สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยกล่าวถึง (1) วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี (2) การศึกษาความแก่อ่อนของใบบัวบกที่เหมาะที่สุด (3) การศึกษาระยะเวลายังยั้งกิจกรรมเอนไซม์Peroxidase ในใบบัวบก (4) การศึกษาดีซอร์พชั่นไอโซเทิร์ม (5) การศึกษาแบบจำลองการทำแห้ง (6) ศึกษาสมบัติทางกายภาพของใบบัวบกแห้งและคุณสมบัติทางเคมีของใบบัวบกทำแห้ง

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1.1.1 เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) ทศนิยม 4 ตำแหน่งรุ่นBP 210S บริษัท Scientific Promotion ประเทศเยอรมัน

1.1.2 เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) ทศนิยม 2 ตำแหน่งรุ่นBP 3100S บริษัท Scientific Promotion ประเทศเยอรมัน

1.1.3 เครื่องทำแห้งแบบถาด (Tray dryer) บริษัท Armfield ประเทศอังกฤษ

1.1.4 เครื่องทำแห้งแบบลดความชื้นโดยใช้เครื่องสูบ (Heat pump dehumidified dryer) (สิงหนาท พวงจันทน์แดงและคณะ 2546)

1.1.5 เครื่องวัดความเร็วลม (Thermoanemometer) รุ่น SK 27V บริษัท Sato keiryoki ประเทศญี่ปุ่น

1.1.6 เครื่องอบแห้ง (Hot air oven) รุ่นU30 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน

1.1.7 โถดูดความชื้น (Desiccator)

1.1.8 เครื่องวัดวอเตอร์แอ็กติวิตี้ (a_w) AQUALAB รุ่น 3 TE ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.1.9 เครื่อง UV/VIS Spectrophotometric บริษัท Perkin-elmer ประเทศเยอรมัน

1.1.10 ปั๊มดูดอากาศ (Vacuum pump) รุ่น B-169 บริษัท BUCHI ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

1.1.11 เครื่องวัดสี (Hunter Lab) รุ่น Ultra Scan XE รุ่นU 3115 บริษัท Hunter Lab ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.1.12 เตาอบไมโครเวฟยี่ห้อ LG รุ่น MS-1822C ความจุ 18 ลิตรความถี่คลื่นไมโครเวฟ 2,450 MHz 800 วัตต์ ประเทศเกาหลี

1.1.13 เครื่องบันทึกข้อมูล (Data Logger) รุ่น DT800 บริษัท Data Taker ประเทศออสเตรเลีย

1.2 สารเคมี

1.2.1 Ethanol (เกรดHPLC) ผลิตโดยบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ

1.2.2 Sodium hydroxide (NaOH) ผลิตโดยบริษัท Univar ประเทศออสเตรเลีย

1.2.3 Sulfuric acid (Na_2HSO_4) ผลิตโดยบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

1.2.4 2,2 –ไดฟีนิล-1-ไพคลิวไฮดราซิล (2,2 –Diphenyl -1-picrylhydrazyl; DPPH) ของบริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

1.2.5 Sodium carbonate (Na_2CO_3) ของบริษัท Ajax finechem Pty ประเทศนิวซีแลนด์

1.2.6 Folin-Ciocalteu reagent ของบริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

1.2.7 Gallic acid ของบริษัท Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH ประเทศเยอรมัน

2. การศึกษาความแก่อ่อนของใบบัวบกที่เหมาะที่สุด

2.1 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely randomized design)

ปัจจัยคือความแก่อ่อน3ระดับ(เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.6 - 4.5, 4.6 - 5.5 และ 5.6 - 6.5เซนติเมตร

2.2 ขั้นตอนการทดลอง

เลือกใบบัวบก (*Centellaasiatica* (L.) Urban) สายพันธุ์สารคามก้านเขียวโดยซื้อมาจากแหล่งปลูกในจังหวัดขอนแก่นซึ่งเป็นใบบัวบกแหล่งเดียวกันโดยมีลักษณะใบสีเขียวทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสไม่เกิน 24 ชั่วโมงโดยก่อนนำมาทดลองให้นำมาวางทิ้งไว้จนกระทั่งมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาล้างทำความสะอาดด้วยคลอรีนความเข้มข้น 5 ppm แล้วผึ่งให้แห้งนำใบบัวบกมาหาความแก่อ่อนที่เหมาะที่สุดโดยแยกใบบัวบกออกเป็น 3 กลุ่มโดยใช้เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.6 - 4.5, 4.6 - 5.5 และ 5.6 - 6.5 เซนติเมตรตามลำดับนำมาศึกษาปริมาณความชื้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและค่าสีของใบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสมบัติการต้านออกซิเดชันและเส้นใยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely randomized design) แล้วนำกลุ่มที่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและมีสมบัติการต้านออกซิเดชันมากกว่ามาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษาระยะเวลายังยั้งกิจกรรมเอนไซม์Peroxidase ในใบบัวบก (Luh and O'Neal 1975)

3.1 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely randomized design) และใช้การจัดหน่วยทดลองแบบแฟคทอเรียล 2×4 โดยปัจจัยในแผนการทดลองนี้มี 2 ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 คือวิธีการลวกลวกด้วยน้ำเดือดและเครื่องไมโครเวฟ (เตาอบไมโครเวฟยี่ห้อLG รุ่นMS-1822C ความจุ 18 ลิตรความถี่คลื่นไมโครเวฟ 2,450 MHz 800 วัตต์)

ปัจจัยที่ 2 คือเวลาในการลวกซึ่งมี 4 ระดับคือ 15 30 45 และ 60 วินาที

3.2 ขั้นตอนการทดลอง

โดยชั่งตัวอย่างใบบัวบกที่มีความแก่อ่อนเหมาะที่สุดจากข้อ 2 ปริมาณ 10 กรัมและนำไปลวกด้วยน้ำร้อนและเครื่องไมโครเวฟที่เวลาต่างๆได้แก่ 15 30 45 และ 60 วินาทีแล้วจึงนำไปทำให้เย็นด้วยน้ำเย็นอุณหภูมิน้อยกว่า 8 องศาเซลเซียสทันทีกรองเอาน้ำออก 2 นาทีนำมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตรบดให้

ละเอียดแล้วกรองสารละลายที่ได้ผ่านผ้าก๊อส (cotton qauze) นำสารละลายที่ได้ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 2 ชุดคือ

1) ชุดควบคุมจะใช้สารละลายที่ได้จากการกรองตัวอย่างที่ยังไม่ได้ผ่านการลวกปริมาณ 1มิลลิลิตร ในหลอดทดลองและเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรแล้วปิดจุกหลอดทดลองผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเพียงเบาๆ

2) ชุดทดลองจะใช้สารละลายที่ได้จากการกรองตัวอย่างที่ผ่านการลวกที่เวลาต่างๆปริมาณ 1 มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลาย guaiacol ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรโดยไม่ต้องเขย่าแล้วเติมสารละลายhydrogen peroxide (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 0.08 (2.7 มิลลิลิตรของสารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้นร้อยละ3 (v/v)) (Weaver and Daniel 2003) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรแล้วปิดจุกหลอดทดลองผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเพียงเบาๆแล้วจับเวลาทันที

ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีภายใน3.5นาทีหรือเกิดการเปลี่ยนสีน้ำตาลแดงขึ้นภายหลัง3.5นาทีให้ถือว่าผลการทดลองเป็นลบคือไม่มีการทำงานของเอนไซม์

ถ้ามีการทำงานของเอนไซม์จะสังเกตเห็นการเกิดสีน้ำตาลขึ้นภายใน 3.5 นาทีถ้าการเปลี่ยนสีมีเพียงเล็กน้อยถือว่ามีการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย (Trace) การลวกที่ให้ผลเป็นลบถือว่าเป็นการลวกที่เพียงพอ

จากนั้นชั่งตัวอย่างใบบัวบกที่มีความแก่อ่อนเหมาะที่สุดจากข้อ2ปริมาณ10กรัมและนำไปลวกด้วยน้ำร้อนและเครื่องไมโครเวฟที่เวลาต่างๆได้แก่ 15 30 45 และ 60 วินาทีแล้วจึงนำไปทำให้เย็นด้วยน้ำเย็นอุณหภูมิน้อยกว่า8องศาเซลเซียสทันทีกรองเอาน้ำออก2นาทีนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและสมบัติการต้านออกซิเดชันเพื่อดูแนวโน้มการลดลงของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและสมบัติการต้านออกซิเดชันเมื่อเวลาการลวกเพิ่มขึ้นโดยการลวกด้วยน้ำร้อนและไมโครเวฟแล้วจึงนำผลที่ได้มาเลือกสภาวะการลวกใบบัวบกที่เหมาะที่สุด

4. การศึกษาซอร์พชันไอโซเทิร์มของใบบัวบกสดและใบบัวบกที่ผ่านการลวก

นำใบบัวบกที่ทำความสะอาดแล้วไปหาปริมาณความชื้นเริ่มต้น (AOAC 2000) จากนั้นนำใบบัวบกประมาณ30กรัมนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแบบถาด (Tray Drier) รุ่นVCP8-A บริษัทAmfield, Hampshire ประเทศอังกฤษที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสความเร็วลมร้อน 0.5 เมตร/วินาที (Sun and Woods 1994) สุ่มตัวอย่างออกมาที่เวลา 0.5 1 1.5 2 2.5 3 และ 3.5 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณความชื้นหรือเพื่อให้ได้ใบบัวบกที่มีความชื้นต่างกัน7ระดับ (Phoungchandang and Woods 2000)

ใส่ตัวอย่างใบบัวบกที่ผ่านการทำแห้งดังกล่าวและทราบความชื้นที่แน่นอนในช่องสำหรับวัดWater activity (a_w) ของเครื่อง Aqua Lab รุ่น Series 3TE เมื่อเข้าสู่สภาวะสมดุลอ่านค่าความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศที่จุดสมดุลที่อุณหภูมิ 20 35 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับเลือกแบบจำลองดีซอร์พชันที่เหมาะที่สุดโดยแทนค่าลงในสมการดีซอร์พชัน (สมการที่ (2.6)-(2.13)) เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการทำนายของสมการด้วยNonlinear regression

5. การศึกษาแบบจำลองการทำแห้ง

5.1 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely randomized design) และใช้การจัดหน่วยทดลองแบบแฟคทอเรียล 2×2×3 โดยปัจจัยในแผนการทดลองนี้มี3ปัจจัยคือ

ปัจจัยที่ 1 คือวัตถุดิบใบบัวบกที่ผ่านการลวก (ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3) และใบบัวบกที่ไม่ผ่านการลวก

ปัจจัยที่ 2 คือเครื่องมือที่ใช้ในการทำแห้งซึ่งมี 2 เครื่องได้แก่เครื่องทำแห้งแบบถาดและเครื่องทำแห้งแบบลดความชื้นโดยใช้เครื่องสูบความร้อน

ปัจจัยที่ 3 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งซึ่งมี 3 ระดับคือ 40 50 และ 60 องศาเซลเซียส

5.2 ขั้นตอนการทดลอง

นำใบบัวบกที่ทำความสะอาดแล้วไปหาปริมาณความชื้นเริ่มต้น (AOAC 2000) จากนั้นนำใบบัวบกประมาณ30กรัมไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบถาด (Amfield, Hampshire ประเทศอังกฤษ)และแบบลดความชื้นโดยใช้เครื่องสูบความร้อน (สิงหนาทพวงจันทน์แดงและคณะ 2546) ที่อุณหภูมิ 40 50 และ60 องศาเซลเซียสความเร็วลมร้อน 0.5 เมตร/วินาที (Sun and Woods 1994) บันทึกน้ำหนักตัวอย่างก่อนทำแห้งและระหว่างการทำแห้งทุก5นาทีด้วยเครื่องบันทึกข้อมูล (Data logger) รุ่น DT800 บริษัท Datataker ประเทศออสเตรเลียจากนั้นคำนวณปริมาณความชื้นที่เวลาการทำแห้งใดๆด้วยสมการที่ (3.1) และวัดความชื้นของอากาศร้อนระหว่างการทำแห้งทุกๆ 30 นาทีและความชื้นของอากาศนอกเครื่องทำแห้งทุกๆ 1 ชั่วโมงโดยสมการที่ (3.1) ทำแห้งต่อจนกระทั่งใบบัวบกมีWater activity น้อยกว่า 0.6 แล้วทำการคัดเลือกแบบจำลองการทำแห้งที่เหมาะที่สุดโดยการใช้ความชื้นสมดุลของใบบัวบกที่ได้จากการทำนายแทนค่าความชื้นเริ่มต้นและค่าความชื้นที่เวลาทำแห้งต่างๆกันและความชื้นสมดุลลงไปในแบบจำลองการทำแห้ง (สมการที่ (2.21)-(2.24)) ความสัมพันธ์ของค่าคงที่ K กับอุณหภูมิของอากาศร้อนโดยใช้แบบจำลองของ Arrhenius (สมการที่ (2.25)) ค่าคงที่N (Drying exponent) (สมการที่ (2.26)) และหาสัมประสิทธิ์การแพร่ (D_{eff}) (สมการที่ (2.27)) แล้วเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการ Nonlinear regression

6. การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของใบบัวบกทำแห้ง

6.1 การวัดความชื้นเริ่มต้น (AOAC 2000)

นำตัวอย่างใบบัวบกประมาณ3กรัมใส่ภาชนะอะลูมิเนียมที่ผ่านการอบและชั่งน้ำหนักแล้วไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่จากนั้นนำตัวอย่างที่อบแล้วเข้าโถดูดความชื้นจนเย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาปริมาณความชื้นจากน้ำหนักที่หายไปดังนี้

$$\text{ความชื้น(ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้}} \qquad (3.1)$$

6.2 การวิเคราะห์ความชื้นระหว่างการทำแห้ง

เริ่มจากการชั่งน้ำหนักถาดและน้ำหนักวัตถุดิบกับถาดจากนั้นบันทึกน้ำหนักของตัวอย่างถาดและน้ำหนักวัตถุดิบกับถาดเป็นระยะระหว่างที่ทำการทดลองแล้วคำนวณความชื้นของผลิตภัณฑ์ที่เวลา (t) ใดๆดังนี้

$$X_t = \left[\left(mX_i - W_1\right)/\left(m - W_1\right)\right] \tag{3.2}$$

โดย X_t = ความชื้นที่เวลาใดๆเป็นค่าทศนิยม (w.b.)

X_i = ความชื้นเริ่มต้นเป็นค่าทศนิยม (w.b.)

m = น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)

W_1 = น้ำหนักที่หายไป (กรัม)

จากนั้นคำนวณปริมาณความชื้นมาตรฐานแห้ง (Dry basis) ดังนี้

$$\%\text{ความชื้น (d.b.)} = \frac{X_i(w.b.)}{1 - X_i(w.b.)} \times 100 \tag{3.3}$$

6.3 การวัดค่าสี

ศึกษาการวัดค่าสีโดยใช้ระบบ CIELAB วัดค่าสีของใบบัวบกโดยการสุ่มตัวอย่างใบบัวบกสดและใบบัวบกแห้งที่สภาวะต่างๆวัดค่า L*, a* และ b* โดยค่า L* คือความสว่าง (Lightness) ซึ่งมีค่าตั้งแต่0คือไม่มีความสว่างหรือสีดำถึง 100 คือมีความสว่างสูงสุดหรือสีขาวค่าa* คือความแดง (Redness) เมื่อมีค่าเป็นบวก (+) หรือค่าความเขียว (Greenness) เมื่อมีค่าเป็นลบ (-) และค่า b* คือค่าความเหลือง (Yellowness) เมื่อมีค่าเป็นบวก (+) หรือค่าความน้ำเงิน (Blueness) เมื่อมีค่าเป็นลบ (-) โดยใช้เครื่องHunter Lab รุ่น Ultrascan XE บริษัท Hunter Lab ประเทศสหรัฐอเมริกาแล้วหาค่าสีในรูปของ ΔL^*, Δa^* และ Δb^* โดยวัดจากค่าสีของใบบัวบกก่อนการทำแห้งลบด้วยค่าสีของใบบัวบกหลังการทำแห้งและค่าสีของใบบัวบกก่อนการทำแห้งลบด้วยค่าสีของใบบัวบกหลังการดูดน้ำกลับคืนแล้วนำมาคำนวณค่าการเปลี่ยนแปลงค่าสีรวม (Total color difference, ΔE^*) คือความแตกต่างของค่าสีทั้งหมดจากค่า ΔL^*, Δa^* และ Δb^* ดังนี้

$$\Delta E^* = \left[\left(\Delta L^*\right)^2 + \left(\Delta a^*\right)^2 + \left(\Delta b^*\right)^2\right]^{1/2} \tag{3.4}$$

6.4 อัตราส่วนการทำแห้ง (Drying ratio)

โดยศึกษาอัตราส่วนค่าน้ำหนักของใบบัวบกหลังการตัดแต่งก่อนการทำแห้งหารด้วยค่าน้ำหนักหลังการทำแห้ง (สิงหนาทพวงจันทน์แดง2537)

6.5 อัตราส่วนการดูดน้ำกลับคืน (Rehydration ratio) (Phoungchandang 1986)

นำตัวอย่างใบบัวบกแห้งหนัก5กรัมมาแช่น้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาทีจากนั้นนำไปผ่านเครื่องกรองเพื่อกรองเอาน้ำออกนำตัวอย่างใบบัวบกที่ได้มาชั่งน้ำหนักหลังการดูดน้ำกลับคืนซึ่งอัตราส่วนการดูดน้ำกลับคืนคือน้ำหนักของใบบัวบกหลังการดูดน้ำกลับคืนหารด้วยน้ำหนักใบบัวบกแห้งก่อนการดูดน้ำกลับคืน

6.6 การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (AOAC 2000)

1) ใส่ตัวอย่างอาหาร 0.5 กรัมลงใน crucible ที่แห้งและทราบน้ำหนักแน่นอนเติม 1.25% H_2SO_4 จำนวน 200 มิลลิลิตรให้ความร้อนอย่างเร็วและให้สารละลายเดือดเบาๆนาน 30 นาทีล้างด้วยน้ำร้อนประมาณ5 ครั้ง

2) เติม 1.25% NaOH จำนวน 200 มิลลิลิตรให้ความร้อนอย่างรวดเร็วและให้สารละลายเดือดเบาๆ นาน30นาทีล้างด้วยน้ำร้อนประมาณ5ครั้ง

3) นำ Crucible ที่มีเส้นใยหลังการย่อยไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมงจากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก (ก่อน)

4) นำไปเผาให้กลายเป็นเถ้าใน Muffle furnace ที่อุณหภูมิ 520 องศาเซลเซียสนาน 8 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะเป็นเถ้าสีขาวจนหมดทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก (หลัง)

5) คำนวณหาปริมาณเส้นใย (Crude fiber)

$$\text{ปริมาณเส้นใย (\%โดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนเผาและหลังเผาx 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}} \qquad (3.5)$$

6.7 การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolics)

ดัดแปลงจากวิธีของ Javanmardi and others (2003)

1) การสกัดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง10กรัมผสมในเอทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาณ 100 มิลลิลิตรเขย่าในที่มืด 4.5 ชั่วโมงที่ 25 องศาเซลเซียสกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ระเหยสารเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2) การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ปิเปตสารสกัด 300 ไมโครลิตรเติมลงใน 1.5 มิลลิลิตร Folin-Ciocalteu's reagent จากนั้นเติม 1.2 มิลลิลิตรของโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 7.5 ผสมให้เข้ากันวางไว้ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตรและเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก

6.8 การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity)

ดัดแปลงจากวิธีของJavanmardi and others (2003)

1) การสกัดตัวต้านออกซิเดชัน

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัมผสมในเอทานอลร้อยละ 99.9 ปริมาณ 100 มิลลิลิตรเขย่าในที่มืด 4.5 ชั่วโมงที่ 25 องศาเซลเซียสกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ระเหยสารละลายเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2) การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชัน

โดยเตรียมสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น $6x10^{-5}$ โมลต่อลิตรของสารละลาย DPPH ในเมทานอลปิเปตสารละลายปริมาณ3มิลลิลิตรเติมน้ำกลั่นขจัดไอออนแล้ว (deionized distilled water; DI) 77 ไมโครลิตรทดสอบดูการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรในเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อทดสอบความเสถียรของสาร DPPH โดยใช้เอทานอลร้อยละ 99.9 เป็นสารละลายไร้ตัวอย่าง

(blank) โดยปิเปตสารละลาย DPPH 3 มิลลิลิตรลงในขวดแก้วใสขนาดเล็กเติมสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 77 ไมโครลิตรเก็บในที่มืดเป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้องและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

$$\text{การคำนวณ\%inhibition} = [(A_S - A_A) / A_S] \times 100 \quad (3.6)$$

เมื่อ A_S = ค่าแอบซอร์แบนซ์ของสารละลาย DPPH

A_A = ค่าแอบซอร์แบนซ์ของตัวอย่าง