บทที่ 2 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสาหร่ายอบแห้ง

เก็บรวบรวมสาหร่ายจากชายทะเลจังหวัดจันทบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดชุมพร นำสาหร่ายมาล้างน้ำประปาจนสะอาด หลังจากนั้นนำสาหร่ายมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่ออบจนแห้งแล้วนำสาหร่ายมาบดด้วยเครื่องปั่นอาหารให้เป็นผงละเอียดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจากสาหร่าย 3 วิธี คือ

(1) ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH (2) การหาปริมาณโพลีฟีนอล (Total Phenolic Content, TPC) และ (3) การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Reducing power)

2.1) ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH โดยชั่งสาหร่ายแห้งที่บดละเอียด 1 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 95%, อะซิโตน และน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดึงส่วนใสมาปิเปตลงหลอดทดลอง 1.08 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH (ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์) 0.12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Murakami *et al*. 2004) และนำมาคำนวณ

สมการ DPPH (Absorbance ที่ 517 นาโนเมตร) = 1.0376(DPPH) – 0.0197

สูตร DPPH %DPPH ที่เหลือ = DPPH (ตัวอย่าง)/DPPH(standard)*100

2.2) การหาปริมาณโพลีฟีนอล โดยชั่งสาหร่ายแห้งที่บดละเอียด 1 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 95%, อะซิโตน และน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตั้งที่ไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดึงส่วนใส มาปิเปตลงหลอดทดลอง 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Na_2CO_3 10% 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร ตามวิธี Folin-Ciocealteau (Wolfe *et al*. 2003) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

2.2.1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิค

2.2.1.1 ละลายกรดแกลลิค 0.0200 กรัม ด้วยเอทานอล (95%) ปรับปริมาตรจนได้ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2.2.1.2 ปิเปตสารละลายกรดแกลลิคที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลอง โดยให้มีปริมาณกรดแกลลิค ตั้งแต่ 0-140 ไมโครกรัม เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร ดังแสดงในตาราง

ตารางที่ 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค

หลอดที่	ไมโครลิตรของ working solution	ไมโครกรัมของกรดแกลลิค	มิลลิลิตรน้ำกลั่น
1	0	0	10.00
2	50	20	9.95
3	100	40	9.90
4	150	60	9.85
5	200	80	9..80
6	250	100	9.75
7	300	120	9.70
8	350	140	9.65

2.2.1.3 เติมสารละลาย Folin-Ciocalteau หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

2.2.1.4 เติมสารละลาย Na_2CO_3 (10%) (วิธีเตรียม Na_2CO_3 จำนวน 10กรัม ละลายด้วยน้ำจำนวน 100 มิลลิลิตร) หลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายหลอดที่ 1 เป็น blank

2.2.1.5 นำผลที่วัดได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงกับปริมาณของกรดแกลลิคได้เป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve)

2.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Reducing power) โดยชั่งสาหร่ายแห้งที่บดละเอียด 0.005 กรัม และ 0.01 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2M, pH6.6) 2.5 มิลลิลิตร และเติม potassium ferriccyanide (1%) 2.5 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath 50 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม trichloroacetic acid (10%) 2.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น ดึงส่วนใส 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และเติม $FeCl_3$ (0.1%) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (Kumar *et al*, 2008) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิค

2.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดแกลลิค

2.3.1.1 ละลายกรดแกลลิค 0.0200 กรัม ด้วยเอทานอล (95%) ปรับปริมาตรจนได้ 50 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2.3.1.2 ปิเปตสารละลายกรดแกลลิคที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลอง โดยให้มีปริมาณกรดแกลลิค ตั้งแต่ 0-140 ไมโครกรัม เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเป็น 10 มิลลิลิตร ดังตารางที่ 1

2.3.1.3 เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.2M, pH6.6) 2.5 มิลลิลิตรและเติม potassium ferriccyanide (1%) 2.5 มิลลิลิตร นำไปต้มใน water bath 50 °C เป็นเวลา 30 นาที

2.3.1.4 เติม trichloroacetic acid (10%) 2.5 มิลลิลิตร ดึงstandard 2.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร และเติม $FeCl_3$ (0.1%) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

2.3.1.5 นำผลที่วัดได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงกับปริมาณของกรดแกลลิคได้เป็นกราฟมาตรฐาน (standard curve)

การบันทึกข้อมูล

บันทึกค่าการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระของ DPPH, TPC และ Reducing power ของสาหร่ายที่ได้จากสารสกัดต่าง ๆ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองได้แก่ ความสามารถในการทำลายสารอนุมูลอิสระ DPPH, ปริมาณโพลีฟีนอล มาวิเคราะห์และประเมินผลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS window version 10.0 เพื่อหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสาหร่ายแต่ละชนิดในการทดลอง

สถานที่ทำการศึกษา

ทำการศึกษาตัวอย่างจาก 3 บริเวณคือ บริเวณริมชายหาดของอ่าวคุ้งวิมาน จ.จันทบุรี สถานีวิจัยประมงคลองวาฬ จ. ประจวบคีรีขันธ์ และสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารวิทยาเขตชุมพร อ.ปะทิว จ.ชุมพร และนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง