

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิจัย

การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM

ซังสาร DPPH ปริมาณ 0.0078 g ละลายด้วยเอทานอล ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

การเตรียมสารละลายวิตามินซี (L-ascorbic acid) ความเข้มข้น 10 mg/mL

ซังสารวิตามินซี (L-ascorbic acid) ปริมาณ 0.1 g ละลายในตัวทำละลายเอทานอล (ethanol) ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL

การเตรียมสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 1 mg/mL

ซังสารกรดแกลลิก (gallic acid) ปริมาณ 10 mg ละลายในตัวทำละลายเอทานอล (ethanol) ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL

การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 2%w/v

ซังสารโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาณ 2 g ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

การเตรียมสารละลาย DPPH spray reagent

ซังสาร DPPH ปริมาณ 6 mg ละลายในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

การเตรียมสารละลาย 10% ferric chloride spraying reagent

ซังสารเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride) ปริมาณ 10 g ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 100 mL

ภาคผนวก ข

การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบ (%yield) ของสารสกัดหยาบใบชู่

การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบ (%yield) ของสารสกัดหยาบใบขลุ่

$$\begin{aligned}\text{ร้อยละของสารสกัดหยาบ (\%yield)} &= \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักพืชแห้งก่อนการสกัด (กรัม)}} \times 100 \\ &= \frac{201.21 \text{ (กรัม)}}{300 \text{ (กรัม)}} \times 100 \\ &= 67.08\%\end{aligned}$$

ภาคผนวก ค

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ด้วยวิธี DPPH assay

ตารางที่ ค-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบใบขลุ่ยที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity)

ความเข้มข้นของ สารสกัดใบขลุ่ย (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความ ยาวคลื่น 515 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย (Mean)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ร้อยละฤทธิ์การยับยั้ง อนุมูลอิสระ			ค่าเฉลี่ย (Mean)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	log concentration
	1	2	3			1	2	3			
blank	1.0211	1.0212	1.0211	1.0211	0.0001	-	-	-	-	-	-
0.039	1.0090	1.0040	1.0039	1.0056	0.0029	3.08	3.56	3.57	3.41	0.28	-1.41
0.078	0.9101	0.9121	0.9116	0.9113	0.0010	12.58	12.39	12.44	12.47	0.10	-1.11
0.156	0.7734	0.7730	0.7730	0.7731	0.0002	25.71	25.75	25.75	25.74	0.02	-0.81
0.312	0.5090	0.5030	0.5083	0.5068	0.0033	51.11	51.69	51.18	51.32	0.32	-0.51
0.625	0.2793	0.2774	0.2755	0.2774	0.0019	73.17	73.36	73.54	73.36	0.18	-0.20
1.25	0.1093	0.1097	0.1096	0.1095	0.0002	89.50	89.46	89.47	89.48	0.02	0.10
2.5	0.1100	0.1096	0.0983	0.1060	0.0066	89.43	89.47	90.56	89.82	0.64	0.40
5	0.1111	0.1109	0.1105	0.1108	0.0003	89.33	89.35	89.39	89.35	0.03	0.70

ตารางที่ ค-2 แสดงผลการหาค่า EC₅₀ ของสารสกัดใบขมิ้นโดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism

Equation	1	2	3	เฉลี่ย
Variables				
BOTTOM	1.873	1.945	2.061	1.873
TOP	91.81	91.59	92.11	91.81
LOGEC50	-0.5613	-0.5641	-0.5575	-0.5613
HILLSLOPE	1.753	1.763	1.756	1.753
EC ₅₀	0.2746	0.2728	0.277	0.2746
Std. Error				
BOTTOM	3.08	3.028	2.98	3.08
TOP	1.928	1.885	1.883	1.928
LOGEC ₅₀	0.03001	0.0295	0.02909	0.03001
HILLSLOPE	0.2024	0.2009	0.197	0.2024
95% Confidence Intervals				
BOTTOM	-6.678 to 10.42	-6.460 to 10.35	-6.211 to 10.33	-6.678 to 10.42
TOP	86.46 to 97.16	86.36 to 96.82	86.89 to 97.34	86.46 to 97.16
LOGEC ₅₀	-0.6446 to - 0.4780	-0.6460 to - 0.4822	-0.6382 to - 0.4767	-0.6446 to - 0.4780
HILLSLOPE	1.191 to 2.315	1.206 to 2.321	1.209 to 2.303	1.191 to 2.315
EC ₅₀	0.2267 to 0.3327	0.2259 to 0.3294	0.2300 to 0.3337	0.2267 to 0.3327
Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	4	4	4	4
R ²	0.9975	0.9976	0.9977	0.9975
Absolute Sum of Squares	22.91	22.26	21.79	22.91
Sy.x	2.393	2.359	2.334	2.393
Data				
Number of X values	8	8	8	8
Number of Y replicates	3	3	3	3
Total number of values	8	8	8	8
Number of missing values	16	16	16	16

ตารางที่ ค-3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของวิตามินซี (L-ascorbic acid) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และ ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity)

ความเข้มข้นของ วิตามินซี (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความ ยาวคลื่น 515 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย (Mean)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ร้อยละการต้านอนุมูล อิสระ			ค่าเฉลี่ย (Mean)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	log concentration
	1	2	3			1	2	3			
blank	1.3271	1.3276	1.3270	1.3272	0.0003	-	-	-	-	-	
0.0016	1.1341	1.1351	1.1359	1.1350	0.0047	14.55	14.47	14.41	14.48	0.07	-2.80
0.0032	1.1097	1.1005	1.1035	1.1046	0.0009	16.39	17.08	16.86	16.77	0.35	-2.49
0.0064	1.0175	1.0134	1.0143	1.0151	0.0022	23.33	23.64	23.58	23.52	0.16	-2.19
0.0125	1.0247	1.0202	1.0209	1.0219	0.0024	22.79	23.13	23.08	23.00	0.18	-1.90
0.025	0.8276	0.8276	0.8256	0.8269	0.0012	37.64	37.64	37.79	37.69	0.09	-1.60
0.05	0.0895	0.0886	0.0882	0.0888	0.0007	93.26	93.32	93.35	93.31	0.05	-1.30
0.1	0.0394	0.0399	0.0397	0.0397	0.0003	97.03	96.99	97.01	97.01	0.02	-1.00
0.2	0.0375	0.0395	0.0379	0.0383	0.0011	97.17	97.02	97.14	97.11	0.08	-0.70

ตารางที่ ค-4 แสดงผลการหาค่า EC_{50} ของวิตามินซี (L-ascorbic acid) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism

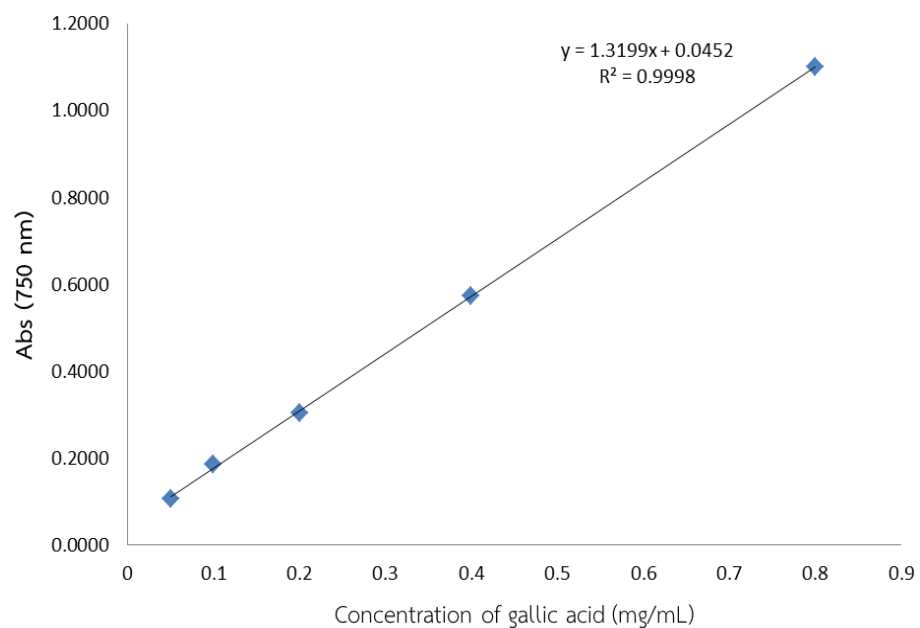
Equation	1	2	3	เฉลี่ย
Variables				
BOTTOM	19.11	19.43	19.33	19.29
TOP	97.31	97.21	97.29	97.27
LOGEC ₅₀	-1.513	-1.513	-1.513	-1.513
HILLSLOPE	5.741	5.818	5.774	5.777
EC ₅₀	0.03071	0.03072	0.03068	0.031
Std. Error				
BOTTOM	1.908	1.943	1.956	1.935
TOP	2.709	2.758	2.776	2.747
LOGEC ₅₀	0.02964	0.03074	0.03064	0.03033
HILLSLOPE	1.604	1.698	1.682	1.66
95% Confidence Intervals				
BOTTOM	13.81 to 24.40	14.04 to 24.82	13.90 to 24.76	13.91 to 24.66
TOP	89.79 to 104.8	89.55 to 104.9	89.58 to 105.0	89.64 to 104.9
LOGEC ₅₀	-1.595 to -1.430	-1.598 to -1.427	-1.598 to -1.428	-1.597 to -1.429
HILLSLOPE	1.287 to 10.19	1.105 to 10.53	1.105 to 10.44	1.168 to 10.39
EC ₅₀	0.02541 to 0.03712	0.02524 to 0.03739	0.02522 to 0.03732	0.02529 to 0.03727
Goodness of Fit				
Degrees of Freedom	4	4	4	4
R ²	0.9945	0.9943	0.9942	0.9943
Absolute Sum of Squares	56.51	58.69	59.42	58.18
Sy,x	3.758	3.831	3.854	3.814
Data				
Number of X values	8	8	8	8
Number of Y replicates	3	3	3	3
Total number of values	8	8	8	8
Number of missing values	16	16	16	16

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ในสารสกัดใบชู่
โดยวิธี Folin–Ciocalteu assay

ตารางที่ ง-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาว คลื่น 750 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย (Mean)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน(SD)
	1	2	3		
0.05	0.1077	0.1058	0.1042	0.1059	0.0018
0.1	0.1821	0.1886	0.1859	0.1855	0.0033
0.2	0.3069	0.3052	0.3035	0.3052	0.0017
0.4	0.5739	0.5752	0.575	0.5747	0.0007
0.8	1.1017	1.1006	1.0999	1.1007	0.0009



ภาพที่ ง-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน (calibration curve) ของกรดแกลลิก (gallic acid)

ตารางที่ ง-2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดใบขลุ่ย (*P.indica* extract) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของสารสกัดใบ ขลุ่ย (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย (Mean)	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)
	1	2	3		
1.0	0.1219	0.1191	0.1166	0.1192	0.003

การคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ในสารสกัดใบขลุ่ย

สารสกัดใบขลุ่ยความเข้มข้น 1.0 mg/mL วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร พบว่า มีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.1192

จากกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของกรดแกลลิก (gallic acid) ให้สมการเส้นตรง

$$Y = 1.3199X + 0.0452$$

เมื่อ Y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

X คือ ความเข้มข้นของกรดแกลลิก (gallic acid) หน่วย mg/mL

จากสมการเส้นตรง แทนค่า Y เท่ากับ 0.1192 จะได้

$$0.1192 = 1.3199X + 0.0452$$

$$X = (0.1192 - 0.0452) / 1.3199$$

$$= 0.0561 \text{ mg/mL}$$

สารละลายสารสกัดปริมาตร 1 mL มีปริมาณสารกรดแกลลิก เท่ากับ 0.0561 mg

สารละลายสารสกัดปริมาตร 5 mL มีปริมาณสารกรดแกลลิก เท่ากับ 0.2805 mg

นั่นคือ สารละลายสารสกัดปริมาตร 1 mg มีปริมาณสารกรดแกลลิก เท่ากับ 0.2805 mg

ถ้าสารละลายสารสกัดปริมาตร 1000 mg จะมีปริมาณสารกรดแกลลิก เท่ากับ 280.5 mg

ดังนั้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดใบขลุ่ย เฉลี่ยเท่ากับ 280.5 mgGAE/1 กรัม สารสกัด