

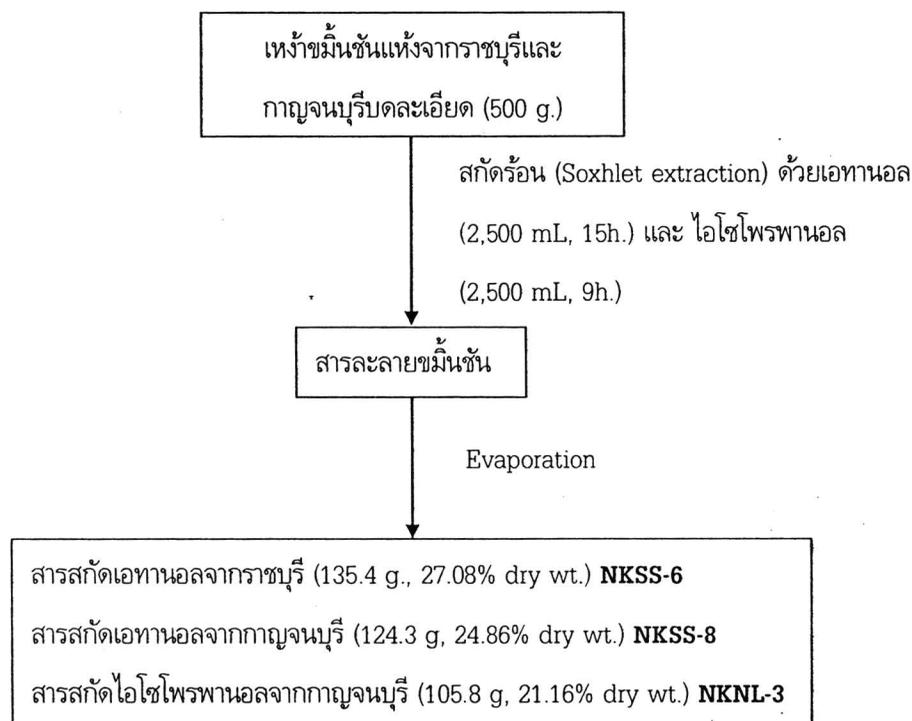
## ส่วนที่ 1

- 1.) วิธีการสกัดสารจากไขมันชั้นด้วยวิธีต่างๆ
- 2.) วิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์จากสารสกัดไขมันชั้น

## วิธีการทดลอง

### I. ทำการสกัดไขมันชั้นด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆดังนี้

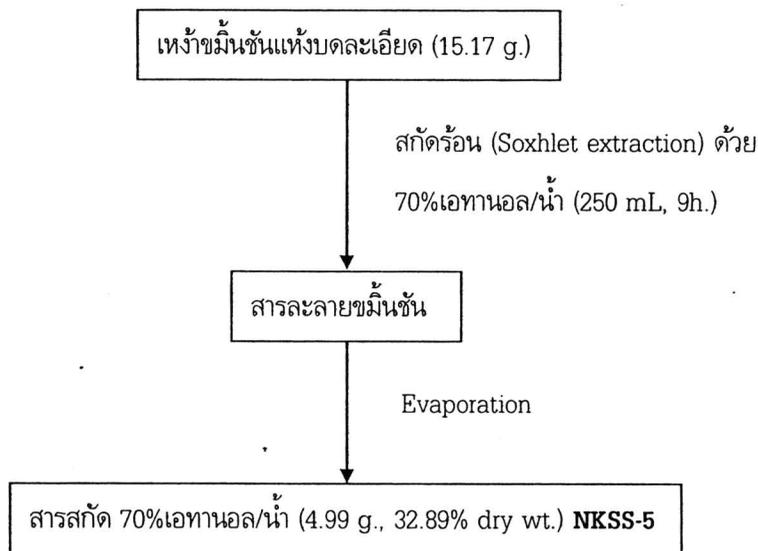
1. การสกัดไขมันชั้นจากจังหวัดราชบุรีด้วยตัวทำละลายเอทานอลและกาญจนบุรีด้วยตัวทำละลายเอทานอล และ ไอโซโพรพานอล โดยวิธีการ Soxhlet extraction (Scheme 1)



**Scheme 1:** การสกัดไขมันชั้นจากจังหวัดราชบุรีด้วยตัวทำละลายเอทานอล และกาญจนบุรีด้วยตัวทำละลายเอทานอลและ ไอโซโพรพานอล โดยวิธีการ Soxhlet extraction

- 1.1 นำเหง้าไขมันชั้นแห้งบดละเอียด ลักษณะสีเหลืองจากราชบุรี มาสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธี Soxhlet Extraction เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และ กาญจนบุรีมาสกัดด้วยเอทานอลและไอโซโพรพานอล โดยวิธี Soxhlet extraction เป็นเวลา 15 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ
- 1.2 นำสารละลายเอทานอลและไอโซโพรพานอลที่ได้จากข้อ 1.1 มาระเหยตัวทำละลายออกจนหมด ได้สารสกัดด้วยเอทานอล (**NKSS-6**(ราชบุรี), **NKSS-8**(กาญจนบุรี))และไอโซโพรพานอล (**NKNL-3**)
- 1.3 ชั่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดจากข้อ 1.2 และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของไขมันชั้น ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 1 (หน้า 5)
- 1.4 วิเคราะห์องค์ประกอบสารสกัดที่ได้จากจังหวัดราชบุรีและกาญจนบุรีเบื้องต้นด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยทดลองใช้ Mobile phase หลาย systems (หน้า 11)

- 1.5 นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัส H5N1
2. การสกัดไขมันชั้นจากจังหวัดกาญจนบุรี\* ด้วยตัวทำละลาย 70%เอทานอล/น้ำ โดยวิธี Soxhlet Extraction (Scheme 2)



**Scheme 2:** การสกัดไขมันชั้นจากกาญจนบุรีด้วยตัวทำละลาย 70%เอทานอล/น้ำ โดยวิธี Soxhlet extraction

- 2.1 นำเหง้าไขมันชั้นแห้งบดละเอียด ลักษณะสีเหลืองจากกาญจนบุรี มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 70%เอทานอล/น้ำ โดยวิธี Soxhlet extraction เป็นเวลา 9 ชั่วโมง
- 2.2 นำสารละลาย 70%เอทานอล/น้ำ ที่ได้จากข้อ 2.1 มาระเหยตัวทำละลายออกจนหมด ได้สารสกัดด้วย 70%เอทานอล/น้ำ
- 2.3 ชั่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดจาก 2.2 และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของไขมันชั้น ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 1 (หน้า 5)
- 2.4 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดที่ได้เบื้องต้นด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยทดลองใช้ Mobile phase หลาย systems (หน้า 11)
- 2.5 นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัส H5N1

\*เนื่องจากไขมันชั้นจากจังหวัดราชบุรีหมด ไม่สามารถหาซื้อได้ จึงใช้ไขมันชั้นจากกาญจนบุรีแทน

### ผลการทดลอง

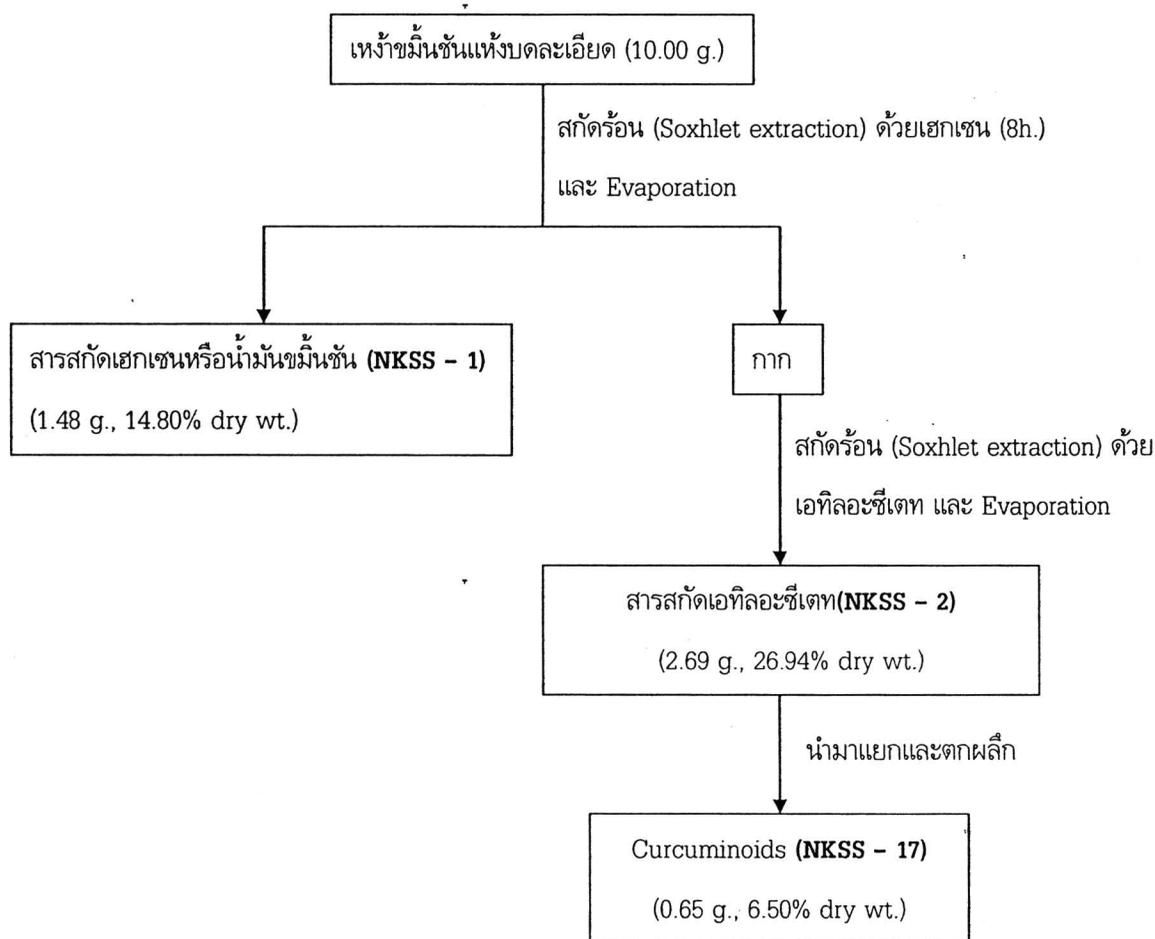
1. ผลการสกัดแห้งน้ำมันชั้นแห้งบดละเอียดจากจังหวัดราชบุรีด้วยเอทานอล(NKSS-6) และกาญจนบุรีด้วยเอทานอล (NKSS-8), ไอโซโพรพานอล (NKNL-3) และ 70%เอทานอล/น้ำ(NKSS-5) โดยวิธี Soxhlet extraction ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเท่ากับ 27.08%, 24.86%, 21.16% และ 32.89% ตามลำดับ สารสกัดดังกล่าวทั้งหมดมีลักษณะเป็นสารเหนียวสีแดงเข้มดังผลการทดลองในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 : แสดงลักษณะและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดด้วยเอทานอล (NKSS-6, ราชบุรี และ NKSS-8, กาญจนบุรี), สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล (NKNL-3) และ สารสกัด 70%เอทานอล/น้ำ (NKSS-5)

รหัสสารสกัด	ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด	ลักษณะของสารสกัด	น้ำหนักพืชที่ใช้สกัด(กรัม)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้(กรัม)	% ผลผลิตต่อน้ำหนักพืชแห้ง
NKSS-6 (ราชบุรี)	เอทานอล	สารเหนียวสีแดงเข้ม	500	135.4	27.08
NKSS-8 (กาญจนบุรี)	เอทานอล	สารเหนียวสีแดงเข้ม	500	124.3	24.86
NKNL-3	ไอโซโพรพานอล	สารเหนียวสีแดงเข้ม	500	105.8	21.16
NKSS-5	70 เอทานอล/น้ำ	สารเหนียวสีแดงเข้ม	15.17	4.99	32.89

### 3. การสกัดขมิ้นชันจังหวัดราชบุรี ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และ เอทิลอะซีเตท โดยวิธี Soxhlet Extraction

(Scheme 3)



**Scheme 3:** การสกัดขมิ้นชันจังหวัดราชบุรี ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และ เอทิลอะซีเตท และการแยกสาร

#### Curcuminoids

- 3.1 นำเหง้าขมิ้นชันแห้งบดละเอียด ลักษณะสีเหลือง มาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน โดยวิธี Soxhlet extraction เป็นเวลา 8 ชั่วโมง
- 3.2 นำสารละลายเฮกเซนมาระเหยตัวทำละลายออกจนหมด ได้สารสกัดด้วยเฮกเซนหรือน้ำมันขมิ้นชัน (NKSS-1)
- 3.3 ชั่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดจากข้อ 3.2 และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดเทียบกับน้ำหนักแห้งของขมิ้นชัน ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 2
- 3.4 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดด้วยเฮกเซนเบื้องต้นด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้ mobile phase หลาย systems (หน้า 11)

- 3.5 นำกากที่เหลือจากการสกัดด้วยเฮกเซนมาสกัดต่อด้วยเอทิลอะซีเตท โดยวิธี Soxhlet Extraction เป็นเวลา 40 ชั่วโมง
- 3.6 นำสารละลายเอทิลอะซีเตทมาระเหยตัวทำละลายออกจนหมด ได้สารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท (NKSS-2)
- 3.7 ชั่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.6 และคำนวณเปอร์เซ็นต์สารสกัดเทียบกับน้ำหนักพืชแห้งของขมิ้นชัน ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 2
- 3.8 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทเบื้องต้นด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) เพื่อดูองค์ประกอบของสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท (หน้า 11)
- 3.9 นำสารสกัดด้วยเฮกเซน และ เอทิลอะซีเตท ที่ได้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัส H5N1
- 3.10 นำสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมาแยกและตกผลึก ได้สาร Curcuminoids (NKSS-17)

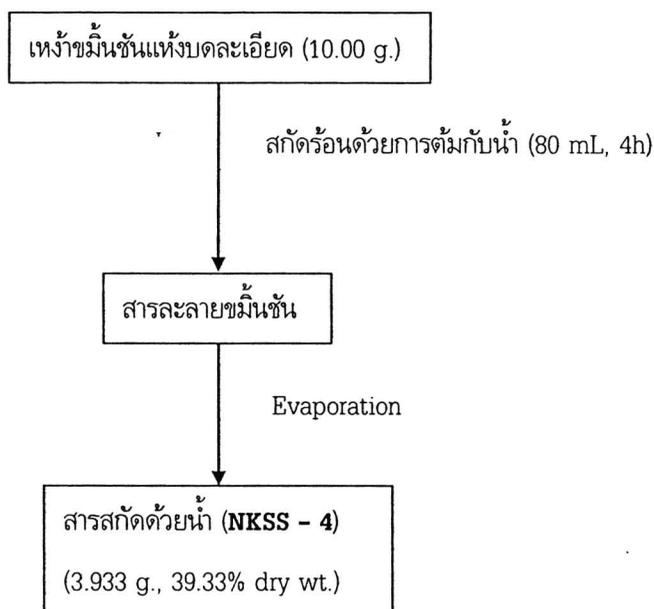
#### ผลการทดลอง

2. ผลการสกัดเหง้าขมิ้นชันแห้งบดละเอียดจากจังหวัดราชบุรีด้วยตัวทำละลายเฮกเซน(NKSS-1)และเอทิลอะซีเตท (NKSS-2) โดยวิธี Soxhlet extraction ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัด NKSS-1 และ NKSS-2 ในปริมาณ 14.80% และ 26.94% ต่อน้ำหนักพืชแห้งตามลำดับ สารดังกล่าวมีลักษณะ เป็นของเหลวสีเหลือง และสารชนิดสีเหลืองส้มเข้มตามลำดับ
3. เมื่อนำสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทมาแยกและตกผลึก ได้ผลึกสีส้มของ Curcuminoids (NKSS-17) มีจุดหลอมเหลว 176 – 178°C และได้ตรวจวิเคราะห์ด้วย HPLC เทียบกับสาร Curcuminoids มาตรฐาน โดยสรุปผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 : แสดงลักษณะและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัด NKSS-1 และ NKSS-2 และสาร Curcuminoids (NKSS-17) ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

รหัสสารสกัด	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ลักษณะของสารสกัดหรือผลึก	น้ำหนักพืชที่ใช้สกัด(กรัม)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้(กรัม)	% ผลผลิตต่อน้ำหนักพืชแห้ง
NKSS-1	เฮกเซน	สารเหลวสีเหลือง	10.00	1.48	14.80
NKSS-2	เอทิลอะซีเตท	สารชนิดสีเหลืองส้มเข้ม	10.00	2.69	26.94
NKSS-17	เอทิลอะซีเตทแยกและตกผลึก	ผลึกสีส้ม	10.00	0.65	6.50

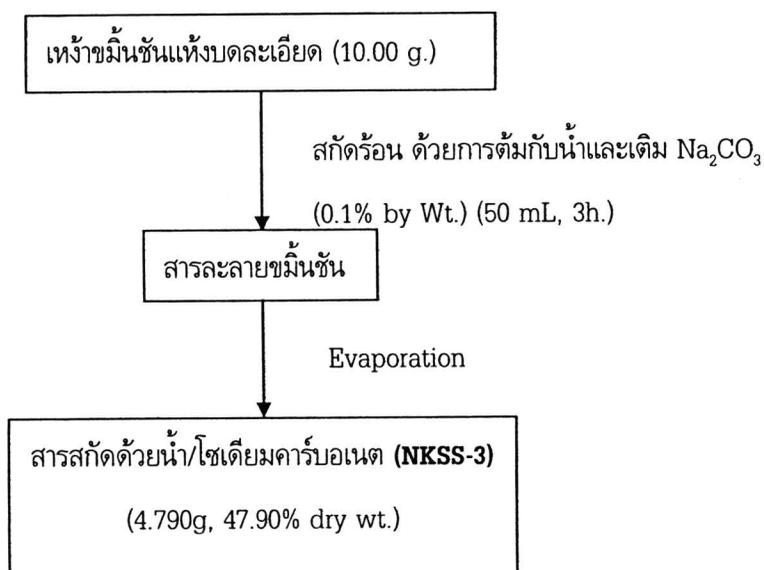
#### 4. การสกัดไขมันชั้นจากจังหวัดกาญจนบุรี ด้วยตัวทำละลายน้ำ โดยวิธีการต้มกับน้ำ (Scheme 4)



**Scheme 4:** การสกัดไขมันชั้นจากจังหวัดกาญจนบุรีด้วยตัวทำละลายน้ำ โดยวิธีการต้มกับน้ำ

- 4.1 นำเหง้าไขมันชั้นแห้งบดละเอียด ลักษณะสีเหลือง มาสกัดด้วยน้ำ โดยวิธีการต้มกับน้ำ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
- 4.2 นำสารละลายน้ำที่ได้จากข้อ 4.1 มาระเหยน้ำออกจนหมด ได้สารสกัดด้วยน้ำ (NKSS-4)
- 4.3 ชั่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดที่พบในข้อ 4.2 และคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของไขมันชั้น ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 3 (หน้า 10)
- 4.4 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดด้วยน้ำในข้อ 4.3 เบื้องต้นด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยทดลองใช้ Mobile phase หลาย systems (หน้า 11)
- 4.5 นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัส H5N1

5. การสกัดไขมันชั้นจากจังหวัดกาญจนบุรี ด้วยตัวทำละลาย น้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต โดยวิธีการต้ม (Scheme 5)



**Scheme 5:** การสกัดไขมันชั้นจากจังหวัดกาญจนบุรีด้วยตัวทำละลายน้ำ และเติมโซเดียมคาร์บอเนต

- 5.1 นำเหง้าไขมันชั้นแห้งบดละเอียด ลักษณะสีเหลือง มาต้มด้วยตัวทำละลายน้ำและเติมโซเดียมคาร์บอเนต ลงไป 0.1% ของน้ำหนักเริ่มต้นของเหง้าไขมันชั้นแห้งและบดละเอียด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 5.2 นำสารละลาย น้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต ที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกจนหมด ได้สารสกัดด้วย น้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต
- 5.3 ชั่งน้ำหนักและบันทึกลักษณะของสารสกัดที่ได้จากข้อ 5.2 และคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของไขมันชั้น ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 3 (หน้า 10)
- 5.4 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดน้ำ/โซเดียมคาร์บอเนตเบื้องต้นด้วย Thin Layer Chromatography (TLC) โดยทดลองใช้ Mobile phase หลาย systems (หน้า 11)
- 5.5 นำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัส H5N1

### ผลการทดลอง

4. ผลการสกัดเหง้าขมิ้นชันแห้งบดละเอียดจากจังหวัดกาญจนบุรีด้วยด้วยตัวทำละลายน้ำและน้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต ได้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตต่อน้ำหนักแห้งของขมิ้นชันเท่ากับ 39.99% และ 47.90% ต่อน้ำหนักแห้งของขมิ้นชันตามลำดับ สารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองเข้มและสารหนืดสีแดงเข้มตามลำดับโดยสรุปผลการสกัดดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 : แสดงลักษณะและเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดขมิ้นชันด้วยน้ำ (NKSS-4) และ น้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต (NKSS-3)

รหัสสารสกัด	ตัวทำละลายที่ใช้สกัด	ลักษณะของสารสกัดหรือผลึก	น้ำหนักพืชที่ใช้สกัด(กรัม)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)	% ผลผลิตต่อน้ำหนักพืชแห้ง
NKSS-4	น้ำ	ของแข็งสีเหลืองเข้ม	10.00	3.933	39.33
NKSS-3	น้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต	สารหนืดสีแดงเข้ม	10.00	4.790	47.90

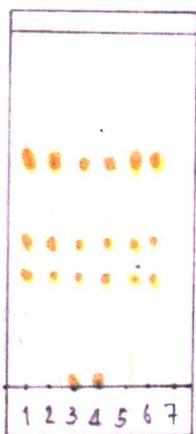
### 5. การสกัดขมิ้นชันสดด้วยวิธี Steam distillation

นำขมิ้นชันที่ล้างสะอาดแล้วปอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นเล็ก นำไปใส่ในเครื่อง Steam distillatory ทำการกลั่นเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

#### ผลการสกัดขมิ้นชันสดด้วยวิธี Steam distillation

จากการทำ Steam distillation ของขมิ้นชันสดปริมาณ 400 กรัม ได้น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน (NKSS-19) 11.76 กรัม คิดเป็น 2.94% ต่อน้ำหนักพืชสด

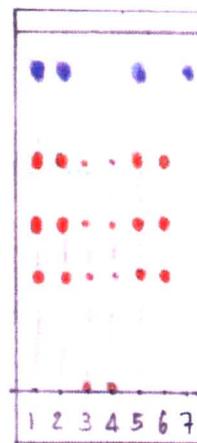
6. วิเคราะห์เบื้องต้นของสารสกัดด้วยเอทานอล (**NKSS-8**), เฮกเซน (**NKSS-1**), ไอโซโพรพานอล (**NKNL-3**), น้ำ (**NKSS-4**), 70%เอทานอล/น้ำ (**NKSS-5**) และ น้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต (**NKSS-3**) จากจังหวัดกาญจนบุรี ด้วย Thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ supporting material คือ Silica gel เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบโดยรวมของชั้น Mobile phase ที่เหมาะสมคือ 5%เมทานอล/ไดคลอโรมีเทน (**รูปที่ 1**)



Detector: มองด้วยตาเปล่า



UV ที่  $\lambda = 254 \text{ nm}$ .



สเปรย์ด้วย vanillin reagent.

**รูปที่ 1** แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย TLC ของสารสกัดชั้นไขมันชนิดต่างๆ

1. สารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล (**NKNL-3**)
2. สารสกัดด้วยเอทานอล (**NKSS-8**)
3. สารสกัดด้วยน้ำ (**NKSS-4**)
4. สารสกัดด้วยน้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต (**NKSS-3**)
5. สารสกัดด้วย 70%เอทานอล/น้ำ (**NKSS-5**)
6. Curcuminoids (**NKSS-17**, เป็นสารเปรียบเทียบ)
7. สารสกัดด้วยเฮกเซนหรือน้ำมันชั้น (**NKSS-1**)

จากการสังเกต TLC โครมาโตแกรมด้วยตาเปล่า, ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ TLC ที่สเปรย์ด้วย Vanillin reagent พบว่าสารสกัดด้วยไอโซโพรพานอล, เอทานอล, 70%เอทานอล/น้ำ มีองค์ประกอบคล้ายกันโดยประกอบด้วยส่วนน้ำมันหอมระเหยและ Curcuminoids สารสกัดด้วยน้ำ และ น้ำ/โซเดียมคาร์บอเนต ประกอบด้วยสารกลุ่ม Curcuminoids และสารที่มีขั้วสูงกว่า (เทียบกับ Curcuminoids (**NKSS-17**))

### 7. วิเคราะห์ปริมาณ Curcuminoids ในสารสกัดขมิ้นชันชนิดต่างๆ

ทำการวิเคราะห์สาร Curcuminoids ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ดังนี้ ไอโซโพรพานอล (NKNL-3), เอทานอล (NKSS-8), 70% เอทานอล/น้ำ (NKSS-5), น้ำ (NKSS-4) และ โซเดียมคาร์บอเนต/น้ำ (NKSS-3) โดยใช้วิธี External standard และทำ Calibration curve ของสารมาตรฐาน (Curcuminoids) ด้วยความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 6.25, 12.5, 25, 50, 100 และ 200 ppm ใช้ supporting material คือ C - 18 ขนาดคอลัมน์ 300X3.9 mm ใช้ mobile phase system ที่เหมาะสม

ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ Curcuminoids ด้วยเครื่อง HPLC ของสารสกัดขมิ้นชันชนิดต่างๆด้วยวิธี External Standard ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 : แสดงปริมาณ Curcuminoids ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในสารสกัดชนิดต่างๆ

รหัสสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ (ppm)	พื้นที่พีคได้จาก HPLC	ความเข้มข้นที่ได้จากการคำนวณ Calibration curve (ppm)	ปริมาณ Curcuminoids ในสารสกัด(กรัม)	% Curcuminoids ในสารสกัด (% by wt.)	% Curcuminoids ต่อน้ำหนักพืชแห้ง (%by wt.)
<b>NKNL-3</b>	60	3653841	17.25	0.304	28.73	6.08
<b>NKSS-5</b>	300	12288615	56.94	0.948	19.00	6.25
<b>NKSS-8</b>	60	7641934	35.81	0.742	59.69	14.84
<b>NKSS-4</b>	300	3172514	14.52	0.190	4.83	1.90
<b>NKSS-3</b>	300	853079	3.72	0.059	1.23	0.59

จากการวิเคราะห์ปริมาณ Curcuminoids ด้วย HPLC พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอล (NKSS-8) ให้ปริมาณ Curcuminoids สูงสุด 14.84% ต่อน้ำหนักแห้งของขมิ้นชัน รองลงมาคือ สารสกัดด้วย 70%เอทานอล/น้ำ และ ไอโซโพรพานอล ให้ปริมาณ Curcuminoids 6.25% และ 6.08% ต่อน้ำหนักแห้งของขมิ้นชันตามลำดับ

8. การแยกสารสกัดด้วยเอทานอลของขมิ้นชันออกเป็นส่วนๆโดย Vacuum Liquid Chromatography (VLC) (Scheme 6)

8.1 นำสารสกัดเอทานอลของขมิ้นชันปริมาณ 51.408 กรัม มาแยกออกเป็นส่วนๆโดย Vacuum Liquid Chromatography (VLC) โดยใช้ซิลิกาเจล No. 7736 จำนวน 200 กรัม คอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร

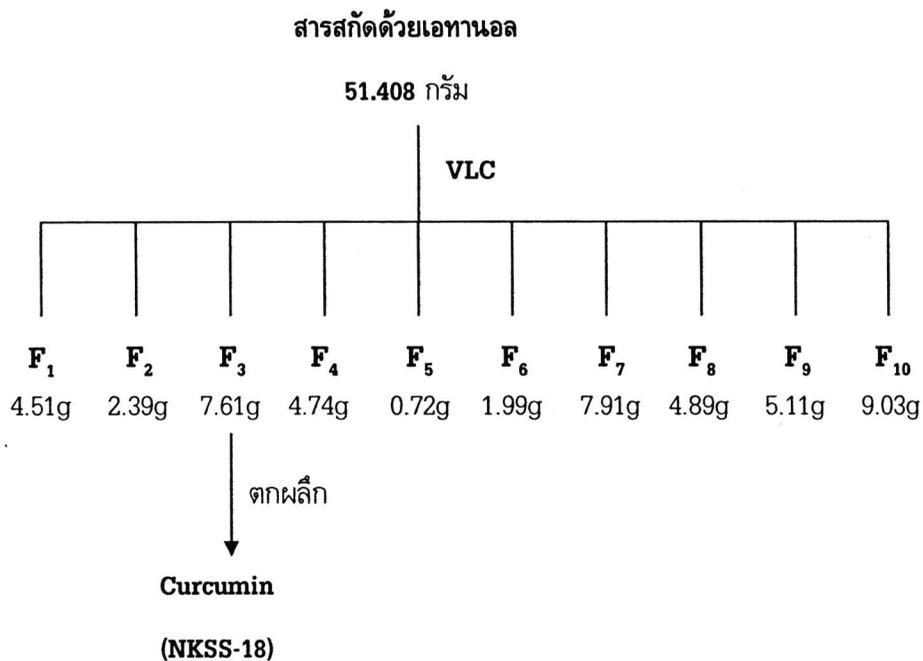
8.2 ชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายต่างๆดังนี้

100%	เฮกเซน	200 mL.
1%	เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน	400 mL.
2%	เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน	200 mL.
4%	เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน	200 mL.
10%	เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน	200 mL.
20%	เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน	200 mL.
50%	เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน	1,200 mL.
55%	เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน	400 mL.
60%	เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน	200 mL.
80%	เฮกเซน/ไดคลอโรมีเทน	200 mL.
100%	ไดคลอโรมีเทน	4,000 mL.
1%	เอทิลอะซิเตท/ไดคลอโรมีเทน	600 mL.
2 %	เอทิลอะซิเตท/ไดคลอโรมีเทน	7,200 mL.
4%	เอทิลอะซิเตท/ไดคลอโรมีเทน	1,000 mL.
10%	เอทิลอะซิเตท/ไดคลอโรมีเทน	1,200 mL.
20%	เอทิลอะซิเตท/ไดคลอโรมีเทน	3,400 mL.
40 %	เอทิลอะซิเตท/ไดคลอโรมีเทน	400 mL.



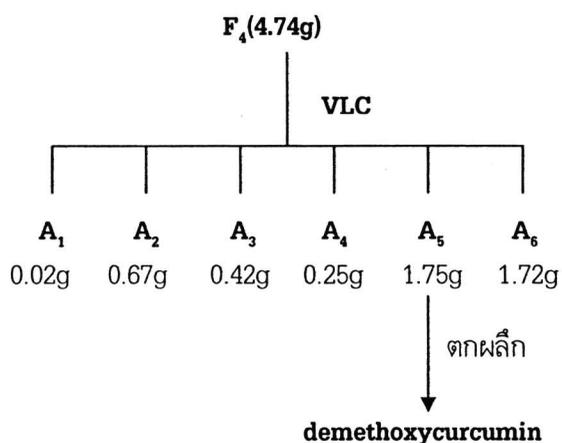
ชะคอลัมน์ด้วยเอทานอลทำการรวมส่วนสกัด โดยดู spot ที่คล้ายกันบน TLC โครมาโตแกรม ได้ 10 ส่วน ( $F_1 - F_{10}$ )

8.3 นำ  $F_3$  มาตกผลึกด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม ได้สารบริสุทธิ์ที่มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองคือ **NKSS - 18** (Scheme 6)



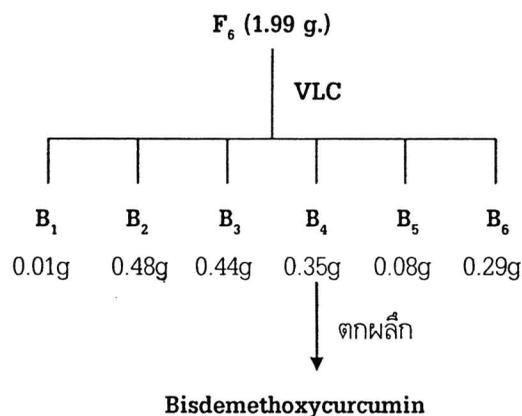
**Scheme 6:** การแยกสารสกัดขมิ้นชันออกเป็นส่วนๆโดยวิธี Vacuum Liquid Chromatography(VLC)

8.4 ทำการแยกสารบริสุทธิ์จาก F<sub>4</sub> ด้วยวิธี Vacuum Liquid Chromatography (VLC) โดย Eluents คือ 0.1% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ได้ส่วนสกัด 6 ส่วน (A<sub>1</sub>-A<sub>6</sub>) จากนั้นนำส่วนของ A<sub>5</sub> มาตกผลึกด้วยตัวทำละลายเอทานอล ได้สารบริสุทธิ์ A<sub>5</sub> เป็นของแข็งสีเหลือง (Scheme 7)



**Scheme 7:** การแยกสารให้บริสุทธิ์จาก F<sub>4</sub> ซึ่งได้จากสารสกัดขมิ้นชัน

8.5 ทำการแยกสารบริสุทธิ์จาก  $F_6$  ด้วยวิธี Vacuum Liquid Chromatography (VLC) โดยใช้ eluents ดังนี้ 0.1 %MeOH/  $CH_2Cl_2$ , 1 %MeOH/  $CH_2Cl_2$  และ 5 %MeOH/  $CH_2Cl_2$  จากนั้นรวมส่วนสกัดที่มี TLC pattern คล้ายกัน ได้ส่วนสกัด 6 ส่วน ( $B_1 - B_6$ ) และทำการตกผลึกส่วนสกัด  $B_4$  ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ได้สารบริสุทธิ์ ( $B_4$ ) เป็นของแข็งสีส้ม (Scheme 8)



**Scheme 8:** การแยกสารให้บริสุทธิ์จาก  $F_6$  ซึ่งได้จากสารสกัดขมิ้นชัน

- 8.6 ทำการวิเคราะห์เบื้องต้นของแข็งบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด ด้วย TLC โดย mobile phase ที่ใช้ คือ 5% MeOH/  $CH_2Cl_2$  พบว่าสารแต่ละชนิด NKSS-18,  $A_5$  และ  $B_4$  ปรากฏบน TLC chromatogram เป็น spot เดียว แสดงได้คร่าวๆว่าเป็นสารบริสุทธิ์
- 8.7 ทำการตรวจสอบจุดหลอมเหลวและวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (IR,  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR, MS) เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารทั้ง 3 ชนิด (NKSS-18,  $A_5$  และ  $B_4$ )

9. การแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด  $F_1$  (น้ำมันขมิ้นชัน) ด้วยวิธี Column Chromatography (CC)

9.1 นำส่วนสกัด  $F_1$  (น้ำมันขมิ้นชัน) 2 กรัม มาแยกออกเป็นส่วนๆ ด้วยวิธี column chromatography (CC) โดยใช้ซิลิกาเจล No. 7734 หนัก 100 กรัม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 2 เซนติเมตร (Scheme 9)

9.2 ทำการชะ Column ด้วยตัวทำละลายต่างๆ ดังนี้

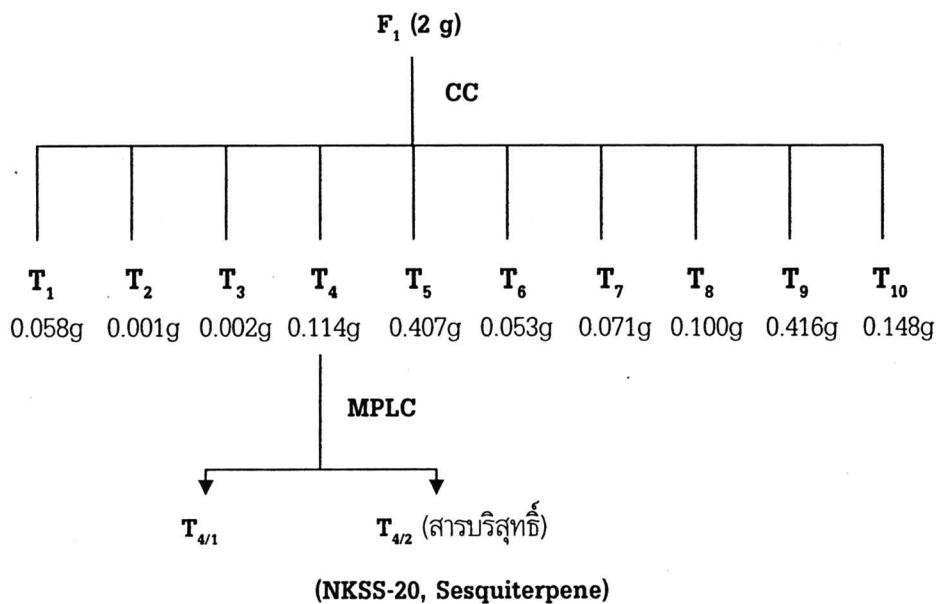
100% เฮกเซน	45 mL
0.25% อะซีโตน/เฮกเซน	600 mL
0.50% อะซีโตน/เฮกเซน	85 mL
0.75% อะซีโตน/เฮกเซน	55 mL
1.0% อะซีโตน/เฮกเซน	60 mL
1.5% อะซีโตน/เฮกเซน	530 mL
2.0% อะซีโตน/เฮกเซน	935 mL
4.0% อะซีโตน/เฮกเซน	245 mL
10% อะซีโตน/เฮกเซน	100 mL
20% อะซีโตน/เฮกเซน	60 mL
40% อะซีโตน/เฮกเซน	140 mL
60% อะซีโตน/เฮกเซน	100 mL
100% เอทานอล	200 mL

9.3 ทำการรวมส่วนสกัด โดยดูลักษณะ Spot ที่คล้ายกันบนแผ่น TLC โครมาโตแกรม ได้ 10 ส่วนสกัด ( $T_1 - T_{10}$ )

9.4 นำส่วนสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายให้แห้งโดยเครื่อง evaporator และชั่งน้ำหนัก

9.5 นำ ส่วนสกัด  $T_4$  (ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่ามีความบริสุทธิ์ 90%) มาแยกต่อโดยวิธี Medium Pressure Liquid Chromatogram (MPLC) ด้วย column สำเร็จรูป ใช้เฮกเซนเป็น Mobile phase ได้ส่วนสกัด 90 ส่วน

9.6 ทำการรวมส่วนสกัดที่มี pattern ของ spot บนแผ่น TLC โครมาโตแกรมคล้ายกันให้เหลือ 2 ส่วน  $T_{4/1}$  (fr. 1-63) และ  $T_{4/2}$  (fr. 64-90) จากการวิเคราะห์ TLC โดย vanillin reagent พบ spot สีม่วงเข้ม 1 spot แสดงว่าเป็นสารบริสุทธิ์ (**NKSS-20**) วิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  และ MS)



**Scheme 9:** การแยกสารให้บริสุทธิ์จาก F<sub>1</sub> จากสารสกัดขมิ้นชัน

ผลการแยกสารสกัดด้วยเอทานอลของขมิ้นชัน ซึ่งออกฤทธิ์ป้องกันเชื้อไข้หวัดนก ออกเป็นส่วนสกัดและเป็นสารบริสุทธิ์ ดังแสดงในตารางที่ 5

1. ผลของการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดเอทานอลด้วยวิธี Vacuum Liquid Chromatography ได้ทั้งหมด 119 ส่วน นำส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์โดย TLC และรวมส่วนที่มี TLC Pattern คล้ายกันทั้งหมด 10 ส่วน ( $F_1 - F_{10}$ ) ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่า  $F_3$  เป็นสารบริสุทธิ์ และนำมาตกผลึกอีกครั้งได้ผลึกสีเหลืองของ **NKSS-18**

ตารางที่ 5: ผลการแยกสารสกัดด้วยเอทานอลของขมิ้นชันด้วย Vacuum Liquid Chromatography (VLC)

Fraction	Total volume (mL.)	Pigments present*	Weight (g.)
1 - 21( $F_1$ )	2,300	Turmeric Oil	4.51
22 - 24 ( $F_2$ )	300	Turmeric Oil + C	2.39
25 - 3 ( $F_3$ ) (สารบริสุทธิ์)	1,600	C (Curcumin)	7.61
39 - 5 ( $F_4$ )	2,400	C + DMC	4.74
52 - 5 ( $F_5$ )	1,200	C + DMC	0.72
59 - 7 ( $F_6$ )	2,200	DMC + BDMC	1.99
71 - 9 ( $F_7$ )	5,200	DMC + BDMC	7.91
98 - 10 ( $F_8$ )	2,400	DMC + BDMC	4.89
111 - 18 ( $F_9$ )	2,600	DMC + BDMC	5.11
119( $F_{10}$ )	4,000	HPCE	9.03

\* C = Curcumin, DMC = Demethoxycurcumin, BDMC = Bisdemethoxycurcumin, HPCE = HighPolar Crude Extract

2. ผลการนำส่วนของ  $F_4$  มาทำการแยกด้วยวิธี Vacuum Liquid Chromatography ได้ส่วนสกัดทั้งหมด 85 ส่วน นำมารวมได้ 6 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยพบว่า  $A_2$  และ  $A_5$  เป็นสารบริสุทธิ์

ตารางที่ 6: ผลการแยกสารให้บริสุทธิ์จาก  $F_4$  ซึ่งได้จากสารสกัดขมิ้นชัน

Fraction	Total volume (mL.)	Pigments present*	Weight (g.)
1 - 4 ( $A_1$ )	1,000	Turmeric Oil + C	0.02
6 - 15( $A_2$ )	300	C	0.67
16 - 2 ( $A_3$ )	420	C + DMC	0.42
30 - 4 ( $A_4$ )	300	C + DMC	0.25
41 - 7 ( $A_5$ )	900	DMC	1.75
71 - 8 ( $A_6$ )	450	DMC + HPCE	1.72

\* C = Curcumin, DMC = Demethoxycurcumin, BDMC = Bisdemethoxycurcumin, HPCE = HighPolar Crude Extract

3. ผลการนำส่วนของ  $F_6$  มาทำการแยกด้วยวิธี Vacuum Liquid Chromatography และทำการรวมส่วนสกัด ได้ทั้งหมด 94 ส่วน ทำการรวมเหลือ 6 ส่วน ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่า  $B_2$  และ  $B_4$  เป็นสารบริสุทธิ์

ตารางที่ 7: ผลการแยกสารให้บริสุทธิ์จาก  $F_6$  ซึ่งได้จากสารสกัดขมิ้นชัน

Fraction	Total volume (mL.)	Pigments present*	Weight (g.)
1 - 19( $B_1$ )	570	C + DMC	0.01
20 - 4 ( $B_2$ )	600	DMC	0.48
41 - 6 ( $B_3$ )	480	DMC + BDMC	0.44
57 - 85 ( $B_4$ )	900	BDMC	0.35
88 - 93 ( $B_5$ )	180	BDMC + HPCE	0.08



94 (B <sub>6</sub> )	2,000	BDMC + HPCE	0.29
----------------------	-------	-------------	------

\* C = Curcumin, DMC = Demethoxycurcumin, BDMC = Bisdemethoxycurcumin, HPCE = HighPolar Crude Extract

4. ผลการนำส่วนสกัด F<sub>1</sub> (น้ำมันชัน) แยกด้วย Column Chromatography (CC) ได้ 10 ส่วน (T<sub>1</sub> - T<sub>10</sub>) โดยดูลักษณะ spot ที่ปรากฏบนแผ่น TLC Chromatography ที่มี Pattern คล้ายกันมารวมกันดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8: ผลการแยกสารให้บริสุทธิ์จาก F<sub>1</sub> ซึ่งได้จากสารสกัดชันชัน ด้วยวิธี Column Chromatography (CC)

Fraction	Total volume (mL.)	Weight (g)
T <sub>1</sub>	20	0.058
T <sub>2</sub>	170	0.001
T <sub>3</sub>	400	0.002
T <sub>4</sub>	90	0.114
T <sub>5</sub>	50	0.407
T <sub>6</sub>	800	0.053
T <sub>7</sub>	590	0.071
T <sub>8</sub>	250	0.100
T <sub>9</sub>	100	0.416
T <sub>10</sub>	100	0.148

5. การวิเคราะห์ T<sub>4</sub> ด้วย GC - MS พบว่ามีความบริสุทธิ์ 90 % จึงนำส่วนสกัด T<sub>4</sub> มาทำการแยกด้วยวิธี MPLC ได้ทั้งหมด 90 ส่วน (F) ทำการรวมเหลือ 2 ส่วน โดย F1 - F63 รวมเป็น T<sub>4/1</sub> และ F64 - F90 รวมเป็น T<sub>4/2</sub> (NKSS-20) ดังแสดงในตารางที่ 9

**ตารางที่ 9: ผลการแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัด T<sub>4</sub>**

Fraction	Total volume (mL.)	Weight (g.)
T <sub>4/1</sub>	320	0.033
T <sub>4/2</sub> (NKSS-20)	130	0.026

**ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีและจุดหลอมเหลวของ NKSS-18, A<sub>5</sub>, B<sub>4</sub> และ NKSS-20**

**สารบริสุทธิ์ Curcumin (NKSS-18)**, yellow crystal, mp. 182 - 184°C, IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3500, 2980 - 2850, 1628, 1597, 1508, 1427, 1028. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ : 3.87 (s, 6H), 5.72 (s, 1H), 6.40 (d, J=15.8 Hz, 2H), 6.86 (d, J=8.1 Hz, 2H), 6.98 (d, J=1.8 Hz, 2H), 7.04 (dd, J=8.1, J=1.8 Hz, 2H) 7.51 (d, 15.8 Hz, 2H), <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ : 55.9, 101.1, 109.7, 114.9, 121.7, 122.8, 127.6, 183.2, 140.5, 146.9, 148.0 MS m/z : 368, 284, 244, 213, 176, 117

**สารบริสุทธิ์ Demothoxycurcumin (A<sub>5</sub>)** orange solid, mp. 170 - 172°C, IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3327, 1625, 1573, 1511, 1440, 1262, 1025 <sup>1</sup>H-NMR (Acetone - d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ : 3.91(s, 3H), 5.97 (s, 1H), 6.64 (d, J=15.8 Hz, 1H), 6.70 (d, J=15.8 Hz, 1H), 6.88 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.16 (dd, J=8.2, J=1.72 Hz, 1H), 7.32 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.55 (dd, J=8.6, J=1.76 Hz, 1H), 7.59 (d, J=15.9 Hz, 1H), 7.60 (d, J=15.9 Hz, 1H) MS m/z : 338, 245, 176, 147.

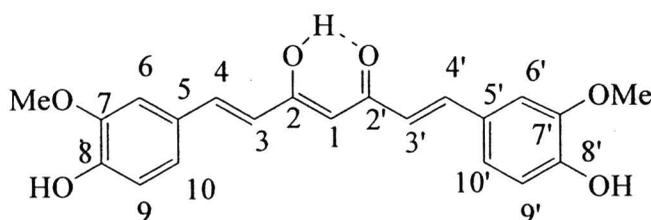
**สารบริสุทธิ์ Bisdemethoxycurcumin (B<sub>4</sub>)** orange solid, mp. 214 - 216°C, IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3238, 1623, 1597, 1559, 1507, 1436, 1268 (Acetone - d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ : 5.97 (s, 1H), 6.66 (d, J=15.8 Hz, 2H), 6.89 (d, J=15.9 Hz, 2H), 8.95 (s, 2H) MS m/z : 308, 268, 225, 147

**NKSS-20 (Sesquiterpene)** มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดไม่มีสี มีค่า R<sub>f</sub> = 0.15 ใช้ เฮกเซน:เอทิลอะซิเตท (92:2) เป็น mobile phase ในการวิเคราะห์เบื้องต้นด้วย TLC พบว่าเมื่อ spray ด้วย vanillin reagent จะพบสีม่วงเข้ม IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 2962 (C-H, CH<sub>3</sub>), 2917 (C-H, CH<sub>2</sub>), 1686 (C=C-C=O), 1621 and 1514 (C=C, Ar) <sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz, CDCl<sub>3</sub> δ (ppm) 1.17 (d, 3H, J=7.0 Hz), 1.78 (d, 3H, J=1.3 Hz), 2.03 (d, 3H, J=1.2 Hz), 2.23 (s, 3H), 2.50-2.65 (m, 2H), 3.15-3.25 (m, 1H), 5.95(sept, 1H), 6.97-7.09 (m, 4H) <sup>13</sup>C-NMR: 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)

20.70, 20.97, 21.98, 35.28, 52.67, 124.08, 126.65, 129.10, 135.54, 143.67, 155.15, 199.92 MS m/z : 216 (25.0), 201 (16.7), 132 (16.7), 119 (59.7), 83 (100), 55 (12.5)

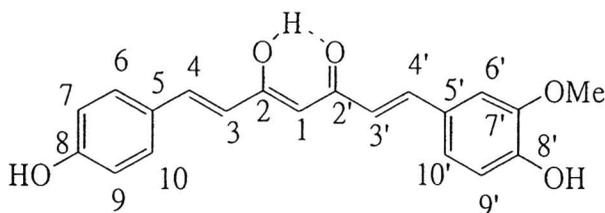
### ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์

สารบริสุทธิ์ F<sub>3</sub> (**NKSS-18**) มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง มีจุดหลอมเหลว 182-184°C จากข้อมูล MS พบ Molecular ion (M<sup>+</sup>) มีค่า m/z เท่ากับ 368, IR สเปกตรัม พบพีคที่ความถี่ 1628 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1597 และ 1508 cm<sup>-1</sup> (C=C,Ar) <sup>1</sup>H NMR พบพีคที่ δ 3.85 เป็น Singlet จำนวน 6 โปรตอน แสดงว่ามี OMe 2 หมู่ เกาะอยู่กับ aromatic พบ Olefinic proton ที่ δ 6.40 และ 7.51 แบบ trans เนื่องจากมีค่า coupling constant = 15.8 Hz, พบพีคโปรตอนของ enol form ที่ δ 5.72 เป็น Singlet จำนวน 1 โปรตอน, พบพีคโปรตอนของ Aromatic ที่ δ 6.8-7.1 และเมื่อนำข้อมูลสเปกโทรสโกปีของ IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS และ mp มาทำการวิเคราะห์โครงสร้างพบว่า เป็น Curcumin (**รูปที่ 2**) ซึ่งเหมือนกับที่ได้มีการรายงานไว้ (Peret-Almeide, L. and co-worker, *Food Research International*, **2005**, 38, 1039 – 1044)



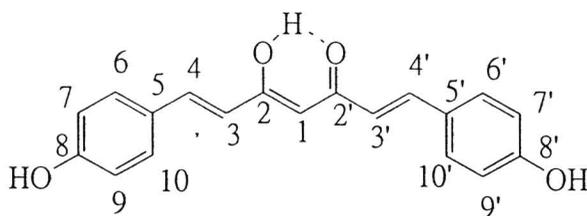
รูปที่ 2 : โครงสร้างของ Curcumin

สารบริสุทธิ์ A<sub>5</sub> มีลักษณะเป็นของแข็งสีส้มมีจุดหลอมเหลว 170-172°C จากข้อมูล MS พบ Molecular ion (M<sup>+</sup>) มีค่า m/z เป็น 338, IR สเปกตรัม พบพีคที่ความถี่ 1625 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1573 และ 1511 cm<sup>-1</sup> (C=C,Ar), <sup>1</sup>H NMR พบพีคที่ δ 3.91 เป็น Singlet จำนวน 3 โปรตอน แสดงว่ามี OMe 1 หมู่ เกาะอยู่กับ Aromatic, พบ Olefinic proton เป็น doublet 2 ชุดที่ δ 6.64, 7.59 และ 6.70, 7.60 เป็น doublet แบบ trans เนื่องจากมีค่า coupling constant = 15.8 Hz, พบพีคโปรตอนของ enol form ที่ δ 5.97 เป็น Singlet จำนวน 1 โปรตอน, พบพีคโปรตอนของ Aromatic ที่ δ 6.88-7.55 ppm และเมื่อนำข้อมูลสเปกโทรสโกปีของ IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS และ mp มาวิเคราะห์โครงสร้างพบว่า เป็น demethoxycurcumin (**รูปที่ 3**) ซึ่งเหมือนกับที่ได้มีรายงานไว้ (Peret-Almeide, L. and co-worker, *Food Research International*, **2005**, 38, 1039 – 1044)



รูปที่ 3 : โครงสร้างของ demethoxycurcumin

สารบริสุทธิ์ B<sub>4</sub> มีลักษณะเป็นผลึกสีส้ม มีจุดหลอมเหลว 214-216°C จากข้อมูล MS พบ Molecular ion(M<sup>+</sup>) มีค่า m/z เท่ากับ 308, IR สเปกตรัม พบ 1632 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1597 และ 1507 cm<sup>-1</sup> (C=C,Ar), <sup>1</sup>H NMR พบพีคโปรตอนของ enol form ที่ δ 5.97 เป็น Singlet จำนวน 1 โปรตอน, พบ Olefinic proton ที่ δ 6.66 และ 7.60 เป็น doublet แบบ trans เนื่องจากมีค่า coupling constant = 15.8 Hz พบพีคโปรตอนของ Aromatic ที่ δ 6.89-7.56, พบพีคที่ δ 8.95 เป็น Singlet จำนวน 2 โปรตอน แสดงว่ามี OH 2 หมู่เกาะอยู่กับ Aromatic และเมื่อนำข้อมูลสเปกโทรสโกปีของ IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS และ mp มาทำการวิเคราะห์โครงสร้างพบว่า เป็น bisdemethoxycurcumin (รูปที่ 4) ซึ่งเหมือนกับที่ได้มีรายงานไว้ (Peret-Almeide, L. and co-worker, *Food Research International*, 2005, 38, 1039 – 1044)



รูปที่ 4 : โครงสร้างของ Bisdemethoxycurcumin

สารบริสุทธิ์ NKSS-20 มาทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR และ MS) ทำให้ทราบโครงสร้างของ NKSS-20 คือสาร Sesquiterpene ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไข้หวัดนก (ไม่สามารถเปิดเผยโครงสร้างได้เนื่องจากกำลังดำเนินการจดสิทธิบัตร)