3 วิธีการ และ เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้

- Acetic anhydride
- Benzoyl chloride
- 4-bromo benzoyl chloride
- 4-methoxy benzoyl chloride
- 4-nitro benzoyl chloride
- DMAP (Dimethylaminopyridine)
- Pyridine
- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical
- Perchloric acid
- Glacial acetic acid
- Thiobarbutiric acid
- Dichloromethane
- Hexane
- Ethyl acetate
- Ethanol

2. เครื่องมือ

- Rotary evaporator
- Magnetic stirrer
- Spectrophotometer
- Centrifuge
- Water-bath
- UV-spectrophotometer
- Micro plate reader

<u>การทดลอง</u>

1 <u>เก็บตัวอย่างต้นส่องฟ้าดง</u>

ทำการเก็บตัวอย่างต้นส่องฟ้า (*Clausená harmandiana*) จากจังหวัดกาฬสินธ์ เมื่อ ปี พ.ศ. 2551 โดยจะทำการแยกเอาเฉพาะส่วนของเปลือกราก มาล้าง และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดย่อยให้มีขนาดเล็ก เพื่อรอการสกัดแยกต่อไป

2 <u>การสกัดแยกสาร coumarins จากต้นส่องฟ้า</u>

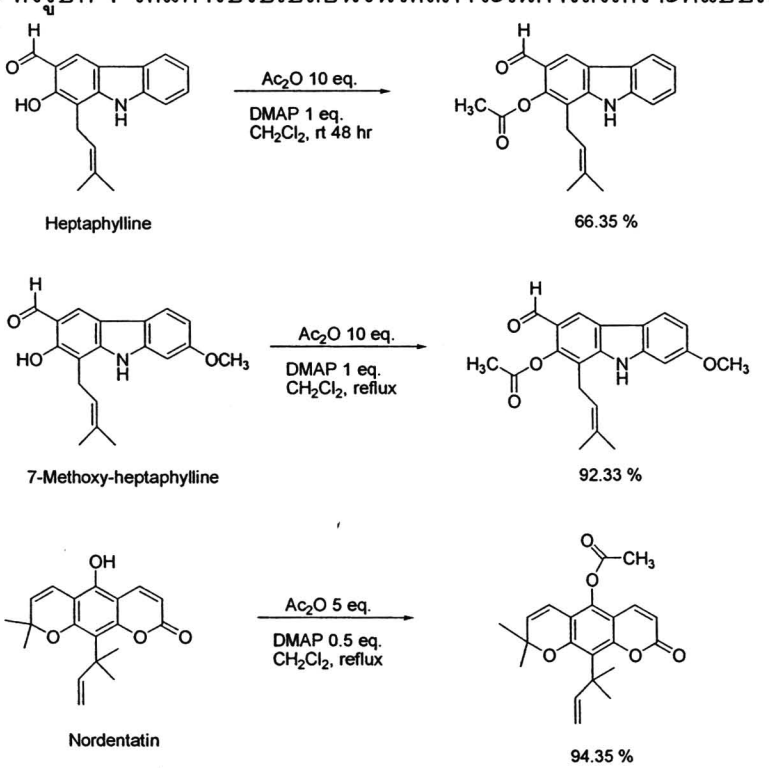
นำเปลือกรากรากที่บดละเอียดแล้วมาหมักด้วย methanol จำนวน 3-4 ครั้ง จากนั้นนำส่วน methanol ที่กรองได้จากการหมัก ไประเหยแห้ง ด้วยเครื่อง rotary evaporator ส่วนกากที่เหลือนำไปแช่สกัดด้วย methanol อีกครั้ง ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง จากนั้นรวบรวมสารสกัดชั้น methanol-น้ำที่ทำให้เข้มข้นมาทำการ partition ต่อด้วย hexane และ dichloromethane ตามลำดับ นำส่วน hexane และ dichloromethane ที่ระเหยแห้งแล้วไปทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธีทาง chromatography โดยใช้สารผสมของ chloroform, dichloromethane, ethyl-acetate, hexane และ methanol เป็นตัวชะ ดังแสดงตามแผนภาพที่ 1

3 <u>การพิสูจน์เอกลักษณ์ของโครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม coumarin</u>

สารที่สกัดแยกได้จากต้นส่องฟ้าทุกตัว รวมทั้งสารที่ได้จากการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีจะนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ ด้วยเครื่อง IR spectroscopy, mass spectrometry และ NMR spectroscopy โดยทำการเปรียบเทียบกับสารเดิมที่มีอยู่ก่อนหน้านี้แล้ว

4 <u>การเตรียมอนุพันธุ์สาร nordentatin</u>

ในขั้นตอนแรกจะเป็นการหาวิธีทางเคมีเพื่อเปลี่ยนสาร dentatin ให้เป็นสาร nor-dentatin จากนั้นจึงทำการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมีบางส่วนที่หมู่ฟังค์ชั่นของสาร nordentatin และสาร dentatin เพื่อให้ได้อนุพันธ์ต่างๆ โดยในเบื้องได้นำสาร heptaphylline, 7-methoxyheptaphylline และ nordentatine มาทำอนุพันธ์ต่างๆ ดังแสดง จากการสังเคราะห์อนุพันธ์ทั้งสารกลุ่ม carbazoles และ coumarins ดังรูปที่ 1 ได้มีการปรับเปลี่ยนจนได้สภาวะในการสังเคราะห์แบบเดียวกันหมด ดังนี้



รูปที่ 1 ภาพแสดงวิธีการสังเคราะห์อนุพันธ์

สภาวะที่ใช้เตรียมสารอนุพันธ์ : นำสาร nordentatin (0.1 mmol) มาละลายในตัวทำละลาย pyridine ปริมาณ 1 มิลลิลิตรภายใต้ก๊าซไนโตรเจน หมุนจนสาร nordentatin ละลายหมด จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปแช่ในน้ำแข็ง และหมุนประมาณ 5 นาที จากนั้น ค่อยๆเติมสาร acid chloride หรือ anhydride ชนิดต่างๆ ปริมาณ 2.0 เท่า ของสารตั้งต้น ลงไปช้าๆ ใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที หมุนสารละลายผสมทั้งหมดในน้ำแข็งต่อ อีก 5 นาที จึงยกออกมาหมุนต่ออุณหภูมิห้องจนปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ จึงนำสารละลายดังกล่าวมาสกัดด้วยน้ำและเอททิลอะซีเตท นำชั้นเอททิลอะซีเตทมาล้างด้วย 1 N HCl 3 ครั้ง ล้างต่อด้วย 5 % $NaHCO_3$ 3 ครั้ง และสุดท้ายให้ล้างด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว นำชั้นเอททิลอะซีเตทที่ได้มาดูดน้ำด้วย anh. Na_2SO_4 กรองและล้างกระดาษกรองด้วยเอททิลอะซีเตท นำไประเหยแห้ง จากนั้นนำสารสกัดเข้มข้นที่ได้ไปแยกบริสุทธิ์ต่อด้วย column chromatography สุดท้ายได้สารอนุพันธ์ที่ต้องการในปริมาณตั้งแต่ 90-100 %

5. <u>การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ</u>

จะทำการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกรากต้นส่องฟ้า และทุกอนุพันธ์ที่สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยวิธี DPPH โดยดูถึงความสามารถในการจับกับ DPPH radical ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร โดยสารดังกล่าวมีสีม่วง ในการทดลองหากสารสังเคราะห์สามารถจับกับ DPPH radical ได้สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองของ DPPH ซึ่งจะสามารถวัดค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่น 517 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรมิเตอร์ การแปลผลข้อมูลจะรายงานในรูปของค่า IC_{50} โดยจะทำการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารที่สังเคราะห์ได้และสารที่แยกได้จากธรรมชาติ

ขั้นตอนในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay

1. เตรียม stock สาร DPPH radical ความเข้มข้น 10 mM โดยชั่งสาร 3.94 mg ละลายด้วย methanol 1mL จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 200 µM โดยปิเปตสารจาก stock 10 mM 100 µLปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 5 mL
2. เตรียมสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ
3. ปิเปตสารแต่ละความเข้มข้น 100 µL ลงใน 96 wells-plate โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำ 5 ซ้ำ, Controlใช้ ethanol 100 µL, Blank ใช้ ethanol 200 µL
4. ปิเปต 200 µM DPPH ปริมาตร 100 µL ลงในแต่ละ wells-plate ยกเว้น blank
5. เก็บให้พ้นแสง 30 นาที
6. นำไปวัด UV-spectrometer ที่ความยาวคลื่น 550 nm

6. <u>การตรวจสอบฤทธิ์ต้านไลปิด</u>

ขั้นตอนในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี TBAR assay

<u>การเตรียมสาร</u>

- Phosphate buffer 4 mM pH 7.4 เตรียมโดย ชั่ง Potassium dihydrogen phosphate 0.54 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 mL ปรับ pH ด้วย NaCl จนได้ pH = 7.4
- Potaasium chloride 467 mM เตรียมโดย ชั่ง Potaasium chloride 3.48 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL
- 1% TBA เตรียมโดยละลาย TBA ใน 50% Glacial acetic acid
- สมองหมู บดใน Phosphate buffer pH 7.4 ด้วยอัตราส่วน 2g : 19 mL

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม tube สำหรับความเข้มข้นของยาต่างๆ โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำ N=4, Negative, Basal
2. Pipette phosphate buffer 1.15 mL + Potassium chloride 0.6 mL ลงในแต่ละ tube
3. เติมสารที่ต้องการทดสอบ 0.05 mL ลงใน tube (*Negative และ basal ใช้ ethanol)
4. เติมสมองหมู 0.2 mL ลงในแต่ละ tube (เขย่าก่อนดูดทุกครั้ง)
5. นำไป shake ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศานาน 30 นาที (เกิดปฏิกิริยาได้ MDA) **ยกเว้น** basal แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที
6. เติม 35% HClO4 0.4 mL ใส่ทุก tube (เพื่อหยุดปฏิกิริยาตกตะกอนโปรตีนและไขมัน) เขย่าให้เข้ากัน
7. นำไปปั่นด้วยความเร็ว 3000 rpm ที่ 4 องศา นาน 5 นาที
8. ดูด supernatant 1.5 mL ใส่ glass tube
9. เติม 1%TBA 0.5 mL
10. นำไป shake ใน water bath อุณหภูมิ 100 องศา นาน 15 นาที (เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับ MDA)
11. วัด Intensity TBARS โดยเครื่อง Spectrofluorometer ที่ความยาวคลื่น 528/551 nm