

1.3 วิธีการวิจัย

1.3.1 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. จุดหลอมเหลว (melting point)

จุดหลอมเหลวของสารวัดด้วยเครื่อง Electrothermal melting point apparatus หน่วยเป็นองศาเซลเซียส (°C)

2. สเปกตรัม

- Ultraviolet (UV) Spectrum

บันทึกด้วยเครื่อง UV-160A Spectrometer (SHIMADZU) หน่วยความยาวคลื่นเป็น nanometre (nm) โดยที่ λ_{\max} แทนค่าที่สารดูดกลืนแสงได้มากที่สุด

- Infrared (IR) Spectrum

บันทึกด้วยเครื่อง PERKIN - ELMER IR 783 มีหน่วยเป็น wave number (cm^{-1})

- Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrum

บันทึกด้วยเครื่อง JEOL-PM_x 60 ที่ 60 MHz และ JNM-A500 ที่ 500 MHz โดยใช้ tetramethylsilane (TMS) เป็นสารอ้างอิงบอกตำแหน่งสัญญาณเรโซแนนซ์ (resonance signal) ด้วยสัญญาณของ Chemical Shift Parameter (δ ppm) ลักษณะสัญญาณแทนค่า s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet) และ br (broad)

3. คอลัมน์โครมาโทกราฟี

คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบธรรมดา ใช้ซิลิกาเจล (silica gel) ชนิด 100 (70 x 230 Mesh) ของ Merck เป็นตัวดูดซับ

คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว, คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง ใช้ซิลิกาเจล ชนิด 60 GF 254 Art. 77301 เป็นตัวดูดซับ

คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin-Layer Chromatography : TLC) ใช้ซิลิกาเจลชนิดเดียวกับคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว อัตราส่วนของซิลิกาเจล ต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 กรัม ต่อ 2 มิลลิลิตร

4. สารเคมี

ตัวทำละลาย (solvents) ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น และเก็บที่จุดเดือดของตัวทำละลายนั้น ๆ ก่อนที่จะนำมาใช้

1.3.2 วิธีดำเนินการ

1.3.2.1 การสกัดและแยกสารจากต้นกระชายหลังง (Elettariopsis spp.)

นำส่วนรากต้นกระชายหลังง (*Elettariopsis spp.*) ที่ตากแห้งแล้วที่อุณหภูมิห้องมาสับให้ละเอียด จำนวน 1,750 กรัม สกัดด้วยตัวทำละลายเมธานอล (12 ลิตร) เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองและระเหยเมธานอลออก ได้สารผสมเหนียวสีน้ำตาลเข้ม (46.33 กรัม)

แบ่งสารผสมสีน้ำตาลเข้มออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 (9.62 กรัม) นำไปทดสอบทางด้านเภสัชวิทยา สำหรับส่วนที่ 2 (36.71 กรัม) นำมาสกัดด้วยเอธิลอะซิเตต (200 มิลลิลิตร x 4 ครั้ง) ได้ส่วนสกัดเอธิลอะซิเตต และสารผสมเหนียวสีน้ำตาลเข้ม (23.45 กรัม)

1.3.2.2 การแยกสารเคมีจากส่วนสกัดเอธิลอะซิเตต

นำส่วนสกัดเอธิลอะซิเตต มาระเหยเอธิลอะซิเตตออกจนหมด ได้สารผสมสีน้ำตาลแดง (10.38 กรัม) แล้วแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ใช้ซิลิกาเจล (silica gel) เป็นตัวดูดซับ ะคอลัมน์ด้วย เฮกเซน, เฮกเซน - เมธิลีนคลอไรด์, เมธิลีนคลอไรด์, เมธิลีนคลอไรด์ - เอธิลอะซิเตต, เอธิลอะซิเตต, เอธิลอะซิเตต - เมธานอล และเมธานอลตามลำดับ จากการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง พบว่ามีปัญหาในการทำสารให้บริสุทธิ์ และสารมีปริมาณน้อย สารส่วนใหญ่เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง x-ray พบว่าเป็นสารประเภทเกลือ

1.3.2.3 การแยกสารเคมีจากส่วนสกัดเมธานอล

นำสารผสมหนืดสีน้ำตาลเข้ม (23.45 กรัม) มาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ใช้ซิลิกาเจล (silica gel) เป็นตัวดูดซับ ะคอลลัมน์ด้วย เฮกเซน, เฮกเซน - เมธิลีน - คลอไรด์, เมธิลีนคลอไรด์, เมธิลีนคลอไรด์ - เอธิลอะซิเตต, เอธิลอะซิเตต, เอธิลอะซิเตต - เมธานอล และเมธานอลตามลำดับ ตรวจสอบส่วนที่ชะด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง รวมส่วนที่คล้ายกันเข้าด้วยกันได้ส่วนต่าง ๆ ดังแสดงตาราง

ส่วนที่	ตัวทำละลาย	อัตราส่วน	ลักษณะสารที่ได้
1	เฮกเซน	100	สีน้ำตาลเข้ม
2	เฮกเซน-เมธิลีนคลอไรด์	80 : 20	สีน้ำตาลอมเหลือง
3	เฮกเซน-เมธิลีนคลอไรด์	50 : 50	สีน้ำตาลอ่อน
4	เมธิลีนคลอไรด์	100	สีเหลืองอมน้ำตาล
5	เมธิลีนคลอไรด์-เอธิลอะซิเตต	80 : 20	สีน้ำตาลเข้ม
6	เอธิลอะซิเตต	100	สีน้ำตาลอมเหลือง
7	เอธิลอะซิเตต- เมธานอล	60 : 40	สีน้ำตาลเข้ม
8	เมธานอล	100	สีเหลืองอมน้ำตาล

ส่วนที่ 1- 4 จากข้อมูล NMR spectrum ปรากฏว่าสารส่วนใหญ่ไม่น่าสนใจจึงไม่ได้นำมาศึกษาต่อ

ส่วนที่ 5 เมื่อนำมาระเหยเอาตัวทำละลายออก จะได้ของแข็งสีขาวเกิดขึ้น ละลายน้ำได้ดี เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง x-ray พบว่าเป็นสารประเภทเกลือ เมื่อนำไปแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ะคอลลัมน์ด้วย เฮกเซน, เฮกเซน - เมธิลีนคลอไรด์, เมธิลีนคลอไรด์ เมธิลีนคลอไรด์ - เมธานอล และเมธานอล ตามลำดับ จากการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง พบว่ามีสารมีความเป็นขั้วสูง ไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้

ส่วนที่ 6 เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ของหนืดสีน้ำตาล นำไปแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ะคอลลัมน์ด้วย เฮกเซน, เฮกเซน - เมธิลีนคลอไรด์, เมธิลีนคลอไรด์ เมธิลีนคลอไรด์ - เมธานอล, และเมธานอล ตามลำดับ จากการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง และ NMR spectrum พบว่ามีสารที่น่าสนใจ แต่เนื่องจากสารมีความเป็นขั้วสูง ไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้

ส่วนที่ 7 เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ของหนืดสีน้ำตาลเข้ม นำไปแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ๒ ขั้นตอนด้วย เฮกเซน, เฮกเซน - เมธิลคลอไรด์, เมธิลคลอไรด์, เมธิลคลอไรด์ - เมทานอล และเมทานอล ตามลำดับ จากการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง และจากข้อมูล NMR spectrum พบว่ามีสารที่น่าสนใจ แต่เนื่องจากสารมีความเป็นขี้สูง ไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้

ส่วนที่ 8 เมื่อระเหยเอาตัวทำละลายออก ได้ของหนืดสีน้ำตาลอมเหลือง นำไปแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ๒ ขั้นตอนด้วย เฮกเซน, เฮกเซน - เมธิลคลอไรด์, เมธิลคลอไรด์, เมธิลคลอไรด์ - เมทานอล และเมทานอลตามลำดับ จากการตรวจสอบด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง และจากข้อมูล NMR spectrum พบว่ามีสารที่น่าสนใจ แต่เนื่องจากสารมีความเป็นขี้สูง ไม่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ได้