วัสดุและวิธีวิจัย

1. วัสดุ

1.1 สารเคมี

Chemical	Grade	Supplier/manufacturer
Acetone	Analytical reagent	Fisher Scientific, U.K
Chloroform	Analytical reagent	Fisher Scientific, U.K
L-ascorbic acid	Analytical reagent	Fisher Scientific, U.K
Citric acid	Analytical reagent	Fisher Scientific, U.K
Oxalic acid	Analytical reagent	Fisher Scientific, U.K
Perchloric acid	Analytical reagent	Fisher Scientific, U.K
Petroleum ether	Analytical reagent	Fisher Scientific, U.K
Selenium	Analytical reagent	Fisher Scientific, U.K
Methanol	HPLC	Fisher Scientific, U.K
Ammonium dihydrogen orthophosphate	Analytical reagent	Ajax Finechem, Australia
Orthophosphoric acid	Analytical reagent	Ajax Finechem, Australia
Sodium carbonate anhydrous	Analytical reagent	Ajax Finechem, Australia
Succinic acid	Analytical reagent	Ajax Finechem, Australia
(+)-tartaric acid	Analytical reagent	Ajax Finechem, Australia
Ammonium molybdate	Analytical reagent	Carto Erba, Italy
DL-malic acid	Analytical reagent	Carto Erba, Italy
Potassium sodium tartrate	Analytical reagent	Carto Erba, Italy
Anthrone	Analytical reagent	Merck, Germany
Boric acid	Analytical reagent	Merck, Germany
Copper sulfate	Analytical reagent	Merck, Germany
Copper(II) sulfate 5-hydrate	Analytical reagent	Merck, Germany

Chemical	Grade	Supplier/manufacturer
Tryptic soy broth(TSB)	Microbiological	Merck, Germany
Tryptic soy agar(TSA)	Microbiological	Merck, Germany
Sodium dihydrogen phosphate	Analytical reagent	Carlo. ERBA, Germany
Sodium chloride (NaCl)	Analytical reagent	Merck, Germany
Liquid paraffin	Analytical reagent	S.TONG Chemicals Co.Ltd., Thailand
Mueller hinton agar	Microbiological	Merck, Germany
Mueller hinton broth	Microbiological	Merck, Germany
Methanol	Analytical reagent	Labscan, Thailand
Hydranol composite-5	Analytical reagent	Riedel-deHean, Germany
Gallic acid	Analytical reagent	Sigma-Aldrich, Germany
Ethyl alcohol absolute anhydrous	Analytical reagent	Mallinckrodt, Mexico
TAE(Tris/Acetic acid/EDTA) buffer	Analytical reagent	Bio-Rad, Italy
Ethidium bromide solution	Analytical reagent	Bio-Rad, Italy
EDTA	Analytical reagent	Bio-Rad, Italy
Di-sodium hydeogen arsenate heptahydrate	Analytical reagent	Fluka, Switzerland
Celite ®	Analytical reagent	Fluka, Switzerland
Sodium sulfate anhydrous	Analytical reagent	Merck, Germany
Sodium hydrogen carbonate	Analytical reagent	Merck, Germany
Sodium chloride	Analytical reagent	Merck, Germany
Potassium sulfate	Analytical reagent	Merck, Germany
Potassium hydroxide	Analytical reagent	Merck, Germany
n-octanol	Analytical reagent	Merck, Germany
Nitric acid	Analytical reagent	Merck, Germany
Hydrochloric acid	Analytical reagent	Merck, Germany

Chemical	Grade	Supplier/manufacturer
D(+)-glucose anhydrous	Analytical reagent	Merck, Germany
Acetic acid	HPLC	Lab-scan Asia Ltd, Thailand
Ammonium iron (III) sulfate dodecahydrate	Analytical reagent	Ajax Finechem Pty Ltd, New Zealand
Benzoic acid	Analytical reagent	BHD Chemicals Ltd, England
n-Butanol	Analytical reagent	Asia Pacific Specialty Chemicals Ltd, Australia
Butylated hydroxyanisole	Analytical reagent	Sigma-Aldrich, Germany
Caprylic/capric triglyceride	Analytical reagent	Numsiang Trading, Thailand
(+)- catechin	HPLC	Sigma-Aldrich, Germany
Chloroform	Analytical reagent	Fisher Scientific U.K. Limited, U.K.
D&C YELLOW NO.10	Manufacturing	International Laboratories Corp., Ltd., Thailand
2-Deoxy-D-ribose	Analytical reagent	Fluka Chemika, Germany
2,2-Diphenyl-l-picrylhydrazyl	Analytical reagent	Sigma-Aldrich, Germany
Dipotassium phosphate	Analytical reagent	Ajax Finechem Pty Ltd, New Zealand
Disodium hydrogen phosphate anhydrous	Analytical reagent	Fluka Chemika, Germany
Ethyl acetate	Analytical reagent	Merk, Germany
Ferric ammonium sulfate	Analytical reagent	Schuchardt, Germany
Ferric chloride	Analytical reagent	Sigma-Aldrich, Germany
Ferrous sulfate heptahydrate	Analytical reagent	Ajax Finechem Pty Ltd, New Zealand
2N Folin-ciocateu's phenol reagent	Analytical reagent	Sigma-Aldrich, Germany
Gallic acid	Analytical reagent	Sigma-Aldrich, Germany
Gentamycin sulfate	Analytical reagent	Sigma-Aldrich, Germany
Glycerol	Manufacturing	Numsiang Trading, Thailand
Hide powder	Analytical reagent	Sigma-Aldrich, Germany
Hydrochloric acid	Analytical reagent	Merk, Germany
Hydrogen peroxide	Analytical reagent	Fisher Scientific, UK
L-ascorbic acid	Analytical reagent	Fluka Chemika, Germany

1.2 ตัวอย่างวิจัย

1.2.1 การคัดเลือกตัวอย่างมะขาม *Tamarindus indica* L. พันธุ์ที่เพาะปลูก (Cultivars) ต่างๆ และจัดทำ herbarium ได้แก่ มะขามเปรี้ยวยักษ์ (TI-PY/P) มะขามหวานพันธุ์สีทองเบา (TI-STB/P) สีทองหนัก (TI-STN/P) ศรีชมภู (TI-SP/P) และพันธุ์ขันตี (TI-K/P) จากจังหวัดเพชรบูรณ์ และมะขามเปรี้ยว (TI-P/K) มะขามหวานพันธุ์ศรีชมภู (TI-SP/K) และสีทองหนัก (TI-STN/K) จากจังหวัดนครราชสีมา (โคราช) นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหาร

1.2.2 เลือกตัวอย่างสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ทำวิจัย คือ ข้าวเจ้า Oryza sativa L. สายพันธุ์ (variety) ต่างๆ รวบรวมจากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี อ. ธัญญบุรี จังหวัดปทุมธานี ทั้งข้าวสาร และรำข้าว ได้แก่

พันธุ์ข้าว amylose ต่ำ (10-19%) ได้แก่ ปทุมธานี 1 และขาวดอกมะลิ 105

พันธุ์ข้าว amylose ปานกลาง (20-25%) ได้แก่ สุพรรณบุรี 60

พันธุ์ข้าว amylose สูง (>25%) ได้แก่ ชัยนาท 1 สุพรรณบุรี 90 สุพรรณบุรี 1

นำตัวอย่างข้าวมาบดละเอียด โดยวิธีบดเปียกแล้วอบให้แห้งที่ 40-50 °C นาน 5-6 ชั่วโมง บดซ้ำอีกครั้งจนได้ผงละเอียด และผ่านแร่ง 60 mesh นำตัวอย่างข้าวและรำข้าวไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอาหาร

2 วิเคราะห์องค์ประกอบของสารอาหารในมะขาม ข้าวและรำข้าว

2.1 การหาความชื้น

ปริมาณความชื้นในเนื้อมะขาม ข้าวและรำข้าว

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยนำตัวอย่างมะขามสดมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งน้ำหนัก 3 กรัม ส่วนตัวอย่างข้าว และรำข้าว ชั่งน้ำหนัก 1 กรัม ด้วยเครื่องวิเคราะห์ความชื้น Precisa รุ่น XM 60 (Precisa, Switzerland) โดยกำหนดการใช้ความร้อนตามมาตรฐานที่อุณหภูมิ 105 °C และให้เครื่องหยุดทำงานเมื่อน้ำหนักของตัวอย่างลดลงน้อยกว่า 2 มิลลิกรัม ภายในเวลา 60 วินาที ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแล้วคำนวณหาปริมาณความชื้น % moisture ในเนื้อมะขาม (Osborne and Voogt, 1978) ทำการทดลองซ้ำแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง หาค่า mean $\pm$ SD คำนวณหา % moisture ดังนี้

$$\% \text{ moisture} = \frac{\text{wt.(g) เริ่มต้น} - \text{wt.(g) สุดท้าย}}{\text{wt.(g) เริ่มต้น}} \times 100$$

ปริมาณความชื้นในเมล็ดมะขาม

1. ชั่งเมล็ดมะขาม 100 g แล้วนำไปคั่วกับทรายในกะทะ คั่วจนเปลือกของเมล็ดมะขามเริ่มแตกออก แล้วนำเมล็ดมะขามแช่ในน้ำ และนำขึ้นทันที เพื่อไม่ให้เปลือกเมล็ดมะขามเปื่อยยุ่ย
2. แกะปลือกเมล็ดมะขามออก โดยใช้คีมบีบให้แตก หลังจากนั้นนำเปลือก และเนื้อเมล็ดมะขามไปอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 40 °C ประมาณ 2-3 ชั่วโมง
3. เมื่ออบให้แห้งแล้วนำเปลือกเมล็ดมะขาม และเนื้อเมล็ดมะขามไปชั่งน้ำหนัก ส่วนเปลือกนำมาบดละเอียด
4. แช่เนื้อเมล็ดมะขามในน้ำร้อน 80 °C ปริมาตร 200 ml ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปเก็บในตู้เย็น 4 °C เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้เนื้อนิ่มขึ้น
5. นำเปลือกเมล็ดมะขามมาบดละเอียด แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก เก็บไว้ในตู้เย็น -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้ทดลองต่อไป
6. เนื้อเมล็ดมะขามแช่จนนิ่ม แล้วนำมาบดหยาบด้วยเครื่องบด หลังจากนั้นนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องโม่ Vita-mix แบบแห้ง (ถ้าโม่ละเอียดแบบใช้น้ำ เมื่อนำไปอบให้แห้ง จะได้เป็นแผ่นแข็ง ซึ่งต้องนำไปโม่แบบแห้งอีกรอบ และเมื่อนำไปหาค่าความชื้นจะได้ค่า % เกินความเป็นจริง) จะได้เป็นผงละเอียดแล้วนำไปอบแห้งอีกครั้ง
7. นำส่วนผงละเอียดของเปลือก และผงละเอียดส่วนเนื้อเมล็ดไปหาความชื้นด้วย เครื่อง Moisture balance โดยใช้เปลือกเมล็ดมะขาม 0.5 g และเนื้อเมล็ดมะขามประมาณ 1.0 g ทำการทดลองหาความชื้นของเปลือก และเนื้อเมล็ดมะขามแต่ละสายพันธุ์ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และค่า SD จากการคำนวณ % moisture ดังนี้

$$\% \text{ moisture} = \frac{\text{wt.(g) เริ่มต้น} - \text{wt.(g) สุดท้าย}}{\text{wt.(g) เริ่มต้น}} \times 100$$

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ carbohydrate

2.2.1 ทำการวิเคราะห์ปริมาณโดยการลบปริมาณของเปอร์เซ็นต์ความชื้น โปรตีน ไขมัน ไฟเบอร์ และเถ้า ออกจากค่า 100% ของตัวอย่างข้าว และรำข้าว

2.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ Carbohydrate โดยวิธี Anthrone Test (Osborne and Voogt, 1978)

การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งสารตัวอย่างแห้ง 1 g เติมน้ำกลั่น 10 ml คนให้กระจายตัวเข้ากัน เติม 13 ml 52% perchloric acid คนทิ้งไว้ 20 นาที
2. เติมน้ำกลั่น 80 ml คนให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 250 mlใน volumetric flask ได้เป็น stock solotion นำไปวิเคราะห์หา carbobydrate

การวิเคราะห์หาปริมาณ carbohydrate

1. เจือจางสารละลายตัวอย่าง stock solution ในน้ำกลั่นประมาณ 20 เท่า หรือตามความเหมาะสมเป็น test solution
2. ปิเปต 1 ml test solution ใส่หลอดทดลอง และ 1 ml น้ำกลั่นในหลอด blank เติม Anthrone Reagent หลอดละ 5 ml ผสมให้เข้ากัน
3. ต้มในน้ำเดือด 12 นาที แล้วนำหลอดทดลอง ออกมาทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. วัดค่า absorbance ที่ 630 nm โดยใช้หลอดน้ำกลั่นเป็น blank แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณ carbohydrate ในรูปของ % glucose โดยเปรียบเทียบกราฟสารละลายมาตรฐาน glucose

2.3 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Micro Kjeldahl Method (Osborne and Voogt, 1978)

1. ชั่งตัวอย่าง 0.5 g ใส่ใน Kjedahl flask ที่บรรจุ catalyst 3 g K_2SO_4 และ 0.1 g copper sulfate
2. เติม 7 ml sulfuric acid นำ flask ไป heat จนตัวอย่างละลายหมด และนำไป digest ที่ 420 °C นาน 40 min จนได้สารละลายใส ได้สีเขียวอมน้ำเงิน
3. ตั้งทิ้งให้เย็นที่ 40 °C เติม 20 ml น้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. เติม 40 ml 50%NaOH แล้วนำไปกลั่นไล่ NH_3 ออกมาใส่ใน flask ที่รับรองซึ่งบรรจุ 15 ml ของ 4% boric acid และ 2 หยด ของ indicator (0.2% methylred และ 0.1%

methylene blue) เมื่อไล่ NH_3 ออกหมดแล้วนำ flask กรด boric acid ไป titrate เพื่อหาปริมาณของ %Nitrogen ด้วย 0.1 N HCL และคำนวณเป็นปริมาณโปรตีน โดยคูณ factor 6.25 จากสมการ

$$\% \text{ protein} = \frac{\text{ml HCl x N}}{\text{น.น.g. ตัวอย่าง}} \times 1.4 \times 6.25$$

N = normality ของ HCl

ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3-4 ครั้ง นำค่าที่ต่างไม่เกิน $\pm$ 5% มาหาค่าเฉลี่ย % protein ในตัวอย่าง เป็นค่า mean และ SD

2.4 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณลิปิด (Lipid content) โดยวิธี Soxhlet extraction</u> (Osborne and Voogt, 1978)

<u>วิธีวิเคราะห์หาปริมาณลิปิด</u>

1. นำ extraction thimble และขวดก้นกลมบรรจุเม็ดลูกแก้วประมาณ 5 เม็ด ไปอบที่ 110 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ บันทึกผลน้ำหนัก
   น้ำหนัก extraction thimble = W1 กรัม
   น้ำหนักขวดก้นกลม = W2 กรัม
2. เติมตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ลงใน extraction thimble ชั่งน้ำหนักรวมที่แน่นอน (= W3 กรัม)
3. เติมปิโตรเลียมอีเธอร์ 300 มิลลิลิตร ใส่ในขวดก้นกลม แล้วต่อเข้ากับชุดสกัด (Soxhlet) และคอนเดนเซอร์ (condenser) ทำการสกัดโดยใช้เตาไฟฟ้า ที่อุณหภูมิปานกลาง ใช้เวลาประมาณ 3-5 ชั่วโมง ให้มีการไซฟ่อน (siphons) 10 ครั้ง
4. นำขวดก้นกลมไประเหยปิโตรเลียมอีเธอร์ ออกด้วย water bath ในตู้ควัน แล้วอบที่ 45 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccators ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (= W4 กรัม)
5. กากที่เหลือจากการสกัดใน extraction thimble ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง คำนวณหาปริมาณ % ไขมัน จากสมการ ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย และ SD

$$\% \text{ crude fat} = (\text{น้ำหนักไขมันที่สกัดได้} / \text{น้ำหนักตัวอย่าง}) \times 100$$

$$= [(W4 - W2)/ (W3 - W1)] \times 100$$

2.5 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใยอาหาร (crude fiber)</u> (Lee, 1975)

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใยอาหารจากตัวอย่างบดละเอียด โดยนำตัวอย่างมาย่อยด้วยกรดและด่าง ได้ส่วนที่เหลือเป็นเส้นใยอาหาร โดยทำตามวิธีการดังขั้นตอนต่อไปนี้

1. ชั่งตัวอย่าง 2 g ใส่ใน beaker สำหรับทดลองหาเส้นใยอาหารขนาด 600 ml
2. เติม 200 ml 1.25% H_2SO_4นำไป reflux นาน 30 นาที
3. นำไปกรองและล้างตะกอนด้วยน้ำเดือดจนปราศจากกรด
4. นำส่วนกากจากการกรองไปเติม 200 ml 1.25% NaOH นำไป reflux นาน 30 นาที
5. นำไปกรองและล้างตะกอนด้วยน้ำเดือดจนหมดด่าง และล้างด้วย alcohol
6. นำตะกอนเส้นใยไปอบแห้งที่ 100-105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำไปชั่ง แล้วนำไปอบอีก 15 นาที แล้วชั่ง ทำเช่นนี้จนกว่าจะได้น้ำหนักที่คงที่ (a)
7. ล้างเส้นใยออกจากภาชนะจนหมด แล้วนำ beaker ไปอบที่ 100-105 องศาเซลเซียส แล้วชั่งน้ำหนัก จนได้น้ำหนักคงที่ (b)
8. คำนวณหาค่า % crude fiber จากสมการ แล้วหาค่าเฉลี่ย และค่า SD จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

$$\% \text{ crude fiber} = \frac{a-b}{\text{น้ำหนัก(g) ตัวอย่าง}} \times 100$$

2.6 <u>ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Ash content)</u> (Osborne and Voogt, 1978)

วิธีทดลองหาปริมาณเถ้าในเนื้อ และเนื้อในเมล็ดมะขาม (kernel) มะขาม และข้าวและรำข้าว โดยการทดลองทำ 3 ซ้ำ ต่อหนึ่งตัวอย่าง

1. ล้าง crucible ให้สะอาด อบแห้งแล้วแช่ในกรด HCl เจือจางข้ามคืน
2. ล้างกรดออกแล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. เผา crucible ใน muffle furnace ที่ 550 องศาเซลเซียส 30 นาที
4. ทิ้งไว้ให้เย็นใน oven (10 นาที) และใน desicator (30 นาที) ชั่งน้ำหนัก crucible จนคงที่ (a = กรัม)
5. ใส่ตัวอย่าง ประมาณ 2 กรัม แล้วชั่งน้ำหนัก (=b กรัม)
6. นำไปเผาบน hot plate ด้วยอุณหภูมิต่ำ จนเป็นสีดำ และหมดควันสีขาว
7. นำไปเผาใน muffle furnace ที่ 550 องศาเซลเซียส 6-8 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เถ้าสีเทาหรือสีขาว

8. ทิ้งไว้ให้เย็นใน oven (10 นาที) และใน desicator (30 นาที) ในช่วงเวลาที่เท่ากับการ activate crucible ในข้อที่ 4 แล้วจึงชั่งน้ำหนัก
9. นำไปเผาใน muffle furnace ที่ 550 องศาเซลเซียส อีกครั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนกระทั่ง crucible สะอาดปราศจากสาร carbon อื่นๆ
10. ทิ้งไว้ให้เย็นใน oven (10 นาที) และใน desicator (30 นาที) ในช่วงเวลาที่เท่ากับการ activate crucible แล้วจึงชั่งน้ำหนัก อีกครั้ง (= c กรัม)
11. คำนวณ % ash จาก สมการ แสดงผลค่าเฉลี่ย และ SD จากการทำ 3 ซ้ำ

$$\% \text{ ash} = \frac{(c-a)}{B} \times 100$$

2.7 **<u>การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุ Na, Mg, Ca, Mn, Cu, Zn, Fe และ K ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)</u> (Osborne and Voogt, 1978)**

(เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ : Atomic Absorption Spectrophotometer)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. นำ Porcelain dish มาล้างให้สะอาด อบแห้ง แล้วนำมาแช่กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เจือจางข้ามคืน จากนั้นล้างกรดออกแล้วอบแห้ง
2. หยดน้ำ DI ลงบนเถ้าของตัวอย่าง จากการวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (ash) ใน crucible ให้เถ้าเปียกพอประมาณ
3. ละลายเถ้าด้วย 5 ml กรดไฮโดรคลอดริกเข้มข้น แล้วเทใส่ลงใน porcelain dish
4. เติมกรดไฮโดรคลอดริกเข้มข้นลงใน porcelain dish จนมีปริมาตรครบ 4 ml
5. นำ porcelain dish ไประเหยกรดออกบน water bath จนแห้งใน hood cabinet
6. ละลาย residue ที่เหลือด้วย 5 ml 10% HCl ต้มจนเริ่มเดือดทิ้งให้เย็น เติมน้ำ DI
7. ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ใน 50 ml volumetric flask จนครบปริมาตร
8. นำไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุด้วยเครื่อง ASS

2.8 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณธาตุ Al, As, P, Pb และ Si ด้วยเครื่อง ICP atomic emission spectrometer</u>

(เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ : Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer; Model Perkin-Elmer PLASMA-1000)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. นำตัวอย่างบดละเอียดอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccators
2. ชั่งตัวอย่างหนัก 1 กรัม ใส่ลงบีกเกอร์ ขนาด 100 ml เติมกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น ปริมาตร 5 ml แล้วนำไประเหยให้แห้งบน hot plate แล้วทำซ้ำจนกระทั่งไม่มีสีดำของ charred material
3. ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมกรดไนตริก (HNO_3) และกรดเพอร์คลอริก ($HClO_4$) เข้มข้น อย่างละ 5 ml
4. ให้ความร้อนอย่างช้าๆ จนกระทั่งสารละลายใส จากนั้นระเหยให้แห้งบน hot plate
5. ละลาย residue ที่เหลือด้วย กรดไนตริก (HNO_3) ปริมาตร 2 ml
6. เติมน้ำ DI ปริมาตร 10-15 ml แล้วกรองผ่าน acid-washed filter paper ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml
7. ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบปริมาตร 50 ml
8. วิเคราะห์หาปริมาณธาตุ ด้วยเครื่อง ICP atomic emission spectrometer

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3. <u>การหาปริมาณ reducing sugar โดยวิธี Nelson-Somogyi method ในเนื้อมะขาม จังหวัดเพชรบูรณ์ และ จังหวัดนครราชสีมา ทำการทดลองตามขั้นตอนดังนี้</u> (Chaplin and Kennedy, 1994)

<u>เตรียมน้ำสกัดเนื้อมะขาม</u>

1. ชั่งมะขามบดละเอียด 1 กรัม
2. เติมน้ำ 40 มิลลิลิตร ผสมเพื่อกระจายสารตัวอย่างให้ทั่ว
3. เซนตริฟิวจ์ครั้งที่ 1 ที่ความเร็ว 3,500 RPM (2851 x g) เก็บส่วนน้ำใส
4. นำส่วนของตะกอนมาละลายน้ำ 30 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
5. เซนตริฟิวจ์ครั้งที่ 2 ที่ความเร็ว 3,500 RPM (2851 x g) เก็บส่วนน้ำใส

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 17 เม.ย. 2555
เลขทะเบียน 245214
เลขเรียกหนังสือ

6. นำส่วนของตะกอนมาละลายน้ำ 30 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
7. เซนตริฟิวจ์ครั้งที่ 3 ที่ความเร็ว 3,500 RPM (2851 x g) เก็บส่วนน้ำใส
8. นำส่วนน้ำใสที่ได้จากการเซนตริฟิวจ์ทั้ง 3 ครั้งมารวมกัน ปริมาตรทั้งหมดประมาณ 100 มิลลิลิตร
9. คนให้เข้ากัน แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำ DI จนครบ 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร เป็นสารตัวอย่าง stock solution

วิธีการเตรียม reagent

1. ละลาย 15 กรัม ของ sodium potassium tartrate และ 30 กรัม ของ anhydrous Na_2CO_3 ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร และละลาย 180 กรัม ของ Na_2CO_4 ในน้ำเดือด ทิ้งให้เย็น เติม 20 กรัม ของ $NaHCO_3$ คนให้เข้ากัน ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน และเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1ลิตร เป็น reagent A
2. ละลาย 5 กรัม ของ $CuSO_4.5H_2O$ และ 45 กรัม ของ anhydrous Na_2SO_4 ลงในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 250 มิลลิลิตรเป็น reagent B
3. ผสม reagent A(4Vol.) และ B(1Vol.) ก่อนใช้ เป็น reagent C
4. ละลาย 25 กรัม ของ Ammonium molybdate ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตรค่อยๆเติม Conc.H_2SO_4 21 มิลลิลิตร แล้วคนให้เข้ากัน ละลาย 3 กรัม ของ $Na_2HAsO_4.7H_2O$ ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร แล้วเติม molybdate solution ทิ้งไว้ 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บในขวดสีชา ก่อนใช้ให้เจือจางด้วย 2 เท่า 0.75 M H_2SO_4 (4 มิลลิลิตรของ Conc.H_2SO_4 ในสารละลาย 100 มิลลิลิตร) เป็น reagent D

การตรวจหาปริมาณ reducing sugar

1. ไปเปตสารตัวอย่าง stock solution มา 2.5 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เป็น test solution
2. ไปเปตสารตัวอย่าง stock solution 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และไปเปตน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด blank
3. ไปเปต reagent C ลงในหลอดทดลองทุกหลอด และ blank อย่างละ 1 มิลลิลิตร
4. ปิดฝาจุกหลอดทดลอง และผสมให้เข้ากัน
5. ต้มในน้ำเดือด 15 นาที
6. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม 1 มิลลิลิตร reagent D ผสมให้เข้ากัน

7. เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำแต่ละหลอดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้ blank ปรับค่า 0 absorbance นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณของน้ำตาล reducing sugar โดยเปรียบเทียบกับกราฟของ standard glucose

การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย standard glucose

เตรียมสารละลาย standard stock solution ของกลูโคส ให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นทำการเจือจางสารละลายกลูโคส ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.020. 0.030, 0.040, 0.050, 0.056, 0.060, 0.065 mg/ml ทำตามขั้นตอนการตรวจหาปริมาณ reducing sugar ข้อ 2-7 วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) เป็น แกน Y และค่าความเข้มข้น standard solution ของกลูโคสเป็นแกน X

4. การแยกและวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ในมะขามโดยเทคนิค HPLC

4.1 การสกัดน้ำมะขามเข้มข้น

1. ชั่งมะขามอบแห้งมาเท่ากับ 150 กรัม มะขามสด
2. เติมน้ำ DI ต้มสุกปริมาตร 350 มิลลิลิตร แล้วปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่น (blender)
3. นำสารผสมที่ได้ใส่ลงในขวด centrifuge และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12-15 ชั่วโมง
4. นำไปปั่นเหวี่ยงแยกกากและน้ำสกัดออกจากกันด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated ultracentrifuge) ที่ความเร็วรอบ 6,000 RPM 1,690 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
5. แยกกากและวัดปริมาตรน้ำสกัด (E_1) ไว้ ส่วนกากนำไปสกัดต่อด้วยน้ำ DI ต้มสุกปริมาตร 225 มิลลิลิตร
6. นำไปปั่นเหวี่ยงแยกกากและน้ำสกัด ออกจากกันด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ตามข้อ 1.4
7. แยกกากและวัดปริมาตรน้ำสกัด (E_2) แล้วนำไปรวมกับน้ำสกัด (E_1)
8. นำน้ำสกัดมะขามมาทำให้เข้มข้นขึ้น โดยระเหยน้ำที่ความดันต่ำ แล้วปรับปริมาตรของน้ำสกัดสุดท้าย เท่ากับ 200 มิลลิลิตร ใน volumetric flash
9. นำน้ำสกัดที่ได้ไปแยก และหาปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยเทคนิค reversed-phased high-performance liquid chromatography

4.2 **การหาปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดมะขามเข้มข้น ด้วยเทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) โดยพัฒนาจากวิธีของ Chen and Lu (2002)**

เครื่องมือ HPLC Shimadzu CLASS-VP version 6.1 HPLC system (Japan)

Column	: Inertsil ODS C18 column (5 μm, 4.6x150 mm)
Mobile phase	: 0.5% (w/v) $(NH_4)H_2PO_4$, pH = 2.9
Flow rate	: 1 ml/min
Run time	: 25 min
Detector	: UV detector
Wavelength	: 210 nm
Temperature	: 25 °C
Internal standard	: Gallic acid

วิธีการทดลอง

1. นำน้ำสกัดมะขามเข้มข้นของมะขามแต่ละสายพันธุ์มาเจือจาง โดยเจือจางน้ำสกัดมะขามเข้มข้น 10-20 เท่า โดยไปเปต 0.5-1.0 มิลลิลิตร ใสใน Volumetric flash 10 ml
2. ปิเปต 4 g/l gallic acid มา 100 μl ผสมลงไปในสารละลายน้ำมะขาม แล้วปรับปริมาตรของตัวอย่างให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วย mobile phase
3. นำสารละลายน้ำมะขามมาแยกกรดอินทรีย์ และหาปริมาณกรดแต่ละชนิด ด้วยเทคนิค RP-HPLC ภายใต้สภาวะการทดลองข้างต้น
4. คำนวณหาปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำมะขาม ในหน่วย กรัม/100 กรัม มะขามสด

5. การประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งข้าว รำข้าวและเมล็ดมะขาม

1. **อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย**

- Scanning Electron Microscope (SEM : JSM 5410LV, JEOL, Tokyo Japan)
- Particle size analyzer (Mastersizer2000, Malvern, Worcestershire, UK.)
- Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR : Spectrum one, Perkin Elmer, Waltham, USA.)

- Fourier transform near infrared spectroscopy (FT-NIR :MPA FT-NIR, Bruker Optics, Ettlingen, Germany)
- Halogen moisture analyzer (HR 83, METLER TOLEDO, Küsnacht, Switzerland)
- Karl fisher (DL38, METLER TOLEDO, Küsnacht, Switzerland)
- Powder characteristic tester (PT-R model, Hosokawa Micron, Cheshire, UK.)
- Ultrapycnometer 1000, Quantachrome, Boynton Beach, USA.
- Glass funnel (diameter 12 mm)

2. ตัวอย่างและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

2.1 ตัวอย่าง

- ข้าวเจ้าและข้าวเหนียว (ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี)
- แป้งข้าวเจ้าที่มีจำหน่าย
  - แป้งข้าวจ้าว ตราใบหยก (บ.บางกอกอินเตอร์ฟูด จำกัด อ.สามพราน จ.นครปฐม)
  - แป้งข้าวเจ้า (บ. ไทยเบตเตอร์ฟู้ดส์ จำกัด อ.บ้านโป่ง จ. ราชบุรี)
- รำข้าว (ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี)
- มะขาม (ไร่ชนิกา ต.ซับสมอทอด อ.บึงสามพัน จ.เพชรบูรณ์ และสวนคุณประนอม ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา)

2.2 สารเคมี

- Hydranol composite-5 Karl Fisher reagent (Lot. 7337B, Riedel-deHaen, Seelze, Germany
- Liquid paraffin, light (Lot. SBC080092, S.TONG Chemicals Co.Ltd., Bangkok, Thailand)
- Methanol (water content 0.05%) (Lot. 0806357, Labscan, Bangkok, Thailand)

3. การเตรียมตัวอย่าง

3.1 ตัวอย่างแป้งข้าว

ตัวอย่างสายพันธุ์ข้าวที่เลือกใช้ทำวิจัย มีดังนี้

ตัวอย่างที่	ประเภทข้าว	รายละเอียดสายพันธุ์	
1	ข้าวเจ้า	พันธุ์ข้าว amylose ต่ำ (10-19%)	ข้าวหอมดอกมะลิ105
2		พันธุ์ข้าว amylose ต่ำ (10-19%)	ปทุมธานี1
3		พันธุ์ข้าว amylose ปานกลาง (20-25%)	สุพรรณบุรี60
4		พันธุ์ข้าว amylose สูง (>25%)	ชัยนาท1
5		พันธุ์ข้าว amylose สูง (>25%)	สุพรรณบุรี1
6		พันธุ์ข้าว amylose สูง (>25%)	สุพรรณบุรี90
7	ข้าวเหนียว	-	กข6

นำตัวอย่างข้าวมาบดละเอียด โดยวิธีบดเปียก นำผงแป้งที่บดได้มาอบให้แห้งที่ 40-50°C นาน 5-6 ชั่วโมง บดซ้ำอีกครั้งจนได้ผงละเอียด

3.2 แป้งข้าวเจ้าที่มีจำหน่าย

- แป้งข้าว ตราใบหยก ผลิตโดย บริษัท บางกอกอินเตอร์ฟูด จำกัด (Starch A)
- แป้งข้าว ผลิตโดย บริษัท ไทยเบตเตอร์ฟู้ดส์ จำกัด (Starch B)

นำตัวอย่างแป้งข้าวจากข้อ 3.1 และ 3.2 มาแร่งผ่านแร่งเบอร์ 60 mesh (250 μm) จากนั้นนำแป้งที่ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 60 mesh มาอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง รอจนเย็นลงแล้วเก็บในภาชนะปิดสนิท ก่อนจะเก็บรักษาใน desiccator ที่บรรจุสารดูดความชื้น (silica gel)

3.3 ตัวอย่างรำข้าว

ตัวอย่างรำข้าวที่เลือกใช้ทำวิจัย มีดังนี้

ตัวอย่างที่	สายพันธุ์ข้าว
1	ข้าวหอมดอกมะลิ105
2	ปทุมธานี1
3	สุพรรณบุรี60
4	ชัยนาท1
5	สุพรรณบุรี1
6	สุพรรณบุรี90
7	กข6

นำตัวอย่างรำข้าวมาแร่งผ่านแร่งเบอร์ 60 mesh (250 μm) จากนั้นนำรำข้าวที่ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 60 mesh ที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง รอจนเย็นลงแล้วเก็บในภาชนะปิดสนิท ก่อนจะเก็บรักษาใน desiccator ที่บรรจุสารดูดความชื้น (silica gel)

3.4 ตัวอย่างแป้งเมล็ดมะขาม (เนื้อเมล็ดมะขาม, kernel)

ตัวอย่างสายพันธุ์มะขามที่เลือกใช้ทำวิจัย มีดังนี้

ตัวอย่างที่	สายพันธุ์มะขาม
1	เปรี้ยวยักษ์ – เพชรบูรณ์ (TI-PY/P)
2	ศรีชมภู – เพชรบูรณ์ (TI-SP/P)
3	ขันตี – เพชรบูรณ์ (TI-K/P)
4	สีทองหนัก – เพชรบูรณ์ (TI-STN/P)
5	สีทองเบา – เพชรบูรณ์ (TI-STB/P)
6	เปรี้ยว – โคราช (TI-P/K)
7	สีทองหนัก – โคราช (TI-STN/K)
8	ศรีชมภู – โคราช (TI-SP/K)

นำตัวอย่างแป้งเมล็ดมะขามมาแร่งผ่านแร่งเบอร์ 60 mesh (250 μm) จากนั้นนำแป้งเมล็ดมะขามที่ขนาดอนุภาคน้อยกว่า 60 mesh ที่ได้มาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง รอจนเย็นลงแล้วเก็บในภาชนะปิดสนิท ก่อนจะเก็บรักษาใน desiccator ที่บรรจุสารดูดความชื้น (silica gel)

ตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากหัวข้อ 3.1-3.4 ใช้สำหรับการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพในหัวข้อต่อไปนี้

5.1 <u>การประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ</u>

5.1.1 สัณฐานวิทยา (Morphology)

สังเกตลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของตัวอย่างแป้งข้าว รำข้าวและแป้งเมล็ดมะขาม ทั้งหมดด้วยตาเปล่า จากนั้นศึกษาขนาด รูปร่างและพื้นผิวภายนอกของตัวอย่างโดยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM, JSM 5410LV JEOL) โดยนำตัวอย่างมากระจายบน stub แล้วนำไปเคลือบทองก่อนนำไปส่องกล้องที่แรงดันไฟฟ้า 15 kV โดยใช้กำลังขยายต่างๆดังนี้คือ 1,000 และ 5,000 เท่า สำหรับแป้งข้าว 75 และ 1,000 เท่า สำหรับรำข้าว 1,000 และ 3,500 เท่าสำหรับแป้งเมล็ดมะขาม

5.1.2 การกระจายขนาดอนุภาค (Particle size distribution)

นำตัวอย่างแป้งข้าว รำข้าวและแป้งเมล็ดมะขามมากระจายตัวใน Liquid paraffin แล้วนำไป sonicate เพื่อกระจายตัวผงของตัวอย่าง ก่อนนำไปวัดหาขนาดเฉลี่ยของอนุภาคโดยใช้เทคนิค Laser light scattering (Mastersizer2000, Malvern®) แต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งแล้วบันทึกค่าเฉลี่ยโดยปริมาตร (Volume mean diameter, D) และค่ามัธยฐานของขนาดอนุภาค (Mass median diameter, D (v, 0.5)) ในหน่วยไมโครเมตร (micrometer, μm)

5.1.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ (Identification)

5.1.3.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

นำตัวอย่างแป้งข้าว รำข้าวและแป้งเมล็ดมะขามประมาณ 1- 2 mg บดผสมรวมกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ (Potassium Bromide , KBr) ประมาณ 150 mg แล้วนำไปอัดเป็นเพลเลต (pellet) จากนั้นนำเพลเลตที่ได้ไปเข้าเครื่องเพื่อสแกนสเปกตรัมในช่วง 4000-450 cm^{-1} ที่ resolution 4.0 cm^{-1} และแต่ละตัวอย่างทำการสแกนทั้งหมด 16 ครั้ง นำสเปกตรัมที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของตัวอย่างในแต่ละประเภท

5.1.3.2 Fourier transform near infrared spectroscopy (FT-NIR)

นำตัวอย่างแป้งข้าว รำข้าวและแป้งเมล็ดมะขามที่บรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิทมาทำการสแกนสเปกตรัมในช่วง 12400-4000 cm^{-1} ที่ resolution 8 cm^{-1} และแต่ละตัวอย่างสแกนทั้งหมด 16 ครั้ง เก็บสเปกตรัมที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ต่อไป

5.1.4 % Loss on drying

นำตัวอย่างแป้งข้าว รำข้าวและแป้งเมล็ดมะขามประมาณ 2-3 กรัมมาหาความชื้นของผงแป้งข้าวด้วยเครื่อง Halogen moisture analyzer (HR 83, METLER TOLEDO) โดยค่อยๆให้ความร้อนแก่ผงตัวอย่างจนถึงอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส แต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความชื้น (%)

5.1.5 ปริมาณน้ำในอนุภาค (Water content)

หาปริมาณน้ำในอนุภาคด้วยเครื่องคาร์ล ฟิสเซอร์ (Karl fisher) ชั่งตัวอย่างแป้งข้าว รำข้าวและแป้งเมล็ดมะขามประมาณ 0.01-0.1 กรัมใส่ใน vessel ที่บรรจุด้วยเมธานอล (methanol) แล้วไตเตรทหาปริมาณน้ำด้วย Karl fisher reagent แต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำในอนุภาค (%)

5.1.6 อัตราการไหล (Flow rate)

ชั่งตัวอย่างแป้งข้าว รำข้าวและแป้งเมล็ดมะขามให้มีน้ำหนักประมาณ 10 กรัม แล้วนำมาทดสอบอัตราการไหลผ่านกรวยแก้วขนาดรูเปิด 12 มิลลิเมตร จับเวลาที่ผงตัวอย่างไหลผ่านกรวยแก้วจนหมด คำนวณอัตราการไหลของผงแป้งในหน่วยกรัมต่อวินาที (g/sec) แต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

5.1.7 มุมการไหล (Angle of repose)

ทดสอบโดยเครื่อง Powder characteristic tester นำตัวอย่างแป้งข้าว รำข้าวและแป้งเมล็ดมะขามมาผ่านแร่งเบอร์ 25 mesh (710 μm) เพื่อกระจายตัวอย่างที่เกาะกันเป็นก้อนออกและผ่านกรวยแก้วลงสู่แท่นที่มีฐานทรงกลมจนเต็มแท่นและวัดมุมการไหล

จากกองผงตัวอย่างที่ได้ โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ยในหน่วยองศา (degree, °)

5.1.8 ความหนาแน่นปรากฏ (Apparent density)

นำตัวอย่างแป้งข้าว รำข้าวและแป้งเมล็ดมะขามที่แห้งมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนและบรรจุลงในไมโครเซลล์(micro cell) จากนั้นนำไปหาค่าความหนาแน่นปรากฏโดยอาศัยหลักการแทนที่ด้วยก๊าซฮีเลียม (He gas)โดยเครื่อง Ultrapycnometer 1000, Quantachrome แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 5 ครั้งและหาค่าเฉลี่ยในหน่วยกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (g/cm^3)

5.1.9 ความหนาแน่นปรากฏ (Bulk density) ความหนาแน่นหลังเคาะ (Tapped density) และร้อยละของความสามารถอัดแน่น (% Compressibility)

ทดสอบโดยเครื่อง Powder characteristic tester โดยนำตัวอย่างแป้งข้าว รำข้าวและแป้งเมล็ดมะขามบรรจุลงในภาชนะที่มีปริมาตรแน่นอนบันทึกน้ำหนักที่ได้ คำนวณเป็นค่าความหนาแน่นปรากฏ (Bulk density) ในหน่วยกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (g/cm^3) จากนั้นนำภาชนะไปเคาะจนปริมาตรคงที่ นำภาชนะมาชั่งน้ำหนักและคำนวณค่าความหนาแน่นหลังเคาะ (Tapped density) ในหน่วยกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (g/cm^3) และนำค่าความหนาแน่นปรากฏและความหนาแน่นหลังเคาะมาคำนวณค่าร้อยละของความสามารถอัดแน่นจากสมการที่ (1)

$$\%Compressibility = \frac{Tapped\ density - Bulk\ density}{Tapped\ density} * 100 \qquad (1)$$

6. ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเนื้อมะขาม

6.1 การเตรียมสารสกัดจากเนื้อมะขาม

6.1.1 ตัวอย่างส่วนเนื้อมะขาม ปริมาณสายพันธุ์ละ 500g นำมาหมักในน้ำ โดยแช่ให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 วัน ที่ 4 °C แยกสารสกัดออกโดยการกรอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ครั้งมารวมกันและนำไประเหยแห้งเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

6.1.2 ตัวอย่างแป้งจากเมล็ดมะขามเข้มข้น 5% ในน้ำและเจือจาง 2 fold dilution ใช้ในการทดสอบที่ 0.6-5% ของแป้งเมล็ดมะขาม

6.2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้และการเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การเตรียมเชื้อเริ่มต้นของเชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC6538P, *Escherichia coli* ATCC25922, *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9721 เชื้อราที่ใช้ทดสอบคือ *Candida albicans* ATCC 10230 และ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียบน tryptic soy agar (TSA) ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 24 ชม.ล้างแบคทีเรียจากผิวหน้าของอาหารโดยใช้น้ำเกลือ 0.9 % ที่ปราศจากเชื้อและปรับความขุ่นของซัสเพนชันของเชื้อให้เท่ากับ McFarland no. 0.5 (10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร) เพื่อใช้ในการทดสอบ

6.3 การเตรียมอาหารแข็งและอาหารเหลว

ละลายผงอาหารในน้ำกลั่นและทำให้ปราศจากเชื้อใน autoclave เป็นเวลา 20 นาที ที่ความดัน 15 pounds (121°C) ใช้ Mueller hinton agar (MHA) สำหรับการทดลอง agar diffusion susceptibility test และ Mueller hinton broth (MHB) สำหรับการทดลอง broth microdilution susceptibility test (Lorian, 1991) ส่วนการทดสอบเชื้อราใช้ Sabouraud dextrose agar and Sabouraud dextrose broth

6.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดน้ำมะขามบนอาหารแข็งโดย Agar diffusion method

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธีของ Lorian, 1991 การทดสอบวิธี Agar diffusion ทำโดยเตรียมสารละลายทดสอบของสารสกัดในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 10 mg/ml และ 100 mg/ml จากนั้นเติมเชื้อทดสอบ 1% ลงไปใน Mueller Hinton Agar เตรียมเชื้อทดสอบโดยการเทียบความขุ่นของเชื้อกับ 0.5 McFarland (10^8CFU ต่อมิลลิลิตร) เจือจางเชื้อโดยการทำ 10-fold dilution จนได้ความเข้มข้นของเชื้อ $5x10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร (Lorian,1991)) และนำอาหารที่ผสมเชื้อ 1% ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ไปเทบนชั้นอาหารในเพลท (plate) ที่เตรียมไว้แล้วที่มีอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar อยู่ชั้นล่าง 20 มิลลิลิตร ตามเทคนิค seed layer method (Lorian, 1991). และเมื่ออาหารแข็งตัวแล้วจึงวาง sterile stainless cylinder cup (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 6 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 8.5 มิลลิเมตร และสูง 10 มิลลิเมตร) บนอาหาร จากนั้นหยอด

สารสกัดลงใน stainless steel cup ปริมาณ 300 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อการเกิด pre-diffusion จากนั้นนำไปเข้าตู้บ่ม 37 °C 24 ชั่วโมง ดูผลโดยวัดความกว้างของโซนใสไม่มีเชื้อขึ้น (inhibition zone) โดยใช้เวอร์เนียร์ (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (triplicates) และใช้น้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุม (Lorian, 1991)

6.5 <u>การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ(MIC)และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดน้ำมะขามโดย Broth microdilution susceptibility test</u> (Mahon and Manuselis, 2000; Bonarentura *et al.*, 2002)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ทดสอบโดยวิธี Broth microdilution susceptibility test ตามวิธีของ NCCLS (1990) เตรียมเชื้อทดสอบให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $5x10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร โดยการเจือจางเชื้อ 10-fold dilution และเทียบความขุ่นของเชื้อกับ 0.5 McFarland (10^8CFU ต่อมิลลิลิตร) ทำการทดสอบใน 96-well microtitre plate โดยใช้ Mueller Hinton Broth (MHB) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ในแต่ละหลุมจะใส่เชื้อทดสอบปริมาณ 0.1 ml ต่อหลุม ($5x10^5$CFU ต่อมิลลิลิตร) และสารละลายทดสอบของสารสกัด 0.1 ml ต่อหลุม โดยเตรียมสารละลายทดสอบของสารสกัดในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 100-3.25 mg/ml โดยเจือจางแบบ 2-fold dilution จากนั้นบ่มไว้เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C ตรวจสอบค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด โดยใช้ gentamicin เป็นกลุ่มควบคุมบวก ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ และ ค่า Minimum Bactercidal Concentration (MBC) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดโดยใช้ gentamicin เป็นกลุ่มควบคุมบวก ที่ฆ่าเชื้อ ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง (ager plate) จะไม่พบการเจริญของเชื้อเมื่อใช้อาหารที่ไม่มีสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุมลบ ในการทดสอบใช้ gentamicin sulfate ที่ความเข้มข้นระหว่าง 64-0.003 µg/ml เป็น positive control

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะ gentamicin จะทำการทดสอบวิธีเดียวกันกับ broth microdilution susceptibility test ที่ใช้กับสารสกัด โดยละลายผง gentamicinในน้ำกลั่นและทำการเจือจางใน Mueller hinton broth (MHB) เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 64 - 0.003 µg/ml

7.การทดสอบฤทธิ์การเป็นยาระบายของน้ำสกัดมะขามในหนูขาว

7.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำสกัดมะขาม

1. การเตรียมน้ำสกัดจากเนื้อมะขามที่ทดลอง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ มะขามเปรี้ยวยักษ์ มะขามหวานพันธุ์ขันตี และพันธุ์ศรีชมพู เก็บจากจังหวัดเพชรบูรณ์ โดยใช้น้ำสกัดหยาบจากเนื้อมะขามสด 20 g ในน้ำกลั่น 100 ml และ blend ให้เข้ากันแล้วแยก filtrate โดยกรองด้วยผ้าขาวบาง เป็นตัวอย่าง Extract1
2. เตรียมน้ำสกัดจากเนื้อมะขามตามวิธีข้อที่ 1 แล้วแยก filtrate โดย centrifuge 1700 xg นาน 20 นาที ที่ 4 $^{\circ}$C เป็นตัวอย่าง Extract2

7.2 การทดสอบฤทธิ์ยาระบายในหนูขาว

การทดลองดัดแปลงจากการทดลองการเคลื่อนที่ของทางเดินอาหาร (Gastrointestinal motility test) ของ Vankatesen *et al.*, 2005

สัตว์ทดลอง หนูขาว (Sprague-Dawley) เพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-260 g จำนวน 9 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

วิธีทดลอง

1. อดอาหารหนูก่อนทดลอง 16-18 ชั่วโมง หนูทุกตัวให้สารทดสอบป้อนทางปาก โดยใช้เข็มป้อน (feeding needle) ในปริมาตร 10 ml/kg body weight
2. หนูแต่ละกลุ่มได้รับสารทดสอบดังนี้
   - หนูกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่น 10 ml/kg
   - หนูกลุ่ม reference drug ได้รับน้ำลูกพรุน (Nestvita) ขนาด 3 เท่า และ 10 เท่า ของขนาดที่ให้ในคนน้ำหนัก 50 กก. รับประทาน คือ 2.5 ml/kg และ 8.4 ml/kg ตามลำดับ (ตามปกติคนรับประทานน้ำลูกพรุน 1 ขวด ในขนาด 42 ml)
   - หนูกลุ่มทดสอบได้รับน้ำมะขามตำหรับต่างๆ ตามตาราง ในขนาดเป็น 3 เท่า ของขนาดที่รับประทานในคน โดยป้อนนาน 30 นาที ก่อนให้ suspension ของผงถ่าน โดยปรับปริมาตรสารทดสอบที่ให้เป็น 10 ml/kg ในทุกกลุ่มตามตารางดังนี้

Sample	Dose of Tamarind extract (ml/kg body wt.)	
	Extract1	Extract2
เปรี้ยวยักษ์ Prew Yak/P(TI-PY/P)	9.96	7.56
ขันตี Kanti/P(TI-K/P)	12.48	10.17
ศรีชมภู Srichompu/P(TI-SP/P)	10.50	7.56

- ปริมาตรสารทดสอบที่ป้อนให้หนูทดลองขนาดน้ำหนัก 250 g ตามตารางดังนี้

Sample	Dose of Extracts (ml)	
	Extract1	Extract2
เปรี้ยวยักษ์ Prew Yak/P(TI-PY/P)	2.49 ตามด้วยน้ำกลั่น 0.01 ml	1.89 ตามด้วยน้ำกลั่น 0.61 ml
ขันตี Kanti/P(TI-K/P)	3.12	2.54
ศรีชมภู Srichompu/P(TI-SP/P)	2.63	1.89 ตามด้วยน้ำกลั่น 0.61 ml

1. ป้อน 3% suspension of deactivated charcoal in 0.5% CMC (carboxymethylcellulose) ปริมาตร 1 ml
2. ทิ้งไว้ 15 นาที
3. ฆ่าหนูโดยวิธี pentobarbital sodium และผ่าตัดหนู ตัดเอาส่วนลำไส้เล็กตั้งแต่ pylorus ถึง caecum
4. วัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่าน ตั้งแต่ pylorus ลงไปตามความยาวของ duodenum หารด้วยความยาวของ duodenum ถึง ileum คูณด้วย 100 เป็นค่า % การเคลื่อนที่

7.3 ศึกษาฤทธิ์ยาระบายของน้ำสกัดมะขามเปรียบเทียบ organic acid standard

ตัวอย่างน้ำสกัดมะขาม เตรียมน้ำสกัดมะขาม 20% แยกน้ำสกัดใสโดย ปั่นแยกตะกอน ที่ 1700 xg ที่ 4 °C นาน 20 นาที

Organic acid ได้แก่ tartaric acid, malic acid และ citric acid

สัตว์ทดลอง

หนูขาว (Spraque-Dawley) ตัวผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-260 กรัม จำนวน 78 ตัว แบ่งเป็น 13 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

วิธีทดลอง

ดัดแปลงจาก แบบทดสอบการเคลื่อนที่ของทางเดินอาหาร (Gastrointestinal motility test) ของ Vankatesan *et al.*, 2005

1. อดอาหารหนูก่อนทดลอง 16-18 ชม.
2. หนูทุกตัวจะได้รับการทดสอบทางปากโดยใช้เข็มป้อน (feeding needle) โดยหนูทุกตัวจะได้รับสารแต่ละชนิดในปริมาตร 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม
3. แบ่งหนูเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้
    a. หนูกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม จะได้รับน้ำกลั่น
    b. หนูกลุ่มที่ 2 จะได้รับน้ำลูกพรุน ขนาด 8.4 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ซึ่งเป็น 10 เท่าของขนาดที่คนน้ำหนัก 50 กก. รับประทาน (ปกติคนรับประทานน้ำลูกพรุน 1 ขวด ในขนาด 42 มล.)
    c. หนูกลุ่มที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 จะได้รับน้ำมะขามพันธุ์ต่างๆ ในขนาด 2 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (ความเข้มข้นเท่ากับน้ำมะขามที่ทดสอบครั้งแรก คือ 20%)
    d. หนูกลุ่มที่ 8, 10 และ 12 จะได้รับ tartaric acid, citric acid หรือ malic acid ในขนาด 10 มิลลิลิตร/น้ำหนัก 1 กิโลกรัม ตามลำดับ
    e. หนูกลุ่มที่ 9, 11 และ 13 จะได้รับ tartaric acid, citric acid หรือ malic acid ในขนาด 100 มิลลิลิตร/น้ำหนัก 1 กิโลกรัม ตามลำดับ
4. หลังจากนั้น 30 นาที หนูทุกตัวจะได้รับ 3%suspension ของผงถ่านใน 0.5% carboxymethylcellulose โดยแต่ละตัวจะรับในปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มป้อน
5. หลังจากทิ้งไว้ 15 นาที หนูทุกตัวจะถูกทำการุณยฆาตโดยยาสลบอีเทอร์

6. ตัดลำไส้เล็กตั้งแต่ pylorus จนถึง caecum แล้ววัดระยะการเคลื่อนที่ของผงถ่านจาก pylorus เพื่อเปรียบเทียบระยะทางที่ผงถ่านเคลื่อนที่ไปได้ของหนูแต่ละกลุ่ม

8. องค์ประกอบและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

8.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

แยกเอาเมล็ดมะขามออกจากเนื้อและเปลือกของผลมะขาม นำเมล็ดมาล้างเอาเนื้อออกด้วยน้ำให้สะอาด ชั่งเมล็ดมะขามหนักประมาณ 100 กรัม แล้วนำไปคั่วกับเม็ดทรายที่ร้อนประมาณ 890 กรัมเป็นเวลา 10นาทีเพื่อให้เมล็ดแตกออก (ไม่ควรคั่วนานเกินไปจนเมล็ดไหม้) หลังจากคั่วแล้วนำเอาเมล็ดมะขามที่กำลังร้อนแช่ในน้ำเย็นทันที เพื่อให้เปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก เทน้ำออก แล้วนำมาวางบนกระดาษหรือผ้าเพื่อซับให้เมล็ดแห้ง ทำการแยกเปลือกออกจากเมล็ด แล้วล้างให้สะอาด นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 40°C จนแห้งและมีน้ำหนักคงที่ แล้วนำไปหาน้ำหนักของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามและเมล็ด ต่อจากนั้นนำเปลือกหุ้มเมล็ดมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดก่อนนำไปสกัดแยก

8.2 การสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม

นำเอาเปลือกหุ้มเมล็ดที่อบจนแห้งและบดให้ละเอียดแล้วมาสกัดแยกสารตามวิธีของ Komutarin *et al.* (2004) ขั้นตอนต่อไปนี้

1.ชั่งเปลือกเมล็ดมะขามที่บดให้ละเอียดแล้วจำนวน 2.0 กรัม ใส่ในกรวยแยก (separating funnel) เติม 70% เอทานอลจำนวน 40 มล. นำมาเขย่าแรงๆ เป็นเวลา 10-20 นาที

2. นำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ประมาณ 8-9 ครั้ง จนได้สารละลายใสสีน้ำตาลอ่อนและไม่มีตะกอน

3. นำเอาส่วนน้ำใสที่กรองได้ (filtrate) จำนวน 20 มล. มาเติมคลอโรฟอร์ม จำนวน 20 มล. จากนั้นเขย่าแรงๆเป็นเวลา 10-20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

4. ดูดเอาสารละลายที่อยู่ชั้นบนของกรวยแยกประมาณ 8 มล. นำมาใส่ในกรวยแยกใบใหม่ แล้วเติม ethyl acetate จำนวน 20 มล.

5. เขย่าแรงๆเป็นเวลา 10-20 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น

6. ดูดเอาสารละลายชั้นบนใส่ในถ้วยกระเบื้องแล้วนำมาทำการระเหยให้แห้งโดยใช้ rotary evaporation ที่อุณหภูมิ 35 °C ในสูญญากาศ

7. เมื่อระเหยจนแห้งแล้ว ชั่งน้ำหนักของ residue และจดบันทึกไว้

8. นำเอา residue ที่ได้มาละลายในเมธานอลจนได้สารละลาย stock solution ความเข้มข้น 100 มก/มล.

9. เก็บสารละลายที่ได้นี้ไว้ที่อุณหภูมิ -4°C เพื่อเป็น stock สำหรับใช้ทดสอบหาปริมาณสารประเภท phenolic compound และฤทธิ์ทางชีวภาพเช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามต่อไป

8.3 <u>การหาปริมาณสารประกอบพวก phenolic compounds (phenolic compound content)</u>

8.3.1 การหาปริมาณ total phenol ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม

การหาปริมาณของ total phenol ในเปลือกเมล็ดมะขามสำหรับการทดลองนี้ใช้วิธี Folin-Ciocaulteau reaction และแสดงค่าของ Total phenol ในรูปของ ปริมาณ gallic acid หน่วยเป็นกรัมต่อ dry extract จำนวน 100 กรัม ดังรายละเอียดวิธีการทดลองต่อไปนี้

1. นำเอา stock ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามที่สกัดได้มาทำการเจือจางจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มก/มล.

2. ดูดเอาสารสกัดที่เจือจางแล้วนี้มาจำนวน 0.1 มล. ใส่ในหลอดทดลองเติมน้ำกลั่นจำนวน 8.4 มล. และ 2 N Folin reagent จำนวน 0.5 มล.

3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที

4. เติมสารละลาย 20% ของ Na_2CO_3 จำนวน 1 มล. แล้วผสมสารละลายให้เข้ากันดี

5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

7.นำเอาค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหาปริมาณ total phenol จาก กราฟมาตรฐาน

8. ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง สำหรับแต่ละตัวอย่างแล้วนำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย

การสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียม gallic acid ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ประมาณ 5 ความเข้มข้น คือ10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อ 100 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย แล้วนำไปหา total phenol โดยวิธี Folin-Ciocaulteau reaction ดังรายละเอียดที่กล่าวข้างต้น ต่อจากนั้นนำเอาค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มา สร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน X เป็นค่าความเข้มข้นของ gallic acid ที่ใช้ และแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง ที่วัดได้ หาปริมาณ total phenol ของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามแต่ละสายพันธุ์ในรูปที่สมมูลย์กับ gallic acid

8.3.2 การหาปริมาณ tannin ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม

สำหรับการหาปริมาณ tannin ในการทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของEuropean pharmacopoeia 4 edition , 2002 โดยมีขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้

1. เตรียมตัวอย่าง โดยนำสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำการกรอง โดยทิ้งสารที่กรองได้ในระยะแรกจำนวน 50 มิลลิลิตร

2. นำสารที่กรองได้ในข้อ 1 มาจำนวน 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวจำนวน 2 มิลลิลิตร มาเติม phosphomolybdotungstic reagent จำนวน 1 มิลลิลิตรและน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 290 กรัม/ลิตร จำนวน 12 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร (A_1)

3. นำสารที่กรองได้ในข้อ 1 จำนวน 10 มิลลิลิตร มาเติม hide power จำนวน 0.10 กรัม เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 60 นาทีแล้วกรอง นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วจำนวน 2 มิลลิลิตร เติม phosphomolybdotungstic reagent จำนวน 1 มิลลิลิตรและน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 290 กรัม/ลิตร จำนวน 12 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร (A_2)

4. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

นำ pyrogallol จำนวน 50 มิลลิกรัมละลาย ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวจำนวน 5 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เจือจางแล้วนี้จำนวน 2 มิลลิลิตร มาเติม phosphomolybdotungstic reagent จำนวน 1 มิลลิลิตรและน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 290 กรัม/ลิตร จำนวน 12 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร (A_3)

นำเอาค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณ tannin ตามสมการดังนี้

$$\%\text{tannin} = \frac{62.5(A_1 - A_2)m_2}{A_3 \times m_1}$$

เมื่อ A_1 A_2 และ A_3 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย, สารละลายที่ไม่ถูกดูดซับด้วย hide powder และสารละลายมาตรฐาน pyrogallol ตามลำดับ

m_1 และ m_2 คือ น้ำหนักสารสกัดและน้ำหนัก pyrogallol ในหน่วยกรัม ตามลำดับ

8.3.3 การหาปริมาณ proanthocyanidin ในสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม

สำหรับการหาปริมาณ proanthocyanidin ในการทดลองนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Troszyńska A. *et al.*, 2002. โดยมีขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้

เติม acid butanol reagent (เตรียมจาก n-butanol จำนวน 9.5 มิลลิลิตร และ สารละลาย HCl จำนวน 0.5 มิลลิลิตร) จำนวน 6 มิลลิลิตร ลงในสารสกัดความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติม iron reagent จำนวน 0.2 มล. (เตรียมจาก $FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$ 0.5 กรัม ลงใน 2N HCl จำนวน 25 มิลลิลิตร) เขย่าให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 95 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 50 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงปริมาณ proanthocyanidin ในสารสกัดแต่ละสายพันธุ์

8.4 <u>การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม</u>

8.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม

8.4.1.1 การหาคุณสมบัติ reducing power ของสารสกัด

การศึกษาคุณสมบัติ reducing power นั้นเป็นการศึกษาความสามารถในการให้ electron และสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระเพื่อเปลี่ยนเป็นสารที่เสถียรขึ้นและเป็นการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ โดยใช้สารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขาม 5 สายพันธุ์ ในการทดสอบหา reducing power นั้น ดัดแปลงมาจากวิธีของ Yen G.C. and Chen H.Y., 1995 มีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

1. เตรียม สารละลาย 0.2 M phosphate buffer pH 6.0 จำนวน 80 ml โดยชั่ง Sodium dihydrogen phosphate 2.028 g, Disodium hydrogen phosphate 0.426 g ละลายน้ำ 60 ml. นำมาวัดค่า pH = 6.2 ปรับ pH ให้เป็น 6.6 ด้วย 0.2 M NaOH แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 80 ml ผสมให้เข้ากัน.

2. เตรียมสารละลาย 1% potassium ferricyanide($K_3Fe(CN)_6$) จำนวน 80 ml โดยชั่ง $K_3Fe(CN)_6$ 0.8 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 80 mL

3. เตรียมสารละลาย 10% trichloroacetic acid จำนวน 80 ml โดยชั่ง trichloroacetic acid จำนวน 8 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 80 ml

4. เตรียมสารละลาย 0.1% ferrous chloride($FeCl_3$) จำนวน 20 ml โดยชัง $FeCl_3$ จำนวน 0.8 g ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 20 ml

ขั้นตอนการทดลอง

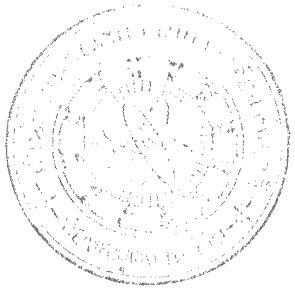
เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.6 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จำนวน 2.5 ml ในสารสกัดที่ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 ml จากนั้นเติม 1% potassium ferricyanide จำนวน 2.5 ml ลงในสารละลาย แล้วนำไปบ่มไว้ที่ 50 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 10% trichloroacetic acid จำนวน 2.5 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายดังกล่าวมาจำนวน 2.5 ml เติมน้ำกลั่นลงไปจำนวน 2.5 ml และ 0.1% ferrous chloride จำนวน 0.5 ml ตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร โดยใช้ reagent เป็น blank และ Butylated hydroxyanisole (BHA) เป็น positive control ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงความสามารถในการเป็น reducing agent ของสารสกัด

8.4.1.2 การศึกษาความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน

ในการศึกษาความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันนั้น ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Jiang Y.H. *et al.* (2005) มีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

เตรียม yolk suspension จากไข่แดงและสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.45 อัตราส่วน 1 : 1 นำสารละลายดังกล่าวมาจำนวน 1 มิลลิลิตร เติม PBS จนได้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร และสารละลาย $FeSO_4.7H_2O$ ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงใน yolk suspension จำนวน 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายไปบ่มไว้ที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม trichloroacetic acid ความเข้มข้น 20% จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และ 2-thiobarbituric acid ความเข้มข้น 0.8% จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4500 rpm เป็นเวลา 10 นาทีนำสารละลายใสส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยใช้ reagent เป็น blank และ ascorbic acid เป็น positive control นำเอาค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา % inhibition rate ดังสมการข้างล่าง จากนั้นนำไปหาค่า IC_{50} ของแต่ละสายพันธุ์

$$\%inhibition\ rate = \left(\frac{A - B}{A}\right) * 100$$



เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่เติมสารสกัด

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเติมสารสกัด

8.4.1.3 การศึกษาความสามารถของสารสกัดในการจับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ($OH^{\bullet}$)

เพื่อศึกษาถึงความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการทำลาย 2-deoxy-ribose ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Betty Hsu *et al.*, 2006 มีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

เติมสารละลายโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ จำนวน 250 ไมโครลิตร สารสกัดความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 250 ไมโครลิตร และสารละลาย 2-deoxy-ribose ความเข้มข้น 28 มิลลิโมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Fe^{3+}-Na_2EDTA จำนวน 200 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย $FeCl_3$ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย Na_2EDTA ความเข้มข้น 104 มิลลิโมลาร์ อัตราส่วน 1:1 แล้วเติมสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร และสารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 1 มิ ลลิโมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวมาเติมสารละลาย trichloroacetic acid ความเข้มข้น 2.8% จำนวน 1 มิลลิลิตร และ 2-thiobarbituric acid ความเข้มข้น 1% จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 95-100 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายดังกล่าวมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร โดยใช้ reagent เป็น blank และ BHA เป็น positive control นำเอาค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา %inhibition ดังสมการข้างล่าง จากนั้นนำไปหาค่า IC_{50} ของ แต่ละสายพันธุ์

$$\%inhibition\ rate = \left(\frac{A - B}{A}\right) * 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่เติมสารสกัด

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อเติมสารสกัด

8.4.1.4 การศึกษาความสามารถของสารสกัดในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Scavenging of Hydrogen peroxide)

เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดในการกำจัด H_2O_2 ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Jiang, Y.-H. *et al*, 2005 โดยมีขั้นตอนโดยย่อดังนี้

เตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 2 mMในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 นำเอาสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จำนวน 0.6 ml มาเติมสารสกัดความเข้มข้น 10-200 µg/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 nm คำนวณหาค่าความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (% Scavenging effect) จากสูตร

$$\% \text{ Scavenging effect} = [(Ab_{control} - Ab_{sample})/ Ab_{control}] \times 100$$

โดยที่ $Ab_{control}$ คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารสกัด

Ab_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ

8.4.1.5 การทดสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity) ของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม (Yen and Chen, 1995)

การทดสอบมีรายละเอียดวิธีการทดลองดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลาย 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 90 µM ใน methanol โดยชั่งสาร DPPH จำนวน 3,548 µg ละลายใน methanol 100 ml

2. เตรียมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามสายพันธุ์ต่างๆ ให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml เป็น stock solution

3. ผสมสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามความเข้มข้น 0-200 µg/ml กับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 90 µM ที่เตรียมไว้ในปริมาณที่กำหนด

4. ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยการ vortex แล้วทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

5. เมื่อครบกำหนดเวลานำไปวัดค่า Absorbance ที่ 517 nm

6. นำผลที่ได้มาสร้างกราฟ ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม (แกน x) กับ ค่า OD 517 nm (แกน Y)

7. คำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในรูป %inhibition หรือ %scavenging โดยใช้สูตร

% inhibition = [(A517 control – A517 sample)/A517 controi]*100

9. <u>การเตรียมเจลใช้ภายนอกของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ด *Tamarindus indica* และวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในหลอดทดลอง</u>

9.1 <u>ตัวอย่างพืช</u>

เก็บตัวอย่างมะขามหวาน สายพันธุ์สีทองเบา TI-STB/P จากไร่ชนิกา จังหวัดเพชรบูรณ์ นำส่วนของเมล็ดมะขาม (100 กรัม) จากฝักมะขามสุก มาอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที แยกส่วนเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามออกจากเนื้อในเมล็ด (kernel) มะขาม แล้วนำมาอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำมาบดให้เป็นผงละเอียด เก็บในขวดปิดสนิท และเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น

9.2 <u>วิธีการสกัด</u>

นำผงเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 2 กรัม สกัดด้วย 70% ethanol ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง WHATMAN เบอร์ 4 นำส่วนที่ได้จากการกรองปริมาตร 20 มิลลิลิตร มาสกัดต่อด้วย chloroform ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใช้ separating funnel หลังจากนั้นนำส่วนของชั้นบนของ aqueous extract ที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 8 มิลลิลิตร มาสกัดต่อด้วย ethyl acetate ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยใช้ separating funnel นำส่วนชั้นบนของ ethyl acetate ที่ได้มาระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน นำสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (TSCE) ที่ได้มาละลายใน 70% ethanol เตรียมที่ความเข้มข้น 100 mg/ml เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9.3 <u>การเตรียมผลิตภัณฑ์เจลใช้ภายนอก</u>

ใช้ Polysaccharide Gel (PG) สกัดจากเปลือกทุเรียนเป็นสารก่อเจล ตัวอย่างสาร Polysaccharide Gel (PG) ได้จากภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9.3.1 สูตรการเตรียมผลิตภัณฑ์ TSCE-PG gel

เตรียม Polysaccharide gel เป็นเจลเบสตามวิธีของ Lertchaiporn (2003) ประกอบด้วย PG ความเข้มข้น 2.5% ในน้ำกลั่น glycerin 10 กรัม propylene glycol 15 กรัม amerchol L-101 0.25 กรัม cremophor RH-40 10 กรัม calcium chloride solution (0.05 M) 0.2 กรัม triethanolamine ปรับค่า pH ที่ 4-4.5 และน้ำ deionized เติมจนครบปริมาตรในผลิตภัณฑ์ 100 กรัม วิธีการเตรียมโดยเติมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามความเข้มข้น 70-280 µg ที่ละลายใน 0.5 มิลลิกรัม ของ 70% ethanol ลงใน PG เจลเบส (1 กรัม) เตรียมผลิตภัณฑ์ซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

9.3.2 การประเมินความคงตัว (stability test) ของผลิตภัณฑ์ (Grimm, 1987)

1. เก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อทดสอบความคงตัว

โดยนำผลิตภัณฑ์เจล 25 กรัม ใส่ในขวดแก้วปากกว้าง แล้วปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 30 วัน ประเมินความเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ ความเป็นกรด-ด่าง และลักษณะการไหลด้วยเครื่อง rheometer แล้วบันทึกผลการทดลอง

2. การทดสอบความคงตัวแบบเร่งด้วยอุณหภูมิ (Accelerate test by temperature cycling)

ทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี heating-cooling cycle โดยนำผลิตภัณฑ์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นครบ 1 รอบของการทดลอง ทำการทดลองซ้ำอย่างต่อเนื่องจนครบ 4 รอบ สังเกตุการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ ความเป็นกรด-ด่าง และลักษณะการไหล แล้วบันทึกผลการทดลอง

9.4 <u>ทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ TSCE-PG gel</u>

ทดสอบฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของผลิตภัณฑ์ TSCE-PG gel ด้วยวิธี lipid peroxidation inhibition test (Jiang *et al.*, 2005) การทดสอบใช้ lipid ในไข่แดงโดยเตรียมตัวอย่างไข่แดง (egg yolk) มาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน นำไข่แดงมาผสมกับ phosphate buffer saline (PBS), pH 7.45 ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer หลังจากนั้นเจือจางด้วย PBS 40 เท่า เพื่อเตรียมเป็น yolk suspension และเตรียมผลิตภัณฑ์เจล 3 กรัม ละลายใน 70% ethanol ปริมาตร 3 มิลลิลิตรเพื่อใช้ในการทดลอง นำ yolk suspension 0.5 มิลลิลิตร และตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร และ $FeSO_4$ 24 mM 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติม 20% trichloroacetic acid 0.5 มิลลิลิตร และ 0.8% 2-thiobarbituric acid 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วน supernatant ใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 532 nm โดยเครื่อง spectrophotometer ฤทธิ์การต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชันคำนวณได้ โดยสมการต่อไปนี้

$$\text{Inhibition of lipid peroxidation (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A คือ ค่าการดูดแสงของ reaction mixture ที่ไม่มีสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

B คือ ค่าการดูดแสงของ reaction mixture ที่มีสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม