

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

นำกระเจี๊ยบแดงแห้งจากร้านปียฟาร์มาซี สถานที่จำหน่ายยาแผนโบราณ จังหวัดกาญจนบุรี (22 พฤษภาคม 2554)

วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต

- 1) กระบอกตวง (Cylinder)
- 2) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 3) กรวยกรอง (Glass funnel)
- 4) Filtering Flask
- 5) กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 (Cat No 1001 090/China)
- 6) ขวดลีซ่า
- 7) ปิเปต (Pipette)
- 8) ขวดปริมาตร (Volumetric flask)
- 9) Aluminium Foil
- 10) เครื่องตีปั่น (House Worth/HW-9302)
- 11) เครื่องชั่งน้ำหนักความละเอียด 4 ตำแหน่ง (240A/Precisa/Switzerland)
- 12) บั้มสุญญากาศ (Vacuum pump) (ST. LOUIS/MO. U.S.A)
- 13) เครื่องกำเนิดคลื่นอุลตราโซนิก ปริมาตร 6 ลิตร (D-78224 Singen/Elma/

Germany)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางกายภาพ

เครื่องวัดค่าสี (NR-3000/Handy Colorimeter/Japan)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี

- 1) เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer (UV-1601/Shimadzu/Australia)
- 2) เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) (ASPIRATOP A-35

EYELA /Japan)

สารเคมี

- 1) เอทานอล 95% (Merck, Germany)
- 2) น้ำกลั่น
- 3) DPPH (2,2,-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich/Germany)

วิธีการ

ศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการสกัด (รักษิณา นิลวรรณ, 2547)

1) สกัดด้วยน้ำกลั่น

ตัวอย่างกระเจี๊ยบแดงแห้ง 20 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องตีปั่นเป็นเวลา 15 วินาที ไม่ควรโดนแสง เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 วัดปริมาณสารละลายทั้งหมดที่กรองได้

2) สกัดด้วยน้ำกลั่นผสมเอทานอล

a) อัตราส่วนน้ำกลั่นต่อเอทานอลความเข้มข้น 95% 3:1

ตัวอย่างกระเจี๊ยบแดงแห้ง 20 กรัมต่อน้ำกลั่นผสมเอทานอล 100 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องตีปั่นเป็นเวลา 15 วินาที ไม่ควรโดนแสง เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 วัดปริมาณสารละลายทั้งหมดที่กรองได้

b) อัตราส่วนน้ำกลั่นต่อเอทานอลความเข้มข้น 95% 1:1

ตัวอย่างกระเจี๊ยบแดงแห้ง 20 กรัมต่อน้ำกลั่นผสมเอทานอล 100 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องตีปั่นเป็นเวลา 15 วินาที ไม่ควรโดนแสง เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 วัดปริมาณสารละลายทั้งหมดที่กรองได้

3) สกัดด้วยเอทานอล

ตัวอย่างกระเจี๊ยบแดงแห้ง 20 กรัมต่อเอทานอล 100 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องตีปั่นเป็นเวลา 15 วินาที ไม่ควรโดนแสง เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 วัดปริมาณสารละลายทั้งหมดที่กรองได้

ศึกษาผลของอุลตราโซนิกอุณหภูมิ และเวลาต่อการสกัดแอนโทไซยานินจากกระเจียบแดง

นำผลการวิเคราะห์ค่าสีและปริมาณแอนโทไซยานินของตัวทำละลายต่อการสกัดที่ดีที่สุดมาทำการสกัดด้วยอุลตราโซนิกในสภาวะต่างๆดังนี้

- ระดับความถี่ (Ultrasonic Power) 40 kHz(40W x 4)
- เปอร์เซ็นต์อุลตราโซนิก 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์
- อุณหภูมิ 65, 75 และ 85 องศาเซลเซียส
- ระยะเวลา 60, 90 และ 120 นาที

วิเคราะห์ค่าสี

นำสารสกัดที่ได้มาวัดค่าสีโดยระบบ CIE LAB L^* a^* b^* ด้วยเครื่อง Handy Colorimeter

วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานิน (บุศรารัตน์ สายเชื้อ, 2545)

ปิเปตสารสกัดที่ได้ปริมาณ 8 มิลลิลิตรทำในบริเวณที่ไม่มีแสง ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นในช่วง 520 นาโนเมตร (Fuleki,T.&Francis, F.J., 1968) แล้วคำนวณปริมาณแอนโทไซยานินตามสูตร

$$T_{Acy} = O.D. \times DV \times \frac{100}{SV} \times \frac{TEV}{SW} \times \frac{1}{E_{1CM}^{1\%}/10}$$

โดยที่

T_{Acy}	คือ ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมแอนโทไซยานินต่อวัตถุดิบ 100 กรัม)
O.D.	คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากสารละลายสกัดที่เจือจางแล้ว
DV	คือ ปริมาตรของสารละลายสกัดที่ได้เจือจางแล้ว (มิลลิลิตร)
SV	คือ ปริมาตรของสารละลายสกัดที่เตรียมสำหรับเจือจาง (มิลลิลิตร)
TEV	คือ ปริมาตรทั้งหมดของสารละลายสกัดที่ได้ (มิลลิลิตร)
SW	คือ น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้สกัด (กรัม)
$E_{1CM}^{1\%}$	คือ ค่า Extinction coefficient ในที่นี้ใช้ค่า $E_{1CM}^{1\%}$ ของ Delphinidin-3-glucosideซึ่งมีค่าเท่ากับ 559

การวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Maisuthisakul *et al.*, 2008)

1) การเตรียมสารละลาย 2,2-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl (DPPH) ในเอทานอล

การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 6×10^{-5} โมล โดยนำ DPPH น้ำหนัก 2.4 มิลลิกรัม มาละลายในเอทานอล 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย 3 มิลลิลิตร ทดสอบดูการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ในเวลา 1 ชั่วโมง

2) การเตรียมสารตัวอย่างและการวิเคราะห์ 086-052-7297

นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอทานอลออก ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเอทานอลระเหยออกหมด นำมาเจือจาง 20 เท่าของสารสกัดเริ่มต้น ปิเปตสารสกัดมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้ครบ 10 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตร ใส่ในสารสกัด เก็บในที่มืด 15 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

038-512538 171

การคำนวณ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100$$

เมื่อ A_b = ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากการวางแผนการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ Response Surface Design (RSD) แบบ Box-Behnken Design โดยใช้โปรแกรม Minitab Version 16 ซึ่งกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาดังตารางที่ 4 ทำให้ได้การทดลองทั้งหมด 13 Design Point ประกอบด้วยจุดกึ่งกลาง (Center Point) จำนวน 1 จุดและ Factorial Point จำนวน 12 จุด

ตารางที่ 3.1 ช่วงของระดับทั้ง 3 ปัจจัยที่ทำการทดลอง

ปัจจัย	สัญลักษณ์	รหัสของปัจจัย		
		-1	0	1
เปอร์เซ็นต์อุลตราโซนิก	X1	60	80	100
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	X2	65	75	85
เวลา (นาที)	X3	60	90	120

จากการทดลองแบบ Response Surface Design (RSD) สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของตัวแปรอิสระที่ศึกษา (Dependent Variable) คือ เปอร์เซ็นต์อุณหภูมิ และเวลาในการสกัดแอนโทไซยานินจากกระเจี๊ยบแดง ดังสมการ

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

โดยที่ Y คือปริมาณแอนโทไซยานิน x_1 คือ กำลังของคลื่นอุลตราโซนิก x_2 คือ อุณหภูมิ x_3 คือ เวลา ในขณะที่ β คือค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression Coefficients)