ภาคผนวก

การวิเคราะห์ผลผลิตร้อยละ

วิธีการ

1. นำขวดที่ใช้ในการวัดร้อยละน้ำหนักตัวอย่างไปอบด้วยตู้อบลมร้อน จนมีน้ำหนักคงที่ จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นและเก็บไว้ในโถดูดความชื้น
2. จากนั้นนำขวดไปชั่งน้ำหนัก บันทึกเก็บไว้
3. นำสารสกัดที่ผ่านการระเหยตัวทำละลายออกแล้ว เทใส่ในขวด
4. จากนั้นนำขวดไปชั่งน้ำหนักอีกครั้ง
5. นำไปคำนวณหาร้อยละของน้ำตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ผลผลิตร้อยละ} = \frac{(\text{น้ำหนัก}_{\text{ตัวอย่าง}} - \text{น้ำหนัก}_{\text{ควบคุม}}) \times 100}{\text{น้ำหนัก}_{\text{ควบคุม}}}$$

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

สารเคมี

1. สาร Folin-Ciocaltue phenol reagent ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (ปริมาณต่อปริมาณ) โดยใช้ Folin-Ciocaltue phenol reagent 10 มิลลิลิตร ปรับให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

2. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 % ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 7.5 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่างจำนวน 2 มิลลิลิตร

2. ใส่สารละลาย Folin-Ciocaltue phenol reagent 5 มิลลิลิตร

3. ผสมให้เข้ากันเครื่องผสม Vortex mixer ทิ้งไว้ 10 นาที

4. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

7. ทำ blank ควบคู่ด้วยโดยการใช้น้ำกลั่นแทน

วิธีทำ Standard

1. ชั่ง Gallic acid 0.1 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายความเข้มข้น 1,000 ppm

2. เจือจางสารละลาย Gallic acid ความเข้มข้น 1,000 ppm ให้มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm

การวิเคราะห์แอนโทไซยานิน

สารเคมี

1. เตรียมสารละลาย 0.025 M โปแตสเซียมคลอไรด์ pH 1.0 โดยชั่ง KCl 0.1864 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย KOH หรือ HCl

2. เตรียมสารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 โดยชั่งโซเดียมอะซีเตต 0.2050 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และประบปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วยอะซีติกแอซิด 0.025 M

วิธีการ

1. ปิเปต 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกมันเทศ และเติมโปแตสเซียมครอไรด์ pH 1.0 8 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 และ 700 นาโนเมตร

2. ปิเปต 1 มิลลิลิตรของตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกมันเทศ และเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 8 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 และ 700 นาโนเมตรโดยใช้น้ำเปล่าเป็น blank

การคำนวณ

คำนวณปริมาณแอนโทไซยานินเป็นมิลลิกรัมของ cyaniding 3 – glucoside equivalent ต่อ 100 กรัมของสารสกัดจากเปลือกมันเทศ

ปริมาณแอนโทไซยานิน = $[(A_{515} - A_{700}) pH_{1.0} - (A_{515} - A_{700}) pH_{14.5}] \times MW \times 1000/E \times C$

MW คือ น้ำหนักโมเลกุลของcyaniding 3 – glucoside เท่ากับ 449.2

E คือ molar absorptivity ของ cyaniding 3 – glucoside เท่ากับ 26,900

C คือ ความเข้มข้นของ buffer ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

สารเคมี

1. สารละลาย sodium nitrite ร้อยละ 5 โดยชั่งสารละลาย 5 กรัม ปรับให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

2. สารละลาย aluminium chloride ร้อยละ 10 โดยชั่งสารละลาย 10 กรัม ปรับให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

3. สารละลาย 1 M sodium hydroxide โดยชั่ง 40 กรัม ปรับให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่างจำนวน 500 ไมโครลิตร

2. เติมน้ำกลั่นจำนวน 2 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลาย sodium nitrit ร้อยละ 5 จำนวน 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. เติมสารละลาย aluminium chloride ร้อยละ 10 จำนวน 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นทิ้งไว้นาน 5 นาที

5. เติมสารละลาย sodium hydroxide จำนวน 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

7. ทำ blank ควบคู่ด้วยโดยการใช้น้ำกลั่นแทน

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH

สารเคมี

เตรียมสาร DPPH โดยชั่ง DPPH 0.0020 กรัม ละลายในเมทานอล 50 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร
2. เติม DPPH 2 มิลลิลิตร
3. เก็บไว้ในที่มืดนาน 60 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร
5. ทำ blank ควบคู่ด้วยโดยการใช้เมทานอลกลั่นแทน

การคำนวณ

$$\% \text{ Inhibition DPPH} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{sample}) \times 100}{Abs_{control}}$$

$Abs_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

Abs_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

การตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS

สารเคมี

1. ชั่งสาร ABTS 0.0192 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย ABTS 7 M

2. ชั่งสาร Potassium persulfate 0.3784 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย Potassium persulfate ที่มีความเข้มข้น 140 M

3. ผสมสารละลาย ABTS 2 มิลลิลิตร กับ สารละลาย Potassium persulfate 35.5 ไมโครลิตรในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้งาน จะได้ stock ABTS radical cation

4. เจือจาง stock ABTS radical cation ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.700 ± 0.02 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน)

วิธีการ

1.เจือจางสารสกัดด้วยเมทานอล ให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายคือ 100, 200, 300, 400 และ 500 ppm

2. ปิเปตตัวอย่างจำนวน 0.1 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง และใช้น้ำกลั่นเป็น blank (ใส่แทนสารสกัดตัวอย่าง)

3. เติม ABTS 2.9 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

5. หา % Inhibition แล้วนำไป plot กราฟ หา IC_{50}

การคำนวณ

$$\% \text{ Inhibition ABTS} = \frac{(Abs_{control} - Abs_{sample}) \times 100}{Abs_{control}}$$

$Abs_{control}$ = ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS

Abs_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value)

สารเคมี

1. กรดอะซิติกและสารละลายคลอโรฟอร์ม ผสมกันด้วยอัตราส่วน 3:2

2. สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (อิ่มตัว)

3. สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 M โดยการชั่งสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 2.4817 กรัม ปรับให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

4. สารละลายแป้ง (อินดิเคเตอร์) 1% ในน้ำกลั่น โดยชั่งแป้งมัน 1 กรัม เติมในน้ำ 80 มิลลิลิตร ละลายเป็นเนื้อเดียวกันต้มจนน้ำแป้งใส ทิ้งไว้ให้เย็น

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างที่นำมาทดสอบ 5.00 ± 0.05 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายกรดอะซิติก - คลอโรฟอร์ม 30 มิลลิลิตร หมุนขวดเบาๆจนตัวอย่างละลาย

3. เติมสารละลายอิ่มตัวโพแทสเซียมไอโอไดด์ 0.5 มิลลิลิตร

4. เติมสารละลายแป้ง (อินดิเคเตอร์) 0.5 มิลลิลิตร

5. นำไปไตเตรตกับ 0.1 M สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต ไตเตรตจนสารละลายไม่มีสี (ถ้าปริมาตรที่ใช้น้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตร ให้ไตเตรตซ้ำโดยใช้สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.01 M แทน)

6. เตรียม blank โดยการไตเตรต blank ปริมาณสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 M ที่ใช้ต้องไม่เกิน 0.1 มิลลิลิตร

การคำนวณ

$$\text{Peroxide Value} = \frac{(S - B)(M)(100)}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใช้}}$$

S คือ ปริมาณที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง

B คือ ปริมาณที่ใช้ในการไตเตรต blank

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต เท่ากับ 0.1

การวิเคราะห์ ค่ากรดไทโอบาร์บิทิวริก (Thiobarbituric acid)

สารเคมี

1. 1-butanol

2. 2-Thiobarbituric acid

3. TBA reagent เตรียมได้จากการละลาย 2 - thiobarbituric acid 200 มิลลิกรัม ใน 1-butanol 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วนำมากรองเพื่อกำจัดสิ่งตกค้างที่ไม่ละลายออก แล้วปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร ด้วย 1-butanol

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างทดสอบ 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย 1-butanol

2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลาย TBA 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ปิดหลอดทดลอง แล้วเขย่าเบาๆให้เข้ากัน

3. นำหลอดทดลองไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 120 นาที

4. นำหลอดทดลองออกจากอ่างควบคุมอุณหภูมิ และทำให้เย็นโดยการแช่ในน้ำประมาณ 10 นาทีหรือจนกว่าจะถึงอุณหภูมิห้อง

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

6. เตรียม blank แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยค่าการดูดกลืนแสงของ blank ไม่ควรเกิน 0.1

การคำนวณ

$$TBA = \frac{7.8 \times (A - B)}{M}$$

A คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

M คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การวิเคราะห์ ค่าพาราแอนนิซิดีน (*p* - Anisidine value)

สารเคมี

1. Isooctane (2,2,4 trimethylpentane)

2. Glacial acid

3. *p*-Anisidine reagent เตรียมโดยการชั่ง 0.25 กรัม ละลายใน glacial acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 0.5 - 4.0 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย isooctane

2. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร (Ab)

3.ปิเปตตัวอย่างที่ปรับปริมาตรด้วย isooatane 5 มิลลิลิตร เติม *p*-Anisidine reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร (As)

5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่า *p*-AV

การคำนวณ

$$p\text{-AV} = \frac{25 \times (1.2As - Ab)}{M}$$

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างผสมกับ*p*-Anisidine reagent

Ab คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

M คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

การวิเคราะห์ ค่ากรดไขมันอิสระ (Free fatty acid)

สารเคมี

1. แอลกอฮอล์ 95 %

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 4 กรัมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้ว

3. เติมแอลกอฮอล์ที่มีสภาพเป็นกลาง 50 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง เขย่าให้ตัวอย่างละลายในแอลกอฮอล์

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างน้ำมันให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-10 กรัมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

2. เตรียมสารละลายแอลกอฮอล์ (ปรับสภาพให้เป็นกลาง) โดยเติมฟีนอล์ฟทาลีน 3-5 หยด หยดโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล โดยหยดทีละหยดพร้อมทั้งเขย่าจน ได้สีชมพูถาวร

3. เติมแอลกอฮอล์ที่มีสภาพเป็นกลาง 50 ml ลงในตัวอย่าง เขย่าอย่างแรงให้ตัวอย่างละลายในแอลกอฮอล์

4. ไตเตรทสารละลายตัวอย่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งได้สีชมพูถาวร

5. คำนวณปริมาณกรดไขมันอิสระจากสูตร

การคำนวณ

$$\text{ร้อยละ FFA} = \frac{(\text{สารละลายปริมาตรด่างที่ใช้} \times \text{ความเข้มข้นด่าง} \times \text{โมเลกุลของกรดไขมัน})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ความเข้มข้นของสารละลายด่าง = 0.1 นอร์มอล

โมเลกุลของกรดไขมัน = น้ำหนักของกรดไขมันของน้ำมันตัวอย่างที่ใช้ หน่วยเป็น กรัม / โมล