

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ขั้นตอนการเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์

การเตรียมสารตรวจวิเคราะห์ TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)

1. สารละลาย Phosphoric acid 0.44 mol/L

เตรียมจากการเจือจาง 10 ml ของ ultra-pure H_3PO_4 (relative density 1.69, 44.0 mol/L, 850 g/l; J.T. Baker Co., Phillipsburg, NJ) ใน น้ำกลั่น 1 L

2. สารละลาย TBA 42 mol/L

เตรียมโดยการใส่ 4,6-dihydroxy-2 thiopyrimidine (no. T-5500, molecular mass 144.2 Da; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ปริมาณ 0.6 g ลงในน้ำกลั่น 80 ml จากนั้นนำไปคนให้ละลายบน hot-plate ที่อุณหภูมิ 50-55°C แล้วจึงนำมาทำให้เย็นลงที่ 25°C และเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้องไว้ได้นาน 2 สัปดาห์

3. สารละลายมาตรฐาน TEP

เตรียมโดยใช้ 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane reagent (anhydrous, relative density 0.918, molecular mass 220.31 Da, purity 97%, no, T-9889; Sigma Chemical Co.) ปริมาณ 60 μ L ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น โดยเตรียมเก็บไว้ได้หนึ่งเดือนที่อุณหภูมิ 4°C

สำหรับ intermediate standard เตรียมโดยใช้ปิเปตดูด 0.5 ml ของ สารละลาย TEP จาก stock ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 50 ml และเจือจางด้วยน้ำกลั่น เตรียมเก็บไว้ได้ 1 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C

สำหรับสารละลายมาตรฐาน TEP ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40, and 50 μ mol/L เตรียมโดยใช้ปิเปตดูดสาร TEP intermediate standard 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 ml ตามใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 12x75 ml ตามลำดับและเจือจางด้วยน้ำกลั่น 0.9, 0.8, 0.7, 0.6 และ 0.5 ml ตามลำดับ เตรียมเก็บไว้ได้ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4°C

การเตรียมสารตรวจวิเคราะห์ Total antioxidant

1. PBS (1X) pH 7.4

โดยชั่ง NaCl 8 g, KCl 0.20 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g เติมน้ำจนครบ 1 Litre

2. Stock ABTS

ชั่ง ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid 300 uM) จำนวน 0.16 g ลงในน้ำกลั่น 1,000 ml

3. Myoglobin

ชั่ง Myoglobin 25 uM (Sigma-Aldrich) 10 mg ลงไปละลายใน PBS ปรับปริมาตร ให้เป็น 2,850 µL

4. Trolox (Sigma-Aldrich) ที่ความเข้มข้น 1.5 mM

โดยชั่ง Trolox 0.375 g ลงในน้ำกลั่น 1,000 ml

5. Hydrogenperoxide % assay 30 นำมาทำให้เป็น 5%

โดยการนำมาจำนวน 16.6 ml เติมน้ำจนครบ 100 ml