

บทที่ 3

วิธีการการดำเนินการวิจัย

สถานที่ดำเนินการวิจัย

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ในการศึกษาวิจัยนี้ มีเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลองแสดงในตาราง 3 และ 4 ตามลำดับ

ตาราง 3 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ – อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิตและรุ่น	ประเทศ
1. เครื่องชั่งชนิด 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)	Mettler Toledo รุ่น AB304 – S	Switzerland
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV – lamp)	CA91786	USA
3. เครื่องระเหยความดันไอลดต่ำ (Evaporator)	Butachi U-2001	Switzerland
4. ชุดรีฟลักซ์		
5. ทีแอลซี เพลท (TLC plate aluminium sheet)	Silica gel F ₂₅₀	Germany
6. นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy)	Bruker AMX 400 MHz ADVANCE	Australia
7. ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโทรมิเตอร์ (Fourier transform infrared spectrometer)	Perkin Elmer	USA

ตาราง 4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)	Analytical reagent A.R	Thailand
2. 1,4-ไซโคลเฮกเซนไดโอน (1,4-cyclohexanedione)	Ajax finechem	Australia
3. ซิลิกา เจล (silica gel GF ₂₅₄)	Aldrich chemistry	Germany
4. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	Merck	Germany
5. โซเดียมซัลเฟต (sodium sulphate anhydrous)	Merck	Germany
6. ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)	J.T.Baker A.R	USA.
7. ไพรีดีน (pyridine)	Ajax finechem	Australia
8. ลิเทียมคลอไรด์ (lithium chloride)	Ajax finechem	Australia
9. เอทานอล (ethanol)	J.T.Baker A.R	USA.
10. เอทิล อะซิเตท (ethyl acetate)	Analytical univar A.R	Australia
11. เฮกเซน (hexane)	Analytical univar A.R	Australia

วิธีการทดลอง

1. เตรียมตัวอย่างใบสายหยุด

นำใบสายหยุดล้างให้สะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 12 ชั่วโมง นำใบสายหยุดที่อบแห้งแล้ว มาป่นให้ละเอียด

2. ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากใบสายหยุด

ผงใบสายหยุดมา 500 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมเอทานอล 500 มิลลิลิตร ปิดฝาบีกเกอร์ ทิ้งไว้ 5 วัน นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นแบบสุญญากาศ นำสารสกัดหยาบใบสายหยุดที่ได้ไปชั่งน้ำหนัก

* ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนเอทานอลเป็น เฮกเซน และ ไคคลอโรมีเทน ตามลำดับ

3. การแยกส่วนประกอบทางเคมีจากใบสายหยุด โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี (Chromatography)

3.1 การเตรียมคอลัมน์

3.1.1 ล้างคอลัมน์ให้สะอาด

3.1.2 นำสำลีบางๆใส่ลงไป

3.1.3 เตรียมเฮกเซน เพื่อใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

3.1.4 เตรียมซิลิกาเจลใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยให้ซิลิกาเจลอยู่ที่ระดับ 200 มิลลิลิตร ของบีกเกอร์

3.1.5 แบ่งสารละลายเฮกเซน ที่เตรียมไว้มา 300 มิลลิลิตร แล้วเทลงในบีกเกอร์ที่บรรจุซิลิกาเจลอยู่ คนให้ซิลิกาเจลกระจายทั่วในสารละลายเฮกเซน แล้วเทลงในคอลัมน์ให้มีความสูงประมาณ 30 เซนติเมตร

3.1.6 ค่อยๆปล่อยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ออกมาจากคอลัมน์จนมีระดับเหนือซิลิกาเจล 0.5 เซนติเมตร

3.2 การแยกส่วนประกอบทางเคมี

3.2.1 แบ่งสารสกัดหยาบใบสายหยุดที่ได้มา 1 กรัม ละลายด้วยไคคลอโรมีเทน 5 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆเทลงในคอลัมน์

3.2.2 ค่อยๆเทสารละลายเฟสเคลื่อนที่เฮกเซน ตามลงไปจนเต็มคอลัมน์

3.2.3 เริ่มปล่อยสารออกจากคอลัมน์และเก็บสารที่ปล่อยออกมาในหลอดทดลองขนาด 20 ml

3.2.4 แล้วเติมสารละลายเฟสเคลื่อนที่ไคคลอโรมีเทน : เฮกเซน ที่อัตราส่วน 0 : 100 จนหมด ค่อยๆชะสารลงมา แล้วเพิ่มขั้วของเฟสเคลื่อนที่ขึ้นเรื่อยๆ โดยเปลี่ยนอัตราส่วนของไคคลอโรมีเทน : เฮกเซน เป็น 20 : 80, 30 : 70, 40 : 60, 50 : 50, 60 : 40, 70 : 30, 80 : 20, 90 : 10, 100 : 0 หรือหยุดเพิ่มขั้วเมื่อสารแยกออกมาจากคอลัมน์หมดแล้ว

3.2.5 ทดสอบหาชนิดของสารสังเคราะห์ที่ปล่อยออกมาจากคอลัมน์ด้วยเทคนิค TLC chromatography โดยใช้ ไคคลอโรมีเทน : เฮกเซน ที่อัตราส่วน 1 : 1 เป็นเฟสเคลื่อนที่

3.2.6 รวมสารที่มีค่า R_f เดียวกันหรือใกล้เคียงกันมากที่สุดไปประเหยด้วยเครื่องระเหยความดัน ใอดำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไปจนแห้ง แล้วเก็บสารที่ติดในขวดก้นกลมไว้ในที่แห้ง

4. การวิเคราะห์หาโครงสร้างส่วนประกอบทางเคมีจากใบสายหยุด ด้วยเทคนิคทาง สเปกโทรสโกปี

4.1 วิเคราะห์หาโครงสร้างสาร ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR)

นำสารสังเคราะห์ห่อนุพันธ์ไฮโดรควิโนนมาละลายด้วยไดคลอโรมีเทน ทดสอบด้วย เครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR)

4.2 นำส่วนประกอบทางเคมีจากใบสายหยุดที่ได้ ไปวิเคราะห์หาโครงสร้างสาร ด้วยเครื่อง ^1H Nuclear magnetic resonance spectrometer ($^1\text{H-NMR}$)

4.2.1 นำสารสังเคราะห์ห่อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน ใส่หลอด NMR sample ที่สะอาดและแห้งสนิท

4.2.2 ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม คือ CDCl_3 ใส่ลงในหลอด NMR สูงประมาณ 2 เซนติเมตร

4.2.3 เขย่าเบา ๆ เพื่อให้สารตัวอย่างละลายในตัวทำละลายแล้วนำไปทดสอบด้วยเครื่อง ^1H Nuclear magnetic resonance spectrometer ($^1\text{H-NMR}$)

5. นำส่วนประกอบทางเคมีที่ได้จากใบสายหยุดมาทำการสังเคราะห์ห่อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

5.1 การสังเคราะห์ห่อนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

5.1.1 นำ 1,4-ไซโคลเฮกเซนไดโอน 28 มิลลิกรัม (2.5×10^{-4} mol) ไอโซยูโนนาล (isounonal) 60 มิลลิกรัม (2.5×10^{-4} mol) และ ลิเทียมคลอไรด์ 11 มิลลิกรัม (2.5×10^{-4} mol)

5.1.2 เติมตัวทำละลายพริดีน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในข้อ 5.1.1

5.1.3 นำไปทำปฏิกิริยาในชุดรีฟลักซ์โดยให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2 การสกัดสารสังเคราะห์

5.2.1 นำสารที่สังเคราะห์ได้ไปสกัดอย่างง่ายด้วยเอทิล อะซีเตท 20 มิลลิลิตร กับ 10 % กรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 10 นาที

5.2.2 แยกนำสารชั้นบนมาสกัดต่อด้วยโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว 10 มิลลิลิตร เขย่าประมาณ 10 นาที

5.2.3 แยกนำสารชั้นบนที่ได้ มาเติมโซเดียมซัลเฟตที่มากเกินพอ

5.2.4 นำสารสังเคราะห์ที่ผ่านกระบวนการสกัดไประเหยด้วยเครื่องระเหย ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วเก็บสารที่ตกในขวดก้นกลมไว้ในที่แห้ง

6. การแยกอนุพันธ์ไฮโดรควิโนน โดย Preparative thin-layer chromatography (PLC)

6.1 การเตรียมแผ่น PLC

นำแผ่นกระจกที่แห้ง มาเคลือบด้วยซิลิกาเจล อบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

6.2 การแยกอนุพันธ์ไฮโดรควิโนน

5.2.1 นำอนุพันธ์ไฮโดรควิโนนที่สังเคราะห์ได้ มาขีดลงแผ่นกระจกที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล จากข้อ 6.1

5.2.2 นำแผ่นกระจก มาแช่ใน Tank ที่บรรจุไดคลอโรมีเทน : เฮกเซน อัตราส่วน 1:1 เป็นเฟสเคลื่อนที่ รอนสารละลายถึงขอบบนของแผ่นกระจกจึงนำออก

5.2.3 ละลายอนุพันธ์ไฮโดรควิโนนที่ถูกดูดซับด้วยซิลิกาเจล ด้วยไดคลอโรมีเทน

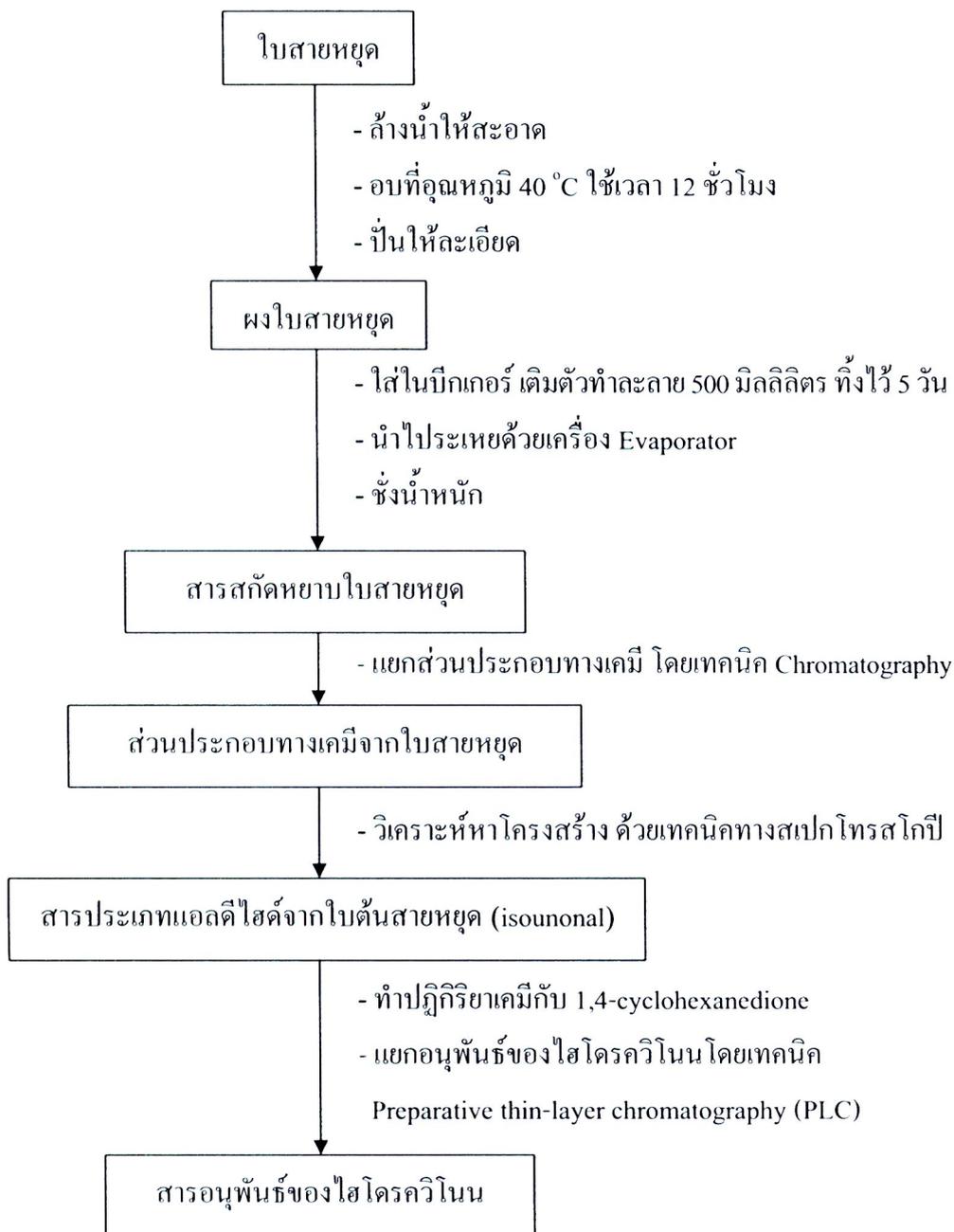
5.2.4 นำสารสังเคราะห์ที่ผ่านกระบวนการสกัดไประเหยด้วยเครื่องระเหย ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วเก็บสารที่ตกในขวดก้นกลมไว้ในที่แห้ง

5.2.5 กรองด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหย ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วเก็บสารที่ตกในขวดก้นกลมไว้ในที่แห้ง

7. การวิเคราะห์หาโครงสร้างอนุพันธ์ของไฮโดรควิโนน ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

ทำเช่นเดียวกับข้อ 4

แผนภาพวิธีการทดลอง



ภาพ 28 แผนภาพวิธีการทดลอง