วิธีการทดลอง

(Materials and Methods)

1. ต้นเปล้าน้อยที่ใช้ในการทดลอง

ต้นกล้าเปล้าน้อย จากศูนย์พัฒนาเขาหินซ้อน จังหวัดฉะเชิงเทรา นำมาปลูกในแปลงทดลอง สวนสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (สิงหาคม 2545) ต้นเปล้าน้อยถูกเก็บในรูปตัวอย่างพืช (herbarium) ณ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ต้นเปล้าน้อยได้พิสูจน์ลักษณะภายนอก และภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามที่มีรายงานของ Esser and Chayamarit (2001) และตรวจเอกลักษณ์ ด้วยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC pattern) ตามรายงานของ Vongchareonsathit and De-Eknamkul (1998)

2 สารมาตรฐาน plaunotol

สารมาตรฐาน plaunotol มีจำหน่ายในรูปแบบยาแผนปัจจุบันที่ชื่อว่า Kelnac® (Sankyo Ltd.) สารมาตรฐาน plaunotol ได้จากการสกัดสาร plaunotol ออกจากสารอื่นๆ ในแคปซูล ในหนึ่งแคปซูล Kelnac® ขนาด 230 mg ประกอบด้วย 80 mg plaunotol และ 150 mg corn oil การแยกสารมาตรฐาน plaunotol ใช้เทคนิค column chromatography บนคอลัมภ์ Silica gel G 60 ขนาด 5x13 cm (0.040-0.06 mm, 230-400 mesh, ASTM, Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain) สำหรับการแยก 1.5 g Kelnac® ใช้ตัวทำละลาย $CHCl_3$:*n*-propanol; 24:1 เก็บ fraction ที่มี plaunotol โดยใช้ Thin layer chromatography ตรวจด้วยการอังไอ-ไอโอดีน ผลการแยกจะได้สารที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดสีเหลืองอ่อนคล้ายน้ำมัน ได้ %recovery ของสาร plaunotol ประมาณ 86% สาร plaunotol ที่แยกได้นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์โดยเทคนิค GC/MS, ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR

3 การวิเคราะห์หาปริมาณ plaunotol ในใบเปล้าน้อย

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

ใช้ใบจากต้นเปล้าน้อยอายุ 6 เดือน (จำนวน 3 ต้น) เก็บใบเรียงลำดับจากยอดลงไปหาโคนกิ่ง จำนวน 10 ใบ บันทึกขนาดและรูปร่างของใบ หลังจากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 คืน บดให้ละเอียด และนำมาผ่านแร่งเบอร์ 60 ชั่งน้ำหนักผงใบ 200 mg สกัดสารด้วย absolute ethanol 10 ml ด้วยวิธี reflux ที่อุณหภูมิ 80°C นาน 1.5 ชั่วโมง กรองผ่านสำลี ปิเปตสารสกัดมา 2 ml นำไประเหยแห้งโดยใช้ Speed vacuum ละลายสารด้วย 50% ethanol 2 ml และ 10% NaOH 0.4 ml เขย่าให้เข้ากันและให้ความร้อนที่ 70°C นาน 30 นาที จากนั้นนำสารละลายมาสกัดด้วย *n*-hexane 3 ml จำนวน 3 ครั้ง เก็บชั้น *n*-hexane มาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ นำ dry residue มาละลายด้วย *n*-hexane 500 µl, centrifuge ใช้สารละลายใสเป็นตัวอย่างวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas chromatography

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ plaunotol ด้วยวิธี Gas chromatography

วิเคราะห์หาปริมาณ Plaunotol ด้วย GC ภายใต้สภาวะต่อไปนี้

Instrument model	Hewlett Packard HP6850 Series GC System
Detector	FID
Column	HP1 Methylsiloxane size 30 m, 0.32 mm x 0.25 µm Fused silica capillary

Column temperature	
Gradient	initial temp. = 235°C hold 1 min.
	Gradient 235-270 °C, 15 °C/min
	Final temp. = 270 °C hold 2.5 min
	Total time = 5.83 min.
Injector temperature	300 °C
Oven temperature	300 °C
Helium carrier gas	flow rate 20.0 ml/min
Hydrogen supply	flow rate 30.0 ml/min
Air flow	flow rate 400 ml/min
Sample size	1 µl

วิเคราะห์หาปริมาณ plaunotol โดยเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของสาร Plaunotol ที่เตรียมจากสารมาตรฐาน plaunotol (ข้อ 2) ในตัวทำละลาย n-hexane ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1.0 µg/µl สร้างเป็นกราฟมาตรฐานให้ค่า linear regression (R^2) = 0.9941

4. การแยกสาร plaunotol

ยอดเปล้าน้อยที่ผ่านการป้อนด้วยกลูโคสชนิด unlabeled, [U-^{13}C]- และ [1-^{13}C]- มาอบแห้งที่ 50°C นานประมาณ 12 ชั่วโมง สกัดสารด้วยวิธี reflux ใน methanol ที่มี 1% NaOH นาน 1 ชั่วโมง ภายหลังจากทำให้สารละลายเย็นลง จากนั้น partition ด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane นำชั้น n-hexane มาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ นำชั้น *n*-hexane มาแยกสาร plaunotol ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค column chromatography บนตัวอยู่กับที่คือ Silica gel G 60 column และตัวเคลื่อนที่เป็น $CHCl_3$:*n*-propanol อัตราส่วน 24:1 รวม fraction ที่เป็น plaunotol สารที่แยกได้ มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน นำไปพิสูจน์เอกลักษณ์วิเคราะห์โครงสร้างและรูปแบบของสารที่ติดฉลาก ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จากยอดเปล้าน้อยที่ป้อนด้วยสารละลาย 1% (w/v) unlabeled glucose ภายใต้สภาวะเดียวกัน

5. การแยกสาร Phytosterols

ขั้นตอนการแยกสาร phytosterols ทำบน Silica gel Column chromatography ซึ่งเป็นการแยกสารต่อเนื่องจากการแยกสาร plaunotol โดยรวม fractions ที่เป็น Phytosterols ภายหลังจากเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน นำมาแยกต่อบนคอลัมน์ของ Silica gel และให้ตัวเคลื่อนที่เป็น $CHCl_3$: Ethyl acetate อัตราส่วน 9:1 ภายหลังจากสารถูกชะออกจากคอลัมน์แล้ว รวม fraction ที่เป็น phytosterols โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β-sitosterol โดยเทคนิค TLC Silica gel 60 F_{254} จากนั้นนำมาระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ นำมาตกผลึก phytosterols ด้วยสารละลายผสมระหว่าง $CHCl_3$: Methanol อัตราส่วน 7:3 ล้างผลึกที่ได้ด้วย Methanol อีกครั้งหนึ่ง ผลที่ได้เป็นสารที่มีผลึกรูปเข็มสีขาว จากนั้นนำสารที่แยกมาได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างและรูปแบบของสารที่ติดฉลาก ด้วยเทคนิค NMR Spectroscopy เปรียบเทียบกับสารที่แยกได้จากยอดเปล้าน้อยที่ป้อนด้วยสารละลาย 1% (w/v) unlabeled glucose ภายใต้สภาวะเดียวกัน

6. Feeding Experiment

6.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับ Feeding experiment

เลือกยอดเปล้าน้อยที่ประกอบด้วยใบเปล้าน้อย 3-4 ใบ เป็นชิ้นส่วนสำหรับ Feeding experiment โดยเริ่มต้นป้อน 0.05% (w/v) [U-^{13}C]-glucose ใน 0.95% (w/v) unlabeled glucose โดยป้อนเป็นเวลา 0, 10 และ 15 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 25±2 $^{\circ}$C ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เก็บตัวอย่างมาเตรียมและสกัดสาร plaunotol จนบริสุทธิ์ (ข้อ 4) นำสารไปตรวจเอกลักษณ์ด้วย ^{13}C-NMR ตรวจดูความเข้มสัญญาณของคาร์บอน เมื่อบันทึกข้อมูลที่ ^{13}C-NMR parameter เหมือนกันทุกประการ

6.2 ป้อนสารติดฉลากไอโซโทปเสถียร ชนิด unlabeled, [U-^{13}C]- และ [1-^{13}C]- glucoses

ตัดยอดเปล้าน้อยที่ประกอบด้วยใบเปล้าน้อย 3-4 ใบ (ความยาวกิ่งประมาณ 10 cm) และจุ่มในสารละลายต่อไปนี้

Solution I 1%(w/v) unlabeled glucose

Solution II 0.95% (w/v) unlabeled glucose + 0.05% (w/v) [U-^{13}C] glucose (99% ^{13}C-enrichment)

Solution III 0.50% (w/v) unlabeled glucose + 0.50% (w/v) [1-^{13}C] glucose (99% ^{13}C-enrichment)

บ่มที่อุณหภูมิ 25±2 $^{\circ}$C ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยเฉือนปลายกิ่งทุกวันเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างมาเตรียมและสกัดสาร plaunotol จนบริสุทธิ์ (ข้อ 4) นำสารที่แยกได้มาวิเคราะห์รูปแบบการติดฉลากด้วย ^{13}C NMR spectroscopy

7. การวิเคราะห์รูปแบบการติดฉลาก ^{13}C- (Determination of ^{13}C labeling pattern)

^{1}H และ ^{13}C-NMR spectra ชนิด one-dimensional และชนิด two-dimensional (HMBC, HMQC) วิเคราะห์ที่ 500 MHz และ 125 MHz ตามลำดับ โดยเครื่อง Varian INOVA-500 spectrometer

วิเคราะห์รูปแบบการติดฉลาก (^{13}C labeling pattern)(Goese et al. 1999, Fellermeier et al. 2001) ของสารที่ทดลองป้อน [1-^{13}C]- glucose เปรียบเทียบกับสารที่มีอยู่ในธรรมชาติ (Natural abundance material, 1.1%) ที่บันทึกภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน บันทึกสัญญาณ ^{13}C-signals และ integrate สัญญาณ ของแต่ละ carbon atom โดยเปรียบเทียบกับสัญญาณที่ได้จากสารที่มีอยู่ในธรรมชาติ ค่าที่ได้คำนวณเป็นค่า Relative ^{13}C abundance ของแต่ละตำแหน่งของโมเลกุลที่มีสารติดฉลากอยู่ สำหรับตัวอย่างที่ป้อนด้วย [U-^{13}C] glucose แสดงในรูป ^{13}C^{13}C couplings integrate แต่ละสัญญาณ satellite คำนวณคู่สัญญาณของ satellite signal เทียบกับ total signal integral ของแต่ละคาร์บอน

$$\text{Relative } ^{13}\text{C abundance} = \frac{^{c}I_{s}}{^{c}I_{n}}$$

$^{c}I_{s}$ = ^{13}C-intensities of expected isotopomer in ^{13}C-spectrum

$^{c}I_{n}$ = ^{13}C-intensities of natural abundance material in ^{13}C-spectrum