

อุปกรณ์และวิธีการ

วัตถุดิบ

เปลือกทุเรียนพันธุ์หมอนทอง ได้รับความอนุเคราะห์จากร้านเพ็ญทิพาทุเรียนทอด

สารเคมี

1. กรดกาแลกทูโรนิก (D-galacturonic acid) ยี่ห้อ SIGMA-ALDRICH
2. กรดแอสคอร์บิก (Vitamin C) ยี่ห้อ Chesupply
3. สารละลายมาตรฐาน 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ยี่ห้อ Sigma Aldrich
4. เอทานอลร้อยละ 95
5. เมทานอล (Methanol reagent grade) ยี่ห้อ Quality Reagent Chemical
6. อะซิโตน (C_3H_6O) ยี่ห้อ J.T.Baker
7. เพคตินทางการค้าเกรด 150 (Pectin grade 150) ชนิด High Methoxyl Pectin (HMP)

เป็นเพคตินจากแอปเปิ้ล

8. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) ยี่ห้อ Ajax Finechem
9. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCL) ยี่ห้อ J.T.Baker
10. ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalene)
11. เมทิลเรด (Methyl red)
12. คาร์บาซอล (Carbazole) ยี่ห้อ HIMEDIA
13. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl) ยี่ห้อ CARLO ERBA
14. น้ำกลั่น
15. Mueller Hinton Agar ยี่ห้อ HIMEDIA
16. Mueller Hinton Broth ยี่ห้อ HIMEDIA
17. *Staphylococcus aureus* TISTR 2329
18. *Escherichia coli* TISTR 073

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องแก้ว
2. อุปกรณ์เครื่องครัว
3. ถ้วยกระเบื้องระเหย (Crucible)

4. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Denver instrument รุ่น TB-214
5. เครื่องปั่น (Blender) ยี่ห้อ Philip บริษัท ฟิลิปส์อิเล็กทรอนิกส์ (ประเทศไทย) จำกัด
6. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ยี่ห้อ Bender รุ่น ULM
7. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น CP3202S
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ยี่ห้อ Sci pro
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter)
10. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophometers) ยี่ห้อ Jasco รุ่น V-630
11. โถดูดความชื้น (Desiccators)
12. เครื่องระเหยสุญญากาศ ยี่ห้อ BUCHI รุ่น R-200
13. ไมโครปิเปต ยี่ห้อ Thermo Finnpiptette รุ่น F2 GLP Kits
14. บิวเรต พร้อมขาตั้ง
15. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
16. เตาเผา Muffle furnace
17. เจ็มเจียเชื้อปลายแหลม
18. ปากคีม
19. ตะเกียงแอลกอฮอล์
20. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
21. กระดาษฟอยล์
22. ผ้าขาวบาง
23. ไม้บรรทัด

วิธีการดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างจากเปลือกทุเรียนหมอนทอง

การเตรียมเปลือกทุเรียนหมอนทอง โดยนำเปลือกทุเรียนหมอนทอง มาล้างด้วยน้ำสะอาดทิ้งให้สะเด็ดน้ำ โดยบดเปลือกทุเรียนส่วนด้านในที่เป็นสีขาวด้วยเครื่องบดหยาบ นำไปอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือให้มีปริมาณความชื้นร้อยละ 9 - 10 โดยน้ำหนัก นำเปลือกทุเรียนที่อบแห้งแล้วเก็บในถุงพลาสติกปิดสนิทและเก็บไว้ในที่แห้งก่อนนำมาทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพคตินจากเปลือกทุเรียนหมอนทอง

การสกัดเปลือกทุเรียนที่เตรียมไว้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยดัดแปลงจากขนิษฐา เลิกชัยภูมิ (2545 : 41 - 42)

2.1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดเพคตินจากเปลือกทุเรียนหมอนทอง

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดเพคตินจากเปลือกทุเรียนหมอนทอง โดยนำเปลือกทุเรียนบดแห้งปริมาณ 100 กรัม ใส่ปิกเกอร์ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2.0 ในอัตราส่วนเปลือกบดแห้งต่อกรดไฮโดรคลอริก เท่ากับ 1:12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) นำไปสกัดในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 70 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งสารสกัดให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำส่วนใสมาตกตะกอนเพคตินโดยเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ในอัตราส่วนสารสกัดต่อเอทานอล 1:2 โดยปริมาตร (v/v) ทำการคนผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง กรองแยกตะกอนเพคตินด้วยผ้าขาวบาง ล้างตะกอนเพคตินด้วยอะซิโตนความเข้มข้นร้อยละ 80 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 50 มิลลิลิตร นำเพคตินที่สกัดได้ใส่ถาดวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้อะซิโตนระเหยอบตะกอนเพคตินที่ได้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วบดให้เป็นผง ทำแต่ละสิ่งทดลอง 3 ซ้ำ เก็บไว้ในถุงฟอยล์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.2 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเพคตินจากเปลือกทุเรียนหมอนทอง

ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเพคตินจากเปลือกทุเรียนหมอนทอง โดยนำเปลือกทุเรียนบดแห้งปริมาณ 100 กรัม ใส่ปิกเกอร์ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2.0 ในอัตราส่วนเปลือกบดแห้งต่อกรดไฮโดรคลอริก เท่ากับ 1:12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) นำไปสกัดในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.1 เป็นเวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง ตั้งสารสกัดให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำส่วนใสมาตกตะกอนเพคตินโดยเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 ในอัตราส่วนสารละลายต่อเอทานอล 1:2 โดยปริมาตร ทำการคนผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างตะกอนด้วยอะซิโตนความเข้มข้นร้อยละ 80 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 50 มิลลิลิตร นำเพคตินที่สกัดได้ใส่ถาดวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้อะซิโตนระเหยอบตะกอนเพคตินที่ได้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วบดให้เป็นผง ทำแต่ละสิ่งทดลอง 3 ซ้ำ เก็บไว้ในถุงฟอยล์ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพของเพคตินที่สกัดได้จากเปลือกทุเรียนหมอนทอง

นำเพคตินที่อบแห้งมาแล้ววิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ประกอบด้วย ปริมาณผลผลิต ความชื้น ถ้า ปริมาณกรดกาแลคทูโรนิก (Galacturonic Acid) ระดับการเกิดเอสเทอร์ (Degree of Esterification, DE) ปริมาณเมทอกซิล (Methoxyl) ค่าสี (L*a*b*) ดังนี้

3.1 ปริมาณร้อยละของผลผลิตเพคติน (% yield) ดังนี้

$$\text{ปริมาณร้อยละของผลผลิตเพคติน} = \frac{\text{น้ำหนักเพคติน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักเปลือกทุเรียนบดแห้ง (กรัม)}} \times 100$$

3.2 ปริมาณกรดกาแลคทูโรนิก (ดัดแปลงจากขนิษฐา เลิกชัยภูมิ. 2545 : 45 - 57)

3.2.1 ทำกราฟมาตรฐานของกรดกาแลคทูโรนิก โดยชั่งน้ำหนักกรดกาแลคทูโรนิก 0.1 กรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วปิเปตสารละลายปริมาตร 1 2 4 5 6 และ 8 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร อย่างละ 1 ขวด และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปิเปตสารละลายในแต่ละความเข้มข้นใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง 3 หลอด ๆ ละ 2 มิลลิลิตร เมื่อปิเปตสารละลายจนครบทุกความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลอง จะได้จำนวนทั้งหมด 18 หลอด เติมสารละลายคาร์บาซอลเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 25 นาที พร้อมทั้งทำตัวอย่างควบคุม โดยเติมแต่เอทานอล 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายคาร์บาซอล (วิเคราะห์ตามวิธีการเดียวกัน) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร แล้วสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสง

3.2.2 การเตรียมสารตัวอย่าง ชั่งน้ำหนักเพคติน 0.1 กรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วทิ้งไว้ 30 นาที ปิเปตสารละลายเพคติน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปิเปตสารละลายเจือจางใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง 3 หลอด ๆ ละ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายคาร์บาซอลเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 12 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 25 นาที นำไปวัดค่า

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร แล้วคำนวณหากรดจากแอลกอฮอล์จากกราฟมาตรฐาน

3.3 การหาปริมาณเมททอกซิล (ดัดแปลงจากขนิษฐา เลิกชัยภูมิ, 2545 : 43 - 44)

ชั่งน้ำหนักเพคตินผง ทั้งที่ได้จากการสกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 0.5 กรัม เติมน้ำกลั่นลงในขวดรูปชมพู่ ขวดละ 2 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น ขวดละ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยดฟีนอล์ฟทาไลน์ลงในขวดรูปชมพู่ ขวดละ 5 หยด นำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วบันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นปริมาตรที่ 1 (NaOH Volume 1) เติมน้ำกลั่นลงในขวดรูปชมพู่ ขวดละ 5 หยด นำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าจนสีชมพูหายไป หยดฟีนอล์ฟทาไลน์ลงในขวดรูปชมพู่ ขวดละ 5 หยด นำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ แล้วบันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นปริมาตรที่ 2 (NaOH Volume 2) แล้วคำนวณหาระดับการเกิดเอสเทอร์ และคำนวณหาปริมาณเมททอกซิลโดยดูจากตารางที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิดเอสเทอร์ที่เทียบกับปริมาณเมททอกซิล

การคำนวณหาระดับการเกิดเอสเทอร์ ดังนี้

$$\text{ระดับการเกิดเอสเทอร์} = \frac{\text{NaOH Volume 1}}{\text{NaOH Volume 1} + \text{NaOH Volume 2}} \times 100$$

3.4 การวัดค่าสีโดยใช้ระบบ CIE (L*a*b*)

นำผงเพคตินที่สกัดได้มาวัดค่าสีเป็น ค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง (b*)

4. ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเพคติน

4.1 การเตรียมสารสกัด

นำตัวอย่างเพคตินของเปลือกทุเรียน 100 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ หลังจากนั้นนำสารสกัดเพคตินที่ได้เก็บในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป โดยคำนวณผลผลิต (Yield) ที่ได้เป็นร้อยละ ดังสมการ

$$\text{ปริมาณร้อยละของสารสกัด} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดจากพืช (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างพืชของเปลือกทุเรียน (กรัม)}} \times 100$$

4.2 ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืช

วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ตามวิธีของและสิงห์ทอง และคณะ (Singhatong and et al. 2010 : 947 - 953) ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย Ascorbic Acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นสารมาตรฐาน คือ 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 ppm ตามลำดับ โดยเปิดสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร ในเมทานอล 2.9 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย Ascorbic Acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้สารทำปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที พร้อมทำตัวอย่างควบคุม หรือสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ที่ 0 ppm ทำโดยใช้เมทานอล จำนวน 0.1 มิลลิลิตร แทนสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ที่นำมาวิเคราะห์ เมื่อครบ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH คำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) และนำไปเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี

5. ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านแบคทีเรียของพืช

นำเชื้อแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบ ประกอบด้วย *Staphylococcus aureus* TISTR 2329 และ *Escherichia coli* TISTR 073 มาเลี้ยงบน Mueller Hinton Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแต่ละชนิดที่เลี้ยงบนอาหาร Mueller Hinton Agar มา 1 หลบ ใส่ลงในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำหลอดเชื้อที่บ่มไว้มาปรับค่าความขุ่นให้มีค่าเท่ากับค่ามาตรฐาน McFarland 0.5 (มีจำนวนเซลล์ 1.5×10^8 CFU ต่อมิลลิกรัม) ใช้ไม้ปั่นสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว กดแนบข้างหลอดเพื่อป้องกันการได้รับเชื้อที่มากเกินไป นำไม้ปั่นสำลีที่มีเชื้อมาป้ายลงบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar โดยป้ายเชื้อเป็น 3 ระบาย โดยแต่ละระบายให้หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ไปเป็นมุม 60 องศาจากการป้ายครั้งแรก ใช้ที่เจาะหลุม (Cork Borer) เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่สารสกัดหยาบ ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม หลุมตรงกลางใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เป็นตัวควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บข้อมูลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง (Inhibition Zone) แต่ละการทดลอง ทำซ้ำ 3 ซ้ำ

6. การประเมินผลทางสถิติ (Statistical Analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี