บทที่ 2
การดำเนินงานวิจัย

2.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

2.1.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. TLC aluminium sheets silica gel 60 F_{254}, บริษัท MERCK
2. HPLC, รุ่น 1100 (Quaternary), บริษัท Hewlett Packard
3. Column HPLC 5 μm 4.6 x 150 mm , บริษัท Hewlett Packard
4. HPLC, รุ่น LC-8A PDA & RI (Preparative),บริษัท Shimadzu
5. Column PREP-ODS 20.0 x 250 mm, บริษัท Hewlett Packard
6. LC-MS, LC รุ่น 1100, บริษัท Hewlett Packard / MSD, รุ่น VL, บริษัท Hewlett Packard
7. GC-MS, GC รุ่น 6890, บริษัท Agilent Technologies / MSD, รุ่น 5973, บริษัท Hewlett Packard
8. กระดาษกรองขนาด 0.45 um, บริษัท Millipore
9. ชุดกรอง mobile phase, บริษัท Millipore
10. ชุดกรอง sample, บริษัท Millipore
11. IR spectrophotometer, รุ่น TENSOR 27, บริษัท Bruker
12. NMR spectrophotometer, รุ่น Bruker DRX 400 MHz บริษัท Bruker (ประเทศไทย) จำกัด
13. Rotary evaporator, รุ่น R-114, บริษัท BUCHI
14. UV lamp, รุ่น VL-6.LC, บริษัท Vilber Lourmat

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1.2 สารเคมี

1. Acetonitrile, CH_3CN, MW 41.05, HPLC Grade
2. Dichloromethane, CH_2Cl_2, MW 84.93, Commercial Grade
3. Ethyl acetate, $CH_3COOC_2H_5$, MW 88.11, Commercial Grade
4. Hexane, C_6H_{14}, MW 86.18, Commercial Grade
5. Methanol, CH_3OH, MW 32.04, Commercial Grade
6. Methanol, CH_3OH, MW 32.04, HPLC Grade
7. Sephadex LH 20, บริษัท Amersham Biosciences
8. Silica gel 60 for Column Chromatrography ขนาด 0.003-0.200 mm, บริษัท MERCK
9. Silica gel 60 PF_{254} for Preparative layer Chromatrography ขนาด < 45 μm, บริษัท MERCK
10. Silica gel 60 for thin layer Chromatrography ขนาด < 45 μm, บริษัท MERCK

2.1.3 พืชที่ใช้ในการทดลอง

ดอกบุนนาค *(Mesua ferrea)* เก็บที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ส่วนที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนเกสร และ ส่วนกลีบดอก และฐานรองดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 วิธีทดลอง

2.2.1 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากเกสรบุนนาค

แผนภาพแสดงขั้นตอนสรุปในกระบวนการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากเกสร แสดงดังรูป 2.1 โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.2.1.1 การสกัดเกสรบุนนาค

นำเกสรบุนนาคแห้ง น้ำหนัก 235.46 กรัม นำมาแช่ในไดคลอโรมีเทน 1 ลิตร เป็นเวลา 2 วัน 2 คืน 2 ครั้ง กรอง และระเหยสารละลายที่สกัดได้ภายใต้ความดันต่ำ เก็บผลิตภัณฑ์หยาบที่ได้ น้ำหนัก 6.7013 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้น สีน้ำตาลส้ม

2.2.1.2 การสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย

นำผลิตภัณฑ์หยาบที่ได้ 6.7013 กรัม มาเติม 15% เมธานอลในน้ำ ปริมาตร 200 cm^3 คนให้ละลาย เติมเฮกเซน ปริมาตร 200 cm^3 คนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และนำมาสกัดแยกในกรวยแยกขนาด 1 ลิตร เขย่า ตั้งทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้แยกชั้น สกัดซ้ำด้วยเฮกเซน ปริมาตร 200 cm^3 และ นำสารละลายชั้น 15% เมธานอลในน้ำ มาสกัดแยกด้วยเอทิลแอซีเทต ปริมาตร 200 cm^3 2 ครั้ง นำสิ่งที่สกัดได้แต่ละชั้นไประเหยภายใต้ความดันต่ำ หลังจากรวมส่วนสกัดทั้งหมดได้ผลดังแสดงในตาราง 2.1

ตาราง 2.1 : ผลการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายของเกสรบุนนาค

ผลิตภัณฑ์หยาบ (กรัม)	น้ำหนักสาร (กรัม)		
	ส่วนสกัดในชั้นเฮกเซน	ส่วนสกัดในชั้นเอทิลแอซีเทต	ส่วนสกัดในชั้น 15%เมทานอลในน้ำ
6.7013	3.1244	2.0902	0.4867

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อนำส่วนสกัดชั้นเฮกเซน และ ชั้นเอทิลแอซีเทต มาทดสอบโดยการทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยมี ไดคลอโรมีเทน : เอทิลแอซีเทต (9:1) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้ UV Lamp (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชุบด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก แล้วเป่าด้วยลมร้อน พบว่าลักษณะของ spot สารที่ได้ทั้งสองส่วนไม่แตกต่างกัน และเนื่องจากสารมีอยู่ในปริมาณที่จำกัดจึงได้รวมสารทั้งสองส่วนให้เป็นส่วนเดียวกัน

2.2.1.3 การแยกสารโดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

(1) การแยกด้วยซิลิกาเจล (Silica gel) ครั้งที่ 1

นำส่วนสกัดในชั้นเฮกเซน+เอทิลแอซีเทต 5.2146 กรัม มาแยกโดยใช้ Silica gel เป็นตัวดูดซับ และ เฮกเซน : ไดคลอโรมีเทน (10:0) และเพิ่มไดคลอโรมีเทนจนถึง 100% แล้วต่อด้วย 1% เอทิลแอซีเทตในไดคลอโรมีเทน จนถึง 30% เอทิลแอซีเทต เป็นตัวชะ เก็บสารที่แยกได้ครั้งละ 20 cm^3 จำนวน 50 ครั้ง นำไปทดสอบโดยการทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยมี ไดคลอโรมีเทน : เอทิล-แอซีเทต (9:1) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้ UV Lamp (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชุบด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก แล้วเป่าด้วยลมร้อน หลังจากรวม Fraction ที่คล้ายกันแล้วนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำได้ส่วนสกัด 5 ส่วน คือ Fraction 1P (1.0641 กรัม), Fraction 2P (0.4310 กรัม), Fraction 3P (0.2123 กรัม), Fraction 4P (0.4076 กรัม) และ Fraction 5P (2.1014 กรัม)

(2) การแยกด้วยซิลิกาเจล (Silica gel) ครั้งที่ 2

นำ Fraction 3P (0.2123 กรัม) จากการทดลอง (1) มาแยกต่อโดยใช้ Silica gel เป็นตัวดูดซับ และ มี 1% เอทิลแอซีเทต ในไดคลอโรมีเทน เป็นตัวชะ เก็บสารที่แยกได้ครั้งละ 20 cm^3 จำนวน 40 ครั้ง นำไปทดสอบโดยการทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยมี เอทิลแอซีเทต :ไดคลอ-โรมีเทน (1:9) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้ UV Lamp (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชุบด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก แล้วเป่าด้วยลมร้อน หลังจากรวม Fraction ที่คล้ายกัน แล้วนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำได้ส่วนสกัด 5 ส่วน คือ Fraction 3.1p (0.0210 กรัม), Fraction 3.2p (0.0081 กรัม), Fraction 3.3p (0.0390 กรัม), Fraction 3.4p (0.0054 กรัม) และ Fraction 3.5p (0.0072 กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) การตกผลึกใหม่

นำ Fraction 3.3p (0.0390 กรัม) ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว มาละลายด้วยเมทานอล : เฮกเซน ปริมาณเล็กน้อย แล้วทิ้งไว้ให้ตกผลึก กรอง และล้างผลึก ด้วยเมทานอลเย็น นำผลึกที่ได้ 0.0302 กรัม (กำหนดเป็นสาร A) ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคยูวี สเปกโทรสโกปี (Ultraviolet Spectroscopy) อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy) นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) และ Mass Spectrometry หาจุดหลอมเหลว และ ค่า Specific rotation ต่อไป

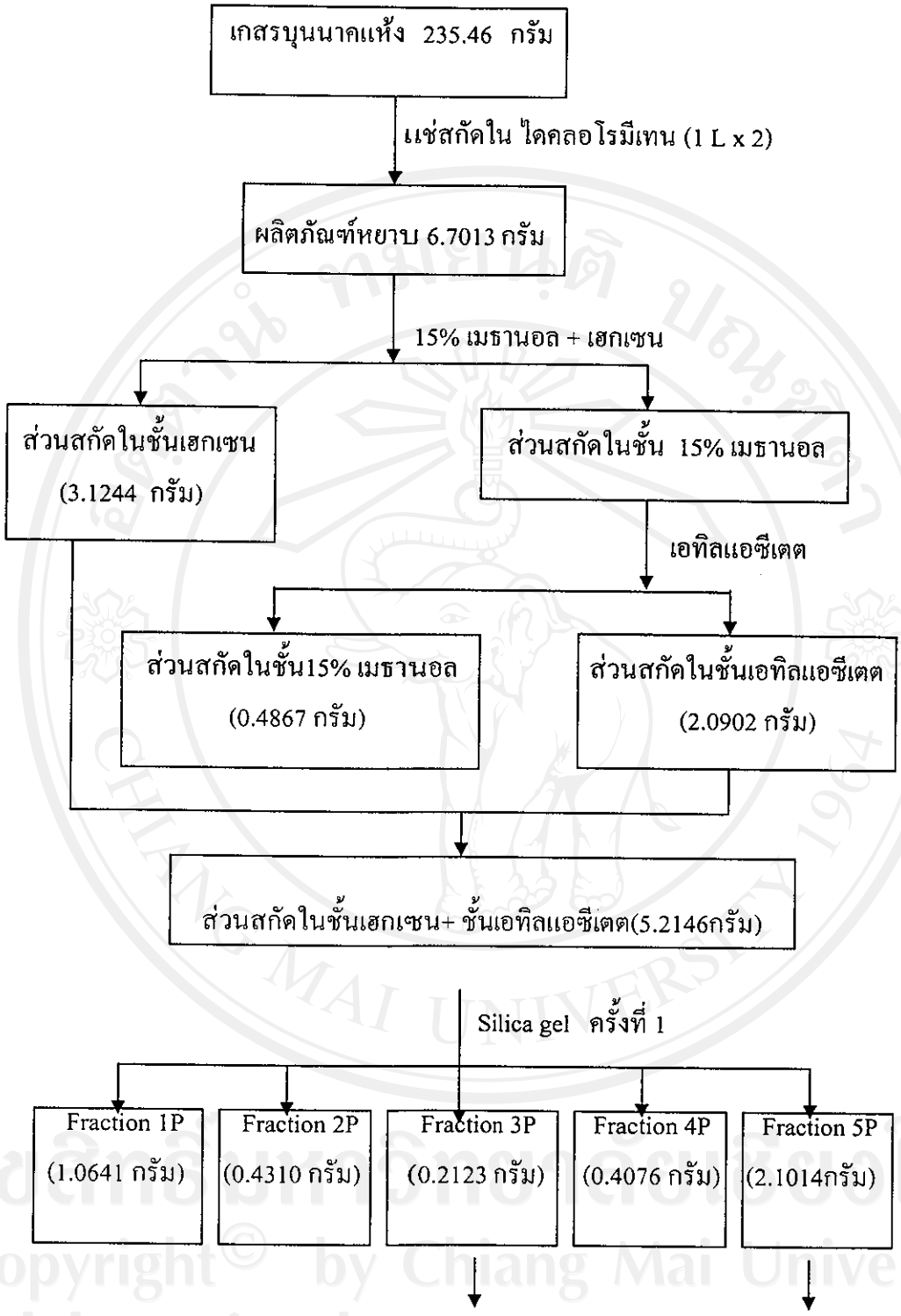
(4) การแยกด้วยซิลิกาเจล (Silica gel) ครั้งที่ 3

นำ Fraction 5P (2.1014 กรัม) จากการทดลอง (1) มาแยกต่อโดยใช้ Silica gel เป็นตัวดูดซับ และ มี 1% เอทิลแอซีเทต ในไดคลอโรมีเทน และเพิ่มเอทิลแอซีเทต จนถึง 50% เป็นตัวชะ เก็บสารที่แยกได้ครั้งละ 20 cm^3 จำนวน 50 ครั้ง นำไปทดสอบโดยการทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยมี เอทิลแอซีเทต :ไดคลอโรมีเทน (1:9) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้ UV Lamp (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และชุบด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก แล้วเป่าด้วยลมร้อน หลังจากรวม Fraction ที่คล้ายกัน แล้วนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำได้ส่วนสกัด 4 ส่วน คือ Fraction 5.1p (0.0386 กรัม), Fraction 5.2p (0.0246 กรัม), Fraction 5.3p (0.0793 กรัม) และFraction 5.4p (1.4216 กรัม)

(5) การแยกด้วยซิลิกาเจล (Silica gel) ครั้งที่ 4

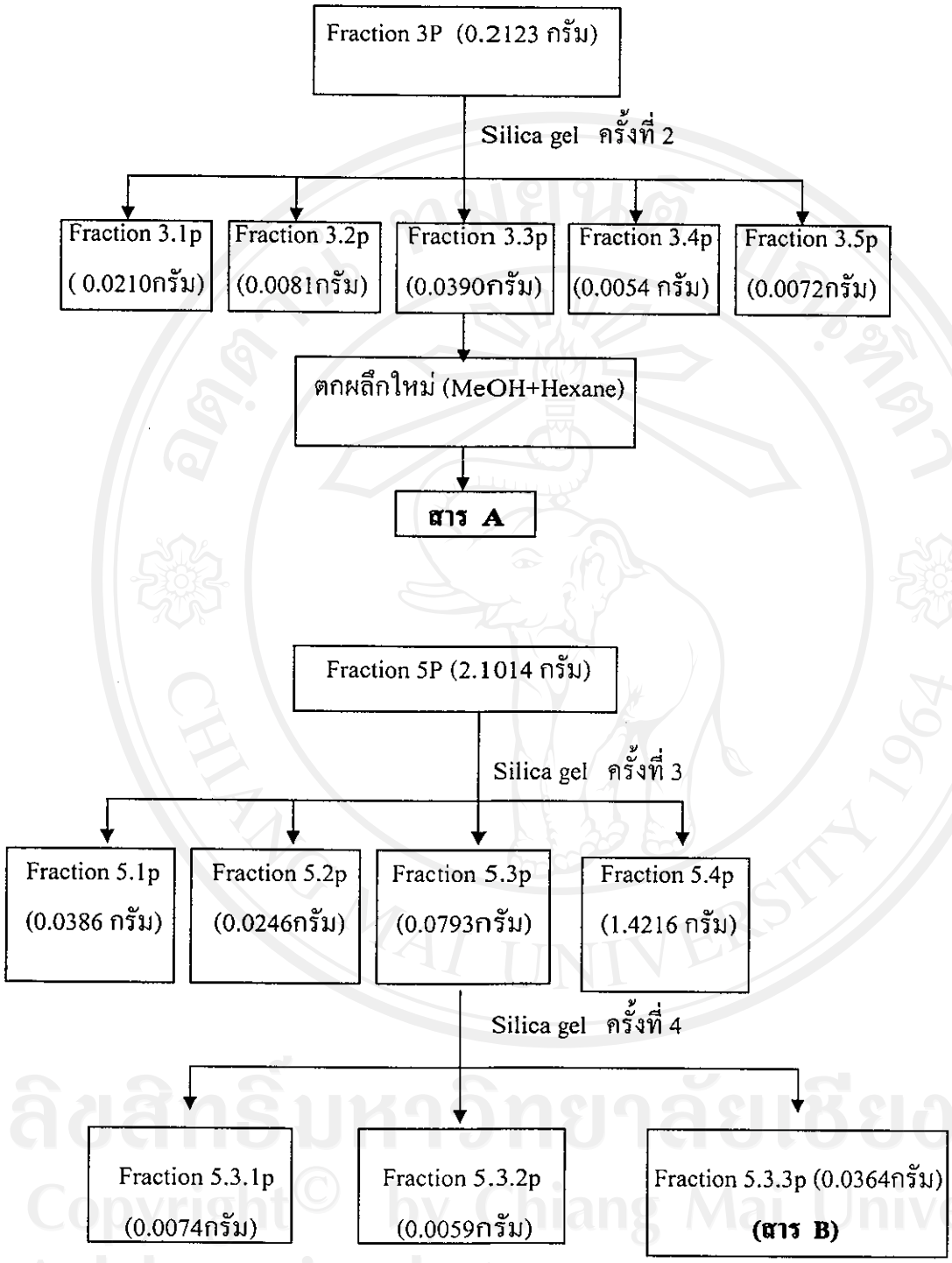
นำ Fraction 5.3P (0.0793 กรัม) จากการทดลอง (4) มาแยกต่อโดยใช้ Silica gel เป็นตัวดูดซับ และ มี 1% เอทิลแอซีเทต ในไดคลอโรมีเทน และเพิ่มเอทิลแอซีเทต จนถึง 20% เป็นตัวชะ เก็บสารที่แยกได้ครั้งละ 20 cm^3 จำนวน 40 ครั้ง นำไปทดสอบโดยการทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยมี เอทิลแอซีเทต : ไดคลอโรมีเทน (1:9) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้ UV Lamp (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) และ ชุบด้วยกรดฟอสโฟโมลิบดิก แล้วเป่าด้วยลมร้อน หลังจากรวม Fraction ที่คล้ายกัน แล้วนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำได้ส่วนสกัด 3 ส่วน คือ Fraction 5.3.1p (0.0074 กรัม), Fraction 5.3.2p (0.0059 กรัม)และ Fraction 5.3.3p (0.0364 กรัม) นำ Fraction 5.3.3p (กำหนดเป็นสาร B) ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.1 ขั้นตอนการสกัดแยกสารบริสุทธิ์ของเกสรบุนนาค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูป 2.1 (ต่อ)

2.2.2 การสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากกลีบดอก และฐานรองดอกบุนนาค

แผนภาพแสดงขั้นตอนสรุปในกระบวนการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากกลีบดอก และฐานรองดอกบุนนาค แสดงดังรูป 2.2 โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.2.2.1 การสกัดกลีบดอก และฐานรองดอกบุนนาค

นำกลีบดอก และฐานรองดอกบุนนาคแห้ง น้ำหนัก 601.71 กรัม มาแช่ในไดคลอโรมีเทน 3 ลิตร เป็นเวลา 2 วัน 2 คืน 2 ครั้ง กรอง และระเหยสารละลายที่สกัดได้ภายใต้ความดันต่ำ เก็บผลิตภัณฑ์หยาบที่ได้ น้ำหนัก 11.74 กรัม มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวข้น สีน้ำตาล

2.2.2.2 การสกัดแยกด้วยตัวทำละลาย

นำผลิตภัณฑ์หยาบที่ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละประมาณ 5 กรัม นำแต่ละส่วนมาเติม 15% เมธานอลในน้ำ ปริมาตร 200 cm^3 คนให้ละลาย เติมเฮกเซน ปริมาตร 200 cm^3 คนสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และนำมาสกัดแยกในกรวยแยกขนาด 1 ลิตร เขย่า ตั้งทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้แยกชั้น สกัดซ้ำด้วยเฮกเซนปริมาตร 200 cm^3 และนำสารละลายชั้น 15% เมธานอลในน้ำมาสกัดแยกด้วยเอทิลแอซีเทต ปริมาตร 200 cm^3 2 ครั้ง นำสิ่งที่สกัดได้แต่ละชั้นไประเหยภายใต้ความดันต่ำ หลังจากรวมส่วนสกัดทั้งหมด ได้ผลดังแสดงในตาราง 2.2

ตาราง 2.2 : ผลการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายจากกลีบดอก และฐานรองดอกบุนนาค

ผลิตภัณฑ์หยาบ (กรัม)	น้ำหนักสาร(กรัม)		
	ส่วนสกัดในชั้นเฮกเซน	ส่วนสกัดในชั้นเอทิลแอซีเทต	ส่วนสกัดในชั้น 15%เมทานอลในน้ำ
11.7406	2.0624	6.9217	2.7556

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.2.3 การแยกสารโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี

(1) การแยกด้วย Sephadex LH 20

นำส่วนสกัดในชั้นเอทิลแอซีเทต (6.9217 กรัม) มาแยกด้วย เทคนิค Gel Filtration Chromatography โดยใช้ Sephadex LH 20 เป็นตัวดูดซับ และใช้ เมทานอลเป็นตัวชะ เก็บสารที่แยกได้ครั้งละ 20 cm^3 จำนวน 30 ครั้ง นำไปทดสอบโดยการทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยมี เฮกเซน : เอทิลแอซีเทต (6:4) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้ UV Lamp (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) หลังจากรวม Fraction ที่คล้ายกัน แล้วนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำได้ส่วนสกัด 3 ส่วน คือ Fraction 1 (1.5276 กรัม), Fraction 2 (5.1033 กรัม) และ Fraction 3 (0.2906 กรัม)

(2) การแยกด้วยซิลิกาเจล (Silica gel) ครั้งที่ 1

นำ Fraction 2 (5.1033 กรัม) จากการทดลอง (1) มาแยกต่อโดยใช้ Silica gel เป็นตัวดูดซับ และ ใช้ เฮกเซน : เอทิลแอซีเทต (10:0) และเพิ่มเอทิลแอซีเทตจนถึง 100% เป็นตัวชะ เก็บสารที่แยกได้ครั้งละ 50 cm^3 จำนวน 70 ครั้ง นำไปทดสอบโดยการทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยมี เฮกเซน : เอทิลแอซีเทต (6:4) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้ UV Lamp (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) หลังจากรวม Fraction ที่คล้ายกัน แล้วนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำได้ส่วนสกัด 5 ส่วน คือ Fraction 1F (0.2155 กรัม), Fraction 2F (0.2130 กรัม), Fraction 3F (1.5163 กรัม), Fraction 4F (0.6114 กรัม) และ Fraction 5F (2.0656 กรัม)

(3) การแยกด้วยซิลิกาเจล (Silica gel) ครั้งที่ 2

นำ Fraction 2F(0.2130 กรัม) จากการทดลอง (2) มาแยกต่อโดยใช้ Silica gel เป็นตัวดูดซับ และ ใช้ เอทิลแอซีเทต 1% ในไดคลอโรมีเทน และเพิ่มเอทิลแอซีเทตจนถึง 50 % เป็นตัวชะ เก็บสารที่แยกได้ครั้งละ 20 cm^3 จำนวน 80 ครั้ง นำไปทดสอบโดยการทำโครมาโทกราฟีผิวบาง โดยมี เฮกเซน : เอทิลแอซีเทต (6:4) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้ UV Lamp (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) หลังจากรวม Fraction ที่คล้ายกัน แล้วนำไประเหยภายใต้ความดันต่ำได้ส่วนสกัด 3 ส่วน คือ Fraction 1f (0.0052 กรัม), Fraction 2f (0.1501 กรัม) และ Fraction 3f (0.0121 กรัม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(4) การแยกด้วยโครมาโทกราฟีผิวบาง (Preparative layer chromatography)

นำ Fraction 2f (0.150 กรัม) มาละลายในไดคลอโรมีเทนปริมาณเล็กน้อย นำมาทำโครมาโทกราฟีผิวบางโดยมีซิลิกาเจล (silica gel 60 F_{254} for thin layer chromatography) เป็นวัฏภาคคงที่ (ความหนา 1.5 มิลลิเมตร) และใช้ เอทิลแอซีเทต 1% ในไดคลอโรมีเทน เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของจุดสารโดยใช้ UV Lamp (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) ขูดเอาซิลิกาเจลที่มีจุดที่ต้องการ นำมาสกัดสารออกด้วยเอทิลแอซีเทต กรองเอาซิลิกาเจลออก ทำการสกัดซ้ำจนสารออกจากซิลิกาเจลจนหมด นำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำจนแห้ง ได้สารหนัก 80 มิลลิกรัม

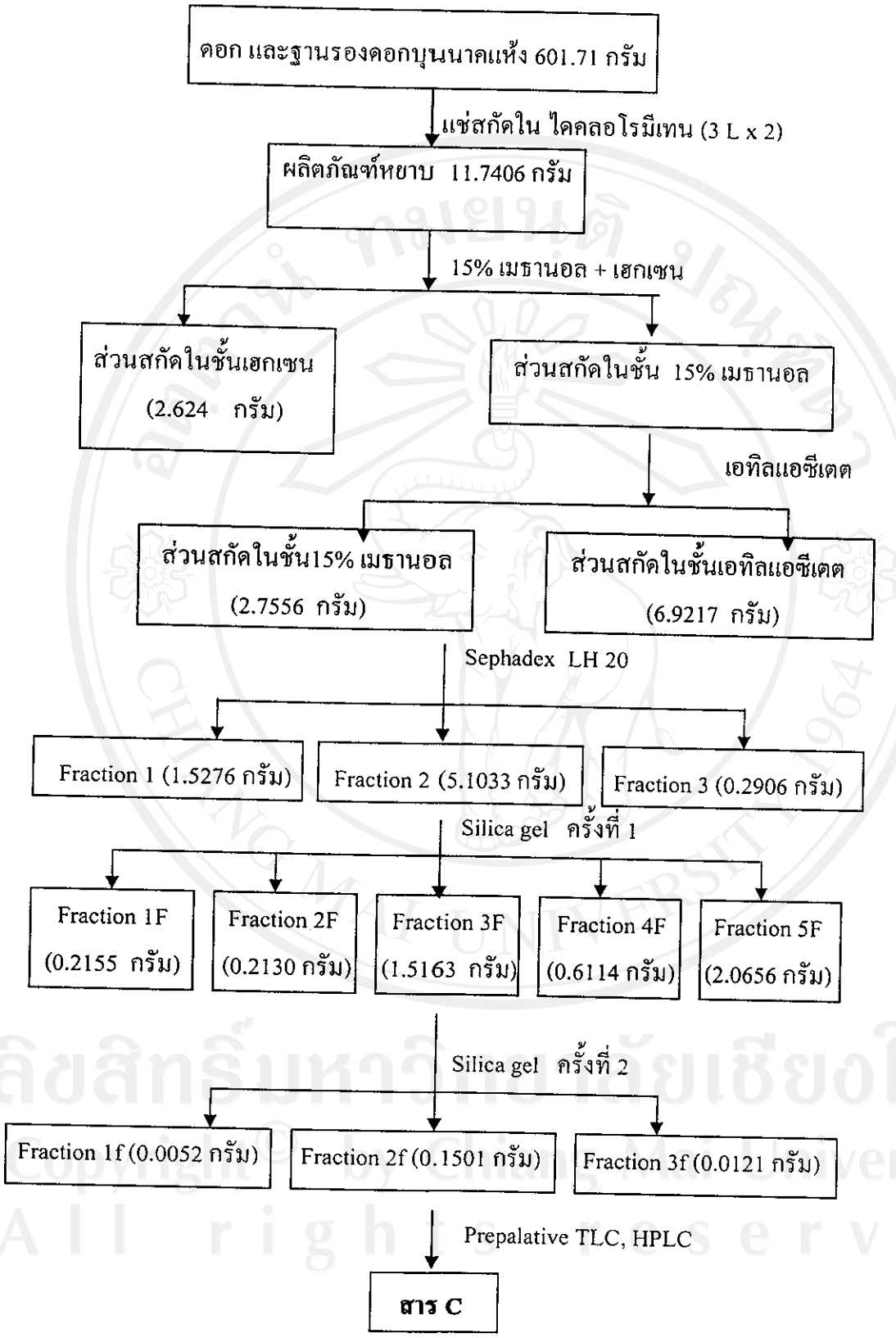
(5) การแยกด้วยเทคนิค Preparative HPLC

นำสารที่ได้จากการทดลอง (4) มาแยกต่อโดยใช้เครื่อง preparative HPLC (สารตัวอย่าง และตัวทำละลายต้องกรองก่อนใช้กับเครื่อง HPLC) เก็บ Fraction ที่ retention time เท่ากับ 7.387 นาที นำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดันต่ำจนแห้ง (ให้เป็นสาร C) นำสาร C 50 กรัม ที่ได้ไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) ต่อไป

สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

Column	PREP-ODS 20.0 x 250 mm
Mobile phase	(A) Acetonitrile 10%
	(B) Methanol 90%
Flow rate of mobile phase	8.0 ml/min
Temperature	25 ^{0}C
Wavelength	254 nm
Injection volume	1 ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูป 2.2 ขั้นตอนการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากกลีบดอกและฐานรองดอกบุนนาค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved