บทที่ 4

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมวุ้นจากใบว่านหางจระเข้เพื่อเตรียมทำผงแห้งโดยวิธี Lyophillization

นำใบว่านหางจระเข้มาล้างเพื่อทำความสะอาดผิวและลอกเปลือกออกเอาแต่วุ้นใสๆมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนัก แล้วนำวุ้นไปปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ หลังจากนั้นนำวุ้นที่ปั่นได้มาผ่านแร่งเบอร์ 80 และแยกตะกอนอีกครั้งโดยใช้เครื่อง centrifuge ในขนาดความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที จะได้วุ้นที่มีลักษณะใสตั้งทิ้งไว้ไม่ตกตะกอน นำวุ้นที่ได้มาทำให้แห้งด้วยวิธีแช่แข็ง (freeze dry) โดยเครื่อง lyophillizer

2. การตรวจคุณสมบัติทางกายภาพของวุ้นว่านหางจระเข้ในรูปผงแห้งเปรียบเทียบกับวุ้นว่านหางจระเข้สด

2.1 การหาค่า pH

2.1.1 วัดค่า pH ของวุ้นสดที่เตรียมใหม่ๆและวุ้นว่านหางจระเข้ในรูปผงแห้งที่นำมาละลายน้ำกลั่นในปริมาตรเดิมก่อนทำให้แห้งด้วยเครื่อง Beckman ϕ 31 pH meter ซึ่งได้ปรับ pH กับ สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4 และ 7 แล้วโดยวัด 3 ครั้งหาค่าเฉลี่ย

2.1.2 วัด pH ของวุ้นผงแห้งที่ตั้งทิ้งไว้ 2, 4, 6, 8, 12 สัปดาห์ด้วยเครื่อง Beckman ϕ 31 pH meter ที่ได้ปรับ pH ของเครื่องกับสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน pH 4 และ 7 แล้ว

2.2 หาค่าความหนืด (viscosity)

2.2.1 วัดความหนืดของสารละลายมาตรฐานที่มีความหนืด 450 cps ด้วยเครื่อง Stromer viscometer โดยใช้ตุ้มน้ำหนัก 30 กรัม หลังจากนั้นจับเวลาที่ตุ้มน้ำหนักตกลงมาซึ่งทำให้รอกหมุนได้ 20 รอบ บันทึกเวลา 3 ค่าแล้วหาค่าเฉลี่ยของเวลา

2.2.2 วัดความหนืดของวุ้นว่านหางจระเข้สดโดยใช้ตุ้มน้ำหนัก 30 กรัม และจับเวลาที่จำนวนรอบของรอกหมุนไป 20 รอบ เช่นเดียวกับข้อ 2.2.1 ทำซ้ำกัน 3 ครั้ง บันทึกค่าเวลาและหาค่าเฉลี่ย

2.2.3 วัดความหนืดของวุ้นว่านหางจระเข้ในรูปผงแห้งที่เตรียมใหม่ๆและที่ตั้งทิ้งไว้ 2, 4, 6, 8, 12 สัปดาห์ โดยนำมาละลายน้ำในปริมาณเท่ากับที่เตรียมจากวุ้นว่านหางจระเข้สด แล้ววัดความหนืดเช่นเดียวกับข้อ 2.2.1

2.2.4 คำนวณค่าความหนืดโดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานคือ

เวลาที่ใช้ a (เวลาในข้อ 2.2.1) วินาที ความหนืดของสารละลายมาตรฐาน 480 cps

เวลาที่ใช้ b (เวลาของวุ้นว่านหางจระเข้ที่วัดในข้อ 2.2.2) วินาที

$$\text{ความหนืดของสารละลายมาตรฐาน} \quad \frac{480 \times b}{a} \quad \text{cps}$$

2.3 การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์โดยการตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count) ตามวิธีของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 152 - 2518[3]

- นำวุ้นว่านหางจระเข้มาทำเจือจางทีละ 10 เท่า (10-fold dilution) ด้วยน้ำเปปโตน จนถึงความเข้มข้น 10^{-7} โดยใช้เครื่องปั่นผสมช่วย ถ้าเป็นวุ้นของว่านหางจระเข้ที่ทำแห้งแบบแช่แข็งให้ใช้น้ำเปปโตนละลายตัวอย่างให้มีปริมาตรเท่ากับวุ้นสดก่อนจะทำการเจือจาง
- ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 จาน ให้ทำทุกความเข้มข้น
- เท nutrient agar ซึ่งมีอุณหภูมิ 45 - 48 °ซ ลงไปจานละ 18 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางให้แข็งตัวบนพื้นเรียบ
- กลับจานนำไปบ่มเพาะในตู้อบที่อุณหภูมิ 35 - 37 °ซ เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง
- นับจำนวนโคโลนีจากจานที่มีเชื้ออยู่ในช่วง 30 - 300 โคโลนี นำค่าที่ได้ทั้ง 2 จานที่มาจากความเข้มข้นเดียวกันมาหาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณหาจำนวนเชื้อต่อ 1 มิลลิลิตร ของตัวอย่าง

3. การตรวจสอบทางเคมี

3.1 การตรวจสอบด้วยรงควิทยาผิวบาง (Thin layer chromatography)

3.1.1 ตรวจสอบโดยนำวุ้นสดที่เตรียมใหม่ๆกับวุ้นผงแห้งที่เตรียมใหม่ๆซึ่งนำมาละลายน้ำในอัตราส่วนเท่ากับปริมาณที่ได้จากวุ้นสด spot ลงในรงควิทยาผิวบาง ซึ่งมีตัวดูดซับ (adsorbant) คือ ซิลิกาเจล จีเอฟ 254 ($SiGF_{254}$) ใช้แผ่นรงควิทยา

ผิวบางมีขนาด 20 x 20 เซนติเมตร spot เทียบทั้งหมด 4 ชุดทำ 3 แผ่น แล้วใส่ลงใน TLC tank ซึ่งมีตัวพา (mobile phase) หรือ developing solvent ต่างกัน 3 ชนิดคือฟีนอล (phenol) ซึ่งอิ่มตัวด้วยน้ำ, CH_3Cl : MeOH : H_2O (9:3:1) และ BAW (บิวทานอล : กรดแอซีติก : น้ำ ในอัตราส่วน 4:1:5) หลังจากที่ตัวพาขึ้นถึง 15 เซนติเมตรนำมาตรวจสอบ (detection) โดยตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรและสารฉีดพ่น (spraying reagent) 4 ชนิดคือ นินไฮดริน (ninhydrin reagent), สารละลายอนิซัลดีไฮด์ในเอทานอล (anisaldehyde solution in alcohol 5% v/v), แอซีติก แอนไฮดราย/กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (acetic anhydride/conc. H_2SO_4) และอังไอของไอโอดีน สังเกตดูผลจาก spot ที่ได้ แล้วเปรียบเทียบกับ spot ของวุ้นสดและวุ้นผงว่ามีสารเหมือนหรือต่างกันอย่างไร

3.1.2 นำวุ้นว่านหางจระเข้สดและวุ้นว่านหางจระเข้ผงที่เตรียมแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 2, 4, 6, 8, 12 สัปดาห์มาทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

3.2 การหาปริมาณของสารเคมีในวุ้นสดกับวุ้นผงแห้งที่เตรียมใหม่ๆและวุ้นผงแห้งที่ตั้งทิ้งไว้นาน 2, 4, 6, 8, 12 สัปดาห์

3.2.1 หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry method[4]

- นำสารตัวอย่าง (วุ้นว่านหางจระเข้สด, วุ้นว่านหางจระเข้ผงที่นำมาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเท่ากับวุ้นสดก่อนทำให้เป็นผงแห้ง) ในความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ 3.0 มิลลิลิตร
- ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลายโฟลิน-ฟีนอล 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
- นำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร
- หาความเข้มข้นของโปรตีนได้โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไบวีน ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่ทำการทดลองเช่นเดียวกัน

3.2.2 หาปริมาณของน้ำตาลกลูโคส(5)

- นำสารตัวอย่าง (วุ้นว่านหางจระเข้สด, วุ้นว่านหางจระเข้ผงที่นำมาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเท่ากับวุ้นสดก่อนทำให้เป็นผงแห้ง) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (mg/ml) มา 2 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ 5% กรดไตรคลอโรแอซีติก (trichloroacetic acid) 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- นำสารที่ได้มาปั่นให้ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีด้วยเครื่อง centrifuge นาน 20 นาที
- ดูดส่วนที่เป็นสารละลายใส (supernatant) 2 มิลลิลิตร ผสมกับ 5% ฟีนอล (phenol) 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (conc. sulfuric acid) 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
- นำไปเก็บในตู้อบ (incubator) ที่อุณหภูมิ 25-30 °ซ 20 นาที แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
- คำนวนหาปริมาณน้ำตาลโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่เจือจางให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น