

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือ สารเคมีและตัวอย่างที่ใช้

##### 3.1.1 เครื่องมือ

1. High-performance liquid chromatography apparatus – Hewlett Packard model 1200 series H/L system equipped with a quaternary pump 79835A, a UV-Vis photodiode array detector 79883A, with an automatic sample injector 79846A, a column oven 79847A and an on-line vacuum degasser G1303A. This instrument was installed with HP ChemStation data software version 6.03
2. Analytical balance – Ohaus, model Adventurer Pro, capable of weighing 0.0001-260 g
3. Autosampler vials and caps amber – Sun, # 200-406
4. Centrifuge – LW Scientific, model 800-726-7345
5. Furnace – Carbolite, model CWF 12/13
6. Micropipette – Eppendorf, 0.5-10  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ l
7. pH meter – Eutech, cyberscan pH 1100
8. Spectrophotometer – Perkin Elmer preciselx, model Lambda 25, USA
9. Ultrasonic bath – Elma, T710DH, Germany

## 1.2 สารเคมี

1. ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] diammonium salt, Fluka, Switzerland
2. L-ascorbic acid, POCH, Poland
3. Ethanol, Merck, Germany
4. Ethyl acetate, Merck, Germany
5. Folin-Ciocalteu phenol reagent, Merck, Germany
6. Gallic acid, Sigma Chemical Co., USA
7. Iron (III) chloride heptahydrate, Ajax Finechem, Australia
8. Methanol, Fisher, UK
9. Potassium dihydrogen phosphate, Merck, Germany
10. Potassium ferricyanide, Ajax Finechem, Australia
11. Potassium persulfate, Ajax Finechem, Australia
12. Sodium acetate, Labscan Asia, Thailand
13. Sodium carbonate (anhydrous), Ajax Finechem, Australia
14. Sodium hydroxide, Ajax Finechem, Australia.
15. Sulfuric acid, Merck, Germany.
16. Trichloroacetic acid, Merck, Germany
17. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), Sigma-Aldrich Chemical Co., USA

### 3.1.3 ตัวอย่างที่ใช้

- 1) การคัดเลือกสายพันธุ์บรอกโคลี

คัดเลือกเมล็ดบรอกโคลีที่มีจำหน่ายในประเทศไทยในช่วงเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2553 – เมษายน พ.ศ. 2554 มีจำนวนทั้งสิ้น 4 สายพันธุ์ ได้แก่ คือ สายพันธุ์กรีนควีน ทีเอ

022 (Green queen TA 022 ), สายพันธุ์มอนท็อบ (Mon top ), สายพันธุ์ท็อปกรีน (Top green) และ สายพันธุ์หยกเขียว 2034 (Yok kheo 2034)

## 2) การเตรียมตัวอย่างบรอกโคลีเริ่มงอก

นำเมล็ดบรอกโคลีสายพันธุ์ตาม ข้อ 1) ไปเพาะในถาดปลูก โดยใช้สำลีหรือกระดาษทิชชูรองที่ก้นถาด แล้ววางเมล็ดพันธุ์ลงไปให้มีระยะห่างอย่างน้อย 1 เซนติเมตร ปิดทับด้วยสำลีหรือกระดาษทิชชูอีกชั้น พรมน้ำเป็นระยะๆ ให้พอเปียก (หากให้น้ำมากเกินไปจะทำให้ตัวอย่างเน่าได้) ใช้เวลา 7 วันจึงเก็บตัวอย่าง และนำมาใช้ในการทดสอบต่อไป

## 3.2 การตรวจคัดกรองทางเคมีเพื่อหากลุ่มสารสำคัญ (Phytochemical screening)

- ใช้วิธีการ โดย Harborne J.B. (1973) และ อ้อมบุญ ส่วนรัตน์ (2536)

### 3.2.1 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids screening test)

นำตัวอย่างบรอกโคลีเริ่มงอก 10 กรัมที่สับเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ในเอทานอล 95% จำนวน 50 มล.ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ระบายให้แห้ง แล้วละลายด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 – 100 °C จำนวน 5 มล. กรองแล้วเติมสารละลายแอมโมเนียเจือจาง 5 มล.และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ประมาณ 10 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

### 3.2.2 การตรวจสอบแทนนิน ( Tannins screening test)

นำตัวอย่างบรอกโคลีเริ่มงอก 10 กรัมที่สับเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ในเอทานอล 95% จำนวน 50 มล.ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ทำการกรองเก็บน้ำยาสกัด นำไปประเหยให้แห้ง

แล้วละลายด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 – 100 °C จำนวน 5 มล. กรอง แล้วเติม สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 5% เล็กน้อย สังเกตสีที่เกิดขึ้น (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

### 3.2.3 การตรวจสอบคูมารินส์ (Coumarins screening test)

บดตัวอย่างบรอกโคลีเริ่มงอก ประมาณ 5 กรัม ใส่หลอดแก้วทดลอง เติมน้ำกลั่น ให้ขึ้น นำกระดาษกรองชุบสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20% ปิดปาก หลอดแก้วทดลองให้สนิท นำหลอดทดลองไปแช่หม้ออังไอน้ำ 5 นาที ถอด กระดาษกรองออกแล้ววางบนกระดาษฟิวส์ นำไปส่องภายใต้แสง UV (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

## 3.3 การหาปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (Quantitative analysis of phenolic compounds)

### 3.3.1 การเตรียมสารสกัดของบรอกโคลีเริ่มงอก

นำตัวอย่างบรอกโคลีเริ่มงอก 10 กรัมที่สับเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ในเอทานอล 95% จำนวน 50 มล.ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองสารสกัด ระบายให้แห้งแล้วเพื่อนำไป ทดสอบต่อไป

### 3.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก

ใช้วิธีการโดย Hammerschmidt และ Pratt (1978) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Folin-Ciocalteu method คำนวณผสมสารสกัด 0.2 มล. กับ 1 มล. ของ 10% Folin-Ciocalteu solution และ 0.8 มล. ของ 7.5% sodium carbonate solution จากนั้นทิ้ง สารผสมนาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 765 nm

คำนวณปริมาณกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก ตามสมการ ดังนี้

$$C = c(V/m')$$

where:  $C$ —total content of phenolic compounds, mg/g seed extract, in GAE;

$c$ —the concentration of gallic acid established from the calibration curve, mg/ml;

$V$ —the volume of extract, ml;

$m'$ —the weight of pure seed ethanolic extract, g.

### 3.4 การวิเคราะห์สมบัติต้านออกซิเดชัน (Antioxidant assay)

#### 3.4.1 การเตรียมสารสกัดของบรอกโคลีเริ่มงอก

นำตัวอย่างบรอกโคลีเริ่มงอก 10 กรัมที่สับเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล, เอทานอล 95% และเอทิลอะซิเตต จำนวนละ 50 มล.ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ระบายตัวทำละลายแต่ละชนิดจนแห้งเพื่อนำไปทดสอบ

#### 3.4.2 ฤทธิ์กำจัดอนุมูล 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid): ABTS method

อ้างอิงวิธีการ โดย Re *et al.*, (1999) ดังนี้ ผสม 7 mM ABTS 5 มล. กับ 140 mM – ของโพแตสเซียมเปอร์ซัลเฟต 88 ไมโครลิตร เก็บในที่มืด 16 ชั่วโมง เจือจางด้วย 95% เอทานอลเพื่อให้อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 734 nm ได้ระหว่าง 0.70 – 0.05 ในการวัดฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS หยดน้ำยานี้ 1 มล. ลงในหลอดที่มีสารทดสอบที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล 95% และเอทิลอะซิเตตที่เตรียมไว้แล้ว ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 6 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 nm นำไปคำนวณฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS เป็นร้อยละ

ฤทธิ์กำจัดอนุมูล ABTS (%) =  $[1 - (A_{734 \text{ sample}} / A_{734 \text{ Blank}})] \times 100$

เมื่อ  $A_{734 \text{ sample}}$  และ  $A_{734 \text{ Blank}}$  เป็นค่าดูดกลืนแสงที่ 734 nm ของสารทดสอบ และแบลนด์ตามลำดับ เปรียบเทียบความเข้มข้นโดยใช้ Trolox และวิตามินซีเป็น สารมาตรฐาน

### 3.4.3 การวัดความสามารถในการรีดิวส์

ใช้วิธีโดย Oyaizu , (1986) ดังนี้ หยดสารทดสอบ 1 มล. ลงในหลอดที่มี 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.6) 2.5 มล. และ 1%(w/v) โปแตสเซียมเพอร์ริกไซยาไนด์ 2.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม(incubate) ในหม้ออังไอน้ำที่ 50 °C เป็นเวลา 20 นาที เติม 10%(w/v) กรดไทรคลอโรอะซิติก (TCA) 2.5 มล. ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายที่อยู่ส่วนบน 0.1 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 1.0 มล. และ 0.1% (w/v) เพอร์ริกคลอไรด์ จำนวน 2.0 มล. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 700 nm เทียบกับวิตามินซี ที่ความเข้มข้นต่างกัน

### 3.5 สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) จากโปรแกรม SPSS version 11.5 for windows, SPSS Inc., USA. เพื่อหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95