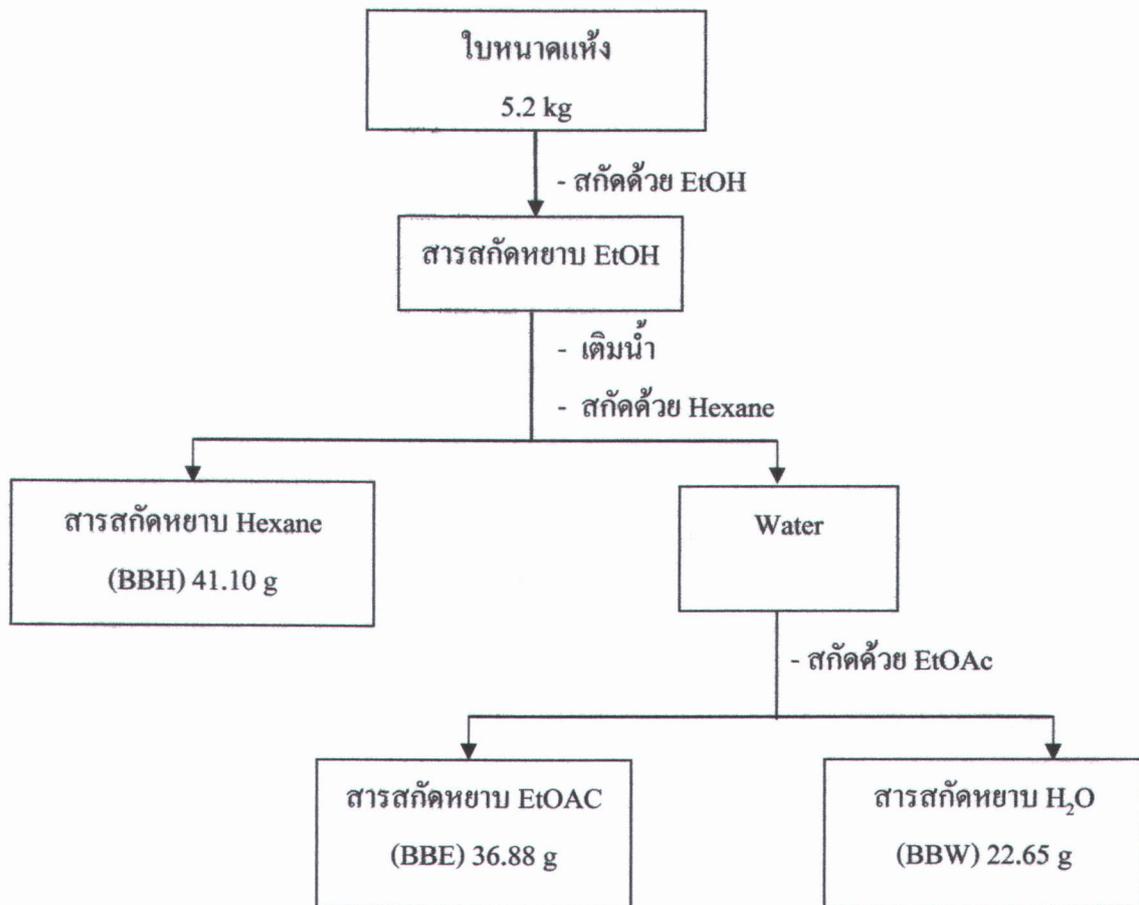


วิธีการดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 : การสกัด แยกสารให้บริสุทธิ์และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1. การสกัดพืช

นำตัวอย่างพืชมาตากลมให้แห้ง แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลเป็นเวลา 7 วัน ทำซ้ำสองครั้ง ระเหยตัวทำละลายออกภายใต้สภาวะลดความดันบรรยากาศ จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบเอทานอลที่ได้มาสกัดด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทตามลำดับ จากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออกได้สารสกัดหยาบเฮกเซน (BBH; 41.10 กรัม) สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท (BBE; 36.88 กรัม) และสารสกัดหยาบน้ำ (BBW; 22.65 กรัม) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การสกัดใบหนาดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

2. การแยกส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทให้บริสุทธิ์ โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดหยาบทั้งหมดพบว่าส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตทแสดงฤทธิ์สูงสุด จึงนำส่วนสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท (BBE) มาแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยโครมาโทกราฟีแบบลดความดัน โดยมีเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทเป็นตัวชะ (eluent) ในลักษณะ polarity gradient ได้ส่วนสกัดย่อย 9 ส่วน (F1-F9)

ส่วนย่อย F2 (30.1 g) นำไปแยกต่อด้วย flash CC โดยใช้ hexane-ethylacetate (4:1) เป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 5 ส่วน (F2-1 ถึง F2-5) จากนั้นนำ F2-3 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค TLC โดยใช้ hexane-ethylacetate (1:1) เป็นตัวชะได้สารบริสุทธิ์ 2 สารคือ dihydroquercetin-7,4'-dimethyl ether (7) (1.49 กรัม) และ blumeatin (9) (53.7 มิลลิกรัม)

Dihydroquercetin-7,4'-dimethylether (7) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว $^1\text{H NMR}$ (Acetone- d_6): δ 11.69 (1H, s, 5-OH), 7.74 (1H, s, 3'-OH), 7.09 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.02 (1H, dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, H-6'), 6.98 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5'), 6.08 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.06 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.10 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-2), 4.79 (1H, d, $J = 4.4$ Hz, 3-OH), 4.67 (1H, dd, $J = 11.6, 4.4$ Hz, H-3), 3.88 (3H, s, 4'-OCH₃), 3.86 (s, 7-OCH₃). $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6): 195.8 (C-4), 168.4 (C-7), 163.8 (C-5), 163.1 (C-9), 148.0 (C-4'), 146.5 (C-3'), 130.1 (C-1'), 119.6 (C-6'), 114.6 (C-2'), 111.1 (C-5'), 100.2 (C-10), 94.9 (C-6), 93.8 (C-8), 83.6 (C-2), 72.3 (C-3), 55.5 (7-OCH₃), 55.4 (4'-OCH₃). ESITOFMS m/z 333 [M + H]⁺

Blumeatin (9) มีลักษณะเป็นของแข็งสีขาว $^1\text{H NMR}$ δ (400 MHz, Acetone- d_6): δ 12.16 (1H, s, 5-OH), 7.12 (1H, s, H-4'), 6.95 (2H, s, H-2' and H-6'), 6.12 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.13 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.50 (1H, dd, $J = 12.6, 2.8$ Hz, H-2), 3.95 (3H, s, 7-OCH₃), 3.20 (1H, dd, $J = 17.1, 12.6$ Hz, H-3b), 2.81 (1H, dd, $J = 17.1, 2.8$ Hz, H-3a), $^{13}\text{C NMR}$ (Acetone- d_6): 197.1 (C4), 167.5 (C7), 163.3 (C5), 162.9 (C9), 145.9 (C3' หรือ C5'), 145.3 (C5' หรือ C3'), 129.4 (C1'), 118.1 (C4'), 115.4 (C6'), 114.5 (C2'), 102.7 (C10), 94.7 (C6), 93.9 (C8), 78.8 (C2), 42.2 (C3) และ 56.0 (7-OCH₃). ESITOFMS m/z 303 [M + H]⁺

ส่วนย่อย F4 (8.29 g) นำไปแยกต่อด้วย flash CC โดยใช้ hexane-ethylacetate (9:1) และเป็นตัวชะ ได้ส่วนย่อย 7 ส่วน (F4-1 ถึง F4-7) ตามด้วย flash CC โดย dichloromethane-ethylacetate-

acetone (18:1:1) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 5 สารคือ rhamnetin (2) (9.2 mg), luteolin (4) (20.3 mg), luteolin-7-methyl ether (5) (5.1 mg), dihydroquercetin-4'-methyl ether (6) (30.1 mg), and 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (8) (302.9 mg)

Rhamnetin (2) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ^1H NMR (Acetone- d_6 + DMSO- d_6): δ 12.08 (1H, s, 5'-OH), 7.76 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.74 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-6'), 7.07 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.52 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.22 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 3.89 (3H, s, 7-OCH₃). ^{13}C NMR (Acetone- d_6 + DMSO- d_6): δ 177.5 (C-4), 165.7 (C-7), 162.6 (C-9), 158.4 (C-5), 148.9 (C-4'), 148.2 (C-2), 146.3 (C-3'), 137.4 (C-3), 124.3 (C-10), 121.8 (C-6'), 116.5 (C-5'), 116.4 (C-2'), 104.7 (C-10), 99.4 (C-6), 94.6 (C-8), 55.8 (7-OCH₃). ESITOFMS m/z 317 [M + H]⁺

Luteolin (4) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ^1H NMR (Acetone- d_6 + DMSO- d_6): δ 13.00 (1H, s, 5-OH), 7.47 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.43 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-6'), 6.97 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.61 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.23 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6). ^{13}C NMR (Acetone- d_6 + DMSO- d_6): δ 181.6 (C-4), 164.4 (C-7), 163.8 (C-2), 161.7.5 (C-9), 157.3 (C-5), 149.5 (C-4'), 145.7 (C-3'), 121.7 (C-1'), 118.4 (C-6'), 115.5 (C-5'), 112.9 (C-2'), 103.6 (C-10), 102.5 (C-3), 98.5 (C-6), 93.4 (C-8). ESITOFMS m/z 287 [M + H]⁺

Luteolin-7-methyl ether (5) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ^1H NMR (Acetone- d_6 + DMSO- d_6): δ 13.00 (1H, s, 5-OH), 7.52 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.49 (1H, dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, H-6'), 6.99 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.68 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-8), 6.62 (1H, s, H-3), 6.32 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-6), 3.93 (3H, s, 7-OCH₃). ^{13}C NMR (Acetone- d_6 + DMSO- d_6): δ 181.8 (C-4), 165.2 (C-7), 164.13 (C-2), 161.5 (C-9), 157.3 (C-5), 151.2 (C-4'), 148.1 (C-3'), 121.3 (C-1'), 120.2 (C-6'), 115.6 (C-5'), 109.8 (C-2'), 104.6 (C-10), 103.0 (C-3), 97.5 (C-6), 92.1 (C-8), 55.5 (7-OCH₃). ESITOFMS m/z 301 [M + H]⁺

Dihydroquercetin-7-methylether (6) มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี ^1H NMR (Acetone- d_6): δ 11.72 (1H, s, 5-OH), 7.09 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.01 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-6'), 6.99 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 5.99 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 5.95 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 5.06 (1H,

d, $J = 11.2$ Hz, H-2), 4.63 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-3), 3.87 (3H, s, 4'-OCH₃). ¹³C NMR (Acetone-d₆): 197.2 (C-4), 167.3 (C-7), 164.1 (C-9'), 163.2 (C-5), 148.0 (C-4'), 146.4 (C-3'), 130.2 (C-1'), 119.6 (C-6'), 114.6 (C-2'), 111.1 (C-5'), 100.5 (C-10), 96.2 (C-8), 95.2 (C-6), 83.5 (C-2), 72.2 (C-3), 55.4 (4'-OCH₃). ESITOFMS m/z 319 [M + H]⁺

5, 6, 3', 5' tetrahydroxyflavanone (8) มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสี ¹H NMR (Acetone-d₆): δ 12.20 (1H, s, 5-OH), 7.03 (1H, s, H-2'), 6.89 (1H, s, H-6'), 6.89 (1H, s, H-4'), 5.95 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.93 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.39 (1H, dd, $J = 12.4, 2.8$ Hz, H-2), 3.14 (1H, dd, $J = 17.2, 12.8$ Hz, H-3), 2.72 (1H, dd, $J = 17.2, 2.8$ Hz, H-3). ¹³C NMR (Acetone-d₆): 197.3 (C-4), 167.5 (C-5), 165.4 (C-9), 164.4 (C-7), 146.5 (C-3'), 146.1 (C-5'), 131.6 (C-1'), 119.3 (C-6'), 116.1 (C-4'), 114.8 (C-2'), 103.3 (C-10), 96.9 (C-6), 80.0 (C-2), 95.9 (C-8), 43.6 (C-3). ESITOFMS m/z 289 [M + H]⁺

ส่วนย่อย F5 (4.65 g) นำไปแยกต่อด้วย flash CC โดยใช้ hexane-ethylacetate (1:1) เป็นตัวชะ ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ tamarixetin (3) (8.5 mg)

Tamarixetin (3) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ¹H NMR (Acetone-d₆ + DMSO-d₆): δ 12.43 (1H, s, 5'-OH), 7.80 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.77 (1H, dd, $J = 8.7, 2.1$ Hz, H-6'), 7.12 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5'), 6.51 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-8), 6.26 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-6), 3.93 (3H, s, 4'-OCH₃). ¹³C NMR (Acetone-d₆ + DMSO-d₆): δ 175.2 (C-4), 164.2 (C-7), 156.3 (C-9), 160.8 (C-5), 149.2 (C-4'), 145.9 (C-2), 146.3 (C-3'), 136.3 (C-3), 123.6 (C-10), 119.6 (C-6'), 114.4 (C-5'), 111.3 (C-2'), 102.8 (C-1'), 98.0 (C-6), 93.1 (C-8), 55.1 (4'-OCH₃). ESITOFMS m/z 317 [M + H]⁺

ส่วนย่อย F7 (5.47 g) นำไปแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 โดยใช้ ethanol และตามด้วย preparative TLC โดยใช้ dichloromethane-ethylacetate-acetone (7:2:1) ได้สารบริสุทธิ์ 1 สารคือ quercetin (1) (22.7 mg)

Quercetin (1) มีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ¹H NMR (Acetone-d₆ + DMSO-d₆): δ 12.39 (1H, s, 5'-OH), 7.83 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 7.68 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-6'), 6.98 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5'), 6.51 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.26 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6). ¹³C NMR (Acetone-d₆ + DMSO-d₆): δ 175.6 (C-4), 164.1 (C-7), 160.9 (C-9), 156.3 (C-5), 147.5 (C-4'), 146.3 (C-2),

144.9 (C-3'), 135.6 (C-3), 122.1 (C-10), 119.8 (C-6'), 115.1 (C-5'), 114.7 (C-2'), 102.7 (C-1'), 97.9 (C-6), 93.1 (C-8). ESITOFMS m/z 303 [M + H]⁺

3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธี 2-2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระในสารสกัดใบหนาดด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีที่มีรายงานโดย Nuchanart และคณะ(2007) โดยหยดสารสกัด (หรือสารบริสุทธิ์, เอทานอล, ascorbic acid; สารมาตรฐาน) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 195 ไมโครลิตร ในไมโครเพลทขนาด 96 หลุม หลังจากนั้นบ่มเพลทในที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท

ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระคำนวณ โดยสมการดังนี้

$$\text{Radical scavenging (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

ค่า SC_{50} ของสารมาตรฐานประเมินค่าโดยการวาดกราฟเส้นระหว่างความเข้มข้น (x) และร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (y) และนำสมการเส้นตรงของสารมาตรฐานแต่ละตัวคำนวณหาความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ ร้อยละ 50

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดใบหนาดด้วยวิธี dopachrome ดัดแปลงจากวิธีที่มีรายงานโดย Kubo และคณะ(2000) การเกิดปฏิกิริยาแบ่งเป็น 4 หลอดทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1 ลำดับการหยดสารดังนี้ หยดโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.8 และหยดสารสกัด (หรือสารบริสุทธิ์, เอทานอล, kojic acid; สารมาตรฐาน) ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสารละลาย L-dopa ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ เขย่าแล้วหยดเอนไซม์ไทโรซิเนส ผสมให้เข้ากันภายใน 10 วินาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร และหลังจาก 20 วินาที วัดค่าดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ 475 นาโนเมตร ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสคำนวณตามสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{Tyrosinase inhibition} = \frac{[A - (B - C)]}{A} \times 100$$

A, B และ C เป็นค่าต่างที่วัดได้ของปฏิกิริยาแต่ละหลอดที่ 475 นาโนเมตร ระหว่างก่อนและหลังบ่ม

ตารางที่ 1 ปริมาณสารละลายในการทำปฏิกิริยาของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

หลอด	L-Dopa (มล.)	บัฟเฟอร์ (มล.)	ตัวทำละลาย (มล.)	ตัวอย่าง (มล.)	ไทโรซิเนส (มล.)
blank	-	2.9	0.1	-	-
A	1.0	1.8	0.1	-	0.1
B	1.0	1.8	-	0.1	0.1
C	1.0	1.9	-	0.1	-

ตอนที่ 2 : การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสารสกัดใบหนาดจากแหล่งที่ต่างกัน

1. วิธีทำให้แห้ง

เก็บใบหนาดจากแหล่งต่าง ๆ (อำเภอเชียงของ, อำเภอเชียงแสน, อำเภอดอยหลวง, อำเภอแม่จัน, อำเภอแม่สาย, อำเภอพญาเม็งราย, อำเภอเวียงชัย) ตากลมที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งวัน

2. การสกัด

ชั่งใบหนาดแห้งแหล่งละ 20 กรัม แช่ในตัวทำละลาย 200 มิลลิลิตร ซึ่งได้แก่ น้ำกลั่น, เอทานอล, เอทิลอะซิเตท, ไดคลอโรมีเทน และ เฮกเซน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 และทำให้แห้งโดยการระเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนการศึกษาครั้งต่อไป

3. การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิธีการทดสอบหาผลรวมสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดใบหนาดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu อ้างอิงวิธีทำจาก Gajula และคณะ(2009) โดยหยดสารสกัด (หรือเอทานอลบริสุทธิ์; กรดแกลลิก) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นหยดสารละลาย Folin Ciocalteu's phenol ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร หลังจาก 5 นาที เติม 7% โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำเพลทปฏิบัติริยาบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านไมโครเพลท นำค่าดูดกลืนแสงของแกลลิกแอซิดที่ความเข้มข้นต่างๆ วาดกราฟเส้นระหว่างความเข้มข้น (x) และค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (y) เพื่อหาสมการเส้นตรง และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดใบหนาดแสดงโดยคำนวณเทียบกับปริมาณกรดแกลลิก (GAE) ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของตัวอย่าง

4. การทดสอบความสามารถในการรีดักชัน

วิธีการทดสอบความสามารถในการรีดักชันในสารสกัดใบหนาดด้วยวิธี Ferrous reducing power ดัดแปลงจากวิธีที่มีรายงานโดย Takashi Kuda และคณะ(2009) หยดสารสกัด (หรือเอทานอลบริสุทธิ์, ascorbic acid, สารมาตรฐานที่ได้กล่าวข้างต้น) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.2 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ potassium ferricyanide ความเข้มข้น 1% ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมในไมโคร

เพลทขนาด 96 หลุม หลังจากนั้นบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 60 นาที หยด Trichloroacetic acid ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร (Abs_{before}) และหลังจากวัดค่าดูดกลืนแสงหยด Ferric chloride ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 25 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงอีกครั้ง (Abs_{after}) ปฏิริยา ค่าดูดกลืนแสงสามารถคำนวณจากสมการดังนี้

$$\text{Reducing Power (OD)} = [Abs_{after} - Abs_{before}]_{\text{sample}} - [Abs_{after} - Abs_{before}]_{\text{control}}$$

5. การวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยวิธี HPLC

วิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณสารประกอบของสกัดใบหนาดด้วยวิธี HPLC คัดแปลงจากวิธีที่มีรายงานโดย Nessa และคณะ (2005) การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารประกอบที่เป็นจำพวกฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบหนาดใช้คอลัมน์ Reverse phase ชนิด C_{18} โดยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย methanol และ 0.5% phosphoric acid (50:50, v/v) อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 285 นาโนเมตร อัตราการเคลื่อนที่ 0.1 มิลลิเมตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีดเข้าเครื่อง 20 ไมโครลิตร ควบคุมอุณหภูมิของระบบที่ 30 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์สารประกอบจะฉีดซ้ำ 3 ครั้ง สำหรับค่าดูดกลืนแสงที่วิเคราะห์เป็นพื้นที่ได้กราฟของสารมาตรฐานจำพวกฟลาโวนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นทำ standard curve เพื่อใช้เปรียบเทียบหาปริมาณสารประกอบในสารสกัด

