บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องวิเคราะห์สารโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ยี่ห้อ Water รุ่น 600-486-717

3.1.2 เครื่องล้างอัลตราโซนิค (ultrasonic cleaner) ULTRAsonik NDI 136H

3.1.3 เครื่องเขย่า GFL 1083

3.1.4 เครื่องวัดสเปกโตรมิเตอร์ช่วง UV-VIS (UV-Vis spectrometer) Hitachi U-1000

3.1.5 ตะแกรงร่อนแยกขนาด 16-18 mesh

3.1.6 ชุดเครื่องแก้ว

3.1.7 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.1.8 ตู้อบ

3.1.9 เครื่องวิเคราะห์ความชื้น รุ่น XM 120

3.2 วัตถุดิบและสารเคมี

3.2.1 ใบสบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.) พันธุ์นครราชสีมา จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ 7 ม.2 ต.เขาหินซ้อน อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา

3.2.2 เมทานอลบริสุทธิ์ (methanol, AR grade)

3.2.3 เอทานอลบริสุทธิ์ (ethanol, AR grade)

3.2.4 กรดไฮโดรคลอลิก (hydrochloric acid, HCl)

3.2.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH)

3.2.6 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$)

3.2.7 วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิค (ascorbic acid)

3.2.8 สารมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) คลอริลาจิน (corilagin) กรดแอลลาจิก (ellagic acid)

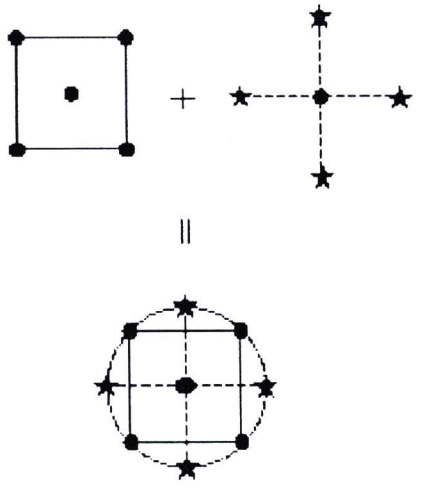
3.2.9 กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid, H_3PO_4)

3.2.10 กระดาษกรองเบอร์ 4

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การออกแบบการทดลอง

การออกแบบการทดลองในงานวิจัยนี้เป็นแบบ Central Composite Design, CCD ซึ่งเป็นวิธีการใช้หลักทางคณิตศาสตร์ด้านมิติ เป็นการออกแบบที่ทุกระดับของแต่ละปัจจัยห่างจาก center ของ design เท่ากัน และทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง แต่ละปัจจัยจะมีระดับการทดลอง 5 ระดับ ($-\alpha$, -1, 0, 1, α) ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ จุดที่อยู่บนแกน coordinate 8 จุด จุดที่อยู่บนแกนหลัก 6 จุด และจุดศูนย์กลาง 1 จุด รวมเป็นหน่วยการทดลองทั้งหมด 15 จุด แต่ละจุดทำการทดลอง 3 ซ้ำ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ตัวแปรที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ อุณหภูมิ (X_1) ความเข้มข้นของเมทานอล (X_2) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (X_3) โดยแต่ละตัวแปรทำการศึกษาที่ 5 ระดับ คือ อุณหภูมิที่ 30 40 50 60 และ 70 องศา-เซลเซียส ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0 25 50 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 5 7 9 และ 11 ผลการออกแบบการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.1 และ 3.2



รูปที่ 3.1 การออกแบบการทดลอง 3 ตัวแปร แบบ Central Composite Design [44]

ตารางที่ 3.1 สัญลักษณ์และระดับตัวแปรต่าง ๆ ในการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design

ตัวแปร	สัญลักษณ์		ระดับ	
	รหัสทั่วไป	รหัสระบุ	รหัสทั่วไป	รหัสระบุ
อุณหภูมิ	T	X_1	30	-1.682
(องศาเซลเซียส)			40	-1
			50	0
			60	1
			70	1.682
ความเข้มข้นของเมทานอล	X	X_2	0	-1.682
(เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)			25	-1
			50	0
			75	1
			100	1.682
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	P	X_3	3	-1.682
(-)			5	-1
			7	0
			9	1
			11	1.682

ตารางที่ 3.2 ผลการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design แบบ 5 ระดับ 3 ตัวแปร

การทดลอง	อุณหภูมิ (X_1) (^{0}c)	ความเข้มข้นของเมทานอล (X_2) (% v/v)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (X_3) (-)
1	-1 (40)	-1 (25)	-1 (5)
2	-1 (40)	-1 (25)	1 (9)
3	-1 (40)	1 (75)	-1 (5)
4	-1 (40)	1 (75)	1 (9)
5	1 (60)	-1 (25)	-1 (5)
6	1 (60)	-1 (25)	1 (9)
7	1 (60)	1 (75)	-1 (5)
8	1 (60)	1 (75)	1 (9)
9	-1.682 (30)	0 (50)	0 (7)
10	1.682 (70)	0 (50)	0 (7)
11	0 (50)	0 (50)	0 (7)
12	0 (50)	-1.682 (0)	0 (7)
13	0 (50)	1.682 (100)	0 (7)
14	0 (50)	0 (50)	-1.682 (3)
15	0 (50)	0 (50)	1.682 (11)
16	0 (50)	0 (50)	0 (7)
17	0 (50)	0 (50)	0 (7)
18	0 (50)	0 (50)	0 (7)

3.3.2 การเตรียมและการวิเคราะห์ความชื้นของใบสบู่ดำ

3.3.2.1 อบแห้งใบสบู่ดำ ในตู้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 80 ± 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.2.2 ลดขนาดใบสบู่ดำอบแห้งด้วยเครื่องบด และคัดแยกขนาดของผงใบสบู่ดำอบแห้งด้วยตะแกรงร่อนขนาด 1-1.19 มิลลิเมตร

3.3.2.3 วิเคราะห์หาความชื้นของผงใบสบู่ดำที่ผ่านการคัดขนาดแล้ว โดยเครื่องวิเคราะห์ความชื้น

3.3.2.4 เก็บรักษาผงใบสบู่ดำอบแห้งในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง และในสภาวะที่ไม่มีแสง

3.3.3 ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำด้วยเครื่องเขย่าและเครื่องอัลตราโซนิค

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำด้วยเครื่องเขย่าและเครื่องอัลตราโซนิค โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้เมทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลาย มีขั้นตอนดังนี้

3.3.3.1 ชั่งน้ำหนักใบสบู่ดำอบแห้ง 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.3.3.2 เติมเมทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร 40 มิลลิลิตร

3.3.3.3 สกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำด้วยเครื่องอัลตราโซนิคที่ความถี่ 44 กิโลเฮิรตซ์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างสารสกัดทุก 5 นาที จนครบ 30 นาที และที่ 40 50 60 120 180 และ240 นาที

3.3.3.4 สกัดสารสำคัญจากใบสบู่ดำด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างสารสกัดทุก 10 นาที จนครบ 30 นาที และที่ 60 120 180 และ240 นาที

3.3.3.5 นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีโนลิคได้แก่ กรดแกลลิก คลอริลาจิน และกรดแอลลาจิก ด้วยเครื่อง HPLC

3.3.3.6 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีโนลิคที่สกัดได้จากใบสบู่ดำโดยใช้วิธีทั้งสอง เพื่อเลือกวิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาต่อไป

3.3.4 ศึกษาอิทธิพลของตัวแปรที่มีผลต่อการสกัดใบสบู่ดำ

ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีโนลิคได้แก่ กรดแกลลิก กรดแอลลาจิก และคลอริลาจิน จากใบสบู่ดำ ด้วยวิธีอัลตราโซนิค โดยทำศึกษาอิทธิพลของตัวแปร 3 ตัว ได้แก่ อุณหภูมิที่ 30 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0 25 50 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 5 7 9 และ 11 มีขั้นตอนดังนี้

3.3.4.1 ชั่งน้ำหนักใบสบู่ดำอบแห้ง 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.3.4.2 ใส่ตัวทำละลายเมทานอล 40 มิลลิลิตร

3.3.4.3 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้เท่ากับ 3

3.3.4.4 ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิคที่ความถี่ 44 กิโลเฮิรตซ์ เป็นเวลา 15 นาที

3.3.4.5 นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีโนลิคได้แก่ กรดแกลลิก คลอริลาจิน และกรดแอลลาจิก ด้วยเครื่อง HPLC

3.3.4.6 วิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากใบสบู่ดำ

3.3.4.7 ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 3.3.4.1 ถึง 3.3.4.6 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเป็น 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5 7 9 และ11ตามลำดับ

3.3.4.8 ทำการทดลองซ้ำตั้งแต่ข้อ 3.3.4.1 ถึง 3.3.4.7 โดยเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นน้ำ หรือ ตัวทำละลายร่วมระหว่างเมทานอลกับน้ำที่ความเข้มข้น 25 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

3.3.4.9 เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำที่สภาวะต่าง ๆ

3.3.4.10 หาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำโดยใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface methodology)

3.4 การวิเคราะห์ผลและการคำนวณ

3.4.1 การหาปริมาณกรดแกลลิก คลอริลาจิน และกรดแอลลาจิก ในสารสกัดใบสบู่ดำ

3.4.1.1 กรองตัวอย่างด้วยตัวกรองที่มี ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน

3.4.1.2 ใส่สารสกัดที่กรองแล้วในขวดสารตัวอย่าง

3.4.1.3 ดูดสารสกัดโดยใช้ micro syringe ขนาด 100 ไมโครลิตร มา 20 ไมโครลิตร และฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

- คอลัมน์ : reverse-phase Shimpack CLC-ODS
- ตรวจวัดสัญญาณของสาร : ใช้ความยาวคลื่นที่ 270 นาโนเมตร
- เฟสเคลื่อนที่ : กรดฟอสฟอลิก 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ อะซิโตไนไตร์ 100 เปอร์เซ็นต์
- อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ : 80:20 โดยปริมาตร
- อัตราการไหล : 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีด : 20 ไมโครลิตร

3.4.1.4 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก คลอริลาจิน และกรดแอลลาจิก (ข้อ 3.4.2)

3.4.1.5 รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมต่อกิโลกรัมใบสบู่ดำแห้ง (มก./กก.ใบสบู่ดำแห้ง)

3.4.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างการสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายกรดแกลลิก มีขั้นตอนดังนี้

3.4.2.1 นำกรดแกลลิก 0.5 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.4.2.2 เติมเอทานอล 10 มิลลิลิตร

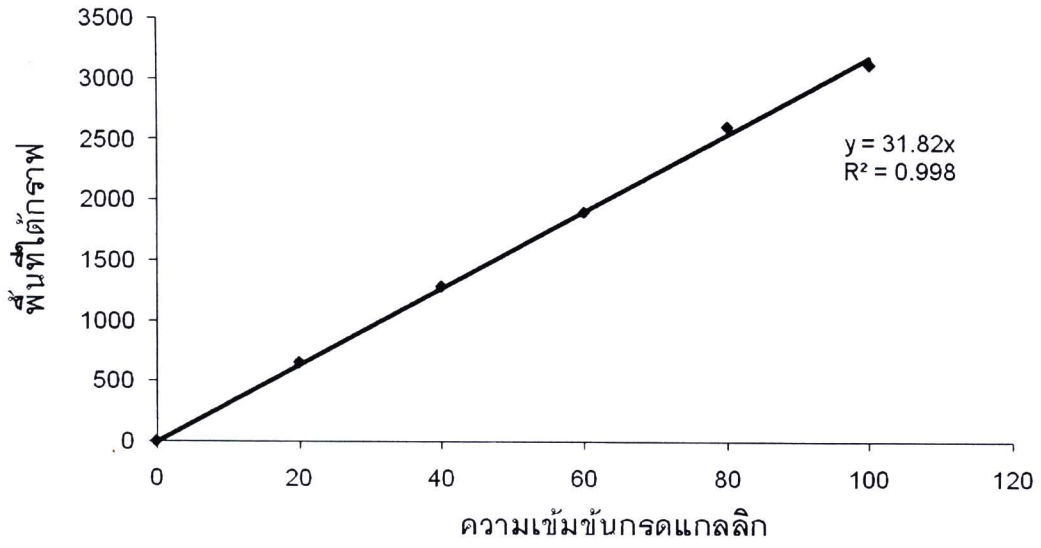
3.4.2.3 ปรับปริมาตรด้วยด้วยน้ำปราศจากไอออน ได้เป็น stock solution

3.4.2.4 นำสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกจาก stock solution ปริมาตร 0 1 2 3 5 และ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

3.4.2.5 ปรับปริมาตรด้วยด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิก เข้มข้น 0 50 100 150 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3.4.2.6 นำสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิกที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณของกรดแกลลิก ด้วยเครื่อง HPLC

3.4.2.7 นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก

3.4.3 วิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

วิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำ ด้วยวิธีmodified original DPPH [12] ตามขั้นตอนดังนี้

3.4.3.1 นำสารสกัดที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ

3.4.3.2 เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 60 ไมโครโมลาร์ในเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ปริมาณ 3.9 มิลลิลิตร

3.4.3.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร

3.4.4 วิเคราะห์พื้นที่ผิวตอบสนองของสารประกอบฟีโนลิคจากใบสบู่ดำ

การวิเคราะห์พื้นที่ผิวตอบสนอง เป็นเทคนิคทางสถิติใช้ในการตรวจความสัมพันธ์ของตัวแปรที่สนใจ เพื่อหาสภาวะที่มีผลได้การสกัดสูงสุด ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ อุณหภูมิที่ 30 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเมทานอลที่ 0 25 50 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 5 7 9 และ 11 สมการที่ได้จากการประมาณพื้นที่ผิวตอบสนองด้วยความสัมพันธ์อันดับสองนั้น สามารถใช้หาค่าระดับของปัจจัยที่ให้ค่าผลตอบที่เหมาะสมที่สุด โดยการหาอนุพันธ์ย่อยเทียบกับค่าสัมประสิทธิ์แต่ละตัว หรือพิจารณาจากรูปพื้นที่ผิวตอบสนองและรูปโครงร่างที่สร้างขึ้นจากสมการการประมาณที่ได้

3.4.5 การศึกษาความคงตัวของสารสกัดใบสบู่ดำ

3.4.5.1 เก็บรักษาสารสกัดใบสบู่ดำที่ได้จากข้อ 3.3.4 ในขวดสีชาที่มีฝาปิด

3.4.5.2 นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีแสง เป็นเวลา 1 เดือน

3.4.5.3 วิเคราะห์หาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดแกลลิก คลอริลาจิน และกรดแอลลาจิก ในสารสกัดใบสบู่ดำในระหว่างการเก็บรักษา ด้วยเครื่อง HPLC

3.4.5.4 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารใบสบู่ดำ ด้วยวิธี modified original DPPH