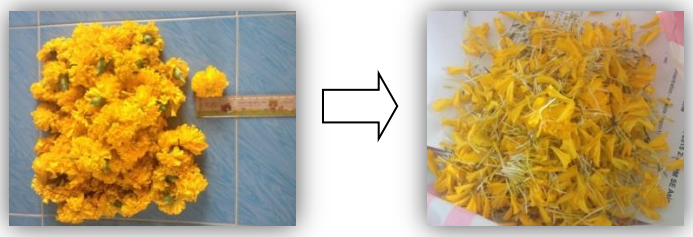
บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บและเตรียมตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างดอกดาวเรืองสดที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวของเกษตกร หมู่บ้านเกาะฝ้าย อ.ขาณุวรลักษบุรี จ.กำแพงเพชร เก็บเมื่อ เดือนธันวาคม พ.ศ 2557

เตรียมตัวอย่างดอกดาวเรืองสด โดยนำมาแกะเอาเฉพาะกลีบดอกแล้วปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น



ภาพ 22 ตัวอย่างดอกดาวเรือง

เครื่องมือและสารเคมี

เครื่องมือ

เครื่อง เขย่า เครื่อง ไมโครเพลท รีดเดอร์ (รุ่น SEECTROstar Nano บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชัน จำกัด) เครื่องระเหยสูญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) (ยี่ห้อ Buchi รุ่น R-124) เครื่อง ยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (รุ่น Lamda 25 บริษัท Perkin Elmer) เครื่องไออา (รุ่น Nicolet iS5 ยี่ห้อ Thermo Scientific) เครื่องชั่งวิเคราะห์ทศนิยม 4 ตำแหน่ง เครื่อง NMR 400 MHz ยี่ห้อ Bruker เครื่อง MS ยี่ห้อ Perkin Elmer เครื่องวัด pH

สารเคมี

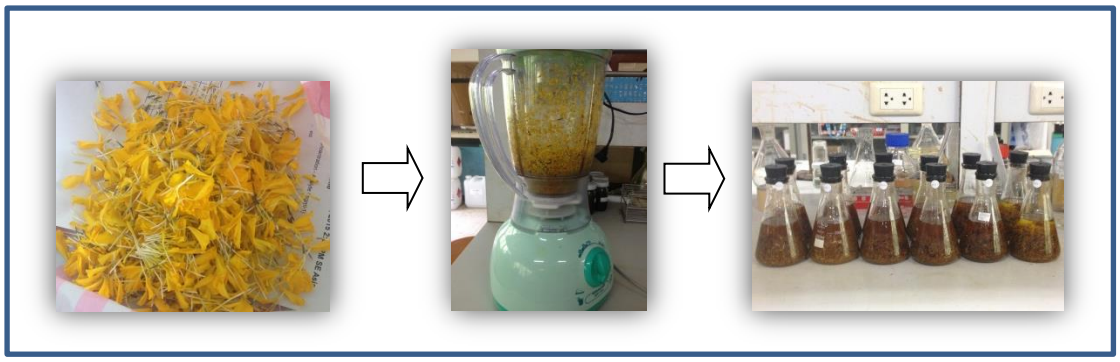
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) จากประเทศ Germany, สารมาตรฐาน Gallic acid, เอทานอล (EtOH), เฮกเซน (Hexane) บริษัท เวิลล์เคมีคอลเซ็นเตอร์, เอทิลอะซิเตท (EtOAc) บริษัททีทีเค ซายเอนซ์, โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3), อลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3.6H_2O$) reagent, ฮอร์โมน จิบเบอเรลลิดแอซิด บริษัท ฟลาย เคมีคัลส์ จำกัด, สารละลายธาตุอาหาร เอ บี บริษัท เซียพานิช พิษณุโลก, ซิลิกา เจล, 4-methoxy-benzaldehyde, H_2SO_4

วิธีการดำเนินการวิจัย

ศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟลาโวนอยด์

เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีสารไม่เหมือนกันทำให้การเลือกตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่างกันด้วย ดังนั้นจึงต้องศึกษาหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารปริมาณมากและตรงเป้าหมาย สำหรับเป้าหมายในครั้งนี้คือ สารประกอบฟลาโวนอยด์ โดยใช้อัตราส่วนของตัวทำละลายที่ต่างกัน ตัวทำละลายที่ใช้คือ เอทานอล เอทิลอะซิเตด และน้ำ ในอัตราส่วนผสมที่ต่างกัน

การเตรียมตัวอย่างดอกดาวเรืองสำหรับศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม เก็บดอกดาวเรืองน้ำหนักสด 2 กิโลกรัม เลือกและแกะเอาเฉพาะกลีบดอก จากนั้นปั่นให้ละเอียด เตรียมขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml 22 ใบ ใส่ดอกดาวเรืองสดน้ำหนัก 50 กรัม ลงในแต่ละใบ (แต่ละความเข้มข้นทำสามซ้ำ) จากนั้นใส่ตัวทำละลายที่เตรียมไว้ 11 ระบบ ดังตาราง 1 จำนวน 150 ml แสดงดังภาพ 23



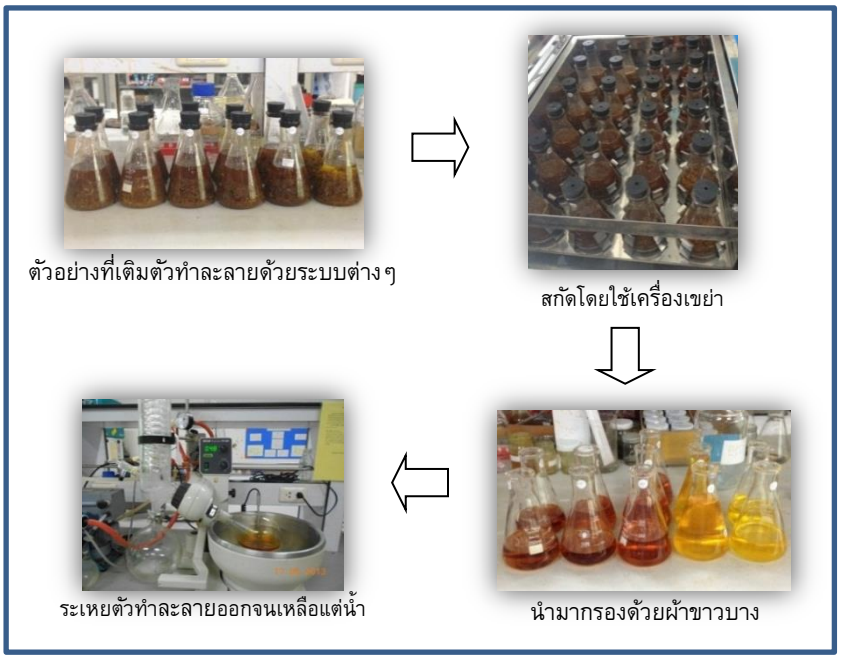
ภาพ 23 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

ตาราง 1 ระบบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

ลำดับ	ระบบตัวทำละลาย	ลำดับ	ระบบตัวทำละลาย
1	100% EtOAc	7	20% H_2O/EtOH
2	20% EtOH/EtOAc	8	40% H_2O/EtOH
3	40% EtOH/EtOAc	9	60% H_2O/EtOH
4	60% EtOH/EtOAc	10	80% H_2O/EtOH
5	80% EtOH/EtOAc	11	100% H_2O
6	100% EtOH		

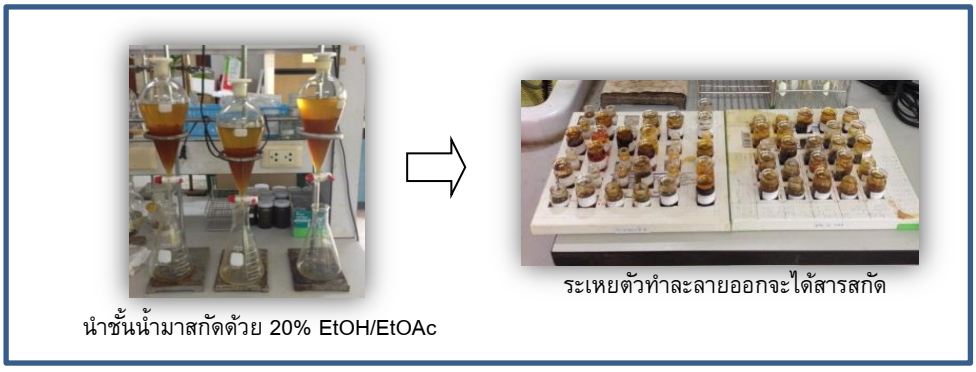
วิธีการสกัด แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือการสกัดแบบแช่ในระบบตัวทำละลายที่ต่างกันด้วยเครื่องเขย่า และนำสารสกัดที่ได้มาสกัดต่อด้วยการสกัดแบบแบ่งส่วนด้วยกรวยสกัด

ตอนที่ 1 นำตัวอย่างที่เตรียมไว้มาสกัดโดยใช้เครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เสร็จแล้วทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator จนเหลือเฉพาะน้ำ แสดงดังภาพ 24



ภาพ 24 ขั้นตอนการสกัดตอนที่ 1

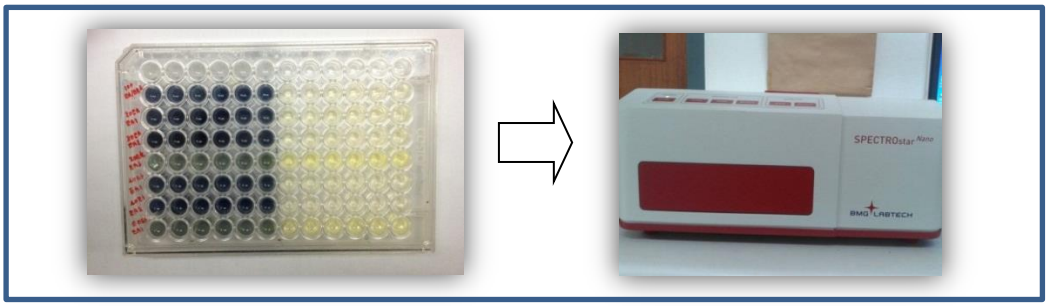
ตอนที่ 2 นำชั้นน้ำที่ได้ใส่กรวยสกัด 100 ml แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย 20% EtOH/EtOAc 100 ml เนื่องจาก ระบบนี้เป็นระบบที่สามารถดึงสารออกมาได้มากที่สุดและแยกชั้นกับชั้นน้ำได้ ทำ 3 ครั้ง แสดงดังภาพ 25



ภาพ 25 ขั้นตอนการสกัดตอนที่ 2

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimatric assay (Anna Pekal , Krystyna Pyrzynska. 2004) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมของสารสกัดทั้งหมด 11 ตัวอย่างด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเหลือง เมื่อเติมสารลงไป สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือน้ำเงิน โดยมีขั้นตอนดังนี

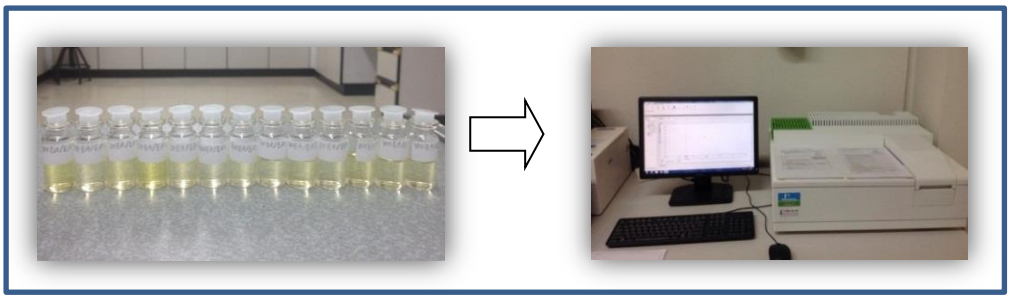
1. เตรียมสารสกัดตัวอย่างทั้งหมด 11 ตัวอย่าง (10mg/ml) ปริมาตรที่ใช้ 20 µl
2. เติมสารละลาย 20% Na_2CO_3 ปริมาตรที่ใช้ 80 µl
3. เติมสารละลาย Folin Ciocalteu reagent ปริมาตรที่ใช้ 100 µl
4. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง Microplate reade เทียบกับน้ำกลั่น นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม เทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic acid



ภาพ 26 ขั้นตอนการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม

การศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม โดยใช้วิธี Aluminium chloride colorimetric assay (Ordonez et al. 2006) การตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ขึ้นอยู่กับการก่อตัวของสารประกอบเชิงซ้อน aluminium-flavonoid วัดด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

1. เตรียมสารสกัดตัวอย่างทั้งหมด 11 ตัวอย่าง (10mg/ml) ปริมาตรที่ใช้ 1 mL
2. เติม 2%$AlCl_3$ ปริมาตรที่ใช้ 0.5 mL
3. เติมน้ำกลั่น ปริมาตรที่ใช้ 0.5 mL
4. ทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 10 น. แล้วนำไปวัดที่ความยาวคลื่น 425 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Quercetagetin



ภาพ 27 ขั้นตอนการศึกษาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

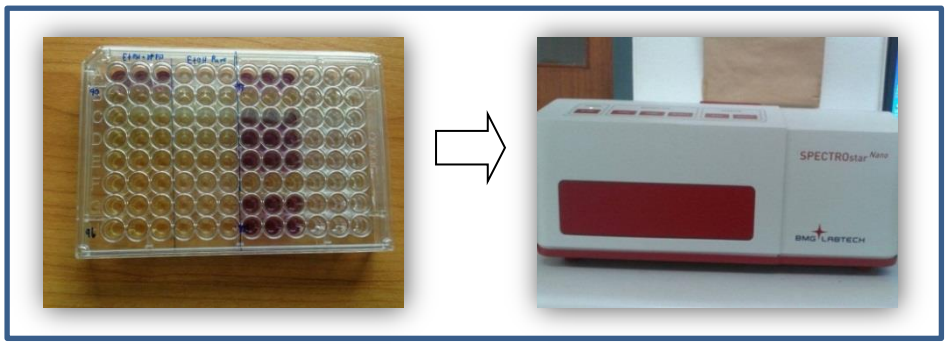
การเตรียมสารสกัด สารที่ได้จากการสกัด 11 ระบบ ชั่งน้ำหนักแต่ละระบบ 10 mg ละลายด้วยเอทานอล 1 ml

การเตรียม DPPH (11.8 mg/100ml)

1) ชั่ง DPPH ใส่ ขวดขนาดเล็ก 11.8 mg
2) ละลายด้วยเอทานอล จนกว่าสารจะละลายหมด โดยเตรียมใส่ Volumetric flask ขนาด 100 ml แล้วปิดด้วยฟอยด์ให้สนิทเพื่อป้องกันแสง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งหมดโดยใช้ DPPH reagent ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีม่วง เมื่อเติมสารลงไป สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง วัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 517 nm โดย

1. เติมเอทานอล 200,180,100,80 µl ตามลำดับ
2. เติมสารสกัดตัวอย่างลงในเพลท (96-well plate) ปริมาตร 20 µl
3. เติมสารละลาย DPPH reagent ปริมาตร 100 µl ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Microplate reader เทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic acid



ภาพ 28 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เปรียบเทียบผลของสารสกัดด้วยเทคนิคที่ต่างกันต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม

นำระบบตัวทำละลายที่ดีที่สุดซึ่งศึกษามาแล้วเบื้องต้นจากการสกัดเพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมจากข้อมูลข้อ 3.3.1 คือ 20%EtOH/EtOAc และ 60%H_2O/EtOH ซึ่งมีปริมาณสารสกัดมากที่สุด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมและสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุด สกัดด้วยเทคนิคที่ต่างกัน คือ สกัดแบบการอังด้วยไอน้ำ สกัดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิก สกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟ ซึ่งวิธีการสกัดเหล่านี้เป็นวิธีที่ ง่าย รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย

การเตรียมสารสกัด

1. เก็บดอกดาวเรืองดังข้อมูลข้อ 3.1
2. เตรียมตัวอย่างโดยแกะเอาเฉพาะกลีบดอกแล้วปั่นให้ละเอียด ใส่ขวดขนาด 1000 ml 200 g ทั้งหมด 6 ขวด
3. เติมตัวทำละลายเทคนิคละ 2 ระบบ คือ 60%H_2O/EtOH และ 20%EtOH/EtOAc
4. สกัดด้วยเทคนิคที่ต่างกัน

   อังด้วยไอน้ำ 1 ชม.

ภาพ 29 เทคนิคการสกัดแบบการอังด้วยไอน้ำ

สกัดด้วยเทคนิคอัลตราโซนิก เป็นเวลา 1 ชม

ภาพ 30 วิธีการสกัดแบบอัลตราโซนิก

สกัดด้วยเทคนิคไมโครเวฟ กำลังไฟฟ้า 460 w เวลา 10 นาที

ภาพ 31 วิธีการสกัดแบบไมโครเวฟ

5. กรองเอากากดอกดาวเรืองออก

6. นำสารสกัดที่ได้ระเหยตัวทำละลายออก

7. ได้สารสกัดแล้วนำไปชั่งน้ำหนักและเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.4 mg/ml เพื่อใช้สำหรับการทดสอบต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม

ขั้นตอนการทดสอบสารสกัดต่อการเจริญเติบโตของผักกาดหอม

การเพาะเมล็ด

1. เพาะเมล็ดในกระบะเพาะ โดยใช้ฟองน้ำสำหรับเพาะเมล็ด นำฟองน้ำมาแช่น้ำและกดฟองน้ำให้น้ำซึมทั่วทั้งฟองน้ำ

2. ใส่เมล็ดพันธุ์ที่ต้องการเพาะลงในฟองน้ำ โดยให้เมล็ดจมลงในฟองน้ำเพียงครึ่งเมล็ด

3. เทน้ำลงในกระบะเพาะ รักษาระดับน้ำประมาณ 3/4 ของความสูงของฟองน้ำ

4. นำกระบะที่ลงเมล็ดแล้วเก็บให้พ้นแสงแดด เย็น และชื้น โดยไม่ต้องปิดฝากระบะเพาะ

5. หลังจาก 1-2 วัน สังเกตเมื่อเมล็ดเริ่มงอก ให้นำกระบะเพาะออกไปตากแดด เป็นแดดตอน เช้า แล้วเก็บเข้าที่ร่มโดยไม่ต้องเก็บในที่มืด

ขั้นตอนการปลูก

1. ทำตามข้อ 5. ไปจนต้นกล้าได้อายุประมาณ 7 วัน นับจากวันที่งอกโดยทุกๆวันให้หมั่นเติมน้ำ 3/4 ของฟองน้ำ

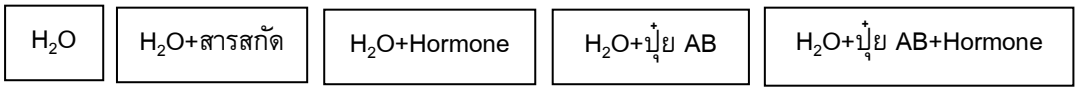
2. ต้นกล้าอายุ 8 วัน สังเกตว่าต้นกล้าเริ่มมีใบที่ 3 งอกออกมาจากนั้นให้เติมสารละลายธาตุอาหาร A,B

3. ทำตามข้อ 2. ไปจนต้นกล้าอายุ 14 วัน โดยรักษาระดับสารอาหาร สังเกตว่าต้นกล้าเริ่มมีใบที่ 4 สมบูรณ์ และมีรากงอกออกมาจากฟองน้ำ

4. นำต้นกล้าที่งอกสมบูรณ์แล้วย้ายลงกล่องปลูก ซึ่งปริมาตรรวม ต่อ 1 กล่อง คือ 8

ลิตร ซึ่งในการปลูกต้องมีกล่องสำหรับทดสอบสารและกล่องที่มีสารควบคุมซึ่งมี negative control และ positive control

5. ดูแลเติมน้ำ รักษาค่า pH และค่า EC ให้เหมาะสม



ภาพ 32 ตัวควบคุมในการปลูกพืช

ขั้นตอนการทดสอบสารสกัด

ดูแลเติมน้ำ รักษาค่า pH ของสารละลายให้อยู่ในช่วง 5.5-6.5 และรักษาธาตุอาหารค่า EC ให้อยู่ในช่วง 0.8 - 1.2 ms/cm จนอายุครบ 30 วัน เติมสารที่ต้องการทดสอบ(sample ความเข้มข้น 0.4 mg/ml, positive control) วัดความสูงของพืช และเก็บผักกาดหอมเมื่อผักครบ 45 วัน

ตัวอย่างการวิเคราะห์ผล

1. วัดความสูงของผักกาดหอม เมื่อผักเจริญเติบโตได้ 15, 30 และ 45 วัน โดยวัดจากส่วนเหนือดิน

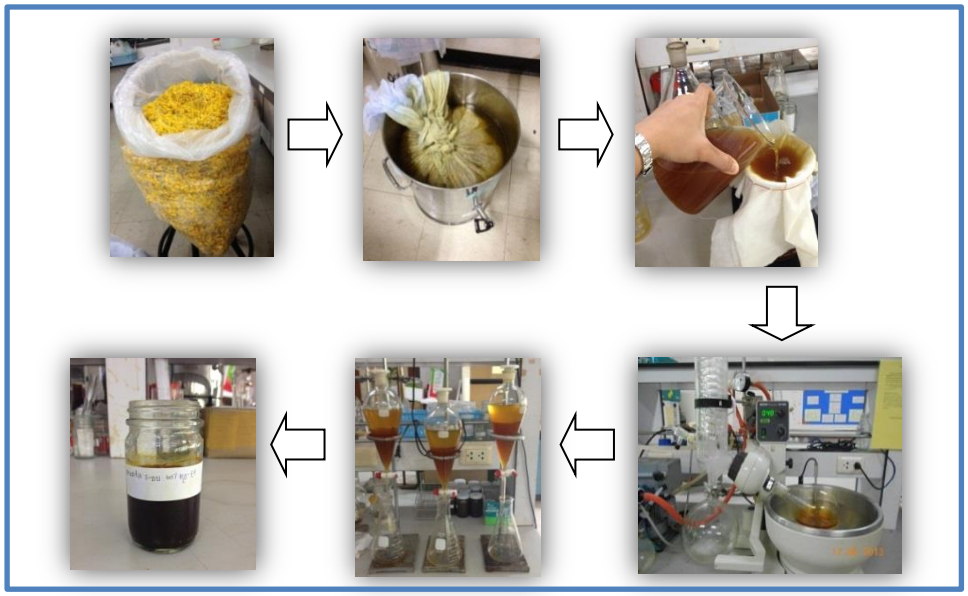
2. ชั่งน้ำหนักสด เก็บผักกาดหอมเมื่อครบ 45 วัน มาชั่งน้ำหนักสดโดยแยกส่วนเหนือดิน และส่วนราก

3. ชั่งน้ำหนักแห้ง นำผักกาดหอมที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 $^{\circ}$C จนแห้งแล้วชั่งน้ำหนักแห้งโดยแยกส่วนเหนือดินและส่วนราก

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของดอกดาวเรืองสด

จากการศึกษาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมและเทคนิคการสกัด ข้อ 3.3.1, 3.3.2 พบว่าตัวทำละลายที่ดีคือ 60%H_2O/EtOH และเทคนิค คือ การอังด้วยไอน้ำ ดังนั้น การศึกษาในหัวข้อนี้จะเลือกเทคนิคการแช่หมัก มาใช้แทนการอังด้วยไอน้ำ เนื่องจากตัวอย่างดอกดาวเรืองที่ใช้มีปริมาณที่มากและต้องการปริมาณสารสกัดที่เพียงพอต่อการศึกษา

ดอกดาวเรืองสดเก็บจากหมู่บ้านเกาะฝ้าย อ.ขาณุวรลักษบุรี จ.กำแพงเพชร เก็บเมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 น้ำหนักประมาณ 10 กิโลกรัม นำมาแกะเอาเฉพาะกลีบดอกแล้วปั่นให้ละเอียด แช่หมักด้วยตัวทำลายปริมาตร 5.5 ลิตร 1 สัปดาห์ จากนั้น นำมากรองเอากากดอกดาวเรืองออกแล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกจนเหลือเฉพาะน้ำ นำชั้นน้ำที่ได้ใส่กรวยสกัด แล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย 20%EtOH/EtOAc ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำแบบหมุนจะได้สารสกัดหยาบเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนของการแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่อไปแสดงดังภาพ 33



ภาพ 33 ขั้นตอนการสกัดเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

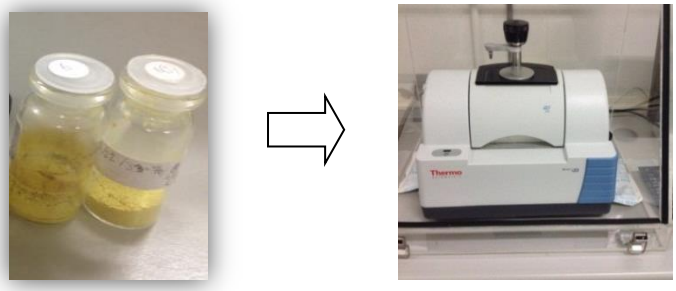
การแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี

1. เลือกขนาดของคอลัมน์ให้เหมาะสมกับน้ำหนักของสารสกัด
2. นำสารสกัดที่ได้ 20.08 g มาคลุกกับซิลิกาเจลจนซิลิกาเจลแห้งเป็นผง
3. เฟสคงที่ คือ ซิลิกาเจล โดยผสมเฟสคงที่กับตัวทำละลาย 60%EtOAc/Hexane จนมีลักษณะข้นเหลว
4. ค่อยๆเทเฟสคงที่ ที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์ที่มีสำลีอุดที่ปลายด้านในโดยระวังไม่ให้ตัวทำละลายไหลออกและควรเคาะคอลัมน์เบาๆ เพื่อไล่ฟองอากาศออกให้หมด
5. ปล่อยให้เฟสคงที่นอนก้น (โดยทำจนได้ความสูงของเฟสคงที่สูงตามต้องการ)
6. เปิดให้ตัวทำละลายไหลออกจนเหลือพอกับที่จะบรรจุสารสกัดตัวอย่างลงไป
7. บรรจุสารสกัดที่เตรียมได้จากข้อ 2. ลงในคอลัมน์แล้วเปิดให้ตัวทำละลายไหลลงจนผิวหน้าเกือบแห้ง แล้วชะสารในคอลัมน์ด้วยตัวทำละลายเล็กน้อยทำซ้ำจนแน่ใจว่าสารตัวอย่างถูกล้างลงสู่เฟสคงที่หมดแล้ว จากนั้นเติมตัวทำละลายได้มากๆ
8. เก็บและรวม Fraction โดยตรวจสอบด้วย UV-visible และ anisaldehyde reagent

ภาพ 34 รูปการแยกสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี

การพิสูจน์โครงสร้างสารที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

1. Infrared Spectroscopy(IR) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ตักสารเพียงเล็กน้อยวางบนช่องวางสำหรับวางสารจากนั้นวัดด้วยเครื่อง Infrared Spectroscopy



ภาพ 35 ขั้นตอนการวัดสารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค IR

2. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ใส่ขวดขนาดเล็กประมาณ 1-10 mg ละลายด้วยตัวทำละลายสำหรับ NMR เช่น $CDCl_3$, CD_3CD, DMSO-d6 แล้ววัดด้วยเครื่อง NMR วิเคราะห์ผลโครงสร้างจาก NMR spectrum (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR)

3. Mass spectroscopy นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ใส่ขวดขนาดเล็กประมาณ 0.5 mg ละลายด้วยตัวทำละลายสำหรับ MS แล้ววัดด้วยเครื่อง MS วิเคราะห์ผลโครงสร้างจาก MS โดยยืนยังผลจาก IR และ NMR

ศึกษาผลของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช

การศึกษาประกอบด้วยหัวข้อดังนี้ การปลูกพืชมีวิธีปลูกเหมือนกันกับข้อมูลข้อ 3.3.2.2 แตกต่างกันในส่วนของการใส่สารและความเข้มข้นของสารสกัดและสารบริสุทธิ์

1. ศึกษาความเข้มข้นที่ต่างกันของฮอร์โมน(0.004, 0.02 และ 0.04 mg/ml) สารสกัด (0.2, 0.3และ 0.4 mg/ml)

2. สารสกัด(0.4 mg/ml) และสารบริสุทธิ์(0.02 และ 0.04 mg/ml)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักกาดหอมที่ได้จากการปลูกด้วยสารสกัดดอกดาวเรืองโดยวิธีไฮโดรโปนิกส์

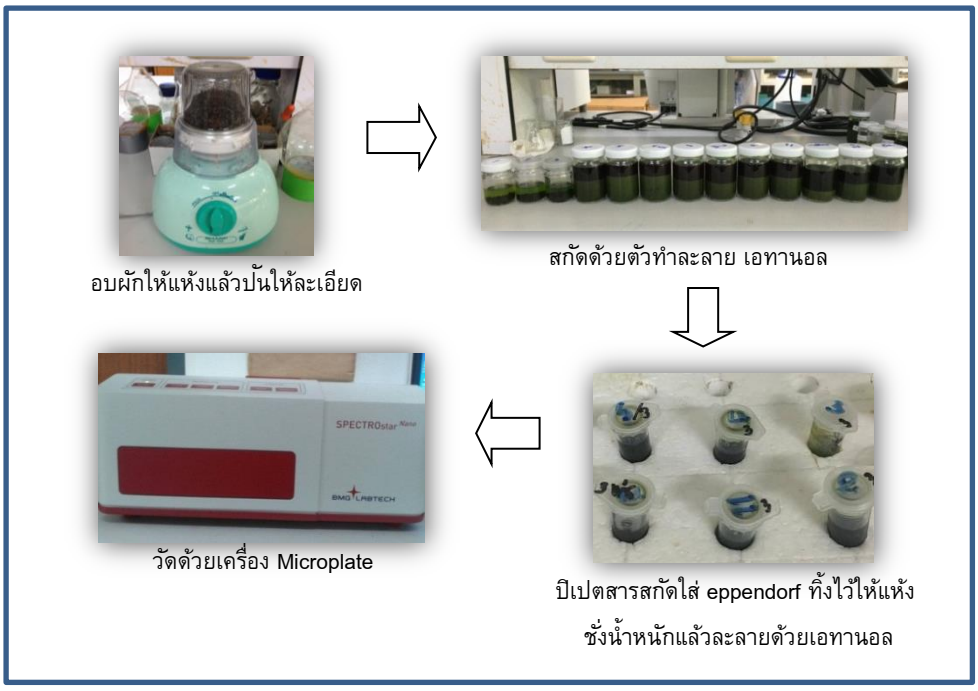
ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งหมดโดยใช้ DPPH reagent วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517nm โดยใช้สารมาตรฐาน Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน เติมเอทานอล 200,180,100,80 µl ตามลำดับ เติมสารสกัดตัวอย่าง(10mg/ml) ลงในเพลท (96-well plate) ปริมาตร 20 µl เติมสารละลาย DPPH reagent ปริมาตร 100 µl ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีและวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Microplate reader

วิธีการเตรียมตัวอย่างผักเพื่อทดสอบฤทธิ์

1. อบผักให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 ºC
2. ปั่นผักที่แห้งให้ละเอียด
3. สกัดด้วยเอทานอลเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในอัตราส่วน (1 g / 6 ml)

วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบฤทธิ์

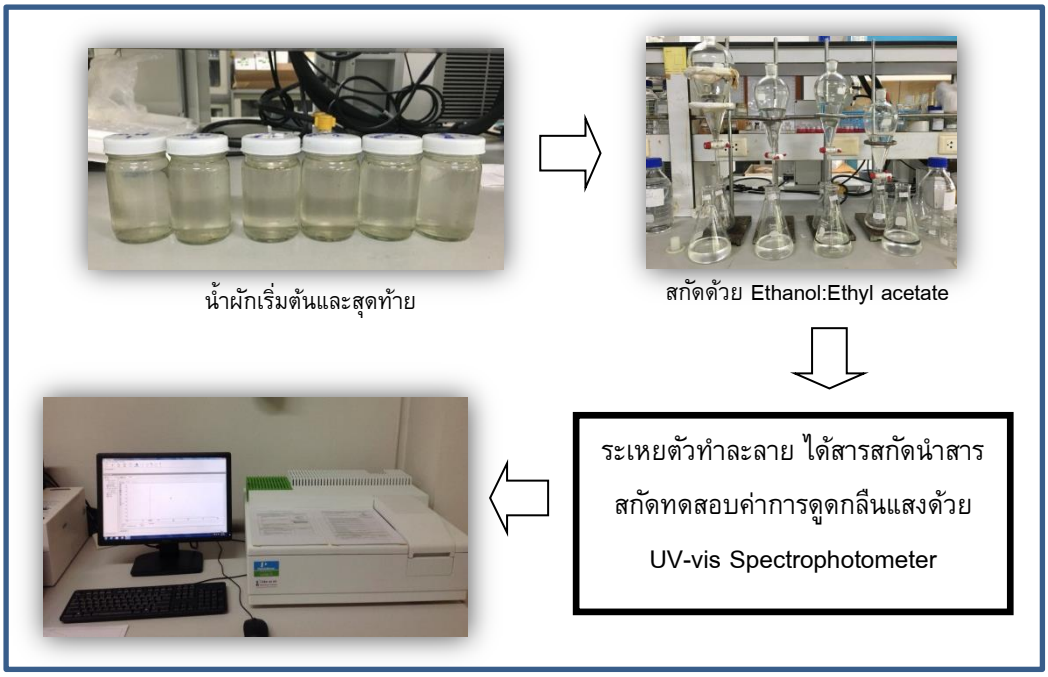
1. ปิเปตสารสกัดผัก 1 ml ใส่ eppendorf tube รอให้แห้ง
2. ชั่งน้ำหนักสารที่แห้งแล้วเติมเอทานอล 10 mg/ml
3. นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหาค่า %Inhibition แสดงดังภาพ 36



ภาพ 36 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างผักกาดหอมเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาปริมาณสารที่ถูกพืชดูดซึมของสารสกัดน้ำที่ใช้ในการปลูกผักกาดหอมด้วยระบบไฮโดรโปนิกส์ (เริ่มต้นและสุดท้ายจากการเก็บผัก)

จากการศึกษาปริมาณสารที่ถูกพืชดูดซึมของสารสกัดน้ำที่ใช้ในการปลูกผักกาดหอมที่ได้จากการเก็บน้ำจากกล่องที่ปลูกผักกาดหอม 2 ครั้ง คือตอนใส่สารสกัด(เริ่มต้น) และหลังจากการเก็บผัก(สุดท้าย) สารละลายมาตรฐานคือ Quercetagetin วัดด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer สารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 1 mL เติม 2%$AlCl_3$ 0.5 mL น้ำกลั่น 0.5 mL ทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง 10 น. วัดที่ความยาวคลื่น 425 nm และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมเทียบจากกราฟสารละลายมาตรฐานของ Quercetagetin



ภาพ 37 การทดสอบปริมาณสารของน้ำผักก่อนและหลังปลูก