**บทที่ 3**

**วิธีการดำเนินงานวิจัย**

**3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง**

1. เมทานอล (Methanol : CH3OH ,ยี่ห้อ Labscan , ireland)
2. เอทานอล (Ethanol : C2H5OH , ยี่ห้อ Qrec , Newzealand)
3. เอทิล อะซิเตท (Ethyl acetate : C4H8O2 , ยี่ห้อ KemAus™ , Australia)
4. กรดแกลลิก (Gallic acid monohydrate , ยี่ห้อ Loba Chemie™ , India)
5. โซเดียมคาร์บอเนต ( Sodium Carbonate : Na2CO3 , ยี่ห้อ KemAus™ , Australia)
6. สารโฟลิน (Folin – Ciocalteau reagent , ยี่ห้อ Loba Chemie™ , India)
7. กรดแอสคอบิค (Ascorbic Acid : C6H8O6 , ยี่ห้อ KemAus™ , Australia)
8. สารดีพีพีเอช (DPPH) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ,ยี่ห้อ Sigma-Aldrich , USA)
9. น้ำกลั่น (Distilled water)

**3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง**

1. บีกเกอร์ (Beaker)
2. ปิเปต (Pipette)
3. ช้อนตักสาร (Spatula)
4. หลอดหยด (Dropper)
5. หลอดทดลอง (Test tube)
6. ลูกยางดูด (Pipette bulb)
7. กรวยแก้ว (Funnel glass)
8. แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)
9. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
10. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
11. ที่ตั้งหลอดทดลอง (Test tube rack)
12. แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil)
13. ขวดก้นกลม (Round bottom flaks)
14. ถ้วยกระเบื้อง (Crucible)
15. คีมคีบครูซิเบิล (Crucible tongs)
16. ตะแกรง 70 µm (Sieve)
17. ถ้วยสำหรับไมโครเวฟ (Microwave cup)
18. ถุงซิปล็อค (Zip lock bag)
19. โถดูดความชื้น (Desiccator)
20. ถาดอะลูมิเนียม
21. ขาตั้ง (Stands)
22. ขวดเก็บสาร (Reagent bottle)
23. เตาอบลมร้อน (Hot air oven)
24. ไมโครเวฟ (Microwave)
25. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking water bath)
26. เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporators)
27. ตู้เย็น (Refrigerator)
28. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
29. เครื่อง UV-VIS Spectrophotometer (UV)

**3.3 วัตถุดิบ**

รำข้าวจากทั้ง 3 ชุมชน ได้แก่ ชุมชนสนวนนอก ชุมชนสวายจีก และชุมชนโคกเมือง

**3.4 การเก็บตัวอย่างรำข้าว**

 ทำการเก็บรำข้าวจากโรงสีชุมชนบ้านโคกเมือง อำเภอประโคนชัย ชุมชนบ้านสวายจีกและ ชุมชนบ้านสนวนนอก อำเภอเมืองบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์ ในเดือนเมษายน ของปี 2565 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

**3.5 การหาความชื้นของรำข้าว**

อบครูซิเบิลและฝาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักที่แน่นอนของครูซิเบิลแล้วปล่อยให้เย็นที่โถดูดความชื้นเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักครูซิเบิล พร้อมจดน้ำหนักที่คงที่ไว้ (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) จากนั้นชั่งตัวอย่างรำข้าวในข้อ 3.4 จำนวน 2 กรัมพร้อมบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนไว้ (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในครูซิเบิล แล้วนำตัวอย่างไปอบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 - 8 ชั่วโมง แล้วนำออกมาทิ้งให้เย็นที่โถดูดความชื้นเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นชั่งน้ำหนักครูซิเบิล พร้อมจดน้ำหนักที่คงที่ไว้ (ครั้งที่ 1) แล้วนำตัวอย่างไปอบต่อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาทิ้งให้เย็นที่โถดูดความชื้นเป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นชั่งน้ำหนักครูซิเบิล พร้อมจดน้ำหนักที่คงที่ไว้ (ครั้งที่ 2) แล้วนำตัวอย่างไปอบต่อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาทิ้งให้เย็นที่โถดูดความชื้นเป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นชั่งน้ำหนักครูซิเบิล พร้อมจดน้ำหนักที่คงที่ไว้ (ครั้งที่ 3) (กษมา ชารีโคตร, 2559)

**3.6 การเตรียมตัวอย่างรำข้าว**

นำตัวอย่างรำข้าวที่เราเก็บมาจากทั้ง 3 ชุมชนมาคัดขนาดอนุภาคด้วยตระแกรงร่อนขนาด 70 µm แล้วนำมาชั่ง 100 กรัม จากนั้นทำการคงสภาพรำข้าวด้วยการนำมาอบด้วยเครื่องไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นลงด้วยอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน ทำขั้นตอนทั้งหมดนี้ 3 ครั้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างรำข้าวใส่ถุงซิปล็อคแล้วนำเข้าตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป (Malekian.F et al , 2000)

**3.7 การสกัดรำข้าวด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ**

**3.7.1 การสกัดตัวทำละลายเอทานอล**

ชั่งตัวอย่างรำข้าวที่เตรียมจากข้อ 3.5 มาอย่างละ 10 กรัม เติมตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเอทานอลปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเขย่าต่อด้วยเครื่องอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง และนำมากรองด้วยกระดาษกรองแล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและชั่งน้ำหนักโดยทันที (Malekian.F et al , 2000)

**3.7.2 การสกัดตัวทำละลายเมทานอล**

ชั่งตัวอย่างรำข้าวที่เตรียมจากข้อ 3.5 มาอย่างละ 10 กรัม เติมตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเมทานอลปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเขย่าต่อด้วยเครื่องอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง และนำมากรองด้วยกระดาษกรองแล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและชั่งน้ำหนักโดยทันที (Malekian.F et al , 2000)

**3.7.3 การสกัดตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท**

ชั่งตัวอย่างรำข้าวที่เตรียมจากข้อ 3.5 มาอย่างละ 10 กรัม เติมตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดเอทิลอะซิเตทปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเขย่าต่อด้วยเครื่องอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง และนำมากรองด้วยกระดาษกรองแล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสและชั่งน้ำหนักโดยทันที (Malekian.F et al , 2000)

**3.8 การศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดรำข้าวที่ได้จากตัวทำละลายเมทานอลของรำข้าว**

**3.8.1 การเตรียมสารละลายโฟลิน**

เตรียมสารโฟลินความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำลารละลายโฟลินมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เช่นใช้สารละลายโฟลิน 10 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร (Yingngam et al , 2014)

**3.8.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต**

เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร(7.5 % w/v) ชั่ง Na2CO3 anhydrous มา 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (Yingngam et al , 2014)

**3.8.3** **การเตรียมกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก**

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่ง กรดแกลลิก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอล 95% และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเจือจางด้วยเอทานอล95 % ให้มีความเข้มข้นเป็น 0 50 100 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก 200 ไมโครลิตร เติมน้ำปริมาตร 2,500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายโฟลินซิ – โอแคลทู ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบเวลา นำสารละลายผสมมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (Yingngam et al , 2014)

**3.8.4 การเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบของรำข้าว**

เตรียมสารละลายจากสารสกัดรำข้าวเข้มข้นจากข้อ 3.7.2 ปริมาตร 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งตัวอย่างรำข้าว 0.025 กรัม ละลายในเอทานอล 95% และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร จากนั้นนำสารละลายตัวอย่าง 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเจือจางด้วยเอทานอล 95 % ให้มีความเข้มข้นเป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลาย 200 ไมโครลิตร เติมน้ำปริมาตร 2,500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารโฟลินซิ - โอแคลทู ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทั้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบเวลา นำสารละลายผสมมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้แปลผลเทียบกับกราฟมาตรฐานแกลลิกที่ได้จากข้อ 3.8.1

จากสูตร

$$mg GAE /gDW=\left[\frac{OD765-0.00004}{slop}\right]\frac{dilution×volume}{1000×W}$$

 w คือ น้ำหนักของสารสกัดรำข้าว (g)

 Slope คือ ความชันที่ได้จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

 Volume คือ ปริมาตรของสารสกัดทั้งหมด (ml)

 Dilution คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างก่อนนำวิเคราะห์

 OD765 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

**3.9 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ****สารสกัดรำข้าว**

**3.9.1 การเตรียมสารละลายดีพีพีเอช (DPPH)**

เตรียมสารละลายดีพีพีเอช ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (DPPH 0.1 mM) เตรียมโดยการชั่งดีพีพีเอช 0.0039 กรัม ละลายในเอทานอล 95% แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

**3.9.2 การเตรียมกราฟ****มาตรฐานสารละลายกรดแอสคอร์บิก**

ชั่งสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 0.025 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วแล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ความเข้มข้นเป็น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่กำหนด คือ 10 30 50 70 และ 90 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 3 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายดีพีพีเอชปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 40 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างเปอร์เซ็นต์อินฮิบิชั่นกับความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก โดยสามารถคำนวณหาเปอร์เซ็นต์อินฮิบิชั่น ได้จาก (Yingngam et al , 2014)

สมการต่อไปนี้

$\%inhibition= \left[\frac{A\_{0}-\left(A\_{1}-A\_{2}\right)}{A\_{0}}\right]×100$ ……สมการ (1)

โดยที่

A0 = เอทานอล 1 มิลลิลิตร + ดีพีพีเอช 3 มิลลิลิตร

A1 = ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร + ดีพีพีเอช 3 มิลลิลิตร

A2 = ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร + เอทานอล 3 มิลลิลิตร

 **3.9.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดหยาบของรำข้าว**

ชั่งสารตัวอย่าง 0.01 กรัมละลายด้วยเอทานอลแล้วแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่าง 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายดีพีพีเอชปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 40 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกในข้อ 3.9.2 เพื่อหาค่าความสามารถการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช เมื่อเทียบในรูปของกรดแอสคอร์บิก (Yingngam et al , 2014) และหาค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH)