

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ Chart-Grote liquid medium (Drummond, 2005)

Stock solutions:	per 400 ml
(1) Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 g
(2) Magnesium sulphate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3 g
(3) Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	3 g
(4) Potassiumdihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	7 g
(5) Sodium Chloride	1 g

ละลายแต่ละสาร (1)-(5) ในน้ำกลั่นปริมาตร 400 ml ได้ stock solution ของสารแต่ละชนิด

ผสม Stock solution จากข้อ (1)-(5) มาชนิดละ 10 ml ปรับ pH = 7.5 ด้วย 0.1 M NaOH ปรับปริมาตรให้เป็น 1 l ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

วิธี 2, 2 -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

วิธีเตรียมสารละลาย

1 M Tris-HCl buffer (pH = 7.9)

Tris M.W. = 121.14 g/mol

- ชั่ง Tris free base 12.114 g ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน
- วัด pH ของ Tris free base solution ปรับ pH ให้เป็น 7.9 โดยใช้ HCl
- ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml

5 mM DPPH in MeOH

DPPH M.W. = 394.323 g/mol

- ชั่ง DPPH 0.0986 g ละลายด้วย MeOH ปริมาตร 50 ml

วิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity

วิธีเตรียมสารละลาย

10 mM Phosphate buffer pH = 7.4

เนื่องจาก K_2HPO_4 M.W. = 174.18 g/mol

KH_2PO_4 M.W. = 136.09 g/mol

ดังนั้นเตรียม 10 mM K_2HPO_4 โดยชั่ง K_2HPO_4 1.7418 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 1 l

และ 10 mM KH_2PO_4 ชั่ง KH_2PO_4 1.3609 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 1 l วัด pH ของทั้งสอง solution แล้วผสมกันให้ได้ pH = 7.4

25 μM FeCl_3 anhydrous

FeCl_3 M.W. = 162.21 g/mol

- ชั่ง FeCl_3 2.4332 mg ละลายด้วย 10 mM Phosphate buffer pH = 7.4 ปริมาตร 100 ml
จะได้สารละลาย FeCl_3 ความเข้มข้น 150 μM
ผสม 150 μM FeCl_3 anhydrous 0.2 ml กับ 10 mM Phosphate buffer pH = 7.4
ปริมาตร 1.0 ml เพื่อให้ได้ 25 μM FeCl_3 anhydrous

100 μM Nitrilotriacetic (NTA)

Nitrilotriacetic (NTA) M.W. = 191.14 g/mol

- ชั่ง NTA 3.855 mg ละลายด้วย 10 mM Phosphate buffer pH = 7.4 ปริมาตร 100 ml
จะได้สารละลาย NTA ความเข้มข้น 200 μM
ผสม 200 μM NTA 0.6 ml กับ 10 mM Phosphate buffer pH = 7.4 ปริมาตร 0.6 ml
เพื่อให้ได้ 100 μM NTA

2.8 mM 2 Deoxy-D-ribose

2 Deoxy-D-ribose M.W. = 134.13 g/mol

- ชั่ง 2 Deoxy-D-ribose 0.0094 g ละลายด้วย 10 mM Phosphate buffer pH = 7.4
ปริมาตร 25 ml จะได้สารละลาย 2 Deoxy-D-ribose ความเข้มข้น 2.8 mM

2.8 mM Hydrogen peroxide (H_2O_2)

Hydrogen peroxide (H_2O_2) M.W. = 34.00 g/mol

- 3% w/w H_2O_2 1 ml ละลายด้วย 10 mM Phosphate buffer pH = 7.4 ปริมาตร 100 ml
จะได้สารละลาย H_2O_2 ความเข้มข้น 8.82 mM
ผสม 8.82 mM H_2O_2 0.38 ml กับ 10 mM Phosphate buffer pH = 7.4 ปริมาตร 0.82 ml
เพื่อให้ได้ 2.8 mM H_2O_2

1% w/v Thiobarbituric acid (TBA)

Thiobarbituric acid (TBA) M.W. = 144.10 g/mol

- ชั่ง TBA 0.5 g ละลายด้วย 10 mM Phosphate buffer pH = 7.4 ปริมาตร 50 ml

2.8% w/v Trichloroacetic acid (TCA)

Trichloroacetic acid (TCA) M.W. = 163.39 g/mol

- ชั่ง TCA 1.4 g ละลายด้วย 10 mM Phosphate buffer pH = 7.4 ปริมาตร 50 ml

วิธี Lipid peroxidation in liver homogenates**การเตรียม Liver homogenate**

ตัดแยกตับของหนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ น้ำหนัก 250 – 300 g มาแช่น้ำใน ice-cold 150 mmol/Tris-HCl buffer (pH 7.2) ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ บดด้วย homogenizer กรองด้วยผ้า gauze เปียก 4 ชั้น นำไปวัดความเข้มข้นของ protein โดยวิธีของ Lowry et al. (1951) แล้วปรับความเข้มข้นของ homogenate ให้ได้ 10 mg protein/ml

วิธีเตรียมสารละลาย

40 mM Tris-HCl buffer (pH = 7.2) M.W. = 121.14 g/mol

- ชั่ง Tris-HCl 4.8456 g ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 900 ml

ปรับ pH ให้เป็น 7.2 โดย 1 N HCl

พอได้ค่า pH = 7.2 จึงปรับให้เป็น 1 l

4 mM FeCl₂•4 H₂O

FeCl₂•4 H₂O (tetrahydrate) M.W. = 198.8 g/mol

- ชั่ง FeCl₂ 0.08 g ละลายด้วย 40 mM Tris-HCl buffer pH = 7.2 ปริมาตร 100 ml

0.1 mM Ascorbic acid

Ascorbic acid M.W. = 176.12 g / mol

- ชั่ง Ascorbic acid 0.0176 g ละลายด้วย 40 mM Tris-HCl buffer pH = 7.2

ปริมาตร 1 l

0.6% TBA (Thiobarbituric acid)

Thiobarbituric acid (TBA) M.W. = 144.10 g/mol

- ชั่ง TBA 1.2 g ละลายด้วย 40 mM Tris-HCl buffer pH = 7.2 ปริมาตร 200 ml

วิธี Metal chelating activity**วิธีเตรียมสารละลาย****2 mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$**

$\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (tetrahydrate) M.W. = 198.8 g/mol

- ชั่ง FeCl_2 0.0398 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 100 ml

5 mM Ferrozine (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-Phenyl-Sulfonic acid)-1,2,4-Triazine)

Ferrozine (3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-Phenyl-Sulfonic acid)-1,2,4-Triazine)

M.W. = 492.46 g/mol

- ชั่ง Ferrozine 0.2463 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 100 ml

วิธี Superoxide radical-scavenging activity

วิธีเตรียมสารละลาย

0.1 M Phosphate buffer pH = 7.4

เนื่องจาก Na_2HPO_4 M.W. = 120 g/mol

NaH_2PO_4 M.W. = 142 g/mol

ดังนั้นเตรียม 0.1 M Na_2HPO_4 โดยชั่ง Na_2HPO_4 12.0 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 1 l

0.1 M NaH_2PO_4 ชั่ง NaH_2PO_4 14.2 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 1 l วัด pH ของทั้งสอง solution แล้วผสมกันให้ได้ pH = 7.4

624 μM b-Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)

b-Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) M.W. = 709.4 g/mol

- ชั่ง NADH 4.4265 mg ละลายด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH = 7.4 ปริมาตร 10 ml

120 μM Phenazine methosulphate (PMS)

Phenazine methosulphate (PMS) M.W. = 306.3 g/mol

- ชั่ง PMS 0.3675 mg ละลายด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH = 7.4 ปริมาตร 10 ml (เตรียมสด)

2.52 mM Nitroblue tetrazolium (NTB)

Nitroblue tetrazolium (NTB) M.W. = 817.6 g/mol

- ชั่ง NTB 20.6 mg ละลายด้วย 0.1 M Phosphate buffer pH = 7.4 ปริมาตร 10 ml

วิธี Reducing power

วิธีเตรียมสารละลาย

0.2 M Phosphate buffer (pH = 6.6)

เนื่องจาก NaH_2PO_4 M.W. = 120 g/mol

Na_2HPO_4 M.W. = 142 g/mol

ดังนั้นเตรียม 0.2 M NaH_2PO_4 โดยชั่ง NaH_2PO_4 24.0 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 1 l

0.2 M Na_2HPO_4 ชั่ง Na_2HPO_4 28.4 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 1 l
วัด pH ของทั้งสอง solution แล้วผสมกันให้ได้ pH = 6.6

1% w/v Potassium ferricyanide

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ M.W. = 329.26 g/mol

- ชั่ง $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 g ละลายด้วย 0.2 M phosphate buffer pH = 6.6 ปริมาตร 100 ml

10% Trichloroacetic acid (TCA)

