บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่าง

ใบสดของพืช 3 ชนิด ได้แก่ มะม่วง สัก และหูกวาง

3.2 สถานที่ดำเนินการวิจัย

1) ห้องปฏิบัติการเคมี ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

2) ห้องปฏิบัติการเคมี ชั้น 3 อาคาร 2 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

3.3 เครื่องมือ วัสดุ-อุปกรณ์ และสารเคมี

3.3.1 เครื่องมือ

1) เครื่องวัดสี (Colorimeter), Miniscan EZ, Color global, America
2) เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Balance); BSA224S-CW, Sartorius Group, Germany
4) เครื่องให้ความร้อน (Hotplate), SH4, Bibby Stuart Scientific, United Kingdom
5) ตู้ทำความเย็น (Refrigerator), SBC-P339K, Sanyo Commercial Solutions, Thailand
6) เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator), R-210, Buchi Labortechnik Ag, Switzerland

3.3.2 วัสดุ-อุปกรณ์

1) กะละมัง
2) ถุงซิปล็อคพลาสติก
3) มีด
4) เขียง
5) บีกเกอร์ขนาด 50 mL, 100 mL, 1,000 mL และ 2,000 mL
6) ขวดน้ำกลั่น
7) ตะแกรงร่อน
8) ขวดปรับปริมาตร
9) กระดาษกรอง เบอร์ 5

10) หลอดหยด

11) หลอดทดลอง

12) กระบอกตวง ขนาด 10 mL และ 100 mL

13) จุกยาง

14) ปิเปตต์ ขนาด 0.5 mL, 1 mL และ 10 mL

15) ขวดระเหย ขนาด 250 mL และ 500 mL

3.3.3 สารเคมี

1) คลอรีนชนิดผง (Calcium hypochiorite, $CaCl_2O_2$), AR, Assay 65%, MW 143 g/mol, World Chemical, Thailand

2) น้ำกลั่น

3) เมทานอล (Methanol, CH_3OH), Assay 99.9%, MW 32.04 g/mol, Lab-Scan LTD, Thailand

4) โลหะแมกนีเซียม (Magnesium, Mg)

5) คลอโรฟอร์ม (Chloroform, $CHCl_3$), AR, Assay 99.8%, Mw 119.38 g/mol, RCI Labscan, Thailand

6) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4), AR, Assay 98.0%, Mw 98.08 g/mol, RCI Labscan, Thailand

7) กรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial acetic acid, CH_3COOH), Assay 100%, MW 60.05 g/mol, Merck KGaA, Germany

8) เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride, $FeCl_3$), Assay 98.0% , MW 162.21 g/mol, Ajax Finechem, Australia

9) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl), Assay 37.0%, MW 36.50 g/mol, Merck KGaA, Germany

10) แอมโมเนียไฮดรอกไซด์ (Ammonia hydroxide, NH_4OH), ACS, Assay 28.0 %, MW 35.05 g/mol, APS Finechem, Australia

11) อลูมิเนียมโพแทสเซียมซัลเฟต (Aluminium potassiumsulphate,$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), Assay 98.0%, MW 474.38 g/mol, Ajax Finechem, Australia

3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

3.4.1 การเตรียมสารละลายคลอรีน

1) ผสมคลอรีนกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วนคลอรีน 30 กรัม ต่อน้ำ 3,000 มิลลิลิตร

2) ทิ้งไว้ 30 นาที ในตู้ดูดควัน ปล่อยให้คลอรีนตกตะกอน

3) รินเอาแต่น้ำใส เพื่อทำการฟอกจางสีเยื่อปอสาต่อไป

3.4.2 การเตรียมเยื่อปอสา

1) นำเยื่อปอสา 1 กิโลกรัม มาใส่ลงในสารละลายคลอรีนที่เตรียมไว้ แล้วคนให้เยื่อกระจายตัว

2) แช่เยื่อปอสาทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จนสีของเยื่อปอสาเปลี่ยนเป็นสีขาว

3) กรองด้วยตะแกรงร่อน แล้วล้างคลอรีนออกด้วยน้ำสะอาด 2–3 ครั้ง

4) เก็บเยื่อปอสาสีขาวที่ล้างจนสะอาดไว้ในถุงซิปล็อคพลาสติกและเก็บไว้ที่ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3.4.3 การเตรียมตัวอย่างพืช

1) นำตัวอย่างพืช ได้แก่ ใบมะม่วง ใบสัก และใบหูกวางล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ

2) ชั่งตัวอย่างพืชแต่ละชนิด ชนิดละ 650 กรัม เพื่อใช้ในการสกัดสีต่อไป

3.4.4 การสกัดสีจากตัวอย่างพืช

1) นำตัวอย่างพืชที่เตรียมได้ในข้อ 3.4.3 มาต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2,600 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที

2) พักไว้ให้เย็น จากนั้นกรองสารสกัดสีด้วยตะแกรงร่อน

3) ปรับปริมาตรให้เป็น 2,600 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.4.5 การเตรียมสารสกัดหยาบจากตัวอย่างพืช

1) แบ่งสารสกัดสีจากตัวอย่างพืชแต่ละชนิดจำนวน 400 มิลลิลิตร จากข้อ 3.4.4

2) นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ

3) นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นต่อไป

3.4.6 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

นำสารสกัดหยาบจากตัวอย่างพืช 3 ชนิด ที่ได้ในข้อ 3.4.5 มาทำการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นดังต่อไปนี้

1) การทดสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นโดยเครื่องให้ความร้อน 5–10 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก จากนั้นหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เจือจาง (0.1% w/v $FeCl_3$) 2–3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสีเขียวดำหรือสีน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

2) การทดสอบแอนทราควิโนน (Anthaquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเจือจาง (10% v/v H_2SO_4) 10 มิลลิลิตร เขย่า นำไปอุ่นโดยเครื่องให้ความร้อน 5–10 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร ปิเปตต์สารผสมใส่หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลายแอมโมเนียเจือจาง (10% v/v NH_3) 2–3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสีชมพูแดงแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

3) การทดสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัด มา 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง เติมเมทานอล 10 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง (1% v/v HCl) 5–10 หยด และลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็ก ๆ จำนวน 2–3 ชิ้น เขย่า จากนั้นนำไปอุ่นโดยเครื่องให้ความร้อน 10–15 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงหรือสีแดงชมพูแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

4) การทดสอบไกลโคไซด์ (Glycosides)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก เติมกรดแกลเชียลแอซิติก (Glacial acetic acid, CH_3COOH) 1 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอริกคลอไรด์เจือจาง (0.1% w/v $FeCl_3$) 2–3 หยด จากนั้นหยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) จำนวน 2–3 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสีเขียวเข้มหรือสีน้ำเงินแสดงว่าพบไกลโคไซด์

5) การทดสอบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง เติมคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) 1 มิลลิลิตร ถ้าปรากฏสีน้ำตาลแดงแสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์

6) การทดสอบซาโปนิน (Saponins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงจนปรากฏฟอง ทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) เขย่าอีกครั้ง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

3.4.7 การเตรียมสารสกัดหยาบจากตัวอย่างพืช เมื่อเติมสารส้ม

1) นำสารส้ม 44 กรัม เติมลงในสารสกัดตัวอย่างพืชที่เหลือ 2,200 มิลลิลิตร ในข้อ 3.4.4

2) แบ่งสารสกัดตัวอย่างพืชแต่ละชนิดจำนวน 400 มิลลิลิตร

3) นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ

4) นำสารสกัดหยาบที่ได้ไปตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นต่อไป ดังข้อ 3.4.6

3.4.8 การทำกระดาษสามีสีจากพืชตัวอย่าง

ใช้กรรมวิธีแบบตักใช้ตะแกรงร่อนอลูมิเนียมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร และใช้วิธีชั่งน้ำหนักของเยื่อเป็นตัวกำหนดความหนาของแผ่นกระดาษแช่เยื่อในอ่างน้ำ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1) นำเยื่อปอสาสีขาวจำนวน 27 กรัม มาแช่ในสารสกัดตัวอย่างพืชที่ได้ในข้อ 3.4.7 (เหลือ 1,800 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 วัน

2) นำมาปรับปริมาตรให้เป็น 8,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3) ใช้ตะแกรงร่อนอลูมิเนียมตักเยื่อปอสาในอ่างน้ำ และใช้มือเกลี่ยกระจายเยื่อบนตะแกรงให้สม่ำเสมอ

4) นำไปผึ่งลม ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

5) เมื่อแห้งแล้วจึงลอกแผ่นกระดาษสาออกจากตะแกรงร่อน

6) นำไปศึกษาการติดสีบนกระดาษสา

3.4.9 การศึกษาการติดสีบนกระดาษสา

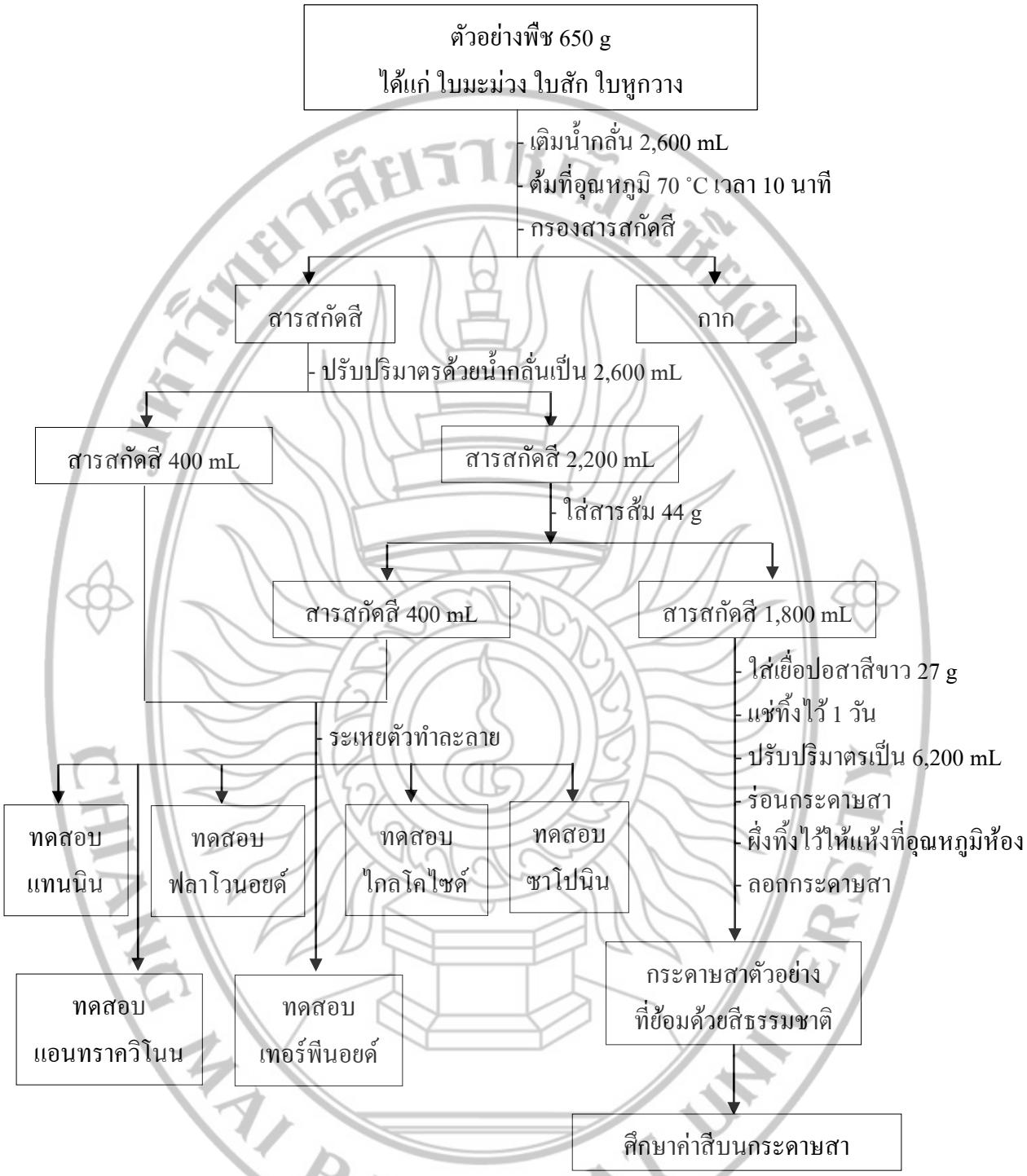
การศึกษาการติดสีของสารสกัดจากพืชตัวอย่างบนกระดาษสา ด้วยการตรวจวัดค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสี ซึ่งเป็นการกำกับค่าของสีวิธีการหนึ่ง โดยแสดงค่าความสว่างหรือค่า L* (L* = 0 หมายถึงสีดำ และ L* = 100 หมายถึงสีขาว) ตำแหน่งที่อยู่ระหว่างสีแดง (Red) กับสีเขียว (Green) หรือค่า a* (ถ้าค่าเป็นค่าลบแสดงว่าไปทางสีเขียว ถ้าเป็นค่าบวกแสดงว่าไปทางสีแดง) และตำแหน่งที่อยู่ระหว่างสีเหลือง (Yellow) กับสีน้ำเงิน (Blue) หรือค่า b* (ถ้าค่าเป็นค่าลบแสดงว่าไปทางสีน้ำเงิน ถ้าเป็นค่าบวกแสดงว่าไปทางสีเหลือง) ค่าความสดใสหรือค่า C* (ที่จุดศูนย์กลางมีความเป็น 0 และมีความสดใสขึ้นตามระยะที่ห่างจากศูนย์กลาง) และมีค่ามุมของสีหรือค่า h* (ค่ามุมของสี, h* เป็นมุมบนแกน +a* มีค่าเป็นองศา โดยที่ 0 องศา แทนค่าด้วย +a* เป็นสีแดง 90 องศา แทนค่าด้วย +b* เป็นสีเหลือง 180 องศา แทนค่าด้วย –a* เป็นสีเขียว และ 270 องศา แทนค่าด้วย –b* เป็นสีน้ำเงิน) มีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมแผ่นกระดาษสาที่ไม่ได้เติมสารสกัดพืชตัวอย่าง เป็นกระดาษสาสีมาตรฐาน (Standard Control) ในการตรวจวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี

2) คัดเลือกกระดาษสาสีมาตรฐาน โดยเลือกแผ่นที่มีความเรียบและมีสีสม่ำเสมอ นำไปตรวจวัดค่าสีโดยเครื่องวัดสี โดยปรับมาตรฐานเครื่องด้วยแผ่นสีขาวมาตรฐาน วัดซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกค่าสี L*, a*, b*, C* และ h* แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย

3) วัดกระดาษสาตัวอย่างจากสีของพืชแต่ละชนิด ได้แก่ มะม่วง สะเดา สัก และใบหูกวาง ชนิดละ 3 แผ่น แผ่นละ 3 ซ้ำ

4) เปรียบเทียบค่าสีของกระดาษสาที่ได้จากพืชแต่ละชนิดกับค่าสีของกระดาษสามาตรฐาน ตามขั้นตอนดังรูป 3.1



รูป 3.1 ขั้นตอนการดำเนินงาน