

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

เก็บพืชตัวอย่างใน อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี นำมาตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์โดยเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้แห้งในหอพรรณไม้ กรมสัตว์ป่าและพรรณพืช

3.2 เทคนิคทั่วไป

3.2.1 Analytical Thin-Layer Chromatography (TLC)

3.2.1.1 Normal phase Thin-Layer Chromatography

Technique	: One dimension, ascending
Adsorbent	: Silica gel 60 F ₂₅₄ (E. Merck) precoated plate (Aluminium sheet)
Layer thickness	: 0.2 mm
Distance	: 5 cm
Temperature	: room temperature (25-35 ^o C)
Detection	: 1. Ultraviolet light at 254 and 365 nm 2. Anisaldehyde reagent

3.2.1.2 Normal phase Thin-Layer Chromatography

Technique	: One dimension, ascending
Adsorbent	: Silica gel 60 F ₂₅₄ (E. Merck) precoated plate (Glass plate)
Layer thickness	: 0.25 mm
Distance	: 5 cm
Temperature	: room temperature (25-35 ^o C)
Detection	: 1. Ultraviolet light at 254 and 365 nm 2. Anisaldehyde reagent

3.2.1.3 Reverse phase Thin-Layer Chromatography

Technique	: One dimension, ascending
Adsorbent	: RP ₁₈ F _{254S} (E. Merck) precoated plate (Glass plate)
Layer thickness	: 0.25 mm
Distance	: 5 cm
Temperature	: room temperature (25-35 ^o C)
Detection	: Ultraviolet light at 254 and 365 nm

3.2.2 Column Chromatography

3.2.2.1 Column Chromatography

Adsorbent:	Silica gel 60 (70-230 mesh); particle size 0.063-0.200 mm (E. Merck)
Sample loading	: ละลายตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วยตัวทำละลาย จากนั้นนำไปใส่ column
Detection	: นำส่วนสกัดที่แยกได้ (Fractions) ตรวจสอบด้วย TLC สังเกตผลด้วยการส่องUV light จากนั้นพ่นด้วย anisaldehyde reagent

3.2.2.2 Gel Filtration Chromatography

Gel filter	: Sephadex LH 20 (Pharmacia)
Packing method	: แห่ Sephadex LH 20 ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เทลงใน column
Sample loading	: ละลายตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วยตัวทำละลาย จากนั้นนำไปใส่ column
Detection	: นำส่วนสกัดที่แยกได้ (Fractions) ตรวจสอบด้วย TLC สังเกตผลด้วยการส่องUV light จากนั้นพ่นด้วย anisaldehyde reagent

3.2.3 Spectroscopy

3.2.3.1 Mass Spectra

Fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS) และ Electron impact mass spectra (EIMS) วัดด้วยเครื่องมือ Polaris Q mass spectrometer (USA)

3.2.3.2 Proton and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance (^1H and ^{13}C -NMR)

Spectra

^1H NMR (500 MHz) และ ^{13}C NMR (125 MHz) spectra วัดด้วยเครื่องมือ Bruker 500 spectrometer (USA)

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

L-DOPA, Kojic acid (Acros Organics, USA), Methanol A.R.grade (Carlo Erba, Italy), Mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich, USA), L-ascorbic acid (Carlo Erba, Italy)

3.3 วิธีเตรียมสารสกัดจากพืช

นำส่วนใบของกระดังงาจีน 1.2 kg อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45°C จากนั้นย่อยให้มีขนาดที่เหมาะสม ส่วนใบกำจัดส่วนไข่ออกด้วยตัวทำละลาย hexane จากนั้นหมักต่อด้วย methanol ครั้งละ 2 L เก็บสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งโดยใช้ เครื่องมือ rotary evaporator (Switzerland) ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

ซังสารสกัดหยาบแล้วละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 1 mg/ml เติมสารที่ต้องการทดสอบ 20 μl ลงใน 96-well plate จากนั้นใส่สารละลาย DPPH 180 μl เก็บไว้เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 570 nm โดยใช้ เครื่องมือ microplate reader คำนวณ % การต้านอนุมูลอิสระ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) โดยมี L-ascorbic acid เป็น positive control

3.4.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ซังสารสกัดหยาบหรือส่วนสกัด นำมาละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 1 mg/ml เติม L-DOPA 20 μl ลงใน 96-well plate ไปเปิดสารที่ต้องการทดสอบ 20 μl เติมสารละลาย tyrosinase 20 μl บ่มที่อุณหภูมิ $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 490 nm โดยใช้ microplate reader คำนวณ % การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) โดยใช้ Kojic acid เป็น positive control

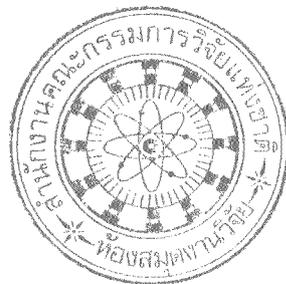
3.5 การแยกสารบริสุทธิ์และการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์จากกระดังงาจีน

นำสารสกัดหยาบของพืชมาทำการแยกจนได้สารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีต่างๆ จากนั้นศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่ออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรเมทรี

3.5.1 การแยกสารสกัดชั้น Methanol จากใบ

นำสารสกัดชั้น methanol 30 g มาแยกให้เป็นส่วนสกัดย่อยด้วยเทคนิค adsorption column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase เริ่มต้นการชะสารด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของตัวทำละลาย ดังนี้

Ethyl acetate	100
Ethyl acetate:Methanol	95:5
Ethyl acetate:Methanol	90:10
Ethyl acetate:Methanol	85:15
Ethyl acetate:Methanol	80:20
Ethyl acetate:Methanol	75:25
Ethyl acetate:Methanol	70:30
Ethyl acetate:Methanol	65:35
Ethyl acetate:Methanol	60:40
Ethyl acetate:Methanol	50:50
Ethyl acetate:Methanol	40:60
Ethyl acetate:Methanol	20:80
Ethyl acetate:Methanol	10:90
Methanol	100%



เก็บส่วนสกัดที่ถูกชะออกมารั้งละ 250 ml เปรียบเทียบแต่ละส่วนสกัดด้วย TLC จากนั้นรวมส่วนสกัดที่มีรูปแบบ TLC (TLC patterns) ที่เหมือนกันไว้ด้วยกัน ดังนั้นจะได้ส่วนสกัดจากลำดับทั้งหมด 7 ส่วนสกัด

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดย่อย

นำส่วนสกัดย่อยทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase และทำการแยกต่อไปจนได้สารบริสุทธิ์

3.5.3 การแยกสารบริสุทธิ์ AH-1, AH-2, AH-3

3.5.2.1 การแยกสารจากส่วนสกัด A5

นำส่วนสกัดย่อย A5 (0.8 g) มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยแยกด้วย gel filtration column chromatography โดยใช้ sephadex LH 20 เป็น stationary phase ส่วน mobile phase ใช้ methanol รวมส่วนสกัดย่อยที่เหมือนกันโดย spot ส่วนสกัดย่อยต่างๆ บน TLC สังเกตผลจากการดูดกลืนแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 254 nm จะได้ส่วนสกัดย่อย 5 fractions นำส่วนสกัด A-53 (0.07 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography โดยใช้ C-18 reverse phase silica gel เป็น stationary phase และใช้ 40% water ใน methanol เป็น mobile phase จะได้สารประกอบ AH-1 (4 mg) และส่วนสกัด A-54 (0.05 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography โดยใช้ C-18 reverse phase silica gel เป็น stationary phase และใช้ 40% water ใน methanol เป็น mobile phase สารประกอบ AH-2 (4 mg)

3.5.2.2 การแยกสารจากส่วนสกัด A6

นำส่วนสกัดย่อยที่ A6 (1.0 g) มาแยกด้วย มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยแยกด้วย gel filtration column chromatography โดยใช้ sephadex LH 20 เป็น stationary phase ส่วน mobile phase ใช้ methanol รวมส่วนสกัดย่อยที่เหมือนกันโดย spot ส่วนสกัดย่อยต่างๆ บน TLC สังเกตผลจากการดูดกลืนแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 254 nm จะได้ส่วนสกัดย่อย 4 fractions นำส่วนสกัด A-71 (0.17 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography โดยใช้ C-18 reverse phase silica gel เป็น stationary phase และใช้ 40% water ใน methanol เป็น mobile phase จะได้สารประกอบ AH-3 (10 mg)

3.6 การหาค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารบริสุทธิ์

สำหรับการหาค่า IC_{50} ของสารบริสุทธิ์ให้เตรียมสารความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นเจือจางต่ออีก 4-5 ความเข้มข้น ทำการทดสอบเช่นเดียวกับสารสกัด หาค่า IC_{50} ของสารด้วยโปรแกรม GraphPad (Prism, USA