

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 เครื่องมือและสารเคมี

ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน (n-hexane), เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate), เมทานอล (methanol), อะซิโตน (acetone), เมทิลีนคลอไรด์ (methylene chloride), คลอโรฟอร์ม (chloroform) ฯลฯ ถ้าเป็นชนิด commercial grade ต้องกลั่นก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง สำหรับตัวทำละลายชนิด AR grade ใช้ในการตกผลึก สำหรับสารเคมีอื่น ได้แก่ Silica gel 60 for Column Chromatography, silica gel 60 PF₂₅₄ for Preparative Layer Chromatography, Silica gel 60 GF₂₅₄ for Thin Layer Chromatography.

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ได้แก่ electrothermal melting point apparatus, rotary evaporator, UV-Vis-Near-IR Spectrophotometer Hitachi model 330, Mass Spectrometer (70 ev) : JEOL JMS-DX 300, Nuclear Magnetic Resonance : Bruker AMX 600, 600 MHz, JEOL JMS-EX 90A, 90MHz FT-NMR Spectrometer, and Fourier Transform Infrared : Bio-Rad model FTS-7 Spectrophotometer.

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 Thin Layer Chromatography (TLC)

TLC เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารโดยวิธีโครมาโทกราฟี ใช้ตรวจสอบสารในแต่ละส่วน (fraction) ที่ได้จากการแยกโดยวิธีทางโครมาโทกราฟีต่าง ๆ ว่า fraction ใดที่มีลักษณะส่วนประกอบที่คล้ายกันเพื่อจะนำไปรวมกัน และใช้เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่แยกได้ ในการทดลองนี้ใช้แผ่น TLC สำเร็จรูปที่เป็นแผ่นอะลูมิเนียมเคลือบด้วย silica gel ซึ่งสามารถตัดได้ตามขนาดที่ต้องการใช้งาน การจุดสารทำโดยใช้ capillary จุดสารละลาย จุดลงบนแผ่น TLC ห่างจากขอบล่างประมาณ 0.5 ซม. ปล่อยให้แห้งแล้วจุ่มลงในภาชนะที่มีฝาปิด ซึ่งภายในมี

กระดาษกรองซึ่งอ้อมตัวไปห้วยโอของตัวทำละลาย ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนถึงระดับที่ห่างจากขอบบนประมาณ 0.5 ซม. จึงเอาออกปล่อยให้แห้งนำไปดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm เมื่อใช้ chromatogram จะเรืองแสงมีสีเขียวอ่อนบริเวณที่มีสารจะเห็น ในกรณีที่ไม่เห็นไม่ชัด ต้องนำไปใส่ภาชนะที่บรรจุไอโอไดน จะปรากฏเห็นเป็นจุดสีน้ำตาล หรืออาจหั่นด้วยสารละลาย 25% H_2SO_4 แล้วอบที่อุณหภูมิ $110^{\circ}C$

3.2.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography, CC)

เป็นเทคนิคที่นำมาใช้มากในการแยกสารอินทรีย์ คอลัมน์ที่ใช้เป็นหลอดแก้วที่สวมใส่แมง ปีนหลายขนาด ที่ใช้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 1.5 - 10 ซม. เลือกใช้ตามความเหมาะสมกับปริมาณสารที่จะแยก การเตรียมคอลัมน์เริ่มโดยเติมตัวทำละลายที่เตรียมไว้สำหรับชะลงในคอลัมน์และ ใช้สำลีรอง เพื่อไม่ให้ silica gel ไหลออก ใส่ทรายลงไปเล็กน้อยเพื่อปรับผิวหน้าให้เรียบ ผสม silica gel (ปริมาณ adsorbent ต่อสารที่จะแยกประมาณ เป็น 30:1 โดยน้ำหนัก) กับ ตัวทำละลาย คนเพื่อไล่ฟองอากาศออกค่อย ๆ เทใส่คอลัมน์ พร้อมกับปล่อยให้ตัวทำละลายไหลออก ขณะเดียวกันก็ใช้สายยางเจาะรอบ ๆ คอลัมน์ เพื่อให้การจัดเรียงตัวของ silica gel สม่ำเสมอทุกส่วนจน silica gel อยู่ตัวไม่ตกลงอีก เติมตัวทำละลายให้เต็มปล่อยให้ไหลออกจนเหลือตัวทำละลายอยู่เหนือ silica gel ประมาณ 1 ซม. จากนั้นจึงใส่สารที่ต้องการแยกลงไป ถ้าสารเป็นของเหลว ใช้หลอดหยด (dropper) หยดสารแล้วค่อย ๆ หยดลงไป ถ้าสารเป็นของแข็งมีลักษณะหนืด เติมตัวทำละลายเล็กน้อยพอให้สารละลายแล้วเติม silica gel ที่ใช้เตรียมคอลัมน์จนให้เข้ากับสาร ระเหยตัวทำละลายออกเพื่อให้สารเคลือบบน silica gel มีลักษณะเป็นผงแห้ง จากนั้นค่อย ๆ เทลงคอลัมน์ โดยผ่านกรวยกรอง โรยไปตามผิวหน้าให้สม่ำเสมอปรับผิวหน้าให้เรียบและปิดทับด้วยทรายจำนวนเล็กน้อย เพื่อป้องกันไม่ให้ สารกระเด็นขึ้นขณะที่เติมตัวทำละลาย ในการทดลองนี้จะเริ่มชะด้วยตัวทำละลายชนิดไม่มีขั้วแล้วค่อย ๆ เพิ่มความมีขั้วขึ้นโดยผสมกับตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้น ดังนั้น สารที่ถูกชะออกมานี้จะเรียงตามความมีขั้วน้อยไปมาก

3.2.3 Preparative Layer Chromatography

ใช้ในการแยกสารที่มีปริมาณน้อยให้บริสุทธิ์ ส่วนมากจะทำหลังจากการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีก่อนจะนำเอาสารที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ต่อไป เตรียมโดยใช้ silica gel 60 Art for Preparative Layer Chromatography 200 กรัม : น้ำ 500 มิลลิลิตร ผสมกันในขวดปชมพู่ ขนาด 1 ลิตร ปิดปากขวด เขย่าแรง ๆ จนไม่มีฟองอากาศ เตรียมแผ่นกระจกขนาด 50x20 ซม. 5 แผ่น ซึ่งล้างให้สะอาดและเช็ดด้วยอะซิโตน (acetone) เทสารละลาย silica gel ขึ้น (slurry) ใส่ Desaga spreader ที่ปรับให้มีความหนา 0.75 มม. แล้วตากให้ silica gel เคลือบบนแผ่นกระจกปรับผิวหน้าให้เรียบโดยการกระชกแผ่น เพื่อทำให้ silica gel จัดตัวสม่ำเสมอ ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 110°C 3-4 ชั่วโมง นำสารที่ต้องการแยกละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมในปริมาณไม่มาก ใช้หลอดหยดดูดสารละลายหยดลงบนแผ่น ให้เป็นเส้นตรงต่อเนื่องกัน พยายามทำให้เป็นแถบ (band) เล็กที่สุด ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายระเหยออกหมด นำไปแช่ในแทงก์ (tank) ที่บรรจุตัวทำละลายที่เหมาะสม (developing solvent) จะสามารถแยกสารออกเป็นแถบ ต่าง ๆ นำไปดูได้แสง UV ชัดเส้นกำหนดตำแหน่งของสารที่เราต้องการ แล้วขูดใส่ขวดปชมพู่ สกัดเอาสารออกด้วยตัวทำละลายที่ละลายสารนั้นได้ดีที่สุด นำไปลบด้วยแท่งคน (stirrer) บน Magnetic stirrer plate กรองเอา silica gel ออก นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออก จะได้สารที่ต้องการ

3.2.4 Flash Column Chromatography (FCC)

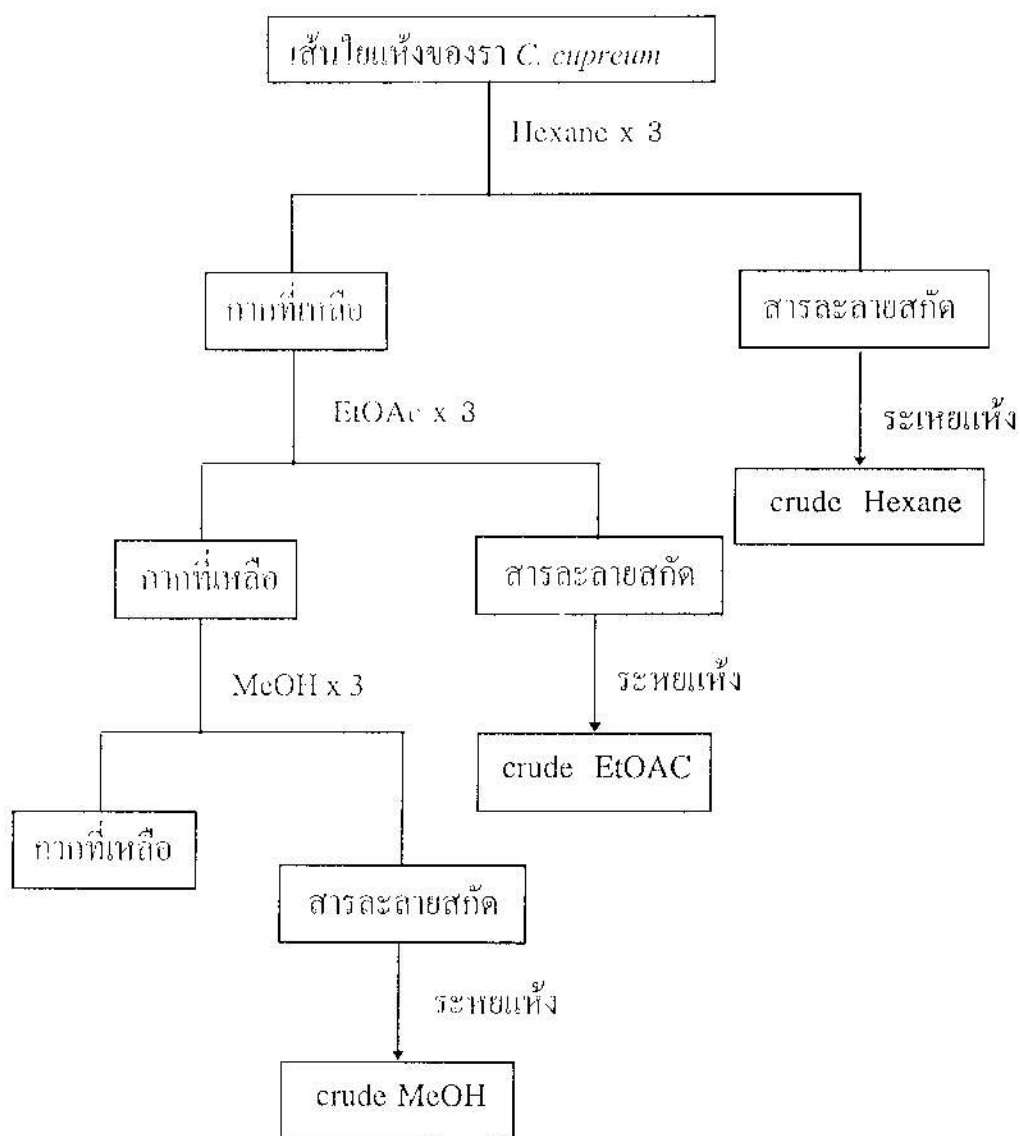
เป็นเทคนิคที่คล้ายกับคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา แต่เทคนิคนี้ใช้ความดันช่วยโดยมีปั๊ม เพิ่มเข้ามาในระบบ สำหรับตัวดูดซับ (adsorbent) ที่ใช้จะมีขนาดเล็กกว่าที่ใช้กับคอลัมน์ธรรมดา ส่วนใหญ่จะใช้กับสารที่มีปริมาณมาก ซึ่งจะทำให้ใช้เวลาในการแยกน้อยลง เหมาะสำหรับการแยกสารแบบคร่าว ๆ ประสิทธิภาพในการแยกสารจะไม่ดีเท่ากับคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา สำหรับการเตรียม คอลัมน์ทำเหมือนกัน แต่ใช้ปั๊มเป็นตัวช่วยดัน silica gel ให้จัดตัวแน่นกว่าในคอลัมน์แบบธรรมดา ในการชะสารก็ต้องใช้โมโนเป็นตัวช่วยดันให้ตัวระเหยไหลผ่านคอลัมน์

3.2.5 Chromatotron

เป็นเทคนิคในการแยกสาร โดยมีหลักการคล้าย Preparative Layer Chromatography แต่อาศัยแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลางช่วยในการแยก เหมาะในการแยกสารที่มีปริมาณน้อย มีความรวดเร็วและสะดวกในการใช้งาน ใช้ตัวชะในปริมาณน้อย ตัวแผ่นทำด้วยกระจกเป็นรูปวงกลม เตรียมแผ่นโดยนำแผ่นกระจกใส่กับตัว handle ให้ด้านผิวหยาบเป็นด้านบนใช้เทปติดขอบกระจกทำเป็นกรอบเอาไว้เพื่อไม่ให้ silica gel ไหลออก ผสม silica gel 60 PF₂₅₄ กับน้ำเย็น 0-5°C (65 กรัม : น้ำกลั่น 130 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากันประมาณ 2 นาที เทใส่แผ่นพร้อมทั้งหมุนแผ่นด้วย handle จนผิวสม่ำเสมอทั้งไว้ให้แห้ง เอา handle ออก นำไปอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำไปแต่งผิวหน้า ขอบและระดับความหนาตามต้องการ ก่อนจะให้ไม้ดูดสารละลายที่จะแยก ลงบนแผ่น ต้องชะแผ่นด้วยตัวทำละลายก่อน การใส่สารละลายที่จะแยกอาจทำได้อีกวิธีคือใช้หลอดหยดดูดสารแล้วหยดรอบผิวที่จุดกลางแผ่น สารจะถูกดูดซับไว้ ซึ่งจะเห็นเป็นแถบรูปวงกลมนำไปติดตั้งกับตัวเครื่องซึ่งมี motor ที่ทำให้แผ่นหมุนในแนวเอียง ประมาณ 45° ขณะที่หมุนสารจะถูกชะโดยตัวทำละลายผ่านเครื่องปั๊ม และเข้าสู่ระบบการแยก โดยสารจะเริ่มแยกและเคลื่อนที่ออกมาพร้อมกับตัวชะ

3.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

นำเส้นใยแห้ง (Mycelial mat) ของรา *C. cupreum*หนัก 372 กรัม. ไปบดด้วยเครื่องปั่นและสกัดด้วยตัวทำละลายโดยการแช่ด้วย เอ็น-เฮกเซน 3 ครั้ง ๆ ละ 1,200 มิลลิลิตร ใช้เวลาแช่นานครั้งละ 3 วัน ระเหยเอา เอ็น-เฮกเซน ออกโดยวิธีกลั่นแบบลดความดัน ได้สารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซน (crude Hexane) มีลักษณะเป็นตะกอนสีน้ำตาลแดงหนัก 38 กรัม (10.21%) นำกากที่กรองได้ไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต 3 ครั้ง ๆ ละ 1,000 มิลลิลิตร ตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว ได้สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (crude EtOAc)หนัก 30 กรัม (8.06%) นำกากที่กรองได้ไปสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเมทานอล 3 ครั้ง ๆ ละ 900 มิลลิลิตร ได้สารสกัดหยาบเมทานอล (crude MeOH)หนัก 56 กรัม (15.05%) (รูปที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 แผนภาพแสดงการสกัดสารจากเส้นใยแห้งของรา *Chaetomium cupreum*

3.4 การแยกและทำให้สารบริสุทธิ์

3.4.1 สารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซน (Crude Hexane)

นำสารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซน 38 กรัม มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้ความดัน โดยมี Silica gel 60 for column Chromatography เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) แล้วชะด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วจากต่ำไปสูง เริ่มจาก Hexane, EtOAc:Hexane, EtOAc:MeOH และ MeOH รวมแยกได้ 61 Fractions เมื่อตรวจสอบด้วย TLC แล้วรวมส่วนที่มีลักษณะคล้ายกันได้เข้าด้วยกันจะได้ 10 Fractions (F_{III} - F_{III0}) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

F_{III} และ F_{III2} เมื่อนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ระบบตัวทำละลาย Hexane : EtOAc เป็นตัวชะ ได้สาร 1 ซึ่งเป็นสารหลักถูกชะออกมาด้วยตัวทำละลาย 5-20% EtOAc :Hexane เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อนหนัก 14.06 กรัม $R_f = 0.62$ (10 % EtOAc : Hexane)

จากการตกผลึก F_{III3} ด้วย Hexane สามารถแยก สาร 2 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 0.214 กรัม (0.06 %) mp = 157-159 °C $R_f = 0.52$ (40 % EtOAc:Hexane) สำหรับส่วนที่เป็น filtrate จาก TLC พบว่ามีสาร 1 ปนอยู่ เมื่อแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ตัวทำละลายระบบเดียวกัน ได้สาร 1 นำไปรวมกับที่แยกไว้แล้วได้น้ำหนักรวม 14.98 กรัม (4.02%)

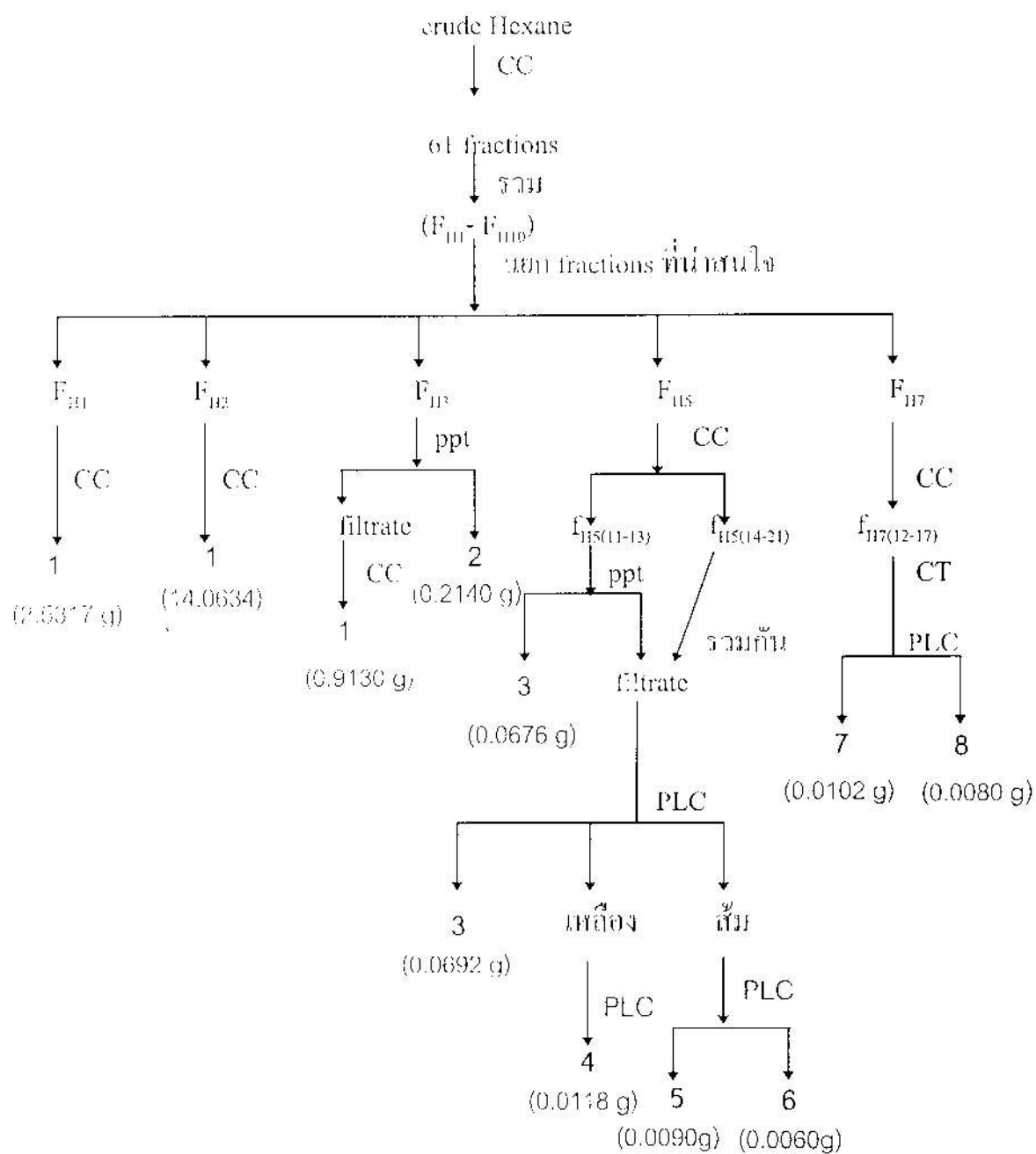
นำ F_{III5} ไปแยกต่อโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีใช้ระบบตัวทำละลาย EtOAc : Hexane เป็นตัวชะ ได้ 60 fractions ดังแสดงในตารางที่ 3.2 ในส่วนแยกย่อย $f_{III5(11-13)}$ มีลักษณะเป็นของแข็งสีแดง นำไปตกผลึกใน CH_2Cl_2 :Hexane ได้สาร 3 เป็นผลึกรูปเข็มละเอียดสีแดงเข็มหนัก 0.0676 กรัม นำส่วน filtrate และ $f_{III5(14-21)}$ ซึ่งมี TLC คล้ายกันรวมกัน แล้วแยกโดยวิธี Preparative Layer Chromatography ใช้ 30% EtOAc:Hexane เป็นตัวชะ ได้สารหลักปรากฏเป็น 3 แถบ คือแถบบน $R_f = 0.40$ เป็น สาร 3 แยกได้ 0.0692 กรัม น้ำหนักรวมของสาร 3 ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซนหนัก 0.1368 กรัม (0.04%) mp = 134-137 °C $R_f = 0.40$ (50% EtOAc:Hexane) แถบที่สอง $R_f = 0.33$ มีสีเหลือง เมื่อนำมาแยกด้วย Preparative Layer Chromatography อีกโดยใช้

45% EtOAc:Hexane เป็นตัวชะ ที่ $R_f = 0.58$ แยกได้ สาร 4 เป็นของแข็งสีเหลือง หนัก 0.0118 กรัม (0.003%) mp = 98-102°C สำหรับแถบล่าง $R_f = 0.58$ มีสีส้ม เมื่อนำมาแยกต่อด้วย Preparative Layer Chromatography ใช้ 50% EtOAc:Hexane เป็นตัวชะ ที่ $R_f = 0.25$ แยกได้สาร 5 เป็นของแข็งสีส้ม หนัก 0.0090 กรัม (0.002%) และที่ $R_f = 0.19$ แยกได้ สาร 6 เป็นของแข็งสีส้มหนัก 0.0060 กรัม

นำ F_{117} ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ 26 fractions เมื่อนำส่วนแยกย่อย $f_{117(12-17)}$ ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย Chromatotron และตามด้วย Preparative Layer Chromatography ใช้ 50% EtOAc : Hexane เป็นตัวชะ จะได้แถบสีม่วง 2 แถบติดกัน เมื่อแยกออกจากกันแถบบน $R_f = 0.53$ ได้สาร 7 เป็นของแข็งสีม่วง หนัก 0.0102 กรัม ส่วนแถบล่าง $R_f = 0.47$ ได้สาร 8 เป็นของแข็งสีม่วง หนัก 0.0080 กรัม

ตาราง 3.1 แสดงการแยกสารจากสารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซน (crude Hexane) 38 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้ความดัน ใช้ silica gel หนัก 420 กรัม ขนาดคอลัมน์ 7x54 ซม

ตัวชะ	Fraction	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะของสาร
5-20% EtOAc : Hexane	$F_{111(1-3)}$	6.72	ของเหลวสีเหลืองอ่อน (1)
20% EtOAc : Hexane	$F_{112(3-8)}$	13.41	ของเหลวสีส้ม (1)
20-30% EtOAc : Hexane	$F_{113(9-16)}$	5.53	ของแข็งผสมของเหลวสีส้ม (1, 2)
20-30% EtOAc : Hexane	$F_{114(17-21)}$	0.3100	ของแข็งสีเหลืองแกมเขียว
50-60% EtOAc : Hexane	$F_{115(22-25)}$	0.9500	ของแข็งสีแดงเข้ม (3, 4, 5, 6)
60-70% EtOAc : Hexane	$F_{116(26-29)}$	0.3800	ของแข็งสีน้ำตาลแดงเข้ม
70-80% EtOAc : Hexane	$F_{117(30-35)}$	0.2400	ของแข็งสีม่วงเข้ม (7, 8)
80-90% EtOAc : Hexane	$F_{118(36-41)}$	0.0600	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
100% EtOAc	$F_{119(42-44)}$	0.1100	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
100% MeOH	$F_{120(45-53)}$	1.06	ของแข็งสีน้ำตาลแดง



รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงการแยกสารจากสารสกัดหยาดเอ็น-เฮกเซน

ตารางที่ 3.2 แสดงผลการแยกสารจาก F_{HS} 0.9500 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ silica gel 40 กรัม ขนาดคอลัมน์ 2.5 x 42 ซม

ตัวชะ	ส่วนแยกย่อย	น้ำหนัก (กรัม)	ลักษณะของสาร
20% EtOAc : Hexane	$F_{HS(1-5)}$	0.3016	ของเหลวชั้นหนืดสีเหลืองอมแดง
20% EtOAc : Hexane	$F_{HS(6)}$	0.0075	ของเหลวชั้นสีน้ำตาลแดง
20% EtOAc : Hexane	$F_{HS(7-8)}$	0.0377	ของเหลวชั้นสีเหลืองอมเขียว
20% EtOAc : Hexane	$F_{HS(9-10)}$	0.0302	ของเหลวชั้นสีแดงเข้ม
20% EtOAc : Hexane	$F_{HS(11-13)}$	0.1206	ของเหลวผสมตะกอนสีแดง (3, 4, 5, 6)
20% EtOAc : Hexane	$F_{HS(14-16)}$	0.1357	ของเหลวชั้นสีแดง (3, 4, 5, 6)
20-40% EtOAc : Hexane	$F_{HS(17-30)}$	0.0452	ของเหลวชั้นสีน้ำตาลแดง
40-60% EtOAc : Hexane	$F_{HS(31-43)}$	0.0302	ของเหลวชั้นสีน้ำตาลแดง
80% EtOAc : Hexane - 100% MeOH	$F_{HS(44-60)}$	0.1960	ของเหลวสีน้ำตาลแดงเข้ม

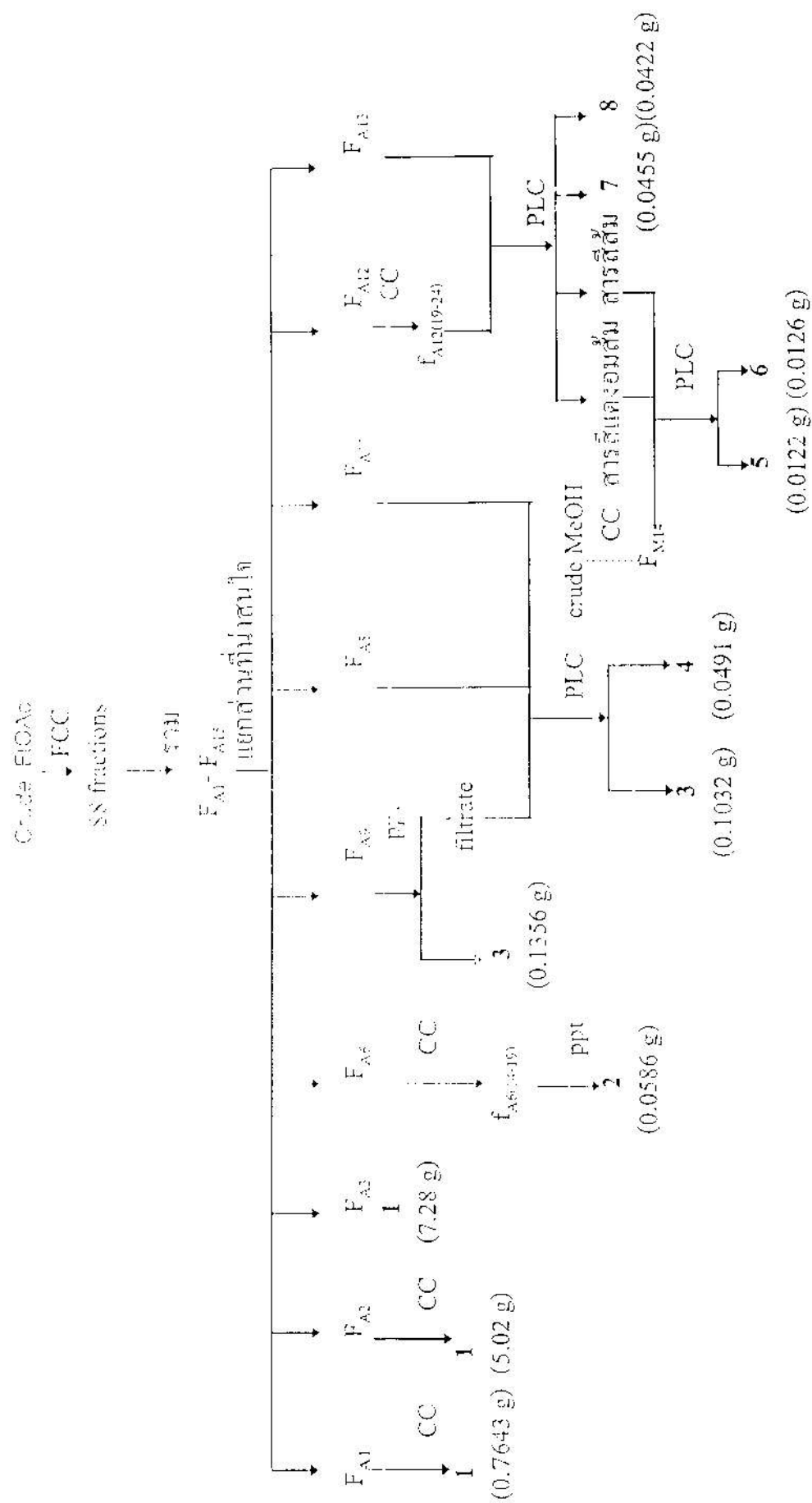
3.4.2 สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (Crude EtOAc)

แยกสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต 30 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้ความดัน ขับด้วย EtOAc : Hexane โดยเพิ่มความเข้มข้นไปสูงตามลำดับ ซึ่งให้สารที่แยกได้ทั้งหมด 88 fractions รวมแล้วลักษณะของ TLC ที่คล้ายกันได้ 15 fractions (F_{A1} - F_{A15}) ดังแสดงในตารางที่ 3.3 และภาพที่ 3.3 นำ F_{A1} และ F_{A2} ไปแยกให้บริสุทธิ์ ได้สาร 1 เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อนหนัก 0.7643 และ 5.0200 กรัม ตามลำดับ นอกจากนี้สาร 1 ยังได้จาก F_{A3} อีก 7.28 กรัม น้ำหนักรวมของสาร 1 จากการแยกสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตเป็น 13.06 กรัม (3.50 %)

นำ F_{A6} ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนแยกย่อย $f_{A6(14-19)}$ ซึ่งเมื่อตกผลึกด้วย Hexane: CH_2Cl_2 ให้ สาร 2 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 0.0586 กรัม (0.02 %)

F_{A9} ซึ่งเป็นของแข็งสีแดง เมื่อนำไปตกผลึกด้วย Hexane: CH_2Cl_2 ได้สาร 3 เป็นผลึกรูปเข็มละเอียดสีดำนหนัก 0.1356 กรัม ส่วนที่เป็น filtrate พบว่ามีลักษณะของ TLC คล้ายกับ F_{A8} และ F_{A10} จึงนำไปรวมกัน แล้วแยกด้วยวิธี Preparative Layer Chromatography ใช้ 30% EtOAc:Hexane เป็นตัวชะ แลบบน $R_f=0.52$ ได้สาร 3 หนัก 0.1032 กรัม น้ำหนักรวมของสาร 3 ที่ได้จากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตเป็น 0.2388 กรัม (0.06 %) แลบล่าง $R_f=0.45$ ได้สาร 4 เป็นของแข็งสีเหลืองหนัก 0.0491 กรัม (0.013 %)

นำ F_{A12} ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้ส่วนแยกย่อย $f_{A(19-24)}$ ซึ่งมีลักษณะของ TLC คล้ายกับ F_{A13} จึงนำมารวมกันแล้วแยกด้วยวิธี Preparative Layer Chromatography ใช้ 60 % EtOAc Hexane เป็นตัวชะ ได้สาร 4 สาร คือ $R_f = 0.60$ เป็นสาร 7 มีลักษณะเป็นของแข็งสีม่วงหนัก 0.0455 กรัม และ $R_f=0.52$ เป็น สาร 8 มีลักษณะเป็นของแข็งสีม่วงหนัก 0.0422 กรัม $R_f=0.41$ เป็นสารสีแดงอมส้ม หนัก 0.0112 กรัม $R_f=0.36$ เป็นสารสีส้ม หนัก 0.0126 กรัม จากลักษณะ TLC ของสารสีแดงอมส้มและสารสีส้ม คล้ายกับ F_{A11} (0.0134 กรัม) ของสารสกัดหยาบเมทานอล จึงรวมทั้งสามสารเข้าด้วยกัน แล้วแยกด้วยวิธี Preparative Layer Chromatography อีกครั้ง ใช้ 60 % EtOAc Hexane เป็นตัวชะ ได้สารสีส้ม 2 สาร คือ แลบบน $R_f = 0.39$ เป็นสาร 5 มีลักษณะเป็นของแข็งสีส้มหนัก 0.0122 กรัม (0.003%) และแลบล่าง $R_f=0.30$ เป็นสาร 6 เป็นของแข็งสีส้มหนัก 0.0126 กรัม(0.003%)



รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงการแยกสารจากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต

ตารางที่ 3.3 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต (crude EtOAc) 30.4 กรัม โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้ความดัน ใช้ silica gel 480 กรัม ขนาดคอลัมน์ 10 x 60 ซม.

ตัวชะ	Fraction	น้ำหนักสาร (กรัม)	ลักษณะของสาร
5% EtOAc : Hexane	F _{A1(1-2)}	1.22	ไขสีขาว (1)
10% EtOAc : Hexane	F _{A2(3-5)}	7.48	ของเหลวสีเหลืองจาง (1)
20-30% EtOAc:Hexane	F _{A3(6-13)}	7.28	ไขสีเหลืองจาง (1)
30-40% EtOAc:Hexane	F _{A4(14-16)}	0.1696	ของเหลวสีน้ำตาลแดงเข้ม
40% EtOAc : Hexane	F _{A5(17-20)}	1.60	ของเหลวสีน้ำตาลแดง
	F _{A6(21-22)}	1.3367	ของแข็งสีน้ำตาลแดง (2)
50% EtOAc : Hexane	F _{A7(24)}	0.1837	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
	F _{A8(25-27)}	0.2718	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม (3, 4)
	F _{A9(28-32)}	0.3227	ของแข็งสีแดง (3, 4)
60% EtOAc : Hexane	F _{A10(33-35)}	0.0555	ของแข็งสีส้มอมแดง (3, 4)
60-70% EtOAc:Hexane	F _{A11(36-45)}	0.2519	ของเหลวชั้นสีเข้ม
70% EtOAc : Hexane	F _{A12(46-50)}	0.2778	ของเหลวชั้นสีม่วงแดง (5, 6, 7, 8)
80% EtOAc : Hexane	F _{A13(51-53)}	0.2037	ของเหลวชั้นสีม่วงอม- น้ำตาล-แดง (5, 6, 7, 8)
10-50% EtOAc:Hexane	F _{A14(59-60)}	0.1303	ของเหลวชั้นสีน้ำตาลแดง
50% EtOAc : Hexane- 100% EtOAc	F _{A15(61-88)}	4.52	ของเหลวชั้นสีน้ำตาลอม- เขียว

3.4.3 สารสกัดหยานเมทานอล

นำสารสกัดหยานเมทานอล 56 กรัม ไปละลายด้วยเมทานอล เติมน้ำในปริมาณที่ทำให้สารละลายเริ่มข้น แล้วสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต จนสีของเอทิลอะซิเตตจางจนเกือบไม่มีสี (ประมาณ 7 ครั้ง ครั้งละ 150 มล) รวมชั้นเอทิลอะซิเตตที่สกัดได้ และดูความชื้นด้วย anhydrous Na_2SO_4 กระจกและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สารตกค้างด้วยเอทิลอะซิเตตเป็นน้ำ เกล็ดแห้งหนัก 9.6 กรัม นำสารที่สกัดได้นี้ ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ ๖๖ ด้วย Hexane:EtOAc, CH_2Cl_2 :MeOH และ MeOH ตามลำดับความมีขั้วต่ำไปสูง ได้สารที่แยกได้ทั้งหมด 74 fractions ตรวจสอบด้วย TLC และรวม fraction ที่คล้ายกันได้ 20 fractions คือ F_{M11} - F_{M20} ดังแสดงในตารางที่ 3.4 พบว่า F_{M12} เป็นสาร 1 หนัก 2.9731 กรัม นำ F_{M12} ไปแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร 1 อีก 0.4458 กรัม รวมน้ำหนักสาร 1 ที่แยกได้จากสารสกัดหยานเมทานอล 3.41 กรัม (0.92 %) สำหรับ F_{M15} เมื่อตกผลึก ด้วย Hexane: CH_2Cl_2 ได้สาร 2 เป็นผลึกรูปเข็มสีขาวหนัก 0.0281 กรัม (0.008 %)

จากลักษณะของ TLC ของ F_{M17} , F_{M19} และ F_{M10} คล้ายกัน จึงนำมารวมกันและแยกด้วยวิธี Preparative Layer Chromatography มี 40% EtOAc : Hexane เป็นตัวชะ แยกออกมาเป็น $R_f = 0.59$ ได้สาร 3 เป็นของแข็งสีเหลืองหนัก 0.0542 กรัม และแถบล่าง $R_f = 0.48$ ได้สาร 4 เป็นของแข็งสีเหลืองหนัก 0.0101 กรัม (0.002%) ส่วน F_{M18} เมื่อตกผลึกด้วย Hexane: CH_2Cl_2 จะได้สาร 3 หนัก 0.1699 กรัม รวมน้ำหนักสาร 3 จากการแยกสารสกัดหยานเมทานอลเป็น 0.2241 กรัม (0.06%)

สำหรับ F_{M14} นำไปรวมกับสารสีแดงอมส้มและสารสีส้มที่แยกได้จากสารสกัดหยานเอทิลอะซิเตต ซึ่งได้สาร 5 และ 6 ดังได้กล่าวมาแล้ว

ตารางที่ 3.4 แสดงผลการแยกสารสกัดหยาบเมทานอล (crude MeOH) 9.61 กรัม

โดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ silica gel 250 กรัม

ขนาดคอลัมน์ 5 x 43 ซม

ตัวชะ	Fractoin	น้ำหนักสาร (กรัม)	ลักษณะของสาร
30% EtOAc : Hexane	F _{M1(1)}	0.0780	ของเหลวสีขาวขุ่น
30% EtOAc : Hexane	F _{M2(2)}	2.97	ของเหลวสีขาวขุ่น (1)
30% EtOAc : Hexane	F _{M3(3)}	1.09	ของเหลวสีขาวขุ่น (1)
30% EtOAc : Hexane	F _{M4(4-5)}	0.5508	ไขสีขาวขุ่น
30% EtOAc : Hexane	F _{M5(6-7)}	0.1127	ของแข็งสีเขียวอมเหลือง (2)
30% EtOAc : Hexane	F _{M6(8-9)}	0.0836	ของแข็งสีเขียวอมน้ำตาลแดง
30% EtOAc : Hexane	F _{M7(10)}	0.0493	ของแข็งสีแดง (3 , 4)
30% EtOAc : Hexane	F _{M8(11-13)}	0.1699	ของแข็งสีแดง (3)
30% EtOAc : Hexane	F _{M9(14- 6)}	0.1348	ของแข็งสีแดงอมเหลือง (3 , 4)
30-40% tOAc : Hexane	F _{M10(17-18)}	0.0365	ของเหลวข้นสีแดงเข้ม (3 , 4)
40-60% tOAc : Hexane	F _{M11(19-26)}	0.0643	สารขุ่นสีน้ำตาลอมแดง
60 % EtOAc : Hexane	F _{M12(27-29)}	0.0310	สารขุ่นสีน้ำตาลแดง
60% EtOAc : Hexane	F _{M13(30-34)}	0.0213	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
60-80% tOAc : Hexane	F _{M14(35-38)}	0.0134	ของแข็งสีส้มอมแดง (5 , 6)
80% EtOAc : Hexane	F _{M15(39-43)}	0.0156	ของแข็งสีน้ำตาลแดง
100% EtOAc			
5% MeOH : CH ₂ Cl ₂	F _{M16(44- 18)}	0.0390	ของเหลวข้นหนืดสีน้ำตาลไหม้
10% MeOH : CH ₂ Cl ₂	F _{M17(49-18)}	0.1682	ของแข็งหนืดสีน้ำตาลแดงเข้ม
30% MeOH : CH ₂ Cl ₂	F _{M18(53-60)}	2.53	ของแข็งเป็นเกล็ดขาวสีน้ำตาล
80% MeOH : CH ₂ Cl ₂	F _{M19(61-58)}	0.2518	ของแข็งเป็นเกล็ดสีน้ำตาลไหม้
100% MeOH	F _{M20(69-74)}	0.1317	ของแข็งสีน้ำตาลแดง

3.5 สรุปผลการแยกสารจากสารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต

และสารสกัดหยาบเมทานอล

สาร 1 (Glyceride) เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อน $R_f = 0.62$ (10% EtOAc : Hexane) ได้จากสารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซนหนัก 14.97 กรัม จากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตหนัก 13.06 กรัม และได้จากสารสกัดหยาบเมทานอลหนัก 3.42 กรัม รวมสาร 1 ที่แยกได้ทั้งหมดหนัก 31.44 กรัม (8.45%) $mp = 29-30^{\circ}C$

IR(neat) V_{max} 2920(vs), 2853(s), 1759(s), 1732(s), 1464(s), 1373(m), 1163(s), 1119(m), 723(m) cm^{-1}

1H -NMR(300 MHz, $CDCl_3$, TMS) : δ 5.388-5.312 (6H, *m*), 5.28 (1H, *dquint*), 4.28-4.13 (4H, *dd*, $J = 12, 4.2, 12, 6.0$ Hz), 2.30 (2H, *t*, $J = 7.5$ Hz), 2.29 (4H, *t*, $J = 7.5$ Hz), 1.99-1.556 (12H, *m*, $J = 6.6$ Hz), 1.29-1.25 (72H, *s*, *br*), 0.87 (9H, *t*, $J = 6.6$ Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, TMS) : δ 173.30 (C=O), 172.82 (C=O), 129.30, 129.66, (C=C), 68.88 ($\underline{CH}$ -OCOCH₂-), 62.02 (2 $\underline{CH}_2$ -OCOCH₂-), 34.14, 34.0, 31.89, 31.87, 29.77, 29.66, 29.62, 29.58, 29.48, 29.43, 29.32, 29.28, 29.23, 29.15, 29.08, 27.18, 27.13, 24.82, 22.63 ($-(CH_2)_n-$), 14.03 (CH₃)

ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสาร 1 นำสาร 1 หนัก 2.2665 กรัม ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย 6M NaOH 4.5 มล เติม EtOH 95% ในปริมาตร 4.5 มล แล้ว reflux ในอ่างน้ำร้อน ประมาณ 1 ชั่วโมง ทั้งให้เย็นในอุณหภูมิต่ำ เติม 6M HCl 4 มล และน้ำเล็กน้อย นำมาสกัดด้วย ether 2 ครั้ง (40 มล) ดูดความชื้นด้วย anhydrous Na₂SO₄ ระเหยตัวทำละลายออกได้เป็นของแข็ง (ไข) สีน้ำตาลอ่อน หนัก 2.0243 กรัม ตรวจสอบด้วย TLC พบว่ามีสารหลักเป็นจุดกลม 1 จุด $R_f = 0.48$ (30% EtOAc:Hexane) ทำให้สารบริสุทธิ์โดยทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ 15-20 % EtOAc:Hexane ได้เป็นไขสีขาว สาร 1a หนัก 1.6399 กรัม

IR (neat) V_{max} : 3202(w, br), 2923(s), 2851(s), 1713(s), 1464 (m), 1298(w) cm^{-1}

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, TMS) : δ 5.34 (1H, *m*, $-\underline{CH}_2\underline{CH}=\underline{C}(\underline{CH}_3)\underline{CH}_2-$), 2.34 (2H, *t*, $J = 7.6$ Hz, HOOC- $\underline{CH}_2-$), 2.00 (2H, *q*, $J = 6.4$ Hz, $-\underline{CH}=\underline{C}(\underline{CH}_3)\underline{CH}_2\underline{CH}_3$), 1.625

(2H, *quint*, $J = 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 1.29 (3H, *s*, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 1.24 (22H, *s*(br), $-(\text{CH}_2)_{11}-$), 0.90 (3H, *t*, $J = 6.4$ Hz, $-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DDCl_3 , TMS) : δ 180.38 ($-\text{CO}_2\text{H}$), 130.01, 129.72 ($-\text{C}=\text{C}-$), 34.08, 31.90, 29.66, 29.49, 29.40, 29.33, 29.29, 29.21, 29.16, 29.03, 27.18, 27.11, 24.64, 22.65 ($-\text{CH}_2$, CH_3), 14.05 ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$)

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของสาร **1b** เตรียมโดยนำสาร **1a** 0.5143 กรัม ละลายใน anhydrous MeOH 4 มล หยด SOCl_2 2-3 หยด stir ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 20 นาที ได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อน ตรวจสอบด้วย TLC มีสารหลักเพียงจุดเดียวที่ $R_f = 0.70$ (10% EtOAc:Hexane) นำสารละลายที่ได้ไปแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ด้วย 5% EtOAc:Hexane ได้สาร **1b** เป็นของเหลวสีเหลืองอ่อนหนัก 0.5011 กรัม

IR (neat) $V_{\max}$: 2925(vs), 2858(s), 1746(vs), 1652(m), 1458(m), 1168(m) cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (90 MHz, CDCl_3 , TMS) : δ 5.34 (2H, *m*, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 3.65 (3H, *s*, $-\text{OCH}_3$), 2.32 (2H, *t*, $-\text{COCH}_3$), 2.0 (2H, *m*), 1.65 (2H, *m*), 1.4-1.5 (26, *s*, br, 13 CH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$ (15 MHz, CDCl_3 , TMS) : δ 172.2 ($\text{C}=\text{O}$), 130.0, 129.8 ($-\text{CH}=\text{CH}-$), 49.3 (OCH_3), 34.1, 32.0, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 27.3, 25.0, 22.7, 14.1,

สาร **2**, (Ergosterol) เป็นผลึกรูปเข็มสีขาว mp = 157-159°C $R_f = 0.52$ (40% EtOAc:Hexane) ได้จากการแยกสารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตตและสารสกัดหยาบเมทานอล 0.2140, 0.0586 และ 0.0281 กรัมตามลำดับ น้ำหนักรวมที่แยกได้เป็น 0.3007 กรัม (0.08%)

IR (nujol) $V_{\max}$: 3419 (br, w), 3050(vw), 2957(s), 2872(s), 1657-1650(m), 1039(s) cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS) : δ 5.58(1H, *m*, $\text{C}=\text{CH}-$), 5.40 (1H, *m*, $\text{C}=\text{CH}-$), 5.20 (2H, *m*, $-\text{CH}=\text{CH}-$), 3.52 (1H, *m*, $\text{HO}-\text{CH}-$), 2.60-1.17 (22H, *m*, $-\text{CH}-$, $-\text{CH}_2$), 1.60 (3H, *s*, $-\text{CH}_3$), 1.02 (3H, *d*, CH_3), 0.90 (6H, *2d*, 2- CH_3), 0.82 (6H, *2d*, 2- CH_3), 0.62(3H, *s*, $-\text{CH}_3$)

^{13}C NMR (15 MHz, CDCl_3 , TMS) : δ 141.37, 139.81 (C=C), 135.60, 132.04 (C=C), 119.46, 116.66 (C=C), 70.49 (C-OH), 55.80, 54.61, 46.30, 42.87, 40.83, 40.42, 39.14, 38.42, 37.08, 33.13, 32.02, 28.81, 23.02, 21.13, 19.96, 19.66, 17.62, 16.32, 12.06 (C, CH, CH_2 , CH_3)

สาร 3, (Rotiorinol) เป็นผลึก, รูปเข็มละเอียดสีแดง mp = 134-137°C R_f = 0.58 (60% EtOAc:Hexane) ได้จากการแยกสารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตดและสารสกัดหยาบเมทานอล 0.1368, 0.2388 และ 0.2241 กรัมตามลำดับรวมน้ำหนักที่แยกได้ 0.5997 กรัม (0.16%)

UV : λ_{max} 492, 256 nm ($\log \epsilon$ = 4.58, 4.25 ตามลำดับ)

IR (Neat) ν_{max} : 3393(w,br), 2926(s), 2853(s), 1732(s), 1651(s), 1539(s), 1239 (m), 1173 (m) cm^{-1}

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3 , TMS) : δ 7.48 (1H, d, J = 2.0 Hz), 7.02 (1H, d, J = 15.7 Hz), 6.72 (1H, s), 6.20 (1H, s), 6.00 (1H, d, J = 15.7 Hz), 5.65 (1H, s, J = 9.7 Hz), 4.78 (1H, d, J = 2.0 Hz), 3.50 (1H, br, OH), 2.52 (3H, s), 2.46 (1H, m), 1.82 (3H, s), 1.42 (2H, m), 1.40 (3H, s, CH_3), 1.31 (2H, quini, CH_2 -), 1.00 (3H, d, $-\text{CH}_3$), 0.85 (3H, s, $-\text{CH}_3$)

^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3 , TMS) : δ 195.1 (C=O), 173.1 ($\text{C}=\text{C}-\text{CO}$), 171.6 (C=O), 159.9 ($\text{C}=\text{C}-\text{O}$ -), 147.79 ($\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$ -), 146.3 ($\text{C}=\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 145.8 ($-\text{CH}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$), 141.9 ($-\text{CH}-\text{CH}-\text{C}$), 132.0 ($-\text{C}=\text{CH}$), 120.6 ($-\text{C}=\text{C}-\text{O}$), 116.4 ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}$), 110.4 ($\text{C}=\text{C}-\text{CO}$), 109.4 ($-\text{CH}=\text{C}$), 102.9 ($-\text{CH}=\text{C}$), 83.2 ($-\text{C}-\text{O}-\text{CO}$), 71.7 ($-\text{C}-\text{OH}$), 35.0 ($-\text{CH}=\text{C}$), 30.1 ($-\text{CH}_2-$), 29.4 (COCH_3), 20.2 ($-\text{CH}_3$), 19.3 ($-\text{CH}_3$), 12.3 ($-\text{CH}_3$), 11.9 ($-\text{CH}_3$)

สาร 4 เป็นของแข็งสีเหลือง R_f =0.48 (60% EtOAc:Hexane) ได้จากการแยกสารสกัดหยาบเอ็น-เฮกเซน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตดและสารสกัดหยาบเมทานอล 0.0118, 0.0491 และ 0.0101 กรัมตามลำดับ รวมน้ำหนักที่แยกได้หนัก 0.0710 กรัม (0.02%)

IR (nujol) ν_{max} : 3309(w,br), 2924(s), 2881(s), 1717(w), 1636(w), 1465(m), 1380(m) cm^{-1}

^1H -NMR (90 MHz, CDCl_3 , TMS) : δ 6.5, 6.2, (2H, AB *quartet* $J_{\text{AB}} = 9$ Hz (*trans* CH=CH), 5.19 (2H, *m*, CH=CH), 2.2-0.7 (66H, CH, CH_2 , CH_3).

^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3 , TMS) : δ 135.4, 135.21, 132.3, 130.8, 79.4, 66.5, 56.3, 51.7, 51.2, 44.6, 42.8, 39.7, 39.4, 36.9, 34.7, 33.1, 30.1, 29.7, 29.3, 28.6, 23.4, 20.9, 20.6, 19.9, 19.6, 18.2, 17.6, 12.9

สาร 5 เป็นของแข็งสีส้ม $R_f = 0.25$ (60% EtOAc:Hexane) ได้จากสารสกัดหยาบ เอ็น-เฮกเซน 0.0090 กรัม จากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต และสารสกัดหยาบเมทานอล 0.0122 กรัม รวมน้ำหนักที่แยกได้หนัก 0.0212 กรัม (0.006%)

สาร 6 เป็นของแข็งสีส้ม $R_f = 0.24$ (60% EtOAc:Hexane) ได้จากสารสกัดหยาบ เอ็น-เฮกเซน 0.0060 กรัม จากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต และสารสกัดหยาบเมทานอล 0.0126 กรัม รวมน้ำหนัก 0.0186 (0.005%)

IR (CH_2Cl_2) V_{max} : 2961(s), 2928(s), 2862(s), 1731(s), 1661(s), 1505(s), 1196(s), 1172(s), 910(m) cm^{-1}

สาร 7 เป็นของแข็งสีม่วง $R_f = 0.38$ (60% EtOAc:Hexane) ได้จากสารสกัดหยาบ เอ็น-เฮกเซน และสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต 0.0102 และ 0.0455 กรัมตามลำดับ รวม น้ำหนักที่แยกได้หนัก 0.1557 (0.014%)

IR (CH_2Cl_2) V_{max} : 3399(w, br), 2925(s), 2858(s), 1733(s), 1638(s), 1456(s), 1207(m), 1159(s) cm^{-1}

สาร 8 เป็นของแข็งสีม่วง $R_f = 0.34$ (60% EtOAc:Hexane) ได้จากสารสกัดหยาบ เอ็น-เฮกเซน และสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต 0.0080 และ 0.0422 กรัมตามลำดับรวม น้ำหนักที่แยกได้หนัก 0.0502 กรัม (0.013%)

IR (CH_2Cl_2) V_{max} : 3410(w, br), 2903(s), 2924(s), 2855(s), 1726(s), 1634(s), 1539(s), 1456(s), 1273(w), 1157(s) cm^{-1}

3.6 การเลี้ยงเชื้อรา *Ch.cupreum* และการทดสอบทางชีวภาพ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนเชื้อราและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจาก รศ .ดร.เกษม สร้อยทอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

เลี้ยงเชื้อรา *Ch. cupreum* ในอาหาร potato dextrose broth (PDB). แล้วบ่มไว้ด้วย เครื่องเขย่า (shaker) ที่อุณหภูมิ 25-28°C เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ กรองเอาเส้นใย (mycelial mat) ด้วยผ้าขาวบางและผึ่งลมให้แห้ง

การทดสอบสารสกัดโดยการอบฆ่าเชื้อ (autoclave)

เป็นการทดลองแบบ Completely Randomized Design จำนวน 4 ซ้ำ โดยมี treatments ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ T₁ (สารสกัด 0 กรัม/ลิตร (0 ppm) PDA 40 มล) T₂ (สารสกัด 0.3 กรัม/ลิตร (300 ppm) โดยซังสาร 0.012 กรัม/PDA 40 ml.) T₃ (สารสกัด 0.5 กรัม/ลิตร (500 ppm) โดยซังสาร 0.02 กรัม/PDA 40 ml.) T₄ (สารสกัด 1.0 กรัม/ลิตร (1000 ppm) โดยซังสาร 0.04 กรัม/PDA 40 ml) .ซังสารให้ได้น้ำหนักตามความเข้มข้นของสารสกัดที่คำนวณไว้ นำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นผสมกับอาหาร PDA (Potato dextrose Agar) ปริมาตร 40 ml. ในขวด (flask) ขนาด 100 ml. เขย่าให้เข้ากัน สำหรับ control ใช้ PDA อย่างเดียวแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เทอาหารผสมสารสกัดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ประมาณ 10 มล/1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ การทดลองนี้ทำ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 จาน ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อเมื่ออาหารผสมสารสกัดและ control เย็นลงและแข็งตัว จึงพร้อมที่จะนำไปทดสอบการเจริญของเชื้อรา *colletotrichum gloeosporioides* โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดส่วนรอบนอกของโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มีอายุ 7 วัน แล้วใช้เชื้อที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยย้ายชิ้นส่วนอาหารที่มีเชื้อราเจริญวางลงตรงกลางจานที่ใช้ทดสอบจานละ 1 ชิ้น ทำเช่นนี้ทุก ๆ ชนิดของสารสกัด บ่มเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-28°C) สังเกตจากจาน control ถ้ามีราเจริญเต็มจานอาหาร จึงวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราได้ โดยการวัดตามแนวเส้นที่ตัดกันเป็นรูปกากบาทแล้วหาค่าเฉลี่ยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตและค่า ED₅₀