

ระเบียบวิธีวิจัย/การทดลอง

วัตถุดิบ และสารเคมี

1. เปลือกผลทับทิม (พันธุ์พื้นบ้าน 3 ช่วงอายุโดยประมาณ คือ 0-25 วัน, 26-50 วัน และ 51-75 วัน จากแหล่งปลูก อ.แม่ทะ จ.ลำปาง และ ต.ป่าแดด อ.เมือง จ.เชียงใหม่)
2. Absolute Ethanol (AR Grade, Mallinckrodt Chemicals)
3. Glacial Acetic acid (บริษัท ศรีจันทร์สหโอสถ จำกัด)
4. Sulfuric acid 98% (AR Grade, RCI Labscan)
5. Methanol (AR Grade, Carlo Erba)
6. Potassium bromide: KBr (IR-Spectro grade)
7. สารมาตรฐานกรดเอลลาจิก ความบริสุทธิ์ 95% (Sigma-Aldrich®)
8. TLC plate (silica gel GF)

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Erlenmeyer flask ขนาด 1 ลิตร 500 มล.
2. Buchner funnel
3. กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman, England)
4. Volumetric Flask ขนาด 10 และ 25 ml
5. Micropipet ขนาด 200 μ l และ 1 ml
6. Pipet tip ขนาด 200 μ l และ 1 ml
7. เครื่องชั่ง
8. Cuvette cell

9. UV-Spectrophotometer (SHIMADZU UV-2450)

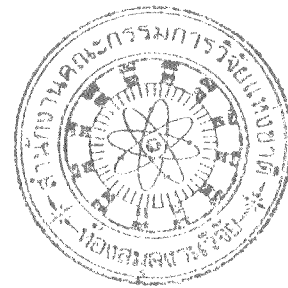
10. Rotary Evaporator (EYELA™ N-1000, BÜCHI R-114)

11. Hot air oven (Memmert)

12. Centrifuge (Labofuge I)

13. Differential scanning calorimeter (Perkin Elmer DSC 7)

14. Infra-Red spectrometer (Nicolet 470 FT-IR)



วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเปลือกหับทิมแห้ง

1.1 เก็บนำผลหับทิมในช่วงอายุต่างกัน (0-25 วัน, 26-50 วัน และ 51-75 วัน) และซื้อหับทิมจีน (ผลใหญ่) จากตลาดมาผ่า แกะเอาเมล็ดออกให้เหลือแต่เปลือกผลหับทิม หั่นเปลือกผลหับทิมเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

1.2 นำเปลือกที่แห้งแล้วไปบดให้เป็นผงละเอียดโดยเครื่องบดสมุนไพร

2. การสกัดเปลือกหับทิม

2.1 การสกัด

1. นำผงเปลือกหับทิมแห้งที่ได้มาซึ่งให้น้ำหนัก 40 กรัม และสกัดด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิดคือ 40% ethanol, 60% ethanol, 80% ethanol , และ water: ethanol: acetic acid (10:10:1) กวนในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

2. นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ทำการกรองเก็บสารละลายสีน้ำตาลเข้มไว้ ส่วนตะกอนที่เหลือทำการสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันอีก 2 ครั้ง

3. นำสารละลายที่ได้มาระเหยภายใต้ความดันต่ำ จนได้ปริมาณเหลือประมาณ 1 ใน 4

2.2 การทำ Acid hydrolysis

1. นำสารสกัดเข้มข้น (ที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายออกแล้วบางส่วน) มาเติม deionized water จนได้ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

2. เติมกรดซัลฟูริก 5% v/v และ stirr ที่ 105 องศาเซลเซียส ใน oil bath เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

3. กรองด้วย Buchner funnel แล้วล้างตะกอนด้วย deionized water

4. อบตะกอนที่ได้ในตู้อบอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

2.3 การทำให้บริสุทธิ์และตกผลึกใหม่

1. ชั่งตะกอนที่ได้จากข้อ 2.2 มาเติม Methanol 30 มิลลิลิตร ต่อ 1 กรัม และ stirr ที่ 45 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

2. กรองด้วย Buchner funnel เก็บส่วนที่ละลายได้ แล้วนำส่วนที่ไม่ละลายมาทำซ้ำด้วยวิธีเดิม อีก 2 ครั้ง

3. ระเหยเอาตัวทำละลายออก จนเหลือปริมาตรประมาณ 10 มิลลิลิตร

4. ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จะได้ผลึก ของกรดเอลลาจิก

5. กรองเอาผลึก และเก็บไว้ใน desiccators

6. รวบรวมผลึกแห้งสนิท แล้วชั่งผลึก คำนวณหา % yield

3. การวิเคราะห์สาร

3.1 วิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง หรือ Thin Layer Chromatography (TLC)

1. นำสารมาตรฐานกรดเอลลาจิกและสารสกัดเปลือกทับทิมที่เป็นผง มาละลายด้วย methanol

2. spot บนแผ่น TLC โดยใช้ Mobile phase เป็น Toluene: Ethyl acetate: Formic acid = 5 : 5 : 2

3. เปรียบเทียบ R_f ที่ได้กับกรดเอลลาจิกมาตรฐาน

3.2 การหาจุดหลอมเหลวโดย Differential Scanning Calorimeter (DSC)

1. นำผงผลึกของสารมาตรฐานกรดเอลลาจิก และผลึกกรดเอลลาจิกที่ได้จากการทดลอง ไปชั่งให้มีน้ำหนักในช่วงประมาณ 2-5 mg

2. นำไปวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่อง DSC ด้วย condition ต่างๆ ดังนี้

Pan	30 μ l (B014-3016)
Cover	0.1 mm (B014-3003)
Heat flow rate	10 mW/min
Temperature	
Start	50 °C
End	450 °C

3. เปรียบเทียบ Thermogram กับสารมาตรฐานกรดเอลลาจิก

3.3 การวิเคราะห์ลักษณะการดูดกลืนแสงโดย เครื่อง UV spectrophotometer

1. นำผงผลึกของสารมาตรฐานกรดเอลลาจิก และผลึกกรดเอลลาจิก ที่ได้จากการทดลอง มาละลายใน Methanol ให้มีความเข้มข้นประมาณ 70 μ M

2. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-spectrophotometer โดย run ความยาวคลื่นที่ 200–800 nm

3. เปรียบเทียบ UV-Spectrum ที่ได้ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน

3.4 การหา Finger print จาก IR-Spectrum โดย FT-IR Spectrometer

1. นำผงผลึกของสารมาตรฐานกรดเอลลาจิก และผลึกกรดเอลลาจิกที่ได้จากการทดลองมา ผสมกับ KBr ในสัดส่วน 1:100 ใน agate mortar ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2. นำของผสมที่ได้ไปอัดเป็นแผ่น ขนาด 7 mm จนได้แผ่นของสารผสมที่ใส

3. เปรียบเทียบลักษณะ finger print ที่ได้จาก สารสกัดเทียบกับของสารมาตรฐาน