บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. HPLC (Shimadzu : HPLC LC-10Avp)
2. UV/VIS spectrometer (PerkinElmer precisely : Lambda 35)
3. vacuum controller (Büchi : V-800)
4. heating bath (Büchi : B-490)
5. rotavapor (Büchi : R-200)
6. incubator 37^{o}C (Termaks)
7. incubator 30^{o}C (Binder : KB 240)
8. water bath (Heto : SBD 50)
9. Oil bath (Memmert : WB 14)
10. centrifuge (Hermle : Z 200A)
11. heating magnetic stirrer (VELP scienifica)
12. vortex (Genie 2)
13. sonicator (Elmasonic : S 30)
14. digital thermometer and thermocouple (FLUKE : 52 II series)

3.2 สารเคมี

1. Ethanol (AR grade ($\geq$99.9%) : Merck, Germany)
2. Pyrogallol (HPLC grade ($\geq$98.0%) : Fluka, Germany)
3. Potassium hydroxide (HPLC grade ($\geq$85.0%) : Merck, Germany)
4. Diethyl Ether (AR grade (95.5%) : LAB-SCAN, Ireland)
5. Sodium sulfate (AR grade ($\geq$99.0%) : Merck, Germany)
6. Hexanes (HPLC grade (99.5%) : LAB-SCAN, Ireland)
7. Methanol (HPLC grade (99.9%) : LAB-SCAN, Ireland)
8. Propan-2-ol (HPLC grade (99.8%) : LAB-SCAN, Ireland)
9. Dichloromethane (HPLC grade (99.8%) : LAB-SCAN, Ireland)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. Standard α-, β-, γ-, δ-Tocopherol (HPLC grade : Sigma-aldrich, Germany)
11. Chloroform (AR grade (99.8%) : LAB-SCAN, Ireland)
12. Methanol (AR grade (≥99.9%) : Merck, Germany)
13. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ((AR grade (≥ 85%) : Fluka,Germany)
14. di-Potassium hydrogen phosphate (AR grade (99.0%) : Merck, Germany)
15. Potassium dihydrogen phosphate (AR grade (99.5%) : Merck, Germany)
16. Potassium ferricyanide (AR grade (99.0%) : Merck, Germany)
17. Trichroroacetic acid (AR grade (>99.5%) : Merck, Germany)
18. Ferric chloride (Laboratory reagent (99.0%) : Merck, Germany)
19. Linoleic acid (GC grade (≥ 99.0%) : Fluka, Germany)
20. Ethanol (AR grade (≥ 99.9%) : Merck, Germany)
21. Ammonium thiocyanate (AR grade (≥ 99.0%) : Merck, Germany)
22. Ferrous chloride (Purum grade (≥ 99.0%) : Sigma-aldrich, Germany)
23. Hydrochloric acid (AR grade (37.0-38.0%) : Merck, Germany)
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 : Sigma-aldrich, Germany)
27. BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methyphenol) (AR grade : Sigma-aldrich, Germany)
28. TBHQ (2,5-Di-tert-butylhydroquinone) (AR grade : Sigma-aldrich, Germany)
29. α-Tocopherol (AR grade : Sigma-aldrich, Germany)
30. Xanthine (HPLC grade (≥ 99.0%) : Sigma-aldrich, Germany)
31. Ethylenediaminetetra acetic acid di-sodium salt (AR grade (99.0-101.0%) : Merck, Germany)
32. Bovine serum albumin (AR grade : Sigma-aldrich, Germany)
33. Copper (II) chloride (AR grade (≥ 98%) : Merck, Germany)
34. Nitrotetrazolium blue chloride (AR grade (≥ 88%) : Merck, Germany)
35. Silicon-oil (Baysilon PM 200, Bayer)
36. ดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวคิง (บริษัทน้ำมันบริโภคไทย จำกัด, ประเทศไทย) ดิสทิลเลตที่ได้จากกระบวนการกำจัดกลิ่น (deodorization) ของน้ำมันรำข้าว, Lot No. : 040805 ผลิตวันที่ 4 สิงหาคม 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1. ศึกษาอัตราส่วนระหว่างดิสทิลเลตกับเฮกเซน อัตราเร็วของใบกวน และอุณหภูมิของเฮกเซนที่เหมาะสมในการสกัดวิตามินอี

ทำการสกัดวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำด้วยวิธีแบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้สารผสมที่มีอัตราส่วนของดิสทิลเลตต่อเฮกเซน เท่ากับ 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 (w/v) โดยในแต่ละอัตราส่วนจะใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิ -10 และ-15^{o}C กวนผสมที่ 250 และ 500 รอบต่อนาที เมื่อได้อุณหภูมิที่กำหนด นำสารละลายที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองไปกรองด้วยกระดาษกรองน้ำตาล แยกส่วนที่ไม่ละลายออก นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองไประเหยเอาเฮกเซนออกด้วยการกลั่นระบบสุญญากาศก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอล โดยใช้ HPLC (AOCS, 1997) ดังแสดงในภาคผนวก ก-1 (ภาคผนวก ก) และทำการชั่งน้ำหนักสารที่สกัดได้ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัด คำนวณปริมาณวิตามินอีที่สกัดได้ ค่าผลผลิต (%) ค่าการตกผลึก (%) และค่า relative recovery (%) ดังแสดงในภาคผนวก ข-1, ข-2, ข-3 และ ข-4 ตามลำดับ (ภาคผนวก ข)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ 4×2×2 Factorial in Completely Randomize Design จากนั้นหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินอีในแต่ละสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's New multiple Range Test เพื่อคัดเลือกอัตราส่วนดิสทิลเลตต่อเฮกเซน อัตราเร็วของใบกวน และอุณหภูมิของเฮกเซนที่เหมาะสมในการแยกวิตามินอีจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว

3.3.2. ศึกษาสมบัติของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำ

3.3.2.1 ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ (scavenging activity) และสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำ

(1) ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ (scavenging activity)

นำวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำในปัจจัยที่คัดเลือกสำหรับวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ของวิตามินอี จากข้อที่ 3.3.1 มาศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) โดยนำวิตามินอีที่มีความเข้มข้น 1.25-700 μg/mL ปริมาตร 4 mL ละลายในส่วนผสมของคลอโรฟอร์ม และเมทานอลในอัตราส่วน 2:1 (v/v) และเติมลงไปในสารละลายของ DPPH radical ในเมทานอลเข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 1 mL นำส่วนผสมไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(2) การวิเคราะห์ค่า reducing power ของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำ

นำสารละลายตัวอย่างวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 µg/mL ปริมาตร 0.1 mL ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 M pH 6.6 ปริมาตร 0.25 mL และ โพแทสเซียมเฟอริคไซยาไนด์ ($K_3Fe(CN)_6$) 1% ปริมาตร 0.25 mL นำสารละลายผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 นาที มาเติม 10% trichloroacetic acid 0.25 mL นำไปเหวี่ยงแยกที่ 3420 รอบต่อนาที ที่ 25°C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนบนมา 0.25 mL ผสมกับน้ำกลั่น 0.25 mL และเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3$) 0.1% ปริมาตร 0.05 mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นแสดงว่ามีค่า reducing power เพิ่มขึ้น (Kim, 2005)

(3) ศึกษาสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำโดย ferric thiocyanate method

นำวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำในข้อที่ 3.3.1 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 µg/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) และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(4) การวิเคราะห์ปริมาณการเกิดมาลอนอัลดีไฮด์ โดยวิธี thiobarbituric acid

เตรียมสารละลายตัวอย่างวิตามินอีตามวิธีของ ferric thiocyanate method ดังข้อ (3) และนำสารละลายตัวอย่างวิตามินอีที่ผ่านการบ่มแล้วเป็นเวลา 5 วัน มาวิเคราะห์ด้วยวิธี thiobarbituric acid test โดยนำสารละลายตัวอย่างวิตามินอี 1 mL ผสมกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 20% ปริมาตร 2 mL และสารละลายกรดไทโอบาบิทิวริก ปริมาตร 2 mL จากนั้นนำไปต้มให้เดือด และทำให้เย็น นำไปเหวี่ยงแยกที่ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสของสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (Kim, 2005)

3.3.2.2 การเปรียบเทียบสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants)

(1) สมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical scavenging activity)

ศึกษาสมบัติการจับอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำในข้อที่ 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), propyl gallate (PG) และ *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) ในระบบสารอิมัลชันของกรดลิโนเลอิก (เตรียมดังวิธี ข้อ (3) ในข้อ 3.3.2.1) โดยส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย โซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 10.5 ปริมาตร 1.2 mL แซนทีน 3 mM ปริมาตร 0.1 mL เกลือเอธิลีน ไดอะมีนเตตระอะซีติคแอซิดไดโซเดียม (EDTA2Na) 3 mM ปริมาตร 0.1 mL โบวีนซีรัมอัลบูมิน 0.15% ปริมาตร 0.1 mL nitroblue tetrazolium salt (NBT) 0.75 mM ปริมาตร 0.1 mL และสารละลายตัวอย่างวิตามินอีอิมัลชัน 0.1 mL ผสมส่วนผสมดังกล่าว และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25^{o}C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติม 6 mU ของ แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase : XOD) และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25^{o}C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมคอปเปอร์คลอไรด์ ($CuCl_2$) 6 mM ปริมาตร 0.1 mL

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(2) สมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity)

ศึกษาสมบัติการต้านการเกิดออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำในข้อที่ 3.3.1 โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของวิตามินอีเช่นเดียวกับข้อ (1) ในข้อ 3.3.2.2 ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกเปรียบเทียบกับแอลฟา-โทโคเฟอรอลสังเคราะห์ และสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (BHA, BHT, TBHQ และ PG) โดยทำตามวิธีในข้อ (3) ในข้อ 3.3.2.1 (Kim, 2005)

การทดลองในแต่ละสภาวะของการเกิดปฏิกิริยา และแต่ละองค์ประกอบในการทดสอบในข้อ 3.3.2.1 และ 3.3.2.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวัดค่า 2 ครั้งในแต่ละซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design หาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's New multiple Range Test

3.3.2.3 ศึกษาความคงตัวต่อความร้อน และอายุการเก็บของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำ

(1) ความคงตัวต่อความร้อนของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำ

นำวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำในข้อที่ 3.3.1 มาศึกษาความคงตัวต่อความร้อน โดยใช้วิตามินอีปริมาณ 5 mL เทลงในหลอดทดลองขนาด 10 mL พ่นแก๊สไนโตรเจนแล้วปิดฝา นำไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง (http://www.cropscience.org.au/icsc2004/poster/5/1/1/654_park.htm) และในน้ำมันที่อุณหภูมิ 180°C เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง (Nystrom และคณะ, 2007) วัดอุณหภูมิของวิตามินอีที่จุดกึ่งกลางของหลอดทดลองเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิตลอดช่วงของการทดลองโดยใช้ thermocouples type K (Rattanathanalerk และคณะ, 2005) ดังแสดงในรูป ง-11 (ภาคผนวก ง) จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอลโดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design หาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินอี ในแต่ละสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's New multiple Range Test

(2) ความเข้มข้นของวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าวโดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำที่เก็บที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 120 วัน

นำวิตามินอีที่สกัดจากดิสทิลเลตของน้ำมันรำข้าว โดยใช้เฮกเซนที่อุณหภูมิต่ำในข้อที่ 3.3.1 มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของวิตามินอี โดยเก็บวิตามินอีในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30$\pm$2°C และความชื้นสัมพัทธ์ เท่ากับ 65%$\pm$5% เป็นระยะเวลา 120 วัน (U.S. Department of Health and Human Services และคณะ, 2003) ดังแสดงในรูป ง-12 และ ง-13 ตามลำดับ (ภาคผนวก ง) วิเคราะห์หาปริมาณแอลฟา-, เบตา-, แกมมา- และเดลตา-โทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอล โดยใช้ HPLC (AOCS, 1997) ดังแสดงในภาคผนวก ก-1 (ภาคผนวก ก) ทุกๆ 15 วัน คำนวณปริมาณวิตามินอี ดังแสดงในภาคผนวก ข-1 (ภาคผนวก ข)

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design หาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลโดยใช้ ANOVA (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินอี ในแต่ละสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's New multiple Range Test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved