บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลองจำนวน 10 ชนิด ได้รับจากสถานีเกษตรหลวงอ่างขาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ รายชื่อพืชทั้งหมดเรียงลำดับตามชื่อวิทยาศาสตร์ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างพืช

ลำดับ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อ	ส่วนที่ใช้
1	*Buddieia asiatica* Lour	ราชาวดีป่า	ใบ
2	*Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume	ติ้วเกลี้ยง	ใบ
3	*Embelia sessiliflora* Kurtz	ส้มกุ่ย	ใบ
4	*Litsea cubeba* Pers.	ตะไคร้ต้น	ใบ
5	*Litsea glutinosa* (Lour.) C.B. Rob.	หมีเหม็น	ใบ
6	*Mosia dianthera* (Buch-Ham. ex Roxb.) Maxim.	ผักฮ้านน้ำ	ลำต้น/ใบ
7	*Persicaria odorata* (Lour.) Soja'k	ผักไผ่	ลำต้น/ใบ
8	*Micromelum minutum Wight & Arn*	ผักสมุย	ใบ
9	*Schima wallichii* (D.C.) Korth.	ทะโล้	ใบ
10	-	หญ้าเอ็นเสือ	ลำต้น/ใบ

3.1.2 สารเคมี

- กรดแกลลิก (Fluka, ประเทศเยอรมัน)
- กรดไขมันลิโนเลอิก (linoleic acid) (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- กรดไตรคลอโรอะซีติก (trichloroacetic acid) (Fisher, ประเทศอังกฤษ)
- กรดไทโอบาร์บิทูริก (thiobarbituric acid) (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- กรดอะซิติก (Lab-scan, ประเทศไอร์แลนด์)
- กรดไฮโดรคลอริก (Lab-scan, ประเทศไอร์แลนด์)
- คลอโรฟอร์ม (Lab-scan, ประเทศไอร์แลนด์)
- โซเดียมคาร์บอเนต (Carlo, ประเทศอิตาลี)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- โซเดียมไทโอซัลเฟต (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- โซเดียมเอไซด์ (Ajex-finechem, ประเทศออสเตรเลีย)

- โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- แป้ง (soluble starch) (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- เอทานอล (Lab-scan, ประเทศไอร์แลนด์)
- ไอโซออกเทน (Lab-scan, ประเทศไอร์แลนด์)
- 1,1,3,3-tetraethoxypropane (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl radical (DPPH) (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine (TPTZ) (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 2,2´-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) (Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Fluorescein sodium salt (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Folin – Ciocalteau reagent (Carlo, ประเทศอิตาลี)
- Iron (III) chloride hydrate (Carlo, ประเทศอิตาลี)
- Para-anisidine (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- $K_2HPO_4.3H_2O$ (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- KH_2PO_4 (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- Tween 20 (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- Tween 40 (Merck, ประเทศเยอรมัน)
- Span 80 (Croda, ประเทศอังกฤษ)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เครื่องชั่ง (4 ตำแหน่ง) (Sartorius TE 214, ประเทศเยอรมัน)
- เครื่องชั่ง (2 ตำแหน่ง) (Mettler Toledo PE 3000, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
- ตู้อบลมร้อน (Memmert UFB 400, ประเทศเยอรมัน)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert WB 29, ประเทศเยอรมัน)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (5,500 rpm) (Hettich Zentrifugen EBA 20, ประเทศเยอรมัน)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (9,000 rpm) (Thermo Scientific Legend Mach 1.6R, ประเทศอังกฤษ)
- ปิเปตอัตโนมัติ (Eppendorf, ประเทศเยอรมัน)

- 96 well microtiter plate (Sero-Wel, Bibby Sterilin, ประเทศอังกฤษ)
- 96 black well microtiter plate (Sero-Wel, Bibby Sterilin, ประเทศอังกฤษ)
- Microtiter Plate Reader (Beckman coulter Multimode Detector DTX 880, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Spectrophometer (Shimazu 1700, ประเทศญี่ปุ่น)
- Hot plate magnetic stirrer (IKA C-MAG HS 7, ประเทศเยอรมัน)
- Homogenizer (IKA T25 digital ultra-turrax, ประเทศเยอรมัน)
- หัวปั่น S25N-25F (IKA S25N-25F, ประเทศเยอรมัน)

3.3 สถานที่ดำเนินงาน

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมสารสกัดพืช

ตัวอย่างพืชจะถูกนำมาล้างด้วยน้ำกรองจำนวน 2 รอบ แล้วผึ่งตัวอย่างในที่ร่ม อบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

การสกัดตัวอย่างพืชทำดังนี้ ชั่งตัวอย่างผงพืช ผสมกับเอทานอล (ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นนาน 1 นาที แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้นเทสารสกัดจากพืชรวมกัน แล้วจึงกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 4) นำสารสกัดพืชใส่ในขวดสีชา เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ (-18) ±1 องศาเซลเซียส จากนั้นทำให้เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 10,000 พีพีเอ็ม (ppm) ภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาสารสกัดจากพืชเข้มข้นที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการวิเคราะห์

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

เตรียมสารละลายพืชแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 500 พีพีเอ็ม นำมาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมดและความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

- ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin - Ciocalteu reagent method ของ Singleton และคณะ (1999)

นำสารสกัดตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารสกัดปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครเพลท จากนั้นเติมรีเอเจนต์ Folin Ciocalteau 12.5 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 10 เปอร์เซ็นต์ 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีในที่มืด นำไปวัดค่า

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microtiter plate reader)

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

- ความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging assay ที่ดัดแปลงมาจาก Brand-Williams และคณะ (1995)

นำสารสกัดตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 4 ระดับ ปิเปตสารสกัดปริมาตร 70 ไมโครลิตรลงในหลุมไมโครเพลท แล้วเติมสารละลาย DPPH (ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์) 210 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างไปคำนวณหา % inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ inhibition} = (1 - A_{sample} / A_{control}) \times 100$$

โดย % inhibition หมายถึง ความสามารถในการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ

$A_{control}$ หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

A_{sample} หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง

จากนั้นนำค่า %inhibition เขียนกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง เพื่อหาสมการความสัมพันธ์และจุดตัดแกน Y ที่ 50 จะได้ค่า IC_{50} หมายถึงความเข้มข้นของการทำลายอนุมูล DPPH ลง 50 เปอร์เซ็นต์ (inhibitory concentration, IC_{50})

- Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) โดยวัดความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ตามวิธีของ Zhou และ Yu (2004)

นำสารสกัดตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารสกัดปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครเพลท แล้วเติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ (ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์) 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง ไปคำนวณหาความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox

- ความสามารถในการรีดิวซ์ทั้งหมดด้วยวิธี Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) ของ Benzie และ Strain (1999)

นำสารสกัดตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารสกัดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครเพลท แล้วเติมสารละลาย FRAP 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที นำไปวัด ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรโดยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง ไปคำนวณหาความสามารถในการรีดิวซ์ทั้งหมด โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox

- การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assays ดัดแปลงจากวิธีของ Dávalos และคณะ (2004)

นำสารสกัดตัวอย่างเจือจางด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมไมโครเพลทของถาดสีดำก้นทึบ แล้วเติมรีเอเจนต์ฟลูออเรสซีน (fluorescein) ความเข้มข้น 10 นาโนมาลาร์ จำนวน 120 ไมโครลิตร ปิดฝา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย AAPH (ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์) 60 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท โดยกำหนดความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation) เท่ากับ 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นของการเปล่งแสง (emission) เท่ากับ 535 นาโนเมตร บันทึกค่าการเปล่งแสงทุกๆ 1 นาทีเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ดังสมการ

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + f_4/f_0 + \ldots\ldots\ldots + f_i/f_0$$

โดย f_0 หมายถึง ค่าฟลูออเรสเซนต์เริ่มต้น (นาทีที่ 0)

f_i หมายถึง ค่าฟลูออเรสเซนต์ที่เวลา i นาที

นำค่า AUC ที่ได้มาหาค่าความแตกต่างของพื้นใต้กราฟระหว่างตัวอย่างกับรีเอเจนต์ (blank) หรือ ค่า net AUC ตามสมการ

$$\text{net AUC} = AUC_{(sample)} - AUC_{(blank)}$$

จากนั้นนำค่า net AUC ไปคำนวณหาความสามารถในการชะลอการเกิดออกซิเดชันของฟลูออเรสซีน โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox

3.4.3 ผลของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของอิมัลชัน

เตรียมอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่มีสัดส่วน 90 และ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมสารสกัดพืช แต่ละชนิดจำนวนทั้งหมด 10 ชนิด ชนิดละ 2 ความเข้มข้น คือ 200 และ 500 พีพีเอ็ม จากนั้นวิเคราะห์การออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี TBARS ค่าเปอร์ออกไซด์ (PV) และค่า p-Anisidine (p-AV) โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างอิมัลชันควบคุม(ไม่เติม BHT) และอิมัลชันเติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม เพื่อคัดเลือกพืชที่เหมาะสมกับอิมัลชันแต่ละประเภทจำนวน 2 ชนิด สำหรับทดสอบในตอนที่ 2 ต่อไป

3.4.3.1 การเตรียมอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันที่มีสัดส่วนน้ำมัน 90 เปอร์เซ็นต์

1) การเตรียมน้ำมัน (ดัดแปลงจากวิธีของ Abdalla และคณะ, 1999)

แบ่งน้ำมันถั่วเหลืองออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 หนัก 20 กรัม และส่วนที่ 2 หนัก 90 กรัม

2) การเตรียมน้ำมันเติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม (ดัดแปลงจากวิธีของ Abdalla และคณะ, 1999)

ชั่ง BHT 1 กรัม ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร (stock 100,000 พีพีเอ็ม) จากนั้นปิเปต stock BHT 0.1 มิลลิลิตร ลงในน้ำมัน(ส่วนที่ 1) 20 กรัม อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซสเซียส นาน 30 นาที เมื่อไปเตรียมอิมัลชัน จะได้อิมัลชันเติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

3) การเตรียมสารละลายพืช

ชั่งน้ำหนักพืชตามความเข้มข้นที่ต้องการ (200 และ 500 พีพีเอ็ม) เติม Tween 20 น้ำหนัก 0.6 กรัมแล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เทสารละลายพืชผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร กวนผสมด้วย magnetic stirrer ที่ความเร็วรอบ 750 rpm นาน 1 นาที เพื่อใช้เป็นส่วนบัฟเฟอร์

ตะกอนพืชส่วนที่เหลือให้นำมาผสมกับ Span 80 น้ำหนัก 0.4 กรัม ละลายด้วยน้ำมันส่วนที่ 1 (น้ำหนัก 20 กรัม) ให้เข้ากัน ใช้เป็นน้ำมันส่วนที่ 1 ในการเตรียมอิมัลชัน

4) ขั้นตอนการเตรียมอิมัลชันควบคุม (ดัดแปลงจากวิธีของ Porras และคณะ, 2008)

เตรียมส่วนบัฟเฟอร์ โดยผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติม Tween 20 หนัก 0.6 กรัม กวนผสมด้วย magnetic stirrer ที่ความเร็วรอบ 750 rpm นาน 1 นาที แล้วเติมน้ำมันส่วนที่ 1 ที่มี Span 80 จำนวน 0.4 กรัมละลายอยู่ลงในส่วนบัฟเฟอร์ช้าๆ ในระหว่างการเติมให้กวนผสมที่ความเร็วรอบ 750 rpm เมื่อเติมน้ำมันหมดแล้วให้กวนผสมต่อไป โดยใช้เวลาช่วงแรกทั้งหมด 10 นาที จากนั้นค่อยๆเติมน้ำมันส่วนที่ 2 (น้ำหนัก 70 กรัม) จนหมดและเพิ่มความเร็วในการผสมเป็น 1000 rpm อิมัลชันจะมีสีขาวขุ่นและมีความหนืดเพิ่มขึ้นให้กวนผสมจนครบ 10 นาที จากนั้นลดความเร็วรอบเหลือ 750 rpm และกวนผสมต่อไปอีก 5 นาที รวมระยะเวลาในการเตรียมทั้งหมด 26 นาที

แบ่งอิมัลชันที่ได้ลงขวดเก็บตัวอย่าง ขวดละ 10 กรัม พักที่อุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส นาน 1 ชั่วโมงก่อนนำไปเก็บรักษาในที่มืด ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซสเซียส สุ่มเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 56 วัน

การเตรียมอิมัลชันที่เติมสารสกัดพืชและอิมัลชันเติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ใช้ขั้นตอนการเตรียมแบบเดียวกับข้อ 2.5 โดยอิมัลชันที่เติมสารสกัดพืชใช้ส่วนบัฟเฟอร์และน้ำมันส่วนที่ 1 ตามข้อ 2.4 ส่วนอิมัลชันเติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ใช้น้ำมันเติม BHT (ข้อ 2.1) แทนน้ำมันส่วนที่ 1

3.4.3.2) อิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันที่มีสัดส่วนน้ำมัน 70 เปอร์เซ็นต์

เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ น้ำมันส่วนที่ 1 และน้ำมันเติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ตามข้อ 1.1-1.3

1) การเตรียมสารละลายพืช

ชั่งน้ำหนักพืชตามความเข้มข้นที่ต้องการ (200 และ 500 พีพีเอ็ม) เติม Tween 20 น้ำหนัก 0.6 กรัมแล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร เทสารละลายพืชผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ 15 มิลลิลิตร คนผสมด้วย magnetic stirrer ที่ความเร็วรอบ 750 rpm นาน 1 นาที เพื่อใช้เป็นส่วนบัฟเฟอร์ ตะกอนพืชส่วนที่เหลือให้นำมาผสมกับ Span 80 น้ำหนัก 0.4 กรัม ละลายด้วยน้ำมันส่วนที่ 1 (น้ำหนัก 20 กรัม)ให้เข้ากัน ใช้เป็นน้ำมันส่วนที่ 1ในการเตรียมอิมัลชัน

2) การเตรียมอิมัลชันควบคุม (ดัดแปลงจากวิธีของ Porras และคณะ, 2008)

เติมน้ำมันส่วนที่ 1 (มี Span 80 น้ำหนัก 0.4 กรัมละลายอยู่) ลงในส่วนบัฟเฟอร์ที่ผสม Tween 20 จำนวน 0.6 กรัม อย่างช้าๆ ในระหว่างการเติมให้กวนผสมด้วย magnetic stirrer ที่ความเร็วรอบ 750 rpm เมื่อเติมน้ำมันหมดแล้วให้กวนผสมต่อไป โดยใช้เวลาในช่วงแรก 10 นาที จากนั้นค่อยๆเติมน้ำมันส่วนที่ 2 (น้ำหนัก 50 กรัม) จนหมด กวนผสมต่ออีก 20 นาที นำอิมัลชันที่ได้ไปโฮโมจีไนซ์ที่ความเร็วรอบ 13,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที

แบ่งอิมัลชันลงขวดเก็บตัวอย่าง ขวดละ 10 กรัม พักที่อุณหภูมิ 4 องศาเซสเซียส นาน 1 ชั่วโมงก่อนนำไปเก็บรักษาในที่มืด ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซสเซียส สุ่มเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกๆ 4 วัน เป็นระยะเวลา 32 วัน

การเตรียมอิมัลชันที่เติมสารสกัดพืชและอิมัลชันเติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม โดยอิมัลชันที่เติมสารสกัดพืชใช้ส่วนบัฟเฟอร์และน้ำมันส่วนที่ 1 ตามข้อ 2.1 ส่วนอิมัลชันเติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ใช้น้ำมันเติม BHT แทนน้ำมันส่วนที่ 1

3.4.3.3) การวิเคราะห์ทางเคมี

1) การวิเคราะห์การออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี TBARS (ดัดแปลงจากวิธีของ McDonald และ Hutin, 1987)

ชั่งตัวอย่างอิมัลชันหนัก 0.1 กรัมในหลอดทดลอง (ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) เติมน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมรีเอเจนต์ TBARS จำนวน 2 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงกำหนดความเร็วรอบ 5,500 rpm นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร คำนวณปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (MDA) จากกราฟมาตรฐานของ 1,1,3,3-tetraethoxypropane แสดงค่าในหน่วย มิลลิโมลาร์ของมาลอนไดอัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง(mM MDA/kg sample)

2) การวิเคราะห์ค่าเปอร์ออกไซด์ (Peroxide Value, PV) ตามวิธี Cd 8-53 (AOCS, 2003)

นำตัวอย่างอิมัลชันไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำลายระบบอิมัลชันด้วยการละลายตัวอย่าง แล้วนำไปเหวี่ยงแยกชั้นน้ำมันด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างน้ำมันที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

ชั่งตัวอย่างน้ำมันจำนวน 0.5 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ (ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ) เติมสารละลายกรดอะซิติกและคลอโรฟอร์ม(อัตราส่วน 3:2) จำนวน 3 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์อิ่มตัวจำนวน 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จะได้สารละลายสีเหลือง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์จำนวน 100 ไมโครลิตร สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน นำมาไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไทโอความเข้มข้น 0.01 นอร์มอลจนสารละลายเปลี่ยนเป็นไม่มีสี จดปริมาตรที่ใช้(S)

ทำการไตเตรต blank ตามขั้นตอนข้างต้นโดยไม่ใส่ตัวอย่าง จดปริมาตรที่ใช้(B) แล้วนำปริมาตรที่ได้มาคำนวณค่าเปอร์ออกไซด์ (PV) ตามสมการ

$$\text{ค่าเปอร์ออกไซด์ (PV)} = \frac{(S-B) \times N \times 1000}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)}}$$

โดย B คือ มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรต blank

S คือ มิลลิลิตรของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

N คือ ความเข้มข้น(นอร์มอล)ของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต

3) การวิเคราะห์ค่า p-Anisidine (p-Anisidine Value, p-AV) ตามวิธี Cd 18-60 (AOCS, 1997)

ชั่งตัวอย่างน้ำมันตามข้อ 4.2.1 หนัก 0.1 กรัม ละลายด้วยไอโซออกเทนปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายดังกล่าว 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง (ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ) เติมรีเอเจนต์ p-Anisidine 0.2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณค่า p-Anisidine ตามสมการ

$$\text{p-AV} = \frac{5 \times (1.2As-Ab)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)}}$$

โดย As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่เติมรีเอเจนต์ p-Anisidine

Ab คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

4) วิเคราะห์ปริมาณออกซิเดชันทั้งหมด (Totox V)

คำนวณปริมาณออกซิเดชันทั้งหมดตามสมการ

$$\text{Totox V} = 2\,\text{PV} + \text{p-AV}$$

การคัดเลือกสารสกัดพืช พิจารณาจากสารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งการออกซิเดชันสูงสุด 2 ลำดับแรกในทุกวิธีทดสอบ โดยเลือกสารสกัดพืช 2 ชนิดในแต่ละความเข้มข้นของอิมัลชันแต่ละประเภท จากนั้นนำไปทดสอบในตอนที่ 2 ต่อไป

3.4.4 ผลของพีเอช และอุณหภูมิต่อการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของอิมัลชันของสารสกัดพืชที่คัดเลือก

นำสารสกัดพืชที่คัดเลือกมาเติมในอิมัลชัน(มีสัดส่วนน้ำมัน 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์)ที่เตรียมในขั้นในสภาวะแตกต่างกัน คือ พีเอช = 3, 5.4 และ 7 แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส วิเคราะห์การออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี TBARS ค่าเปอร์ออกไซด์(PV) และค่า p-Anisidine(p-AV) โดยเปรียบเทียบตัวอย่างอิมัลชันควบคุม (ไม่เติม BHT) และอิมัลชันเติม BHT ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม

3.4.4.1 การเตรียมอิมัลชันที่ประกอบด้วยน้ำมัน90 และ 70 เปอร์เซ็นต์

1) การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ (พีเอช = 3, 5.4 และ 7)

เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช = 5.4) ตามข้อ 2.1 ส่วนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช=3 เตรียมโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก 10 นอร์มอล และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช=7 ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์ เติมลงในบัฟเฟอร์เพื่อปรับพีเอชให้มีค่าตามที่กำหนดไว้ จากนั้นเติมโซเดียมเอไซด์(0.2 กรัม)แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มิลลิลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดที่เตรียมขึ้นนี้ มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จึงต้องเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ในขั้นตอนการเตรียมอิมัลชัน

2) ขั้นตอนการเตรียมอิมัลชัน

การเตรียมอิมัลชันที่ประกอบด้วยน้ำมัน90 และ 70 เปอร์เซ็นต์ มีรายละเอียดตามข้อ 2.5 และ 3.2 ตามลำดับ โดยเปลี่ยนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีพีเอชตามที่กำหนด แล้วนำไปเก็บในที่มืด ควบคุมอุณหภูมิที่ 25, 35 และ 45 องศาเซียสเซส โดยสุ่มเก็บตัวอย่างตามความเหมาะสมของแต่ละอุณหภูมิ

3) การวิเคราะห์ทางเคมี

ทำการวิเคราะห์ทางเคมีตามรายละเอียดที่แสดงไว้ในข้อ 4.1-4.3 และคำนวณหาค่า Q_{10} และ ค่าครึ่งชีวิต ($t_{1/2}$) ตามสมการ

$$Q_{10} = \frac{\text{อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียส } (T+10^{\circ}C)}{\text{อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่กำหนด } (T^{\circ}C)}$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

โดย k หมายถึง ค่าคงที่ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่กำหนด

3.4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าที่วิเคราะห์ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองอย่างน้อย 2 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างของความสามารถของพืชแต่ละชนิด ด้วยวิธี one-way ANOVA procedure ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์