บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.11 วัตถุดิบ

พืชเจียวกู้หลานที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นใบเจียวกู้หลานาจากโครงการหลวงศูนย์แม่ทาเหนือ จังหวัดลำพูน

3.1.2 สารเคมี

1. น้ำกลั่น (Distillation Water)
2. เจลาติน (Gelatin)
3. กลูโคส (Glucose)
4. ดินขาว (Kaolin)
5. Indigro carmine
6. DNS reagent
7. เกลือ (Sodium Chloride: NaCl, Merck, Germany)
8. เอทานอล (Ethanol: C_2H_5OH, AR grade, Merck, England)
9. เมทานอล (Methanol: CH_3OH, AR grade, Merck, England)
10. ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether: $(C_2H_5)_2O$, AR grade, Lab-scan, Ireland)
11. เอ็น-บิวทานอล (n-Buthanol: $CH_3(CH_2)_3OH$, AR grade, Lab-scan, Ireland)
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide: NaOH, AR grade, Merck, England)
13. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid: H_2SO_4, AR grade, Merck, England)
14. ด่างทับทิม (Potassium permanganate: $KMnO_4$, AR grade, Merck, England)
15. เมทานอล (Methanol: CH_3OH), HPLC grade, Merck, England)
16. อะซีโตไนไตร์ (Acetronitrile: CH_3CN, HPLC grade, Lab-scan, Ireland)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

17. Gypenoside Rb_1 (Wilshire technologies, lnc Princeton, NJ)

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องแก้ว
2. คิวเวตต์แก้ว
3. เครื่องปั่น (Blender, Imarflex: IF-308, Thailand)
4. ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer, Sanyo: SF-C992NG, Italy)
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electronic analytical balance, Sartorius: A120S, Germany)
6. Sep-Pek C18 (Restex)
7. ตะแกรงร่อน ขนาด 50 mesh (Sive 50 mesh)
8. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร (Micropipette, Wiggen hauser, Germany)
9. ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)
10. กระป๋องหาความชื้น (Moisture can)
11. กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 เซนติเมตร (Whatman, England)
12. เครื่องกวนผสมแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate and Megnetic stirrer, Whatman: HPMS, England)
13. เตาไมโครเวฟ (Microwave oven, Sharp: R254, Thailand)
14. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert: 400, Germany)
15. เตาเผาเถ้า (Muffle furnace)
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, Gallenkamp, England)
17. โถดูดความชื้น (Desiccator)
18. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary Vacuum Evaporator, Buchi: V800, Switzerland)
19. เตาอบถาดหมุน (Tray dryer: สีทอง JR ริกกี้, Likhitchewan CO., LTD, Chiangmai, Thailand)
20. heat reflux extraction
21. High pressure (Food lab S-FL-850-9-W, Stansted Fluid power LTD, England)
22. ตู้ดูดควัน (Hood, Toplab Design and Technology, England)
23. Freeze dry (Labconco, America)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

24. เครื่อง High performance liquid chromatrography ของบริษัท Shimudsu Kyoto ประกอบด้วย Column oven (CTO-10A vp), Degasser (DGU-14A), Pump (LC-10AD vp), Diode array detector (SPD-M 10A vp), System controller (SCL-10A vp), Low pressure vale (FCV-10AL vp), Column Dimonsil18, 5μm 250x4.6 mm.

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างสมุนไพรเจียวกู้หลานที่ใช้ในการทดลอง นำเจียวกู้หลานที่ได้มาล้างด้วยน้ำสะอาด สะเด็ดน้ำ และทำให้แห้งโดยใช้เครื่องอบลมร้อนแบบถาดหมุน (สีทอง JR ริกกี้, Likhitchewan CO., LTD, Chiangmai, Thailand) อุณหภูมิ 50 ^{0}C เวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งมีความชื้นไม่เกิน 7% หลังจากนั้นนำมาบดและผ่านตะแกรงร่อนเบอร์ 50

3.2.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของสมุนไพร

3.2.2.1 ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

3.2.2.2 ปริมาณเถ้ารวม (AOAC, 2000)

3.2.2.3 ปริมาณแทนนิน (Pearson, 1981)

ชั่งชาบดละเอียด 5 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ต้มนาน 1 ชั่วโมง กรองผ่านสำลี แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้เข้ากันดี (เรียกว่าสารละลาย A) ปิเปตสารละลาย A มา 100 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายเจลาตินลงไป 50 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย acid sodium chloride เทใส่ใน flask ขนาดใหญ่ (400 มิลลิลิตร) เติมเกาลิน (Kaolin) ลงไป 20 กรัม เขย่านาน 15 นาที แล้วกรอง สารละลายที่ได้เรียกว่า สารละลาย B

ปิเปตสารละลาย A มา 10 มิลลิลิตร ใส่ใน flask เติมสารละลาย indigo carmine 25 มิลลิลิตร ปรับให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 750 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นนำสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต ความเข้มข้น 0.008 โมล่าร์ ใส่ในบิวเรต ค่อยๆหยดใส่ลงใน flask ครั้งละ 1 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เขย่าขณะทำการไตเตรชั่น สีจะค่อยๆเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองและสีชมพูอ่อน หยุดไตเตรตเมื่อได้สีชมพูอ่อน จดปริมาตรของสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาแนตที่ใช้ = A มิลลิลิตร

ปิเปตสารละลาย B มา 25 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Flask เติมสารละลาย indigo carmine 25 มิลลิลิตร ปรับให้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 750 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ไตเตรชั่นกับสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนต จนได้สีชมพูอ่อน จดปริมาตรของสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ใช้ = B มิลลิลิตร

ปริมาตรสารละลายโปแตสเซียมเปอร์แมงกาเนตที่ใช้ในการไตเตรชั่นกับแทนนิน = (A - 4.0) – (B - 4.5)

4.0 และ 4.5 เป็นค่า blank ของสารละลาย A และ B ตามลำดับ คำนวณหาปริมาณแทนนินต่อน้ำหนักแห้ง

3.2.2.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมด (James, 1995)

การหาน้ำตาลรีดิวซ์

ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ใส่ใน flask เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรแล้วนำไปต้มใน water bath 50 ^{0}C นาน 10 นาทีกรองด้วยกระดาษกรอง ล้างส่วนที่เหลือบนกระดาษกรองแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรใน Volumetric flask ดูดสารละลาย 1 มิลลิลิตร เติม DNS reagent 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มใน water bath 100 ^{0}C นาน 5 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำเย็นทันที จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม เติมกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1.5 โมลาร์จำนวน 10มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath 100 ^{0}C นาน 20 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำเย็นทันทีเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10% จำนวน 12 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร เติม DNS reagent 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้ม water bath 100 ^{0}C นาน 5 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำเย็นทันที ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.5 ปริมาณซาโปนินทั้งหมด (ดัดแปลงจากสถาบันวิจัยสมุนไพร, 2538 และ Kwon *et al*., 2003)

ชั่งผงสมุนไพรจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ แล้วเติม 80% เมทานอล จำนวน 200 มิลลิลิตร สกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดมาระเหยที่ 55 ^{0}C เพื่อระเหยเมทานอลออก จากนั้นนำสารสกัดมาสกัดไขมันออกด้วย diethyl ether หลังจากการสกัดใช้กรวยแยก ether ออก ส่วนสารสกัดที่ได้นำมาสกัดด้วย n-BuOH saturated with water 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยที่อุณหภูมิ 55 ^{0}C นำสารสกัดที่เหลือไปอบที่อุณหภูมิ 105 ^{0}C จนมีน้ำหนักที่คงที่จึงนำไปคำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณสารสกัดของซาโปนินทั้งหมด

3.2.2.6 ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด (ดัดแปลงจากสถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548 และ Kwon *et al*., 2003)

ชั่งผงสมุนไพรจำนวน 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ แล้วเติม 80% เมทานอลจำนวน 200 มิลลิลิตร สกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 นำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดนำมาระเหยที่ 55 ^{0}C เพื่อระเหยเมทานอลออก จากนั้นนำสารสกัดมาสกัดไขมันออกด้วย diethyl ether หลังจากการสกัดใช้กรวยแยก ether ออก ส่วนสารสกัดที่ได้นำมาสกัดด้วย n-BuOH saturated with water 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยที่อุณหภูมิ 55 ^{0}C ส่วนที่เหลือจากการระเหยนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร บรรจุลงใน Sep-Pak C-18 ล้างส่วนที่ไม่ต้องการใน Sep-Pak C-18 ออก ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร จากนั้นล้างด้วย 50% เมทานอล จำนวน 5 มิลลิลิตร และ 60% เมทานอลจำนวน 2 มิลลิลิตรตามลำดับ และในขั้นตอนสุดท้ายให้ล้างด้วยเมทานอล จำนวน 3 มิลลิลิตร นำสารละลายเมทานอลดังกล่าวใส่ในขวดแก้วที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วระเหยจนแห้งโดยใช้เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณจีเพนโนไซด์รวมจากน้ำหนักของผงสมุนไพรที่ปราศจากความชื้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.7 การวิเคราะห์ Saponin ในเจียวกู้หลานโดย High performance Liquid Chromatography (HPLC) (ดัดแปลงจาก Wu *et al*., 2001)

วิเคราะห์ Saponin ในเจียวกู้หลานโดย High performance Liquid Chromatography (HPLC) ของ Shimadsu, Kyoto, Japan เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน จินเซนโนไซด์ Rb_1 (Wilshire technologies, lnc Princeton, NJ)

3.2.3 การศึกษาวิธีการสกัด ซาโปนิน ด้วยน้ำ และเอทานอล โดยวิธีดั้งเดิม

3.2.3.1. การศึกษาวิธีการสกัด ซาโปนิน ด้วยน้ำ

ชั่งผงสมุนไพรเจียวกู้หลานจำนวน 10 กรัม ลงในบีกเกอร์เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร นำไปต้มที่ 100 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ (Circosta *et al*., 2005)

3.2.3.2. การศึกษาวิธีการสกัด ซาโปนิน ด้วยเอทานอล

ชั่งผงสมุนไพรเจียวกู้หลานจำนวน 10 กรัม ลงใน Flask เติมเอทานอล 95% จำนวน 200 มิลลิลิตร (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2538) นำไปสกัดด้วยระบบ heat reflux เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ (ดัดแปลงจาก Kwon *et al*., 2003)

การวิเคราะห์

- ปริมาณผลผลิต ที่ได้จากการสกัด
- ปริมาณซาโปนิน ทั้งหมด (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548)
- ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548)
- ปริมาณจินเซนโนไซด์ Rb1 โดยใช้ HPLC (ดัดแปลงจาก Wu *et al*., 2001)

3.2.4 การศึกษาวิธีการสกัดด้วยน้ำ เอทานอล โดยใช้เทคนิคไมโครเวฟ

3.2.4.1 การศึกษาวิธีการสกัดซาโปนินด้วยน้ำ โดยใช้เทคนิคไมโครเวฟ (Kwon *et al*., 2003 and Circosta *et al*., 2005)

ศึกษาวิธีการสกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟโดยใช้น้ำ วางแผนการทดลองแบบ Central composite design โดยศึกษา 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยอัตราส่วนของตัวอย่าง: น้ำ เป็น 5, 15 และ 25%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เวลาในการสกัด 1, 3 และ 5 นาที โดยใช้เตาไมโครเวฟ (Microwave oven, Sharp: R254) 800 W หาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Optimization วิธี Response Surface methodology

3.2.4.2 การศึกษาวิธีการสกัดซาโปนินด้วยเอทานอล โดยใช้เทคนิคไมโครเวฟ

ในการศึกษาพัฒนาวิธีการสกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟโดยใช้เอทานอล เลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด ในการศึกษาการสกัดซาโปนินด้วยน้ำโดยใช้เทคนิคไมโครเวฟวางแผนการทดลองแบบ Central composite design โดยศึกษา 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยความเข้มข้นของเอทานอล 40, 60 และ 80% เวลาในการสกัด 1, 3 และ 5 นาทีหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Optimization วิธี Response Surface methodology (Kwon *et al*., 2003)

การวิเคราะห์

- ปริมาณผลผลิตที่ได้จากการสกัด
- ปริมาณซาโปนินทั้งหมด (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548)
- ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2548)
- ปริมาณจินเซนโนไซด์ Rb1 โดยใช้ HPLC (ดัดแปลงจาก Wu *et al*., 2001)

3.2.5 การศึกษาวิธีการสกัดซาโปนินโดยใช้เทคนิคความดันสูงยิ่ง (High pressure technique)

การสกัดด้วยเทคนิคความดันสูงยิ่ง วางแผนการทดลองแบบ Central composite design โดยศึกษา 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยอัตราส่วน ตัวอย่าง: น้ำ 5, 15 และ 25% และความดันในการสกัด 400, 500 และ 600 MPa ใช้อุณหภูมิที่ 30 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที หาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Optimization วิธี Response Surface methodology (Zhang *et al*., 2006)

การวิเคราะห์

- ปริมาณผลผลิตที่ได้จากการสกัด
- ปริมาณซาโปนินทั้งหมด (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2538)
- ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2538)
- ปริมาณจินเซนโนไซด์ Rb1 โดยใช้ HPLC (ดัดแปลงจาก Wu *et al*., 2001)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design แบบ Face center (3^2 Factorial design + 3 cp) ศึกษา 2 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาโมเดลโดยวิธี Regression ในลักษณะ Quadratic model ดังสมการ

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X^2_1 + b_{22}X^2_2$$

โดยที่ Y คือผลตอบสนอง ได้แก่ ผลลิต ปริมาณซาโปนินทั้งหมด ปริมาณจีเพนโนไซด์ทั้งหมด และปริมาณ จินเซนโนไซด์ Rb1

X_1, X_2 คือตัวแปรอิสระหรือปัจจัยที่ศึกษา

b_0 คือค่าคงที่ของสมการ

b_1, b_2 คือสัมประสิทธิ์ของ Linear effects

b_{11}, b_{22} คือสัมประสิทธิ์ของ Quadratic effects

b_{12} คือสัมประสิทธิ์ของ Interaction effects

จากโมเดลผลตอบสนองทั้งหมดจะทำ Response surface graphs เพื่อดูพื้นผิวตอบสนอง โดยใช้โปรแกรม Design-Expert Program (Design-Expert version 6.0.10, Stat-Ease Inc, MN) เพื่อหา Optimization ของค่าสูงสุดในแต่ละผลตอบสนอง ให้ได้สภาวะการสกัดที่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved