

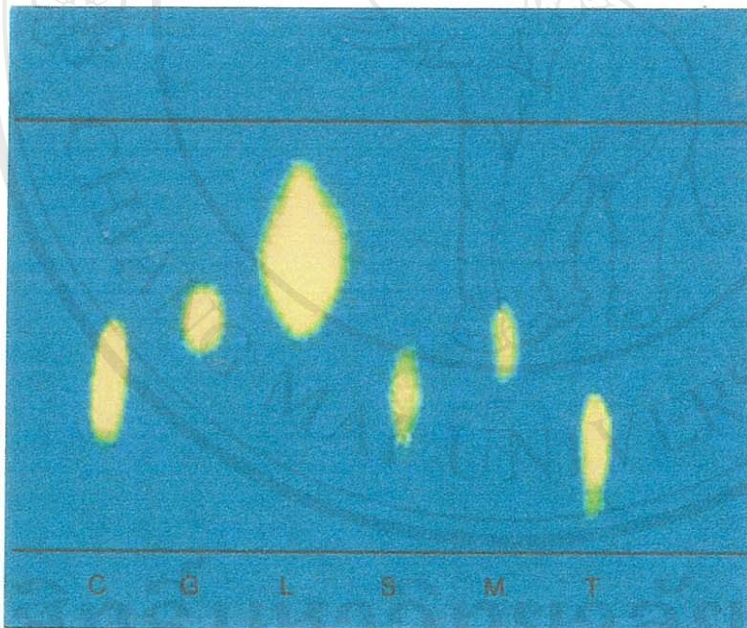
บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การสกัดและคัดแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากผักปวยล่า

1.1 การทดสอบเบื้องต้นหากรดแอลฟาไฮดรอกซีในผักปวยล่า

เมื่อนำสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบผักปวยล่ามาทดสอบหากรดเบื้องต้นโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ โดยใช้ น้ำยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และ น้ำยาชะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4) ได้ผลการทดลองดังนี้



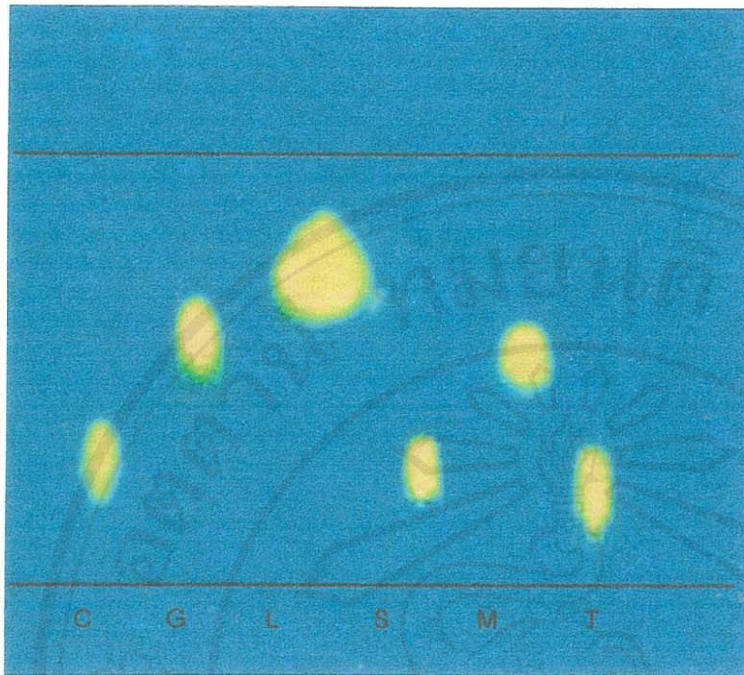
C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทาริก

รูป 8 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบผักปวยล่าเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

ตาราง 1 แสดงค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจาก ใบผักปวยล่าและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.42
กรดไกลโคลิก	0.58
กรดแลคติก	0.75
สารสกัดน้ำจากใบผักปวยล่า	0.42
กรดมาลิก	0.55
กรดทาร์ทาริก	0.28

จากโครมาโตแกรมรูป 8 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 1 พบว่าค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบผักปวยล่าเท่ากับค่า Rf ของกรดซิตริก เท่ากับ 0.42 คาดว่าใบผักปวยล่าจะมีกรดซิตริกอยู่



C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทาริก

รูป 9 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบผักปวยล่าเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาชะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

ตาราง 2 แสดงค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบผักปวยล่าและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาชะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.34
กรดไกลโคลิก	0.64
กรดแลกติก	0.81
สารสกัดน้ำจากใบผักปวยล่า	0.34
กรดมาลิก	0.60
กรดทาร์ทาริก	0.28

จากโครมาโตแกรมรูป 9 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 2 พบว่าค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบผักปวยล่าเท่ากับค่า Rf ของกรดซิตริก เท่ากับ 0.34 คาดว่าใบผักปวยล่าจะมีกรดซิตริกอยู่

1.2 การสกัดพืชตัวอย่างและแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

ตาราง 3 แสดงผลการสกัดพืชตัวอย่างผักปวยล่าและแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์

พืชตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)	คิดเป็นร้อยละของ ใบผักปวยล่าแห้ง
น้ำหนักใบผักปวยล่าแห้งที่นำมาสกัด	500.00	100.00
น้ำหนักสารสกัดเมทานอลเข้มข้น	89.99	18.00
น้ำหนักสารสกัดน้ำเข้มข้น	40.98	8.20
น้ำหนักกรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้	2.48	0.50

ตาราง 4 แสดงผลการแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่าด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์

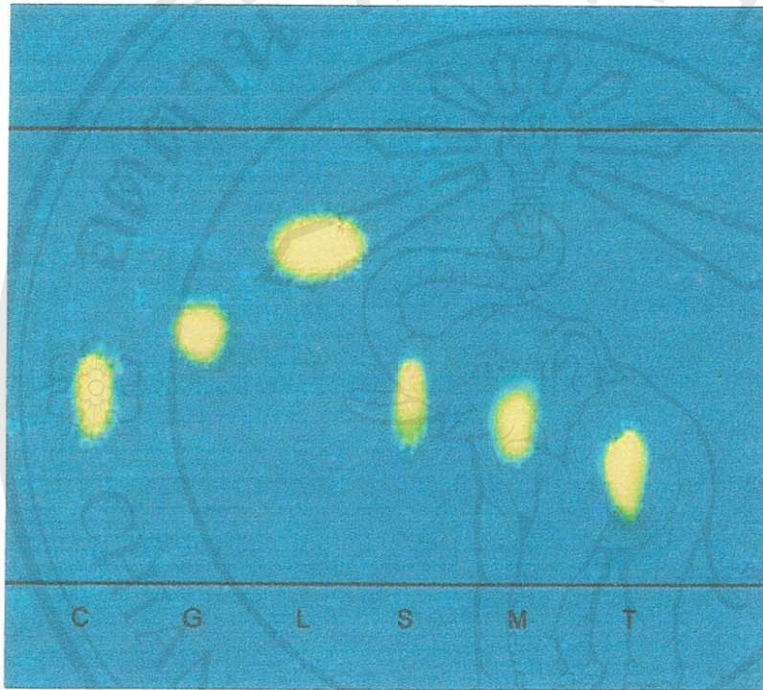
คอลัมน์ซิลิกาเจล	อัตราส่วนน้ำยาชะ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล	Fraction ที่มีกรด
ครั้งที่ 1	8 : 2	81-98
ครั้งที่ 2	8 : 2	66-79
ครั้งที่ 3	8 : 2	43-55

การสกัดพืชตัวอย่างโดยนำใบผักปวยล่าแห้งน้ำหนัก 500 กรัม มาทำการสกัดด้วยสารละลายเมทานอลโดยวิธี Reflux ได้สารเมทานอลเข้มข้นหนัก 89.99 กรัม คิดเป็นร้อยละ 18 นำไปผ่านคอลัมน์ไดโอไอออนเรซิน เอชพี-20 ได้สารสกัดน้ำเข้มข้นหนัก 40.98 กรัม คิดเป็นร้อยละ 8.20 จากนั้นนำมาแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์ พบว่ากรดถูกชะออกมาเมื่อผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 3 ในน้ำยาชะ คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 8 : 2 ใน fraction ที่ 43-55 ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองใส นำมารวมกันแล้วทิ้งไว้ให้ตกผลึกได้กรดหนัก 2.48 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.50

1.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์กรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้

1.3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ

ก. โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษชนิด 1 มิติ ในน้ำยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)



C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทาริก

รูป 10 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยเล้งเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

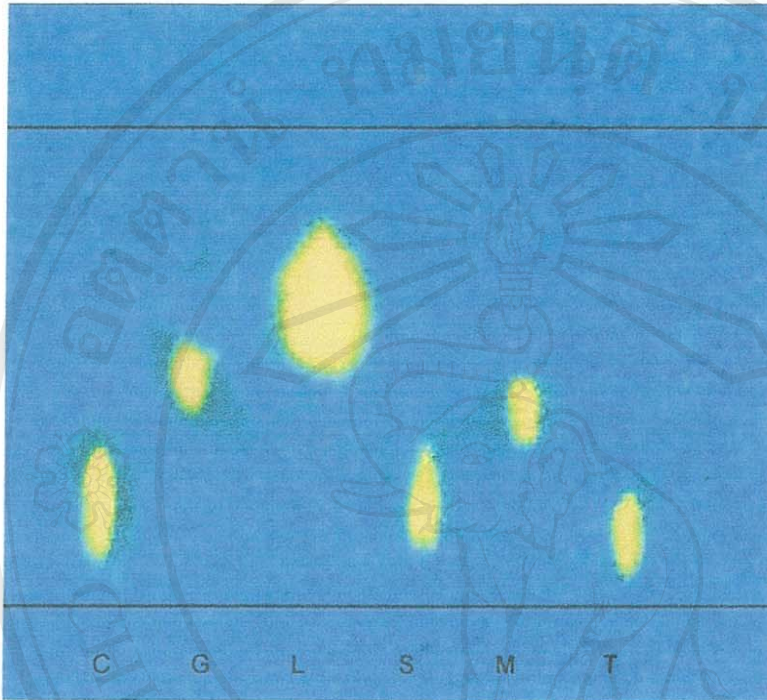
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 แสดงค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่าและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.49
กรดไกลโคลิก	0.66
กรดแลคติก	0.85
กรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่า	0.49
กรดมาลิก	0.43
กรดทาร์ทาริก	0.32

จากโครมาโตแกรมรูป 10 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 5 พบว่าค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่าเท่ากับค่า Rf ของกรดซิตริก เท่ากับ 0.49 แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบผักปวยล่าน่าจะเป็นกรดซิตริก

ข. โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษชนิด 1 มิติในน้ำยาอะเอิน-โปรพานอลและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)



C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทาริก

รูป 11 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยเล้งเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะเอิน-โปรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

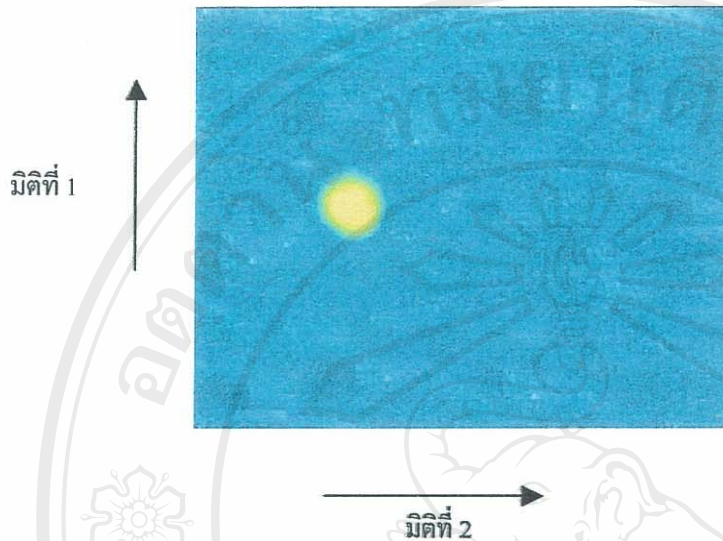
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 แสดงค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่าและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะซี-เฮน-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

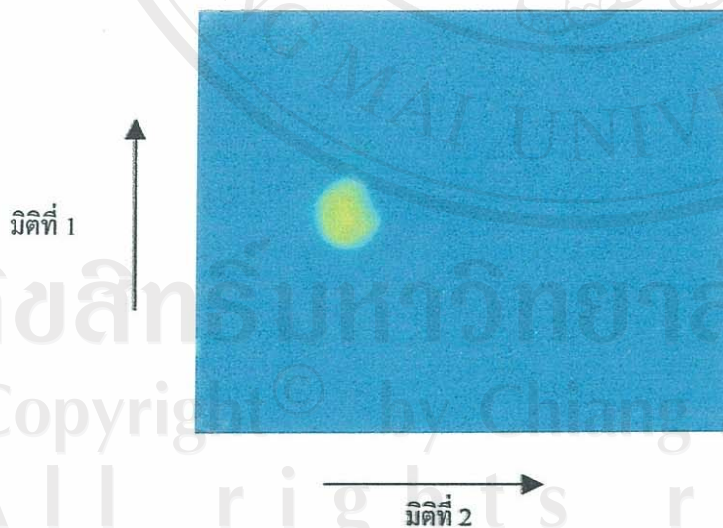
กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.26
กรดไกลโคลิก	0.57
กรดแลคติก	0.75
กรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่า	0.26
กรดมาลิก	0.49
กรดทาร์ทาริก	0.21

จากโครมาโตแกรมรูป 11 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 6 พบว่าค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่าเท่ากับค่า Rf ของกรดซิตริก เท่ากับ 0.26 แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบผักปวยล่าจะเป็นกรดซิตริก

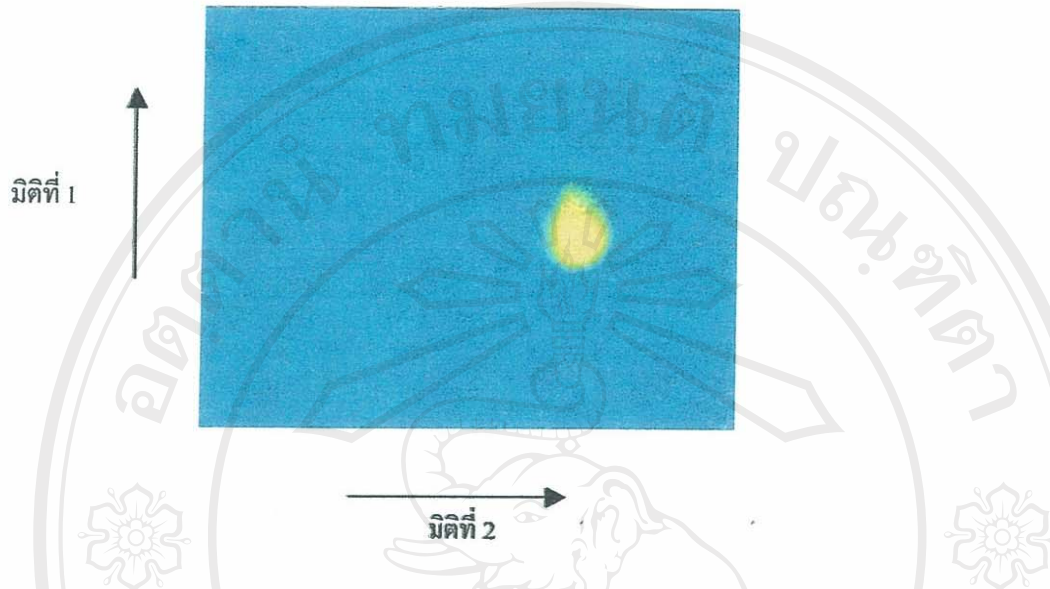
ก. โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษชนิด 2 มิติ



รูป 12 แสดงโครมาโตแกรม 2 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่าในน้ำยาชะมิติแรกคือ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และมิติที่ 2 คือ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)



รูป 13 แสดงโครมาโตแกรม 2 มิติของกรดมาตรฐานซิตริกในน้ำยาชะมิติแรกคือ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และมิติที่ 2 คือ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)



รูป 14 แสดงโครมาโตแกรม 2 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่าและกรดมาตรฐานซิตริก ในน้ำยาชะมิติแรกคือ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และมิติที่ 2 คือ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

จากโครมาโตรแกรมรูป 14 พบว่ามี spot สีเหลืองบนพื้นสีน้ำเงินซ้อนทับเป็นจุดเดียว แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบผักปวยล่าจะเป็นกรดซิตริก

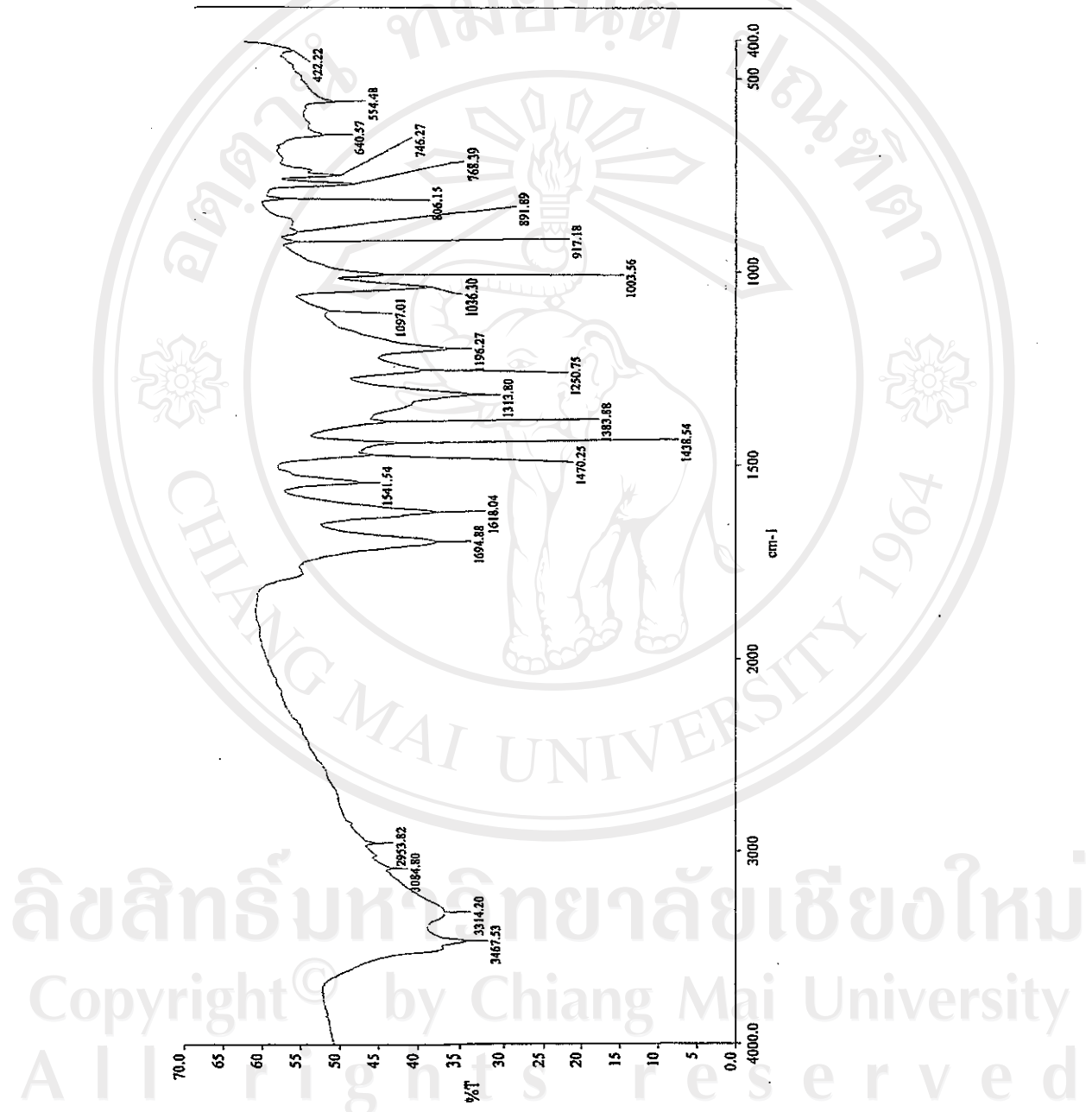
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

1.3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด

ผลของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่าเปรียบเทียบกับมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด แสดงดังรูป 15



รูป 15 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบผักปวยล่า

ตาราง 7 แสดงค่า wave number จากอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดที่แยกได้จากใบผักปวยล่าเทียบกับ
กรดมาตรฐานซิตริก

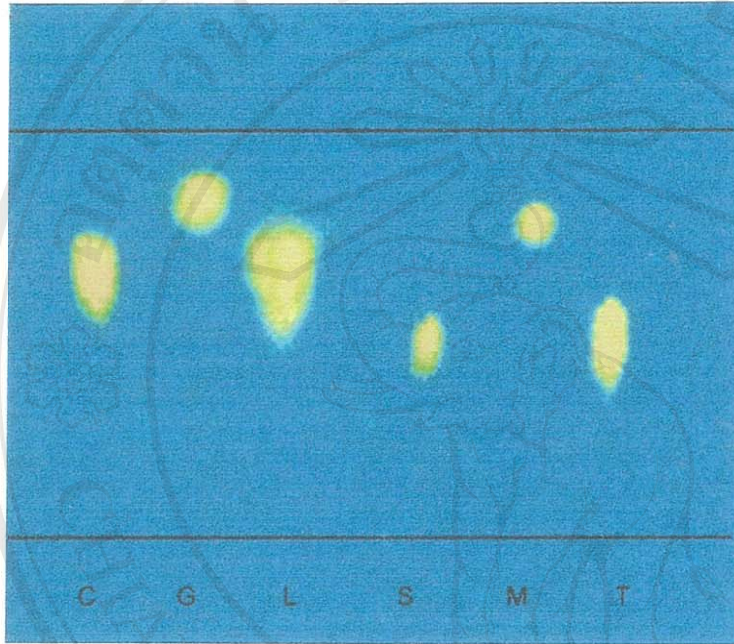
หมู่ฟังก์ชัน	wave number กรดที่แยกได้ จากใบผักปวยล่า (cm^{-1})	wave number กรดมาตรฐาน ซิตริก (cm^{-1})
O-H stretching	3000-3600	3000-3500
C=O stretching	1694.88	1701.14
C-O stretching	1250.75	1238.77
O-H blending	917.18, 1438.54	943.31, 1429.89

จากตาราง 7 ค่า wave number จากอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดที่แยกได้จากใบผักปวยล่า
พบว่ามีหมู่ฟังก์ชัน C=O ที่ 1694.88, C-O ที่ 1250.75 และ O-H ที่ 3000-3600, 917.18, 1438.54
แสดงว่ากรดที่แยกได้เป็นกรดคาร์บอกซิลิก และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของ
กรดที่แยกได้จากใบส้มป่อยดังรูป 15 กับอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดมาตรฐานซิตริกดังรูป 32
พบว่ามีค่าคล้ายคลึงกัน แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบผักปวยล่าจะเป็นกรดซิตริก

2. การสกัดและคัดแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อม

2.1 การทดสอบเบื้องต้นหากรดแอลฟาไฮดรอกซีในใบมะขามป้อม

เมื่อนำสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบมะขามป้อมมาทดสอบหากรดเบื้องต้นโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ โดยใช้น้ำยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และ น้ำยาชะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4) ได้ผลการทดลองดังนี้



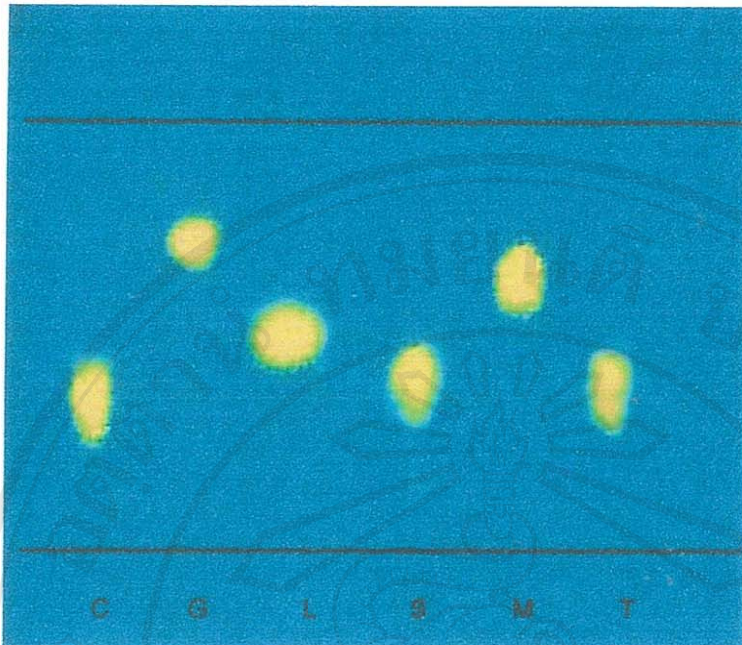
C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทาริก

รูป 16 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบมะขามป้อมเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

ตาราง 8 แสดงค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบมะขามป้อมและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.67
กรดไกลโคลิก	0.84
กรดแลคติก	0.69
สารสกัดน้ำจากใบมะขามป้อม	0.53
กรดมาลิก	0.79
กรดทาร์ทาริก	0.53

จากโครมาโตแกรมรูป 16 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 8 พบว่าค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบมะขามป้อมเท่ากับค่า Rf ของกรดทาร์ทาริก เท่ากับ 0.53 คาดว่าใบมะขามป้อมน่าจะมีกรดทาร์ทาริกอยู่



C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทาริก

รูป 17 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบมะขามป้อมเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

ตาราง 9 แสดงค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบมะขามป้อมและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.43
กรดไกลโคลิก	0.81
กรดแลกติก	0.58
สารสกัดน้ำจากใบมะขามป้อม	0.47
กรดมาลิก	0.74
กรดทาร์ทาริก	0.47

จากโครมาโตแกรมรูป 17 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 9 พบว่าค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบมะขามป้อมเท่ากับค่า Rf ของกรดทาร์ทาริก เท่ากับ 0.47 คาดว่าใบมะขามป้อมน่าจะมีกรดทาร์ทาริกอยู่

2.2 การสกัดพืชตัวอย่างและแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

ตาราง 10 แสดงผลการสกัดพืชตัวอย่างมะขามป้อมและแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์

พืชตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)	คิดเป็นร้อยละของ ใบมะขามป้อมแห้ง
น้ำหนักใบมะขามป้อมแห้งที่นำมาสกัด	1,000.00	100.00
น้ำหนักสารสกัดเมทานอลเข้มข้น	428.71	42.87
น้ำหนักสารสกัดน้ำเข้มข้น	152.63	15.26
น้ำหนักกรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้	0.56	0.06

ตาราง 11 แสดงผลการแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อมด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์

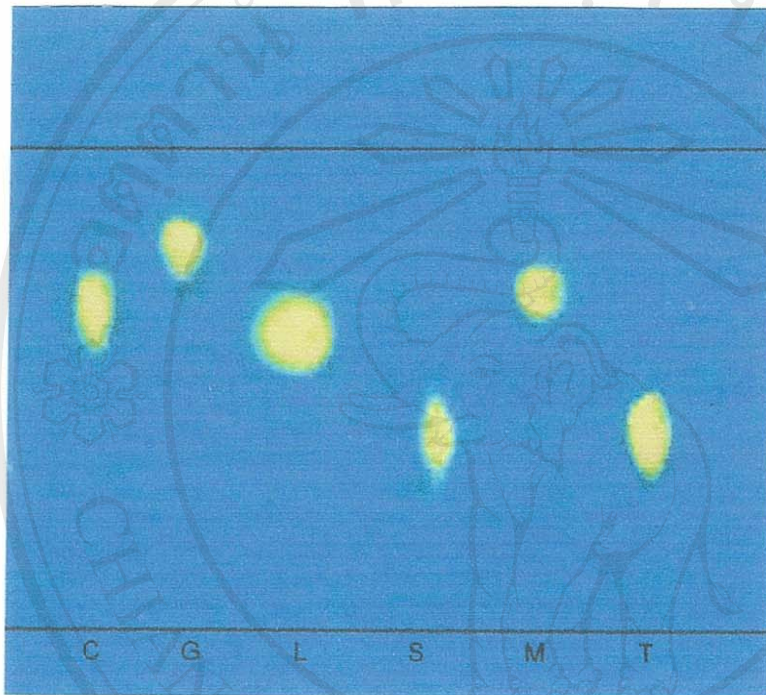
คอลัมน์ซิลิกาเจล	อัตราส่วนน้ำยาชะ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล	Fraction ที่มีกรด
ครั้งที่ 1	8 : 2	54-69
ครั้งที่ 2	8.5 : 1.5	44-58
ครั้งที่ 3	8.5 : 1.5	41-62
ครั้งที่ 4	8.5 : 1.5	31-37

การสกัดพืชตัวอย่างโดยนำใบมะขามป้อมแห้งน้ำหนัก 1000 กรัม มาทำการสกัดด้วยสารละลายเมทานอลโดยวิธี Reflux ได้สารเมทานอลเข้มข้นหนัก 428.71 กรัม คิดเป็นร้อยละ 42.87 นำไปผ่านคอลัมน์ไดโอไอออนเรซิน เอชพี-20 ได้สารสกัดน้ำเข้มข้นหนัก 152.63 กรัม คิดเป็นร้อยละ 15.26 จากนั้นนำมาแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์ พบว่ากรดถูกชะออกมาเมื่อผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 4 ในน้ำยาชะ คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 8.5 : 1.5 ใน fraction ที่ 31-37 ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองใส นำมารวมกันแล้วทิ้งไว้ให้ตกผลึกได้กรดหนัก 0.56 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.06

2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์กรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้

2.3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ

ก. โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษชนิด 1 มิติ ในน้ำยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)



C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทาริก

รูป 18 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อมเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

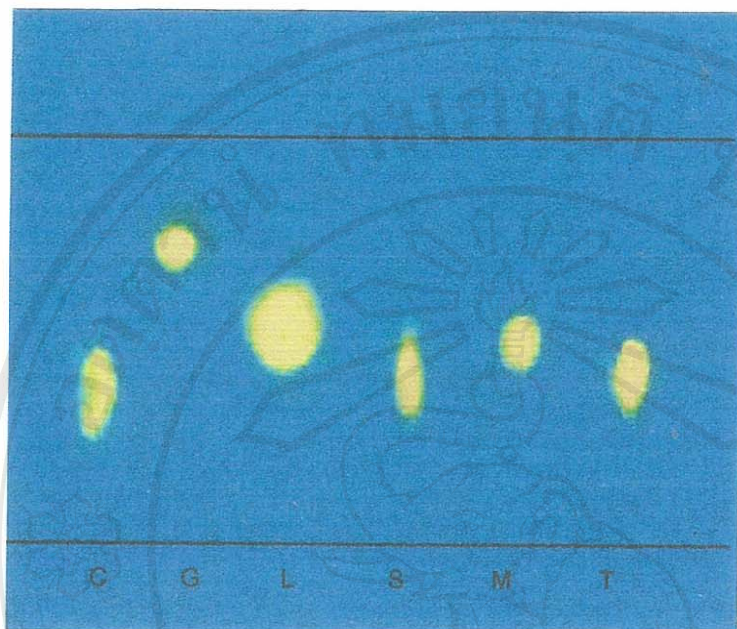
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 12 แสดงค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อมและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.75
กรดไกลโคลิก	0.90
กรดแลคติก	0.70
กรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อม	0.45
กรดมาลิก	0.79
กรดทาร์ทาริก	0.45

จากโครมาโตแกรมรูป 18 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 12 พบว่าค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อมเท่ากับค่า Rf ของกรดทาร์ทาริก เท่ากับ 0.45 แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบมะขามป้อมน่าจะเป็นกรดทาร์ทาริก

ข. โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษชนิด 1 มิติ ในน้ำยาอะเอิน-โพรพานอลและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)



C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทาริก

รูป 19 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อมเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะเอิน-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

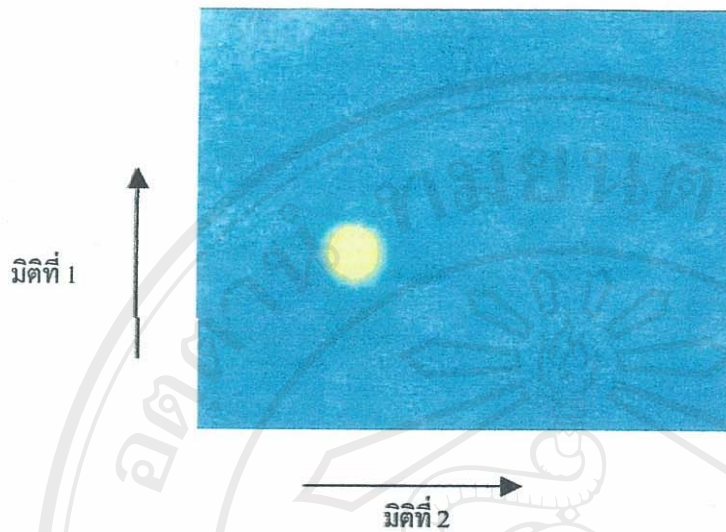
All rights reserved

ตาราง 13 แสดงค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อมและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-โพรพานอล และเมทิลเมนิมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

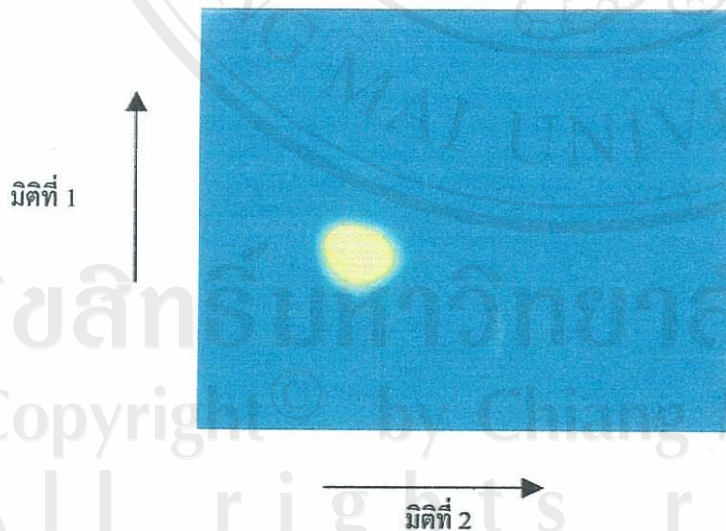
กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.42
กรดไกลโคลิก	0.75
กรดแลคติก	0.58
กรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อม	0.45
กรดมาลิก	0.53
กรดทาร์ทาริก	0.45

จากโครมาโตแกรมรูป 19 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 13 พบว่าค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อมเท่ากับค่า Rf ของกรดทาร์ทาริก เท่ากับ 0.45 แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบมะขามป้อมน่าจะเป็นกรดทาร์ทาริก

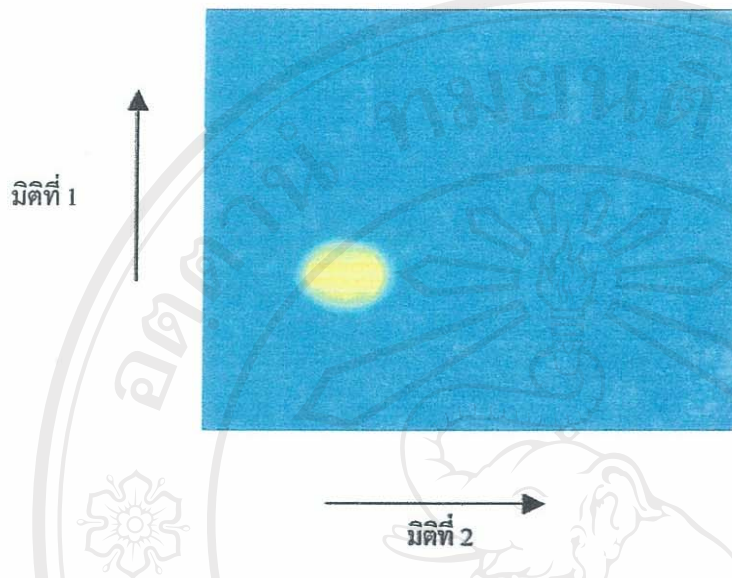
ค. โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษชนิด 2 มิติ



รูป 20 แสดงโครมาโตแกรม 2 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อมในน้ำยาชะมิติแรกคือ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และมิติที่ 2 คือ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ (6 : 4)



รูป 21 แสดงโครมาโตแกรม 2 มิติของกรดมาตรฐานทาร์ทริกในน้ำยาชะมิติแรกคือ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และมิติที่ 2 คือ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)



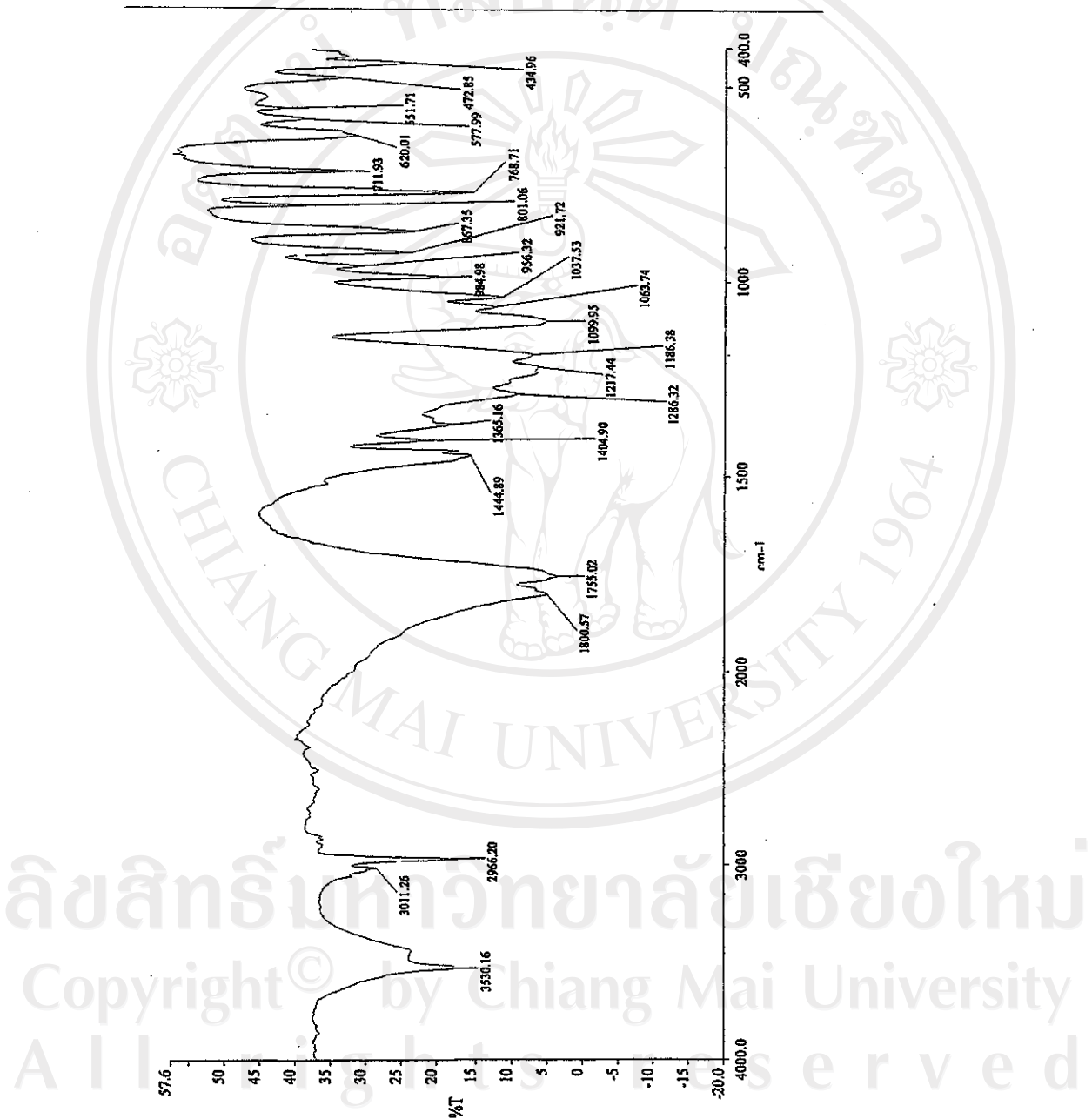
รูป 22 แสดงโครมาโตแกรม 2 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อมและกรดมาตรฐาน
ทาร์ทริกในน้ำยาหะมิติแรกคือ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และมิติที่ 2 คือ เอ็น-
โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

จากโครมาโตรแกรมรูป 22 พบว่ามี spot สีเหลืองบนพื้นสีน้ำเงินซ้อนทับเป็นจุดเดียว
แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบมะขามป้อมน่าจะเป็นกรดทาร์ทริก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด

ผลของการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อมเปรียบเทียบกับกรดมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด แสดงดังรูป 23



รูป 23 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบมะขามป้อม

ตาราง 14 แสดงค่า wave number จากสเปกตรัมอินฟราเรดของกรดที่แยกได้จากใบมะขามป้อม เทียบกับกรดมาตรฐานทาร์ทริก

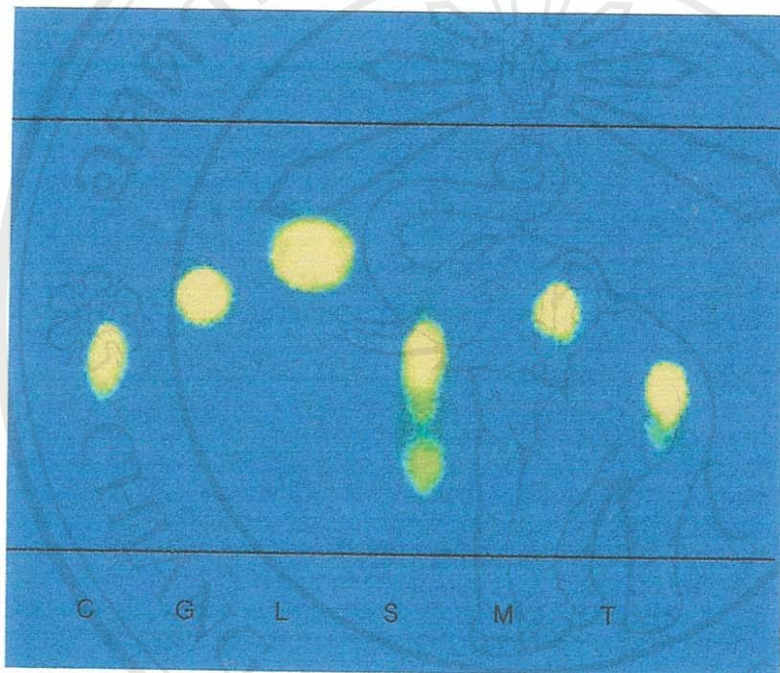
หมู่ฟังก์ชัน	wave number กรดที่แยกได้ จากใบมะขามป้อม (cm ⁻¹)	wave number กรดมาตรฐาน ทาร์ทริก (cm ⁻¹)
O-H stretching	3100-3600	3100-3600
C=O stretching	1755.02	1740.79
C-O stretching	1286.32	1256.30
O-H blending	921.72, 1444.89	944.78, 1449.54

จากตาราง 14 ค่า wave number จากอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดที่แยกได้จากใบมะขามป้อม พบว่ามีหมู่ฟังก์ชัน C=O ที่ 1755.02, C-O ที่ 1286.32 และ O-H ที่ 3100-3600, 921.72, 1444.89 แสดงว่ากรดที่แยกได้เป็นกรดคาร์บอกซิลิก และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดที่แยกได้จากใบมะขามป้อมดังรูป 23 กับอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดมาตรฐานทาร์ทริกดังรูป 36 พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบมะขามป้อมน่าจะเป็นกรดทาร์ทริก

3. การสกัดและคัดแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อย

3.1 การทดสอบเบื้องต้นหากรดแอลฟาไฮดรอกซีในใบส้มป่อย

เมื่อนำสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบส้มป่อยมาทดสอบหากรดเบื้องต้นโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ โดยใช้ยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และ ยาชะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4) ได้ผลการทดลองดังนี้



C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทริก

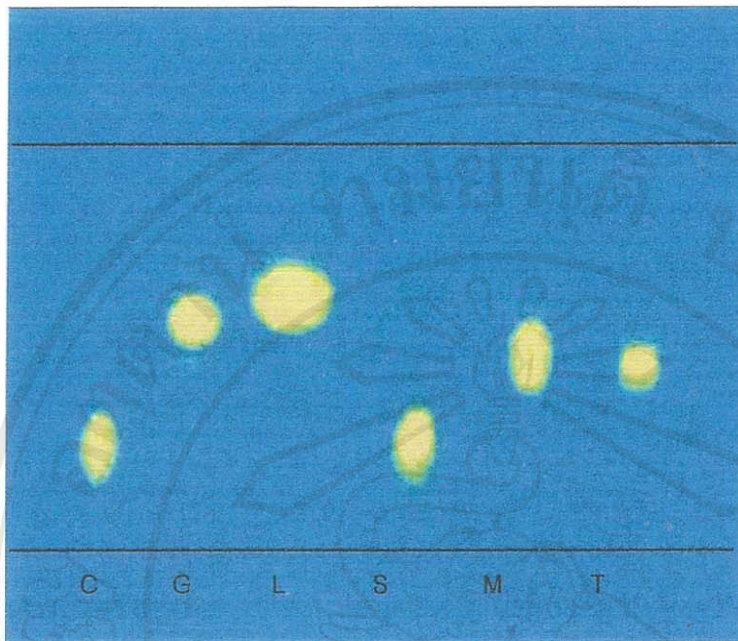
รูป 24 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบส้มป่อยเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 15 แสดงค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบส้มป่อยและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.55
กรดไกลโคลิก	0.70
กรดแลคติก	0.79
สารสกัดน้ำจากใบส้มป่อย	0.30, 0.55
กรดมาลิก	0.68
กรดทาร์ทาริก	0.49

จากโครมาโตแกรมรูป 24 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 15 พบว่าค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบส้มป่อยเท่ากับค่า Rf ของกรดซิตริก เท่ากับ 0.55 คาดว่าใบส้มป่อยน่าจะมีกรดซิตริกอยู่



C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทาริก

รูป 25 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบส้มป่อยเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

ตาราง 16 แสดงค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบส้มป่อยและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.28
กรดไกลโคลิก	0.60
กรดแลกติก	0.67
สารสกัดน้ำจากใบส้มป่อย	0.28
กรดมาลิก	0.51
กรดทาร์ทาริก	0.49

จากโครมาโตแกรมรูป 25 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 16 พบว่าค่า Rf ของสารสกัดน้ำเข้มข้นจากใบส้มป่อยเท่ากับค่า Rf ของกรดซิตริก เท่ากับ 0.28 คาดว่าใบส้มป่อยน่าจะมีกรดซิตริกอยู่

3.2 การสกัดพืชตัวอย่างและแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

ตาราง 17 แสดงผลการสกัดพืชตัวอย่างส้มป่อยและแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์

พืชตัวอย่าง	น้ำหนัก (กรัม)	คิดเป็นร้อยละของ ใบส้มป่อยแห้ง
น้ำหนักใบส้มป่อยแห้งที่นำมาสกัด	700.00	100.00
น้ำหนักสารสกัดเมทานอลเข้มข้น	50.00	7.14
น้ำหนักสารสกัดน้ำเข้มข้น	22.40	3.20
น้ำหนักกรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้	0.86	0.12

ตาราง 18 แสดงผลการแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อยด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์

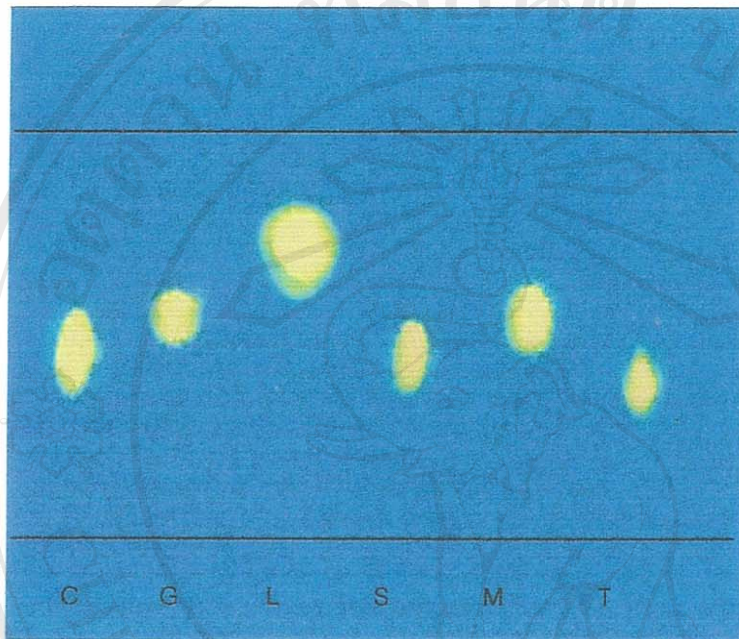
คอลัมน์ซิลิกาเจล	อัตราส่วนน้ำยาชะ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล	Fraction ที่มีกรด
ครั้งที่ 1	7.5 : 2.5	62-77
ครั้งที่ 2	7.5 : 2.5	45-59
ครั้งที่ 3	8 : 2	40-53
ครั้งที่ 4	8 : 2	27-34

การสกัดพืชตัวอย่างโดยนำใบส้มป่อยแห้งน้ำหนัก 700 กรัม มาทำการสกัดด้วยสารละลายเมทานอลโดยวิธี Reflux ได้สารเมทานอลเข้มข้นหนัก 50 กรัม คิดเป็นร้อยละ 7.14 นำไปผ่านคอลัมน์ไดโอไอออนเรซิน เอชพี-20 ได้สารสกัดน้ำเข้มข้นหนัก 22.40 กรัม คิดเป็นร้อยละ 3.20 จากนั้นนำมาแยกกรดแอลฟาไฮดรอกซีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีคอลัมน์ พบว่ากรดถูกชะออกมาเมื่อผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 4 ในน้ำยาชะ คลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 8 : 2 ใน fraction ที่ 27-34 ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองใส นำมารวมกันแล้วทิ้งไว้ให้ตกผลึกได้กรดหนัก 0.86 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.12

3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์กรดแอลฟาไฮดรอกซีที่แยกได้

3.3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษ

ก. โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษชนิด 1 มิติ ในน้ำยาอะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)



C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลคติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทาริก

รูป 26 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อยเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

ตาราง 19 แสดงค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อยและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาชะ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1)

กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.51
กรดไกลโคลิก	0.60
กรดแลคติก	0.77
กรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อย	0.51
กรดมาลิก	0.58
กรดทาร์ทาริก	0.43

จากโครมาโตแกรมรูป 26 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 19 พบว่าค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อยเท่ากับค่า Rf ของกรดซิตริก เท่ากับ 0.51 แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบส้มป่อยน่าจะเป็นกรดซิตริก

ข. โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษชนิด 1 มิติ ในน้ำยาชะ เอ็น-โพรพานอล และ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)



C= กรดซิตริก, G= กรดไกลโคลิก, L= กรดแลกติก, S= สารตัวอย่าง, M= กรดมาลิก, T= กรดทาร์ทริก

รูป 27 แสดงโครมาโตแกรม 1 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อยเทียบกับกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาชะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

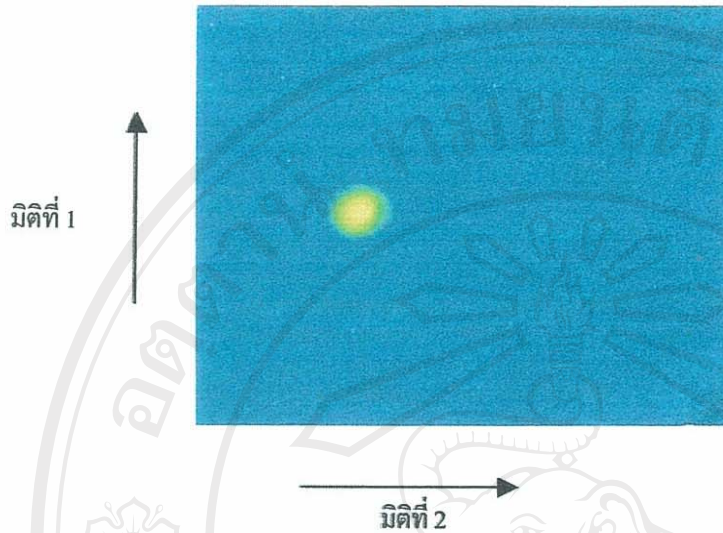
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 20 แสดงค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อยและกรดแอลฟาไฮดรอกซีมาตรฐาน 5 ชนิดในน้ำยาอะ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

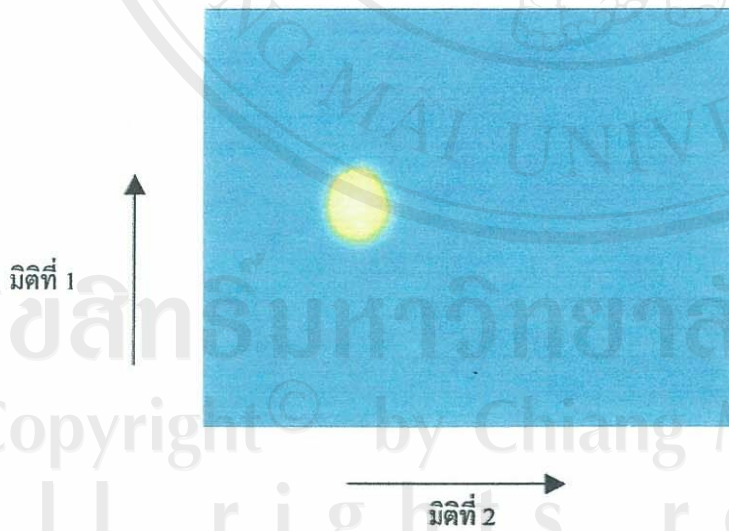
กรดอินทรีย์	ค่า Rf
กรดซิตริก	0.30
กรดไกลโคลิก	0.62
กรดแลคติก	0.75
กรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อย	0.30
กรดมาลิก	0.60
กรดทาร์ทาริก	0.38

จากโครมาโตแกรมรูป 27 ได้ค่า Rf แสดงดังตาราง 20 พบว่าค่า Rf ของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อยเท่ากับค่า Rf ของกรดซิตริก เท่ากับ 0.30 แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบส้มป่อยน่าจะเป็นกรดซิตริก

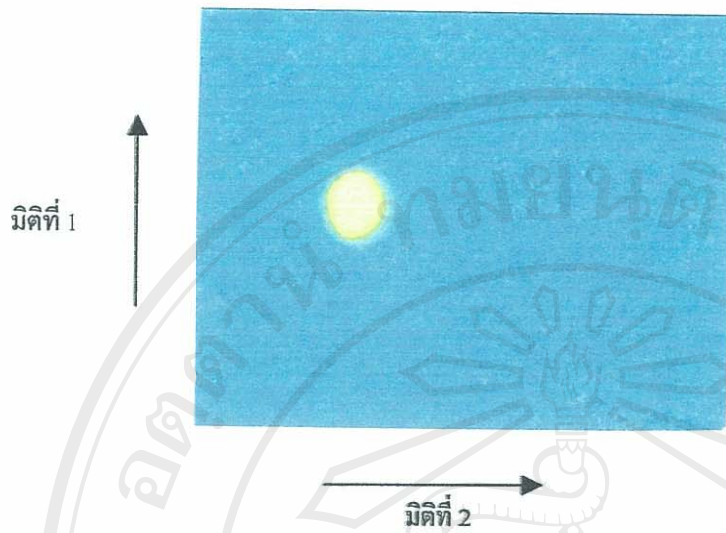
ก. โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีกระดาษชนิด 2 มิติ



รูป 28 แสดงโครมาโตแกรม 2 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อยในน้ำยาชะมิติแรกคือ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และมิติที่ 2 คือ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ (6 : 4)



รูป 29 แสดงโครมาโตแกรม 2 มิติของกรดมาตรฐานซิตริกในน้ำยาชะมิติแรกคือ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิติก และน้ำ (4 : 1 : 1) และมิติที่ 2 คือ เอ็น-โพรพานอล และแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ (6 : 4)



รูป 30 แสดงโครมาโตแกรม 2 มิติของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อยและกรดมาตรฐาน
ซิทริกในน้ำยาอะมิตแรกคือ เอ็น-บิวทานอล, กรดอะซิดิก และน้ำ (4 : 1 : 1) และมิติที่ 2 คือ เอ็น-
โพรพานอล และแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ (6 : 4)

จากโครมาโตแกรมรูป 30 พบว่ามี spot สีเหลืองบนพื้นสีน้ำเงินซ้อนทับเป็นจุดเดียว
แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบส้มป่อยน่าจะเป็นกรดซิตริก

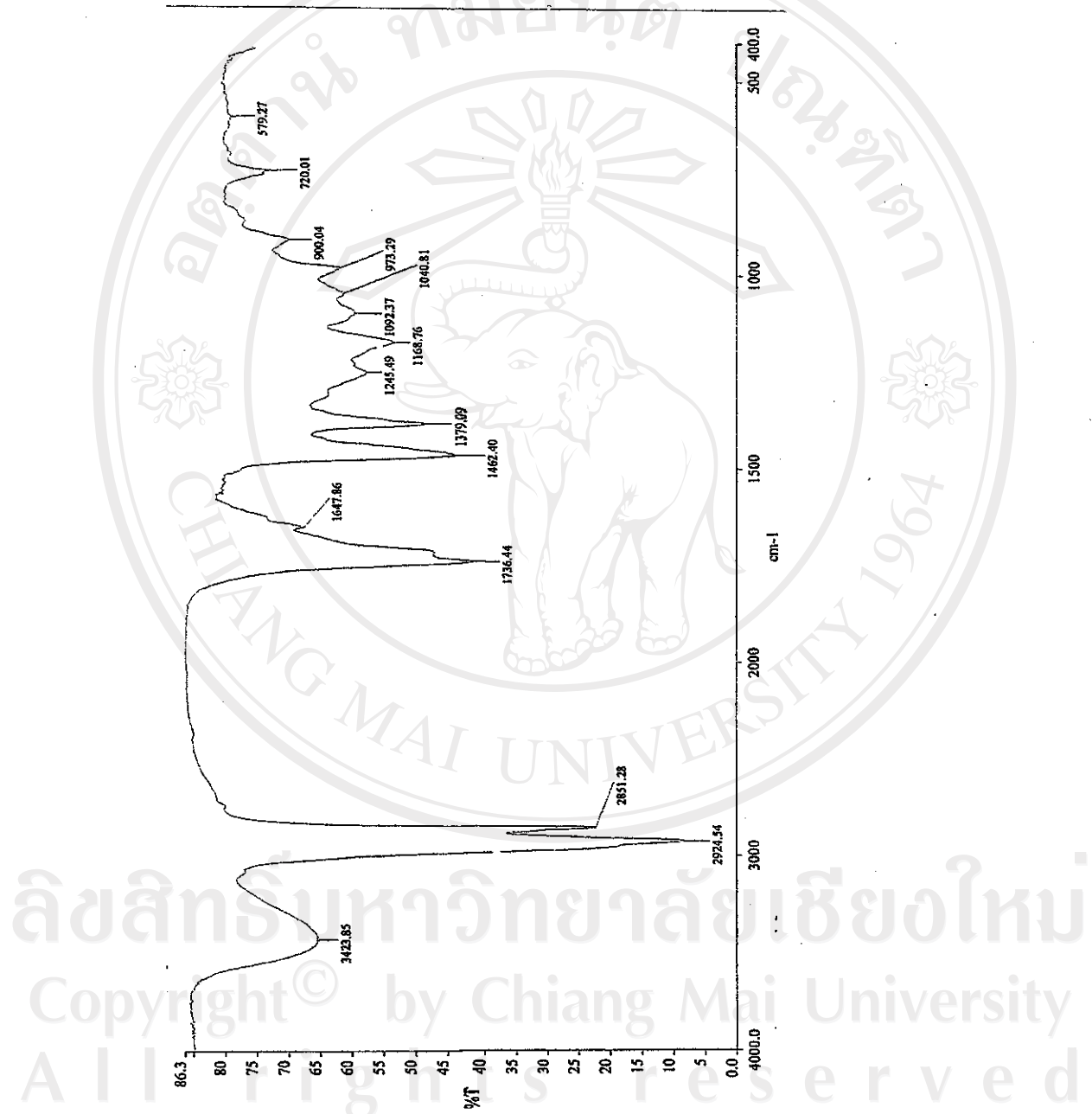
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

3.3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิคการดูดกลืนรังสีอินฟราเรด

ผลของค่าการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อยเปรียบเทียบกับกรดมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด แสดงดังรูป 31



รูป 31 แสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดแอลฟาไฮดรอกซีจากใบส้มป่อย

ตาราง 21 แสดงค่า wave number จากสเปกตรัมอินฟราเรดของกรดที่แยกได้จากใบส้มป่อยเทียบกับ
กรดมาตรฐานซิตริก

หมู่ฟังก์ชัน	wave number กรดที่แยกได้ จากใบส้มป่อย (cm ⁻¹)	wave number กรดมาตรฐาน ซิตริก (cm ⁻¹)
O-H stretching	3100-3600	3000-3500
C=O stretching	1736.44	1701.14
C-O stretching	1245.49	1238.77
O-H blending	900.04, 1462.40	943.31, 1429.89

จากตาราง 21 ค่า wave number จากอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดที่แยกได้จากใบส้มป่อย
พบว่ามีหมู่ฟังก์ชัน C=O ที่ 1736.44, C-O ที่ 1245.49 และ O-H ที่ 3100-3600, 900.04, 1462.40
แสดงว่ากรดที่แยกได้เป็นกรดคาร์บอกซิลิก และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของ
กรดที่แยกได้จากใบส้มป่อยดังรูป 31 กับอินฟราเรดสเปกตรัมของกรดมาตรฐานซิตริกดังรูป 32
พบว่ามีค่าคล้ายคลึงกัน แสดงว่ากรดที่แยกได้จากใบส้มป่อยน่าจะเป็นกรดซิตริก