

ผลการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างเปลือกหับทิม

จากการเก็บตัวอย่างเปลือกหับทิมในช่วงอายุต่าง ๆ กัน นำไปอบและบดละเอียดจนได้ผงแห้ง จะได้ผงมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อน-น้ำตาลเหลือง

2. การสกัดเปลือกหับทิมและการทำ acid hydrolysis

2.1 ผลการสกัดและการทำ acid hydrolysis ของเปลือกหับทิมในช่วงอายุต่าง ๆ กัน

จากการนำเปลือกหับทิมในช่วงอายุต่าง ๆ กันคือ 0-25 วัน, 26 -50 วัน และ 54-75 วันมาทำการสกัดด้วยวิธีกวนในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และทำการไฮโดรไลซิสในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5% ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักและลักษณะของตะกอน crude products หลังจากการทำ acid hydrolysis

ช่วงอายุเปลือกหับทิม (วัน)	น้ำหนักเปลือกหับทิมที่ใช้ (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดหยาบ (กรัม)	ลักษณะสารสกัดหยาบ
0-25	40.00	4.80	ตะกอนสีน้ำตาลเข้ม - ดำ
26-50	40.00	5.60	ตะกอนสีน้ำตาลเข้ม - ดำ
51-75	40.00	4.82	ตะกอนสีน้ำตาลเข้ม - ดำ

2.2. การทำให้บริสุทธิ์และการตกผลึกของเปลือกหับทิมในช่วงอายุต่าง ๆ กัน

เมื่อนำตะกอนที่ได้จากการไฮโดรไลซิสที่ได้จากข้อ 2.1 จากมาทำให้บริสุทธิ์โดยการนำไปละลาย methanol โดยใช้ปริมาณ methanol 30 มล. ต่อมสกัดหยาบ 1 กรัม และนำไปกวนในน้ำความร้อน ประมาณ 45 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ครั้ง ได้ผลการตกผลึกใหม่ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 น้ำหนักและลักษณะของตะกอนหลังการตกผลึกด้วย methanol

ช่วงอายุเปลือก ทับทิม (วัน)	น้ำหนักสารสกัด หยาบเริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักตะกอน หลักการตกผลึก	% yield	ลักษณะตะกอนที่ได้
0-25	4.80	1.12	2.80	สีน้ำตาลเข้ม
26-50	5.60	1.30	3.25	สีเขียวซีม้อ่อน
51-75	4.82	1.92	4.80	สีเขียวซีม้อเข้ม

2.1 ผลการสกัดและการทำ acid hydrolysis ของเปลือกทับทิมในแก๊ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

เมื่อนำเปลือกทับทิมแก่ของไทยมาทดลองสกัดด้วยตัวละลายชนิดต่างๆ และเปรียบเทียบกับทับทิมจีน ได้ผลดังตารางที่ 3 และตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ผลการสกัดเปลือกทับทิมแก่ของไทย ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดตัวทำละลาย	น้ำหนักเปลือก ทับทิมที่ใช้ (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด หยาบ (กรัม)	% yield	ลักษณะสารสกัด หยาบ
40 % ethanol	40.00	0.4325*	1.08	ตะกอนสีเขียวซีม้ออ่อน
60 % ethanol	30.00	1.164	3.88	ตะกอนสีเหลือง
80 % ethanol	30.01	0.5622	1.87	ตะกอนสีเหลือง

*เหนียว ไม่แยกชั้นหลังปั่น กรองไม่ออก

ตารางที่ 4 ผลการสกัดเปลือกหุ้มแก่นของจีน ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดตัวทำละลาย	น้ำหนักเปลือก หุ้มที่ใส่ (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด หยาบ (กรัม)	% yield	ลักษณะสารสกัด หยาบ
40 % ethanol	40.00	1.7354	4.34	ตะกอนสีเหลือง
60 % ethanol	40.00	1.4462	3.62	ตะกอนสีเหลือง
80 % ethanol	40.00	0.9125	2.28	ตะกอนสีเหลือง

3. การวิเคราะห์สาร

3.1 การตรวจสอบด้วย TLC

เมื่อนำสารสกัดเปลือกหุ้มมาละลายด้วย methanol และตรวจสอบโดยวิธี TLC เปรียบเทียบ

ระหว่างสารสกัดหยาบ ตะกอนหลังการตกผลึก เปรียบเทียบการสารมาตรฐานกรดกรดเอลลาจิก ได้ผลดังตาราง
ที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบเบื้องต้นด้วย TLC

สารสกัด	Rf
สารมาตรฐานกรดเอลลาจิก	0.31
สารสกัดหลังการ hydrolysis	0.31
สารสกัดก่อนการ hydrolysis	0.14

Spot ที่ได้ detect ได้โดยการดู spot ภายใต้แสง UV 254 nm

โดยสารสกัดหลังการ hydrolysis ของตัวอย่างทุกชนิดที่ทำมีค่า Rf อยู่ในช่วงเดียวกัน

3.2 การวิเคราะห์ตะกอนหลังการตกผลึกด้วย Differential Scanning Calorimeter (DSC)

เมื่อนำตะกอนที่ได้หลังการตกผลึกมาตรวจสอบด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter

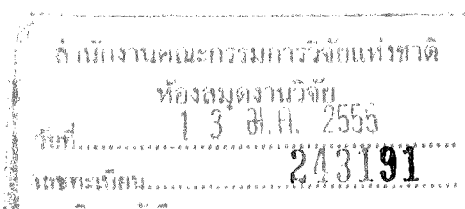
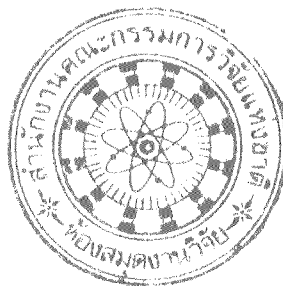
(DSC) ได้ผลดังตารางที่ 6

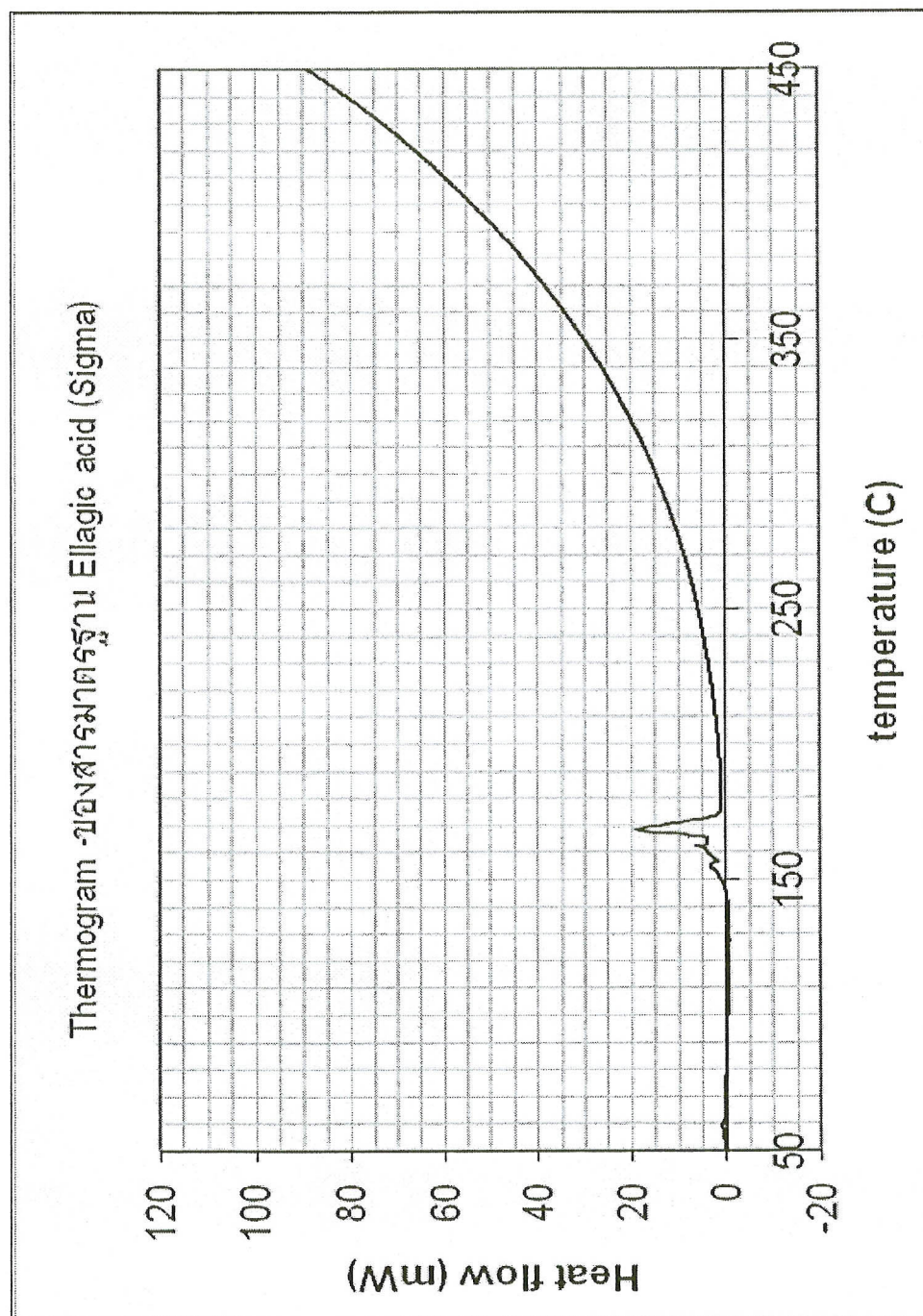
ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลวโดย Differential Scanning Calorimeter (DSC)

ผลึกที่ใช้ทดสอบ	น้ำหนักผลึกที่ใช้ ทดสอบ (มก.)	จุดหลอมเหลว 1 (°C)	จุดหลอมเหลว 2 (°C)	หมายเหตุ
สารมาตรฐานกรด เอซิลลาจิก	3.046	168.103	>350.000	มี peak ขนาด เล็กมากที่ 168.100 (°C)
ผลึกจากเปลือกหับทิม ช่วงอายุ 0-25 วัน	3.362	176.044	>350.000	-
ผลึกจากเปลือกหับทิม ช่วงอายุ 26-50 วัน	2.870	175.961	>350.000	มี peak ขนาด เล็ก 2 peak ที่ 155-158 (°C)
ผลึกจากเปลือกหับทิม ช่วงอายุ 51-75 วัน	3.790	172.109	>350.000	มี peak ขนาด เล็ก 2 peak ที่ 155-160 (°C)
ผลึกจากเปลือกหับทิม ไทยที่ได้จากการสกัด โดย 60% ethanol	3.682	171.320	>350.000	-
ผลึกจากเปลือกหับทิม จีนที่ได้จากการสกัด โดย 60% ethanol ตกตะกอน ครั้งที่ 1	3.409	173.639	>350.000	มี peak ขนาด เล็กที่ 173.557 (°C)

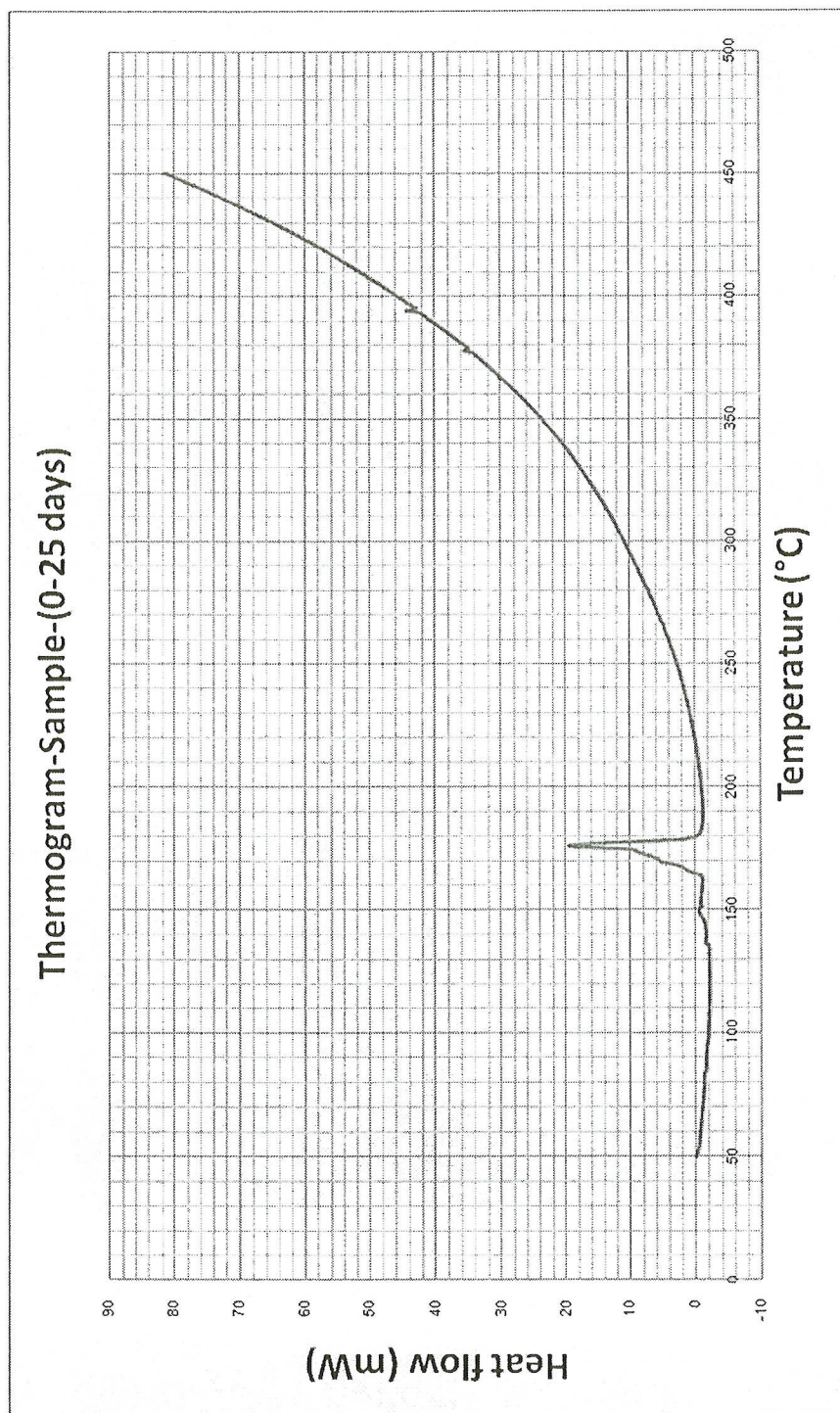
ผลึกจากเปลือกหับทิม จีนที่ได้จากการสกัด โดย 60% ethanol ตกตะกอนครั้งที่ 2	3.668	172.413	>350.000	มี peak ขนาด เล็กที่ 172.130 (°C)
ผลึกจากเปลือกหับทิม จีนที่ได้จากการสกัด โดย 60% ethanol ตกตะกอน ครั้งที่ 3	3.498	171.280	>350.000	-

Thermagram ที่ได้จากการวิเคราะห์แสดงได้ดังรูป

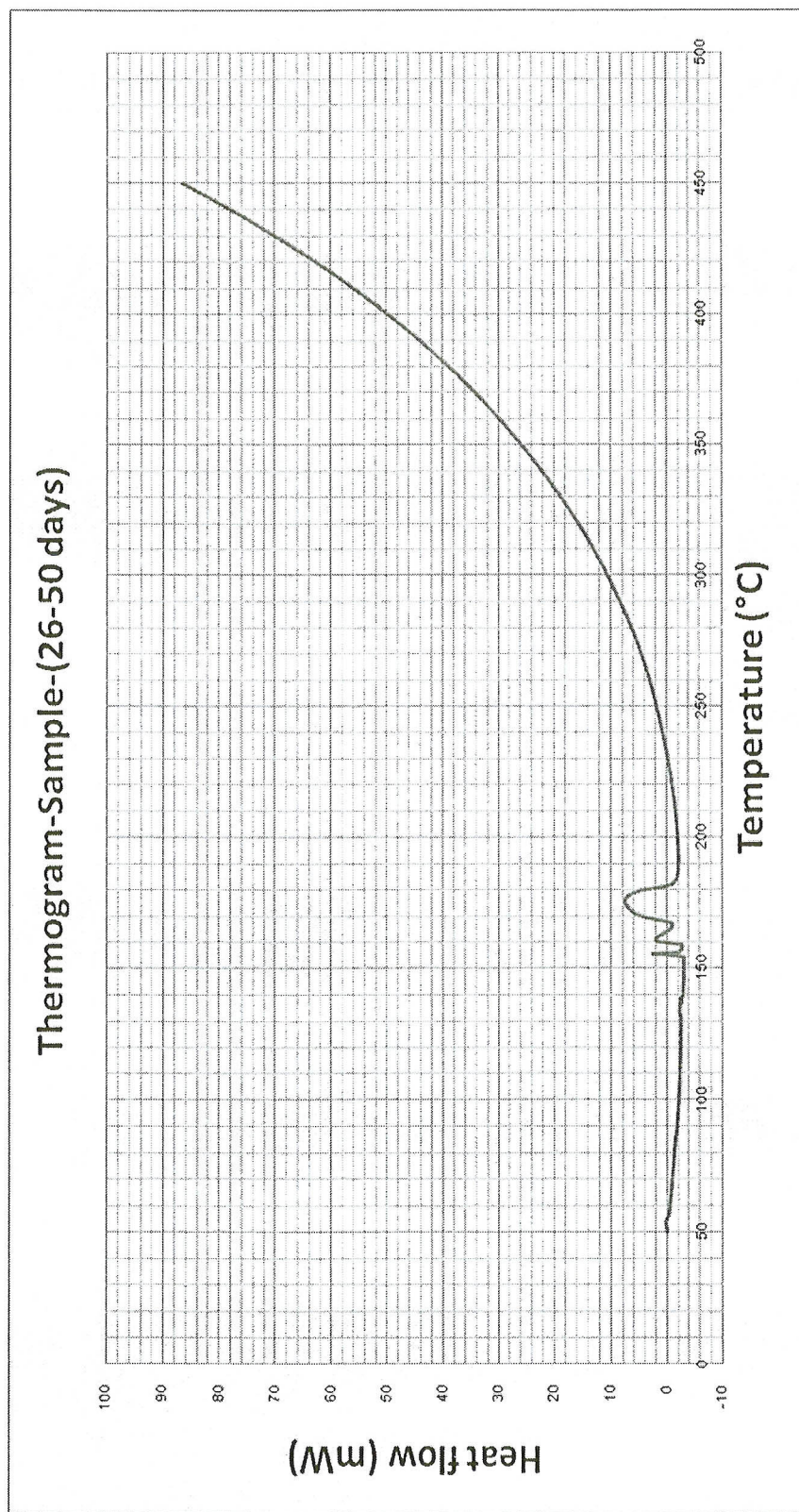




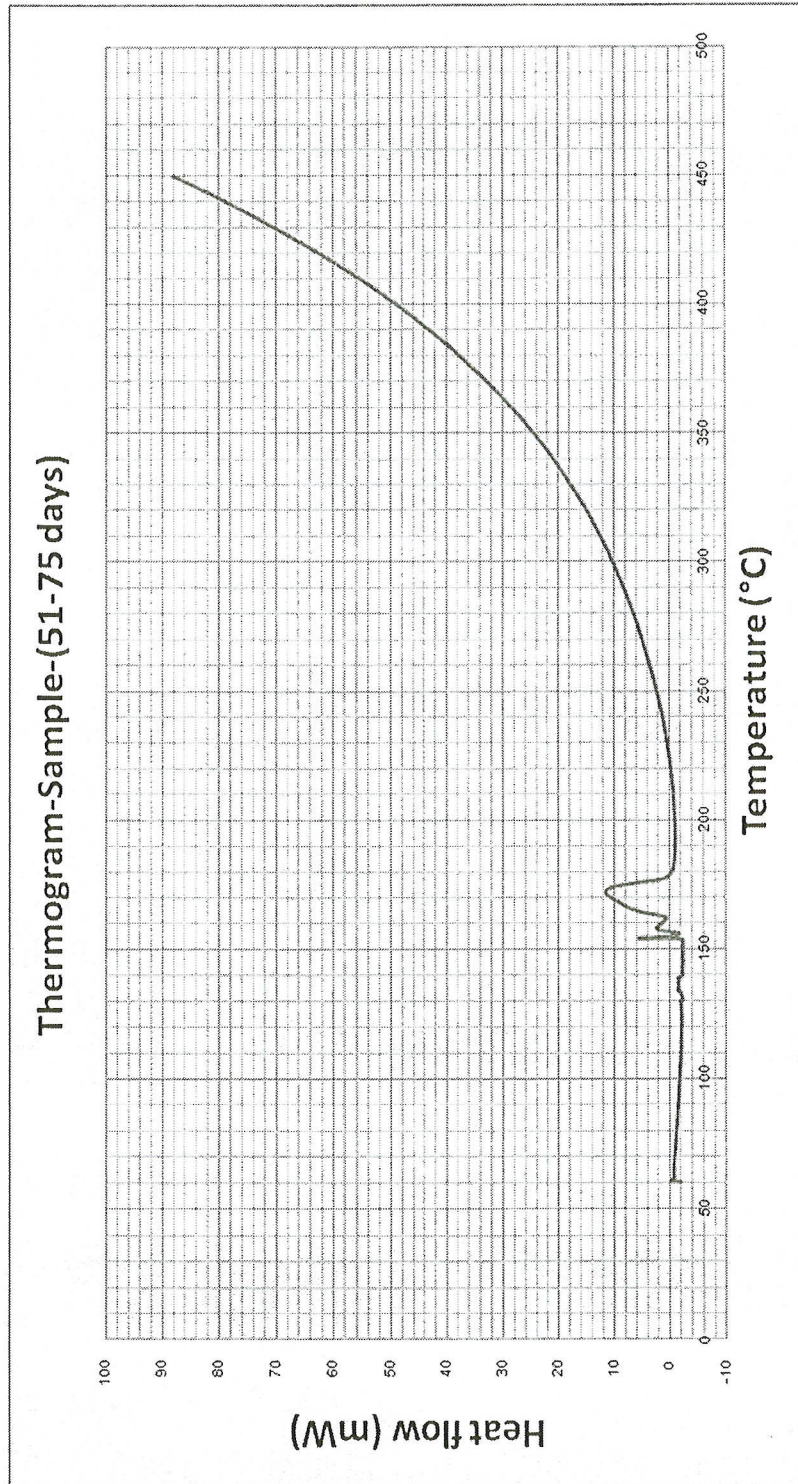
รูป 2 Thermogram ของ Standard ellagic acid



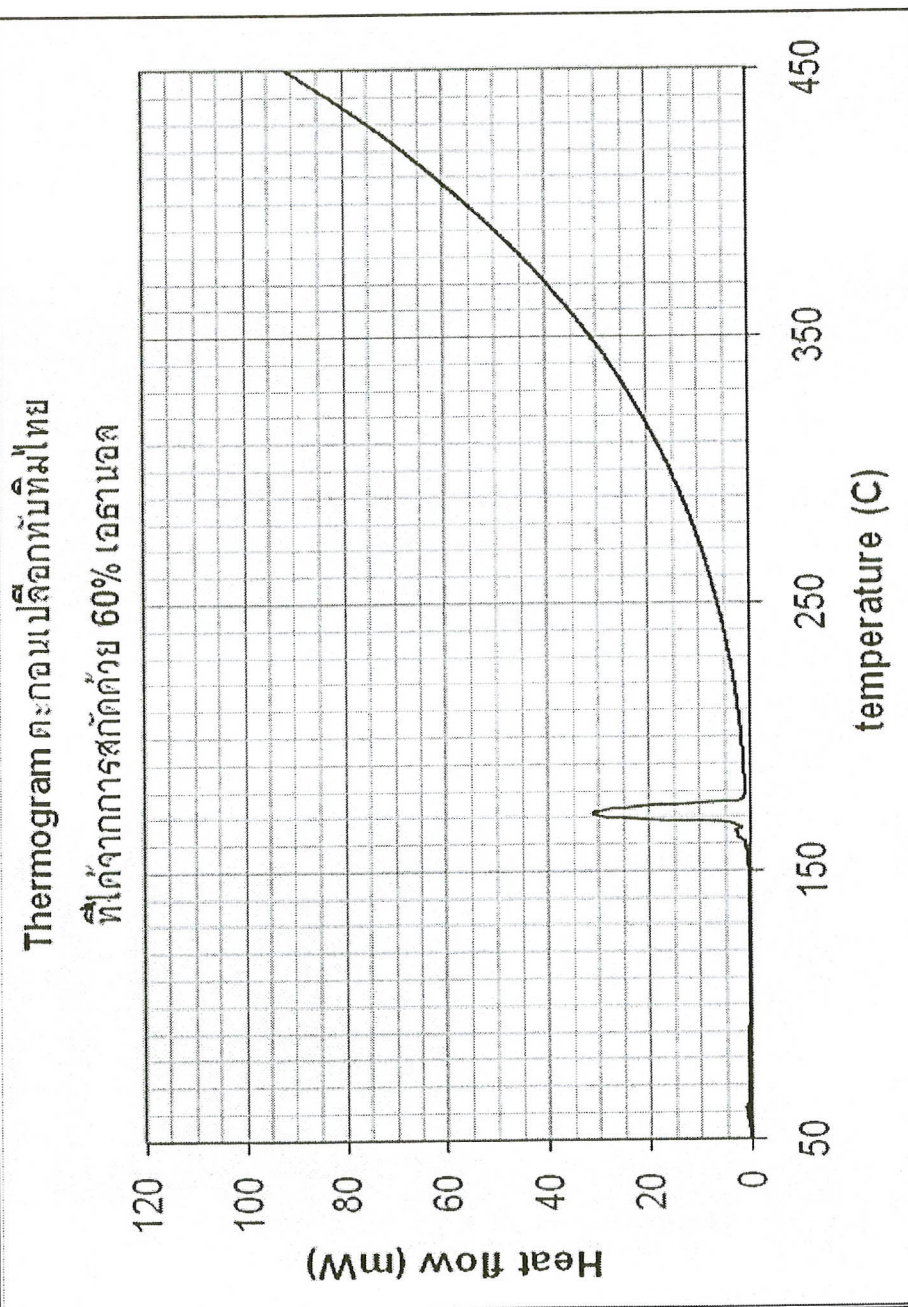
รูป 3 Thermogram ของผลึกจากเปลือกทับทิมที่เฝ้าอายุ 0-25 วัน



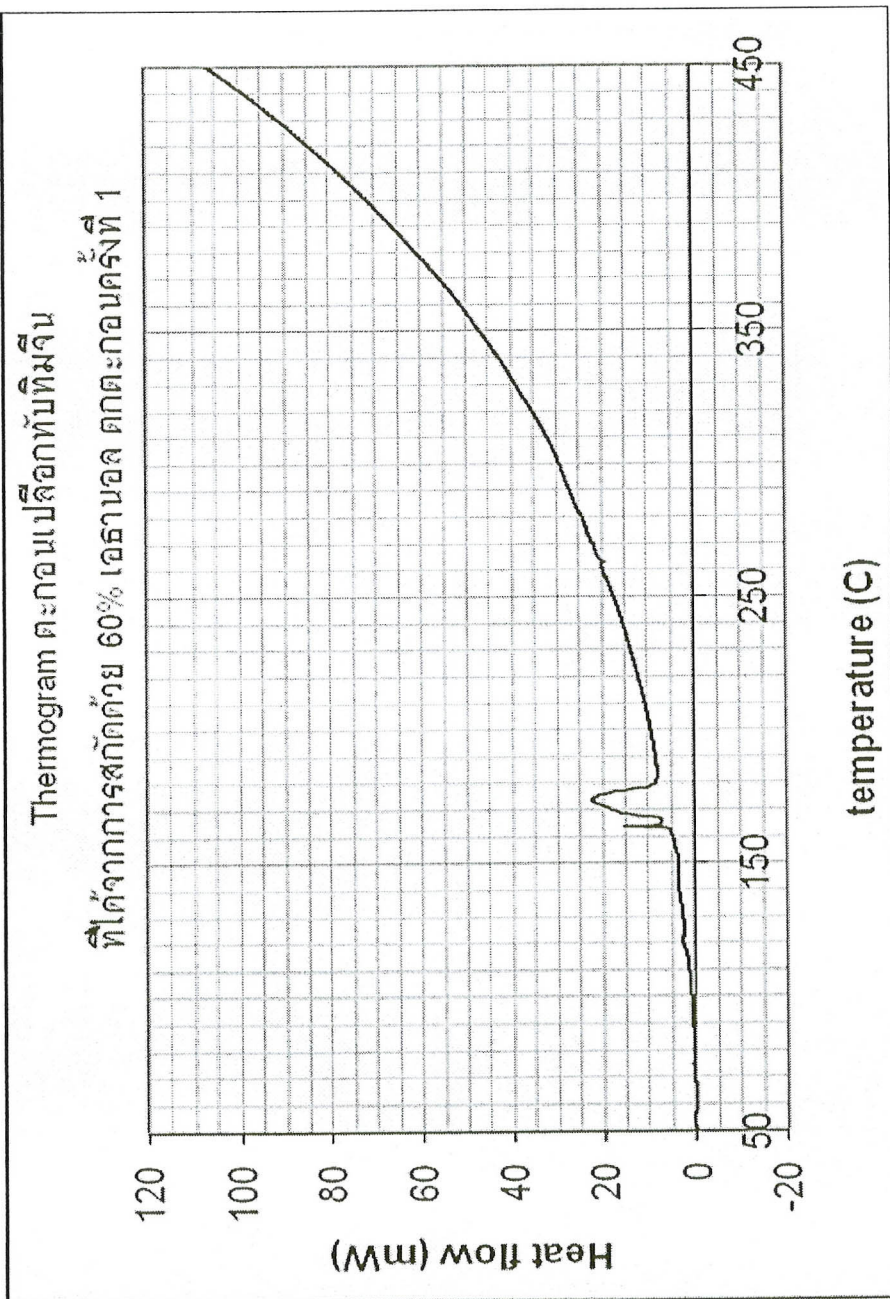
รูป 4 Thermogram ของผลึกจากเปลือกหับที่มีอายุ 26-50 วัน



รูป 5 Thermogram ของผลึกจากเปลือกหอยที่มีอายุ 51-75 วัน



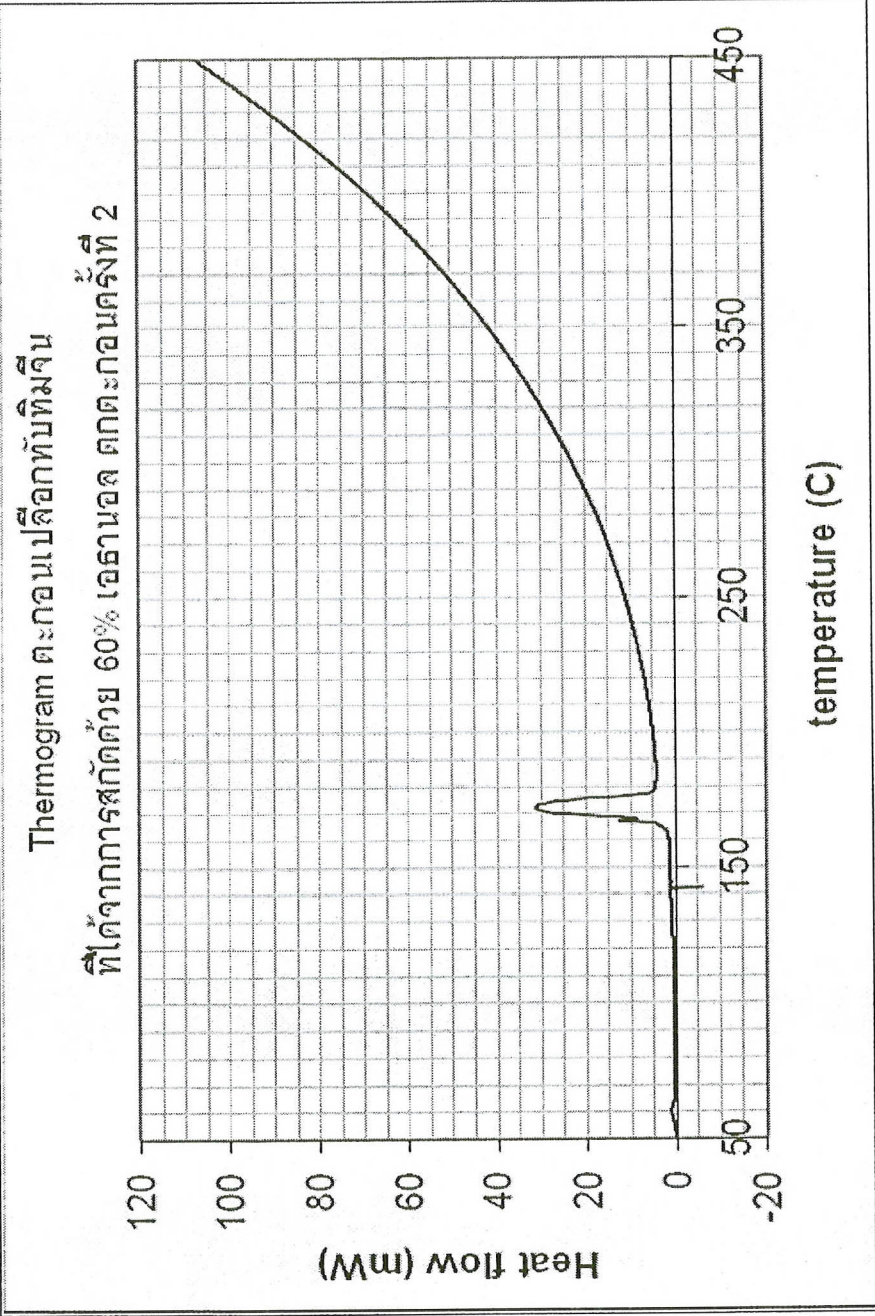
รูป 6 Thermogram ของผลึกจากเปลือกหอยหิมไทยที่สกัดด้วย 60% เอทานอล



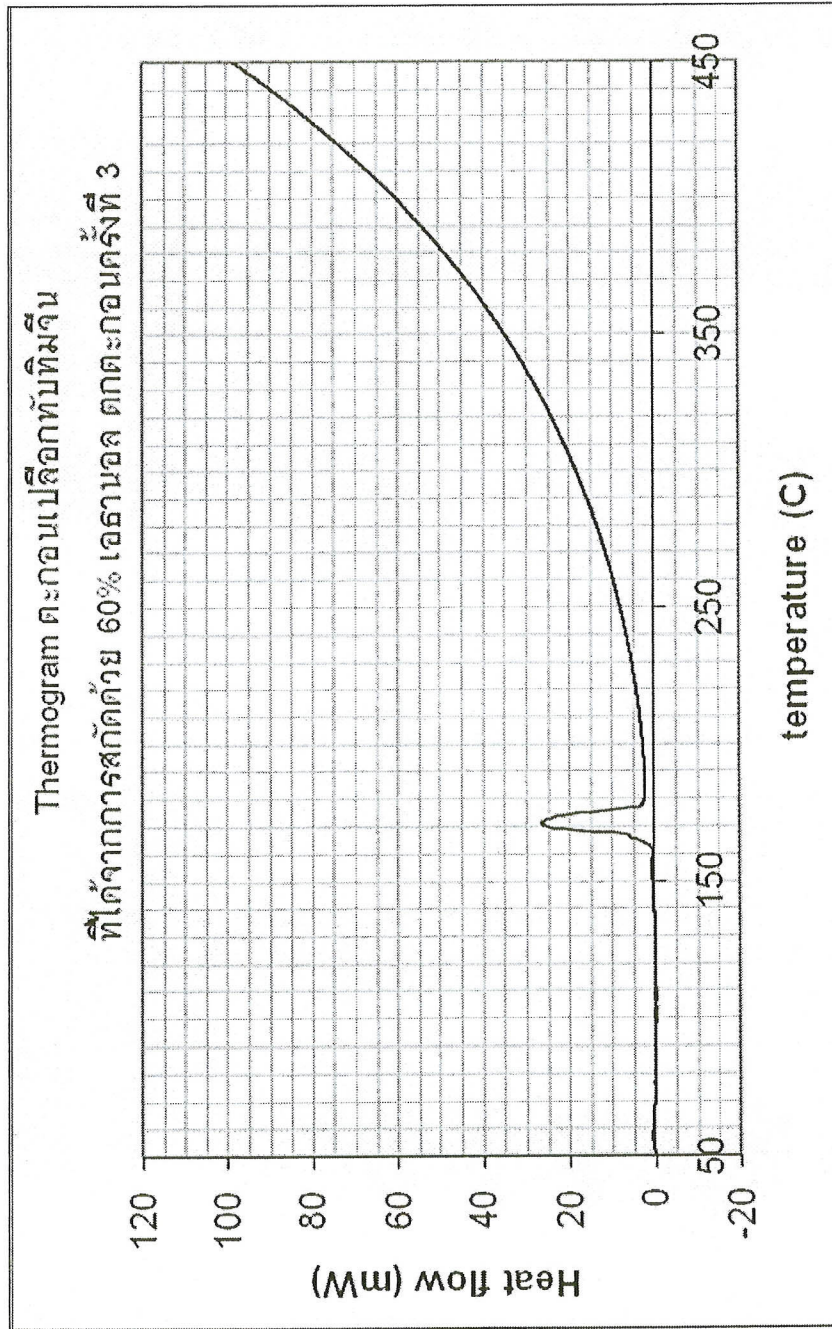
รูป 7 Thermogram ของผลึกจากเปลี่ยนที่หิมจีนที่สกัดด้วย 60% เอธานอล

ทำการตกผลึกครั้งที่ 1 ในเมทานอล





รูป 8 Thermogram ของผลึกจากเปลือกหอยหิมจีนที่สกัดด้วย 60% เอธานอล
ทำการตกผลึกครั้งที่ 2 ในเมทานอล

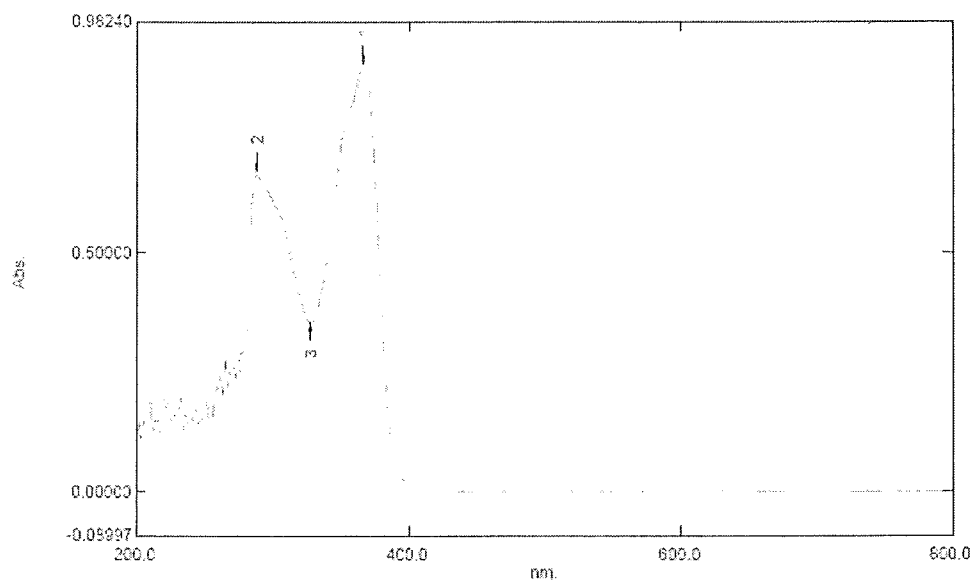


รูป 9 Thermogram ของผลึกจากเปลือกหอยที่มีเงินที่สกัดด้วย 60% เอทานอล

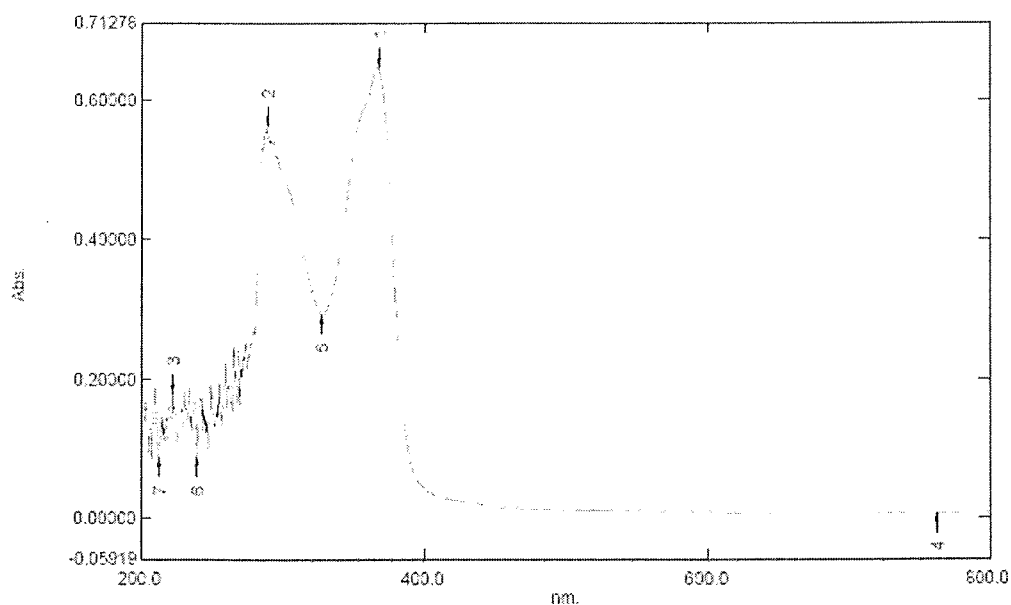
ทำการตกตะกอนครั้งที่ 3 ในเมทานอล

3.3 การวิเคราะห์ลักษณะการดูดกลืนแสงโดย เครื่อง UV spectrophotometer

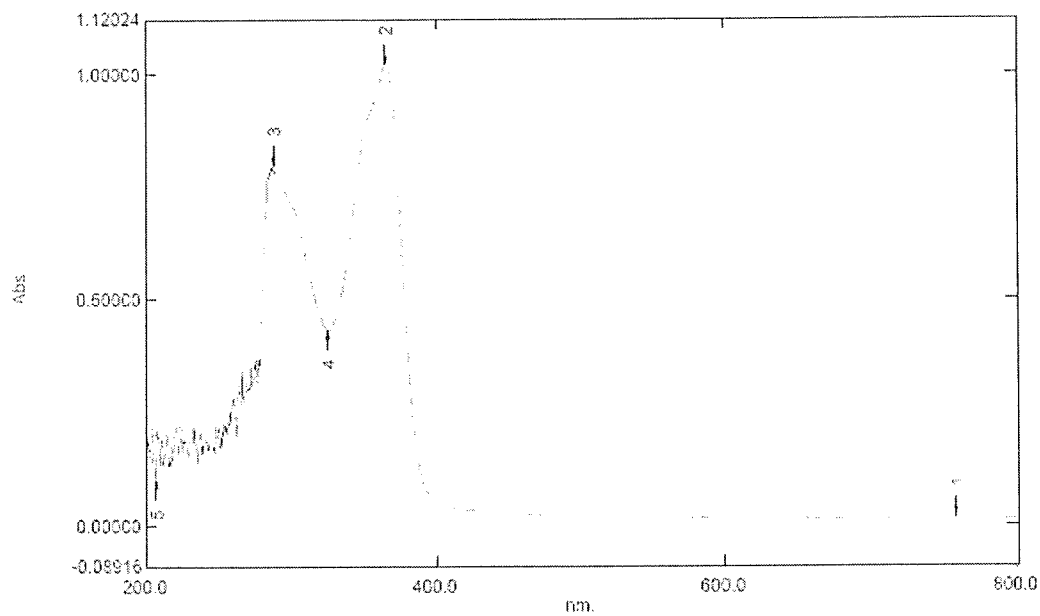
เมื่อนำผงตะกอนที่ได้รับการสกัดเปลือกหับหิมอายุต่าง ๆ กันที่ตกตะกอนในเมธานอลมาละลายด้วย methanol ให้มีความเข้มข้นประมาณ 80-100 μM และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200-800 nm แสดงได้ดังรูป 10-13



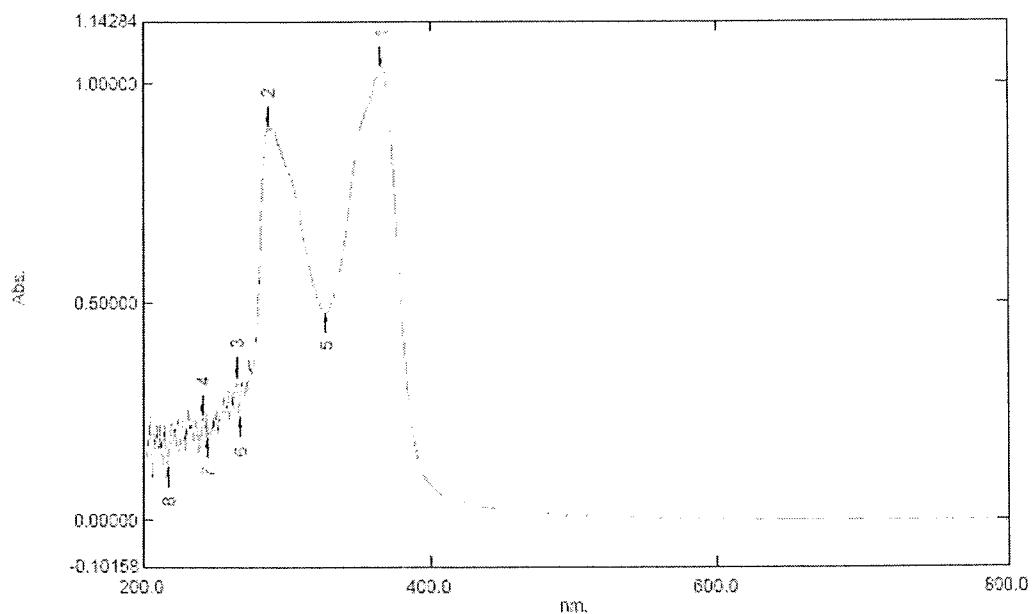
รูป 10 UV-Spectrum ของ Standard ellagic acid (Sigma) โดยมี $\lambda_{\text{max 1}}$ เท่ากับ 366.0 nm และ $\lambda_{\text{max 2}}$ เท่ากับ 286.0 nm.



รูป 11 UV spectrum ของสารสกัดที่ได้จากเปลือกหับหิมไทยอายุ 0-25 วัน โดยมี $\lambda_{\text{max 1}}$ เท่ากับ 366.5 nm และ $\lambda_{\text{max 2}}$ เท่ากับ 287.0 nm.

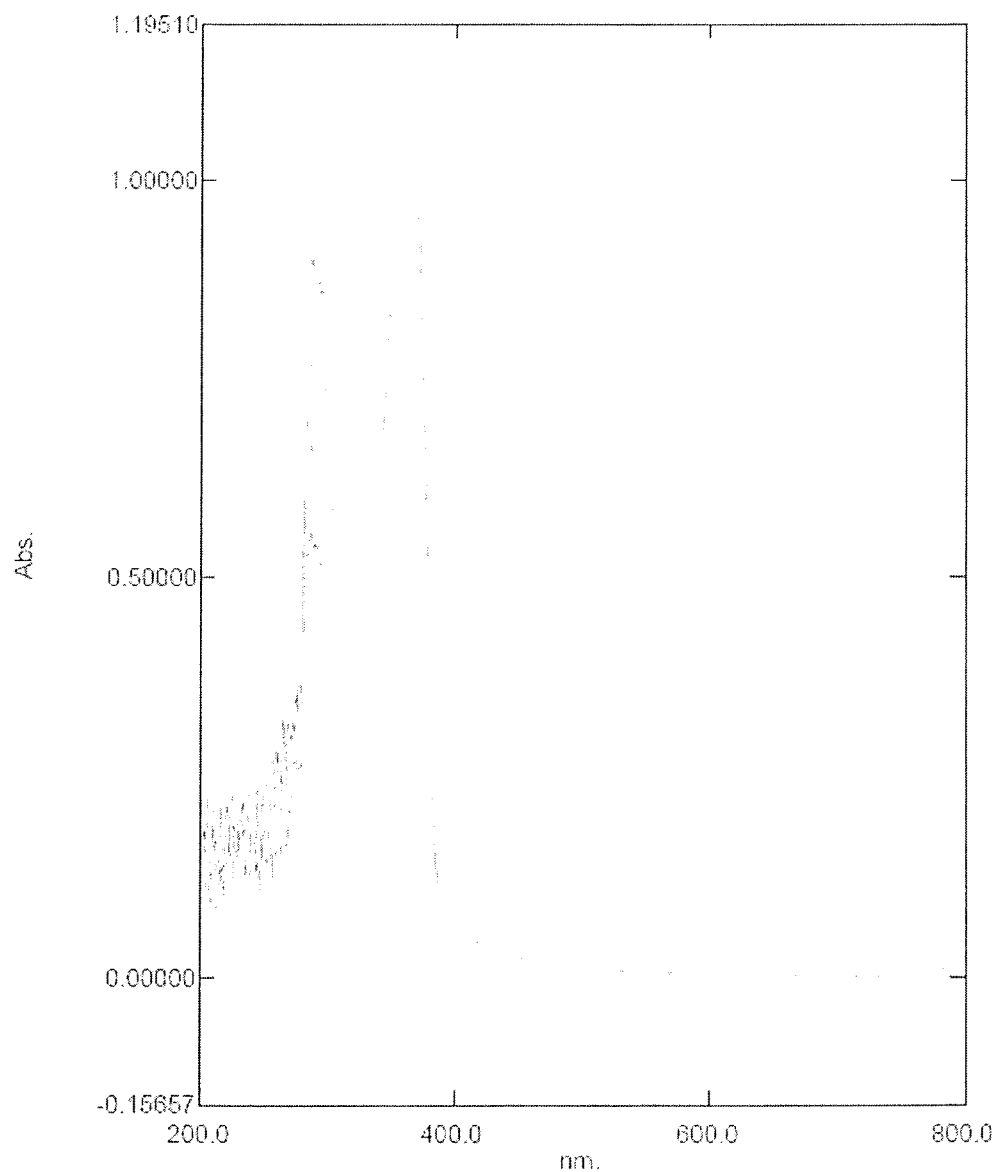


รูป 12 UV-Spectrum ของผลึกจากเปลือกหับทิมที่มีอายุ 26-50 วัน โดยมี $\lambda_{\text{max 2}}$ เท่ากับ 366.0 nm และ $\lambda_{\text{max 3}}$ เท่ากับ 288.0 nm.



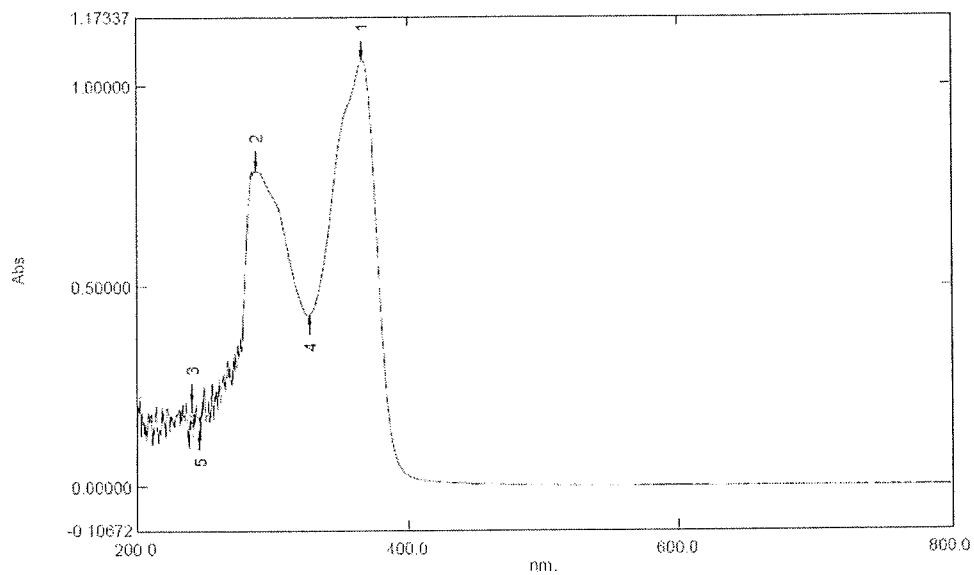
รูป 13 UV-Spectrum ของผลึกจากเปลือกหับทิมที่มีอายุ 51-75 วัน โดยมี $\lambda_{\text{max 1}}$ เท่ากับ 366.0 nm และ $\lambda_{\text{max 2}}$ เท่ากับ 286.0 nm.

เมื่อนำ Spectrum ของตัวอย่างผลึกที่ได้และสารมาตรฐานมาซ้อนกัน แสดงได้ดังรูป 14

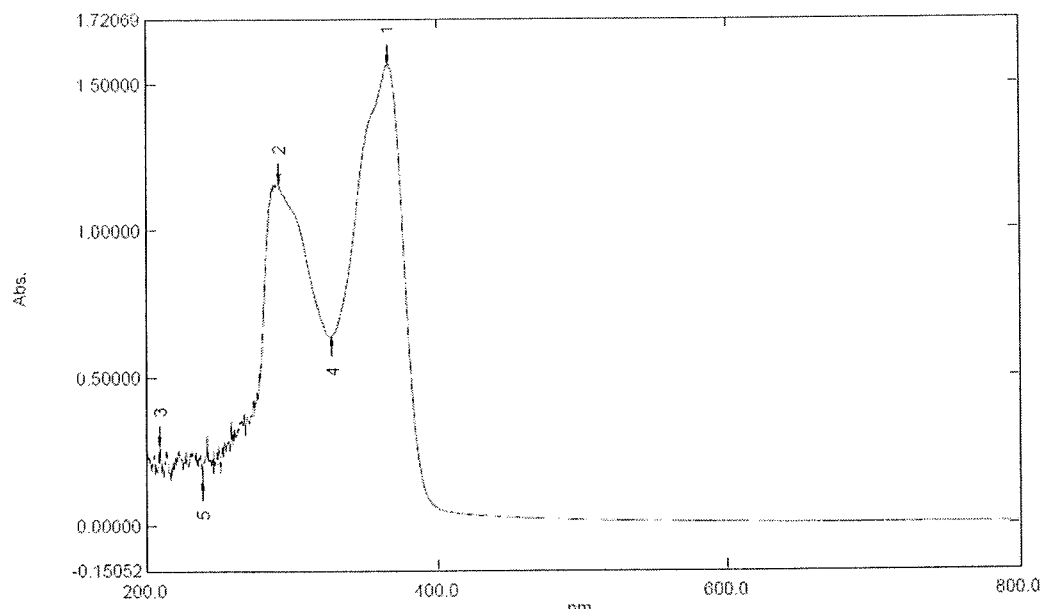


รูป 14 แสดงการเปรียบเทียบ UV-Spectrum ของ Standard กับผลึกจากเปลือกทับทิมทั้ง 3 ช่วงอายุ

ส่วนตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วย methanol และน้ำ ให้รูปแบบ UV spectrum เหมือนที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีกรดอะซิติกเป็นองค์ประกอบด้วย เช่น ตัวอย่าง spectrum ของ ตะกอนที่ได้จากตัวทำละลาย 60% เอทานอล ดังรูป 15-16

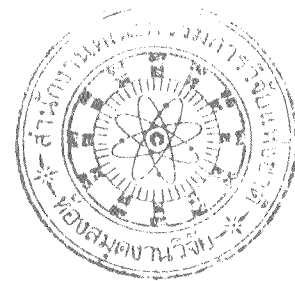


รูป 15 UV-Spectrum ของผลึกจากเปลือกหับหิมไทยที่สกัดโดย 60% เอทานอล โดยมี $\lambda_{\text{max 1}}$ เท่ากับ 366.0 nm และ $\lambda_{\text{max 2}}$ เท่ากับ 288.5 nm.



รูป 16 UV-Spectrum ของผลึกจากเปลือกหับหิมจีนที่สกัดโดย 60% เอทานอล โดยมี $\lambda_{\text{max 1}}$ เท่ากับ 366.0 nm และ $\lambda_{\text{max 2}}$ เท่ากับ 291.55 nm.

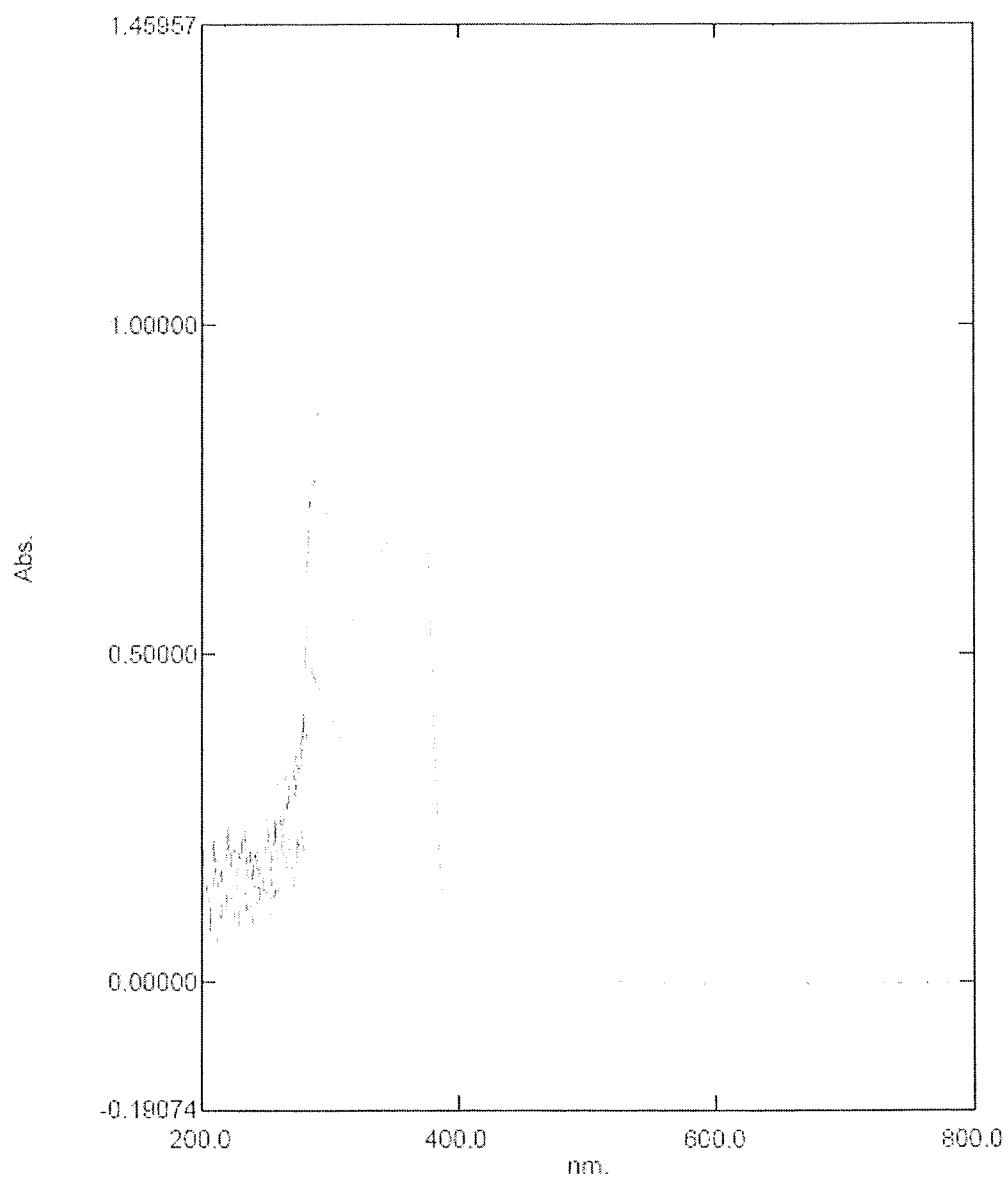
ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปได้เป็นตารางเพื่อเปรียบเทียบตารางที่ 7



ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์หา $\lambda_{\max}$ จาก UV spectrum โดย UV-Visible spectrophotometer

ตัวอย่างที่วิเคราะห์	ความเข้มข้นที่ใช้ (μM)	$\lambda_{\max}$ 1 (nm)	$\lambda_{\max}$ 2 (nm)
สารมาตรฐานกรดเอลลาจิก	72	366.0	286.0
ผลึกจากเปลือกทับทิมช่วง อายุ 1-25 วัน	72	366.5	287.0
ผลึกจากเปลือกทับทิมช่วง อายุ 26-50 วัน	99	366.0	288.0
ผลึกจากเปลือกทับทิมช่วง อายุ 51-75 วัน	112.2	366.0	286.0
ผลึกจากเปลือกทับทิมที่ได้ จากการสกัดโดย 60% เอธานอล	188.8	366.0	288.5
ผลึกจากเปลือกทับทิมจีนที่ ได้จากการสกัดโดย 60% เอธานอล	72	366.0	291.5

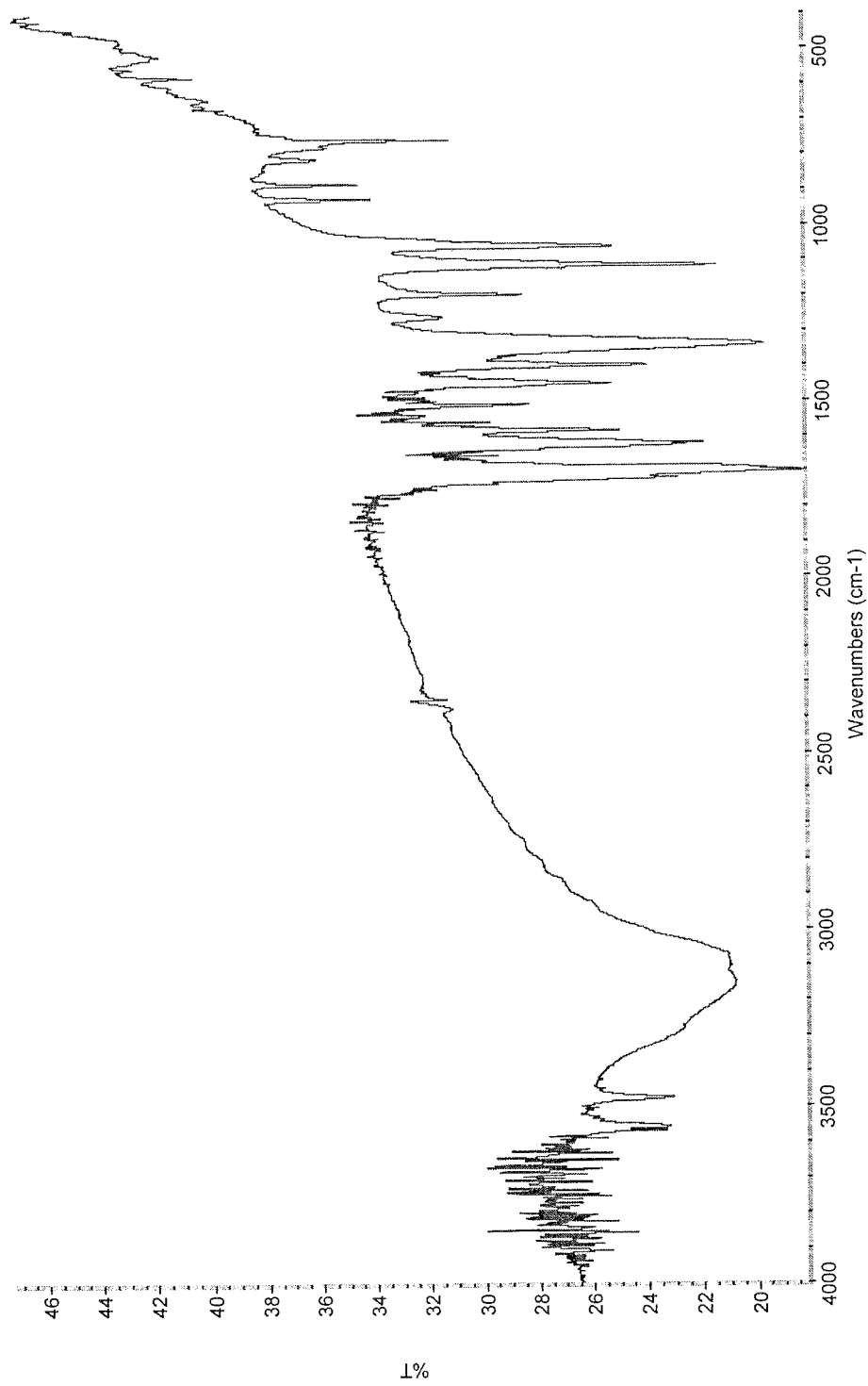
เมื่อนำผลึกที่ได้ไปทดลองตกผลึกซ้ำด้วย methanol 3 ครั้ง ลักษณะ UV spectrum ยังคงมีลักษณะ
เช่นเดิม ดังรูป 17



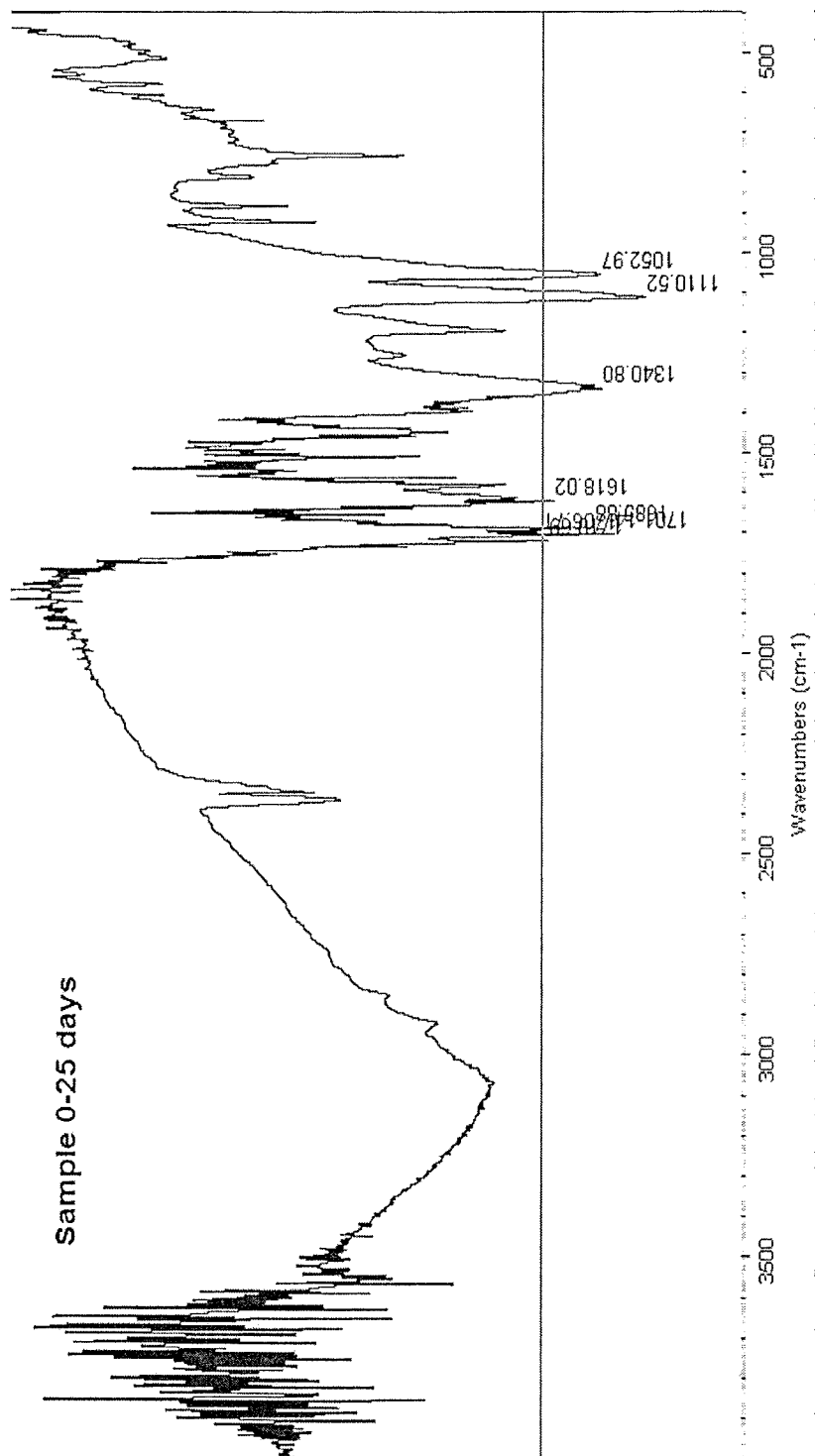
รูป 17 UV-Spectrum ของผลึกจากเปลือกหับทิมที่ทำการ purification ด้วย methanol จำนวน 3 ครั้ง แสดงลักษณะเดียวกันทั้ง 3 ครั้ง

3.4 การหา Finger print จาก IR-Spectrum โดย FT-IR Spectrometer

เมื่อนำผงผลึกกรดเอลลาจิกที่ได้จากการตกผลึกมาตรวจสอบโดยวิธี IR spectrophotometry โดยวิธี KBr disk ได้ผลดังรูป

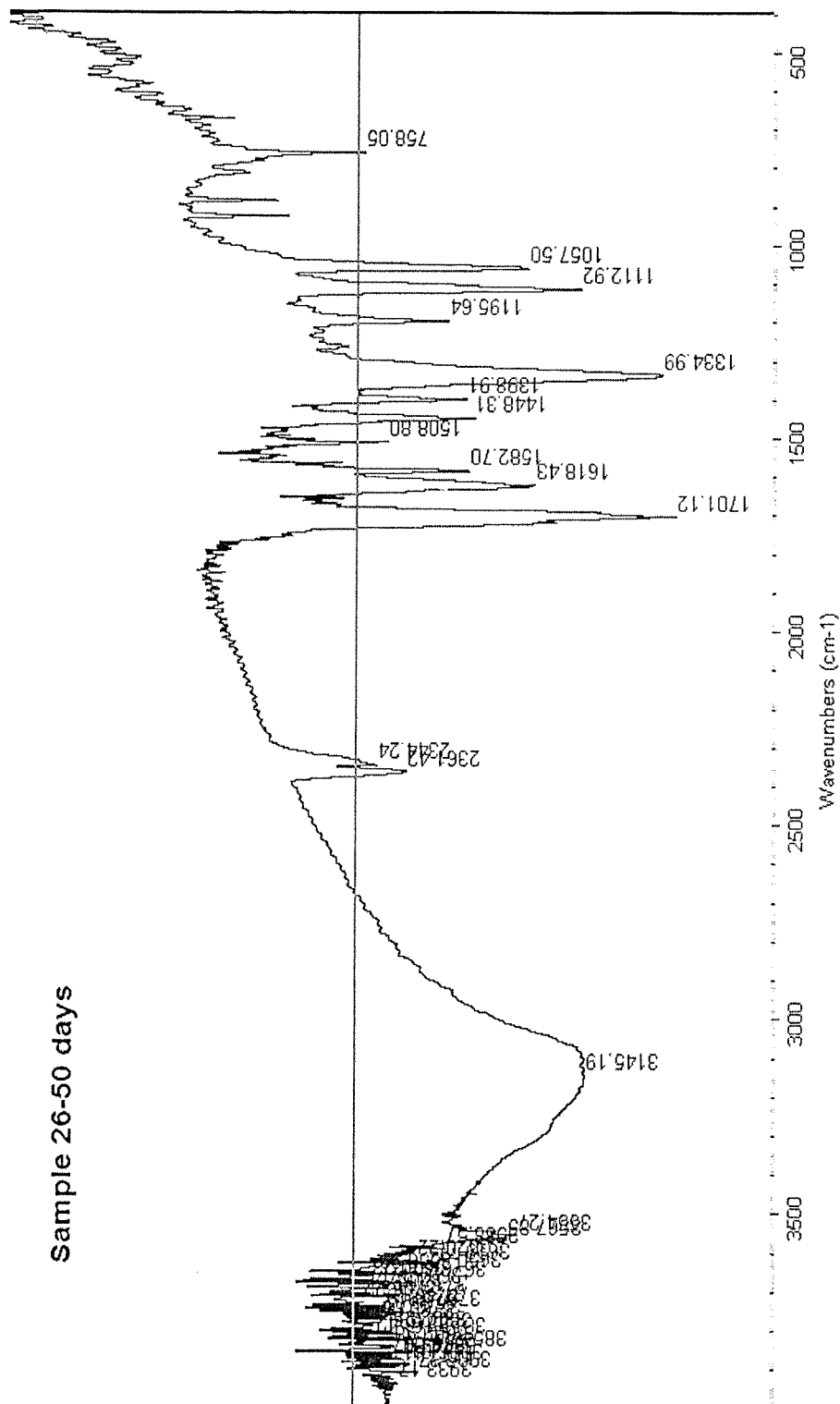


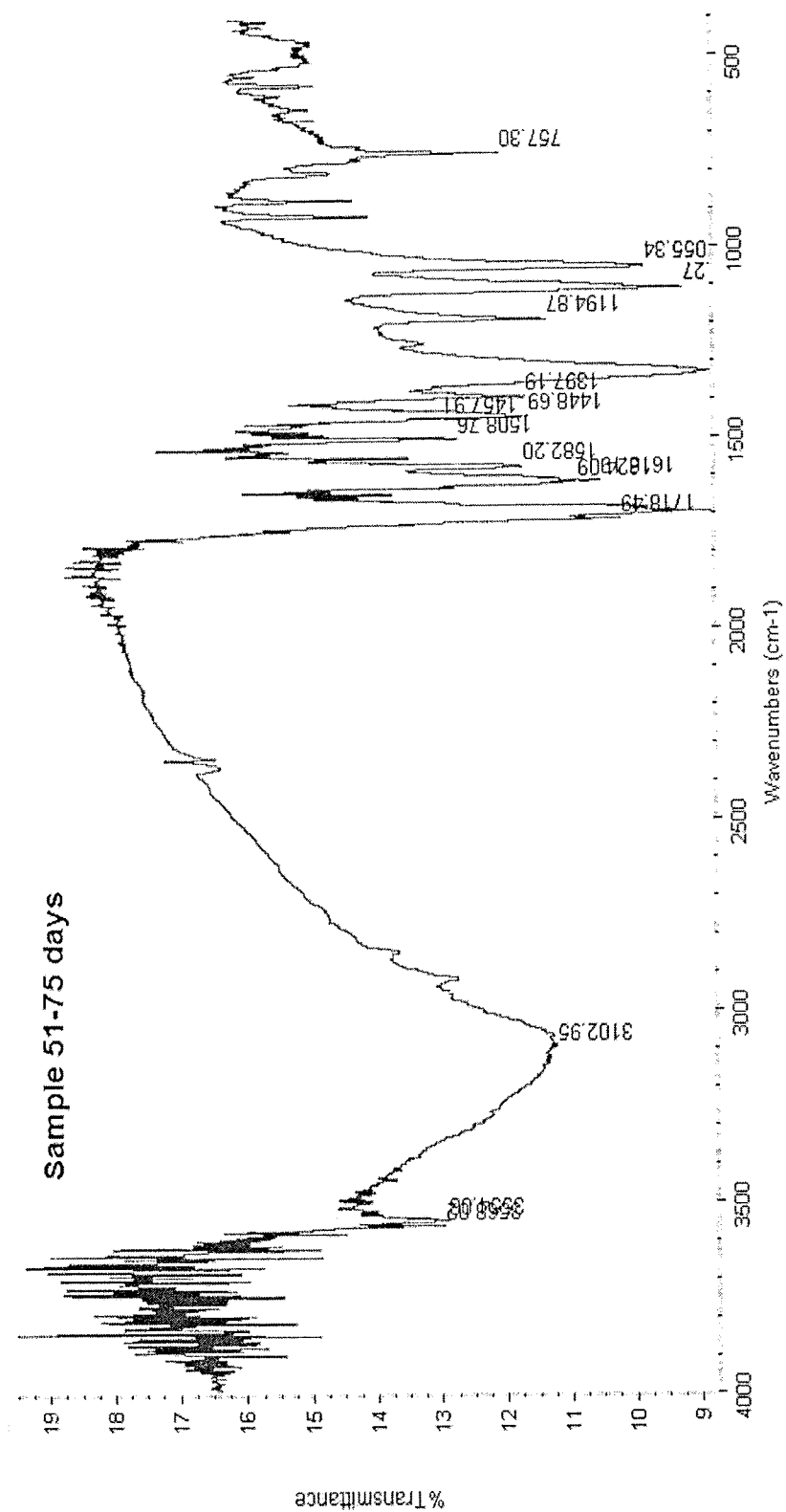
รูป 18 IR-Spectrum ของกรดเอลลาจิกมาตรฐาน



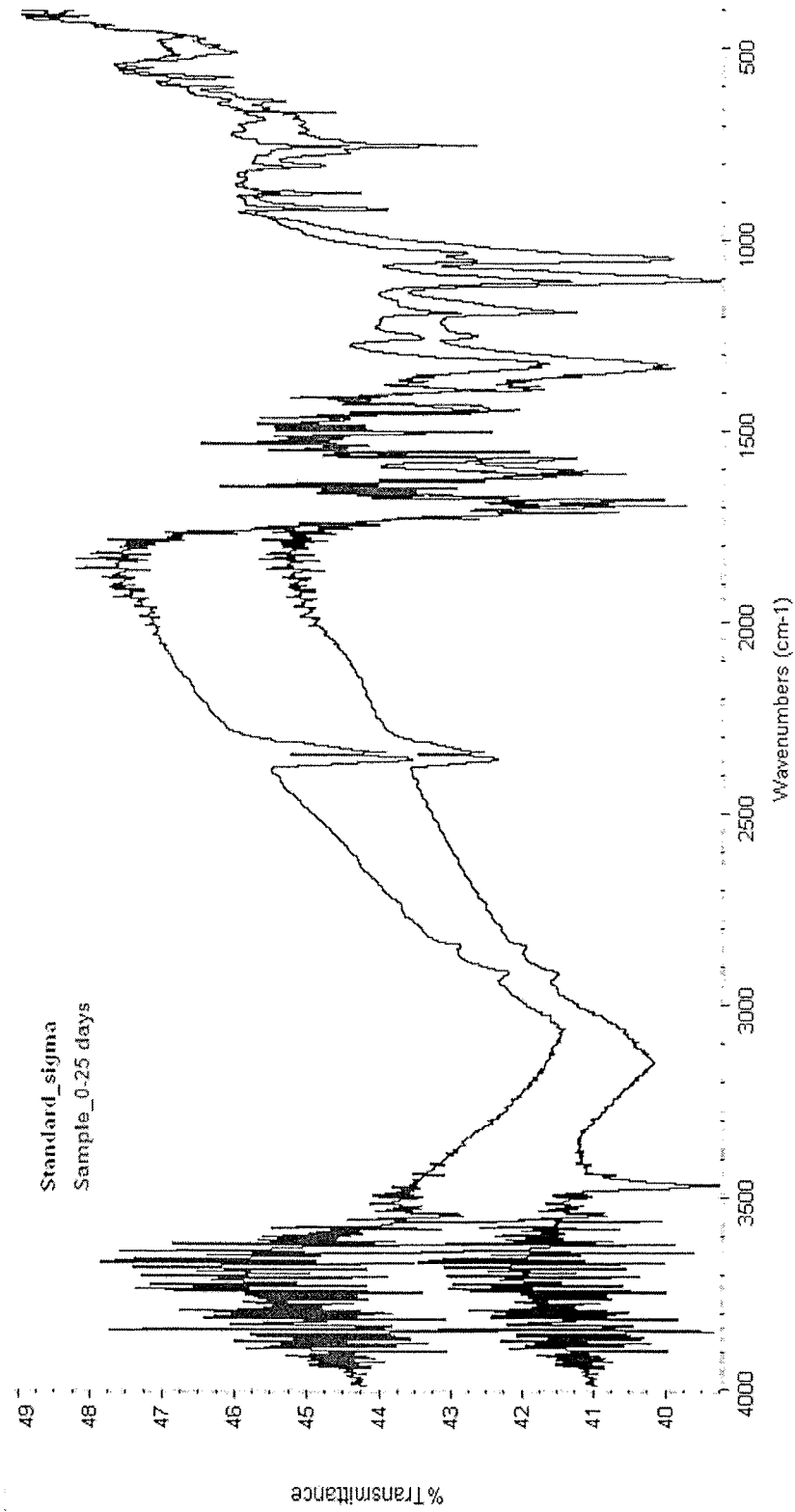
รูป 19 IR-Spectrum ของผลึกจากเปลือกหุ้มที่มีอายุ 0-25 วัน

Sample 26-50 days

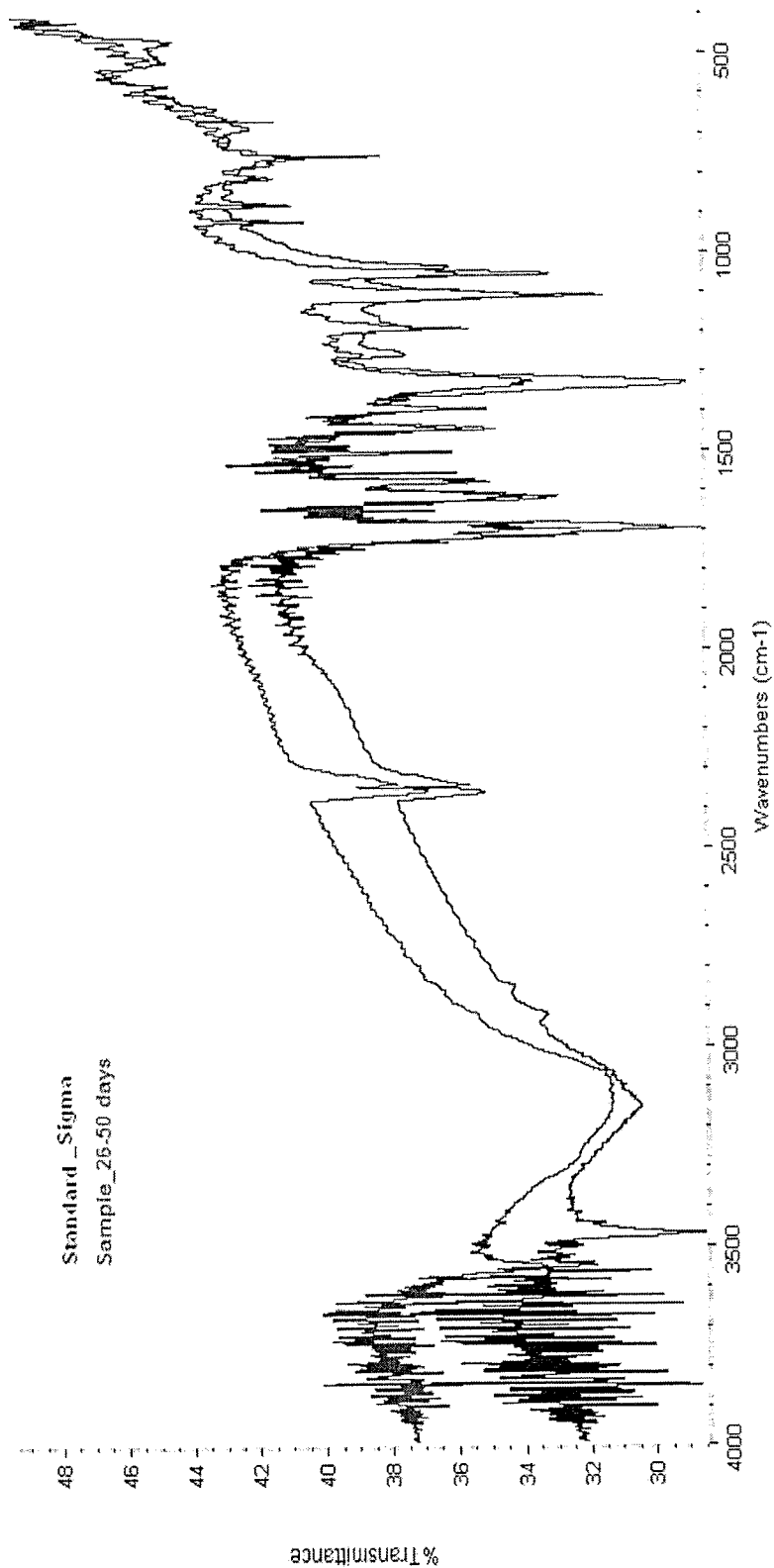




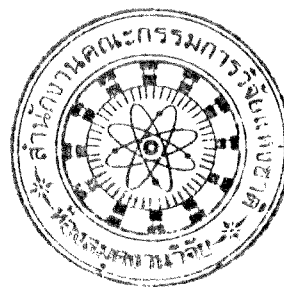
รูป 21 IR-Spectrum ของผลึกจากเปลือกหอยที่หมักอายุ 51-75 วัน

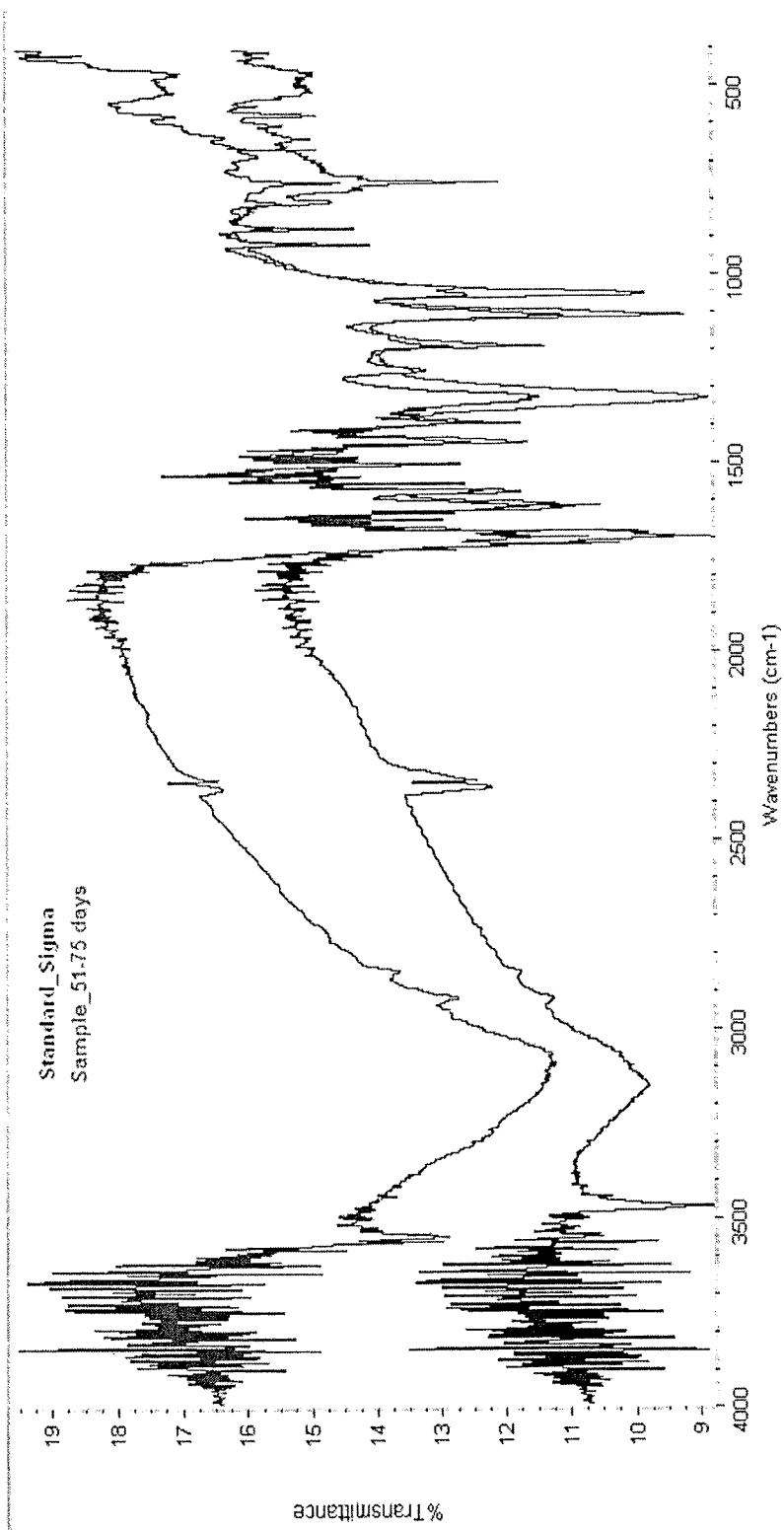


รูป 22 เปรียบเทียบ Finger print ระหว่าง สารมาตรฐานกรดเอลลาจิก และตะกอนจากเปลือกทับทิมที่มีอายุ 0-25 วัน



รูป 23 เปรียบเทียบ Finger print ระหว่าง สารมาตรฐานกรดเอลลาจิก และตะกอนจากเปลือกทับทิมที่มีอายุ 26-50 วัน





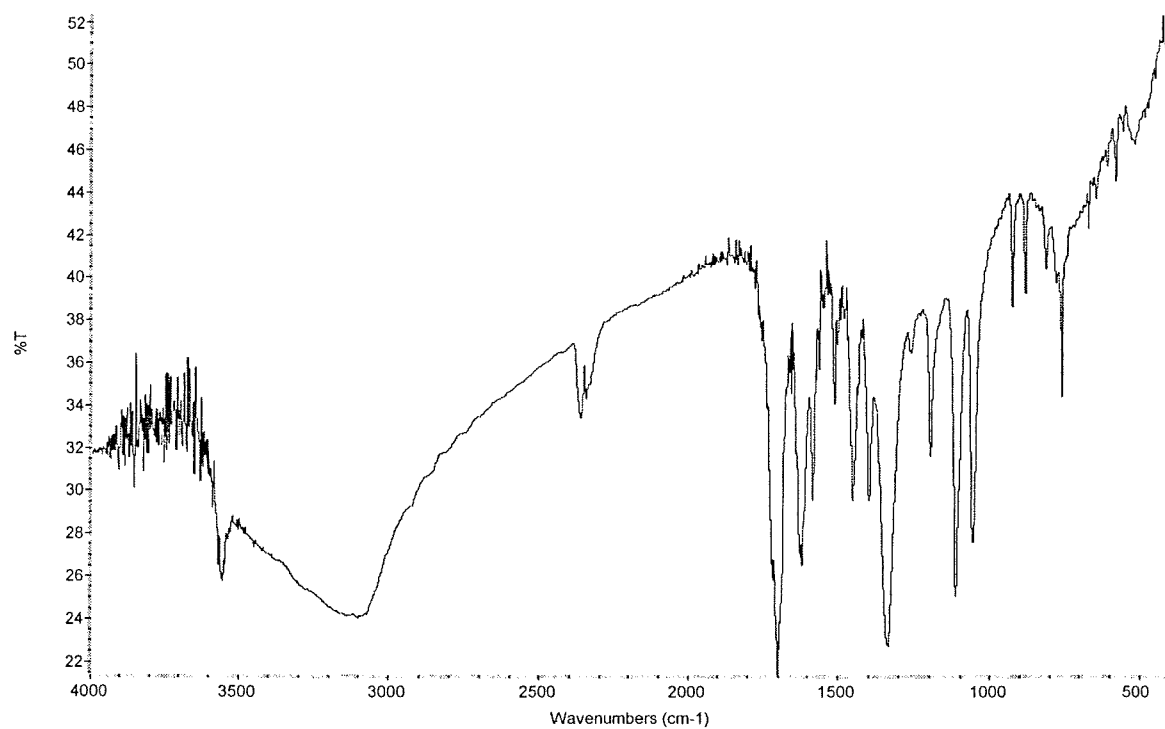
รูป 24 เปรียบเทียบ Finger print ระหว่าง สารมาตรฐานกรดเดอลาลิก และตะกอนจากเปลือกหอยที่มีอายุ 51-75 วัน

จาก Spectrum ที่ได้ เปรียบเทียบลักษณะ peak ที่ได้ระหว่างผลึกที่ได้และสารมาตรฐาน แสดงได้ดังตารางที่ 8

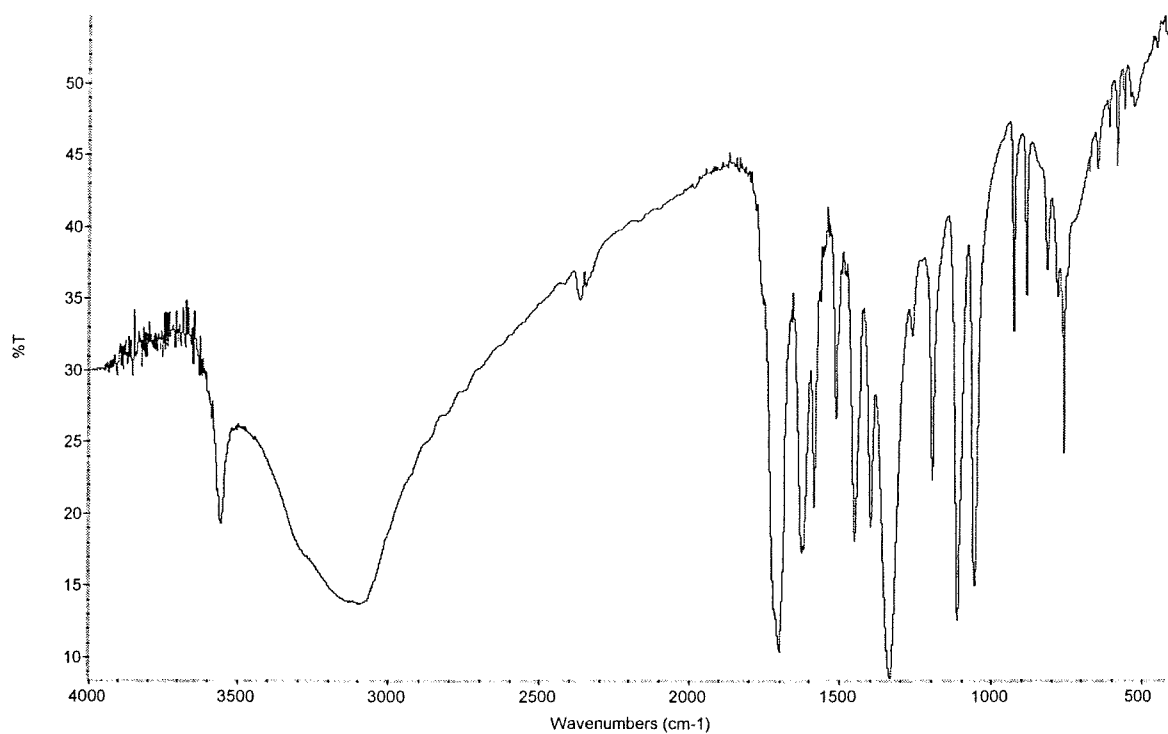
ตารางที่ 8 แสดงความยาวคลื่นที่พบในช่วง Finger print (500 cm^{-1} - 1500 cm^{-1}) ของสารสกัดที่ได้เทียบกับสารมาตรฐาน กรดเอลลาจิก

ตำแหน่ง peak ที่พบใน สารมาตรฐานกรดเอลลา จิก (cm^{-1})	ตำแหน่ง peak ที่พบใน สารสกัดเปลือกอายุ 0- 25 วัน (cm^{-1})	ตำแหน่ง peak ที่พบใน สารสกัดเปลือกอายุ 26-50 วัน (cm^{-1})	ตำแหน่ง peak ที่พบใน สารสกัดเปลือกอายุ 51- 75 วัน (cm^{-1})
1508.64	1509.00	1508.80	1508.76
1448.51	1448.72	1448.31	1448.69
1397.86	1398.75	1398.91	1397.19
1339.40	1335.50	1337.19	1342.64
1331.15	1340.80	1195.64	1194.87
1113.08	1110.52	1112.27	1113.36
1059.51	1052.97	1057.50	1058.45
924.26	923.61	924.26	925.34
758.33	757.28	758.05	757.30

เมื่อเปรียบเทียบ IR ของตะกอนที่สกัดจากเปลือกทับทิมไทยและทับทิมจีน ที่สกัดด้วย 60% methanol ก็ให้
ลักษณะของ spectrum เหมือนกันดังรูป 25-26



รูป 25 IR spectrum ที่ได้จากตะกอนทับทิมไทยที่สกัดด้วย 60% เอทานอล



รูป 26 IR spectrum ที่ได้จากทับทิมจีนที่สกัดด้วย 60% เอทานอล