บทที่ 5
ผลการทดลองและการวิจารณ์

1. สาหร่ายทะเลสีน้ำตาลในสกุล Sargassum เก็บจากบริเวณหน้าสถานีประมงจังหวัดพังงาในช่วงเดือน มกราคม นำมาตากให้แห้งในที่ร่ม เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้น นำมาบดให้ละเอียดและหมักด้วยเมธานอล เป็นเวลา 1 สัปดาห์

2. นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบหาสาร ในกลุ่มต่างๆ ดังนี้

2.1 การทดสอบหา อัลคาลอยด์ (Alkaloids)

ใช้น้ำยาทดสอบ ดราเจนดรอฟ (Dragen-dorff's reagent) , มาร์ม (Marme's reagent) และแวกเนอร์ (wagner's reagent) ซึ่งผลการทดสอบไม่พบ ตะกอนในน้ำยาทดสอบแต่ละชนิด แสดงว่าไม่อัลคาลอยด์

2.2 การทดสอบหา สเตอรอยด์ (sterodis)

ใช้น้ำยาทดสอบ ลิเบอร์มานน์ เบอร์ชาร์ด (Libermann-Burchard reagent) ซึ่งผลการทดสอบพบว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินแกมเขียว แต่สีค่อนข้างจางแสดงว่ามีสารในกลุ่มสเตอรอยด์อยู่บ้าง

2.3 การทดสอบหาคูมาริน (coumarin)

ดูการเรืองแสงของสารบนกระดาษกรอง (ที่หยดด่างลงไปเล็กน้อย) ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ซึ่งจากผลการทดสอบ ไม่พบการเรืองแสง แสดงว่าไม่มีสารกลุ่มคูมาริน

2.4 การทดสอบหา ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ใช้วิธี ไซยานิดิน (cyanidin test) ผลการทดสอบ ปรากฏว่าไม่พบสารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์

3. การแยกสารโดยวิธีโครมาโตกราฟี

3.1 นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 1 ซึ่งผ่านการระเหยตัวทำละลายออก ภายใต้ความดันต่ำ ได้สารสกัดที่เข้มข้น ทิ้งไว้ในตู้เย็นจะมีเกลือตกผลึกลงมา กรองสารละลายและนำไประเหยให้เข้มข้นขึ้นทิ้งไว้ 1 คืน ในตู้เย็น จะมีผลึกรูปเข็มสีขาวตกผลึกลงมา ทำการกรองแยกผลึกออกมา ได้ปริมาณ 30 กรัม (s-1) นำไปวิเคราะห์โดยวิธีทางกายภาพได้ข้อมูลดังต่อไปนี้

commpound s-1

จุดหลอมเหลว (melting point)

167 - 168° C

Infrared spectrum (ภาพประกอบที่ 1)

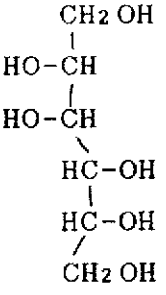
KBr ν (cm-1) 3450,3330 (OH-stretching), 1470,1430 (CH_2 bending), 1280,1090,1020,940 890,700

Proton Nuclear Magnetic Resonance : 90 MHz ,
D_2O (ภาพประกอบที่ 2)

3.5-4.1 ppm

Mass spectrum : EIMS 70 ev, 300 VA (ภาพประกอบที่ 3)
M/e : 183 (M^+,0.55) , 133 (13.3) , 103 (42.7),
73 (Base peak 100)

จากข้อมูลดังกล่าว เมื่อนำมาวิเคราะห์และประมวลผล พบว่าสารดังกล่าวเป็นน้ำตาลชนิดหนึ่ง ชื่อ Manitol ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์เป็นยาขับปัสสาวะ (Diuretic) อย่างอ่อน โดยมีสูตรโครงสร้าง ดังนี้



Manitol

3.2 นำสารสกัดที่เหลือมาระเหยเอาตัวทำละลายออก ได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียวสีเขียวน้ำตาล นำสารสกัดมาผ่านกรรมวิธีโครมาโตกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick column chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane) แล้วจึงค่อยๆ เพิ่มเติมอัตราส่วนของเอธิลอะซีเตต (Ethy acetate) สุดท้ายเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง เอธิลอะซีเตต กับ เมธานอล เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ส่วนละ 80 มล. นำแต่ละส่วนมาตรวจสอบโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin-layer chromatography) รวมส่วนที่เหมือนกันเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นนำส่วนที่มี spot ที่น่าสนใจไปทำการแยกต่อ โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี และวิธีโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (preparative thin layer chromatography) สามารถแยกสารได้ 3 ชนิด คือ S-2 , S-3 และ S-4 เมื่อนำไปวิเคราะห์โดยวิธีทางสเปคโตรสโคปี จะได้ข้อมูลดังต่อไปนี้

compond S - 2
มีลักษณะเป็นน้ำมันใสสีเหลืองอ่อนๆ มีปริมาณ 10 มก.
Infrared spectroscopy : KBr_{max} (cm^{-1})
(ภาพประกอบที่ 4)

2960 (C-H stretching ใน CH_3)

1725 (carbonyl stretching)

1350 (C-H bending)

1060 - 1040 (C-O stretching)

Proton Nuclear Magnetic Resonance : 90 MHz, $CDCl_3$

(ภาพประกอบที่ 5)

chemical Shift (ppm)

7.90-7.40 (aromatic proton)

4.21 (doublet เป็นของ $-O-CH_2-$)

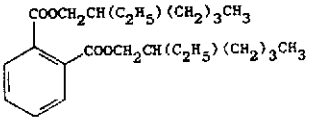
1.55-0.80 ($(CH_2)_6CH_3$)

Mass spectrometry : EIMS (ภาพประกอบที่ 6)

M/e: 390 (M^+,0.42) , 279(22.2),

206 (3.5) , 167(42.2),149 (Base peak,100)

จากข้อมูลดังกล่าว เมื่อนำมาวิเคราะห์ และเปรียบเทียบกับสเปคตรัมของสารมาตรฐานแล้วพบว่าสารดังกล่าว คือ Dioctyl phthalate โดยมีสูตรโครงสร้างดังนี้



Dioctyl phthalate

compound S-3

มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว มีปริมาณ 12 มก.

จุดหลอมเหลว (Melting point)

140-141°c

Infrared spectroscopy : $^{KBr}\nu_{max}$ (cm^{-1})

(ภาพประกอบที่ 7)

3400 (O-H Stretching)

2950 (C-H Stretching ของ CH_3)

1460 (CH_2 bending)

1380 (CH_3 bending)

1050-960 (C-O stretching)

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

Proton Nuclear Magnetic Resonance: 90 MHz,$CDCl_3$
(ภาพประกอบที่ 8)

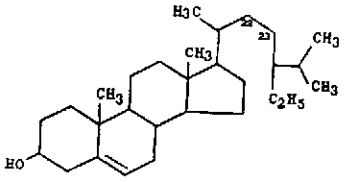
chemical shift (ppm.)

5.90	(-CH=C)
3.50	(hydroxy,OH)
0.23-0.70	(CH,CH_2,CH_3

Mass Spectrometry : EIMS (ภาพประกอบที่ 9)

m/e : 414 (M^+,Base peak 100), 396 (38.8), 329(26.1), 303(32.8) 273(26.3) , 255(35.3)

จากข้อมูลดังกล่าวเมื่อดูลักษณะ pattern ของ NMR น่าจะเป็นสารในกลุ่ม Steroid หรือ triterpenoid เนื่องจากมีสัญญาณของกลุ่ม Hydrocarbon อยู่หนาแน่นในย่าน 0.23-0.70 ppm และจากการพบว่ามีมวล 414 ซึ่งเมื่อค้นดูแล้วพบว่า น่าจะเป็น β-sitosterol เมื่อนำมาวิเคราะห์ และเปรียบเทียบกับสาร authentic ดูแล้วพอจะสรุปได้ว่าสารตัว นี้คือ -Sitosterol โดยมีสูตรโครงสร้างดังนี้



β-Sitosterol

compound S-4

มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวรูปเข็ม มีปริมาณ 15 มก.

จุดหลอมเหลว (Melting point)

124-125°c

Infrared spectrum : $^{KBr}\nu_{max}$ (cm^{-1})
(ภาพประกอบที่ 10)

3360	(O-H Stretching)
2950	(C-H) Stretching ใน CH_3
1480	(CH_2 bending)
1360	(CH_3 bending)

Proton Nuclear Magnetic Resonance: 90 MHz, $CDCl_3$

ภาพประกอบที่ 11

chemical shift (ppm.)

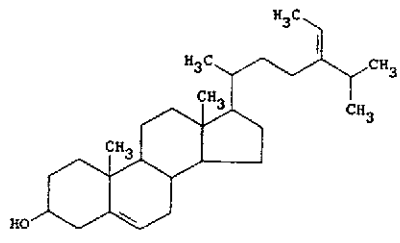
	CH_3 v
5.20 -	(H, C = CH)
5.35 -	(H, CH = C -)
3.51	(hydroxy , OH)
2.31-0.68	(CH,CH_2 ,CH_3)

Mass Spectrometry : EIMS (ภาพประกอบที่ 12)

m/e : 412 (M^+, 11.5) , 394 (7.0),

314 (Base peak, 100),299 (23.0)

จากข้อมูลที่ได้ เมื่อนำมาวิเคราะห์ จาก แมสสเปคตรัมพบว่าน้ำหนักโมเลกุลขาดไป 2 หน่วย เมื่อเปรียบเทียบกับ β -Sitosterol แสดงว่าโครงสร้างขาดโปรตอนไป 2 ตัว และเมื่อดูนิวเคลียร์แมกเนติค เรโซแนนซ์ สเปคตรัม พบว่าสัญญาณที่ 5.35 - 5.25 ppm มี Intregration เป็น 2 เท่า ของโปรตอนตรงตำแหน่ง 3.51 ซึ่งเป็นของไฮดรอกซีโปรตอน (hydroxy proton) แสดงว่ามีโปรตอนที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated proton) อยู่ 2 ตัว และเมื่อสังเกตุลักษณะของ มีสัญญาณที่เป็น quartet (ที่ 5.20 ppm) ซ้อนอยู่กับสัญญาณที่ 5.35 จึงพอจะสรุปได้ว่าโครงสร้างดังกล่าวน่าจะคล้ายกับ β -Sitosterol แต่มีพันธะคู่เพิ่มขึ้นอีก 1 พันธะ โดยโปรตอนบนพันธะดังกล่าวมีเพียง 1 โปรตอน และจะต้องมี หมู่เมทธิลอยู่ข้างเคียงทำให้โปรตอน ตัวดังกล่าวเกิดการ Coupling ได้ลักษณะของสัญญาณเป็น quartet ซึ่งสอดคล้องกับสารที่ชื่อ Fucosterol โดยมีโครงสร้างดังนี้



Fucosterol

4. การวิเคราะห์หาโลหะหนักที่สำคัญในสาหร่าย

เราทำการวิเคราะห์โลหะหนักที่สำคัญในสาหร่าย โดยอาศัยเทคนิคใหม่ในการวิเคราะห์ โดยใช้เทคนิค ICP-AES (Inductively coupling Plasma - Atomic Emisson spectroscopy) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ความเที่ยงตรง ในการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักในระดับปริมาณต่ำๆ และข้อดีคือ สามารถวิเคราะห์ธาตุหลายๆ ธาตุในเวลาเดียวกัน โดยไม่ต้องใช้วิธีการเปลี่ยนแหล่งกำเนิดแสง ทำให้สะดวกมากในการวิเคราะห์ในกรณีที่มีจำนวนธาตุมาก

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก ในสาหร่ายจำนวน 5 ตัวอย่าง มีดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงความเข้มข้น (ppm) ของธาตุ Cu, Pb, Zn และ Cd. ของตัวอย่างสาหร่าย

ธาตุ	ความเข้มข้น(ppm)	เฉลี่ย
Cu	3.04	3.61 ppm
	5.23	
	2.74	
	3.51	
	3.53	
Pb	0.52	0.41 ppm
	0.65	
	0.33	
	0.26	
	0.29	
Zn	5.30	4.50 ppm
	5.77	
	2.58	
	4.24	
	4.61	
Cd	0.55	0.48 ppm
	0.59	
	0.38	
	0.40	
	0.48	