บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

1. ผักแส้ว
2. ผักกระถิน
3. ผักคาวตอง

ผักทั้งสามชนิดซื้อจากตลาดสด บ้านกาดเมฆ ในอำเภอเมือง จังหวัดลำปาง ช่วงเดือนมิถุนายน

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในสารสกัดป้องกันการหืน

1. 2,2 – ไดฟีนิล – พิคริลไฮดราซิล (2,2 – diphenyl – 1 – picrylhydrazyl (DPPH radical) ; $C_{18}H_{12}N_5O_6$, Fluka, USA.)
2. เมทานอล (Methanol ; CH_3OH, Merck, Germany)
3. แอซีโทน (Acetone ; C_3H_6O, Merck, Germany)
4. เอทิลแอซีเตต (Ethyl acetate ; $C_4H_8O_2$, Merck, Germany)
5. เอทานอล (Ethyl alcohol ; C_2H_5OH, Merck, Germany)
6. บิทิลเลเตดไฮดรอกชีทอลูอีน (Butylated hydroxyl toluene ; BHT, Food grade, Thailand)
7. บิวทิลเลเตดไฮดรอกชีแอนิโซล (butylated hydroxyl anisole ; BHA, Food grade, Thailand)
8. แก๊สไนโตรเจน (Nitrogen; N_2)

3.1.2 อุปกรณ์

1. เครื่องสกัดซอล์กเลต (soxhlet apparatus ; Büchi B-811, Switzerland)
2. เครื่องระเหยสุญญากาศ (vacuum rotary evaporator ; Buchi RII, Switzerland)
3. เครื่องกรองสุญญากาศ (filter-vacuum pump; Büchi, Switzerland)
4. เครื่องปั่นผสม (blender; National MX897GM, Malaysia)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (balance; Mettler torado AG204 ; Switzerland)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 110 มิลลิเมตร (filter paper No.1 ; Whatman)
7. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer ; Model UV 6001 Shimadzu, Japan)
8. เครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟี- แมสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (GC-MS, Agilent, Germany)
9. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (high Incubator Labec; Laboratory equipment PTY, Germany)
10. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator; Contherm, New Zealand)
11. ขวดสีชา
12. ฟอล์ยอะลูมิเนียม (aluminum foil)
13. เครื่องทำแห้งเยือกแข็ง (freezing drier; Freezone 4.5, England)
14. ขวดไวแอล (vial)

3.2 วิธีการทดลอง

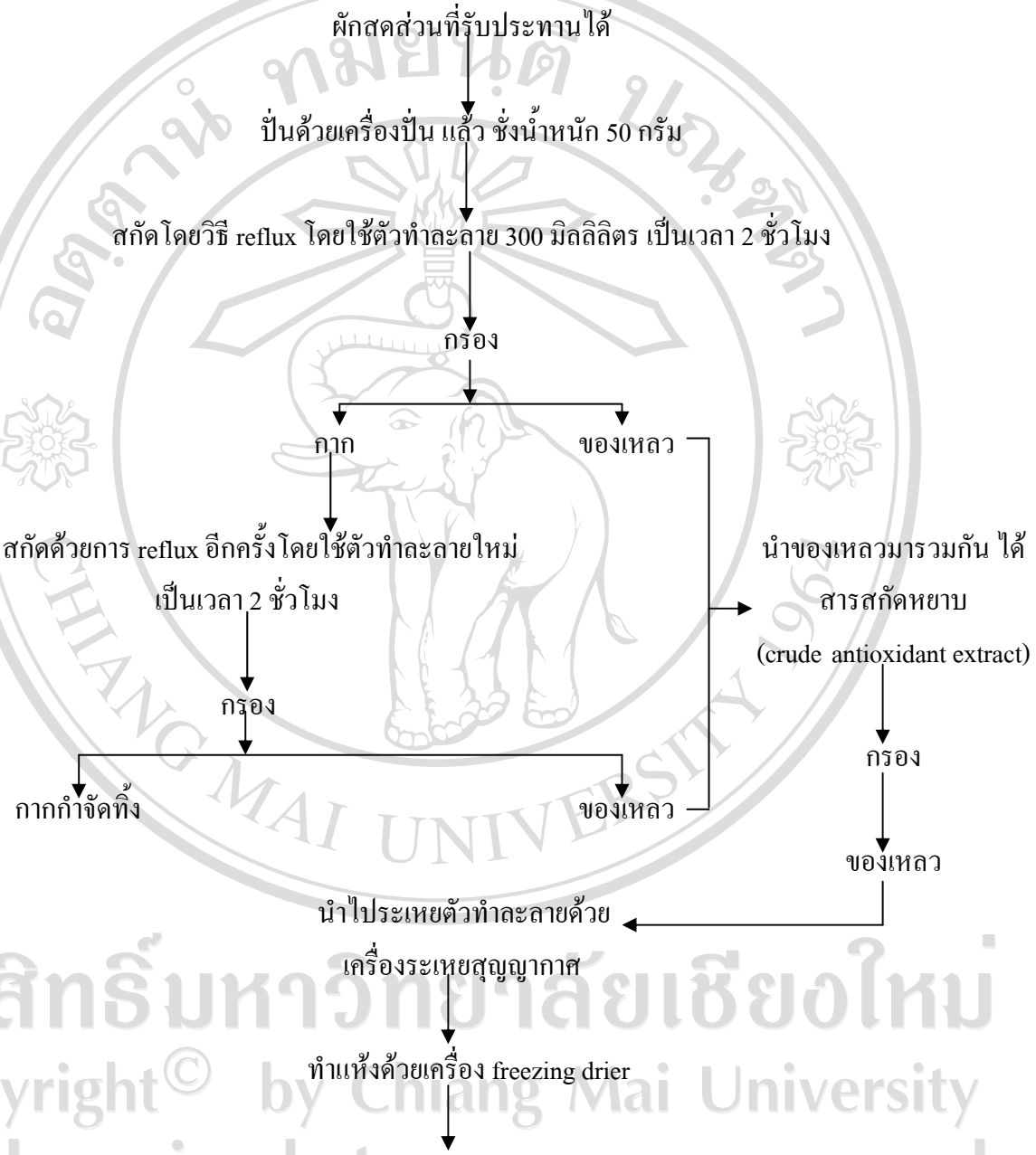
นำส่วนที่รับประทานได้ (ใบ และก้านอ่อน) ผักพื้นบ้าน 3 ชนิด คือ ผักแส้ว ผักกระถิน และผักคาวตอง ที่เก็บมาไม่เกิน 1 นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา นำเอาผักที่ผ่านการล้างผึ่งให้สะเด็ดน้ำบนตะแกรง แล้วนำมาศึกษา โดยมีขั้นตอนการทดลองดังต่อไปนี้

3.2.1 การหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้าน

นำตัวอย่างผักสดในส่วนที่รับประทานได้มาปั่นให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง จำนวน 50 กรัม สกัดโดยวิธี refluxing ด้วยเครื่องสกัดแบบ Soxhlet และใช้ตัวทำละลายในการสกัด คือ เอทิลแอซีเตต แอซีโทน และเมทานอล ปริมาตร 300 มิลลิลิตร สกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองเก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้ แล้วทำการ reflux ส่วนที่เป็นกากสกัดด้วยตัวทำละลายใหม่ปริมาตร 300 มิลลิลิตร อีกครั้ง (Murray *et al*., 2004) กรองและเก็บส่วนที่เป็นสารละลายมารวมกันกับสารละลายที่กรองครั้งแรก นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาบที่อยู่ในขวดก้นกลม หุ้มด้วยกระดาษฟอล์ย จากนั้นนำไปดูดความชื้นและตัวทำละลายที่ค้างอยู่ในสารสกัดด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งเป็นเวลา 2 วัน เมื่อได้สารสกัดที่ปราศจากความชื้นและตัวทำละลายแล้ว เก็บสารสกัดในขวดไวแอลที่หุ้มด้วยกระดาษฟอล์ย นำสารสกัดที่ได้ ความเข้มข้น100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1000 มิลลิกรัมต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิตร ไปศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารสกัด วิธีการสกัดแสดงดังภาพที่ 3.1



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 3.1 การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้าน
ที่มา : ดัดแปลงจาก Murray *et al*., 2004 และ พรทวี, 2548

3.2.2 ศึกษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี Spectrophotometer assay : Radical scavenging activity on DPPH Radical โดยนำสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านที่ได้จากข้อ 3.2.1 มาทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที และนำสารละลายมาวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณค่า ร้อยละของการยับยั้ง (% Inhibition) (Mao *et al*., 2006) ดังสมการที่ 3.1

$$\text{ร้อยละของการยับยั้ง} = \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}} \times 100 \quad \text{---------- (3.1)}$$

$A_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม

A_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

หาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบในการใช้ต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ BHT และ BHA

3.3 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารสกัดจากผักพื้นบ้าน

คัดเลือกสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดของผักแต่ละชนิด และความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยพิจารณาจาก ร้อยละของการยับยั้งสูงที่สุดและศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารสกัด 3 ปัจจัย คือ แสง อากาศ และอุณหภูมิ ดังนี้

3.3.1 ศึกษาผลของแสงที่มีต่อความคงตัวของสารสกัด

นำสารสกัดมาเก็บรักษาในภาชนะแก้วแบบใสและแบบทึบแสง โดยปิดปากภาชนะเพื่อไม่ให้สัมผัสอากาศและเติมก๊าซไนโตรเจน เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (32±1 °C) เป็นเวลา 20 วัน โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระทุกๆ 5 วันจนครบ 20 วัน เพื่อศึกษาความคงตัวของสารสกัดต่อแสงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา วิเคราะห์สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Spectrophotometer assay : Radical scavenging activity on DPPH Radical หาร้อยละการยับยั้งตามข้อ 3.2.2 (พรทวี, 2548)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 ศึกษาผลของอากาศที่มีต่อความคงตัวของสารสกัด

นำสารสกัดมาศึกษาผลของอากาศต่อความคงตัว โดยเปรียบเทียบสารสกัดที่สัมผัสและไม่สัมผัสกับอากาศ ในภาชนะบรรจุแบบทึบแสง สารสกัดในภาชนะที่ไม่สัมผัสอากาศจะเติมด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อกำจัดออกซิเจนออกก่อน แล้วทำการปิดปากภาชนะ นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (32±1 ^{o}C) เป็นเวลา 20 วัน โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระทุกๆ 5 วัน จนครบ 20 วัน เพื่อศึกษาความคงตัวของสารสกัดต่ออากาศตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทำการวิเคราะห์สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Spectrophotometer assay : Radical scavenging activity on DPPH Radical หาร้อยละการยับยั้งตามข้อ 3.2.2 (พรทวี, 2548)

3.3.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของสารสกัด

นำสารสกัดมาศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัว โดยเปรียบเทียบสารสกัดที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (32±1 ^{o}C) และที่อุณหภูมิ 60±1 ^{o}C เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็นหนึ่งเท่าของอุณหภูมิห้อง โดยเก็บในภาชนะแบบทึบแสงและปิดสนิทเป็นเวลา 20 วัน โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสมบัติการต้านอนุมูลอิสระทุกๆ 5 วันจนครบ 20 วัน เพื่อศึกษาความคงตัวของสารสกัดต่ออุณหภูมิตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทำการวิเคราะห์หาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Spectrophotometer assay : Radical scavenging activity on DPPH Radical หาร้อยละการยับยั้งตามข้อ 3.2.2 (พรทวี, 2548)

3.4 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากผัก 3 ชนิด

นำสารสกัดจากผักพื้นบ้านทั้ง 3 ชนิด คือ ผักแส้ว ผักกระถิน และผักคาวตอง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง แก๊สโครมาโทรกราฟี-แมสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Gas chromatography-Mass spectrophotometer, GC-MS) สภาวะของเครื่อง GC-MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ GC detector ชนิด flame ionization (FID) ใช้ คอลัมน์ชนิด capillary column (HP-5) ขนาด 50×0.20 มิลลิเมตร อุณหภูมิในการวิเคราะห์ คือ อุณหภูมิตั้งเป็นแบบโปรแกรม โดยใช้อุณหภูมิที่ 50^{O}C อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิคือ 5^{O}C ต่อนาที ถึง 150^{O}C นาน 2 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจาก 150^{O}C อัตราการเพิ่ม 10^{O}C ต่อนาที เป็น 250^{O}C นาน 30 นาที ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สพา อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที (Garcia *et al*., 2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved