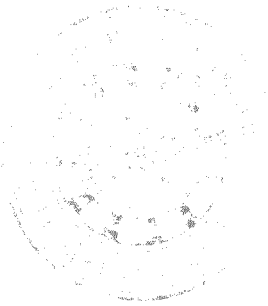
บทที่ 3

การทดลอง



1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพืชตามตารางที่ 1 ที่ทราบสายพันธุ์ หรือจากตลาดที่ผู้ค้าบอกแหล่งที่มาได้ จาก 3 แหล่ง ปลูกในช่วงฤดูเก็บเกี่ยวเดียวกัน ตัวอย่างละ 1 ถึง 2 กิโลกรัม ตามลักษณะของตัวอย่าง และถ่ายภาพ

ตารางที่ 1: ตารางชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

กลุ่มพืช	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้
อาหาร /ผลไม้	1. กะหล่ำปลี	*Brassica oleracea Linn.*	ใบ
	2. กระเทียม	*Allium sativum Linn.*	หัว
	3. กระเพรา	*Ocimum sanctum Linn.*	ใบ
	4. กล้วย	*Musa sapientum Linn.*	หัวปลี
	5. กุยช่าย	*Allium tuberosum Rottler*	ลำต้น
	6. ขี้เหล็ก	*Senna siamea (Lam.) Irwin&Barneby*	ใบ
	7. ชะพลู	*Piper sarmentosum Roxb.*	ใบ
	8. เดือย	*Coix lachrymal-jobi Linn.*	เมล็ดใน
	9. ตะไคร้	*Cymbopogon citrates Stapf*	ลำต้นแก่
	10. เตยหอม	*Pandanus amryllifolius Roxb.*	ต้นและราก
	11. แตงกวา	*Cucumis sativus Linn.*	ผลรวมเปลือก
	12. แตงโม	*Citrullus vulgaris Schard.*	เนื้อสีแดง
	13. ตำลึง	*Cocinia grandis Voigt*	เถาแก่
	14. ถั่วเหลือง	*Glycine max Merr.*	เมล็ด
	15. บัว	*Nelumbo nuifera Gaerth*	สาย
	16. บัวบก	*Centelia asiatica (Linn.) Urban*	ใบ
	17. ผักชี	*Terminalia catappa Linn.*	ทั้งต้นไม่รวมราก
	18. ผักบุ้ง	*Ipomoea aguatica*	ทั้งต้นไม่รวมราก
	19. ผักหวาน	*Sauropus abicans*	ใบ
	20. ฝรั่ง	*Psidium guajava Linn.*	ผล
	21. ฟักทอง	*Cucurbita moschata Decne*	ผล
	22. พริกขี้หนู	*Capsicum fretescens Linn.*	ผลรวมเมล็ด
	23. มะเขือพวง	*Solanum torvum Sw.*	ผล
	24. มะระขี้นก	*Momordica charantia Linn.*	ผล

กลุ่มพืช	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้
อาหาร /ผลไม้	25. มะระขี้นก	*Momordica charantia Linn.*	ยอด
	26. มะระจีน	*Momordica charantia Linn.*	ผล
	27. มะละกอ	*Carica papaya Linn.*	น้ำคั้นจากเนื้อดิบ
	28. มะแว้งเครือ	*Solanum trilobatum L.*	ผล
	29. ยอ	*Morinda citrifolia Linn.*	ผล
	30. สะเดา	*Azadirachta indica A. Juss*	ใบ
	31. หอมใหญ่	*Allium cepa Linn.*	หัว
	32. โหรพา	*Ocimum basilicum Linn.*	ใบ
	33. แมงลัก	*Ocimum basilicum*	ใบ
เครื่องดื่ม	34. กระเจี๊ยบ	*Hibicus sabdariffa Linn.*	ดอก
	35. ดอกคำฝอย	*Carthamus tinctorius Linn.*	ดอกแห้ง
สมุนไพร	36. กระชายดำ	*Kaempferia parvflora Wall. Ex Baker*	หัว
	37. คูน	*Cassia fistula Linn.*	เนื้อในฝัก
	38. ทองพันชั่ง	*Rhinacnthus nastus Kurz.*	ใบ
	39. โทงเทง	*Physalia pubescens*	ราก
	40. พญาสัตบรรณ	*Alstonia scholaris (L.) R.Br.*	เปลือกต้น
	41. ฝอยข้าวโพด	*Zea mays Linn.*	ฝอยดิบ
	42. ฟ้าทะลายโจร	*Andrographis paniculata (burn.F) Wall. Ex Nees*	ใบ
	43. หูกวาง	*Terminalia Linn*	ใบ
	44. ไมยราบ	*Mimosa pudica L. hispidabrenan*	ก้านและใบ
	45. ลูกใต้ใบ	*Phyllanthus amarus Schum&Thonn.*	ต้นไม่รวมราก
	46. ว่านหางจรเข้	*Aloe barbadensis Mill.*	เนื้อวุ้น
	47. สัก	*Tectona grandis*	ใบ
	48. เหงือกปลาหมอ	*Acanthus ebracteatus Vahl*	ใบ
	49. หนวดแมว	*Orthosiphon aristatus Mig*	ใบ
	50. อินทนิลน้ำ	*Lagerstroemia speciosa (L.) Pers.*	ใบ

(ข้อมูลการลดน้ำตาลในเลือดจาก พเยาว์ 2534, ภูมิพิชญ์ และปรีชา 2535, มาโนช และเพ็ญนภา 2537, วุฒิ 2541, สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน 2541 , www.progenebio.in/DMP)

2. การเตรียมสารสกัดพืชตัวอย่าง

ทำความสะอาดพืชตัวอย่าง ในวันที่ทำการสกัด แล้วสุ่มตัวอย่าง (sampling) โดย พืชใบสุ่มจากใบในลำดับที่ 5 ถึง 10 จากยอด ของแต่ละกิ่ง ตามแนวขวางของใบหั่น เป็นชิ้นเล็กๆ กว้างประมาณ 2 ถึง 3 มิลลิเมตร สุ่มย่อย (sub sampling) อีกครั้งให้ได้น้ำหนัก 300 ถึง 400 กรัม ส่วนพืชที่มีลักษณะผลหรือหัว เช่น ผลฝรั่ง ปลีกล้วย สุ่มตัวอย่างโดยฝานด้วยมีดคม จากขั้วผล ตามยาวถึงฐานผลด้านตรงข้ามกัน เป็นซีกจำนวน 4 ชิ้น กว้าง 2 เซ็นติเมตร แล้วหั่นย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดกว้างประมาณ 2 ถึง 3 มิลลิเมตร สุ่มย่อยอีกครั้งให้ได้น้ำหนัก 300 ถึง 400 กรัม พืชที่มีลักษณะเป็นกลีบ เช่น กระเทียม ดอกกระเจี๊ยบ สุ่มตัวอย่างแต่ละหัว หรือ ดอกอย่างละ 4 กลีบ ที่อยู่ตรงข้ามกัน แล้วหั่นย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดกว้างประมาณ 2 ถึง 3 มิลลิเมตร สุ่มย่อยตัวอย่างอีกครั้งให้ได้น้ำหนัก 300 ถึง 400 กรัม บดละเอียดพืชที่ได้จากการสุ่มย่อยที่ -20 °ซ ใต้ในโตรเจนเหลว ด้วยครก (motar) ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 100 กรัม จำนวน 2 ชุด แล้วนำไปสกัดดังนี้

ชุดแรก สกัดตัวอย่างที่ละเอียดแล้ว 100 กรัม ด้วย น้ำกลั่นที่เย็น 4 °ซ ใน สัดส่วน 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ปั่น ด้วยอุปกรณ์ปั่นน้ำผลไม้ภายใต้อุณหภูมิ 4 °ซ กรอง สารสกัด ด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่กรองได้ไปเหวี่ยง แยก ตะกอนละเอียด ออกจากสารละลาย ด้วยการเซนตริฟิวจ์ ที่ 5,000 x g นาน 15 นาที เก็บส่วนบนแยกจากตะกอน (เรียกว่า Water Extract ย่อ W) แบ่งใส่หลอดขนาดเล็ก 2 มิลลิลิตร เก็บที่ -20 °ซ เพื่อศึกษากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส คุณสมบัติต้านออกซิเดชั่น และอื่นๆ ภายใน 10 วันนับจากวันที่สกัด ที่เหลือ แบ่งใส่ขวดแก้วขวดละ 20 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น -20°ซ สำรองไว้ใช้วิเคราะห์ภายใน 12 เดือน

ชุดที่สอง สกัดตัวอย่างที่ละเอียดแล้ว 100 กรัม ด้วย 95 % ethanol ที่เย็น 4 °ซ ในสัดส่วน 1 กรัมต่อ 95 % ethanol 10 มิลลิลิตร ปั่นด้วยอุปกรณ์ปั่นน้ำผลไม้ภายใต้อุณหภูมิ 4 °ซ กรองสารสกัดด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่กรองได้ไปเหวี่ยง แยกตะกอนละเอียดออกจากสารละลาย ด้วยการเซนตริฟิวจ์ที่ 5,000 g นาน 15 นาที เก็บส่วนบนแยกจากตะกอน แบ่งใส่ขวดแก้วขวดละ 20 มิลลิลิตร นำแต่ละขวดระเหย ethanol ที่ 60 °ซ จนหมด นำขวดตัวอย่างส่วนหนึ่งเก็บที่ -20°ซ สำรองไว้ใช้วิเคราะห์ภายใน 12 เดือน ขวดตัวอย่างที่เหลือละลายคืนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วเซนตริฟิวจ์ที่ 5,000 x g นาน 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัดตะกอน เก็บส่วนบนแยกจากตะกอน (เรียก Ethanol Water Extract ย่อ Et W*) แบ่งใส่ หลอดขนาดเล็ก 2 มิลลิลิตร เพื่อศึกษากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส คุณสมบัติต้านออกซิเดชั่น และอื่นๆ ภายใน 10 วันนับจากวันที่สกัด

หมายเหตุ EtW* การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์หากใช้ในรูปสารสกัด ethanol จะมีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพ (denaturation) ไม่สามารถตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ได้ จึงต้องระเหย ethanol และละลายคืนสารในขวด ด้วยน้ำกลั่น

3. การตรวจฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลาย และจากตับอ่อนเชิงคุณภาพด้วยปฏิกิริยาเกิดสีระหว่างแป้งกับไอโอดีน

บรรจุ สารละลายผสม วุ้น 1% และแป้ง 1% ในสารละลาย 0.02 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 -0.01 M NaCl (บัฟเฟอร์ A) 60 °ซ ในถาด (petri dish) ทิ้งให้แข็งตัว เจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. ที่กลางถาด 1 หลุม เตรียมจำนวนเท่ากับตัวอย่าง ในแต่ละวันพร้อมถาดควบคุม

นำสารสกัดพืชตัวอย่างแต่ละชนิด ทั้งที่สกัดด้วยน้ำ (W) หรือ Et W ปริมาตร 100 µL ผสมกับเอนไซม์อะไมเลส ที่ทราบกิจกรรมทำงาน (unit activity) ในปริมาตรที่เท่ากันเขย่าผสมเบาๆ ที่ 4 °ซ แล้วนำสารผสม 100 µL ใส่ลงในหลุมที่เจาะไว้ จนครบทุกตัวอย่าง สำหรับถาดควบคุมบรรจุสารผสม 100 µL ของเอนไซม์อะไมเลสที่ผสมกับบัฟเฟอร์ A แทนตัวอย่าง บ่มถาดวุ้นตัวอย่าง และถาดควบคุม ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ดูดสารแต่ละหลุมทิ้งล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน 1% ใน 0.5 M HCl ที่เตรียมใหม่ๆ เพื่อดูขอบเขตการยับยั้งการย่อยแป้งของอะไมเลส โดยบริเวณที่มีการย่อยแป้งจะปรากฏเป็นเนื้อใส ส่วนบริเวณที่มีการยับยั้งการย่อยแป้งจะปรากฏสีน้ำเงิน วัดระยะทางรอยใสจากจุดศูนย์กลางถาดของหลุมบรรจุตัวอย่างและเอนไซม์ ถึงขอบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นประมวลผลทั้งหมด ที่ได้ของแต่ละตัวอย่าง เทียบกับถาดควบคุม คำนวณหาค่าดัชนีการยับยั้ง (AI index) ตามสมการ

$$\text{AI index} = \frac{\text{ระยะทางจากจุดศูนย์กลางขอบใสในหน่วยเซ็นติเมตรของถาดควบคุม}}{\text{ระยะทางจากจุดศูนย์กลางขอบใสในหน่วยเซ็นติเมตรของถาดทดสอบ}}$$

4. การตรวจฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลาย และจากตับอ่อนเชิงปริมาณ

ผสมตัวอย่าง กับเอนไซม์อะไมเลสที่ทราบกิจกรรมในหลอดทดลอง ในปริมาตรที่เท่ากัน (100 µL) บ่มที่ 37° ซ 30 นาที เมื่อครบเวลา นำสารละลายจากการบ่มไปตรวจหากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่เหลือ โดยปฏิกิริยาการย่อยน้ำแป้ง 2 % เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวประเภทน้ำตาลรีดิวซิ่งหลังการบ่มที่ 37 °ซ นาน 3 นาที และตรวจวัดน้ำตาลที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Bernfeld (1955) ด้วยสาร 3, 5-dinitrosalicylic acid วัดความเข้มของสีที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พร้อมกับหลอดควบคุมที่มีส่วนผสมและเวลาบ่มเช่นตัวอย่างแต่ไม่ใส่น้ำแป้ง โดยใช้มอลโตสเป็นสารมาตรฐานตัวแทนน้ำตาลรีดิวซิ่ง

คำนวณค่าการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลสในสารสกัดตัวอย่างโดย นำค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสตั้งต้นที่ทราบลบด้วยค่ากิจกรรมอะไมเลสที่เหลือหลังจากการบ่มกับสารยับยั้ง โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของกิจกรรมของอะไมเลส คือปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซิ่งรูปมอลโตส 1 มิลลิกรัม ภายใต้สภาวะการตรวจวัด 37 °ซ ที่เวลา 3 นาที นำค่ากิจกรรมการเอนไซม์ที่ได้คำนวณเป็นค่าร้อยละการยับยั้ง

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = \frac{100\ (\text{กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสตั้งต้น} - \text{กิจกรรมอะไมเลสที่เหลือ})}{\text{กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสตั้งต้น}}$$

การศึกษาเชิงปริมาณในหลอดทดลอง *(in vitro)* นี้ได้มีการทำหลอดควบคุม เพื่อตัดการเกิดผลลวงบวกจากการตกตะกอนระหว่างเอนไซม์กับแทนนินหรือสารอื่นในตัวอย่าง และปฏิกิริยาอื่น ๆ เช่น ปฏิกิริยาของสารที่มีคุณสมบัติริดิวซ์ 3, 5-dinitrosalicylic acid ได้ ดังนั้นผลที่ได้จากการทดลองผู้วิจัยจึงนับเป็นผลบวกทั้งหมด เนื่องจากทุกปฏิกิริยาที่มีผลลดการทำงานของอะไมเลส รวมถึงการตกตะกอนเอนไซม์โดยสารสกัดที่ทดสอบ ให้ผลดีต่อการลดน้ำตาลในเลือดได้ ดังงานวิจัยของ Gin และคณะ (1999)

5. การตรวจศักยภาพเชิงปริมาณในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสจากน้ำลาย และจากตับอ่อนด้วยค่า IC_{50}

คัดเลือกตัวอย่างที่ทดสอบจากสองแหล่ง ที่แสดงผลบวกของฤทธิ์ทางชีวภาพเชิงปริมาณในการยับยั้งอะไมเลสมากกว่าร้อยละ 50 มาตรวจหาปริมาณของสารสกัดที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทดสอบได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) โดย ผสมสารสกัดพืชตัวอย่าง และ ที่ถูกเจือจาง ในลำดับต่างๆ กับเอนไซม์อะไมเลสที่ทราบกิจกรรมในหลอดทดลอง ในปริมาตรที่เท่ากัน (100 µL) บ่มที่ 37° ซ 30 นาที เมื่อครบเวลานำสารละลายจากการบ่มไปตรวจหากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสที่เหลือ โดยปฏิกิริยาการย่อยน้ำแป้งเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวประเภทน้ำตาลรีดิวซิ่ง เช่นที่กล่าวข้างต้น

คำนวณค่าการยับยั้งกิจกรรมอะไมเลส ของสารสกัดตัวอย่างของแต่ละความเข้มข้น เขียนกราฟเส้นระหว่าง กิจกรรมการยับยั้งอะไมเลสกับความเข้มข้นของตัวอย่างแต่ละลำดับการเจือจาง แล้วหาค่าปริมาณของตัวอย่างที่ให้ค่าการยับยั้งร้อยละ 50 (IC_{50})

6. การตรวจคุณสมบัติต้านออกซิเดชั่น (Silva และคณะ2004)

ผสมสารสกัดตัวอย่างจากพืช กับสารละลาย 0.1 mM 2, 2-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl (DPPH) ใน 95% ethanol ในปริมาตรที่เท่ากัน และใช้ 95% ethanol แทนตัวอย่างในหลอดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที เซนตริฟิวจ์ ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำส่วนใสที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสง(ABS)ที่ 520 nm คำนวณคุณสมบัติต้านออกซิเดชั่น จาก

$$\%\text{DPPH scavenging} = (\text{ABScontrol} - \text{ABSsample}/\text{ABScontrol}) \times 100$$

7. จำแนกชนิดสารยับยั้งเอนไซม์ว่าเป็น ชนิดที่เป็นโปรตีน หรือ ชนิดที่ไม่เป็นโปรตีน

จำแนกชนิดสารยับยั้งอะไมเลสที่มีในสารสกัดน้ำ (W) และสารสกัด Et W ของพืชตัวอย่าง ว่าเป็นโปรตีน หรือไม่เป็นโปรตีน และจำแนกกลุ่มที่ไม่เป็นโปรตีนว่าเป็นสารประกอบฟีนอลลิก หรือคาร์โบไฮเดรตขนาดเล็ก ดังนี้

7.1 ตรวจโปรตีน

(1). วิธี Biuret (Clark และZwiter 1997)

วิธี Biuret อาศัยหลักการที่ Cu^{2+} สามารถจับกับไนโตรเจนอะตอมของพันธะเปปไทด์ของโปรตีน หรือสารเปปไทด์ ทำให้เกิดสีม่วง ที่มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm วิธีนี้มีข้อดีมากในแง่ที่เป็นปฏิกิริยา

จำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ ไม่มีปฏิกิริยารบกวนจาก กรดอะมิโนในโปรตีน กรดอะมิโนอิสระ ช่วงการตรวจปริมาณโปรตีน คือ 1-6 มก./มล.

วิธีทดลอง ผสมสารสกัดพืชตัวอย่างกับ สารละลาย Biuret ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 550 nm เทียบหาปริมาณ กับโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin

(2). วิธี Lowry's (Lowry และคณะ 1951)

วิธี Lowry's เป็นวิธีที่นิยมที่สุด ประยุกต์จากวิธี Biuret อาศัยหลักการที่ สารละลายคอปเปอร์ทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายใต้สภาวะด่าง แล้วเติมสารละลาย Folin-Ciocalteau (ซึ่งประกอบด้วยสารผสมของ phosphomolybdic-phosphotungstic acids) เพื่อรีดิวซ์คอปเปอร์คอมเพล็กซ์ให้เป็นสารละลายสีน้ำเงินเข้ม วิธีนี้ ใช้หาปริมาณโปรตีนระหว่าง 0.1-1 มก./มล.

วิธีทดลอง ผสมสารสกัดพืชตัวอย่าง กับสารละลายคอปเปอร์ในด่าง (2%Na_2CO_3 in 0.1N NaOH: 2% sodium potassium tartate :1 % $CuSO_4$ ในอัตราส่วน 100:1:1 โดยปริมาตร) ตั้งที่อุณหภูมิห้อง10 นาที เติม 1N Folin-Ciocalteau ผสมให้เข้ากันและตั้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 nm เทียบหาปริมาณ กับโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin

(3). วิธี Bradford (1976)

วิธี Bradford (1976) อาศัยหลักการที่ สาร Coomassie Brilliant Blue G-250 เมื่อจับกับโปรตีนแล้วทำให้เกิดการดูดแสงที่ความยาวคลื่น (wavelength, l) 595 นาโนเมตร (nm) สาร Coomassie Brilliant Blue มักจับกับกรดอะมิโน arginine และ aromatic amino acids มากกว่ากรดอะมิโนตัวอื่น ใช้หาปริมาณโปรตีนระหว่าง 0.2-1.4 มก./มล.

วิธีทดลอง ผสมสารสกัดพืชตัวอย่างกับ สารละลายBradford หลังการทำปฏิกิริยากับประจุบวกบนโปรตีน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 nm เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin

(4). วิธี Davis (1964) และGiri และKachole (1996)

แยกสารที่เป็นโปรตีนด้วย เจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบธรรมชาติผสมน้ำแป้ง (starch-native polyacrylamide gel electrophoresis, starch-Native PAGE) ทำการแยกภายใต้กระแสไฟฟ้า แล้วย้อมแถบโปรตีนด้วยสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250

วิธีทดลอง นำตัวอย่างที่แสดงผลบวกว่าเป็นโปรตีนจากวิธีข้างต้น หยอดลงบนแผ่นเจลที่มีน้ำแป้งผสมอยู่จำนวน 2 แผ่น ให้กระแสไฟฟ้า เสร็จแล้วนำแผ่นแรกย้อมเจลด้วยCoomassie brilliant blue แถบโปรตีนจะติดสีน้ำเงิน ส่วนแผ่นที่สอง แช่แผ่นเจลในสารละลายอะไมเลสนาน 30 นาที ที่ 37 °ซ ยกขึ้นและล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ย้อยด้วยสารละลายไอดีนในกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมใหม่ๆ บริเวณที่แป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์จะให้สีใส ส่วนบริเวณแถบโปรตีนที่แยกได้และมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของอะไมเลสจะมีสีน้ำเงินเนื่องจากเอนไซม์ไม่ย่อยแป้งบริเวณนั้นจึงสามารถทำปฏิกิริยากับไอโอดีนเกิดสีน้ำเงินได้ วิธีนี้นอกจากจะบอกว่าสารตัวอย่างมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนแล้ว ยังสามารถบอกความสามรถในการยับยังอะไมเลสเชิงคุณภาพได้

7.2 ตรวจสารที่ไม่เป็นโปรตีน

(1). วิธีตรวจหมู่ฟีนอลิก (Slinkard และ Singleton 1997)

สารจำนวนมากที่ละลายน้ำดี เป็นสารกลุ่มฟีนอลิก เช่นกรดแกลลิก และ แทนนิน เป็นต้น สารในกลุ่มฟีนอลิกสามารถเกิดปฏิกิริยาบวกกับ สารละลายโฟลินสารกลุ่ม lipophilic compounds พวก triterpenes, oleanolic acid และ ursolic acid ที่ได้จากการสกัด *Phyllanthus amaras*

วิธีทดลอง ผสมสารตัวอย่างกับสารละลายโฟลิน 1N ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย 20% w/v โซเดียมคาร์บอเนต ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm

คำนวณปริมาณฟีนอลิก จากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ซึ่งได้จากการนำสารละลาย กรดแกลลิกที่ทราบความเข้มข้น แทนตัวอย่างในปฏิกิริยาข้างต้น

(2). วิธีตรวจสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตขนาดโมเลกุลช่วงกลูโคส (G1) – maltoheptaose (G7)

อาศัยหลักการที่ สารเช่น สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตขนาดเล็ก ได้แก่อะคาร์โบสซึ่งเป็น pseudotetrasaccharide ย้อมติดสีกับ N-(1-naphthyl ethylenediamine)-5% sulfuric acid ในเมทานอล

วิธีทดลอง แยกคาร์โบไฮเดรตจากตัวอย่าง ด้วยdenaturating solvent เช่น ethanol หลังแยกโปรตีนแล้วด้วย trichloroacetic acid ตรวจวัดหมู่รีดิวซิ่งของน้ำตาล(Bernfeld 1955) ทำ TLC (Silica coat)เทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน G1-G7 ตามวิธีของ Kim และคณะ(2002) ฉีดพ่นด้วย 0.3% N-(1-naphthyl ethylenediamine) ใน 5% sulfuric acid ในเมทานอล อบที่ 110 °ซ 10 นาที สารที่เป็นคาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์จะติดสีชมพู

8. การวิเคราะห์ผลข้อมูล

ใช้สถิติพื้นฐาน ในการหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, sd) การวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (2n) สำหรับแต่ละตัวอย่าง ที่มาจาก 3 แหล่งเก็บ (3 N) ของตัวอย่างทั้ง 50 ชนิด