บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 อุปกรณ์การทดลอง

นอกจากเครื่องแก้วและอุปกรณ์พื้นฐานต่างๆที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการเคมีแล้ว ผู้ทำการวิจัยยังได้ใช้เครื่องมืออื่นเพิ่มเติม ดังนี้

2.1.1 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ของบริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

2.1.2 เครื่อง soxhlet

2.1.3 เครื่องกลั่นธรรมดา

2.1.4 เครื่องโครมาโททรอน (Chromatotron) รุ่น 7924 ของบริษัท Harrison Research ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.5 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Fourier Transform) รุ่น VXR-Unity mercury 400 ของบริษัท Varian ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.1.6 UV lamp ใช้ตรวจสอบสารที่ดูดกลืนแสงในช่วง UV บนแผ่น TLC

2.1.7 เครื่องดูดอากาศ (suction pump)

2.1.8 เครื่องอังไอน้ำ (water bath)

2.1.9 เครื่องชั่งไฟฟ้า

2.2 สารเคมี

2.2.1 ตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตต และเมทานอล โดยตัวทำละลายทั้งหมดจะนำมากลั่นก่อนนำมาใช้

2.2.2 ซิลิกาเจลชนิด 60G Art.7734 สำหรับการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี และซิลิกาเจลชนิด 7731 สำหรับทำควิกคอลัมน์

2.2.3 ซิลิกาเจลชนิด 60 PF_{254} (7749) สำหรับการทำโครมาโททรอน ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมัน

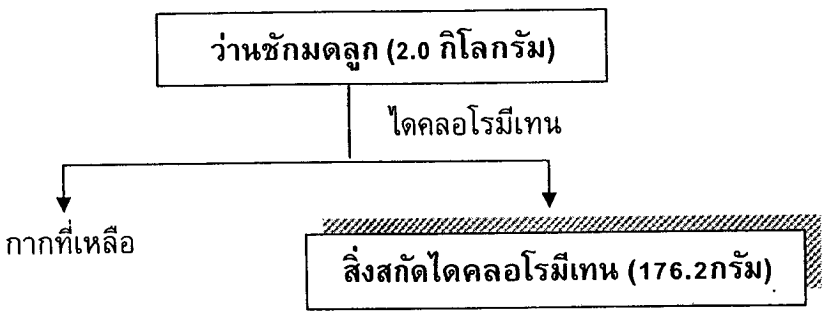
2.2.4 แผ่น Thin-Layer Chromatography (TLC) สำเร็จรูปซิลิกาเจลชนิด PF_{254} ของบริษัท E.Merck ประเทศเยอรมัน

2.3 วิธีการดำเนินการวิจัย (Materials & method)

2.3.1 ว่านชักมดลูก เก็บมาจาก จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อปี พ.ศ 2553 แหล่งปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

2.3.2 การสกัดว่านชักมดลูก

นำว่านชักมดลูกที่แห้งและตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จำนวน 2.0 กิโลกรัม มาทำการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน โดยใช้ Soxhlet extractor เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นกรองเพื่อแยกกากออก สารละลายที่กรองได้นำไปกลั่นแบบลดความดันเพื่อแยกตัวทำละลายออก ได้สิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนหนักประมาณ 176.2 กรัม โดยขั้นตอนการสกัดแสดงในแผนภาพที่ 1

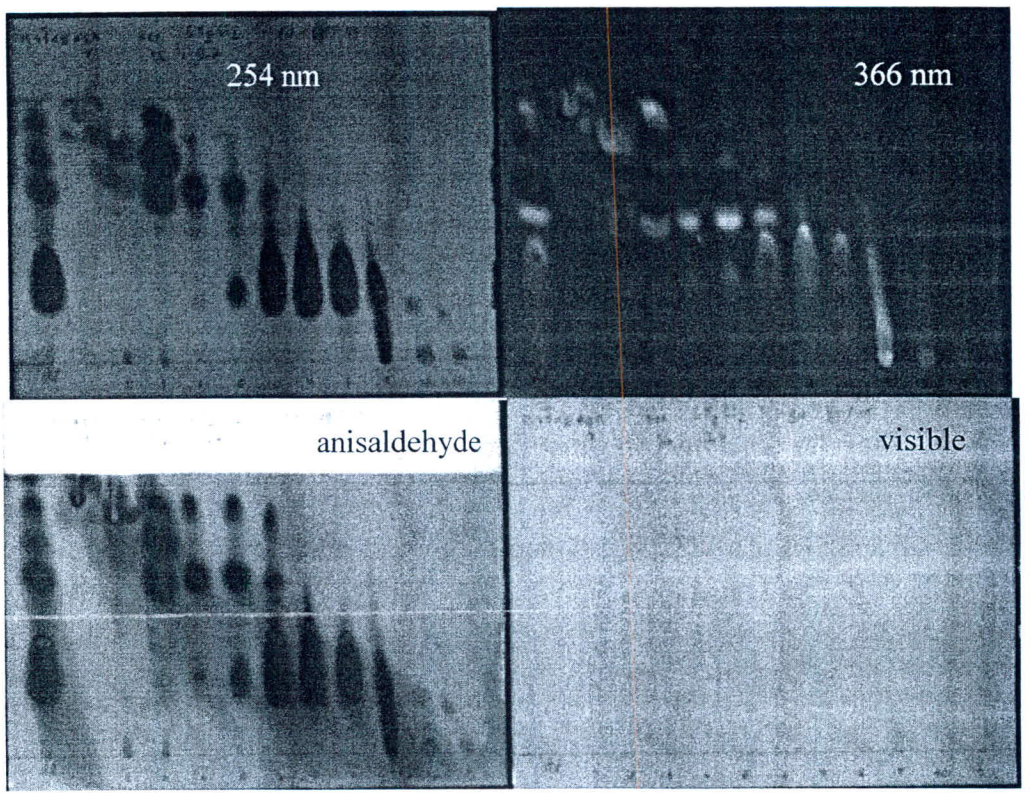


แผนภาพที่ 1 การสกัดว่านชักมดลูก

2.3.3 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของว่านชักมดลูก

การแยกสารบริสุทธิ์ในสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน

นำสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน 176.2 กรัม มาแยกด้วยเทคนิควิกคอลัมน์ (quick column) โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเริ่มจาก 100% เฮกเซน, 20% และ 40% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซนไปจนถึง 100% ไดคลอโรมีเทน ต่อมาจึงชะด้วย 5%, 10%, 20% และ 40% เอทิลอะซิเตดในไดคลอโรมีเทนไปจนถึง 100% เอทิลอะซิเตต จากนั้นจึงชะด้วย 5%, 10%, 20%, 40% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนไปจนถึง 100% เมทานอล ในขั้นตอนนี้สามารถเก็บสารได้ 10 แฟรกชัน ดังรูปที่ 1 โดยรวมแต่ละแฟรกชันที่เหมือนกันจากการทำ TLC ได้ 5 แฟรกชัน



รูปที่ 1 TLC ของแฟรกชันที่แยกได้จากเทคนิคควิกคอลัมน์ของสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทน

นำสารแต่ละแฟรกชันที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

แฟรกชันที่	น้ำหนักสาร (กรัม)	ลักษณะ
1	9.88	สีเหลืองอ่อน
2	2.53	สีเหลืองอ่อน
3	36.58	สีส้มแดง
4	34.91	สีน้ำตาลแดงเข้ม
5	13.66	สีน้ำตาลแดงเข้ม

นำสารแฟรกชันที่ 3 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 36.58 กรัม ที่ได้จากการทำควิกคอลัมน์ มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ เริ่มชะด้วยตัวทำละลาย 100% เฮกเซน, 2%, 4%, 6%,10% และ 20% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซนไปจนถึง 100% ไดคลอโรมีเทน จากนั้นจึงชะด้วย 5%, 10%, 20%, 30% และ 50% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนไปจนถึง 100% เมทานอล โดยจะเก็บแฟรกชันใส่ขวดรูปชมพู่ 50 มิลลิลิตร ครั้งละ 20 มิลลิลิตร ในขั้นตอนนี้สามารถเก็บสารได้ 11 แฟรกชัน จากการ

รวมสารที่ให้ผล TLC เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ จากนั้นจึงนำสารแต่ละแฟรกชันที่ได้มาระเหยแห้ง

แฟรกชันที่	น้ำหนักสาร (กรัม)	ลักษณะ
3.1	0.11	สีเหลืองอ่อน
3.2	0.42	สีเหลืองอ่อน
3.3	2.64	สีเหลืองอ่อน
3.4	1.42	สีเหลืองอ่อน
3.5	1.22	สีส้มแดง หนืดและมีตะกอน
3.6	6.03	สีเหลืองเข้มและหนืด
3.7	4.00	สีดำมีตะกอนสีเหลือง
3.8	4.11	สีน้ำตาลแดงเข้ม
3.9	0.54	สีน้ำตาลแดงเข้ม
3.10	0.44	สีน้ำตาลแดงเข้ม
3.11	0.18	สีน้ำตาลดำ

นำสารแฟรกชันที่ 3.9 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดงเข้ม น้ำหนัก 0.54 กรัม ที่ได้จากข้อข้างต้นมาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ เริ่มชะด้วยตัวทำละลาย 100% เฮกเซน, 2%, 4%, 6%,10% และ 20% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซนไปจนถึง100% ไดคลอโรมีเทน ขั้นตอนนี้สามารถเก็บสารได้ 50 แฟรกชัน รวมเป็น 6 แฟรกชัน (3.9.1-3.9.6) จากการตรวจสอบด้วย TLC จากนั้นจึงนำสารแต่ละแฟรกชันที่ได้มาระเหยแห้ง

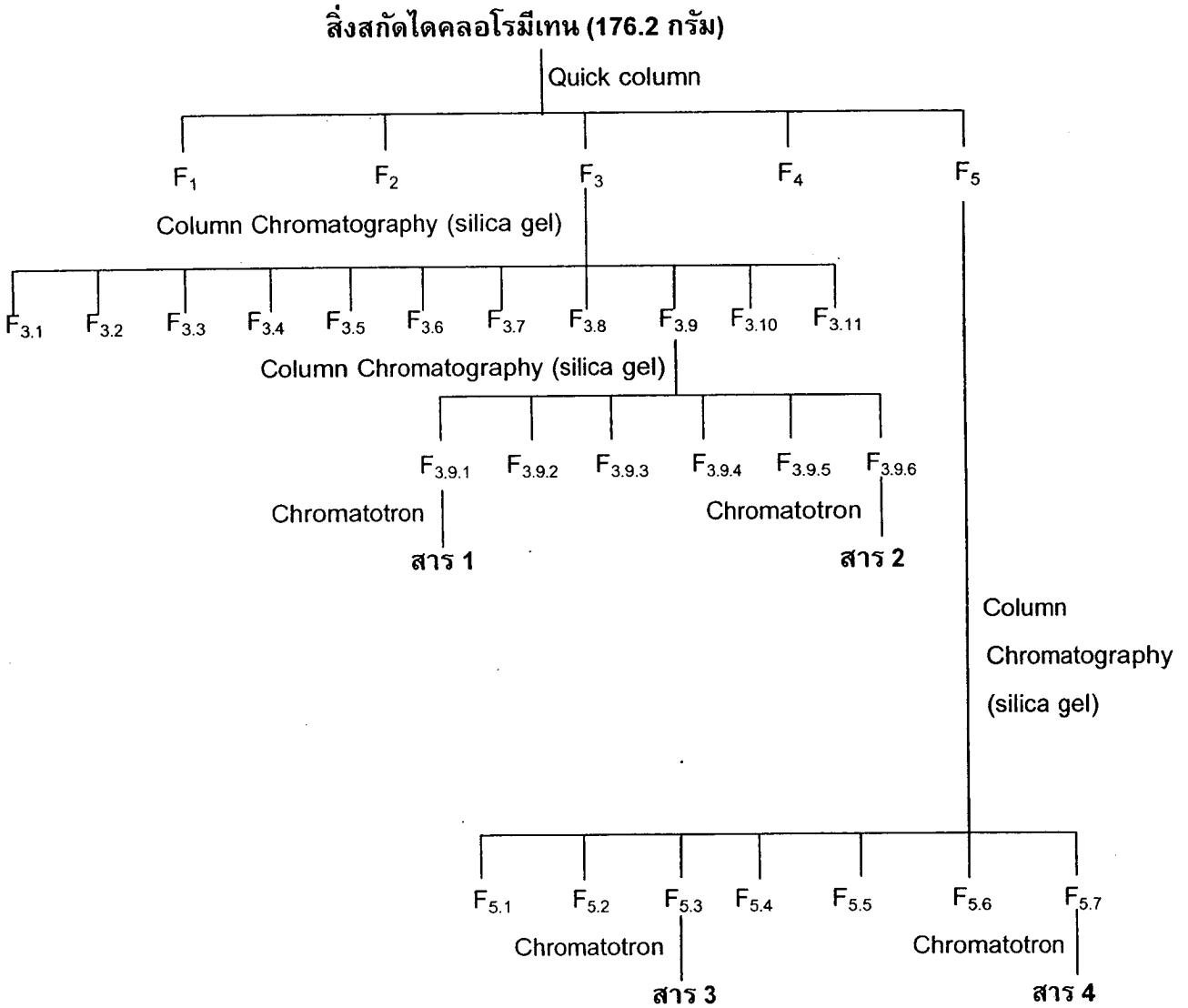
นำสารแฟรกชันที่ 3.9.1 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 0.16 กรัม มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโททรอน (Chromatotron) ด้วย 5% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน จะได้สารออกมา 2 แฟรกชัน จากนั้นจึงนำเอาสารแฟรกชันที่ 2 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านเทคนิคโครมาโททรอนอีกครั้งหนึ่งด้วย 100% เฮกเซน จะได้ สาร **1** หนัก 0.018 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี ได้แก่ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR

นำสารแฟรกชันที่ 3.9.5 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 0.072 กรัม มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโททรอน (Chromatotron) ด้วย 5% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซน จะได้สารออกมา 2 แฟรกชัน จากนั้นจึงนำเอาสารแฟรกชัน ที่ 2 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านเทคนิคโครมาโททรอนอีกครั้งหนึ่งด้วย 100% เฮกเซน จะได้ สาร **2** หนัก 0.009 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี ได้แก่ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR

นำสารแฟรกชันที่ 5 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีน้ำตาลแดงเข้ม น้ำหนัก 13.66 กรัม ที่ได้จากการทำควิกคอลัมน์ มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ เริ่มชะด้วยตัวทำละลาย 100% เฮกเซน, 10%, 20%, 30%, 50% และ 80% ไดคลอโรมีเทนในเฮกเซนไปจนถึง 100% ไดคลอโรมีเทน จากนั้นจึงชะด้วย 10%, 20%, 50% และ 70% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนไปจนถึง 100% เมทานอล โดยจะเก็บแฟรกชันใส่ขวดรูปชมพู่ 50 มิลลิลิตร ครั้งละ 20 มิลลิลิตร ในขั้นตอนนี้สามารถเก็บสารได้ 20 แฟรกชัน และรวมสารที่ให้ผล TLC เหมือนกันเข้าด้วยกันได้ 7 แฟรกชัน (5.1-5.7)จากนั้นจึงนำสารแต่ละ fraction ที่ได้มาระเหยแห้ง

นำสารแฟรกชันที่ 5.3 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 1.56 กรัม มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโททรอน (Chromatotron) ด้วย 100% ไดคลอโรมีเทน จะได้สารออกมา 2 แฟรกชัน จากนั้นจึงนำเอาสารแฟรกชันที่ 2 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านเทคนิคโครมาโททรอนอีกครั้งหนึ่งด้วย 100% เฮกเซน จะได้สาร **3** หนัก 0.191 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี ได้แก่ ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR

นำสารแฟรกชันที่ 5.7 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน น้ำหนัก 0.61 กรัม มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโททรอน (Chromatotron) ด้วย 100% ไดคลอโรมีเทน จะได้สารออกมา 2 แฟรกชัน จากนั้นจึงนำเอาสารแฟรกชันที่ 2 มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อน มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านเทคนิคโครมาโททรอนอีกครั้งหนึ่งด้วย 50% เอทิลอะซิเตตในเฮกเซนจะได้ สาร **4** หนัก 0.073 กรัม มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างโดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโคปี ได้แก่ ^{1}H-NMR ดังแผนภาพที่ 2



<u>แผนภาพที่ 2</u> ขั้นตอนการแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากว่านชักมดลูกให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟี

2.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในว่านชักมดลูก ที่ปลูกจากการทดลองที่ 1

เรื่อง ผลของการพรางแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต ของสมุนไพรว่านชักมดลูก และการทดลองที่ 2 เรื่องชนิดและอัตราปุ๋ยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต ของสมุนไพรว่านชักมดลูก ครั้งที่ 1 อายุการเก็บเกี่ยว 8 และ19 เดือน

2.3.4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดว่านชักมดลูก

การสกัดสารจากสมุนไพรว่านชักมดลูกโดยใช้เครื่องเขย่า เพื่อหา Condition ที่เหมาะสม สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ

1. ชั่งผงว่านชักมดลูกที่ดูดความชื้นจนแห้งสนิท น้ำหนัก 1,2,3,4 กรัม อย่างละ 6 ซ้ำ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml

2. เติมตัวทำละลายคือ Hexane, CH_2Cl_2, EtOAc และ Methanol 10, 25 และ 100 ml และ เขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็ว 300 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุก 1,2,3,4 และ 5 ชั่วโมง

3. กรองกากผงออก และนำสารละลายมาปรับปริมาตรดังเริ่มต้น

4. นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละสภาวะมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยชุดวิเคราะห์ HPTLC (High performance thin-layer chromatography) โดยใช้ Ethyl acetate : Methanol (85:15) เป็น mobile phase

5. สภาวะที่เหมาะสมที่สามารถสกัดสารสำคัญได้มากที่สุดคือ ผงว่านชักมดลูก 1 กรัม สกัดด้วยเมทานอล 10 ml เขย่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.3.4.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในว่านชักมดลูกจากการทดลองที่ 1 และ 2 โดยใช้ชุดวิเคราะห์ HPTLC (High performance thin-layer chromatography) โดยใช้ Ethyl acetate : Methanol (85:15) เป็น mobile phase วิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ densitometer

2.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในว่านชักมดลูก ที่ปลูกจากการทดลองที่ 1 เรื่อง ผลของการพรางแสงที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต ของสมุนไพรว่านชักมดลูก และการทดลองที่ 2 เรื่องชนิดและอัตราปุ๋ยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ผลผลิต ของสมุนไพรว่านชักมดลูก ครั้งที่ 2 อายุการเก็บเกี่ยว 7 เดือน ทำเหมือนกับข้อ 2.3.4

2.3.6 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในว่านชักมดลูก จากตัวอย่างที่ซื้อจากท้องตลาด

2.3.6.1 การสกัดสารจากสมุนไพรว่านชักมดลูกโดยใช้เครื่องเขย่า สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ

1. ชั่งผงว่านชักมดลูก ชนิดแคปซูลที่ซื้อจากท้องตลาดน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml

2. เติม Methanol 10 ml และ เขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3. กรอง และนำสารละลายมาปรับปริมาตรเป็น 15 ml

2.3.6.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยชุดวิเคราะห์ HPTLC (High performance thin-layer chromatography) โดยฉีดสารสกัด 5 ไมโครลิตรเทียบกับสารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น (2, 4, 8,12 ไมโครลิตร) ใช้ Ethyl acetate : Methanol (85:15) เป็น mobile phase