บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

ผลมะระขี้นกซื้อมาจากร้านขายผักป้าแฉล้ม ตลาดหนองมน ตำบลแสนสุข จังหวัดชลบุรี จำนวน 10 กิโลกรัม ในช่วงเดือน ตุลาคม-พฤศจิกายน พ.ศ. 2551

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) (1350 FX, Shel Lab, United States of America)
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) (AT 110, Jouan S/N, Denmark)
3. เครื่องเขย่าแบบแผ่นเรียบ (Platform Shaker) (Innova 2050, New Brunswick Scientific, United States of America)
4. เครื่องบดลดขนาด (Blender) (SS110 Pulverizer, Waring Commercial, United States of America)
5. ตู้แช่แข็ง (Deep Freezer) (MDF-U33V, Sanyo, Japan)
6. เครื่องทำแห้งแบบระเหิด (Freeze Dryer) (FD-3-85A-MP, FTS Flexi-Dry MP, United States of America)
7. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Genesys 5, Spectronic Intrument, United States of America)
8. เครื่องอัลตร้าโซนิค (Ultrasonic Cleaner) (275T, TRU-Sweep, New York)
9. เครื่องผสมสารแบบเขย่า (Vortex Mixer) (REAX 2000, Heidolph, Germany)
10. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (AC211S, Sartorius AG Göttingen, Germany)
11. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AC211S-00MS, Sartorius AG Göttingen, Germany)
12. เครื่องวัดค่าสี (Handy Colorimeter) (Model BYK, Germany)
13. เครื่องทำแห้งแบบสุญญากาศความเร็วสูง (Speed Vacuum) (SC 110, Savant, Switzerland)
14. เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) (Labo Rota S 320, Resona Technics, Switzerland)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

15. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Z323K, Benchtop Eentrifuge, Germany)

16. หลอดปั่นเหวี่ยงชนิดฝาเกลียว ขนาด 50 มิลลิลิตร (Centrifuge Tubes) (CE 03931, Timster, UK)

17. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (High-Performance Liquid Chromatography; HPLC) (HP 1100, Agilent, United States of America)

18. กระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 (Whatman No. 1) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร (Schleicher & Schuell, Germany)

19. แผ่นกรองแบบเข็มฉีด (PVDF Target Syringe Filter) ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร (National Scientific, United States of America)

20. คอลัมน์แยกสาร HPLC ชนิด Reversed Phase ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ความยาว 4.6x250 มิลลิเมตร (Column Sunfire, Waters, United States of America)

21. การ์ดคอลัมน์ HPLC ขนาดอนุภาค 5 ไมโครเมตร ความยาว 4.6x20 มิลลิเมตร (Column Sunfrie Guard, Waters, United States of America)

22. การ์ดโฮลเดอร์ HPLC ขนาดความยาว 3.9x20 มิลลิเมตร (Guard Holder Universal, Waters, United States of America)

23. ใยแก้ว (Glass Wool)

24. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer) อุณหภูมิ 0-100 องศาเซลเซียส

25. โถดูดความชื้น (Desiccator)

26. นาฬิกาจับเวลา

27. ออโต้ปิเปต (Auto pipette) ขนาด 20 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

28. ปิเปต ชนิดมีสเกล (Graduate Pipette) ขนาด 10 มิลลิลิตร

29. ปิเปต ชนิดมอห์ร (Mohr Pipette) ขนาด 1 2 3 5 7 และ 10 มิลลิลิตร

30. คิวเวตต์ ชนิดควอทซ์ ขนาดช่องแสงผ่าน 10 มิลลิเมตร

31. คิวเวตต์คอรูปตัววาย ชนิดพลาสติก ขนาดช่องแสงผ่าน 10 มิลลิเมตร

32. ถุงพลาสติกโพลีเอทธีลีน ชนิดความหนาแน่นต่ำ ขนาด 18 × 20.5 เซนติเมตร

33. เครื่องแก้วสำหรับใช้ในงานปริมาณวิเคราะห์ เช่น หลอดทดลอง ขวดปรับปริมาตร สีชา บีกเกอร์ ขวดรูปกรวย ขวดปรับปริมาตร กระบอกตวง กระจกนาฬิกา ถ้วยกระเบื้อง เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารเคมี

1. เมทานอลบริสุทธิ์ (Absolute methanol; CH_3OH) (AR Grade, Purity = 99.8 %, Merck, Germany)

2. ฟอลิน ซิโอแคลตู รีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu Reagent) (Carlo Erba Reactifs SA, France)

3. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate anhydrous; Na_2CO_3) (Ajax Finechem, New Zealand)

4. กรดแกลลิก (Gallic acid; $C_7H_6O_5$) (HPLC Grade, Purity = 98 %, Fluka, Switzerland)

5. ดีพีพีเอช (DPPH; 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; $C_{18}H_{12}N_5O_6$) (AR Grade, Purity = 97 %, Fluka, Germany)

6. โทรล็อกซ์ (Trolox™; 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-carboxylate ; $C_{14}H_{18}O_4$ (HPLC Grade, Purity = 98 %, Fluka, Germany)

7. เอบีทีเอส (ABTS; 2, 2-Azinobis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$) (HPLC Grade, Purity = 99 %, Fluka, Germany)

8. โปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulphate; $K_2S_2O_8$) (AR Grade, Mallinckrodt, New York)

9. อะซิโตน (Acetone; CH_3OH) (AR Grade, Purity = 80 %, Merck, Germany)

10. คาเตชิน (Catechin Hydrate) (HPLC Grade, Purity = 96 %, Fluka, Switzerland)

11. กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acid hemihydrate) (HPLC Grade, Purity = 98 %, Aldrich Chemistry, India)

12. กรดคาเฟอิก (Caffeic acid) (HPLC Grade, Purity = 95 %, Fluka, China)

13. น้ำ (Water, HPLC Grade, Lab-Scan Analytical Sciences, Thailand)

14. กรดอะซิติก (Glacial acetic acid; CH_3COOH) (AR Grade, Purity = 99.7 %, Lab-Scan Analytical Sciences, Thailand)

15. อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile; CH_3CN) (HPLC Grade, Purity = 99 %, Analytical Sciences, Thailand)

16. ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane; CH_2Cl_2), HPLC Grade, Purity = 99.8 %, Hipersolv, England)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

17. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulphate anhydrous; Na_2SO_4) (AR Grade, Ajax Finechem, New Zealand)

18. เทอร์ทีเรียบูทิลไฮโดรควิโนน (TBHQ; tertiary Butyl hydroquinone; $C_{10}H_{14}O_2$) (AR Grade, Fluka, Switzerland)

19. เอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate; $CH_3COOC_2H_5$) (AR Grade, RCI Labscan, Thailand)

20. ก๊าซไนโตรเจน (Nitrogen Gas; N_2) (Industrial Grade, Purity = 99.99 %, Thai Industrial Gas, Thailand)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

ผลมะระขี้นกสดซื้อมาจากร้านขายผักป้าแฉล้ม ตำบลแสนสุข จังหวัดชลบุรี (ในช่วงเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2551) และนำมาเก็บในตู้เย็น(อุณหภูมิ 8±1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อทำวิจัยในวันต่อมา จากนั้นล้างผลมะระขี้นกด้วยน้ำประปา 1 ครั้ง เพื่อนำสิ่งสกปรกออก และล้างผลมะระขี้นกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อล้างสารเคมีตกค้างที่ได้จากน้ำประปาออก แล้วผึ่งให้แห้ง คัดแยกผลมะระขี้นกที่มีผลสุก (ภาพที่ 3-1) และผลมะระขี้นกที่มีลักษณะของตำหนิและการเน่าเสียที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงดัง ก่อนคัดผลมะระขี้นกที่มีขนาดความยาว 5-9 เซนติเมตร (ภาพที่ 3-2)

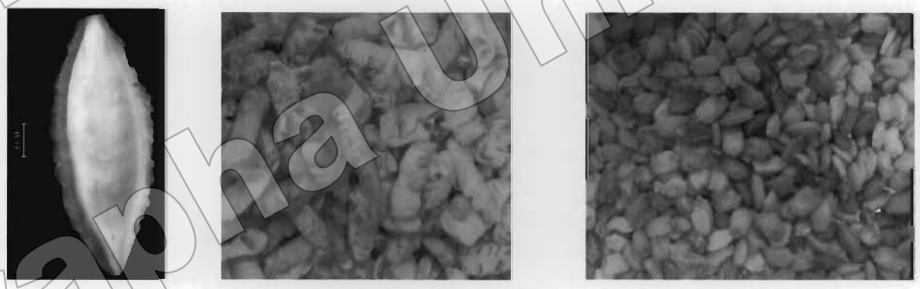
(ก)

ภาพที่ 3-1 ลักษณะปรากฏของผลมะระขี้นกสุก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 3-2 ผลมะระขี้นกที่มีขนาดความยาว 5-9 เซนติเมตร

ผ่าผลมะระขี้นก ออกเป็น 2 ซีก เพื่อแยกส่วนของเนื้อผลมะระขี้นก เยื่อภายใน และเมล็ด (ภาพที่ 3-3) ชั่งน้ำหนักบันทึกค่าที่ได้ เพื่อคำนวณผลผลิตที่ได้ (เปอร์เซ็นต์) จากนั้นตัดแบ่งเป็น 6 ชิ้น ต่อมะระขี้นก 1 ซีก ชิ้นละ 1x1 เซนติเมตร (ภาพที่ 3-4) นำมาหาค่าความชื้นตามวิธี AOAC Method 925.10 (1990) (รายละเอียดแสดงดังภาคผนวก ก-1)



(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 3-3 ผลมะระขี้นกที่ผ่านการแยกส่วน (ก) เนื้อผลมะระขี้นก (ข) เยื่อภายใน และ (ค) เมล็ด

ภาพที่ 3-4 ขนาดการตัดแบ่งชิ้นของเนื้อผลมะระขี้นก 1x1 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด ในส่วนต่าง ๆ ของผลมะระขี้นก

2.1 การเตรียมผงมะระขี้นก

นำมะระขี้นกที่ผ่านการตัดแบ่งแล้ว ชั่งน้ำหนัก และ เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -64±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเข้าเครื่องทำแห้งแบบระเหิด ที่อุณหภูมิ -52±2 องศาเซลเซียส จนเหลือความดันของเครื่องทำแห้งแบบระเหิดที่ 230 มิลลิปรอท (ประมาณ 72 ชั่วโมง) จากนั้นบดส่วนของเนื้อ เยื่อหุ้ม และ เมล็ดของผลมะระขี้นก ให้ละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องบดลดขนาด Waring Commercial บรรจุผงส่วนของเนื้อ เยื่อหุ้ม และ เมล็ดของผลมะระขี้นกที่ได้ใส่ถุงโพลีเอทธีลีนปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 0±2 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์ (Horax et al., 2005)

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดในส่วนต่าง ๆ ของผลมะระขี้นก

ตัวแปรที่ศึกษา คือ ส่วนต่าง ๆ ของผลมะระขี้นก ได้แก่ เนื้อผลมะระขี้นก เยื่อภายใน และ เมล็ด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Dancan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด ซึ่งดัดแปลงจาก ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และวันทนีย์ ช้างน้อย (2545); Deepa et al. (2005) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.2.1 การสกัดสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดจากส่วนต่าง ๆ ของผลมะระขี้นกเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด

ชั่งผงมะระขี้นก จำนวน 100 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 25 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) บันทึกน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากนั้นปิเปตสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดตัวอย่างแต่ละหลอด ชั่งน้ำหนักหลอดตัวอย่างแต่ละหลอดด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักหลอดตัวอย่าง วางหลอดตัวอย่างใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักหลอดตัวอย่างแต่ละขวดด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่งอีกครั้ง บันทึกน้ำหนักหลอดตัวอย่าง และคำนวณน้ำหนักที่ลดลงของแต่ละหลอด (โดยปกติในระหว่างการสกัดมีการระเหยของของเหลวบ้าง และ มีค่าประมาณ 0.2 กรัม ถ้ามีน้ำหนักที่ลดลงมากกว่า 0.5 กรัม ให้ปรับให้มีน้ำหนักที่เท่าเดิม โดยค่อย ๆ หยดสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดตัวอย่าง แยกส่วนใสของของผสมใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร โดยการกรอง

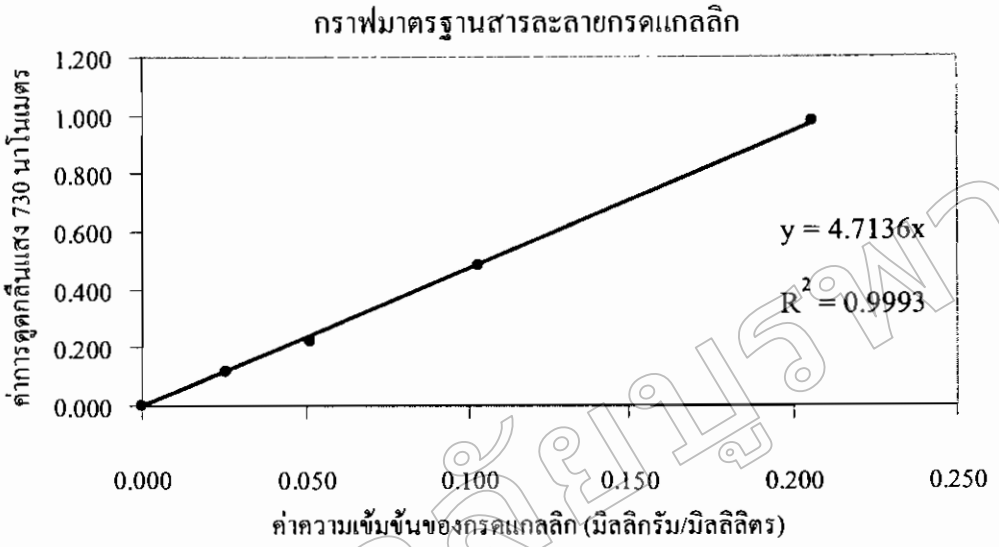
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ปิดฝาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8±1 องศาเซลเซียส รอการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด

2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดจากส่วนต่าง ๆ ของผลมะระขี้นก

ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 20 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เติมสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และโฟลิน ซิโอแคลทู รีเอเจนต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารแบบเขย่า วางหลอดตัวอย่างในตะแกรงวางหลอด จับเวลา 5 นาที (สังเกตสีของสารละลายมีสีเขียวใส) เมื่อครบเวลา ปิเปตสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์ (วิธีการเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต แสดงดังภาคผนวก ข-1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารแบบเขย่า วางหลอดตัวอย่างในตะแกรงวางหลอด จับเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (สังเกตสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน ความเข้มของสีน้ำเงินแสดงถึงปริมาณของสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุม คือ สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง (ค่าปกติของหลอดควบคุม คือ ประมาณ 0.01) และ คำนวณปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดในรูปของ GAE (Gallic acid equivalent) จากกราฟมาตรฐานของสารละลายแกลลิก (ที่ละลายในสารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์) (วิธีการเตรียมสารมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงดังภาคผนวก ข-2 และ ข-3 และการสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมดในสารสกัดจากเนื้อมะระขี้นกแสดงดังภาพที่ 3-5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3-5 กราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิกสำหรับคำนวณปริมาณประกอบสารฟีโนลิกทั้งหมดในรูปของ GAE (Gallic acid equivalent)

3. การศึกษาฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผลมะระขี้นก

3.1 การทดสอบการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH• (Scavenging of the Stable Radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl-DPPH• Assay)

วิธีทดสอบการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH• ดัดแปลงจาก Wu and Teik Ng (2007) ดังนี้

3.1.1 การเตรียมสารสกัดจากส่วนต่างๆของผลมะระขี้นก (Horax, Hettiarachchy,& Islam, 2005)

- ผสมผงมะระขี้นกในอัตราส่วน 1:50 กรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองนี้ใช้ผงมะระขี้นก จำนวน 100 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ในขวดรูปกรวยขนาด 125 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) บันทึกน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากนั้นปิเปตสารละลายเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดตัวอย่างแต่ละขวด (ใช้ปิเปตชนิดมอห์ร) ชั่งน้ำหนักขวดตัวอย่างแต่ละขวดด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักขวดตัวอย่าง ปิดปากขวดด้วยฟิล์มยืด วางบนเครื่องเขย่าปรับให้มีรอบของการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที กำหนดเวลาในการสกัดเป็น 6 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) กรองแยกของเหลว และ ของแข็งด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 แล้วทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนที่อุณหภูมิ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

60 องศาเซลเซียส ความดัน 100 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 12 นาที นำไปทำให้แห้งโดยการใช้เครื่องทำแห้งแบบสุญญากาศความเร็วสูง เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำผงมะระขี้นกที่ได้ชั่งน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายเมทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -4±2 องศาเซลเซียส เกณฑ์ในการตัดสินจากการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากผลมะระขี้นก คือ ปริมาณผลผลิตที่สกัดได้ (% yield) ดังภาคผนวก ก-2

3.1.2 การวิเคราะห์การจับกับอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$

ปิเปตสารละลาย DPPH (วิธีการเตรียมสารละลาย DPPH แสดงดังภาคผนวก ข-4) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร เก็บในที่มืด จากนั้นปิเปตสารสกัดจากมะระขี้นกที่ได้จากข้อ 3.1.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลาย DPPH (ทำ 3 ซ้ำ) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารแบบเขย่าเป็นเวลาประมาณ 3 วินาที เก็บในที่มืดเป็นเวลา 4 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้หลอดควบคุม คือ สารละลายเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างสารสกัด คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การจับกับอนุมูล DPPH จากสูตร (Kumaran & Karunakaran, 2006)

$$\text{การจับอนุมูล DPPH}^{\bullet}\ (\text{เปอร์เซ็นต์}) = [(A_0-A_1)/A_0 \times 100]$$

เมื่อ A_0 และ A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม และสารสกัด ตามลำดับ ที่เวลา 30 นาที

3.2 การวิเคราะห์การจับกับอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet+}$ (Scavenging of radical cation 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)

วิธีการวิเคราะห์นี้ดัดแปลงจาก Saura-Calixto and Goñi (2006); Dorman and Hiltunen (2004) และ Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yung, and Rice-Evans (1999) ปิเปตสารละลาย ABTS ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร ที่มีโปแตสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ ABTS เปลี่ยนเป็น ABTS$^{\bullet+}$ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เพื่อปรับให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.700 (±0.030) ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมสารสกัดมะระขี้นกจากข้อ 3.1.1 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมลงในสารละลาย ABTS$^{\bullet+}$ ปริมาตร 1.485 มิลลิลิตร ให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารแบบเขย่าในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 3 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เป็นเวลา 15 นาที คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การจับกับอนุมูล ABTS จากสูตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การจับอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ (เปอร์เซ็นต์) = $100 \times [A_0-A_1]/A_0$

เมื่อ A_0 และ A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม และสารสกัด ตามลำดับ ที่เวลา 15 นาที

4. การศึกษาผลของการให้ความร้อนด่อชนิด และ ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด และการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ จากส่วนของเนื้อผลมะระขี้นก

4.1 การเตรียมส่วนของเนื้อผลมะระขี้นก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) ตัวแปรที่ศึกษา คือ ภายหลังการให้ความร้อนเนื้อผลมะระขี้นกในวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ การให้ความร้อนโดยการนึ่ง การให้ความร้อนโดยการลวก การให้ความร้อนโดยการต้ม และ การให้ความร้อนโดยการอบไอน้ำภายใต้ความดัน ภายหลังการทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบถาด และการทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบระเหิด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกทั้งหมด (จากข้อ 2.2-2.3) การกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ (จากข้อ 3.1) และ $ABTS^{\bullet+}$ (จากข้อ 3.2) มีรายละเอียดการให้ความร้อนดังต่อไปนี้

4.1.1 การให้ความร้อนโดยการนึ่ง

การให้ความร้อนโดยการนึ่ง ใช้ผ้าขาวบางรองหม้อนึ่งก่อนแล้ววางเนื้อผลมะระขี้นกที่ผ่านการตัดแบ่ง (ข้อมูลแสดงดังหน้าที่ 34) ให้ความร้อนโดยการนึ่งเนื้อผลมะระขี้นกที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ 0-200 องศาเซลเซียส ในการตรวจวัดอุณหภูมิเป็นเวลา 4 นาที (ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส) ในน้ำ 6 ลิตร ต่อเนื้อผลมะระขี้นก 500 กรัม จากนั้นใส่ลงในน้ำที่อุณหภูมิ 0±2 องศาเซลเซียส ทันทีเพื่อยับยั้งการเปลี่ยนสีของเนื้อผลมะระขี้นก

4.1.2 การให้ความร้อนโดยการลวก

การให้ความร้อนเนื้อผลมะระขี้นกโดยการลวก นำส่วนของเนื้อผลมะระขี้นกที่ผ่านการตัดแบ่ง (ข้อมูลแสดงดังหน้าที่ 34) ลวกเนื้อผลมะระขี้นกที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ 0-200 องศาเซลเซียส ในการตรวจวัดอุณหภูมิเป็นเวลา 4 นาที (ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส) ในน้ำ 6 ลิตร ต่อเนื้อผลมะระขี้นก 500 กรัม จากนั้นใส่ลงในน้ำที่อุณหภูมิ 0±2 องศาเซลเซียส ทันที เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อยับยั้งการเปลี่ยนสีของเนื้อผล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

มะระขี้นก จากนั้นนำเนื้อผลมะระขี้นกมาสะเด็ดน้ำให้แห้งโดยวางบนตะแกรงที่มีความถี่ของรูตะแกรงขนาด 1x1 เซนติเมตร

4.1.3 การให้ความร้อนโดยการต้ม

การให้ความร้อนเนื้อผลมะระขี้นกโดยการต้ม นำส่วนของเนื้อผลมะระขี้นกที่ผ่านการตัดแบ่ง (ข้อมูลแสดงดังหน้าที่ 34) ต้มเนื้อผลมะระขี้นกที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ 0-200 องศาเซลเซียส ในการตรวจวัดอุณหภูมิเป็นเวลา 30 นาที ในน้ำ 6 ลิตร ต่อเนื้อผลมะระขี้นก 500 กรัม

4.1.4 การให้ความร้อนโดยการอบไอน้ำภายใต้ความดัน

นำเนื้อผลมะระขี้นกที่ผ่านการตัดแบ่ง (ข้อมูลแสดงดังหน้าที่ 34) จำนวน 50 กรัม บรรจุใส่ขวดทรงสูงที่มีฝาปิดสนิทขนาด 250 มิลลิลิตร ที่สามารถทนความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำได้ จากนั้นใส่น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 ของเนื้อผลมะระขี้นก แล้วนำขวดที่ผ่านการบรรจุเนื้อผลมะระขี้นกแล้วไปให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดทำเย็นทันทีโดยใช้น้ำเย็นที่อุณหภูมิ 0±2 องศาเซลเซียส จากนั้นเปิดขวดเพื่อนำเนื้อผลมะระขี้นกมาทำการวิเคราะห์ต่อไป

นำตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วทั้งหมดเข้าเครื่องทำแห้งแบบถาด ที่อุณหภูมิ 60±2 องศาเซลเซียส จนเนื้อผลมะระขี้นกมีความชื้นสุดท้ายเหลือ 5.42 เปอร์เซ็นต์ (ประมาณ 12 ชั่วโมง) เปรียบเทียบกับการนำเข้าเครื่องทำแห้งแบบระเหิด ที่อุณหภูมิ -52±2 องศาเซลเซียส จนเหลือความดันของเครื่องทำแห้งแบบระเหิดที่ 230 มิลลิปรอท (ประมาณ 72 ชั่วโมง) แล้วบดเนื้อมะระขี้นกให้ละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องบดลดขนาด Waring Commercial บรรจุผงมะระขี้นก ที่ได้ใส่ถุงโพลีเอทธีลีนปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 0±2 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาวิเคราะห์ ใช้ตัวอย่างเนื้อผลมะระขี้นกที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนเป็นตัวควบคุม และวิเคราะห์ค่าสีของผลมะระขี้นกที่ผ่านการให้ความร้อนดังวิธีที่กล่าวมาข้างต้น ใช้เครื่องวัดค่าสี (Colorimeter) โดยนำผงมะระขี้นกใส่ลงในถาดใส่ตัวอย่างปริมาตร 2 ต่อ 3 ส่วนของถาดใส่ตัวอย่าง จากนั้นเกลี่ยหน้าผงมะระขี้นกให้เรียบก่อนการวิเคราะห์ และทำการวิเคราะห์ จดบันทึกค่า L*a*b* จากนั้นคำนวณค่า ΔE จากสูตร (Bolívar, Casals, Byrne, Okie, & Cisneros-Zevallos, 2006)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

$$\Delta E = \sqrt{(L^*_2-L^*_1)^2+(a^*_2-a^*_1)^2+(b^*_2-b^*_1)^2}$$

โดยที่ L^*_1 = ค่าความสว่างของตัวควบคุม, L^*_2 = ค่าความสว่างของตัวอย่าง

a^*_1 = ค่าความเป็นสีแดงของตัวควบคุม, a^*_2 = ค่าความเป็นสีแดงของตัวอย่าง

b^*_1 = ค่าความเป็นสีน้ำเงินของตัวควบคุม, b^*_2 = ค่าความเป็นสีน้ำเงินของตัวอย่าง

วิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) เอ และบี ซึ่งดัดแปลงจาก Arnon (1949) โดยชั่งผงมะระขี้นกจำนวน 0.09 ± 0.003 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บันทึกน้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ จากนั้นปิเปตสารละลายอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดตัวอย่างแต่ละหลอด และหุ้มหลอดทดลองด้วยกระดาษฟลอยด์ เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ 4±0.2 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงแยกส่วนใสของของผสมโดยการกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 663 และ 645 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้หลอดควบคุม คือ สารละลายอะซิโตน 80 เปอร์เซ็นต์ แทนสารละลายตัวอย่าง จากนั้นคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์เอ และบี จากสูตร

คลอโรฟิลล์ เอ (C_a; มิลลิกรัม ต่อกรัม) = $12.70(OD_{663}) - 2.69(OD_{645})$

คลอโรฟิลล์ บี (C_b; มิลลิกรัม ต่อกรัม) = $22.90(OD_{645}) - 4.68(OD_{663})$

เมื่อ OD_{663} และ OD_{645} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

4.2 ศึกษาชนิดของกรดฟีโนลิกในสารสกัดจากส่วนของเนื้อผลมะระขี้นก

วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kubola and Siriamornpun (2008)

4.2.1 การเตรียมส่วนสกัดเมทานอล

นำผงมะระขี้นกที่ได้จากการทำแห้ง ปริมาณ 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวที่มีสารผสมเมทานอล และกรดไฮโดรคลอริก (อัตราส่วน 100:1 ปริมาตรต่อปริมาตร) รวมกับ TBHQ ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดจากผงมะระขี้นกในสภาวะที่มีก๊าซไนโตรเจน (N_2 Inert Atmosphere) ในที่มืดเป็นเวลา 720 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่อยๆริน เพื่อแยกของเหลวใสใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว แล้วนำสารสกัดเมทานอลที่ได้มาทำให้แห้ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน ที่ความดัน 200 มิลลิปรอท อุณหภูมิ 40 ± 3 องศาเซลเซียส จนสารสกัดจากผงมะระขี้นกมีลักษณะข้นหนืด จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้มาสกัดต่อจำนวน 2 ครั้ง โดยใช้ไดคลอโรมีเทนปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสกัดต่อ 4 ครั้ง โดยใช้เอทิลอะซิเตท ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ดูดความชื้นสารสกัดที่ได้โดยการกรองผ่านโซเดียมซัลเฟต จากนั้นทำแห้งสารสกัดเอทิลอะซิเตท โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน ที่สภาวะเดิมจนสารสกัดจากมะระขี้นกแห้ง เติมเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำสารสกัดเมทานอล เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 8±1 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

4.2.2 การวิเคราะห์ชนิดของกรดฟีโนลิกในสารสกัดเมทานอล

การวิเคราะห์ชนิดของกรดฟีโนลิกในสารสกัดเมทานอลโดยใช้วิธี HPLC ในการวิเคราะห์เริ่มจากการนำสารสกัดที่ได้จากข้อ 4.2.1 กรองด้วยแผ่นกรองแบบฉีด ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร วิเคราะห์สารฟีโนลิกที่แยกได้โดยเฟสคงที่ คือ Sunfire C18 (ความยาว 4.6x250 มิลลิเมตร และขนาดของอนุภาค 5 ไมโครเมตร) เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิด คือ กรดอะซิติกความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย A) และสารผสมกรดอะซิติก: อะซิโตไนไตร: น้ำ (3: 25: 72) (สารละลาย B) ตั้งโปรแกรมระบบของเฟสเคลื่อนที่ให้เป็นระบบ Isocratic วิเคราะห์โดยการตั้งอัตราการไหลที่ 1.0 มิลลิลิตร ต่อนาที ตัวตรวจรับ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 278 นาโนเมตร อุณหภูมิของคอลัมน์ คือ 30 องศาเซลเซียส แสดงสภาวะดังตารางที่ 3-1

สารมาตรฐานที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของกรดฟีโนลิก คือ กรดแกลลิก (+)- คาเตชิน กรดคลอโรจีนิก และกรดคาเฟอิก ซึ่งแสดงรายละเอียดการเตรียมสารมาตรฐาน แสดงตังภาคผนวก ข-5 เพื่อใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานจากการวิเคราะห์สารประกอบฟีโนลิกด้วยเทคนิค HPLC

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-1 ระบบความเข้มข้นของสารละลาย A และสารละลาย B (เปอร์เซ็นต์) ในช่วงเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้นของสารละลาย A (เปอร์เซ็นต์)	ความเข้มข้นของสารละลาย B (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตรสารต่อระยะเวลาการฉีด (มิลลิลิตรต่อนาที)
2	95	5	1.0
7	95	5	1.0
12	65	35	1.0

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University