

ภาคผนวก

วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

1. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (AOAC., 1995)

1.1 วิธีวิเคราะห์

1.1.1 นำถั่วยอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด อบที่อุณหภูมิ 105 °ซ นาน 3 ชั่วโมง นำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

1.1.2 ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในถั่วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว

1.1.3 นำถั่วยอลูมิเนียมพร้อมตัวอย่างอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 105 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกมาใส่โถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก

1.1.4 นำมาอบซ้ำอีกครั้ง ละ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่

1.2 วิธีคำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น.น.ตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น.น.ตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น.น.ตัวอย่างก่อนอบ}}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC., 1995)

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.5 กรัม และโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 6.5 กรัม

2.1.2 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ($\text{conc. H}_2\text{SO}_4$)

2.1.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 40

2.1.4 ไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) 0.1 N

2.1.5 กรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4

2.1.6 อินดิเคเตอร์ที่เป็นสารผสมระหว่างเมทิลเรด เมทิลีนบลู และโบรโมคลีโซลกรีน

2.2 การเตรียมอินดิเคเตอร์ผสม

2.2.1 ชั่งเมทิลเรด 0.152 กรัม และเมทิลีนบลู 0.082 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้นร้อยละ

2.2.3 ผสมสารละลายจากข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ในอัตราส่วนปริมาตรเท่ากับ 5:2 ตามลำดับ

2.3 การเตรียมสารละลาย HCl 0.1 N

2.3.1 เลือกขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร ที่สะอาดบรรจุน้ำกลั่นครึ่งขวด ใช้ปิเปต ปล่อยกรดไฮโดรคลอริก (AR-grade) เข้มข้น จำนวน 8.2 มิลลิลิตร ลงในขวดที่มีน้ำกลั่นอยู่ผสมโดยหมุนขวดช้าๆ ปรับปริมาตรให้ถึงปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันโดยปิดจุกให้แน่นคว่ำขวดไป-มา สารละลายนี้มีความเข้มข้นโดยประมาณ 0.1 N

2.3.2 Standardization สารละลายกรด HCl โดยใช้โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

2.3.3 เลือกบิวเรตสะอาด และแห้ง กลั้วด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมได้ ปล่อยกรดออกจากบิวเรต บรรจুবิวเรตด้วยกรดจนถึงขีดที่สามารถอ่านตัวเลขได้ง่าย นำโซเดียมคาร์บอเนตอบใน hot air oven ที่ 105°C นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งโซเดียมคาร์บอเนตประมาณ 0.13 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด เติมน้ำกลั่นประมาณ 20 มิลลิลิตร หยดอินดิเคเตอร์ที่เตรียมไว้สามหยด อินดิเคเตอร์นี้มีสีเขียวในสารละลายต่าง และเปลี่ยนไปเป็นสีม่วงอมชมพูในสารละลายกรด นำไปไทเทรตกับกรด โดยในช่วงแรกเมื่อเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงอมชมพูให้นำไปตั้งบน hot plate จนสารละลายกลับมาเป็นสีเขียวเหมือนเดิม ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปไทเทรตต่อจนกระทั่งเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงอมชมพู จดบันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้ทั้งหมด ทำการทดลองซ้ำ

2.4 การคำนวณความเข้มข้นกรด HCl

มวลโมเลกุลของกรดโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เท่ากับ 106 แต่มีน้ำหนักสมมูลเท่ากับ 53.0 นั่นคือ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1 N จำนวน 1000 มิลลิลิตร มีปริมาณสาร 53 กรัม โดยให้

Y = กรัมของโซเดียมคาร์บอเนต

x = มิลลิลิตรของไฮโดรคลอริกที่ต้องใช้ทำปฏิกิริยากับโซเดียมคาร์บอเนต y กรัม

z = ค่าเป็น N ของกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมได้จริง

จากการไทเทรต y กรัมโซเดียมคาร์บอเนตถูกทำให้สะเทินด้วย x มิลลิลิตรของ z N.HCl จำเป็นต้องคำนวณปริมาณกรดที่ถูกทำให้สะเทินด้วยโซเดียมคาร์บอเนต 53.0 กรัม

ซึ่งมีค่าเท่ากับ $(x \ 53.0)/y$ มิลลิลิตรของ z N.HCl

เนื่องจาก 1000 มิลลิลิตรของ 1 N โซเดียมคาร์บอเนตประกอบด้วยสาร 53.0 กรัม ดังนั้น 1000 มิลลิลิตร ของ 1 N โซเดียมคาร์บอเนตถูกทำให้สะเทินด้วย $(x \ 53.0)/y$ มิลลิลิตรของ z N.HCl ดังนั้น จะได้สมการดังนี้

$$[x \ 53.0] \text{ มิลลิลิตรของ } z \text{ N.HCl} = 1000 \text{ มิลลิลิตรของ } 1 \text{ N.HCl}$$

$$\text{เพราะฉะนั้น HCl (M)} = (19.868 \times W_1)/(A_1 + A_2)$$

A_1 = ปริมาตรของ HCl ไทเทรตครั้งแรก

A_2 = ปริมาตรของ HCl ไทเทรตครั้งที่สอง

W_1 = น้ำหนักของ Na_2CO_3

2.5 วิธีวิเคราะห์

2.5.1 ขั้นตอนการย่อย

2.5.1.1 ชั่งตัวอย่าง (ของแข็ง) ให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1.5 กรัม (ตัวอย่างเหลว ใช้ปริมาตร 10-15 มิลลิลิตร) ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน

2.5.1.2 เติม catalyst ซึ่งเป็นส่วนผสมของ K_2SO_4 6.5 กรัม กับ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 กรัม ในลักษณะเม็ด

2.5.1.3 เติมกรดซัลฟริกเข้มข้น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2.5.1.4 วางหลอดย่อยโปรตีนในเตาย่อยแล้วประกอบสายยางระหว่างสายครอบเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย

2.5.1.5 เปิดสวิตช์เครื่องดักจับไอกรด และเตาย่อยตั้งอุณหภูมิประมาณ $400^{\circ}C$ และย่อยประมาณ 2 ชั่วโมงจนสารละลายใส

2.5.1.6 ปลอ่ยทิ้งให้เย็น

2.5.1.7 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บไว้กลั่นต่อไป

2.5.1.8 ทำ blank ด้วย

2.5.2 ขั้นตอนการกลั่น และไตเตรท

2.5.2.1 นำสารละลายตัวอย่างที่ย่อยได้ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่างของขวดชุดกลั่น แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป จนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลให้ได้ประมาณ 150 มิลลิลิตร

2.5.2.2 นำขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 จำนวน 20 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด แล้วนำไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควมแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

2.5.2.3 เปิดสวิตช์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นควมแน่น

2.5.2.4 นำไปไตเตรท โดยเก็บของเหลวที่กลั่นได้ประมาณ 150 มิลลิลิตร

2.5.2.5 ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วยไฮโดรคลอริก 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็น สีม่วง

2.6 วิธีการคำนวณปริมาณโปรตีน

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{A - B \times N \times 14.007 \times F}{W}$$

เมื่อ A = ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับ blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรด (N)

F = แฟคเตอร์ของตัวอย่าง (ถ้าใช้แฟคเตอร์ 5.71)

W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC., 1995)

3.1 สารเคมี

petroleum ether

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 อบขวดกันกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตรในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำ ออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นกระทั่งอุณหภูมิของขวดกันกลมลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

3.2.2 ทำซ้ำเช่นข้อที่ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3.2.3 ชั่งตัวอย่างอาหารบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลี เพื่อให้สารละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ

3.2.4 นำตัวอย่างใส่ลงในชอคเลต เติมสารละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดกันกลมหาไขมัน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน

3.2.5 ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัดไขมันพร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น และเปิดสวิทช์ให้ความร้อน

3.2.6 ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.2.7 เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากชอคเลต และกลั่นเก็บสารทำละลายจนเหลือสารทำละลายในขวดกันกลมเพียงเล็กน้อยด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายระบบสุญญากาศ

3.2.8 นำขวดหาไขมันไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 °ซ จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นกระทั่งอุณหภูมิของขวดกันกลมลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

3.2.9 อบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

3.3 วิธีคำนวณปริมาณไขมัน

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{(W3 - W1) \times 100}{W2}$$

เมื่อ $W1$ = น้ำหนักขวดกันกลม (กรัม)

$W2$ = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

$W3$ = น้ำหนักตัวอย่างขวดกันกลมหลังนำไปอบ (กรัม)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย (AOAC., 1995)

4.1 การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่หาปริมาณไขมันแล้วประมาณ 1-2 กรัม (W_1) ถ่ายตัวอย่างลงในปีกเกอร์

4.2 วิธีวิเคราะห์

4.2.1 ตวงสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 1.25 จำนวน 200 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงถ่ายใส่ปีกเกอร์ที่มีตัวอย่างอยู่

4.2.2 นำไปต้มบนเตาไฟฟ้าโดยใช้ขวดกันกลมปิดปากของปีกเกอร์ให้สนิท เพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย เมื่อเริ่มเดือดจับเวลา 30 นาที

4.2.3 กรองทันทีด้วยกรวยบุชเนอร์ที่มีกระดาษกรองเบอร์ 541 โดยใช้แรงสุญญากาศผ่านขวดแก้วสำหรับกรอง

4.2.4 ฉีดล้างสิ่งที่เหลือนบนปีกเกอร์ด้วยน้ำร้อนหลายๆ ครั้งลงในกรวยบุชเนอร์

4.2.5 ล้างสิ่งที่ตกค้างบนกระดาษกรองด้วยน้ำร้อนจนสารละลายกรดหมดทดสอบสารละลายที่กรองได้ด้วยกระดาษลิตมัส โดยจะต้องไม่เปลี่ยนสีกระดาษลิตมัสจากสีน้ำเงินเป็นสีแดง

4.2.6 ตวงสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.25 จำนวน 200 มิลลิลิตร ใส่ในปีกเกอร์ที่ใช้ต้มต่าง นำไปต้มให้เดือดบนเตาไฟฟ้า แล้วล้างกากบนกระดาษกรองลงในปีกเกอร์ใบเดิมให้หมด

4.2.7 นำไปต้มบนเตาไฟฟ้า โดยใช้ขวดกันกลมปิดปากปีกเกอร์ให้สนิทเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลาย เมื่อเริ่มเดือดจับเวลา 30 นาที

4.2.8 กรองทันทีผ่านกรวยบุชเนอร์ซึ่งบุด้วยกระดาษกรองเบอร์ 541 ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน (W_2) และฉีดน้ำให้แนบสนิทกับกรวยบุชเนอร์

4.2.9 ฉีดน้ำล้างสิ่งที่เหลือนบนปีกเกอร์ ด้วยน้ำร้อนหลายๆ ครั้งลงในกรวยบุชเนอร์

4.2.10 ล้างสิ่งที่ตกค้างบนกระดาษกรอง ด้วยน้ำร้อนจนหมดต่าง ทดสอบสารละลายที่กรองได้ด้วยกระดาษลิตมัส โดยจะต้องไม่เปลี่ยนสีกระดาษลิตมัสจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน

4.2.11 นำกระดาษกรองวางบนถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (W_3) ไปอบที่ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ $100 \pm 2^\circ\text{C}$ 3 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนัก (W_4)

4.2.12 เผาถ้วยกระเบื้องพร้อมกากที่อบเรียบร้อยแล้วในเตาเผาอุณหภูมิ $550 \pm 10^\circ\text{C}$ นาน 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก (W_5)

4.3 วิธีคำนวณหาปริมาณเยื่อใย

$$\text{ปริมาณเยื่อใย (ร้อยละ)} = \frac{(W4 - W3 - W2) + (W5 - W3)(100 - M - F)}{W1}$$

- เมื่อ
- W1 = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)
 - W2 = น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัม)
 - W3 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง (กรัม)
 - W4 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง+กระดาษกรอง+กากหลังอบแห้ง (กรัม)
 - W5 = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง+กากหลังเผา (กรัม)
 - M = ปริมาณความชื้นของตัวอย่าง
 - F = ปริมาณไขมันของตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC., 2000)

5.1 การเตรียมตัวอย่าง

5.1.1 นำตัวอย่างที่ผ่านการทำให้แห้งเล็กน้อยมาบดให้ละเอียดเป็นผงด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า

5.1.2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่บดเป็นผงละเอียดแล้ว ประมาณ 1 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเถ้าต่อไป

5.2 เครื่องมือ

5.2.1 เตาเผา (muffle furnace)

5.2.2 ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)

5.2.3 โถดูดความชื้น (desiccators)

5.2.4 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (electronic analytical balance)

5.3 วิธีวิเคราะห์

5.3.1 เเผาถ้วยกระเบื้องเคลือบบนเตาที่เผาที่อุณหภูมิ 550 °ซ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิทช์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-40 นาที เพื่อให้อุณหภูมิในเตาเย็นลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

5.3.2 เเผาซ้ำอีกครั้งประมาณ 1 ชั่วโมง และทำเช่นข้อ 5.3.1. จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองไม่เกิน 3 มิลลิกรัม

5.3.3 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบซึ่งทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาบนตะเกียงเบนเซนในตู้ดูดควันจนหมดควัน จึงนำเข้าเตาเผาตั้งอุณหภูมิเตาเผาไว้ที่ 550 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทำเช่นเดียวกับข้อ 5.3.1 และ 5.3.2

5.4 วิธีการคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

6. การวิเคราะห์หาปริมาณ GABA (ดัดแปลงจาก Kitaoka และ Nakano, 1969 และ karladee and Suriyong, 2012)

6.1 สารเคมี

6.1.1 สารละลายฟีนอลร้อยละ 6 ชั่งฟีนอล 6 กรัม ในขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6.1.2 7.5% NaOCl เตรียมโดยปิเปต 10% NaOCl 75 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6.1.3 borate buffer pH 9.0 เตรียมโดยผสม 0.2 โมลาร์กรดบอริก 50 มิลลิลิตร กับ 0.2 โมลาร์โซเดียมบอเรต ปริมาตร 59 มิลลิลิตร

6.2 วิธีทำกราฟมาตรฐานกาบา

6.2.1 ชั่งสารมาตรฐาน GABA 0.050 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

6.2.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานมา 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

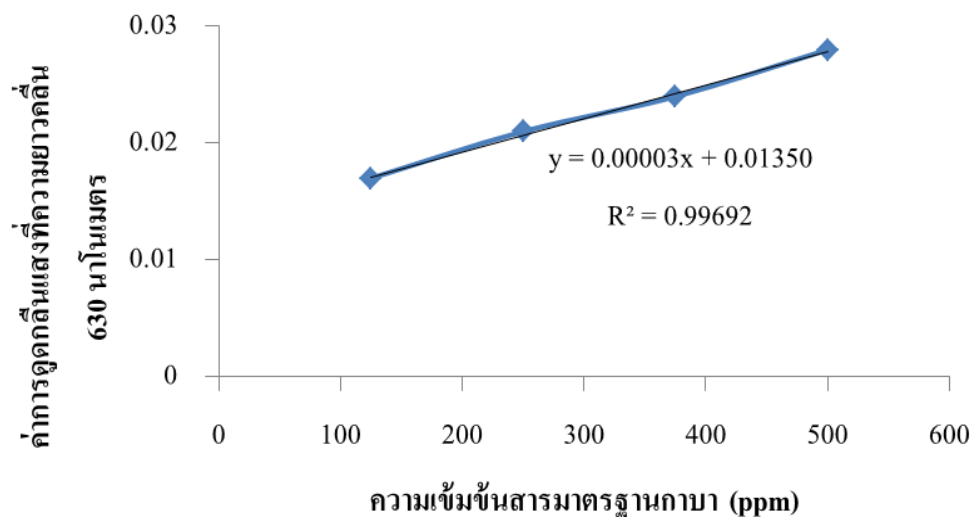
6.2.3 ปิเปต borate buffer 0.2 มิลลิลิตร และ 6% phenol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง

6.2.4 เติม 7.5% NaOCl ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6.2.5 นำมาต้มให้เดือดที่อุณหภูมิประมาณ 100 °ซ นาน 10 นาที ทำให้เย็นทันทีในน้ำเย็นจัด 5 นาที

6.2.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอลเป็น blank

6.2.7 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกาบาในหน่วยมิลลิกรัม



รูปที่ ก 1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของสารกาบาในการวิเคราะห์ปริมาณกาบา

6.3 วิธีการเตรียมสารสกัด

6.3.1 ชั่งตัวอย่างถั่ว 3 กรัม ละลายใน 80% เอทานอล ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

6.3.2 ตั้งทิ้งไว้จน เอทานอล ระเหยออกหมด จากนั้นเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร

6.3.3 นำสารสกัดที่ได้บรรจุในขวดสีชา

6.4 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกาบา

6.4.1 นำสารสกัด 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม borate buffer 0.2 มิลลิลิตร และ 6% phenol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง

6.4.2 เติม 7.5% NaOCl ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

6.4.3 นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที

6.4.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร โดยใช้ Blank เป็นสารละลายที่เตรียม แต่ไม่มีสารสกัด

7. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Inchuen et al., 2010)

7.1 สารเคมี

7.1.1 Folin-Ciocalteu

7.1.2 โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 10%

7.1.3 สารละลายกรดแกลลิกความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

7.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

7.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นเริ่มต้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

7.2.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานดังกล่าวใส่หลอดทดลอง หลอดละ 0, 0.05, 0.15, 0.20, 0.30, และ 0.35 มิลลิลิตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร

7.2.3 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

7.2.4 เติมสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

7.2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร

7.2.6 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแกลลิกในหน่วยไมโครกรัม

7.3 การสกัดสาร

7.3.1 นำแบ่งผสมกับกรดไฮโดรคลอริก (0.1 นอร์มอล) ในเมทานอล (85:15 v/v) ในอัตราส่วน 1:10 (w/v) ปรับพีเอชเท่ากับ 1 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (4.0 นอร์มอล)

7.3.2 นำไปแช่เย็นที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 2 ชั่วโมง

7.3.3 ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล 85% ให้ได้ 30 มิลลิลิตร ทำการกรอง เก็บส่วนใสไว้ในขวดสีชา

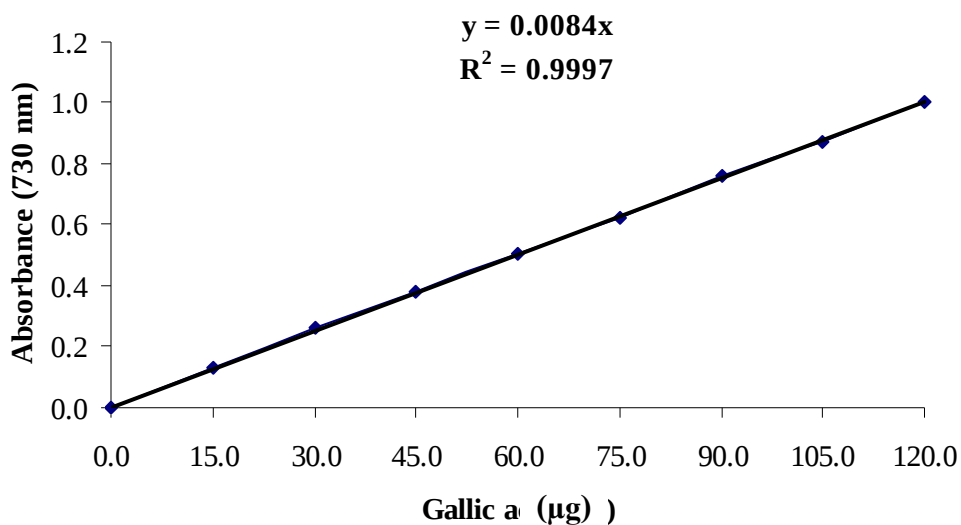
7.4 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างสารสกัด

7.4.1 ปิเปตตัวอย่างสารสกัด ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมเป็น 10 มิลลิลิตร

7.4.2 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

7.4.4 เติมสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

7.4.5 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น blank



รูปที่ ก 2 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

8. การวิเคราะห์หาสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (DPPH) (Inchuen *et al.*, 2010)

8.1 สารเคมี

8.1.1 เมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 50

8.1.2 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate)

8.2 วิธีวิเคราะห์

8.2.1 นำตัวอย่าง 2 กรัม เติมเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรทำการสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

8.2.2 นำสารที่สกัดได้มาปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางด้วยความเร็ว 5000g เป็นเวลา 15 นาที

8.2.3 แยกส่วนใสออก จากนั้นล้างตะกอนที่เหลือด้วยเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

8.2.4 ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง

8.2.5 นำสารสกัดที่ได้ไประเหยที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่ 70 °ซ ให้เหลือปริมาตร 20 มิลลิลิตร

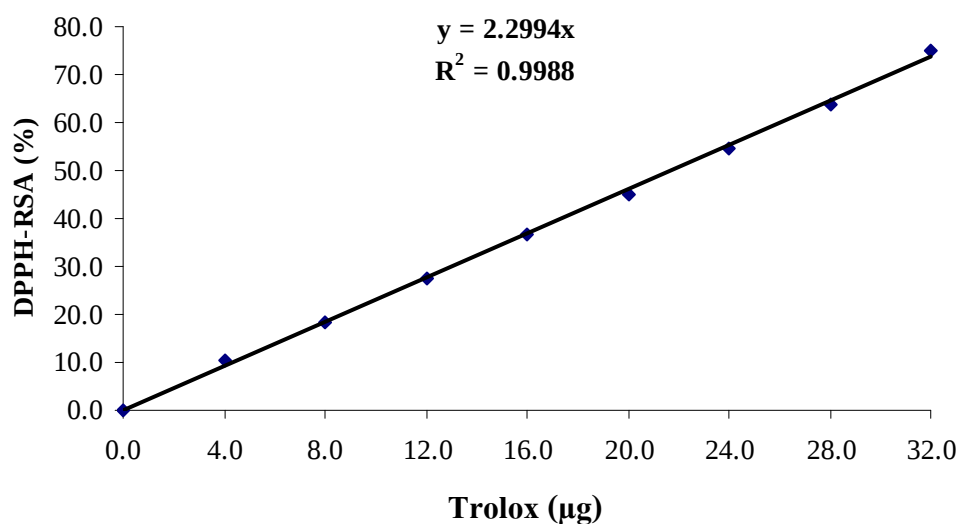
8.2.6 นำสารสกัดที่ผ่านการระเหยแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นปิเปตด้วยไมโครปิเปตมา 100 µL

8.2.7 เติมสารละลาย DPPH ที่ละลายในเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 ลงไป 3.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

8.2.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร

8.3 วิธีคำนวณ

$$\text{Antioxidant activity} = \frac{\text{abs}_{\text{control}} - \text{abs}_{\text{sample}}}{\text{abs}_{\text{control}}}$$



รูปที่ 3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโทรลอกซีในหน่วยไมโครกรัม

9. การวิเคราะห์หาสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP) (Inchuen *et al.*, 2010)

9.1 สารเคมี

9.1.1 อะซิเตต บัฟเฟอร์ (Acetate buffer) pH 3.6 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

9.1.2 สารละลาย TPTZ (2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ใน HCl ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง TPTZ 0.1562 กรัม ละลายใน HCl ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

9.1.3 สารละลาย Iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยชั่ง $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2703 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร

9.1.4 FRAP reagent เตรียมโดยผสมสารละลายที่เตรียมไว้ทั้งหมดดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยให้มีอัตราส่วนของอะซิเตต บัฟเฟอร์ : สารละลาย TPTZ : สารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ เป็น 10 : 1 : 1 โดยปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งต้องเตรียมใหม่ทุกวัน

9.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานโทรลอกซ์

9.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ความเข้มข้นเริ่มต้น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

9.2.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานดังกล่าวใส่หลอดทดลอง หลอดละ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14 และ 0.16 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 0.2 มิลลิลิตร

9.2.3 เติมสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

9.2.4 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) วางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 นาที

9.2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็น blank

9.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกในตัวอย่างสารสกัด

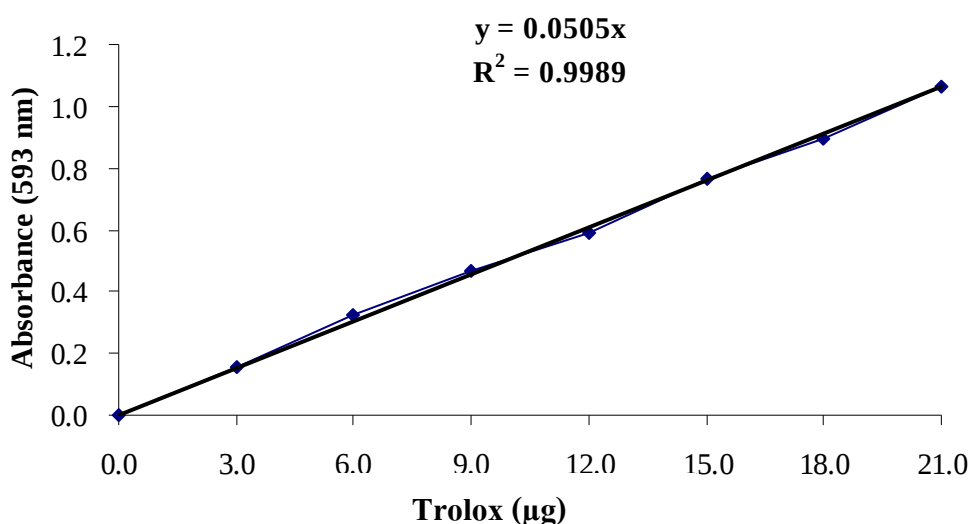
9.3.1 ปิเปตตัวอย่างสารสกัดลงในหลอดทดลอง และปรับปริมาตรด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 0.2 มิลลิลิตร

9.3.2 เติมสารละลาย FRAP reagent 6 มิลลิลิตร

9.3.3 ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) วางตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 นาที

9.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

9.3.5 สำหรับ blank ให้ใช้ตัวทำละลายแทนตัวอย่างสารสกัดในข้อ 9.3.1 ในปริมาณที่เท่ากัน



รูปที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณโทรออกซีในหน่วยไมโครกรัม