

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

2.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี

บริษัทผู้ผลิต

Acetic acid	Merck
Acetone	Merck
Ammonium hydroxide	Merck
Ammonium nitrate	Difco laboratories
Ammonium sulfate	Merck
Agar	Difco laboratories
Benzene	Merck
Boric acid	Merck
Calcium chloride	Merck
Chloroform	Merck
Cobalt chloride	Merck
Copper sulfate	BDH
Diethylether	Carlo erba
Ethanol	Ayudhaya
Ethanolaminediaminetetraacetic acid sodium salt	Merck
Ethylacetate	Merck
Ferric chloride	BDH
Ferric sulfate	BDH
6- Furfurylaminopurine (kinetin)	Fluka
Glucose	BDH
Glycine	BDH
Hexane	Merck
Hydrochloric acid	Carlo erba
Hydrogen peroxide	Merck
Manganese sulphat	Merck

ชื่อสารเคมี**บริษัทผู้ผลิต**

Magnesium sulfate	M&B
Methanol	BDH
Myo-inositol	M&B
Naphthaleneacetic acid (NAA)	Fluka
Nicotinic acid	J.T. Baker
Petroleum ether	J.T. Baker
Potassium dihydrogenphosphate	BDH
Potassium nitrate	M&B
Potassium sulfate dihydrogen	BDH
Potassium hydroxide	BDH
Potassium iodide	BDH
Pyridoxine-HCl	J.T. Baker
Silica gel 40	Merck
Sodium carbonate	Carlo erba
Sodium dihydrogenphosphate	Merck
10% Sodium hypochlorite	Merck
Sodium molybdate	BDH
Sucrose	Top Supermarket
Sulphuric acid	J. T. Baker
Thiamine – HCl	J. T. Baker
Trichloroacetic acid	Carlo erba
Zinc sulfate	J. T. Baker

2.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์**ชื่ออุปกรณ์****บริษัทผู้ผลิต**

Analytical balance	Satorius
Autoclave	Hirayama
Circulation bath	Lauda

ชื่ออุปกรณ์

บริษัทผู้ผลิต

Centrifuge 6000 rpm

Centurion

Chromatography column

Gallenkamp

Drying oven

Gallenkamp

Light microscope

Olympus

pH meter

Corning

Rotatory evaporator

Gallenkamp

Spectrophotometer, Spectronic 21

Milton roy

Shaker

Gallenkamp

TLC aluminium sheet silica gel 60F

Merck

UV-VIS spectrophotometer model U2000

Hitachi Japan

Vortex genie 2

Scientific industries, Inc.

Water bath

Gallenkamp

2.1.3 พืชที่ใช้

รากและเมล็ดของยอป่า *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib.

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การตรวจสอบชนิดของต้นยอป่าจากตัวอย่างรากและใบดอกที่เก็บมา

เก็บตัวอย่างข้อใบ ดอกและเมล็ดของต้นยอป่าในภาคเหนือเพื่อตรวจสอบลักษณะให้ตรงกับวงศ์ของพืชที่ต้องการ คือ *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. โดยดูความกว้างและความยาวของใบ ลักษณะดอก ลำต้น และเมล็ด พบว่ายอที่ต้องการมีชื่อท้องถิ่นว่า ชรัก ดง ดั้งไล สลัก (เชียงใหม่) สลักป่า (ลำปาง) ยอไก่ (น่าน) ลักษณะที่ต้องตรวจให้ตรงคือจะเป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูงประมาณ 1 เมตร มีกิ่งก้านมาก ใบเดี่ยวออกตรงกันข้าม ขนาด 4-5 x 15-18 เซนติเมตร รูปขอบขนานแกมรูปหอก ปลายใบแหลม ฐานใบเรียงเข้าหากันใบ ขอบใบเรียบ เส้นแขนงใบ 9-12 คู่ มีหูใบรวมก้านใบยาว 1-3 เซนติเมตร ดอกเป็นช่อ มีลักษณะเป็นกระจุกกลมโดยมีใบเลี้ยงเชื่อมติดกัน กลีบเลี้ยงสีเขียว กลีบดอกเป็นหลอด ปลายดอกแยกเป็น 4-6 กลีบ มีกลิ่นหอม ก้านดอกยาว 2-5 เซนติเมตร เป็นดอกชนิดสมบูรณ์เพศ ผลรูปไข่หรือค่อนข้างกลม ขนาด 1-3 เซนติเมตร เป็นผลสดสีเขียว เมื่อแก่มีสีน้ำตาลดำ เมล็ดมีสีดำ รากจะมีเปลือกรากสีแดง เนื้อในรากเป็นสีเหลือง

2.2.2 การสกัดรงควัตถุสีแดงจากรากยอป่า

รากยอป่าจากต้นที่วิเคราะห์ว่าเป็นสายพันธุ์ตรงตามต้องการ นำมาล้างและสับเป็นชิ้นเล็กๆ อบให้แห้งที่ 60 °C แล้วบดเป็นผง ผงรากยอป่าที่ได้นำมาสกัดด้วย 95% เอทานอลในชุดสกัดแบบต่อเนื่องจนสีถูกสกัดออกจากผงรากจนหมด นำน้ำสกัดที่ได้มาทดสอบเคมีเบื้องต้น แล้วส่วนที่เหลือนำมาระเหยแห้งโดยใช้ rotatory evaporator เพื่อแยกหาองค์ประกอบหลักของสารให้สีในรากยอป่า โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีคอลัมน์ต่อไป

2.2.3 การทดสอบเคมีเบื้องต้นของสารให้สีจากรากยอป่า

2.2.3.1 การทดสอบสารให้สีกลุ่มแคโรทีนอยด์

นำน้ำสกัดจากรากยอป่าที่ระเหยแห้งแล้วมาละลายในอะซีโตน หยดด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น ถ้ามีสารแคโรทีนอยด์จะปรากฏเป็นสารสีน้ำตาลแดง หรือสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม กรองเก็บน้ำยาสกัดมาหยดด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น ถ้ามีสารประกอบแคโรทีนอยด์จะปรากฏเป็นสีน้ำเงินหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน

2.2.3.2 การทดสอบกลุ่มฟลาโวนอยด์

สกัดด้วยเมทานอล แยกสารสกัดที่ได้มาต้มกับกรดแมกนีเซียมพร้อมหยดด้วยกรดเกลือเข้มข้น (HCl) ถ้ามีน้ำยาสกัดมีสารประกอบฟลาโวนอยด์ชนิดที่มีโครงสร้าง Benzo- γ -pyrone เป็นนิวเคลียสจะปรากฏเป็นสีแดงอมส้ม หรือสีแดงเข้ม หรือสีแดงม่วง

2.2.3.3 การทดสอบกลุ่มอัลคาลอยด์

สกัดด้วยโซเดียมคาร์บอเนตและสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม กรองเก็บสารสกัดคลอโรฟอร์มนำมาระเหยแห้งแล้วนำมาละลายในกรดเกลือเข้มข้น 2% ทำเป็นน้ำยาสกัดตัวอย่างนำไปทดสอบกับ Mayer's reagent และ Dragendroff's reagent ถ้ามีสารประกอบอัลคาลอยด์จะปรากฏเป็นตะกอนสีขาว หรือตะกอนสีส้มน้ำตาล ตามลำดับ

2.2.3.4 การทดสอบกลุ่มแอนทราควิโนน

สกัดด้วยเมทานอล นำน้ำยาสกัดที่ได้มาต้มกับสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ เติมน้ำยาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เจือจางลงไป กรองเก็บน้ำยาสกัดที่ได้แล้วเติมกรดน้ำส้มจนเป็นกรด สกัดน้ำยานี้ด้วยเบนซีน ถ้ามีสารประกอบแอนทราควิโนนจะปรากฏสีเหลืองในชั้นเบนซีน และเมื่อแยกชั้นเบนซีนมาเขย่ากับน้ำยาแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เจือจาง จะปรากฏสีชมพูหรือแดงขึ้นในชั้นแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

2.2.3.5 การทดสอบกลุ่มเมลานิน

สกัดด้วย 5% Trichloroacetic acid (TCA) และแยกตะกอนสีดำออกโดยการปั่นแล้วนำตะกอนสีดำมาสกัดด้วย อีเทอร์ : เอทานอล (1:1) ครั้งละ 10 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง

สกัดด้วยอีเทอร์ 1 ครั้ง และนำตะกอนสีดำที่ได้จากการปั่นแยกละลายในโซเดียมคาร์บอเนต 0.05 โมลาร์ โดยต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที นำไปปั่นที่ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้ในปิอกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปอบที่ 160 °C ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วละลายด้วยสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.85 นอร์มอล อุ่น 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจประเภทของสารให้สี โดยนำมาหยดน้ำยาไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 0.3% จะเกิดการฟอกสีได้สารละลายใส หรือนำน้ำยาสกัดมาหยดด้วยสารละลายเพอร์ริกคลอไรด์ ถ้ามีสารประกอบของโพลีฟีนอลจะทำให้เกิดตะกอนสีน้ำตาล

2.2.4 การแยกองค์ประกอบหลักของสารให้สีจากรากยอป่า

ทำการแยกหาองค์ประกอบหลักของสารให้สีจากรากยอป่า โดยการนำเอาสารสกัดเข้มข้นจากการสกัดด้วยเมธานอลแยกหาองค์ประกอบหลักโดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีคอลัมน์ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

ก. การทดลองหาระบบตัวชะ (Eluting solvent system)

การทดลองหาระบบตัวชะที่ใช้ในการแยกสารสกัดจากรากยอป่าในโครมาโทกราฟีคอลัมน์นั้นได้อาศัยเทคนิคของโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) โดยมี silica gel 40 เป็นตัวดูดซับ และใช้น้ำยา 0.5 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ เป็นตัวฉีกพื้นเพื่อดูสารที่ให้สีที่แยกบนแผ่น TLC โดยระบบตัวชะต่างๆกัน ผลการศึกษาพบว่า ระบบตัวชะหรือตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการศึกษาสารสกัดจากรากยอป่าโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบาง คือ น้ำยาผสมของ chloroform และ methanol ในอัตราส่วนต่างๆกัน เช่น chloroform/methanol ในอัตราส่วน 9/1, 8/2 และ 7/3 เป็นต้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ระบบตัวชะในการแยกสารในโครมาโทกราฟีคอลัมน์เป็น chloroform กับ methanol โดยการเริ่มต้นด้วย chloroform จากนั้นจึงเพิ่ม polarity ด้วย methanol

ข. การแยกหาองค์ประกอบหลักของสารให้สีในสารสกัดเข้มข้นจากข้อ 2.2.2 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์

ดังรายละเอียด คือ ใช้คอลัมน์เป็นกระบอกแก้วขนาด 45x3 เซนติเมตร บรรจุด้วยตัวดูดซับ silica gel 40 จำนวน 60 กรัม และใช้สารสกัดเข้มข้นที่จะแยก 3 กรัม ผ่านคอลัมน์ ชะด้วย chloroform/methanol (9/1) และตามด้วย chloroform/methanol (1/1)

2.2.5 การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบหลักของสารให้สีที่แยกได้จากรากยอป่า

2.2.5.1 การทำให้สารประกอบหลักมีความบริสุทธิ์

ก. การใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีคอลัมน์

รายละเอียดคือ ใช้คอลัมน์เป็นกระบอกแก้วขนาด 20x1.5 เซนติเมตร บรรจุด้วยตัวดูดซับ silica gel 40 จำนวน 16 กรัม แห่อยู่ใน hexane และใช้ผงสารเคมี anthraquinone ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์จำนวน 50 มิลลิกรัม ผ่านลงในคอลัมน์และชะออกมาด้วยตัวผสมของ hexane/chloroform ในอัตราส่วน 9/1 ทำการชะติดต่อกันไปเรื่อยๆด้วยวิธีการที่เรียกว่า isocratic elution จนกระทั่งน้ำยาชะที่เก็บไม่มีสี จึงนำน้ำยาชะทั้งหมดรวมกันและนำไประเหยแห้ง พบว่าได้สารเคมี anthraquinone ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลัก จำนวน 35.50 มิลลิกรัม

ข. การตกผลึกซ้ำ

นำสารเคมี anthraquinone ที่ได้ทั้งหมด 35.50 มิลลิกรัม มาละลายใน methanol ร้อนๆ จำนวน 100 มิลลิลิตร และหยดด้วยกรดเกลือเข้มข้น 10% จำนวน 5-10 หยด จนน้ำยาของสารละลายมีความเป็นกรด จากนั้นนำไปตั้งทิ้งไว้ค้างคืนในตู้เย็น สาร anthraquinone ที่ต้องการจะเกิดการตกผลึกแยกตัวออกมา ผลึกที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็ม สีเหลืองส้ม ละลายได้ดีใน chloroform และได้น้ำยาเป็นสีเหลือง พบว่าผลึก anthraquinone นี้มีความบริสุทธิ์มาก หลังการตรวจสอบยืนยันอีกครั้งด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีผิวบางในน้ำยา developing solvents ต่างๆ

2.2.5.2 การวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากข้อ ข.

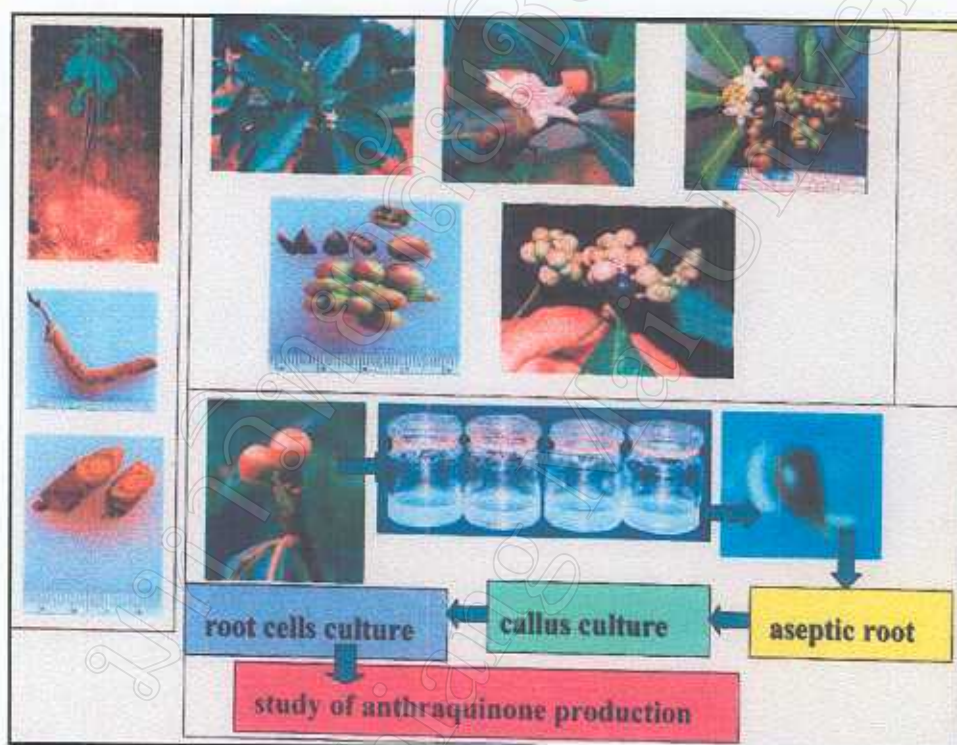
โดยการวิเคราะห์หาสมบัติทางสเปกโตรสโคปี 3 ชนิด คือ วิเคราะห์ด้วย UV-visible spectroscopy, mass spectrometry และ C^{13} Nuclear magnetic resonance

2.2.6 การศึกษาการเพิ่มผลผลิตสีย้อมธรรมชาติจากรากยอป่าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

มีการศึกษาการผลิตสาร anthraquinone ในพืชสกุล *Morinda* หลายสกุลพบว่าแหล่งที่สร้างสารให้สีในกลุ่มนี้อยู่ที่รากและได้มีผู้ทดลองเพาะเนื้อเยื่อรากพืชสกุลนี้เพื่อผลิตสีแต่ยังไม่กว้างขวางนัก ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพื่อผลิตสารให้สีจากรากยอป่าสกุล *Morinda angustifolia* Roxb. ซึ่งมีสารให้สีหลักเป็น morindone ตามที่รายงานไว้แล้ว

2.2.6.1 การตัดเนื้อเยื่อรากยอป่า

ผู้วิจัยได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเก็บรากยอป่ามาล้างน้ำให้สะอาด ปรากฏว่าตัดเนื้อเยื่อไม่ได้เนื่องจากรากยอป่าเมื่อเก็บมาถึงห้องปฏิบัติการจะแห้งและแข็ง การตัดเนื้อเยื่อในสนามก็ได้ทดลองทำปรากฏว่ามีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในดิน วิธีการแก้ปัญหา ผู้วิจัยได้รับคำแนะนำว่าให้นำเมล็ดยอป่ามาเพาะในห้องปฏิบัติการในสภาพปลอดเชื้อ เมื่อเมล็ดงอกแล้วจึงตัดเนื้อเยื่อจากรากปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงและกระตุ้นการผลิตต่อไป รูปที่ 2.1 สรุปขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากยอป่าเพื่อเพิ่มผลผลิต



รูป 2.1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรากยอป่าเพื่อเพิ่มผลผลิตสีย้อมธรรมชาติ

2.2.6.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ราก

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ MS ประกอบด้วย

Macronutrient	mg/l	10x (g)
NH_4NO_3	1,650	16.50
KNO_3	1,900	19.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	4.40
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	3.70
KH_2PO_4	170	1.70
Micronutrient	mg/l	100x (g)
H_3BO_3	6.2	0.62
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6.9	0.69
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.14	0.614
KI	0.83	0.083
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.0025
Iron source	mg/l	100x (g)
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	37.25	3.725
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	2.785
Organic component	mg/l	100x (g)
Glycine	2.0	0.2
Nicotinic acid	0.5	0.05
Pyridoxine-HCl	0.5	0.05
Thiamine-HCl	0.1	0.01

ข. อาหารเลี้ยงเชื้อ Gamborg's B₅ ประกอบด้วย

Macronutrient	mg/l	10x (g)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150	1.5
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150	1.5
KNO ₃	2,500	25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	2.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	1.34
Micronutrient	mg/l	100x (g)
H ₃ BO ₃	3.0	0.3
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.0025
KI	0.075	0.0075
CuSO ₄	0.025	0.0025
MnSO ₄ ·H ₂ O	10.0	1.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.0	0.2
Iron source	mg/l	100x (g)
NaFe-EDTA	28.0	2.8
Organic component	mg/l	100x (g)
Thiamine-HCl	10.0	1.0
Nicotinic acid	1.0	0.1
Pyridoxine-HCl	1.0	0.1
Plant hormone	mg/l	100x (g)
Naphthaleneacetic acid	1.0	0.1
Kinetin	0.2	0.002

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (1 ลิตร)

- รวม stock solution เข้าด้วยกันดังนี้

Macronutrient	(10x)	ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร
Micronutrient	(100x)	ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร
Iron source	(100x)	ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร
Organic component	(100x)	ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร
- เติมน้ำ Plant hormone	(100x)	ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร
Myo-Inositol			0.1	กรัม
Sucrose			30.0	กรัม

- ปรับความเป็นกรด-เบสให้ได้พีเอช 5.6 โดยใช้ HCl หรือ KOH และปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 1000 มิลลิลิตร
- เติมน้ำ (Agar) 8 กรัม
- เคี่ยวสารละลายอาหารเพื่อหลอมละลายวุ้นแล้วเทลงในขวดที่จะใช้เลี้ยง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 Psi (121°C) เป็นเวลา 20 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น

ข. วิธีการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากรากและเมล็ดของต้นรากยอป่า

แบ่งวิธีศึกษาเป็น 3 แบบ คือ ใช้เมล็ดอ่อน เมล็ดสุกและราก โดยนำเมล็ดหรือรากมาทำให้ปลอดเชื้อโดยการล้างด้วยน้ำก๊อกที่ไหลแรงๆ แล้วแช่ใน 95% เอทานอลประมาณ 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่ปราศจากเชื้อ (Sterilized water) จากนั้นนำมาใส่ตู้ปลอดเชื้อ โดยแช่รากในสารละลาย Clorox เจือจาง (Clorox : Sterilized ; 1:10) นาน 15-20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง

การชักนำให้เกิดแคลลัส (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) โดยทำการตัดรากออกเป็นชิ้นๆ ยาวประมาณ 1 ซม. วางชิ้นส่วนลงบนอาหารแข็ง MS ในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเก็บในที่มืดที่ 25 °C จนกระทั่งมีกลุ่มเซลล์เกิดขึ้นแล้วจึงนำมาเลี้ยงเซลล์ลงบนอาหาร Gamborg's B₅ ใหม่ เป็นเวลา 14-30 วัน จนอาหารหมดและเซลล์ไม่แบ่งตัวต่อจึงเก็บเซลล์

2.2.6.3 การสกัดรงควัตถุจากเซลล์ราก

นำเซลล์ราก 0.5 กรัม สกัดด้วยเมทานอล 20 มิลลิลิตร กรองกากเซลล์ทิ้งไปแล้วระเหยตัวทำละลายออกให้แห้ง นำมาเติม 5% H₂SO₄ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แช่ไว้ 12 ชั่วโมง

ที่ 80 °C นำสารละลายที่ได้มาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทครั้งละ 1 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แยกชั้นเอทิลอะซิเตท ออกมาล้างน้ำครั้งละ 1 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ตรวจสอบสาร anthraquinone โดยฉีดสารละลายครั้งละ 5 ไมโครลิตร ในเครื่อง HPLC

2.2.6.4 การแยกสารให้สีหลักจากเซลล์ราก

นำกลุ่มเซลล์สกัดด้วย chlorlform นำมาระเหย chlorlform ออกให้แห้งแล้วนำไปแยกด้วย TLC ซึ่งมีระบบตัวชะเป็น chloroform : methanol เท่ากับ 9:1 เทียบแถบสีที่แยกได้จากสารสกัดกับสีที่สกัดจากรากโดยตรงและเทียบกับสารมาตรฐาน morindone ที่สกัดจากรากโดยตรงและแยกบริสุทธิ์แล้ว

2.2.6.5 การวิเคราะห์โครงสร้างสารให้สีหลักจากเซลล์ราก

การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารให้สีหลัก กระทำการวิเคราะห์หาคุณสมบัติทาง spectroscopy ดังนี้

ก. การวิเคราะห์ด้วย UV-visible spectroscopy นำสารให้สีที่แยกได้จาก Preparative TLC มาหาความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด โดยนำสารให้สีที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-VIS spectrophotometer และใช้น้ำยาชะเป็นสารอ้างอิงจะได้สเปกตรัมออกมา

ข. การวิเคราะห์ด้วย Infrared spectroscopy นำสารให้สีที่แยกได้จาก Preparative TLC มาวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชัน โดยละลายอยู่ในคลอโรฟอร์มแล้วหยดสารลงบนโซเดียมคลอไรด์เซลล์แล้วปล่อยให้คลอโรฟอร์มระเหยจนแห้ง หยดสารซ้ำอีกเรื่อยๆ เพื่อให้สารที่ต้องการวิเคราะห์เคลือบเป็นแผ่นฟิล์มและมีความเข้มข้นพอที่จะวิเคราะห์ได้ อาจทดสอบโดยการนำไปวิเคราะห์ดูก่อนหากต้องการให้สารเข้มข้นขึ้นอีกจึงค่อยหยดสารเพิ่มบนเซลล์ และนำไปวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี จะได้อินฟราเรดสเปกตรัม