

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ

- 3.1.1 เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง (Analytical balance) ยี่ห้อ DENVER INSTRUMENT รุ่น s1-234
- 3.1.2 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrometer) ยี่ห้อ CECIL รุ่น CE 4002
- 3.1.3 เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography) ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 1100 series
- 3.1.4 เครื่องระเหยสุญญากาศ (evaporator) ยี่ห้อ Heidolph รุ่น Laborata 4000
- 3.1.5 เครื่องปั่น (vortex) ยี่ห้อ Scientefic Industries รุ่น vortex genie-2
- 3.1.6 หม้อนึ่งความดัน (Auto clave)
- 3.1.7 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)
- 3.1.8 คอลัมน์สำหรับเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC column) (ACE-129-2546, 25cm*4.6mm)

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 ขวดวัดปริมาตร และเครื่องแก้วชนิดต่างๆ
- 3.2.2 กระดาษฟลอยด์
- 3.2.3 กระดาษกรอง whatman เบอร์ 4
- 3.2.4 แผ่น TLC Silica gel 60 F₂₅₄ บริษัท Merck
- 3.2.5 Auto pipette ขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
- 3.2.6 ขวดสเปรย์
- 3.2.7 หลอดคเคปิลารี
- 3.2.8 ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
- 3.2.9 จานเลี้ยงเชื้อแก้ว
- 3.2.10 ขวดขนาดเล็ก (vial)
- 3.2.11 สำลีพันปลายไม้
- 3.2.12 สำลี
- 3.2.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.14 ปากคืบ
- 3.2.15 คอลัมน์แก้ว 500 มิลลิลิตร

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 สารสกัดจากใบฮวานร็อก
- 3.3.2 Bacillus cereus (ATCC 10876)
- 3.3.3 Staphylococcus aureus (ATCC 25923)
- 3.3.4 Escherichia coli (ATCC 25922)
- 3.3.5 Enterobacter aerogenes (ATCC 13048)

- 3.3.6 Agar,
- 3.3.7 Beef extract
- 3.3.8 Peptone
- 3.3.9 1,1-diphenyl 1-2-picrylhydrazyl (DPPH)
- 3.3.10 Hexane, HPLC grade บริษัท RCL Labscan
- 3.3.11 Ethanol, AR grade บริษัท RCL Labscan
- 3.3.12 Ethyl acetate, AR grade บริษัท Merck
- 3.3.13 Methanol, HPLC grade บริษัท RCL Labscan
- 3.3.14 Acetonitrile, AR grade บริษัท Merck
- 3.3.15 Acetic acid, AR grade บริษัท Merck
- 3.3.16 Formic acid, AR grade บริษัท Merck
- 3.3.17 Glacial Acetic acid, AR grade บริษัท Merck
- 3.3.18 Silica 7734 บริษัท Merck
- 3.3.19 Silica 7731 บริษัท Merck
- 3.3.20 Rutin hydrate บริษัท Sigma
- 3.3.21 Catechin บริษัท Sigma
- 3.3.22 น้ำกลั่นและน้ำ RO (Distilled water and Reversed osmosis water)

3.4 การเตรียมสารสกัด

นำใบหวานฉ่ำออกสด ล้างทำความสะอาด ตากให้แห้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียด และสกัดฟลาโวนอยด์ออกมาด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 ลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งสูญญากาศ (evaporator) ซึ่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ทั้งหมด เก็บใส่ขวดขนาดเล็ก (vial) เพื่อเตรียมทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในสารสกัดจากใบหวานฉ่ำ

3.5.1 วิธีการทดลอง

3.5.1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. การเตรียมอาหารแข็ง NA (Nutrient Agar)

ชั่ง Beef extract 3 กรัม Peptone 5 กรัม และผงวุ้น (Agar) 15 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส เทใส่ขวดรูปชมพู่ นำสำลีอุดปากขวดใช้กระดาษฟลอยด์ปิดทับอีกชั้น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (Auto clave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที เมื่อฆ่าเชื้อเสร็จแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อเทใส่จานเลี้ยงเชื้อในทันที รอให้อาหารแข็งตัวนำไปฆ่าเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)

ข.การเตรียมอาหารแข็ง NB (Nutrient Broth)

ชั่ง Beef extract 0.75 กรัม Peptone 1.25 กรัม และน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร นำไปต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส ใช้ปิเปตดูดใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำสำลีมาอุดปลายหลอดใช้กระดาษฟลอยด์ปิดทับอีกชั้น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (Auto clave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

3.5.1.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือ *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) ที่อยู่ในอาหารแข็ง NB (Nutrient Broth) ไปใส่ในอาหารเหลว โดยลนไฟปากหลอดทดลองที่ใส่เชื้อแบคทีเรีย และลนไฟห่วงเขี่ยเชื้อที่ตะเกียงแอลกอฮอล์ให้ร้อนจนเป็นสีแดง ทิ้งไว้สักครู่จากนั้นนำไปเขี่ยเชื้อในหลอดทดลอง ลนไฟก่อนใช้สำลีปิดที่ปากหลอดทดลอง จากนั้นลนไฟที่ปากหลอดทดลองของอาหารเหลว นำเชื้อที่ติดในห่วงเขี่ยเชื้อไปใส่ในอาหารเหลวลนไฟที่ปากหลอดอีกครั้งก่อนใช้สำลีปิดที่ปากหลอดทดลอง เมื่อเตรียมเชื้อครบทุกตัวแล้วนำไปเข้าเครื่องปั่น (Vortex) เพื่อให้เชื้อไม่ติดเป็นก้อน

3.5.1.3 การเตรียมสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นในการทดสอบ

เตรียมสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารสกัดใบฮวานร็อก ในขวดวัดปริมาตรขนาด 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย DMSO

3.5.2 การปฏิบัติการทดสอบ

ลนไฟปากหลอดทดลองเชื้ออาหารเหลวที่เตรียมไว้ ใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในหลอดทดลอง ปิดให้แน่นพอดูกับข้างหลอดทดลอง ลนไฟก่อนปิดปากหลอดทดลอง นำสำลีทำให้ทั่วบนจานเลี้ยงเชื้ออาหารแข็ง NA (Nutrient Agar) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียเชื้อละ 3 ข้าง ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ ใช้ปากคีบ คีบกระดาษกรอง (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร) ที่ปราศจากเชื้อ วางลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นในตำแหน่งที่กำหนดไว้ กดเบาๆ (พยายามอย่าให้อาหารเลี้ยงเชื้อแตก) นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ตามตำแหน่งที่กำหนด ทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

เมื่อบ่มเชื้อครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ให้สังเกตวงใส (clear zone) รอบกระดาษกรองที่เกิดขึ้น โดยทำการวัดวงใส (clear zone) จากด้านหนึ่งไปอีกด้านหนึ่งโดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของกระดาษกรองด้วย บันทึกผลการทดลองหน่วยเป็นเซนติเมตร

3.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบฮวานร็อก

3.6.1 วิธีการทดลอง

3.6.1.1 การทดสอบด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-vis)

ก. การเตรียมสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นในการทดสอบ

เตรียมสารตัวอย่างจากสารสกัดใบฮวานร็อกความเข้มข้น 1,000 ppm ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล เตรียมความเข้มข้น 800 ppm, 600 ppm, 400 ppm, 300 ppm, 200 ppm และ 100 ppm ในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 ppm ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล

ข. การเตรียมสารละลาย 1,1-diphenyl 1-2-picrylhydrazyl (DPPH)

ชั่งสารละลาย DPPH 0.0012 กรัม ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล สังเกตสารละลายเมื่อละลายหมดแล้วห่อขวดวัดปริมาตรด้วยกระดาษฟลอยด์ให้มีความสูงเท่ากับความสูงของสารละลาย นำไปเก็บในที่มืด

ค. การเตรียมสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ

นำสารตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำกระดาษฟลอยด์ปิดหลอดทดลองให้สูงเท่ากับความสูงของสารละลายรวมทั้งปิดที่ปากหลอดทดลองด้วย นำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที

ง. การเตรียมสารละลายผสม DPPH กับ เอทานอล

นำสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และสารละลายเอทานอลปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมในหลอดทดลองขนาดเล็ก นำกระดาษฟลอยด์ปิดหลอดทดลองให้มีความสูงเท่ากับความสูงของสารละลาย เก็บไว้ในที่มืด 15 นาที

3.6.2 การปฏิบัติการทดสอบ

เมื่อเวลาผ่านไปครบ 15 นาที นำสารละลายทุกตัวที่เตรียมไว้ข้างต้นทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเครื่อง UV-visible light spectrometer โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร

3.6.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของสารแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ย รวมทั้งสารละลายผสม DPPH กับเอทานอลด้วย และนำมาหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) และ ค่า % R.C.

3.6.1.2 การทดสอบด้วยวิธีสเปย์ DPPH

นำสารสกัดหยาบมาแยกตามความสามารถในการละลายและความมีขี้ของตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตต เมทานอล ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ก. เทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

ชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่เหลือ ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 17 กรัม นำสารสกัดมาคลุกกับ silica (7734) ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำ silica (7731) มาคลุกกับสารละลายเฮกเซน โดยใช้ silica (7731) ปริมาณ 2 เท่าของน้ำหนักสารสกัดหยาบ บรรจุลงคอลัมน์ให้แน่น สารสกัดหยาบที่คลุก silica (7734) แล้วมาโรยลงในคอลัมน์ นำตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดในอัตราส่วนต่างๆ มาชะสารสกัดในคอลัมน์

ข. เทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี

เมื่อได้สารสกัดในอัตราส่วนตัวทำละลายต่างๆแล้ว นำสารสกัดที่ได้รวมกลุ่มกับสารที่มีลักษณะคล้ายกัน โดยใช้เทคนิคทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (TLC) ระบบที่ใช้คือ อัตราส่วนของตัวทำละลายแต่ละตัว

ค. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยการสเปรย์ DPPH

นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยให้แต่ละแผ่น TLC มีการ spot เทียบกับสารมาตรฐานฟลาโวนอยด์ ได้แก่ คาร์ทีซินส์และรูทีน ระบบที่ใช้ คือ ethyl acetate : formic acid : glacial acetic acid : water (16.9 : 1.8 : 1.8 : 4.5) หลังจากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้มาสเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH ให้ทั่วแผ่น เก็บไว้ในที่มืดสักครู่ สังเกตสีแต่ละ spot ที่ปรากฏบนแผ่น บันทึกรูป และเลือกกลุ่มสารสกัดที่สนใจที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณฟลาโวนอยด์ต่อไป

3.7 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฟลาโวนอยด์

นำสารสกัดที่สนใจจากข้อ 3 ด้วยการสเปรย์ DPPH มาทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของฟลาโวนอยด์ในสารสกัด ซึ่งสารสกัดที่ใช้ทดสอบมีดังนี้

1. สารมาตรฐานคาร์ทีซินส์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารมาตรฐานรูทีนที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
3. สารละลายผสมของสารมาตรฐานคาร์ทีซินส์และรูทีน 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
4. สารตัวอย่างที่สนใจที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิเคราะห์หาสถานะที่สามารถใช้แยกสารผสมของสารมาตรฐานคาร์ทีซินส์และรูทีน และนำสถานะนั้นมาใช้ในการฉีดสารตัวอื่นด้วย

เมื่อฉีดสารที่ใช้ทดสอบทั้งหมดแล้ว ปรากฏว่าสารตัวอย่างที่สนใจอาจจะมีคาร์ทีซินส์อยู่ ซึ่งการทดลองในขั้นต่อไปคือ นำสารมาตรฐานคาร์ทีซินส์ผสมกับสารตัวอย่างแล้วนำไปฉีดอีกครั้งที่สถานะเดียวกัน ถ้าสารตัวอย่างที่สนใจมีสารคาร์ทีซินส์อยู่จริง โครมาโทแกรมที่ได้จะปรากฏขึ้นมาเป็น peak เดียว มี retention time ตรงกับสารมาตรฐานคาร์ทีซินส์ และตรวจสอบ spectrum ที่ได้ว่าตรงกับคาร์ทีซินส์หรือไม่ ถ้าตรงกับคาร์ทีซินส์แสดงว่ามีคาร์ทีซินส์ในสารสกัดให้คำนวณหาปริมาณของคาร์ทีซินส์โดยคำนวณผ่านกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้สารมาตรฐานคาร์ทีซินส์ที่ความเข้มข้น 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.5, 1, 2, 4 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร