเอาน้ำมันที่ละลายออก แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เฮกเซนหลาย ๆ ครั้ง ทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยธินแลร์โครมาโทกราฟี ได้ผลึกรูปเข็มสีเขียว หนัก 0.20 กรัม (1.23% ของน้ำหนักรากแห้ง) และ 0.48 กรัม (1.50% ของ

น้ำหนักรากแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ตามลำดับ จุดหลอมเหลว 184-185°C R_f 0.74 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในเบนซีน ไดคลอโรมีเทน อีเธอร์ เอทานอล เมทานอล อะซีโตน และเอธิลอะซีเตต ไม่ละลายในเฮกเซน ให้ผลลบกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ และ 5% $FeCl_3$ ให้ผลบวกกับ 2,4-DNP, $KMnO_4$ และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3100, 3020 (=C-H), 1670 (C=O), 1630, 1595, 1510, 1460 (อะโรแมติก), 1390, 1375 (gem-dimethyl) และ 1240, 1095 (C-O-C) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 27

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 1.56 (6H, s, $2CH_3$), 2.39 (3H, s, CH_3), 3.93 (3H, s, OCH_3), 4.02 (6H, s, $2OCH_3$), 6.74 (1H, s), 7.28 (1H, s), 7.32 (1H, S) และ 8.04 (1H, s) ดังในรูปที่ 28

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอน 19 สัญญาณ ที่ δ 199.3 (C=O), 157.8, 154.93, 147.4, 130.77, 130.74, 127.15, 123.37, 119.20, 114.32, 110.2, 100.55, 99.01, 55.47 (OCH_3), 55.36 (OCH_3), 55.09 (OCH_3), 49.5, 28.33 และ 16.65 (CH_3) ppm ดังในรูปที่ 29

อัลตราไวโอเลตสเปกตรัม แสดง λ_{max} (EtOH) ของ α, β-unsaturated ketone ที่ 213 (ε 5.48×10^4) และ 234 (sh., ε 4.19×10^4), ของอะโรแมติก ที่ 256 (ε 4.53×10^4) และ 403 (ε 3.41×10^4) nm ดังในรูปที่ 30

การวิเคราะห์ธาตุ พบ C 74.47%, H 6.74% การคำนวณสำหรับ $C_{20}H_{22}O_4$: MW = 326.16 ได้ C 73.62%, H 6.75%

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของ molecular ion (M^+) ที่ m/e 326 นอกจากนี้พบพีคที่ m/e 311 (M^+-CH_3), 283, 255 และ 225 ดังในรูปที่ 31

2.8.6 การทำสาร ฉ ให้บริสุทธิ์ และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ฉ เป็นของแข็งรูปแผ่นสีขาวในน้ำมันสีเหลือง จากส่วนที่ 177-201 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1) ในการสกัดวิธีที่ 2 (ตารางที่ 14) แยกสารออกโดยคนด้วยเมทานอลกรองเอาน้ำมันที่ละลายออก แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยคลอโร-ฟอร์ม-เมทานอลหลาย ๆ ครั้ง ทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยธินแลร์โครมาโทกราฟี ได้ผลึกรูปแผ่นสีขาว หนัก 0.15 กรัม (0.47% ของน้ำหนักรากแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 2 จุดหลอมเหลว 199-200°C R_f 0.14 (คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน เบนซีน อีเธอร์ และเอธิลอะซีเตต ละลายได้เล็กน้อยในเอทานอลและเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซนและอะซีโตน ให้ผลบวกกับ 2,4-DNP และ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์ได้สารละลายสีเขียว แสดงว่า สาร ฉ เป็นสารประเภทสเตอรอยด์ที่มีหมู่คาร์บอนิลของอัลดีไฮด์หรือคีโตน

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 2950, 2860 (C-H), 1705 (C=O), 1460 (C-H), 1420 ($COCH_2$), 1380 (C-H) และ 1260, 1240 (C-$\overset{O}{\overset{\|}{C}}$-C) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 32

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 0.69 (3H, s, CH_3), 0.85 (12H, $4CH_3$), 0.96 (3H, s, CH_3) และ 2.01-2.65 (7H) ppm ดังในรูปที่ 33

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ δ 211.33 (C=O), 209.17 (C=O), 59.47, 56.55 และ 53.47 ppm

แมสสเปกตรัม พบพีคของ molecular ion ที่ m/e 428 นอกจากนี้พบพีคที่ m/e 287 (M^+-$C_{10}H_{21}$), 260, 245 (M^+-$C_{10}H_{21}$-42), 231, 177, 137, 109, 98 69 ดังในรูปที่ 35

การวิเคราะห์ธาตุ พบ C 81.14%, H 11.29% การคำนวณสำหรับ $C_{29}H_{48}O_2$: MW = 428.75 ได้ C 81.31%, H 11.21%

จากข้อมูลข้างต้น แสดงถึง สาร ฉ เป็นสารประเภท C_{29}-dioxo สเตอรอยด์ ซึ่งจากการเปรียบเทียบ จุดหลอมเหลว อินฟราเรดสเปกตรัม โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม และแมสสเปกตรัม กับ 5α-stigmastane-3, 6-dione พบว่าเหมือนกัน

การเตรียมอนุพันธ์ 2,4-dinitrophenylhydrazone ของสาร ฉ

ละลายสาร ฉ 10 มิลลิกรัม ด้วย 95% เอทานอล เมื่อสาร ฉ ละลายหมด เติม 2,4-DNP ที่เตรียมใหม่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเกิดตะกอนสีแดง กรองตะกอนออกจากสารละลาย แล้วนำตะกอนมาตกผลึกด้วยเอทานอลร้อนหลาย ๆ ครั้ง ได้สาร 1 ฉ

สาร 1 ฉ เป็นผลึกรูปเข็มสีแดง จุดหลอมเหลว 144-146°C R_f 0.09 (คลอโรฟอร์ม) อินฟราเรดสเปกตรัม แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3300 (N-H), 3100, 1620, 1590 1590 และ 1510 (อะโรแมติก) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 36

2.9 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารในสิ่งสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและสิ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

2.9.1 การทำสาร ช ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ช เป็นของแข็งรูปเข็มสีเหลืองอ่อนในน้ำมันสีเหลือง จากส่วนที่ 91-105 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4) ในการสกัดวิธีที่ 1 (ตารางที่ 15) และจากส่วนที่ 91-118 ซึ่งชะด้วยเฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4) ในการสกัดวิธีที่ 2 (ตารางที่ 16) แยกสารออกโดยคนด้วยเมทานอล กรองเอาน้ำมันที่ละลายออก แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยคลอโรฟอร์ม-เมทานอลหลาย ๆ ครั้ง ทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยธินแลร์โครมาโทกราฟี ได้ผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน หนัก 0.03 กรัม (0.18% ของน้ำหนักรากแห้ง) และ 0.54 กรัม (1.69% ของน้ำหนักรากแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ตามลำดับ จุดหลอมเหลว 184-185°C R_f 0.088 (คลอโรฟอร์ม) ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน อีเธอร์ และอะซีโตน ละลายได้เล็กน้อยในเอทานอล เมทานอล และเอธิลอะซีเตต ไม่ละลายในเฮกเซนและเบนซีน ให้ผลลบกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์, 5% $FeCl_3$ และ 2,4-DNP

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3500-3200 (O-H), 3040 (C=C), 1710 (แลคโตน), 1620, 1565, 1500, 1470 (อะโรแมติก), 1270, 1120 (C-O-C) และ 1200, 1150 (C-O) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 37

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 3.89 (3H, s, OCH_3), 3.92 (3H, s, OCH_3), 6.21 (1H, d, J = 9.8 Hz),

6.31 (1H, S), 6.44 (1H, S, OH) และ 7.95 (1H, d, J = 9.5 Hz) ดังในรูปที่ 38

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$ + DMSO-d_6) ปรากฏสัญญาณของ 11 คาร์บอนที่ δ 161.2 (C=O), 156.5 (C-9), 151.7 (C-7), 147.0 (C-5) 139.4 (C-4), 132.4 (C-6), 110.4 (C-3), 103.4 (C-10), 91.3 (C-8), 60.78 (OCH_3) และ 56.02 (OCH_3) ppm

อัลตราไวโอเลตสเปกตรัม แสดง λ_{max}(EtOH) ที่ 242 nm (ε 1.48 x 10^4) และ 318 nm (ε 6.76 x 10^4)

แมสสเปกตรัม พบพีคของ molecular ion ที่ m/e 222 นอกจากนี้พบพีคที่ m/e 207 (M^+-CH_3), 179(207-CO) และ 151(179-CO) ดังในรูปที่ 41

การวิเคราะห์ธาตุ พบ C 59.76%, H 4.51% การคำนวณสำหรับ $C_{11}H_{10}O_5$: MW = 222.16 ได้ C 81.13%, H 4.50%

<u>การทดสอบคูมารินโดยเปเปอร์โครมาโทกราฟี</u>[43]

แต้มสาร ช ลงบนกระดาษกว้าง 3 ซม. ยาว 4.6 ซม. ปล่อยให้แห้ง นำไป develop ในถังแก้วทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 ซม. ยาว 48 ซม. ซึ่งอิ่มตัวด้วย 10% HOAc ดำเนินการแบบ descending ปล่อยให้ตัวทำละลายขึ้นถึงปลายกระดาษอีกด้านหนึ่ง เอาออกมาทำให้แห้งพ่นด้วย 5% aqueous NaOH เมื่อกระดาษแห้งนำไปวางภายใต้แสง UV ตำแหน่งที่มีคูมารินจะเป็นสีเหลืองเขียว สำหรับสาร ช.ให้สีเหลืองเขียวโดยมีค่า R_f = 0.67

จากข้อมูลข้างต้น แสดงว่า สาร ช เป็นสารประเภทคูมารินซึ่งมี 2 หมู่ เมธอกซี และ 1 หมู่ ไฮดรอกซิล เปรียบเทียบจุดหลอมเหลว อินฟราเรดสเปกตรัม โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม อัลตราไวโอเลตสเปกตรัม และ แมสสเปกตรัมกับ 5-hydroxy-6, 7-dimethoxy coumarin พบว่าเหมือนกัน

2.9.2 <u>การทำสาร ช.ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง</u>

<u>สาร ช</u> เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีน้ำตาลเหลือง จากส่วนที่ 150-152 ซึ่งชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1) ในการสกัดวิธีที่ 2 (ตารางที่ 16) แยกสารออกโดยคนด้วยเมทานอล กรองเอาน้ำมันที่ละลายออก แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วย

เมทานอลร้อนหลาย ๆ ครั้ง ทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยธินแลร์โครมาโตกราฟี ได้ผลึกรูปอสัณฐานสีขาว หนัก 90 มิลลิกรัม (0.03% จากน้ำหนักรากแห้ง) จากการสกัดวิธีที่ 2 จุดหลอมเหลว 108-110° C R_f 0.57 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม) ละลายได้เล็กน้อยในเบนซีน ไดคลอโรมีเทน เอทานอล และเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน อีเธอร์ อะซีโตน และเอธิลอะซีเตต ให้ผลลบกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์, 5% $FeCl_3$, 2,4-DNP, $KMnO_4$ และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3400-3000 (N-H), 1660 (C=O), 1520 (N-H) และ 710 ($(-CH_2-CH_2-CH_2-)_n$) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 42

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$ + DMSO-d_6) ปรากฏสัญญาณของโปรตอนที่ δ 0.87 (t, CH_3), 1.25 (s, $(CH_2-CH_2-CH_2)_n$), 4.1 (t), 7.5 (d, N-H) ppm ดังในรูปที่ 43

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$ + DMSO-d_6) ปรากฏสัญญาณของคาร์บอนที่ δ 170.59 (C=O), 35.42 (C-2), 31.5 (C-5), 29.1 ($(-CH_2-CH_2-CH_2-)_n$), 28.8 (C-4), 25.5 (C-3), 22.3 (C-6) และ 14.4 (CH_3) ppm ดังในรูปที่ 44

แมสสเปกตรัม พบพีคของ molecular ion ที่ m/e 703 (การคำนวณสำหรับ $C_{48}H_{97}NO$: MW = 703.48), 689 (การคำนวณสำหรับ $C_{47}H_{95}NO$: MW = 689.47), 675 (การคำนวณสำหรับ $C_{46}H_{93}NO$: MW = 675.46), 661 (การคำนวณสำหรับ $C_{45}H_{91}NO$: MW = 661.45) และ 647 (การคำนวณสำหรับ $C_{44}H_{89}NO$: MW = 647.44) นอกจากนี้พบพีคที่ m/e 659 (703-$CONH_2$), 645, 631, 617 และ 603 ดังในรูปที่ 45

2.9.3 การทำสาร ฌ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ฌ เป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันเหนียวข้นสีน้ำตาล จากส่วนที่ 109-113 ซึ่งชะด้วยไดคลอโรมีเทนในการสกัดวิธีที่ 1 (ตารางที่ 15) และจากส่วนที่ 166-213 ซึ่งชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1) ในการสกัดวิธีที่ 2 (ตารางที่ 16) แยกสารออกโดยคนด้วยเมทานอล กรองเอาน้ำมันที่ละลายออก แล้วนำของแข็งที่ได้มาตกผลึกด้วยเมทานอล

ร้อนหลาย ๆ ครั้ง ได้ของแข็งอสัณฐานสีขาว (ของผสม ฌ) ให้สารละลายสีเขียวกับ Libermann-Burchard รีเอเจนต์ ทำธินแลร์โครมาโทกราฟีปรากฏ R_f เท่ากับ 0.06 และ 0.57 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม) ซึ่งที่ R_f เท่ากับ 0.57 ตรงกับ R_f ของสาร ช

อินฟราเรดสเปกตรัมของของผสม ฌ แสดงการดูดกลืนเนื่องจาก สาร ช ที่ความถี่ 1640 (C=O), 1520 (N-H) และ 715 ($(-CH_2-CH_2-CH_2-)_n$) ซม.$^{-1}$ และแสดงการดูดกลืนเนื่องจากสาร ฌ ที่ความถี่ 3350 (O-H) และ 1060-1020 (glycosidic linkage) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 46

<u>การไฮโดรไลส์ของผสม ฌ ด้วยด่างเพื่อแยกสาร ช และสาร ฌ</u>

ละลายของผสม ฌ 200 มิลลิกรัม ด้วยเมทานอล-คลอโรฟอร์มในขวดก้นกลมขนาด 50 ซม.^{3} เติมเบนซีน 2-3 ซม.^{3} และ 10% methanolic KOH 15 ซม.^{3} เขย่าให้เข้ากัน รีฟลักซ์บนอ่างน้ำเดือด 5 ชั่วโมง ทำธินแลร์โครมาโทกราฟีเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น และสาร ช พบว่าของผสม ฌ ไม่มีจุดที่มีค่า R_f เท่ากับสาร ช จึงหยุดปฏิกิริยา ตั้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง มีตะกอนสีขาวตกออกมา กรองตะกอนแล้วตกผลึกด้วยเมทานอล-คลอโรฟอร์มหลาย ๆครั้ง ได้สาร ฌ ทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยธินแลร์โครมาโทกราฟี ได้สาร ฌ หนัก 0.01 กรัม (0.03% ของน้ำหนักรากแห้ง)

สาร ฌ เป็นผลึกรูปอสัณฐานสีขาว จุดหลอมเหลว 280-283^{o}C R_f 0.06 (5% เมทานอล-คลอโรฟอร์ม) ละลายได้เล็กน้อยในเอทานอลและเมทานอลร้อน ไม่ละลายในเฮกเซน เบนซีน ไดคลอโรมีเทน อีเธอร์ อะซีโตน และเอธิลอะซีเตต ให้สารละลายสีเขียวกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3410 (O-H), 1620 (C=C) และ 1065-1020 (glycosidic linkage) ซม.$^{-1}$ ดังในรูปที่ 47

โปรตอนเอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ, $CDCl_3$ + DMSO-d_6) ปรากฏสัญญาณของสเตอรอยด์ที่ δ 0.68-1.25 (m) และ 5.35 (1H, โอลีฟินิกโปรตอน) ปรากฏสัญญาณของน้ำตาลที่ δ 3.41-3.78 (m) และ 4.40 (1H, d, J=7Hz, anomeric โปรตอน) ดังในรูปที่ 48

คาร์บอน-13 เอนเอมอาร์สเปกตรัม (δ , $CDCl_3$ + DMSO-d_6) ปรากฏสัญญาณ 2 คาร์บอน ของพันธะคู่ ที่ δ 104.31 และ 121.29 ppm ปรากฏสัญญาณของ 6 คาร์บอน ที่ต่อกับออกซิเจนอะตอมที่ δ 100.98, 73.46, 70.21, 61.38, 56.34 และ 55.53 ppm ส่วนพีคที่เหลือสอดคล้องกับสเตอรอยด์ ดังในรูปที่ 49

แมสสเปกตรัม พบพีคที่ m/e 414, 412, 396 (414-H_2O), 381 (396-CH_3), 329 (414-C_6H_{13}), 273 (414-$C_{10}H_{21}$), 255 (414-$C_{10}H_{21}$-H_2O), 231 (414-$C_{13}H_{27}$) และ 213 (414-$C_{10}H_{21}$-42) ดังในรูปที่ 50

<u>การไฮโดรไลส์ สาร ฌ ด้วยกรด</u>

ไฮโดรไลส์ สาร ฌ 50 มิลลิกรัม ด้วย 10% HCl ในเอทานอล รีฟลักซ์บนอ่างน้ำเดือด 10 ชั่วโมง ทำธินแลร์โครมาโทกราฟีเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ นำสารละลายมากลั่นลดความดันโดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน เพื่อไล่ตัวทำละลายออก นำส่วนที่เหลือมาเจือจางด้วยน้ำ และสกัดด้วยอีเธอร์ ได้ aglycone ในชั้นอีเธอร์ และน้ำตาลในชั้นน้ำ

<u>การศึกษา aglycone</u>

นำชั้นอีเธอร์จากการไฮโดรไลส์มาล้างด้วย 5% $NaHCO_3$ และน้ำ แล้วจึงดูดน้ำออกด้วยแอนไฮดรัสโซเดียมซัลเฟต หลังจากนั้นระเหยอีเธอร์ นำส่วนที่เหลือมาตกผลึกด้วยเมทานอลร้อนหลาย ๆ ครั้ง ได้ aglycone เป็นผลึกรูปเข็มสีเขียว จุดหลอมเหลว 135-137^{o}C R_f 0.15 (25% คลอโรฟอร์ม-เฮกเซน) ให้สารละลายสีเขียวกับ Liebermann-Burchard รีเอเจนต์

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3300-3500 (O-H), 1640 (C=O) และ 820, 800 (trisubstituted vinyl)

จากการเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของ aglycone กับ β-sitosterol พบว่า น่าจะเป็นสารประเภทเดียวกัน จึงนำมาวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 2%, อุณหภูมิคอลัมน์ 260^{o}C , อุณหภูมิ injection 290^{o}C และการไหลของ 48 ซม.^{3}/นาที) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานสเตอรอยด์ซึ่งได้แก่ cholesterol, campesterol, stigmasterol และ β-sitosterol ได้แก๊สโครมาโทแกรม ดังใน

รูปที่ 52 และแสดง retention time ของ aglycone เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานสเตอรอยส์ ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ค่า Retention time ของสารละลายมาตรฐานสเตอรอยส์ และ aglycone จากแก๊สโครมาโทแกรม

สาร	Retention time (นาที)	log retention time	พื้นที่ใต้พีค
cholesterol	15.49	1.19	
campesterol	19.65	1.29	
stigmasterol	21.19	1.33	
β-sitosterol	24.12	1.38	
aglycone	19.50	1.29	87071
	20.96	1.32	109312
	23.90	1.38	674225

จากโครมาโทแกรม ส่วนที่เป็น aglycone ประกอบด้วย 10% campesterol, 12% stigmasterol และ 77% β-sitosterol

การวิเคราะห์น้ำตาล

หลังจากแยก aglycone ซึ่งได้จากการไฮโดรไลส์ด้วยกรดออกแล้ว neutrallize ชั้นน้ำด้วยซิลเวอร์ไนเตรต กรองตะกอนสีขาวออก ได้สารละลายใสซึ่งเป็นส่วนของน้ำตาล นำสารละลายที่เหลือมาทำให้งวด ด้วยการกลั่นลดความดัน โดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน ทำเปเปอร์โครมาโทกราฟี เทียบกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาล พบว่า มีค่า R_f เท่ากับ ของน้ำตาลกลูโคส (R_f = 0.58, ตัวทำละลาย : 1-บิวทานอล : เบนซีน : ไพรีดีน : น้ำ ในอัตราส่วน 5:1:3:3 โดยปริมาตร) แสดงว่าน้ำตาลที่ต่ออยู่กับสเตอรอยด์เป็นน้ำตาล glucose

2.10 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสิ่งสกัดด้วยน้ำ

นำสิ่งสกัดด้วยน้ำ 50.82 กรัม มาดูดสีด้วยผงถ่าน กรองแยกสิ่งสกัดด้วยน้ำออก แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.10.1 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบเบื้องต้นและปริมาณของเกลืออนินทรีย์

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบเบื้องต้นของเกลืออนินทรีย์ ด้วย Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometer พบว่ามี K, Ca, Cl, S และ P เป็นองค์ประกอบ ดังรูปที่ 53

การวิเคราะห์หาปริมาณของเกลืออนินทรีย์ ด้วย Atomic Absorption Spectrophotometer พบว่ามี K 1.02×10^4 ppm และ Ca 1.3×10^3 ppm

2.10.2 การวิเคราะห์หากรดอะมิโนและปริมาณ

การวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วย Amino Acid Analyzer ผลดังรูปที่ 54 ตารางที่ 22

ตารางที่ 22 กรดอะมิโนที่พบในสิ่งสกัดด้วยน้ำ

กรดอะมิโนที่พบ	ความเข้มข้น (ppm)
Threonine	0.05
Glycine	0.16
Alanine	0.28
Isoleucine	0.16
Leucine	0.04
γ-aminobutyric acid	0.39
Arginine	0.19

2.10.3 การวิเคราะห์หาน้ำตาล

การวิเคราะห์น้ำตาลด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography โดยเปรียบเทียบretention time ของน้ำตาลที่พบกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาล ผลดังรูปที่ 55 ตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานน้ำตาล และน้ำตาลในสิ่งสกัดของน้ำ

สาร	retention time (นาที)
rhamnose	3.25
xylose	3.76
arabinose	4.16
fructose	4.55
glucose	5.30
galactose	5.58
sucrose	7.30
maltose	9.01
สิ่งสกัดด้วยน้ำ	3.28
	4.03
	4.50
	5.01

2.11 การศึกษาความสามารถในการต่อต้านเชื้อรา และแบคทีเรียของสารที่แยกได้*

วิธีที่ใช้ทดสอบคือ paper disc method ดังได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 2.6.2 สารที่นำมาทดสอบ คือ สาร ก , สาร ข , สาร ง และ สาร ช เชื้อราที่ใช้ทดสอบ คือ Pythium ultimum, Helminthosporium teres และ Rhizoctonia solani เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบคือ Xanthramonas campesterous

ผลการทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อรา และแบคทีเรีย แสดงดังในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ผลการทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อราและแบคทีเรียเบื้องต้นของ สาร ก , สาร ข , สาร ง และ สาร ช

สาร	% การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย			
	P	H	R	XC
ก	42	-	33	20
ข	18	-	18	-
ง	20	-	-	-
ช	45	-	66	71

สำหรับสารอื่น ๆ กำลังอยู่ในระหว่างการทดสอบ

---

*ทำการทดสอบโดย Dr.H.D. Miles ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัย Mississippi State ประเทศสหรัฐอเมริกา