บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้แก่ ใบและรากกระพังโหม ซึ่งเก็บมาจากบ้านโคกสี ตำบลหนองปลิง อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม

ภาพที่ 3 ตัวอย่างใบและรากกระพังโหมที่ใช้ในการทดลอง

3.1.2 วัสดุสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ประกอบด้วย

1) เอทานอล (absolute ethanol)
2) สารละลายโฟลิน (Folin-Ciocalteu reagent)
3) โซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3.10H_2O$)
4) 1,1-ไดฟีนิล-2- พิคริลไฮดราซิล (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)
5) เฟอรัสซัลเฟตแอนไฮดรัส ($FeSO_4$)
6) เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)
7) 2,4,6-ไตร-(2-ไพริดิล)-เอส-ไตรอะซีน (2,4,6-tri-(2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ)
8) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% (HCl)
9) โซเดียมแอซีเตต ($CH_3COONa.3H_2O$)
10) กรดแอซีติก (CH_3COOH)
11) โพแทสเซียมไทไอซัลเฟต ($K_2S_2O_8$)
12) กรดแกลลิก (gallic acid)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

13) 2, 2'-azobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)

14) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)

3.1.3 อุปกรณ์เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วย

1) บีกเกอร์

2) ขวดรูปชมพู่

3) หลอดทดลอง

4) ขวดวัดปริมาตร

5) แท่งแก้วคน

6) ปิเปตต์

3.2 เครื่องมือที่ใช้

3.2.1 เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่นแลมบ์ดา 14 บริษัทเพอร์กิน เอลเมอร์

3.2.2 เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน (rotary evaporator) รุ่น 214

3.2.3 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freezing drier) ยี่ห้อ Fexi dry

3.2.4 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Memmert

3.2.5 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker)

3.3 การเตรียมตัวอย่างและการหาความชื้น

3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างกระพังโหมมาแยกส่วนใบออกมาล้างด้วยน้ำ ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ลดขนาดลงโดยการหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ส่วนรากกระพังโหมลอกเปลือกออก ล้างทำความสะอาด แยกเอาส่วนที่เป็นแกนกลางของรากออกไป หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ หลังจากนั้นผึ่งลมให้แห้งประมาณ 1 วัน นำตัวอย่างไปหาความชื้นและนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีการต่างกัน

3.3.2 การหาความชื้นและการเตรียมตัวอย่างแห้ง

นำตัวอย่างใบและรากกระพังโหม ชนิดละ 5 กรัม นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ และนำไปคำนวณหาปริมาณความชื้นในตัวอย่าง (ทำชนิดละ 3 ซ้ำ) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างสดก่อนอบ}} \times 100$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ NAKHONSAWAN RAJABHAT UNIVERSITY

1) ตัวอย่างใบและรากกระพังโหมผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง (สัญลักษณ์แทนด้วย L และ R)

นำตัวอย่างใบและรากกระพังโหมสด ไปผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ 1 คืน หลังจากนั้นนำไปบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 500 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างไว้ในภาชนะปิดสนิท รอการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

2) ตัวอย่างใบและรากที่ผ่านการอบแห้งด้วยลมร้อน (ใช้สัญลักษณ์แทนด้วย LH และ RH)

นำใบและรากกระพังโหมสด ชนิดละ 250 กรัม ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในตู้อบลมร้อน นาน 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นบดตัวอย่างและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 500 ไมโครเมตร เก็บไว้ในภาชนะปิดสนิท เพื่อรอการวิเคราะห์ในขั้นตอนการสกัดต่อไป

3) ตัวอย่างใบและรากที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ใช้สัญลักษณ์แทนด้วย LF และ RF)

นำใบและรากกระพังโหมสด ชนิดละ 250 กรัมไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งโดยการระเหิดด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง หลังจากนั้นบดตัวอย่างให้มีขนาดเล็กลงแล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 500 ไมโครเมตร เก็บไว้ในภาชนะปิดสนิท เพื่อรอการวิเคราะห์ในขั้นตอนการสกัดต่อไป

3.4 ขั้นตอนการสกัดและการหาปริมาณร้อยละของผลผลิตที่ได้ (Yield)

ในการสกัดตัวอย่างจะใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 2 ชนิด คือ น้ำ และสารละลาย 70% เอทานอล โดยใช้อัตราส่วนของสารตัวอย่างต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยมีขั้นตอนการสกัดดังนี้

3.4.1 นำตัวอย่างใบและรากกระพังโหมทั้ง 6 ชนิด ซึ่งประกอบด้วย

1) ใบผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง (L)
2) ใบที่อบแห้งด้วยลมร้อน (LH)
3) ใบที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (LF)
4) รากผึ่งลมที่อุณหภูมิห้อง (R)
5) รากที่อบแห้งด้วยลมร้อน (RH)
6) รากที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (RF)

ชั่งตัวอย่างชนิดละ 5.0 กรัม (ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง)ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ชนิดละ 2 ใบ เติมตัวทำละลาย คือ น้ำ และสารละลาย 70% เอทานอล ลงในขวดแต่ละใบ โดยแยกสกัดแต่ละชนิด โดยใช้ปริมาตรตัวทำละลาย 50 มิลลิลิตร

3.4.2 ทำการสกัดตัวอย่างแต่ละชนิดในตัวทำละลายทั้งสองส่วน โดยการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำมากรองผ่านกรวยกรองบุชเนอร์ นำส่วนที่กรองได้ไประเหยแยกตัวทำละลายออกโดยเครื่องกลั่นแบบลดความดัน แล้วนำไปทำให้แห้งโดยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง จะได้สารสกัดหยาบ (crude extract) หลังจากนั้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง นำไปคำนวณหาร้อยละผลผลิตที่ได้ (percentage yield) ในแต่ละส่วน โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละผลผลิตที่ได้} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด}}{\text{น้ำหนักสารตัวอย่าง}} \times 100$$

3.5 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจะดัดแปลงจากวิธีของ Fang et al. (2009) โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน และรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างหนัก 1 กรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g dry weight) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.5.1 การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.1000 กรัม ละลายใน 95% เอทานอล แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร เก็บไว้เป็น stock standard solution

2) เจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 20 -100 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวนชนิดละ 25 มิลลิลิตร โดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก stock standard solution มาจำนวน 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วย 95% เอทานอล จะได้สารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิก ที่จะนำไปใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve)

3) ปิเปตสารละลายมาตรฐานแกลลิก แต่ละความเข้มข้นในข้อ 2) จำนวน 0.2 มิลลิลิตร หรือ (200 ไมโครลิตร) ผสมกับสารละลายโฟลิน จำนวน 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (20 % w/v) จำนวน 0.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลานาน 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

4) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกกับค่าการดูดกลืนแสง

3.5.2 การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content, TPC) ในสารสกัด

1) เตรียมสารละลายของสารสกัดแต่ละชนิด ในช่วงความเข้มข้น 2-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดในแต่ในส่วนที่ได้จากข้อ 3.4 ชนิดละ 0.01- 0.05 กรัม ละลายในตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด จำนวน 5 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2) ปิเปตสารละลายของสารสกัดแต่ละชนิด จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายโฟลิน จำนวน 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20% ลงไปจำนวน 0.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรทุกหลอดให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3) คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดแต่ละส่วน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (ความเข้มข้นในช่วง 20 – 100 มิลลิกรัมต่อลิตร) และรายงานผลปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเป็น มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อตัวอย่างหนัก 1 กรัมน้ำหนักแห้ง (mg GAE/g dry weight)

3.6 การหาฤทธิ์การต้านการเกิดออกซิเดชัน

ในการทดสอบฤทธิ์การต้านการเกิดออกซิเดชันของสารสกัดในแต่ละตัวอย่างจะใช้วิธีการจับอนุมูลอิสระและวิธีวัดความสามารถในการรีดิวซ์

3.6.1 ทดสอบการยับยั้งอนุมูลอิสระ 1,1,-ไดฟีนิล-2- พิคริลไฮดราซิล (DPPH Method)

การหากิจกรรมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและรากกระพังโหมในแต่ละส่วน โดยพิจารณาจากการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งมีสีม่วง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Brand-William et al. (1995) และรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH หรือเทียบเป็นปริมาณสมมูลของสาร Trolox (ไมโครโมล TE ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมของตัวอย่าง) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ปิเปตสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง และ 95% เอทานอล (แบลงค์) ชนิดละ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมล จำนวน 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3) รายงานผลการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เทียบกับสารละลาย Trolox

4) คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH โดยเทียบกับสารละลายบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (BHT) หรือสารละลาย Trolox โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%\text{ การยับยั้ง} = \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} \times 100$$

เมื่อ A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของแบลงค์ (เอทานอล + DPPH)

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง (สารสกัด + DPPH)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม วิทยานิพนธ์ งานวิจัย

3.6.2 การยับยั้งการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^+$

การหากิจกรรมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและรากกระพังโหมในแต่ละส่วน โดยพิจารณาจากการยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ ซึ่งมีสีเขียว โดยดัดแปลงจากวิธีของ Re et al. (1999) โดยรายงานผลเป็นปริมาณสมมูลของสาร Trolox (ไมโครโมล TE ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมของตัวอย่าง) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) ปีเปตสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 0.2 -1.0 mM ชนิดละ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย $ABTS^+$ 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตร์

3) คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ โดยเทียบกับสารละลาย Trolox และรายงานผลเป็นปริมาณสมมูลของสาร Trolox (ไมโครโมล TE ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมของตัวอย่าง)

3.6.3 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP Method)

วิธีนี้เป็นวิธีวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดตัวอย่าง โดยดัดแปลงจากวิธีของ Benzie and Strain (1996) โดยมีขั้นตอนทดลองดังนี้

1) ปีเปตสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต ความเข้มข้น 0.2 – 1.0 mM ชนิดละ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

3) คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน โดยเทียบกับสารละลายเฟอรัสซัลเฟต รายงานผลในรูปของ ไมโครโมลเฟอรัสซัลเฟตต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมของตัวอย่าง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดลองจะทำการสกัดตัวอย่างชนิดละ 3 ซ้ำ ข้อมูลปริมาณความชื้น ปริมาณร้อยละของสารสกัดที่ได้ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH , $ABTS^+$ และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน จะรายงานในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญ $p \leq .05$ หาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน