

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. HPLC (Knauer : EZchrom Germany)
2. UV/VIS spectrophotometer (PerkinElmer precisely : Lambda 35)
3. vacuum-system (Büchi : B-169)
4. water bath (Büchi : B-480)
5. rotavapor (Büchi : R-124)
6. incubator 37°C (Termaks)
7. incubator 30°C (Binder : KB 240)
8. vortex (Genie 2)
9. digital thermometer and thermocouple (FLUKE : 52 II series)
10. shaker (Heidolph UNIMAX 2010)

3.2 สารเคมี

1. Ethanol (AR grade (99.8%) : Merck, Germany)
2. Potassium hydroxide (AR grade (85.0%) : Fisher, Germany)
3. Diethyl Ether (AR grade (99.5%) : LAB-SCAN, Ireland)
4. Sodium sulfate anhydrous (AR grade (99.5%) : Ajax, Australia)
5. Methanol (AR grade (99.9%) : LAB-SCAN, Ireland)
6. Methanol (HPLC grade (99.9%) : Fisher, Germany)
7. Acetic acid (AR grade (100.0%) : LAB-SCAN, Ireland)
8. Standard α -, γ -, δ -Tocopherol (HPLC grade : Sigma-aldrich, Germany)
9. Chloroform (AR grade (99.8%) : LAB-SCAN, Ireland)
10. Acetonitrile (AR grade ($\geq 99.0\%$) : LAB-SCAN, Ireland)
11. Acetonitrile (HPLC grade ($\geq 99.9\%$) : LAB-SCAN, Ireland)
12. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ((AR grade ($\geq 85\%$) : Fluka, Germany)

13. di-Potassium hydrogen phosphate (AR grade (99.0%) : Ajax, Australia)
14. Potassium dihydrogen phosphate (AR grade (99.5%) : Ajax, Australia)
15. Potassium ferricyanide (AR grade (99.0%) : Ajax, Australia)
16. Trichloroacetic acid (AR grade (99.5%) : Merck, Germany)
17. Ferric chloride (Laboratory reagent (98.0%) : Fisher, Germany)
18. Linoleic acid (GC grade (99.0%) : Fluka, Germany)
19. Tween 20 (AR grade (99.5%) : Ajax, Australia)
20. Ethanol (AR grade (99.9%) : Merck, Germany)
21. Ammonium thiocyanate (AR grade (98.5%) : Ajax, Australia)
22. Ferrous chloride (Purum grade (99.0%) : Sigma-aldrich, Germany)
23. Hydrochloric acid (AR grade (37.0%) : LAB-SCAN, Ireland)
24. 2-Thiobarbituric acid (Purum grade (98.0%) : Fluka, Germany)
25. Xanthine oxidase from buttermilk (Biochemika grade (0.07 U/mg) :
Fluka, Germany)
26. BHA (Butylated hydroxyanisole) (AR grade (98.0%) : Sigma-aldrich, Germany)
27. BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methyphenol) (AR grade (98.0%) : Sigma-aldrich, Germany)
28. TBHQ (2,5-Di-tert-butylhydroquinone) (AR grade (97.0%) : Fluka, Germany)
29. α -Tocopherol (AR grade : Sigma-aldrich, Germany)
30. Xanthine (HPLC grade ($\geq 99.0\%$) : Sigma-aldrich, Germany)
31. Ethylenediaminetetra acetic acid di-sodium salt (AR grade (99.0%) :
Ajax, Australia)
32. Bovine serum albumin (AR grade (96.0%) : Fluka, Germany)
33. Copper (II) chloride (AR grade ($\geq 98\%$) : Merck, Germany)
34. Nitrotetrazolium blue chloride (AR grade ($\geq 88\%$) : Fluka, Germany)
35. คีส์ทิลเลตของน้ำมันรำข้าวคิง (บริษัทน้ำมันบริโกคไทย จำกัด, ประเทศไทย) คีส์ทิลเลตที่
ได้จากกระบวนการกำจัดกลิ่น (deodorization) ของน้ำมันรำข้าว, Lot No. : 040509 ผลิตวันที่ 4
พฤษภาคม 2552

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1. ศึกษาอัตราส่วนระหว่างดิสทิลเลตกับอะซิโตนไตรล์ ที่เหมาะสมในการสกัด แอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล จากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยวิธี winterization

ทำการสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลายอะซิโตนไตรล์ (Ko *et al.*, 2008) ด้วยวิธี winterization โดยใช้สารผสมที่มีอัตราส่วนของดิสทิลเลตต่ออะซิโตนไตรล์ เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 (w/v) โดยในแต่ละอัตราส่วนจะใช้อะซิโตนไตรล์ที่อุณหภูมิ 0 และ -20°C ตามลำดับ แต่ละครั้งของการสกัดจะสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง กวนผสมที่ 200 รอบต่อนาที นำสารละลายที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ (ใช้กระดาดกรองเบอร์ 5) ที่อุณหภูมิประมาณ -22 °C แยกส่วนที่ไม่ละลายออก นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองไประเหยอะซิโตนไตรล์ออกด้วยการกลั่นระบบสุญญากาศ จากนั้นทำบริสุทธิ์สารสกัดที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองด้วยการทำซาฟอนิฟิเคชันแบบเย็น (cold saponification) (AOCS, 1997) ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ แอลฟา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล ด้วยเทคนิค RP- HPLC (Rangkadilok *et al.*, 2010) และทำการชั่งน้ำหนักสารที่สกัดได้ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัด คำนวณความเข้มข้นของวิตามินอีที่สกัดได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดเลือกอัตราส่วนดิสทิลเลตต่ออะซิโตนไตรล์ ที่เหมาะสมที่สุดในการแยกวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

3.3.2. ศึกษาสมบัติของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้ อะซิโตนไตรล์ด้วยวิธี winterization

3.3.2.1 ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ (scavenging activity) และสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้ อะซิโตนไตรล์ด้วยวิธี winterization เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

(1) ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ (scavenging activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

นำวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตนไตรล์ด้วยวิธี winterization ในปัจจัยที่คัดเลือกสำหรับวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ของวิตามินอี จากข้อที่ 3.3.1 มาศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยนำวิตามินอีที่มีความเข้มข้น 0-10 µg/mL ปริมาตร 4 mL ละลายในส่วนผสมของคลอโรฟอร์ม และเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) และเติมลงไปในส่วนละลายของ DPPH radical ในเมทานอลเข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 1 mL นำส่วนผสมไปตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์สมบัติการจับ

อนุมูลอิสระ degree of free radical scavenging activity โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm หากมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำ แสดงว่ามีสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูง (Kim, 2005) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH radical สามารถคำนวณได้จากสมการ ดังแสดงในภาคผนวก ข-1 (ภาคผนวก ข)

(2) ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ (scavenging activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

นำวิตามินอีที่สกัดจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตนไตรล์ด้วยวิธี winterization ในปัจจัยที่คัดเลือกสำหรับวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ของวิตามินอี จากข้อที่ 3.3.1 มาศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยนำวิตามินอีและสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (แอลฟา-โทโคเฟอรอล, BHA, BHT และ TBHQ) ที่มีความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 4 mL ละลายในส่วนผสมของคลอโรฟอร์มและเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) และเติมลงในสารละลายของ DPPH radical ในเมทานอลเข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 1 mL นำส่วนผสมไปตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์สมบัติการจับอนุมูลอิสระ degree of free radical scavenging activity โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm หากมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำ แสดงว่ามีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูง (Kim, 2005) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH radical สามารถคำนวณได้จากสมการ ดังแสดงในภาคผนวก ข-1 (ภาคผนวก ข)

(3) การวิเคราะห์ค่า reducing power ของวิตามินอีที่สกัดจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยใช้อะซิโตนไตรล์ด้วยวิธี winterization

นำสารละลายตัวอย่างวิตามินอีที่สกัดจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้ อะซิโตนไตรล์ ด้วยวิธี winterization ในปัจจัยที่คัดเลือกสำหรับวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ของวิตามินอี จากข้อที่ 3.3.1 มาศึกษาสมบัติ reducing power โดยนำวิตามินอีที่สกัดได้ที่มีความเข้มข้น 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 0.1 mL ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M pH 6.6 ปริมาตร 0.25 mL และโพแทสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 1%w/v ปริมาตร 0.25 mL นำสารละลายผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 นาที มาเติม 10%v/v trichloroacetic acid 0.25 mL นำไปเหวี่ยงแยกที่ 4500 รอบต่อนาที ที่ 25°C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนบนมา 0.25 mL ผสมกับน้ำกลั่น 0.25 mL และเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) 0.1%w/v ปริมาตร 0.05 mL นำไป

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นแสดงว่ามีค่า reducing power เพิ่มขึ้น (Kim, 2005)

(4) ศึกษาสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตนไตรล์ด้วยวิธี winterization โดย ferric thiocyanate method

นำวิตามินอีที่สกัดจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตนไตรล์ด้วยวิธี winterization ในข้อที่ 3.3.1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 $\mu\text{g/mL}$ มาศึกษาสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชัน ในปฏิกิริยาการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก โดยเติมสารอิมัลชันของกรดลิโนเลอิก 0.02 M pH 7.0 ซึ่งเตรียมโดยการผสมกรดลิโนเลอิก 0.2804 g กับ tween 20 จำนวน 0.2804 g ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 50 mL ใช้สารอิมัลชันของกรดลิโนเลอิกปริมาตร 2.5 mL และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M pH 7.0 ปริมาตร 2 mL ลงไปในสารละลาย 0.5 mL ของวิตามินอีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 วัน ทำการวัดทุก ๆ 24 ชั่วโมงโดยนำส่วนผสม ปริมาตร 0.1 mL มาเติมเอทานอล 75% ปริมาตร 4.7 mL แอมโมเนียมไทโอไซยาเนต 30% ปริมาตร 0.1 mL และ 0.2 M เฟอรัสคลอไรด์ ในสารละลายไฮโดรคลอริก 3.5% ปริมาตร 0.1 mL นำมาวัดค่าเปอร์ออกไซด์ (peroxide value) เพื่อหาค่า degree of oxidation ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm (Kim, 2005) และการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (%) สามารถคำนวณได้จากสมการดังแสดงในภาคผนวก ข-2 (ภาคผนวก ข)

(5) การวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยวิธี thiobarbituric acid

เตรียมสารละลายตัวอย่างวิตามินอีตามวิธีของ ferric thiocyanate method ดังข้อ (4) และนำสารละลายตัวอย่างวิตามินอีที่ผ่านการบ่มแล้วเป็นเวลา 5 วัน มาวิเคราะห์ด้วยวิธี thiobarbituric acid test โดยนำสารละลายตัวอย่างวิตามินอี 1 mL ผสมกับสารละลายกรดไทรคลอโรอะซิติก 20%v/v ปริมาตร 2 mL และสารละลายกรดไทโอบาบิทูริก ปริมาตร 2 mL จากนั้นนำไปต้มให้เดือด และทำให้เย็น นำไปเหวี่ยงแยกที่ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสของสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (Kim, 2005)

(6) ศึกษาสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตนไตรัลด้วยวิธี winterization โดย ferric thiocyanate method และวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ โดยวิธี thiobarbituric acid เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

ศึกษาสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตนไตรัลด้วยวิธี winterization ในข้อที่ 3.3.1 โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของวิตามินอีเท่ากับ 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกเปรียบเทียบกับแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHA, BHT และ TBHQ) โดยทำตามวิธีในข้อ (4) และ (5) (Kim, 2005) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวัดค่า 2 ครั้งในแต่ละซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design หาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's New multiple Range Test

(7) สมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical scavenging activity)

ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ของวิตามินอีที่สกัดจากคิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้อะซิโตนไตรัลด้วยวิธี winterization ในข้อที่ 3.3.1 โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของวิตามินอีที่มีค่า reducing power สูง และค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่วัดโดย ferric thiocyanate method และ thiobarbituric acid test ที่มีค่าสูงสุด เปรียบเทียบกับ แอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ได้แก่ butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) ในระบบสารอิมัลชันของกรดลิโนเลอิก (เตรียมดังวิธี ข้อ (4)) โดยส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย โซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 10.5 ปริมาตร 1.2 mL แแซนทีน 3 mM ปริมาตร 0.1 mL กลีเซอรีน ไดอะมินเตตระอะซีติกแอซิดไดโซเดียม (EDTA2Na) 3 mM ปริมาตร 0.1 mL โบวินซีรีมอัลบูมิน 0.15% ปริมาตร 0.1 mL nitroblue tetrazolium salt (NBT) 0.75 mM ปริมาตร 0.1 mL และสารละลายตัวอย่างวิตามินอีอิมัลชัน 0.1 mL ผสมส่วนผสมดังกล่าว และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม 6 mU ของ แแซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase : XOD) และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมคอปเปอร์คลอไรด์ (CuCl_2) 6 mM ปริมาตร 0.1 mL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 nm และ

อัตราการยับยั้งสามารถคำนวณโดยการวัดปริมาณของฟอร์มazan (formazan) ที่เกิดขึ้นจาก NBT ในปฏิกิริยาที่มีซูเปอร์ออกไซด์ (Senevirathne *et al.*, 2006; Kim, 2005; และ Nagai *et al.*, 2003)

