บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี อุปกรณ์ และพืชที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

1. Hexane, Analytical grade, (Merk, Germany)
2. Dichloromethane, Analytical grade, (Merk, Germany)
3. Methanol, Analytical grade, (Merk, Germany)
4. Sodium sulphate anhydrous (Merk, Germany)
5. Silica gel 60
   - No. 7734, particle size 0.063-0.200 mm. (Merk, Germany)
   - No. 7729, particle size 0.063 mm. (Merk, Germany)
6. Silica gel 60 PF_{254} pre-coated on aluminum plate, (Merk, Germany)
7. Trolox (Sigma-Aldrich, Germany)
8. DPPH (2,2-diphenyl-1-pricrylhydrazyl radical) (Sigma chemical Co., USA)
9. Folin-Ciocalteau reagent (Merck, Germany)
10. Gallic acid (Sigma-Aldrich, Germany)
11. Ethanol, Analytical grade, (Merk, Germany)
12. Absolute ethanol (Merk, Germany)
13. Sodium carbonate (Sigma-Aldrich, Germany)
14. ABTS (Sigma-Aldrich, Germany)
15. Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) (Merk, Germany)
16. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich, Germany)
17. Sodium dihydrogenphosphate (NaH_2PO_4) (Sigma-Aldrich, Germany)
18. Potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) (Sigma-Aldrich, Germany)
19. Trichloroacetic acid (TCA) (Merck, Germany)
20. Ferric chloride ($FeCl_3$) (Sigma-Aldrich, Germany)
21. Deuterochloroform ($CDCl_3$) (Sigma-Aldrich, Germany)

PAYAP UNIVERSITY

3.1.2 อุปกรณ์

1. TLC aluminium sheets silica gel $60F_{254}$ (Merk, Germany)
2. Microplate UV/VIS Spectrophotometer (Multimode detector, Beckman Coulter DTX880, U.S.A.)
3. UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV2450, Japan)
4. Labsystems multiskan EX type 335 Microplate reader (Helsinki, Finland).
5. SpectraMax M5 muti-detection microplate reader (Molecular Devices, USA)
6. Nuclear magnetic resonance spectrometer (400 MHz ^{1}H-NMR และ 100 MHz ^{13}C-NMR) (Bruker AVANCE, Karlsruhe, Germany)
7. FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometer) (Tensor 27, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany).
8. Gas chromatography / mass spectrometer, GC/MS (HP GC6850 coupled with a HP 5973N mass selective detector)
9. Vacuum rotary evaporator (Buchi R-124)
10. Water bath (Memmert, Germany)

3.1.3 พืชที่ใช้ในการทดลอง

บุนนาค เก็บที่มหาวิทยาลัยพายัพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2553 นำส่วนกิ่งของต้นบุนนาคที่มีใบติดอยู่ มาจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้ง โดย J. F. Maxwell นักพฤกษศาสตร์ ภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และเก็บไว้อ้างอิงที่หอพรรณไม้และฐานข้อมูลของพืชพรรณ (Herbarium and Flora Database) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้ชื่อ (code number) ว่า Sukanya02 ส่วนที่จะใช้ศึกษาในการวิจัยครั้งนี้จะแบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ใบและกิ่ง

3.2 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบบุนนาค

นำใบสดของบุนนาค 1000 กรัม มาล้างทำความสะอาด และหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในขวดก้นกลมขนาด 5 ลิตร เติมน้ำกลั่น 3.5 ลิตร จัดตั้งอุปกรณ์ชุดกลั่นด้วยไอน้ำ (Clevenger-type apparatus) ให้ความร้อนแก่ขวดก้นกลมด้วยเครื่องให้ความร้อนแบบหลุม ทำการกลั่นเป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำน้ำมันหอมระเหยและน้ำในส่วน cleavenger ใส่ในกรวยแยก เติมไดคลอโรมีเทนปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปิดจุก แล้วทำการเขย่ากรวยแยก ตั้งกรวยแยกทิ้งไว้จนสารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ไขสารละลายชั้นล่างใส่ขวดรูปชมพู่ เติมโซเดียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ (anhydrous sodium sulfate) 1-2 ช้อน กรองด้วยกระดาษ

PAYAP UNIVERSITY

กรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยไดคลอโรมีเทนออกโดยนำไปตั้งบนไอน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ชั่งหาน้ำหนักน้ำมันหอมระเหย และคำนวณหาร้อยละน้ำมันหอมระเหยที่ได้

$$\text{ร้อยละน้ำมันหอมระเหย} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำมันหอมระเหยที่ได้}}{\text{น้ำหนักของใบสดที่นำมาสกัด}} \times 100$$

3.3 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิค GC/MS

นำน้ำมันหอมระเหยจากใบบุนนาคไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS ใช้คอลัมน์ HP-5 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ยาว 30 เมตร และมีสภาวะที่ใช้ในการทดลองดังนี้

เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี

อุณหภูมิของตัวนำสารเข้า	260	องศาเซลเซียส
โปรแกรมอุณหภูมิของคอลัมน์		
อุณหภูมิเริ่มต้น	40	องศาเซลเซียส
อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ	6	องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิสุดท้าย	275	องศาเซลเซียส
คงที่ที่อุณหภูมิสุดท้าย	12	นาที
อัตราการไหลของก๊าซฮีเลียม	20	มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรสารที่ฉีด	1	ไมโครลิตร (slpit ratio 1:20)
อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด	280	องศาเซลเซียส

เครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์

อุณหภูมิของส่วนเชื่อมต่อ	280	องศาเซลเซียส
วิธีการผลิตไอออน	Electron Impact Ionization (EI)	
พลังงานเฉลี่ยของอิเล็กตรอน	70	อิเล็กตรอนโวลต์
อุณหภูมิของตัวผลิตไอออน	250	องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ทำโดยการเปรียบเทียบแมสเปคตรัมของสารแต่ละพีคกับแมสเปคตรัมของสารมาตรฐานที่เก็บไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ (Libraly search software) ได้แก่ WILEY และ NIST และคำนวณหาค่า retention index (RI) ของสารแต่ละตัว โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานไฮโดรคาร์บอนผสม (คาร์บอน 7 – คาร์บอน 30) ที่วิเคราะห์ด้วยสภาวะเดียวกันกับน้ำมันหอมระเหย ค่า RI คำนวณได้จากสมการ

$$RI = 100Z + 100\left(\frac{\log t'_{R(x)} - \log t'_{R(Z)}}{\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{R(Z)}}\right)$$

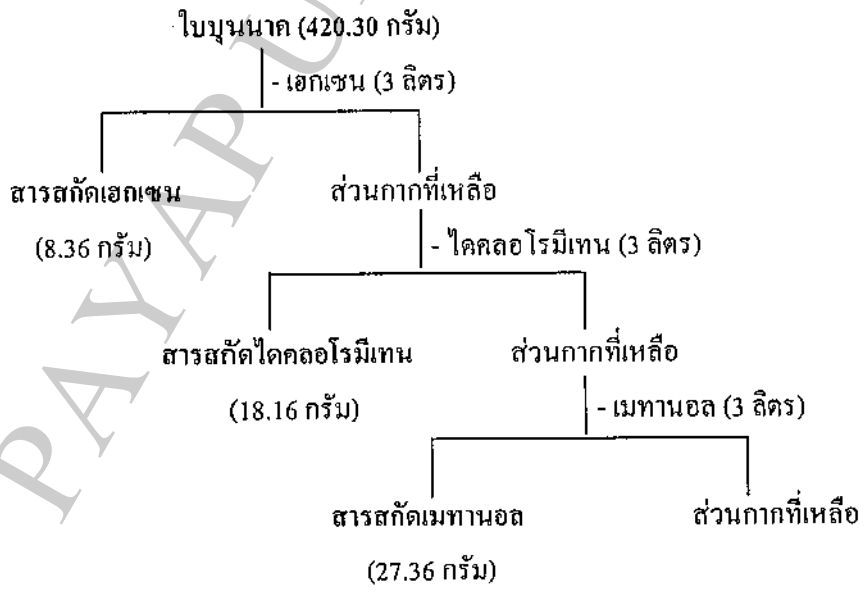
PAYAP UNIVERSITY

เมื่อ	RI	=	retention index
	t'_R	=	retention time
	x	=	the compound of interest
	Z	=	*n*-alkanes with Z carbon atom, where Z is an even number
	Z+1	=	*n*-alkanes with Z+1 carbon atoms

3.4 การสกัดสารจากใบและกิ่งบุนนาค

3.4.1 การสกัดสารจากใบบุนนาค

ใบบุนนาคนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปบดให้ละเอียด ชั่งใบบุนนาคบดละเอียด 420.30 กรัม ใส่ในโถแก้วขนาดใหญ่ เติมตัวทำละลายเฮกเซน ปริมาตร 3 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ทำการสกัดซ้ำอีกครั้ง กรองสารละลายโดยใช้การกรองแบบสุญญากาศ นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ ภายใต้ความดันต่ำ ส่วนกากที่เหลือให้ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงขึ้น ได้แก่ ไดคลอโรมีเทนและเมทานอล ทำการกรองและระเหยตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดเมทานอลของใบบุนนาค ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้นสีเขียวเข้ม คำนวณหาน้ำหนักของสารสกัดที่ได้ แผนภาพการสกัดของใบบุนนาคด้วยตัวทำละลายต่างๆ แสดงในรูป 3.1

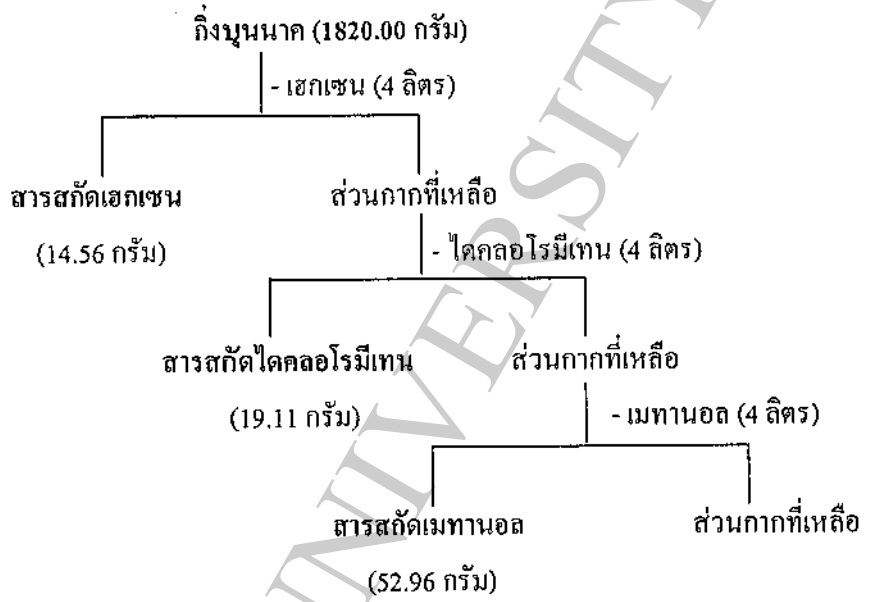


รูป 3.1 แผนภาพแสดงการสกัดของใบบุนนาคด้วยตัวทำละลายต่างๆ

PAYAP UNIVERSITY

3.4.2 การสกัดสารจากกิ่งบุนนาค

สำหรับการสกัดสารจากกิ่งบุนนาคด้วยตัวทำละลายต่างๆ ให้ทำการทดลองเหมือนกับการสกัดสารจากใบบุนนาค แต่ใช้เวลาอบกิ่งให้แห้งเป็นเวลา 26 ชั่วโมง และใช้กิ่งบุนนาคบดละเอียด 1820.00 กรัม สารสกัดเฮกเซนของกิ่งบุนนาคมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้นสีเขียว แต่สารสกัดไดคลอโรมีเทนและสารสกัดเมทานอลของกิ่งบุนนาคลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้นสีน้ำตาลเข้ม แผนภาพการสกัดของกิ่งบุนนาคด้วยตัวทำละลายต่างๆ แสดงในรูป 3.2



รูป 3.2 แผนภาพแสดงการสกัดของกิ่งบุนนาคด้วยตัวทำละลายต่างๆ

3.5 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

นำสารสกัดจากใบและกิ่งบุนนาคด้วยตัวทำละลายต่างๆ ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteau reagent method (60) ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid เข้มข้น 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (stock solution) โดยการชั่ง gallic acid มา 10.00 มิลลิกรัม ละลายด้วยสารละลายเมทานอลต่อน้ำ (50:50 v/v) จนปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06 และ 0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปต stock solution มา 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.60 และ 0.70 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายผสมเมทานอลกับน้ำจนถึงขีดวัดปริมาตร

PAYAP UNIVERSITY

ชั่งสารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดเมทานอลของใบบุนนาค จำนวน 10, 10 และ 1 มิลลิกรัม ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดเมทานอลของกิ่งบุนนาค ชั่งมาจำนวน 50, 10 และ 1 มิลลิกรัม ตามลำดับ นำไปละลายด้วยตัวทำละลายเมทานอลในขวดวัดปริมาตรจนมีปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานมา 1.00 มิลลิลิตร และสารละลาย Folin-Ciocalteau reagent (1:10 v/v) 5.00 มิลลิลิตร ใส่ ในหลอดทดลอง เขย่าสารละลายด้วยเครื่อง Vortex mixer และตั้งทิ้งไว้ 8 นาที เติมสารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่อง Vortex mixer แล้วเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง ส่วนสารละลายที่เป็น blank เตรียมโดยใช้เมทานอล 1.00 มิลลิลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง นำสารละลายทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid ในตัวอย่างแห้งหนัก 1 กรัม (mg GAE/g dry weight)

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

ในการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging (61-62) ใช้ trolox และ vitamin C เป็นสารมาตรฐาน

3.6.1.1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐานโดยวิธี DPPH

เตรียมสารมาตรฐาน trolox เข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง trolox มา 20.00 มิลลิกรัม ละลายในเอธานอลจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.02, 0.04, 0.08, 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.10, 0.20, 0.40, 0.50 และ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

เตรียมสารมาตรฐาน vitamin C เข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยชั่ง vitamin C มา 20.00 มิลลิกรัม ละลายในเอธานอลจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

และเตรียมสารละลาย DPPH 0.004% w/v โดยการชั่ง DPPH มา 4 มิลลิกรัม แล้วเติมตัวทำละลายเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PAYAP UNIVERSITY

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยพายัพ 1050033553

ปิเปตสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ เติมลงใน plate well 96 หลุม โดยสารละลายความเข้มข้นหนึ่งๆ จะใส่ 4 หลุม แต่ละหลุมจะมีปริมาตรรวมเป็น 200 ไมโครลิตร ดังนี้

หลุมที่		สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน (ไมโครลิตร)	เอธานอล (ไมโครลิตร)	สารละลาย DPPH (ไมโครลิตร)
1	Blank	20	180	0
2	Sample	20	0	180
3	Positive control	0	20	180
4	Negative control	0	200	0

ทำการวิเคราะห์สารละลายแต่ละความเข้มข้นซ้ำอีก 2 ครั้ง เมื่อทำการเตรียมสารละลายแล้ว ทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Multimode Detector ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{[(\text{Apositive - Anegative}) - (\text{Asample - Ablank})] \times 100}{(\text{Apositive - Anegative})}$$

นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ มาพล็อตกราฟกับความเข้มข้นต่างๆ หาสมการเส้นตรง เพื่อนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่สามารถขจัดอนุมูล DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

3.6.1.2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและกิ่งบุนนาคโดยวิธี DPPH

นำสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากใบบุนนาค มาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 50.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสารสกัดมา 500 มิลลิกรัม เติมเอธานอลจนปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 2.00, 3.00, 4.00 และ 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร ส่วนสารสกัดเมทานอลจากใบบุนนาคนำมาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดมา 100 มิลลิกรัม เติมเอธานอลจนปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 และ 0.60 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

PAYAP UNIVERSITY

ส่วนสารสกัดเฮกเซนจากกิ่งบุนนาคมาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 50.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสารสกัดมา 500 มิลลิกรัม เติมเอธานอลจนปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 1.00, 4.00, 5.00, 6.00 และ 8.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.20, 0.80, 1.00, 1.20 และ 1.60 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร ส่วนสารสกัดไดคลอโรมีเทนและสารสกัดเมทานอลจากใบบุนนาคนำมาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดมา 100 มิลลิกรัม เติมเอธานอลจนปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร สำหรับสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากกิ่งบุนนาคให้นำมาเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 และ 2.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร ส่วนสารสกัดเมทานอลจากกิ่งบุนนาคให้นำมาเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.05, 0.10, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ทำการทดสอบหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและกิ่งบุนนาค และคำนวณหาค่า IC_{50} เหมือนกับสารละลายมาตรฐาน

3.6.1.3 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย โดยวิธี DPPH

นำน้ำมันหอมระเหยจากใบบุนนาคมาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งน้ำมันหอมระเหยมา 500 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลายเอธานอลจนปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางสารละลายด้วยตัวทำละลายเอธานอลให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร ทำการทดสอบหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย และคำนวณหาค่า IC_{50} เหมือนกับสารละลายมาตรฐาน

3.6.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

ในการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS (62) ใช้ trolox และ vitamin C เป็นสารมาตรฐาน

3.6.2.1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐานด้วยวิธี ABTS

เตรียมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ (mM) โดยชั่งสาร ABTS มา 0.038 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

PAYAP UNIVERSITY

เตรียมสารละลาย $K_2S_2O_8$ เข้มข้น 140 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งสาร $K_2S_2O_8$ มา 0.3783 กรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ผสมสารละลาย ABTS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารละลาย $K_2S_2O_8$ 176 ไมโครลิตร ในขวดสีชา ตั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลาย ABTS radical cation

เจือจางสารละลาย ABTS radical cation ด้วยเอธานอล ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.700-0.900

เตรียมสารมาตรฐาน trolox เข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง trolox มา 10.00 มิลลิกรัม ละลายในเอธานอลจนครบปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

เตรียมสารมาตรฐาน vitamin C เข้มข้น 2.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร โดยชั่ง vitamin C มา 20.00 มิลลิกรัม ละลายในเอธานอลจนครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 และ 1.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

นำสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ มา 1.00 มิลลิลิตร กับสารละลาย ABTS ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ใช้ตัวทำละลายเอธานอลเป็น blank คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{(Ab - As)}{Ab} \times 100$$

เมื่อ Ab คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารมาตรฐาน และ As คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารมาตรฐาน แล้วนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ มาพล็อตกราฟกับความเข้มข้นต่างๆ หาสมการเส้นตรงเพื่อนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานที่สามารถขจัดอนุมูล ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

3.6.2.2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและกิ่งบุนนาค ด้วยวิธี ABTS

นำสารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน และเมทานอลจากใบและกิ่งบุนนาค มาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งสารสกัดมา 100 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลาย

PAYAP UNIVERSITY

เมทานอลจนปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร สารสกัดเฮกเซนและสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากใบบุนนาคให้นำมาเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.20, 0.40, 0.50, 0.60, 0.80 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร ส่วนสารสกัดเมทานอลจากใบบุนนาคให้นำมาเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ส่วนสารสกัดเฮกเซนจากกิ่งบุนนาคให้นำมาเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.20, 0.40, 0.50, 0.60, 0.80 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.20, 0.40, 0.60, 0.80 และ 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร สำหรับสารสกัดไดคลอโรมีเทนและเมทานอลจากกิ่งบุนนาคให้นำมาเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

ทำการทดสอบหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและกิ่งบุนนาค แล้วคำนวณหาค่า IC_{50} เหมือนกับสารละลายมาตรฐาน

3.6.2.3 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี ABTS

นำน้ำมันหอมระเหยจากใบบุนนาคมาเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการชั่งน้ำมันหอมระเหยมา 200 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลายเอธานอลจนปริมาตรเป็น 2 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางสารละลายด้วยตัวทำละลายเอธานอลให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 2.00, 4.00, 6.00, 8.00 และ 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.10, 0..20, 0.30, 0.40 และ 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วเติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร ทำการทดสอบหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยและคำนวณหาค่า IC_{50} เหมือนกับสารละลายมาตรฐาน

3.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิธี Reducing power

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากใบบุนนาค และสารสกัดจากใบและกิ่งบุนนาคด้วยตัวทำละลายต่างๆ ด้วยวิธี Reducing power (63) ดังนี้

เตรียมสารละลายมาตรฐาน trolox, น้ำมันหอมระเหย, สารสกัดเฮกเซน, สารสกัดไดคลอโรมีเทน และสารสกัดเมทานอลจากใบและกิ่งบุนนาค ที่ความเข้มข้น 10.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง

PAYAP UNIVERSITY

สารมา 50.00 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร และทำการเจือจางให้ได้สารละลายเข้มข้น 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลาย stock solution มา 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, และ 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเอธานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร

นำสารละลายของตัวอย่างปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย phosphate buffer 0.2 M (pH = 6.6) ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร และสารละลาย $K_3Fe(CN)_6$ 1% w/v ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม 10% Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงปั่นที่ 3000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนมาปริมาตร 2.50 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน 2.50 มิลลิลิตร และ 0.1% $FeCl_3$ 0.50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 700 นาโนเมตร

3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

3.7.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา โดยวิธี agar-well diffusion

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา โดยวิธี agar-well diffusion (64-65) เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ใช้ศึกษาได้รับการอนุเคราะห์จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ส่วนเชื้อราที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Candida albican*, *Aspergillus flavus* และ *Trichophyton mentagrophyte* ใช้สารละลาย gentamicin (75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ amoxicillin (75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นสารมาตรฐานสำหรับเชื้อแบคทีเรีย และสารละลาย ketoconazole (250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นสารมาตรฐานสำหรับเชื้อรา ส่วนสารละลายที่ทดสอบมีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งน้ำมันหอมระเหย สารสกัดจากเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล จากใบและกิ่งบุนนาค ชั่งมา 30 มิลลิกรัม ทำการเจือจางสารด้วยเอธานอลจนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำโดยละลายอาหารเลี้ยงเชื้อในน้ำอุ่นโดยใช้ Mueller-Hinton agar 38.0 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร (สำหรับเชื้อแบคทีเรีย) และใช้ Sabouraud dextrose agar 65.0 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร (สำหรับเชื้อรา) นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ละลายแล้ว ไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ จานละ 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว และทำการเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไปเลี้ยงใน Mueller-Hinton Broth (MHB) เทียบความขุ่นกับ 5.0 McFarland ส่วนเชื้อรานำไปเลี้ยงใน Sabouraud dextrose agar เทียบความขุ่นกับ 1.0 McFarland นำไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารละลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ป้ายเชื้อให้กระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ เจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร

PAYAP UNIVERSITY

ปิเปิตสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่เจาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับเชื้อแบคทีเรียให้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อราให้บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดบริเวณยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางในหน่วยมิลลิเมตร

3.7.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยวิธี microtiter broth method

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากใบบุนนาคและสารสกัดจากใบและกิ่งบุนนาคด้วยตัวทำละลายต่างๆ โดยวิธี microtiter broth method (66) เชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ ได้แก่ เชื้อแกรมบวก *S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อแกรมลบ *E. coli* ATCC 25922 เตรียมสารสกัดจากใบและกิ่งบุนนาคด้วยตัวทำละลาย 95% เอธานอล โดยให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันหอมระเหยจากใบบุนนาคโดยให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 2-fold serial dilution ด้วย MHB เติมสารละลายสารสกัดและสารละลายน้ำมันหอมระเหยแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน microtiter 96-well plate เติม MHB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเชื้อทดสอบที่ถูกปรับความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามลำดับลงในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเครื่อง labsystems multiskan EX type 335 microplate reader วิเคราะห์ผลจากยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ถ้าสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ค่าการดูดกลืนแสงจะต้องไม่เพิ่มขึ้น หรือมีค่าใกล้เคียงกับหลุมทดสอบควบคุมผลบวก ความเข้มข้นของสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย คือ ค่า MIC (Minimal inhibitory concentration)

3.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

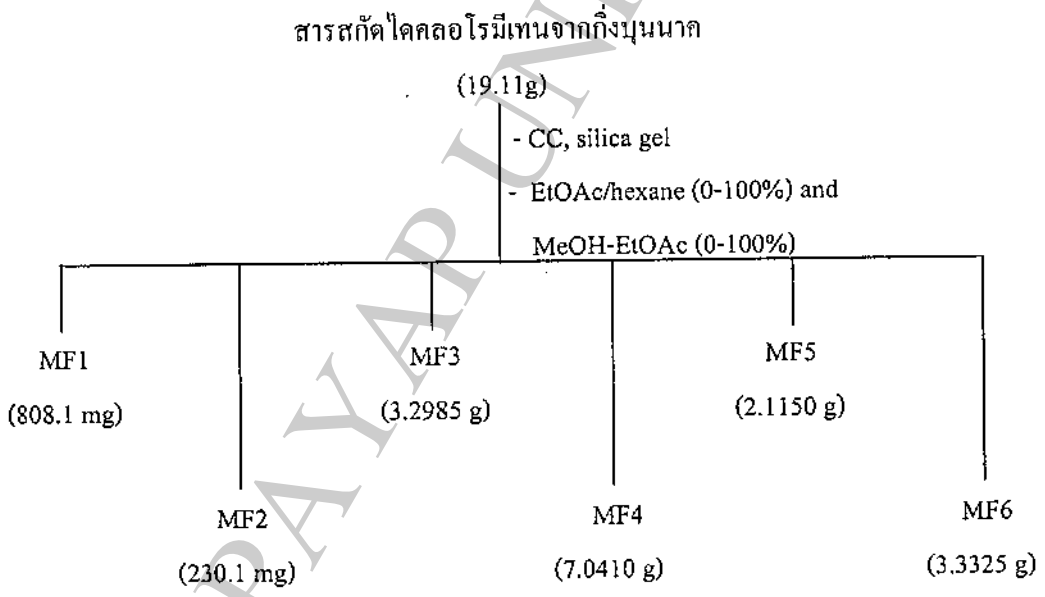
นำสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ จากใบและกิ่งบุนนาค และน้ำมันหอมระเหยจากใบบุนนาคไปทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anticancer) ใช้เซลล์มะเร็งของคน ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB (oral cancer, ATCC CCL-17), เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 (breast cancer, ATCC HTB-22) และเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H 187 (small cell lung cancer, ATCC CRL-5804) ด้วยวิธี Resazurin microplate assay (REMA) (67) เตรียมสารละลายโดยให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยตัวทำละลาย 0.5% DMSO แล้วเจือจางลดความเข้มข้นลงแบบ 3-fold serial dilution ใช้ 0.5% DMSO เป็น negative control และใช้ Ellipticine ความเข้มข้น 0.325 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Doxorubicine ความเข้มข้น 0.147

PAYAP UNIVERSITY

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น positive control และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (cytotoxicity against *vero* cell) โดยใช้เซลล์ของไตลิง (African green monkey kidney, ATCC CCL-81) โดยทดสอบด้วยวิธี Green fluorescent protein (GFP)-based assay (68) ใช้ Ellipticine เป็น positive control คำนวณหา ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์ทดสอบร้อยละ 50 ตาย (ค่า IC_{50})

3.9 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดไดคลอโรมีเทนของกิ่งบุนนาค

นำสารสกัดไดคลอโรมีเทนของกิ่งบุนนาคมาแยกสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยนำส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากกิ่งบุนนาค 19.11 กรัม มาแยกโดยใช้ซิลิกาเจลเบอร์ 7734 เป็นตัวดูดซับ และใช้ตัวทำละลายจากขั้วต่ำไปหาสูงเพื่อชะสาร เริ่มจากสารละลายผสมเอทิลแอซีเทตในเฮกเซน (0-100%) แล้วต่อด้วยเมทานอลในเอทิลแอซีเทต (0-100%) เก็บสารที่แยกได้ครั้งละ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปทดสอบโดยโครมาโทกราฟีผิวบาง ใช้สารละลายผสมเฮกเซนต่อเอทิลแอซีเทต (8:2) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลีนแล้วอังเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส จากแผ่น TLC รวมสารละลายที่ให้ผลคล้ายกันไว้ด้วยกัน แล้วนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำ ได้ส่วนสกัด 6 ส่วน คือ fraction MF1 – fraction MF6 ดังแผนภาพในรูป 3.3



รูป 3.3 แผนภาพการแยกสารออกจากสกัดไดคลอโรมีเทนของกิ่งบุนนาค

PAYAP UNIVERSITY

3.9.1 การแยกสาร MF3.2A22, MF3.4A22 และ MF3.6A2

นำ fraction MF3 มาแยกหาองค์ประกอบทางเคมีต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเบอร์ 7734 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต (0-20% EtOAc/hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และการฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลีน สามารถแยกส่วนสกัดได้ 7 กลุ่ม (MF3.1-MF3.7) ดังแผนภาพในรูป 3.4

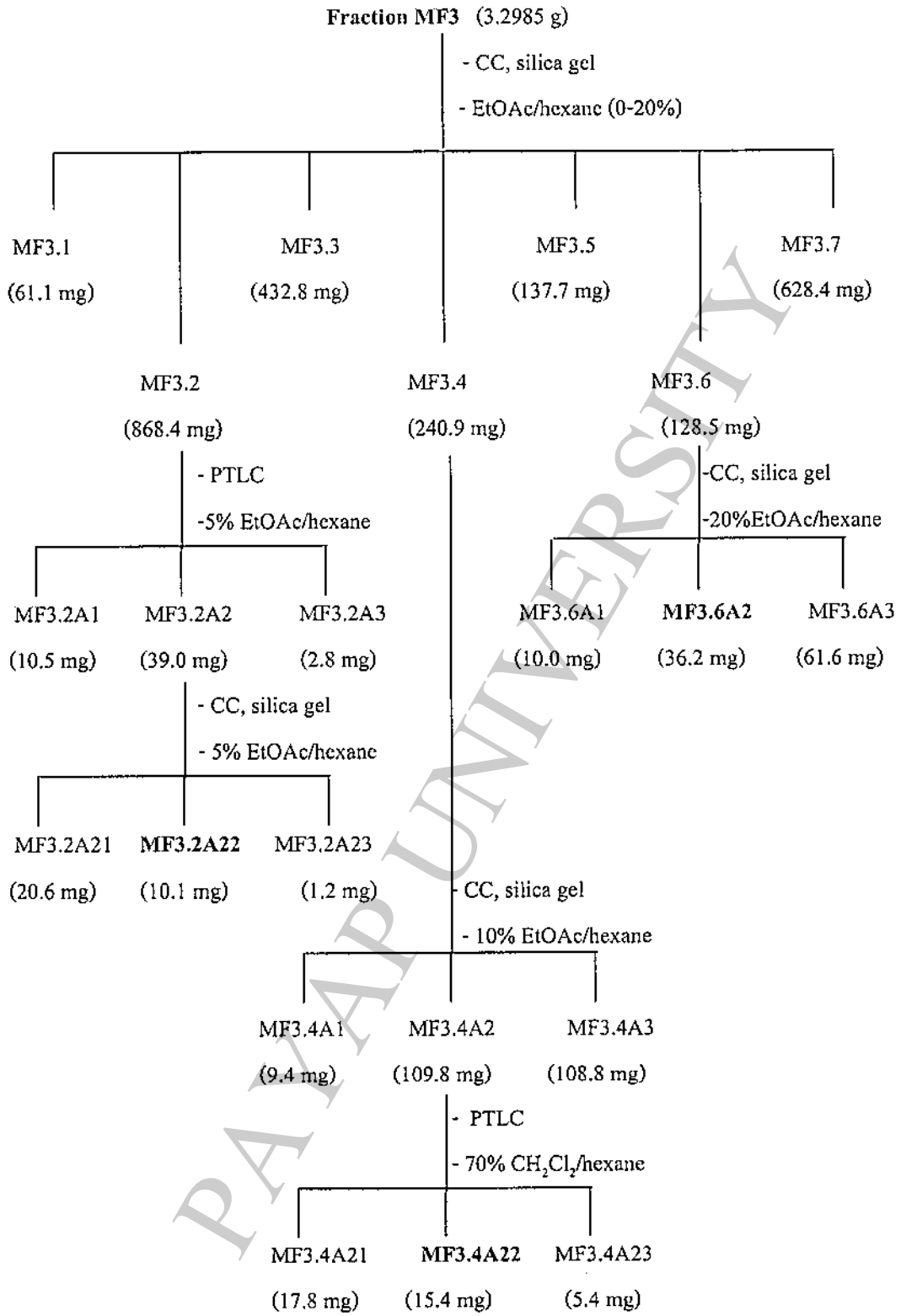
นำ fraction MF3.2 มาแยกหาองค์ประกอบทางเคมีต่อด้วย Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC) ใช้ซิลิกาเจล 60 GF-254 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายเอทิลอะซิเตตในเฮกเซน (5% EtOAc/hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์และการฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลีน สามารถแยกส่วนสกัดได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ fraction MF3.2A1 - MF3.2A3 เมื่อนำ fraction MF3.2A2 มาแยกต่อหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค PTLC ใช้ซิลิกาเจล 60 GF-254 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายเอทิลอะซิเตตในเฮกเซน (20% EtOAc/hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์และการฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลีน สามารถแยกส่วนสกัดได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ MF3.2A21-MF3.2A23 (แผนภาพในรูป 3.4)

นำ fraction MF3.4 มาแยกต่อหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเบอร์ 7729 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายเอทิลอะซิเตตในเฮกเซน (10% EtOAc/hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์และการฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลีน สามารถแยกส่วนสกัดได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ MF3.4A1-MF3.4A3 เมื่อนำ fraction MF3.4A2 มาแยกต่อด้วยเทคนิค PTLC ใช้ซิลิกาเจล 60 GF-254 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนในเฮกเซน (70% CH_2Cl_2/hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์และการฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลีน สามารถแยกส่วนสกัดได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ MF3.4A21-MF3.4A23 (แผนภาพในรูป 3.4)

นำ fraction MF3.6 มาแยกต่อหาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเบอร์ 7729 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายเอทิลอะซิเตตในเฮกเซน (20% EtOAc/hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโทรโฟโตมิเตอร์และการฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลีน สามารถแยกส่วนสกัดได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ MF3.6A1-MF3.6A3 (แผนภาพในรูป 3.4)

นำสาร MF3.2A22, MF3.4A22 และ MF3.6A2 ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR, GC/MS, ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR เพื่อพิสูจน์โครงสร้างของสาร รวมถึงนำสารที่ได้ไปทดสอบหาจุดหลอมเหลว

PAYAP UNIVERSITY



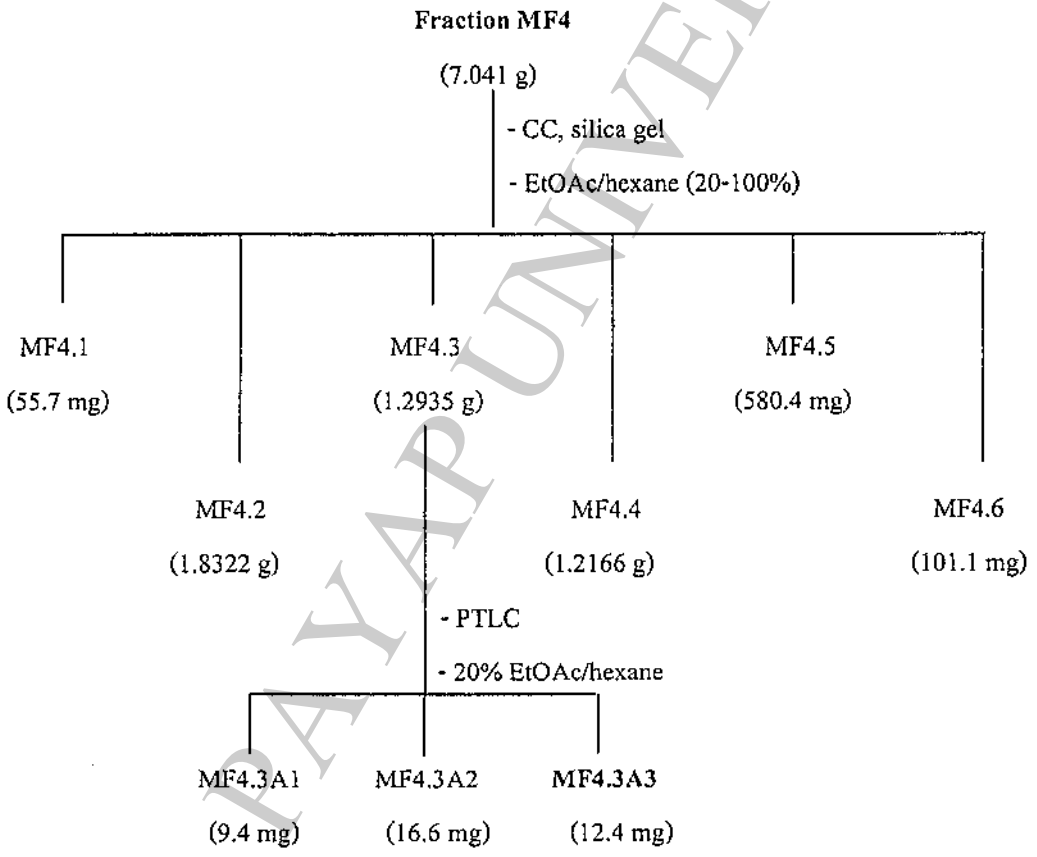
รูป 3.4 แผนภาพการแยกสาร MF3.2A22, MF3.4A22 และ MF3.6A2

PAYAP UNIVERSITY

3.9.2 การแยกสาร MF4.3A3

เมื่อนำ fraction MF4 มาแยกหาองค์ประกอบทางเคมีต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจลเบอร์ 7734 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตต (20-100% EtOAc/hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่อง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร และการฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลีน สามารถแยกส่วนสกัดได้ 6 กลุ่ม (MF4.1-MF4.6) ดังแผนภาพในรูป 3.5

นำ fraction MF4.3 จำนวน 60 มิลลิกรัม มาแยกหาองค์ประกอบทางเคมีต่อด้วย PTLC ใช้ซิลิกาเจล 60 GF-254 เป็นวัฏภาคคงที่ และใช้สารละลายเอทิลอะซิเตตในเฮกเซน (20% EtOAc/hexane) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้เครื่อง UV และการฉีดพ่นด้วยสารละลายวานิลีน สามารถแยกส่วนสกัดได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ Fraction MF4.3A1 – MF4.3A3 เมื่อนำสาร MF4.3A3 ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค IR, GC/MS, ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR เพื่อพิสูจน์โครงสร้าง รวมถึงนำสารที่ได้ไปทดสอบหาจุดหลอมเหลว



รูป 3.5 แผนภาพการแยกสาร MF4.3A3

PAYAP UNIVERSITY

3.10 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์

นำสาร MF3.2A22, MF3.4A22 และ MF3.6A2 และ MF4.3A3 ที่แยกได้ ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต่อเชื้อ *E. coli* และเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี microtiter broth method เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย (หัวข้อ 3.7.2) และนำสารบริสุทธิ์ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB, เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งปอด NCI-H 187 และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เช่นเดียวกับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย (หัวข้อ 3.8)

PAYAP UNIVERSITY