

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุดิบ

3.1.1 เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน

- เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานได้รับความอนุเคราะห์จากร้านขายน้ำส้มคั้นที่
ต.คลองหก อ.คลองหลวง จ. ปทุมธานี โดยเก็บตัวอย่างในเดือนพฤษภาคม 2546

3.1.2 สารเคมี

- บีโตรเลียมอีเธอร์	BHD	อังกฤษ
- เอทานอล 95%	องค์การสุรากรมสรรพสามิต	ไทย
- เมทานอล	Merck	เยอรมันนี
- คลอโรฟอร์ม	Lab scan analytical science	ไทย
- เอธิลอะซีเตต	Merck	เยอรมันนี
- อะซีโตรไนไตรท์	Merck	เยอรมันนี
- โซเดียมคาร์บอเนต	Merck	เยอรมันนี
- โพลินรีเอเจนต์	Merck	เยอรมันนี
- กรดแกลลิก	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
- ABTS (2,2 – azino-di (3– ethylbenzthiazoline sulfonate))	Sigma	สหรัฐอเมริกา
- DPPH (1,1-Diphenyl-2-phenylhydrazyl)	Sigma	สหรัฐอเมริกา
- Na ₂ HPO ₄	Merck	เยอรมันนี
- NaH ₂ PO ₄	Merck	เยอรมันนี
- โซเดียมคลอไรด์	Merck	เยอรมันนี
- ไมโอโกลบิน	Sigma	สหรัฐอเมริกา
- โพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
- กรดแอสคอร์บิก	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
- ไทรอกซ์	Merck	เยอรมันนี

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 อุปกรณ์ในการเตรียมวัตถุดิบ

- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) Memmert 854 Schwabach เยอรมันนี
- ถาดอะลูมิเนียม

3.2.2 อุปกรณ์ในการเตรียมการสกัด

- เครื่องบดละเอียด Blender and grinder SharpEM-11 ไทย
- เครื่องสกัดไขมัน Soxhlet apparatus BUCHI 810 สวิตเซอร์แลนด์
- เตาหลุมให้ความร้อน Electro thermal EME6 0500/CE อังกฤษ
- เครื่องทำความเย็น Cooling รุ่น CBD1 ไทย
- เครื่องระเหยสุญญากาศ Rotavapor BUCHI R-114 สวิตเซอร์แลนด์
- ปัมสุญญากาศ Vacuum system BUCHI B-169 สวิตเซอร์แลนด์
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ Water bath BUCHI B-480 สวิตเซอร์แลนด์
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด Metter AE 3000 สวิตเซอร์แลนด์
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง UNTOP 200 SL VIRTIS สหรัฐอเมริกา

3.2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลทางเคมี

- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Spectrophotometer 22 สหรัฐอเมริกา
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) Memmert 854 Schwabach เยอรมันนี
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ Water bath BUCHI B-480 สวิตเซอร์แลนด์

3.3 สถานที่ดำเนินงาน

- โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตพระนครใต้

3.4 วิธีดำเนินงาน

3.4.1 การเตรียมเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานอบแห้ง

นำเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน มาล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำไปตากแดด 6 ชั่วโมง (ช่วงเวลา 10.00 - 16.00 น.) จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียสจนมีความชื้นสุดท้ายต่ำกว่าร้อยละ 5 แล้วเก็บตัวอย่างแห้งใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ - 15 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดเพื่อเลือกอุณหภูมิเหมาะสมในการอบแห้งวัตถุดิบตามวิธีข้อ 3.4.2 โดยใช้เอธานอลและน้ำกลั่นเป็นตัวสกัด

3.4.2 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

นำเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด แล้วนำไปสกัดไขมันออกโดยใช้เครื่อง Soxhlet และใช้ ปิโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) เป็นตัวสกัด ใช้เวลาในการสกัด 2 ชั่วโมง จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกจากตัวอย่างเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน โดยตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 30 นาที

ซึ่งเปลือกและเมล็ดส้มบดละเอียดที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว 10 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัดชนิดต่างกัน 7 ชนิด คือน้ำกลั่น, เอธานอล, เมธานอล, อะซีโตน, อะซีโตรไนไตรท์, คลอโรฟอร์ม และเอธิลอะซีเตต ปริมาตร 100 มิลลิลิตร สกัดโดยการรีฟลักซ์นาน 1 ชั่วโมง กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 โดยใช้กรวยบุชเนอร์ นำไประเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ระบบสุญญากาศ โดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนตัวทำละลายที่เป็นน้ำจะใช้วิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดที่ได้และเก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดที่ได้จากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 7 ชนิดจะใช้วิธีที่คิดแปลงจากวิธีของ Alonso และคณะ (2002) ซึ่งมีหลักการดังนี้ คือสารประกอบโพลีฟีนอลจะทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu ให้สารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำเงิน ดังนั้น การหาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ สามารถทำได้โดยการวัดปริมาณของสารประกอบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร และใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารประกอบฟีนอลิกมาตรฐาน

3.4.3.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ชั่งกรดแกลลิกมา 0.02 กรัมละลายในเอธานอล 95% แล้วปรับปริมาตรด้วยเอธานอล 95% ให้ครบ 50 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายกรดแกลลิกที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40, และ 0.50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตรซึ่งในแต่ละหลอดทดลองจะมีปริมาณกรดแกลลิกอยู่เท่ากับ 0, 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัม ตามลำดับ

นำหลอดทดลองทั้งหมดมาเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 10 % ลงไป 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวกับปริมาณกรดแกลลิกเป็นไมโครกรัม

3.4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลในตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน

ชั่งสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 7 ชนิด มาตัวอย่างละ 0.1 กรัม จากนั้นละลายในเอธานอล 95% ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยเอธานอล 95% สำหรับสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจะละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเก็บสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ไว้ในขวดสีชา

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้มาตัวอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น 9.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 10% ลงไป 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ส่วน Blank เตรียมได้โดยใช้เอธานอล 95% 0.5 มิลลิลิตร หรือน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรแทนตัวอย่างสารสกัดแล้วแต่กรณี

3.4.4 การศึกษาสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน

3.4.4.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน

ซึ่งสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 7 ชนิด มาตัวอย่างละ 0.1 กรัม จากนั้นละลายในเอทานอล 95% แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยเอทานอล 95% สำหรับสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มที่สกัดด้วยน้ำกลั่นจะละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเก็บสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ไว้ในขวดสีชา จะได้สารละลายของสารสกัด สำหรับใช้ตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

3.4.4.2 การเตรียมสารละลายของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน

ซึ่งโทรอกซ์ วิตามินซี และโพรพิลแกลเลต (propyl gallate) ซึ่งใช้เป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานอย่างละ 0.1 กรัม แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร โดยใช้เอทานอล 95% เป็นตัวทำละลาย สำหรับวิตามินซีจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย จากนั้นเก็บสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ไว้ในขวดสีชา จะได้สารละลายของสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐานสำหรับใช้ตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

3.4.4.3 การตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานโดยใช้อนุมูลอิสระ ABTS^{•+}

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน จะอาศัยการติดตามความสามารถของตัวอย่างสารสกัดในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระของ 2,2 – azino-di (3-ethylbenzthiazoline sulfonate) หรือ ABTS^{•+} ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ ที่ทำให้สารละลายมีสีน้ำเงินแกมเขียวและสามารถดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร ดังนั้น ถ้าสารตัวอย่างมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระดังกล่าวได้ดี จะทำให้อัตราการเกิดสีน้ำเงินแกมเขียวของสารละลายปฏิกิริยาช้า ซึ่งแสดงว่าสารนั้นมีสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี (Landrault *et al.* 2001) โดยจะเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน 3 ชนิด คือ โพรพิลแกลเลต , วิตามินซี และโทรอกซ์

เตรียมสารละลายปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากับ 9.58 มิลลิลิตร โดยปิเปตสารละลายต่าง ๆ ต่อไปนี้ ใส่หลอดทดลอง คือสารละลาย ABTS (2,2- azino-di (3-ethylbenzthi- azoline sulfonate)) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ 0.8 มิลลิลิตร, สารละลายไมโอโกลบิน (myoglobin) ความเข้มข้น 0.188 % 1.44 มิลลิลิตร, สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 6.2 มิลลิลิตร, สารละลายของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานความเข้มข้น 10 % (ข้อ 3.4.4.1) 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจน

เปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 0.96 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer พร้อมกับจับเวลาทันที ถ่ายสารละลายปฏิกิริยาใส่คิวเวต (cuvette) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร อ่านผลทุกๆ 30 วินาทีเป็นเวลา 20 นาที นำข้อมูลผลการทดลองที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรกับเวลาในการเกิดปฏิกิริยา

สำหรับปฏิกิริยาควบคุม (control) จะใช้เอทานอล 95% หรือน้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตรแล้วแต่กรณีแทนสารละลายตัวอย่างสารสกัด และหลอดที่เป็น Blank จะเตรียมเหมือนปฏิกิริยาควบคุมแต่เติมสารละลายสารละลาย PBS ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 0.96 มิลลิลิตรลงไปแทนสารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.4.4.4 การตรวจวัดสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานโดยใช้อินดิเคเตอร์ DPPH

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานโดยวิธีนี้จะอาศัยการติดตามความสามารถของตัวอย่างสารสกัดในการทำลายอนุมูลอิสระของ DPPH ซึ่ง เป็นอนุมูลอิสระที่ทำให้สารละลายมีสีม่วงและสามารถดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (Parejo *et al.*, 2002) โดยจะเปรียบเทียบกับสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมาตรฐาน 3 ชนิด คือ โพรพิลแกลเลต , วิตามินซี และโทรอกซ์

เตรียมสารละลายปฏิกิริยาที่มีปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากับ 6 มิลลิลิตร โดยเปิดสารละลายต่าง ๆ ต่อไปนี้ใส่หลอดทดลอง คือ สารละลาย DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.188% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรใน 95 % เอทานอล 0.72 มิลลิลิตร, สารละลายของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานความเข้มข้น 10 % (ข้อ 3.4.4.1) 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 40 % เอทานอล 5.18 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer พร้อมกับจับเวลาทันที เมื่อครบ 30 นาทีแล้วถ่ายสารละลายปฏิกิริยาใส่คิวเวต นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร

สำหรับปฏิกิริยาควบคุม (control) จะใช้เอทานอล 95% และน้ำกลั่น 0.1 มิลลิลิตรแทนสารละลายตัวอย่างสารสกัด และหลอดที่เป็น Blank จะเตรียมเหมือนปฏิกิริยาควบคุมแต่เติม 95 %เอทานอล 0.72 มิลลิลิตร ลงไปแทนสารละลาย DPPH

3.4.5 การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานเมื่อกำหนดให้ปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลเท่า ๆ กัน

โดยนำสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวาน มาศึกษาความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดในรูปของปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดเท่า ๆ กันคืออยู่ในช่วง 30 – 40 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด โดยใช้วิธีทดสอบอนุมูลอิสระ DPPH ตามการทดลองในข้อ 3.4.4.4