

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และหาปริมาณ total phenolic compound

1.1 100 μ M DPPH solution

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	3.9433	mg
--------------------------------------	--------	----

Absolute methanol	100	ml
-------------------	-----	----

ละลาย DPPH ด้วย methanol เก็บในที่ปราศจากแสง

1.2 ABTS solution

ABTS	3.84	mg
------	------	----

$K_2S_2O_8$	0.6	mg
-------------	-----	----

เตรียม ABTS ความเข้มข้น 7mM โดยละลาย ABTS ด้วยน้ำกลั่น 10 ml เตรียม $K_2S_2O_8$ ความเข้มข้น 2.45 mM โดยละลาย $K_2S_2O_8$ ด้วยน้ำกลั่น 14.2 ml นำสารทั้งสองมาผสมกัน นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ให้ค่าอยู่ในช่วง 0.7-0.9 nm

1.3 300 mM Acetate buffer pH 3.6

Sodium acetate-3-hydrate	3.1	g
--------------------------	-----	---

Glacial acetic acid	16	ml
---------------------	----	----

น้ำกลั่น	1	L
----------	---	---

ละลาย sodium acetate-3-hydrate ด้วย glacial acetic acid ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจน

ครบ 1 ลิตร

1.4 20 mM Ferric chloride solution

$FeCl_3$	0.1638	g
----------	--------	---

น้ำกลั่น	50	ml
----------	----	----

ละลาย $FeCl_3$ ด้วยน้ำกลั่น เก็บในที่ปราศจากแสง เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

1.5 40 mM HCl

HCl	0.71	ml
-----	------	----

น้ำกลั่น	200	ml
----------	-----	----

เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตร

1.6 10 mM TPTZ solution

TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine)	0.789	g
40 mM HCl	25	ml
ละลาย TPTZ ด้วย 40 mM HCl เก็บที่ 2-8 °C		

1.7 FRAP reagent

300 mM acetate buffer pH 3.6	50	ml
10 mM TPTZ solution	5	ml
20 mM Ferric chloride solution	5	ml
ผสมสารละลายทั้งหมด เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้		

1.8 2N Folin-ciocalteu reagent

Folin-ciocalteu	5	ml
น้ำกลั่น	5	ml
ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน เก็บในที่ปราศจากแสง		

1.9 20% Sodium carbonate

Sodium carbonate	20	g
น้ำกลั่น	100	ml
ละลาย sodium carbonate ด้วยน้ำกลั่น 100 ml		

2. การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส ในหลอดทดลอง

2.1 Mushroom tyrosinase 100 units/ml

mushroom tyrosinase	0.6	mg
PBS pH 6.8	10	ml
ละลาย mushroom tyrosinase ด้วย PBS pH 6.8 ปริมาตร 10 ml		

2.2 Tyrosine 2M

Tyrosine	3.8	g
PBS pH 6.8	100	ml
ละลาย tyrosine ด้วย PBS pH 6.8 ปริมาตร 100 ml		

3. การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เมลานोไซต์

3.1 Growth medium ; DMEM (Dulbecco' Modified Eagle Medium)

DMEM	1	ซอง
Na ₂ CHO ₃	3.7	g
น้ำกลั่น	1	L

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.2-7.4 ด้วย 1N NaCl หรือ 1N HCl และกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 μ m เก็บในขวด Duran ขนาดบรรจุ 250 ml ที่ 4 °C

3.2 Completed growth medium ; DMEM

DMEM	100	ml
Fetal bovine serum	10	ml

เติม fetal bovine serum 10 ml ในอาหาร DMEM เก็บที่ 4 °C

3.3 Phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	8.0	g
KCl	0.2	g
Na ₂ HPO ₄	1.15	g
KH ₂ PO ₄	0.2	g
น้ำกลั่น	1	L

ผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับด้วย pH ให้อยู่ในช่วง 7.2-7.4 ด้วย 1N NaCl หรือ 1N HCl และกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 μ m เก็บในขวด Duran ขนาดบรรจุ 250 ml ที่ 4 °C

3.4 MTT solution

MTT	0.1	g
PBS 7.4	100	ml

ละลาย MTT ด้วย PBS และกรองผ่าน 0.2 μ m เก็บที่ 4 °C

3.5 Theophylline 10 μ g

Theophylline	10	mg
PBS	10	ml
DMEM+10% FBS		

ละลาย Theophylline ด้วย PBS 10 ml กรองผ่าน 0.2 μm เจือจางให้ได้ความเข้มข้น ที่ต้องการด้วย DMEM+10% FBS

4. การทดสอบฤทธิ์ป้องกันเซลล์จากสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

4.1 6.4 mM Hydrogen peroxide (H_2O_2)

Hydrogen peroxide stock 30%	4	μl
DMEM+10% FBS	2	ml

ละลาย H_2O_2 ด้วย DMEM+10% FBS ได้ความเข้มข้นแรกเท่ากับ 6.4 mM จากนั้นเจือจางความเข้มข้นที่ต้องการด้วยวิธี 2-fold dilution ด้วย DMEM+10% FBS

5. การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส ในเซลล์เพาะเลี้ยง

5.1 L-DOPA 1mg/ml

L-DOPA	10	mg
PBS pH 7.4	10	ml
DMEM+10% FBS		

ละลาย L-DOPA ด้วย PBS pH 7.4 กรองผ่าน 0.2 μm เจือจางให้ด้วย DMEM+10% FBS

6. การทำ TLC fingerprint

6.1 0.5% anisaldehyde in sulfuric acid reagent

anisaldehyde	0.5	g
sulfuric acid	100	ml

ละลาย anisaldehyde ด้วย sulfuric acid

6.2 10% ethanolic KOH reagent

potassium hydroxide	10	g
ethanol	100	ml

ละลาย potassium hydroxide ด้วย ethanol

6.3 Kedde' reagent

3,5, dinitro benzoic acid	10	g
KOH	5	g
methanol	100	ml

ละลาย 3,5, dinitro benzoic acid ด้วย methanol และเตรียม 5%KOH ใน methanol
ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน

6.4 Dragendorff's reagent

bismuth nitrate	8	g
nitric acid 30% w/v	12	ml
potassium iodide	27.2	g
น้ำกลั่น		

สารละลาย bismuth nitrate ด้วย nitric acid 30% w/v 12 ml และละลาย potassium iodide ด้วยน้ำกลั่น 50 ml จากนั้น เทสารละลาย potassium iodide ลงใน bismuth nitrate กรองเอาส่วนใส และปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 100 ml