บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี

1. Absolute ethanol (Lot. NO. 10030343, ACI Labscan, Thailand)
2. Follin-Ciocalteu Reagent (Lot & filling code : 1386482 42708012, Fluka Analytical)
3. Gallic acid (Lot & filling code : 456715/1 51204106, Fluka Analytical)
4. 2,2-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (Lot. 0001424973, Fluka Analytical)
5. 6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman -2 carboxylic acid (HTCC) (Lot. S43353-148, Aldrich Chem Co.) (ชื่อการค้าว่า Trolox)
6. Ascorbic acid (Lot. J040C08 Rankem, RFCL Limited, India)
7. 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) (Lot. 0001 453262, Fluka Analytical)
8. Iron (III) chloride hexahydrate (Lot. I6014-1-0250 95214-1212, QREC)
9. 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) (Lot.04414, MU Aldrich Chem Co.)
10. Sodium carbonate (B/No. 0912454 Univar, Ajax Fiechem, New Zealand)
11. Potassium persulfate (Lot. J009L09 Rankem, RFCL Limited, India)
12. Glacial acetic acid (Lot. K32453417 338, BDH Analar)
13. Sodium acetate (B/No. 0801100, Univar, Ajax Finechem, New Zealand)

เครื่องมือ

1. UV – vis spectrophotometer (model: Cary 1 E, S/N: EL 97103044, Australia)
2. Autopipet ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร และขนาด 5.0, 10.0 มิลลิลิตร
3. Ultrasonic bath (Delta, D200H)
4. เครื่องแก้วสำหรับทำการทดลอง

วิธีวิจัย

1. ตัวอย่างยาหอมที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดของยาหอมที่ใช้ในการทดลอง

ยาหอม	Lot 1	วันผลิต	Lot 2	วันผลิต
A	JH272	12/10/52	JH276	01/03/53
B	S520101	16/03/52	S52003	30/11/52
C	251	16/05/52	252	12/11/52
D	022	02/10/52	042	04/10/53
E	02	02/06/52	01	08/03/53
F	-	-	-	-
G	-	-	-	-
H	-	-	-	-
I	-	-	-	-
J	-	-	-	-

แหล่งที่ซื้อ:

ตำรับ A ถึง E ซื้อจากร้านขายยาแผนปัจจุบัน ตำรับ J ซื้อจากร้านขายยาจีนย่านสำเพ็ง ตำรับ F ซื้อจากโรงพยาบาลอู่ทอง ตำรับ G ซื้อจากร้านย่านวัดโพธิ์ ตำรับ H และ I ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ คณะเภสัชศาสตร์ ม.มหิดล

2. การสกัดตัวอย่าง

1. ชั่งผงยาหอมแต่ละตัวอย่าง (ยี่ห้อ) ชนิดละ 0.5 กรัม ใส่ Erlenmeyer flask ชนิดฝาเกลียว ขนาด 125 มิลลิลิตร

2. สกัดด้วยตัวทำละลาย 50.0 มิลลิลิตร โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ de-ionized water และ absolute ethanol โดยปิดฝาให้สนิท หมักนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เขย่าเป็นครั้งคราว เมื่อครบเวลา ทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No. 1) โดยทิ้งส่วนแรกไปประมาณ 5 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นคงที่

3. เก็บตัวอย่างสารสกัดในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว ปิดฝาให้สนิทและหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันแสง เก็บในอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์โดยแต่ละตัวอย่างทำการสกัด 3 ครั้ง (n = 3)

3. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (total phenolic compounds)

1. เตรียมสารละลาย 0.2 M Folin-Ciocalteu reagent โดยเจือจางจาก 2 M Folin-Ciocalteu reagent ด้วย de-ionized water

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานของ gallic acid โดยชั่ง gallic acid 0.1000 กรัม ใส่ volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ด้วย de-ionized water จะได้ความเข้มข้นของ gallic acid stock solution เท่ากับ 200 mg% ทำการเจือจางโดยปิเปตสารละลาย gallic acid stock solution มา 1.25, 2.5, 3.75, 5.0, 6.25 และ 7.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย de-ionized water จะได้สารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 mg% ตามลำดับ

3. ทำปฏิกิริยาเพื่อวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในสารสกัด โดยดูดตัวอย่างสารสกัดตัวอย่างละ 0.10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองชนิดฝาเกลียวที่แห้ง จากนั้นเติมสารละลาย 0.2 M Folin-Ciocalteau reagent ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งให้ทำปฏิกิริยานาน 4 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา เติมสารละลาย 7.5% sodium carbonate 3.2 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เป็นกลาง จากนั้นเก็บในที่มืดนาน 1 ชั่วโมงจะได้สารละลายสีน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยใช้ de-ionized water เป็น blank

4. คำนวณหาปริมาณ total phenolic compounds เป็นค่าของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อปริมาณยาหอม 1.0 กรัม (มิลลิกรัม/กรัม) โดยการคำนวณจากสมการเชิงเส้นถดถอยที่ได้จากเส้นกราฟมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 10-60 mg% ที่ทำปฏิกิริยาในลักษณะเดียวกันกับตัวอย่างสารสกัด โดยทำกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการทดลอง

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด โดยวิธี DPPH radical scavenging assay

1. เตรียมสารละลาย DPPH• radical โดย ชั่ง DPPH มาประมาณ 0.01 กรัม ละลายด้วย 80% ethanol ปริมาตร 300 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ระหว่าง 0.8-0.9

2. ทำปฏิกิริยาโดยปิเปตสารละลาย DPPH• จำนวน 7.9 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองชนิดมีฝาเกลียว เก็บไว้ในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ใช้ de-ionized water เป็น blank

3. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นค่า HTCC equivalent หรือ Trolox equivalent (TE) และ ascorbic acid equivalent (AE) ให้มีหน่วยเป็น ไมโครโมล/1 กรัมของผงยาหอม โดยใช้สมการเชิงเส้นถดถอยที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox

ในช่วงความเข้มข้น 100-2500 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย ascorbic acid ในช่วงความเข้มข้น 100-1500 ไมโครโมลาร์ ที่ทำปฏิกิริยาในลักษณะเดียวกัน โดยทำกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการทดลอง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 100 -2500 ไมโครโมลาร์

1. เตรียม Trolox stock solution เข้มข้น 5000 ไมโครโมลาร์ โดยชั่ง Trolox 0.0313 กรัม ใส่ volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วย absolute ethanol

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก Trolox stock solution โดยปิเปต 0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ด้วย absolute ethanol จะได้สารละลาย Trolox ความเข้มข้น 100, 500, 1000, 1500, 2000 และ 2500 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid ความเข้มข้น 100-1500 ไมโครโมลาร์

1. เตรียม ascorbic acid stock solution เข้มข้น 5000 ไมโครโมลาร์ โดยชั่ง ascorbic acid 0.0880 กรัม ใส่ volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วย de-ionized water

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก ascorbic acid stock solution โดย ปิเปตสารละลาย ascorbic acid ที่เตรียมไว้ มา 0.5, 1.25, 2.5, 5.0 และ 7.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ด้วย de-ionized water จะได้สารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 100, 250, 500, 1000 และ 1500 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี ABTS radical scavenging assay

1. เตรียมสารละลาย $ABTS^{+}$• radical โดยชั่งสาร ABTS ประมาณ 0.02 กรัม ละลายในสารละลาย potassium persulfate (0.07%) 4 มิลลิลิตร เก็บในที่มืด อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง

2. เมื่อครบเวลา นำสารละลายในข้อ 1 เจือจางด้วย 80% ethanol จำนวน 500 มิลลิลิตร เพื่อให้มีค่าการดูดกลืนแสงระหว่าง 0.8 - 0.9 ใช้ de-ionized water เป็น blank

3. ปิเปตสารละลาย ABTS radical ($ABTS^{+}$•) ในข้อ 2 ปริมาตร 6.9 มิลลิลิตร ให้ทำปฏิกิริยากับสารสกัดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดนาน 6 นาที เมื่อครบเวลาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 744 นาโนเมตร

4. คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า Trolox equivalent (TE) และ ascorbic acid equivalent (AE) มีหน่วยเป็น ไมโครโมล/1 กรัมของผงยาหอม โดยใช้สมการเชิงเส้นถดถอยที่ได้

จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ในช่วงความเข้มข้น 250-1500 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย ascorbic acid ในช่วงความเข้มข้น 50-1000 ไมโครโมลาร์ ที่ทำปฏิกิริยาในลักษณะเดียวกัน โดยทำกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการทดลอง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 250 -1500 ไมโครโมลาร์

1. เตรียม Trolox stock solution เข้มข้น 5000 ไมโครโมลาร์ โดยชั่ง Trolox 0.0313 กรัม ใส่ volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วย absolute ethanol

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก Trolox stock solution โดยปิเปต 0, 1.25, 2.5, 5.0 และ 7.5 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ด้วย absolute ethanol จะได้สารละลาย Trolox ความเข้มข้น 250, 500, 1000 และ 1500 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid ความเข้มข้น 50 -1000 ไมโครโมลาร์

1. เตรียม ascorbic acid stock solution เข้มข้น 5000 ไมโครโมลาร์ โดยชั่ง ascorbic acid 0.0880 กรัม ใส่ volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วย de-ionized water

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก ascorbic acid stock solution โดย ปิเปตสารละลาย ascorbic acid ที่เตรียมไว้ มา 0.25, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ด้วย de-ionized water จะได้สารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 50, 200, 400, 600, 800 และ 1000 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโดยวิธี Ferric reducing ability power (FRAP assay)

1. เตรียม FRAP reagent โดยผสม 300 mM acetate buffer pH 3.6 จำนวน 40.0 มิลลิลิตร กับ 10 mM 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ใน 40 mM HCl 4.0 มิลลิลิตร และ 20 mM $FeCl_3$ $6H_2O$ 4.0 มิลลิลิตร

วิธีเตรียมสารละลายแต่ละชนิดทำดังนี้

- 300 mM acetate buffer pH 3.6 (เตรียมโดยผสม acetic acid 1.6 ml กับ sodium acetate 0.2585 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร)

- 10 mM TPTZ (เตรียมโดยละลาย TPTZ 0.0125 กรัม ใน 40 mM HCl ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร)

- 20 mM $FeCl_3$.$6H_2O$ (เตรียมโดยละลาย $FeCl_3$.$6H_2O$ 0.1352 กรัม ในน้ำปริมาตร 25 มิลลิลิตร)

2. เจือจาง FRAP reagent ด้วย absolute ethanol ในสัดส่วนปริมาตร 1:1 จากนั้นปิเปตมา 5.0 มิลลิลิตร ใส่ test tube with screw cap เติมสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งให้ทำปฏิกิริยาในที่มืดนาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

3. นำค่าการดูดลืนที่ได้ไปคำนวณค่าความสามารถการเป็นสารรีดิวซ์ โดยเทียบเป็นความเข้มข้นของสารละลาย Fe^{2+} ซึ่งคำนวณจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย $FeSO_4.6H_2O$ ที่ความเข้มข้น 500, 1000, 1500, 1750 และ 2000 ไมโครโมลาร์ ซึ่งทำปฏิกิริยาโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละหลอดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ให้ทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent ที่เจือจางแล้ว 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งให้ทำปฏิกิริยาในที่มืดนาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

4. คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเทียบเป็นค่า Trolox equivalent และ ascorbic acid equivalent มีหน่วยเป็น ไมโครโมลาร์/1 กรัมของผงยาหอม โดยใช้เส้นกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ในช่วงความเข้มข้น 100-1500 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย ascorbic acid ในช่วงความเข้มข้น 250-2500 ไมโครโมลาร์ ที่ทำการทดลองในลักษณะเดียวกัน โดยทำกราฟมาตรฐานทุกครั้งที่ทำการทดลอง

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 100 -1500 ไมโครโมลาร์

1. เตรียม Trolox stock solution เข้มข้น 5000 ไมโครโมลาร์ โดยชั่ง Trolox 0.0313 กรัม ใส่ volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วย absolute ethanol

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก Trolox stock solution โดยปิเปต 0.5, 1.25, 2.5, 3.75, 5.0 และ 7.5 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ด้วย absolute ethanol จะได้สารละลาย Trolox ความเข้มข้น 100, 250, 500, 750, 1000 และ 1500 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน ascorbic acid ความเข้มข้น 250-2500 ไมโครโมลาร์

1. เตรียม ascorbic acid stock solution เข้มข้น 5000 ไมโครโมลาร์ โดยชั่ง ascorbic acid 0.0880 กรัม ใส่ volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรจนครบด้วย de-ionized water

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานจาก ascorbic acid stock solution โดย ปิเปตสารละลาย ascorbic acid ที่เตรียมไว้มา 1.25, 2.5, 3.75, 5.0, 10.0 และ 12.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ด้วย de-ionized water จะได้สารละลาย ascorbic acid ความเข้มข้น 250, 500, 750, 1000, 2000 และ 2500 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่าสถิติ one-way ANOVA และเมื่อพบว่ามีความแตกต่าง จึงทำการวิเคราะห์รายคู่ (Post-hoc analysis) โดยใช้สถิติ Scheffe's ดูค่านัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p<0.01$

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學