ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การหาความชื้น (Hot Air Oven Method, AOAC, 1990)

หลักการ

ตัวอย่างถูกทำให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2-4 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ น้ำหนักที่หายไปจะเป็นปริมาณความชื้นที่มีอยู่ในตัวอย่าง

วิธีทดลอง

1. อบถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝาปิดที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน ในตู้อบลมร้อน จากนั้นนำมาวางทิ้งให้เห็นในเดสิกเคเตอร์ เป็นเวลานาน 30 นาที ชั่งน้ำหนักถ้วยและฝาปิดให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (a กรัม)
2. ชั่งน้ำหนักชั่งตัวอย่างใบและรากกระพังโหมสด ชนิดละ 5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด นำไปใส่ในถ้วยอลูมิเนียมแล้วชั่งอีกครั้งหนึ่ง บันทึกน้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมพร้อมตัวอย่าง (b กรัม)
3. นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเปิดฝาทิ้งไว้นาน 6 ชั่วโมง
4. นำมาทิ้งให้เย็นในเดสิกเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นทำการอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ (c กรัม) โดยที่น้ำหนักที่ชั่งได้ติดต่อกันสองครั้งแตกต่างกันไม่เกิน 0.003 กรัม
5. ผลที่ได้นำมาคำนวณหาร้อยละของปริมาณความชื้นในตัวอย่างโดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\% \text{ ความชื้น (ฐานเปียก)} = \frac{(b - c) \times 100}{(b - a)}$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Folin – Ciocalteu Method, Fang et al., 2009)

หลักการ

ปริมาณสารสกัดในตัวอย่างจะหาโดยทำปฏิกิริยากับสารละลายโฟลินในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งวิธีนี้จะเป็นการวัดสีของสารเชิงซ้อนสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเนื่องจากโมลิบโดทังสเตนรีเอเจนต์ และดูการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบ คือ Mo (VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านการเกิดออกซิเดชันแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo (V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน ซึ่งจะติดตามได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และรายงานผลปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในหน่วย มิลลิกรัมของกรดแกลลิกสมมูลต่อน้ำหนัก 1 กรัม ตัวอย่างแห้ง

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร จากสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายโฟลินจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงไปเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20% (w/v) จำนวน 0.8 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอดปรับให้สารละลายในแต่ละหลอดมีปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้สารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที
3. นำสารละลายในข้อ 2 ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer และสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก
4. ปิเปตสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง แล้วเติมสารละลายโฟลิน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 1 นาที เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20% จำนวน 0.8 มิลลิลิตร และปรับให้สารละลายมีปริมาตรครบ 5 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้สารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก
5. รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยของ มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารตัวอย่าง 1 กรัมน้ำหนักแห้ง

$$\text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก} = \frac{\text{มิลลิกรัมของกรดแกลลิก}}{\text{กรัมของสารตัวอย่าง}}$$

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

การหาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH (Brand-William et. 1995)

หลักการ

สารประกอบฟีนอลในสารสกัดตัวอย่าง แสดงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอน ซึ่งสังเกตได้จากการทำให้สีม่วงของสารละลายอนุมูลอิสระ 1,1,-ไดฟีนิล-2- พิคริลไฮดราซิล (DPPH)ในเอทานอลจางลง

วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายสีม่วงของอนุมูลอิสระ DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1.8 มิลลิลิตร ลงไปเขย่าให้สารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที
2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร
3. คำนวณหา % การยับยั้งหรือการจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้จาก

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \left(\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right) \times 100$$

เมื่อ A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งไร้ตัวอย่าง (สารละลาย DPPH + เอทานอล)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด (สารละลาย DPPH + สารสกัด)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ง

การหาความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ (Re et al., 1999)

หลักการ

อนุมูลอิสระ $ABTS^+$ เตรียมได้จากการผสมสารละลาย ABTS 7 μM กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 mM และตั้งไว้ในที่มืดนาน 16 ชั่วโมง จะเกิดสารละลายสีเขียวเข้มซึ่งมีอนุมูลอิสระของ $ABTS^+$ ก่อนนำไปใช้งานจะถูกทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.2 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

วิธีทดลอง

1. ปิเปตสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายสีเขียวของอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ จำนวน 1.8 มิลลิลิตร ลงไปเขย่าให้สารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร
3. คำนวณหา % การยับยั้งหรือการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ ได้จาก

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \left(\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right) \times 100$$

เมื่อ A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสิ่งไร้ตัวอย่าง (สารละลาย $ABTS^+$ + น้ำ)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด (สารละลาย $ABTS^+$ + สารสกัด)

4. รายงานผลในเทอมของ μmol TE/สารตัวอย่าง 1 กรัมน้ำหนักแห้ง (TE = Trolox Equivalent)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

หมายเหตุ การเตรียมอนุมูลอิสระ ABTS (Re et al., 1999)

ABTS เตรียมจากบัฟเฟอร์ 3.84 mg/ml (7.01 mM) ผสมสารละลายนี้ 15 มิลลิลิตร กับสารละลาย $K_2S_2O_8$ จำนวน 1 มิลลิลิตร (10.6 mg/ml, 39.2 mM) เตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ของผสมนี้ถูกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง และถูกทำให้เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการก่อนใช้งาน วิธีนี้มีปฏิกิริยาข้างเคียงและมีการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และมีช่วงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของอนุมูลแดทไอออนและค่าการดูดกลืนแสงอย่างน้อย 2.0 หน่วย

ภาคผนวก จ

การหาความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออน (FRAP Assay, Benzie and Strain, 1996)

หลักการ

วิธีนี้เป็นวิธีวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการที่ เฟอริกไอออน (Fe^{3+}) รับอิเล็กตรอนจากสารต้านการเกิดออกซิเดชันแล้วกลายเป็นเฟอรัสไอออน (Fe^{2+}) หลังจากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ (Fe^{3+}) ซึ่ง เฟอริกไตรไพริดิลไตรอะซีน (Fe^{3+}-TPTZ) เป็นสารละลายไม่มีสี เมื่อถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านการเกิดออกซิเดชันเป็นเฟอรัสไตรไพริดิลไตรอะซีน (Fe^{2+}-TPTZ) ซึ่งเป็นสารละลายสีม่วงน้ำเงิน นั่นคือ ถ้าตัวอย่างที่ทดสอบมีความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันได้สูง จะเกิด (Fe^{2+}-TPTZ) ได้มาก ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร มีค่ามากขึ้น

วิธีทดลอง

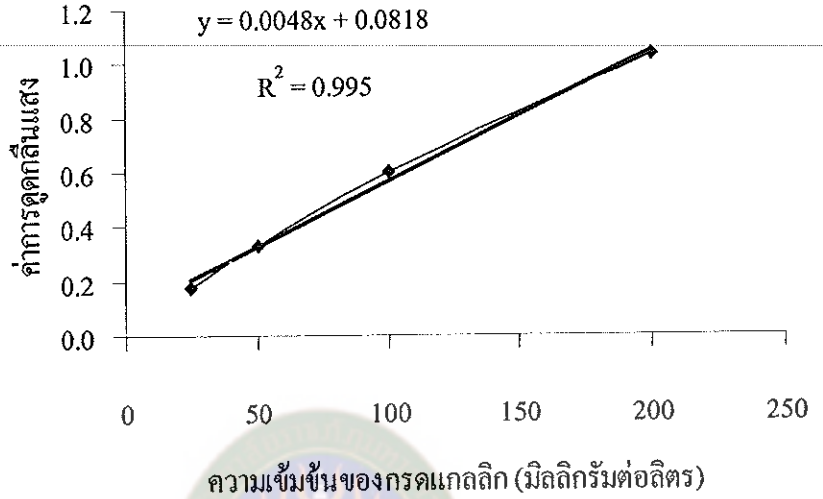
1. เตรียมสารละลาย FRAP ซึ่งประกอบด้วย
   1.1 สารละลายบัฟเฟอร์แอซีเตต (pH 3.6)
   1.2 สารละลาย 10 mM ของ 2,4,6-ไตรไพริดิล-เอส-ไตรซีน (TPTZ)ในสารละลาย 40 mM กรดไฮโดรคลอริก
   1.3 สารละลาย 20 mM เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$)
2. ผสมสารละลายทั้งสามชนิดเรียงตามลำดับโดยใช้อัตราส่วน 10:1:1 โดยปริมาตร (สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทดลองและต้องแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้งาน)
3. เตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) เข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mM
4. ปิเปตสารละลายมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต แต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง หลังจากนั้นเติมสารละลาย FRAP ลงไปหลอดละ 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน
5. ปิเปตสารละลายสารสกัดตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย FRAP จำนวน 1.8 มิลลิลิตร ลงไปเขย่าให้สารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร
6. รายงานผลลัพธ์ความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารสกัดในรูปของค่า FRAP

$$\text{ค่า FRAP} = \frac{\text{ไมโครโมล (μmol)ของเฟอรัส(II)ซัลเฟต}}{\text{กรัมของสารตัวอย่างแห้ง}}$$

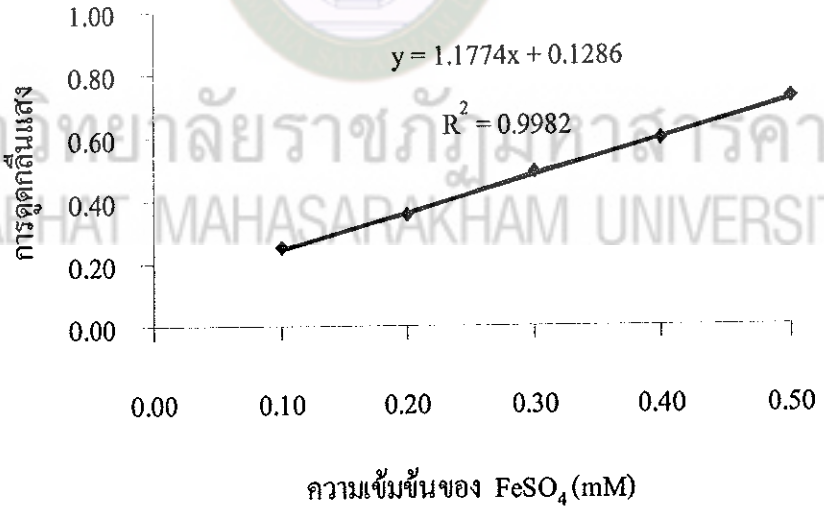
มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครสวรรค์ RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ฉ

กราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY