

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และ สารเคมี ที่ใช้ในงานวิจัย

##### 3.1.1 เครื่องมือ

1. คอลัมน์สำหรับทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร)
2. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Bartorius BL210 s
3. ตู้อบ (Oven) memmert D 06062
4. โถดูดความชื้น (Desicator)
5. เครื่องระเหยแห้ง (Rotary evaporator) Buchi R-124
6. UV-lamp
7. ปั่นลม
8. NMR Varian Mercury Plus 400 Spectrometer (ส่งไปวิเคราะห์ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น)
9. Spectrum 2000 FT-IR spectrophotometers
10. ชุดหาจุดหลอมเหลว

##### 3.1.2 อุปกรณ์

1. แผ่นฟิล์มเยอร์โครมาโทกราฟี
2. บีกเกอร์ ขนาด 100, 250 มิลลิลิตร
3. ขวดรูปขมพู ขนาด 125, 25 มิลลิลิตร
4. แท่งแก้ว
5. ช้อนตักสาร
6. ปิเปต
7. สำลี
8. กระจกนาฬิกา

### 3.1.3 สารเคมี

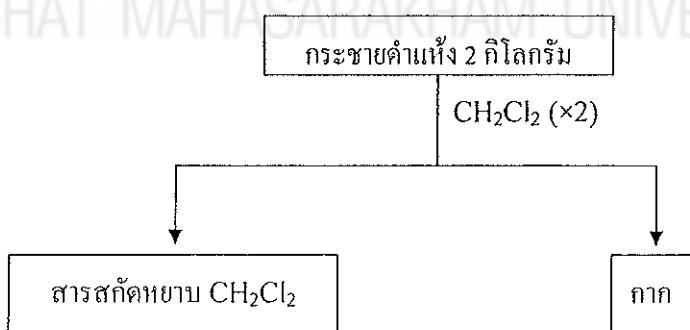
1. Hexane ( $C_6H_{14}$ )
2. Dichloromethane ( $CH_2Cl_2$ )
3. Ethyl acetate (EtOAc)
4. Methanol (MeOH)
5. Sodium sulphate anhydrous ( $Na_2SO_4$ )
6. Silica gel 60

### 3.2 ขั้นตอนการทดลอง

1. นำส่วนของหัวหรือหางกระชายดำแห้งที่บดละเอียดน้ำหนัก 2 กิโลกรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลาย  $CH_2Cl_2$
2. แยกสารที่สกัดได้จากกระชายดำ ด้วยวิธีคอตมันน์โครมาโทกราฟี
3. ตกผลึกสารที่แยกได้
4. พิสูจน์โครงสร้างของสารที่แยกได้โดยวิธีทางสเปคโทรสโกปี (FT-IR,  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR)

### 3.3 วิธีการสกัด

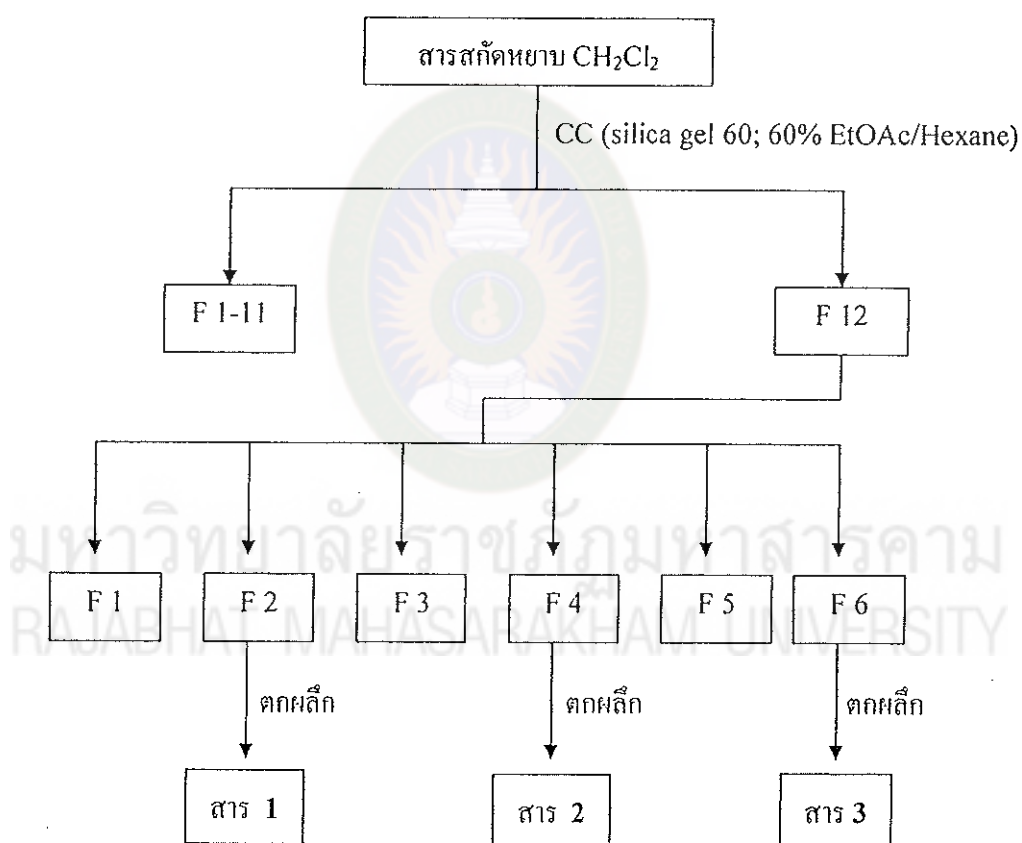
นำส่วนของหัวหรือหางกระชายดำที่แห้งและบดละเอียดแล้วมาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์  $CH_2Cl_2$  2 ครั้ง ครั้งละ 3 ลิตร ระยะเวลาที่ทำการสกัดออกจะได้อส่วนสกัดหยาบ  $CH_2Cl_2$  โดยมีน้ำหนักเป็น 268 กรัม



รูปที่ 3.1 การสกัดสารจากกระชายดำ

### 3.4 การแยกสารให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบ  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  จำนวน 30 กรัม มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์จากขั้วต่ำแล้วเพิ่มขั้วให้สูงขึ้นโดยเริ่มจากตัวทำละลาย 2 % EtOAc/Hexane เก็บ fraction ครั้งละ 75 มิลลิลิตร จากนั้นรวม fraction คล้ายกันตามลักษณะของ TLC ได้สาร 12 fraction และนำ fraction 12 จำนวน 4.07 กรัม มาแยกโดยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ โดยเริ่มจากตัวทำละลาย 50% EtOAc/Hexane เก็บ fraction คล้ายกันตามลักษณะของ TLC ได้สารทั้งหมด 6 fraction ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 การแยกสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน

นำสารใน fraction ที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลืองอ่อน ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกซ้ำด้วย EtOAc และ Hexane ได้สาร 1 fraction ที่ 4 ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาวใส ทำให้

บริสุทธิ์โดยการตกผลึกซ้ำด้วย EtOAc และ Hexane ได้สาร 2 และนำ fraction ที่ 6 ที่มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว ตกผลึกซ้ำด้วย EtOAc และ Hexane ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกด้วย EtOAc และ Hexane ได้สาร 3

ตารางที่ 3.1 การแยกสารสกัดของกระชายดำจาก fraction ที่ 12 ของกระชายดำ

ตัวชะ	flask ย่อย	Fraction (F)	ลักษณะสาร
50% EtOAc/Hexane	1-31	12.1	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
60% EtOAc/Hexane	32-55	12.2	ผลึกสีขาวใส
60% EtOAc/Hexane	56-59	12.3	ของแข็งสีเหลืองอ่อน
60% EtOAc/Hexane	60-68	12.4	ผลึกสีขาวใส
60% EtOAc/Hexane	69	12.5	ของแข็งสีขาว
60% EtOAc/Hexane	70-94	12.6	ผลึกสีขาวใส