บทที่ 2

การทดลองและผลการทดลอง

2.1 เครื่องมือและสารเคมี

2.1.1 Ultraviolet lamp ของ Hanau

2.1.2 Pye Unicam SP 8000 Ultraviolet Visible Recording Spectrophotometer ผลิตโดยบริษัท Pye Unicam Ltd Combridge England

Silica cell path length 10 mm

2.1.3 Thin layer chromatography ฉาบด้วย silicagel H-F 254

2.2 หนูทดลอง

2.2.1 วิธีเลี้ยง

หนูตัวเมียน้ำหนักเฉลี่ย ตัวละ (120-150 g) จำนวน 15 ตัว เลี้ยงโดยให้กินอาหารหนู(ลักษณะเป็นเม็ด) จากบริษัท F.E Zwllig ประเทศสิงคโปร์ หนูแต่ละตัวอยู่ในกรงแยกกันกรงละ 1 ตัว พื้นกรงทำด้วยลวดตาข่าย เพื่อให้อุจจาระและปัสสาวะตกลงมาที่กรวยพลาสติก ซึ่งผูกติดกับพื้นกรง ภายในกรวยใส่ลูกแก้วกลมขนาดใหญ่ที่ก้นกรวย กันอุจจาระปนกับปัสสาวะ อุจจาระจะอยู่ในกรวยซึ่งมีตาข่ายเล็ก ๆ วางกั้นอยู่ ส่วนปัสสาวะจะผ่านลงมาที่ลูกแก้ว และลงสู่ปลายกรวยซึ่งมีหลอดแก้วรอรับส่วนบนของกรงทำด้วยลวดตาข่ายเช่นเดียวกัน บนลวดตาข่ายเจาะทำที่ใส่ตะแกรงเล็ก ๆ เพื่อบรรจุอาหารหนู ภายในตะแกรงยังใช้เป็นที่ใส่ขวดน้ำอีกด้วย หนูจะกินน้ำได้จากปลายโลหะกลวงเล็ก ๆ ที่ติดอยู่ที่จุกขวด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2 คุณสมบัติ HCB และปริมาณที่ให้

HCB มีลักษณะผงสีเหลืองผลิตจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน ใช้ละลายน้ำ 40 mg/ml เพื่อให้เกิดการละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จึงใส่ไข่แดงเล็กน้อย

แต่ละวันใน 10 วันแรก ใช้ HCB 0.8-1.0 g ต่อ kg ของ น.น.ตัว หลังจากนั้นเพิ่มเป็น 1.2-1.3 g ต่อ kg ของ น.น.ตัวในแต่ละวันไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งใกล้เดือนที่สาม เมื่อสังเกตอาการหนู ถ้าพบอาการอ่อนแอลงกว่าเดิมมาก ลด HCB ให้เหลือ 2-3 วัน ให้ครั้งหนึ่ง

คุณสมบัติทั่ว ๆ ไปของ HCB (1)

ใช้เป็นยาฆ่าแมลงทั้งในบ้านในป่าและในการกสิกรรม สารเหล่านี้ร่างกายดูดซึมได้ดีทั้งในระบบทางเดินอาหารและระบบหายใจ หากได้รับมาก ๆ ทำให้ชักและถึงตายได้ ใช้ขนาดปานกลางทำให้เกิดอาการเบื่ออาหาร น้ำหนักลด หากสะสมไว้นาน ๆ จนถึงระดับมาก ก็จะทำให้เกิดอาการชักและถึงตายได้เช่นกัน ถ้าได้รับทีละเล็กละน้อยเป็นเวลานาน ก็อาจมีอาการชักได้ การเกิดพิษพบว่าเป็นพิษต่อระบบประสาท แต่กลไกทางชีวเคมียังไม่ทราบชัด

การเป็นพิษเฉียบพลัน หากได้รับปริมาณ 4.4×10^{-2} g ต่อ kg ของ น.น.ตัว ทำให้มีอาการชักภายใน 20 นาที หากได้รับปริมาณ 25.6×10^{-3} g ต่อ kg ของ น.น. ร่างกายเกิดอาการป่วยและถึงตายได้ หากได้รับทางผิวหนังโดยสัมผัสกับสารละลาย 0.5-2.5 % จะพบว่าเกิดพิษใน 24 ช.ม. ถึงสัปดาห์ ในอาหารพบว่าปริมาณมากกว่า 2.5×10^{-4} g ต่อ ลบ.ม. ทำให้เกิดพิษได้

2.2.3 วิธีป้อน

ใช้ Microsyling ขนาด 5 ml ที่ปลายมีหลอดพลาสติกเล็ก ๆ ติดอยู่ เพื่อสะดวกในการป้อน เวลาป้อนพยายามให้ปลายหลอดพลาสติกอยู่ตรงช่องหลอดอาหาร หนูจะได้ไม่สำลัก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.4 การเก็บอุจจาระ

เก็บอุจจาระจากหนูหลาย ๆ ตัวนำมารวมกัน และแช่ 5 % H_2SO_4 ใน CH_3OH เก็บไว้ในตู้เย็น ณ อุณหภูมิห้อง

ผลการทดลอง เริ่มเลี้ยงหนูทั้งหมด 15 ตัว หนูที่ให้กิน HCB 11 ตัว หนูที่ไม่ให้กิน HCB 4 ตัว

เดือนที่ 1 หนูยังแข็งแรงเป็นปกติ กินอาหารและน้ำได้มาก อุจจาระและปัสสาวะมาก ปัสสาวะสีเหลืองใส อุจจาระสีน้ำตาลมีลักษณะไม่แข็ง เมื่อครบ 1 เดือน หนูที่มี น.น. ตัวน้อยสุดจะตายไป 1 ตัว คงเหลือหนูที่ให้กิน HCB ในเดือนแรก 10 ตัว หนูที่ไม่ได้กิน HCB อยู่ครบ 4 ตัว

เดือนที่ 2 อาการหนูเฉื่อยชาลง กินอาหารและน้ำลดลง สังเกตจากอุจจาระและปัสสาวะลดลง ปัสสาวะสีเหลืองเข้ม อุจจาระสีน้ำตาลดำ ลักษณะแข็งกว่าเดือนแรก เมื่อครบเดือนที่ 2 หนูจะตายไปอีก 2 ตัว เหลือหนูที่ให้กิน HCB 8 ตัว หนูที่ไม่ให้กิน HCB อยู่ครบทุกตัว

เดือนที่ 3 อาการหนูอ่อนแอลงมาก ปัสสาวะและอุจจาระน้อยมาก ปัสสาวะจะเป็นสีแดงเข้ม อุจจาระสีดำมีลักษณะแข็ง สัปดาห์สุดท้ายก่อนหนูจะตายจะมีอาการดังนี้ ตกใจง่าย ร่างกายมีอาการสั่นตลอดเวลา จะมีอาการสั่นมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป จนกระทั่งไม่สามารถทรงกายกินอาหารและน้ำได้เอง ผลสุดท้ายร่างกายจะเป็นอัมพาต เคลื่อนไหวไม่ได้ ถ้าพบลักษณะอาการเช่นนี้ ประมาณ 1-2 วัน ก็จะตาย ระยะเวลาเกือบจะสิ้นเดือนที่ 3 หนูจะอ่อนแอลงมาก และจะตายวันละ 1-2 ตัว จนถึงสิ้นเดือนที่ 3 หนูที่ให้กิน HCB จะตายไปจำนวน 7 ตัว เหลือ 1 ตัว ส่วนหนูที่ไม่ได้กิน HCB ตาย 1 ตัว เหลือ 3 ตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

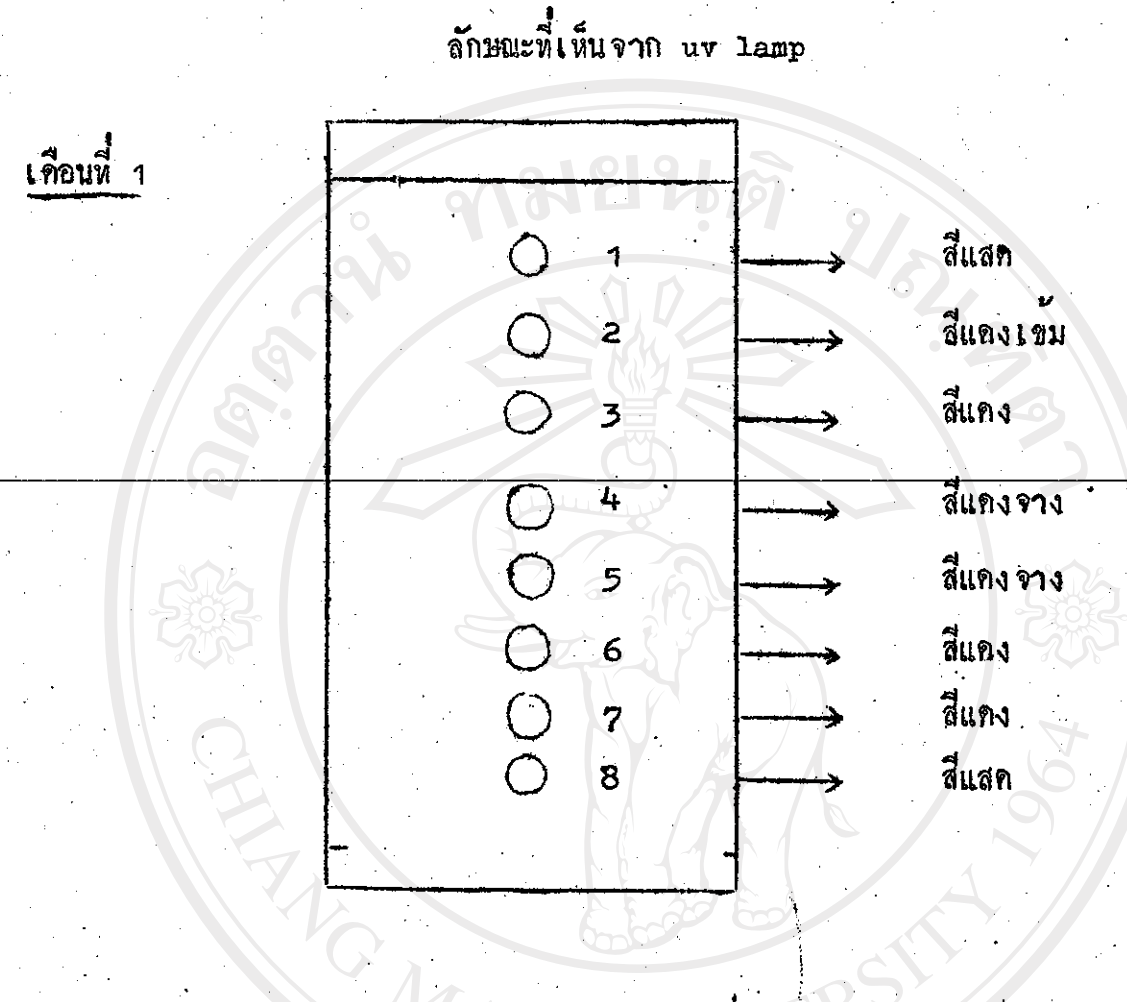
2.3 การเตรียม Porphyrins methyl ester (pme)

นำอุจจาระหนูจำนวน 20 g บดให้ละเอียด ใส่ 5 % H_2SO_4 ใน CH_3OH ทิ้งไว้ค้างคืน 18 ช.ม. เก็บไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เติม $CHCl_3$ 200 ml เขย่าให้เข้ากัน กรอง นำตะกอนล้างด้วย $CHCl_3$ จนกระทั่ง $CHCl_3$ ที่ล้างไม่มีสี red fluorescense นำ $CHCl_3$ ที่ได้จากการกรองครั้งแรกรวมกับ $CHCl_3$ ที่ล้างจำนวนมาก และทำให้เป็นกลางด้วย NH_3 1 % 100 ml และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง หลังจากนั้น กรองด้วยกระดาษกรองที่อิ่มตัวด้วย $CHCl_3$ ถ้ามีน้ำปนใน $CHCl_3$ กระดาษกรองจะเป็นตัวดูดน้ำไว้ นำสารละลาย $CHCl_3$ ทั้งหมด evaporate ให้ $CHCl_3$ ระเหยภายใต้ความดันต่ำ ณ อุณหภูมิ 40-50 °C ก็จะได้ porphyrins methyl ester เหลืออยู่

2.4 Isolation และ purification

นำ porphyrins methyl ester ที่ได้จากข้อ 2.3 มาทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ TLC ละลาย (pme) ด้วย $CHCl_3$ จำนวนเล็กน้อย ใช้ capillary tube spot บน plate developing solvent ที่ใช้คือ benzene:butan 2 40 : 3 v/v เมื่อ plate แห้ง run อีกครั้งใน solvent system A chloroform: kerosene : methonal 40 : 20 : 1 v/v/v จะได้ผลดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 5 แสดงผลวิเคราะห์ pme ในอุจจาระหนูที่กิน HCB ในเดือนที่ 1

ผลการทดลอง

ในเดือนที่ 1 จะพบว่า pme จะแยกได้ 8 spot เมื่อส่องด้วย uv lamp จะเห็นสี red fluorescence จากการเปรียบเทียบค่า Rf จากตารางที่ 2 กับการทดลองของ GH Elder(8) พบว่า spot 1 คือ Protoporphyrin methyl ester, spot 2 คือ Coproporthyrin methyl ester spot 3 คือ Porphyrin 1 (isocoproporphyrin methyl ester & de-ethyl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

isocoproporphyrin methyl ester, spot 4 คือ Penta carboxylic porphyrin methyl ester, spot 5 คือ hexacaroxylic porphyrin methyl ester, spot 6 คือ heptacarboxylic porphyrin methyl ester spot 7 คือ uroporphyrin methyl ester, spot 8 คือ porphyrin 2 (hydroxyisocoproporphyrin methyl ester)

ลักษณะที่สังเกตจาก uv lamp พบว่า spot ที่ 1 สีแดงไม่เข้มเท่า spot ที่ 2 spot ที่ 2 สีแดงเข้มมากที่สุด เมื่อเทียบกับ spot อื่น ๆ แสดงว่า สัดส่วนของ copro มีมากที่สุด

spot ที่ 3 สีแดง แต่ไม่เข้มมาก ลักษณะเหมือนกับมี 2 spot ซ้อนกัน แยกจากกันไม่เด่นชัด

spot ที่ 4, 5, 6 สีแดงจาง ๆ

spot ที่ 6 สีแดงเข้มกว่า spot ที่ 4, 5

spot ที่ 7 สีแดง

spot ที่ 8 สีแดงจาง

ตารางที่ 2

Rf values (x100) ของ porphyrins methyl ester ที่ได้จากการทดลอง

solvent system	Proto	Copro	Porphyrin 1	penta	hexu	heptu	uro	Porphyrin 2
$CHCl_3$: Kesosin: CH_3OH:	84	71	65	60	49	39	29	15

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 การแยกและตกผลึก porphyrins methyl ester บางตัว

porphyrin methyl ester ที่ได้จากข้อ 2.3 นำมาละลาย $CHCl_3$ 5 ml ใช้ 0.3 ml applied เป็น streak บน plate แล้ว run developing solvent จะได้ผลดังที่กล่าวแล้วถึง 8 band

ใช้ Plate ขนาด 20 x 20 cm จำนวนหลายแผ่น ทำการทดลองดังข้อ 2.5 แล้วดูด porphyrin methyl ester ชนิดเดียวกัน แต่ละ plate มารวมกัน นำไปละลาย $CHCl_3$ แล้วกรองเพื่อให้ silicagel ออกมา นำไป evaporate ให้ $CHCl_3$ ระเหย ก็จะได้ porphyrin methyl ester แต่ละ band แยกกัน จากการทดลองพบว่าหลังจาก $CHCl_3$ ระเหยหมดแล้ว ก็ยังพบว่าแต่ละ band ของ porphyrin methyl ester ที่แยกได้ ยังมีของเหลวจำนวนเล็กน้อยเหลืออยู่ เข้าใจว่าคงเป็นพวกน้ำมัน ขั้นต่อไปต้องการทำให้ porphyrin methyl ester แต่ละ band ที่แยกได้เกิดการตกผลึก โดยนำไปละลายใน $CHCl_3$: CH_3OH 4:1 v/v จำนวนเล็กน้อย ทิ้งไว้ค้างคืนจะพบว่า ในแต่ละ band ไม่เกิดการตกผลึกเลย

เดือนที่ 2

นำอุจจาระจำนวน 20 g ทำ PLC เช่นเดียวกับเดือนแรกจะได้ผลการทดลองดังนี้ จากการสังเกตจาก uv lamp พบว่า band ที่ 2 copro มีสีแดงเข้มเช่นเดือนแรก แต่ขนาด band เล็กกว่าเดือนแรก ส่วน band ที่ 7 (uro) สีแสดแดง band ใหญ่กว่าเดือนแรก ในเดือนที่สองจะพบว่าปริมาณ copro น้อยกว่า uro band 4, 5 สีแดงเข้มกว่าเดือนแรก ส่วน band อื่น ๆ มีลักษณะคล้ายเดือนแรก

จากการทดลองได้ทำ PLC ซ้ำ 3-4 ครั้ง แต่ละครั้งพบว่าลักษณะที่สังเกตได้จาก uv lamp ไม่คล้ายกันพอที่จะแยก porphyrin methyl ester ชนิดเดียวรวมกันได้ ยกเว้น band 1 และ 2 จึงนำไปรวมกับ band ที่ 1 และ band ที่ 2 ของเดือนแรก และทำให้ตกผลึกดังข้อ 2.5 พบว่าไม่สามารถทำให้ตกผลึกได้ เพราะหลังจาก evaporate ให้ $CHCl_3$ ระเหยหมดแล้ว ยังมีของเหลวเล็กน้อยเหลืออยู่เช่นเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เดือนที่ 3

ทำ PLC เช่นเดียวกับเดือนแรก จะได้ผลการทดลองดังนี้ ในเดือนที่ 3 เมื่อสังเกตจาก uv lamp พบว่า copro จะมีสีแดงเข้ม band ใหญ่กว่า band ที่ 7 ส่วน band ที่ 4, 5, 6 สีแดงเข้มมากกว่าเดือนแรกและเดือนที่สอง band ที่ 7 (uro) ขนาด band เล็กลงกว่าเดือนที่สอง ลักษณะ band อื่น ๆ คล้ายกับเดือนแรก จากการสังเกตพบว่า ปริมาณ copro จะมากกว่า uro ในเดือนที่ 3

ในเดือนแรกและเดือนที่สอง หลังจากแยก porphyrins methyl ester ได้แล้ว ได้ทิ้งค้างคืนไว้ในตู้มืดหลายวันที่อุณหภูมิห้อง ก่อนที่จะนำไป run TLC แต่ในเดือนที่สาม หลังจากแยก porphyrins methyl ester ได้แล้ว นำไป run TLC เลย โดยไม่ได้เก็บไว้ในตู้มืด จากการทดลองใช้อุจจาระแต่ละครั้ง จำนวน 20 g พบว่าหลังจาก run TLC แล้ว สังเกตจาก uv lamp จะพบว่า แต่ละ band ที่แยกได้ในแต่ละครั้งมีลักษณะคล้ายกัน พอที่จะทำ porphyrins methyl ester ในแต่ละ plate ที่เป็นชนิดเดียวกัน รวมกันได้

ดำเนินการทดลองเพื่อแยก porphyrins methyl ester ให้ได้มาก ๆ เพื่อใช้ในการตกผลึกดังข้อ 2.5 พบว่า ไม่สามารถเกิดผลึกได้ เพราะหลังจากevaporate ให้ $CHCl_3$ ระเหยแล้ว ก็ยังพบของเหลวจำนวนเล็กน้อยเหลืออยู่

2.5 Spectral obsorption

ใช้ $CHCl_3$ 5 ml ละลาย crude porphyrins methyl ester applied เป็น streak บน plate 1 แผ่น ขูดแต่ละ band ละลาย $CHCl_3$ ที่ไม่มีสี red fluorescense ใน silicagel บนกระดาษกรอง นำ $CHCl_3$ ทั้งหมดไป evaporate ให้ $CHCl_3$ ระเหย เติม $CHCl_3$ 5 ml ของทุก ๆ band เพื่อให้มีปริมาตรเท่ากัน นำสารละลายใส่ silica cell วัด spectrum ในช่วง visible จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 6-13 และค่า absorption Maxium ของ porphyrin methyl ester ดังตารางที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

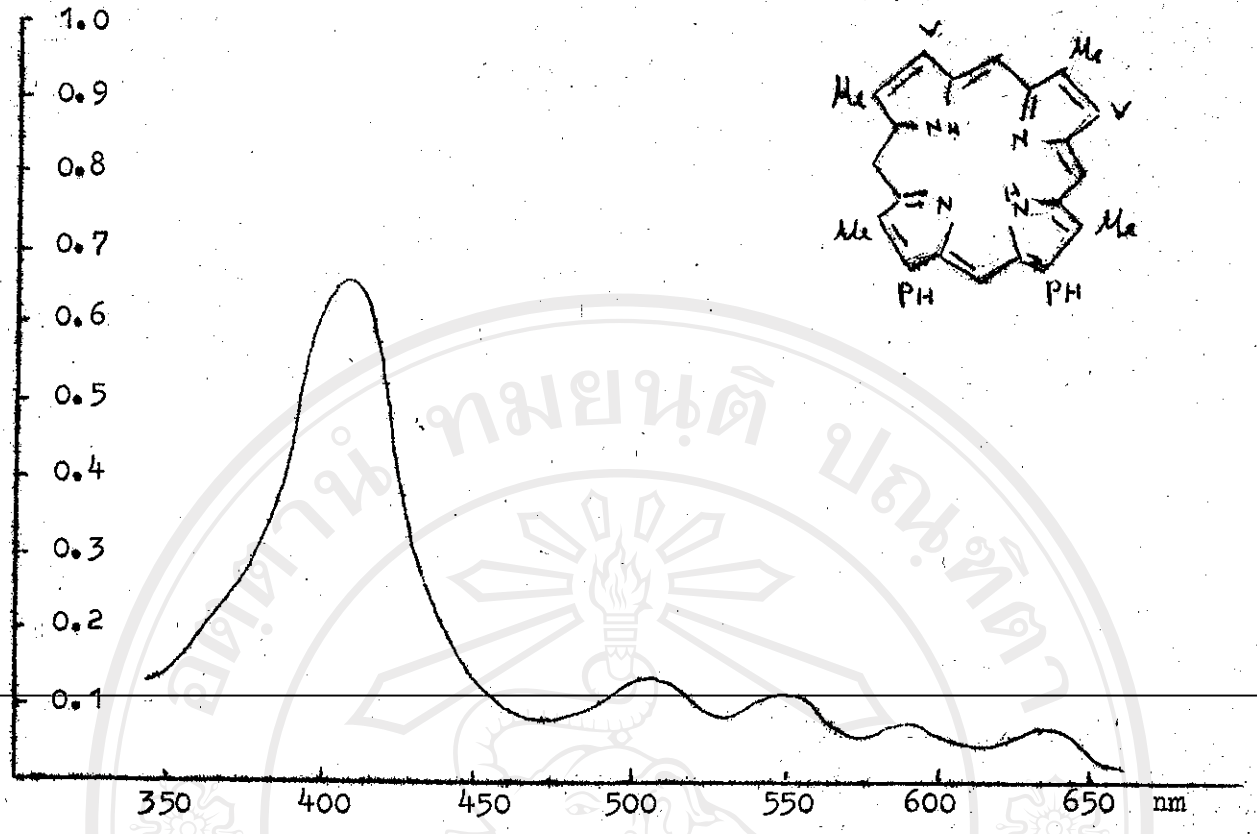
ตารางที่ 3

Absorption Maxima of porphyrins methyl ester

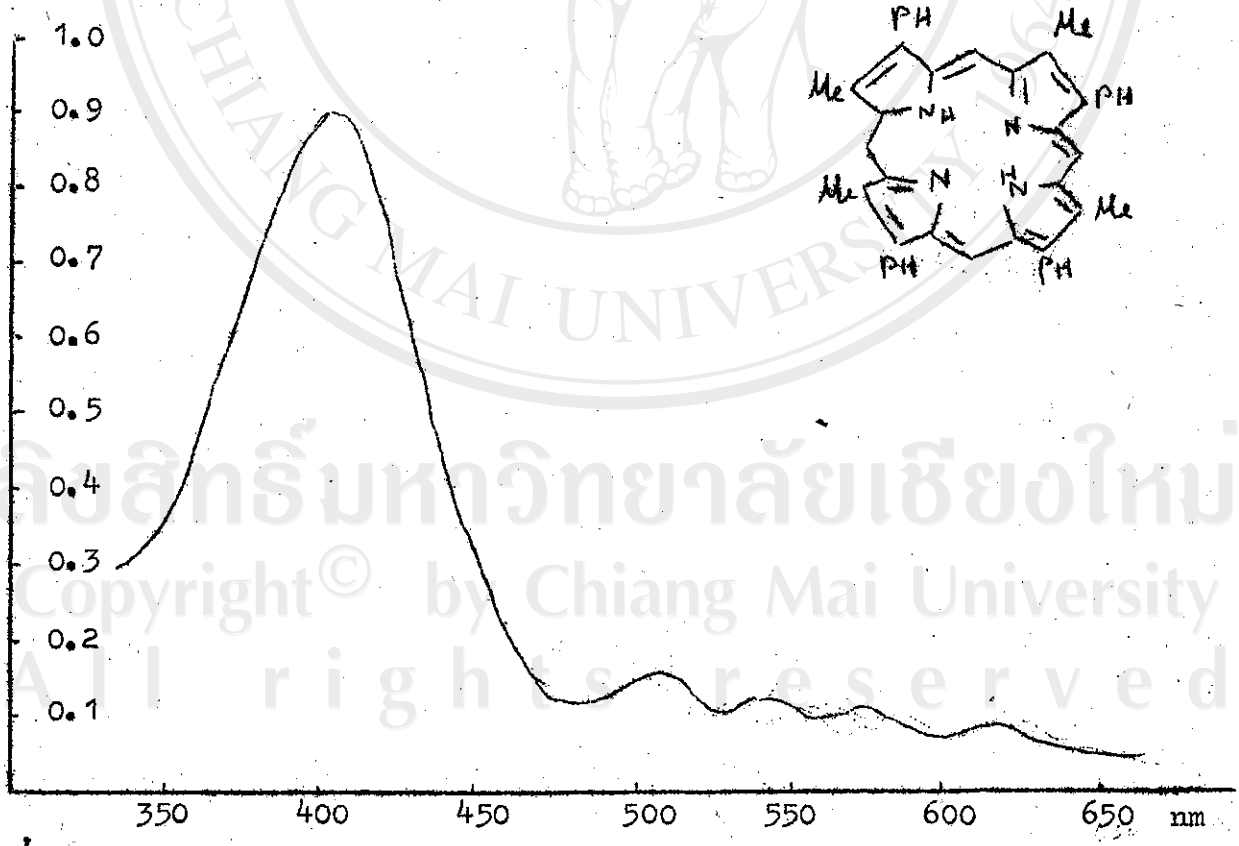
isolaled from feces of rats intonicated Henachlorobenzene

porphyrins	solvent $CHCl_3$	Absorption spectra wavelength maxima in nm				
		Soret	IV	III	II	I
proto	"	404	501	538	572	628
copro	"	400	502	536	566	610
porphyrin 1	"	406	498	538	564	622
penta	"	398	498	530	565	620
hexa	"	402	498	532	568	620
hepta	"	402	502	536	562	625
uro	"	401	498	534	562	622
porphyrin 2	"	400	500	530	572	600

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

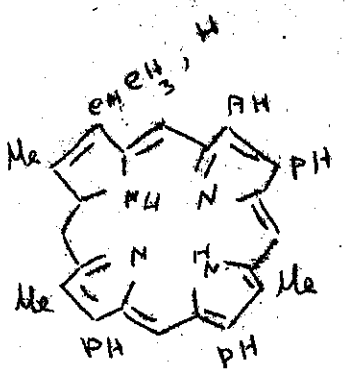


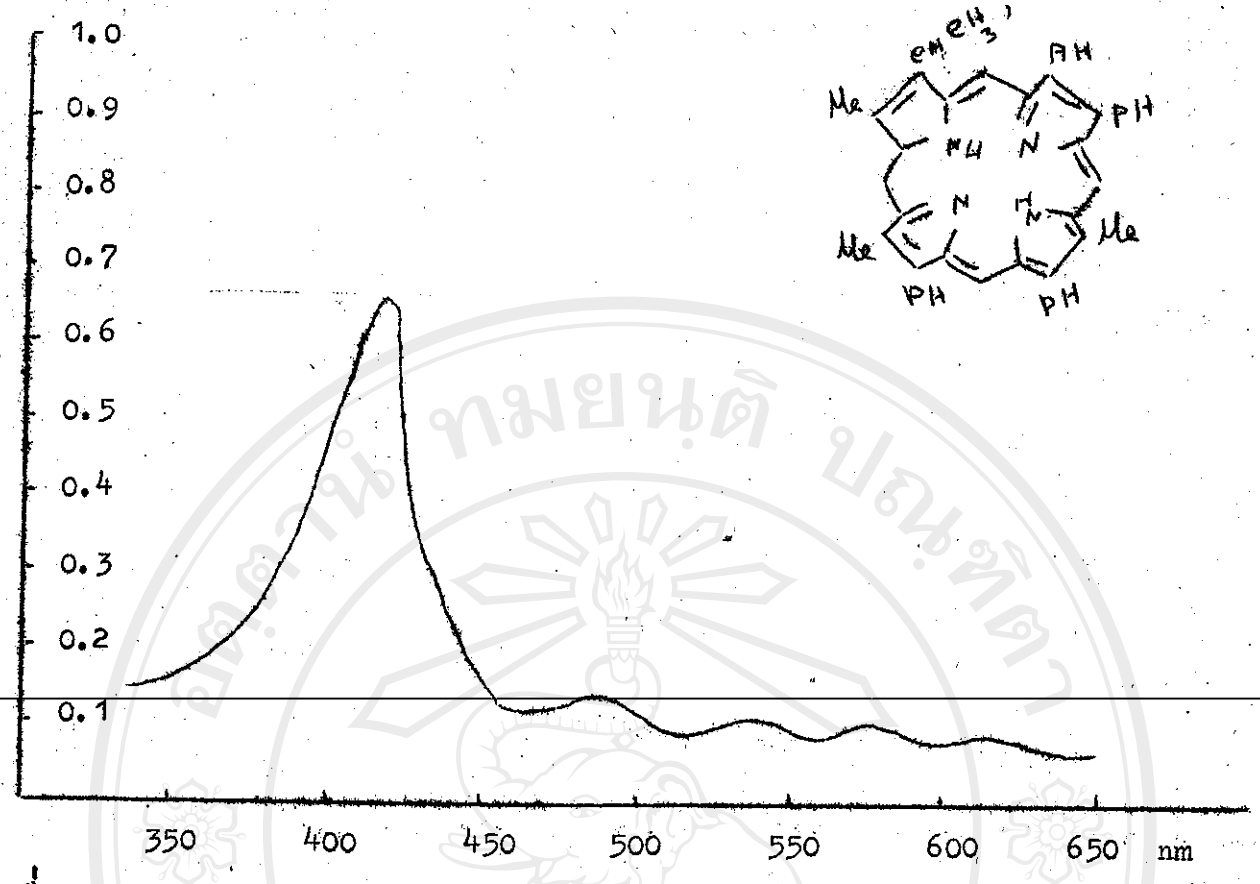
รูปที่ 6 Electronic Spectra of Protoporphyrin IX dimethyl Ester in $CHCl_3$



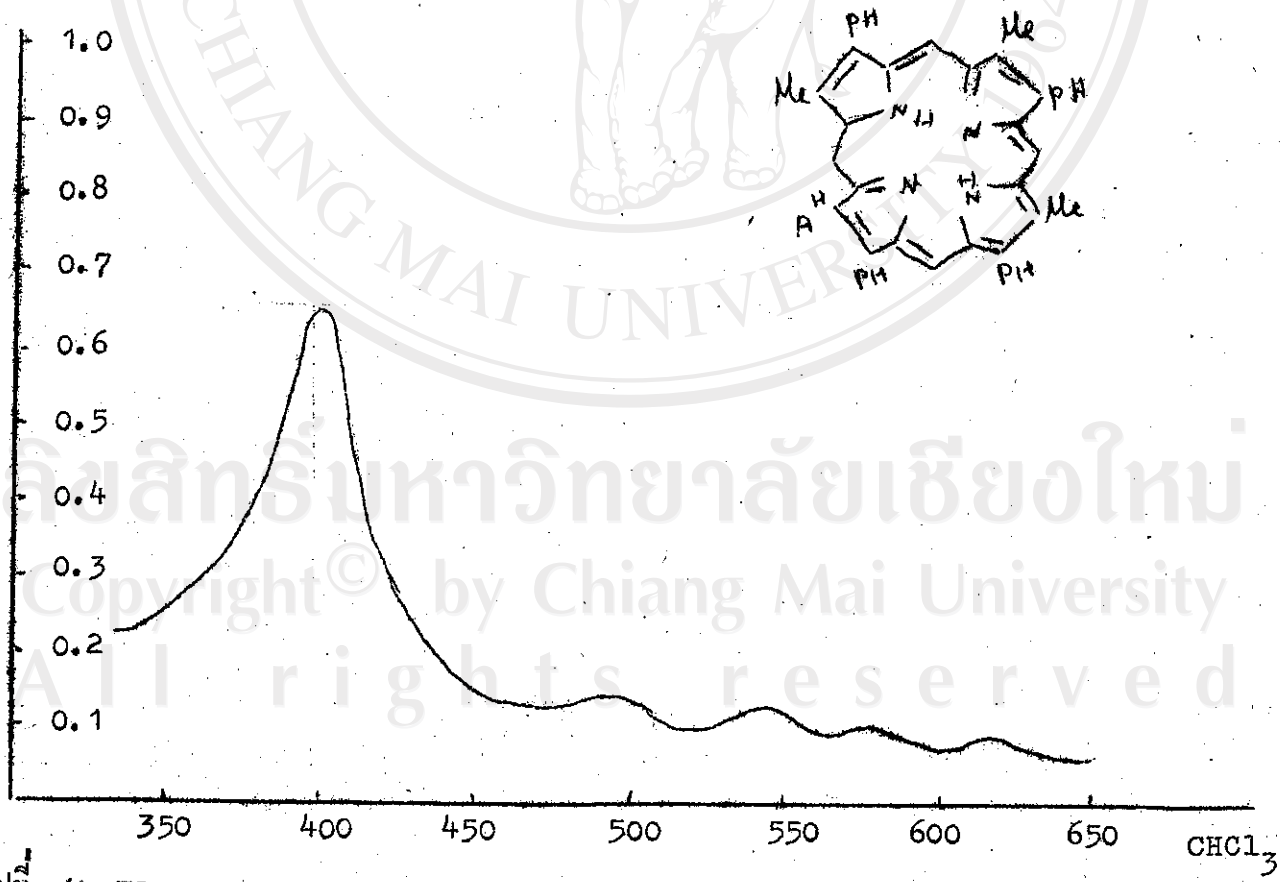
รูปที่ 7 Electronic Spectra of coproporphyrin methyl ester in $CHCl_3$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



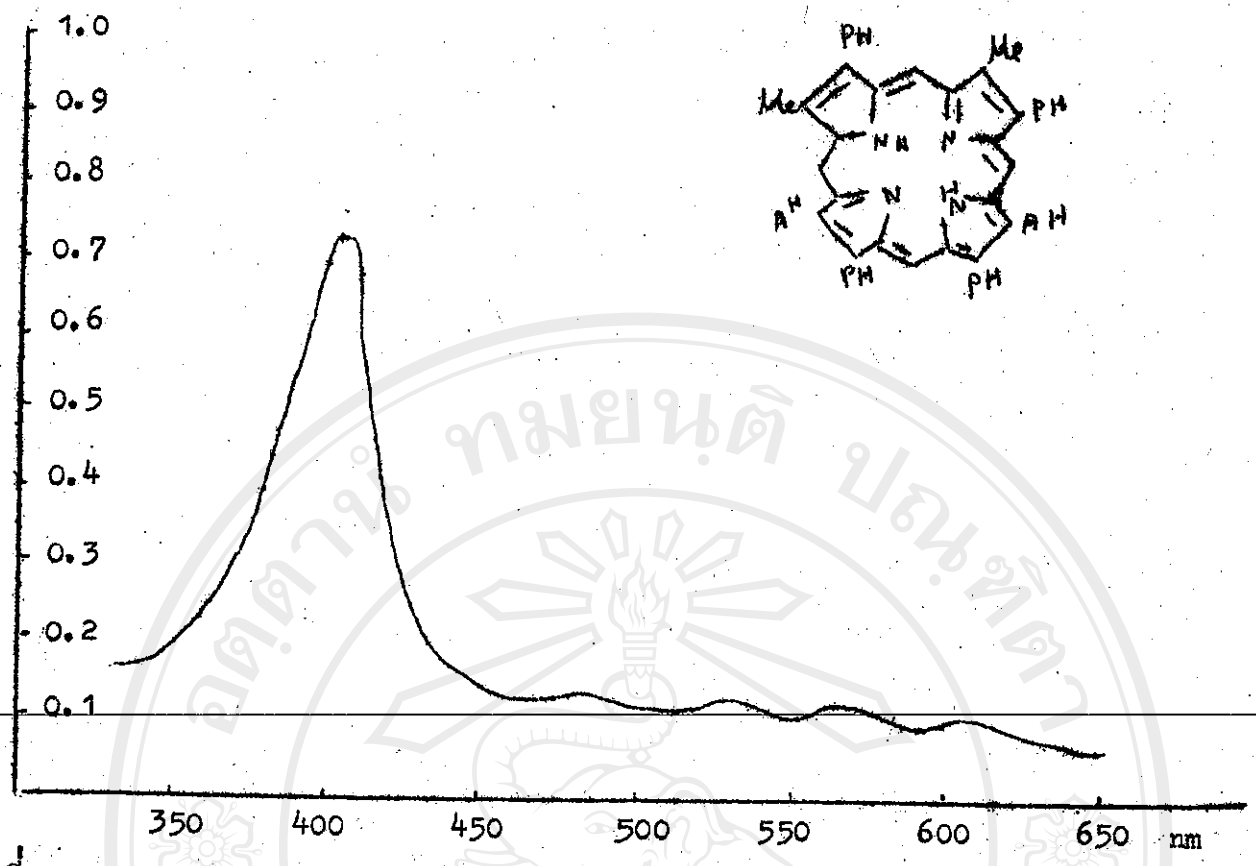


รูปที่ 8 Electronic Spectra of porphyrin 1 methyl ester in $CHCl_3$

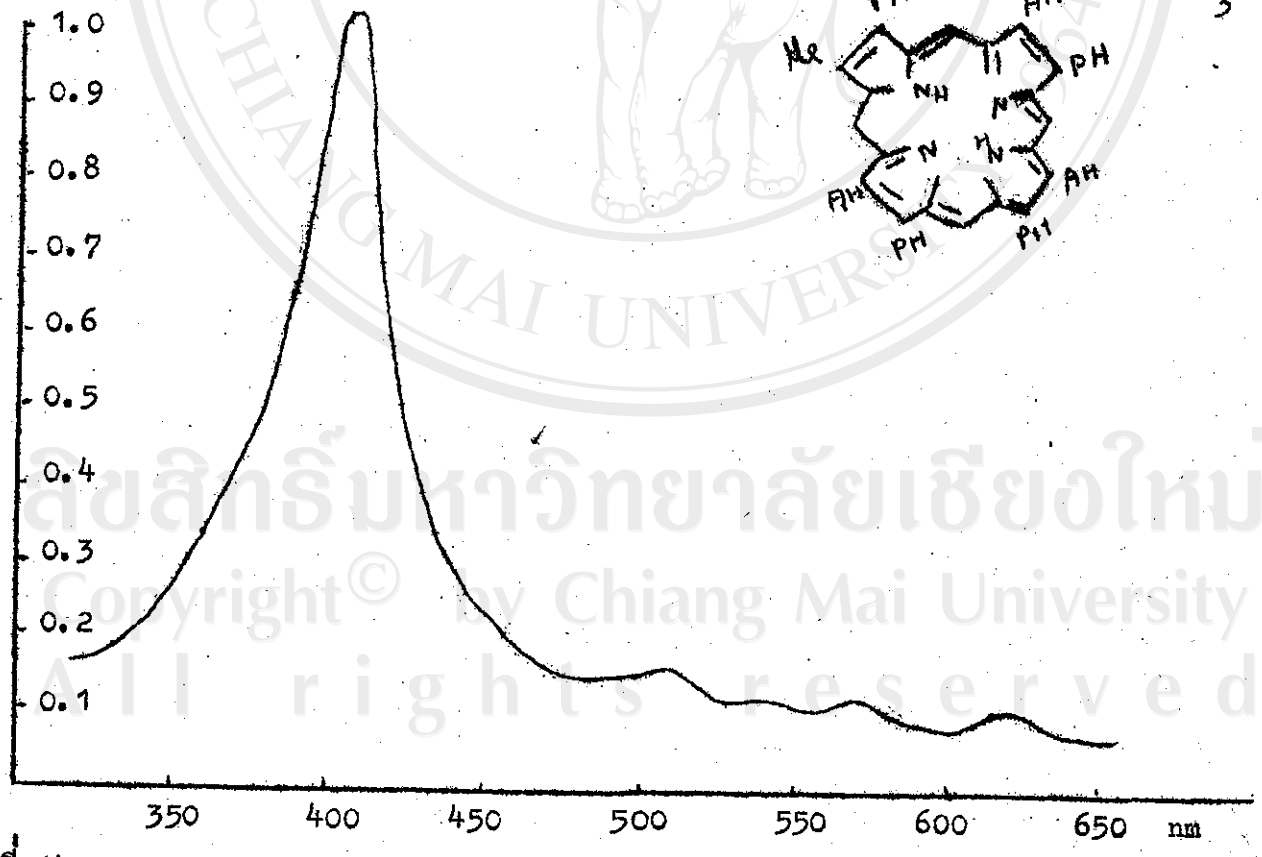


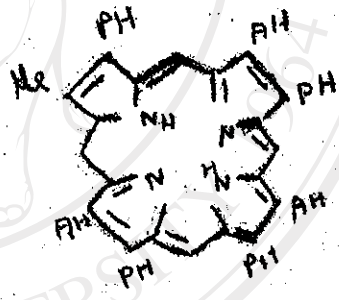
รูปที่ 9 Electronic Spectra of pentacarboxylicporphyrin methyl ester in

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



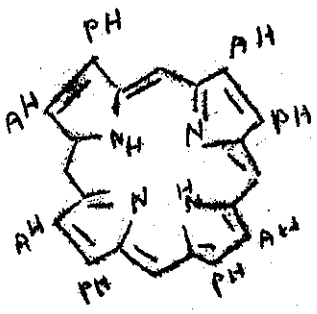
รูปที่ 10 Electronic spectra ของ hexacarboxylic porphyrin methyl ester in $CHCl_3$

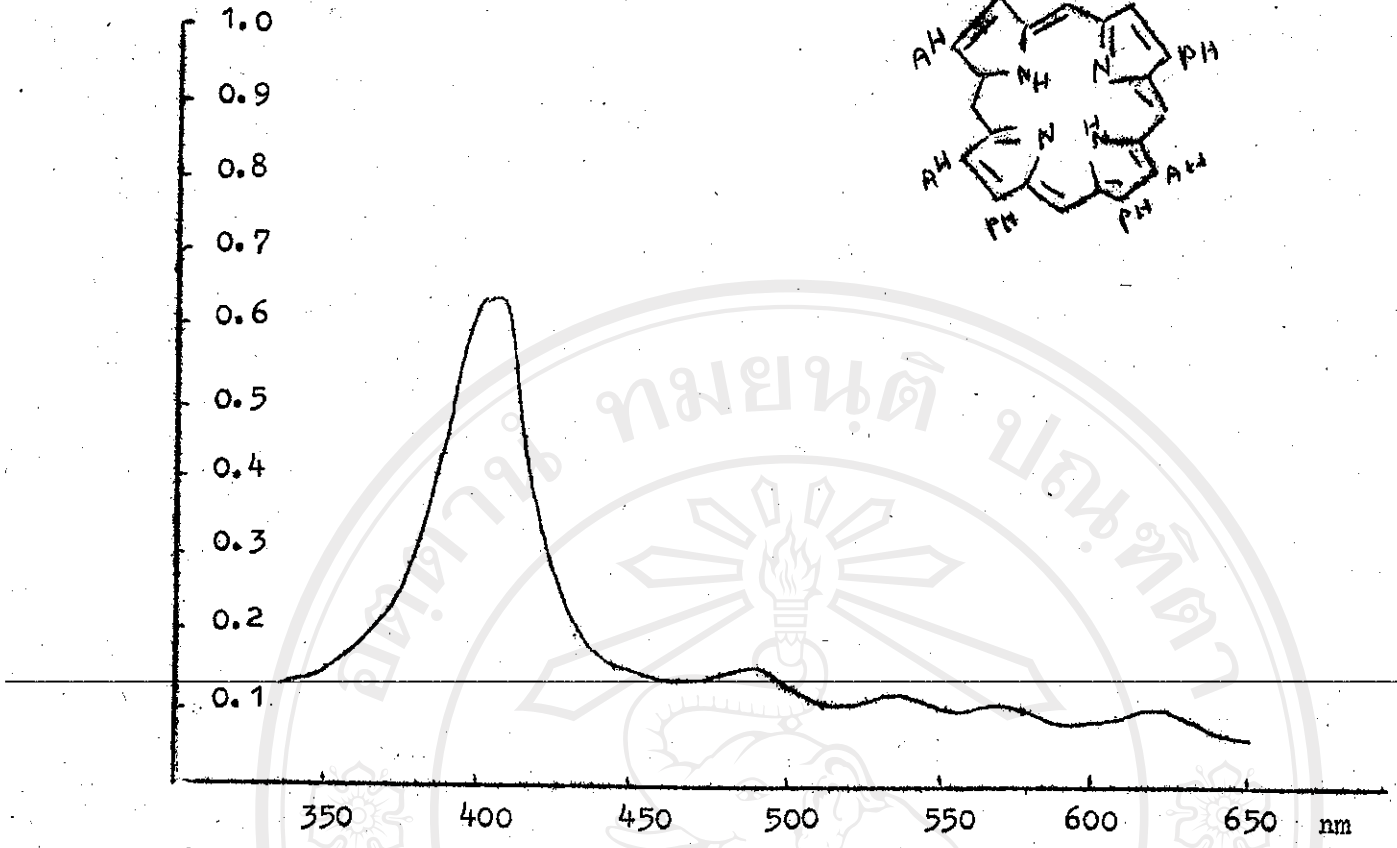




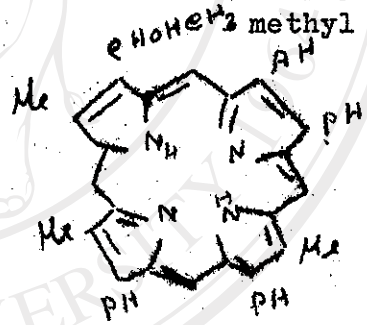
รูปที่ 11 Electronic spectra ของ heptacarboxylic porphyrin methyl ester in $CHCl_3$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

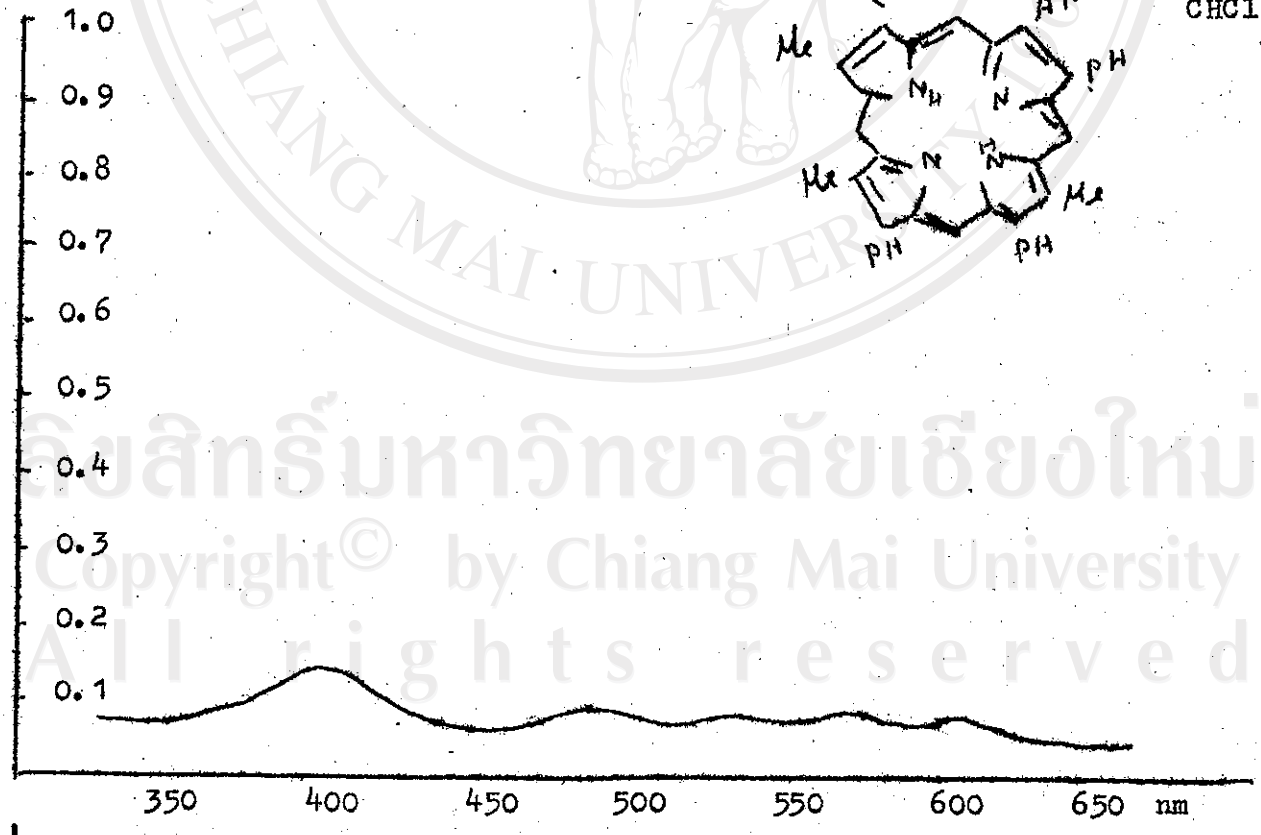




รูปที่ 12 Electronic spectra ของ uroporphyrin octacarboxylicporphyrin



methyl ester in $CHCl_3$

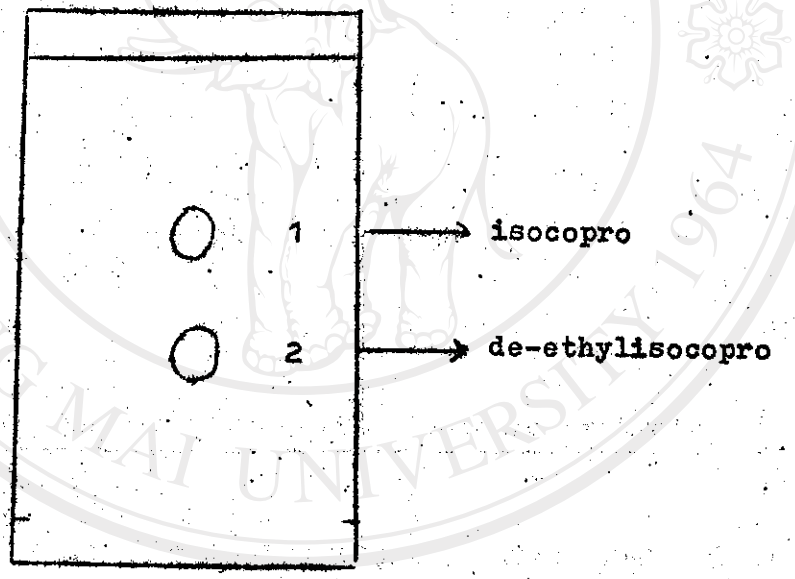


รูปที่ 13 Electronic spectra of porphyrin 2 methyl ester in $CHCl_3$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7 การแยก isocoproporphyrin และ de-ethylisocoproporphyrin (porphyrin 1) จาก band ที่ 3

ชุด band ที่ 3 จากผลการทดลองในเดือนที่ 3 ละลาย $CHCl_3$ 5 ml กรองเพื่อให้ silicagel ออก นำสารละลายที่ได้ evaporate ให้ $CHCl_3$ ระเหย จะพบว่ายังมีของเหลวเหลืออยู่เล็กน้อย ทิ้งไว้ในตู้มืด จนกระทั่งของเหลวแห้ง เติม $CHCl_3$ ลงไปเล็กน้อย ใช้ capillary tube spot บน plate developing solvent ที่ใช้คือ solvent system B cyclobenzene : acetone 3 : 1 v/v เมื่อ plate แห้งส่อง uv lamp จะพบว่ามีวงกลมสีแดงเล็ก ๆ 2 วง แยกกัน ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 แสดง pme ที่แยกได้จาก band ที่ 3

เมื่อเทียบค่า Rf จากการทดลองกับการการทดลองของ GH Elder(Ref) พบว่า spot ที่ 1 เป็น isocoproporphyrin methyl ester

spot ที่ 2 เป็น de-ethylisocoproporphyrin methyl ester

isocoproporphyrin methyl ester จะมีสีแดงเข้มกว่า de-ethylisocoproporphyrin เมื่อสังเกตจาก uv lamp แสดงว่า isocoproporphyrin methyl ester มีปริมาณมากกว่า de-ethylisocoproporphyrin methyl ester

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

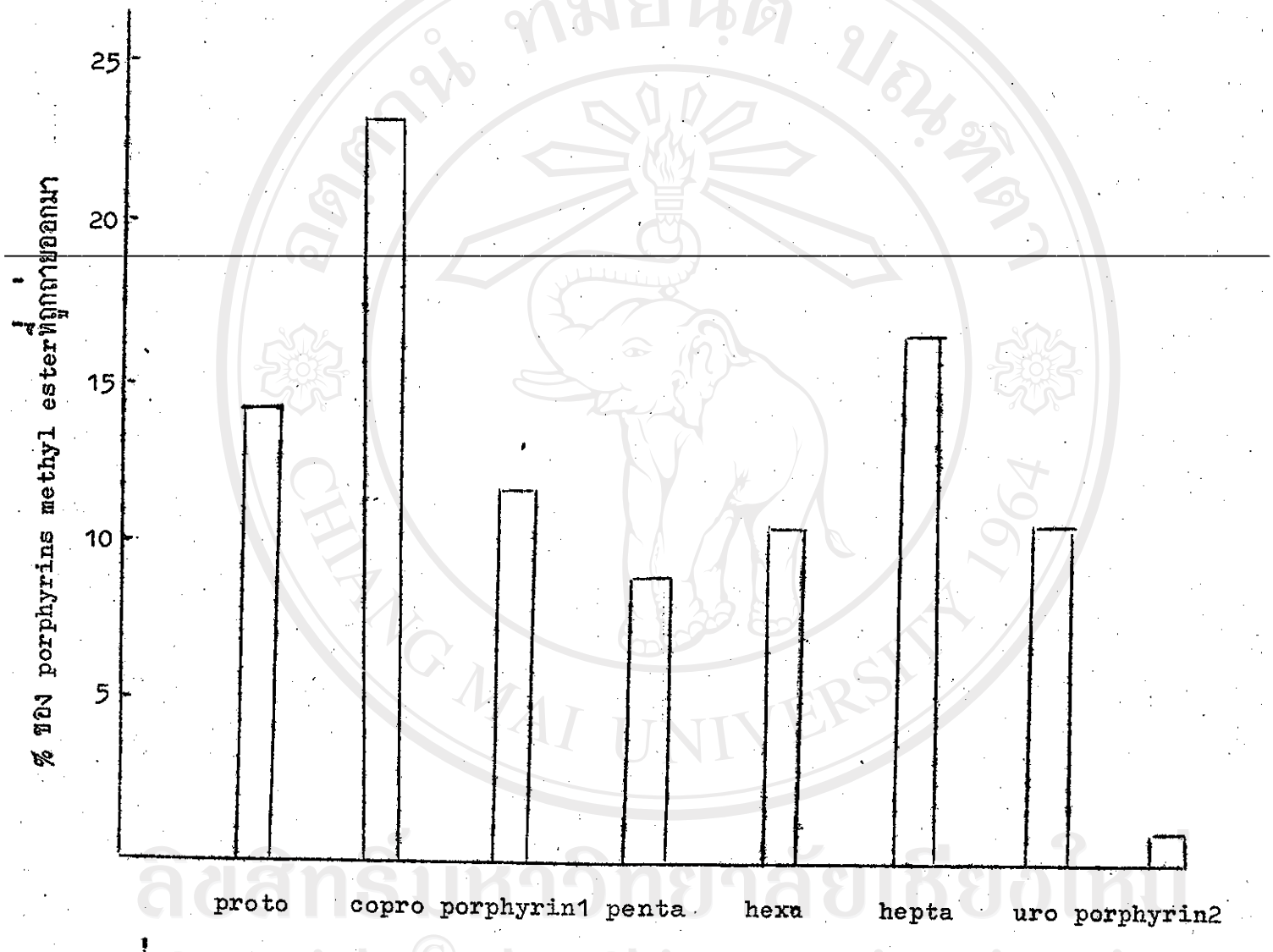
2.8 หา relative concentation ของ porphyrin methyl ester แต่ละ band ที่แยกได้

ตัด absorption spectra ของ porphyrin แต่ละชนิดตรง soret peak นำไปชั่งก็จะทราบ relative concentation ของแต่ละชนิดว่ามีเท่าไรจาก อุจจาระ 20 g จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 15

จะได้ Proto = 14.02 %, Copro = 23.39 %, porphyrin 1 = 12.28 % penta = 9.99 %, hexa = 11.48 %, hepta = 17.17 %, uro = 10.79 % porphyrin 2 = 0.87 % จะได้ relative concentration ของ porphyrin ดังนี้

Copro > hepta > proto > porphyrin 1 > uro > hexa > penta > porphyrin 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

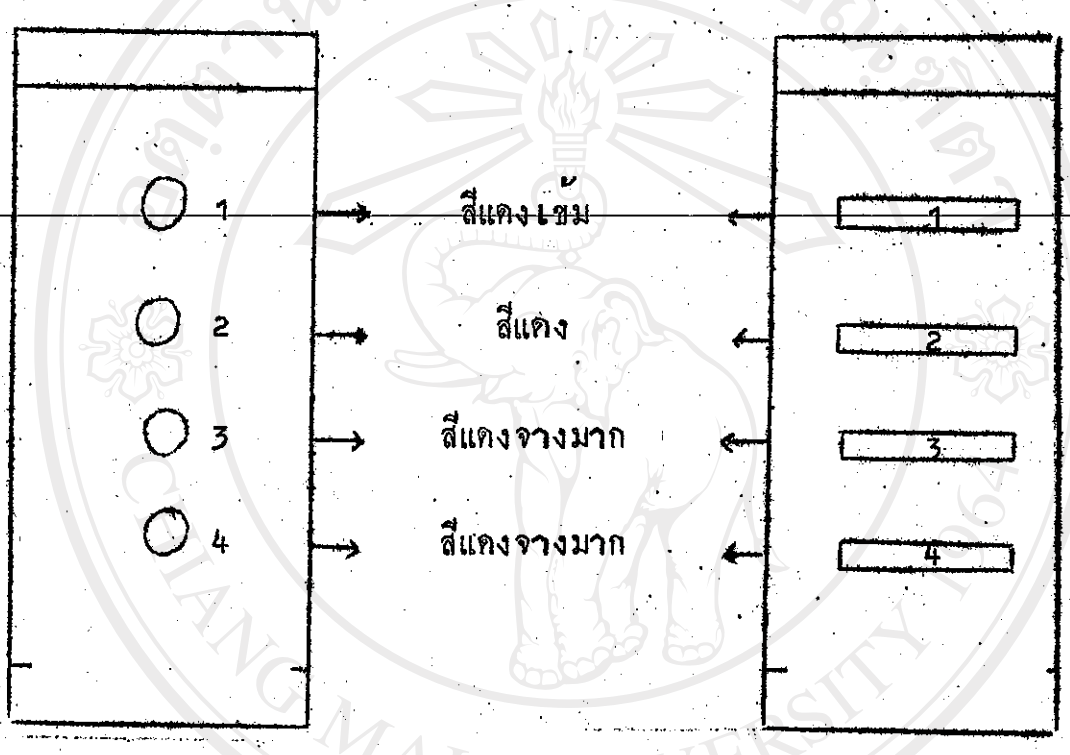


รูปที่ 15 แสดง relative concentration of porphyrins methyl ester จากอุจจาระ 20 g ในระยะเดือนที่ 3 ที่ให้ HCB

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 การเตรียม Porphyrins methyl ester จากอุจจาระหนู 40 g ที่ไม่ให้กิน HCB

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.4 จากนั้นทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ดังข้อ 2.5 จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 16 และรูปที่ 17



รูปที่ 16 แสดง TLC ของ pme จากอุจจาระหนูไม่ให้ HCB

รูปที่ 17 แสดง PLC ของ pme จากอุจจาระหนูไม่ให้ HCB

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง

เมื่อใช้ uv lamp ส่องจะพบว่า porphyrin methyl ester จะแยกได้ 4 spot หลังจากเปรียบเทียบค่า Rf จากตารางที่ 4 กับการทดลองของ GH Elder (6) พบว่า

spot 1 = protoporphyrin methyl ester

spot 2 = coproporphyrin methyl ester

spot 3 = pentacarboxylic porphyrin methyl ester

spot 4 = uroporphyrin methyl ester

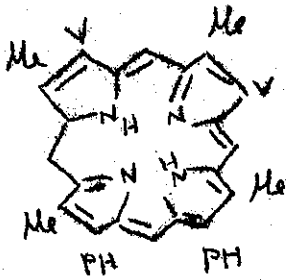
spot ที่ 1 จะเห็นสีแดงเข้มและมีปริมาณมากกว่า spot อื่น

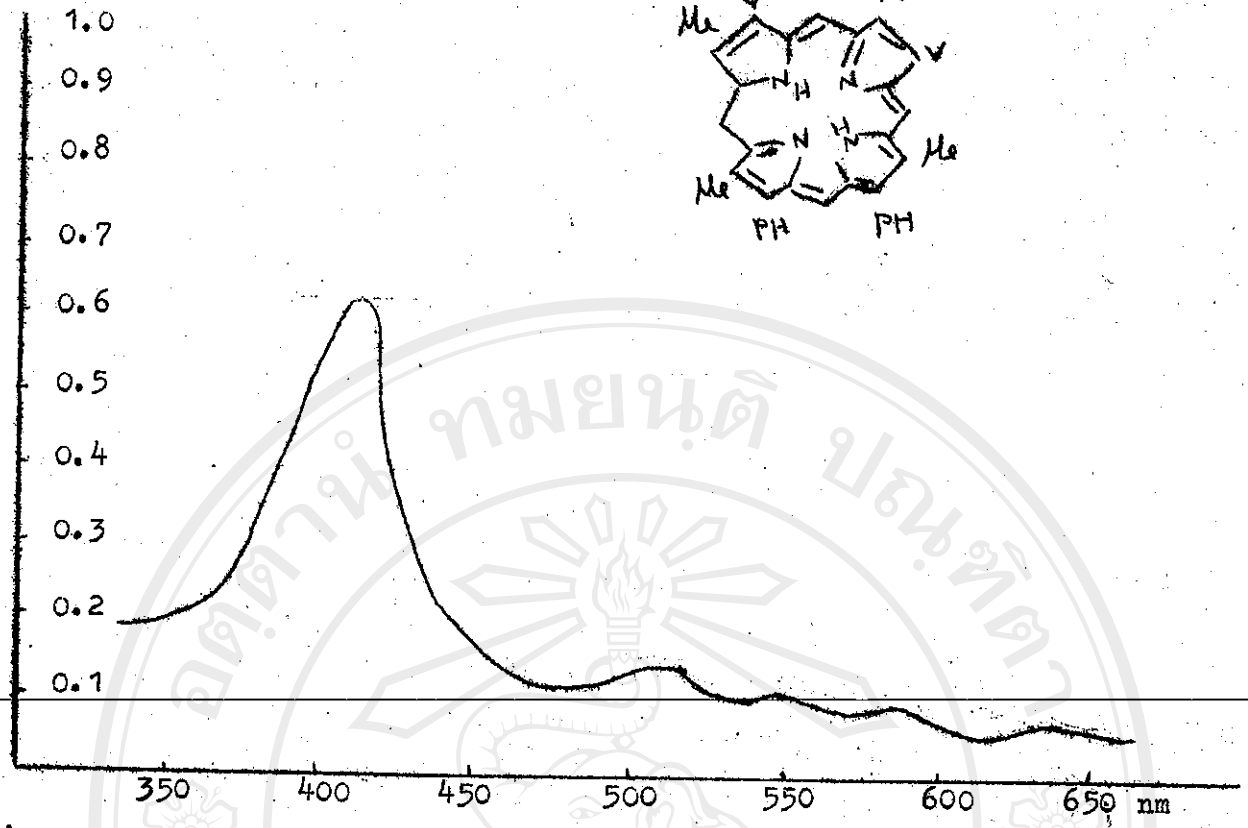
spot ที่ 2 สีแดง ไม่เข้มเท่า spot ที่ 1

spot ที่ 3, 4 สีจางมาก เกือบจะมองไม่เห็น

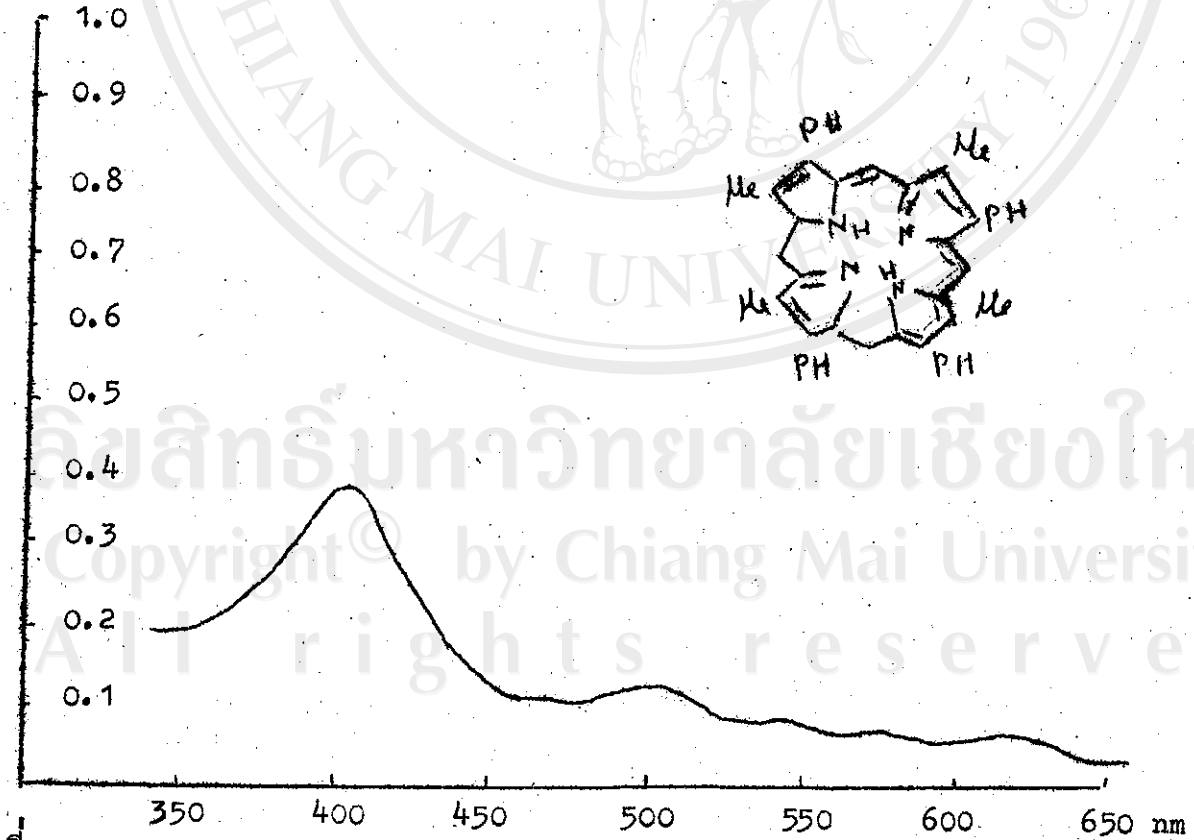
การทดลองทำ preparative TLC ของ pme จากอุจจาระ 40 g ทดลองเช่นเดียวกับในหนูที่ให้กิน HCB จะได้ผลการทดลอง ดังรูปที่ 17 ขูดแต่ละ band ละลาย $CHCl_3$ จนไม่มีสี red fluoresene ใน $CHCl_3$ แล้วกรอง นำสารละลายที่ได้ไป evaporate ให้ $CHCl_3$ ระเหย แล้วใส่ $CHCl_3$ 5 ml ในแต่ละ band นำสารละลายที่ได้แต่ละ band ใส่ใน silica cell วัด visible spectrum จะได้ผลการทดลองในรูปที่ 18-21 และหาค่า absorption maxima ได้ดังตารางที่ 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



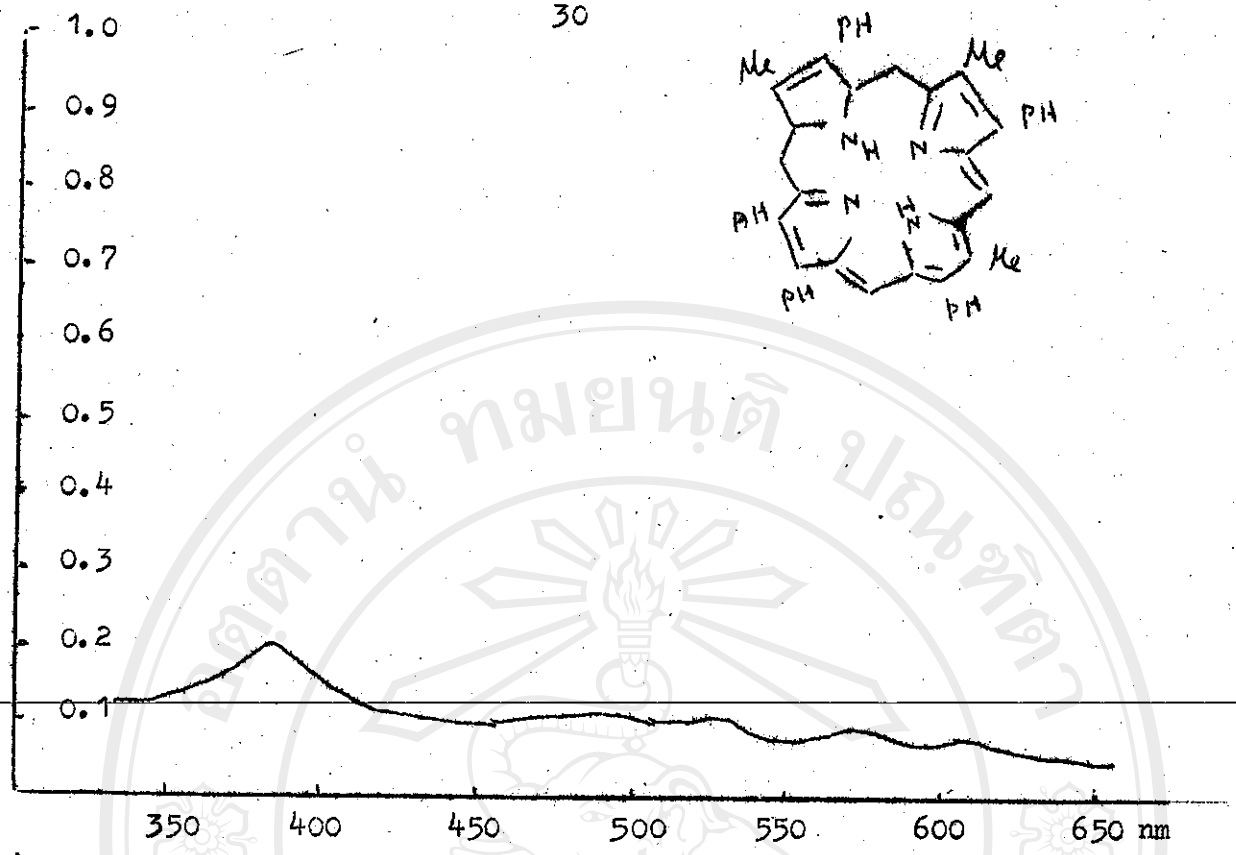


รูปที่ 18 Electronic Spectra of protoporphyrin methyl ester in $CHCl_3$

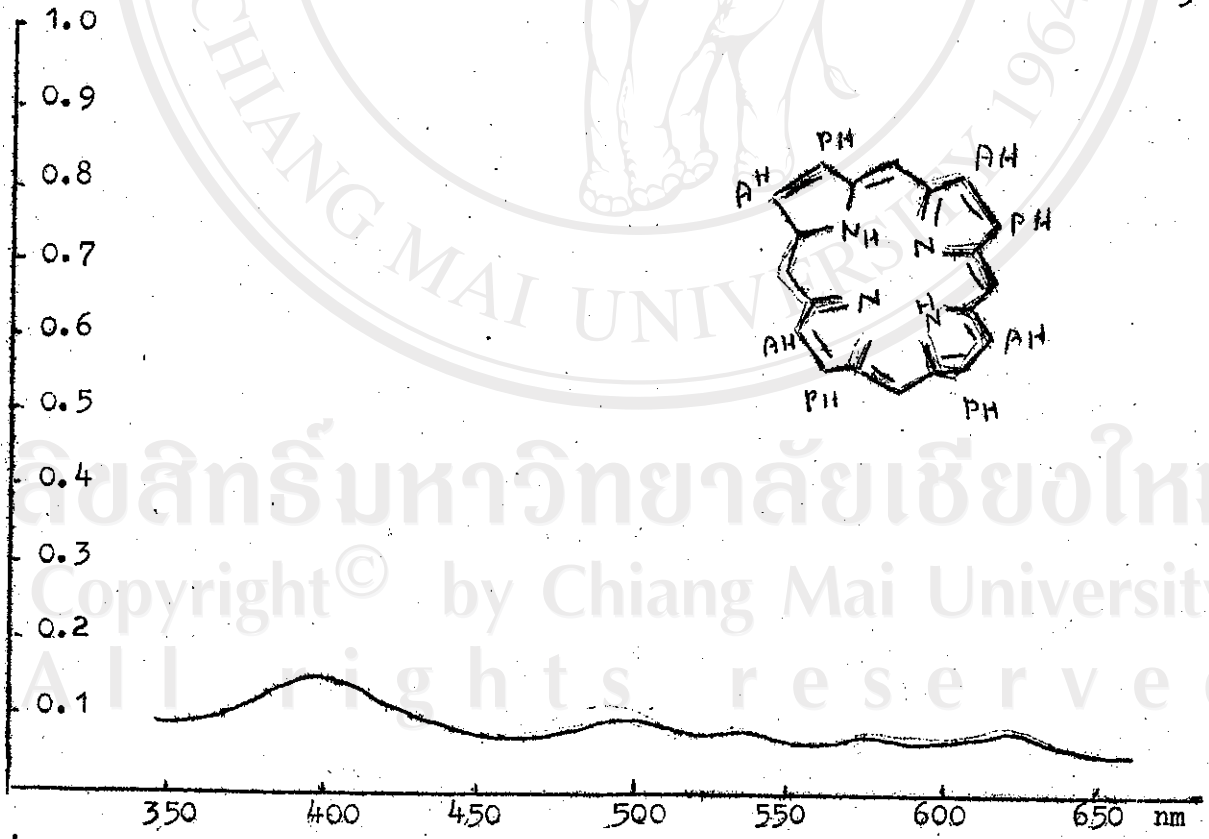


รูปที่ 19 Electronic Spectra of Coproporphyrin methyl ester in $CHCl_3$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 20 Electronic Spectra of pentacarboxylicporphyrin methyl ester in $CHCl_3$



รูปที่ 21 Electronic Spectra of uroporphyrin methyl estra in $CHCl_3$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4

ค่า Rf value(x100) of porphyrins methyl ester ในอุจจาระหนูที่ไม่ให้ HCB

solvent system	Proto	Copro	penta	hexa	hepta	uro
chloroform: kesorene: Methanol:	82	69	53	-	-	36

ตารางที่ 5

Absorption Maxima of porphyrin methyl ester isolated from feces of control rats

porphyrins	solvent $CHCl_3$	Absorption spectra wavelength maxima in nm				
		Soret	IV	III	II	I
proto	"	402	504	542	575	632
copro	"	408	504	540	560	600
penta	"	400	500	530	570	598
uro	"	400	500	535	572	630

เนื่องจากแยก porphyrin methyl ester ได้ไม่มากพอจึงไม่สามารถทำให้ตกผลึกได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved