



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Potassium Phosphate Buffer pH 7.5 ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

เตรียมโดยละลาย Potassium Phosphate (K_3PO_4) 2.653 g ในน้ำกลั่น 240 ml จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้มีค่าเท่ากับ 7.5 และปรับปริมาตรให้ได้ 250 ml

2. วิธีการเตรียม Xanthine 0.184 mM ปริมาตร 50 ml

$$\text{Xanthine} = 152.11 \text{ g/mol}$$

$$152.11 \times 0.184 \times 10^{-3} \text{ mM} = 0.02798824 \text{ g}$$

Solution 1000 ml มี Xanthine 0.02798824 g

Solution 50 ml มี Xanthine $\frac{50 \text{ ml} \times 0.02798824 \text{ g}}{1000 \text{ ml}}$

$$1000 \text{ ml}$$

$$\text{ซึ่ง Xanthine} = 1.4 \text{ mg}$$

ดังนั้น ซึ่ง Xanthine มา 1.4 mg ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml

3. วิธีการเจือจางสารละลาย xanthine ให้ได้ 0.06 mM ปริมาตร 100 ml

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{0.06 \text{ mM} \times 100 \text{ ml}}{0.184 \text{ mM}}$$

$$0.184 \text{ mM}$$

ปิเปตต์ สารละลาย xanthine จาก Stock มา 32.61 ml และปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml

4. วิธีการเตรียม Allopurinol (272.22 $\mu\text{g/ml}$) หรือมีค่าเท่ากับ 2.0 mM

$$\text{ซึ่ง Allopurinol} \quad 6.8 \quad \text{mg}$$

$$\text{ละลายน้ำ} \quad 25 \quad \text{mg}$$

จะได้ 2.0 mM Stock Standard solution of Allopurinol

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$272.22 \mu\text{g/ml} \times V_1 = 10 \mu\text{g/ml} \times 25 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{10 \mu\text{g/ml} \times 25 \text{ ml}}{272.22 \mu\text{g/ml}}$$

$$272.22 \mu\text{g/ml}$$

ดังนั้น ปิเปตต์สารละลาย allopurinol จาก Stock standard solution มา 0.92 ml แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 25 ml

5. วิธีการเตรียม 0.2 units/ml ของเอนไซม์ xanthine oxidase

จาก Stock Xanthine oxidase คือ 40 units

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{0.2 \text{ units/ml} \times 1000 \mu\text{l}}{40 \text{ units}}$$

ปิเปตต์ xanthine oxidase จาก stock มา 2 μl ละลายใน Phosphate buffer (pH 7.5) เย็น ปริมาตร 995 μl จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วแช่น้ำแข็งไว้จนกว่าจะใช้งาน

6. วิธีการเตรียม FRAP reagent

300 mM acetate buffer (pH 3.6) 2.5 ml

10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl 2.5 ml

20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.5 ml

7. วิธีการเตรียม Dragendorff 's reagent

Solution A: 17 g basic bismuth nitrate in 100 ml water/ acetic acid (4:1)

Solution B: 40 g potassium iodide in 100 ml of water

Mix reagents:

5 ml A + 5 ml B + 20 acetic acid + 70 ml water

8. วิธีการเตรียม Anisaldehyde

Anisaldehyde : HClO_4 : acetone : H_2O (1 : 10 : 20 : 80)

ภาคผนวก ข การคำนวณฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสจากสารสกัดหยาบ

ตัวอย่าง

1. ตัวอย่างการคำนวณฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสจากสารสกัดหยาบตัวอย่าง

การคำนวณ % Inhibition

จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(A-B)} \times 100$$

จากสารสกัดหยาบใหม่ข้าวโพดหวาน ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 290 nm เท่ากับ

ค่า A คือ มีเอนไซม์และสับสเตรทแซนทีนวัดค่า OD_{290} ได้เท่ากับ 0.186

B คือ มีสับสเตรทแซนทีนแต่ไม่มีเอนไซม์วัดค่า OD_{290} ได้เท่ากับ 0.000

C คือ มีเอนไซม์ สับสเตรทแซนทีนและสารสกัดหยาบจากใหม่ข้าวโพดหวานวัดค่า OD_{290} ได้เท่ากับ 0.101

D คือ ไม่มีเอนไซม์ แต่มีสับสเตรทแซนทีนและสารสกัดหยาบจากใหม่ข้าวโพดหวานวัดค่า OD_{290} ได้เท่ากับ 0.000

แทนค่าจากสมการ

$$\begin{aligned} \% \text{ Inhibition} &= \frac{(0.186 - 0.000) - (0.101 - 0.000)}{(0.186 - 0.000)} \times 100 \\ &= 61.29 \end{aligned}$$

ดังนั้น ที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g/ml}$ ของสารสกัดหยาบจากใหม่ข้าวโพดหวานมีร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ แซนทีนออกซิเดส เท่ากับ 61.29

ภาคผนวก ค การคำนวณปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ของสารสกัดจากโสมข้าวโพดหวาน
เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid (Gallic acid equivalent; GAE)

ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง

จากกราฟมาตรฐาน gallic acid ได้สมการเส้นตรง คือ $Y = 5.035 x$

เมื่อ Y เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของ gallic acid

X เท่ากับ ความเข้มข้นของ gallic acid

หาความเข้มข้นของสารสกัดจากโสมข้าวโพดหวานเทียบกับ gallic acid

โดยแทนค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดในสมการ

เมื่อค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากโสมข้าวโพดหวาน เท่ากับ 0.492

จะได้ความเข้มข้นของ gallic acid เท่ากับ 0.098 mg ของ gallic acid

น้ำหนักของสารสกัดตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

สารละลายของสารสกัดตัวอย่างโสมข้าวโพดหวาน 1000 μ l มีสารสกัดจากโสมข้าวโพด
หวาน 100 mg

เจือจาง 50 เท่า สารสกัดโสมข้าวโพดหวานที่เจือจางมีน้ำหนัก 2 mg

สารสกัดตัวอย่างโสมข้าวโพดหวานที่ใช้ในการทดลองมีปริมาตร 100 μ l

สารสกัดตัวอย่างโสมข้าวโพดหวานปริมาตร 100 μ l มีน้ำหนัก $\frac{100 \mu\text{l} \times 2 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = 0.2 \text{ mg}$

ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างโสมข้าวโพด 1 g เทียบกับความเข้มข้นของ Gallic acid

ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างเทียบกับความเข้มข้นของ gallic acid ปริมาตร 1000 μ l

เทียบได้กับความเข้มข้นของ gallic acid = 0.098 mg

เมื่อ gallic acid ที่ใช้ในการทดลอง ปริมาตร 100 μ l

ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง เทียบกับความเข้มข้นของ gallic acid

$$= \frac{(100 \mu\text{l} \times 0.098 \text{ mg})}{1000 \mu\text{l}}$$

$$= 0.0098 \text{ mg}$$

$$= 0.0098 \text{ mg}$$

สารสกัดตัวอย่าง 0.2 mg จะได้ความเข้มข้นของ gallic acid = 0.0098 mg

ถ้าสารสกัดตัวอย่าง 1000 mg จะได้ความเข้มข้นของ gallic acid 49 mg

สารสกัดตัวอย่างมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 49 mg gallic acid equivalent

(GAE) mg/g ของสารสกัด

ภาคผนวก ง การคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP โดยแสดงค่าเป็น AAE

(Ascorbic acid equivalent) ของสารสกัดเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid

ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบไหมข้าวโพดหวาน

จากกราฟมาตรฐาน ascorbic acid ได้สมการเส้นตรง คือ $Y = 1.278 x$

เมื่อ Y เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ของ ascorbic acid

X เท่ากับ ความเข้มข้นของ ascorbic acid

หาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบไหมข้าวโพดหวานเทียบกับ ascorbic acid

โดยแทนค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดในสมการ

เมื่อค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน เท่ากับ 0.348

จะได้ความเข้มข้นของ ascorbic acid เท่ากับ 0.272 mg ของ ascorbic acid

น้ำหนักของสารสกัดหยาบไหมข้าวโพดหวานที่ใช้ในการทดลอง

น้ำหนักของสารสกัดตัวอย่าง 1 mg ปริมาตร 1000 μ l

สารสกัดตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีปริมาตร 100 μ l มีน้ำหนัก

สารสกัดตัวอย่างปริมาตร 1000 μ l มีน้ำหนักของสารตัวอย่าง 1 mg

ถ้าสารตัวอย่างปริมาตร 100 μ l มีน้ำหนักของสารตัวอย่าง $\frac{100 \mu\text{l} \times 1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = 0.1 \text{ mg}$

ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างไหมข้าวโพด 1 mg เทียบกับความเข้มข้นของ ascorbic acid

สารสกัดตัวอย่าง 0.1 mg เทียบได้กับความเข้มข้นของ ascorbic acid = 0.272 mmole

ดังนั้น สารสกัดตัวอย่าง 1 mg เทียบได้กับความเข้มข้นของ ascorbic acid

$$= \frac{1 \text{ mg} \times 0.272 \text{ mmole}}{0.1 \text{ mg}} = 2.72 \text{ mmole}$$

0.1 mg

เมื่อ ascorbic acid ปริมาตร 1000 ml มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.72 mmole

ปริมาตรของ ascorbic acid ที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 100 μ l

จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเทียบกับความเข้มข้นของ ascorbic acid

$$= \frac{100 \mu\text{l} \times 2.72 \text{ mmole}}{1000 \text{ ml}} = 0.272 \mu\text{mole}$$

1000 ml

สารสกัดหยาบไหมข้าวโพดหวานมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (AAE) เท่ากับ 0.272

$\mu\text{mole} / \text{mg}$

ความเข้มข้นของสารที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทในส่วนสกัดย่อยที่ 6 ของไหมข้าวโพดหวาน

จากกราฟมาตรฐาน ascorbic acid ได้สมการเส้นตรง คือ $Y = 1.278 x$

เมื่อ Y เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ของ ascorbic acid

X เท่ากับ ความเข้มข้นของ ascorbic acid

หาความเข้มข้นของสารสกัดหยาบไหมข้าวโพดหวานเทียบกับ ascorbic acid

โดยแทนค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดในสมการ

เมื่อค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดจากไหมข้าวโพดหวาน เท่ากับ 0.680

จะได้ความเข้มข้นของ ascorbic acid เท่ากับ 0.532 mg ของ ascorbic acid

น้ำหนักของสารสกัดหยาบจากไหมข้าวโพดหวานที่ใช้ในการทดลอง

น้ำหนักของสารสกัดตัวอย่าง 1 mg ปริมาตร 1000 μ l

สารสกัดตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีปริมาตร 100 μ l มีน้ำหนัก

สารสกัดตัวอย่างปริมาตร 1000 μ l มีน้ำหนักของสารตัวอย่าง 1 mg

ถ้าสารตัวอย่างปริมาตร 100 μ l มีน้ำหนักของสารตัวอย่าง $\frac{100 \mu\text{l} \times 1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{l}} = 0.1 \text{ mg}$

ความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างไหมข้าวโพด 1 mg เทียบกับความเข้มข้นของ ascorbic acid

สารสกัดตัวอย่าง 0.1 mg เทียบได้กับความเข้มข้นของ ascorbic acid = 0.532 mmole

ดังนั้น สารสกัดตัวอย่าง 1 mg เทียบได้กับความเข้มข้นของ ascorbic acid

$$= \frac{1 \text{ mg} \times 0.532 \text{ mmole}}{0.1 \text{ mg}} = 5.32 \text{ mmole}$$

0.1 mg

เมื่อ ascorbic acid ปริมาตร 1000 ml มีความเข้มข้นเท่ากับ 5.32 mmole

ปริมาตรของ ascorbic acid ที่ใช้ในการทดลองเท่ากับ 100 μ l

จะได้ความเข้มข้นของสารสกัดเทียบกับความเข้มข้นของ ascorbic acid

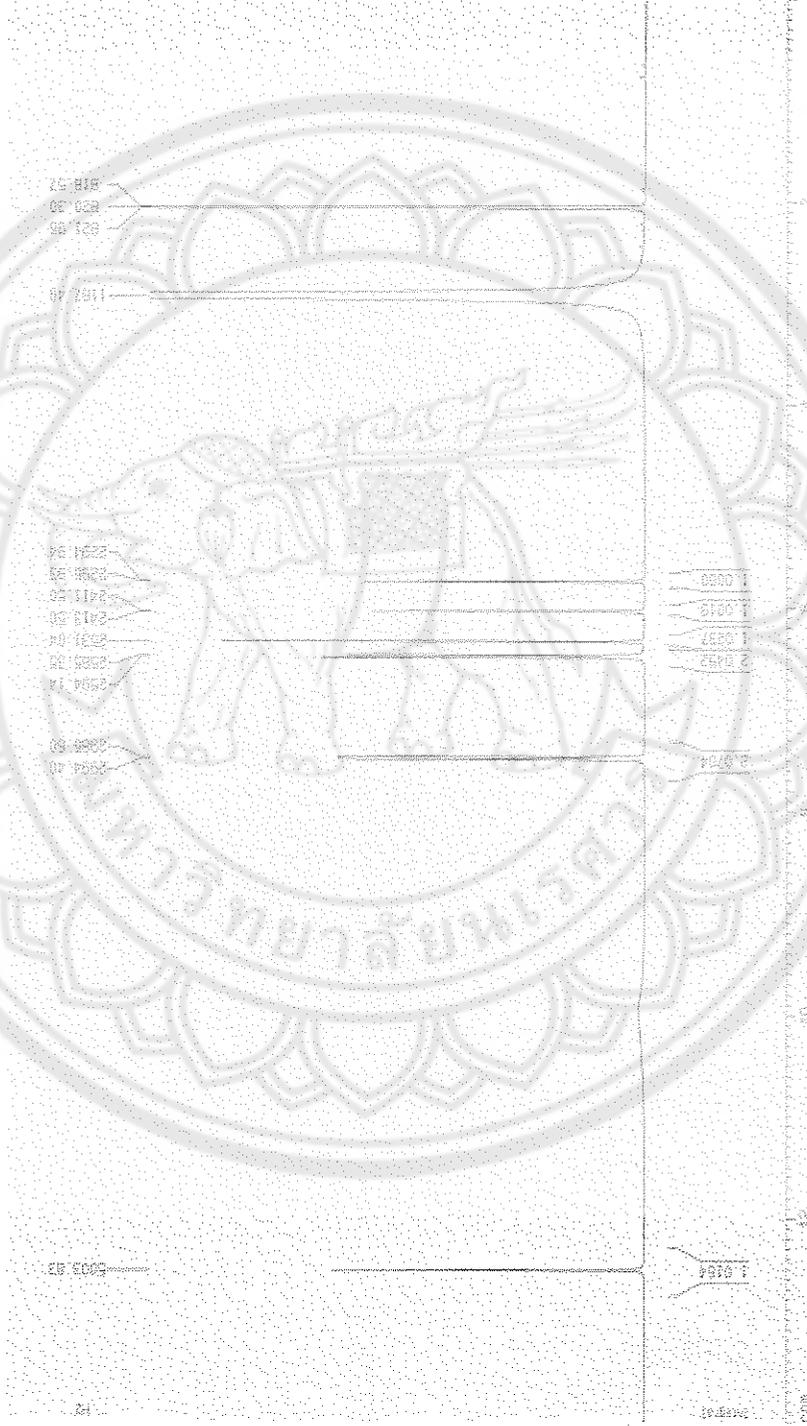
$$= \frac{100 \mu\text{l} \times 5.32 \text{ mmole}}{1000 \text{ ml}} = 0.532 \mu\text{mole}$$

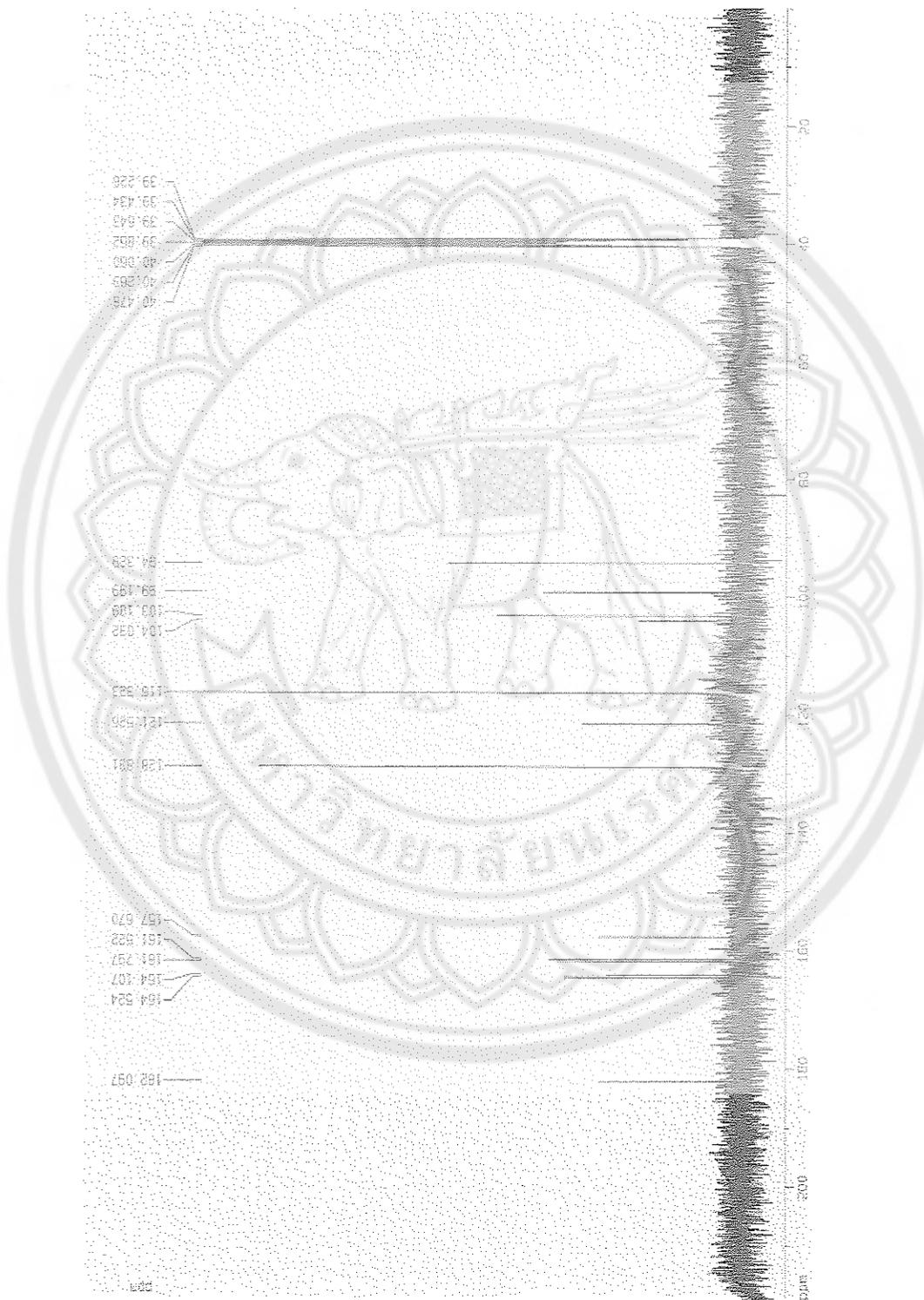
1000 ml

สารสกัดหยาบจากไหมข้าวโพดหวานมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (AAE) เท่ากับ 0.532

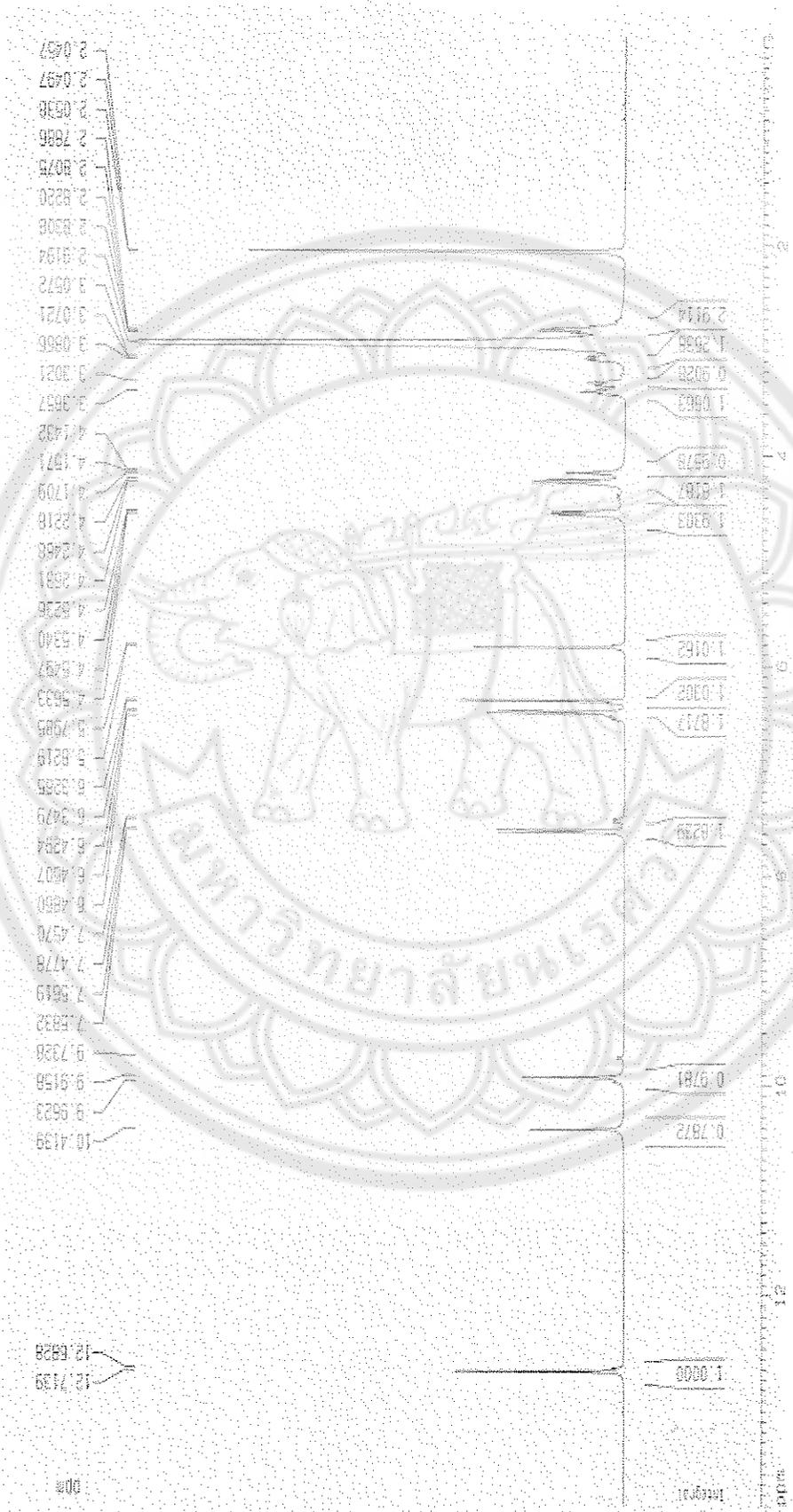
$\mu\text{mole} / \text{mg}$

ภาคผนวก จ ภาพแปลตา ¹H - NMR และ ¹³C - NMR ของสารมาตรฐาน Apigenin Vitexin และ Luteolin

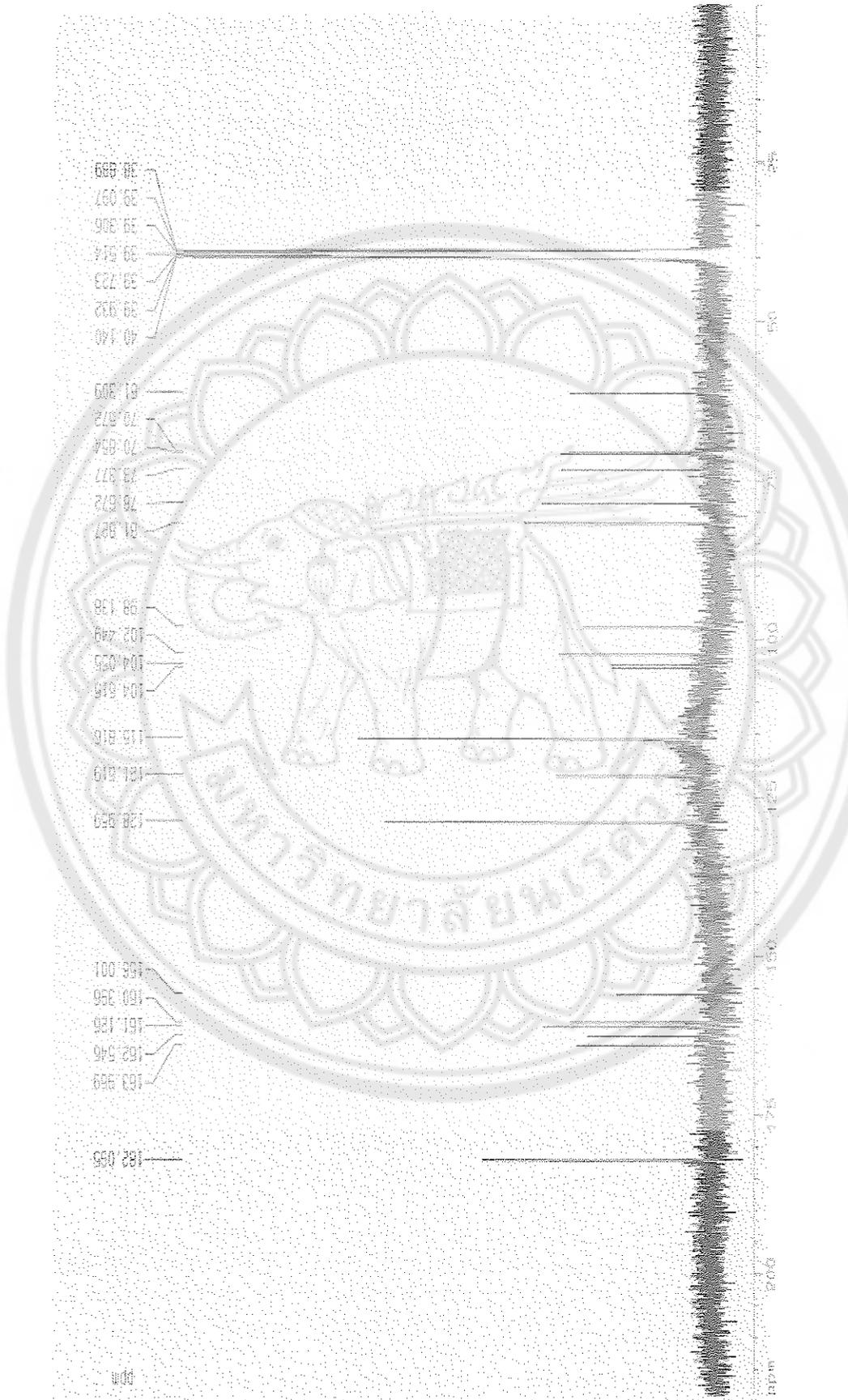




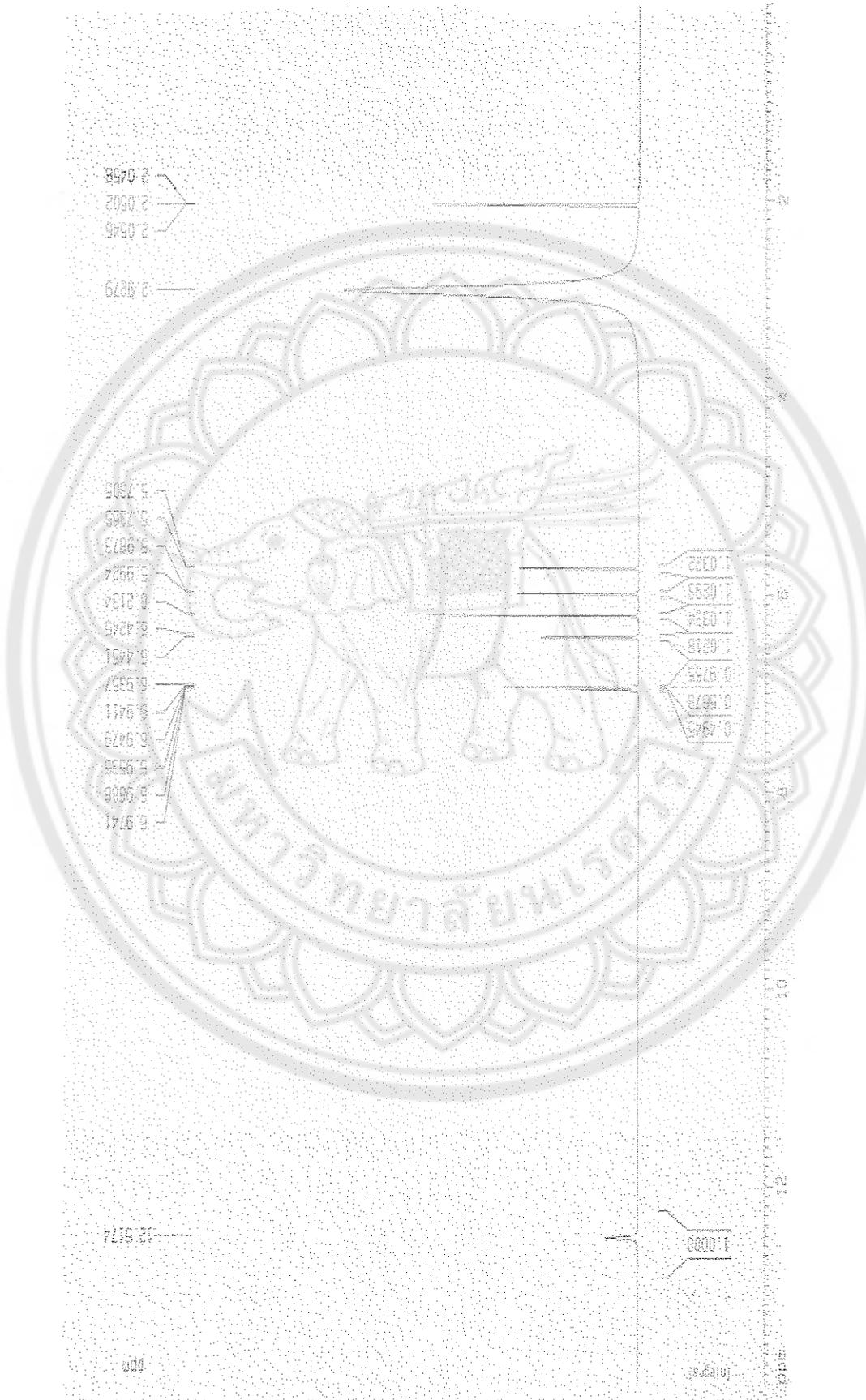
ภาพ 36 สเปกตรัม ^{13}C -NMR ของ Apigenin

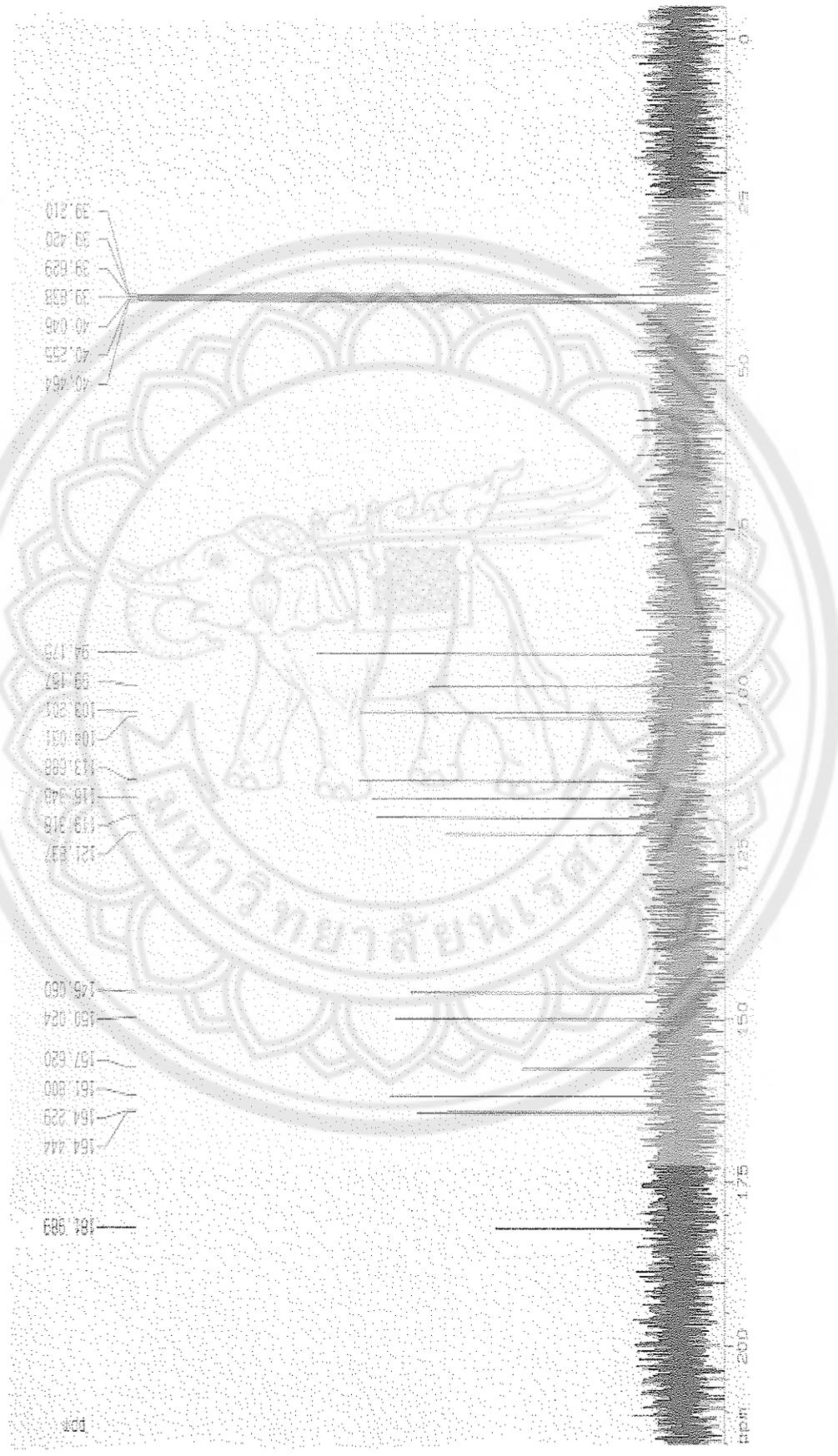


ภาพ 37 สเปกตรัม ¹H-NMR ของ Vitexin



ภาพ 38 สเปกตรัม $^{13}\text{C-NMR}$ ของ Vitexin





ภาพ 40 สเปกตรัม ¹³C-NMR ของ Luteolin