

การสักและแยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากขอย และประสิทธิภาพของสาร  
ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด

ปริญญานิพนธ์

ของ

นิคม สาคู

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
สุทนต์ ๑๑ คณะวิทยาศาสตร์ ม. — โทร. ๑๑๒๑๖๗๕-๑๑๑๑๑๑๑

2227

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2522

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การสกัดและแยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากข่อยและประสิทธิภาพ  
ของสารในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด

บทคัดย่อ

ของ

นิคม สาคกร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษิตตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2522

การศึกษานี้มีความมุ่งหมายเพื่อสกัดและแยกสารธรรมชาติจากเปลือกกล้วย เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ตลอดจน ทดสอบสมบัติทางเคมี และกายภาพของสารที่แยกได้

จากผลการทดลองพบว่า สารที่สกัดได้ เมื่อนำไปแยกด้วย Thin-Layer Chromatography จะแยกเป็นสี่แถบ (zone) ซึ่งมีค่า Rf 0, 0.11, 0.24 และ 0.68 ตามลำดับ สารทั้งสี่แถบให้ผลบวก (positive test) กับ Folin-Ciocalteu's reagent แสดงว่า สารทั้งสี่นี้เป็นสารจำพวก phenolic หากเมื่อนำสารที่สกัดได้ดังกล่าว ไปแยกด้วย Column Chromatography จะได้สารออกมาสองส่วน (fraction) ทั้งสองส่วนให้ผลบวกกับ Folin-Ciocalteu's reagent แต่เฉพาะส่วนที่สองของ Column Chromatography และแถบที่สี่ของ Thin-Layer Chromatography จะให้ผลบวกกับ 3, 5-dinitrobenzoic acid ซึ่งแสดงคุณสมบัติของ cardiac glycoside นอกจากนี้ สารในแถบที่หนึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea สารในแถบที่สองยับยั้งการเจริญของเชื้อ Bacillus subtilis และ Sarcina lutea สารในแถบที่ 3-4 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea และ Staphylococcus aureus และสารที่แยกได้จาก Column Chromatography ทั้งสองส่วนยับยั้งการเจริญของเชื้อ Bacillus subtilis และ Sarcina lutea และ Staphylococcus aureus.

ผลการวิจัยทางเภสัชวิทยาเชื้อแบคทีเรีย แสดงว่า crude extract มีผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่า และมีประสิทธิภาพ สูงกว่าสารบาง ๆ ที่แยกออกมาได้เหล่านั้นแต่ละตัว

THE EXTRACTION AND SEPARATION OF NATURAL PRODUCTS  
FROM THE ROOT BARK OF STREBLUS ASPER, LOUR.  
AND THEIR ANTIBACTERIAL EFFECTS

AN ABSTRACT

BY

NIKOM SAKORN

Presented in partial fulfillment of the requirements  
for the Master of Education degree  
at Srinakharinwirot University

February 1979

The purposes of this study are to extract, separate the natural product from the root bark of Streblus asper and their antibacterial effects.

The Thin-Layer Chromatography and Column Chromatography technique are useful for separation of the crude extract. It was found that, by Thin-Layer Chromatography the substances are separated into four zones which have Rf values 0, 0.11, 0.24 and 0.68 correspondingly. All of these give positive test with Folin-Ciocalteu's reagent which show a phenolic character. Substance in zone four shows a cardiac glycoside character by giving a positive test with 3, 5-dinitrobenzoic acid. By Column Chromatography they are separated in two fractions methanol washing, these two fractions also give positive test with Folin-Ciocalteu's reagent and fraction 2 also gives positive test with 3, 5-dinitrobenzoic acid too.

For their antibacterial effects, they were found that zone 1 inhibits Sarcina lutea, zone 2 inhibits Bacillus subtilis zone 3, 4 inhibit Sarcina lutea and Staphylococcus aureus and two fraction from Column Chromatography inhibit Sarcina lutea Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis.

The crude extract indicated higher antibacterial effect than that obtained from the individually separated substance.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตได้พิจารณาปัญหานี้อย่างถี่ถ้วนแล้ว  
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษาหาบัณฑิต  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

๗๖๗ วะวิท ประธาน

๙๖๓ วัดจันทน์ กรรมการ

## ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์เรื่องนี้สำเร็จลงได้ เนื่องจากผู้เขียนได้รับคำแนะนำและการช่วยเหลือเป็นอย่างดีจากอาจารย์กษิธร วสุวัต และ อาจารย์จินดา วงษ์ไวยจินตนา ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์สมเกียรติ กริทอง ผู้เขียนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุก ๆ ท่านแห่งกองอุตสาหกรรมเภสัช สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ความรู้ต่าง ๆ และขอขอบคุณเพื่อน ๆ ที่เป็นแรงใจให้กับผู้เขียน

นิคม สาคกร

## สารบัญ

| บทที่                                                    | หน้า |
|----------------------------------------------------------|------|
| 1 บทนำ                                                   | 1    |
| คำนำ                                                     | 1    |
| จุดมุ่งหมายของการศึกษาคนควา                              | 2    |
| ความสำคัญของการศึกษาคนควา                                | 2    |
| ขอบเขตของการศึกษาคนควา                                   | 3    |
| นิยามศัพท์เฉพาะ                                          | 3    |
| 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาคนควา                    | 5    |
| 3 วิธีดำเนินการ                                          | 17   |
| สกัดสารจากเปลือกกรากขอย โดยใช้สารละลาย                   | 17   |
| การทดลองใช้ Thin-Layer Chromatography แยกสารที่สกัดได้   |      |
| จากเปลือกกรากขอย                                         | 17   |
| การทดลองหาการดูดกลืนแสง ultraviolet                      | 20   |
| การทดลองหาปริมาณสารที่แยกได้ด้วย Thin-Layer              |      |
| Chromatography                                           | 20   |
| การทดลองแยกสารจากเปลือกกรากขอยด้วย Column                |      |
| Chromatography                                           | 20   |
| การทดลองหาปริมาณสารที่แยกได้ด้วย Column Chromatography   | 21   |
| การทดสอบสารที่แยกได้กับสารเคมีบางชนิด                    | 21   |
| การทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารที่แยกได้ |      |
| จากเปลือกกรากขอย                                         | 22   |

| บทที่                                                                            | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------|------|
| 4 ผลการค้นคว้า                                                                   | 24   |
| ตัวอย่างที่เหมาะสมของ Thin-Layer Chromatography                                  | 24   |
| ปริมาณของสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography<br>และ Column Chromatography  | 26   |
| ผลการตรวจสอบกับสารเคมีบางชนิด                                                    | 26   |
| ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการหาเชื้อของแบคทีเรียของสารที่<br>แยกได้จากเปลือกกรากขอย | 28   |
| 5 บทย่อ สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ                                           | 32   |
| บทย่อ                                                                            | 32   |
| จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า                                                    | 32   |
| ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า                                                         | 32   |
| สรุปผลการค้นคว้า                                                                 | 33   |
| อภิปรายผลการทดลอง                                                                | 34   |
| ข้อเสนอแนะ                                                                       | 36   |
| บรรณานุกรม                                                                       | 37   |
| ภาคผนวก                                                                          | 40   |

## บัญชีตาราง

| ตาราง                                                                                            | หน้า |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 สารที่แยกได้จากเปลือกกรากข่อยโดยการสกัดด้วย diethyl ether และ<br>chloroform                    | 7    |
| 2 สารที่แยกได้จากเปลือกกรากข่อยโดยการสกัดด้วย diethyl ether และ<br>chloroform ที่เป็นอสังฐาน     | 8    |
| 3 สารที่ได้อจากการไฮโดรไลซ์ glycoside I                                                          | 9    |
| 4 สารที่แยกได้จากกรากและเปลือกข่อยด้วยวิธี Paper Chromatography                                  | 12   |
| 5 สารที่ได้อจากการไฮโดรไลซ์ glycoside II                                                         | 13   |
| 6 ขอบบ่งบการการของสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography                                      | 24   |
| 7 ขอบบ่งบการการของสารที่แยกได้จาก Column Chromatography                                          | 25   |
| 8 การทดสอบสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography กับสารเคมี<br>บางชนิด                        | 27   |
| 9 การทดสอบสารที่แยกได้จาก Column Chromatography กับสารเคมี<br>บางชนิด                            | 27   |
| 10 ประสิทธิภาพของสารจากเปลือกกรากข่อยในการฆ่าเชื้อ<br><u>Bacillus subtilis</u>                   | 29   |
| 11 ประสิทธิภาพของสารจากเปลือกกรากข่อยในการฆ่าเชื้อ <u>Sarcina lutea</u>                          | 30   |
| 12 ประสิทธิภาพของสารจากเปลือกกรากข่อยในการฆ่าเชื้อ <u>Staphylococcus</u><br><u>aureus</u>        | 31   |
| 13 ปริมาณสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography ที่มีค่า Rf<br>ต่าง ๆ จากการใช้ plate สามแผ่น | 41   |
| 14 ตัวทำละลายและผลการแยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากข่อย                                             | 42   |

## บัญชีภาพประกอบ

| ภาพประกอบ                                                               | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------|------|
| 1    ฝั่งแสดงภาพ Chromato plate                                         | 19   |
| 2    การแยกสารด้วย Column Chromatography                                | 43   |
| 3    การดูดกลืนแสง UV ของสารแถบที่หนึ่งจาก Thin-Layer<br>Chromatography | 44   |
| 4    การดูดกลืนแสง UV ของสารแถบที่สองจาก Thin-Layer<br>Chromatography   | 45   |
| 5    การดูดกลืนแสง UV ของสารแถบที่สามจาก Thin-Layer<br>Chromatography   | 46   |
| 6    การดูดกลืนแสง UV ของสารแถบที่สี่ จาก Thin-Layer<br>Chromatography  | 47   |
| 7    การดูดกลืนแสง UV ของสารส่วนที่หนึ่งจาก Column<br>Chromatography    | 48   |
| 8    การดูดกลืนแสง UV ของสารส่วนที่สองจาก Column<br>Chromatography      | 49   |

บทนำ

คำนำ

การดำรงชีวิตของมนุษย์นั้น มีความสำคัญอย่างใกล้ชิดกับพืช ในชั้นแรกมนุษย์มักจะแสวงหาพืชเป็นอาหาร และขั้นต่อไปก็คือ การแสวงหาพืชเพื่อนำมาใช้บำบัดโรคภัยไข้เจ็บก่อนที่จะมียารักษาโรคสมัยใหม่ที่ใช้กันอยู่ทุกวันนี้ มนุษย์ได้ใช้พันธุ์ไม้จากธรรมชาติรักษาโรคกันมาก่อน และในปัจจุบันนี้ก็ยังมีใช้กันอยู่ ยาด่าง ๆ จำนวนไม่น้อยที่ได้มาทั้งทางตรงและทางอ้อมจากสมุนไพร เช่น แพงพวยฝรั่ง (*Vinca rosea* Linn.) มีสาร vinblastine และ vincristine มีฤทธิ์ในการบำบัดโรคมะเร็ง (วิเชียร จีรวงศ์ 2520 : 43) ระบาย (*Rawofia serpentina*) ใช้เป็นยารักษาโรค การศึกษาคุณสมบัติในทางยา (therapeutic value) ของสมุนไพรว่าใช้ได้จริงหรือไม่ มีควาเทียบเคียงได้กับยาอะไรเป็นพินัยเล็กน้อยอย่างไร ทั้งนี้ การทดสอบจาก crude extracts เกี่ยวกับคุณสมบัติดังกล่าวได้ทำกันมานาน แต่การศึกษาทางเคมี (chemical examination) ที่เกี่ยวกับการแยก (separation) การทำให้บริสุทธิ์ (purification) และการหาสูตรโครงสร้างยังไม่กว้างขวาง (เทพ เชียงทอง 2520 : 47)

ข่อย (*Streblus asper*, Lour.) เป็นพืชขนาดกลาง ลำต้นสูงประมาณ 4 ถึง 10 เมตร ใบเล็กหนาแข็งและลากคล้ายกระดาษทราย ดอกเล็กสีขาว ๆ เหลือง ๆ เมล็ดกลมสีขาว คล้ายคลึงกับเมล็ดพริกไทยอ่อน ข่อยชอบขึ้นตามริมแม่น้ำลำคลองและที่ลุ่มชื้นแฉะ เป็นไม้ที่ทนต่อดินฟ้าอากาศ เปลือกต้นข่อยใช้ทำกระดาษเรียกว่า กระดาษข่อยหรือทำเป็นสมุนไพร เรียกว่าสมุนไพรข่อย กระดาษและสมุคที่ทำด้วยเปลือกข่อยนี้สามารถเก็บไว้ได้นานมากโดยไม่ตัวสัควิน แชกอินดู ใช้กักกันข่อยยู่กันทำให้มันทนทาน ส่วนใบข่อยทางภาคเหนือของไทยใช้ย่างไฟให้เคืองกรอบ ชงน้ำด่างใบข่อยรับประทานเป็นยาระบายท้องอ่อน ๆ เปลือกรับประทานเป็นอายุวัฒนะ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร ขับผายลม แก้ท้องขึ้นอืดเฟ้อ

รากใช้รักษาบาดแผล ตามสรรพคุณโบราณกล่าวว่า ขอยรสเบื่อเมา เปลือกคั้นพิษในกระดูก และในเส้นเอ็น แก้กโรคฟันผุ แก่พยาธิผิวหนัง คั้นพิษทั้งปวง หุงเป็นน้ำมันทาแก้โรคผิวหนัง (เส่งี่ยม พงษ์บุรุษ 2508 : 119) ชาวอินเดียได้รวบรวมพืชสมุนไพรและรายงานว่าเป็นเลือกขอยที่ใช้ทำเป็นยาต้มใช้แก้ไข้ แก้กโรคบิด (dysentary) โรคท้องร่วง (diarrhoea) โรคเกี่ยวกับไขมัน และใช้แก้พิษงู ยาง (milky juice) สามารถฆ่าเชื้อโรคได้ เปลือกมีสารที่มีรสขม สลีสรร วสุวัต และ พรสวรรค์ คินยบุตร ได้สกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของขอย เพื่อตรวจดูว่าสารที่สกัดได้จากส่วนใดที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และจากการตรวจพบว่า สารที่สกัดได้จากเปลือกกรากขอยสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้ คือ Sarcina Lutea, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis ดังนั้น การวิจัยครั้งนี้ จะทำการสกัด (extract) และแยก (separate) สารธรรมชาติจากเปลือกกรากขอย เพื่อที่จะได้สารบางชนิดที่อาจมีสมบัติในทางยา ซึ่งอาจใช้เป็นยาแทนยาปฏิชีวนะ หรือใช้เป็นยาในการบำบัดรักษาโรค อันเป็นการใช้สมุนไพรที่มีในประเทศให้เกิดประโยชน์

#### จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษากรรมวิธีที่เหมาะสมในการ สกัดและแยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากขอย
2. ศึกษาสมบัติทางค่านเคมีและกายภาพของสารธรรมชาติที่แยกได้จากเปลือกกรากขอย โดยศึกษา
  - การดูดกลืนแสง ultraviolet (UV-absorption maxima)
  - การทดสอบสารที่แยกได้กับ reagent บางชนิด
3. ทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดของสารที่แยกได้

#### ความสำคัญของการศึกษาค้นคว้า

1. การวิจัยครั้งนี้ทำให้สามารถสกัดและแยกสาร ธรรมชาติบางอย่างที่มีอยู่ในเปลือกกรากขอย

2. เทคนิคและวิธีการในการทำวิจัยครั้งนี้ สามารถนำไปดัดแปลงใช้ในการสกัดและแยกสารธรรมชาติ ซึ่งมีอยู่ในพืชไค้กว้างขวาง

3. สารที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย อาจนำมาใช้เป็นยาได้

### ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

① สกัดสารธรรมชาติบางอย่างที่มีอยู่ในเปลือกรากข่อย โดยใช้ hexane, diethyl ether, methanol เป็นตัวทำละลายตามลำดับ

② แยกสารธรรมชาติที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยใช้วิธี Chromatography แบบ Thin-Layer Chromatography และ Column Chromatography

3. ศึกษาเกี่ยวกับ

คุณภาพวิเคราะห์ ทำการตรวจหาสมบัติการดูดกลืนแสงของสารธรรมชาติที่แยกได้ด้วย UV-spectrophotometer ตรวจค่า Rf จาก Thin-Layer Chromatography และคุณสมบัติทางเคมีกับ Chemical reagent บางชนิด

ปริมาณวิเคราะห์ตรวจหาปริมาณสารธรรมชาติที่แยกได้

④ ทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารที่แยกได้กับเชื้อ Bacillus subtilis, Sarcina lutea, Staphylococcus aureus.

### นิยามศัพท์เฉพาะ

1. ข่อย ไผ่ยืนคนขนาดกลาง ลำต้นสูงประมาณ 4 ถึง 10 เมตร มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Streblus asper, Lour. ใบเล็กหนาแข็งสาก ดอกเล็กสีขาว ๆ เหลือง ๆ ชอบขึ้นตามริมแม่น้ำลำคลองและที่ชุ่มชื้นแฉะ มีชื่อเรียกอย่างอื่นอีก เช่น สมผอ สมพอ (จังหวัดหนองคายและภาคเหนือ)

2. เปลือกรากข่อย หมายถึง ส่วนของรากข่อยที่แยกเอาส่วนที่เป็นเนื้อไม้ (woody) ออกแล้ว

3. สมุนไพรมายถึง ยาที่ได้จากพฤษชาติ สัตว์ หรือแร่ ซึ่งยังมีไคโมสมปรงหรือแปรสภาพ

4. Chromatography หมายถึง ขบวนการแยกสารออกจากสารผสม โดยอาศัยหลักการแพร่ของสารในตัวทำละลายต่างชนิดกันไม่เท่ากัน และสารจะถูกดูดซับ (adsorb) ได้ไม่เท่ากัน ดังนั้น เมื่อสารผสม (mobile phase) ไหลผ่านตัวกลาง (stationary phase) ที่เหมาะสม สารต่าง ๆ ในส่วนผสมจะเคลื่อนตัวไปด้วยอัตราเร็วที่ไม่เท่ากัน ด้วยเหตุนี้นี้ จึงทำให้สารผสมแยกออกจากกันได้

5. Thin-Layer Chromatography คือ ขบวนการ Chromatography ที่ใช้ตัวดูดซับบางชนิด เช่น silica gel, alumina เคลือบหรือฉาบเป็นผิวบาง ๆ บนแผ่นโลหะหรือแผ่นแก้ว แล้วให้ตัวชะ (eluent) เคลื่อนที่ไปตามแผ่นโลหะหรือแผ่นแก้วจากสมบัติที่สารต่าง ๆ ถูกดูดซับและละลายในตัวทำละลายต่าง ๆ ไม่เท่ากัน ทำให้สารต่าง ๆ แยกออกจากกันได้

6. Column Chromatography เป็นขบวนการ Chromatography ที่ให้สารที่เป็นตัวดูดซับบรรจุอยู่ใน column เมื่อใส่สารผสมลงไปแล้วก็ใส่ตัวชะตามลงไป สารผสมจะถูกดูดซับและเคลื่อนที่ไปตาม column ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ทำให้สารผสมแยกออกจากกันได้

7. ค่า Rf หมายถึง ค่าคงที่ซึ่งแสดงสมบัติเฉพาะตัวของสารเคมีแต่ละชนิดในตัวทำละลายตัวใดตัวหนึ่งและที่ภาวะหนึ่ง ที่ใช้ในขบวนการ Thin-Layer Chromatography ค่า Rf นี้ได้จากอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อตัวชะหรือตัวทำละลายเคลื่อนที่ไป

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

ฟ.ร.

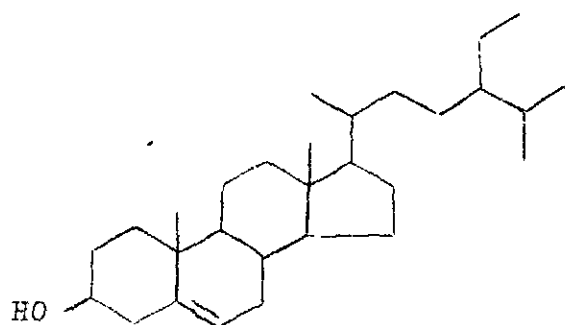
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาค้นคว้า

Krishnamurti และ Subrahmanyam ได้สกัดเอนไซม์ที่มีสมบัติทำให้นม  
ตกตะกอน (milk clotting) จากข่อย โดยใช้เอนไซม์จากใบและกิ่งข่อย  
(Krishnamurti and Subrahmanyam. 1948 : 106) ในปี 1949 Dastur  
ได้รวบรวมพืชที่มีเอนไซม์ที่ทำให้นมตกตะกอน เพื่อนำเอนไซม์ที่ได้จากพืชมาใช้ในอุตสาหกรรม  
เนย และพบว่าข่อยเป็นพืชที่ได้รับรายงานว่ามีเอนไซม์ที่ทำให้นมตกตะกอนด้วย (Dastur.  
1949 : 451)

Ram และ Reddi ได้เตรียมเอนไซม์ที่ทำให้นมตกตะกอนจากใบข่อย โดยนำ  
ใบข่อยสดมาทำให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วทำให้แห้งโดยใช้ anhydrous calcium chloride  
ดูดความชื้น เพื่อมิให้ใบข่อยเปลี่ยนสภาพไปจากเดิม จากนั้นใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย สกัด  
เอนไซม์ออกมา ส่วนที่สกัดได้ครั้งแรกมีสีน้ำตาลเข้ม ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี dialysis  
และ ultrafiltration ซึ่งทั้งสองวิธีนี้ทำให้ประสิทธิภาพ (reactivity) ของ  
เอนไซม์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากสองวิธีดังกล่าว ยังมีวิธีทำเอนไซม์บริสุทธิ์  
โดยนำไปตกตะกอนกับ acetone พบว่า ส่วนที่ตกตะกอนไม่มีสมบัติดังกล่าว แต่ส่วนที่  
ละลายใน acetone มีสมบัติของเอนไซม์ที่ทำให้นมตกตะกอน และเอนไซม์นี้ถ้าลด pH  
จาก 6.5 เป็น 4.8 จะทำให้นมตกตะกอนได้เร็วขึ้น (Ram and Reddi. 1953 :  
215)

Roy ได้ศึกษาทางค่านเคมีและเภสัชของพืชที่มีสมบัติทางยาของอินเกีย โดยได้  
นำใบข่อยมาสกัดด้วย ethanol นาน 48 ชั่วโมง ได้สารมีลักษณะสีเขียว แยกเอาสาร  
สีเขียวออกโดยใช้ aqueous acetic acid 1 เปอร์เซ็นต์ กรองเอาส่วนที่เป็นสารละลาย  
ไว้ สารละลายส่วนนี้ ตรวจไม่พบ alkaloid เอาส่วนที่เป็นกาก (residue) ที่ได้จาก  
การกรองมาทำให้แห้ง นำไปละลายใน benzene แล้วนำไปแยกโดยใช้ Column  
Chromatography ที่มี alumina เป็นตัวดูดซับ ใช้ petroleum ether และ

benzene เป็นตัวชะตามล้ากับ พบว่าส่วนที่ petroleum ether เป็นตัวชะได้สารมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลือง และส่วนที่ใช้ benzene เป็นตัวชะได้เป็นผลึกสีขาว ซึ่งทำปฏิกิริยากับ Liebermann-Burchard reagent แสดงว่า เป็น sterol เมื่อทดสอบเปรียบเทียบกับสารที่ทราบแล้ว พบว่าสาร sterol นี้คือ  $\beta$ -sitosterol (Roy. 1960 : 353) สูตรโครงสร้างของ  $\beta$ -sitosterol ดังแสดงข้างล่าง



$\beta$ -sitosterol

ประวัติ

\* ในปี ค.ศ. 1961 Fernandes ได้สกัดสารจากเปลือกกรากช้อย โดยใช้ alcohol 90 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้เข้มข้น แยกเอาคลอโรฟิลล์ออก พบว่า มีสารพวก glycoside, free sugar, tannin แต่ตรวจไม่พบ alkaloid นำเอาสารที่สกัดได้มาสกัดด้วย chloroform ได้ผงสีเหลืองอ่อน มีรสขม กู้ความชื้น น้ำผงสีเหลืองมาละลายน้ำแล้วสกัดด้วย chloroform อีกครั้ง ได้ผลึกรูปเข็มสีขาว มีจุดหลอมเหลว  $160^\circ \text{C}$  สูตรโมเลกุล  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_6$  มี  $-\text{OCH}_3$  และ  $-\text{CH}_3$  อย่างละหนึ่งหมู่ มี active hydrogen 2-3 ตัว ผลึกนี้ละลายได้ดีในน้ำและ chloroform ทำปฏิกิริยากับ acetic anhydride และ sulfuric acid เข้มข้น โดยจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีชมพู แล้วเปลี่ยนเป็นสีเขียว ฟอกจางสี potassium permanganate และ bromine water รีทิวส์ Tollen's reagent อย่างช้า ๆ พบว่า สารนี้ คือ  $\beta$

-unsaturated lactone นำสารที่ตกผลึกได้นี้มาทดสอบทางเภสัชวิทยา โดยทดลองกับหนู พบว่า สารนี้มีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบ มีผลต่อความดันของโลหิต และมีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจ และถ้าให้หนูได้รับสารนี้ 4.8 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม จะทำให้หนูตาย

ไปครึ่งหนึ่ง(LD<sub>50</sub>) และมีอาการชักกระตุกก่อนตาย (Fernandes, 1961 : 420)

ต่อมา Khare และคณะ แยก glycoside จากเปลือกกรากข่อย โดยสกัดด้วย ethanol แล้วเติม  $Pb(OH)_2$  ทำให้เซมซน แล้วแบ่งเป็นสามส่วน ส่วนที่หนึ่ง นำไปสกัดด้วย diethyl ether ส่วนที่สอง สกัดด้วย chloroform ส่วนที่สาม สกัดด้วย chloroform : ethanol อัตราส่วน 2 : 1 ส่วนที่หนึ่งและส่วนที่สอง นำมาแยกโดยวิธี Preparatory Paper Chromatography และ Column Chromatography ที่มี silica gel และ alumina เป็นตัวดูดซับ ได้ผลึก cardenolide glycoside หกชนิด ดังตารางหนึ่ง

ตาราง 1 สารที่แยกได้จากเปลือกกรากข่อยโดยการสกัดด้วย diethyl ether และ chloroform

| ชื่อสาร     | จุดหลอมเหลว | สูตรโมเลกุล          | specific rotation $[\alpha]_D$ in MeOH |
|-------------|-------------|----------------------|----------------------------------------|
| kamaloside  | 174-178° C  | $C_{31}H_{48}O_9$    | + 10.6                                 |
| asperoside  | 198-205° C  | $C_{31}H_{48}O_9$    | - 19.5                                 |
| strebloside | 153-158° C  | $C_{31}H_{46}O_{10}$ | + 25.3                                 |
| indroside   | 222-228° C  | $C_{31}H_{46}O_{10}$ | + 18.0                                 |
| lucknoside  | 253-253° C  | $C_{31}H_{46}O_{10}$ | - 4.0                                  |
| substance F | 175-182° C  | $C_{31}H_{48}O_{10}$ | - 12.6                                 |

นอกจากนี้ ยังได้สาร di-O-acetyl derivative มีจุดหลอมเหลว 161-162° C specific rotation  $[\alpha]_{D25}$  -19.4 และได้ glycoside ที่เป็นอสัณฐาน (amorphous) ดังตารางสอง

ตาราง 2 สารที่แยกได้จากเปลือกกรากขอย โดยการสกัดด้วย diethyl ether และ chloroform ที่เป็นอิสระ

| ชื่อสาร      | สูตรโมเลกุล          | specific rotation $[\alpha]_D$ in MeOH |
|--------------|----------------------|----------------------------------------|
| substance G  | $C_{30}H_{46}O_9$    | - 1.8                                  |
| substance G' | $C_{30}H_{46}O_9$    | - 12.5                                 |
| substance H  | $C_{31}H_{46}O_{10}$ | - 15.4                                 |

และแยกได้ non-cardenolide glycoside จุดหลอมเหลว  $210-220^\circ C$  สูตรโมเลกุล  $C_{30}H_{50}O_9$  ซึ่งเมื่อไฮโดรไลซ์ได้น้ำตาลเมื่อนำน้ำตาลที่ได้ไปวิเคราะห์โดย Paper Chromatography จะเหมือนกับ 3-O-methyl-D-glucose

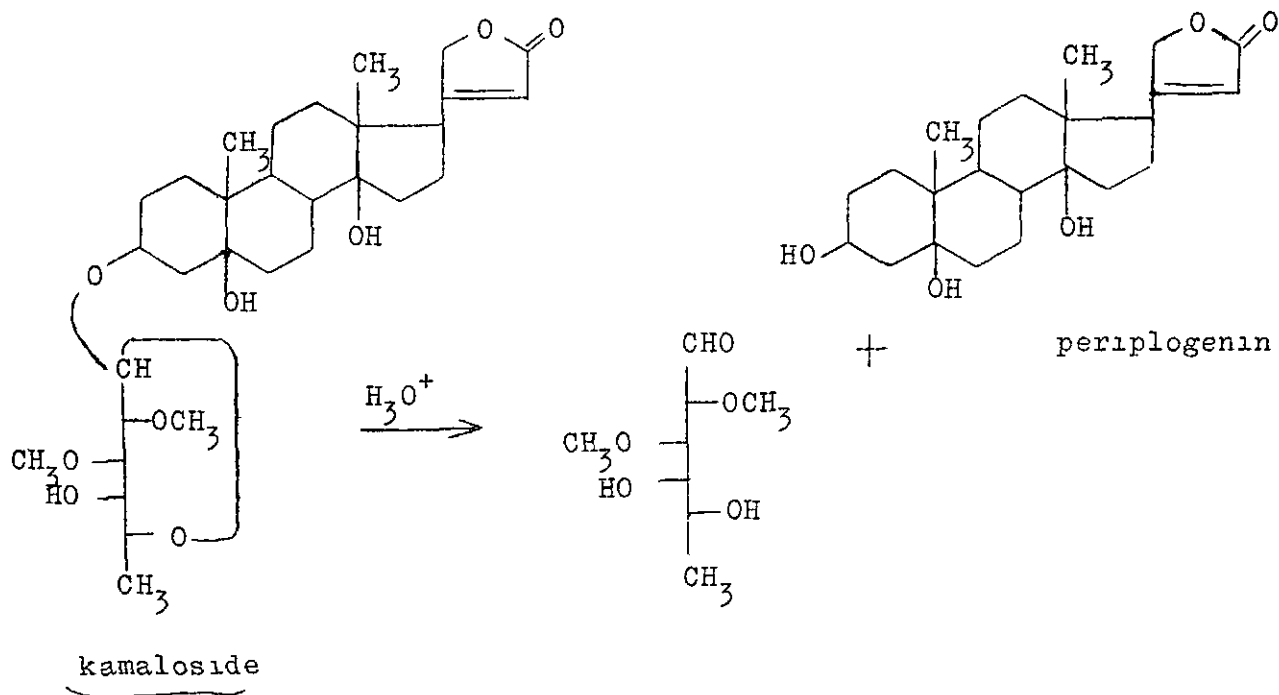
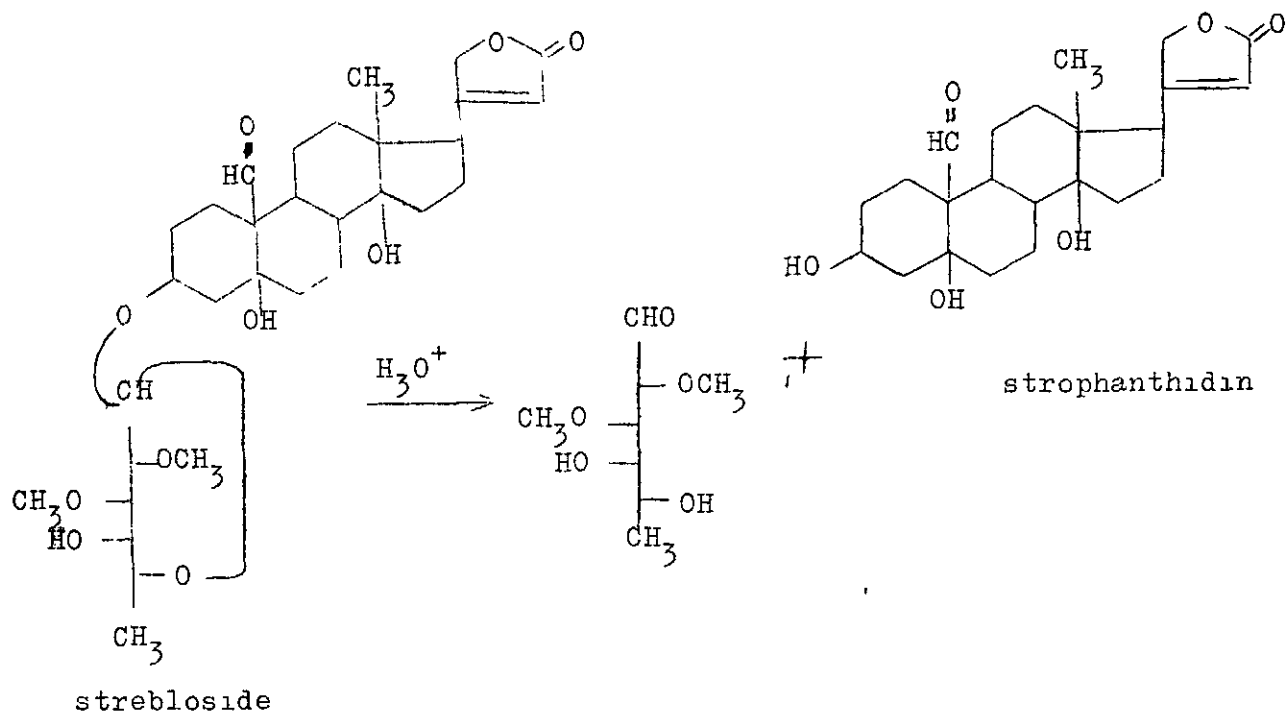
สำหรับส่วนที่สาม ที่สกัดด้วย chloroform-ethanol หลังจากแยกโดย Paper Chromatography ได้ glycosides ทำขนิก (Khare. 1962 : 1515) ในปี 1962 Khare ได้หาโครงสร้างของ glycoside บางชนิดที่สกัดได้จากเปลือกกรากขอย พบว่า asperoside คือ 3-digitoxigenin-2, 3-di-O-methyl- -D-glycopyranoside glycopyranoside strebloside คือ 3-strophanthidin-2, 3-di-O-methyl- -D-fucopyranoside

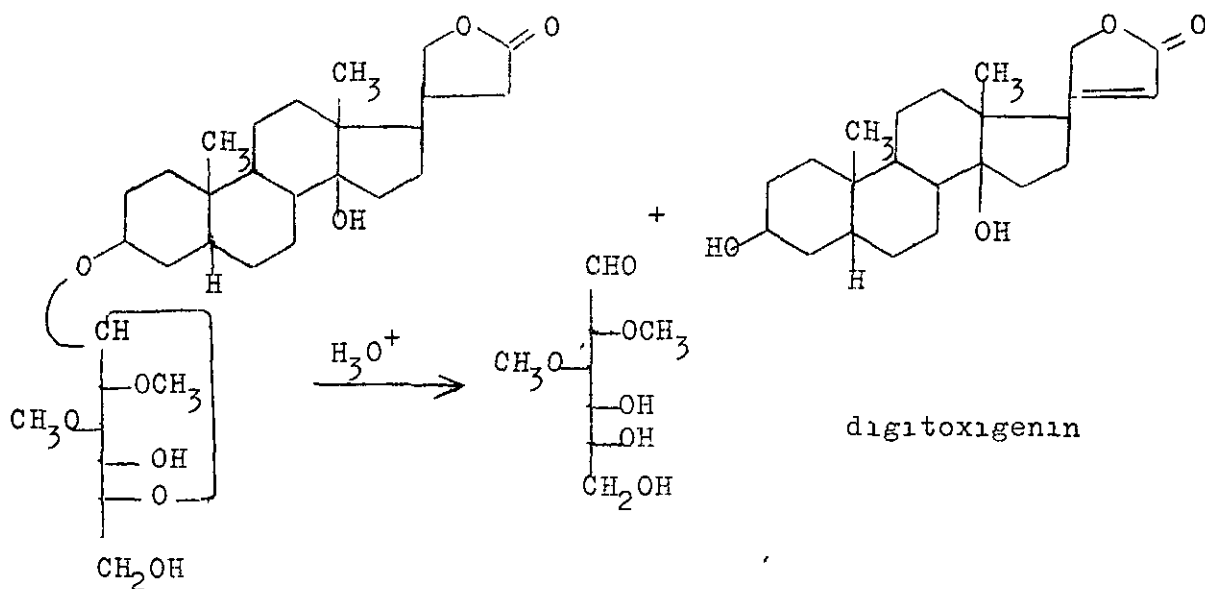
เมื่อนำ asperoside 120 มิลลิกรัม ไฮโดรไลซ์ด้วย hydrochloric acid ใน aqueous acetic acid ที่  $100^\circ C$  นาน 1 ชั่วโมง ได้ผลึกของ 2, 3-di-O-methyl-glucose 3.5 มิลลิกรัม ซึ่งมีจุดหลอมเหลว  $110-112^\circ C$  และถ้าไฮโดรไลซ์ asperoside 120 มิลลิกรัม ด้วย acetone และ hydrochloric acid เข้มข้น ที่  $20^\circ C$  ในบรรยากาศของ carbon dioxide นาน 45 วัน นำมาสกัดด้วย chloroform แล้วแยกโดย Column Chromatography ที่ใช้ alumina เป็นตัวดูดซับ ได้ผลึกของ digitoxigenin 2 มิลลิกรัม มีจุดหลอมเหลว  $255-260^\circ C$  ทำการทดลองหานองเดียวกับ glycosides อื่น ๆ บางตัว พบสารที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ ดังแสดงในตารางที่สาม

ตาราง 3 สารที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ glycoside . I

| glycoside     | สารที่ได้จากการไฮโดรไลซ์                                                                                     |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| kamaloside \  | periplogenin<br>2, 3-di-O-methyl-D-fucose<br>2, 3-di-O-methylfucose<br>3-O-acetyl derivative of periplogenin |
| asperoside (  | digitoxigenin<br>2, 3-di-O-methyl-D-glucose                                                                  |
| strebloside   | strophanthidin<br>2, 3-di-O-methyl-D-fucose<br>O-acetyl derivative of strophanthidin                         |
| indroside '   | 2, 3-di-O-methylfucose                                                                                       |
| substance F , | gitoxigenin<br>2, 3-di-O-methyl-D-glucose                                                                    |
| substance G   | 2-O-methylfucose                                                                                             |
| substance G'  | periplogenin<br>6-deoxyallose                                                                                |
| substance H   | corotoxigenin<br>2, 3-di-O-methyl-D-glucose                                                                  |

สมการแสดงการไฮโดรไลซ์ของ glycosides บางตัว





asperoside

ในปี 1963 Iyengar และ Pendse ได้ศึกษาผลทางยาของเปลือกรากข่อย พบว่า เปลือกรากข่อยมีสารที่เป็นตัวรีดิวส์ (reducing agent) และสารจำพวกแป้ง ไม่มี alkaloid, saponin, protein ซึ่ง Iyengar ได้นำเปลือกรากข่อยมาสกัดด้วยน้ำ แล้วเติม lead acetate ซึ่งต่อมาแยกเอา lead acetate ออกด้วย disodium hydrogen phosphate แล้วสกัดด้วย chloroform ตกตะกอน glycoside ด้วย petroleum ether ได้ glycoside 0.14 เปอร์เซ็นต์ จากเปลือก รากทั้งหมด glycoside มีจุดหลอมเหลว  $113-116^{\circ}C$  จากการตรวจโดยใช้ Infrared spectrum พบว่ามี steroid และ lactone ring นำสารที่สกัดได้มา แยกโดยใช้ Column Chromatography ได้ 37 ส่วน (fraction) Iyengar ได้เตรียมหัตถ์เจอร์ของข่อยและหัตถ์เจอร์ของ digitalis แล้วฉีดหัตถ์เจอร์ของสารทั้งสองนี้ เข้าทางเส้นเลือด (femoral vein) ของแมว ซึ่งพบว่า หัตถ์เจอร์ของข่อยใช้ปริมาณสาร

10.5 มิลลิกรัมค่อน้ำหนักสัตว์ที่ใช้ทดลอง 1 กิโลกรัม หึ่งเจอร์ของ digitalis ใช้ปริมาณสาร 13.5 มิลลิกรัมค่อน้ำหนักสัตว์ที่ใช้ทดลอง 1 กิโลกรัม ปรากฏว่า ปริมาณของสารดังกล่าว ทำให้สัตว์ที่ใช้ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง (Iyengar. 1963 : 372)

Manzetti และ Reichstein ได้แยก cardenolide glycosides ที่มีโพลาไรสูง (high polarity) จากรากและเปลือกข่อย ออกด้วยวิธี Paper Chromatography ได้สารทั้งแสดงในตารางสี่ สารที่แยกได้นั้นนำไปไฮโดรไลซ์ ได้สารทั้งตารางห้า นอกจากนี้ยังได้หาสูตรโครงสร้างของ glycosides ดังกล่าว ทั้งสูตรโครงสร้างของ glycosides ที่แสดงไว้

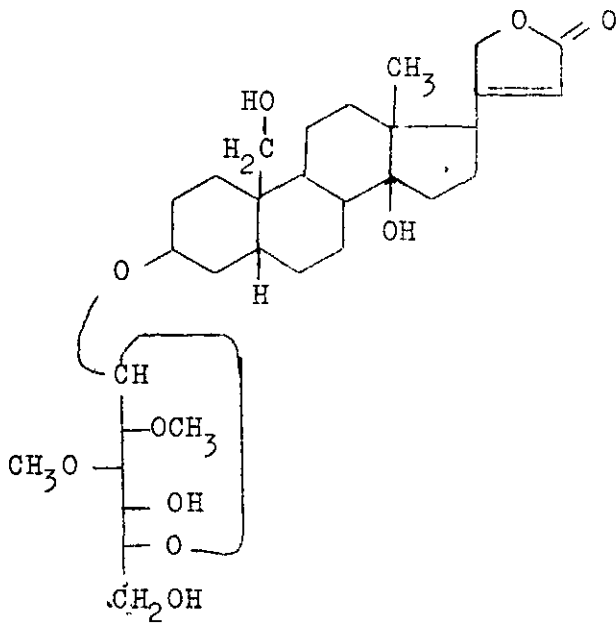
ตาราง 4 สารที่แยกได้จากรากและเปลือกข่อย ด้วยวิธี Paper Chromatography

| ชื่อสาร                           | สูตรโมเลกุล                      | จุดหลอมเหลว specific rotation $[\alpha]_D$ |
|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|
| ① ✓ strophalloside                | $C_{29}H_{42}O_{10} \cdot 3H_2O$ | + 5.0                                      |
| ② ✓ strophanolloside              | $C_{29}H_{44}O_{10} \cdot 4H_2O$ | - 6.9                                      |
| ③ glucokamaloside                 | $C_{37}H_{58}O_{14}$             | - 4.8                                      |
| ④ glucostrebloside                | $C_{37}H_{56}O_{15}$             | + 8.9                                      |
| ⑤ ✓ cannodimethoside              | $C_{31}H_{48}O_{10}$             | - 14.1                                     |
| ✓ 16-O-acetylglucogitodimethoside | $C_{39}H_{60}O_{16}$             | - 19.4                                     |
| ⑥ glucogitomethoside              | $C_{37}H_{58}O_{15}$             | -                                          |
| ⑦ sarmethoside                    | $C_{30}H_{46}O_{10}$             | - 7.6                                      |

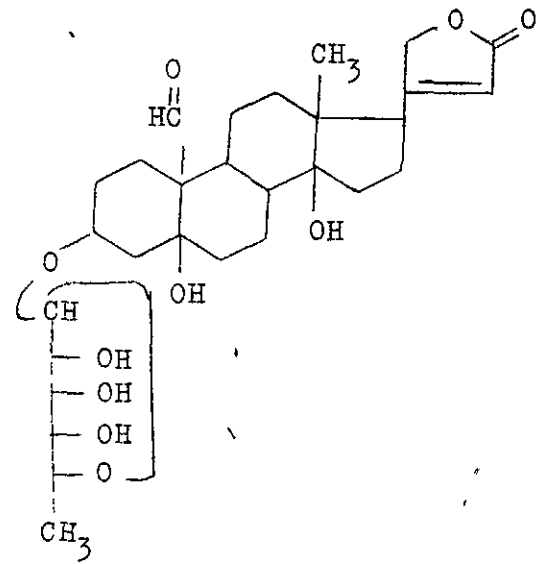
ตาราง 5 สารที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ glycoside II

| glycoside                       | สารที่ได้จากการไฮโดรไลซ์                             |
|---------------------------------|------------------------------------------------------|
| cannodimethoside                | cannogenol<br>2, 3-di-O-methylglucose                |
| strophalloside                  | strophanthidine<br>6-deoxyallose                     |
| 16-O-acetylglucogitodimethoside | oleandrigenine<br>2, 3-di-O-methylglucose<br>glucose |
| glucogitodimethoside            | gitoxigenin<br>2, 3-di-O-methylglucose<br>glucose    |
| strophanolloside                | strophanthidol<br>6-deoxyallose                      |
| glucokamaloside                 | periplogenin<br>2, 3-di-O-methylglucose<br>glucose   |
| sarmethoside                    | samentogenin<br>3-O-methyl-D-glucose                 |
| glucostrebloside                | strophanthidin<br>2, 3-di-O-methyl-D-fucose          |

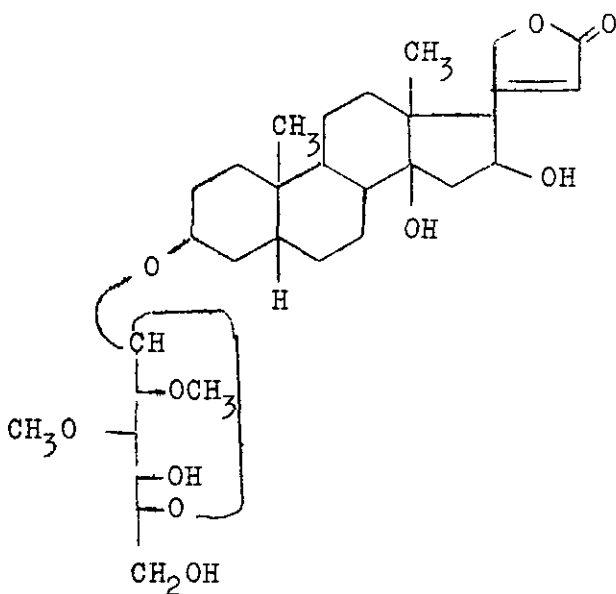
สูตรโครงสร้างของ glycoside บางตัว



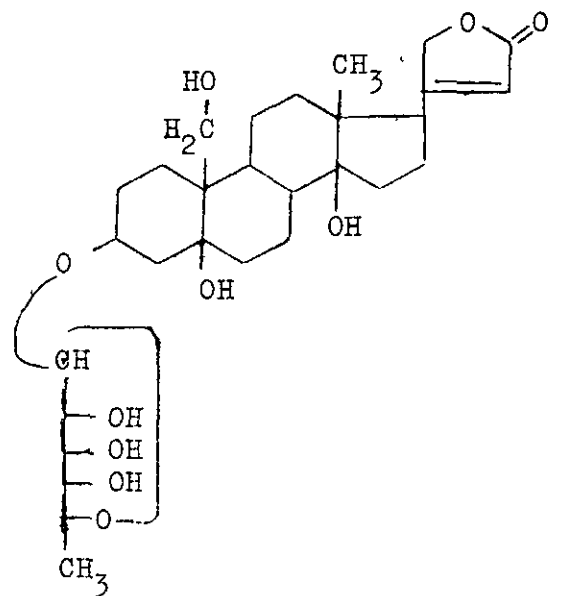
cannodimethoside



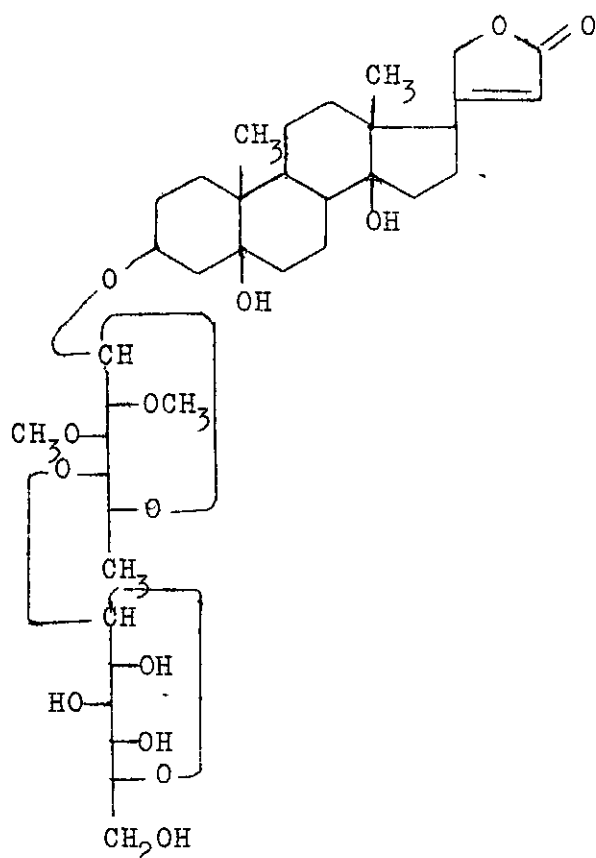
strophalloside



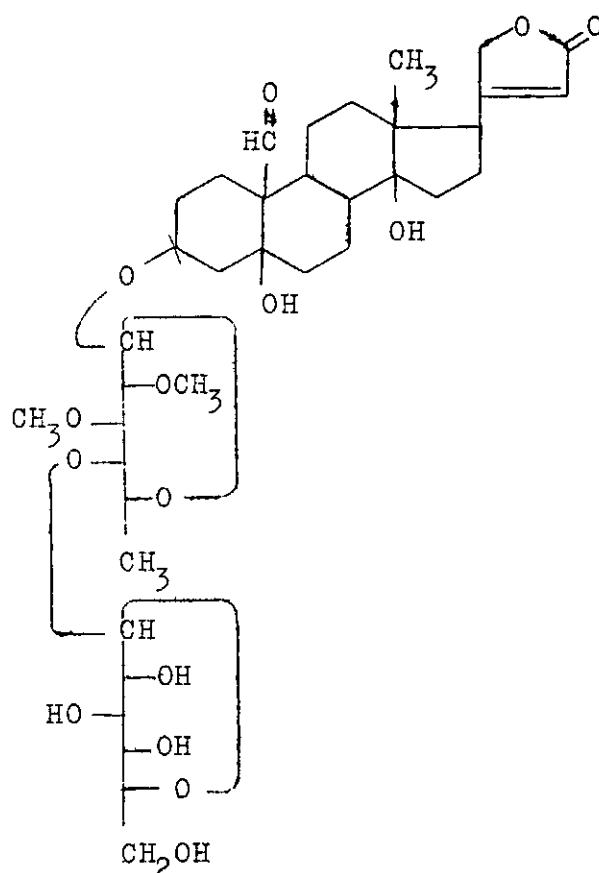
gitodimethoside



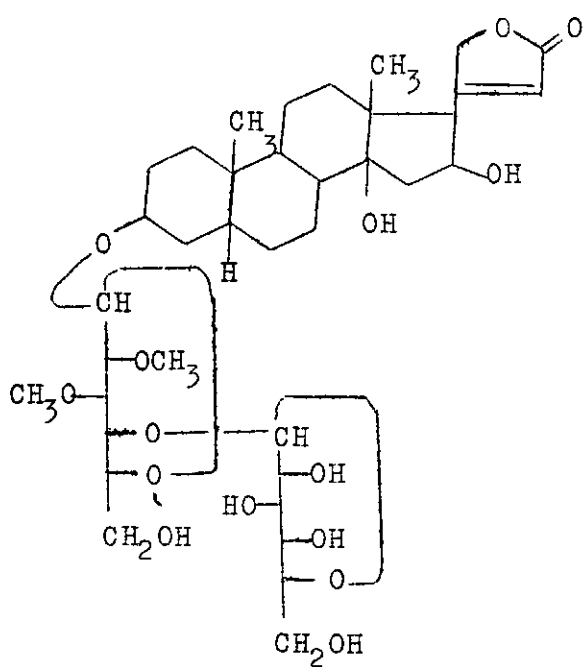
strophanolloside



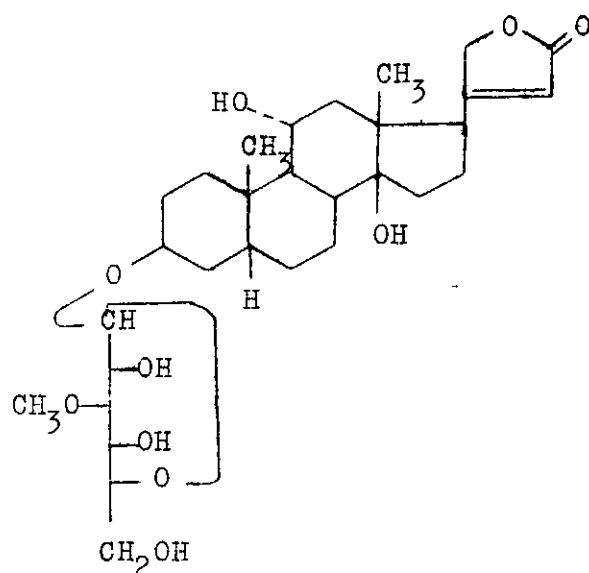
glucokamaloside



glucostrebloside



glucogitodimethoside



sarmethoside

Gaetonde ศึกษาสมบัติทางเคมีและสมบัติทางยาของเปลือกกรากชอย โดยนำมาสกัดด้วย petroleum ether ทำให้ไขมันละลายออกมาสกัดด้วย 80 เปอร์เซ็นต์ alcohol ทำให้ไขมันละลายออกมาสกัดด้วย chloroform ได้สารลักษณะเป็นอสัณฐาน สีครีม มีรสขม จุดหลอมเหลว 110-114°C สารนี้ 100 ไมโครกรัม ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจของกระต่ายที่ใช้ในการทดลอง (Gaetonde. 1964 : 191) Barua และคณะ ได้ตรวจสอบสารเคมีในเปลือกกรากชอย ซึ่งสกัดด้วย petroleum ether แล้วแยกด้วย Column Chromatography ได้สารสามชนิด คือ  $\alpha$ -amyrin acetate, lupeol acetate และ  $\beta$ -sitosterol (Barua. 1968 : 87)

### วิธีดำเนินการ

ตัวอย่างของเปลือกกรากขอยที่ใช้ในการวิจัยเพื่อสกัดและแยกสารธรรมชาติและประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ได้รับความอนุเคราะห์จากกองวิจัยอุตสาหกรรมเภสัช สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย

#### 1. สกัดสารจากเปลือกกรากขอยโดยใช้สารละลาย

นำเปลือกกรากขอยมาบดให้ละเอียดแล้วสกัดด้วย hexane จากนั้นแยกเอาส่วนที่ไม่ละลายใน hexane มาสกัดด้วย diethyl ether แล้วนำเอาส่วนของเปลือกกรากขอยที่ไม่ละลายใน diethyl ether นี้มาสกัดต่อไปอีก ด้วย methanol แล้วแยกเอาสารส่วนที่ละลายใน methanol มาทำให้เข้มข้นโดยกลั่นแบบลดความดัน นำสารที่ละลายใน methanol ที่ทำให้เข้มข้นนี้มาใช้ทดลองต่อไป

#### 2. แยกสารละลายเพื่อใช้ใน Thin-Layer Chromatography และ Column Chromatography โดยใช้สารละลายต่อไปนี้ คือ

n-hexane

benzene

chloroform

diethyl ether

ethyl acetate

methanol

สารละลายข้างบนนี้เรียงลำดับ polarity ตามลำดับ n-hexane มี polarity ต่ำสุด และ methanol มี polarity สูงสุด เพื่อใช้ในการทดลอง Thin-Layer Chromatography และ Column Chromatography

#### 3. การทดลองใช้ Thin-Layer Chromatography แยกสารที่สกัดได้จากเปลือกกรากขอย

3.1 การเตรียม plate ซึ่ง silica gel G 40 กรัม ผสมกับน้ำ 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมให้ silica gel G กับน้ำให้มีลักษณะเลอะ (slurry) แล้วบรรจุในเครื่องทำ plate Desaga Heidelberg เพื่อฉาบ silica gel G ลงบนแผ่นแก้วขนาด 20 x 20 เซนติเมตร โดยกำหนดความหนาของ silica gel G เท่ากับ 0.25 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ให้น้ำระเหย แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบ (not air oven) ที่อุณหภูมิ 110°C นานสองถึงสามชั่วโมง

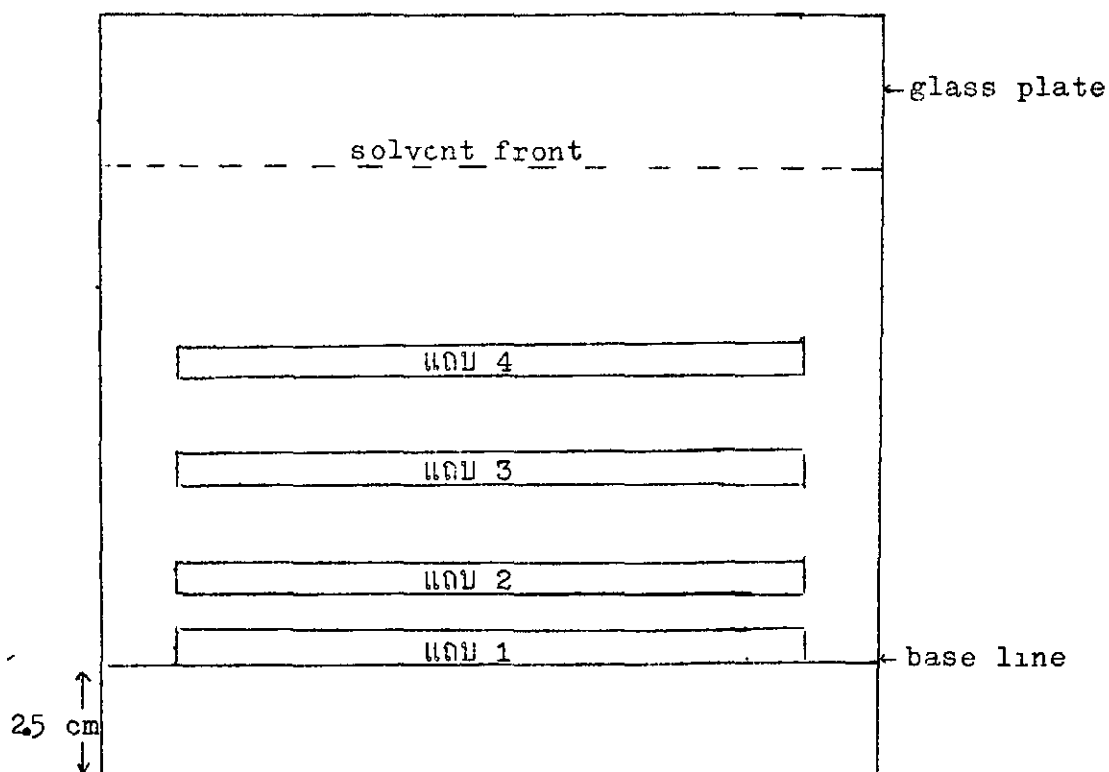
3.2 การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทดลองแยกด้วย Thin-Layer Chromatography น้ำสารละลาย n-hexane, benzene, chloroform, diethyl ether, ethyl acetate และ methanol มาผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ซึ่งจะทำให้มีสมบัติในการแยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากข่อยได้แตกต่างกัน แล้วนำมาใส่ขวดโหลประมาณ 150 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นตัวชะหรือตัวทำละลายสำหรับการแยกน้ำสารธรรมชาติที่สกัดด้วย methanol ที่ได้จากข้อหนึ่ง มาหยดลงบน plate ที่มี silica gel G เป็นตัวดูดซับที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 โดยให้เส้นผ่าศูนย์กลางของสารบน plate มีขนาดประมาณ 5 มิลลิเมตร และบริเวณที่หยดสารนี้ห่างจากขอบล่างของ plate 2.5 เซนติเมตร รวบน้ำ plate ที่เตรียมได้นี้ไปจุ่มในขวดโหลที่มีตัวทำละลายที่เตรียมไว้ และให้ขอบ plate ด้านล่างแช่อยู่ในตัวทำละลาย ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนไปตาม plate ระยะทางพอประมาณ (15 เซนติเมตร) แล้วนำ plate ออกจากขวดโหล รวบน้ำ plate ไปตรวจสอบกับ UV-light ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น detector เพื่อคำนวณค่า Rf ของสาร

จากการทดลองพบว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถแยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากข่อย คือสารผสมระหว่าง ether : methanol = 1 : 2 ซึ่งสามารถแยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากข่อยได้สี่แถบ (zone) ซึ่งได้จากการตรวจสอบด้วย UV-light จากนั้นหยดสารธรรมชาติจากเปลือกกรากข่อยลงบน plate ประมาณ plate ละ 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยหยดหลาย ๆ หยดติดต่อกันเป็นแถบ ปล่อยให้แห้ง แล้วนำไปแยกในขวดโหลที่มีค่าตัวทำละลาย ether : methanol = 1 : 2

แล้วนำไปตรวจภายใต้ UV-light เพื่อตรวจแถบสารที่แยกได้ ดังภาพประกอบหนึ่ง  
คำนวณค่า Rf ของแถบ 1-4

นำ plate ที่แยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากชอยด้วยสารละลายได้แล้ว  
มาทำการจุดแถบ 1-4 นำแต่ละแถบบรรจุลงใน column แล้วชะด้วย methanol เก็บ  
สารละลายที่ผ่าน column เพื่อนำไปตรวจสอบกับเครื่อง UV-Spectrophotometer

ขบวนการนี้ต้องทำ blank ด้วย โดยใช้ plate ที่เคลือบด้วย silica  
gel G มา run ในสารละลาย ether : methanol = 1 : 2 แล้วให้ตัวทำละลาย  
เคลื่อนที่ไปบน plate เป็นระยะทางเท่ากับระยะทางของตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลอง



ภาพประกอบ 1 แสดงภาพ Chromato plate

หมายเหตุ แถบ 1-4 คือ แถบสารที่แยกได้และวิ่งแสงเมื่อตรวจสอบด้วย UV-light

แยกสารธรรมชาติ ชุบแต่ละแถบที่มีระยะทางเท่ากับแถบ 1-4 นำไปชะใน column ด้วย methanol เก็บสารละลายที่ผ่าน column เพื่อใช้เป็น blank controlling sample ใน UV-spectrophotometer

#### 4. การทดลองหาการดูดกลืนแสง ultraviolet

เปิดเครื่อง (warm) UV-spectrophotometer ก่อนการทดลองประมาณ 20 นาที นำสารละลายที่แยกได้จากเปลือกกรากข่อยในข้อสาม โดยนำแต่ละแถบ จาก แถบที่ 1-4 มาวัด UV-spectrophotometer และใช้ blank controlling sample ที่มีระยะทางเท่ากับแถบ 1-4 เป็น blank ตามลำดับ บันทึก UV absorption ระหว่าง 400-200 nanometer (nm.)

#### 5. การทดลองหาปริมาณสารที่แยกได้ด้วย Thin-Layer Chromatography

นำ plate ที่เตรียมไว้ ซึ่งมี silica gel G เป็นตัวดูดซับแยกสารธรรมชาติ ที่สกัดได้จากเปลือกกรากข่อยที่ทราบความเข้มข้น (ร้อยละ 4.2 โดยน้ำหนัก) หยดลงบน plate 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยหยดให้เป็นแถบยาว ๆ ไปตาม plate นำ plate นี้ไปแยกสารธรรมชาติในตัวทำละลาย ether : methanol = 1 : 2 ซึ่งแยกสารธรรมชาติ ได้สี่แถบ แล้วชกเอาแต่ละแถบออกมาชะด้วย methanol แล้วทำให้เข้มข้นเมื่อใส่สารละลาย ออก แล้วนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 55° C เพื่อใส่สารละลายออกให้หมด จนน้ำหนักของสารคงที่ ซึ่งน้ำหนักสารที่ใด โดยหักน้ำหนักของ blank ซึ่งทำโดยวิธีเดียวกัน

#### 6. การทดลองแยกสารจากเปลือกกรากข่อยด้วย Column Chromatography

นำสารที่สกัดได้จากข้อหนึ่งมา 0.8972 กรัม แล้วนำไปละลายใน methanol จำนวนเล็กน้อย แล้วนำไปผสมกับ silica gel จำนวนหนึ่ง แล้วอมใส่ methanol ออก ให้หมด ที่อุณหภูมิ 55° C แล้วบรรจุลงใน column ใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ ประมาณสามในสี่ของความยาวของ column ใช้ ether และ methanol เป็นตัวชะ ตามลำดับ เก็บสารละลายที่ผ่าน column ประมาณตัวอย่างละ 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปตรวจด้วย UV-spectrophotometer peak จะค่อยเริ่มขึ้นสูงในขวดแรก ๆ แล้ว ลดน้อยลงจะกระทั่ง peak หายไป บันทึกความยาวคลื่นที่ peak ขึ้นสูงสุดไว้แล้วเปลี่ยนตัวชะ ตามลำดับ

7. การทดลองหาปริมาณสารที่แยกได้ด้วย Column Chromatography

นำสารละลายที่ผ่าน column ชนิดเดียวกัน และเป็นสารที่คลกคลื่นแสง UV ที่ความยาวคลื่นเดียวกันมาทำให้เข้มข้น โดยกลั่นแบบลดความดัน ทำให้แห้งอีกครั้ง โดยนำเข้าตูบที่  $55^{\circ}\text{C}$  จนน้ำหนักสารคงที่ บันทึกน้ำหนักของสาร

นำสารแต่ละชนิดแยกเก็บไว้ในแต่ละขวด ไปทำการทดลองแยกด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography ทั้งนี้ เพื่อตรวจสอบชนิดสารที่แยกได้ในส่วน (fraction) ต่าง ๆ และหาค่า Rf

8. การทดสอบสารที่แยกได้กับสารเคมีบางชนิด

นำ plate ที่แยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากข่อยได้แล้ว (จากข้อสาม) มาพ่นด้วยสารดังต่อไปนี้

8.1 ทดสอบ alkaloid และสารที่มี nitrogen เป็นองค์ประกอบ โดยใช้ Dragendorff's reagent

วิธีเตรียม ผสม acetic acid 25 มิลลิลิตร กับ bismuth carbonate 2.6 กรัม และ sodium iodide 7 กรัม ต้มให้เดือด 2-3 นาที ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง จะได้ตะกอนของ sodium acetate กรองเอาตะกอนออกโดยใช้ sinter glass filter ได้สารละลายสีน้ำตาลแดงสกปรก นำสารละลายนี้มา 20 มิลลิลิตร ผสมกับ ethyl acetate 80 มิลลิลิตร และน้ำ 0.5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้นี้ไว้เป็น stock solution ในขวดสีน้ำตาล

วิธีทดสอบ นำ stock solution 10 มิลลิลิตร ผสมกับ acetic acid 100 มิลลิลิตร และ ethyl acetate 240 มิลลิลิตร แล้วพ่นลงบน plate ที่ต้องการทดสอบประมาณ 5 ถึง 10 มิลลิลิตร

ผลการทดสอบ alkaloid และสารที่มี nitrogen เป็นองค์ประกอบ จะได้สีส้มบนพื้นสีเทา และสีจะเข้มขึ้นถ้าพ่นทับด้วย 0.05 M sulphuric acid

8.2 ทดสอบ phenolic compound โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent

วิธีเตรียม เตรียมสารเป็น stock solution โดยใช้ sodium tungstate 10 กรัม sodium molybdate 2.5 กรัม ในน้ำ 70 มิลลิลิตร เติม

85 เปอร์เซ็นต์ phosphoric acid 5 มิลลิลิตร 36 เปอร์เซ็นต์ hydrochloric acid 10 มิลลิลิตร นำของผสมนี้ไปต้ม (reflux) 10 ชั่วโมง แล้วเติม lithium sulphate 15 กรัม น้ำ 5 มิลลิลิตร และ bromine 1 หยด นำไปต้มประมาณ 15 นาที ทำให้เย็น แล้วเติมน้ำให้เป็น 100 มิลลิลิตร สารที่ได้ต้องไม่เป็นสีเขียว

วิธีทดสอบ พ่น 20 เปอร์เซ็นต์ aqueous sodium carbonate ลงบน plate ที่จะทดสอบ แล้วทำให้แห้ง พ่นด้วย stock solution ที่ทำให้เจือจางลงสามเท่า โดยเติมน้ำลงไป

ผลการทดสอบ phenolic compound จะให้สีน้ำเงิน

8.3 ทดสอบ cardiac glycoside โดยใช้ 3, 5-dinitrobenzoic acid

วิธีเตรียม ชั่ง 3, 5-dinitrobenzoic acid 1 กรัม ละลายใน methanol 50 มิลลิลิตร และ 2 M potassium hydroxide 50 มิลลิลิตร เป็น stock solution

วิธีทดสอบ พ่น stock solution ลงบน plate ที่ต้องการทดสอบ

ผลการทดสอบ cardiac glycoside จะให้สีน้ำเงินม่วงกับ reagent นี้

8.4 ทดสอบ steroid โดยใช้ perchloric acid

วิธีเตรียม เตรียม 20 เปอร์เซ็นต์ aqueous perchloric acid

วิธีทดสอบ พ่นสาร 20 เปอร์เซ็นต์ aqueous perchloric acid ลงบน plate ที่ต้องการทดสอบ แล้วทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ  $150^{\circ}\text{C}$  ประมาณ 10 นาที

ผลการทดสอบ steroid จะให้สีภายใต้ ultraviolet long wavelength

9. ทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารที่แยกได้จากเปลือกกรากฮอย

9.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ nutrient agar โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งให้แข็ง

9.2 เตรียม suspension ของเชื้อเพื่อให้ปริมาณของเชื้อที่จะทดสอบเท่ากัน โดยให้ความเข้มข้น คิดเป็น optical density เท่ากับ 0.85 ที่ความยาวคลื่น 540 nm. ซึ่งค่านี้ได้จากการวัดจากเครื่อง spectrophotometer ใช้ pipette suspension ใส่จานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 9.1 จานละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานเพาะเชื้อ

9.3 นำสารที่แยกได้จากเปลือกกรากข่อยมาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาหยดลงบนกระดาษวงกลม (disc) เส้นผ่าศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร โดยหยดสารลงบนกระดาษวงกลม แผ่นละ 0.01, 0.02, 0.03 และ 0.04 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปอบแห้ง และนำกระดาษวงกลมนี้ไปวางลงบนจานเพาะเชื้อ

9.4 นำจานเพาะเชื้อจากข้อ 9.3 ไปเพาะเชื้อ (incubate) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเปรียบเทียบขนาดของ clear zone โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางจากด้านหนึ่งถึงอีกด้านหนึ่งเป็นมิลลิเมตร clear zone ที่มีขนาดกว้าง แสดงว่า มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดีกว่า clear zone ที่มีขนาดแคบ

ผลการค้นคว้า

ผลการค้นคว้าทดลองในการสกัดสารธรรมชาติจากเปลือกกรากชอย โดยใช้สารละลาย แยกสารธรรมชาติที่สกัดได้ โดยใช้ Thin-Layer Chromatography และ Column Chromatography หาประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ปรากฏดังนี้

① การสกัดสารจากเปลือกกรากชอย ใช้เปลือกกรากชอยแห้งบดละเอียดหนัก 1,200 กรัม สกัดด้วย hexane, diethyl ether, methanol ตามลำดับ ได้สารที่ละลายในส่วนของ methanol ที่นำมาแยกและทดลองต่อไปหนัก 57 กรัม คิดเป็นร้อยละ 4.75 จากเปลือกกรากชอย

② ตัวทำละลายที่เหมาะสมของ Thin-Layer Chromatography

2, 3 การทดลอง ใช้ silica gel G เป็นตัวดูดซับ ผลปรากฏว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สามารถแยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากชอยที่สกัดด้วย methanol คือ

ether : methanol = 1 : 2 สามารถแยกสารออกเป็นสี่แถบ ซึ่งมีค่า Rf ตามลำดับ ดังนี้ แถบแรก (zone 1) Rf = 0 แถบสอง (zone 2) Rf = 0.11 แถบสาม (zone 3) Rf = 0.24 แถบสี่ (zone 4) Rf = 0.68 ดังตาราง

ตาราง 6 ข้อมูลบางประการของสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography

| สาร   | Rf   | UV absorption maxima (nm.) | น้ำหนักสารเป็นร้อยละจาก ส่วนที่สกัดด้วย methanol | สีภายใต้ UV-light |
|-------|------|----------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|
| แถบ 1 | 0    | 218-216                    | 6.25                                             | สีฟ้าเข้ม         |
| แถบ 2 | 0.11 | 222-218                    | 6.54                                             | สีฟ้าอ่อน         |
| แถบ 3 | 0.24 | 222-216                    | 7.74                                             | สีฟ้าอ่อน         |
| แถบ 4 | 0.68 | 230-218                    | 52.68                                            | สีน้ำตาลเหลือง    |

การตรวจหา maximum absorption กับเครื่อง UV-spectrophotometer

นำ plate ที่แยกสารธรรมชาติจากเปลือกรากชอยในตัวทำละลาย ether : methanol = 1 : 2 ซึ่งแยกสารได้สี่แถบดังกล่าว มาชุกเอาสารในแต่ละแถบออก แล้วชะด้วย methanol เพื่อแยกเอาสารธรรมชาติออกจาก silica gel G แล้วนำไปตรวจสอบการดูดกลืนแสง ultraviolet ปรากฏว่า UV absorption maxima ของแถบหนึ่ง ( $R_f = 0$ ) เท่ากับ 218–216 nm. แถบสอง ( $R_f = 0.11$ ) เท่ากับ 222–218 nm. แถบสาม ( $R_f = 0.24$ ) เท่ากับ 222–216 nm. แถบลี ( $R_f = 0.68$ ) เท่ากับ 230–218 nm. ดังตารางหกและภาพแสดงการดูดกลืนแสง ultraviolet ดังแสดงในภาคผนวก

(6) เมื่อแยกสารธรรมชาติจากเปลือกรากชอยด้วยวิธี Column Chromatography โดยใช้ ether และ methanol เป็นตัวชะตามลำดับ แล้วนำสารละลายที่ผ่าน column ไปตรวจสอบกับ UV-spectrophotometer พบว่าในส่วน (fraction) ที่ชะด้วย methanol แยกได้สองส่วน ส่วนที่หนึ่งได้สารหนักร้อยละ 86.71 โดยคิดจากสารที่นำมาแยกจากการสกัดด้วย methanol UV absorption maxima เท่ากับ 230–226 nm. ดังภาพเจ็ดในภาคผนวก มีค่า ( $R_f = 0.11$ ) ส่วนที่สองได้สารหนักร้อยละ 6.33 โดยคิดจากสารที่นำมาแยกจากการที่สกัดด้วย methanol UV absorption maxima เท่ากับ 230–222 nm. ดังภาพแปดในภาคผนวก ค่า ( $R_f = 0.68$ ) ดังตารางเจ็ด ส่วนที่ชะด้วย ether ได้สารหนักคิดเป็นร้อยละ 2.35 จากสารที่นำมาแยกด้วย column สารส่วนนี้ไม่ได้นำมาศึกษาสมบัติทางเคมีและกายภาพต่อ เนื่องจากไม่มีผลในการหาเชื้อแบคทีเรีย

ตาราง 7 ข้อมูลบางประการของสารที่แยกได้จาก Column Chromatography

| สาร       | $R_f$ | UV absorption maxima<br>(nm.) | น้ำหนักสารเป็นร้อยละจาก<br>ส่วนที่สกัดด้วย methanol | สีภายใต้<br>UV-light |
|-----------|-------|-------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------|
| ส่วนที่ 1 | 0.11  | 230–226                       | 86.71                                               | สีฟ้า                |
| ส่วนที่ 2 | 0.68  | 230–224                       | 6.33                                                | สีฟ้า                |

## ปริมาณสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography และ Column

### Chromatography

(5) ก. Thin-Layer Chromatography ใช้สารละลายที่สกัดได้จาก methanol มีความเข้มข้นของสาร 4.2 เปอร์เซ็นต์ หยดลงบน plate สามแผ่น ๆ ละ 0.2 ลูกบาศก์ เซนติเมตร แล้วนำไปแยกในตู้หาละลาย ether : methanol = 1 : 2 ชูคแต่ละแถบ นำไปชะด้วย methanol เพื่อแยกสารธรรมชาติออกจาก silica gel G นำสารละลาย ที่ได้เข้าตูบเพื่อไล้ตัวหาละลายออก โดยอบที่อุณหภูมิ  $55^{\circ}\text{C}$  จนน้ำหนักสารคงที่ ซึ่งน้ำหนักสาร โดยคิดเป็นร้อยละจากน้ำหนักสารที่นำมาแยกที่สกัดด้วย methanol ได้น้ำหนักดังตารางท

(6) ข. Column Chromatography ซึ่งสารที่สกัดได้จาก methanol น้ก 0.8972 กรัม แยกได้ส่วนที่หนึ่งโดยคิดเป็นร้อยละจากสารที่สกัดด้วย methanol ได้ 86.71 และส่วนที่สองได้ร้อยละ 6.33 จากสารที่สกัดด้วย methanol ดังตารางเจ็ด

### ผลการตรวจสอบกับสารเคมีบางชนิด

นำ plate จาก Thin-Layer Chromatography ที่แยกสารด้วยตัวหาละลาย ether : methanol = 1 : 2 ซึ่งแยกสารได้สี่แถบมาตรวจหา phenolic compound โดยใช้ Folin-Ciocalteu's reagent ตรวจ alkaloid โดยใช้ Dragendorff's reagent ตรวจ cardiac glycoside โดยใช้ 3, 5-dinitrobenzoic acid ตรวจ steroid โดยใช้ perchloric acid ปรากฏว่า สารทุกแถบให้ปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu's reagent สารแถบสี่ ( $R_f = 0.68$ ) ให้ปฏิกิริยากับ 3, 5-dinitrobenzoic acid และทุกแถบไม่ทำปฏิกิริยากับ Dragendorff's reagent และ perchloric acid ดังตารางแปด

ตาราง 8 การทดสอบสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography กับสารเคมีบางชนิด

| สาร   | Rf   | การทดสอบกับสารเคมี    |                           |                 |                          |
|-------|------|-----------------------|---------------------------|-----------------|--------------------------|
|       |      | Dragendorff's reagent | Folin-Ciocalteu's reagent | perchloric acid | 3, 5-dinitrobenzoic acid |
| แถบ 1 | 0    | -                     | +                         | -               | -                        |
| แถบ 2 | 0.11 | -                     | +                         | -               | -                        |
| แถบ 3 | 0.24 | -                     | +                         | -               | -                        |
| แถบ 4 | 0.68 | -                     | +                         | -               | +                        |

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่ใช้ทดสอบ  
 + หมายถึง ทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่ใช้ทดสอบ

ผลการทดสอบกับสารเคมีของสารที่แยกได้จากวิธี Column Chromatography ปรากฏว่าทั้งสองส่วนทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu's reagent และส่วนที่สองทำปฏิกิริยากับ 3, 5-dinitrobenzoic acid ไม่ทำปฏิกิริยากับ Dragendorff's reagent และไม่ทำปฏิกิริยากับ perchloric acid ดังตารางแก่

ตาราง 9 การทดสอบสารที่แยกได้จาก Column Chromatography กับสารเคมีบางชนิด

| สาร       | Rf   | การทดสอบกับสารเคมี    |                           |                 |                          |
|-----------|------|-----------------------|---------------------------|-----------------|--------------------------|
|           |      | Dragendorff's reagent | Folin-Ciocalteu's reagent | perchloric acid | 3, 5-dinitrobenzoic acid |
| ส่วนที่ 1 | 0.11 | -                     | +                         | -               | -                        |
| ส่วนที่ 2 | 0.68 | -                     | +                         | -               | +                        |

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่ใช้ทดสอบ  
 + หมายถึง ทำปฏิกิริยากับสารเคมีที่ใช้ทดสอบ

๑ ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของสารที่แยกได้จากเปลือกกรากข่อย  
การทดสอบประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ใช้เชื้อแบคทีเรียสามชนิด คือ

Bacillus subtilis

Sarcina lutea

Staphylococcus aureus

ปรากฏว่า สารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography ของสารแถบที่หนึ่ง ( $R_f = 0$ ) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc แถบที่สอง ( $R_f = 0.11$ ) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Bacillus subtilis ที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc และยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.15 mg./disc 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc และ 0.60 mg./disc แถบที่สาม ( $R_f = 0.24$ ) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc 0.60 mg./disc และยับยั้งการเจริญของเชื้อ Staphylococcus aureus ที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc แถบที่สี่ ( $R_f = 0.68$ ) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.15 mg./disc 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc และ 0.60 mg./disc และยับยั้งการเจริญของเชื้อ Staphylococcus aureus ที่ความเข้มข้นของสาร 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc 0.60 mg./disc และสารที่แยกได้จาก Column Chromatography จากส่วนที่หนึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Bacillus subtilis ที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.15 mg./disc 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc และ 0.60 mg./disc และยับยั้งการเจริญของเชื้อ Staphylococcus aureus ที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc และสารจากส่วนที่สองสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.15 mg./disc 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc และ 0.60 mg./disc และยับยั้งเชื้อ Staphylococcus aureus ที่ความเข้มข้นของสาร 0.45 mg./disc และ 0.60 mg./disc ดังปรากฏในตาราง 10 ตาราง 11 และตาราง 12

นำ crude extract ที่ยังไม่ได้แยกสารออกจากกันมาหาประสิทธิภาพในการยับยั้ง  
การเจริญของแบคทีเรีย พบว่า crude extract สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ  
Bacillus subtilis Sarcina lutea และ Staphylococcus aureus ที่ความ  
เข้มข้นของ crude extract 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc และ 0.60  
mg./disc ทั้งตาราง 10 ตาราง 11 และตาราง 12

ตาราง 10 ประสิทธิภาพของสารจากเปลือกรากข่อยในการฆ่าเชื้อ Bacillus subtilis

| สาร           | Rf   | UV<br>absorption<br>maxima<br>(nm.) | ปริมาณของสารธรรมชาติจากเปลือกรากข่อย |                  |                  |                  |         |
|---------------|------|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
|               |      |                                     | 0.15<br>mg./disc                     | 0.30<br>mg./disc | 0.45<br>mg./disc | 0.60<br>mg./disc | control |
| แถบ 1         | 0    | 218-216                             | -                                    | -                | -                | -                | -       |
| แถบ 2         | 0.11 | 222-218                             | -                                    | -                | -                | +                | -       |
| แถบ 3         | 0.24 | 222-216                             | -                                    | -                | -                | -                | -       |
| แถบ 4         | 0.68 | 230-218                             | -                                    | -                | -                | -                | -       |
| ส่วนที่ 1     | 0.11 | 230-226                             | -                                    | -                | -                | +                | -       |
| ส่วนที่ 2     | 0.68 | 230-224                             | -                                    | -                | -                | -                | -       |
| crude extract |      |                                     | -                                    | +                | +                | +                | -       |

หมายเหตุ แถบ 1-4 เป็นสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography

ส่วนที่ 1-2 เป็นสารที่แยกได้จาก Column Chromatography

เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เครื่องหมาย + หมายถึง ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ตาราง 11 ประสิทธิภาพของสารจากเปลือกรากข่อยในการฆ่าเชื้อ *Sarcina lutea*

| สาร           | Rf   | UV<br>absorption<br>maxima<br>(nm.) | ปริมาณของสารธรรมชาติจากเปลือกรากข่อย |                  |                  |                  |         |
|---------------|------|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
|               |      |                                     | 0.15<br>mg./disc                     | 0.30<br>mg./disc | 0.45<br>mg./disc | 0.60<br>mg./disc | control |
| แถบ 1         | 0    | 218-216                             | -                                    | -                | -                | +                | -       |
| แถบ 2         | 0.11 | 222-218                             | +                                    | +                | +                | +                | -       |
| แถบ 3         | 0.24 | 222-216                             | -                                    | +                | +                | +                | -       |
| แถบ 4         | 0.68 | 230-218                             | +                                    | +                | +                | +                | -       |
| ส่วนที่ 1     | 0.11 | 230-226                             | +                                    | +                | +                | +                | -       |
| ส่วนที่ 2     | 0.68 | 230-224                             | +                                    | +                | +                | +                | -       |
| crude extract |      |                                     | -                                    | +                | +                | +                | -       |

หมายเหตุ แถบ 1-4 เป็นสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography

ส่วนที่ 1-2 เป็นสารที่แยกได้จาก Column Chromatography

เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เครื่องหมาย + หมายถึง ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ตาราง 12 ประสิทธิภาพของสารจากเปลือกรากขอยในการฆ่าเชื้อ Staphylococcus aureus

| สาร           | Rf   | UV<br>absorption<br>maxima<br>(nm.) | ปริมาณของสารธรรมชาติจากเปลือกรากขอย |                  |                  |                  |         |
|---------------|------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
|               |      |                                     | 0.15<br>mg./disc                    | 0.30<br>mg./disc | 0.45<br>mg./disc | 0.60<br>mg./disc | control |
| แถบ 1         | 0    | 218-216                             | -                                   | -                | -                | -                | -       |
| แถบ 2         | 0.11 | 222-218                             | -                                   | -                | -                | -                | -       |
| แถบ 3         | 0.24 | 222-216                             | -                                   | -                | -                | +                | -       |
| แถบ 4         | 0.68 | 230-218                             | -                                   | +                | +                | +                | -       |
| ส่วนที่ 1     | 0.11 | 230-226                             | -                                   | -                | -                | +                | -       |
| ส่วนที่ 2     | 0.68 | 230-224                             | -                                   | -                | +                | +                | -       |
| crude extract |      |                                     | -                                   | +                | +                | +                | -       |

หมายเหตุ แถบ 1-4 เป็นสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography  
 ส่วนที่ 1-2 เป็นสารที่แยกได้จาก Column Chromatography  
 เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย  
 เครื่องหมาย + หมายถึง ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

บทย่อ สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายของการศึกษาค้นคว้า

1. เพื่อศึกษากรรมวิธีที่เหมาะสมในการสกัดและแยกสารธรรมชาติจากเปลือก  
รากชอย
2. ศึกษาสมบัติทางค่านเคมีและกายภาพของสารที่แยกได้จากเปลือกรากชอย  
โดยศึกษาการดูดกลืนแสง ultraviolet (UV absorption maxima) และทดสอบ  
สารที่แยกได้กับ reagent บางชนิด
3. ทดสอบประสิทธิภาพในการหาเชื้อแบคทีเรียบางชนิดของสารธรรมชาติที่แยกได้

ขอบเขตของการศึกษาค้นคว้า

- (1) สกัดสารธรรมชาติจากเปลือกรากชอยโดยใช้สารละลาย
- (2) แยกสารธรรมชาติที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยใช้ขบวนการ Thin-  
Layer Chromatography and Column Chromatography
3. ศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพวิเคราะห์ ทำการตรวจหาสมบัติการดูดกลืนแสงของสาร  
ธรรมชาติที่แยกได้ด้วย UV spectrophotometer ตรวจหาค่า Rf ของสารจาก Thin-  
Layer Chromatography และคุณสมบัติทางเคมีกับ reagent บางชนิด
- (4) ทดสอบประสิทธิภาพในการหาเชื้อแบคทีเรียของสารที่แยกได้กับเชื้อ

Bacillus subtilis

Sarcina lutea

Staphylococcus aureus

## สรุปผลการค้นคว้า

1. แยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากข่อยด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography ได้สี่สาร และ Column Chromatography แยกได้สองสาร จากการชะด้วย methanol
2. สารที่แยกได้ด้วย Thin-Layer Chromatography มีค่า Rf เท่ากับ 0, 0.11, 0.24, 0.68 และมีค่า UV absorption maxima ที่ความยาวคลื่น 218-216, 222-218, 222-216 และ 230-218 nm. ตามลำดับ สารที่แยกได้จาก Column Chromatography นำไปหาค่า Rf ด้วย Thin-Layer Chromatography ส่วนที่หนึ่ง มีค่า Rf 0.11 และส่วนที่สองมีค่า Rf 0.68 ตามลำดับ และมีค่า UV absorption maxima ที่ความยาวคลื่น 230-226 nm. และ 230-224 nm. ตามลำดับ
3. สารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography แถบ 1-4 ให้ปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu's reagent แถบสี่ให้ปฏิกิริยากับ 3, 5-dinitrobenzoic acid แถบ 1-4 ไม่ให้ปฏิกิริยากับ Dragendorff's reagent และ perchloric acid สารที่แยกได้จาก Column Chromatography ส่วนที่ 1-2 ให้ปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu's reagent และส่วนที่สอง ให้ปฏิกิริยากับ 3,5-dinitrobenzoic acid ทั้งสองส่วนไม่ให้ปฏิกิริยากับ Dragendorff's reagent และ perchloric acid
4. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สารแถบหนึ่ง (Rf = 0) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc สารแถบสอง (Rf = 0.11) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Bacillus subtilis ที่ความเข้มข้น 0.60 mg./disc ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.15 mg./disc 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc 0.60 mg./disc สารแถบสาม (Rf = 0.24) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc และ 0.60 mg./disc และยับยั้งการเจริญของเชื้อ Staphylococcus aureus ที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc สารแถบสี่ (Rf = 0.68) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของ

สาร 0.15 mg./disc 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc และ 0.60 mg./disc  
 ส่วนสารจาก Column Chromatography สารส่วนที่หนึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ  
Bacillus subtilis ที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc ยับยั้งการเจริญของเชื้อ  
Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.15 mg./disc 0.30 mg./disc 0.45  
 mg./disc 0.60 mg./disc และยับยั้งการเจริญของเชื้อ Staphylococcus aureus  
 ที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc สารจากส่วนที่สองสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ  
Sarcina lutea ที่ความเข้มข้นของสาร 0.15 mg./disc 0.30 mg./disc 0.45  
 mg./disc และ 0.60 mg./disc และยับยั้งการเจริญของเชื้อ Staphylococcus  
aureus ที่ความเข้มข้นของสาร 0.45 mg./disc และ 0.60 mg./disc

### อภิปรายผลการทดลอง

กรรมวิธีในการสกัดและแยกสาร

นำสารที่สกัดได้มาแยกด้วย Thin-Layer Chromatography วิธีนี้ใช้สาร  
 นำมาแยกจำนวนเล็กน้อยและทราบผลรวดเร็ว จึงเหมาะที่จะใช้แยกสารที่มีจำนวนน้อยและ  
 ต้องการทราบผลเร็ว จากการทดลองแยกสารจากเปลือกกรากช่อนี้ แยกสารได้สี่ชนิด

วิธี Column Chromatography วิธีนี้ใช้เวลานาน และใช้สารได้ปริมาณมาก ๆ  
 ข้อดีของ Column Chromatography คือ ใช้แยกสารได้ครั้งละปริมาณมาก ๆ

การทดลองใช้ Thin-Layer Chromatography กับ Column  
 Chromatography แยกสาร วิธี Thin-Layer Chromatography ต้องควบคุมอุณหภูมิ  
 ความหนาของ plate และสภาวะไฟคงที่ เพราะถ้าสภาวะเปลี่ยนไป การแยกสารก็  
 เปลี่ยนแปลงไปด้วย

การทดสอบกับ reagent บางชนิด

จาก Thin-Layer Chromatography แยกสารได้สี่ชนิด สารทั้งสี่ชนิดให้  
 ปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu's reagent ซึ่งแสดงคุณสมบัติของสารประเภท  
 phenolic และในแถบสี ( $R_f = 0.68$ ) ให้ปฏิกิริยากับ 3, 5-dinitrobenzoic acid

ที่ใช้สำหรับทดสอบ cardiac glycoside จาก Column Chromatography แยกได้สองส่วน ทั้งสองส่วนให้ปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu's reagent และส่วนที่สองให้ปฏิกิริยากับ 3, 5-dinitrobenzoic acid ผลการทดลองนี้แสดงว่า สารที่แยกได้จากเปลือกกรากชอย เป็นสารประเภท phenolic และ cardiac glycoside จาก Thin-Layer Chromatography แยกสารได้สี่ชนิด ส่วนจาก Column Chromatography แยกได้สามชนิด โดยยังมีสารที่ติดอยู่ใน column อีกหนึ่งส่วน (ซึ่งอาจจะเป็นสารเดียวกันที่ได้จากแถบหนึ่ง  $R_f = 0$ )

ผลการทดลองแยกสารจากเปลือกกรากชอยนี้ แยกได้สารประเภท phenolic และ cardiac glycoside สาร cardiac glycoside มีรายงานว่าพบจากเปลือกกรากชอย แต่ยังมีได้ทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ทั้งนี้ cardiac glycoside อาจมีผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย จากการทดลองสารที่แสดงว่าเป็น cardiac glycoside สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้

ผลการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

ประสิทธิภาพของสารในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียพบว่า crude extract สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Bacillus subtilis ที่ความเข้มข้นของสาร 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc 0.60 mg./disc เมื่อนำ crude extract มาแยกสารที่แยกได้ในแถบสอง และส่วนที่หนึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc เชื้อ Sarcina lutea พบว่า crude extract สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของสาร 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc 0.60 mg./disc เมื่อนำ crude extract มาแยกแล้วทดสอบกับเชื้อ Sarcina lutea พบว่าสารแถบหนึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อได้น้อยที่สุด คือ ยับยั้งที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc เชื้อ Staphylococcus aureus crude extract ยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของสาร 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc 0.60 mg./disc เมื่อนำ crude extract มาแยกพบว่า แถบ 1-2 ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ แถบสามยับยั้งที่ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc แถบสี่ยับยั้งที่ความเข้มข้นของสาร 0.30 mg./disc 0.45 mg./disc 0.60 mg./disc ส่วนที่หนึ่ง

ใช้ความเข้มข้นของสาร 0.60 mg./disc ส่วนที่สองใช้ความเข้มข้นของสาร 0.45 mg./disc และ 0.60 mg./disc ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Staphylococcus aureus

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อพบว่า crude extract ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียดีกว่า สารที่แยกออกจากกันแล้ว

ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของ crude extract ดีกว่าสารที่แยกแล้ว เพราะใน crude extract มีสารอยู่มากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งมีความสามารถในการฆ่าเชื้อต่าง ๆ ได้ก็แตกต่างกัน เมื่อแยกสารออกจากกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารบางตัวเสริมประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียแก่กันและกัน จึงทำให้ crude extract มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่าและประสิทธิภาพดีกว่าสารที่แยกได้

จาก crude extract แยกสารที่แยกได้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับผลในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในปัจจุบัน ในรายงานของ ศศิธร วสุวัต และคณะ พบว่า เชื้อ Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus และ Sarcina lutea ถูกยับยั้งโดย terramycin ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.5 mg./ml. และจากการวิจัยประสิทธิภาพของสารจากเปลือกรากข่อย ใช้ crude extract 0.30 mg./disc สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ได้ จึงนำสารจากเปลือกรากข่อยมาศึกษาต่อเพื่อใช้ประโยชน์เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

#### ข้อเสนอแนะ

1. สารที่แยกได้และมีผลในทางฆ่าเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกัน ควรศึกษาเพิ่มเติมในค่านเคมี เกสชีววิทยา เพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอแก่การใช้ประโยชน์ทางยา
2. ปรับปรุงวิธีการแยกสารขึ้นห้องปฏิบัติการนี้ให้เหมาะสมแก่การผลิตขั้นอุตสาหกรรม เพื่อความรวดเร็วในการแยกและแยกสารได้คราวละมาก ๆ
3. ศึกษาความเหมาะสมทางเภสัชวิทยา เพื่อหาแนวทางที่จะใช้สมุนไพรข่อยมาใช้เป็นยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียแทนยาฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน
4. อาจใช้วิธีการทดลองในครั้งนั้นนำไปปรับปรุงเพื่อใช้แยกสารจากพืชชนิดอื่นที่เหมาะสมได้

บรรณานุกรม

## บรรณานุกรม

- เทพ เชียงทอง "การวิจัยทางเคมีและปัญหาข้อขัดข้องเกี่ยวกับการวิจัยสมุนไพรไทย"  
วิทยาศาสตร์ 11 . 47-51 พฤศจิกายน 2520
- พรสวรรค์ คิษยบุตร และ ศศิธร วสุวัต การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคของสมุนไพร พิมพ์ในงานรายงานการวิจัยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย 1 กุมภาพันธ์ 2520 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย 2520, 6 หน้า
- วิเชียร จีรวงส์ "สมุนไพร" วิทยาศาสตร์ 11 : 11-28 พฤศจิกายน 2520
- 27 ศศิธร วสุวัต และ พรสวรรค์ คิษยบุตร งานวิจัยสกัดสารแสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์จากต้นข่อย เพื่อใช้เป็นตัวยาฆ่าเชื้อในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและยสมิในยาสีฟันป้องกันฟันผุ พิมพ์ในงานรายงานการวิจัยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย 25 เมษายน 2517 สถาบันวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย 2520, 15 หน้า
- เสงี่ยม พงษ์บุตรอก ไม้เทศไม้เมืองไทย เกษมบรรณกิจ 2508, 596 หน้า
- 38 Blair, J.E., E.H. Lennet and J.P. Traunt. Manual of Clinical Microbiology. Betheoda, American Society for Microbiology, 1970. 727 p.
- Barua, A.K., S.P. Dutta and S.K. Pal. "Thin-Layer Chromatography of Pentacyclic Triterpenes," Journal of Chromatography. 31 : 569-571, September, 1967.
- Barua, A.K., S.K. Pal and K.K. Karu. "Chemical Examination of Streblus asper," Journal Indian Chemistry Society. 45 : 89, January, 1968.
- Chopra, R.N. and others. Glossary of Indian Medicinal Plant. Calcutta, Dhuz U.N. and Son Private Limited, 1956. 235 p.
- Dustur, N. Noshir. "Milk-Clotting Enzyme from Plants," Indian Farming. 9 : 451-453, November, 1949.
- Dutta, S.P. "Separation of cis and trans of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated acids by Thin-Layer Chromatography," Journal of Chromatography. 29 : 263-264, July, 1967.

- Fernandes, F., V.N. Kamat and S.S. Bhatnagar. "The Chemical and Pharmacological Examination of Streblus asper," Current Science (Indian). 30 : 420, November, 1961.
- Gaionde, B.B., A.X. Vaz and Petel R. Jal. "Chemical and Pharmacological Study of Root Bark of Streblus asper Linn.," Indian Journal of Medicinal Sciences. 4 : 191-199, April, 1964.
- Gupta, A.S. and Sukh Dev. "Chromatography of Organic Compounds I Thin-Layer Chromatography of Olefins," Journal of Chromatography. 12 : 189-195, October, 1963.
- Ikan, R. Kashman and E.D. Bergmann. "Thin-Layer Chromatography of Tetra- and Pentacyclic Triterpenes," Journal of Chromatography. 14 : 275-279, April, 1964.
- Iyengar and G.S. Pendse. "Pharmacognosy of Streblus asper Root Bark and Its Tincture," The Indian Journal of Pharmacy. 25 : 372-375, November, 1963.
- Khare, M.F. and others. "Glycoside and Aglycon CCXXVII Glycoside of Streblus asper," Helvetica Chimica Acta. 45 : 1515-1576, May, 1962.
- Krisnamurti, C.R. and V. Subrahmanyam. "Vegetable Rennet II Vegetable Rennet from Streblus asper and Preparation of Cheese by Use of Vegetable Rennets," Indian Journal Dairy Science. 1 : 106-110, June, 1948.
- Manzetti and T. Reichstein. Glycosides and Aglycons CCLX Glycosides of Streblus asper," Helvetica Chimica Acta. 47 : 2303-2330, October, 1964.
- Ram, J. and K.K. Reddi. "Studies on the Milk-Clotting Enzyme of Streblus asper," Journal Indian Institute of Science. 35 : 215-222, January, 1953.
- Roy, K. Sunil. "Chemical Investigation of Streblus asper," Annals of Biochemistry and Experimental Medicine. 12 : 353-354, December, 1960.
- Stahl, E. Thin-Layer Chromatography A Laboratory Hand Book. New York, Academic Pressing, 1965. 1041 p.

ภาคผนวก

ตาราง 13 ปริมาณสารที่แยกได้จาก Thin-Layer Chromatography ที่มีค่า Rf ต่าง ๆ  
จากการใช้ plate สามแผ่น

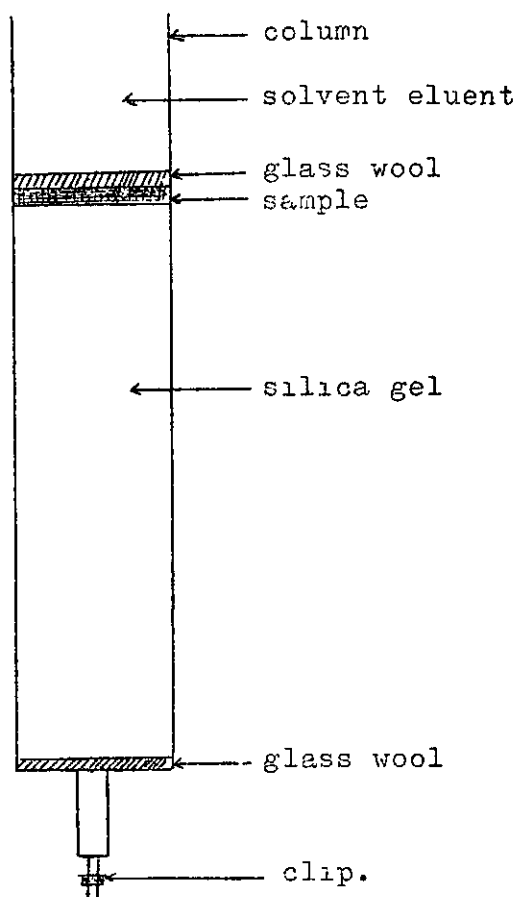
| Number          | Dish + S.a<br>(g.) | Dish<br>(g.) | S.a.<br>(g.) |
|-----------------|--------------------|--------------|--------------|
| P <sub>11</sub> | 39.1048            | 39.1031      | 0.0017       |
| P <sub>12</sub> | 26.6290            | 26.6270      | 0.0020       |
| P <sub>13</sub> | 29.1952            | 29.1927      | 0.0025       |
| P <sub>14</sub> | 28.1173            | 28.0977      | 0.0196       |
| P <sub>21</sub> | 36.7391            | 36.7373      | 0.0018       |
| P <sub>22</sub> | 23.6874            | 23.6848      | 0.0026       |
| P <sub>23</sub> | 27.0142            | 27.0115      | 0.0027       |
| P <sub>24</sub> | 27.9435            | 27.9283      | 0.0152       |
| P <sub>31</sub> | 25.6180            | 25.6152      | 0.0028       |
| P <sub>32</sub> | 36.3091            | 36.3071      | 0.0020       |
| P <sub>33</sub> | 40.7104            | 40.7071      | 0.0027       |
| P <sub>34</sub> | 27.2354            | 27.2170      | 0.0184       |

หมายเหตุ S.a. = Streblus asper

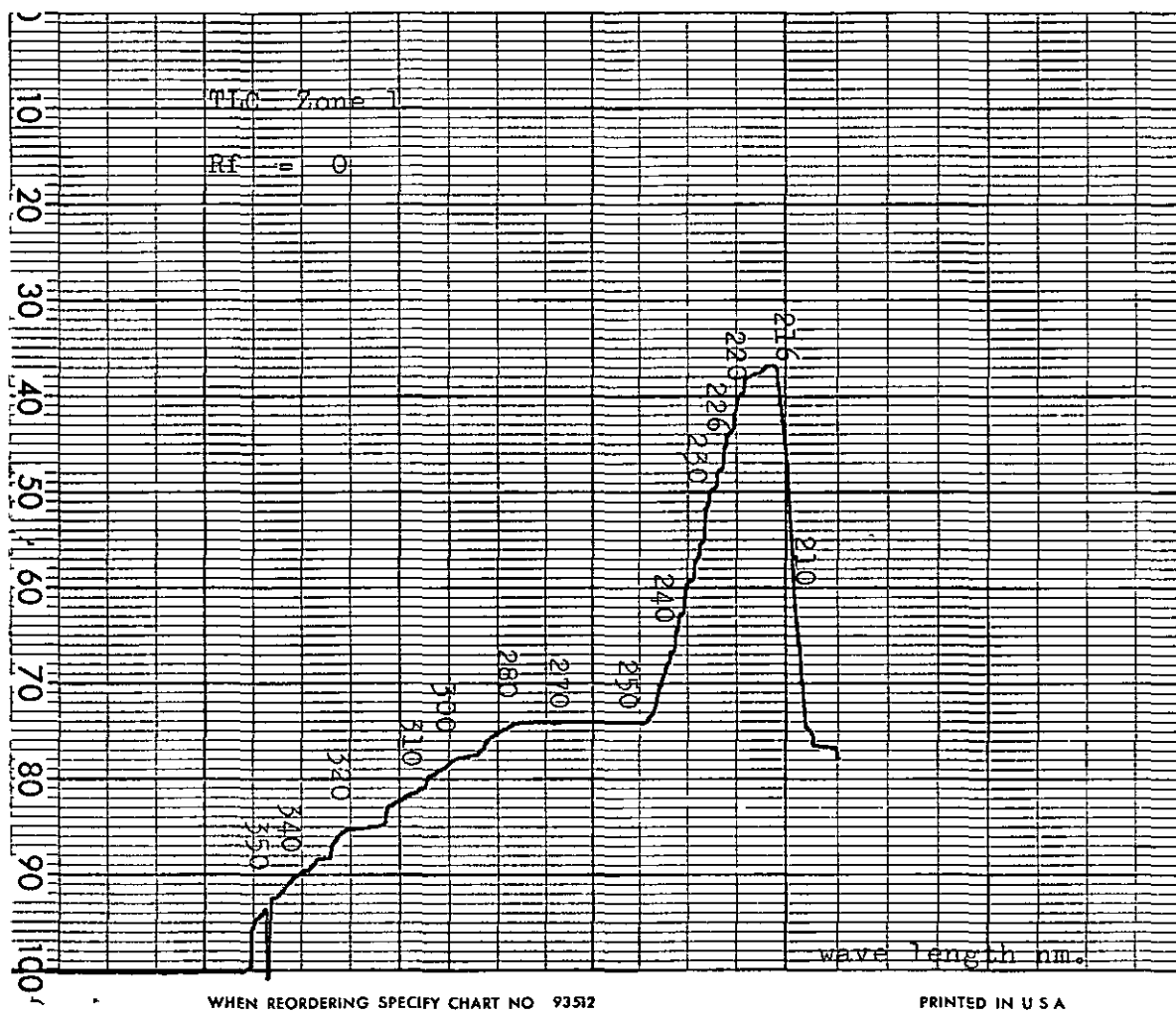
P<sub>34</sub> = สารที่มีค่า Rf ในแถบที่สี่ของ plate ที่สาม

ตาราง 14 ตัวทำละลายและผลการแยกสารธรรมชาติจากเปลือกกรากข่อย

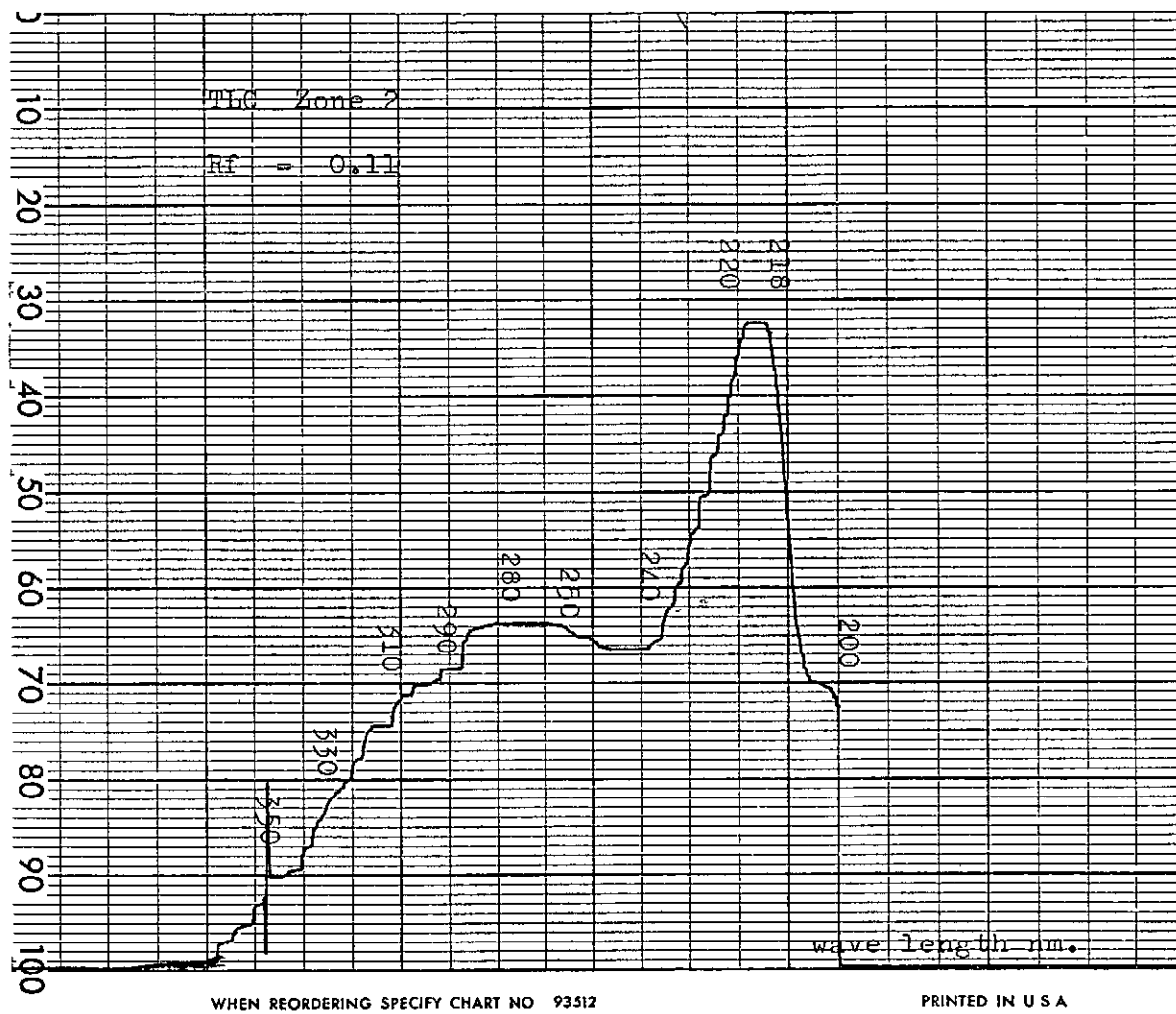
| Number | Solvent system (V/V)                             | Detecting | Zone separation |
|--------|--------------------------------------------------|-----------|-----------------|
| 1      | ether saturated with water                       | UV-light  | -               |
| 2      | benzene : ether : ethanol = 3 : 2 : 1            | UV-light  | 2               |
| 3      | benzene : ether : ethanol = 1 : 1 : 1            | UV-light  | -               |
| 4      | benzene : ether : ethanol = 5 : 3 : 1            | UV-light  | -               |
| 5      | benzene : ether : ethanol = 5 : 4 : 1            | UV-light  | -               |
| 6      | benzene : ether : ethanol = 4 : 4 : 1            | UV-light  | 2               |
| 7      | benzene : ether : ethanol = 5 : 3 : 2            | UV-light  | -               |
| 8      | benzene : ether : ethanol = 1 : 3 : 5            | UV-light  | -               |
| 9      | benzene : ether : ethanol = 4 : 3 : 1            | UV-light  | -               |
| 10     | benzene : ether : ethanol = 5 : 2 : 1            | UV-light  | 3               |
| 11     | benzene : ether : ethanol = 1 : 1 : 2            | UV-light  | -               |
| 12     | benzene : ether : methanol = 5 : 2 : 1           | UV-light  | 3               |
| 13     | benzene : ether : methanol = 5 : 3 : 1           | UV-light  | -               |
| 14     | benzene : chloroform : methanol =<br>1 : 2 : 1   | UV-light  | -               |
| 15     | benzene : chloroform : methanol =<br>2 : 4 : 1   | UV-light  | -               |
| 16     | benzene : chloroform : methanol =<br>3 : 2 : 1   | UV-light  | -               |
| 17     | benzene : ether : chloroform =<br>1 : 1 : 1      | UV-light  | -               |
| 18     | ethyl acetate : methanol : water =<br>16 : 1 : 1 | UV-light  | -               |
| 19     | benzene : ether = 5 : 3                          | UV-light  | -               |
| 20     | benzene : ethanol = 5 : 3                        | UV-light  | -               |
| 21     | benzene : chloroform = 2 : 1                     | UV-light  | -               |
| 22     | benzene : ether = 5 : 1                          | UV-light  | -               |
| 23     | benzene : ether = 1 : 1                          | UV-light  | 2               |
| 24     | benzene : chloroform = 1 : 2                     | UV-light  | -               |
| 25     | ether : ethanol = 1 : 1                          | UV-light  | -               |
| 26     | ether : ethanol = 3 : 1                          | UV-light  | -               |
| 27     | benzene : ethanol = 3 : 1                        | UV-light  | -               |
| 28     | chloroform : methanol = 9 : 1                    | UV-light  | -               |
| 29     | ether : methanol = 1 : 1                         | UV-light  | -               |
| 30     | ether : methanol = 3 : 2                         | UV-light  | -               |
| 31     | ether : ethanol = 3 : 2                          | UV-light  | -               |
| 32     | ether : methanol = 1 : 2                         | UV-light  | 4               |
| 33     | ether : methanol = 2 : 3                         | UV-light  | -               |



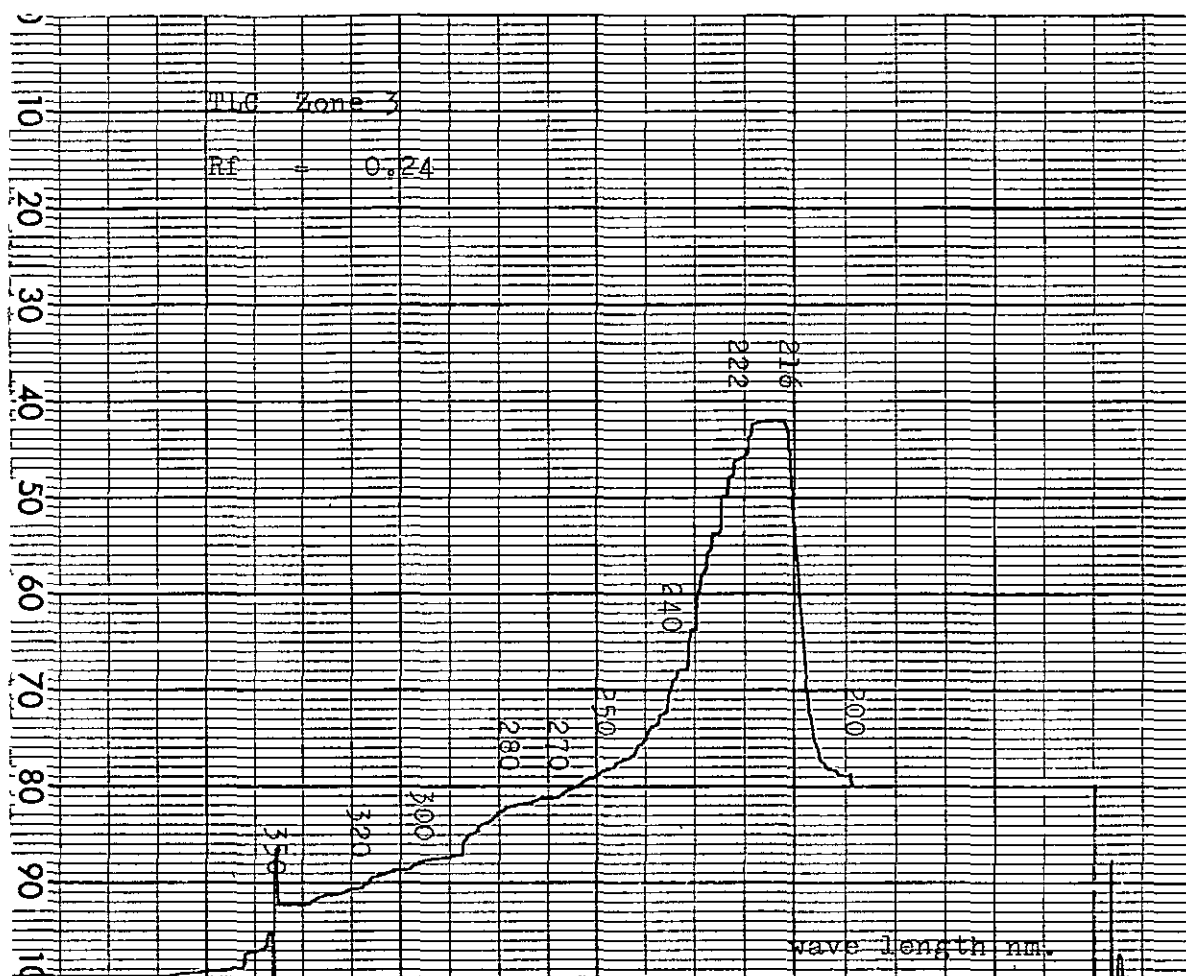
ภาพประกอบ 2 การแยกสารด้วย Column Chromatography



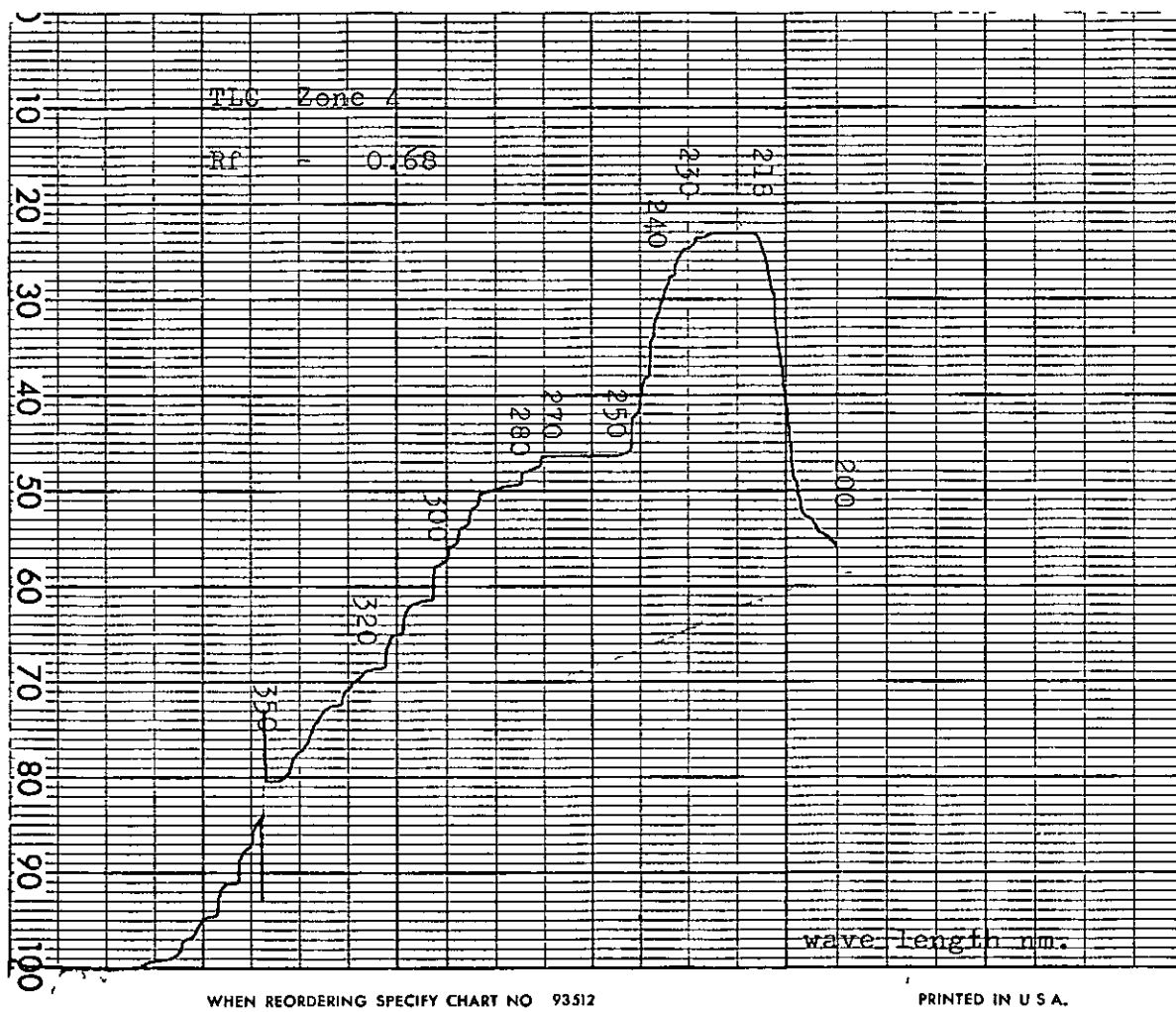
ภาพประกอบ 3 การดูดกลืนแสง UV ของสารแถบที่หนึ่งจาก Thin-Layer Chromatography



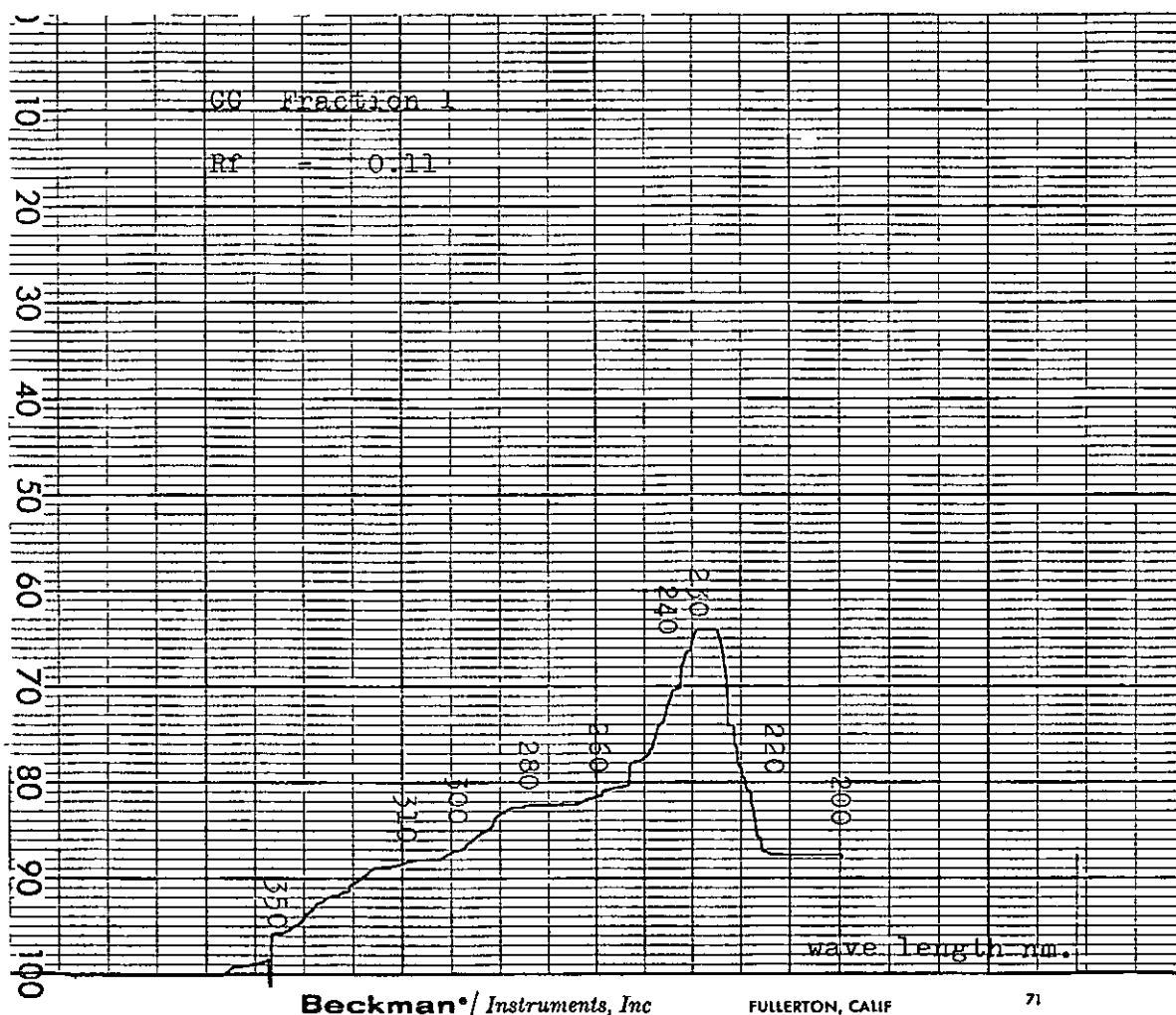
ภาพประกอบ 4 การดูดกลืนแสง UV ของสารแถบที่สองจาก Thin-Layer Chromatography



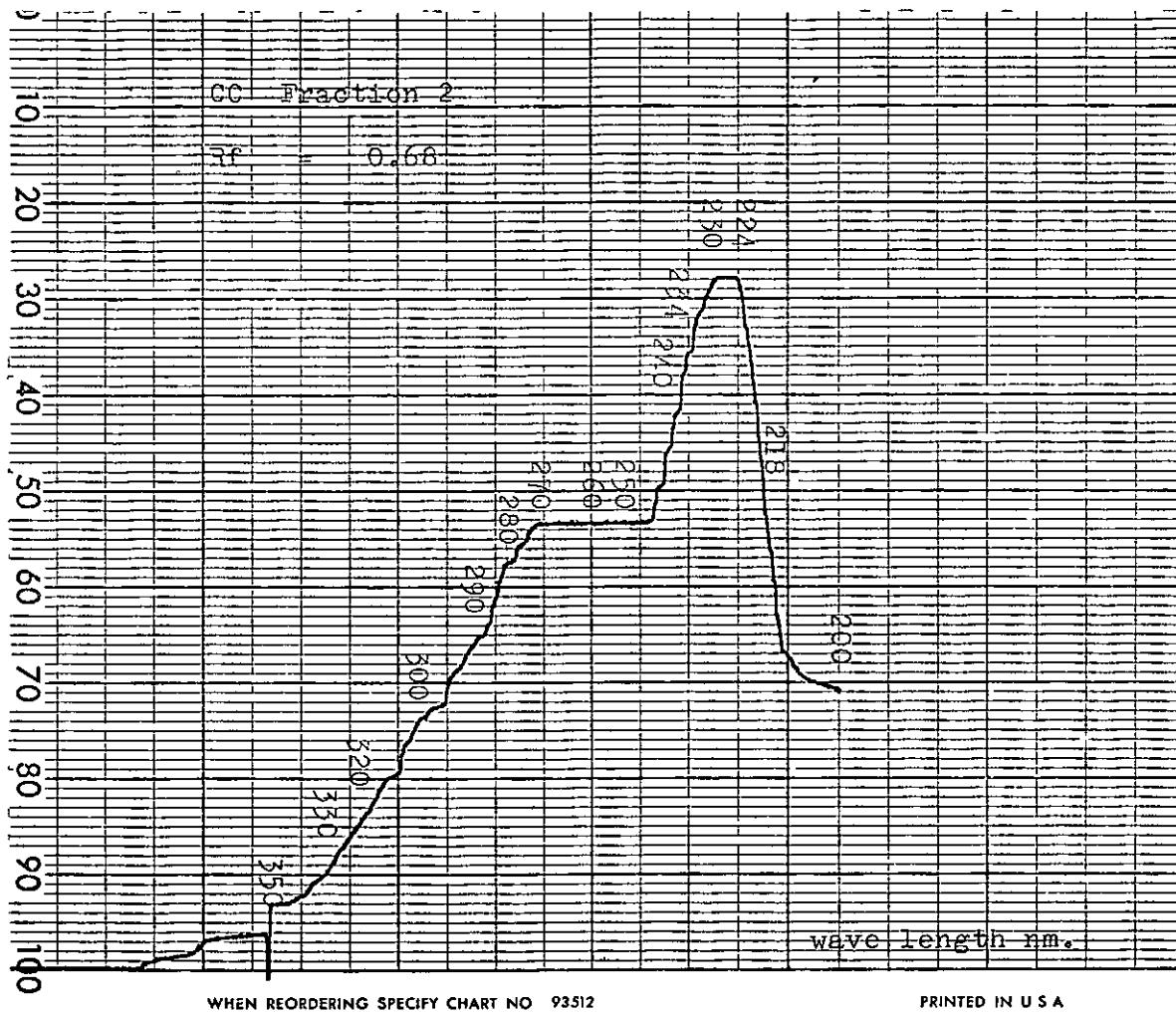
ภาพประกอบ 5 การดูดกลืนแสง UV ของสารแถบที่สามจาก Thin-Layer Chromatography



ภาพประกอบ 6 การดูดกลืนแสง UV ของสารแถบที่ 4 จาก Thin-Layer  
Chromatography



ภาพประกอบ 7 การดูดกลืนแสง UV ของสารส่วนที่หนึ่งจาก Column  
Chromatography



ภาพประกอบ 8 การดูดกลืนแสง UV ของสารส่วนที่สองจาก Column  
Chromatography