บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ มีขั้นตอนในการดำเนินการดังต่อไปนี้

1. แหล่งที่เลือกเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์
2. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย
3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
4. วิธีดำเนินการวิจัย
5. สถานที่ทำการศึกษาและวิจัย
6. ระยะเวลาทำการวิจัย

แหล่งที่เลือกเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดเพื่อนำมาวิเคราะห์ครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ใช้ตัวอย่างต้นตานหม่อนที่ปลูกใน ตำบลวังไก่เถื่อน อำเภอหันคา จังหวัดชัยนาท โดยทำการเก็บตัวอย่างจากหลายๆต้นที่ปลูกในบริเวณเดียวกัน

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)
2. เครื่อง UV–VIS Spectrophotometer
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
4. เครื่อง Vortex mixer
5. เครื่องกลั่นลำดับส่วน (Fractional distillation)
6. เครื่องบดพืช
7. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 1000, 250, 100 และ 50 มิลลิลิตร
8. กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100 มิลลิลิตร
9. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
10. ปิเปต (Pipette)

11. Glass Cuvette
12. คอลัมน์ (Column) สำหรับทำโครมาโทกราฟีเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร
13. Clamp, Stand และ Clamp holder
14. แผ่น TLC
15. หลอดแคพิลลารี (Capillary tube)
16. เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)
17. หลอดทดลอง (Test tube)
18. ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)
19. กระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์
20. สำลี
21. เครื่องย่อยโปรตีน
22. เครื่องย่อยไขมันโปรตีน
23. เครื่องย่อยไขมัน
24. เครื่องหาเยื่อใย
25. เตาเผา
26. Descicator

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. DPPH (2,2–diphenyl–1– picrylhydrazyl)
2. ABTS (2,2–azino–bis(3–ethylbenzthiazoline sulfonate))
3. BHA (Butylated hydroxyanisole)
4. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Conc. HCl)
5. Ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$)
6. Dichloromethane (CH_2Cl_2)
7. Absolute ethanol (C_2H_6O)
8. Ammonia's reagent test
9. Dragendorff's reagent
10. เส้นลวด Magnesium

11. Developing reagent

12. Gelatin salt solution

13. 1% Ferric chloride

14. Ethanol (EtOH)

15. Wagner's reagent

16. Marmes's reagent

17. Mayer's reagent

18. Gelatin solution

19. Hexane (C_6H_{14})

20. Octyl alcohol

21. น้ำกลั่น

22. Petroleum ether

23. H_2SO_4 (conc)

24. NaOH

25. กรดบอริก

26. $CuSO_4$

27. K_2SO_4

28. อินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมต้นตานหม่อน

1.1 เก็บต้นตานหม่อนที่ได้จากจังหวัดชัยนาท

1.2 นำมาผึ่งลมจนแห้ง แล้วบดละเอียด

1.3 ใส่ถุงเก็บไว้ในที่แห้ง

2. การหาคุณค่าทางโภชนาการ

2.1 วิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

2.1.1 อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก

2.1.2 กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2.1.3 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้น ซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว

2.1.4 นำไปอบในตู้ไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง

2.1.6 อบซ้ำอีกครั้งๆละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2.1.7 คำนวณหาปริมาณความชื้น จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

2.2 วิเคราะห์หาปริมาณเถ้า

2.2.1 เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปิดสวิทซ์เตาเผารอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก

2.2.2 เผาซ้ำอีกครั้งๆละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นในข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2.2.3 ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในกระเบื้องเคลือบซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผา ตั้งอุณหภูมิเผาที่ 600 องศาเซลเซียส และกระทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

2.2.4 คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้าคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

2.3 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

2.3.1 ขั้นตอนการย่อย

1) ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5-1 กรัม ใส่ในหลอดย่อยโปรตีนและทำแบลงค์

2) ใส่สารผสม $CuSO_4.5H_2O$ และ K_2SO_4 5 กรัม

3) เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ประมาณ 20 มิลลิลิตร

4) วางหลอดย่อยในเตาย่อยแล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบ ขวดใส่ด่างและเครื่องจับไอกรดให้เรียบร้อย

5) เปิดสวิทซ์เครื่องจับไอกรดและเตาย่อย แล้วตั้งอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที จากนั้นปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 350 องศาเซลเซียส ย่อยต่ออีก 60 นาที จนได้สารละลายใส

6) ปล่อยทิ้งให้เย็น

7) นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นล้างหลอดย่อยให้หมด ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้กลั่นต่อไป

2.3.2 ขั้นตอนการกลั่น

1) จัดอุปกรณ์กลั่นแล้วเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่นด้วย

2) นำขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้นร้อยละ 4) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

3) ดูดสารละลายตัวอย่างด้วยปิเปตแบบกระเปาะขนาด 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 20 มิลลิลิตร

4) กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ

5) ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.02 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง

6) คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีนคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{(A-B) \times N \times 14.007 \times F}{W} \times 100$$

เมื่อ A = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรตกับแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรด (นอร์มาล)

F = แฟกเตอร์

W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

2.4 วิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

2.4.1 อบขวดก้นกลมสำหรับหาปริมาณไขมันซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตรในตู้อบไฟฟ้าทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2.4.2 ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ถ้าตัวอย่างเป็นอาหารชนิดที่ไม่มีไขมันมากให้ชั่ง 1-2 กรัม ถ้าเป็นชนิดที่มีไขมันน้อยให้ชั่ง 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิดตามวิธีการห่อ แล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยใยแก้วหรือสำลีเพื่อให้สารตัวทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ

2.4.3 นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซอคเลต

2.4.4 เติมสารตัวละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดหาไขมันประมาณ150 มิลลิลิตร แล้ววางลงบนเตา

2.4.5 ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นแล้เปิดสวิทซ์ให้ความร้อน

2.4.6 ใช้เวลาในการสกัดไขมันนาน 6 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของตัวทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 15 หยดต่อนาที

2.4.7 เมื่อครบ 6 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจากซอคเลตลงในขวดก้นกลมจนหมด

2.4.8 ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ

2.4.9 นำขวดหาไขมันอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียสจนแห้ง ใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถความชื้น

2.4.10 ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำๆ ครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกัน ไม่เกิน 1-3 มิลลิลิตร

2.4.11 คำนวณหาปริมาณไขมันจาก สูตร

$$\text{ปริมาณไขมันคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

2.5 วิเคราะห์หาปริมาณสารเยื่อใย

2.5.1 นำกระดาษกรองวางบนกระจกนาฬิกา อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำออกมาใส่โถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักเก็บไว้ใช้กรองในขั้นตอนต่อไป

2.5.2 ชั่งตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดไขมันออกแล้วลงในบีกเกอร์ทรงสูง สำหรับวิเคราะห์สารเยื่อใยขนาด 600 มิลลิลิตร

2.5.3 เติมกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

2.5.4 วางบีกเกอร์บนอุปกรณ์ให้ความร้อนซึ่งต่อเข้ากับอุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นพร้อมเปิดสวิทซ์ไฟ

2.5.5 ต้มให้เดือด 30 นาที

2.5.6 กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองที่ชั่งน้ำหนักแล้ว

2.5.7 ล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นกรด

2.5.8 ถ่ายกากที่ได้ลงในบีกเกอร์ใบเดิม

2.5.9 เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

2.5.10 วางบีกเกอร์บนอุปกรณ์ให้ความร้อนซึ่งต่อกับอุปกรณ์ควบแน่นเช่นเดิม และต้มต่ออีก 30 นาที

2.5.11 กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองแผ่นเดิม

2.5.12 ล้างด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างหมดความเป็นด่าง

2.5.13 ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (ร้อยละ 95) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

2.5.14 นำกระดาษกรองพร้อมกากใส่ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ อบแห้งในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

2.5.15 ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำอีกครั้ง ๆ ละ 30 นาที จนกระทั่งได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2.5.16 นำถ้วยกระเบื้องพร้อมกากที่อบแห้งแล้วไปเผาเช่นเดียวกับวิธีการวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

2.5.17 คำนวณหาปริมาณสารเยื่อใยจากสูตร

$$\text{ปริมาณสารเยื่อใยคิดเป็นร้อยละ} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างหลังอบและหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \text{ X } 100$$

2.6 วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต (by difference)

สูตรคำนวณ คือ

คาร์โบไฮเดรต (%) = 100 – (%ความชื้น + %โปรตีน+ ไขมัน + สารเยื่อใย + เถ้า)

3. การหาส่วนประกอบทางเคมีของสารสกัดตานหม่อน

3.1 การเตรียมสารสกัดตานหม่อน

3.1.1 นำตัวอย่างต้นตานหม่อนที่บดเสร็จแล้วมาแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด คือ hexane , ethyl acetate และ ethanol โดยครั้งแรกแช่ด้วย hexane ใช้อัตราส่วนของต้นตานหม่อน 591.12 กรัม ต่อตัวทำละลาย 3 ลิตร และเขย่าเป็นครั้งคราวแช่ไว้ เป็นเวลา 2-3 วัน

3.1.2 กรองเอาสารสกัดที่ได้ด้วยสำลีใส่ภาชนะที่แห้งและสะอาด

3.1.3 ระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) โดยใช้ อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดที่ข้นเหนียว ทำทั้งหมด 3 ซ้ำเพื่อให้ได้สารสกัดในแต่ละชั้นมากที่สุด

3.1.4 เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชา

3.1.5 บันทึกผลของสารสกัดที่ได้ คือ สี และ น้ำหนักของสารสกัดที่ได้

หมายเหตุ ต่อไปจึงเปลี่ยนสารละลายเป็นแช่สารสกัดต่อด้วย ethyl acetate และ ethanol ตามลำดับ โดยทำเหมือนข้อที่ 3.1.1 – 3.1.5

3.2 การทดสอบหาชนิดของกลุ่มสารในสารสกัดตานหม่อนด้วยรีเอเจนต์ชนิดต่างๆ

นำสารสกัดตานหม่อนทั้งหมด 3 ส่วน มาทดสอบหากลุ่มสารสำคัญตามวิธีของอ้อมบุญ ล้วนรัตน์. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย. คณะเภสัชศาสตร์. มหิดล (2536) ดังนี้

3.2.1 ทดสอบกลุ่มสารแอลคาลอยด์

1) หยด 0.5% สารละลายสารสกัดตานหม่อนชั้น hexane ประมาณ 2-3 หยดลงในหลอดทดลอง (ในกรณีที่ตะกอนมีสีขาว ขาวนวลหรือเหลืองอ่อน) เติมกรดเจือจาง 1 หยด

2) หยดน้ำยาทดสอบลงไป 1-2 หยด (ระวังอย่าหยดมากเกินไป) ทำซ้ำ 3 ซ้ำ

3) สังเกตสีและปริมาณของตะกอนที่เกิดขึ้น บันทึกผล

ตาราง 3.1 น้ำยาทดสอบสารแอลคาลอยด์ที่ใช้และการแปลผล

น้ำยาทดสอบ	**ผล (สีของตะกอน)**
Dragendorff's reagent	ส้ม
Marme's reagent	ขาว
Mayer's reagent	ขาว
Wagner's reagent	น้ำตาลแดง

หมายเหตุ สารละลายสารสกัดตานหม่อนในชั้น ethyl acetate และ ethanol ทำเหมือนข้อที่ 1) – 3)

3.2.2 ทดสอบกลุ่มสารฟลาโวนอยด์

1) วิธี Shinoda test

1. นำสารสะลายสารสกัดตานหม่อนชั้น hexane ประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลองใส่แมกนีเซียม 1 ชิ้น (เล็กน้อย) เติม conc. HCl 10 หยด สังเกตสีส้มถึงสีแดงที่เกิดขึ้น ทำให้หลอดเย็นโดยเจือจางด้วยน้ำปริมาตรเท่าตัว

2. เติม octyl alcohol 1 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นสังเกตสีแต่ละชั้น บันทึกผล ทำซ้ำ 3 ซ้ำ

ตาราง 3.2 การแปลผลการทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยวิธี Shinoda test

กลุ่มสาร	**ผล**
ถ้ามี Flavonol	จะให้สีแดงถึงสีแดงเลือดนก
ถ้ามี Flavone	จะให้สีส้มถึงสีแดง
ถ้ามี Flavanone	จะให้สีแดงเลือดนกถึงสีม่วงชมพูอ่อน
ถ้ามี Flavanonols	จะให้สีเข้ม แดงถึงม่วงแดง

2) วิธี Pew test

ถ่ายสารละลาย 1 ml ลงในหลอดทดลอง เติม Zn-dust 0.5 g และ 2N HCl 2 หยด เขย่าให้เข้ากันประมาณ 1 นาที เติม conc HCl 10 หยด จะเกิดสีแดงเข้มภายใน 2-5 นาที แสดงว่ามี Flavanonol หรือ Flavonol-3-glycoside ส่วน Flavanone และ Flavonol จะให้สีจางๆ

3) ปฏิกิริยากับด่าง

นำสารละลายสารสกัดตานหม่อนชั้น hexane ประมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแล้วเติม Ammonia TS ทีละหยด แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้น ทำ 3 ซ้ำ และบันทึกผล

ตาราง 3.3 การแปลผลการทดสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยวิธีปฏิกิริยากับด่าง

กลุ่มสาร	ผล
ถ้ามี Flavone, Flavonol, Xanthone	จะให้สีเหลือง
ถ้ามี Flavonone	จะให้สีส้มแดง
ถ้ามี Chalcone and Aurone	จะให้สีม่วงทันที
ถ้ามี Flavanonol	จะให้สีส้มน้ำตาล

หมายเหตุ : สารสกัดตานหม่อนชั้น ethyl acetate และ ethanol ทำเหมือนข้อที่ 1) – 3)

3.2.3 การทดสอบกลุ่มสารแทนนินและฟีโนลิค

แบ่งสารสะลายตานหม่อนชั้น hexane ใส่ลงในหลอดทดลองหลอดละ 2 มิลลิลิตร จำนวน 7 หลอด

หลอดที่ 1 ใช้เป็น control (sodium chloride solution)

หลอดที่ 2 เติม gelatin solution 2-3 หยด ผลบวก ได้ตะกอนขุ่นขาว

หลอดที่ 3 เติม gelatin salt solution 2-3 หยด ผลบวก ได้ตะกอนขุ่นขาว

หลอดที่ 4 เติม 1% ferric chloride 2-3 หยด ผลบวก ได้สีน้ำเงินเขียว

หลอดที่ 5 เติม bromine water 5-6 หยด ผลบวก ได้ตะกอนเทาสีอ่อน (buff–coloured)

หลอดที่ 6 vanillin–HCl test ถ่ายสารสกัดลงใน evaporating dish ระเหยจนแห้งบนอ่างอังไอน้ำเติม vanillin reagent 1 มิลลิลิตร และconc. HCl 1 หยด ผลบวก สีแดง (crimson colour)

หลอดที่ 7 เติม lime-water 5 มิลลิลิตร ผลบวก ตะกอนสีเหลือบน้ำเงินเทา (blue–gray colour)

ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

การแปลผล

1 ให้ผลลบกับ gelatin และ gelatin salt reagent ไม่ให้สีกับ ferric chloride แสดงว่าไม่มี tannin หรือ phenolic

2 ให้ผลบวกกับ gelatin และ gelatin salt reagent ให้สีเขียวกับ ferric chloride, bromine water และ vanillin–HCl test ให้ผลลบกับ lime-water แสดงว่ามี condensed tannin

3 ให้ผลบวกกับ gelatin และ gelatin salt reagent ให้สีออกน้ำเงิน น้ำเงินดำกับ ferric chloride และ lime–water ให้ผลลบกับ bromine water และ vanillin–HCl test แสดงว่ามี hydrolysable tannin

4 ให้ผลบวกกับทุกการทดสอบ ให้สีน้ำเงินอมเขียวกับ ferric chloride แสดงว่ามี tannin ทั้งสองประเภท

5 ให้ผลลบกับ gelatin และ gelatin salt reagent ให้สีน้ำเงินหรือ สีเขียว หรือ สีผสมของทั้งสองสีกับ ferric chloride แสดงว่ามี phenolic แต่ไม่มี tannin

หมายเหตุ สารสกัดตานหม่อนในชั้น ethyl acetate และ ethanol ทำเหมือนหลอดที่ 1 – 7

3.2.4 การตรวจสอบกลุ่มสารจากการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

1) นำสารสกัดตานหม่อนชั้น hexane, ethyl acetate และ ethanol ละลายด้วยตัวทำละลายจนได้สารละลายตานหม่อนพอประมาณ

2) นำสารละลายตานหม่อนมาคลุกกับซิลิกา โดยค่อยๆเติมซิลิกาทีละน้อยคนจนแห้ง

3) เตรียมคอลัมน์โดยใช้ตัวดูดซับเป็นซิลิกาเจล ใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย ให้ความสูงของตัวดูดซับประมาณ 15–16 เซนติเมตร

4) ค่อยๆโรยผงสารสกัดตานหม่อนลงในคอล้มน์

5) ใช้ตัวชะเริ่มจาก hexane, hexane - ethyl acetate, ethyl acetate - ethanol และ ethanol โดยเพิ่มปริมาณของตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่าขึ้นเรื่อย ๆ

6) ตรวจหาสารจากคอลัมน์ด้วยแผ่น TLC และทำการรวมกลุ่มสารที่แยกได้เพื่อนำไปทดสอบกลุ่มสารด้วยรีเอเจนต์ต่อไป

4. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากตานหม่อน

4.1 การตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตานหม่อนโดยวิธี DPPH (Wenli Yu ,2002 อ้างถึงใน นันธิดา ศรเผือก, 2548)

4.1.1 เตรียมสารละลายตัวอย่างของสารสกัดตานหม่อนในชั้น hexane โดยนำสารสกัดที่ได้ มาทำให้เจือจางด้วย dichloromethane ให้ได้ความเข้มข้นต่างกัน 5 ความเข้มข้น ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำ linear regression (absorbance and concentration)

4.1.2 ปิเปตสารละลาย DPPH 0.3 มิลลิโมลาร์ 1.00 มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที

4.1.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย ส่วนหลอดที่เป็นปฏิกิริยาควบคุม (control) และหลอดที่เป็นแบลงค์ (blank) ใช้ dichloromethane ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างสารสกัด

4.1.4 คำนวณ % radical scavenging

4.1.5 นำค่าความเข้มข้นของสารละลายและ % radical scavenging ไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณค่า IC_{50}

4.1.6 สารสกัดใน ethyl acetate, ethanol และสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ทำเหมือนข้อ 4.1.1– 4.1.6

4.2 การตรวจฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตานหม่อนโดยวิธี ABTS (Re et al., 1999 อ้างถึงใน สุรศักดิ์ ใจเขียนดี และ คณะ, 2550)

4.2.1 เตรียมสารละลายตัวอย่างของสารสกัดต้นตานหม่อนในชั้น hexane โดยนำสารสกัดที่ได้มาทำให้เจือจางด้วย acetone (CH_3COCH_3) ให้ได้ความเข้มข้นต่างกัน 5 ความเข้มข้น ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำ linear regression (absorbance and concentration)

4.2.2 ปิเปตสารละลาย 7 มิลลิโมลาร์ ABTS 3.00 มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 6 นาที

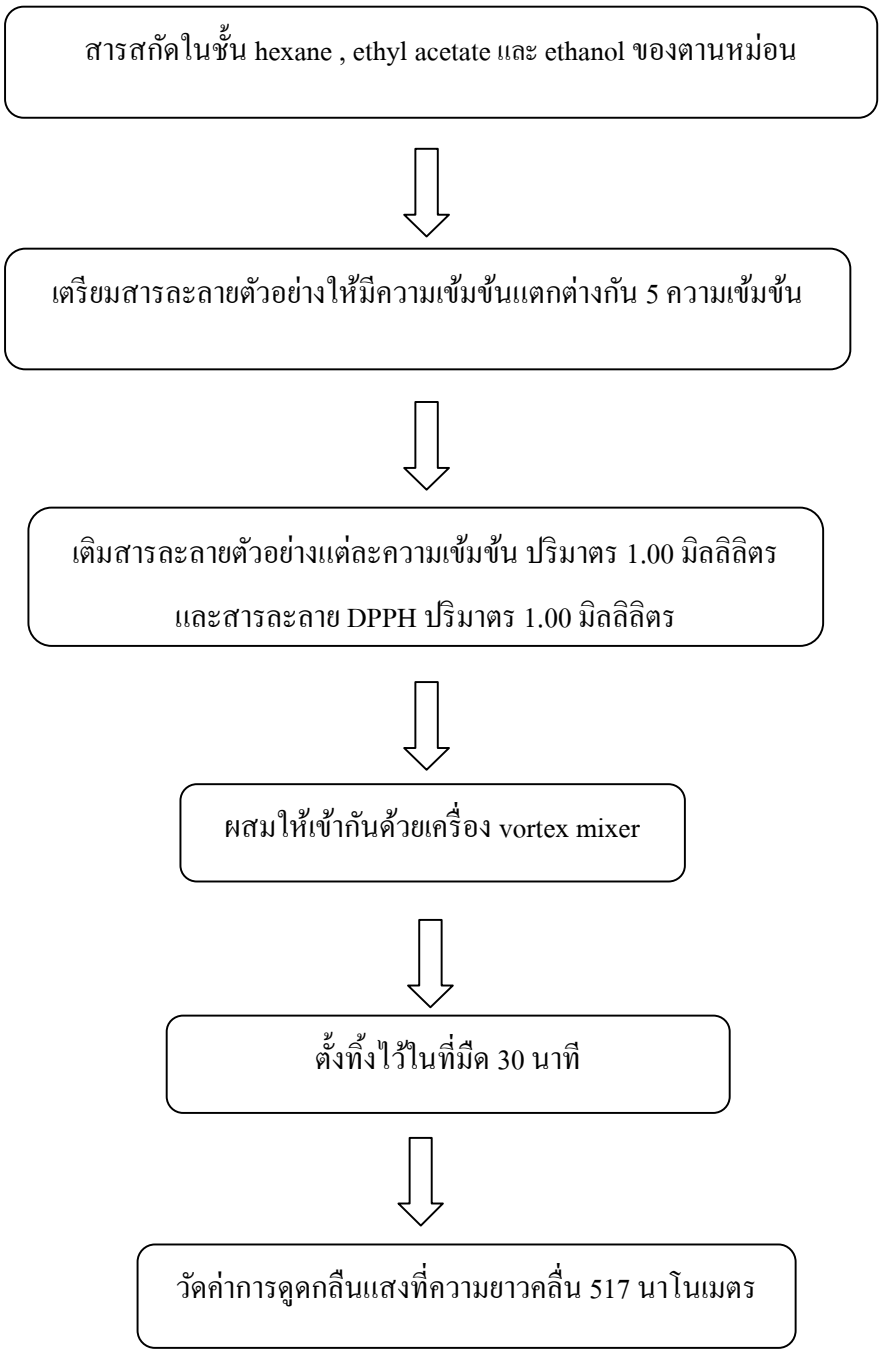
4.2.3 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ในแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย ส่วนหลอดที่เป็นปฏิกิริยาควบคุม ให้ใช้ acetone ปริมาตร 1.00 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างสารสกัดและหลอดที่เป็นแบลงค์ ใช้ acetone

4.2.4 คำนวณ % radical scavenging

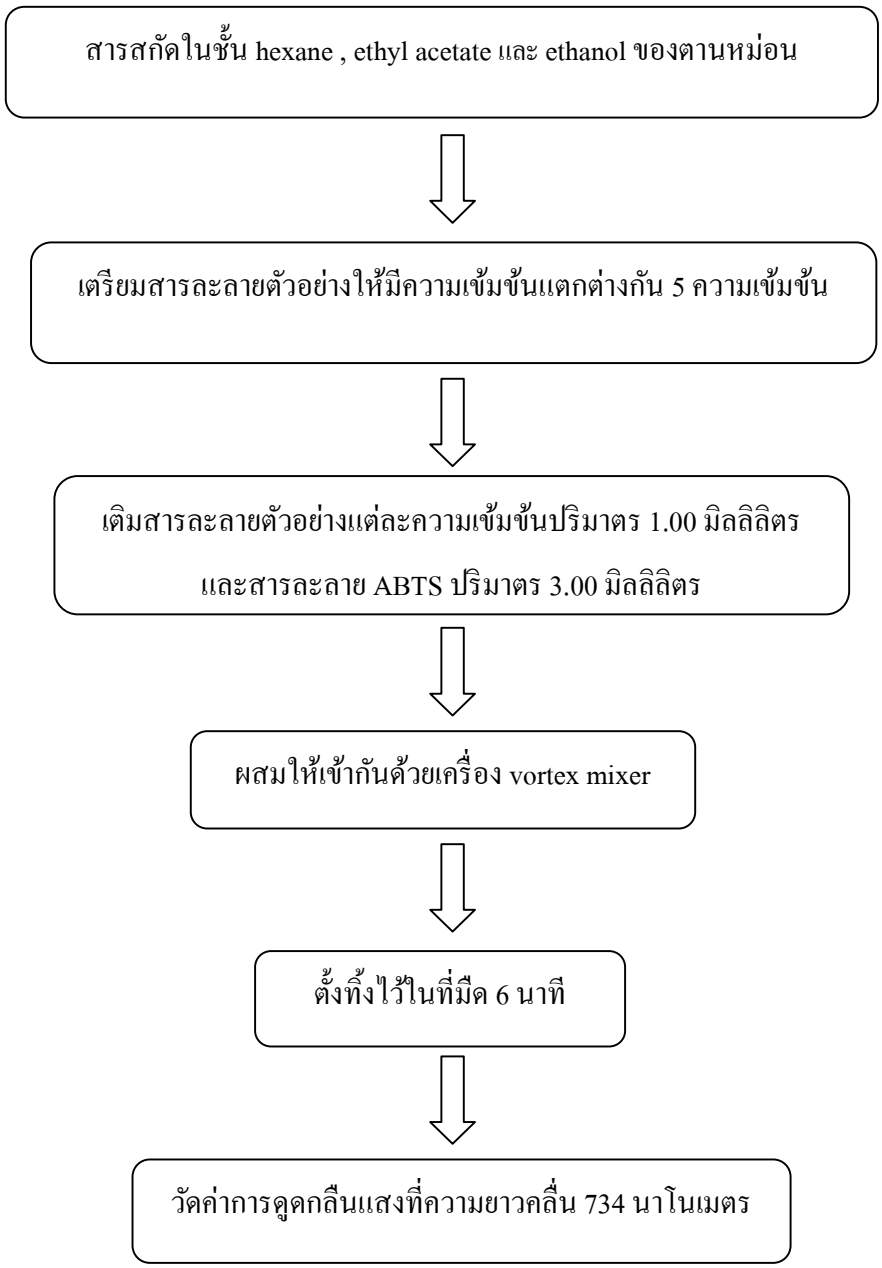
4.2.5 จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของสารละลายและ % radical scavenging ไปสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณค่า IC_{50}

4.2.6 สารสกัดด้วย ethyl acetetate , ethanol และสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ทำเหมือนข้อ 4.2.1 – 4.2.5

แผนภูมิแสดงวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS ดังภาพที่ 3.1 - 3.2 ตามลำดับ



ภาพที่ 3.1 แผนภูมิแสดงวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH



ภาพที่ 3.2 แผนภูมิแสดงวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS

4.3 การตรวจฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์

โดยห้องปฏิบัติการ Biotec ตรวจฤทธิ์ต้านเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA) ใช้ Negative control เป็น 0.5 % DMSO ส่วน Positive control เป็น Amphotericin B ความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ คือ 50 µg/ml (รายละเอียดในภาคผนวก)

4.4 การตรวจฤทธิ์ต้านมะเร็ง

โดยห้องปฏิบัติการ Biotec ตรวจฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด (NCI-H187-Small cell lung cancer) ด้วยวิธี Resazurin Microplate assay (REMA) ใช้ Negative control เป็น 0.5% DMSO ส่วน Positive control เป็น Ellipticine, Doxorubicin และ Tamoxifen ความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ คือ 50 µg / ml (รายละเอียดในภาคผนวก)

4.5 การตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

โดยห้องปฏิบัติการ Biotec ตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ด้วยวิธี Green Fluorescent Protein (GFP)-based assay ใช้ Negative control เป็น 0.5 % DMSO ส่วน Positive control เป็น Ellipticine ความเข้มข้นสุดท้ายของสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ คือ 50 µg/ml (รายละเอียดในภาคผนวก)

4.6 การตรวจฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์

ฤทธิ์ต้านอัลไซเมอร์ของสารสกัดตานหม่อน ตรวจสอบจากความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase) โดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโคปี ใช้แอซีทิลไธโอโคลีนไอโอไดด์ (acetylthiocholineiodide) เป็นสารตั้งต้น ตามวิธีที่ปรับปรุงมาจากวิธีการของ Ellman [Ref] การทดลองจะใช้ถาดหลุมชนิด 96 หลุม โดยเริ่มแรกใส่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 140 มิลลิลิตร ตามด้วย 20 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรส (0.2 U/mL) และ 20 มิลลิลิตรของสารตัวอย่างที่ละลายใน 80% เมทานอล จากนั้นบ่มสารผสมดังกล่าวเป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายเติม 20 มิลลิลิตรของสารละลายผสม 5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย 5,5′-ไดไธโอบิช[2-ไนโตรเบนโซอิค แอซิด] ที่มีโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) อยู่ 0.1% และ 5 มิลลิโมลาร์สารละลายแอซีทิลไธโอโคลีน ไอโอไดด์ ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microtiter plate reader (Sunrise, Tecan) ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

เอนไซม์แอซีทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยใช้กาแลนทามีน เป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน และทุกๆ การทดลองจะทำซ้ำ 3 ครั้ง

4.7 การตรวจฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเอชไอวี (HIV)

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีของสารสกัดเอทานอลของตานหม่อน โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMC) มีขั้นตอนการทำตามลำดับดังนี้

1. ใส่ IL-2-GM (20%FBS) 100 µl ต่อ หลุม ในทุกหลุม columns 2-12 (column 2 ทำ virus control) ของเพทแบบ 96 หลุมรูปตัวยู. ใส่ IL-2-GM (20%FBS) 150 µl ใน columns 1 (cell control).

2. ใส่สารสกัดเอทานอลของตานหม่อน 125 µl ทำซ้ำใน row E-H, column 3-4. (1 g stock solution).

3. ผสมสารสกัดเอทานอลของตานหม่อน ใน row E-H, column 3-4 แล้วถ่าย 125 µl ไปยัง row E-H, column 5-6. ทำซ้ำและถ่ายเพื่อทำการเจือจางสารสกัดเอทานอลของตานหม่อนจนไปถึง row A-D, column 3-12 (these are serial; 2-fold dilutions). หลังจากนั้นก็ผสมให้เข้ากัน แล้วถ่ายที่เหลือ 125 µl.ทิ้ง ดังแสดงตามแผนภาพแสดงการเจือจางสารสกัดเอทานอลของตานหม่อน

4. ใส่ไวรัสเอชไอวี 50 µl ในทุกหลุมของ column 2-12 [เจือจางไวรัสในสารสกัดเอทานอลของตานหม่อน เลี้ยงเซลล์ (IL-2-GM (20%FBS) ให้มีค่าไวรัสที่ 100 TCID]. Column 2 เป็น virus controls (ไม่ใส่สารสกัดเอทานอลของตานหม่อน . Column 1 เป็น cell controls (ไม่ใส่ไวรัส และสารสกัดเอทานอลของตานหม่อน).

5. นำไปอบในตู้อบ CO_2 ที่ 37°C และ 5% CO_2 1 ชั่วโมง.

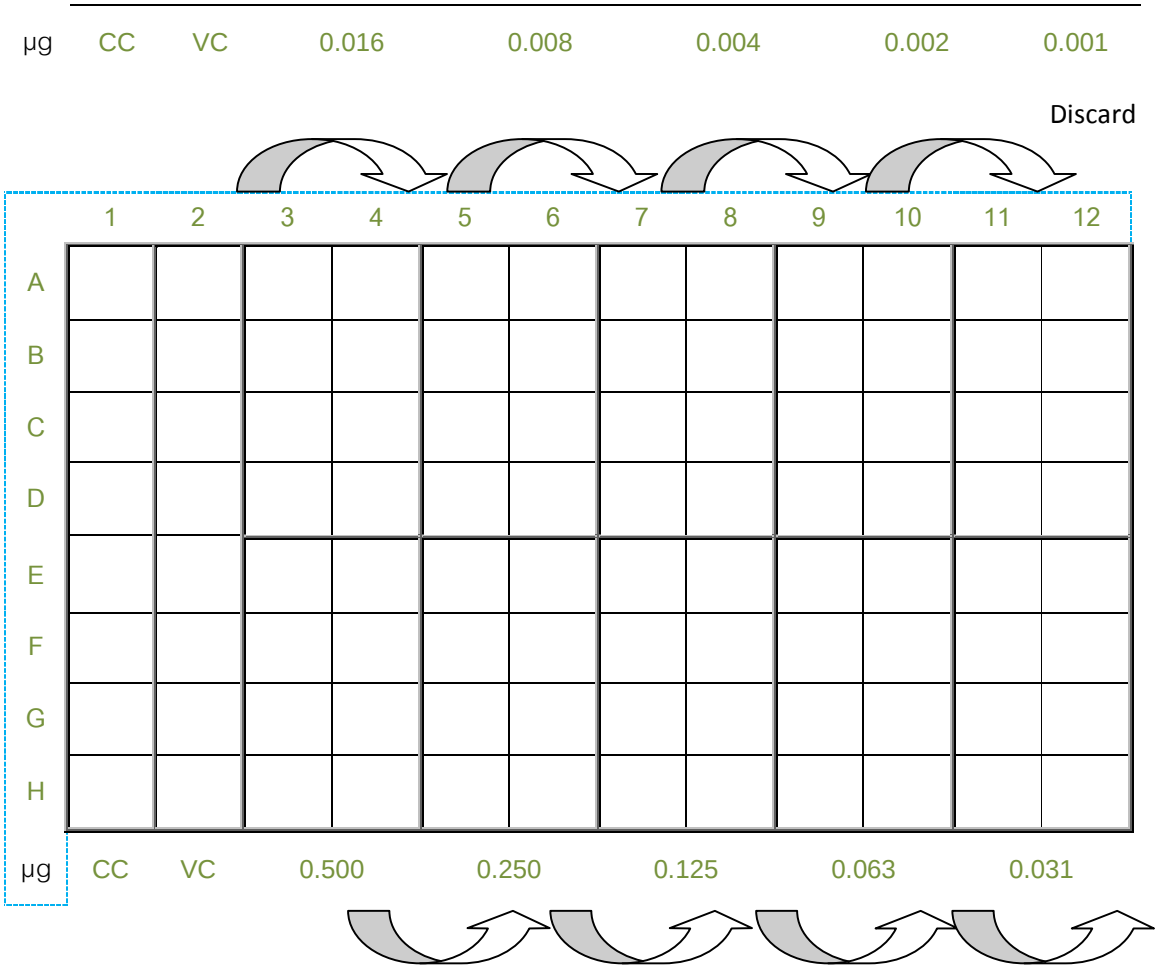
6. นำเซลล์ เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMC) มานับ แล้วเจือจางให้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 100,000 เซลล์ต่อ 1 ml โดยผสมด้วย IL-2-GM(20%FBS) อย่างน้อย 10 ml.

7. ใส่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMC) 100 µl โดยให้มีความเข้มข้นที่ 100,000 เซลล์ต่อ 1 ml (10,000 เซลล์ต่อหลุม) ในทุกหลุมของเพท 96 หลุม.

8. นำไปอบในตู้อบ CO_2 ที่ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 7 วัน และทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับหลังจากอบเพื่อดูการติดเชื้อและความเป็นพิษ.

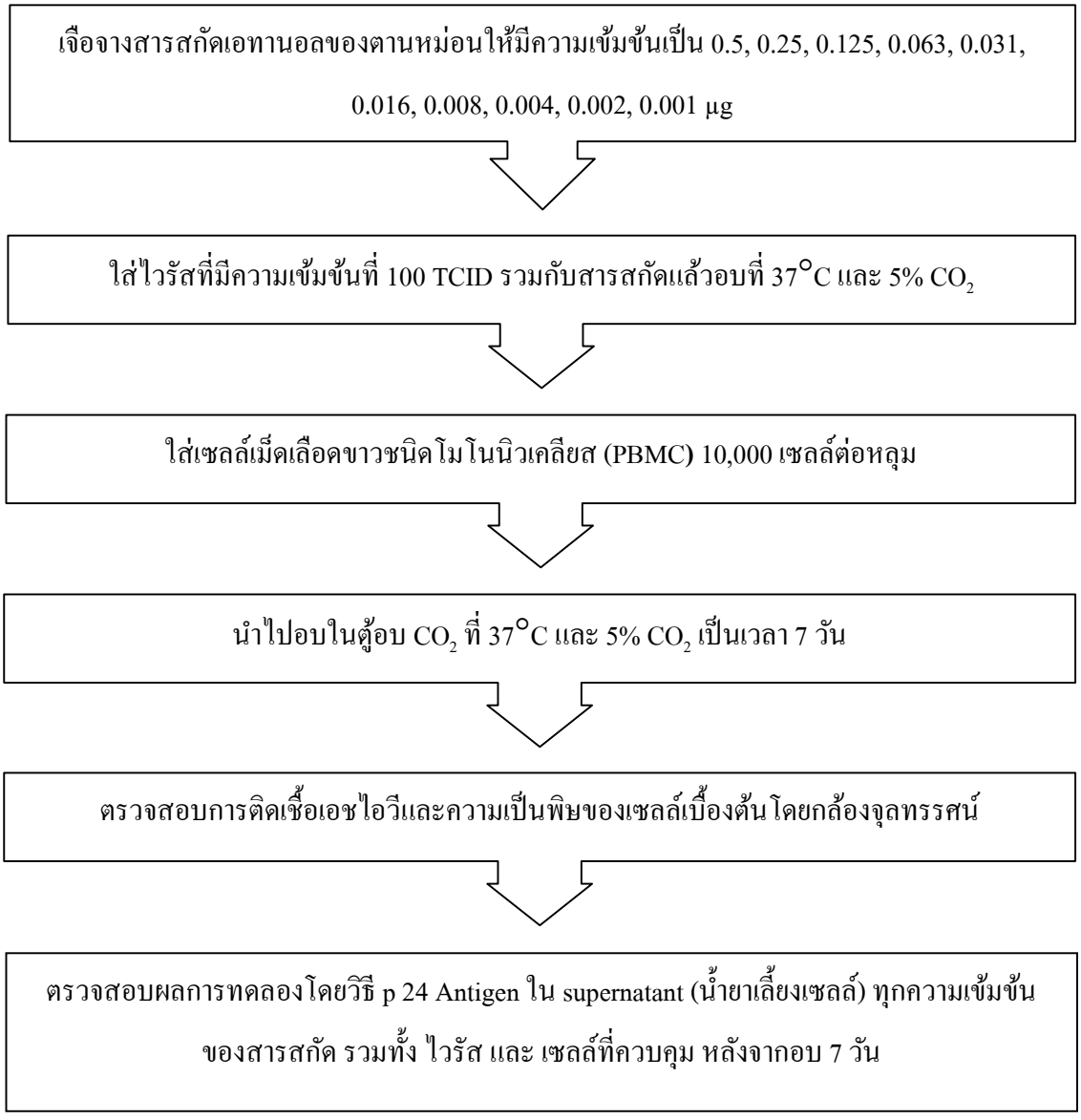
9. ตรวจผลการทดลองโดยวิธี p24 Antigen ใน supernatant (สารสกัดเอทานอลของตานหม่อนที่เลี้ยงเซลล์) ในทุกความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลของตานหม่อน รวมถึง ไวรัส และ เซลล์ที่ทำการควบคุม หลังจากอบ 7 วัน.

แผนภาพแสดงการเจือจางสารสกัดเอทานอลของตานหม่อน



ภาพที่ 3.3 แผนภาพแสดงการเจือจางสารสกัดเอทานอลของตานหม่อน

การทดสอบการยับยั้งเชื้อเอชไอวีด้วยสารสกัดเอทานอลของตานหม่อน ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMC). แสดงเป็นแผนภาพง่ายๆได้ดังนี้



สถานที่ทำการศึกษาและวิจัย

1. การทดสอบหาคุณค่าทางโภชนาการ ทำการทดสอบที่สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม และที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การบดตานหม่อนด้วยเครื่องบดขนาดใหญ่ ทำการบดที่สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

3. การวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมี ทำการวิเคราะห์ที่สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม

4. การตรวจหาฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ทำการตรวจที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลศิริราช

ระยะเวลาทำการวิจัย

1 ปี 7 เดือน เริ่มวิจัย เดือน มกราคม พ.ศ 2555 ถึง เดือน กรกฎาคม พ.ศ 2556