บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ

1. เครื่องระเหยสูญญากาศ (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi, R-124, Switzerland
2. เครื่องทำให้แห้งที่จุดเยือกแข็ง (Freeze dryer) ยี่ห้อ STS systems รุ่น FD 3-55D-MP
3. คูลเลอร์ (Recirculating chiller) ยี่ห้อ Buchi, B-740, Switzerland
4. ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) ยี่ห้อ Buchi, B-169 Vacuum system, Switzerland
5. เตาหลุมให้ความร้อน (Heating mantle) ยี่ห้อ Boeco, Heating mantles KM-ME, Germany
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert
7. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (2 Digit analytical balance) ยี่ห้อ Sartorious รุ่น CP 3202 S
8. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4 Digit analytical balance) ยี่ห้อ Sartorious รุ่น BP 210 S
9. เครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ (Microplate reader) ยี่ห้อ Metertech, Accureader M965, Taiwan
10. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) ขนาด 20 200 และ 1000 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Eppendorf ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. ปิเปตหลายช่อง (Multichannel pipette) ขนาด 20 ไมโครลิตร รุ่น Rainin ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. เครื่องอัลตราไวโอเลต วิซิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) รุ่น T60 UNNIS
13. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Hiraymma รุ่น HA-30ML
14. เครื่องอบความร้อนแห้ง (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น 600
15. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Issco รุ่น BV 124
16. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Jenway

สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane, C_6H_{14}) Com grade, ยูแอนด์วี โฮลดิ้ง (ไทยแลนด์) จำกัด
2. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane, CH_2Cl_2) Com grade, ยูแอนด์วี โฮลดิ้ง (ไทยแลนด์) จำกัด
3. เมทานอล (Methanol, CH_3OH) Com grade, ACl labscan
4. ทวีน 80 (Tween 80, $C_{64}H_{124}O_{26}$) AR grade, Chemikit limited
5. โฟลิน-ไซโอแคลทู รีเอเจนต์ (Folin Ciocalteu's reagent) AR grade, Himedia
6. สารอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, $C_{18}H_{12}N_5O_6$) AR grade, Alfa aesar
7. กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid, $C_6H_8O_6$) AR grade, Fluka
8. บิวทิลเลดเตด ไฮดรอกซีโทลูอีน (Butylated hydroxytoluene, BHT) AR grade
9. อนุมูลอิสระเอบีทีเอส (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$) AR grade
10. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3) Com grade, Chemikit limited partnership
11. ยาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (Gentamicin) Com grade, Aenta 4
12. เคซีน (Acid digest of casein) Lab grade, BactoTM Tryptone
13. สตาร์ช (Starch) Lab grade, Uniivar
14. ผงวุ้นสำหรับเลี้ยงเชื้อ (Agar power) Lab grade
15. แบเรียม คลอไรด์ (Barium chloride, $BaCl_2$) AR Grade
16. กรดซันฟิวริก (Sulphuric acid, H_2SO_4) AR grade, Chemikit limited partnership
17. กรดแกลิก (Gallic acid hydrate) AR grade, TCI

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดชาเลือดมังกรด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

1.1 นำตัวอย่างชาเลือดมังกรหนักประมาณ 200 กรัม มาบรรจุลงในถุงผ้าขาวบาง แล้วนำมาสกัดด้วยเฮกเซนด้วยวิธีการแช่ เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากนั้นให้นำของเหลวที่ได้จากการสกัดมากรองโดยใช้สำลี แล้วนำของเหลวที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จะได้ส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของชาเลือดมังกร

1.2 นำกากชาเลือดมังกรจากข้อ 1.1 มาสกัดด้วยเฮกเซนซ้ำอีกครั้ง ตามวิธีข้อ 1.1 แล้วนำส่วนสกัดหยาบเฮกเซนที่สกัดได้ไปรวมกัน หลังจากนั้นติดฉลากขวดใส่สารสกัดว่าส่วนสกัดหยาบเฮกเซนของชาเลือดมังกร

1.3 นำกากชาเลือดมังกรจากข้อ 1.2 นำมาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนด้วยวิธีการแช่ เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากนั้นให้นำของเหลวที่ได้จากการสกัดมากรองโดยใช้สำลี แล้วนำของเหลวที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จะได้ส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของชาเลือดมังกร

1.4 นำกากชาเลือดมังกรจากข้อ 1.3 มาสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนซ้ำอีกครั้ง ตามวิธีข้อ 1.3 แล้วนำส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนที่สกัดได้ไปรวมกัน หลังจากนั้นติดฉลากขวดใส่สารสกัดว่าส่วนสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนของชาเลือดมังกร

1.5 นำกากชาเลือดมังกรจากข้อ 1.4 นำมาสกัดด้วยเมทานอลด้วยวิธีการแช่ เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากนั้นให้นำของเหลวที่ได้จากการสกัดมากรองโดยใช้สำลี แล้วนำของเหลวที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ จะได้ส่วนสกัดหยาบเมทานอลของชาเลือดมังกร

1.6 นำกากชาเลือดมังกรจากข้อ 1.5 มาสกัดด้วยเมทานอลซ้ำอีกครั้ง ตามวิธีข้อ 1.5 แล้วนำส่วนสกัดหยาบเมทานอลที่สกัดได้ไปรวมกัน หลังจากนั้นติดฉลากขวดใส่สารสกัดว่าส่วนสกัดหยาบเมทานอลของชาเลือดมังกร

1.7 นำกากชาเลือดมังกรจากข้อ 4 นำมาสกัดด้วยน้ำร้อนด้วยวิธีการต้ม เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นให้นำของเหลวที่ได้จากการสกัดมากรองโดยใช้สำลี แล้วนำของเหลวที่ได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) จะได้ส่วนสกัดหยาบน้ำของชาเลือดมังกร

1.8 จากขั้นตอนที่ 1.1-1.7 จะได้ส่วนสกัดหยาบของชาเลือดมังกรทั้งหมด 4 ชนิด ไล่ตามสภาพขั้วของสาร นั้นคือ ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เมทานอล และน้ำ ตามลำดับ หลังจากนั้นคำนวณร้อยละผลผลิต

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2. การสกัดใบเลือดมังกรด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

2.1 นำใบสดของต้นเลือดมังกรหนักประมาณ 500 กรัม มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ผึ่งลมให้พอแห้ง ทำการกลับตัวอย่างอย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง เพื่อตัวอย่างแห้งดี

2.2 หลังจากตากใบเลือดมังกรครบ 3 วัน ให้นำมาสกัดวิธีการเดียวกับการสกัดชาเลือดมังกร แต่เปลี่ยนชาเลือดมังกรเป็นใบเลือดมังกรที่ได้จากข้อ 2.1

2.3 จากขั้นตอนข้างต้น จะได้ส่วนสกัดหยาบของใบเลือดมังกรทั้งหมด 4 ชนิด ไล่ตามสภาพขั้วของสาร นั้นคือ ส่วนสกัดหยาบเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เมทานอล และน้ำ ตามลำดับ หลังจากนั้นคำนวณร้อยละผลผลิต

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

3.1 การเตรียมสารละลายกรดแกลลิก โดยปิเปตสารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 4 โมลต่อลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร 30 มิลลิลิตร และทำการเจือจางสารให้มีความเข้มข้น 2, 1, 0.5 และ 0.25 โมลต่อลิตร โดยใช้สูตรคำนวณความเข้มข้นพื้นฐาน ($C_1V_1 = C_2V_2$) ซึ่งสามารถศึกษาได้จากหนังสือเคมี ม.ปลาย

3.2 การเตรียมสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลทูความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปิเปตสารสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลทูเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ใส่ขวดวัดปริมาตรใช้น้ำกลั่นหรือ tween 20 ผสมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร

3.3 การเตรียมโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสาร 1.8xx กรัม ใส่ขวดวัดปริมาตรใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.4 การเตรียมสารตัวอย่างความเข้มข้น 2000 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยชั่งสาร 0.0020 กรัม ละลายในน้ำ 3 มิลลิลิตร การสร้างกราฟมาตรฐาน

3.5 ปิเปตกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 4 2 0.5 และ 0.25 มิลลิโมลาร์ ใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิด ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และใส่โฟลิน-ซิโอแคลทู 732 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3.6 ใส่โซเดียมคาร์บอเนต 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที

3.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร

3.8 นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

3.9 ปิเปตสารสกัดชาเลือดมังกรและใบสดของต้นเลือดมังกรที่ใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดปริมาตร 100 ไมโครลิตร และใส่โฟลิน-ซิโอแคลทู 732 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที

3.10 ใส่โซเดียมคาร์บอเนต 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที

3.11 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการขจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช

4.1 การเตรียมสาร

1) การเตรียมสารละลายบีเอชที โดยการชั่งบีเอชที หนัก 0.0010x กรัม ละลายบีเอชทีด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

2) การเตรียมสารละลายดีพีพีเอช โดยการชั่งสารหนัก 0.003x กรัม ละลายสารด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วห่อด้วยฟอยล์ทันทีเพื่อป้องกันแสง

3) การเตรียมสารตัวอย่าง โดยการชั่งสารหนัก 0.20xx กรัม ละลายสารด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร

4) การเตรียมกรดแอสคอร์บิกโดยการชั่งสารหนัก 0.004x กรัม ละลายสารด้วยเมทานอลและปรับปริมาตรให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งหมดโดยใช้ดีพีพีเอชเป็นรีเอเจนต์ (Reagent) ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีม่วงเมื่อเติมสารลงไปสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ วัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

1) ปิเปตสารที่เตรียมใส่ในเวลเพลท 96 หลุม

2) เติมดีพีพีเอชเป็นขั้นตอนสุดท้าย ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดทันทีจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ ที่เวลา 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการขจัดอนุมูลอิสระเอบีทีเอส

5.1 ปิเปตสารสารละลายเอบีทีเอส 8 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ออกไซด์ 12 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชา ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 16-18 ชั่วโมง

5.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นปรับให้ค่า อยู่ในช่วง 0.7 ± 0.2 เมื่อต้องการนำมาใช้

5.3 ชั่งสารตัวอย่าง 0.0056 กรัม ละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 280 50 40 30 10 โมลต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

5.4 นำสารละลายตัวอย่าง น้ำปราศจากไอออน และสารละลายเอบีทีเอสใส่ในคิวเวทท์ (Cuvette) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ปริมาณสารตัวอย่าง สารละลายบีเอสที และน้ำปราศจากไอออนในคิวเวทท์

ความเข้มข้น	สารละลายตัวอย่าง	สารละลายเอบีทีเอส	น้ำปราศจากไอออน
280	50	950	0
120	50	950	0
96	40	950	10
72	30	950	20
48	20	950	30
24	10	950	40
0	0	950	50

5.5 เติมสารละลายเอบีทีเอสเป็นขั้นตอนสุดท้ายจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี Bovine serum albumin (BSA)

นำส่วนสกัดหยาบจากชาเลือดมังกรและใบเลือดมังกรทั้ง 8 ชนิด มาทดลองฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธี Bovine serum albumin (BSA)

6.1 เตรียม BSA solution (0.4 %, w/v) ใน Tris buffered saline (เม็ดละลาย 1 เม็ด ในน้ำปราศจากไอออน 15 ml ให้ได้ 0.05 M Tris buffered saline และ 0.15 M NaCl pH เท่ากับ 7.6 ที่อุณหภูมิ 25 ℃)

6.2 ปรับ pH สารละลายเป็น 6.4 ด้วย Glacial acetic acid

6.3 เตรียมสารละลายสต็อกของสารสกัดหยาบแต่ละชนิดในเมทานอลที่ความเข้มข้น 50 µg/ml

6.4 เติมสารละลายสต็อกจากข้อ 3) 5.0, 10 และ 20 µl ตามลำดับ ซึ่งตรงกับความเข้มข้นที่ 0.25, 0.50 และ 1.00 µg/ml ตามลำดับ ลงในหลอดทดลองที่มี 1 ml 0.4% w/v BSA buffer

6.5 จากนั้น ให้ความร้อนแก่สารละลายในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาทีและทำให้เย็นลงเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

6.6 วัดความขุ่นของสารละลาย (ระดับการตกตะกอนของโปรตีน) ที่ 660 nm ในเครื่องยูวีสเปกโทร-โฟโตมิเตอร์ ทำทดลอง 2 ซ้ำ และบันทึกค่าการดูดซับเฉลี่ย

6.7 คำนวณร้อยละการต้านการอักเสบจากการตกตะกอน (การสูญเสียโปรตีน) ใช้สมการต่อไปนี้:

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

% การต่อต้านการแปรสภาพ = $\frac{\text{การดูดซับของตัวควบคุม – การดูดซับของตัวอย่าง}}{\text{การดูดซับของตัวควบคุม}} \times 100$

% การต่อต้านการแปรสภาพ = % การยับยั้งการเสื่อมสภาพของโปรตีน

= % ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด

7.1 เตรียมดิสก์โดยการนำส่วนสกัดหยาบจากชาเลือดมังกรและใบเลือดมังกรทั้ง 8 ชนิด ละลายด้วยเมทานอล ให้ได้ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 150 มิลลิกรัมต่อดิสก์ เพื่อบรรจุลงดิสก์ยาแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

7.2 การเตรียมดิสก์ยาปฏิชีวนะ ใช้ดิสก์ยาเจนตามัยซิน (Gentamicin) เป็น ตัวควบคุมเชิงบวก ให้มีความเข้มข้น 10 ต่อดิสก์

7.3 ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียและเพาะเชื้อสแตปฟิโลคอคคัสออเรียส (*Staphylococcus aureus*) บาร์ซิลลัสซับซิลิส (*Bacillus subtilis*) เอสเชอริเชียโคไล (*Escherichia coli*) ซูโดโมนเนสอาร์รูจีโนซ่า (*Pseudomonas aeruginosa*) ในอาหารเอ็นเอ (Nutrient agar, NA) เพื่อใช้ในการทดสอบ

7.4 นำสารแขวนลอย (Suspension) ในอาหารเอ็นบี (Nutrient broth, NB) มาเพาะ เลี้ยงบนอาหารทีเอสเอ (Tryptic soy agar, TSA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้เพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบ่มที่อณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง จะได้แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 4 ชนิด

7.5 นำแบคทีเรียที่เตรียม มาเทียบความขุ่นของแบคทีเรียกับสารละลายแม็คฟาแลนด์ (McFarland) เบอร์ 0.5 โดยใช้โซเดียมคลอไรด์เป็นตัวปรับความขุ่นใสจะได้จำนวนเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1.5 X 10^8 โคโลนี ฟอร์มิ่ง ยูนิต (Colony forming unit, CFU)

7.6 ใช้ไม้พันสำลีชุบเชื้อที่เตรียมไว้แล้วมาป้ายบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานให้ทั่วจานเพาะเชื้อ โดยป้าย 3 แนว แต่ละแนวให้หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อตามไปด้วยเป็นมุม 120 องศาทั้ง 3 แนวตั้งทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง 3 - 5 นาที จากนั้นนำดิสก์ที่เตรียมไว้มาวางบนผิวหน้าอาหารตามจุดที่กำหนด

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

7.7 นำจานเพาะเชื้อมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณยับยั้งเชื้อ แล้ววัดขนาดของพื้นที่ ที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่าง โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเชื้อจำนวน 3 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยของพื้นที่ และบันทึกผลโดยแต่ละชุดทำ 3 ซ้ำ นำผลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยความสามารถในการยับยั้ง