บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.1 เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis Spectrophotometer, G10S, Thermo Scientific, China)

3.1.2 เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนสุญญากาศ (Vacuum rotary evaporator, Buchi, China)

3.1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH mater, Hanna Hi 9321, China)

3.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorious, CPA3245, England)

3.1.5 ไมโครปิเปต (Micropipette, Rainin Instrument, LLC, METTLER TOLEDO Company, USA)

3.1.6 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)

3.1.7 หลอดทดลอง (Test tube)

3.1.8 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.1.9 บีกเกอร์ (Beaker)

3.1.10 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

3.3.11 กระดาษกรองเบอร์ 5 (Whatman No.5)

3.1.12 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

3.1.13 อลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil)

3.2 สารเคมี

3.2.1 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4, Analytical Reagent Grade, La Jota, Spain)

3.2 .2 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium dihydrogen phosphate, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, Analytical Reagent Grade, Ajax Finechem, Australia)

3.2.3 เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase, 5 kU Sigma-Aldrich, USA)

3.2.4 แซนทีน (Xanthine, $C_5H_4N_4O_2$, Sigma-Aldrich, China)

3.2.5 อัลโลพิวรินอล (Allopurinol, $C_5H_4N_4O$, Laboratory Reagent Grade, USA)

3.2.6 เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH, Analytical Reagent Grade, Merck, Germany)

3.2.7 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl, Analytical Reagent Grade, Ajax Finechem, Australia)

3.2.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH, Analytical Reagent Grade, Ajax Finechem, Australia)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.2.9 เฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$, Laboratory Reagent Grade, Ajax Finechem, Australia)

3.2.10 อลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminium chloride, $AlCl_3$, Analytical Reagent Grade, Ajax Finechem, Australia)

3.2.11 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4, Chemikit, Commercial Grade, Thailand)

3.2.12 ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH_2Cl_2, Chemikit, Commercial Grade, Thailand)

3.2.13 แอมโมเนีย (Ammonia, NH_3, Chemikit, Commercial Grade, Thailand)

3.2.14 ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether, $(C_2H_5)_2O$, Panreac Quimica SAU, Commercial Grade, EU)

3.2.15 ลวดแมกนีเซียม (Magnesium wire, Mg, Chemikit, Commercial Grade, Thailand)

3.2.16 กรดอะซิติก (Acetic acid, CH_3COOH, Chemikit, Commercial Grade, Thailand)

3.2.17 อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile, CH_3CN, Burdick & Jackson, HPLC Grade, USA)

3.2.18 น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, H_2O, Burdick & Jackson, HPLC Grade, USA)

3.2.19 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, $(CH_3)_2SO$, Fisher Scientific, Analytical Grade, UK)

3.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ (pH 7.5)

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต หนัก 2.3636 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต หนัก 1.1521 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรประมาณ 500 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ 7.5

3.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแซนทีนความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลายแซนทีนเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งแซนทีน หนัก 0.0570 กรัม ละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ เล็กน้อย แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 25.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.5) ให้ได้ปริมาตร 25.00 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายแซนทีนให้ได้ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ โดย

ปิเปตต์สารละลายแซนทีนเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50.00 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.5) ให้ได้ปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร

3.3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานอัลโลพิวรินอลความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งอัลโลพิวรินอลหนัก 0.050 กรัม ละลายด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์เล็กน้อย ถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 50.00 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 7.5) ให้ได้ปริมาตร 50.00 มิลลิลิตร

3.3.4 การเตรียมสารละลายเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสความเข้มข้น 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เตรียม สารละลายเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยทำการละลายเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น0.05 โมลาร์ (pH 7.5) ที่เย็นปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็น

3.3.5 การเตรียมสารละลายอลูมิเนียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร

ชั่งอลูมิเนียมคลอไรด์หนัก 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำเล็กน้อย จากนั้นถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 10.00 มิลลิลิตร

3.3.6 การเตรียมสารละลายเฟอริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร

ชั่งเฟอริกคลอไรด์หนัก 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำเล็กน้อย จากนั้นถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10.00 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร

3.3.7 การเตรียมน้ำยาตราเจนดอร์ฟ

ละลายสารต่อไปนี้ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ได้แก่ บิสมัตซับไนเตรต 8 กรัม กรดไนตริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมไอโอไดด์ 27.2 กรัม

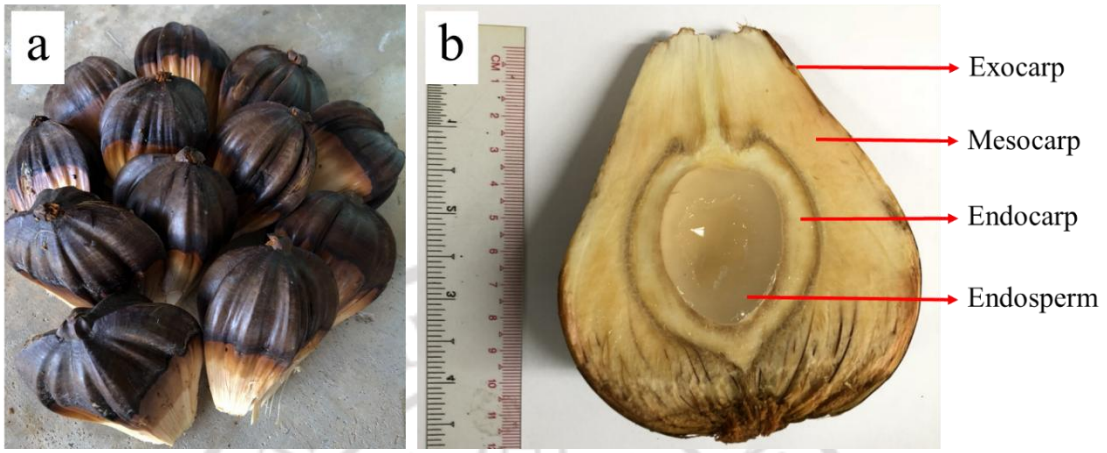
3.4 การเก็บตัวอย่าง

ในงานวิจัยนี้จะทำการวิเคราะห์ผลจากในส่วนของเปลือกแข็ง เปลือกอ่อน ส่วนเนื้อ และทั้งผล ดังนั้นจะเลือกเก็บผลจากในระยะสุกที่มีอายุประมาณ 4 เดือน เพื่อจะได้ส่วนของเนื้อผลจากในระยะที่รับประทานได้มาใช้ในการวิเคราะห์ อีกทั้งงานนี้มีเป้าหมายสำคัญอีกข้อหนึ่ง คือการใช้ประโยชน์จากเปลือกผลจากเหลือทิ้งหลังจากใช้ส่วนเนื้อในการบริโภคไปแล้ว โดยการเก็บตัวอย่างจะ ทำการสุ่มเก็บผลจากช่วงเดือนมกราคม ในพื้นที่ตำบลคลองขวาง อำเภอเมือง จังหวัดตราด

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.5 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดผลจาก

นำผลจากมาล้างให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง แบ่งผลจากออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ ผลจากทั้งผล ดังภาพที่ 3.1(a) ส่วนเปลือกแข็ง มีสีน้ำตาลเข้ม (Exocarp + Mesocarp) ส่วนเปลือกอ่อน มีสีน้ำตาลอ่อน (Endocarp) และส่วนเนื้อมีสีขาวขุ่น (Endosperm) แสดงดังภาพที่ 3.1(b)



ภาพที่ 3.1 (a) ผลจากทั้งผล (b) การแบ่งส่วนต่าง ๆ ของผลจาก

ทำแต่ละส่วนให้ละเอียดด้วยการหั่น แล้วชั่งน้ำหนักตัวอย่างผลจากส่วนต่าง ๆ ทั้ง 4 ส่วน ที่อัตราส่วนของน้ำหนักตัวอย่างต่อปริมาตรของตัวทำละลาย 1 ต่อ 3 (กรัมต่อมิลลิลิตร) บันทึกน้ำหนักที่ใช้ โดยตัวอย่างทั้ง 4 ส่วน ได้ทำเป็น 3 ชุด สำหรับการทดลอง ดังนี้

ชุดที่ 1 การสกัดด้วยน้ำร้อน โดยต้มน้ำที่อุณหภูมิ 60±1 องศาเซลเซียส แล้วนำตัวอย่างแต่ละส่วนมาต้มในน้ำร้อน

ชุดที่ 2 การสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง (27±1 องศาเซลเซียส) โดยนำแต่ละส่วนของผลจากมาแช่น้ำจนท่วม

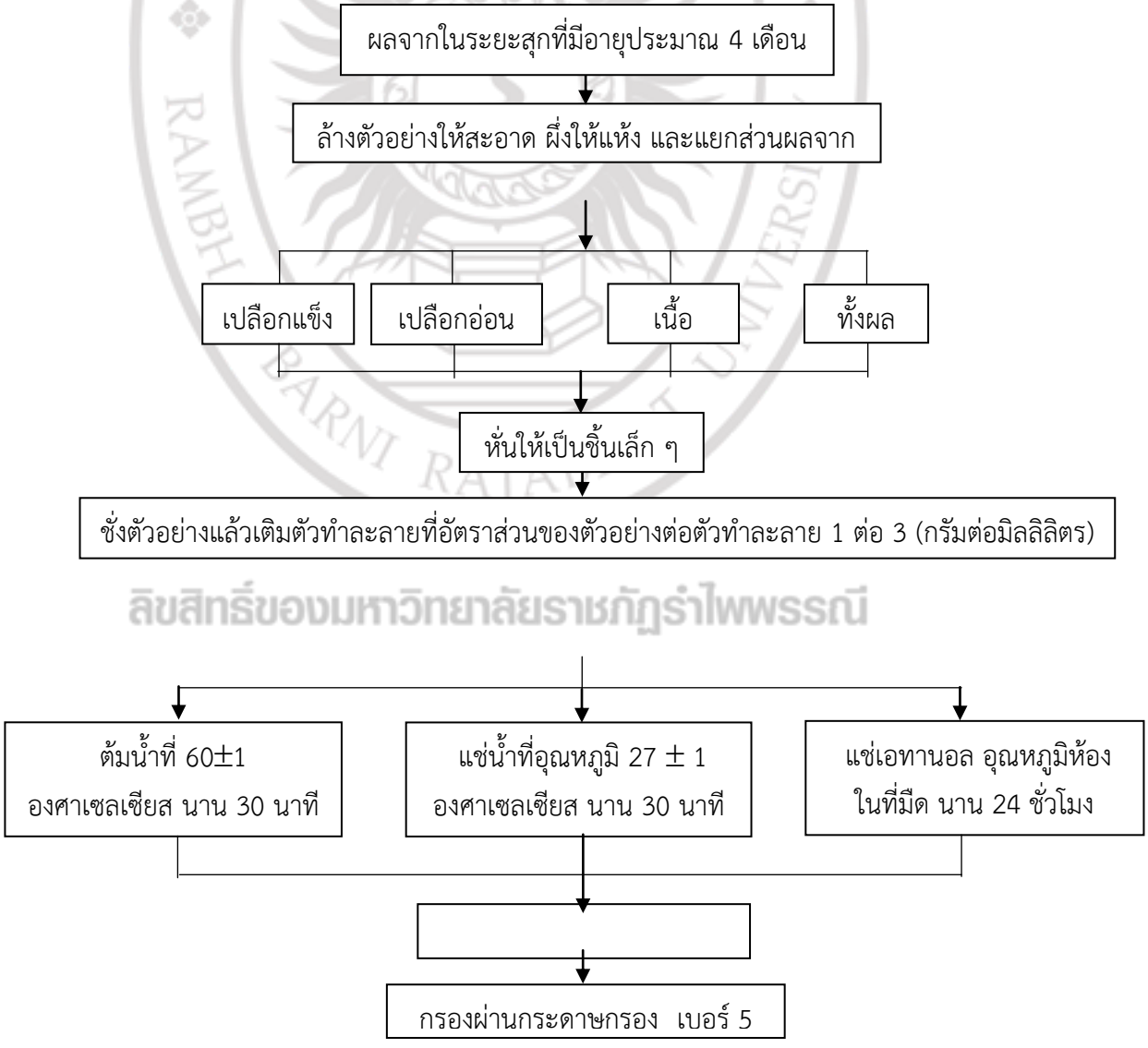
ชุดที่ 3 การสกัดด้วยเอทานอล โดยนำแต่ละส่วนของผลจากมาแช่เอทานอลจนท่วม

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

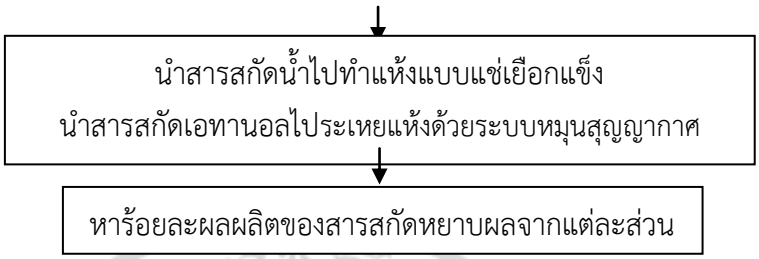
ชุดที่ 1 และ 2 ใช้ เวลาในการสกัดหรือต้ม ที่ 30 นาที โดยอิงจากภูมิปัญญาชาวบ้าน จังหวัดตราดที่ใช้เวลาในการต้มผลจากประมาณ 30 นาที แล้วนำน้ำมาดื่มกินเพื่อลดอาการปวด ข้อ ส่วนชุดที่ 3 ตั้งทิ้งไว้นาน 1 วัน ในที่มืด

จากนั้นนำมากรองแยกส่วนกากออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองซ้ำด้วยกระดาษกรองเบอร์ 5 นำสารสกัดน้ำที่ได้ไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) ส่วนสารสกัดจากเอทานอลจะนำไปทำการระเหยแห้งเอาตัวทำละลายออกเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบด้วยเครื่อง ระเหยแห้งด้วยระบบหมุน

สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งจะได้สารสกัดหยาบทั้งหมดรวม 12 ตัวอย่าง ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและการสกัด แสดงดังภาพที่ 3.2



ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของผลจาก

3.6 การตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น 8 ชนิด คือ สารประกอบฟีนอลิก แอลคา - ลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ ซาโปนิน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ และอิริดอยด์ไกลโค - ไซด์ วิธีการตรวจสอบดังนี้ (สุนิษา สุวรรณเจริญ และคณะ, 2560 : หน้า 521-530)

3.6.1 การตรวจสอบฟีนอลิก

ชั่งสารสกัดหยาบ 0.04 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่น แล้วเติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร 2-3 หยด ลงไปในของเหลว หากปรากฏสีเขียวปนดำ เขียวปน น้ำตาล ดำปนน้ำตาล ม่วง หรือน้ำเงินปนดำ แสดงว่าพบสารประกอบฟีนอลิก

3.6.2 การตรวจสอบแอลคาลอยด์

ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ร้อยละ 2 โดยปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นประมาณ 2-3 นาที แล้วนำไปหยดน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's reagent) หากปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.6.3 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์

ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม สกัดสีของสารสกัดออกด้วยไดเอทิลอีเทอร์ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ละลายสารสกัดส่วนที่เหลือด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 โดยปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 2-3 ชิ้น นำไปต้ม และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น หากได้สารละลายสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

3.6.4 การตรวจสอบแอนทราควิโนน

ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปอุ่น 5 นาที แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 2-3 หยด หากเกิดสีชมพูถึงแดงในชั้นด่างแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

3.6.5 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์

ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม สกัดสีของสารสกัดออกด้วยไดเอทิลอีเทอร์ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติมไดคลอโรมีเทน 2 มิลลิลิตร เขย่า และค่อย ๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลายแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

3.6.6 การตรวจสอบซาโปนิน

ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด แล้วนำมาเติมน้ำกลั่น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟองเกิดขึ้นนาน 30 นาที แสดงว่าพบซาโปนิน

3.6.7 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ส่วน ตามโครงสร้างพื้นฐานของคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ คือ ส่วนสเตียรอยด์ และส่วนน้ำตาลดีออกซี การทดสอบทำได้ดังนี้ ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม สกัดสีออกด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ครั้งละ 5 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ละลายสารสกัดด้วย 80% เอทานอล ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann test) โดยการเติมกรดแกเชียลอะซิติก 3 หยด และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 หยด ถ้าปรากฏสีน้ำเงิน หรือน้ำเงินเขียว แสดงว่าพบสเตียรอยด์ และทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซีด้วยการทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller-Kiliani test) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะซิติก 1 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ประมาณ 1-2 หยด ผสมให้เข้ากันเอียงหลอดทดลอง ค่อย ๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ลงไปตามผนังด้านในของหลอดทดลองให้เกิดการแยกชั้น หากปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลแดงบริเวณรอยต่อระหว่างสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบน้ำตาลดีออกซี

3.6.8 การตรวจสอบอิริดอยด์ไกลโคไซด์

ชั่งสารสกัด 0.02 กรัม เติมกรดอะซีติก 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย คอปเปอร์ (II) ซัลเฟตร้อยละ 2 โดยปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายกลายเป็นสีน้ำเงินหรือสีน้ำตาล แสดงว่าพบอิริดอยด์ไกลโคไซด์

3.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสในสารสกัด ผลจากแต่ละส่วน ทำโดยวิธีที่ปรับมาจากเอกสารอ้างอิง (Owen & Johns, 1999 : pp 149-160) ขั้นตอนการทดสอบทำโดยผสมสารสกัดตัวอย่างช่วงความเข้มข้น 0.16 – 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร 0.15 มิลลิ-โมลาร์ แซนทีน 300 ไมโครลิตร สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ (pH 7.5) 550 ไมโครลิตร และเติม 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส 50 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างสารสกัดในช่วง 0.016 – 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ผสมแล้วไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร บันทึกผลที่เวลาเริ่มต้นปฏิกิริยา และที่เวลาผ่านไป 5 นาที ในการทดลองนี้ใช้สารละลายมาตรฐานอัลโลพิวรินอลเป็นตัวควบคุมเชิงบวกช่วงความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รายละเอียดการผสมสาร แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดการผสมสารละลายสำหรับทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

รายการ	**ตัวควบคุม (ไมโครลิตร)**	**ตัวอย่าง (ไมโครลิตร)**
สารละลายตัวอย่าง	-	100
ตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายตัวอย่าง	100	-
สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH เท่ากับ 7.5) เข้มข้น 0.05 โมลาร์	550	550
สารละลายแซนทีนเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์	300	300
สารละลายเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส 0.1 ยูนิต	50	50

ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปทำการคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (%Inhibition) มีสูตรการคำนวณดังสมการที่ (1) ดังนี้

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}})}{\Delta A_{\text{control}}} \times 100 \qquad (1)$$

โดยที่ $\triangle A_{control}$ = ผลต่างของการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมที่เวลาเริ่มต้นถึงเวลาที่ 5 นาที

$\triangle A_{sample}$ = ผลต่างของการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้นถึงเวลาที่ 5 นาที

จากนั้นนำค่า %Inhibition ที่ได้ ไปหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิ - เดสได้ร้อยละ 50) โดยทำการพล็อตกราฟระหว่าง %Inhibition และความเข้มข้นของตัวอย่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อได้สมการเส้นตรง ($y = mx + c$) แล้วแทนค่า y เท่ากับ 50 เพื่อแก้สมการหาค่า x ซึ่งคือค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสได้ร้อยละ 50

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี