

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Gas chromatography – Mass รุ่น QP 2000A บริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น
2. Infrared spectrophotometer รุ่น A – 800 บริษัท Jasco ประเทศญี่ปุ่น
3. UV – Visible spectrophotometer รุ่น UV – 265 บริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น
4. เครื่องมือกลั่นไอน้ำโดยตรง (direct steam distillation)
5. เครื่องบด (blender)
6. Rotary Vacuum Evaporator
7. ฐานเคลือบเพลท
8. TANK แก้ว
9. แผ่นแก้ว
10. UV lamp (short wave)

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็น lab grade ได้ทำให้บริสุทธิ์ก่อนใช้ โดยนำไปกลั่นที่อุณหภูมิ ณ จุดเดือดของตัวทำละลายนั่น ๆ

สารเคมีที่ผลิตโดยบริษัท BDH Chemical Ltd., England

1. Ethyl acetate $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}_3$, MW. 88.12, lab grade (b.p. 77°C)
2. Toluene $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$, MW.92.14, AR grade

สารเคมีที่ผลิตโดยบริษัท E.Merck, Darmstadt, Germany

1. Acetone (CH_3)₂CO, MW. 58.08, lab grade (b.p. 56.5°C)
2. Silica gel GF254

สารเคมีที่ผลิตโดยบริษัท J. T. Baker, U S A

Dichloromethane CH_2Cl_2 , MW.84.93, AR grade

สารเคมีที่ผลิตโดยบริษัท Farmitalia Carlo erba SRL AR, Italy

Anhydrous magnesium sulphate MgSO_4 , MW 12.32, Lab grade

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

มะกรูด	เป็นพืชในตระกูล RETACEAE ชื่อสามัญ Bergamot ชื่อวิทยาศาสตร์ <i>Citrus hystrix</i> Dc. ในการทดลองนี้ได้มาจากตลาดต้นพะยอม อ.เมือง จ. เชียงใหม่
ส้มโอ	เป็นพืชตระกูล RETACEAE ชื่อสามัญ Pomelo ชื่อวิทยาศาสตร์ <i>Citrus grandis</i> Osb. ในการทดลองนี้ได้มาจากตลาดต้นพะยอม อ. เมือง จ.เชียงใหม่
ตะไคร้หอม	เป็นพืชตระกูล GRAMINEAE ชื่อสามัญ Citronella Grass ชื่อวิทยาศาสตร์ <i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt. ในการทดลองนี้ได้มาจากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.4 การทดลอง

2.4.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด ผิวส้มโอ และตะไคร้หอม

ในการทดลองนี้ใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำโดยตรง (direct steam distillation) ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และประหยัดค่าใช้จ่าย ขั้นตอนการสกัดมีดังนี้ คือ

2.4.1.1 จัดเครื่องมือกลั่นแบบ direct steam distillation

2.4.1.2 ชั่งผิวมะกรูด ผิวส้มโอ หรือตะไคร้หอมที่หั่นแล้วประมาณ 100 กรัม นำไปปั่นในเครื่องปั่น ลงในขวดก้นกลมเติมน้ำกลั่นประมาณ 400 – 450 มล. หลังจากนั้นทำการกลั่นเก็บของเหลวที่กลั่นได้จนปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยที่ได้คงที่ (ประมาณ 3 ชั่วโมง)

2.4.1.3 นำของเหลวที่ได้จากการกลั่นนี้มาแยกเอาน้ำมันหอมระเหยออกโดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย ในการทดลองครั้งนี้ตัวทำละลายที่ใช้คือ dichloromethane เทสารละลายที่กลั่นได้ลงในกรวยสกัด (separating funnel) เติม dichloromethane ลงไป 30 มล. เขย่าแรง ๆ เป็นเวลา 2 – 3 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น หลังจากนั้นแยกชั้น dichloromethane ซึ่งลอยอยู่ด้านบนออกมา เติม anhydrous magnesium sulphate ลงในสารละลาย dichloromethane นี้ลงไปปริมาณเล็กน้อยเพื่อดูดน้ำที่ยังคงมีอยู่ในสารละลายกรองเอา anhydrous magnesium sulphate ออก

2.4.1.4 นำสารละลาย dichloromethane ไประเหยเอา dichloromethane ออกโดยเครื่อง Rotary Vacuum Evaporator เมื่อ dichloromethane ระเหยออกหมดแล้ว จะเหลือน้ำมันหอมระเหยอยู่ในขวดกลั่น

2.4.2 การทดสอบสมบัติการไต่ของของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด ผิวส้มโอและตะไคร้หอม

นำน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด ผิวส้มโอ และตะไคร้หอม มาทดสอบสมบัติการไต่ของ โดยวิธีการดังต่อไปนี้

1. ทำการเพาะยุง โดยนำลูกน้ำจากแหล่งน้ำใกล้บ้านมาใส่ในอ่างน้ำที่วางในกล่องซึ่งฝาปิดมิดชิด โดยด้านหน้ากล่องเป็นพลาสติกใสเพื่อเราจะได้เห็นว่าลูกน้ำเปลี่ยนสภาพเป็นยุงตัวเต็มวัยหรือยัง

2. เตรียมยาทาแก้นยุง 3 สูตร ดังต่อไปนี้
 1. วาสลิน : น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด (1:1 โดยปริมาตร)
 2. วาสลิน : น้ำมันหอมระเหยจากผิวส้มโอ (1:1 โดยปริมาตร)
 3. วาสลิน : น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม (1:1 โดยปริมาตร)
3. เตรียมห้องทดสอบขนาด $2.5 \times 3 \times 3$ ม. ซึ่งมีมุ้งลวดที่หน้าต่างและประตู
4. ทำการทดสอบสมบัติการไล่ยุง
 - 4.1 นำยุงที่เพาะได้ประมาณ 100 ตัว ปล่อยเข้าไปภายในห้องทดสอบ
 - 4.2 นำยาแก้นยุงทาผู้ทดสอบ
 - 4.3 นำผู้ทดสอบเข้าไปในห้องและคอยนับจำนวนยุงที่มากาะภายใน 1 ชั่วโมง ทำเช่นนี้จนครบ 3 สูตรเทียบกับการไม่ทายาแก้นยุงและทาวาสลินเพียงอย่างเดียว

2.4.3 การแยกสารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดโดยเทคนิคโครมาโตกราฟี ฝิวบาง (Thin Layer Chromatography ,TLC)

2.4.3.1 การเตรียม โครมาโตเพลทสำหรับใช้ใน โครมาโตกราฟีฝิวบาง

ตัวดูดซับที่ใช้ในการทดลองนี้คือ silica gel GF254 ผสม silica gel GF 254 กับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 เขย่าแรง ๆ ในขวดกั่นกลมเป็นเวลาประมาณ 1 – 2 นาทีจนเป็น slurry เทใส่เครื่อง TLC spreader ที่สามารถปรับความหนาของตัวดูดซับได้ (การทดลองนี้ใช้เครื่องลากแบบ Quickfit) ลากไปบนเพลทที่ทำด้วยแผ่นแก้วใสก็จะได้โครมาโตเพลท นำโครมาโตเพลทนี้ไปอบที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนโครมาโตเพลทแห้ง

2.4.3.2 การแยกองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีฝิวบาง

นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการสกัดตามข้อ 2.4.1 มาแล้วเติม dichloromethane ประมาณ 5 มล. แล้วนำสารละลายที่ได้ไปหยดลงบนโครมาโตเพลทที่เตรียมจากข้อ 2.4.3.1 โดยการหยดน้ำมันหอมระเหยเป็นแถว (ดังรูป 2.1) แล้วปล่อยให้แห้งดีแล้วโดยใช้เครื่องเป่าเมื่อแห้งแล้วนำโครมาโตเพลทไปหย่อนลงในแท็งค์แก้วที่บรรจุตัวทำละลายที่ประกอบด้วย Toluene : Ethyl acetate ในอัตราส่วน 93 : 7 โดยปริมาตรแล้วปิดฝาแท็งค์ให้แน่นให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไปเป็นระยะทางประมาณ 15 ซม. หลังจากนั้นจึงนำออกจากแท็งค์ปล่อยให้แห้งในตู้ควัน



รูป 2.1 ไดอะแกรมแสดงการหยดสารบนโครมาโตเฟลทของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด นำแผ่นโครมาโตแกรมมาส่องดูด้วย UV - lamp จะปรากฏว่ามีการเรืองแสงเกิดขึ้น ขณะที่ส่องดูก็ขีดแนวของสารที่ปรากฏให้เห็นภายใต้ UV - lamp เพื่อให้รู้ขอบเขต หรือบริเวณที่อยู่ของสารที่แยกตัวออกมาเป็นแถบ ๆ ต่อจากนั้นจุดซิลิกาเจล ที่มีสารที่แยกออกจากกันในแต่ละแถบที่ Rf ต่าง ๆ ใส่ในขวดหมุ่นนำเอาผงซิลิกาเจล ที่จุดได้มาทำการสกัดแยกเอาสารออกจากซิลิกาเจล อีกครั้งหนึ่งด้วยตัวทำละลาย dichloromethane โดยการสกัดหลายครั้งด้วยกันเพื่อให้สารออกมาหมดขั้นต่อไปนำสารที่กรองได้แต่ละส่วนไปทำการระเหยให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่อง Rotary Vacuum Evaporator เพื่อระเหย dichloromethane ออก

นำสารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่แยกได้ในแต่ละแถบตามข้อ 2.4.3.2 มาทำการตรวจสอบดูอีกครั้งหนึ่งว่าเป็นสารบริสุทธิ์หรือไม่

2.4.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิบบาง (Thin Layer Chromatography)

นำสารองค์ประกอบที่ได้ตามข้อ 2:4.3.2 ในแต่ละส่วนมาตรวจสอบดูอีกครั้งว่าเป็นสารบริสุทธิ์หรือไม่โดยหยดสารแต่ละส่วนลงบนโครมาโตเฟลทแต่เปลี่ยนชนิดของ developing solvent มากกว่า 1 ชนิดนำแผ่นโครมาโตแกรมมาส่องดูด้วย UV – lamp

2.4.5 การทดสอบสมบัติการละลายของสารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่แยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิบบาง (Thin Layer Chromatography)

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบสมบัติการละลายของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดผิวส้มโอและตะไคร้หอมแต่สูตรของยาทาทั้งยุงใช้สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่แยกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิบบางผสมกับวาสลีนแทนน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรทั้งสามชนิดซึ่งจะได้ยาทาทั้งยุงทั้งหมด 4 สูตรคือ $Rf_1 - Rf_4$

2.4.6 การวิเคราะห์สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่แยกโดยเทคนิค TLC ซึ่งมีสมบัติละลายได้

2.4.6.1 การวิเคราะห์สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดด้วย Infrared spectrometer นำองค์ประกอบเหล่านั้นแต่ละตัวทาบน NaCl - cell

2.4.6.2 การวิเคราะห์สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดด้วย UV – Visible spectrometer นำองค์ประกอบเหล่านั้นแต่ละตัวมาละลายใน dichloromethane นำไปวัดการดูดกลืนแสง UV – Visible ในช่วงคลื่น 200 – 600 nm เทียบกับ dichloromethane

2.4.6.3 การวิเคราะห์สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดด้วย Mass spectrometer ของเครื่อง GC – MS รุ่น QP 2000A

2.4.7 การวิเคราะห์สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวส้มโอ และตะไคร้หอม

การวิเคราะห์สารองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยเหล่านี้ใช้ Gas chromatography – Mass spectrometer รุ่น QP 2000A

โดยมีเงื่อนไขการวิเคราะห์ดังนี้

- Column : เป็นชนิด fused silica แบบ WCOT Model CBP 1 – M 25 – 025
 : เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 มม. ของ บริษัท SHIMUDSU
 : ความยาว 250 ซม. เคลือบด้วย OV – 1
- Carrier gas He : อัตราการไหล 0.75 Kg / cm^2
- Temperature : อุณหภูมิ injector = $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 : อุณหภูมิ oven = program 70 - 185 $^{\circ}\text{C}$
 : อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 15 $^{\circ}\text{C / นาที}$
- MS : พลังงาน 70 eV