บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส มีรูปแบบการวิจัยเป็นงานวิจัยเชิงทดลอง (Experimental study design)

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมืออุปกรณ์

1.1 pH meter (Metter Toledo 320)

1.2 Vacuum rotating evaporator (Buchi B-480)

1.3 Freeze - dryer (FTS Systems, Flexi - Dry^{TM})

1.4 UV/Visible scaning spectrophotometer (Milton Roy,Spectronic Genesis 5)

1.5 Oven (Contherm)

1.6 Water bath (Julabo, SW 20)

1.7 Electric heating (mantle)

1.8 Funnel

1.9 Cylinder

1.10 Stirring rod

1.11 Beaker

1.12 Magnetic bar

1.13 Autopipette

1.14 Test tube

1.15 Round bottom flask

1.16 เครื่องบดสารตัวอย่าง

1.17 TLC plate (silica gel 60 F_{254}) (Merck)

1.18 High performance liquid chromatography (HPLC)(Shimadzu)

1.19 Liquid Chromatography - Mass Spectrometer (LC-MS)(Bruker)

1.20 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (Bruker 400 MHz)

2. สารเคมี

2.1 Xanthine ($C_5H_4N_4O_2$) (Sigma Analytical grade)

2.2 Xanthine oxidase (Grade IV: From bovine milk) (Sigma Analytical grade)

2.3 Allopurinol ($C_5H_4N_4O$) (Sigma Analytical grade)

2.4 Sodium hydroxide (NaOH) (Merck)

2.5 Hydrochloric acid (HCl) (37% HCl) (Merck)

2.6 Potassium phosphate tribasic (K_3PO_4) (Sigma)

2.7 Folin Ciocalteu's phenol reagent (Fluka)

2.8 Gallic acid ($C_7H_6O_5$) (Fluka)

2.9 Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Riedel-de Haën)

2.10 Absolute ethanol (C_2H_6O) (Merck)

2.11 Dimethyl sulfoxide (DMSO)(Riedel-de Haën)

2.12 Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$) (Fluka)

2.13 Methanol (CH_3OH) (Lab-Scan ; Analytical Reagent)

2.14 Acetonitrile (CH_3CN) (Lab-Scan ; HPLC)

2.15 Ethyl acetate ($CH_3COOC_2H_5$) (Lab-Scan

2.16 Apigenin ($C_{15}H_{10}O_5$) (Sigma)

2.17 Luteolin ($C_{15}H_{10}O_6$)(Sigma)

2.18 Vitexin ($C_{21}H_{20}O_{10}$) (Sigma)

2.19 Acetone-*d* 6 (C_3D_6O)(Sigma)

2.20 Glacial acetic acid (CH_3COOH) (Lab-Scan)

2.21 Phosphoric acid (H_3PO_4) (Lab-Scan)

2.22 Iron(III) chloride Hexahydrate ($FeCl_3.6H_20$) (Riedel-de Haën)

2.23 Sodium acetate tribasic ($C_2H_2NaO_2.3H_2O$) (Riedel-de Haën)

2.24 TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine (Fluka)

2.25 L ± Ascorbic acid ($C_6H_8O_6$) (Riedel-de Haën)

การดำเนินการวิจัย

1. กลุ่มพืชตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษาคือ ไหมข้าวโพดหวานสด (stigma of *Zeamays saccharata*, poaceae female flowers) และใบตำลึงแก่สด (*Coccinia grandis* L.Voigt cucurbitaceae) ที่เก็บมาจากอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

2. การเตรียมพืชตัวอย่าง

นำใบตำลึงแก่และไหมข้าวโพดหวานสด มาล้างทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้งแล้วอบแห้งที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบดละเอียดแยกกันด้วยเครื่องบดสารตัวอย่าง

3. การสกัดสารจากพืชตัวอย่าง

นำตำลึงและไหมข้าวโพดหวานผงมาอย่างละ 1 กิโลกรัม สกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย โดยใช้เทคนิคการสกัดสารด้วยน้ำร้อน (hot water extract) โดยให้อุณหภูมิขณะทำการสกัดสารไม่เกิน 100 °C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้น นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วนำสารละลายที่ผ่านการกรองไประเหยด้วยเครื่องระเหยแห้ง (vacuum rotating evaporator) สุดท้ายนำสารสกัด เข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer) เพื่อให้ได้สารสกัดอยู่ในรูปผงแห้ง และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ที่ได้จากการสกัด

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

4.1 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นแซนทีนต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

4.1.1 เตรียมหลอดทดลอง 9 หลอด เขียนหมายเลขกำกับตามที่ 1 – 9

4.1.2 ปิเปตต์สารละลายต่างๆ ลงในหลอดทดลอง ตามลำดับที่แสดงไว้ในตาราง 1 โดยเติมเอนไซม์ เป็นลำดับสุดท้าย (ยกเว้นหลอดที่ 1 เติม 0.5 M HCl ก่อนเติมเอนไซม์)

4.1.3 เมื่อเติมเอนไซม์แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 0.5 M HCl ในหลอดที่ 2 – 9 หลอดละ 0.1 ml ผสมให้เข้ากัน (หลอดที่ 1 เติมเอนไซม์แทน 0.5 M HCl)

4.1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร (A_{290}) โดยใช้หลอดที่ 1 ปรับเป็น 0

4.1.5 บันทึกผลในตารางและคำนวณ 1/[s] และ 1/V

4.1.6 เขียนกราฟระหว่าง 1/[s] และ 1/V แล้วคำนวณค่า K_{App} และ V_{max} จากกราฟ

4.1.7 เปรียบเทียบค่า K_m และ V_{max} ที่ได้จากข้อ 6

ป
SB
191
.M2
ส713ผ
25
2554 2553 สำนักหอสมุด
1.553351X

ตาราง 1 การเตรียมสารผสมเพื่อทดสอบผลของความเข้มข้นแซนทีนต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

สารละลาย (ml)	หลอดทดลองที่ (ml)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
50mM Potassium Phosphate buffer (pH 7.5)	2.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
0.01 mM Xanthine solution	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-
0.15 mM Xanthine solution	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-
0.21 mM Xanthine solution	-	-	-	1.0	-	-	-	-	-
0.35 mM Xanthine solution	-	-	-	-	1.0	-	-	-	-
0.53 mM Xanthine solution	-	-	-	-	-	1.0	-	-	-
0.77 mM Xanthine solution	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-
1.10 mM Xanthine solution	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-
1.60 mM Xanthine solution	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0
0.2 units/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1

4.2 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

4.2.1 เตรียมหลอดทดลอง 6 หลอด พร้อมทั้งระบุหมายเลขกำกับไว้ตามลำดับ

4.2.2 ปิเปตต์สารต่างๆ ลงหลอดทดลองตามปริมาตรและลำดับที่แสดงไว้ในตาราง 2 โดยเติมเอนไซม์เป็นลำดับสุดท้าย (ยกเว้นหลอดที่ 1 ให้เติม 0.5 M HCl ก่อนเติมเอนไซม์)

4.2.3 เมื่อเติมเอนไซม์แล้วผสมให้เข้ากันบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

4.2.4 เมื่อครบกำหนดเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M HCl ในหลอดที่ 2 - 6 หลอดละ 0.1 ml (หลอดที่ 1 เติมเอนไซม์แทน 0.5 M HCl) ผสมให้เข้ากัน

4.2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร (A_{290}) โดยใช้หลอดที่ 1 ปรับเป็น 0

4.2.6 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร กับ ความเข้มข้นของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

ตาราง 2 การเตรียมสารผสมเพื่อทดสอบผลของความเข้มข้นเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส ต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

สารละลาย (ml)	หลอดทดลองที่ (ml)					
	1	2	3	4	5	6
50mM Potassium Phosphate buffer (pH 7.5)	2.0	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
0.06 mM Xanthine solution	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
0.006 U/ml xanthine oxidase solution	-	0.1	-	-	-	-
0.01 U/ml xanthine oxidase solution	-	-	0.1	-	-	-
0.05 U/ml xanthine oxidase solution	-	-	-	-	-	-
0.10 U/ml xanthine oxidase solution	-	-	-	0.1	-	-
0.20 U/ml xanthine oxidase solution	-	-	-	-	0.1	-
0.40 U/ml xanthine oxidase solution	-	-	-	-	-	0.1
0.50 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1

4.3 การศึกษาผลของ pH ต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา

4.3.1 เตรียมหลอดทดลอง 6 หลอด พร้อมทั้งเขียนหมายเลขกำกับตามลำดับ 1-6

4.3.2 ปิเปตต์สารต่างๆ ลงหลอดทดลอง ตามปริมาตรและลำดับที่แสดงไว้ในตาราง 3 โดยหลอดที่ 1, 3 และ 5 ให้เติม 0.5 M HCl ก่อนเติมเอนไซม์

4.3.3 เมื่อเติมเอนไซม์แล้วผสมให้เข้ากันบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

4.3.4 หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M HCl ปริมาตร 0.1 ml (หลอดที่ 1, 3 และ 5 เติมเอนไซม์แทน 0.5 M HCl)

4.3.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 3 และ 5 ปรับเป็น 0

4.3.6 เขียนกราฟระหว่าง A_{290} และค่า pH ต่างๆ ของ 50 mM potassium phosphate buffer

ตาราง 3 การเตรียมสารผสมเพื่อทดสอบผลของ pH ต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

สารละลาย (ml)	หลอดทดลองที่ (ml)					
	1	2	3	4	5	6
50mM potassium phosphate buffer (pH 7.2)	1.9	1.9	-	-	-	-
50mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)	-	-	1.9	1.9	-	-
50mM potassium phosphate buffer (pH 7.8)	-	-	-	-	1.9	1.9
0.06 mM xanthine Solution	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
0.2 Unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1

5. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ (crude extract) ตัวอย่าง ต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

เตรียมปฏิกิริยาของสารผสมที่ประกอบด้วย 0.06 mM aqueous xanthine solution ปริมาตร 1 ml สารสกัดหยาบที่ได้จากไหมข้าวโพดหวานและใบตำลึง นำมาเจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆ (10, 25, 50 และ100 µg/ml) ในปริมาตร 100 µl เติมสารละลาย 50 mM phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 1.8 ml และเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (0.2 U/ml ในสารละลาย phosphate buffer pH 7.5) ปริมาตร 100 µl (ควรเตรียมแล้วใช้ทันที) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์ทำงานย่อยสับสเตรท และหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M HCl ปริมาตร 100 µl จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร โดยเตรียม Blank เหมือนกับสารสกัดที่ต้องการทดสอบ แต่เติมเอนไซม์หลังจากหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M HCl ก่อน (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) และหาค่าเฉลี่ยพร้อมค่า standard deviation (SD)

1 unit ของ xanthine oxidase คือปริมาณเอนไซม์ที่ต้องการในการสร้างกรดยูริก 1 mmole ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C

Xanthine Oxidase inhibitory activity จะแสดงออกมาเป็น % Inhibitor ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibitor} = \left\{ \frac{(A-B)-(C-D)}{A-B} \right\} \times 100$$

โดยค่า A คือค่า Activity ของเอนไซม์ที่ไม่มีสารสกัดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ

B คือค่า Control ของค่า A ที่ไม่มีทั้งสารสกัดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบและเอนไซม์

C คือค่า Activity ของเอนไซม์ที่มีสารสกัดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบและเอนไซม์

D คือค่า Activity ของเอนไซม์ที่มีเฉพาะสารสกัดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแต่ไม่มีเอนไซม์

allopurinol (10, 25, 50 และ 100 µg/ml) ซึ่งทราบว่าเป็น inhibitor ของ xanthine oxidase ใช้เป็น positive control

6. การศึกษาสารสกัดหยาบ (crude extract) ตัวอย่างต่อชนิดการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

6.1 การเตรียมสารผสมเพื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยที่ไม่มีตัวยับยั้ง

6.1.1 เตรียมหลอดทดลอง 4 หลอด เขียนหมายเลขกำกับแต่ละหลอด

6.1.2 ปิเปตต์สารละลายลงในหลอดทดลองตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตาราง 4 โดยใส่เอนไซม์เป็นลำดับสุดท้าย ยกเว้นหลอดที่ 1 ให้เติม 0.5 M HCl ก่อนแล้วจึงเติมเอนไซม์

6.1.3 เมื่อเติมเอนไซม์แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

6.1.4 เมื่อครบกำหนดเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M HCl ในหลอดที่ 2 – 4 หลอดละ 0.1 ml ผสมให้เข้ากัน (หลอดที่ 1 เติมเอนไซม์แทน 0.5 M HCl)

6.1.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรโดยใช้หลอดที่ 1 ปรับเป็น 0

6.1.6 บันทึกผลในตารางและคำนวณ 1/[S] และ 1/[V] เขียนกราฟระหว่าง 1/[S] และ 1/[V] ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

6.2 การศึกษาผลของยาอัลโลพูรินอล ต่อชนิดการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

6.2.1 เตรียมหลอดทดลอง 12 หลอด เขียนหมายเลขกำกับแต่ละหลอด

6.2.2 ปิเปตต์สารละลายลงในหลอดทดลองตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตาราง 5 - 7 โดยใส่เอนไซม์เป็นลำดับสุดท้าย ยกเว้นหลอดที่ 1 ให้เติม 0.5 M HCl ก่อนแล้วจึงเติมเอนไซม์

6.2.3 เมื่อเติมเอนไซม์แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

6.2.4 เมื่อครบกำหนดเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M HCl ในหลอดที่ 2 – 12 หลอดละ 0.1 ml ผสมให้เข้ากัน (หลอดที่ 1 เติมเอนไซม์แทน 0.5 M HCl)

6.2.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรโดยใช้หลอดที่ 1 ปรับเป็น 0

6.2.6 บันทึกผลในตารางและคำนวณ 1/[S] และ 1/[V] เขียนกราฟระหว่าง 1/[S] และ 1/[V] ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ตาราง 4 การเตรียมสารผสมที่มีสารละลายแซนทีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลาย	หลอดทดลองที่ (ml)			
	1	2	3	4
50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5	2.9	1.9	1.9	1.9
0.02 mM Xanthine Solution	-	1.0	-	
0.04 mM Xanthine Solution	-	-	1.0	
0.06 mM Xanthine Solution	-	-	-	1.0
0.2 unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1

ตาราง 5 การเตรียมสารผสมที่มี 0.02 mM แซนทีน และยาอัลโลพูรินอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลาย	หลอดทดลองที่ (ml)			
	1	2	3	4
50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5	1.8	1.8	1.8	1.8
0.02 mM Xanthine Solution	1.0	1.0	1.0	1.0
10 µg/ml allopurinol	0.1	-	-	-
25 µg/ml allopurinol	-	0.1	-	-
50 µg/ml allopurinol	-	-	0.1	
100 µg/ml allopurinol	-	-	-	0.1
0.2 unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1

ตาราง 6 การเตรียมสารผสมที่มี 0.04 mM แซนทีน และยาอัลโลพูรินอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลาย	หลอดทดลองที่ (ml)			
	5	6	7	8
50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5	1.8	1.8	1.8	1.8
0.04 mM xanthine Solution	1.0	1.0	1.0	1.0
10 µg/ml allopurinol	0.1	-	-	-
25 µg/ml allopurinol	-	0.1	-	-
50 µg/ml allopurinol	-	-	0.1	-
100 µg/ml allopurinol	-	-	-	0.1
0.2 unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1

ตาราง 7 การเตรียมสารผสมที่มี 0.06 mM แซนทีน และยาอัลโลพูรินอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลาย	หลอดทดลองที่ (ml)			
	9	10	11	12
50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5	1.8	1.8	1.8	1.8
0.06 mM xanthine Solution	1.0	1.0	1.0	1.0
10 µg/ml allopurinol	0.1	-	-	-
25 µg/ml allopurinol	-	0.1	-	-
50 µg/ml allopurinol	-	-	0.1	-
100 µg/ml allopurinol	-	-	-	0.1
0.2 unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1

6.3 การศึกษาสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน ต่อชนิดของการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

6.3.1 เตรียมหลอดทดลอง 12 หลอด เขียนหมายเลขกำกับแต่ละหลอด

6.3.2 ปิเปตต์สารละลายลงในหลอดทดลองตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตาราง 8 - 10 โดยใส่เอนไซม์เป็นลำดับสุดท้ายยกเว้นหลอดที่ 1 ให้เติม 0.5 M HCl ก่อนแล้วจึงเติมเอนไซม์

6.3.3 เมื่อเติมเอนไซม์แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

6.3.4 เมื่อครบกำหนดเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M HCl ในหลอดที่ 2 - 15 หลอดละ 0.1 ml ผสมให้เข้ากัน (หลอดที่ 1 เติมเอนไซม์แทน 0.5 M HCl)

6.3.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรโดยใช้หลอดที่ 1 ปรับเป็น 0

6.3.6 บันทึกผลในตารางและคำนวณ 1/[S] และ 1/[V] เขียนกราฟระหว่าง 1/[S] และ 1/[V] ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ตาราง 8 การเตรียมสารผสมที่มี 0.02 mM แซนทีน และสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลาย	หลอดทดลองที่ (ml)			
	1	2	3	4
50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5	1.8	1.8	1.8	1.8
0.02 mM Xanthine Solution	1.0	1.0	1.0	1.0
10 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	0.1	-	-	-
25 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	-	0.1	-	-
50 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	-	-	0.1	
100 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	-	-	-	0.1
0.2 unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1

ตาราง 9 การเตรียมสารผสมที่มี 0.04 mM แซนทีน และสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลาย	หลอดทดลองที่ (ml)			
	5	6	7	8
50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5	1.8	1.8	1.8	1.8
0.04 mM Xanthine Solution	1.0	1.0	1.0	1.0
10 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	0.1	-	-	-
25 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	-	0.1	-	-
50 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	-	-	0.1	-
100 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	-	-	-	0.1
0.2 unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1

ตาราง 10 การเตรียมสารผสมที่มี 0.06 mM แซนทีน และสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลาย	หลอดทดลองที่ (ml)			
	9	10	11	12
50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5	1.8	1.8	1.8	1.8
0.06 mM xanthine solution	1.0	1.0	1.0	1.0
10 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	0.1	-	-	-
25 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	-	0.1	-	-
50 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	-	-	0.1	-
100 µg/ml สารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน	-	-	-	0.1
0.2 unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1

6.4 การศึกษาสารสกัดจากใบตำลึงแก่ต่อชนิดการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

6.4.1 เตรียมหลอดทดลอง 12 หลอด เขียนหมายเลขกำกับแต่ละหลอด

6.4.2 ปิเปตต์สารละลายลงในหลอดทดลองตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตาราง 11 - 13 โดยใส่เอนไซม์เป็นลำดับสุดท้าย ยกเว้นหลอดที่ 1 ให้เติม 0.5 M HCl ก่อนแล้วจึงเติมเอนไซม์

6.4.3 เมื่อเติมเอนไซม์แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

6.4.4 เมื่อครบกำหนดเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M HCl ในหลอดที่ 2 - 15 หลอดละ 0.1 ml ผสมให้เข้ากัน (หลอดที่ 1 เติมเอนไซม์แทน 0.5 M HCl)

6.4.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 นาโนเมตรโดยใช้หลอดที่ 1 ปรับเป็น 0

6.4.6 บันทึกผลในตารางและคำนวณ 1/[S] และ 1/[V] เขียนกราฟระหว่าง 1/[S] และ 1/[V] ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ตาราง 11 การเตรียมสารผสมที่มี 0.02 mM แซนทีน และสารสกัดจากใบตำลึงแก่ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลาย	หลอดทดลองที่ (ml)			
	1	2	3	4
50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5	1.8	1.8	1.8	1.8
0.02 mM xanthine Solution	1.0	1.0	1.0	1.0
10 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	0.1	-	-	-
25 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	-	0.1	-	-
50 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	-	-	0.1	
100 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	-	-	-	0.1
0.2 unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1

ตาราง 12 การเตรียมสารผสมที่มี 0.04 mM แซนทีน และสารสกัดจากใบตำลึงแก่ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลาย	หลอดทดลองที่ (ml)			
	5	6	7	8
50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5	1.8	1.8	1.8	1.8
0.04 mM Xanthine Solution	1.0	1.0	1.0	1.0
10 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	0.1	-	-	-
25 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	-	0.1	-	-
50 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	-	-	0.1	-
100 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	-	-	-	0.1
0.2 unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1

ตาราง 13 การเตรียมสารผสมที่มี 0.06 mM แซนทีน และสารสกัดจากใบตำลึงแก่ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารละลาย	หลอดทดลองที่ (ml)			
	9	10	11	12
50 mM potassium phosphate buffer pH 7.5	1.8	1.8	1.8	1.8
0.06 mM Xanthine Solution	1.0	1.0	1.0	1.0
10 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	0.1	-	-	-
25 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	-	0.1	-	-
50 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	-	-	0.1	-
100 µg/ml สารสกัดจากใบตำลึงแก่	-	-	-	0.1
0.2 unit/ml xanthine oxidase	0.1	0.1	0.1	0.1
0.5 M HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Total volume	3.1	3.1	3.1	3.1

7. **การทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน** (Total phenolic content assay)

ไหมข้าวโพดหวานถูกนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ น้ำ เอทิลอะซีเตท และ เฮกเซน โดยมีวิธีการสกัดดังนี้

การสกัดไหมข้าวโพดหวานด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท

ชั่งไหมข้าวโพดหวานสดมา 100 กรัม นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาใส่ในบีกเกอร์ แล้วเติมน้ำกลั่นเล็กน้อย เติม NaOH 0.1 g ลงไปแล้วคนให้เข้ากัน (stir) เพื่อทำให้ผนังเซลล์พืชแตกด้วยเครื่องกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้สารต่างๆ ในเซลล์พืชหลุดออกมา เติมตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท เพื่อทำการสกัดสารที่สนใจออกมาแล้วคนให้เข้ากันต่อ (stir) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกส่วนสกัดชั้นเอทิลอะซีเตท ออกมา จากนั้นเติม $MgSO_4$ 1 กรัม เพื่อดูดซับน้ำที่ปนออกมาแล้วนำส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท มากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนสกัดที่แยกได้มาตั้งทิ้งไว้เพื่อระเหยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทออกไปและหา %Yield ที่ได้จากการสกัด [76]

การสกัดไหมข้าวโพดหวานด้วยตัวทำละลายเฮกเซน

ชั่งไหมข้าวโพดหวานสดมา 100 กรัม นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นเล็กน้อย จากนั้นเติม NaOH 0.1 g ลงไปแล้วคนให้เข้ากัน (stir) เพื่อทำให้ผนังเซลล์พืชแตก ด้วยเครื่องกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมตัวทำละลายเฮกเซนเพื่อทำการสกัดสารที่สนใจออกมาแล้วคนให้เข้ากันต่อ (stir) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกส่วนสกัดชั้นเฮกเซนออกมา จากนั้นเติม $MgSO_4$ 1 กรัม เพื่อดูดซับน้ำที่ปนออกมา แล้วนำส่วนสกัดเฮกเซน มากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วนำส่วนสกัดที่แยกได้มาตั้งทิ้งไว้เพื่อระเหยตัวทำละลายเฮกเซนออกไปและหา %Yield ที่ได้จากการสกัด [76]

การตรวจหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ทำการสกัดโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ น้ำ เอทิลอะซีเตท และ เฮกเซน โดยวิธี Folin - Ciocalteu ดัดแปลงมาจากวิธีของ Pourmorad, et al. [77] โดยเตรียมสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่ความเข้มข้น 100 µg/ml และเตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ใน methanol : H_2O (50:50) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 mg/ml เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) จากสารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) จากนั้นนำสารละลายสารสกัดไหมข้าวโพด จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.2 N Folin – Ciocalteu reagent 1 มิลลิลิตร และสารละลาย 1 M โซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้เครื่อง UV- visible spectrophotometer การทดสอบสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำเช่นเดียวกับการทดสอบสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน สำหรับวิธีการเตรียม Blank เตรียมดังเช่นวิธีที่กล่าวข้างต้น โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดจากไหมข้าวโพดหรือสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ครั้ง(triplicate) จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวัดหาสารประกอบฟีนอลิก จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิก (gallic acid) และค่าการดูดกลืนแสงในหน่วย gallic acid equivalents (GAE) mg/g นำหนักแห้งและน้ำหนักสด

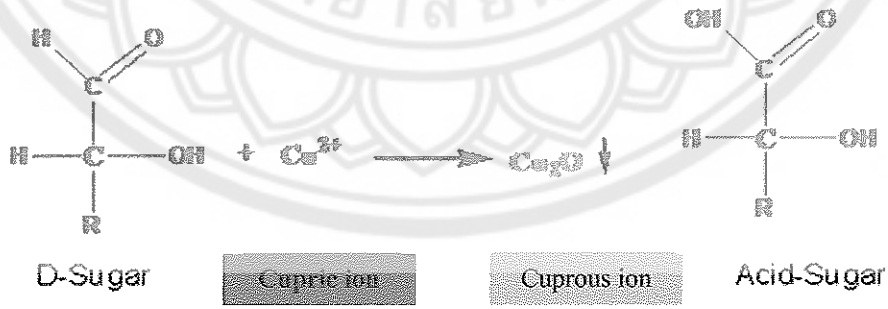
8. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay)

วิธี FRAP เป็นวิธีวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการ Ferric (Fe^{3+}) รับอิเล็กตรอน (e^-) จากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วเปลี่ยนเป็น Ferrous (Fe^{2+}) จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้น ซึ่งสารละลายจะเป็นสีม่วงน้ำเงินดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm

ชั่งสารสกัดหยาบและสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตทในส่วนสกัดย่อยที่ 6 (fraction 6) ของไหมข้าวโพดหวานมาอย่างละ 1 mg ในตัวทำละลาย 1 ml จากนั้นปิเปตต์มา 0.1 ml เติมลงใน FRAP reagent [78, 79] ปริมาตร 3.0 ml ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm วิธีการเตรียม Blank ใช้ตัวทำละลาย 0.1 ml แทนสารสกัดตัวอย่าง และหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid (0.1, 0.3, 0.5 และ 1.0 mM) แสดงค่าในรูป ascorbic acid equivalents (AAE/mg) ของสารสกัด(ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) [80]

9. การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing property) **ของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานด้วยวิธี** Benedict's test

การทดสอบด้วยวิธีเบเนดิกต์ (Benedict' s test) เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบน้ำตาลที่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (มีหมู่ hemiacetal-OH หรือ หมู่ hemiketal-OH) จะทำปฏิกิริยากับ cupric ion (Cu^{++}) ในน้ำยาเบเนดิกต์ที่มีสภาวะเป็นด่างกลายเป็น Cuprus oxide (Cu^{+}) ซึ่งเป็นตะกอนสีเหลืองหรือน้ำตาลแดง ดังปฏิกิริยา [81]



ภาพ 10 แสดงหลักการตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) **ด้วย** Benedict's test

เมื่อสารสกัดมีองค์ประกอบของไกลโคไซด์ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ส่วน คือ ส่วนของน้ำตาล (glycone part) และส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล (aglycone part) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) หมู่รีดิวซ์ (reducing group) ของน้ำตาลจะทำปฏิกิริยากับ cupric ion (Cu^{++}) เกิดเป็นตะกอนสีเหลืองหรือน้ำตาลแดง [82]

เตรียมหลอดทดลอง 3 หลอด จากนั้นเตรียมสารละลายลงในหลอดทดลองดังนี้ หลอดที่ 1 เติมสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน 1 ml หลอดที่ 2 เติมสารละลายกลูโคส 1 ml หลอดที่ 3 ไม่เติมทั้งสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานและสารละลายกลูโคส จากนั้นเติมสารละลายเบเนดิกต์ 3 หยดลงในหลอดทดลองทั้ง 3 หลอดผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำร้อนเป็นเวลา 5 นาที สังเกตและบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายและสีของตะกอน

10. **การทำปฏิกิริยา** acid hydrolysis **สารสกัดไหมข้าวโพดหวาน**

การทำปฏิกิริยา acid hydrolysis ของสารสกัดไหมข้าวโพดหวานดัดแปลงวิธีการทดลองมาจาก Pazmino-Duran และคณะ [83] ติดตั้งชุด reactor (hot plate, condenser, magnetic bar, bottle flask ขนาด 50 ml) เติม 2 M HCl 14 ml ลงใน bottle flask หมุนปุ่ม stir และปรับอุณหภูมิเป็น 100 °C ทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที ปิเปตต์ 2 M HCl ผสมกับสารสกัดไหมข้าวโพดหวานผสมและละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำมาใส่ในขวดก้นกลมที่มี 2 M HCl ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อให้สารผสมเกิดปฏิกิริยา เมื่อครบกำหนดเวลาทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยุดให้ความร้อนและรอให้สารผสมเย็น จากนั้นนำสารผสมมาปรับ pH ให้เป็นกลาง (7.0) แล้วทำการสกัดสารด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยเติมตัวทำละลายเอทิลอะซีเตทลงในกรวยแยก (separatory funnel) 30 มิลลิลิตร เขย่า แล้วไขเอาส่วนที่เป็นชั้นน้ำออกและเก็บสารละลายชั้นเอทิลอะซีเตทไว้ แล้วนำชั้นน้ำดังกล่าวมาใส่ในกรวยแยกแล้วทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตท (ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง) จากนั้นนำสารละลายเอทิลอะซีเตทที่สกัดได้มารวมกัน แล้วเติม Magnesium sulphate anhydrous 1 กรัม ลงในสารละลายเพื่อดูดซับน้ำที่ปนมากับสารละลาย จากนั้นนำสารละลายมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วนำสารละลายที่ได้จากการกรองมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากการทำ acid hydrolysis มาทดสอบด้วย Benedict's test แล้วนำมาทำการแยกด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีต่อไป

11. **การตรวจหาองค์ประกอบของสารที่มีในสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง** (Thin Layer Chromatography; TLC)

เตรียมถังแก้วปิดฝา จากนั้นเติม Developings solvent (MeOH : ACN) ในอัตราส่วน 0:100 ถึง 100:0 spot สารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ลงบนแผ่น TLC (siliga gel 60) 2 แผ่น โดยใช้หลอดคะปิลลารี spot สารสกัดตัวอย่างลงบนแผ่น TLC แต่ละแผ่นให้ห่างจากขอบ

ล่างของแผ่น TLC ประมาณ 1 cm หย่อนแผ่น TLC ลงในถังแก้วที่เตรียมไว้อย่างช้าๆ ในแนวดิ่ง และควรระมัดระวังไม่ให้ระดับของตัวทำละลายท่วม spot สารตัวอย่างและปิดฝา เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึงบริเวณ solvent front ยกแผ่น TLC ออก และทำเครื่องหมายตรง solvent front จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง 2-3 นาที นำแผ่น TLC แผ่นแรกมา stain ด้วย anisaldehyde's reagent ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100-120 °C นำแผ่น TLC แผ่นที่ 2 stain ด้วย dragendorff's reagent ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100-120 °C บันทึกระยะทางที่สารเคลื่อนที่ และคำนวณค่า Rf [84]

12. **การแยกสารสกัดไหมข้าวโพดหวานที่ผ่านและไม่ผ่านการเกิดปฏิกิริยา** Acid Hydrolysis **ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี** (Chromatography technique)

12.1 **การแยกสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานโดยเครื่อง** HPLC

การแยก active compounds ที่มีในสารสกัดหยาบไหมข้าวโพดเริ่มจาก นำสารสกัดหยาบจากไหมข้าวโพดที่สกัดด้วยน้ำร้อนทั้ง 2 ชนิดมาอย่างละ 0.025 กรัม มาละลายในน้ำกลั่น 2 ml จากนั้นนำมากรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ โครมาโทกราฟีของเครื่อง HPLC (Shimadzu) โดยใช้คอลัมน์ที่ถูกบรรจุด้วย C18 (column prodigy, 4.6 mm × 250 mm ,5 µm (ODS-3)) เพื่อทำการแยก active compounds โดยสภาวะที่ใช้สำหรับทำการแยก active compounds ด้วยเครื่อง HPLC แสดงดังตาราง 14 และใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ในระบบ gradient elution (ตาราง 15) ของ H_2O : acetonitrile (95 : 5) ถึง (5 : 95) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Hsieh และคณะ [61] โดยสภาวะที่ใช้มีดังนี้ โดยเริ่มชะสาร (elution) ด้วยตัวทำละลายดังกล่าวที่มีอัตราการไหล (flow rate) 1ml/min แล้วทำการเก็บ Fraction สารสกัดไหมข้าวโพดหวานทั้งหมด 6 fractions ที่ค่า t_R ต่างๆ ทั้งสารสกัดไหมข้าวโพดหวานที่ทำและไม่ทำปฏิกิริยา acid hydrolysis ในช่วง 1.50 – 43.00 นาที (ตาราง 16) แล้วนำทุก fractions ที่เก็บได้มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป จากนั้นละลายสารที่เหลือด้วยน้ำกลั่น 1 ml เพื่อเตรียมสำหรับนำ fractions ต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสต่อไป

ตาราง 14 สภาวะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการแยกสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน

Column	:	C18 (4.6 × 250 mm ,5 µm (ODS-3))
Oven Column	:	30 °C
Detector	:	UV 214 nm
Flow rate	:	1 ml/min
Injection loop	:	20 µl
Gradient System	:	

ตาราง 15 ระบบ gradient system ของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

H_2O	:	CH_3CN	Time Gradient (min)
95	:	5	0 - 4
80	:	20	4 - 7
65	:	35	7 - 10
50	:	50	10 - 19
35	:	65	19 - 23
20	:	80	23 - 41
5	:	95	41 - 59
95	:	5	59 - 70

ตาราง 16 การเก็บแต่ละ fraction ที่ค่า retention time ต่างๆ

Retention time(t_R) min	Fraction no.
1.50 - 3.50	1
3.50 - 6.00	2
6.00 - 9.00	3
9.00 - 12.00	4
12.00 - 16.00	5
27.00 - 29.00	6
37.0 - 43.00	7

13. การทดสอบสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวานที่แยกด้วย HPLC ต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

เตรียมปฏิกิริยาของสารผสมที่ประกอบด้วย 0.06 mM aqueous xanthine solution ปริมาตร 1 ml และเติม fractions ที่เก็บได้จากการแยกด้วยเทคนิค HPLC ปริมาตร 100 µl เติมสารละลาย 50 mM phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 1.8 ml และเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมเอนไซม์ xanthine oxidase solution (0.2 U/ml ละลายด้วย phosphate buffer pH 7.5) ปริมาตร 100 µl (ควรเตรียมแล้วใช้ทันที) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์ทำงานย่อยสับสเตรท และหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M HCl ปริมาตร 100 µl จากนั้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารด้วยเครื่อง UV-Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 290 nm โดยเตรียม Blank เหมือนกับสารสกัดที่ต้องการทดสอบ แต่เติมเอนไซม์หลังจากหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M HCl (ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง) และหาค่าเฉลี่ยพร้อมค่าส่วนเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นนำมาคำนวณหา (%) การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสโดยใช้สูตรการคำนวณดังที่กล่าวไว้ในข้อ 4

14. การวิเคราะห์แยกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identify) สารตัวอย่าง

14.1 การวิเคราะห์แยกและการพิสูจน์เอกลักลักษณ์ (identify) สารตัวอย่างด้วยเครื่อง LC/MS

นำส่วนสกัดย่อยต่างๆ ที่เก็บได้จากการแยกส่วนสกัดย่อยที่ 6 (fraction 6) มาวิเคราะห์แยกและทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identify) สารด้วยเครื่องHigh Performance Liquid Chromatography เชื่อมต่อกับเครื่อง mass – spectrometer (LC-MS) โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์เดียวกันกับที่กล่าวไว้หัวข้อที่ 12 โดยเริ่มจากการนำสารตัวอย่างฉีดเข้าที่ injection port สารตัวอย่างจะกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปใน column ด้วยของเหลวตัวพา (mobile phase) อย่างช้าๆ สารผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วน ๆ ที่ column จากนั้น โมเลกุลของสารจะถูกผ่านเข้าสู่เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (MS) เพื่อทำการ identify สาร โดยการทำงานจะอาศัยการทำให้โมเลกุลของสารซึ่งอยู่ในรูปของสารระเหยเกิดการแตกตัวเป็นไอออนที่มีประจุบวก ด้วยการยิงด้วยอิเล็กตรอน ซึ่งจะให้ M^+(molecular ion) ที่มีค่ามวลต่อประจุ (m/z) เท่ากับน้ำหนักโมเลกุลของสารนั้น และโมเลกุลของไอออนจะแตกตัวเป็น fragment ต่างๆ ซึ่งจะเป็นลักษณะเฉพาะของสารนั้น และเปรียบเทียบค่า molecular ion และ fragment หลัก กับค่าที่บันทึกไว้ใน reference library ก็จะทำให้ทราบถึงองค์ประกอบต่างๆ ได้ โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นสามารถเขียนออกมาเป็น โครมาโทแกรมด้วยเครื่อง recorder ดังนั้นจึงทำให้ทราบองค์ประกอบของสารได้

15. การวิเคราะห์แยกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของ Fraction 6 ที่สกัดด้วยเอทิลอะซีเตท

นำส่วนสกัดย่อยที่เก็บได้จากส่วนสกัดย่อยที่ 6 (fraction 6) มาระเหยเอาตัวทำละลายออก จากนั้นทำการสกัดแยกด้วยวิธี Liquid - Liquid extraction ด้วยเอทิลอะซีเตท สกัด 3 ครั้ง (ครั้งละ 50 ml) จากนั้น นำสารสกัดชั้นเอทิลอะซีเตทมารวมกัน แล้วเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) เพื่อกำจัดน้ำที่ปนออกมา แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 สุดท้ายระเหยเอาตัวทำละลายออกจากนั้น นำสารสกัดที่ได้ทำการแยกด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Luteolin, Vitexin และ Apigenin โดยสภาวะการทดลองที่ใช้คือ คอลัมน์ C18 (250×4.6 mm) เฟสเคลื่อนที่ (methanol: acetonitrile:acetic acid : phosphoric acid: water (200 :100: 10:10:200 v/v) ตรวจวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 352 nm อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 0.60 ml/min [85]

16. การยืนยันโครงสร้างของสารที่ได้ด้วยเทคนิค ^{1}H-NMR และ ^{13}C-NMR

นำส่วนสกัดย่อยต่างๆ ที่เก็บได้จากการแยกส่วนสกัดย่อยที่ 6 (fraction 6) มายืนยันโครงสร้างของสารที่ได้ด้วยเทคนิค ^{1}H และ ^{13}C NMR โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Luteolin Vitexin และ Apigenin ขั้นตอนการเตรียมสารเพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H - NMR และ ^{13}C - NMR เตรียมสารมาตรฐานมาอย่างละ 1 กรัม ละลายใน Acetone $-d_6$ + D_2O แล้วนำมาใส่ในหลอด NMR แล้วนำมาวางในสนามแม่เหล็กของเครื่อง NMR Bruker 400 spectrometer ที่ 300 K มี standard pulse sequences ส่วนการเตรียมส่วนสกัดย่อยต่างๆ เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}H และ ^{13}C NMR ควรทำการเก็บส่วนสกัดย่อยที่สนใจหลายๆ ครั้งเพื่อให้ได้สารที่มีความเข้มพอที่จะวัดสัญญาณ ^{1}H - NMR และ ^{13}C - NMR ได้

17. การทดสอบสารที่พบในสารสกัดไหมข้าวโพดหวานต่อการยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

เตรียมปฏิกิริยาของสารผสมที่ประกอบด้วย 0.06 mM aqueous xanthine solution ปริมาตร 1 ml สารละลายมาตรฐาน (Luteolin Apigenin และ Vitexin) และสารละลายยาอัลโลพูรินอล (standard inhibitor) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.035, 0.087, 0.175 และ 0.349 mM) ปริมาตร 100 µl จากนั้น เติมสารละลาย 50 mM phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 1.8 ml และเริ่มปฏิกิริยาโดยเติมเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (0.2 U/ml ละลายด้วย phosphate buffer pH 7.5) ปริมาตร 100 µl (ควรเตรียมแล้วใช้ทันที) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เอนไซม์ทำงานย่อยสับสเตรท และหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M HCl ปริมาตร 100 µl จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 290 nm โดยเตรียม

Blank เหมือนกับสารสกัดที่ต้องการทดสอบ แต่เติมเอนไซม์หลังจากหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M HCl ก่อน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ยพร้อมค่าส่วนเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นนำมาคำนวณหา (%) การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส โดยใช้สูตรการคำนวณดังที่กล่าวไว้ในข้อ 5

18. **การวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดลอง**

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ Statistical analysis T-test