

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัย

นำแก่นมะหาดไปตากให้แห้ง 5 กิโลกรัม นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Blender) จะได้ผงละเอียดสีเหลืองหนัก 4.5 กิโลกรัม ซื้อจากห้างขายยา ไทย ฮั่ว จั่น เมื่อวันที่ 9 สิงหาคม 2555

วัสดุ สารเคมี อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. วัสดุและสารเคมี

- 1.1 กระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 1)
- 1.2 เอซิลอะซิเตต 99 % (Ethyl acetate commercial grade, จักรवाल แอพพลิเคชั่น ประเทศไทย)
- 1.3 เมทานอล 99 % (Methanol commercial grade, จักรवाल แอพพลิเคชั่น ประเทศไทย)
- 1.4 เอทานอล 99 % (Ethanol AR grade, Carlo Erba, Italy)
- 1.5 ฟูริน ซีโอคอลด์ทิลฟีนอล รีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu phenol reagent, Sigma Aldrich, USA)
- 1.6 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 , Carlo Erba, Italy)
- 1.7 กรดแกลลิก (Gallic acid, Carlo Erba, Italy)
- 1.8 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริลไฮดราซิล (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH, Sigma Aldrich, USA)
- 1.9 วิตามินซี (L-ascorbic acid, Carlo Erba, Italy)

2. อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- 2.1 กระบอกตวง (Cylinder)
- 2.2 กรวยแก้ว (Glass funnel)
- 2.3 ขวดก้นกลม (Round bottom flask)
- 2.4 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 2.5 ขวดปริมาตร (Volumetric flask)
- 2.6 ปีกเกอร์ (Beaker)

- 2.7 ปิเปต (Pipette)
- 2.8 หลอดทดลอง (Test tube)
- 2.9 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
- 2.10 หลอดหยด (Dropper)
- 2.12 เครื่องกลั่นสุญญากาศ (EYELA ACE CA-1100, Switzerland)
- 2.13 เครื่องชั่งอย่างละเอียด 4 ตำแหน่ง (Precisa 240A)
- 2.14 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-2401 PC, Japan)
- 2.15 Glass drying oven (Buchi B-580, Switzerland)
- 2.16 เครื่องบด (Blender)

การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากแก่นมะหาดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

1. ชั่งแก่นมะหาดบดละเอียด 2.3 กิโลกรัม นำไปห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น จากนั้นนำไปใส่ภาชนะที่มีฝาปิดสนิท แล้วทำการแช่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต (EtOAc) ปริมาตร 15 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน นำมากรองสารสกัดออกมาเก็บไว้ แล้วนำกากแก่นมะหาดมาแช่ต่อด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมทำซ้ำ 5 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตต (Crude EtOAc extract) ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ นำกากที่เหลือมาทำการแช่สกัดด้วยเมทานอล (MeOH) ปริมาตร 15 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน นำมากรองสารสกัดออกมาเก็บไว้ แล้วนำกากแก่นมะหาดมาแช่ต่อด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมทำซ้ำ 5 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (Crude MeOH extract) ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้

2. ชั่งแก่นมะหาดบดละเอียด 1.5 กิโลกรัม แล้วนำไปห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น จากนั้นนำไปใส่ภาชนะที่มีฝาปิดสนิท แล้วทำการแช่สกัดด้วยเอทานอล (EtOH) ปริมาตร 15 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 วัน นำมากรองสารสกัดออกมาเก็บไว้ แล้วนำกากแก่นมะหาดมาแช่ต่อด้วยตัวทำละลายชนิดเดิมทำซ้ำ 5 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary Vacuum Evaporator) จะได้สารสกัดหยาบชั้นเอทานอล (Crude EtOH extract) ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic content) ของสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Singleton, et al., 1999)

1. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ทำได้ดังนี้

1.1 เตรียมสารละลาย Folin-Ciocalteuphenol reagent ในน้ำให้มีความเข้มข้น 10 % โดยปริมาตร

1.2 เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ให้มีความเข้มข้น 7.5 % น้ำหนักโดยปริมาตร

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

1.4 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากแก่นมะหาดที่ความเข้มข้น 0, 50, และ 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

1.5 นำสารสกัดหยาบเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ DI ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 10 % Folin-Ciocalteuphenol reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติม 7.5 % โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV – VIS Spectrophotometer) โดยวัดที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีสารตัวอย่างและเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid และนำค่าที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคสคาเวนจิง (scavenging method) โดยวิธี DPPH ของสารสกัดจากแก่นมะหาด (Singhatong, et al., 2010)

1. การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH assay ทำได้ดังนี้

1.1 เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ในเอทานอลให้มีความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์

1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

1.3 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจากแก่นมะหาดที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย

1.4 ผสมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ กับสารละลาย DPPH ในเอทานอลที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 1:2 โดยปริมาตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไวโอเลตวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV – VIS Spectrophotometer) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า Radical scavenging (%) โดยใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน

$$\text{Radical scavenging (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

A_{sample} = ค่า Absorbance ที่วัดได้ของสารผสมระหว่างสารละลาย DPPH กับสารตัวอย่าง

A_{control} = ค่า Absorbance ที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

จากนั้นคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดแก่นมะหาดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระ 50 % (IC_{50}) จากกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของสารสกัดจากแก่นมะหาด