บทที่ 2

การทดลอง

พืชตัวอย่างและสารเคมี

ใบผักปู่ย่า (C. *mimosoides*)

ใบมะขามป้อม (*P. emblica*)

ใบส้มป่อย (*A. concinna*)

กรดมาตรฐานไกลโคลิก (Aldrich Chemical Company Inc)

กรดมาตรฐานซิตริก (Fluka AG)

กรดมาตรฐานทาร์ทาริก (BDH Chemicals Ltd)

กรดมาตรฐานแลคติก (E.Merch, Darmstadt)

กรดมาตรฐานมาลิก (Fluka AG)

กรดน้ำส้ม (J.T.Baker)

กรดเกลือ (Merck)

คลอโรฟอร์ม (Fisher Chemicals)

ซิลิกาเจล 230 mesh (Merck)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Eka Aktiebolag Fack)

ไดไอโอนเรซิน เอชพี-20 (Supelco Park)

โบรโมครีซอลกรีน (BDH Chemicals Ltd)

เมทานอล (Lab-Scan)

เอ็น-บิวทานอล (GRUPPO MONTEDISON FARMITALIA CARLO ERBA)

เอ็น-โปรปานอล (BDH Chemicals Ltd)

แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Anala R)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัสดุและอุปกรณ์

กระดาษกรอง whatman no.1 สำหรับทำ paper chromatography
ขวดสำหรับฉีดพ่นน้ำยา
เครื่องชั่งสารทศนิยม 3 ตำแหน่ง
เครื่องบดสมุนไพร
เครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ
เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นรังสีอินฟราเรด
ชุดอุปกรณ์สกัดแบบรีฟลักซ์
ตู้อบพืชสมุนไพร
เตาไฟฟ้าชนิดบุนวม
ถังสำหรับแช่โครมาโตกราฟีกระดาษ
หม้ออังไอน้ำ
อุปกรณ์สำหรับการแยกโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์

แผนการดำเนินงาน

1. การเก็บและจัดเตรียมพืชตัวอย่าง
2. การทดสอบเบื้องต้นหากรดแอลฟาไฮดรอกซีในพืชตัวอย่างโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ
3. การสกัดพืชตัวอย่าง
4. การแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์
5. การพิสูจน์เอกลักษณ์กรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ 1 มิติ และ 2 มิติ และ IR Spectroscopy

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการทดลอง

1. การเก็บและจัดเตรียมพืชตัวอย่าง

1.1 พืชตัวอย่างผักปู่ย่า

เก็บใบผักปู่ย่า จาก ต.สันป่ายาง อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ หนัก 5 กิโลกรัม นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำมารูดเอาใบผักปู่ย่าออกจากก้านใบ ชั่งน้ำหนักใบผักปู่ย่าแห้งได้ 0.5 กิโลกรัม จากนั้นนำมาบดให้เป็นผงละเอียด

1.2 พืชตัวอย่างมะขามป้อม

เก็บใบมะขามป้อม จาก ต.สันป่ายาง อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ หนัก 10 กิโลกรัม นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำมารูดเอาใบมะขามป้อมออกจากก้านใบ ชั่งน้ำหนักใบมะขามป้อมแห้งได้ 1.5 กิโลกรัม จากนั้นนำมาบดให้เป็นผงละเอียด

1.3 พืชตัวอย่างส้มป่อย

เก็บใบส้มป่อย จาก ต.สันป่ายาง อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่ หนัก 10 กิโลกรัม นำมาล้างด้วยน้ำสะอาด นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำมารูดเอาใบผักส้มป่อยออกจากก้านใบ ชั่งน้ำหนักใบส้มป่อยแห้งได้ 0.7 กิโลกรัม จากนั้นนำมาบดให้เป็นผงละเอียด

2. การทดสอบเบื้องต้นหากรดแอลฟาไฮดรอกซีในพืชตัวอย่าง

นำใบพืชตัวอย่าง 3 ชนิด คือ ผักปู่ย่า, มะขามป้อม และส้มป่อย ที่อบแห้งและบดเป็นผงละเอียดแล้วมาเล็กน้อย ต้มในน้ำประมาณ 10 นาที นำมากรอง แล้วต้มบนหม้ออังไอน้ำระเหยให้ได้สารสกัดเข้มข้น นำมาทดสอบหากรดเบื้องต้นโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ โดยใช้หลอดคาปิลลารีจุ่มสารสกัดเข้มข้นแล้วนำไปจุดลงบนกระดาษโครมาโตกราฟีขนาด 20 x 20 เซนติเมตร และจุดสารมารฐานกรดแอลฟาไฮดรอกซีทั้ง 5 ชนิด คือ กรดซิตริก, กรดไกลโคลิก, กรดแลคติก , กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริก ลงบนกระดาษแถวเดียวกัน แล้วเย็บกระดาษให้ติดกันเป็นทรงกระบอก นำไปแช่ลงในถังแช่ที่บรรจุด้วยน้ำยาชะ โดยน้ำยาชะที่ใช้ทดสอบมี 2 ชนิดคือ

1) เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ ในอัตราส่วน 4 : 1 : 1

2) เอ็น-โปรปานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วน 6:4

ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งน้ำยาชะเคลื่อนที่ขึ้นข้างบนได้ระยะทาง 15 เซนติเมตรที่กำหนดไว้ จากนั้นจึงนำแผ่นโครมาโตแกรมที่ได้ขึ้นมาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงให้กรดอะซิติกระเหยให้หมดเพื่อไม่ให้มารบกวนการทดสอบ นำแผ่นโครมาโตแกรมมาพ่นด้วยน้ำยาทดสอบโบรโมครีซอลกรีน ทำการวัดและเปรียบเทียบค่า Rf ของสารสกัดและกรดมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การสกัดพืชตัวอย่าง

นำใบแห้งพืชตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วมาทำการสกัดโดยใช้อุปกรณ์สกัดแบบรีฟลักซ์ ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย สกัดทั้งหมดจำนวน 3 ครั้ง ใช้เวลาสกัดนานครั้งละ 8 ชั่วโมง นำสารสกัดเมทานอลที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้งเทรวมกันแล้ว กรองเอาตะกอนออก จากนั้นนำไประเหยให้เข้มข้นโดยเครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ นำสารสกัดเมทานอลเข้มข้นที่ได้มาต้มกับน้ำกลั่นบนหม้ออังไอน้ำ นำสารสกัดน้ำที่ได้ไปชะผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยไดไอโอนเรซิน เอชพี-20 แล้วนำไประเหยแห้งบนหม้ออังไอน้ำจนได้สารสกัดที่เข้มข้น

4. การแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี

นำสารสกัดเข้มข้นที่ได้มาแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์โดยเทลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล แล้วใช้ตัวทำละลายผสมคลอโรฟอร์มและเมทานอลเป็นน้ำยาชะ โดยเริ่มจากคลอโรฟอร์มต่อเมทานอล อัตราส่วน 9 : 1 เก็บน้ำยาที่ชะออกมาลงในหลอดทดลอง ครั้งละ 20 ซีซี แล้วใช้กระดาษโบรโมครีซอลกรีนเป็นตัวทดสอบว่ามีกรดอยู่หรือไม่ โดยจุ่มลงในหลอดทดลองทุกหลอด ถ้ามีกรดอยู่กระดาษจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นเหลือง แล้วค่อยเปลี่ยนอัตราส่วนน้ำยาชะไปเรื่อยๆ โดยเพิ่มอัตราส่วนเมทานอลครั้งละ 0.5 จนกว่าจะแน่ใจว่าชะกรดออกมาจากคอลัมน์หมดแล้ว จากนั้นเทน้ำยาที่ชะได้ในหลอดที่พบกรดรวมกัน นำมาตั้งทิ้งไว้ให้ตกผลึก หากยังไม่ตกผลึกได้สารที่บริสุทธิ์ ก็นำไปทำการแยกต่อโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์ โดยใช้คอลัมน์ที่มีขนาดเล็กลงจนกว่าจะได้สารที่บริสุทธิ์

5. การพิสูจน์เอกลักษณ์กรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้

5.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ

ก. เทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ 1 มิติ ในน้ำยาชะที่มีความเป็นกรด

นำผลึกของกรดที่แยกได้แบ่งมาเล็กน้อยละลายในน้ำ ใช้หลอดคาปิลลารีจุดลงบนแผ่นกระดาษโครมาโตกราฟี และจุดสารมาตรฐานกรดแอลฟาไฮดรอกซีทั้ง 5 ชนิด ลงบนกระดาษแถวเดียวกัน แล้วเย็บกระดาษให้ติดกันเป็นทรงกระบอก นำไปแช่ลงในถังแช่ที่บรรจุด้วยน้ำยาชะที่อิ่มตัวของเฮ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งน้ำยาชะเคลื่อนที่ขึ้นข้างบนได้ระยะทาง 15 เซนติเมตรที่กำหนดไว้ จากนั้นจึงนำแผ่นโครมาโตแกรมที่ได้ขึ้นมาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง นำแผ่นโครมาโตแกรมมาพ่นด้วยน้ำยาทดสอบโบรโมครีซอลกรีน ทำการวัดและเปรียบเทียบค่า Rf ของสารสกัดและกรดมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข. เทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ 1 มิติ ในน้ำยาชะที่มีความเป็นด่าง

วิธีทดลองเหมือนข้อ 5.1.ก เพียงแต่เป็นส่วนผสมน้ำยาชะเป็น เอ็น-โปรปานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วน 6:4

ค. เทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ 2 มิติ

นำผลึกของกรดที่แยกได้แบ่งมาเล็กน้อยละลายในน้ำ ใช้หลอดคาปิลลารีจุดลงบนแผ่นกระดาษโครมาโตกราฟี และจุดสารมาตรฐานกรดแอลฟาไฮดรอกซีชนิดที่สงสัยว่าเป็นตัวเดียวกันลงตรงตำแหน่งเดียวกัน นำไปแช่ลงในถังแช่ที่บรรจุด้วยน้ำยาชะที่อิ่มตัวของเอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำในอัตราส่วน 4 : 1 : 1 ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งน้ำยาชะเคลื่อนที่ขึ้นข้างบนได้ระยะทาง 10 เซนติเมตรที่กำหนดไว้ จากนั้นจึงนำแผ่นโครมาโตแกรมที่ได้ขึ้นมาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นกระดาษมากลับทิศ 90 องศาแช่ลงในถังแช่ที่บรรจุด้วยน้ำยาชะที่อิ่มตัวของเอ็น-เอ็น-โปรปานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในอัตราส่วน 6:4 ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งน้ำยาชะเคลื่อนที่ขึ้นข้างบนได้ระยะทาง 10 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำแผ่นโครมาโตแกรมที่ได้ขึ้นมาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นโครมาโตแกรมมาพ่นด้วยน้ำยาทดสอบโบรโมครีซอลกรีน หากปรากฏจุดสีเหลืองบนแผ่นโครมาโตแกรมเพียงจุดเดียวแสดงว่ากรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้กับสารมาตรฐานกรดเป็นสารชนิดเดียวกัน

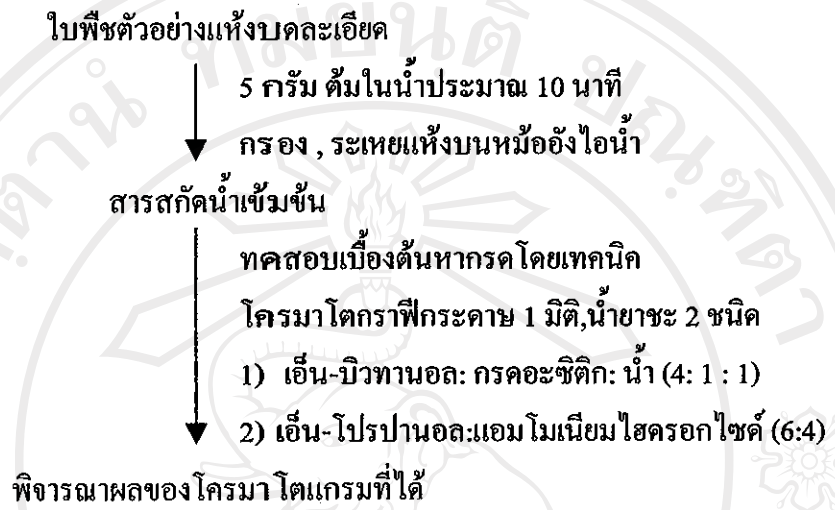
5.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด

โดยวัดค่าการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด เปรียบเทียบกับกรดมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

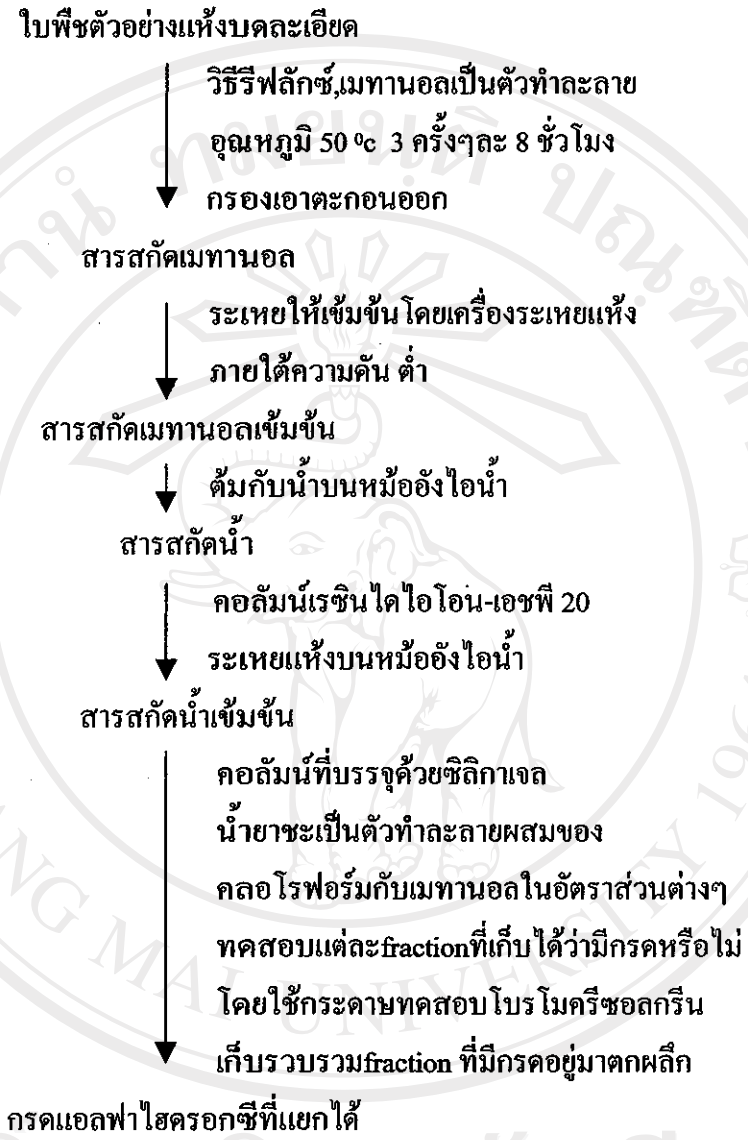
รูป 7 แสดงแผนภาพขั้นตอนการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การทดสอบเบื้องต้นหากรดแอลฟาไฮดรอกซีในพืชตัวอย่าง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนที่ 2 การสกัดและการแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นตอนที่ 3การพิสูจน์เอกลักษณ์กรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้

กรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้

↓ พิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค

↓ -โครมาโตกราฟีกระดาษ 1 มิติ และ 2 มิติ

↓ - การดูดกลืนรังสีอินฟราเรด

พิจารณาผลของโครมาโตแกรมและอินฟราเรดสเปคตรัมที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved