

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ

ก.1 วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic)

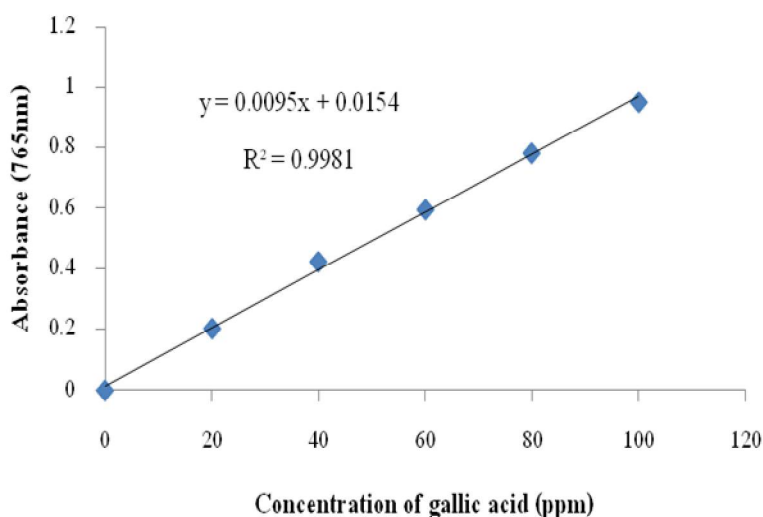
ดัดแปลงวิธีจาก Singleton และ Rossi (1965)

สารเคมี

- 1) เตรียม 7.5% sodium carbonate โดยชั่ง Na_2CO_3 7.5 กรัม แล้วละลายในน้ำกลั่นใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
- 2) เตรียม 10% Folin-Ciocalteu phenol reagent เตรียมโดยใส่ Folin-ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
- 3) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) เตรียมโดยละลายสารมาตรฐานแกลลิกจำนวน 0, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008 และ 0.010 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย volumetric flask ได้ working solution ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร นำมาวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอล (polyphenol)

วิธีการ

ดูดตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 6.6 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 993.4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixture และสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 993.4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที เติมน้ำกลั่น 7.5% sodium carbonate 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที โดย blank ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง นำสารละลายที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร นำค่าที่คำนวณได้หาปริมาณสารฟีนอลิกโดยเปรียบเทียบผลกับกราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังรูปที่ ก.1



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นร้อยละ 0-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ก.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH')

ดัดแปลงวิธีจาก Bois (1958)

สารเคมี

สารละลาย 0.1 มิลลิโมลาร์ DPPH' เตรียมโดยชั่ง DPPH' ($M_w=394.32$) 0.0394 กรัม ละลายในเอทานอลร้อยละ 95 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรที่ห่อด้วย aluminum foil จากนั้นเขย่าให้ DPPH' ละลายโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิก

วิธีการ

ดูดตัวอย่างสารสกัดความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 0.1 มิลลิโมลาร์ DPPH' 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระเป็น % DPPH' scavenging effect

ก.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS⁺⁺)

ดัดแปลงวิธีจาก Re และคณะ (1999)

สารเคมี

- 1) สารละลาย 7 มิลลิโมลาร์ ABTS⁺⁺ เตรียมโดยชั่ง ABTS⁺⁺ 0.192 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร
- 2) สารละลาย 2.45 มิลลิโมลาร์ โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate, $K_2S_2O_8$) เตรียมโดยชั่ง $K_2S_2O_8$ 0.033 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

วิธีการ

ผสมสารละลาย 7 มิลลิโมลาร์ ABTS⁺⁺ กับสารละลาย 2.45 มิลลิโมลาร์ $K_2S_2O_8$ อัตราส่วน 2:1 บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง และเจือจางด้วยเอทานอลร้อยละ 95 จนสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ในช่วง 0.670-0.730 จากนั้นดูดตัวอย่างสารสกัดความเข้มข้นปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS⁺⁺ เจือจาง 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร คำนวณค่าการต้านอนุมูลอิสระเป็น %ABTS⁺⁺ scavenging effect