บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 พืชตัวอย่าง

ผักเบี้ยหินที่นำมาศึกษาได้มาจากบริเวณคลองชลประทาน ใกล้วัดตากแดด ต. บ้านไร่ อ. เมือง จ. ราชบุรี เก็บพืชตัวอย่างในเดือนกันยายน พ.ศ 2537 โดยนำผักเบี้ยหินทั้งต้นซึ่งประกอบด้วยลำต้น ใบ และราก โดยมีลำต้นและรากเป็นส่วนใหญ่ นำมาสับตากแดดให้แห้ง

2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สาร

1. Elemental analyzer model 240c ของบริษัท Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน

2. Fisher Jonhs Melting Point Apparatus ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับหาจุดหลอมเหลว

3. Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry Model AC-F 200 ของบริษัท Bruker ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ สำหรับพิสูจน์สารโดยใช้โปรตอนและคาร์บอนนิวเคลียแมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรา สารตัวอย่างที่ใช้วัดเตรียมโดยละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี ($CDCl_3$) หรือสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO-d6) หรือสารละลายผสมระหว่างสารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี กับสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ($CDCl_3$-d + DMSO-d6) โดยน้ำหนักของสารตัวอย่างที่ใช้วัดโปรตอนสเปกตราประมาณ 0.01-0.02 กรัม และประมาณ 0.02-0.05 กรัมสำหรับวัดคาร์บอนสเปกตรา อุณหภูมิที่ใช้ในการตรวจวัดประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส

4 Gas-Liquuid chromatography Model GC-7AG ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น สำหรับบันทึกโครมาโทแกรมเพื่อหาจำนวนคาร์บอน

2.5 การเตรียมอนุพันธ์ของสารที่สกัดได้

เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่สกัดมาได้ หรือเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของหมู่แทนที่บางหมู่ของสารบริสุทธิ์ให้ง่ายต่อการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร

2.5.1การเตรียมอนุพันธ์แอซิเตตของสารประกอบประเภทไกลโคไซด์ (53)

นำสารหนัก 0.12 กรัม มาละลายในพิริดีน 5 มิลลิลิตร เติมแอซิติกแอนไฮไดรด์ 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปรีฟลักซ์บนเครื่องอังไอน้ำเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจสอบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นหรือไม่ด้วย ทิลแลร์โครมาโทกราฟี เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้ว เทสารที่ได้ลงในน้ำผสมน้ำแข็งจำนวน 30 มิลลิลิตร จะได้ตะกอนสีขาว กรอง ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นจนหมดกลิ่นพิริดีน ทำให้ตะกอนแห้ง แล้วนำมาตกผลึกใหม่ด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนและคลอโรฟอร์มหลาย ๆ ครั้งจะได้ผลึกรูปเข็มสีขาว

2.6 เทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

2.6.1 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography)(54)

ขนาดของคอลัมน์แก้วที่ใช้ ขึ้นอยู่กับ ปริมาณสารที่ต้องการแยก ถ้าปริมาณสารที่ต้องการแยกมีปริมาณมาก ขนาดของคอลัมน์ที่ใช้ก็จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาวของคอลัมน์มากกว่าเมื่อใช้ปริมาณสารที่ต้องการแยกมีน้อย

วิธีเตรียม นำคอลัมน์แก้วมาอุดปลายด้านล่าง ซึ่งมีลักษณะเรียวเล็กด้วยสำลีที่สะอาด โดยใช้แท่งแก้วดันสำลีให้อยู่ปลายด้านล่าง บรรจุตัวทำละลายลงไปครึ่งหนึ่งของคอลัมน์ เปิดที่เปิดด้านล่างของคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านเพื่อไล่ฟองอากาศ ผสมซิลิกาเจลชนิด 60 Art.7734 กับตัวทำละลาย คนให้เข้ากัน เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศในคอลัมน์ระหว่างบรรจุซิลิกาเจลลงในคอลัมน์ ต้องเปิดคอลัมน์ให้ตัวทำละลายไหลผ่านอย่างช้าๆ พร้อมทั้งเคาะคอลัมน์ไปเบาๆ เพื่อให้ซิลิกาเจลเรียงตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ เมื่อบรรจุซิลิการเจลเสร็จแล้วก็ปล่อยให้ตัวทำละลายลดลงจนเหลือประมาณ 3 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าซิลิกาเจล จึงปิดที่เปิดปิดด้านล่างของคอลัมน์ นำสิ่งสกัดที่ต้องการแยกมาคลุกกับซิลิกาเจลให้เข้ากันจนร่วน แล้วบรรจุลงในคอลัมน์ช้าๆ โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ปรับผิวหน้าให้เรียบ ฉีดล้างด้านในคอลัมน์ให้สะอาด

ด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมในปริมาณเล็กน้อย จากนั้นปล่อยให้ระดับของสารละลายลดลงจนเกือบถึงผิวหน้าของซิลิกาเจล แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารต่อไป

2.6.2 ธินแลร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) (55)

การเตรียมโครมาโทเพลท (chromatoplate) ซิลิกาเจลชนิด 60 G Art.7731 ผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:2 เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทลงใน desaga speader ที่ปรับความหนา 0.25 มิลลิเมตร เคลือบลงบนกระจกขนาด 5x20 ตารางเซนติเมตร หรือ 20x20 ตารางเซนติเมตร ที่เช็ดด้วยแอซิโตนสะอาดแล้ว เมื่อได้โครมาโทเพลทแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปอบในตู้อบ อุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง

การเตรียมภาชนะสำหรับ develop ใช้ขวดแก้วสะอาดที่มีฝาปิด ขนาดใหญ่พอใส่โครมาโทเพลทได้ จากนั้นนำกระดาษกรองมาใส่ลงในขวดแก้ว โดยให้กระดาษกรองทาบผิวด้านในขวด แล้วเติมตัวทำละลายลงในขวดให้สูงประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดฝาขวดเพื่อให้ตัวทำละลายในขวดแก้วอิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

การแต้มสาร ใช้หลอดรูเล็ก (Capillary tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 0.05 เซนติเมตร แต้มสารที่ต้องการตรวจสอบลงบนโครมาโทเพลท โดยให้จุดเริ่มต้นห่างกันไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร และห่างจากขอบล่างประมาณ 2 เซนติเมตร ด้านบนขีด solvent front ไว้ รอจนกว่าจุดที่แต้มสารจะแห้งสนิท จึงนำไป develop จุ่มโครมาโทเพลทที่แต้มสารเรียบร้อยแล้วลงในขวดแก้วที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ปิดฝา ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึงขีด solvent front แล้วจึงนำโครมาโทเพลทออกจากขวดแก้ว โดยปล่อยทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยไปจนหมด จึงนำไปตรวจสอบหาตำแหน่งของสารต่อไป

การตรวจหาตำแหน่งของสารสามารถใช้ไอโอดีน, 25% H_2SO_4 หรือแสงอัลตราไวโอเลต การใช้ไอโอดีนเป็นตัวตรวจสอบทำได้โดยนำโครมาโทเพลทที่ develop แล้วใส่ในขวดที่มีเกล็ดไอโอดีน ปิดฝาขวดให้สนิทปล่อยจนกระทั่งบริเวณที่มีสารเป็นจุดสีน้ำตาลเกิดขึ้น สำหรับการใช้ 25% H_2SO_4 ทำได้โดยพ่น 25% H_2SO_4 ลงบนโครมาโทเพลทที่ develop แล้วทิ้งไว้จนแห้งนำไปอบไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-10 นาที พบว่าบริเวณที่มีสารจะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลดำชัดเจน

2.6.3 การกลั่น

เป็นการแยกตัวทำละลายที่มากเกินพอออกจากสารละลาย การกลั่นมี 2 วิธี ได้แก่ การกลั่นแบบธรรมดาและการกลั่นแบบลดความดัน การกลั่นจะพิจารณาจากตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำก็จะใช้การกลั่นแบบธรรมดา เช่น เฮกเซน คลอโรฟอร์ม แต่ถ้าตัวทำละลายที่มีจุดเดือดสูงและมีขั้วก็จะใช้แบบลดความดัน เช่น เมทานอล ทั้งนี้เพื่อป้องกันการสลายตัวของสารที่สกัดออกมา โดยตัวทำละลายจะเดือดก่อนถึงจุดเดือดเพราะการกลั่นแบบลดความดันจะใช้ความร้อนต่ำกว่าการกลั่นแบบธรรมดาเมื่อตัวทำละลายเป็นชนิดเดียวกัน เครื่องมือที่ใช้ในการกลั่นแบบนี้เรียกว่า เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator)

2.6.4 โครมาโททรอน (chromatotron)

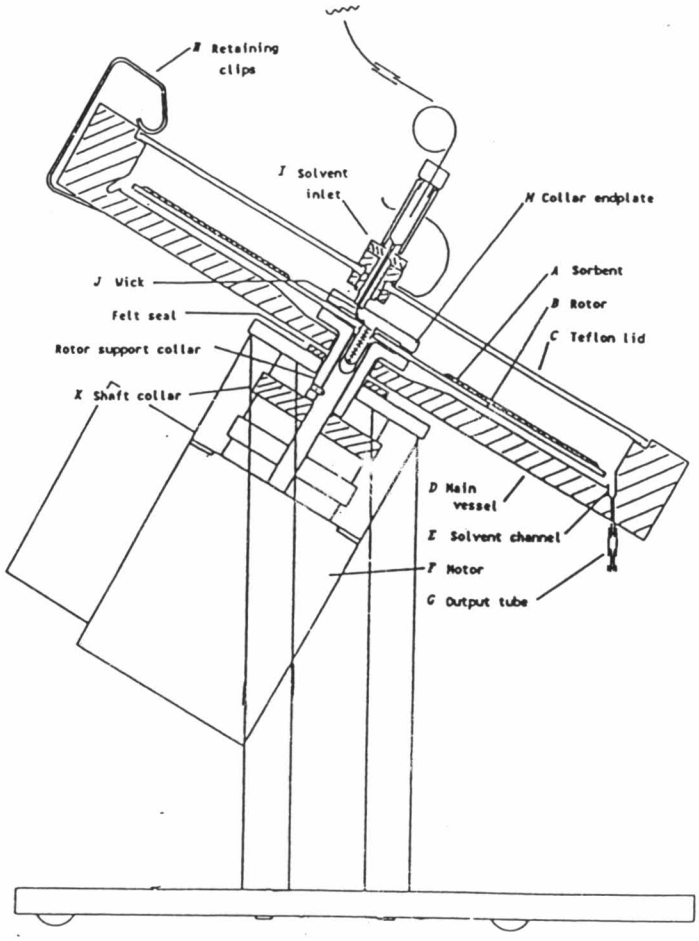
เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกสารผสมปริมาณเล็กน้อยที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตให้มีความบริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการทางโครมาโทกราฟี (Chromatography) ร่วมกับแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifugally Force acceleration) อุปกรณ์ของโครมาโททรอนจะประกอบไปด้วย

1. ตัวเครื่องโครมาโททรอน ซึ่งจะประกอบด้วย Rotor ซึ่งเป็นแผ่นแก้วทรงกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 24 เซนติเมตร โดยมีมอเตอร์ที่มีความเร็ว 120 นาทีต่อรอบ ตัวดูดซับที่ใช้เคลือบเป็นซิลิกาเจล ชนิด 60 PF-254 Art. 7749 ที่ประกอบด้วย Calcium Sulfate ความหนาของการเคลือบด้วยตัวดูดซับขึ้นอยู่กับการเตรียมตัวดูดซับซึ่งแสดงถึงการเตรียมดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณสารที่ใช้เตรียมแผ่นโครมาโททรอน

สารที่ใช้	ปริมาณสารต่อความหนาของตัวดูดซับ(มิลลิเมตร)		
	1	2	4
Silica gel 60 PF-250 กับ calcium sulfate (กรัม)	45	65 (0-5 ^{o}C)	115 (0-5 ^{o}C)
น้ำกลั่น(มิลลิลิตร)	90 (0-5 ^{o}C)	130 (0-5 ^{o}C)	200 (0-5 ^{o}C)
ปริมาณสารที่ใช้แยก(กรัม)	0.100-0.250	0.300-0.750	1.5000

อุปกรณ์ที่ประกอบกันเป็นเครื่องโครมาโททรอนส่วนใหญ่จะทำด้วย Teflon ซึ่งแสดงให้เห็นดังรูปที่ 2.1



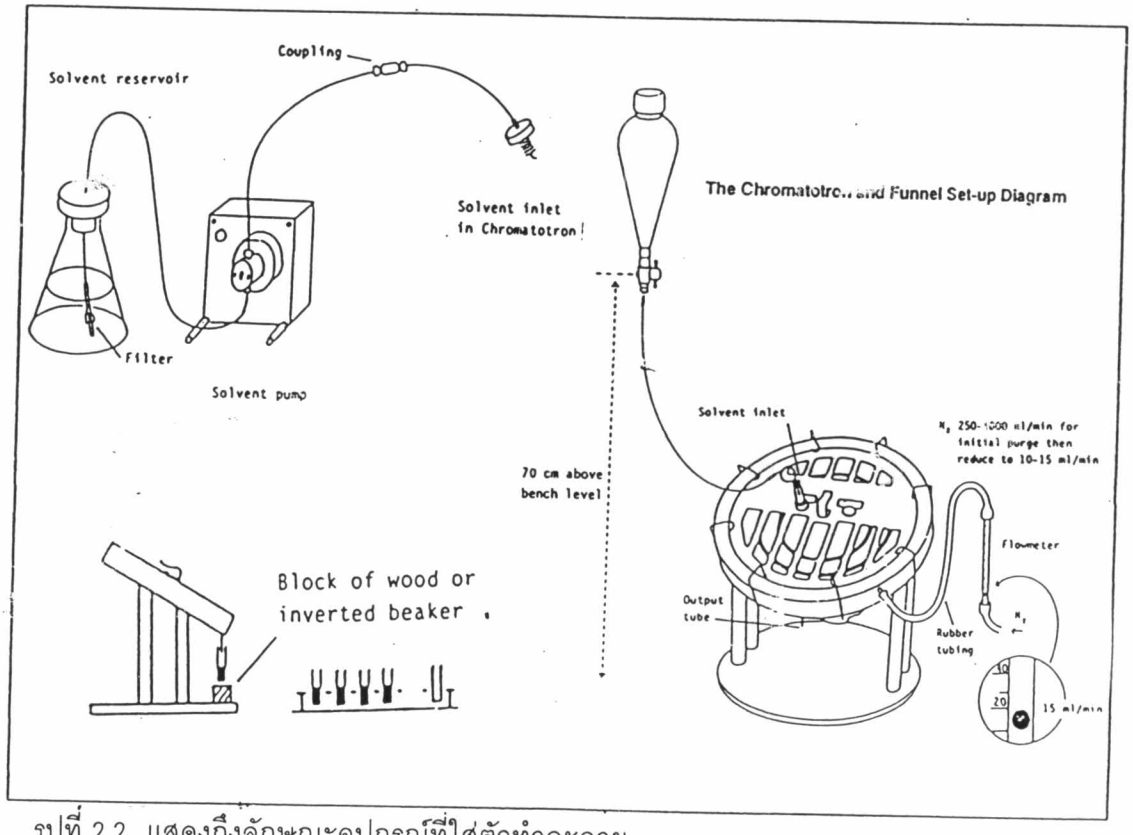
รูปที่ 2.1 อุปกรณ์ของเครื่องโครมาโททรอน

2. ปั๊มดูดตัวทำละลาย (Sovent Pump) จะเป็นเครื่องดูดตัวทำละลายและสารที่ต้องการที่จะแยกเข้าสู่แผ่นซึ่งเคลือบด้วยตัวดูดซับ โดยอัตราเร็วที่ใช้ในการดูดตัวทำละลายขึ้นอยู่กับความหนาของตัวดูดซับที่เคลือบบนแผ่นนั้นซึ่งจะแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความหนาของตัวดูดซับกับอัตราเร็วของปั๊มดูดตัวทำละลาย

ความหนาของตัวดูดซับ(มิลลิเมตร)	อัตราเร็ว (ml/min)
1	2-4
2	6-8
4	8-10

3. ขวดใส่ตัวทำละลาย เป็นขวดแก้วธรรมดา โดยตัวทำละลายที่ใช้กับเครื่องมือชนิดนี้จะต้องไม่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ เนื่องจากคลอรีนอาจจะกัดกร่อนอุปกรณ์ที่เป็น Teflon ได้ และตัวทำละลายจะต้องเตรียมใส่ขวดไว้เพื่อความสะดวกที่จะใช้ตัวทำละลายเป็นตัวชะ โดยจะใช้ตัวทำละลายจากไม่มีขั้วไปหามีขั้วนั้นคือ เฮกเซน ตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลแอซิเตต เอทิลแอซิเตต ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทิลแอซิเตตกับเมทานอล เมทานอล และ ..% ของกรดแอซิติกในเมทานอล (ล้างแผ่นให้สะอาด) เมื่อทำการแยกสารเสร็จแล้วจะต้องไล่ตัวทำละลายไปหาไม่มีขั้วอีกที



รูปที่ 2.2 แสดงถึงลักษณะอุปกรณ์ที่ใส่ตัวทำละลาย

4. เครื่องส่องแสงอัลตราไวโอเลต (UV Lamp) เพื่อส่องแถบของสารที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต

วิธีทำ เริ่มจากนำสารที่ต้องการแยกมาตรวจสอบด้วยธิลแลเยอร์โครมาโทกราฟีแล้วสังเกตว่ามีการแยกของสารที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตแตกต่างกันอย่างไร ถ้าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ไม่อยู่ชิดกันเกินไปก็สามารถนำไปแยกโดยเครื่องโครมาโททรอนได้ ก่อนที่จะใช้เครื่องโครมาโททรอนจะต้องเตรียมตัวทำละลายและเพลทให้พร้อมก่อน จากนั้นเมื่อเริ่มทำจะ

ต้องชะแผ่นโครมาโททรอน ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนจนตัวดูดซับที่อยู่บนแผ่นอิ่มตัวด้วยตัวทำละลายเฮกเซน จึงเริ่มใส่สารตัวอย่างลงไป ค่อยๆเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายขึ้น จนกระทั่งแถบที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตแยกออกจากกัน ให้คงใช้ตัวทำละลายตัวเดิมก่อนจนแถบห่างจากกันมากขึ้นจึงเพิ่มความมีขั้วของตัวทำละลายเพื่อไล่ให้แถบดูดกลืนออกจากโครมาโททรอน โดยเก็บใส่ขวดรูปกรวยแต่ละแถบการดูดกลืน เมื่อไล่จนสารออกมาหมดแล้วล้างแผ่นโครมาโททรอนด้วยเมทานอล หรือ 1% ของกรดแอซิติกในเมทานอล แล้วไล่กลับไปหาตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วทิ้งไว้สักครู่จึงปิดเครื่อง

2.7 การทดสอบสารประกอบทางเคมีเบื้องต้น

โดยการผักเบี้ยหินที่แห้งจำนวน 100 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอล 500 มิลลิลิตร โดยรีฟลักซ์บนอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้แห้ง กรองแล้วนำสารละลายมาทำให้งวด จนเหลือปริมาตร 50 มิลลิลิตร ได้สิ่งสกัดในเอทานอล และนำสิ่งสกัดที่ได้จากหัวข้อ 2.8 ในการสกัดวิธีที่ 2 นำไปทดสอบหาสารประกอบทางเคมี 4 ประเภท คือ สเตียรอยด์ ไทรเทอร์ปีนอยด์ เฟลโวนอยด์ และ แอลคาลอยด์ โดยอาศัยวิธีตาม Phytochemical Screening Technique

ตารางที่ 2.3 แสดงผลการทดสอบหาสารประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดต่างๆ

สิ่งสกัด	ผลการทดสอบ			
	สเตียรอยด์	ไทรเทอร์ปีนอยด์	เฟลโวนอยด์	แอลคาลอยด์
เอทานอล	+++	+++	--	--
เฮกเซน	+++	+++	--	--
ไดคลอโรมีเทน	+++	+++	--	--
เมทานอล	++	--	++	+

หมายเหตุ -- ไม่สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงได้

\+ สารละลายให้ผลการสังเกตไม่ชัดเจนนัก

++ สารละลายให้ผลการสังเกตชัดเจน

+++ สารละลายให้ผลการสังเกตชัดเจนมาก

2.8 การสกัด

ได้ศึกษาการสกัดผักเบี้ยหินด้วยตัวทำละลายต่างๆ 2 วิธี คือ

2.8.1 วิธีที่ 1 สกัดด้วยตัวทำละลายตามลำดับต่อไปนี้ เอทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ขั้นตอนการสกัดแสดงดังแผนภาพที่ 2.3

การสกัดด้วยเอทานอล

นำผักเบี้ยหินสดทั้งต้นจำนวน 25 กิโลกรัมมาทำความสะอาดแล้วนำมาสับและตากแดดเป็น เวลา 15 วัน จึงนำมาบดให้ละเอียดได้น้ำหนักแห้งจำนวน 5 กิโลกรัม นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลจำนวน 40 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองแล้วกลั่นไล่เอทานอลออกโดยใช้วิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน นำเอทานอลที่กลั่นได้ไปสกัดผักเบี้ยหินซ้ำอีกหลายๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายที่กรองได้ไม่มีสีจึงหยุดสกัด ได้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลได้ของเหลวเหนียวสีดำเขียวหนัก 320.0 กรัม(คิดเป็น 12.80 %ของน้ำหนักแห้ง) ซึ่งจะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ ต่อไป

การสกัดด้วยเฮกเซน

นำสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของผักเบี้ยหินหนัก 315.0 กรัม มาสกัดด้วยเฮกเซนจำนวน 500 มิลลิลิตร โดยการกวนแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น กรอง นำสารที่กรองได้มาแยกเอาเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน นำเฮกเซนที่กลั่นได้ไปใช้สกัดซ้ำอีกหลายๆ ครั้ง จนกระทั่งสารละลายที่กรองได้ไม่มีสีจึงหยุดสกัด ได้สิ่งสกัดด้วยเฮกเซนคล้ายวุ้นสีดำเขียว มีกลิ่นฉุน หนัก 140.0 กรัม(คิดเป็น 5.60 %ของน้ำหนักแห้ง)

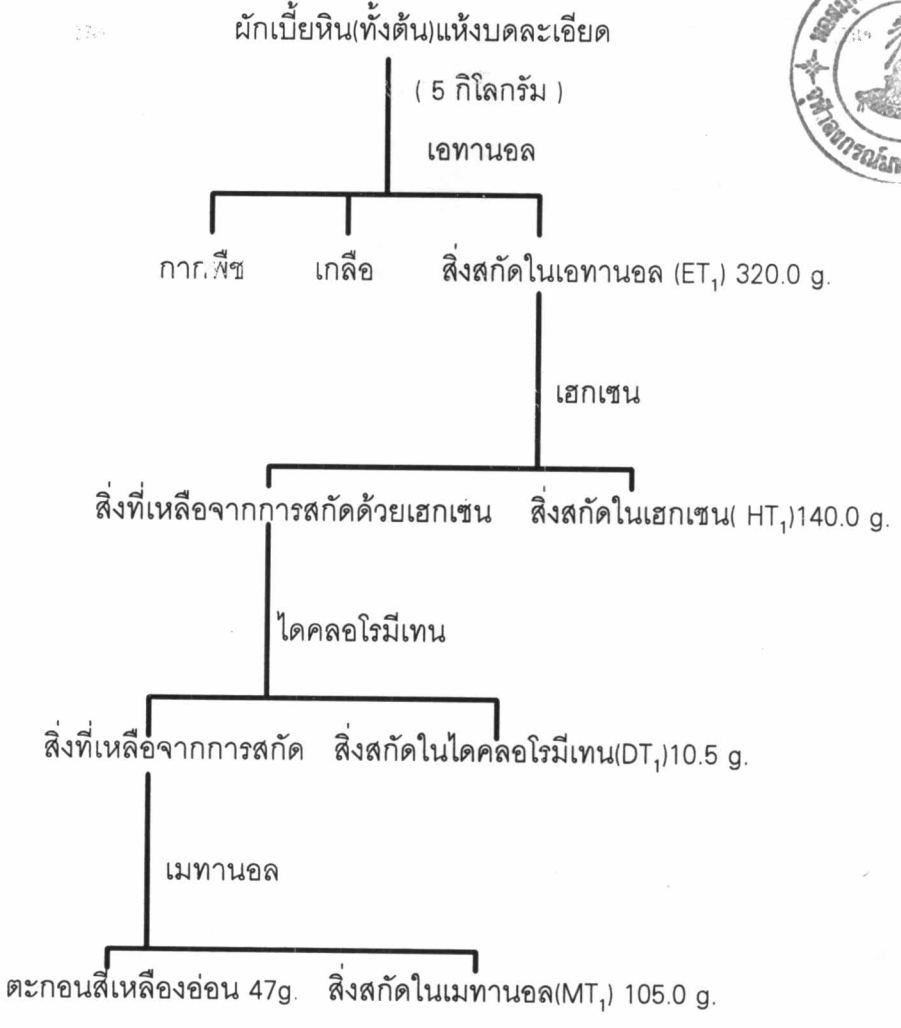
การสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน

นำสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของผักเบี้ยหินที่เหลือ มาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนจำนวน 500 มิลลิลิตร โดยการกวนแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทำเช่นเดียวกันกับการสกัดด้วยเฮกเซน ได้สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนเหนียวข้นสีดำเขียว มีกลิ่นฉุน หนัก 10.50 กรัม(คิดเป็น 0.04 %ของน้ำหนักแห้ง)

การสกัดด้วยเมทานอล

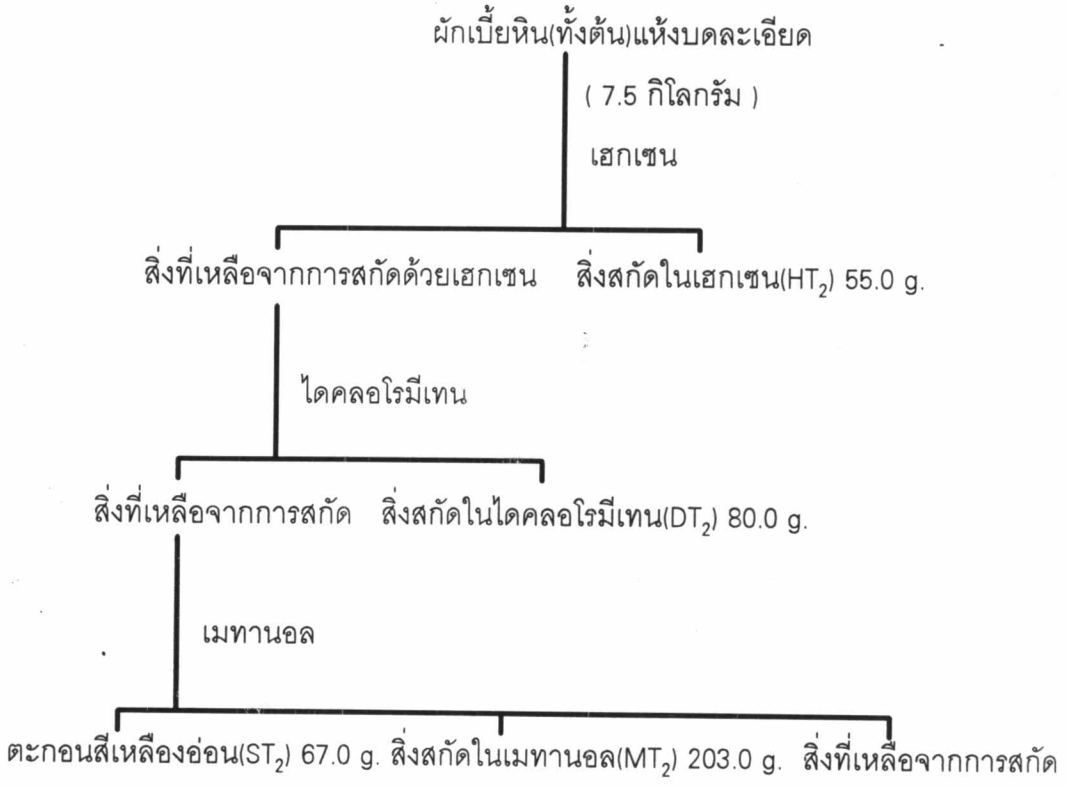
นำสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของผักเบี้ยหินที่เหลือ มาสกัดด้วยเมทานอลจำนวน 500 มิลลิลิตร โดยการกวนแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ทำเช่นเดียวกันกับการสกัดด้วยเฮกเซน ปรากฏว่ามีตะกอนสีเหลืองขาวตกลงมาจึงทำการแยกได้ตะกอนจำนวน 47.0 กรัม(คิดเป็น 1.88 % ของน้ำหนักแห้ง) และได้สิ่งสกัดเมทานอลเป็นของเหลวสีดำแดง มีกลิ่นฉุน หนัก 105.0 กรัม (คิดเป็น 4.20 %ของน้ำหนักแห้ง)

แผนภาพที่1 แสดงขั้นตอนการสกัดผักเบี้ยหินวิธีที่ 1



2.8.2 <u>วิธีที่ 2</u> สกัดด้วยตัวทำละลายตามลำดับต่อไปนี้ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ขั้นตอนการสกัดแสดงดังแผนภาพที่ 2

<u>แผนภาพที่ 2</u> แสดงขั้นตอนการสกัดผักเบี้ยหินวิธีที่ 2



<u>การสกัดด้วยเฮกเซน</u>

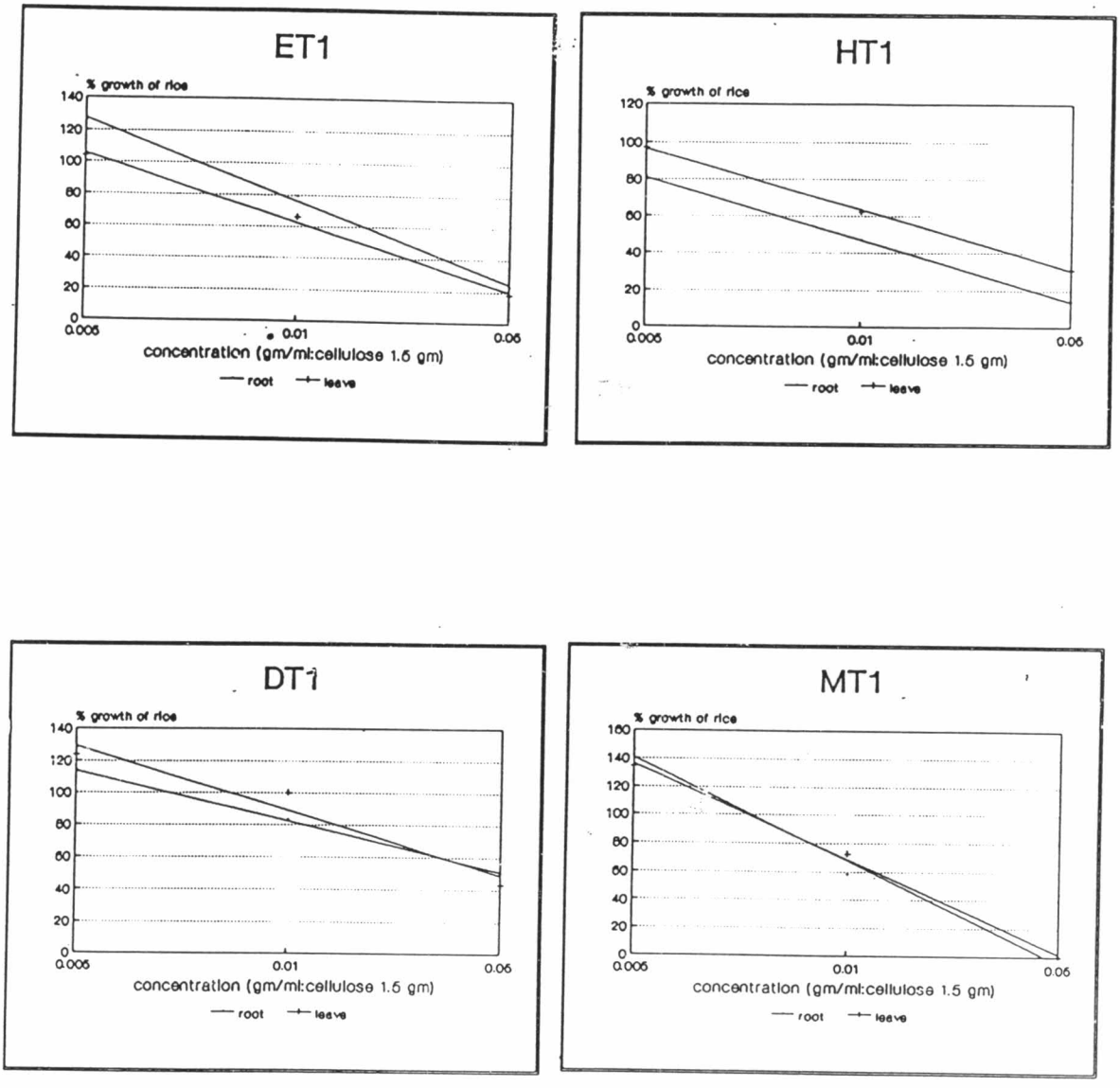
นำผักเบี้ยหินสดทั้งต้นจำนวน 35.0 กิโลกรัม มาทำความสะอาดแล้วนำมาสับและตากแดดเป็นเวลา 10 วัน จึงนำมาบดให้ละเอียดได้น้ำหนักแห้งจำนวน 7.5 กิโลกรัม นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธีการแช่จำนวน 50 ลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นกรองแล้วกลั่นไล่เอทานอลออกโดยใช้วิธีกลั่นลดความดันด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน นำเฮกเซนที่กลั่นได้ไปสกัดผักเบี้ยหินซ้ำอีก 2 ครั้ง ได้สิ่งสกัดเฮกเซนเป็นของแข็งสีเหลืองหนัก 55.0 กรัม(คิดเป็น 0.73% ของน้ำหนักแห้ง)

เปรียบเทียบทำเช่นเดียวกัน แต่ไม่ใส่สารสกัดจากผักเบี้ยหิน ทุกกรรมวิธีทำซ้ำ 3 ครั้ง นำหลอดแก้วดังกล่าวนี้ไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ โดยมีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอด 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น 7 วัน ทำการวัดความยาวของราก และความยาวของกาบใบที่ 2 ของต้นข้าวอ่อน เพื่อดูว่าสารที่สกัดได้จากผักเบี้ยหินมีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวอย่างไร โดยการเปรียบเทียบกับหลอดมาตรฐาน ถ้าความยาวของรากและใบใกล้เคียงกับความยาวมาตรฐาน แสดงว่าสิ่งที่สกัดได้นั้น ไม่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว แต่ถ้าแตกต่างกันแสดงว่าสิ่งที่สกัดได้นั้นมีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดข้าว

ตารางที่ 2.4 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าวของสิ่งสกัดจากผักเบี้ยหิน วิธีที่ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

รหัส	สิ่งสกัด	ส่วนที่ศึกษา	%ความยาวที่ความเข้มข้นต่างๆ		
			0.005	0.01	0.05
ET_1	เอทานอล	ราก	125.88	79.20	23.30
		กาบใบ	103.56	66.21	18.23
HT_1	เฮกเซน	ราก	81.17	47.12	13.74
		กาบใบ	97.05	62.29	31.11
DT_1	ไดคลอโรมีเทน	ราก	113.51	83.03	50.87
		กาบใบ	123.60	99.97	43.41
MT_1	เมทานอล	ราก	145.38	57.69	0.00
		กาบใบ	134.50	72.32	0.00

จากผลการทดสอบดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.4 พบว่าสิ่งสกัดในเมทานอล ที่ความเข้มข้น 0.05 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าวมากที่สุด เมื่อสังเกตโดยรวมพบว่าสิ่งสกัดที่นำมาทดสอบไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าว นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้นเปรียบเทียบกับความยาวของรากและลำต้นของข้าว เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้น ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังกราฟรูปที่ 2.3



แกนตั้ง แสดงเปอร์เซนต์ตวามยาว

แกนนอน -แสดงความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.3 กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความยาวของรากและกาบใบของต้นข้าว เมื่อได้รับสารจากสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.9.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดที่มีต่อผักกาดขาว

การเตรียมเมล็ดผักกาดขาว นำเมล็ดผักกาดขาวพันธุ์เบา ของบริษัทเจียไต๋ จำกัด มาทำการเพาะโดยนำมาแช่น้ำอุ่นทิ้งไว้ 2 คืน เพื่อให้เมล็ดผักกาดขาวงอกส่วนรากออกมา เลือกเมล็ดผักกาดขาวที่มีความยาวของรากประมาณ 1-2 มิลลิลิตร

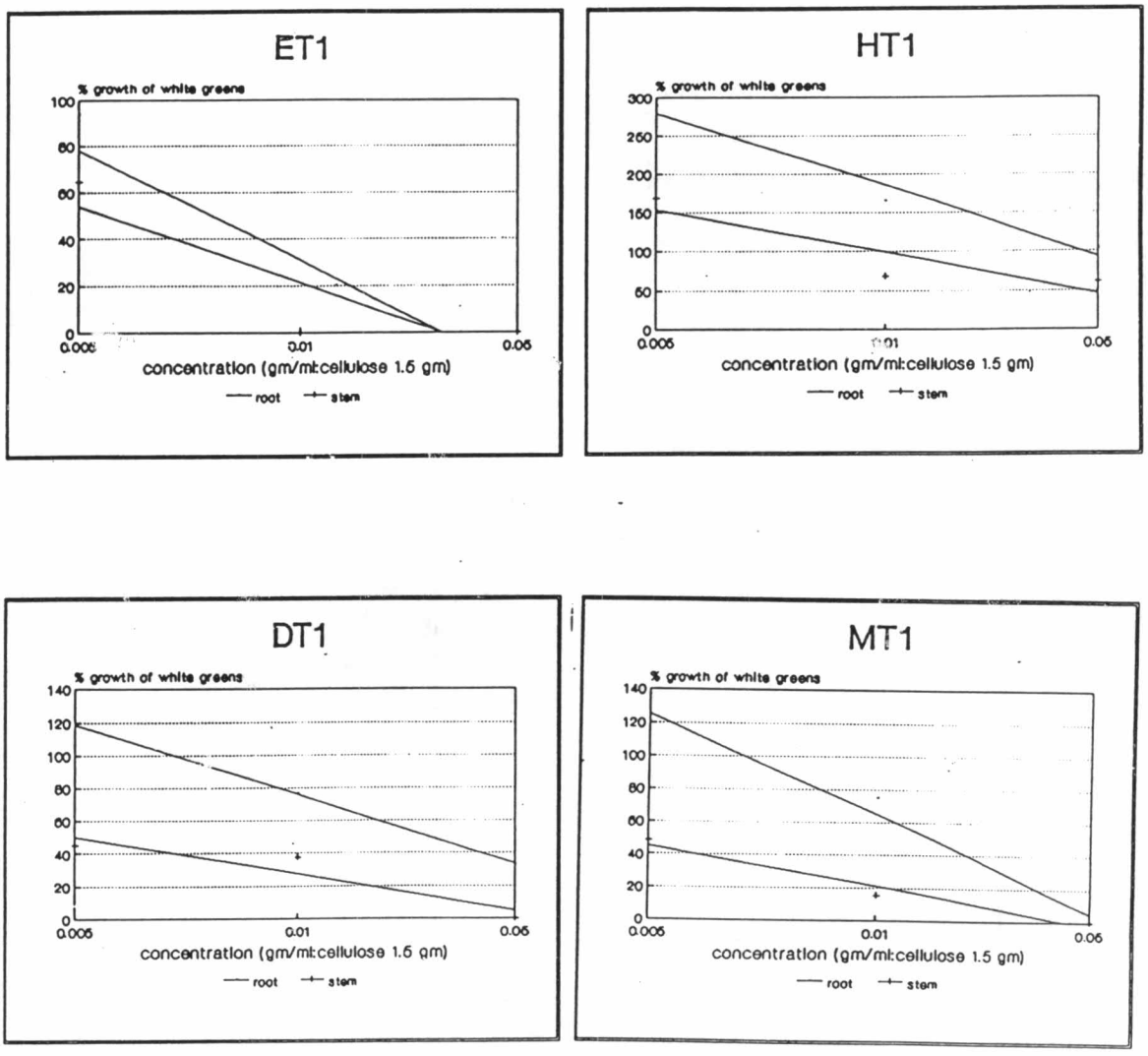
การเตรียมการทดลองทำเช่นเดียวกับการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าวเพียงแต่เปลี่ยนจากเมล็ดข้าวเป็นเมล็ดผักกาดขาว และนำสิ่งสกัดในวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญโตของผักกาดขาว ซึ่งแสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 2.5 และ 2.6

ตารางที่ 2.5 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นผักกาดขาว ของสิ่งสกัดจากผักเบี้ยหิน วิธีที่ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

รหัส	สิ่งสกัด	ส่วนที่ศึกษา	เปอร์เซนต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่างๆ		
			0.005	0.01	0.05
ET1	เอทานอล	ราก	93.75	0.00	0.00
		ลำต้น	64.68	0.00	0.00
HT1	เฮกเซน	ราก	289.18	165.52	103.45
		ลำต้น	68.96	68.85	61.94
DT1	ไดคลอโรมีเทน	ราก	117.95	76.92	33.33
		ลำต้น	45.36	37.38	0.00
MT1	เมทานอล	ราก	120.00	75.00	0.00
		ลำต้น	48.32	15.59	0.00

จากผลการทดสอบดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.5 พบว่าสิ่งสกัดเอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาวมากที่สุด รองลงมาคือสิ่งสกัดเมทานอล ที่ความเข้มข้น 0.05 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม ในขณะที่สิ่งสกัดเฮกเซนไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาว เมื่อนำข้อมูลที่ได้

มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้น เปรียบเทียบกับความยาวของรากและลำต้นของผักกาดขาว เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้น ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม) ดังแสดงในรูปที่ 2.4



แกนตั้ง - แสดงเปอร์เซนต์ความยาว

แกนนอน -แสดงความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

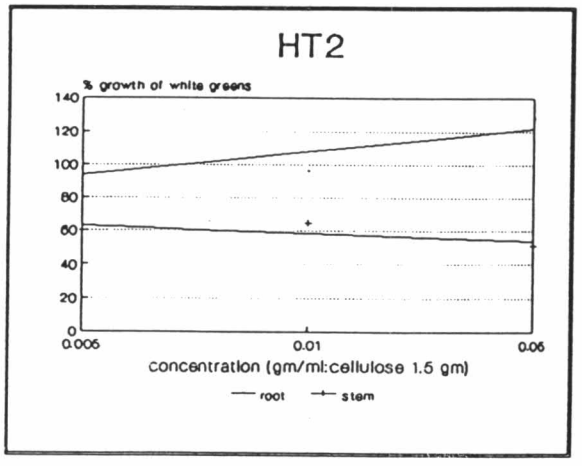
รูปที่ 2.4 กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้นของผักกาดขาว เมื่อได้รับสารจากสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

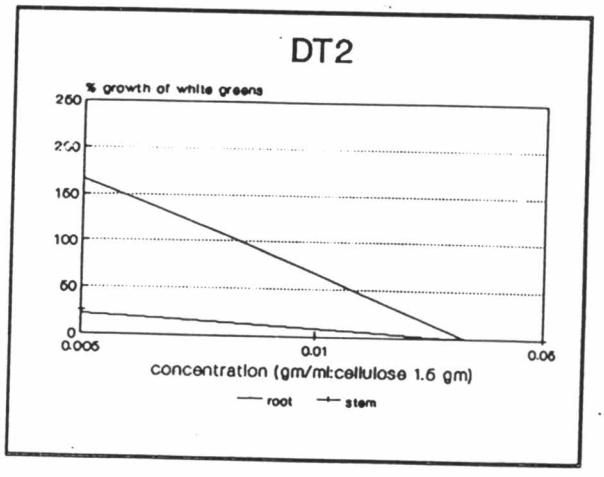
I16840549

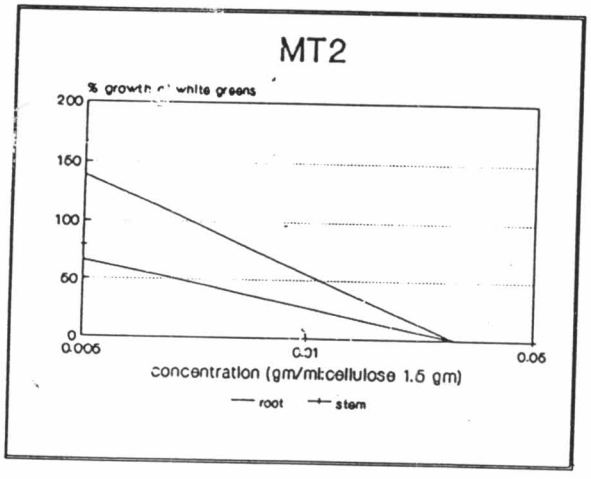
ตารางที่ 2.6 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นผักกาดขาวของสิ่งสกัดจากผักเบี้ยหิน วิธีที่ 2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

รหัส	สิ่งสกัด	ส่วนที่ศึกษา	%ความยาวที่ความเข้มข้นต่างๆ		
			0.005	0.01	0.05
HT_2	เฮกเซน	ราก	100.00	96.00	128.00
		ลำต้น	60.00	64.64	51.28
DT_2	ไดคลอโรมีเทน	ราก	200.00	0.00	0.00
		ลำต้น	25.68	0.00	0.00
MT_2	เมทานอล	ราก	166.66	0.00	0.00
		ลำต้น	79.54	0.00	0.00

จากผลการทดสอบดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.6 พบว่าสิ่งสกัดในเมทานอลและไดคลอโรมีเทน ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.05 กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาวมากที่สุด ในขณะที่เฮกเซนไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาว นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้น เปรียบเทียบกับความยาวของรากและลำต้นของผักกาดขาว เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้น ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)ดังแสดงในรูปที่ 2.5







แกนตั้ง -แสดงเปอร์เซนต์ความยาว

แกนนอน -แสดงความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

<u>รูปที่ 2.5</u> กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้นของผักกาดขาว เมื่อได้รับสารจากสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.9.3 การศึกษาความสามารถในการยับยั้ง CELL LINES

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง CELL LINES ของสิ่งสกัดจากผักเบี้ยหิน แสดงดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง CELL LINES ของสิ่งสกัดจากผักเบี้ยหิน

CELL LINES	Crude Extract I C_{50} (ug / ml) (n=3)		
	HT_2	DT_2	MT_2
Human Casopharyngeal Carcinoma(KB)	-	10	10
Human Carcinoma of Stomach	-	1	10
Human Leukemia (HL-60)	-	10	10
Human Mammary Cancer	-	10	10
K562	-	-	-
Human Carcinoma of Esophagus	-	-	-
Human Pulmonary Carcinoma	-	-	-

สัญลักษณ์ - แสดงว่าไม่มีความสามารถในการยับยั้ง

หมายเหตุ วิธีการทดลองจะแสดงอยู่ภาคผนวก

2.10 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดเฮกเซน

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดจากผักเบี้ยหินพบว่ามีการสกัด 2 วิธีด้วยกันซึ่งจะเลือกการสกัดวิธีที่ 2 มาทำการหาองค์ประกอบทางเคมี ทั้งนี้เนื่องจากการสกัดวิธีที่ 1 ปริมาณสารที่อยู่ในสิ่งสกัดเฮกเซนมีปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งสกัดเฮกเซนในการสกัดวิธีที่ 2 ในขณะเดียวกันสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากการสกัดวิธีที่ 1 มีปริมาณน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบสิ่งสกัดที่เหมือนกันในการสกัดวิธีที่ 2 นั้นแสดงให้เห็นว่าการสกัดในครั้งที่ 1 ในการสกัดด้วยเอทานอลน่าจะมีน้ำปนด้วย จึงทำให้การสกัดด้วยเฮกเซนในสิ่งสกัดเอทานอลมีการดึงเอาส่วนที่มีขั้วออกมาด้วยทำให้สิ่งสกัดที่น่าจะอยู่ในชั้นไดคลอโรมีเทนมาอยู่ในสิ่งสกัดเฮกเซนแทน ซึ่งทำให้การแยกเกิดข้อผิดพลาดขึ้นและทำให้สิ่งสกัดในไดคลอโรมีเทนมีปริมาณน้อย

2.10.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสิ่งสกัดเฮกเซนจำนวน 50.0 กรัม มาแยกหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตรยาว 116 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 เบอร์ 7734 หนัก 600 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามากคือ เฮกเซน สารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล และเมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาจากคอลัมน์ครั้งละ 600 ลูกบาศก์เซนติเมตรแล้วนำแต่ละส่วนที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออก เก็บสารละลายแต่ละส่วนลงในขวดรูปกรวยปริมาตร 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่โดยใช้ธินเลเยอร์โครมาโทกราฟีตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น แล้วรวมส่วนที่เหมือนกันเก็บไว้เข้าด้วยกันนำส่วนที่มีสารไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ซึ่งผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซนแสดงดังตารางที่ 2.8

ตารางที่2.8 แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเฮกเซน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
HT_21	เฮกเซน	1-4	ของเหลวขุ่นและผลึกสีขาว	1.4531
HT_22	เฮกเซน	5-16	น้ำมันสีเหลืองเข้มมีตะกอนขาว	2.0088
HT_23	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (19:1-4:1)	17-35	น้ำมันสีเหลืองเข้มมีตะกอนขาว	1.6623
HT_24	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:1-7:3)	36-47	น้ำมันสีเหลืองมีตะกอนขาว	1.7258
HT_25	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (13:7)	48-54	น้ำมันสีส้มมีผลึกเข็มสีขาว	2.9300
HT_26	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)	55-59	น้ำมันสีเหลืองอ่อนมีผลึกเข็มสีขาว	2.0997
HT_27	ไดคลอโรมีเทน	60-70	น้ำมันสีเหลืองดำมีของแข็งสีขาว	5.1677
HT_28	ไดคลอโรมีเทน: เมทานอล(19:1)	71-77	น้ำมันสีเหลืองดำมีของแข็งสีขาว	5.1339
HT_29	เมทานอล	78-84	น้ำมันสีเหลืองดำ	7.2123

2.11 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน

2.11.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี นำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจำนวน 80.0 กรัม มาแยกหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร ยาว 116 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 เบอร์ 7734 หนัก 1000 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามากคือสารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล และเมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาจากคอลัมน์ครั้งละ 600 มิลลิลิตร แล้วนำแต่ละส่วนที่ได้ไประเหยเอา

ตัวทำละลายออก เก็บสารละลายแต่ละส่วนลงในขวดรูปกรวยปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำแต่ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่โดยใช้ธินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น แล้วรวมส่วนที่เหมือนกันเก็บไว้ด้วยกัน นำส่วนที่มีสารไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ซึ่งผลการแยกสารของสิ่งสกัดในไดคลอโรมีเทนแสดงดังตารางที่ 2.9

ตารางที่2.9 แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดในไดคลอโรมีเทนโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$DT_2$1	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(9:1)	1-26	น้ำมันสีแดง	2.7058
$DT_2$2	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(4:1)	27-48	น้ำมันสีส้มมีตะกอนสีขาว	1.7153
$DT_2$3	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (7:3)	49-59	น้ำมันสีเหลืองมีตะกอนสีขาว	0.7073
$DT_2$4	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (13:7)	60-77	น้ำมันสีเหลืองมีตะกอนสีขาว	5.6365
$DT_2$5	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)	78-103	มีผลึกเข็มสีขาว	10.0168
$DT_2$6	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)	104-115	น้ำมันเหลืองดำมีผลึกเข็มสีขาว	0.9798
$DT_2$7	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(3:2)	116-127	น้ำมันเหลืองดำมีตะกอนเป็นเม็ดสีขาว	0.7981
$DT_2$8	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)	128-135	น้ำมันเหลืองดำมีตะกอนสีเหลือง	3.2570
$DT_2$9	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน(1:1)	136-145	น้ำมันสีดำ	2.1345
$DT_2$10	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:1)	146-171	น้ำมันสีดำมีผลึกเป็นเม็ดสีเหลือง	1.5399

ตารางที่2.9(ต่อ)แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนโดยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$DT_2$11	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:7)	172-195	น้ำมันสีดำมีผลึกเป็นแผ่นสีเหลือง	1.0543
$DT_2$12	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4)	196-205	น้ำมันสีเหลืองดำมีผลึกสีขาว	0.8003
$DT_2$13	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (1:4)	206-219	น้ำมันสีเหลืองดำมีผลึกสีเหลือง	1.0219
$DT_2$14	ไดคลอโรมีเทน	220-250	น้ำมันสีดำ	0.8944
$DT_2$15	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (19:1)	251-277	น้ำมันสีดำ	14.2315
$DT_2$16	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล(7:3)	278-282	น้ำมันสีดำมีตะกอนสีขาวขุ่น	5.2733
$DT_2$17	เมทานอล	283-298	ของเหลวสีดำแดงมีผลึกเป็นเม็ด	25.7117

2.12 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสิ่งสกัดเมทานอล

2.12.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดเฮกเซนด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสิ่งสกัดเมทานอลจำนวน 112.0 กรัม มาแยกหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร ยาว 116.0 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60 เบอร์ 7734 หนัก 1000.0 กรัม ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเรียงตามความมีขั้วจากน้อยไปหามากคือสารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ไดคลอโรมีเทน สารละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล และเมทานอล เก็บสารละลายที่ชะออกมาจากคอลัมน์ครั้งละ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำแต่ละส่วนที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออก เก็บสารละลายแต่ละส่วนลงในขวดรูปกรวยปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำแต่

ละส่วนมาทดสอบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกันหรือไม่โดยใช้ธินแลร์โครมาโทกราฟีตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น แล้วรวมส่วนที่เหมือนกันเก็บไว้เข้าด้วยกัน นำส่วนที่มีสารไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ซึ่งผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอลแสดงดังตารางที่ 2.10

ตารางที่2.10 แสดงผลการแยกสารของสิ่งสกัดในเมทานอลโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รหัส	ตัวทำละลาย	ลำดับส่วนที่	ลักษณะสาร	น้ำหนักสาร (กรัม)
$MT_2$1	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:2)	1-2	น้ำมันสีเหลืองเข้มมีกลิ่นเหม็น	1.7518
$MT_2$2	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (2:3)	3-4	น้ำมันสีเหลืองมีกลิ่นหอม	2.2546
$MT_2$3	เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน (3:7)	5-6	น้ำมันสีเหลืองน้ำตาล	7.9123
$MT_2$4	ไดคลอโรมีเทน	7-15	น้ำมันสีดำ	14.1885
$MT_2$5	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (9:1)	16-27	น้ำมันสีน้ำตาลดำมีตะกอนสีขาว	13.5722
$MT_2$6	ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)	28-45	ของเหลวสีน้ำตาลดำ	21.6174
$MT_2$7	เมทานอล	46-63	ของเหลวสีน้ำตาล	40.0069

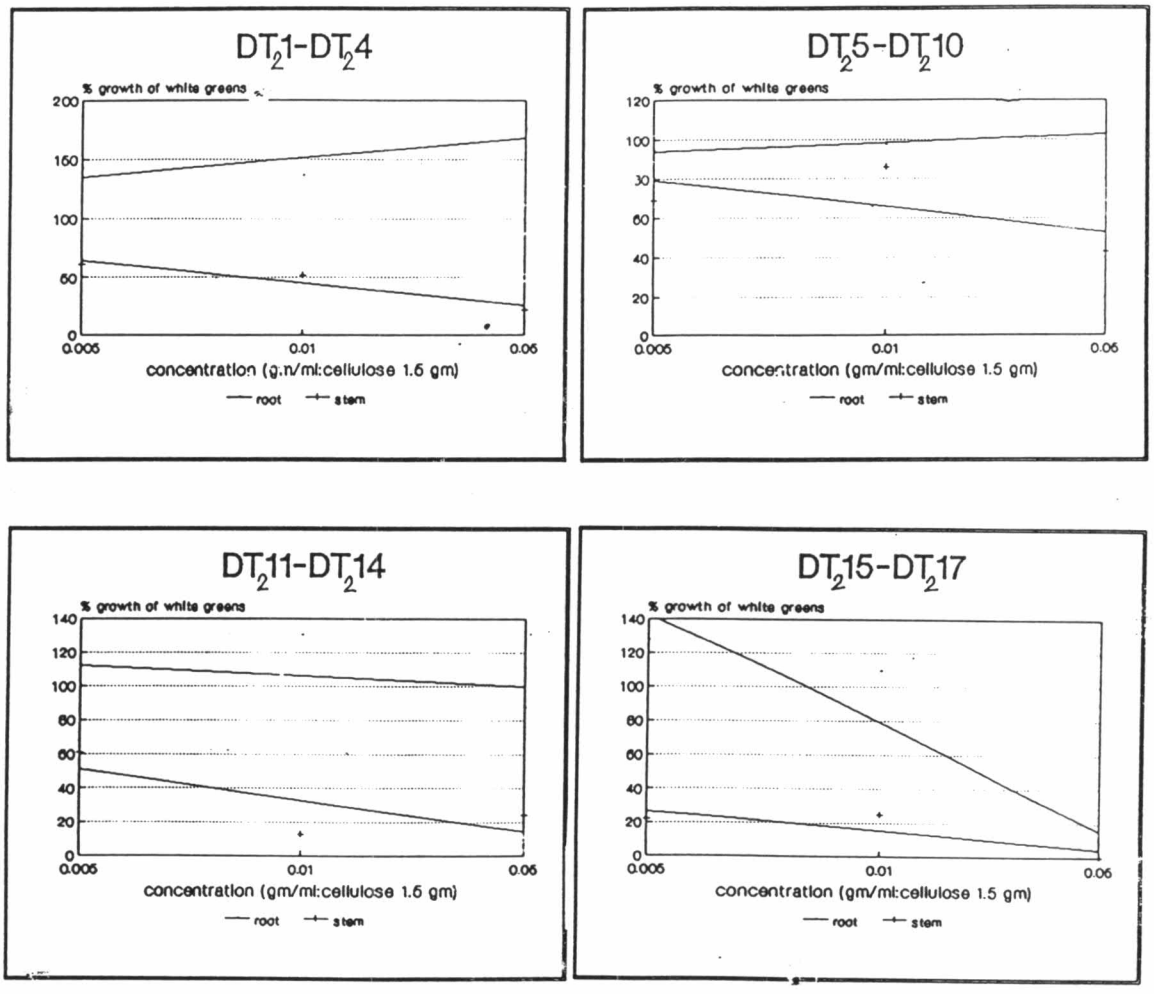
2.1 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสิ่งสกัดที่แยกจากวิธีทางโครมาโทกราฟี

นำสารส่วนที่แยกได้จากสิ่งสกัดในส่วนที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาวคือสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนและเมทานอลมาทำการทดสอบโดยจัดเป็นกลุ่มๆ เพื่อสะดวกในการติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพและประหยัดสารที่นำมาใช้ในการทดสอบด้วยซึ่งให้ผลการทดสอบได้แสดงดังตารางที่ 2.11

ตารางที่ 2.11 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นผักกาดขาวของสารที่แยกจากคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ช่วงรหัส	ส่วนที่ศึกษา	เปอร์เซนต์คว เมียาวที่ความเข้มข้นต่างๆ		
		0.005	0.01	0.05
DT_21-DT_24	ราก	142.42	136.36	175.75
	ลำต้น	61.32	52.27	22.05
DT_25-DT_210	ราก	93.93	96.96	103.03
	ลำต้น	69.18	85.50	43.20
DT_211-DT_214	ราก	100.00	130.30	87.87
	ลำต้น	61.33	12.39	24.17
DT_215-DT_217	ราก	127.27	109.09	0.00
	ลำต้น	22.05	24.77	0.00
MT_21-MT_23	ราก	116.21	0.00	0.00
	ลำต้น	9.74	0.00	0.00
MT_24-MT_25	ราก	91.89	122.10	140.54
	ลำต้น	13.93	15.96	17.27
MT_26-MT_27	ราก	167.57	154.05	0.00
	ลำต้น	58.49	22.56	0.00

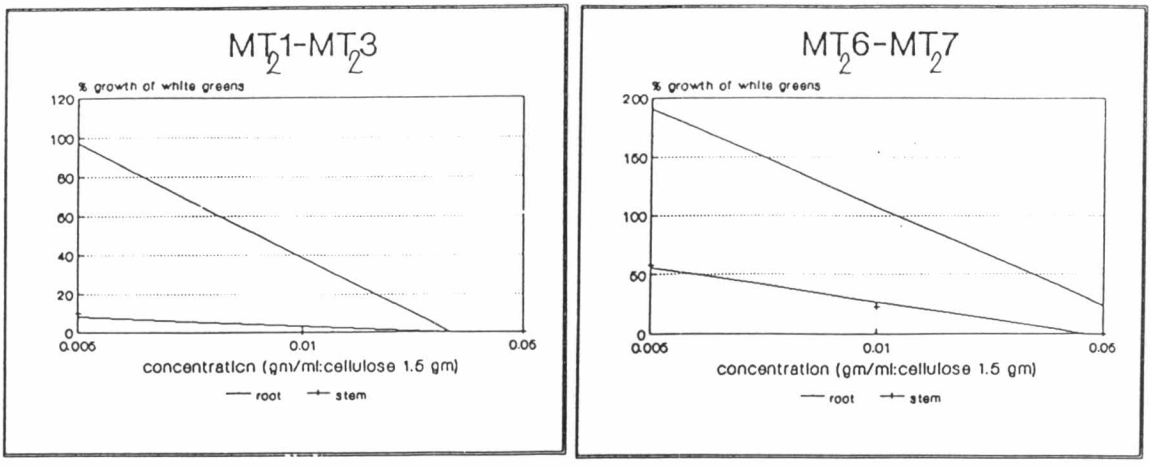
จากผลการทดสอบดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2.11 พบว่าสิ่งสกัดในรหัส $MT_2$1-$MT_2$3 มีฤทธิ์ในการยับยั้งมากที่สุด ซึ่งในสิ่งสกัดรหัส $DT_2$11-$DT_2$14, $DT_2$15-$DT_2$17, $MT_2$1-$MT_2$3, $MT_2$4-$MT_2$5 และ $MT_2$6-$MT_2$7 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากของผักกาดขาวได้ นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้นเปรียบเทียบกับความยาวของรากและลำต้นของผักกาดขาว เมื่อไม่ได้รับสารเหล่านี้ กับความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ โดยแกนตั้งเป็นเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้น ส่วนแกนนอนเป็นความเข้มข้นของสิ่งสกัดที่ใช้ (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

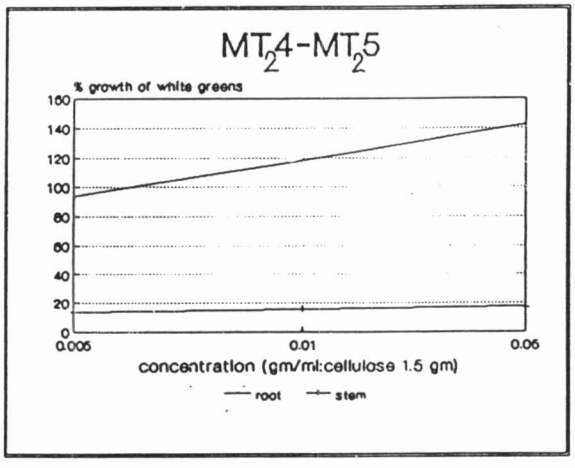


แกนตั้ง — แสดงเปอร์เซนต์ความยาว

แกนนอน—แสดงความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

<u>รูปที่ 2.6</u> กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้นของผักกาดขาว เมื่อได้รับสารจากสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ





แกนตั้ง — แสดงเปอร์เซนต์ความยาว

แกนนอน—แสดงความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

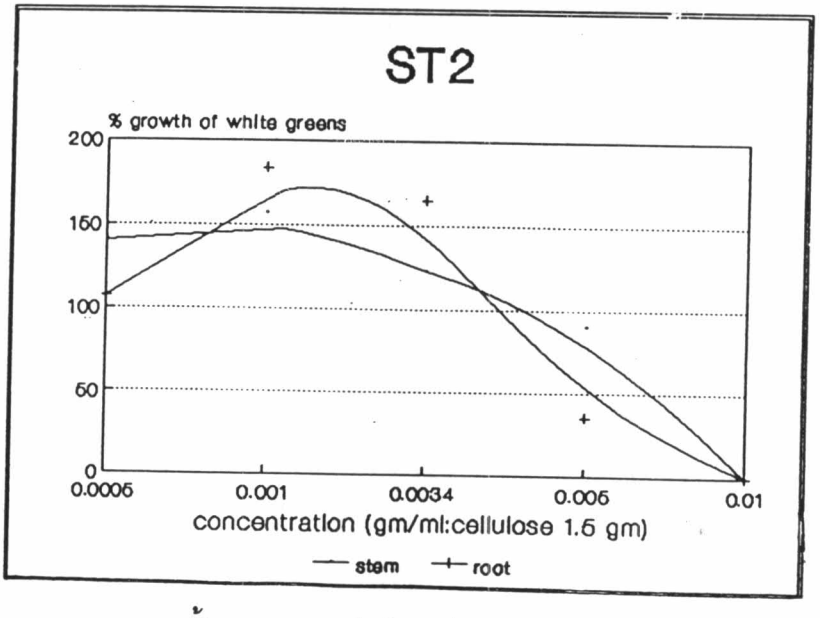
<u>รูปที่ 2.6</u> (ต่อ) กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้นของผักกาดขาว เมื่อได้รับสารจากสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

ในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพกับผักกาดขาว จากการสังเกตพบว่าในส่วนที่มีแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพจะอยู่ในส่วนที่มีขั้วมากๆ ดังนั้นจึงนำสารที่ตกผลึกออกมาได้ในส่วนนั้นมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2.12

ตารางที่ 2.12 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่ตกผลึกออกมา

รหัส	ส่วนที่ศึกษา	เปอร์เซนต์ความยาวที่ความเข้มข้นต่างๆ				
		0.0005	0.0010	0.0034	0.0050	0.0100
ST_2	ต้น	140.00	156.67	123.33	90.90	0.00
	ราก	106.90	183.83	164.36	35.35	0.00

จากการทดสอบพบว่าในช่วงความเข้มข้นที่มากกว่า 0.0034 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของผักกาดขาวได้ ในขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.0034 กรัมต่อเซลลูโลส 1.5 กรัม ช่วยทำให้ผักกาดขาวเจริญเติบโตดี



แกนตั้ง -- แสดงเปอร์เซน ความยาว

แกนนอน----แสดงความเข้มข้นของสาร (กรัม:เซลลูโลส 1.5 กรัม)

รูปที่ 2.7 กราฟแสดงเปอร์เซนต์ความยาวของรากและลำต้นของผักกาดขาว เมื่อได้รับสารจากสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

2.14 การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารในสิ่งสกัดเฮกเซน

จากการแยกสารของสิ่งสกัดเฮกเซน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าสามารถแยกสารออกมาได้ด้วยการตกผลึกด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของผักเบี้ยหินที่ได้จากการผ่านคอลัมน์มีดังนี้

การทำสาร ก ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ก มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาว ได้จากลำดับส่วนที่ 1-4 (HT_21) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี และเมื่อนำสาร ก มาตกผลึกด้วยแอซิโตน-เฮกเซนจะได้ผลึกแผ่นแววาวสีขาวหนัก 0.0207 กรัม จุดหลอมเหลว 54-56 องศาเซลเซียส สาร ก ละลายได้ดีในเฮกเซน แต่ละลายได้เล็กน้อยในไดคลอโรมีเทนและคลอโรฟอร์ม ไม่ละลายในเอทิลแอซิเตต แอซิโทน และเมทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann Burchard, 2,4-DNP, 5% $FeCl_3$ และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 2920, 2860, 1475, 1375 และ 730-720 ซม.$^{-1}$ ดังแสดงในรูป 2.

จากการทดสอบรีเอเจนต์ต่างๆ และข้อมูลทางอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่า สาร ก น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นจึงนำสาร ก มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 อุณหภูมิของคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียส และการไหลของ N2 50 มิลลิลิตร/นาที) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอน 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 และ 33 ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังรูปที่ 2. จากนั้นจึงสร้างกราฟการเปรียบเทียบมาตรฐานระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง ได้กราฟเส้นตรง ดังรูปที่ 2. เมื่อนำค่า log retention time ของสาร ก มาเทียบกับกราฟ ก็จะสามารถหาจำนวนคาร์บอนของ สาร ก ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.12

ตารางที่ 2.13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรงและสาร ก กับจำนวนคาร์บอน

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน
tetracosane(C_{24})	3.55	0.55	24
pentacosane(C_{25})	4.50	0.65	25
hexacosane(C_{26})	5.77	0.76	26
heptacosane(C_{27})	7.61	0.88	27
octacosane(C_{28})	9.48	0.98	28
nonacosane(C_{29})	12.18	1.08	29
triacontane(C_{30})	15.83	1.20	30
hentriacontane(C_{31})	20.16	1.30	31
dotriacontane(C_{32})	26.43	1.42	32
tritriacontane(C_{33})	34.23	1.53	33
สาร ก	4.65	0.67	25
	5.88	0.77	26
	7.40	0.87	27
	9.46	0.97	28
	12.11	1.08	29
	15.78	1.20	30
	20.21	1.30	31
	26.51	1.42	32
	33.88	1.53	33

การทำสาร ข ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ข มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองเข้ม มีกลิ่นหอม ซึ่งได้จากลำดับส่วนที่ 5-16 ($HT_2$2)และลำดับส่วนที่ 17-35 ($HT_2$3) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งถูกชะออกมาด้วยเฮกเซน เมื่อนำ สาร ข มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล จะได้ผลึกอสัณฐานสีขาวหนัก 0.4103 กรัม จุดหลอมเหลว 68-71 องศาเซลเซียส สาร ข ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตน เอทิลแอซิเตต แต่ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับรีเอเจนต์ 5% $FeCl_3$ และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 2920, 2840, 1730, 1450, 1170 และ 730-720 ซม.$^{-1}$ ดังแสดงในรูป 3.4.

จากการทดสอบรีเอเจนต์ต่างๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่าสาร ข น่าจะเป็นสารประกอบประเภทเอสเทอร์

การทำสาร ค ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ค มีลักษณะเป็นของแข็งอสัณฐานสีขาวในน้ำมันสีเหลืองเข้ม ซึ่งได้จากลำดับส่วนที่ 36-47 ($HT_2$4) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วนที่อยู่ในช่วง 3:1-7:3 และเมื่อนำสาร ค มาตกผลึกด้วยไดคลอโรมีเทน-เมทานอล จะได้ผลึกอสัณฐานสีขาวหนัก 0.6477 กรัม จุดหลอมเหลว 74-79 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.63 (เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 9:1) สาร ค ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน แอซิโตน เอทิลแอซิเตต แต่ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับรีเอเจนต์ 5% $FeCl_3$ และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3630-3210, 2910, 2840, 1460, 1050 และ 730-720 ซม.$^{-1}$ ดังแสดงในรูป 3.5

จากการทดสอบด้วยรีเอเจนต์ต่างๆ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่าสาร ค น่าจะเป็นสารประกอบประเภทแอลกอฮอล์ ดังนั้นจึงนำสาร ค มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊ซโครมา โทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 อุณหภูมิของคอลัมน์ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียส และการไหลของ N_2 50 มิลลิลิตร/นาที) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอัลกอฮอล์โซ่ตรง ที่มีจำนวนคาร์บอน 14, 16, 18, 20 และ 22 ได้แก๊สโครมาโทแกรมดังรูปที่ 3.5 จากนั้นจึงสร้างกราฟการเปรียบเทียบมาตรฐานระหว่างค่า log retention time กับจำนวนคาร์บอนของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรง ได้กราฟเส้นตรง ดังรูปที่ 3.6 เมื่อนำค่า log retention time ของสาร ค มาอ่านเทียบกับกราฟ ก็จะสามารถหาจำนวนคาร์บอนของสาร ค ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.14

ตารางที่ 2.14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์โซ่ตรงกับสาร ค

สาร	retention time (นาที)	log retention time	จำนวนคาร์บอน
tetradecanol(C_{14})	0.94	-0.027	14
hexadecanol(C_{16})	1.24	0.093	16
heptadecnol(C_{18})	1.79	0.253	18
eicosanol(C_{20})	2.83	0.452	20
docosan(C_{22})	4.48	0.651	22
สาร ค	21.75	1.337	30
	25.89	1.413	31
	30.46	1.484	32
	34.19	1.534	33

การทำสาร ง และ จ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ง มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาวในน้ำมันสีส้มในลำดับส่วนที่ 48-54 (HT_25) และผลึกรูปเข็มสีขาวอยู่ในน้ำมันสีเหลืองอ่อน ซึ่งได้จากลำดับส่วนที่ 55-59 (HT_26) ในการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน ในอัตราส่วนที่อยู่ในช่วง 13:7-3:2 เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี พบว่าประกอบด้วยสาร 2 ตัวผสมกันซึ่งไม่ดูดกลืนแสงอุลตาไวโอเลต จึงทำการแยกออกจากกันโดยใช้อาศัยสมบัติการละลาย โดยใช้เฮกเซนที่อุ่นเป็นตัวแยกเนื่องจากสามารถละลายสารตัวหนึ่งจนหมด ในขณะอีกส่วนหนึ่งไม่ละลาย และแยกออกจากกันโดยนำมากรองด้วยกระดาษกรองล้างตะกอนด้วยเฮกเซน จะได้ตะกอนเข็มสีขาว(สาร จ) ปล่อยสารละลายที่กรองได้ทิ้งไว้ จะตกผลึกออกมาเป็นผลึกรูปเข็ม นำมาตกผลึกใหม่ด้วยเฮกเซนร้อน จะได้ผลึกเข็มสีขาวใส 3.6550 กรัม จุดหลอมเหลว 138-142 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.60(เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 3:2) สาร ง จะละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรมีเทน แอซิโตน เอทิลแอซิเตต แต่ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน ไม่ละลายในเมทานอล เอทานอล นอกจากนี้ยังให้ผลบวกกับปฏิกิริยา Liebermann-Berchard และ Br_2 ใน CCl_4

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3630-3210, 2980-2940, 1650-1640, 1460, 1380, 1060-1050, 970, 960 และ 840, 800 ซม.$^{-1}$ ดังแสดงในรูป 3.9

จากการทดสอบด้วยรีเอเจนต์ต่างๆ ข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม และสมบัติทางกายภาพ พบว่าสาร ง น่าจะเป็นสารประกอบประเภทสเตียรอยด์ ดังนั้นจึงนำสาร ง มาทำการวิเคราะห์ด้วยแก๊ซโครมาโทกราฟี (คอลัมน์ OV-1 อุณหภูมิของคอลัมน์ 260 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ injection 290 องศาเซลเซียส และการไหลของ N_2 50 มิลลิลิตร/นาที) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานสเตียรอยด์ที่ประกอบด้วย campesterol, stigmasterol และ β- sitosterol ได้แก๊ซโครมาโทแกรมดังรูปที่ 3.11

ตารางที่ 2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานสเตียรอยด์และสาร ง จากแก๊ซโครมาโทแกรม

สาร	retention time (นาที)	log retention time
campesterol	15.78	1.198
stigmasterol	16.60	1.220
β-sitosterol	18.38	1.264
สาร ง	16.12	1.210
	18.79	1.274

จากแก๊สโครมาโทแกรมพบว่าสาร ง ประกอบด้วย stigmasterol และ β-sitosterol

สาร จ มีลักษณะเป็นผลึกเข็มสีขาวซึ่งแยกออกมาจากสาร ง ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วนที่อยู่ในช่วง 13:7-3:2 และเมื่อนำสาร จ มาตกผลึกใหม่ด้วยไดคลอโรมีเทน-เฮกเซนร้อน จะได้ผลึกเข็มสีขาวหนัก 0.0450 กรัม จุดหลอมเหลว 285-287 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.45 (เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 3:2) สาร จ ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต แต่ละลายได้เล็กน้อยใน แอซิโทน เมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน นอกจากนี้ยังให้สารละลายสีม่วงกับปฏิกิริยา Liebermann Burchard ฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 และให้ผลบวกกับ 2,4-DNP แต่ให้ผลลบกับ 5% $FeCl_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3450, 2935, 2865, 1740, 1695, 1475, 1380, 1305, 1205 และ 1035 ซม.$^{-1}$ ดังแสดงในรูป 3.16

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 0.7-2.0, 2.15-2.47, 4.37-4.50, 4.8, 5.4 ppm ดังรูปที่ 3.17

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 183.5, 171.12, 160.05, 118.21, 80.95, 55.63, 51.33 ,33.89,33.69, 32.10, 31.66 , 30.95, 30.01, 29.84, 28.95, 28.15, 26.44, 23.88, 23.01, 21.90, 18.93, 17.79, 16.86 และ 15.49 ppm ดังรูปที่ 3.18

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 32.10, 41.35, 49.17, 55.63, 80.95 และ 118.21 ppm ดังรูปที่ 3.19

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนด้านบนที่ 15.49, 16.86, 21.90, 23.01, 26.44, 28.15, 28.95, 32.10, 41.35, 49.17, 55.63, 80.95 และ 118.21 ppm ปรากฏสัญญาณคาร์บอนด้านล่างที่ 17.79, 18.93, 23.88, 30.01, 30.95, 31.66, 33.69, 33.89, 35.67, 37.43 และ 40.89 ppm ดังรูปที่ 3.20

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 482 นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 452, 423, 269, 248, 234, 189, 173, 119, 95 และ 69 ดังรูปที่ 3.21

จากการทดสอบรีเอเจนต์ และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าสาร จ น่าจะเป็นสารประกอบประเภทไทรเทอร์ปีนอยด์ ที่ไม่อิ่มตัวและมีหมู่คาร์บอนิล

2.15 **<u>การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารในสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน</u>**

จากการแยกสารของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าสามารถแยกสารออกมาซึ่งได้สารซ้ำกับในสิ่งสกัดเฮกเซนนั้นคือ

<u>สาร ข</u> ในลำดับส่วนที่ 27-48 ซึ่งชะออกมาด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 4:1 (DT_23) หลังจากตกผลึกใหม่ได้ตะกอนสีขาวหนัก 0.0572 กรัม มีจุดหลอมเหลว 71-72 องศาเซลเซียส

<u>สาร ค</u> ในลำดับส่วนที่ 49-59 และ 60-77 ซึ่งชะออกมาด้วยตัวทำตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 7:3-13:7 (DT_24-DT_25) หลังจากตกผลึกใหม่ได้ตะกอนสีขาวหนัก 0.1297 กรัม มีจุดหลอมเหลว 74-76 องศาเซลเซียส

<u>สาร ง</u> ในลำดับส่วนที่ 78-103 และ 104-115 ซึ่งชะออกมาด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 3:2 (DT_26-DT_27) หลังจากตกผลึกใหม่ได้ผลึกเข็มสีขาวหนัก 2.1097 กรัม มีจุดหลอมเหลว 138-142 องศาเซลเซียส

<u>สาร จ</u> ในลำดับส่วนที่ 116-127 ซึ่งชะออกมาด้วยตัวทำตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วน 3:2 (DT_28) หลังจากตกผลึกใหม่ได้ผลึกเข็มหนาสีขาวหนัก 0.0807 กรัม มีจุดหลอมเหลว 283-285 องศาเซลเซียส

การทำสาร ฉ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ฉ มีลักษณะเป็นผลึกอสัณฐานสีเหลืองในน้ำมันสีดำเหลือง ซึ่งอยู่ในสิ่งสกัดเฮกเซนในลำดับส่วนที่ 71-79 ถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วนที่ 19:1 ($HT_2$7) ซึ่งได้ผลึกออกมาน้อยจึงนำมารวมกับสารที่ได้จากสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนที่อยู่ในลำดับส่วนที่ 128-135 ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วนที่ 3:2 ($DT_2$9) การนำเอาทั้งสองส่วนมารวมกันเนื่องจากเมื่อนำไปทดสอบด้วยธินเลเยอร์โครมาโทกราฟีพบว่าให้จุดที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตตรงกัน เมื่อสารที่สนใจดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีโดยใช้เครื่องโครมาโททรอนคือ ทำการแยกเอาส่วนที่เป็นของแข็งสีเหลืองออกมาก่อนโดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซนแยกเอาส่วนที่เป็นน้ำมันสีดำเหลืองๆออกมา นำของแข็งสีเหลืองมาละลายในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนแล้วทำให้มีปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปผ่านเครื่องโครมาโททรอนตามเทคนิคที่กล่าวแล้วข้างต้น เก็บสารละลายที่ชะออกมาจากเครื่องโครมาโททรอนโดยเก็บตามแถบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งให้ผลการแยกตามตารางข้างล่างนี้

ตารางที่ 2.16 แสดงผลการแยกด้วยเครื่องโครมาโททรอน

ขวดที่	ตัวทำละลาย	ลักษณะของสาร
1	5%เฮกเซน:เอทิลแอซิเตต	สารละลายใส
2	10%เฮกเซน:เอทิลแอซิเตต	สารละลายมีสีเหลืองเล็กน้อย
3	20%เฮกเซน:เอทิลแอซิเตต	สารละลายสีเหลืองเข้ม
4	50%เฮกเซน:เอทิลแอซิเตต	สารละลายสีเหลืองอ่อน
5	100%เอทิลแอซิเตต	สารละลายสีเหลืองเข้ม

จากทั้ง 5 ขวด ขวดที่ 3 ซึ่งมีสารละลายสีเหลืองและมีแถบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตกว้างมาระเหยเอาตัวทำละลายออกจนเหลือในปริมาตรที่เหมาะสม ตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึกได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง กรองและล้างตะกอนด้วยเฮกเซน นำผลึกที่ได้มาตกผลึกใหม่ด้วยไดคลอโรมีเทน-เฮกเซน จะได้ผลึกเข็มสีเหลือง(สาร ฉ)หนัก 0.0117 กรัม จุดหลอมเหลว 242-245 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.49 (เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 3:2) สาร ฉ

ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต แต่ละลายได้เล็กน้อยใน แอซิโตน เมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน นอกจากนี้ยังให้ผลบกับปฏิกิริยา Liebermann Burchard ฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 และให้ผลบวกกับ 2,4-DNP และ 5% $FeCl_3$

โปรตอน เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 12.74, 7.76, 7.73, 7.64, 6.15, 6.12, 2.17 และ 2.11 ppm ดังรูปที่ 3.22

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 102, 106, 107, 110 , 154, 156, 157, 8.05 และ 7.95 ppm ดังรูปที่ 3.23

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 110, 157 และ 161 ppm ดังรูปที่ 3.24

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนด้านบนที่ 110, 157, 161, 8.05 และ 7.95 ppm ดังรูปที่ 3.25

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 206 นอกจากนี้ยังพบพีคที่191,177,163,149,131,103 และ77 ดังรูปที่ 3.26

พบว่าสาร ฉ น่าจะเป็นสารประกอบประเภทอนุพันธ์ของฟีนอล ที่ไม่อิ่มตัวและมีหมู่คาร์บอนิล

การทำสาร ช ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ช มีลักษณะเป็นผลึกอสัณฐานสีเหลืองซึ่งอยู่ในน้ำมันสีดำเหลือง ซึ่งอยู่ในลำดับส่วนที่ 136-171 ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วนในช่วง 3:2-1:1 (HT_28-HT_210) นำสารละลายที่ได้ไปทดสอบธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี พบว่าให้จุดที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตหลายจุดที่ห่างจากกัน เมื่อสารที่สนใจดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี โดยใช้เครื่องโครมาโททรอน การแยกสารที่สนใจออกจากน้ำมันสีดำนั้นใช้สมบัติการละลาย โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซนแยกเอาส่วนที่เป็นน้ำมันสีดำเหลืองออกมา นำของแข็งสีเหลืองมาละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลปริมาณเล็กน้อยแล้วทำให้มีปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปผ่านเครื่องโครมาโททรอนตามเทคนิคที่กล่าวแล้วข้างต้น พบว่าหลังจากชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลแอซิเตต (9:1) จะเกิดการแยกของของแถบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตเป็น 2 แถบ จึงเพิ่มขั้วของตัวทำละลายขึ้นเพื่อให้ทั้ง 2 แถบออก

มาจากเครื่องโครมาโททรอน เก็บสารละลายที่ชะออกมาได้ 5 ขวด ซึ่งให้ผลการแยกตามตารางที่ 2.17

ตารางที่ 2.17 แสดงผลการแยกสารจากเครื่องโครมาโททรอน

ขวดที่	ตัวทำละลาย	ลักษณะของสาร
1	5%เฮกเซน:เอทิลแอซิเตต	สารละลายใส
2	15%เฮกเซน:เอทิลแอซิเตต	สารละลายมีสีเหลืองเล็กน้อย
3	30%เฮกเซน:เอทิลแอซิเตต	สารละลายสีเหลืองเข้ม
4	70%เฮกเซน:เอทิลแอซิเตต	สารละลายสีเหลืองอ่อน
5	100%เมทานอล	สารละลายสีเหลืองเข้ม

นำสารละลายแต่ละขวดมาตรวจสอบด้วยธินเลเยอร์โครมาโทกราฟี พบว่าสารที่สนใจอยู่ใน ขวดที่ 3 จึงนำมาระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้ว พบว่ามีของแข็งสีเหลือง นำมาตกผลึกโดยใช้คลอโรฟอร์มเมทานอลร้อน ปล่อยทิ้งไว้ให้ตกผลึก กรอง ได้ผลึกอสัณฐานสีเหลือง(สาร ช)หนัก 0.0372 กรัม จุดหลอมเหลว 128-130 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.78 (ไดคลอโรมีเทน) สาร ช ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทนเมทานอลร้อน ละลายได้เล็กน้อยในไดคลอโรมีเทน เอทิลแอซิเตต เมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน นอกจากนี้ยังให้ผลลบกับปฏิกิริยา Liebermann Burchard ฟอกจางสี Br_2 ใน CCl_4 และให้ผลบวกกับ 2,4-DNP และ 5% $FeCl_3$

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3390, 3100, 2925, 2855, 1710, 1660, 1629, 1580, 1510, 1470, 1418, 1365, 1300, 1260, 1170, 1100, 1073 และ 840 ซม$^{-1}$ ดังแสดงในรูป 3.28

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 12.21, 10.22, 6.64, 6.30, 6.19, 2.78, 1.56, 1.18 และ 0.72 ดังรูปที่ 3.29

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 194.31, 181.95, 165.39, 161.91, 156.66, 157.55, 109.66, 105.68, 100.00, 94.46, 37.96, 31.61, 30.27, 30.08, 29.38, 29.16, 28.64, 23.00, 22.08 และ 13.83 ppm ดังรูปที่ 3.30

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 109, 100 และ 94.46 ดังรูปที่ 3.32

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณเมทิลและเมไทล์คาร์บอนด้านบนที่ 109, 105, 100 และ 13.83 ppm ปรากฏสัญญาณเมทิลีนคาร์บอนด้านล่างที่ 37.96, 31.61, 30.27, 30.08, 29.38, 29.16, 28.64, 23.47 และ 22.08 ppm ดังรูปที่ 3.31

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 542 นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 514, 500, 486, 472, 458, 445 และ 429 ดังรูปที่ 3.33

จากการทดสอบรีเอเจนต์ และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี พบว่าสาร ช น่าจะเป็นสารประกอบประเภทอนุพันธ์ของฟีนอล ที่ไม่อิ่มตัวและมีหมู่คาร์บอนิล

การทำสาร ฌ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ฌ มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวในน้ำมันสีดำเหลือง อยู่ในลำดับส่วนที่ 196-205 ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอัตราส่วนที่ 1:4 แยกผลึกออกจากน้ำมันสีดำเหลืองโดยใช้สมบัติการละลาย เนื่องจากน้ำมันสีดำเหลืองละลายในเอทิลแอซิเตต ส่วนผลึกไม่ละลาย ละลายน้ำมันสีดำเหลือง แล้วกรองผลึกด้วยกระดาษกรอง ล้างผลึกด้วยเอทิลแอซิเตต นำผลึกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโททรอน โดยนำผลึกที่ได้ไปละลายด้วยไดคลอโรมีเทนร้อนจนมีปริมาตร 2 มิลลิลิตรจึงนำไปผ่านเครื่องโครมาโททรอน ซึ่งถูกชะออกมาด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลแอซิเตตในอัตราส่วน 4:1 ปล่อยสารละลายที่ได้ทิ้งไว้ให้ตกผลึกเอง กรอง จะได้ผลึกเข็มสีขาว (สาร ฌ) หนัก 0.1125 กรัม มีจุดหลอมเหลว 293-294 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.38 (เฮกเซน:ไดคลอโรมีเทน อัตราส่วน 3:2) สาร ฌ ละลายได้ดีใน ไดคลอโรมีเทนร้อน แต่ละลายได้เล็กน้อยในเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซนและเอทิลแอซิเตต

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3420, 3000,2960, 2910 2855 ,1735, 1580, 1505, 1460, 1449, 1410, 1375, 1295, 1270, 1170, 1140, 1120, 1105, 1055, 1040, 1020, 900, 840และ 740 ซม$^{-1}$ ดังแสดงในรูป 3.34

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 7.70, 4.49 และ 2.57 ดังรูปที่ 3.35

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 165, 133, 129และ 62 ดังรูปที่ 3.36

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนด้านบนที่ 129 ppm ปรากฏสัญญาณคาร์บอนด้านล่างที่ 62 ppm ดังรูปที่3.37

จากการทดสอบรีเอเจนต์ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่าสาร ฌ น่าจะเป็นสารประกอบประเภทอนุพันธ์ของอะโรมาติก

<u>การทำสาร ญ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง</u>

<u>สาร ญ</u> มีลักษณะเป็นผลึกอสัณฐานสีเหลืองในน้ำมันสีดำเหลือง ซึ่งอยู่ในลำดับส่วนที่ 206-219 และ 220-250 ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทนในอตราส่วน 1:9 และไดคลอโรมีเทน($HT_2$13-$HT_2$14) นำสารละลายที่ได้ไปทดสอบธินเลเยอร์โครมาโทกราฟีพบว่าให้จุดที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตหลายจุดที่ห่างจากกัน จึงนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีโดยใช้เครื่องโครมาโททรอน คือ ทำการแยกเอาส่วนที่เป็นของแข็งสีเหลืองออกมาก่อนโดยใช้ตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนแยกเอาส่วนที่เป็นน้ำมันสีดำเหลืองออกมา นำของแข็งสีเหลืองที่กรองได้มาละลายในตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลร้อนแล้วทำให้มีปริมาตรประมาณ 2 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปผ่านเครื่องโครมาโททรอนตามเทคนิคที่กล่าวแล้วข้างต้น พบว่าหลังจากชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับเอทิลแอซิเตต(6:4) แล้วจะเกิดการแยกของของแถบการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตเป็นหลายแถบ จึงเพิ่มขั้วของตัวทำละลายขึ้นเพื่อให้แถบออกมาจากเครื่องโครมาโททรอน ซึ่งเก็บสารละลายที่ชะออกมาได้ 7 ขวด ซึ่งให้ผลการแยกจากเครื่องโครมาโททรอนตามตารางที่ 2.18

ตารางที่ 2.18 แสดงผลการแยกสารจากเครื่องโครมาโททรอน

ขวดที่	ตัวทำละลาย	ลักษณะของสาร
1	5%เฮกเซนต่อเอทิลแอซิเตต	สารละลายออกสีเหลืองเล็กน้อย
2	10%เฮกเซนต่อเอทิลแอซิเตต	สารละลายออกสีเหลืองจางๆ
3	40%เฮกเซนต่อเอทิลแอซิเตต	สารละลายใส
4	95%เฮกเซนต่อเอทิลแอซิเตต	สารละลายมีสีเหลืองเข้ม
5	5%เอทิลแอซิเตตต่อเมทานอล	สารละลายสีเหลืองอ่อน
6	10%เอทิลแอซิเตตต่อเมทานอล	สารละลายสีเหลืองอ่อน
7	100%เมทานอล	สารละลายสีเหลืองเข้ม

จากการตรวจสอบด้วยธินเลเยอร์โครมาโทกราฟีซึ่งสารที่สนใจคือสารที่อยู่ในขวดที่ 4 และ 5 จึงนำไประเหยเอาตัวทำละลายออก นำสารที่ได้มาละลายด้วยไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลร้อน ปล่อยทิ้งไว้ให้ตกตะกอน กรองและล้างตะกอนด้วยไดคลอโรมีเทน จะได้สารที่มีผลึกเข็มสีเหลือง นำผลึกที่ได้ผ่านเครื่องโครมาโททรอนอีกครั้ง จะได้ผลึกรูปเข็มสีเหลือง (สาร ญ) มีน้ำหนัก 0.0172 กรัม มีจุดหลอมเหลว 257-259 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.54 (ไดคลอโรมีเทน) สาร ญ ละลายได้ดีในเมทานอลไดคลอโรมีเทนร้อน แต่ละลายได้เล็กน้อยในเมทานอลร้อน ไดคลอโรมีเทนร้อน ไม่ละลายในเฮกเซน เอทิลแอซิเตต แอซิโตน

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3450, 2855, 2768, 1665, 1625, 1455, 1400, 1375, 1264, 1210, 1135, 960, 850 และ745 ซม.$^{-1}$ ดังแสดงในรูป 3.39

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณโปรตอนที่ 2.12, 2.29, 3.75, 7.00-7.09, 7.15, 7.40, 7.90,10.9 และ 12.97 ppm ดังรูปที่ 3.40

คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 182.84, 162.20, 161.75, 156.89,156.19, 152.57, 133.02, 128.38, 119.67, 117.26, 117.14, 112.97, 108.92, 108.74, 106.55, 60.34, 8.33 และ 8.07 ppm ดังรูปที่ 3.41

DEPT 90 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนที่ 133.02, 128.38, 119.67, 117.14 และ 108.93 ppm ดังรูปที่ 3.41

DEPT 135 คาร์บอน-13 เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม ($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนด้านบนที่ 133.02, 128.38, 119.67, 117.14 , 108.93, 60.34, 8.33 และ 8.07 ppm ดังแสดงในรูปที่ 3.42

แมสสเปกตรัม ปรากฏพีคของไอออนเชิงโมเลกุล (M^+) ที่ 312 นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 297, 282, 179, 165, 151, 121, 89 และ 77 ดังรูปที่ 3.43

จากการทดสอบรีเอเจนต์ และข้อมูลอินฟราเรดสเปกตรัม พบว่าสาร ญ น่าจะเป็นสารประกอบประเภทอนุพันธ์ของฟีนอล ที่ไม่อิ่มตัวและมีหมู่คาร์บอนิล

การทำสาร ฏ ให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้าง

สาร ฏ มีลักษณะเป็นตะกอนสีขาวในน้ำมันสีดำ อยู่ในลำดับส่วนที่ 278-282 ซึ่งถูกชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วนที่ 7:3 แยกตะกอนออกจากน้ำมันสีดำโดยใช้สมบัติการละลาย เนื่องจากน้ำมันสีดำเหลืองละลายในเมทานอล ส่วนตะกอนไม่ละลาย ละลายน้ำมันสีดำเหลือง แล้วกรองผลึกด้วยกระดาษกรอง ล้างผลึกด้วยเมทานอล จะได้ตะกอนสีขาวขุ่น นำตะกอนที่ได้มาตกผลึกซ้ำในเอทานอลร้อน เมื่อตะกอนละลายหมดแล้ว ตั้งทิ้งไว้จนเหลือสารละลายพอสมควร แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น จะได้ตะกอนสีขาวตกลงมา กรองและล้างตะกอนด้วยเมทานอล นำตะกอนที่ได้มาตกผลึกซ้ำหลายๆ ครั้ง จะได้ตะกอนสีขาว(สาร ฏ) หนัก 0.0885 กรัม เมื่อนำมาหาจุดหลอมเหลวพบว่าจะสลายตัวที่ 273 องศาเซลเซียส มีค่า R_f เท่ากับ 0.36 (ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล อัตราส่วน 4:1) สาร ฏ ละลายได้ดีใน เอทานอลร้อน แต่ละลายได้เล็กน้อยในเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน เอทิลแอซิเตต ไดคลอโรมีเทน จากลักษณะดังกล่าวข้างต้นพอจะบอกได้ว่า สาร ฏ ที่ได้เป็นสารประกอบประเภทไกลโคไซด์

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนแสงที่ความถี่ดังแสดงในรูป 3.45

เนื่องจากสาร ฏ เป็นสารประกอบประเภทไกลโคไซด์ ซึ่งละลายได้ยากในตัวทำละลายทั่วๆ ไป ดังนั้นการที่จะนำมาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างจะต้องลดความมีขั้วลง วิธีที่นิยมใช้กันก็คือการเตรียมอนุพันธ์แอซิเตต โดยนำสาร ฏ จำนวน 40 มิลลิกรัม มาทำอะเซทิเลชันดังวิธีที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 2.5 ตกผลึกโดยใช้คลอโรฟอร์ม-เมทานอล จะได้ผลึกเข็มสีขาวจำนวน 25 มิลลิกรัม หาจุดหลอมเหลวได้ 120-123 องศาเซลเซียส ค่า R_f เท่ากับ

0.75 ละลายได้ดีในไดคลอโรมีเทน คลอโรฟอร์ม เอทิลแอซิเตต ละลายได้เล็กน้อยในเฮกเซน และไม่ละลายในเมทานอล

โปรตอนเอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม($CDCl_3$)ปรากฏสัญญาณโปรตอน ดังรูปที่ 3.46

คาร์บอน-13เอ็นเอ็มอาร์สเปกตรัม($CDCl_3$) ปรากฏสัญญาณคาร์บอนดังรูปที่ 3.47

2.15 <u>การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารในสิ่งสกัดเมทานอล</u>

จากการแยกสารของสิ่งสกัดเมทานอล โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีพบว่าสามารถแยกสารออกมาซึ่งได้สารซ้ำกับในสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนคือ

<u>สาร ฎ</u> อยู่ในลำดับส่วนที่ 16-27 ซึ่งชะออกมาด้วยตัวทำตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนกับเมทานอลในอัตราส่วน 9:1 (MT_25) หลังจากตกผลึกใหม่ได้ผลึกอสัณฐานสีขาวหนัก 0.0215 กรัม มีจุดหลอมเหลว 273 องศาเซลเซียส(สลายตัว)

2.16<u>การทำสารให้บริสุทธิ์และการตรวจหาสูตรโครงสร้างของสารที่ตกผลึกลงมาจากการสกัดด้วยเมทานอล</u>

<u>สาร ฎ</u> เป็นสารที่ตกผลึกลงมาหลังจากนำสิ่งสกัดเมทานอลมาระเหยตัวทำละลายออก ผลึกที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกแท่ง เหลี่ยมและเข็ม นำผลึกที่ได้มาตกผลึกใหม่ด้วยน้ำกลั่น ระเหยน้ำออกจนสารละลายเข้มข้นจึงนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมเมทานอลลงไปผลึกก็จะตกลงมา กรองและนำผลึกที่ได้มาทำการตกผลึกใหม่ในลักษณะเหมือนเดิม แต่ปล่อยทิ้งไว้ให้ตกผลึกเองจะได้ผลึกในลักษณะเป็นเข็ม เหลี่ยม และแท่งสีขาว(<u>สาร ฎ</u>) จำนวน 45 กรัม จุดหลอมเหลวว่าสูงกว่า 300 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในน้ำ ส่วนตัวทำละลายชนิดอื่นๆ ไม่ละลาย

อินฟราเรดสเปกตรัม (KBr) แสดงการดูดกลืนที่ความถี่ 3450, 1580, 1440, 1400 และ1020ซม.-1 ดังแสดงในรูป 3.49