บทที่ 4
วิธีการวิจัย

2. การสกัดสาร

สาหร่ายที่นำมาวิจัย เก็บจากบริเวณหน้าสถานีประมงจังหวัดพังงา นำขึ้นมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วตากให้แห้งในที่ร่ม จากนั้นนำมาบดเป็นผงละเอียด ได้สาหร่ายหนัก 8 กิโลกรัม นำมาหมักในเมธานอล จำนวน 16 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน แล้วกรองเอาสารสกัดที่ได้ มาทำการระเหยให้ได้สารละลายที่ข้นขึ้น มีปริมาตร 4 ลิตร นำไปแช่ในตู้เย็น เพื่อตกตะกอนเกลืออกไปจากสารละลาย หลังจากนั้น นำมาระเหยให้สารละลายเข้มข้นขึ้น มีปริมาตร 2 ลิตร แล้วนำไปแช่ในตู้เย็น จะพบว่ามีสารผลึกตกลงมาเป็นจำนวนมาก มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวรูปเข็ม (S-1) มีปริมาณ 30 กรัม

นำสารสกัดที่เหลือจากการกรองเอา S-1 ออกหมดแล้ว นำมาทำการระเหยให้แห้ง ได้สารสกัดหนัก 28 กรัม

3. การทดสอบประเภทของสารอินทรีย์ในสาหร่าย

3.1 การทดสอบอัลคาลอยด์ (Alkaloids)

อัลคาลอยด์ จะทำปฏิกิริยากับ reagent หลายชนิดเกิดเป็นตะกอนที่ไม่ละลาย จึงใช้ตรวจสอบว่ามี อัลคาลอยด์ อยู่ในพืชหรือสิ่งสกัดจากพืช ในการตรวจสอบจะต้องให้อัลคาลอยด์ อยู่ในรูปของสารละลายมักใช้ dilute acid extract ของพืช ตะกอนที่เกิดขึ้นได้จากการเติม reagent 2-3 หยด ลงในสิ่งสกัดจากพืช ลักษณะของตะกอน อาจเป็น amorphous หรือเกิดเป็นรูปผลึก ซึ่งบางชนิด รูปผลึก จะมีรูปร่างและสีเฉพาะ ที่สามารถใช้เป็นข้อสังเกตุในการ identify อัลคาลอยด์

เราจะใช้ reagent ที่ใช้ในการทดสอบอัลคาลอยด์ อันได้แก่ ดารเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) ซึ่งจะให้ตะกอนสีส้ม, มาร์ม (Marme's reagent) จะได้ตะกอนสีขาว และ แวกเนอร์ (Wagner's reagent) จะได้ตะกอนสีน้ำตาล โดยนำเอาสารสกัดที่ได้มาเล็กน้อย เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลาร์ จำนวน 15 มล. คนและอุ่นในหม้อต้มน้ำ 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วกรอง แบ่ง

สารละลายที่กรองได้ ใส่ในถาดหลุม 4 หลุม นำน้ำยาทดสอบ หยดลงไปในแต่ละหลุม เปรียบเทียบกับหลุมที่ไม่ได้หยด

3.2 การทดสอบหาสเตอรอยด์ (steroids) และไตรเทอร์ปีนอยด์ (**Triterpenoids**)

นำ alcoholic extract ประมาณ 5 มล. ใส่ใน evaporating dish ระเหยบน water bath ให้แห้ง ทำให้เย็นลง ใส่ petroleum ether เพื่อละลายสีที่ติดออกมา เอา residue มาละลายใน chloroform แล้วกรอง จากนั้นแบ่งออก เป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 ใช้เป็น reference

ส่วนที่ 2 เติม acetic anhydride 3 หยด ผสมให้เข้ากันแล้วเติมกรดซัลฟูริก 2-3 หยด

สังเกตุสีที่เกิดขึ้นถ้าสารมีสเตอรอยด์อยู่จะให้สีน้ำเงินถึงสีเขียว ถ้าสารมีไตรเทอร์ปีนอยด์ จะให้สีแดงถึงแดงม่วง

3.3 การทดสอบหาคูมาริน (coumarins)

สารประเภทคูมาริน เมื่อละลายในเบสจะทำให้วงแหวนไพโรน เปิดออกได้เป็น 6-hydroxy cinnamic acid ซึ่งเป็นแบบซิส (cis-form) ไม่เรืองแสง แต่เมื่อถูกแสงอุลตราไวโอเลต จะเปลี่ยนเป็นแบบทราน (trans form) ซึ่งจะเรืองแสงสีเขียวอมเหลือง โดยนำกระดาษกรองชุบสารสกัด แล้วนำไปหยดด้วยด่าง N NaOH นำกระดาษกรองไปวางไว้ในแสงอุลตราไวโอเลต สังเกตุการเรืองแสง

3.4 การทดสอบหาฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

การทดสอบฟลาโวนอยด์ จะใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของไซยานิดิน (cyanidin) กับลิวโคแอนโทไซยานิน (leucoanthocyanin) การตรวจสอบว่าเป็น aglycone หรือ glycoside นั้น ให้สังเกตุสีในชั้นออกทานอล (octanol) โดย glycoside จะไม่ให้สีในชั้นออกทานอล ส่วน aglycone จะให้สีในชั้นออกทานอลและชั้นน้ำไม่มีสี การสังเกตุสี ถ้าในชั้นออกทานอลให้สีส้มถึงสีแดงแสดงว่าเป็นฟลาโวน(Flavone) ถ้าให้สีแดงเลือดหมูแสดงว่าเป็น ฟลาโวนอล (Flavonols) และถ้าให้สีแดงเลือดหมูถึงม่วงแดงว่าเป็น ฟลาวาโนน (Flavanones) โดยนำสารสกัดมาเล็กน้อย สกัดไขมันออก

ด้วย petroleumether 15 มล. แยกเอาชั้น petroleum ether ออกเติม เอธานอล 10 มล. กรองแบ่งสารละลายที่ได้เป็น 3 ส่วน นำไปทดสอบการเปลี่ยนสีของไซยานิดิน >และลิวโคแอนโทไซยานินเทียบกับหลอดที่ 1 ซึ่งเป็นหลอดเปรียบเทียบ

การทดสอบไซยานิดิน

นำสารละลายในหลอดทดสอบที่ 2 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 มล. และใส่ชิ้นแมกนีเซียม 3-4 ชิ้น เติม น้ำกลั่น 1-2 มล. เติม ออกทานอล 1 มล. เขย่าให้แยกชั้นสังเกตุสีในแต่ละชั้น

การทดสอบลิวโคแอนโทไซยานิน

นำสารละลายในหลอดทดสอบที่ 3 เติมสาระลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นจำนวน 0.5 มล. อุ่น 3 นาที ดูการเปลี่ยนสีของสารละลาย

4. การแยกสกัดสารด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 2 มาละลายกับ ether เพื่อแยกเกลือที่ยังตกค้างอยู่ นำสารชั้น ether มาระเหยให้แห้ง แล้วนำมาแบ่งเป็น 4 ส่วน แต่ละส่วนนำมาแยกโดยใช้เทคนิค คอลัมน์โครมาโตรกราฟีแบบรวดเร็ว (Quick column chromatography) โดยใช้ เฮกเซน (Hexane) เป็นตัวทำละลาย จากนั้นค่อยๆ เพิ่มอัตราส่วนของเอธิลอะซีเตต (Ethyl acetate) สุดท้ายเปลี่ยนตัวทำละลายผสมระหว่างเอธิลอะซีเตต กับ เมธานอล เก็บตัวทำละลายที่ถูกชะล้างออกมาเป็นส่วนๆ ละ 100 มล. ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบรวดเร็ว

No	ตัวทำละลาย		ลักษณะของสาร
1	Hexane		เป็นสารเหนียวสีเขียวน้ำตาล
2	Hexane:	9:1	เป็นสารเหนียวสีเขียว
3	Hexane:Ethyl acetate	9:1	เป็นสารเหนียวสีเขียว
4-6		8:1	เป็นสารเหนียวสีเหลืองอ่อน
7-8		4:1	เป็นสารเหนียวสีเหลือง
9-12		3:1	เป็นสารเหนียวสีเหลือง
13-15		2:1	เป็นสารเหนียวสีขาวเหลือง
16-20	Ethyl acetate		เป็นสารเหนียวสีขาวเหลือง
21-22	Ethyl acetate:methanol	9:1	เป็นสารเหนียวสีขาวเขียว
23		7:1	เป็นสารเหนียวสีขาวเขียว
24		5:1	เป็นสารเหนียวสีขาวเขียว

ในส่วนที่ 7-8 เราพบว่ามีลักษณะ TLC ที่น่าสนใจ มี 3 spot นำมาแยกต่อโดยใช้ คอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้คอลัมน์ขนาดกลาง เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจลหนัก 80 กรัม เป็นตัวดูดซับ แล้วชะด้วยเฮกเซน: เอทธิลอะซีเตด (4:0.5) จากนั้นนำมาทำ preparative thin-layer chromatography สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 1 ชนิด ปริมาณ 10 มก. (S-4) มีลักษณะเป็นน้ำมัน (oil) ส่วนสารอีก 2 ชนิดมีปริมาณน้อยและไม่สามารถแยกเป็นสารบริสุทธิ์ได้

ในส่วนที่ 13-15 เราพบว่ามีลักษณะ TLC ที่น่าสนใจอยู่ 3 spot นำมาแยกต่อโดยใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร ใช้ซิลิกาเจล 60 กรัม เป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วยตัวทำละลาย คลอโรฟอร์ม: เอทิลอะซีเตด ในอัตราส่วน 9:1 , 8:1 , 6:1 , 4:1 และ เอทิลอะซีเตดเพียงอย่างเดียว เราพบว่าส่วนที่ 7-8 ซึ่งชะด้วยคลอโรฟอร์ม: เอทิลอะซีเตด ในอัตราส่วน 8:1 ได้สารที่มี

ลักษณะผลึกสีขาว (S-3) จำนวน 12 มิลลิกรัม ในส่วนที่ 12-14 ซึ่งชะด้วยคลอโรฟอร์ม: เอทิลอะซีเตต ในอัตราส่วน 6:1 ได้สารมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวรูปเข็ม (S-3) จำนวน 15 มิลลิกรัม

สำหรับ สารสกัดในส่วนที่ถูกชะออกด้วยเอทิลอะซีเตต กับ เมธานอล ได้นำมาแยกต่อโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance Liquid chromatography) โดยมีสภาวะการทดลอง ดังนี้

Column : Bonclone 10 C-18 (300 x 3.9 mm)

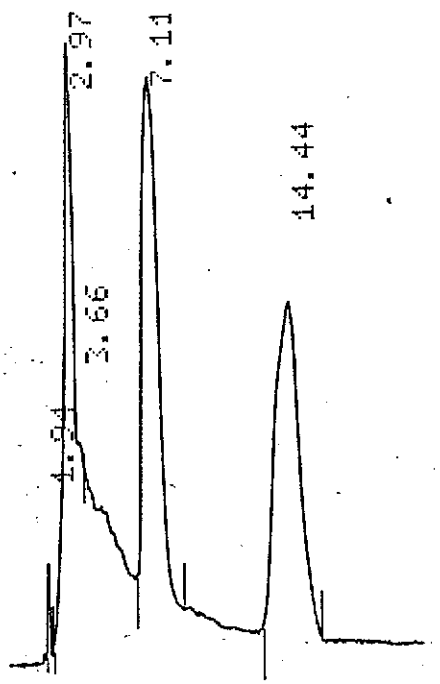
Mobile phase: MeOH : H_2O

60 : 40

Flow rate : 0.9 ml/min

Detector : UV-vis at 420 nm (0.2 AUFS)

Injection volumn : 60 l.



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของสารสกัดที่ถูกชะออกด้วยเอทิลอะซีเตตกับเมธานอล

ลักษณะโครมาโตแกรม (chromatogram) ที่ได้จะแสดงในรูปที่ 2 เราพบพีคของสารที่เด่นชัด ที่เวลา 2.92 , 7.11 และ 14.44 นาที เมื่อทำการแยกซ้ำหลายๆ ครั้ง พบว่าปริมาณสารที่แยกได้แต่ละตัวมีปริมาณน้อยมาก พบว่าสารที่แยกได้มี

ลักษณะเป็นของเหลวข้นคล้ายน้ำมัน เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางกายภาพ พบว่าสารที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ ยังมีสารเจือปนอยู่ เมื่อนำไปแยกด้วยคอลัมน์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นคือ spherisorb ODS-2 (250 x 10 mm) พบว่าสารที่แยกได้ยังมีลักษณะเช่นเดิมและไม่บริสุทธิ์

5. การวิเคราะห์หาโลหะหนักที่สำคัญในสาหร่าย

นำสาหร่ายแห้งมาอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซนเซียส เป็นเวลา 24 ช.ม. แล้วบดให้ละเอียดในโกร่ง ชั่งผงสาหร่ายมา 4.0 กรัม (จำนวน 5 ตัวอย่าง) ใส่ลงใน crucible แล้วนำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle furnance) ที่ 450 องศาเซนเซียส เป็นเวลา 16 ช.ม. จากนั้นทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำเถ้าที่ได้ไปย่อยสลายด้วย 1N HNO_3 และให้ความร้อนจนกระทั่งสารใน crucible แห้ง ละลายส่วนที่เหลืออยู่นี้ด้วย 0.1 N HNO_3 จำนวน 40 มล. นำมากรองผ่าน membrane filter ได้สารละลายที่ใส เก็บในขวดโพลีเอธิลีน เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อ

เราทำการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก 4 ชนิด คือ Zn ,Cd,Pb,และ Cu โดยใช้เทคนิค ICP-AES (Inductiveiy Coupling Plasma - Atomic Emission Spectroscopy)

เราทำการเตรียม สารละลายมาตรฐานของธาตุแต่ละธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ โดยให้มีความเข้มข้นดังตารางที่2

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์ธาตุ Zn,Cd,pb และ Cu

ธาตุ	S_1 (ppm)	S_2 (ppm)
Zn	10	50
Cd	1	10
Pb	2	10
Cu	1	5

S_1 = Standard 1

S_2 = Standard 2