

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ตอน ได้แก่ การสกัด การแยกสารสกัดและการศึกษาโครงสร้างของสารที่แยกได้จากสารสกัดสมุนไพรกิ่งไผ่เน่า

อุปกรณ์/เครื่องมือและสารเคมี

วัสดุและสารเคมี

1. ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น
2. Absolute ethanol (Analytical grade; Clrlo Erba : 414608)
3. Dichloromethane
4. Ethyl acetate
5. Hexane
6. Methanol
7. สารดูดซับ
 - Silica gel สำหรับ Column chromatography
 - Silica gel (0.063-200 mm, Merck 1.07734)
 - Silica gel (<0.063mm, Merck 1.07729)
 - Silica gel สำหรับ quick column chromatography
 - Silica gel (<0.063mm, Merck 1.07785)
8. Developing reagent (anisaldehyde: conc. H_2SO_4 : H_2 : Absolute ethanol ในอัตราส่วน (2: 3: 2: 90)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. หลอดกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 nm
2. เครื่องหาจุดหลอมเหลว

3 . Nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker Avance 400)

4. Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-211)

3.1 การสกัดสมุนไพรกิ่งไผ่เน่า

ที่มาของ กิ่งไผ่เน่า (*Vitex glabrata*)

พืชที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้นำมาจาก : ต. ดอนปราง อ. ศรีประจันต์ จ. สุพรรณบุรี

เก็บในช่วงเดือน : เดือน ธันวาคม ปี 2552



ภาพที่ 1 รัดต้นไผ่เน่าและขั้นตอนการสกัดแยก

3.1.1 การสกัดกิงโซ่เน่าในชั้นเฮกเซน (Hexane)

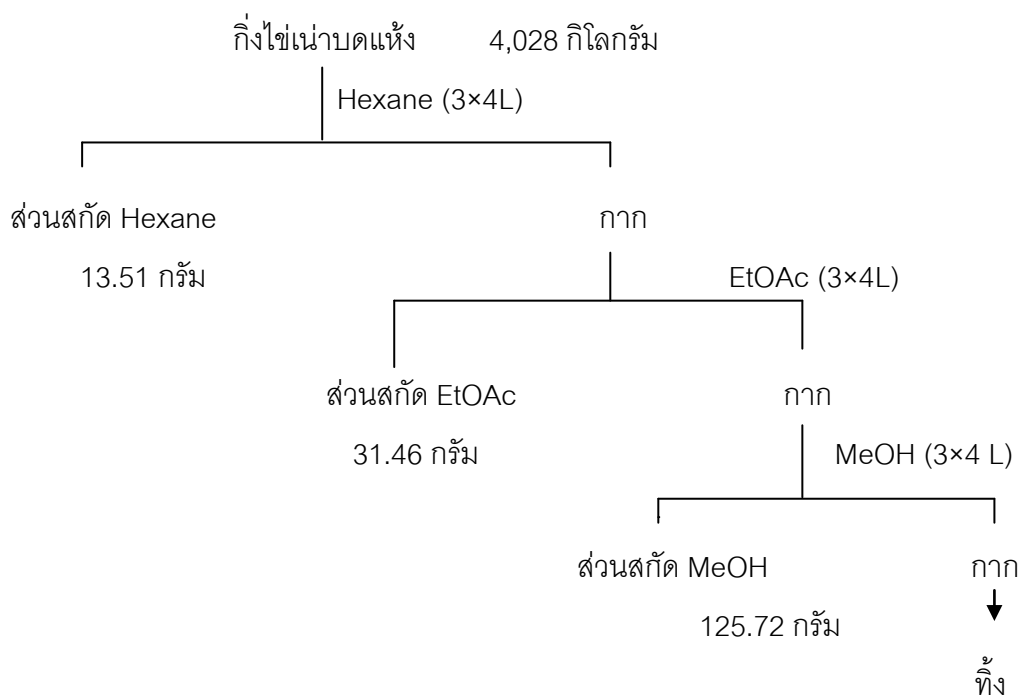
นำกิงโซ่เน่ามาทำความสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกออก ผึ่งแดดให้แห้งแล้วนำมาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไป บดให้ละเอียด น้ำหนัก 4,028 กรัม ทำการสกัด ด้วยเฮกเซน (Hexane จำนวน 4 ลิตร ให้ท่วม ปิดฝาขวดไว้ให้สนิทเพื่อป้องกันตัวทำละลายระเหยออก แช่สารเป็นเวลา 5 วัน โดยสกัดซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อแช่ครบกำหนดแล้วนำออกมากรองด้วยสำลี เพื่อแยกเอาสารละลายออกมา และรวมกันทั้ง 3 ครั้ง

3.1.2 การสกัดกิงโซ่เน่าในชั้นเอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate)

ส่วนกากที่เหลือจากชั้นเฮกเซน นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate อีก โดยสกัดซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 4 ลิตร แล้วทำตามข้อ 3.1.1

3.1.3 การสกัดกิงโซ่เน่าในชั้นเมทานอล (Methanol)

ส่วนกากที่เหลือจากชั้นเอทิล อะซิเตต นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย Methanol โดยสกัดซ้ำ 3 ครั้ง ครั้งละ 4 ลิตร แล้วทำตามข้อ 3.1.1 นำสารละลายในแต่ละชั้นไประเหยตัวทำละลายออกให้หมดด้วยเครื่อง Vacuum Rotary Evaporator จะได้ส่วนสกัดหยาบของแต่ละชั้น ซึ่งเราเรียกว่า ครูด (Crude) ได้แก่ Crude Hexane น้ำหนัก 13.51 กรัม Crude Ethyl acetate น้ำหนัก 31.46 กรัม และ Crude Methanol น้ำหนัก 125.72 กรัม ดังแสดงในแผนผังที่ 1



แผนผังที่ 1 แสดงการสกัดสารจากกิงโซ่เน่าด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด

3.2 การแยกส่วนสกัดหยาบ

3.2.1 ส่วนสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (Hexane extract) กิ่งไข่ม้วน

นำส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของ กิ่งไข่ม้วน น้ำหนัก 13.51 g มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel ขนาด 7734 เป็นตัวดูดซับและทำการแพ็คคอลัมน์ด้วย 100% Hexane ทำการชะคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 100% Hexane, Hexane : CH₂Cl₂ และ โดยค่อยๆเพิ่มขึ้นทีละ 5% CH₂Cl₂ จนถึง 100% CH₂Cl₂ และ 1% MeOH ตามลำดับ ในขณะที่ทำการชะคอลัมน์ต้องเก็บสารที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ทุกๆ 100 mL โดยประมาณ แล้วทำการตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสามารถแบ่งสารได้เป็น 6 2 fractions ย่อย และรวม fractions ได้ 17 fractions และได้สารกลุ่มที่เป็น ไตรเทอร์ปีน (triterpene) ซึ่งเป็นสารผสม มีลักษณะเป็น amorphous solid ได้แก่ beta – sitosterol (11) และ stigmasterol (12)

3.2.2 ส่วนสกัดหยาบชั้นเอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate extract) กิ่งไข่ม้วน

นำส่วนสกัดหยาบเอทิล อะซิเตตของกิ่งไข่ม้วน น้ำหนัก 31.46 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธีคอลัมน์ โครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel ขนาด 7734 เป็นตัวดูดซับและทำการแพ็คคอลัมน์ด้วย 100% Hexane ทำการชะคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 80% Hexane, Hexane: EtoAc โดยค่อยๆเพิ่ม 10% EtoAc ตามลำดับ ขณะที่ทำการชะคอลัมน์ต้องเก็บสารที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ทุกๆ 100 mL โดยประมาณ แล้วจึงทำการตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสามารถแบ่งสารได้เป็น 71 fractions ย่อย และรวม fractions ได้ 22 fractions มีลักษณะเป็น amorphous solid ดังแสดงในแผนผังที่ 2

VG (S)-EA-11/31.46 g

Hexane : EtOAc: MeOH

Fr.1	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Fr.5	Fr.6	Fr.7	Fr.8	Fr.9	Fr.10	Fr.22
Fr.1 VG(S)-EA-11/1-4 (0.4177 g)	Fr.2 VG(S)-EA-11/5 (1.3480 g)	Fr.3 VG(S)-EA-11/6-7 (2.4661 g)	Fr.4 VG(S)-EA-11/8-12 (0.8803 g)	Fr.5 VG(S)-EA-11/13 (0.0704 g)	Fr.6 VG(S)-EA-11/14-16 (0.3136 g)	Fr.7 VG(S)-EA-11/17-20(0.5183 g)	Fr.8 VG(S)-EA-11/21-24 (1.5591 g)	Fr.9 VG(S)-EA-11/25-26 (1.7832 g)	Fr.10 VG(S)-EA-11/27-28(0.0989 g)	Fr.11 VG(S)-EA-11/29-32(1.8280 g)
						Fr.13 VG(S)-EA-11/37-44 (0.2172 g)	Fr.14 VG(S)-EA-11/45-48 (0.4309 g)	Fr.15 VG(S)-EA-11/49-52 (0.1154 g)	Fr.16 VG(S)-EA-11/53-56 (0.3669 g)	Fr.17 VG(S)-EA-11/57-60 (0.3642 g)
						Fr.18 VG(S)-EA-11/61-63 (0.4428 g)	Fr.19 VG(S)-EA-11/64-66 (1.968 g)	Fr.20 VG(S)-EA-11/67-68 (0.1177 g)	Fr.21 VG(S)-EA-11/69 (0.7447 g)	Fr.22 VG(S)-EA-11/70-71 (0.8609 g)

แผนผังที่ 2 แสดงการแยกส่วนสกัดหยาบชั้น Ethyl acetate ของกิ่งไผ่เน่า

นำ fractions ที่ 19 VG (S)- EA-11/64-66 (1.968 กรัม) ชั้น Ethyl acetate

น้ำหนัก 1.968 g และทำการแยกต่ออีก 4 ครั้ง ได้น้ำหนัก โดยใช้ silica gel ขนาด 7729 เป็นตัว

ดูดซับและทำการแพ็คคอลัมน์ด้วย 100% EtOAc ทำการชะคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 90%

EtOAc , EtOAc:MeOH โดยค่อยๆเพิ่ม 1% MeOH ตามลำดับ แล้วตรวจสอบด้วย TLC ระบบตัว

ทำละลายต่างๆ พบว่าสามารถแบ่งสารได้เป็น 8 fractions จากนั้นนำ fractions ที่ 4 ไปทำการ

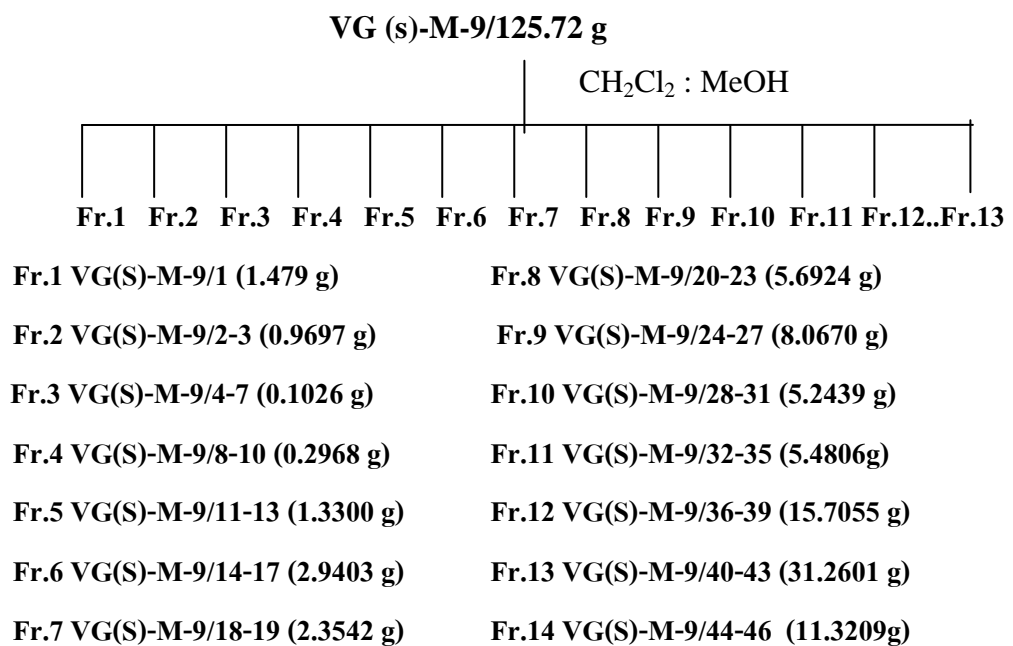
แยกต่อโดยใช้ silica gel ขนาด 7729 เป็นตัวดูดซับและทำการแยกคอลลัมน์ด้วย 100% EtOAc ทำการชะคอลลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 90% EtOAc, EtOAc:MeOH โดยค่อยๆเพิ่ม 1% MeOH ตามลำดับ แล้วตรวจสอบด้วย TLC ระบบตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสามารถแบ่งสารได้ เป็น 9 fractions จากนั้นนำ fractions ที่ 4 ไปทำการแยกต่อโดยใช้ silica gel ขนาด 7729 เป็นตัวดูดซับและทำการแยกคอลลัมน์ด้วย 100% EtOAc ทำการชะคอลลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 91% EtOAc, EtOAc:MeOH โดยค่อยๆเพิ่ม 1% MeOH ตามลำดับ แล้วตรวจสอบด้วย TLC ระบบตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสามารถแบ่งสารได้เป็น 1 fractions จากนั้นนำ fractions ที่ได้ไปทำการแยกต่อโดยใช้ silica gel ขนาด 7729 เป็นตัวดูดซับและทำการแยกคอลลัมน์ด้วย 100% CH₂Cl₂ ทำการชะคอลลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 92% CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:MeOH โดยค่อยๆเพิ่ม 1% MeOH ตามลำดับ แล้วตรวจสอบด้วย TLC ระบบตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสามารถแบ่งสารได้ เป็น 6 fractions จากนั้นนำ fractions ที่ 4 ไปทำการแยกต่อโดยใช้ RP-18 เป็นตัวดูดซับและทำการแยกคอลลัมน์ด้วย 100% MeOH ทำการชะคอลลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 90% H₂O, H₂O:MeOH โดยค่อยๆเพิ่ม 10% MeOH แล้วตรวจสอบด้วย TLC ระบบตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ 3 ชนิดได้แก่ 20- hydroxyecdysone (2), ajugasterone C (13) และ pterosterone (14)

3.2.3 ส่วนสกัดหยาบชั้นเมทานอล (Methanol extract) กิ่งไข่เน่า

นำส่วนสกัดหยาบเมทานอลของกิ่งไข่เน่า น้ำหนัก 125.72 กรัม มาทำการแยกด้วยวิธี คอลลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel ขนาด 7747 เป็นตัวดูดซับและทำการแยกคอลลัมน์ด้วย 100% CH₂Cl₂ ทำการชะคอลลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 100% CH₂Cl₂, 100% CH₂Cl₂:MeOH

โดยค่อยๆเพิ่มขึ้นทีละ 5% MeOH และสุดท้ายเป็น 50% CH₂Cl₂:50% MeOH ตามลำดับ ในขณะที่ทำการชะคอลัมน์ต้องเก็บสารที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ทุกๆ 200 mL โดยประมาณ แล้วจึงทำการตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสามารถแบ่งสารได้ 46 fractions ย่อย และรวม fractions ได้ 14 fractions มีลักษณะเป็น amorphous solid ดังแสดงในแผนผังที่

3



แผนผังที่ 3 แสดงการแยกส่วนสกัดหยาบชั้น Methanol ของกิ่งไข่ม้วน

ในการแยกคอลัมน์ของ Fractions ที่ 8 VG (S)-M-9/20-23 ในชั้น Methanol น้ำหนัก 5.692 g และทำการแยกคอลัมน์ต่ออีก 2 ครั้ง ครั้งแรกได้น้ำหนัก 2.348 กรัม โดยใช้ silica gel ขนาด 7734 เป็นตัวดูดซับและทำการแพ็คคอลัมน์ด้วย 100% CH₂Cl₂ ทำการชะคอลัมน์ด้วยระบบตัวทำละลาย 100% CH₂Cl₂, 100% CH₂Cl₂:MeOH โดยค่อยๆเพิ่มขึ้นทีละ 5% MeOH และสุดท้ายเป็น 50%CH₂Cl₂:50% MeOH ตามลำดับ และครั้งที่ 2 ได้น้ำหนัก 638.1 mg แต่ครั้งที่ 2 ทำการแยกคอลัมน์โดยใช้ RP-18 ใน H₂O:MeOH แล้วตรวจสอบด้วย TLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสามารถแบ่งสารได้ 7 fractions และได้สารที่บริสุทธิ์ใน fractions ที่ 4 มีลักษณะเป็น amorphous solid ชื่อว่า agnuside (8)

ในการแยกคอลัมน์ของ Fractions ย่อย ที่ 5 VG(S)-M-51/11-24 ทำในทำนองเดียวกับข้างต้น สามารถแบ่งสารได้เป็น 8 fractions และได้สารที่บริสุทธิ์ใน fractions ที่ 4 และ 7 มีลักษณะเป็น amorphous solid ได้แก่ turkesterone (1) และ 20-hydroxyecdysone (2)

3.3 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรกิ่งไข่ม้วน

ได้ส่งสารสกัดที่ทำการทดสอบได้ไปทดสอบที่ รองศาสตราจารย์ ดร . นันทนา อรุณฤกษ์ ภาควิชาโษษุวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