

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์

สารเคมี

1. Absolute ethanol (Merk, Germany)
2. Acetic acid (Labscan LTD, Ireland)
3. Ammonia T.S.
4. Ammonium Hydroxide
5. 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH, Wako Pure Chemical Industries, Japan)
6. Bismuth nitrate
7. Butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma chemical Co., USA)
8. Chloroform (Merk, Germany)
9. Cholesterol from lanolin ($C_{27}H_{46}O$, fluka chemie GmbH., Japan)
10. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma chemical Co., USA)
11. Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4 , Sigma chemical Co., USA)
12. Ethyl acetate (Labscan LTD, Ireland)
13. Ferric chloride
14. Gelatin
15. Kaempferol (Sigma chemical Co., USA)
16. Mercuric chloride
17. Methanol (Labscan LTD, Ireland)
18. n-Hexane (Labscan LTD, Ireland)
19. Nitric acid
20. Octylphenoldecaethylene glycol ether (triton x-100)
21. Phosphatidylcholine (Epikulon 200, Degussa, Germany)
22. Picric acid
23. Potassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4 , Sigma chemical Co., USA)

24. Potassium Iodide
25. Quercetin (Sigma chemical Co., USA)
26. Silica gel 60
 - No.1.07734.1000 (70-230 mesh) Merck, Germany
 - No.1.09385.2500 (230-400 mesh) Merck, Germany
27. Sodium chloride
28. Sodium sulphate anhydrous (Merk, Germany)
29. 2-Thiobarbituric acid 98% (TBA, Sigma chemical Co., USA)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Erlenmeyer flask
2. Gas chromatography-Mass spectrometer
 - GC 7890 Agilent, MSA 5973 (EI)
 - Shimadzu GC-MS QP 2010 Plus
3. Heating mantle
 - ELECTROMANTLE EM 0500/C MR1, ISOPSD U2/102
4. Microplate UV/VIS Spectrophotometer
 - Beckman Coulter, DTX 800 multimode detector
5. Micropipet
 - GILSON MODEL PIPETMAN P20, P200, P1000.
6. Nuclear Magnetic Resonance
 - Bruker Avance 400 FT-NMR spectrometer
7. pH meter
 - Metrohm
8. Rotary evaporator
9. Round bottom flask
10. Soxhlet's apparatus
11. TLC plate (silica gel GF254) ชนิด alumina sheet ขนาด 20x20 ซม.
 - Merck, Germany
12. TLC tank
13. Water bath (Memmert, Germany)

3.2 วิธีการทดลอง

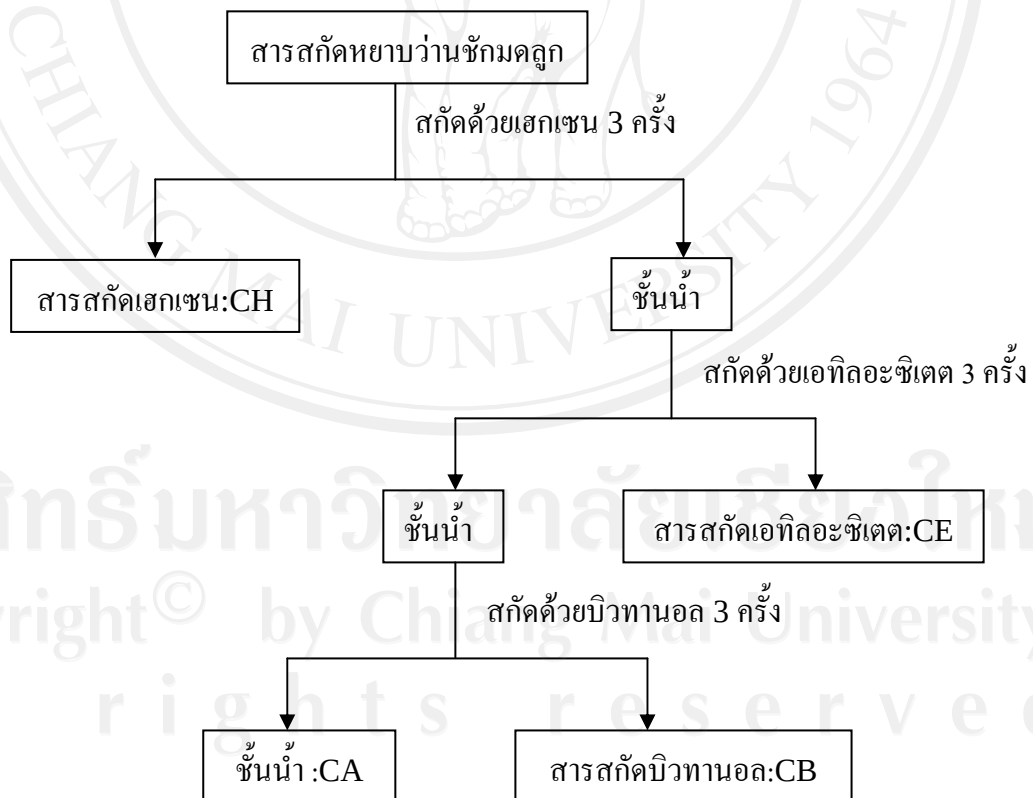
3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร

1. การจัดเก็บพืช จำแนกพืช และตรวจสอบตามอนุกรมวิธานให้ถูกต้อง โดยทำการเก็บเหง้าว่านชักมดลูก (*C. comosa* Roxb.) ที่เป็นพันธุ์พื้นเมืองของไทย จาก อ.แมริม จ.เชียงใหม่
2. นำพืชมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นแผ่นบาง ๆ นำไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 45-50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดให้เป็นผงละเอียด ด้วยเครื่องบดละเอียด แล้วเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท

3.2.2 การเตรียมสารสกัด

1. ทำการสกัดพืชด้วยตัวทำละลาย 95% ethanol โดยใช้ Soxhlet 's apparatus สารสกัดหยาบที่ได้นำไปทำให้แห้ง โดยการระเหยตัวทำละลาย ภายใต้อากาศดันต่ำ บันทึกน้ำหนักสารสกัดที่ได้ และคำนวณร้อยละของผลผลิต (%yield)
2. ทำการแยกสารสกัดหยาบด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด โดยเรียงลำดับดังนี้ คือ เฮกเซน, เอทิลอะซิเตต และ บิวทานอล ตามลำดับ

การสกัดแยกส่วนสารสกัดหยาบโดยวิธี Liquid-Liquid Extraction



รูปที่ 4 แผนภูมิการสกัดแยกส่วนของสารสกัดหยาบว่านชักมดลูกด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ใช้ในการทดสอบ มีวิธีที่มีกลไกแตกต่างกัน ดังนี้

3.2.3.1. ความสามารถในการขจัด 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH method)^(65, 66)

เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 167 μM ใน microplate

↓
เติมสารละลายตัวอย่าง (sample) ที่ละลายด้วย absolute ethanol ปริมาณ 20 μl
ผสมให้เข้ากันและเริ่มจับเวลาทันที

↓
ทิ้งไว้ 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance, Ab)
ที่ความยาวคลื่น 540 nm

↓
นำค่าที่ได้ คำนวณ % การยับยั้ง (% inhibition)

↓
สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition
และความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง

↓
คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่สามารถขจัด DPPH radical
ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50})

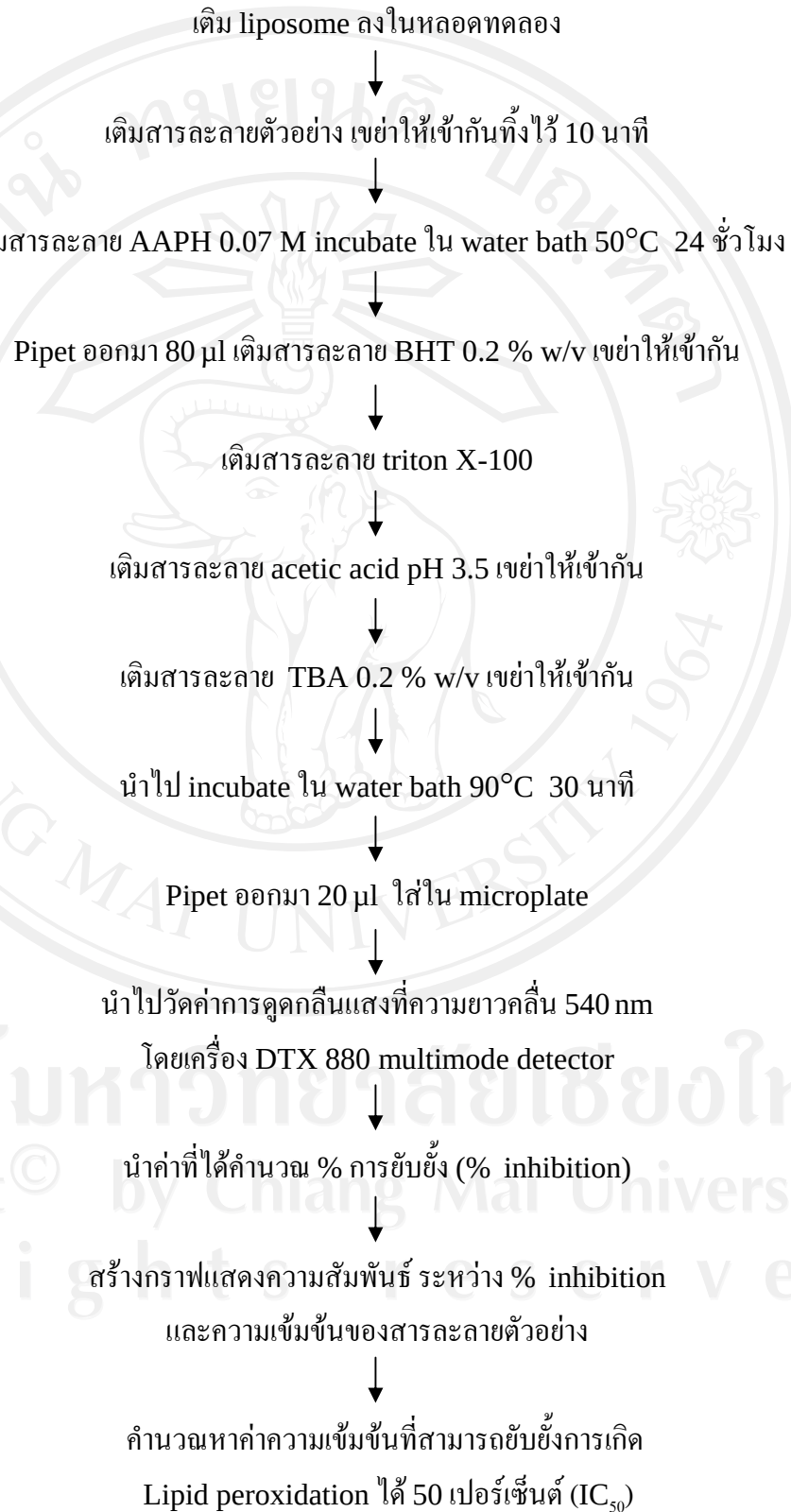
การคำนวณ % inhibition

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(\text{Ab. positive control} - \text{Ab. negative control}) - (\text{Ab. Sample} - \text{Ab. blank})]}{[(\text{Ab. positive control} - \text{Ab. negative control})]} \times 100$$

หมายเหตุ

1. Positive control ประกอบด้วย absolute ethanol+สารละลาย DPPH
2. Negative control ประกอบด้วย absolute ethanol
3. Sample ประกอบด้วย สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน+สารละลาย DPPH
4. Blank ประกอบด้วย สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน+absolute ethanol
5. สารมาตรฐาน ได้แก่ kaempferol quercetin และ BHT

3.2.3.2. ความสามารถในการยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation โดยใช้ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS method) ^(58, 67)



การคำนวณ % inhibition

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(\text{Ab. positive control} - \text{Ab. negative control}) - (\text{Ab. Sample} - \text{Ab. blank})] \times 100}{[(\text{Ab. positive control} - \text{Ab. negative control})]}$$

หมายเหตุ

1. Positive control ประกอบด้วย liposome+absolute ethanol
2. Negative control ประกอบด้วย phosphate buffer+absolute ethanol
3. Sample ประกอบด้วย สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน+liposome
4. Blank ประกอบด้วย สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน+phosphate buffer
5. สารมาตรฐาน ได้แก่ kaempferol, quercetin และ BHT

3.2.3.3. ตรวจสอบสารองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยวิธี Rapid TLC screening method ด้วย DPPH radical⁽⁶⁸⁾

โดยทำการตรวจสอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง และฉีดแผ่นโครมาโทแกรมด้วยสารละลาย DPPH (0.2% ใน Methanol) ณ ตำแหน่งของสารใดก็ตามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ทำให้สีม่วงของ DPPH หายไปจึงปรากฏการฟอกจางสีของสารบนพื้นซีลิกานบนแผ่น TLC

3.2.4 การตรวจสอบองค์ประกอบทางพิษเคมีเบื้องต้นโดยวิธีทางเคมี

3.2.4.1 การตรวจสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์

ละลายสารสกัดตัวอย่าง 0.2 กรัม ใน 2 N HCl ปริมาตร 20 มิลลิลิตร กรองแล้วแบ่งสารมาทดสอบด้วย Reagent ต่างๆดังนี้

- | | |
|-------------------------|----------------------------|
| - Mayer's reagent | (positive = ตะกอนขาวขุ่น) |
| - Wagner's reagent | (positive = ตะกอนสีเหลือง) |
| - Hager's reagent | (positive = ตะกอนสีเหลือง) |
| - Dragendorff's reagent | (positive = ตะกอนสีส้ม) |

3.2.4.2 การตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

ละลายสารสกัดตัวอย่าง 0.2 กรัม ในเมทานอล นำไประเหยแห้งใน evaporating dish เหลือ ประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ใส่หลอดแมกนีเซียมลงไปอังบนหม้ออังไอน้ำและหยด conc.HCl ลงไป 5-6 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น (positive = สีแดงส้ม : flavone , สีแดงเลือดนก: flavonol , สีแดงม่วง: flavonone)

3.2.4.3 การตรวจสอบสารประกอบ ฟีนอลิกและแทนนิน

นำสารสกัดส่วนเอทานอลมาระเหยบนไอน้ำจนได้สารละลายข้นเหนียว เติมน้ำกลั่นร้อน 25 มิลลิลิตร คนจนกระทั่งเย็น เติม 10% NaCl 2-3 หยด เพื่อ salt out สารที่ไม่ใช่ Tannin ให้ตกตะกอนแยกออก กรองด้วย Buchner funnel จนได้น้ำยาใส แบ่งเป็น 4 ส่วน ส่วนละ 2 มิลลิลิตร ทดสอบดังนี้

ส่วนที่ 1 เติม 1% gelatin solution 4-5 หยด สังเกตการตกตะกอน

ส่วนที่ 2 เติม 1% gelatin solution+10% NaCl 4-5 หยด สังเกตการตกตะกอน

ส่วนที่ 3 เติมน้ำยา Ferric chloride 1% 3-4 หยด สังเกตสีและตกตะกอนที่เกิดขึ้น

ส่วนที่ 4 ไม่เติมน้ำยาใดๆ ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

กรณีที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับ Ferric chloride แสดงว่าไม่มี Tannin หรือ Phenolic

กรณีที่เกิดสีเขียวอมฟ้า หรือสีเขียวเข้มเกือบดำ เมื่อเติม Ferric chloride และตกตะกอน gelatin ในน้ำเกลือด้วย แสดงว่ามี Tannin กลุ่ม Catechol

กรณีที่เกิดสีน้ำเงินเข้มเมื่อเติม Ferric chloride และตกตะกอน gelatin ในน้ำเกลือด้วย แสดงว่ามี Tannin กลุ่ม Pyrogallol หรือ gallic tannin

กรณีที่เกิดสีเขียวหรือสีน้ำเงินกับ Ferric chloride แต่ไม่ตกตะกอน gelatin แสดงว่าไม่มี Tannin แต่มีสารประกอบ Phenolic ชนิดอื่นๆ

3.2.4.4 การตรวจสอบสารกลุ่ม แอนทราควิโนนกลัยโคไซด์

ต้มสารสกัดเอทานอล 0.2 กรัม กับ dil. HCl 15 มิลลิลิตร บนหม้ออังไอน้ำ ทิ้งให้เย็น แล้วกรอง นำส่วนที่กรองได้สกัดด้วย Chloroform เก็บชั้น Chloroform เติมสารละลาย dil. NaOH เขย่า และสังเกตสีในชั้นล่าง (positive = เกิดสีชมพูในชั้นล่าง)

3.2.4.5 การตรวจสอบสารกลุ่มสเตอรอลกลัยโคไซด์หรือไตรเทอร์พีน

Liebermann Burchard's reaction

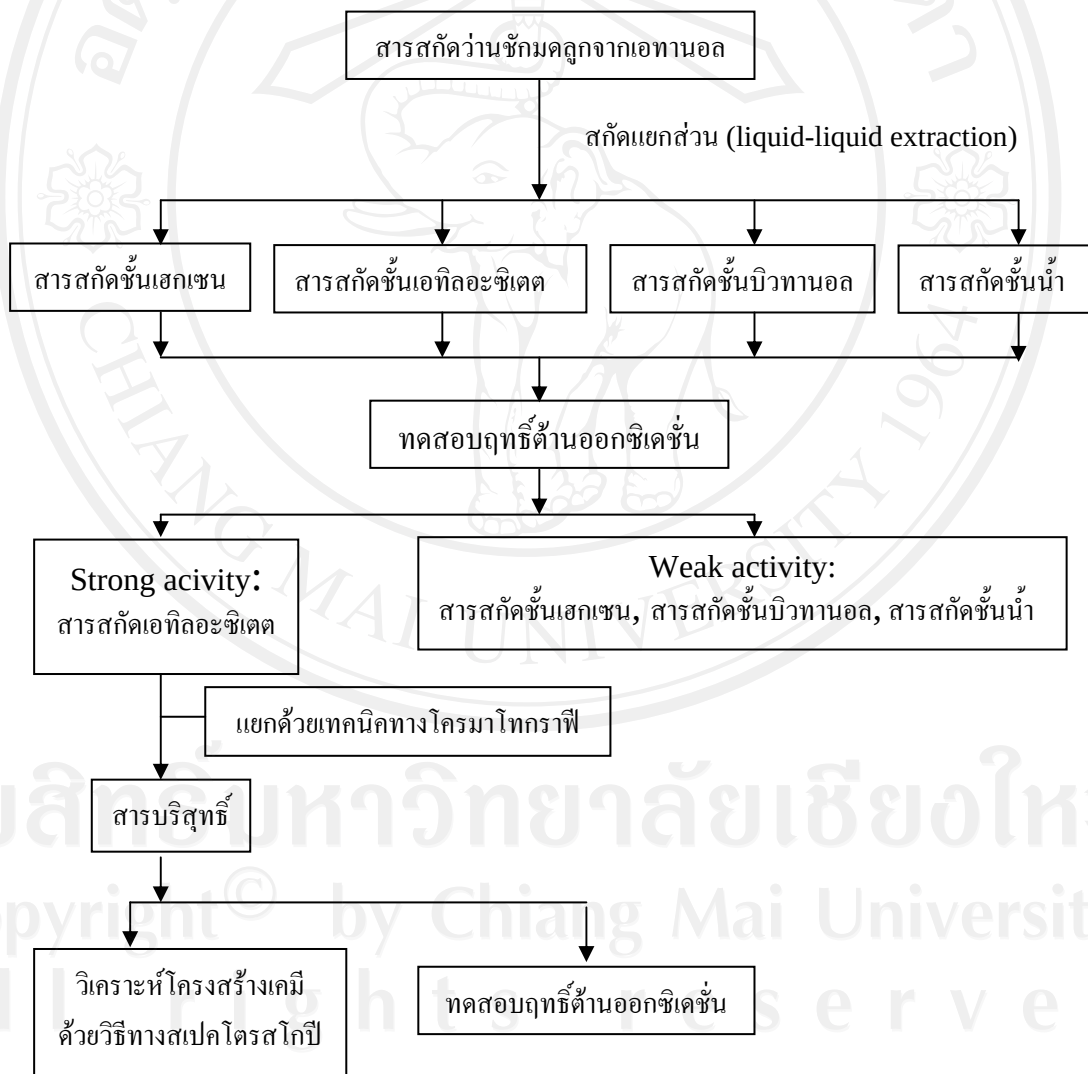
ระเหยน้ำยาสกัดเอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนแห้ง ละลายตะกอนที่เหลือด้วย Acetic anhydride 0.5 มิลลิลิตร และ Chloroform 0.5 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอดทดลองที่แห้งและ

สะอาด เดิมกรดกำมะถันเข้มข้น 1-2 มิลลิลิตร โดยใช้หลอดหยดแต่ละข้างหลอดทดลองให้การไหลลงไปยังหลอดซ้ำๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้นระหว่างชั้นของน้ำยาทั้งสองทันที และสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีในระยะเวลา 15 นาที และ 30 นาที

ถ้าปรากฏว่าเริ่มแรกมีสีแดงหรือน้ำตาลแดง แล้วเปลี่ยนเป็นสีม่วงจนสุดท้ายเปลี่ยนเป็นสีเขียว หรือเขียวปนฟ้า แสดงว่ามีกลุ่ม sterol

ถ้าสีเปลี่ยนจากสีแดงหรือน้ำตาลแดงเป็นสีม่วงและคงอยู่ แสดงว่าเป็นกลุ่ม triterpene

3.2.5 การแยกสารและการทำให้บริสุทธิ์ ร่วมกับการตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงการแยกสารสกัดจากวุ้นชั่งมดลูกโดยอาศัย Bioassay-guided isolation

3.2.5.1 เทคนิคทางโครมาโทกราฟี

1. โครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin layer chromatography)

เทคนิค	: one dimension ascending
ตัวดูดซับ	: ซิลิกาเจล 60 F ₂₅₄ (Merck)
ความหนา	: 0.2 มิลลิเมตร
ระยะทาง	: 5 เซนติเมตร
การตรวจวัด	: 1. ภายใต้ UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ 365 นาโนเมตร 2. นีดพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulphuric acid นำไป อบที่ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5-10 นาที

2. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography)

2.1. Vacuum column chromatography

ตัวดูดซับ	: ซิลิกาเจล 60 (No.1.07734.1000) ขนาดอนุภาค 0.063-0.200 nm (70-230 mesh ASTM) และซิลิกาเจล 60 (No.1.09385.2500) (บริษัท Merck)
การบรรจุ	: โดยวิธีแบบแห้ง (dry packing)
การบรรจุตัวอย่าง	: นำตัวอย่างละลายด้วยตัวทำละลายในปริมาณเล็กน้อยแล้วนำมาผสมกับซิลิกาเจล โดยใช้ปริมาณซิลิกาเจลน้อยที่สุด หลังจากนั้นนำมาบรรจุลงในคอลัมน์
การตรวจวัด	: นำแต่ละ fraction ตรวจวัดด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร หลังจากนั้นนึ่งพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulphuric acid นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C 5-10 นาที และนึ่งพ่นด้วย สารละลาย DPPH

2.2. แฟลชคอลัมน์ (Flash column chromatography)

ตัวดูดซับ	: ซิลิกาเจล 60 (No.1.07734.1000) ขนาดอนุภาค 0.063-0.200 nm (70-230 mesh ASTM) และซิลิกาเจล 60 (No.1.09385.2500) ขนาดอนุภาค 0.040-0.063 nm (230-400 mesh ASTM) (บริษัท merck)
การบรรจุ	: โดยวิธีแบบเปียก (wet packing)
การบรรจุตัวอย่าง	: นำตัวอย่างละลายด้วยน้ำยาชะในปริมาณเล็กน้อย แล้วจึงนำไปบรรจุลงในคอลัมน์
การตรวจวัด	: นำแต่ละ fraction ตรวจวัดด้วยโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง(ตามข้อ1.2.1)

3.2.5.2 การแยกสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต

นำสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต หนักประมาณ 24 กรัม มาทำการแยกสารโดยอาศัยเทคนิค Vacuum column chromatography โดยใช้ซิลิกาเจล 60 (No.7734) เป็นตัวดูดซับ แล้วชะคอลัมน์ตามความมีขั้วของตัวทำละลายโดยเรียงลำดับ ดังนี้ คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล สามารถแยกได้เป็น 100 fractions นำแต่ละ fractions ไประเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันต่ำ เก็บรวบรวม fraction ที่ให้ผลของโครมาโทกราฟีผิวบางเหมือนกันเข้าด้วยกัน โดยใช้สภาวะตัวทำละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์ม:เมทานอล อัตราส่วน 9:1 ซึ่งสามารถรวบรวมได้ 9 fractions (CE1 ถึง CE9) ดังแสดงในตารางที่ 3 หลังจากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านออกซิเดชันโดยวิธี Rapid TLC screening method ด้วย DPPH radical

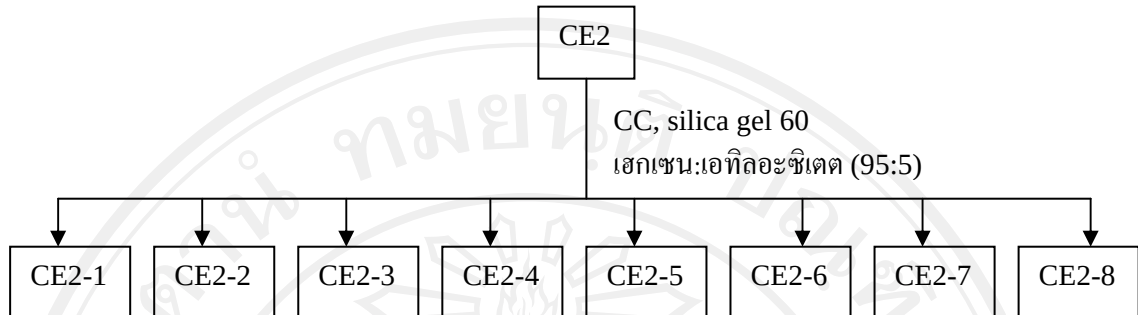
ตารางที่ 3 แสดงอัตราส่วนและปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการแยกสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต โดย Vacuum column chromatography

Fraction	อัตราส่วน (%) เฮกเซน:เอทิลอะซิเตต	อัตราส่วน (%) เอทิลอะซิเตต:เมทานอล	ปริมาตร ของตัวชะ (ml)	รวม fraction	น้ำหนัก
1-7	100:0	-	1400	CE1	0.0223
8-9	95:5	-	400		
10-11	85:15	-	400	CE2	0.9462
12-20	80:20	-	1900		
21-38	70:30	-	3900	CE3	1.3750
39-50	60:40	-	2400	CE4	1.6311
51-58	50:50	-	1600	CE5	2.4201
59-70	30:70	-	2400	CE6	5.0926
71-76	0:100	-	1600	CE7	3.0768
77-84	-	95:5	1600	CE8	1.9977
85-93	-	90:10	1000	CE9	1.3032
94-100	-	80:20	1000		

3.2.5.3 การแยกสาร และทำสารให้บริสุทธิ์

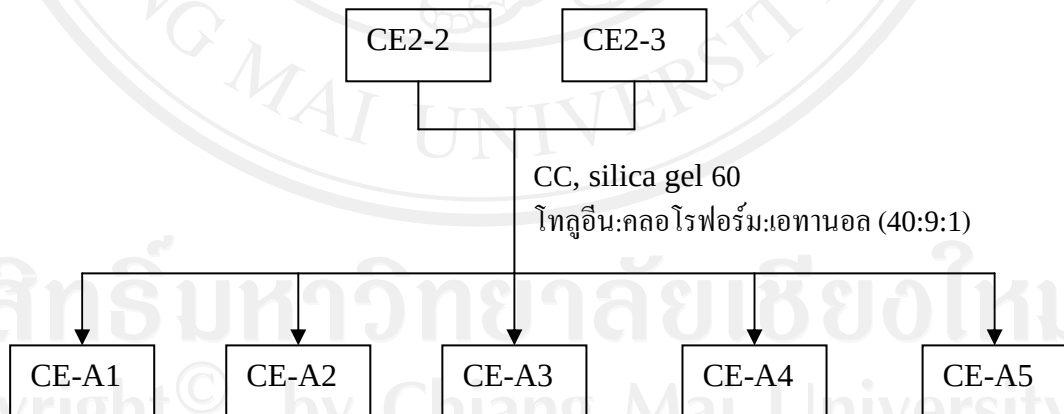
นำ fraction CE2 น้ำหนัก 0.70 กรัม มาทำการแยกสารโดยใช้เทคนิคเฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (CC) (เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 2.5 cm) ใช้ซิลิกาเจล 60 (No.7734) เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง เฮกเซนกับเอทิลอะซิเตต อัตราส่วน 95:5 เมื่อนำมา

ตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีผิวบาง ซึ่งสามารถรวบรวมสารได้ทั้งหมด 8 fractions (CE2-1 ถึง CE2-8) ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แผนภูมิแสดงการแยก fraction CE2

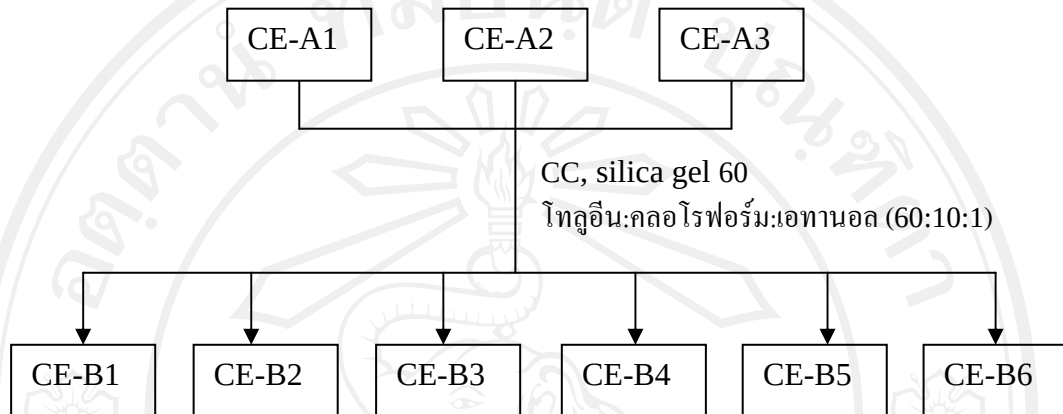
นำ fraction CE2-2 และ CE2-3 น้ำหนัก 0.2724 กรัม มาแยกด้วยเฟลชคอลัมน์โครมาโทกราฟี (เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 2.5 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 60 (No.9385) เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง โทลูอิน:คลอโรฟอร์ม:เอทานอล อัตราส่วน 40:9:1 เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีผิวบางและฉีดพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulphuric acid สามารถรวบรวมสารได้ทั้งหมด 5 fractions (CE-A1 ถึง CE-A5) ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แผนภูมิแสดงการแยก fraction CE2-2 และ CE2-3

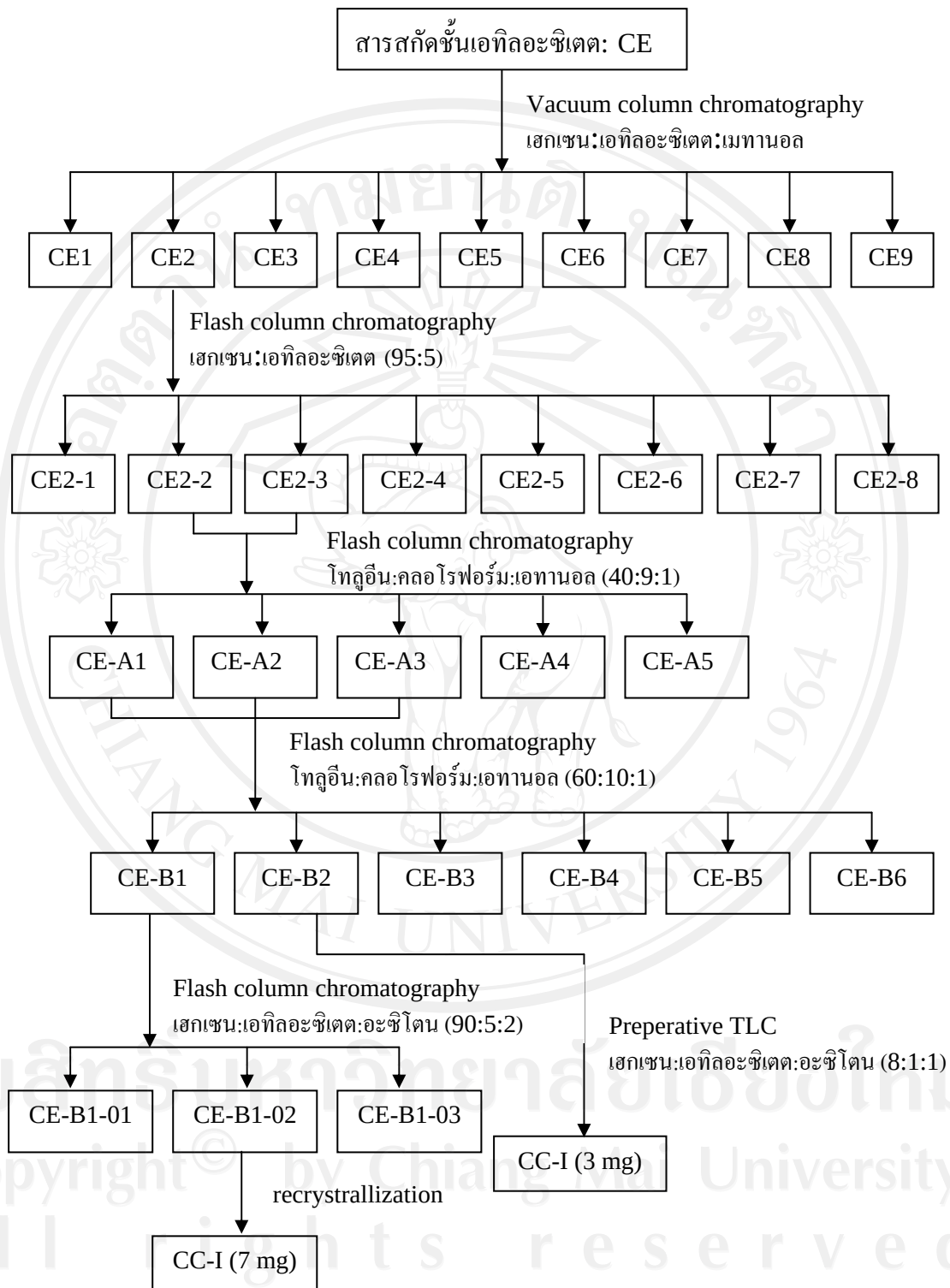
หลังจากนั้นนำ fraction CE-A1, CE-A2 และ CE-A3 น้ำหนัก 0.1277 กรัม มาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 2.5 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 60 (No.9385) เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง โทลูอิน:คลอโรฟอร์ม:เอทานอล อัตราส่วน

60:10:1 เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีผิวบางและฉีดพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulphuric acid สามารถรวบรวมสารได้ 6 fractions (CE-B1 ถึง CE-B6) ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แผนภูมิแสดงการแยก fraction CE-A1, CE-A2 และ CE-A3

จากการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีผิวบางและฉีดพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulphuric acid นำ fraction CE-B1 0.0376 กรัม มาทำการแยกต่อโดยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ 1.5 cm) โดยใช้ซิลิกาเจล 60 (No.9385) เป็นตัวดูดซับและชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง เฮกเซน:เอทิลอะซิเตต:อะซิโตน อัตราส่วน 90:5:2 ซึ่งสามารถได้รวบรวม 3 fractions คือ CE-B1-01 ถึง CE-B1-03 เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีผิวบางและฉีดพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulphuric acid พบว่า fraction CE-B1-02 ก่อนข้างจะเป็น สารบริสุทธิ์ จึงได้นำมาทำการตกผลึก และได้สารบริสุทธิ์ CC-I (7 mg) และนำ fraction CE-B2 0.0152 กรัม มาทำการแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธี Preperative TLC โดยใช้ซิลิกาเจล GF₂₅₄ ชนิด Aluminium sheet ขนาดความหนา 0.25 mm (20x20 cm, Merck) ชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่าง เฮกเซน : เอทิลอะซิเตต : อะซิโตน อัตราส่วน 8:1:1 ซึ่งสามารถแยกสารบริสุทธิ์ CC-I (3 mg) ได้ และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีผิวบางและฉีดพ่นด้วยสารละลาย anisaldehyde-sulphuric acid หลังจากนั้นนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นทั้ง 2 วิธี คือ Lipid peroxidation โดยใช้ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และความสามารถในการกำจัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)



รูปที่ 9 แผนภูมิแสดงขั้นตอนโดยรวมของการแยกสาร CC-I จากสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตต
ของว่านชักมดลูก

3.2.5.4 การตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของสาร CC-I

ทำการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสาร CC-I ด้วยโปรตรอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี ($^1\text{H-NMR}$), คาร์บอน-13 นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี ($^{13}\text{C-NMR}$) และแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี (GC-MS)

3.2.6 องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยจากว่านชักมดลูก

3.2.6.1 การกลั่นน้ำมันหอมระเหย

นำเหง้าใต้ดินของว่านชักมดลูกล้างให้สะอาด ทำการลดขนาดโดยการหั่นให้มีขนาดประมาณครึ่งนิ้ว จากนั้นสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แยกเฉพาะน้ำมันหอมระเหยออก และใช้ sodium sulphate anhydrous กำจัดน้ำที่เหลือ

3.2.6.2 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

ทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วย GC-MS สภาวะในการวิเคราะห์ มีดังนี้

Instrument model	: Shimadzu GC-MS QP 2010 Plus
Column	: DB-5 length 30.3 m film thickness 0.25 μm inner diameter 0.25 mm
Carrier gas	: He
Injector temperature	: 180 $^{\circ}\text{C}$
Detector	: Quadrupole, 70 eV
Split ratio	: 1:5
Flow rate	: 1.00 ml/min

Column temperature program

	Rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Hold time (min)
1.	-	60.0	0.00
2.	0.5	130.0	3.00
3.	5.0	200.0	1.00
4.	10.0	230.0	3.00

3.2.6.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น ซึ่งมีกลไกแตกต่างกัน 2 วิธี คือ การยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation โดยใช้ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และความสามารถในการขจัด 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl radical (DPPH) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin, kaempferol และ BHT



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved