บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1. Freeze dry (Christ/Gamma 2-16)
2. Rotary evaporator (Rotavapor II, BUCHI)
3. ขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน (Kjeldahl Apparatus)
4. เครื่องย่อย (Digestion Apparatus)
5. เครื่องกลั่น (Distallation)
6. ขาตั้งและบิวเรตสำหรับไทเทรตสารละลาย
7. ขวดรูปชมพู่ขนาด (Erlenmeyer flask) 250 มิลลิลิตร
8. กระบอกตวงขนาด 25, 100 และ 300 มิลลิลิตร
9. glass bead or boiling chip
10. ปิเปตต์ (steriled pipette) ขนาด 1-10, 20-200 และ 1-20 ไมโครลิตร
11. เครื่องอังน้ำ (water bath)
12. น้ำกลั่น (Demonize)
13. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
14. กระดาษกรองเบอร์ 4
15. เครื่องปั่นหยาบ
16. Filtering flask
17. Crucible
18. Buchner funnel
19. ผ้าลิกนิน
20. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (sigma-aldrich)
21. Folin-Ciocateu reagent (Lobo)
22. Gallic acid monohydrate (sigma-aldrich)
23. Na_2CO_3 (Lobo)
24. 10% $AlCl_3.6H_2O$
25. 5% $NaNO_2$
26. Quercetin
27. spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu)

28. $CuSO_4$
29. $NaSO_4$
30. conc.H_2SO_4
31. H_3BO_3 (boric acid)
32. HCL
33. C_2H_5OH
34. C_4H_{14}
35. Resazurin
36. Ellipticine
37. Tamoxifen
38. Doxorubicin
39. DMSO 0.5%
40. copper sulfate:
41. potassium sulfate
42. methylred
43. bromocresol green

2. ขั้นตอนการวิจัย

2.1 การสกัดพืช

นำข้าวโพดดิบ (นำเฉพาะส่วนที่เป็นเมล็ด) กล้วยน้ำว้าดิบ(นำเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อ) ถั่วลันเตา (นำเฉพาะส่วนที่เป็นเมล็ด) ผักคะน้า (นำเฉพาะส่วนที่เป็นใบและก้าน) และผักโขม (นำเฉพาะส่วนที่เป็นใบและก้าน) มาจากอำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี ล้างทำความสะอาดผึ่งให้แห้ง น้ำโดยห้ามโดนแดดประมาณ 5 ชั่วโมง หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำมาสกัดด้วยวิธีหมัก (maceration) โดยนำตัวอย่างพืชทั้งหมดที่หั่นแล้วแต่ละชนิดประมาณ 2 กิโลกรัม แช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 1,000 มิลลิลิตร นาน 3 วัน เทตัวทำละลายที่มีสารสกัดออกเก็บไว้เติมเอทานอลใหม่ปริมาณเท่าเดิมลงไปในกากแช่อีก 3 วันแยก ตัวทำละลายที่มีสารสกัดครั้งที่สองออกนำมารวมกับ สารสกัดที่ได้ในครั้งแรก ทำอย่างนี้ครบ 3 ครั้ง และกรองเอากากออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลทั้งหมดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator (Rotavapor II, BUCHI) จนตัวทำละลายระเหยออกไปหมด จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดแช่ตัวทำละลายเอธิลอะซิเตรตและน้ำด้วยวิธีเดียวกัน แต่หลังจากระเหยเอาตัวทำละลายออกแล้วนำไประเหยให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้ง Freeze dry (Christ/Gamma 2-16) ชั่งน้ำหนัก เก็บสารสกัดตัวอย่างทั้งหมดในรูปผงแห้ง ยกเว้น สกัด

ด้วยน้ำจากนั้นเตรียมสารสกัดตัวอย่างทั้งหมดโดยนำไปละลายด้วย Absolute Ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.2 การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

2.2.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH assay (ดัดแปลงจาก Kriengsak et al., 2006)

นำสารสกัดตัวอย่าง ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 1000 ppm ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดนาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงโดย spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Trolox (Sigma®, St. Louis, MO, USA) และรายงานผลเป็นปริมาณ trolox equivalent

2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (total phenolic compound) ใช้วิธี Folin-Ciocalteu (ดัดแปลงจาก Skereget et al., 2005)

นำสารสกัดตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ น้ำบริสุทธิ์ (deionized water) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 7.5% (w/v) Na_2CO_3 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Gallic acid และรายงานผลเป็น ปริมาณ Gallic acid equivalent

2.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ (Total Flavonoid content) ใช้วิธีcolorimetric method (ดัดแปลงจาก Bao et al., 2005)

นำสารสกัดตัวอย่าง ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่น้ำบริสุทธิ์ ปริมาณ 3 มิลลิลิตร และ 5% $NaNO_2$ ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม10% $AlCl_3.6H_2O$ ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาณ 1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu) ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตรทำการทดลอง 3 ซ้ำเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ quercetin evaluates (mg QE/g of extract)

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity assay) ของสารสกัดทั้ง 5 ชนิดเฉพาะที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย

2.3.1 มะเร็งปอด (Human small lung cancer cell, NCI-H187) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-17) ด้วยวิธี Resazurin microplate assay (REMA) (Brien et al., 2000)

ขั้นตอน

1. นำเซลล์มะเร็งปอดขนาดเล็ก (NCI-H187) ทำให้อยู่ในสภาพแขวนลอย โดยเจือจางให้ได้ 6.7 x 104 cells / ml โดยทำในจาน 384 หลุม

2. เติมสารสกัด 5 ไมโครลิตร และสารแขวนลอย 45 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้อบความชื้น 5% CO_2 นาน 5 วัน

3. หลังจากนั้นเติมสารละลาย resazurin จำนวน 12.5 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในแต่ล่ะหลุม แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตรและ 590 นาโนเมตร โดยมี Ellipticine Tamoxifen และ Doxorubicin เป็นตัวควบคุมบวกและ DMSO 0.5% เป็นตัวควบคุมเชิงลบ คำนวณหาปริมาณเปอร์เซ็นต์ของ cytotoxicity โดยสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [1-(FU_T / FU_C)] \times 100$$

หมายเหตุ FU_T ค่าการดูดกลืนแสง จากเซลล์ที่ทดสอบ

FU_C ค่าการดูดกลืนแสง จาก 0.5% DMSO

2.3.1 เซลล์ไตปกติของลิง (Vero cell) ด้วยวิธีการตรวจหาโปรตีนเรืองแสงสีเขียว (Green fluorescent protein - GFP) (Hunt et al., 1999)

1. นำ DNA ของลิงของแอฟริกาที่มีลำดับเบส ATCC CCL-81 มียีน gfp จาก plasmid (pEGFP-N1, Clontech) โดยทำให้เซลล์เจือจางให้ได้ 3.3 x104 cells / ml

2. เติมสารสกัด 5 ไมโครลิตร เจือจางด้วย 45 ไมโครลิตรจาก DMSO 5% ในตู้อบความชื้น 5% CO_2 นาน 4 วัน

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 นาโนเมตรและ 535 นาโนเมตร

4. โดยมี Ellipticine เป็นตัวควบคุมบวกและ DMSO 0.5% เป็นตัวควบคุมเชิงลบ คำนวณหาปริมาณเปอร์เซ็นต์ของ cytotoxicity โดยสมการต่อไปนี้:

$$\% \text{ Cytotoxicity} = [1-(FU_T / FU_C)] \times 100$$

หมายเหตุ FU_T คือ ค่าการดูดกลืนแสง จากเซลล์ที่ทดสอบ

FU_C คือ ค่าการดูดกลืนแสง จาก 0.5% DMSO

2.4 การแปรรูปอาหารเพื่อสุขภาพ

นำข้าวโพด กล้วยน้ำว้า ถั่วลันเตา ผักคะน้า และผักโขม เฉพาะที่สกัดด้วยน้ำ มาแปรรูปเป็น น้ำสกัดสมุนไพร คุกกี้สมุนไพร ข้าวเกรียบ Cornflake Cookie (คุกกี้คอนเฟลก) และ Peanut Butter Crispy Rice Trets (ซีเรียลบรา) โดยมีรายละเอียด ดังภาคผนวก

2.5 การตรวจวิเคราะห์สารอาหาร จากการแปรรูปอาหารเพื่อสุขภาพ (AOAC, 2000)

2.5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม

ขั้นตอนเตรียมสารเคมีดังนี้

1. Conc. Sulfuric acid

2. Mix Catalyst (สารผสมระหว่าง copper sulfate: potassium sulfate อัตราส่วน 1:10)

3. Sodium hydroxide (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 40 โดยใช้ Sodium hydroxide 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. Hydrochloric (HCL) เข้มข้น 0.1 N

5. Boric acid เข้มข้นร้อยละ 4 เตรียมโดยต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริกลงไป 4.0 กรัม ต้มจนละลายหมด ทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลงแล้วจึงเติมน้ำ

6. Indicator เตรียมโดยใช้ (mixed indicator: methylred 0.1 กรัม : bromocresol green 0.1 กรัม ใน ethanol 100 ml)

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัม ใส่ลงใน Kjeldalh flask เติม Mixed catalyst: $CuSO_4$ 0.1 กรัม $NaSO_4$ 2 กรัม และ conc.H_2SO_4 25 กรัม

2. ย่อยบน heating mantle โดยให้ความร้อนอ่อนๆ จนกระทั่งหมดฟอง แล้วค่อยเพิ่มความร้อนอุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส จนกระทั่งสารละลายใสทิ้งไว้ให้เย็น

3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 10-15 ml นำหลอดย่อยมาต่อเข้ากับเครื่องกลั่น

4. เติม 40% NaOH 40-50 ml

5. นำ receiving flask ที่มี 4% boric acid อยู่ 20-25 ml และเติม indicator ให้เรียบร้อยแล้วมารองรับสารละลายที่กลั่นได้

6. กลั่นจนได้สารละลายประมาณ 25 ml

7. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 0.1 N HCl จนกระทั่งสีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอมชมพู

8. ทำ blank ตามข้อ 1-7 โดยไม่ต้องใส่ตัวอย่าง

9. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสมการ ต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B)\times N\times 1.4\times F}{Wt}$$

หมายเหตุ A คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank (มิลลิลิตร)

Wt คือ น้ำหนักของตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)

F คือ ค่าแฟคเตอร์

2.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. ใส่ขวดกลมสำหรับการหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำ หนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำ หนัก 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง

3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงใน Soxhlet เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดหา ไขมัน ประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

4. ประกอบอุปกรณ์ชุดกลั่นไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำ หล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทซ์ ให้ความร้อน

5. ปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

6. เมื่อครบ 6 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจาก Soxhlet ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจาก Soxhlet ลงในขวดก้นกลมจนหมด

7. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ

8. นำขวดหาไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

9. ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

10. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{W_1 \times 100}{W_2}$$

หมายเหตุ W_1 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างหลังอบ

2.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใย

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1 .ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม (ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) ใส่ขวดก้นกลมแล้วเติม H_2SO_4 1.25 % 200 ml

2. นำขวดก้นกลมไปต่อกับเครื่องวิเคราะห์หาเส้นใยที่มี condenser ควบคุมความเข้มข้นของสารละลายให้คงที่เป็นเวลา 30 นาที

3. นำสารละลายออกจากเครื่อง แล้วกรองตะกอนด้วยเครื่องบนผ้าลิกนินที่มี Buchner funnel ที่ต่อกับ Filtering flask

4. ขูดตะกอนออกจากผ้าลิกนินให้หมดและใส่ลงขวดก้นกลมอันเดิมเติมด่าง NaOH 1.25 % 200 ml ลงในขวดกนกลมและทำเช่นเดียวกับการเติม H_2SO_4 1.25 %

5. นำสารละลายมากรอง ล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดด่างและล้างด้วย ethanol ประมาณ 20-30 ml

6. ขูดตะกอนออจากผ้าลิกนินใส่ใน crucible

7. นำ crucible พร้อมตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 100 ℃ ทิ้งไว้ 1 คืน

8. นำ crucible ออกมาทิ้งให้เย็นและชังน้ำหนัก

9. นำ crucible พร้อมตะกอนไปเผาที่เตาเผาที่อุณหภูมิ 550-600 ℃ ประมาณ 2-3 ชั่วโมงจนตะกอนถูกเผาไปเป็นเถ้า

10. นำ crucible ออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccators แล้วชั่งน้ำหนัก นำมาคำนวณโดยใช้สมการดังนี้

$$\% \text{ เส้นใยอาหาร} = \frac{(A-B) \times 100}{W}$$

หมายเหตุ A คือ น้ำหนัก Crucible+ น้ำหนักกากที่ย่อยแล้วก่อนเผา

B คือ น้ำหนัก Crucible+ น้ำหนักเถ้าหลังเผา

W คือ น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทุกตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ คิดเป็นค่าเฉลี่ย ด้วยโปรแกรม อโนวา ดันแคน (Duncan’s test) ที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) ด้วยโปรแกรม SPSS