

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. Spectronic20+
2. cuvette, pathlength 1 cm
3. ตู้อบ
4. burette 50 mL
5. pipette 0.1, 5 และ 10 mL
6. โกร่งบดยา
7. beaker 25, 100 และ 250 mL
8. Whatman no. 1
9. Microfibre filter glass (Whatman no. 1822 090)
10. dropper and bubble
11. parafilm
12. stirrer and magnetic bar
13. graduate cylinder 50 และ 250 mL
14. stirring rod
15. volumetric flask 25, 50, 100 และ 250 mL
16. glass funnel
17. base and stand
18. watch glass
19. wash bottle
20. digital balance
21. สำลี

3.2 สารเคมี

1. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, assay 90%) จาก Sigma Chemical Co.)
2. Methanol (เกรดอุตสาหกรรมนำมากลั่นที่ 66 – 67 °C ก่อนนำไปใช้)
3. น้ำกลั่น

4. Folin – Ciocalteu reagent (Fluka Chemical)
5. Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Reidel – dettaën and Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.)
6. gallic acid (Fluka Chemical)
7. ascorbic acid (vitamin C) (Reidel – dettaën and Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.)

3.3 สารตัวอย่าง

1. ใบหูกวาง (เก็บในช่วงเดือน มค-กพ)
2. ใบต้นหยง
3. ใบปอบิด
4. ใบส้มกุ้งขน
5. ใบหว่า

ข้อ 2-5 ได้จากสวนสมุนไพรสิริรุกษชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (ศาลายา)

3.4 การเตรียมสารสกัด

นำใบพืชสารตัวอย่างสดมาบดด้วยโกร่งให้ละเอียด ชั่งสารตัวอย่าง 1.00 g เติม 80%, MeOH (aqueous) 20 mL นำของผสมไปคนด้วยเครื่องคน (stirrer) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 - 30 นาที นำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman no.1001 110) ล้างตะกอนด้วย 80%, MeOH ปริมาตรเป็น 25 mL จะได้ความเข้มข้นประมาณ 40,000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ นำไปเตรียมเป็น stock solution เท่ากับ 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (ดัดแปลงจาก Han *et al.*, 2004 and Georgé S, 2005)

3.5 การเตรียมสารละลาย 1,000 μM , DPPH

ชั่ง DPPH (MW = 394.32, assay = 90%) 0.0111 g นำมาละลายใน 80%, MeOH (aqueous) ปริมาตรเป็น 25 mL ใช้เป็น stock solution ก่อนใช้ให้เจือจางสารละลายลงไปอีก 5 เท่าจะได้ 200 μM , DPPH ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าประมาณ 1.0 ที่ 515 nm

3.6 การสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และความยาวคลื่น (wavelength) ระหว่าง 370-900 nm ของสารละลาย DPPH

3.6.1 การเตรียมสารละลาย 200 μM , DPPH

1. ชั่งเกลือ DPPH (ของแข็งสีม่วง) 0.0111 g (90% assay, Sigma Aldrich) นำมาละลายใน 80% MeOH 5-10 mL ทำการปรับปริมาตรให้เป็น 25 mL ด้วย 80% MeOH จะได้สารละลาย 1,013 μM , DPPH
2. pipette สารละลายในข้อ 1 จำนวน 2.5 mL ลงใน volumetric flask ทำการเจือจางด้วย 80% MeOH จนครบ 25 mL จะได้สารละลาย $\sim 200 \mu\text{M}$, DPPH

3.6.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs)

1. เปิดเครื่อง Spectronic 20+ อุ่นเครื่อง 20 นาที
2. หมุนตั้งความยาวคลื่นของ Spectronic 20+ เริ่มต้นที่ 370 nm
3. ปรับ 0 %T
4. บรรจุ 80% MeOH (ใช้เป็น blank) ประมาณ 4 mL ลงใน cuvette และทำการ set 100% T
5. pipette 202.6 μM , DPPH 4 mL ลงใน cuvette วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 nm ได้เท่ากับ 0.52
6. เปลี่ยนความยาวคลื่นจาก 370 nm เป็น 375-900 nm ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 3 - 5
7. นำข้อมูล (ตารางที่ 3) ไปเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Abs) และความยาวคลื่น (wavelength) (ดูภาพที่ 9)

3.7 การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระกับสารละลาย DPPH

3.7.1 การทำ calibration curve ของ ascorbic acid กับสารละลาย DPPH

ชั่ง ascorbic acid 0.0253 g นำมาละลายด้วย 80% MeOH เจือจางให้ได้ปริมาตร 25 mL จะได้ stock solution 1,000 μg / mL นำไปเจือจางเพื่อเตรียมความเข้มข้น 2.0, 2.4, 2.8, 3.2 และ 3.6 μg / mL ตามลำดับ

ปิเปต 200 μM , DPPH 2.0 mL ลงใน cuvette ตามด้วย 2.0 mL, 80% MeOH นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm บันทึกค่าที่ได้ (Ac)

ปิเปตความเข้มข้น 2.0 μg / mL จำนวน 2.0 mL ผสมกับ 200 μM , DPPH จำนวน 2 mL ทั้งหมด 3 ชุด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25-28 °C) นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ 515 nm คำนวณหาค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ทั้ง 3 ครั้ง (A_{30}) เปลี่ยนจากความเข้มข้น 2.0 μg / mL เป็น 2.4, 2.8, 3.2 และ 3.6 μg / mL ตามลำดับ นำข้อมูลไปคำนวณหา %RS (Radical Scavenging, สมการ 46) เขียนกราฟระหว่าง %RS กับ total concentration of sample (μg / mL) หาค่า EC_{50} จากสมการเส้นตรงของกราฟที่ได้ ($\text{EC}_{50} = 1.96 \mu\text{g}$ / mL, ภาพที่ 10)

(total concentration of sample เป็นค่าความเข้มข้นสุดท้ายของ sample ที่อยู่ใน cuvette หลังจากผสมกับ reagent ต่าง ๆ แล้ว)

$$\% \text{ Radical Scavenging } (\%RS) = \left(\frac{A_c - A_{30}}{A_c} \right) \times 100 \quad \dots(46)$$

A_c = ค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย DPPH ก่อนทำปฏิกิริยา

A_{30} = ค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย DPPH หลังทำปฏิกิริยาเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที

3.7.2 การทดสอบสารสกัดกับสารละลาย DPPH

ปิเปต 200 μM , 2.0 mL และ 80% MeOH(aqueous) จำนวน 2.0 mL ลงใน cuvette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm บันทึกเป็นค่า A_c (control)

นำสารตัวอย่างที่เจือจางได้ความเข้มข้นเหมาะสม เช่น สารสกัดจากใบต้นหยงให้เตรียม stock solution เท่ากับ 400 $\mu\text{g} / \text{mL}$ นำไปเตรียมเป็นความเข้มข้น 20, 24, 28, 32 และ 36 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ตามลำดับ ปิเปตสารสกัดความเข้มข้น 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ จำนวน 2.0 mL ลงใน cuvette (จำนวน 3 ชุด) ใสสารละลาย 200 μM , DPPH ที่อยู่ในบิวเรตจำนวน 2.0 mL ลงไป (ใช้ 80% MeOH เป็น blank) เขย่าให้สารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °C) นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 20+ ที่ความยาวคลื่น 515 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย (A_{30}) นำไปคำนวณหา %RS เขียนกราฟระหว่าง %RS กับ total concentration of sample ($\mu\text{g} / \text{mL}$) คำนวณหา EC_{50} (Efficacy Concentration 50%) (ภาพที่ 12) เปลี่ยนสารสกัดจากใบต้นหยงเป็นใบมะขามเทศ ใบหว่า ใบหูกวาง และใบปอบิดตามลำดับ

3.8 การหา % solid content

ชั่งใบสดต้นหยง 1.1372 g (แยกส่วนก้านใบออกไป) นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 – 90 °C นานประมาณ 6 ชม. จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง คำนวณหา % solid content จาก

$$\% \text{solid content} = \left(\frac{\text{dry weight (g)}}{\text{fresh weight (g)}} \right) \times 100$$

เปลี่ยนจากใบต้นหยงเป็นพืชชนิดอื่น ๆ ตามลำดับ

3.9 การหาปริมาณหมู่ฟีนอล

3.9.1 การทำ calibration curve ของ gallic acid

ชั่ง gallic acid, 0.2501 g ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 25 mL จะได้ ความเข้มข้น $5,000 \mu\text{g} / \text{mL}$ นำไปเจือจางให้มีความเข้มข้น $5.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ เพื่อใช้เป็น stock solution นำไปเตรียมความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ $4.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ ตามลำดับ

ปีเปตสารละลายความเข้มข้น $1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ จำนวน 1.0 mL ลงใน cuvette ตามด้วย Folin – Ciocalteu reagent, น้ำกลั่น และ 7.5%(w/v) Na_2CO_3 จำนวน 0.2, 1.2, 1.8 และ 2.0 mL ตามลำดับ จำนวน 3 ชุด ที่อุณหภูมิห้อง ($25-28^\circ\text{C}$) นาน 1 ชม. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Abs) ที่ 765 nm (ใช้น้ำกลั่นเป็น blank) คำนวณหาค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสง เปลี่ยนจากความเข้มข้น $1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ เป็น 2.0, 3.0, 4.0 และ $5.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ ตามลำดับ นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Abs) กับ total concentration of sample ($\mu\text{g} / \text{mL}$) (ภาพที่ 16)

3.9.2 การหาหมู่ฟีนอลในสารตัวอย่าง

ปีเปตสารสกัดใบต้นหยง ($200 \mu\text{g} / \text{mL}$) 2.0 mL ลงในหลอดทดลองตามด้วย Folin – Ciocalteu reagent , น้ำกลั่น และ 7.5 % Na_2CO_3 อย่างละ 0.4, 3.6 และ 4.0 mL ตามลำดับ ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชม. จะเกิดตะกอนสีขาวขึ้น ให้ใช้สำลีพันปลาย dropper ดูดส่วนใสของสารละลายถ่ายลงใน cuvette ประมาณ 4.0 mL หรือกรองด้วย Micro fibre filter glass (Whatman cat. no. 1822 090) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า GAE จากสมการเส้นตรงของ calibration curve เปลี่ยนจากสารสกัดเนื้อใบต้นหยงเป็นสารตัวอย่างอื่น ๆ