บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาวิธีการสกัดแยกและการตรวจเอกลักษณ์สารไดเทอร์พีนอยด์จากต้นฟ้าทะลายโจร ใช้สารตัวอย่าง สารเคมีและเครื่องมือดังนี้

1. สารตัวอย่าง: ใบและส่วนที่อยู่เหนือดินของฟ้าทะลายโจรซึ่งผ่านการอบแห้งแล้ว
2. สารเคมี:
    - Absolute ethanol (AR; Merck KGaA, Germany; 100983)
    - Chloroform (AR; Fisher Scientific UK Limited, England; C/4900/17)
    - Ethyl acetate (AR; J.T.Baker, USA; 9280-03)
    - Methanol (AR; Merck KGaA, Germany; 106009)
    - Hexane (AR; BDH Laboratory, England; 28483)
    - 3,5 Dinitrobenzoic acid (Sigma Chemical Co., USA; D-4766)
    - Potassium hydroxide (APS Fine Chem, Australia; 090999)
    - Andrographolide (Aldrich®, USA; 36564-5)
    - Silica gel 60 for column chromatography (40-63 µm; Merck KGaA, Germany; 109385)
    - Silica gel 60 F_{254} pre-coated plates (aluminium sheets; Merck KGaA, Germany; 105554)
3. เครื่องมือ
    - Rotary evaporator (Buechi, Switzerland ประกอบด้วย Heating mantle B-490, Rotavapor R-205, Vacuum controller V-800, Vacuum pump V-500)
    - Fraction collector (Retriever IV, Isco Inc., USA)
    - Melting point apparatus (Electrothermal IA 9200, USA)
    - UV/ VIS Spectrophotometer (Jasco, V-530, USA)
    - Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectrometer (JNM-A500, Japan)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารตัวอย่าง (Starting material for extraction)

1.1 เอาดินและสิ่งเจือปนออกจากใบและส่วนที่อยู่เหนือดินของฟ้าทะลายโจรซึ่งผ่านการอบแห้งแล้ว

1.2 นำฟ้าทะลายโจรที่ปราศจากสิ่งเจือปนแล้วมาบดด้วยเครื่องบด

2. การสกัดแยกสารไดเทอร์พีนอยด์ (Extraction and isolation of diterpene lactones)

2.1 การสกัดแยก andrographolide

2.1.1 หมักผงฟ้าทะลายโจรแห้ง 1 กิโลกรัม ด้วย ethanol (3 ครั้ง, ปริมาณ ethanol ที่ใช้ในการหมักแต่ละครั้งจะเติมลงไปจนท่วมผงยาและอยู่เหนือผงยาประมาณ 2 นิ้ว)

2.1.2 รวมน้ำยาสกัดที่ได้จากข้อ 2.1.1 กรองผ่าน buchner funnel

2.1.3 ระเหย ethanol ออกจากน้ำยาสกัด ณ อุณหภูมิ 45°C ภายใต้ภาวะลดความดันโดยใช้ rotary evaporator

2.1.4 นำน้ำยาสกัดที่ได้จากข้อ 2.1.3 มาเจือจางด้วยน้ำและนำไป partition ด้วย hexane และ ethyl acetate ตามลำดับ

ตรวจสอบว่ามี andrographolide ในส่วนใด ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) บนแผ่น silica gel GF_{254} [Developing Solvent System (DVS) คือ chloroform : absolute ethanol = 85 : 15] โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®)andrographolide จะ quenching ภายใต้แสง UV 254 nm และให้สีม่วงคล้ำ (dark violet) เมื่อสเปรย์ด้วย Kedde reagent [Solution A: 2% ของ 3,5-dinitrobenzoic acid ใน methanol; Solution B: 5.7% ของ potassium hydroxide ใน methanol] พบว่า andrographolide อยู่ในชั้น ethyl acetate

2.1.5 นำน้ำยาสกัดชั้น ethyl acetate มาแยก andrographolide ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ โดยใช้ column chromatography (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 3.5 ซม. ความยาว 90 ซม.) ซึ่งบรรจุ silica gel 60 ใน chloroform (สูงประมาณ 78 ซม.) จากนั้นค่อยๆ เพิ่มความมีขั้ว (polarity) ของสารละลายโดยใช้ methanol จนกระทั่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายผสม

chloroform : methanol = 85:15 เก็บ fraction (~ 8 ml) โดยใช้ fraction collector (การเพิ่มความมีขั้วของ solvent system จะกระทำเมื่อ TLC fingerprint ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงต้องเพิ่มความมีขั้วให้สารที่มีขั้วสูงถูกชะออกมา)

ตรวจสอบว่ามี andrographolide ในส่วนใด ด้วยวิธี TLC (รายละเอียดในข้อ 2.1.4)

2.1.6 นำ andrographolide fraction ที่ได้จากข้อ 2.1.5 มาแยกองค์ประกอบอื่นๆ ออกไปโดยใช้ column chromatography (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 2.5 ซม. ความยาว 90 ซม.) ซึ่งบรรจุ silica gel 60 ในสารละลายผสม chloroform : methanol = 85:15 (สูงประมาณ 60 ซม.) เก็บ fraction (~6 ml) โดยใช้ fraction collector

ตรวจสอบว่ามี andrographolide ในส่วนใด ด้วยวิธี TLC (รายละเอียดในข้อ 2.1.4)

2.1.7 นำสารละลายส่วนที่มี andrographolide มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยวิธีตกผลึก

2.1.8 ผลึกของ andrographolide ที่ได้จากข้อ 2.1.7 ยังไม่บริสุทธิ์ ให้ตกผลึกใหม่ด้วย hexane ผลึกที่ได้จะมีสีขาวรูป plate

2.2 **การสกัดแยก neoandrographolide**

2.2.1 นำน้ำยาสกัด hexane และ ethyl acetate ที่ได้จากข้อ 2.1.4 มาตรวจสอบว่ามี neoandrographolide หรือไม่ ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) บนแผ่น silica gel GF_{254} [Developing Solvent System (DVS) คือ chloroform : absolute ethanol = 85 : 15] โดยเปรียบเทียบกับค่า hR, ของ neoandrographolide ใน Thai Herbal Pharmacopoeia (Vol. I. 1995: 30) หลังสเปรย์ด้วย Kedde reagent [Solution A: 2% ของ 3,5-dinitrobenzoic acid ใน methanol; Solution B: 5.7% ของ potassium hydroxide ใน methanol] ให้สีม่วงคล้ำ (dark violet) พบว่า neoandrographolide อยู่ในน้ำยาสกัด ethyl acetate

2.2.2 นำน้ำยาสกัดขั้น ethyl acetate มาแยก neoandrographolide ออกจากองค์ประกอบอื่นๆ โดยใช้ column chromatography (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 3.5 นิ้ว ความยาว 90 ซม.) ซึ่งบรรจุ silica gel 60 ใน chloroform (สูงประมาณ 78 ซม.) จากนั้นค่อยๆ เพิ่มความมีขั้ว (polarity) ของสารละลายโดยใช้ methanol จนกระทั่งความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายผสม chloroform : methanol = 85:15 เก็บ fraction (~8 ml) โดยใช้ fraction collector (การเพิ่มความมีขั้วของ solvent system จะกระทำเมื่อ TLC fingerprint ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงต้องเพิ่มความมีขั้วให้สารที่มีขั้วสูงลูกชะออกมา)

ตรวจสอบดูว่ามี neoandrographolide ใน fraction ใดด้วยวิธี TLC (รายละเอียดในข้อ 2.2.1)

2.2.3 นำ fraction ที่มี neoandrographolide (จากข้อ 2.2.2) มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยวิธี column chromatography (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 2.5 นิ้ว ความยาว 90 ซม.) ซึ่งบรรจุ silica gel 60 ในสารละลายผสม chloroform : methanol = 80:20 (สูงประมาณ 60 ซม.) เก็บ fraction (~6 ml) โดยใช้ fraction collector ตรวจสอบว่ามี neoandrographolide ใน fraction ใดด้วยวิธี TLC (รายละเอียดในข้อ 2.2.1)

2.2.4 นำ fraction ที่มี neoandrographolide (จากข้อ 2.2.3) มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยวิธีตกผลึกด้วยด้วย chloroform และ hexane ผลึกที่ได้จะมีสีขาวรูปเข็ม

2.3 การตรวจเอกลักษณ์ andrographolide

นำผลึก andrographolide ที่แยกได้ ไปตรวจเอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน andrographolide (Aldrich®) ด้วยวิธี

2.3.1 วัด melting point

2.3.2 วัดการดูดกลืนแสง UV

2.3.3 Thin Layer Chromatography (TLC) บนแผ่น silica gel GF_{254} ใช้ Developing Solvent System (DVS) 3 systems ดังนี้

1. chloroform : absolute ethanol = 85 : 15

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

2. acetone : methanol = 90:10

3. n-butanol : ethyl acetate = 20 : 80

จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV 254 nm และสเปรย์ด้วย Kedde reagent

2.3.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เปรียบเทียบกับสารสังเคราะห์ andrographolide (Aldrich®) โดยใช้สภาวะดังนี้

Column : Reversed Phases-18, Luna® (10 µm), 4.6 mm I.D. x 25 cm.

Mobile Phase : 1. MeOH : H_2O = 80 : 20

2. MeOH : H_2O = 70 : 30

3. MeOH : H_2O = 60 : 40

Flow rate : 1 ml/min

Detector : 255 nm

2.4 **การตรวจเอกลักษณ์ neoandrographolide**

นำผลึก neoandrographolide ที่แยกได้ไปตรวจเอกลักษณ์โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงด้วยวิธี

2.4.1 วัด melting point

2.4.2 วัดการดูดกลืนแสง UV

2.4.3 Thin Layer Chromatography (TLC) บนแผ่น silica gel GF_{254} ใช้ Developing Solvent System (DVS) 3 systems ดังนี้

1. chloroform : absolute ethanol = 85 : 15
2. chloroform : methanol = 7 : 1
3. n-butanol : ethyl acetate = 20 : 80

2.4.4 1D- / 2D-^{1}H Nuclear Magnetic Resonance (1D- / 2D-^{1}H NMR) โดยใช้ CD_3OD เป็นสารละลาย สูตรโครงสร้างและลำดับการเชื่อมต่อของแต่ละส่วนของโมเลกุล neoandrographolide ทำนายได้จาก 1D และ 2D (COSY) ^{1}H-NMR Spectra