

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเรื่องการสกัด และการศึกษาสารสกัดจากพืชตระกูลเฟิน ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดส ซึ่งมีวิธีการดำเนินการตามลำดับดังนี้

3.1 การสำรวจข้อมูลพื้นฐาน

ขั้นตอนนี้เป็นการสำรวจข้อมูลพื้นฐาน ศึกษาวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ และวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดส โดยศึกษาจากเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

3.2 การวางแผนการทดลอง

ขั้นตอนนี้เป็นการวางแผนการทดลอง โดยการศึกษาเอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัด และวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดส วางแผนการทดลองสกัด และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดสในพืชตระกูลเฟิน

3.3 การทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์

ขั้นตอนนี้ได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เพื่อสกัดและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดสในพืชตระกูลเฟิน

ผู้วิจัยได้ทำการทดลองโดยใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี ในห้องปฏิบัติการภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

3.4 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

งานวิจัยนี้ศึกษาเรื่องสารสกัดจากพืชตระกูลเฟินที่มีฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดส ซึ่งมีเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และพืชที่ใช้ทดลองดังนี้

3.4.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. ชุดสกัดแบบต่อเนื่อง (Soxhlet)
2. เครื่องบดไฟฟ้า
3. เครื่องบดคัดขนาด (Centrifugal mill)
4. เครื่องชั่งวิเคราะห์

5. เตาอบ
6. ขวดวัดปริมาตร
7. ปิเปตพร้อมลูกยาง
8. หลอดหยด. ชุดกรองแบบสุญญากาศ
9. ซ้อนตักสาร
10. แท่งแก้วคน
11. กรวยแก้ว
12. บีกเกอร์
13. กระดาษกรอง Whatman No.4
14. ขวดเก็บตัวอย่าง
15. ขวดรูปชมพู่
16. กระจกนาฬิกา
17. หลอดคาปิลลารี
18. เครื่องระเหยลดความดันแบบหมุน (Rotary Evaporator)
19. เครื่องยู่วิจิเบิลแอปซอร์บเบนซ์ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเฟลทริคเตอร์
20. โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) ชนิดอะลูมินียม
21. คอลัมน์โครมาโทกราฟี (CC)

3.4.2 สารเคมี

1. Hexane
2. Ethyl acetate
3. Ethanol
4. Acetone
5. น้ำกลั่น
6. Silica gel 60, F254
7. Anisaldehyde reagent
8. Conc. Sulfuric
9. Acetic acid
10. Sodium carbonate
11. Dimethylsulfoxide
12. Potassium Phosphate
13. Sodium Phosphate

14. α -glucosidase

15. *p*-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranoside

3.4.3 พืชที่ใช้ในการทดลอง

ผักกูด และผักแว่น ใช้ส่วนใบและลำต้นอ่อน กระแตไต่ไม้ ใช้ส่วนเหง้าหรือหัว

3.5 วิธีการสกัดสาร [14]

วิธีการสกัดสารจากพืชตระกูลเฟินประกอบด้วย การเตรียมวัตถุดิบ วิธีการสกัดแบบหมัก และวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

3.5.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำเฟินมาล้างให้สะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาอบให้แห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเฟินแห้งมาบดด้วยเครื่องบด คัดแยกขนาด ให้มีขนาดไม่เกิน 1.5 มิลลิเมตร นำเฟินที่คัดแยกขนาดแล้วใส่ในถุงซิปล็อก เก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น

3.5.2 วิธีการสกัดเฟินโดยวิธีการสกัดแบบหมัก (Maceration)

นำเฟินแห้งที่ผ่านการบดและคัดขนาดแล้วปริมาณ 100 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนปริมาตร 500 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.1 ก ข และ ค) สกัดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยลดความดันแบบหมุน (Rotary Evaporator) (รูปที่ 3.2) และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิม 3 ครั้ง จะได้สารสกัดหยาบ (Crude)



(ก)



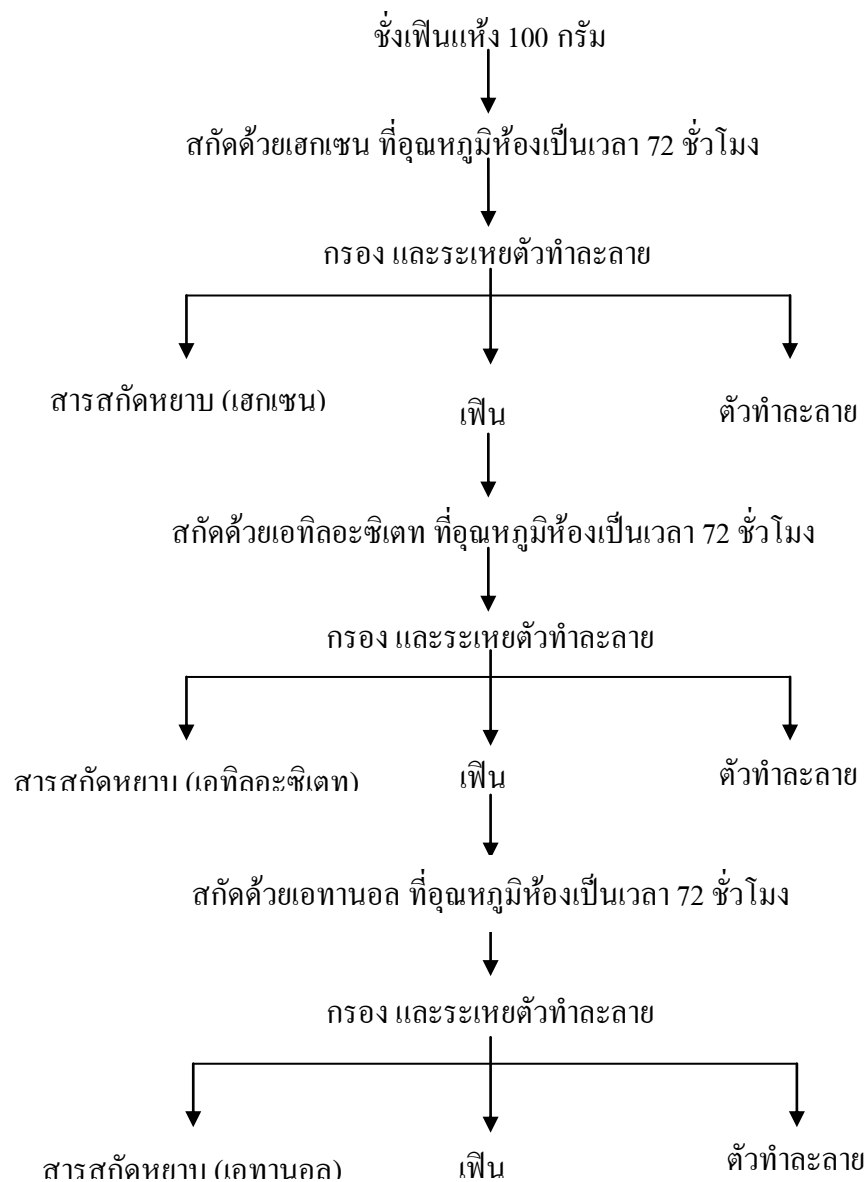
(ข)



(ค)

รูปที่ 3.1 วิธีการสกัดแบบหมัก (ก) ผักกูด (ข) ผักแว่น และ (ค) กระแตไต่ไม้

นำกากเฟินที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน มาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 500 มิลลิลิตร สกัดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิม 3 ครั้ง จะได้สารสกัดหยาบ นำกากเฟินมาสกัดต่อเช่นเดิม ด้วยตัวทำละลายเอทานอลปริมาตร 500 มิลลิลิตร สกัดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรอง แล้วนำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการสกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเดิม 3 ครั้ง จะได้สารสกัดหยาบ ดังแผนภาพที่ 3.1 ซึ่งนำหนักที่ได้ เพื่อบรรยายสารสกัดขั้นตอนการสกัดเฟินแบบหมัก



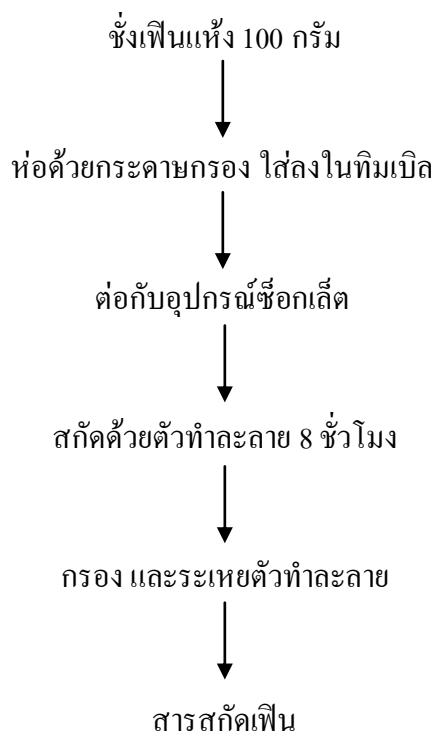
แผนภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการสกัดเฟินแบบหมัก



รูปที่ 3.2 ระเหยตัวทำละลายออกจากด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน

3.5.3 วิธีการสกัดเฟินโดยวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง

นำเฟินแห้งที่ทำการบดแล้วปริมาณ 5 กรัม หุ้มด้วยกระดาษกรองใส่ลงในทิมเบิล (Thimble) แล้วเติมเอทิลอะซิเตทปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วก้นกลม ทำการสกัดที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดันจะได้สารสกัดหยาบ และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดังแผนภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดเฟินแบบต่อเนื่อง



แผนภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดเฟินแบบต่อเนื่อง

ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลด้วยวิธีการเดียวกัน ซึ่งน้ำหนักที่ได้จากการสกัดในตัวทำละลายต่างๆ เพื่อหาร้อยละสารสกัด

3.6 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส [11]

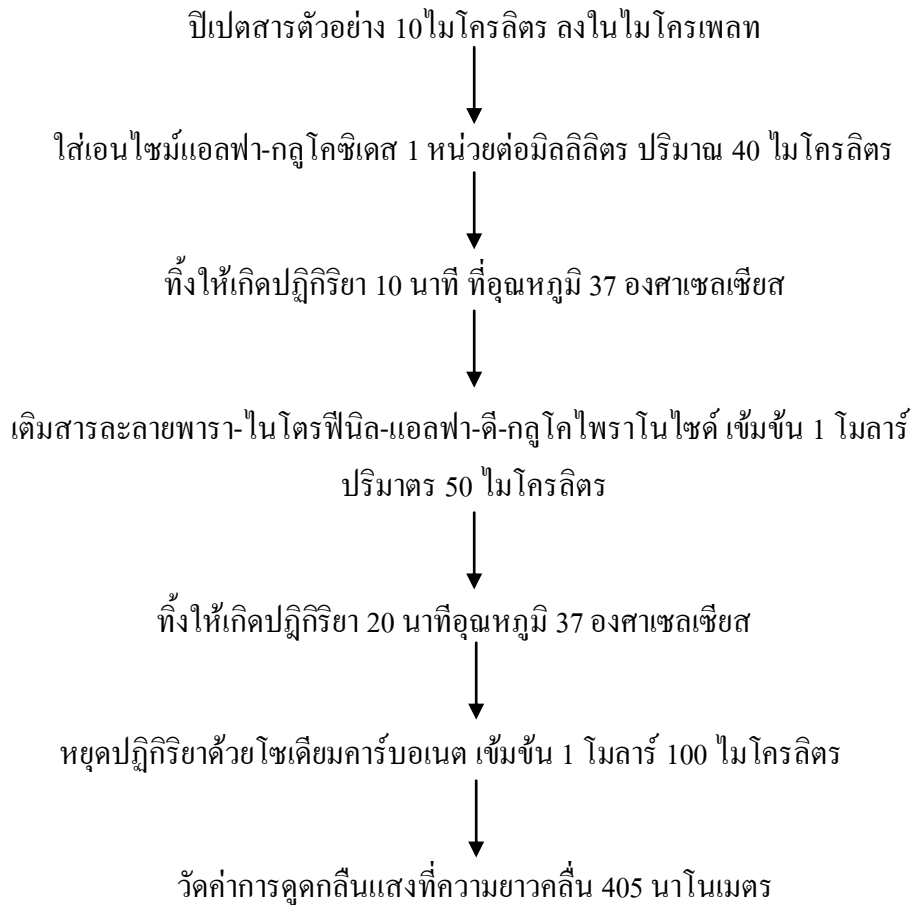
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสมีขั้นตอนในการทดสอบดังนี้

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยซึ่งสารสกัดหยาบหนัก 2 มิลลิกรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท (microplate) จากนั้นใส่เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
3. เติมน้ำตาลละลายพารา-ไนโตรฟีนอล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งทำหน้าที่เป็นซับสเตรตลงไป ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 20 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
4. หยุดปฏิกิริยากับโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 1 โมลาร์ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องยูวีวิชิเบิล แอบซอร์บแนนซ์ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลทรีดเดอร์ (UV/Vis absorbance spectrophotometer microplate reader) ดังรูปที่ 3.3 ใช้ DMSO เป็นแบล็ค (Blank) จากนั้นเติมน้ำตาลละลายชนิดเดียวกันลงไป เหมือนกับการทดลองข้างต้น ดังแผนภาพที่ 3.3 ใช้อะคาร์โบส (Acarbose) เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ



รูปที่ 3.3 เครื่องยูวีวิชิเบิล แอบซอร์บแนนซ์ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลทรีดเดอร์

ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส



แผนภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ดังสมการที่ 3.1

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

A_{blank} คือค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่มีสารตัวอย่าง

A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเคมี ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

3.7 วิธีการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำซิลิกาเจลมาแช่ในตัวทำละลาย 100% เฮกเซนจนอิ่มตัว ทำการกวนไปด้วย จากนั้นนำซิลิกาเจลที่ได้เทลงในคอลัมน์ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร) จนได้ความสูงประมาณ 15 เซนติเมตร (รูปที่ 3.4 ก) ค่อยๆถ่ายเฮกเซนออกจากคอลัมน์ จนเหลือตัวทำละลายในระดับที่สูงกว่าซิลิกาเจลประมาณ 2 เซนติเมตร เพื่อป้องกันการแตกตัวของซิลิกาเจลเนื่องจากความร้อน และนำสารละลายซูบอะซิโตนมาพันรอบคอลัมน์ให้คอลัมน์เย็น เพื่อป้องกันการแตก (รูปที่ 3.4 ข)



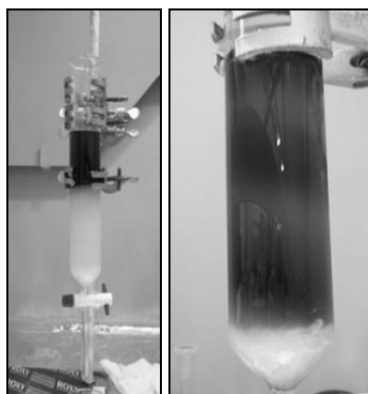
(ก)



(ข)

รูปที่ 3.4 การบรรจุซิลิกาเจลในคอลัมน์ (ก) บรรจุซิลิกาเจล (ข) พันคอลัมน์ด้วยสารละลายซูบอะซิโตน

นำกรดที่ระเหยตัวทำละลายออกแล้ว จำนวน 0.5 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายในตัวทำละลาย 100% เฮกเซน ใช้หลอดหยดหยดสารละลายลงในคอลัมน์จนหมด ปล่อยสารที่ได้จากคอลัมน์ลงในบีกเกอร์ครั้งละ 20 มิลลิลิตร โดยชะด้วยตัวทำละลายเฮกเซน:เอทิลอะซิเตท จากนั้นค่อยๆเพิ่มเข้าไปเรื่อยๆ โดยใช้อัตราส่วน 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วยอัตราส่วน 100:0 90:10 80:20 70:30 ... 0:100 ตามลำดับ (รูปที่ 3.5) ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจากบีกเกอร์จนหมด จะได้สารทั้งหมด 50 แพรกซ์

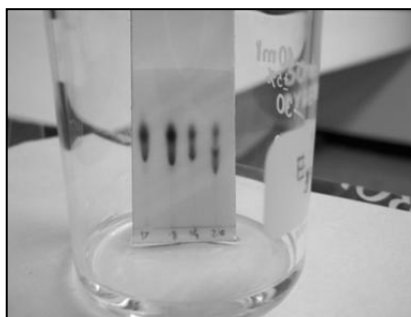


รูปที่ 3.5 การแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี

3.8 วิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารด้วยแผ่นโครมาโทกราฟี

ตัดแผ่นอะลูมิเนียมโครมาโทกราฟีให้มีขนาดกว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 5 เซนติเมตร กำหนดตำแหน่งเฟสเคลื่อนที่ และเฟสอยู่กับที่ด้วยดินสอ นำสารที่ได้ในแต่ละแฟรกชันละลายใน 100% เฮกเซน ประมาณ 2 หยด

เตรียมอ่างสำหรับแช่แผ่นโครมาโทกราฟี โดยเติมเฮกเซน:เอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 80:20 ประมาณ 1 มิลลิลิตรลงบีกเกอร์ ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ครอบกระดาดทรงภายในบีกเกอร์ เพื่อให้ตัวทำละลายอิมตัว ปิดด้วยกระจกนาฬิกา จากนั้นทำการสปอตสารในแต่ละแฟรกชันด้วยหลอดคาปิลลารี ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟี (เฟสอยู่กับที่) ระยะห่างของแต่ละจุดประมาณ 0.3 เซนติเมตร วางแผ่นโครมาโทกราฟีลงในบีกเกอร์ แล้วปิดด้วยกระจกนาฬิกา ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (รูปที่ 3.6) ไปจนถึงเส้นที่กำหนดไว้ คีบแผ่นโครมาโทกราฟีออกจากบีกเกอร์ ระเหยตัวทำละลายออก



รูปที่ 3.6 การเคลื่อนที่ของสารบนแผ่นอะลูมิเนียมโครมาโทกราฟี

นำมาส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ใช้ดินสอทำเครื่องหมายบริเวณสีที่เกิดขึ้นบนแผ่นโครมาโทกราฟี ตรวจสอบสารที่ไม่มีสีอีกครั้ง โดยนำแผ่นโครมาโทกราฟีแผ่นเดิมมาชุบด้วยแอนิซอลดีไฮด์รีเอเจนต์ (Anisaldehyde reagent) แล้วนำไปวางบนเพลทให้ความร้อน (Hot plate) ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส สังเกตสีที่เกิดขึ้น ทำเครื่องหมายแสดงจุดที่เกิดสี นำแผ่นโครมาโทกราฟีที่ได้ทั้งหมดมาเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของสาร เพื่อทำการแยกให้บริสุทธิ์อีกครั้ง เลือกจุดที่เกิดขึ้นบนแผ่นโครมาโทกราฟีในช่วงที่ใกล้เคียงกัน แล้วนำสารที่ได้ในช่วงนั้นมารวมเป็นแฟรกชันเดียวกัน ทำการแยกสารในแต่ละแฟรกชันให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยคอลัมน์ นำสารที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส