

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 สารเคมี

ตาราง 2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Absolute ethanol (analytical grade)	MERCK
Acetone	MERCK
Ammonium hydroxide 25%	MERCK
Ammoniummolybdate	MERCK
L(+)-Ascorbic acid	MERCK
2,2-Biquinoline	Sigma
n-Butanol	BDH
Caffeic acid	Sigma
β -Carotene	Sigma
Chloroform	BDH
Chlorogenic acid	Fluka
Copper nitrate	Fluka
m-Coumaric acid	Sigma
Cupric acetate monohydrate	Fluka
EDTA	Aldrich
Ethanol	MERCK
Ethyl acetate	BDH
Diethyl ether	BDH
Gallic acid	MERCK
Glacial acetic acid	MERCK
n-Heptane (analytical grade)	M & B
Hexane	MERCK
Hydrochloric acid 37.4%	J. T. Baker

ตาราง 2.1 (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Hydroquinone	Fluka
Hyflo Super Cel	Fluka
Isopropanol	BDH
Linoleic acid	BDH
Methanol	MERCK
p-Nitroaniline	MERCK
Oxalic acid	MERCK
Phosphomolybdic acid	PROLABO
m-Phosphoric acid	MERCK
Potassium hydroxide	MERCK
n-Propanol	BDH
Pyrocatechol	BDH
Pyrogallol	MERCK
Sinapic acid	Fluka
Sodium carbonate anhydrous	Fluka
Sodium carbonate decahydrate	MERCK
Sodium hydroxide	EKA
Sodium nitrite	Fluka
Sodium sulfate anhydrous	Fluka
Sodium tungstate	Riedel-De Haen
Sudan I	Sigma
Sulfuric acid 96%	LAB-SCAN
Tannic acid	M & B
Toluene (analytical grade)	MERCK
Tween 40	Fluka
Urea	MERCK

หมายเหตุ : สารเคมีที่ไม่ได้ระบุ grade ให้หมายถึง lab grade

2.2 เครื่องมือ

ตาราง 2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องอบแบบเป่าลมร้อน	-
เครื่องเป่าลม	MATSUSHITA
Analytical balance	Sartorius
Centrifuge JA20-MC	BECKMAN
pH Meter	Radiometer / Copenhagen
Shaker	-
Spectronic 21	Milton Roy
Ultraviolet lamp	ORIGINAL HANAU/FLUOTEST
U 2000 Spectrophotometer	HITACHI
Water bath	Heto

2.3 วัสดุดิบ

2.3.1 ตัวอย่างพืชผักพื้นบ้านจากตลาดสดท้องถิ่น ใน อ. เมือง จ. เชียงใหม่

2.3.2 ตัวอย่างสมุนไพรไทยซึ่งบดเป็นผงแล้วจากร้านขายสมุนไพรทั่วไป

2.4 วิธีการทดลอง

2.4.1. การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างพืชผักพื้นบ้านนำมาล้างทำความสะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แบ่งส่วนหนึ่งใช้สำหรับเป็นตัวอย่างสด อีกส่วนหนึ่งนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบแบบเป่าลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิห้องสำหรับการทดลองต่อไป

2.4.2. การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย (Hammerschmidt and Pratt, 1978 ; Pratt and Birac, 1979)

2.4.2.1 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 0.50 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีเมทานอล 2.50 มล. (สำหรับตัวอย่างแห้งใช้เมทานอล 5 มล.) ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อครบเวลานำมาอุ่นเป็นเวลา 45 วินาที แล้ว

กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 ล้างภาควัตถุอย่างด้วยเมธานอลร้อน นำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยที่อุณหภูมิ 40 °C จนเหลือปริมาตรประมาณ 1 มล.

2.4.2.2 การวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ปีเปตสารละลายเบต้า-แคโรทีนในคลอโรฟอร์ม (1.0 มก. / 10 มล.) ปริมาตร 1 มล. ลงในปิกเกอร์ที่มีกรดลิโนเลอิก 20 มก. และทวิน 40 200 มก. นำไประเหยคลอโรฟอร์มที่อุณหภูมิ 50 °C เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการให้อากาศเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปริมาตร 50 มล. ลงไปพร้อมทั้งคนอย่างแรง จากนั้นปีเปตสารละลายในปิกเกอร์ปริมาตร 5 มล. ลงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากตัวอย่าง 0.20 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร โดยอ่านค่าทุกๆ 15 นาทีจนครบ 105 นาที สำหรับหลอดควบคุมใช้เมธานอล 0.20 มล. แทนสารสกัด ส่วนหลอดแบลนด์ใช้คลอโรฟอร์มแทนสารละลายเบต้า-แคโรทีนในคลอโรฟอร์ม และใช้เมธานอลแทนสารสกัดในปริมาตรที่เท่ากัน

อัตราการฟอกสีของเบต้า-แคโรทีนคำนวณจากความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ระหว่างเวลาเริ่มต้น (0) และเวลาสุดท้ายที่อ่านได้ค่าคงที่หารด้วยเวลา แอคติวิตีของสารต้านอนุมูลอิสระคำนวณออกมาเป็นค่าดัชนีเรียกว่า antioxidant index โดยคำนวณจากอัตราการฟอกสีของเบต้า-แคโรทีนของหลอดควบคุมหารด้วยอัตราการฟอกสีของเบต้า-แคโรทีนของสารสกัดจากตัวอย่าง

2.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี (รณฤทธิ์ , 2535)

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีทำโดยใช้เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่มีสารละลาย 0.07 M. oxalic acid / 0.02 mM. EDTA 3% meta-phosphoric acid / 8% acetic acid 5% sulfuric acid และ 5% ammoniummolybdate ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน 0.1% L-ascorbic acid วิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีเป็นดังนี้

2.4.3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

1. สารละลายมาตรฐาน 0.1% L-ascorbic acid

ชั่ง L-ascorbic acid 0.1000 กรัม ละลายในสารละลาย oxalic acid / EDTA และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

2. สารละลาย 0.07 M. oxalic acid / สารละลาย 0.02 mM. EDTA

เตรียมสารละลาย 0.02 mM. EDTA โดยชั่ง EDTA 0.0058 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มล. ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นชั่ง oxalic acid 6.3028 กรัม ละลายในสารละลาย 0.02 mM. EDTA ที่เตรียมไว้

3. สารละลาย 3% meta-phosphoric acid / สารละลาย 8% acetic acid

เตรียมสารละลาย 8% acetic acid โดยปิเปต acetic acid ปริมาตร 40 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 500 มล. ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ และปรับปริมาตรให้ถึงขีดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงชั่ง m-phosphoric acid 15.0 กรัม ละลายในสารละลาย 8% acetic acid ที่เตรียมไว้

4. สารละลาย 5% sulfuric acid

ปิเปตสารละลาย sulfuric acid 5.0 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ และปรับปริมาตรให้ถึงขีดด้วยน้ำกลั่น

5. สารละลาย 5% ammoniummolybdate

ชั่ง ammoniummolybdate 5.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

2.4.3.2 การทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

นำสารละลายมาตรฐาน 0.1% L-ascorbic acid ทำปฏิกิริยากับสารละลาย 0.07M. oxalic acid / 0.02 mM. EDTA วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร วิธีการทำกราฟมาตรฐานของวิตามินซีแสดงดังตารางที่ 2.3

ตาราง 2.3 ปริมาตรและสารต่างๆที่ใช้สำหรับการทำกราฟมาตรฐานของวิตามินซี

สารละลาย	ปริมาตร (มล.)						
	1	2	3	4	5	6	7
0.1% L-ascorbic acid	0	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
0.07 M. oxalic acid / 0.02 mM. EDTA	5.00	4.90	4.80	4.70	4.60	4.50	4.40
3% meta-phosphoric acid / 8%HOAc	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
5% sulfuric acid	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
5% ammoniummolybdate	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
ปรับปริมาตรให้เป็น 25 มล. ในขวดวัดปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วนำไปวัด A_{760}							

2.4.3.3 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 0.50 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มล. ที่มีสารละลาย 0.07 M. oxalic acid / 0.02 mM. EDTA ปริมาตร 10 มล. ปิดปากขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลากรงเอากากออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1

2.4.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

เปิดสารสกัดที่กรองได้ 2.50 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ที่มีสารละลาย 0.07 M. oxalic acid / 0.02 mM. EDTA 2.50 มล. เติมสารละลาย 3% meta-phosphoric acid / 8% acetic acid 0.5 มล. สารละลาย 5% sulfuric acid 1.0 มล. และสารละลาย 5% ammoniummolybdate 2.0 มล. ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่น ให้ถึงขีดวัดปริมาตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร สำหรับหลอดแบบลงค์ให้ใช้สารละลาย oxalic acid / EDTA แทนสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่าง

2.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี (Contreras-Guzman and Strong III, 1982)

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีอาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของ cupric ions และการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง cuprous ion และ 2,2'-biquinoline ซึ่งตรวจสอบได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร วิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีเป็นดังนี้

2.4.4.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี

1. สารละลายมาตรฐาน 0.1% tocopherol ในเอทานอล
 ชั่ง α -tocopherol 0.1000 กรัม ละลายในเอทานอล และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร
2. สารละลาย 1.25% sodium sulfate
 ชั่ง sodium sulfate 1.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร
3. สารละลาย 5% L-ascorbic acid
 ชั่ง L-ascorbic acid 5.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร
4. สารละลาย 50% potassium hydroxide
 ชั่ง potassium hydroxide 50.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร
5. สารละลาย potassium hydroxide ในเอทานอล
 ปิเปิดสารละลาย 50% potassium hydroxide ปริมาตร 30 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ปรับปริมาตรด้วยเอทานอลให้ถึงขีดวัดปริมาตร
6. สารละลาย 80% เอทานอล
 ปิเปิด absolute ethanol ปริมาตร 80 มล. ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดวัดปริมาตร
7. สารละลาย 0.5% biquinoline / toluene
 ชั่ง 2,2-biquinoline 0.50 กรัม ละลายในโทลูอีน และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

8. สารละลาย 0.5% copper nitrate

ซึ่ง copper nitrate 0.50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

9. สารละลาย 2.5% ยูเรียในแอลกอฮอล์

ซึ่งยูเรีย 2.50 กรัม ละลายใน absolute ethanol และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

10. สารละลาย complexing reagent

ผสมสารละลาย 0.5% biquinoline / toluene 4 มล. และสารละลาย 0.5% copper nitrate 20 มล. ในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 2.5% ยูเรียในแอลกอฮอล์ให้ถึงขีดวัดปริมาตร

2.4.4.2 การทำให้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ขึ้น

1. เฮปเทน และโทลูอีน

เติมสารละลายอิ่มตัวของ cupric acetate monohydrate 5.0 มล. ลงใน เฮปเทน หรือโทลูอีน (analytical grade) 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทสารละลายใส่ขวดกลั่น ล้างสารละลายด้วยน้ำกลั่น เติม sodium sulfate anhydrous ลงไปเพื่อดูดน้ำ จากนั้นจึงนำไปกลั่น

2. เอทานอล

เติม potassium hydroxide 5 กรัม ลงใน absolute ethanol (analytical grade) 1 ลิตร นำไปกลั่น จากนั้นนำสารละลายที่กลั่นได้มาเติม cupric acetate 0.10 กรัม แล้วนำไปรีฟลักซ์เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำสารละลายนี้ไปกลั่นอีกครั้งหนึ่ง

2.4.4.3 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่าง 0.1 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี absolute ethanol 20 มล. ปิดปากขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ และพันทับด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหย นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 85 °C เป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว เมื่อครบเวลาจึงเติม

เฮปแทน 20 มล. เขย่านาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 1.25% sodium sulfate 20 มล. เขย่านาน 2 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น สำหรับการทดลองควบคุมให้ใช้สารละลายมาตรฐาน 0.1% α -tocopherol 0.50 มล. แทนตัวอย่าง

2.4.4.4 การกำจัดสารรบกวนโดยวิธี slight saponification

ปิเปตสารละลายชั้นบนที่สกัดได้จากข้อ 2.4.4.3 ปริมาตร 7 มล. (สำหรับแปลงค่าให้ใช้เฮปแทนแทนสารที่สกัดได้จากตัวอย่าง) เติมสารละลาย 5% L-ascorbic acid 5 มล. และสารละลาย potassium hydroxide / เอทานอล 5 มล. เขย่านาน 2.5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นนำสารละลายชั้นบนปริมาตร 5 มล. มาเติมสารละลาย 80% เอทานอล 10 มล. เขย่านาน 1 นาที เพื่อแยกไขมันที่ถูกไฮโดรไลซ์ ascorbate และ potassium hydroxide

2.4.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี

นำสารละลายชั้นบนที่ได้จากข้อ 2.4.4.4 ปริมาตร 2.50 มล. มาเติมสารละลาย complexing reagent 5 มล. เขย่าอย่างแรงนาน 2.5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นดูดสารละลายชั้นบนทิ้งไป ปิเปตสารละลายชั้นล่างมา 3 มล. เติม absolute ethanol 0.50 มล. เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตร

2.4.4.6 การคำนวณปริมาณวิตามินอี

จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายวิตามินอีในสารสกัดที่อ่านได้ นำมาคำนวณเป็นปริมาณวิตามินอีได้ดังสูตรต่อไปนี้ (Contreras-Guzman and Strong III, 1982)

$$\text{ปริมาณวิตามินอี (mg./100 g.)} = \frac{A_x C_s f}{1000 A_s W_x}$$

- โดยที่ A_x = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตรของตัวอย่าง
 A_s = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 นาโนเมตรของสารมาตรฐาน
 C_s = จำนวนไมโครกรัมของสารมาตรฐาน / 1 มล.
 W_x = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)
 f = dilution factor

2.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์ (Helrich , 1990)

การวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์ทำโดยอาศัยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีเพื่อแยกแคโรทีนและแซนโทฟิลล์ และเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรีเพื่อหาปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์ที่แยกได้ วิธีการการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์เป็นดังนี้

2.4.5.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์

1. สารละลาย 40% เมธานอล ใน potassium hydroxide
ชั่ง potassium hydroxide 40 กรัม ละลายในเมธานอล ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร
2. สารละลาย 10% sodium sulfate
ชั่ง sodium sulfate 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร
3. สารละลายมาตรฐาน 1.0 mM. 1-(phenylazo)-2-naphthol (Sudan I)
นำ Sudan I ไปทำให้ตกผลึกอีกครั้งด้วยเอธานอลร้อน อบแห้งผลึกที่อุณหภูมิ 70 °C จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นชั่ง Sudan I 0.0249 กรัม ละลายในสารละลายผสมของ acetone และ isopropanol (1:1 โดยปริมาตร) ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร เก็บในขวดสีชา
4. สารละลายมาตรฐาน 0.04 mM. 1-(phenylazo)-2-naphthol
ปิเปตสารละลายในข้อ 3 ปริมาตร 2 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. ปรับปริมาตรด้วยสารละลายผสมของ acetone และ isopropanol (1:1 โดยปริมาตร) เก็บในขวดสีชา

2.4.5.2 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 0.50 กรัม ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ปิเปตสารละลายสกัด (hexane : acetone : ethanol : toluene ; 10 : 7 : 6 : 7 โดยปริมาตร) ลงไป 30 มล. ปิดจุก และเขย่าเป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลา ปิเปตสารละลาย 40% เมธานอล / potassium

hydroxide 2 มล. ปิดจุกและเขย่าเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 56 ± 1 °C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อรอให้เย็น จากนั้นเปิด hexane 30 มล. ลงไป ปิดจุกและเขย่าเป็นเวลา 1 นาที แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ด้วยสารละลาย 10% sodium sulfate ปิดจุกและเขย่าเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.4.5.3 การทำคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รองกันคอลัมน์ด้วย glass wool หรือสำลีปริมาณเล็กน้อย เติม absorbent (Hyflo Super-Cel ; activated magnesia และ diatomaceous earth 1/1 โดยน้ำหนัก) ลงไปให้มีความสูงประมาณ 12 ซม. ใช้แท่งแก้วกดให้พื้นผิวเรียบและแน่น จากนั้นเติม sodium sulfate anhydrous ให้มีความสูงประมาณ 2 ซม. กดด้วยแท่งแก้วอีกครั้งหนึ่ง หุ้มด้านนอกคอลัมน์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อป้องกันแสง ล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายผสมของ hexane : acetone (90 : 10 โดยปริมาตร) เปิดสารละลายชั้นบนที่ได้จากข้อ 2.4.5.2 มา 10 มล. ใส่ลงในคอลัมน์ ใช้สารละลายผสมของ hexane : acetone (90 : 10 โดยปริมาตร) เป็นตัวชะแโรทีนออกจากคอลัมน์ โดยมีขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์รองรับ รอจนกระทั่งชั้นของแโรทีนออกมาจนหมด ปรับปริมาตรของสารละลายแโรทีนเป็น 25 มล. ด้วยสารละลายผสมของ hexane : acetone (90 : 10 โดยปริมาตร) จากนั้นเติมสารละลายผสมของ hexane : acetone : methanol (80 : 10 : 10 โดยปริมาตร) ลงในคอลัมน์เพื่อชะแซนโทฟิลล์ที่ยังค้างอยู่ในคอลัมน์ โดยมีขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มล. ที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์รองรับ รอจนกระทั่งชั้นของแซนโทฟิลล์ออกมาจนหมด ปรับปริมาตรของสารละลายแซนโทฟิลล์เป็น 25 มล. ด้วยสารละลายผสมของ hexane : acetone : methanol (80 : 10 : 10 โดยปริมาตร) นำสารละลายแโรทีนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายผสมของ hexane : acetone (90 : 10 โดยปริมาตร) เป็นแบลนด์ ส่วนสารละลายแซนโทฟิลล์นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายผสมของ hexane : acetone : methanol (80 : 10 : 10 โดยปริมาตร) เป็นแบลนด์ โดยก่อนการวัดให้ทำการตรวจสอบความแม่นยำของเครื่อง spectrophotometer โดยใช้สารละลายมาตรฐาน 0.04 mM. Sudan I วัดค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งควรอ่านได้ 0.56 ที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร และ 0.46 ที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร

2.4.5.4 การคำนวณหาปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์

จากค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายแคโรทีนและแซนโทฟิลล์ที่อ่านได้ นำมาคำนวณเป็นปริมาณแคโรทีนและแซนโทฟิลล์ได้ดังสูตรต่อไปนี้ (Helrich, 1990)

$$\text{ปริมาณแคโรทีน (g./Kg.)} = \frac{(A_{436} \times 125)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 196}$$

$$\text{ปริมาณแซนโทฟิลล์ (g./Kg.)} = \frac{(A_{474} \times 125)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 236}$$

2.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน (Helrich, 1990)

การวิเคราะห์ปริมาณแทนนินทำโดยใช้เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมทรี วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาที่มีสารละลาย Folin-Denis reagent และสารละลายอิมตัวของ sodium carbonate ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก วิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีเป็นดังนี้

2.4.6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน

1. สารละลายมาตรฐาน 0.1 มก./มล. tannic acid

ซึ่งกรดแทนนิก 0.0100 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

2. สารละลาย Folin-Dennis reagent

ซึ่ง sodium tungstate 50 กรัม และกรด phosphomolybdic 10 กรัม ลงในขวดก้นกลมขนาด 500 มล. เติมน้ำกลั่น 375 มล. ปิเปตกรด phosphoric ลงไป 25 มล. นำไปรีฟลักซ์ทิ้งที่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 500 มล. ในขวดวัดปริมาตร เก็บในขวดสีชา

3. สารละลายอิมตัวของ sodium carbonate

ซึ่ง sodium carbonate 35 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ที่อุณหภูมิ 70-80 °C ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้สารละลายตกผลึก ถ้าสารละลายไม่ตก

ผลึกให้เติม $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ลงไปเล็กน้อยเพื่อล่อให้ตกผลึก จากนั้นกรอง
ผลึกออกโดยใช้ glass wool

2.4.6.2 การทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน

นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก 0-10 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Denis reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ขั้นตอนการทำกราฟมาตรฐานเป็นดังตารางที่ 2.4

ตาราง 2.4 ปริมาตรและสารต่างๆที่ใช้สำหรับการทำกราฟมาตรฐานกรดแทนนิก

สารละลาย	ปริมาตร (มล.)				
	1	2	3	...	11
น้ำกลั่น	75	75	75	...	75
สารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก	-	1	2	...	10
สารละลาย Folin-Denis reagent	5	5	5	...	5
สารละลายอิ่มตัวของ sodium carbonate	10	10	10	...	10
ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัด A_{760}					

2.4.6.3 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่าง 0.40 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มล. เติมน้ำ 10 มล. ปิดปากขวดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ และพันทับด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไประเหยอีเธอร์ที่อุณหภูมิ 60°C เติมน้ำกลั่นลงไป 70 มล. นำไปต้มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร แล้วกรองเอากากออก

2.4.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณแทนนิน

ปิเปตสารสกัดที่กรองได้จากข้อ 2.4.6.3 ปริมาตร 1 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ที่มีน้ำกลั่น 75 มล. เติมสารละลาย Folin-Denis reagent 5 มล. และสารละลายอิ่มตัวของ sodium carbonate 10 มล. ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์

กัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร สำหรับหลอดแบบลงคี่ให้ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่าง

2.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพสารประกอบฟีนอลิก (Krygier et. al. ,1982 ; Nacz et. al. ,1992 ; Raymond et. al. , 1984 ; Trakarnsirinont and Rakariyatham, 2000)

เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกในธรรมชาติมักพบอยู่รวมกับสารอื่น ในที่นี้จึงทำการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกใน 5 ประเภท คือ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compound) สารประกอบฟีนอลิกอิสระ (free phenolic compound) สารประกอบฟีนอลิกเอสเทอร์ (esterified phenolic compound) สารประกอบฟีนอลิกส่วนที่อยู่กับโปรตีน (protein-bound phenolic compound) และสารประกอบฟีนอลิกส่วนที่อยู่กับกาก (residue-bound phenolic compound) โดยนำตัวอย่างทุกชนิดมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และเลือกตัวอย่าง 12 ชนิดซึ่งมีค่า antioxidant index สูงได้แก่ กระถิน ชะพลู ผักชีล้อม ผักเชียงดา ผักหนามญี่ปุ่น ผักฮ้วนหมู ฟักทะลายใจ สะเดา สะระแหน่ หน่อกวน หม่อน และโหระพาข้าง มาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอีก 4 ประเภท และวิเคราะห์คุณภาพเฉพาะประเภทสารประกอบฟีนอลิกอิสระ วิธีการสกัดสารประกอบฟีนอลิกประเภทต่างๆ รวมทั้งการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของสารประกอบฟีนอลิกมีดังนี้

2.4.7.1 การเตรียมสารละลายสำหรับการตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิก

1. สารละลาย 6 M. hydrochloric acid

เปิดสารละลาย hydrochloric acid เข้มข้น 49.14 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดวัดปริมาตร

2. สารละลาย 4 M. sodium hydroxide

ชั่ง sodium hydroxide 16.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

3. สารละลาย 2% sodium carbonate

ชั่ง sodium carbonate 2.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

4. สารละลายมาตรฐาน 0.01 M. pyrocatechol

ชั่ง pyrocatechol 0.1101 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

5. สารละลาย Folin-Dennis reagent

เหมือนข้อ 2 ในหัวข้อ 2.4.6.1

6. สารละลายอิ่มตัวของ sodium carbonate

เหมือนข้อ 3 ในหัวข้อ 2.4.6.1

7. สารละลาย 2 M. hydrochloric acid

ปิเปตสารละลาย hydrochloric acid เข้มข้น 16.38 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดวัดปริมาตร

8. สารละลาย 0.5% p-nitroaniline ใน 2 M. hydrochloric acid

ชั่ง p-nitroaniline 0.50 กรัม ละลายในสารละลาย 2 M. hydrochloric acid และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

9. สารละลาย 5% sodium nitrite

ชั่ง sodium nitrite 5.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

10. สารละลาย 20% sodium acetate

ชั่ง sodium acetate 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

11. สารละลาย diazotized p-nitroaniline

ผสมสารละลาย 0.5% p-nitroaniline ใน 2 M. hydrochloric acid สารละลาย 5% sodium nitrite และสารละลาย 20% sodium acetate ในอัตราส่วน 3 : 1 : 40 โดยปริมาตร คนให้เข้ากันแล้วเก็บในขวดสีชา

12. สารละลาย 10% acetic acid

ปิเปตสารละลาย acetic acid 10 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดวัดปริมาตร

13. สารละลาย Hoepfner 's reagent

ชั่ง sodium nitrite 1.0 กรัม ละลายในสารละลาย 10% acetic acid และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มล. ในขวดวัดปริมาตร

14. สารละลาย BAW (6 : 1 : 2 โดยปริมาตร)

ผสมสารละลาย n-butanol ปริมาตร 60 มล. สารละลาย glacial acetic acid ปริมาตร 10 มล. และน้ำกลั่นปริมาตร 20 มล. แล้วคนให้เข้ากัน

15. สารละลาย 2% acetic acid

ปิเปตสารละลาย acetic acid 2 มล. ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มล. ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ถึงขีดวัดปริมาตร

16. สารละลาย n-propanol : NH_4OH (7 : 3 โดยปริมาตร)

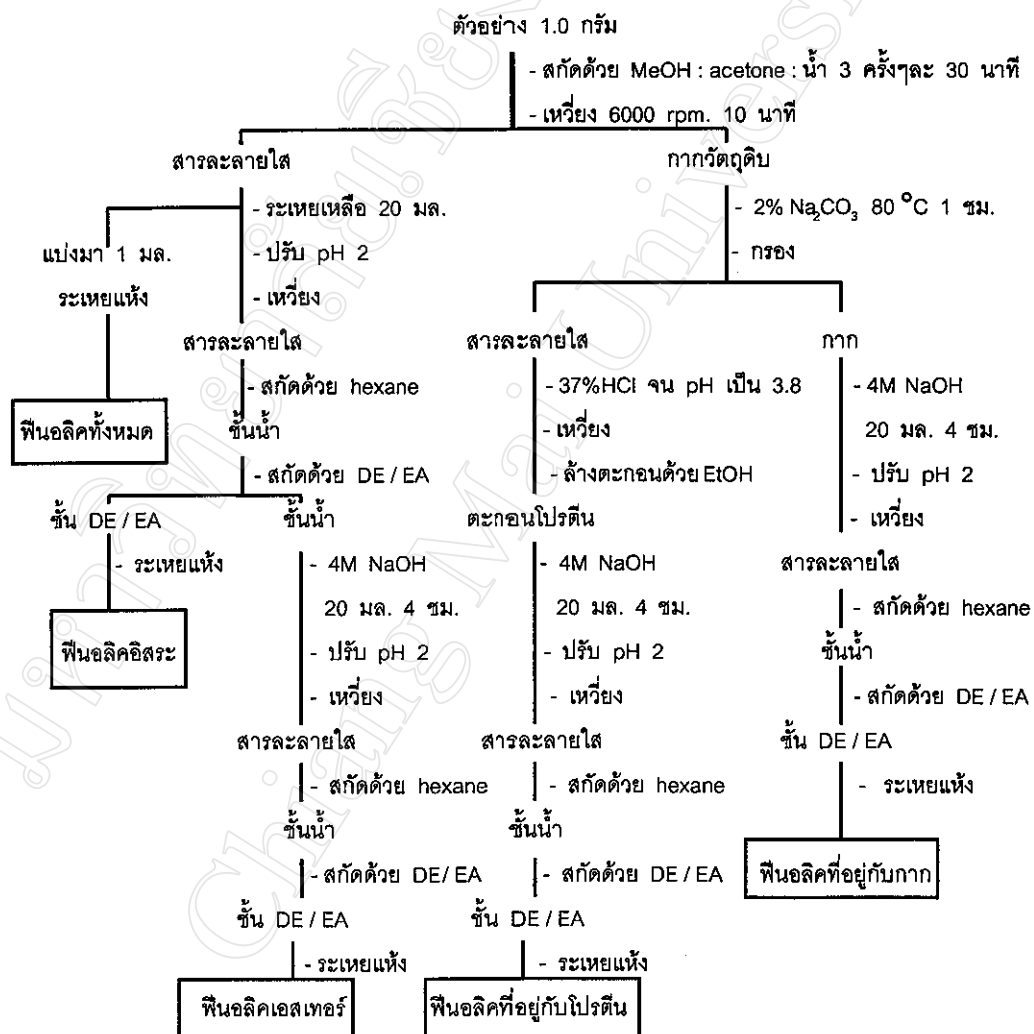
ผสมสารละลาย n-propanol ปริมาตร 70 มล. และสารละลาย ammonium hydroxide 25% ปริมาตร 30 มล. แล้วคนให้เข้ากัน

17. สารละลาย BAW (4 : 1 : 1 โดยปริมาตร)

ผสมสารละลาย n-butanol ปริมาตร 40 มล. สารละลาย glacial acetic acid ปริมาตร 10 มล. และน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. แล้วคนให้เข้ากัน

2.4.7.2 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่าง

การเตรียมสารสกัดสารประกอบฟีนอลิกในประเภทต่างๆสรุปได้ดังแผนภูมิในรูปที่ 2.1



หมายเหตุ DE = diethyl ether ; EA = ethyl acetate

รูป 2.1 แผนภูมิแสดงการแยกสารประกอบฟีนอลิกประเภทต่างๆ (Trakarnsirinont and Rakariyatham, 2000)

1. ชั่งตัวอย่าง 1.0 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายผสมของ acetone : methanol : น้ำ (7 : 7 : 6 โดยปริมาตร) ปริมาตร 20 มล. เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงแยกออกจากออกที่ความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที กากที่แยกได้ให้นำไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง เก็บส่วนสารละลายไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟีนอลิกอิสระ และฟีนอลิกเอสเทอร์ ส่วนกากเก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกส่วนที่อยู่กับโปรตีน และฟีนอลิกส่วนที่อยู่กับกาก

2. สารละลายจากข้อ 1. แบ่งเก็บไว้ 1 มล. สำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด สารละลายส่วนที่เหลือนำไประเหยจนเหลือปริมาตรประมาณ 20 มล. แล้วปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วยสารละลาย 6 M. hydrochloric acid นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนสารละลายใสมาสกัดด้วย hexane ในปริมาตรที่เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไซแยกส่วนที่เป็นชั้นของน้ำ (ชั้นล่าง) มาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำชั้นของน้ำที่แยกได้มาสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethyl ether : ethyl acetate (1 : 1 โดยปริมาตร) ในปริมาตรที่เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ไซแยกส่วนที่เป็นชั้นของสารละลายอินทรีย์ (ชั้นบน) ซึ่งเป็นชั้นของสารประกอบฟีนอลิกอิสระเก็บไว้ ส่วนชั้นของน้ำนำมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วรวมชั้นของสารละลายอินทรีย์ที่สกัดได้ทั้ง 3 ครั้ง นำไประเหยไล่ตัวทำละลายจนแห้ง แล้วจึงละลายใหม่ด้วยเอทานอลปริมาตรเล็กน้อย เก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอิสระ

3. ชั้นน้ำที่แยกได้จากการสกัดด้วยสารละลายผสมของ diethyl ether : ethyl acetate จากข้อ 2. นำมาไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลาย 4 M. sodium hydroxide 20 มล. เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วยสารละลาย 6 M. hydrochloric acid นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนสารละลายใสมาสกัดด้วย hexane และสารละลายผสมของ diethyl ether : ethyl acetate ตามลำดับดังได้กล่าวไว้ในข้อ 2. นำชั้นของสารละลายอินทรีย์ไประเหยไล่ตัวทำละลายจนแห้ง แล้วจึงละลายใหม่ด้วยเอทานอลปริมาตรเล็กน้อย เก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเอสเทอร์

4. กากตัวอย่างที่เก็บไว้ในข้อ 1. นำมาเติมสารละลาย 2% sodium carbonate 20 มล. เขย่าที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงกรองแยกออกจากออก นำสารละลายที่กรองได้มาตกตะกอนโปรตีนโดยเติมสารละลาย 37% hydrochloric acid จนมี pH เป็น 3.8 นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที

ล้างตะกอนโปรตีนด้วยเอทานอล แล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงนำตะกอนโปรตีนไปไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลาย 4 M. sodium hydroxide 20 มล. เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วยสารละลาย 6 M. hydrochloric acid นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนสารละลายใสมาสกัดด้วย hexane และสารละลายผสมของ diethyl ether : ethyl acetate ตามลำดับดังได้กล่าวไว้ในข้อ 2. นำชั้นของสารละลายอินทรีย์ไประเหยไล่ตัวทำละลายจนแห้ง แล้วจึงละลายใหม่ด้วยเอทานอลปริมาณเล็กน้อย เก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบส่วนที่อยู่กับโปรตีน

5. นำส่วนของกากที่แยกได้จากการกรองในข้อ 4. มาไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลาย 4 M. sodium hydroxide 20 มล. เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงปรับ pH ให้เป็น 2 ด้วยสารละลาย 6 M. hydrochloric acid นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนสารละลายใสมาสกัดด้วย hexane และสารละลายผสมของ diethyl ether : ethyl acetate ตามลำดับดังได้กล่าวไว้ในข้อ 2. นำชั้นของสารละลายอินทรีย์ไประเหยไล่ตัวทำละลายจนแห้ง แล้วจึงละลายใหม่ด้วยเอทานอลปริมาณเล็กน้อย เก็บไว้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส่วนที่อยู่กับกาก

2.4.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

1. การทำกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

นำสารละลายมาตรฐาน pyrocatechol เข้มข้น 0.15, 0.25, 0.35, ..., 0.95 mM. ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Folin-Denis reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ขั้นตอนการทำกราฟมาตรฐานเป็นดังตารางที่ 2.5

ตาราง 2.5 ปริมาตรและสารต่างๆที่ใช้สำหรับการทำกราฟมาตรฐานสารประกอบฟีนอลิก

สารละลาย	ปริมาตร (มล.)				
	1	2	3	...	10
สารละลาย 0.01M. pyrocatechol ปิเปตใส่ในขวด ปริมาตรขนาด 10 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นให้ถึงขีดปริมาตร	-	0.15	0.25	...	0.95
ปิเปตจากขวดปริมาตรลงในหลอดทดลอง	-	1.0	1.0	...	1.0
น้ำกลั่น	1.0	-	-	...	-
Deionized water	10	10	10	...	10
สารละลาย Folin-Denis reagent	2	2	2	...	2
ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที					
สารละลายอิมิตัวของ sodium carbonate	2	2	2	...	2
ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร					

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ปิเปตสารสกัดสารประกอบฟีนอลิก 1 มล. ลงในหลอดทดลอง เติม deionized water 10 มล. สารละลาย Folin-Denis reagent 2 มล. และสารละลายอิมิตัวของ sodium carbonate 2 มล. เช่นเดียวกับในการทำกราฟมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร สำหรับหลอดแบบวงก็ให้ใช้สารละลายผสมของ acetone : methanol : น้ำ (7 : 7 : 6 โดยปริมาตร) แทนสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดได้จากตัวอย่าง

2.4.7.4 การวิเคราะห์คุณภาพสารประกอบฟีนอลิกอิสระ โดยเทคนิคโครมา

โทกราฟีบนกระดาษแบบสองทิศทาง (Raymond et. al. , 1984)

นำสารสกัดที่เป็นสารประกอบฟีนอลิกอิสระที่แยกได้จากตัวอย่างทั้ง 12 ชนิดดังกล่าว มาวิเคราะห์คุณภาพโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบสองทิศทาง โดยนำกระดาษ Whatman เบอร์ 3 มาตัดให้มีขนาด 20 x 20 ซม. ชีดเส้นห่างจากขอบกระดาษทั้ง 4 ด้าน ด้านละ 2.5 ซม. จุดสารสกัดของสารประกอบฟีนอลิกอิสระลงบนกระดาษโดยให้หลอดคาปิลารี ม้วนกระดาษเป็นทรงกระบอกแล้วเย็บขอบกระดาษด้วยที่เย็บกระดาษ นำม้วนกระดาษใส่ในแท่งคอล์มโบที่ 1 ซึ่งมีสารละลายผสมของ n-butanol

: glacial acetic acid : น้ำ (BAW) (6 : 1 : 2 โดยปริมาตร) เป็นสารละลายตัวพาทิศทางที่ 1 เมื่อสารละลายเคลื่อนที่จนถึงขีดด้านบน (solvent front) จึงนำกระดาษออกมาเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลม จากนั้นเปลี่ยนทิศทางของกระดาษแล้วม้วนเป็นทรงกระบอกนำไปใส่ในแท่งคอล์มโบที่ 2 ซึ่งมีสารละลาย 2% acetic acid (HOAc) เป็นสารละลายตัวพาทิศทางที่ 2 เมื่อสารละลายเคลื่อนที่จนถึงขีดด้านบน จึงนำกระดาษออกมาเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลม นำกระดาษโครมาโทแกรมไปตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ตรวจสอบและบันทึกสีที่เกิดขึ้นจากการสเปรย์ด้วยสารละลายทดสอบ diazotized p-nitroaniline และสารละลาย Hoeplner's reagent บันทึกค่า Rf ของสารที่แยกได้ รวมทั้งนำสารประกอบฟีนอลิกที่แยกได้แต่ละจุดไปวัดค่าความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงสูงสุดโดยตัดโครมาโทแกรมบริเวณที่มีสารที่แยกได้ให้เป็นชิ้นเล็กๆแล้วเติมเมธานอลปริมาตร 2.5 มล. ลงไป เขย่าเพื่อให้สารบนโครมาโทแกรมถูกละลายออกมาให้มากที่สุด เทส่วนสารละลายใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200-800 นาโนเมตรเทียบกับสารมาตรฐานฟีนอลิก

2.4.7.5 การแยก gallic acid จากฟ้าทะลายโจร และ sinapic acid จากหญ้าหวาน โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบทิศทางเดียว

เนื่องจากเมื่อนำสารสกัดสารประกอบฟีนอลิกอิสระจากฟ้าทะลายโจรและหญ้าหวานไปวิเคราะห์คุณภาพโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบสองทิศทาง ดังวิธีทดลองในข้อ 2.4.7.4 และเมื่อนำ gallic acid จากฟ้าทะลายโจร และ sinapic acid จากหญ้าหวานไปตรวจสอบวัดค่าความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงสูงสุด พบว่าสารทั้งสองชนิดให้สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงไม่ตรงกับสารมาตรฐานเนื่องจากมีสารชนิดอื่นปนอยู่ ดังนั้นจึงต้องนำมาแยกอีกครั้งโดยเปลี่ยนชนิดของสารละลายตัวพา และแยกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบทิศทางเดียว โดย gallic acid จากฟ้าทะลายโจรแยกโดยใช้ n-propanol : NH_4OH (7 : 3 โดยปริมาตร) เป็นสารละลายตัวพา ส่วน sinapic acid จากหญ้าหวานแยกโดยใช้ BAW (4 : 1 : 1 โดยปริมาตร) เป็นสารละลายตัวพา เมื่อแยกได้แล้วจึงนำไปตรวจสอบค่าความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงสูงสุดอีกครั้งเทียบกับสารมาตรฐาน

2.4.8 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดวิตามินซี วิตามินอี แครโธทีน แซนโทฟิลล์ แทนนิน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

นำสารสกัดวิตามินซี วิตามินอี แครโธทีน แซนโทฟิลล์ แทนนิน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่าง 12 ชนิด คือ กระถิน ชะพลู ผักชีล้อม ผักเชียงดา ผักหนามปูย่า ผักฮ้วนหมู ฟักทะลายใจ สะเดา สะระแหน่ หญ้าหวาน หม่อน และโหระพา ช้าง ตามการทดลองที่ 2.4.3-2.4.7 มาระเหยไว้ตัวทำละลายจนแห้ง จากนั้นจึงละลายใหม่ด้วยเมธานอลปริมาตร 5 มล. แล้วนำไปศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีวิธีการทดลองดังได้กล่าวไว้ในข้อ 2.4.2.2 และเปรียบเทียบค่า antioxidant index ที่คำนวณได้

2.4.9 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกอิสระ

2.4.9.1 การเตรียมสารละลาย

- สารละลายเบต้า-แครโธทีน

ชั่งเบต้า-แครโธทีน 6 มก. ละลายในคลอโรฟอร์มปริมาตร 30 มล. เติมน้ำมัน linoleic acid ลงไป 2 หยด แล้วเติมน้ำมันปริมาตร 60 มล. คนให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

2.4.9.2 การทำโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบสองทิศทาง

นำสารสกัดที่เป็นสารประกอบฟีนอลิกอิสระที่แยกได้จากตัวอย่างทั้ง 12 ชนิดดังกล่าว มาวิเคราะห์คุณภาพโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีบนกระดาษแบบสองทิศทาง โดยมีสารละลาย BAW (6 : 1 : 2 โดยปริมาตร) เป็นสารละลายตัวพาทิศทางที่ 1 และสารละลาย 2% acetic acid เป็นสารละลายตัวพาทิศทางที่ 2 ดังได้กล่าวไว้แล้วในข้อ 2.4.7.4 นำกระดาษโครมาโทแกรมที่ได้มาสเปรย์ด้วยสารละลายเบต้า-แครโธทีน โดยปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง รอจนกระดาษกลายเป็นสีขาวดังเดิม สังเกตบริเวณที่ยังคงมีสีเหลืองอยู่ซึ่งคือบริเวณที่มีสารต้านอนุมูลอิสระนั่นเอง