บทที่ 3

การทดลอง

3.1 พืชตัวอย่าง

เปลือกต้นเปล้าใหญ่ *Croton oblongifolius* Roxb. ได้จากอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย ในเดือนเมษายน 2544 เมื่อได้ตรวจสอบเทียบกับลักษณะตัวอย่างพืชในหอพรรณไม้ที่กรมป่าไม้พบว่ามีลักษณะเหมือนกับต้นเปล้าใหญ่ หมายเลขกำกับ BKF 084729

3.2 วัสดุและเครื่องมือ

3.2.1 Gas Chromatograph-Mass spectrometer (GC-MS)

GC model 8000-MS model Trio 2000 ของบริษัท Fisons ประเทศอังกฤษ

3.2.2 Ultraviolet-Visible Spectrometer (UV-VIS)

ของบริษัท Hewlett Packard 8452 (A diode array spectrophotometer in chloroform)

3.2.3 Fourier Transform-Infrared spectrophotometer (FT-IR)

model 410 ของบริษัท Nicolet Impact

3.2.4 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (FT-NMR)

model AC-F200 ของบริษัท Bruker ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ และ model JNM-A 500 ของบริษัท Jeol ประเทศญี่ปุ่น

3.2.5 Optical Rotation

polarimeter รุ่น 341ของบริษัท Perkin-Elmer

3.2.6 High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

model LC-3A ของบริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

3.2.7 เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator)

ของบริษัท Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

3.2.8 เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Fisher-John Melting Point Apparatus)

ของบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3 สารเคมี

3.3.1 ตัวทำละลาย ใช้ตัวทำละลายคุณภาพชั้นอุตสาหกรรม ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เมธานอล เอธานอล แอซีโตน เอธิลแอซิเตต และอีเธอร์

3.3.2 ตัวดูดซับ ใช้ซิลิกาเจลชนิด 60G Art 7734 และArt 9385 สำหรับคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.3.3 TLC Plastic Sheets Silica Gel 60 F_{254} และ TLC Aluminium sheets Silica Gel 60 F_{254} ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.3.4 Sephadex LH-20 ของบริษัท Pharmacia Biotech AB. ประเทศสวีเดน

3.3.5 Xantine Oxidase (from microorganism) 100 units ของบริษัท Sigma

3.3.6 Allopurinol (4-Hydroxypyrazolo [3,4] pyrimidine) ของบริษัท Sigma

3.3.7 Uric Acid (2,6,8-Trihydroxypurine) Minimum 99% ของบริษัท Sigma

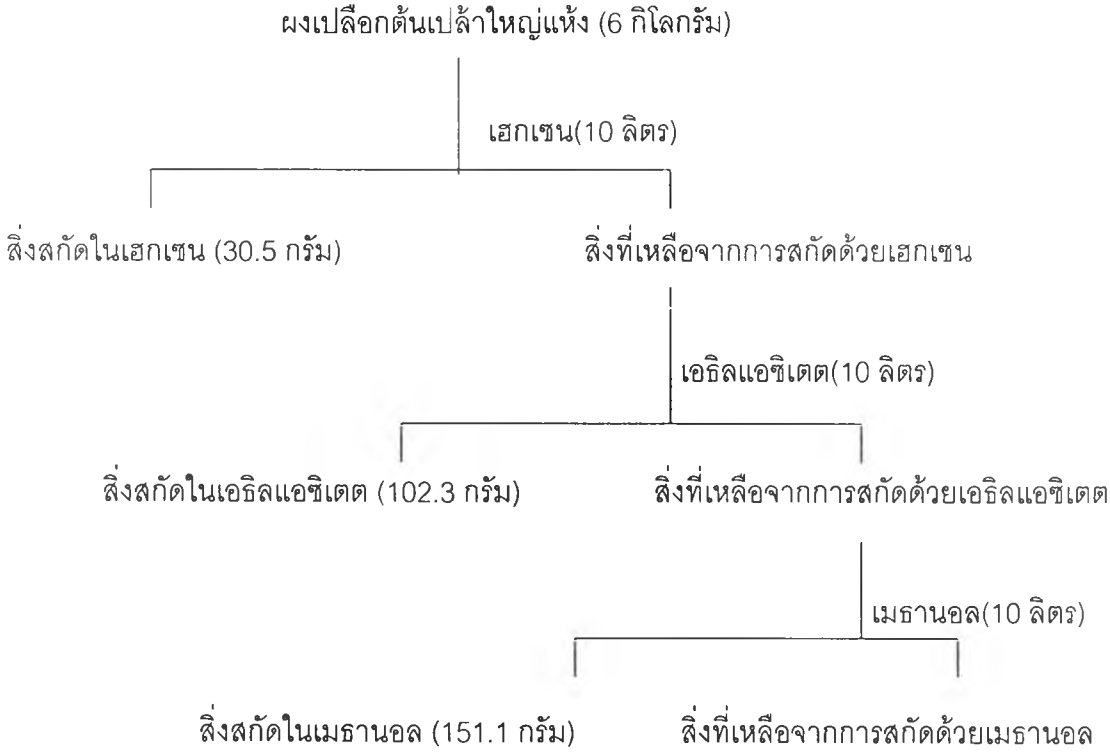
3.3.8 Xanthine (2,6-Dihydroxypurine) 99% ของบริษัท Sigma

3.3.9 Sodium Phosphate Buffer pH 7.5

3.4 การสกัด

นำเปลือกต้นเปล้าใหญ่แห้งและบดละเอียดน้ำหนัก 6 กิโลกรัม มาสกัดด้วยการแช่ในเฮกเซน 10 ลิตร เอธิลแอซิเตต 10 ลิตร และเมธานอล 10 ลิตร ตามลำดับ กรองสารละลายที่ได้แล้วนำไปกลั่นแยกตัวทำละลายออกจนหมด โดยกลั่นแบบลดความดันแล้วระเหยแห้งบนอ่างน้ำเดือดได้ สิ่งสกัดในเฮกเซนมีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาล สิ่งสกัดในเอธิลแอซิเตตมีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลแดง และสิ่งสกัดในเมธานอลมีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลดำ

แผนภาพที่ 3 ขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่



3.5 **การแยกสาร**

3.5.1 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเฮกเซน

นำสิ่งสกัดในเฮกเซนหนัก 30.5 กรัม แยกด้วย**วิธี**คอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร บรรจุด้วยซิลิกาเจล 40 กรัม ชะสารด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และค่อยๆเพิ่มเอธิลแอซิเตตจนถึง 100% สามารถแยกสารประกอบได้จากสิ่งสกัดในเฮกเซนได้ 1 ชนิด ตกผลึกใน 5%เอธิลแอซิเตตในเฮกเซนมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว146-148 °C (สาร 1)

3.5.2 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเอธิลแอซิเตต

นำสิ่งสกัดในเอธิลแอซิเตตหนัก 102.3 กรัม แยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 เซนติเมตร บรรจุด้วยซิลิกาเจล 100 กรัม ชะสารด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และค่อยๆเพิ่มเอธิลแอซิเตต และเมธานอลจนถึง 100% สามารถทำการแยกสารประกอบได้จากสิ่งสกัดในเอธิลแอซิเตตได้ 3 ชนิดคือ สาร 2 มีลักษณะข้นเหนียวโปร่งแสง แยกมาในส่วนที่ชะด้วย 30%เอธิลแอซิเตตในเฮกเซน สาร 3 มีลักษณะเหนียวโปร่งแสง แยกมาในส่วนที่ชะด้วย 30%เอธิลแอซิเตตในเฮกเซน และสาร 4 มีลักษณะเป็นมีลักษณะข้นเหนียวโปร่งแสง แยกมาในส่วนที่ชะด้วย 40%เอธิลแอซิเตตในเฮกเซน

3.5.3 การแยกสารจากสิ่งสกัดในเมธานอล

สิ่งสกัดในเมธานอลหนัก 151.1 กรัม ไม่สามารถทำการแยกได้เนื่องจากไม่ละลายในตัวทำละลาย

3.6 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

ละลายสารประกอบที่สกัดจากสมุนไพรที่ได้จากข้อ 3.4 และสารตัวอย่างอื่นๆที่ต้องการทดสอบใน 1% ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide: DMSO) ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นนี้ไม่ใช่ความเข้มข้นสุดท้าย เนื่องจากเมื่อมีการเติมสารละลายอื่นๆแล้วความเข้มข้นของสารตัวอย่างจะลดลงเหลือ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดยูริกและกราฟมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐานกรดยูริก (Uric acid) เตรียมโดยนำสารละลายกรดยูริกความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆตามตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดยูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของกรดยูริก(μM)	ปริมาณของกรดยูริก100 μM ที่ใช้ (μl)	น้ำกลั่น (μl)
Blank	0	1000
0	0	1000
10	100	900
20	200	800
30	300	700
40	400	600

นำสารละลายที่เตรียมได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดยูริกและค่าการดูดกลืนแสง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

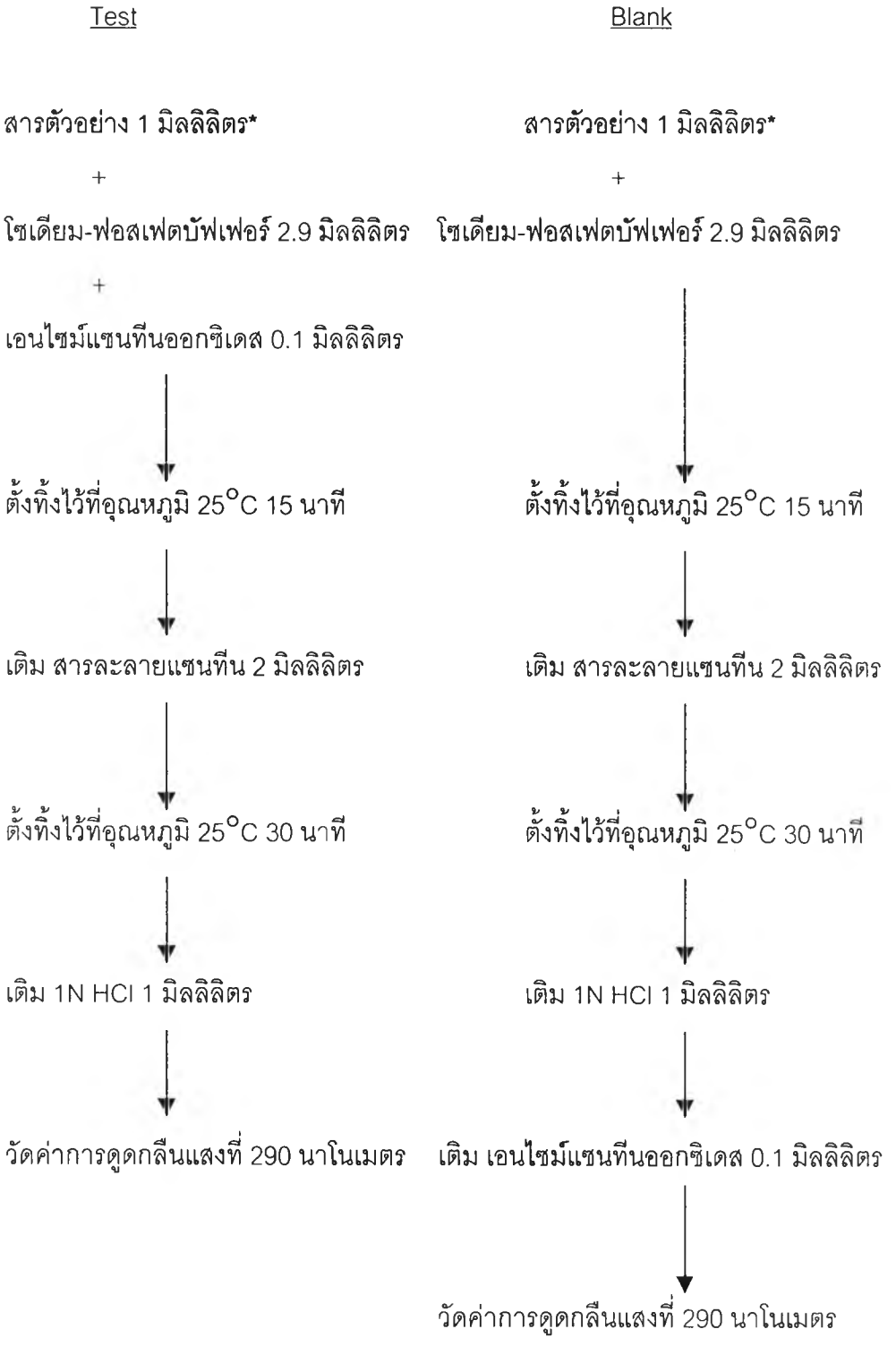
3.8 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแซนทีนออกซิเดสของสารตัวอย่าง

ทำการทดสอบตามวิธีของ Gonzalez และคณะ [31] ดังนี้ (แผนภาพที่ 4)

1. หลอด test ใส่สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.9 มิลลิลิตร ตามด้วยเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C 15 นาที เติมแซนทีน (สารตั้งต้น) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C 30 นาที เติม 1N HCl 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตร

2. หลอด blank ใส่สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C 15 นาที เติมแซนทีน(สารตั้งต้น) 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C 30 นาที เติม 1N HCl 1 มิลลิลิตร ตามด้วยเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตร

*มีหลอดที่ไม่ใส่สารตัวอย่างและ สารตัวอย่างทุกตัวทำ 2 ซ้ำแล้วนำค่าเฉลี่ยไปคำนวณเปอร์เซนต์การยับยั้งแซนทีนออกซิเดสตามวิธีในหัวข้อ 3.9



แผนภาพที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดสของสารตัวอย่าง

* ไม่ใส่สารตัวอย่างในหลอด non-test

3.9 การแปรผล

นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ มาอ่านค่าความเข้มข้นกรดยูริกจากกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแซนทีนออกซิเดส (% Inhibition) ได้ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(a-b)}{a} \times 100$$

กำหนดให้

a = ความเข้มข้นของกรดยูริกจากปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวยับยั้ง

b = ความเข้มข้นของกรดยูริกจากปฏิกิริยาที่มีตัวยับยั้ง

3.10 การหาค่า IC_{50}

เตรียมสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 100, 200, 300, 500 และ 1000 μg/ml ตามลำดับ นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดสในแต่ละความเข้มข้น คำนวณ % Inhibition เพื่อนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (แกน x) และ %Inhibition (แกน y) ลากเส้นจากแกน y ที่ความเข้มข้น 50 % ตัดเส้นกราฟและตัดแกน x จะได้ค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างนั้นๆ