

บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ดอกจ๊วและใบจ๊วที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นจ๊วที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ ที่อำเภอเลาขวัญ จังหวัดกาญจนบุรี โดยเก็บดอกในเดือนธันวาคม – กุมภาพันธ์ ส่วนใบเก็บในเดือน เมษายน - พฤษภาคม

3.2 สถานที่ทำการวิจัย

1. สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กรุงเทพมหานคร
2. สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต จังหวัดภูเก็ต

3.3 สารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือ

3.3.1 สารเคมี

ethylacetate	hexane
chloroform	acetone
ethanol	methanol
DMSO for NMR	dichloromethane
sodiumsulfate anhydrous	H ₂ SO ₄ conc.
NaOH	petroleum ether
boric acid	HCl
bromocresol green	methylene blue
DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	methyl red
BHA(3-tert-butyl-4-hydroxyanisole)	K ₂ SO ₄
CuSO ₄ .5H ₂ O	ceric sulfate
diethylether	aceticanhydride
silica gel 0.04 - 0.06 mm for flash chromatography	
silica gel 0.06 - 0.2 mm for column chromatography	
silica gel for preparative thin layer chromatography	

3.3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้อบไฟฟ้า memmert
2. เครื่อง Precisa รุ่น XT 220 A- FR

3. โถดูดความชื้น (desiccators)
4. Rotary Evaporator รุ่น Strike 202
5. เครื่อง Spectronic Genesys 5 ของ Milton Roy
6. เตาเผา (Muffle furnace)
7. เครื่องหาเชื้อไฮหยาบ Velp Scientifica
8. เครื่อง Buchi Rotavapor R- 114
9. เครื่อง Electromantle Me ใช้ย้อยไขมัน
10. Hot plate
11. เครื่องเขย่า
12. เครื่อง Transsonic 460 ของ Elma
13. เครื่อง NMR ที่มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต
14. Volumetric flask ขนาดต่าง ๆ
15. เครื่องชั่งหาโปรตีน
16. Beaker ขนาดต่าง ๆ
17. ขวด Conical flask ขนาดต่าง ๆ
18. คอลัมน์ขนาดต่าง ๆ ใช้แยกสาร
19. ขวดเก็บสารที่แยกได้จากคอลัมน์
20. ขวด Evaporator ขนาดต่าง ๆ
21. Burette และ Pipette ขนาดต่าง ๆ
22. เครื่องแก้วพื้นฐาน
23. TLC Plate 20x 20 cm silica gel 60 F
24. กระดาษกรอง
25. can
26. thimble

3.4 รูปแบบการวิจัย

- เก็บตัวอย่างดอกจ๊วและใบจ๊วให้เพียงพอต่อการทดลอง ตากแดด / ฝั่งลมให้แห้ง
 บดเป็นชิ้นเล็ก ๆ

- วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ
- วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
- วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี
- วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 สารตัวอย่าง

- ศึกษาแหล่งของต้นจ๊วที่จังหวัดกาญจนบุรี
- พิสูจน์เอกลักษณ์ของต้นจ๊วจากสำนักงานหอพรรณไม้
- เก็บตัวอย่างดอกจ๊วและใบจ๊ว มาตากแดดหรือผึ่งลมให้แห้ง บดให้เป็นผงหยาบ ๆ

3.5.2 วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของดอกจ๊วและใบจ๊ว

3.5.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น

อุปกรณ์

1. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า (electric oven)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. เครื่องชั่ง

วิธีทดลอง(ดัดแปลงจากA.O.A.C.1999)

1. อบอุ่นสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก
2. กระทำเช่นข้อ 1 ซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียด ประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้น ชั่งทราบน้ำหนักแล้ว
4. นำไปอบในตู้ไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง
5. นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก
6. อบอุ่นอีกครั้งๆละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
7. กำหนดหาปริมาณความชื้น จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

3.5.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

สารเคมี และอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ย่อยโปรตีน ประกอบด้วยเตาเผา และเครื่องดักจับไอกรด (scrubber)
2. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร และขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ปิเปต (แบบกระเปาะ) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
5. บิวเรตต์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
6. ลูกแก้ว (glass bead)
7. เครื่องหึ่งไฟฟ้า
8. สารผสมระหว่าง ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) และ (K_2SO_4) อัตราส่วน 1 : 10
9. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 60
11. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4
12. กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.02 N
13. อินดิเคเตอร์ เป็นสารผสมระหว่าง เมทิลเรด เมทิลินบลู และ โบรโมคริสซอลกรีน

วิธีการทดลอง(ดัดแปลงจาก A.O.A.C.1999)

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5-1 กรัม ใส่ในหลอดย่อยโปรตีนและทำแบลงค์
2. ใส่สารผสม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ และ K_2SO_4 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ประมาณ 20 มิลลิลิตร
4. วางหลอดย่อยในเตาย่อยแล้วประกอบสายขวงระหว่างฝาครอบ ขวดใส่ต่างและเครื่องจับไอกรดให้เรียบร้อย
5. เปิดสวิทซ์เครื่องจับไอกรดและเตาย่อย แล้วตั้งอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที จากนั้นปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 350 องศาเซลเซียส ย่อยต่ออีก 60 นาที จนได้สารละลายใส
6. ปลดอxygenให้เย็น
7. นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นล้างหลอดย่อยให้หมด ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้กลั่นต่อไป

ขั้นตอนการกลั่น

1. จัดอุปกรณ์กลั่น แล้วเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่นด้วย

2. นำขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้นร้อยละ 4) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ซึ่งเติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควมแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้
3. คูดสารละลายตัวอย่างด้วยปิเปตแบบกระเปาะขนาด 10 มิลลิลิตร ใสลงในช่องใส่ตัวอย่าง แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 20 มิลลิลิตร
4. กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างอุปกรณ์ควมแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ
5. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.02 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง
6. กำหนดหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีนคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{(A-B) \times N \times 14.007 \times F}{W} \times 100$$

- เมื่อ
- A = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
 - B = ปริมาตรกรดที่ใช้ไทเทรตกับแบลนค์ (มิลลิลิตร)
 - N = ความเข้มข้นของกรด (นอร์มัล)
 - F = แฟกเตอร์
 - W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

3.5.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus) ประกอบด้วย ขวดก้นกลม ซอกเลต (soxhlet) อุปกรณ์ควมแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mantle)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
3. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. โถดูดความชื้น (desiccator)
7. บีโตรีเลียม อีเทอร์ หรือเฮกเซน

วิธีการทดลอง (ดัดแปลงจาก A.O.A.C.1999)

1. อบขวดก้นกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็น ในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ถ้าตัวอย่างเป็นอาหารชนิดที่ไม่มีไขมัน มากให้ชั่ง 1-2 กรัม ถ้าเป็นชนิดที่มีไขมันน้อยให้ชั่ง 3-5 กรัม ห่อให้มีฉิดชิดตามวิธีการห่อ แล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยใยแก้วหรือสำลีเพื่อให้สารตัวทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในชอคเคต
4. เติมสารตัวละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดหาไขมันประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางลงบนเตา
5. ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นแล้วเปิดสวิตซ์ให้ความร้อน
6. ใช้เวลาในการสกัดไขมันนาน 6 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารตัวละลาย กลับัน ตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 15 หยดต่อนาที
7. เมื่อครบ 6 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากชอคเคต ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจาก ชอคเคตลงในขวดก้นกลมจนหมด
8. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ
9. นำขวดหาไขมันอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
10. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำๆ ครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิลิตร
11. คำนวณหาปริมาณไขมันจาก สูตร

$$\text{ปริมาณไขมันคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

3.5.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า

อุปกรณ์

1. เตาเผา (muffle furnace)
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า

วิธีทดลอง(ดัดแปลงจากA.O.A.C.1999)

1. เเผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปิดสวิทซ์เตาเผาประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาตกลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก
2. เเผาซ้ำอีกครั้งๆละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นในข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผา ตั้งอุณหภูมิเผาที่ 600 องศาเซลเซียส และกระทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1-2
4. กำหนดหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้าคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

3.5.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารเยื่อใย

วิธีการทดลอง

1. นำกระดาษกรองวางบนกระดาษฟิลา อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วนำออกมาใส่โถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก เก็บไว้ใช้กรองในขั้นตอนต่อไป
2. ชั่งตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดไขมันออกแล้วลงในบีกเกอร์ทรงสูง สำหรับวิเคราะห์สารเยื่อใยขนาด 600 มิลลิลิตร
3. เติมกรดซัลฟูริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

4. วางบีกเกอร์บนอุปกรณ์ให้ความร้อนซึ่งต่อเข้ากับอุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นพร้อมเปิดสวิทซ์ไฟ

5. ต้มให้เดือด 30 นาที

6. กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองที่ชั่งน้ำหนักแล้ว

7. ล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นกรด

8. ถ่ายกากที่ได้ลงในบีกเกอร์ใบเดิม

9. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1.25 ปริมาณ 200 มิลลิลิตร

10. วางบีกเกอร์บนอุปกรณ์ให้ความร้อนซึ่งต่อกับอุปกรณ์ควบแน่นเช่นเดิม และต้มต่ออีก 30 นาที

11. กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองแผ่นเดิม

12. ล้างด้วยน้ำร้อนจนน้ำล้างหมดความเป็นด่าง

13. ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์(ร้อยละ 95) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

14. นำกระดาษกรองพร้อมกากใส่ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ อบแห้งในตู้อบไฟฟ้า อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 ชั่วโมง และทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

15. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำอีกครั้ง ๆ ละ 30 นาที จนกระทั่งได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

16. นำถ้วยกระเบื้องพร้อมกากที่อบแห้งแล้วไปเผาเช่นเดียวกับวิธีการวิเคราะห์ ปริมาณถ้ำ

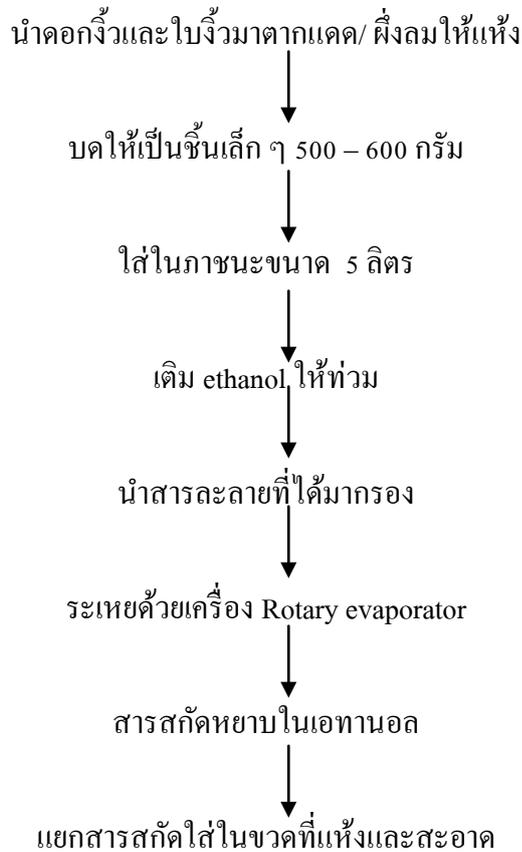
17. คำนวณหาปริมาณสารเยื่อใยจากสูตร

$$\text{ปริมาณสารเยื่อใยคิดเป็นร้อยละ} = \frac{\text{ผลต่างของ นน. ตัวอย่างหลังอบและหลังเผา}}{\text{นน. ตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

3.5.2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรต

$$\text{คาร์โบไฮเดรต (\%)} = 100 - (\% \text{ความชื้น} + \% \text{โปรตีน} + \% \text{ไขมัน} + \% \text{เยื่อใย} + \% \text{ถ้ำ})$$

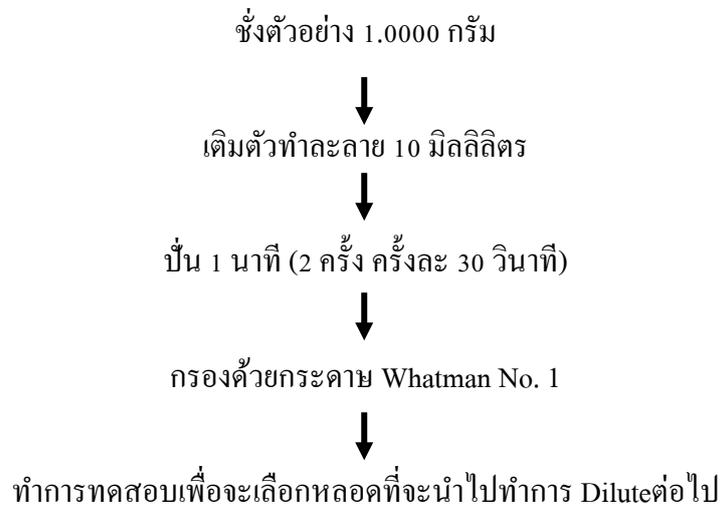
3.5.3 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของดอกงิ้วและใบงิ้ว เตรียมสารสกัดจากดอกงิ้วและใบงิ้ว



เตรียมการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ DPPH assay

- เตรียมสารละลายตัวอย่างด้วย absolute ethanol ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 8 ความเข้มข้น ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำ linear regression (absorbance and concentration) โดยใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลาย
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) ให้มีความเข้มข้นที่ต่าง ๆ กัน 8 ความเข้มข้น
- เตรียมสารละลายมาตรฐาน 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.3 mM โดยชั่ง DPPH 11.8 มิลลิกรัม (น้ำหนักโมเลกุลของ DPPH เท่ากับ 394.32) ละลายด้วย absolute ethanol แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง



ขั้นตอนการทดสอบ

หลอดที่	สารสกัด(ml)	Solvent (ml)	สารละลาย DPPH (ml)
1	1.00	0.00	1.00
2	0.80	0.20	1.00
3	0.60	0.40	1.00
4	0.40	0.60	1.00
5	0.20	0.80	1.00
6	0.10	0.90	1.00

หลังจากเติมสารละลาย DPPH แล้วตั้งทิ้งไว้ที่มีด 30 นาที แล้วทำการเลือกหลอดทดลอง โดยดูจากสี (สีต้องไม่เป็นสีของสารละลาย DPPH หรือสีของสารสกัดมากเกินไป) แล้วนำหลอดทดลองที่เลือกแล้วนั้นมาทำการ dilute ตามขั้นตอนดังนี้

การ Dilute เพื่อการทดลองหาค่า Absorbance

หลอดที่	สารสกัด(ml)	Solvent(ml)	DPPH (ml)
1	1.00	0.00	1.00
2	0.85	0.15	1.00
3	0.70	0.30	1.00
4	0.55	0.45	1.00
5	0.40	0.60	1.00
6	0.25	0.75	1.00
7	0.10	0.90	1.00
8	0.00	1.00	1.00

หลังจากเติมสารละลาย DPPH แล้วตั้งทิ้งไว้ที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่า Absorbance ที่ 516 นาโนเมตร

คำนวณ % radical scavenging จากสมการ

$$\% \text{ radical scavenging} = \left\{ 1 - \frac{A_{516 \text{ nm}} \text{ Sample}}{A_{516 \text{ nm}} \text{ Control}} \right\} \times 100$$

เมื่อ $A_{516 \text{ nm}} \text{ Sample}$ = absorbance ที่วัดได้จากสารสกัดผสมกับ DPPH และ

$A_{516 \text{ nm}} \text{ Control}$ = absorbance ที่วัดได้ของ DPPH และตัวทำละลายที่ใช้

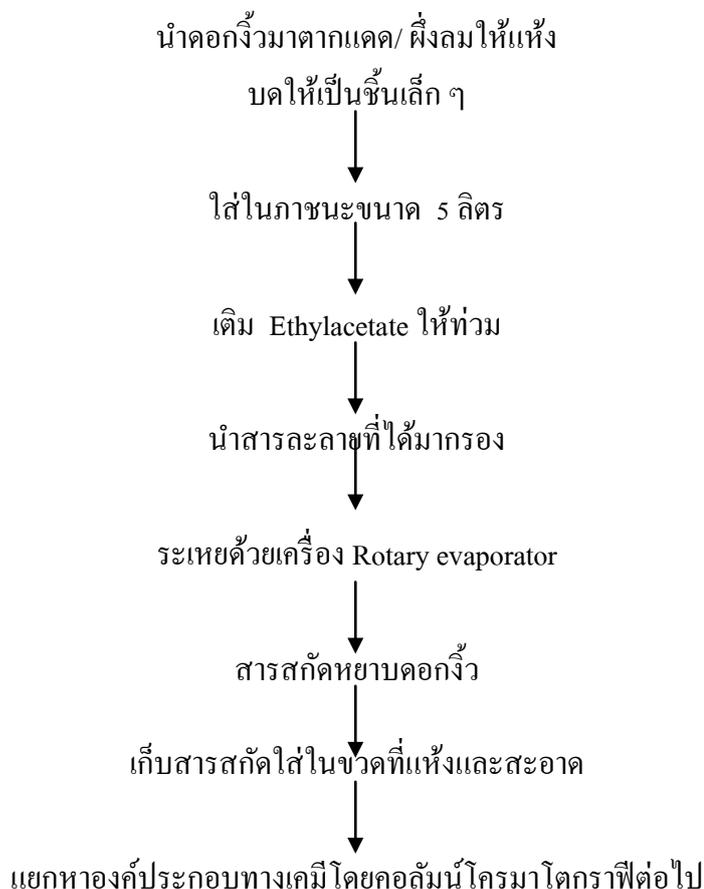
การหาค่า IC_{50}

- จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสง และ % radical scavenging ไป plot graph เพื่อทำ linear regression จะได้สมการสำหรับคำนวณค่า IC_{50} (IC_{50} คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ 50 %)

- คำนวณค่า IC_{50} จากสมการที่ได้

3.5.4 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของดอกจ๊วและใบจ๊ว

โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น Column chromatography , GC-MS , NMR เพื่อยืนยันโครงสร้างของสารที่ได้ มีขั้นตอนการเตรียมสารสกัดดังนี้



ในการแยกสารใช้ silica gel 70-230 และ 230-400 Mesh ASTM (Scharlau) เป็น adsorbent ใน column chromatography และใช้ silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck) สำหรับ preparative thin-layer chromatography (PTLC)

ใช้แผ่นสำรับ aluminum sheets silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) ใน thin-layer chromatography (TLC)

ตรวจสอบสารบน TLC โดยใช้ 1% Ce(SO₄)₂ ใน 10% สารละลาย H₂SO₄ ฉีดพ่นลงไป แล้วให้ความร้อน

เมื่อแยกองค์ประกอบของสารสกัดได้เป็นสารบริสุทธิ์หรือสารประกอบแล้ว นำสารบริสุทธิ์หรือสารประกอบที่ได้มาทำการทดลองต่อดังนี้

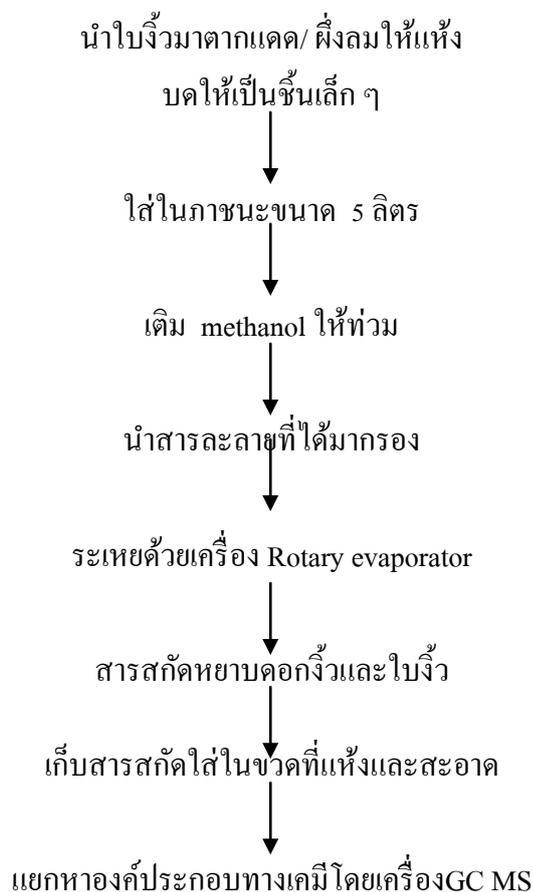
1. หาจุดหลอมเหลวของสารประกอบโดยใช้เครื่อง Büchi melting point B-540 apparatus โดยมีได้ปรับเปลี่ยนจุดหลอมเหลวที่ได้

2. บันทึก ^1H NMR สเปกตรัมของสารประกอบโดยใช้ CDCl_3 หรือ $\text{DMSO}-d_6$ เป็นตัวทำละลายด้วยเครื่อง Bruker AVANCE400 400 MHz Spectrometer และใช้ TMS เป็นมาตรฐาน (internal standard) บันทึก ^{13}C NMR สเปกตรัมของสารประกอบวัดที่ 100.62 MHz ค่า chemical shifts (δ) ใช้หน่วยเป็น parts per million ที่ downfield จาก TMS และค่า coupling constants มีหน่วยเป็น Hz เทคนิคการทดลองแบบ DEPT COSY HMQC และ HMBC ใช้ software ของ Bruker

3. บันทึก EI mass สเปกตรัม ด้วยเครื่อง GC-MS Finnigan INCOS 50 และ GC-MS Finnigan Polaris Spectrometer

4. บันทึก high resolution mass สเปกตรัม ด้วยเทคนิค HRTOF-APCIMS บันทึกด้วยเครื่อง Bruker Micro TOF Mass Spectrometer

เตรียมสารสกัดใบจิ้งในตัวทำละลายเมทานอล



การแยกสารโดยใช้เครื่อง GC-MS มีขั้นตอนดังนี้

- 1 ละลายสารตัวอย่างที่ได้ด้วย methanol จำนวน 300 ไมโครกรัม
- 2 ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ซึ่งประกอบด้วยเครื่อง GC-Agilent รุ่น 6890N และเครื่อง MS-Agilent รุ่น 5973N

สภาวะที่ใช้ในการแยกของเครื่อง GC-MS คือ

- Column HP-5 Length 30 m ID 0.25 mm Filmthickness 0.25 mm.
- Oven temperature 70⁰C hold 5 min ramp 6⁰C/MIN 240⁰C hold 5 min.
- Injection mode split Ratio 100-1
- Inlet temperature 250⁰C
- Detector 240⁰C

3.5.5. วิเคราะห์ฤทธิ์ด้านการอักเสบของดอกจิวและใบจิว

นำสารสกัดหยาบของดอกจิวและใบจิวในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้ มาทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ 3 วิธี คือ

1. ใช้ชุดเครื่องมือ Eliza kit สำหรับทดสอบ COX – 2 (cyclooxygenase- 2)

โดยนำสารสกัดมาทำการชั่งน้ำหนักและละลายใน DMSO ให้ได้ stock ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml แล้วใช้ stock เตรียมเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบต่อไป โดยปริมาตรที่ใช้ในการทดสอบ จะทำให้ความเข้มข้น 1, 10 ,50 และ 100 µg/ml สารละลายที่ใช้ปรับความเข้มข้นคือ reaction ของชุดทดสอบ

ในการทดสอบส่วนแรก COX enzyme จะเปลี่ยน substrate arachidonic acid ให้เป็น prostaglandin ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของ prostaglandin ที่เกิดจากปฏิกิริยาดังกล่าวให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม โดย protocol ระบุว่าต้องทำให้อยู่ในระดับช่วง C2 หรือ 1:2000 (dilution of the original sample) สำหรับค่า OD (optical density) ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 412 nm

2. ใช้ชุดเครื่องมือ Eliza kit สำหรับทดสอบ iNOS (inducible nitric oxide synthase)

หลังจากที่เลี้ยงเซลล์แมโครฟาจซึ่งถูกกระตุ้นด้วย LPS จนทำให้เซลล์แมโครฟาจมีการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ในเซลล์เพิ่มขึ้น (เซลล์ควบคุม) เมื่อมีการเติมสารสกัดใดๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน (แมโครฟาจ + LPS + extracts) สารสกัดใดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ โดยการลดการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS ก็จะทำให้เซลล์แมโครฟาจไม่มีการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS หรือแสดงน้อยกว่าปกตินั่นเอง จากนั้นจึงนำเซลล์ทั้งหมดซึ่งมีเซลล์ควบคุม และเซลล์ที่มีสารสกัด มาสกัดแยก iNOS ออกมา แล้วนำไปปั่นตกตะกอนโปรตีนเอนไซม์ iNOS ที่ได้เพื่อนำมาตรวจต่อไปใน Eliza ตามวิธีการที่กำหนดไว้ในคู่มือของเครื่อง Eliza kit ดังนี้

- 1) เติมสารละลาย diluent RDI-34 ปริมาณ 100 ไมโครลิตรทุกหลุมของ Eliza ซึ่งเคลือบด้วย iNOS ที่ก้นหลุมแล้ว
- 2) เติม iNOS มาตรฐานที่ปริมาณความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 40- 20 U/mL (1 U/mL = 1 ng/mL) และเซลล์ที่เก็บไว้จากการ treat ด้วยสารสกัดต่างๆ มาละลายด้วย diluent RDI-34 เติมในปริมาณ 100 μ L ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 3) ดูดสารละลายในหลุมทั้งหมดออก แล้วล้างด้วย washing buffer ในปริมาณ 200 μ L จำนวน 4 รอบ
- 4) เติมสารละลาย iNOS conjugate ในปริมาณ 200 μ L
- 5) ทิ้งไว้ในที่มืด 2 ชั่วโมง
- 6) ดูดสารละลายในหลุมทั้งหมดออก แล้วล้างด้วย washing buffer ในปริมาณ 200 μ L จำนวน 4 รอบ
- 7) เติม substrate ที่ประกอบด้วย TMB และ H_2O_2 ในปริมาณ 100 μ L ทุกหลุม
- 8) ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที
- 9) เติมสารหยุดปฏิกิริยา 2N H_2SO_4 ในปริมาณ 50 μ L
- 10) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm
- 11) เปรียบเทียบปริมาณ iNOS ด้วยกราฟมาตรฐานที่ได้ มีหน่วยเป็น pg/mL
- 12) ทำการสรุปปริมาณ iNOS โดยแสดงผลเป็น pg ในปริมาณโปรตีนที่เท่ากันทั้งหมดคือ 50 μ g

3. ใช้ Model Rat Paw Edema

โดยใช้สัตว์ทดลอง หนูขาวเพศผู้พันธุ์ wistar น้ำหนัก 180 – 200 กรัม จำนวน 30 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตสาธิตา จังหวัดนครปฐม

วิธีการทดสอบ

ก่อนทำการทดสอบ นำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24 ± 1 °C จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่ายและทำสัญลักษณ์ประจำตัว โดยการแต้มเบอร์ที่หาง ออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ออกอาหารหนู 16 ชั่วโมงก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ

เตรียมสารแขวนลอยพื้นฐาน จาก น้ำกลั่น, tragacanth และน้ำมันพืช ส่วนสารแขวนลอยตัวอย่างทดสอบและสารแขวนลอยยามาตรฐาน (standard drug) เตรียมแยกกัน ในสารแขวนลอยพื้นฐานที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเตรียม Carrageenan ซึ่งเป็นสารเหนียวทำให้เกิดการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูในรูปสารละลาย โดยละลาย Carrageenan ใน 0.9% Normal saline ที่ขนาด 1% น้ำหนัก/ปริมาตร

ในวันทดสอบ วัดปริมาตรทำข้างซ้ายของหนูทุกตัว ด้วยเครื่อง Plethysmometer บันทึกไว้ หลังจากนั้นป้อนสารทดสอบทางปากแก่หนูแต่ละตัว ทั้งนี้ กลุ่มทดลองได้รับสารแขวนลอยของ “Bombax anceps” ในขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว กลุ่มควบคุมบวกได้รับสารแขวนลอยมาตรฐาน Phenylbutazone ขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว และกลุ่มควบคุมได้รับสารแขวนลอยพื้นฐานปริมาตรเทียบเท่ากับกลุ่มทดลอง เมื่อครบ 1 ชั่วโมง หลังจากป้อนสารทดสอบ นีดสารละลาย 1% carrageenan ที่อุ้งเท้าหนูข้างซ้ายในขนาด 0.1 ml หลังจากนั้นวัดความเปลี่ยนแปลงของปริมาตรอุ้งเท้าหนูที่ชั่วโมงที่ 1, 2 และ 3

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%