



ภาพ 4.4 ลักษณะการคลุมถาดหลุมที่ปลูกต้นอ่อนขมิ้นด้วยถุงพลาสติกใส



ภาพ 4.5 ลักษณะของต้นอ่อนขมิ้นชั้นภาพหลังการย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 1 สัปดาห์



ภาพ 4.6 ลักษณะการย้ายต้นอ่อนขมิ้นชั้นออกปลูกในเรือนเพาะชำ



ภาพ 4.7 ลักษณะของต้นอ่อนขมิ้นชันภายใต้การย้ายออกปลูกในเรือนเพาะชำเป็นเวลา 8 สัปดาห์

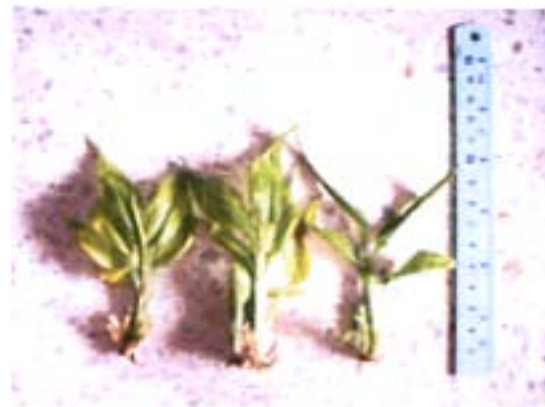
การทดลองที่ 4 การสกัด และแยกสารสกัดของขมิ้นชันโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีผิวบาง

#### การทดลองที่ 4.1. การสกัดสารจากส่วนต่างๆ ของขมิ้นชัน

จากการนำส่วนต่างๆ ของขมิ้นชันทั้งหมด 10 ส่วน คือ ใบ ลำต้น ราก และเหง้าจากธรรมชาติ ใบ ลำต้น และรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใบ ลำต้น รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก มาสกัดสาร

ลักษณะต้นขมิ้นชันจากธรรมชาติอายุ 2 เดือนก่อนนำมาสกัดสารจะมีใบสีเขียวเข้ม เรียวยาวใหญ่ ผิวใบมันวาว ลำต้นสีเขียวอ่อน ค่อนข้างแข็ง มีรากจำนวนมาก ส่วนเหง้าขนาดใหญ่เนื้อในมีสีเหลืองอมส้ม

ลักษณะของต้นขมิ้นชันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก่อนนำมาสกัดสารซึ่งมีอายุ 6 สัปดาห์ (ภาพ 4.8) จะมีใบเรียวยาวขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน ผิวใบไม่มันวาว ลำต้นเหนียวเป็นก้านขนาดเล็กสีเขียวอ่อน



ภาพ 4.8 ลักษณะต้นขมิ้นชันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 6 สัปดาห์

ส่วนลักษณะดินอ่อนขมึนชั้นที่มีอายุ 8 สัปดาห์ ซึ่งได้จากการย้ายดินขมึนชั้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูก ก่อนนำมาสกัดสาร (ภาพ 4.9) ใบมีสีเขียวเข้ม ลักษณะเรียบ เรียวยาว ขนาดใหญ่ หนากว่าดินอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่เล็กกว่าดินจากธรรมชาติ ลำต้นเหนือดินค่อนข้างแข็งแรง หนากว่าดินจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ลักษณะของรากมีทั้งรากฝอย และรากขนาดใหญ่ บางต้นมีปมราก แต่ยังไม่มีการ



ภาพ 4.9 ลักษณะของดินขมึนชั้นที่ได้จากการย้ายดินขมึนชั้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อออกปลูก ก่อนนำมาสกัดสาร

ก่อนสกัดสารจะนำเอาส่วนต่างๆ ของขมึนชั้นที่ได้จากแหล่งต่างๆ ไปอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วชั่งให้ได้ 6.33 กรัม เท่ากัน แล้วนำไปสกัดด้วยเอทานอล 95% ได้น้ำหนักสารที่สกัดได้ แล้ว เปรูเซ็นต์น้ำหนักของสารสกัด ดังตาราง 4.5 และลักษณะของสารที่สกัดได้ ดังตาราง 4.6

ตาราง 4.5 น้ำหนักของสารสกัดที่ได้จากส่วนต่างๆ ของขมิ้นโดยเอทานอล

	แหล่งของขมิ้นชัน									
	ธรรมชาติ				เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ			เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วย้ายออกปลูก		
	ใบ	ต้น	ราก	เหง้า	ใบ	ต้น	ราก	ใบ	ต้น	ราก
นน.สารที่สกัดได้	1.707	1.654	2.614	2.677	2.009	2.542	2.285	1.810	1.225	2.769
%นน.สารสกัด	26.94	26.10	41.28	42.26	31.71	40.13	36.08	28.58	19.34	43.72

ตาราง 4.6 ลักษณะของสารสกัดที่ได้จากส่วนต่างๆ ของขมิ้นชันโดยเอทานอล

แหล่งที่มา	ลักษณะของสารสกัด
จากธรรมชาติ	
ใบ	ชั้นเหนียว มีสีขาวเข้มอมเหลือง
ต้น	น้ำมันสีน้ำตาลแดง
ราก	น้ำมันมีน้ำตาลอ่อน
เหง้า	น้ำมันสีเหลืองอมส้ม
จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	
ใบ	ชั้นเหนียวสีซีขาวอ่อน
ต้น	ชั้นเหนียว สีเขียวและมีน้ำมันสีน้ำตาล
ราก	น้ำมันสีน้ำตาลอ่อน มีหยดน้ำมันสีน้ำตาลเข้มลอยอยู่
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วย้ายออกปลูก	
ใบ	ชั้นเหนียวสีซีขาวเข้ม
ต้น	ชั้นเหนียว สีน้ำตาลอ่อนออกเหลือง
ราก	เป็นน้ำมันสีน้ำตาลอ่อน มีหยดน้ำมันสีน้ำตาลเข้มลอยอยู่

#### การทดลองที่ 4.2 การแยกสารสกัดโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีผิวบาง

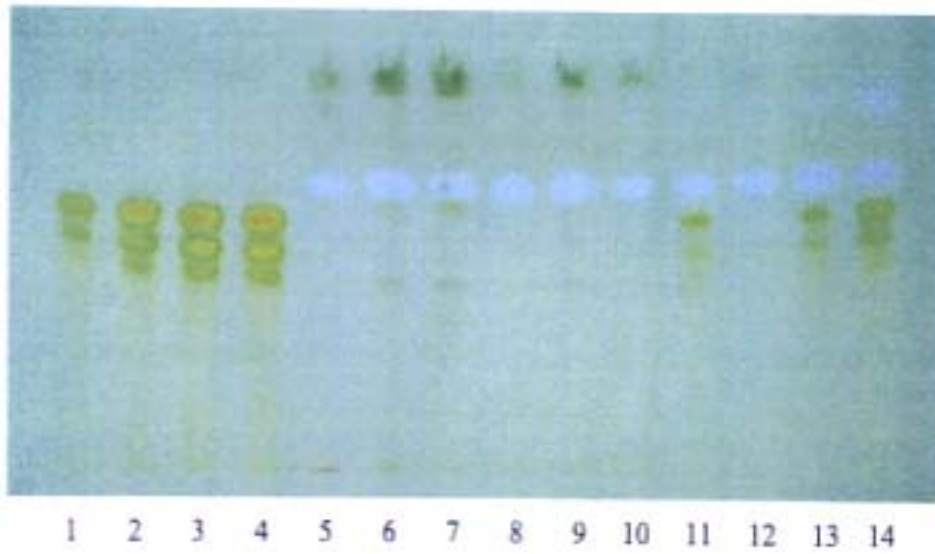
จากการสกัดสารจากส่วนต่างๆ ของขมิ้นชันที่มาจาก 3 แหล่ง คือ จากธรรมชาติ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และจากการย้ายปลูกต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยเอทานอล 95% และแยกสารด้วยวิธี TLC โดยใช้ความเข้มข้นของสารตัวอย่างให้เท่ากับ 5% ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และใช้เซอร์คูมิน ความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1.0% และ 2.0% ปริมาณ 2 ไมโครลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน spot สาร ด้วยเครื่อง Automatic TLC Sample 4 แล้วแยกสารโดยตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ เฮกเซน: คลอโรฟอร์ม: เอทานอล อัตราส่วน 4.1:4.9:1.0 v/v พบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของขมิ้นชัน 10 ส่วน คือ ใบ ลำต้น ราก และเหง้าจากธรรมชาติ ใบ ลำต้น และรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ใบ ลำต้น รากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก จะมีแถบที่แตกต่างกัน (ภาพ 4.10 และ 4.11) โดยสารที่สกัดส่วนเดียวกันแต่มาจากแหล่งต่างกันจะมีลักษณะของแถบ และค่า  $R_f$  ใกล้เคียงกัน (ตาราง 4.7) สารละลายมาตรฐาน (curcumin) ทั้ง 4 ความเข้มข้น จะมีจำนวนแถบน้อยที่สุด คือ 3 แถบ โดยมีค่า  $R_f$  เฉลี่ยในแต่ละแถบเท่ากับ 0.48, 0.52 และ 0.59 ซึ่งเป็นสาร บิสดีเมโทซิฟิเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin), ดีเมโทซิฟิเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) และเซอร์คูมิน (curcumin) ตามลำดับ

สารสกัดจากใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูกจะมี 4 แถบ (มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.43, 0.65, 0.85 และ 0.90) เหมือนกัน ซึ่งมากกว่าใบที่ได้จากธรรมชาติที่มี 3 แถบ (ไม่มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.43)

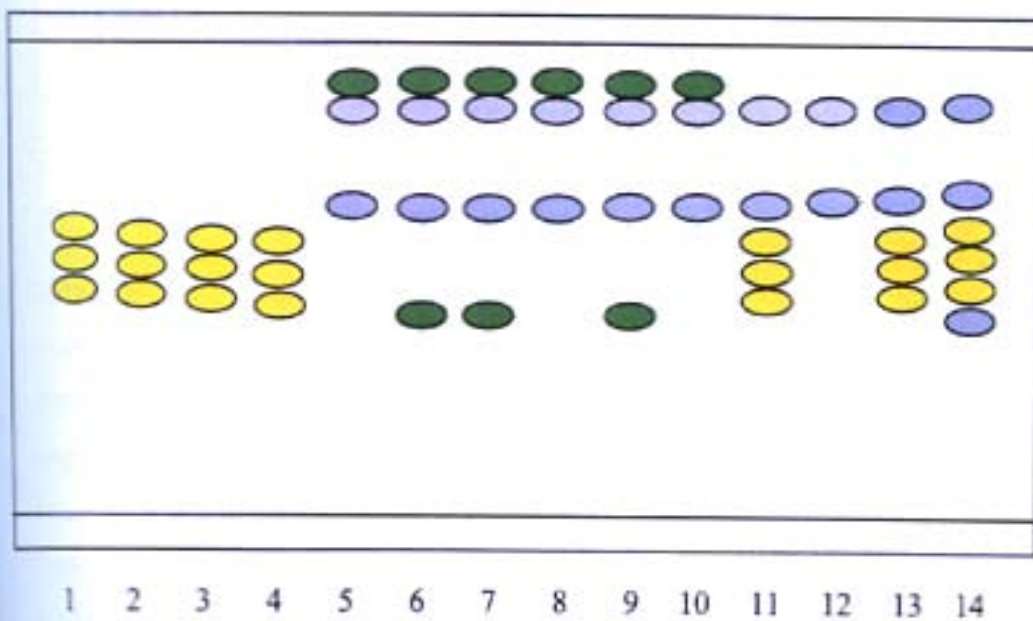
ส่วนสารสกัดจากลำต้นที่ได้จากธรรมชาติ และลำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูกจะมี 3 แถบ (มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.65, 0.85 และ 0.90) เหมือนกัน ซึ่งต่างจากลำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มี 4 แถบ (มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.43, 0.65, 0.85 และ 0.90)

ส่วนของรากที่ได้จากธรรมชาติ และรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูกจะมี 5 แถบ (มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.46, 0.52, 0.58, 0.66 และ 0.87) ส่วนรากที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีเพียง 2 แถบ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.66 และ 0.87

ส่วนของเหง้าจะมีแถบมากที่สุด คือ 6 แถบ ซึ่งมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.36, 0.49, 0.55, 0.61, 0.68 และ 0.88



ภาพ 4.10 TLC โครมาโตแกรมส่วนต่างๆ ของขมิ้นชันที่สกัดด้วยเอทานอล เมื่อใช้ curcumin เป็นสารมาตรฐาน และใช้เฮกเซน: กลอโรฟอร์ม: เอทานอล อัตราส่วน 4.1:4.9:1.0 v/v เป็นตัวทำละลาย ที่ส่องที่ ได้แสง UV 254 nm



ภาพ 4.11 โดอะแกรม TLC โครมาโตแกรมของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของขมิ้นชัน และสารมาตรฐาน

หมายเหตุ

1-4 คือ สารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1.0% และ 2.0% ตามลำดับ

5-7 คือ ใบที่ได้จากธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก ตามลำดับ

8-10 คือ ลำต้น ที่ได้จากธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก ตามลำดับ

11-13 คือ รากที่ได้จากธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก ตามลำดับ

14 คือ เหง้าที่ได้จากธรรมชาติ

ตาราง 4.7 เปรียบเทียบค่า  $R_p$  ของสารที่ได้จากส่วนต่างๆ ของขมิ้นดำจาก 3 แหล่ง

แบบ ที่	ค่า $R_p$													
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*	11*	12*	13*	14*
1	0.48	0.47	0.46	0.45		0.43	0.43		0.43		0.46		0.46	0.38
2	0.53	0.52	0.51	0.51	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.52		0.53	0.49
3	0.60	0.59	0.57	0.56	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.58		0.59	0.55
4					0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.66	0.66	0.67	0.61
5											0.87	0.87	0.87	0.68
6														0.88

\*หมายเหตุ

1\*-4\* คือ สารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินความเข้มข้น 0.1%, 0.5%, 1.0% และ 2.0% ตามลำดับ

5\*-7\* คือ ใบที่ได้จากธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก ตามลำดับ

8\*-10\* คือ ลำต้น ที่ได้จากธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก ตามลำดับ

11\*-13\* คือ รากที่ได้จากธรรมชาติ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก ตามลำดับ

14\* คือ เหง้าที่ได้จากธรรมชาติ

เมื่อนำแผ่นโครมาโตแกรมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 nm ด้วยเครื่อง Manual TLC Scanner 3 จะได้ peak การดูดกลืนแสงที่ค่า  $R_f$  ต่างๆ ของสาร จากการดูตำแหน่งของสารที่ spot ภายใต้อัลตราไวโอเล็ต 254 nm สารมาตรฐานมีค่า  $R_f$  อยู่ระหว่าง 0.46 ถึง 0.60 และเมื่อดูที่ peak ในช่วง  $R_f$  ดังกล่าวที่สูงต่ำตามความเข้มข้นของสารมาตรฐานอย่างเด่นชัดจึง integrate เลือก peak ในช่วง  $R_f$  ดังกล่าวในทุกสารที่ spot โยเมื่อเลือกช่วง  $R_f$  ดังกล่าวแล้วเครื่อง Manual TLC Scanner 3 จะรายงานว่าพบ substance 1 คือสารจากกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ ในรากจากธรรมชาติ รากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก และเหง้าจากธรรมชาติ (ภาพ 4.11) และจะรายงานค่า  $R_f$  ของสารในช่วง peak ที่กำหนด โดยสารมาตรฐาน 0.1% จะมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.53 และ 0.98 สารมาตรฐาน 1% จะมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.54 สารมาตรฐาน 2% จะมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.53 รากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูกมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.55 และเหง้าจากธรรมชาติ มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.57

เพื่อยืนยันว่าสารมาตรฐาน และสารที่พบในส่วนดังกล่าวเป็นสารชนิดเดียวกันจึง scan wavelength (nm) และ Absorption unit ของสารมาตรฐานทั้ง 4 ความเข้มข้น (ภาพ 4.12) และสารตัวอย่างจากรากจากธรรมชาติ รากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วย้ายออกปลูก และเหง้าจากธรรมชาติ ในช่วง  $R_f$  ที่เลือก (ภาพ 4.13) พบว่าสารตัวอย่างจากส่วนดังกล่าวเป็นสารชนิดเดียวกับสารมาตรฐานเนื่องจากมี peak ที่เหมือนกันกับสารมาตรฐาน

จากการ integrate เลือกช่วงการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานจะได้กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน และเมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างในช่วงเดียวกันกับสารมาตรฐานจะทราบปริมาณสารเทอร์ปีนในสารตัวอย่าง (ภาพ 4.13)