Trichloroacetic acid (TCA) M.W. = 163.39 g/mol

- ชั่ง TCA 10 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 100 ml

0.1% FeCl_3 anhydrous

FeCl_3 M.W. = 162.21 g/mol

- ชั่ง FeCl_3 0.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 100 ml

ภาคผนวก ค

ข้อมูลปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์

ตาราง 6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 และ 665 nm ของสารละลายคลอโรฟิลล์ที่สกัดได้จากสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützinger

ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 650 (nm)	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 665 (nm)	ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (mg/g cell dry weight)	ปริมาณคลอโรฟิลล์บี
1	0.398	0.488	3.166	4.901
2	0.375	0.423	2.578	4.925
3	0.436	0.559	3.736	5.166
ค่าเฉลี่ย	0.403	0.490	3.160	4.997
SD			0.579	0.147

ตาราง 7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ของสารละลายแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützinger

ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 450 (nm)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (mg/g cell dry weight)
1	0.138	0.425
2	0.103	0.317
3	0.148	0.455
ค่าเฉลี่ย	0.129	0.399
SD		0.073

ภาคผนวก ง

ข้อมูลปริมาณกิจกรรมต้านออกซิเดชันทั้ง 7 วิธี ของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

ตาราง 8 ค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้ง ABTS^{•+} radical ที่ความยาวคลื่น 734 nm ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

Sample						
Concentration	N1	N2	N3	N4	N5	N6
mg/ml						
control	0.699	0.687	0.697	0.686	0.703	0.690
0.1	0.645	0.646	0.580	0.652	0.626	0.540
0.5	0.564	0.557	0.593	0.534	0.568	0.552
1.0	0.463	0.440	0.444	0.450	0.510	0.425
2.0	0.324	0.253	0.238	0.259	0.336	0.206
3.0	0.037	0.050	0.127	0.084	0.044	0.076
4.0	0.012	0.008	0.011	0.006	0.009	0.010
5.0	0.012	0.008	0.009	0.005	0.008	0.009
6.0	0.011	0.008	0.009	0.006	0.010	0.009
7.0	0.012	0.010	0.010	0.007	0.012	0.010
8.0	0.014	0.010	0.011	0.011	0.014	0.012

ตาราง 9 % Inhibition ของ $\text{ABTS}^{+\bullet}$ radical ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

Sample								
Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Average	SD
0.1	8	6	17	5	11	22	11	6.614
0.5	19	19	15	22	19	20	19	2.354
1.0	34	36	36	34	27	38	34	3.761
2.0	54	63	66	62	52	70	61	6.994
3.0	95	93	82	88	94	89	90	4.841
4.0	98	99	98	99	99	99	99	0.304
5.0	98	99	99	99	99	99	99	0.319
6.0	98	99	99	99	99	99	99	0.239
7.0	98	99	99	99	98	99	99	0.253
8.0	98	99	98	98	98	98	98	0.227

ตาราง 10 การคำนวณค่า IC_{50} ของการยับยั้ง $\text{ABTS}^{+\bullet}$ radical จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

	สมการ	IC_{50}
N1	$y = 30.076x + 4.2895$	1.520
N2	$y = 29.637x + 4.2266$	1.545
N3	$y = 24.412x + 4.0099$	1.884
N4	$y = 26.461x + 8.6401$	1.563
N5	$y = 23.079x + 6.1228$	1.901
N6	$y = 26.936x + 8.7267$	1.884
Average	$y = 28.115x + 5.4696$	1.584
SD		0.183

ตาราง 11 ค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้ง DPPH[•] radical ที่ความยาวคลื่น 517 nm ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützting

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Sample blank
control	1.254	1.156	1.112	1.121	1.136	1.145	0
0.01	0.983	0.926	0.913	0.877	0.937	0.921	0.003
0.02	0.868	0.842	0.813	0.802	0.805	0.840	0.007
0.04	0.643	0.642	0.581	0.572	0.603	0.614	0.013
0.06	0.447	0.467	0.429	0.434	0.456	0.434	0.023
0.09	0.346	0.343	0.327	0.330	0.337	0.335	0.031
0.30	0.383	0.384	0.378	0.375	0.355	0.379	0.098
0.50	0.419	0.421	0.420	0.415	0.422	0.418	0.165
1.00	0.511	0.52	0.526	0.527	0.530	0.513	0.327
1.50	0.627	0.635	0.644	0.650	0.668	0.622	0.524

ตาราง 12 % Inhibition ของ DPPH[•] radical ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Average	SD
0.01	22	20	18	22	18	20	20	1.789
0.02	31	28	28	29	30	27	29	1.472
0.04	50	46	49	50	48	48	49	1.517
0.06	66	62	63	63	62	64	63	1.506
0.09	75	73	73	73	73	73	73	0.816
0.30	77	75	75	75	77	75	76	1.033
0.50	80	78	77	78	77	78	78	1.095
1.00	85	83	82	82	82	84	83	1.265
1.50	92	90	89	89	87	91	90	1.751

ตาราง 13 การคำนวณค่า IC₅₀ ของการยับยั้ง DPPH[•] radical จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

	สมการ	IC ₅₀
N1	y = 888.14x + 13.42	0.041
N2	y = 837.34x + 11.562	0.046
N3	y = 922.14x + 9.5537	0.044
N4	y = 853.2x + 13.417	0.043
N5	y = 874.76x + 10.941	0.045
N6	y = 903.41x + 10.312	0.044
Average	y=877.97x+11.633	0.044
SD		0.002

ตาราง 14 ค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้ง $\text{OH}^\bullet$ radical ที่ความยาวคลื่น 532 nm ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Sample blank
Control	0.377	0.386	0.384	0.394	0.409	0.384	0
0.5	0.352	0.361	0.366	0.361	0.366	0.363	0.018
1.0	0.346	0.353	0.345	0.344	0.349	0.349	0.031
5.0	0.370	0.358	0.365	0.364	0.371	0.365	0.126
10.0	0.411	0.404	0.415	0.409	0.421	0.406	0.243
20.0	0.425	0.430	0.421	0.443	0.412	0.423	0.329
30.0	0.567	0.565	0.563	0.564	0.547	0.560	0.500
40.0	0.645	0.641	0.642	0.646	0.632	0.638	0.604
50.0	0.743	0.745	0.733	0.733	0.743	0.732	0.710

ตาราง 15 % Inhibition ของ $\text{OH}^\bullet$ radical ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Average	SD
0.5	11	11	9	13	15	10	12	2.003
1.0	16	17	18	21	22	17	19	2.366
5.0	35	40	38	40	40	38	38	1.850
10.0	55	58	55	58	56	58	57	1.298
20.0	75	74	76	71	80	76	75	2.845
30.0	82	83	84	84	89	84	84	2.195
40.0	89	90	90	89	93	91	91	1.473
50.0	91	91	94	94	92	94	93	1.557

ตาราง 16 การคำนวณค่า IC_{50} ของการยับยั้ง $\text{OH}^\bullet$ radical จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

สมการ	IC_{50}
N1 $y = 4.3201x + 12.68$	8.639
N2 $y = 4.5953x + 13.748$	7.889
N3 $y = 4.0834x + 15.288$	8.501
N4 $y = 4.1254x + 17.338$	7.917
N5 $y = 3.7817x + 19.44$	8.081
N6 $y = 4.4634x + 13.695$	8.134
Average $y = 4.2282x + 15.365$	8.191
SD	0.309

ตาราง 17 ค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้ง Lipid peroxidation ที่ความยาวคลื่น 532 nm ของสารสกัด
ด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

Sample						
Concentration	N1	N2	N3	N4	N5	N6
(mg/ml)						
control	0.140	0.124	0.140	0.165	0.196	0.208
5.0	0.104	0.094	0.107	0.127	0.150	0.164
8.0	0.065	0.058	0.059	0.078	0.090	0.096
10.0	0.024	0.027	0.021	0.046	0.059	0.060
12.0	0.015	0.014	0.016	0.012	0.037	0.010
14.0	0.006	0.006	0.006	0.009	0.010	0.018
16.0	0.006	0.006	0.006	0.007	0.011	0.010
18.0	0.006	0.006	0.006	0.009	0.010	0.011

ตาราง 18 % Inhibition ของ Lipid peroxidation ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

Sample								
Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Average	SD
5.0	26	24	24	23	23	21	24	1.527
8.0	54	53	58	53	54	54	54	2.001
10.0	83	78	85	72	70	71	77	6.431
12.0	89	89	89	93	81	95	89	4.752
14.0	96	95	96	95	95	91	95	1.641
16.0	96	95	96	96	94	95	95	0.583
18.0	96	95	96	95	95	95	95	0.422

ตาราง 19 การคำนวณค่า IC_{50} การยับยั้ง Lipid peroxidation จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

	สมการ	IC_{50}
N1	$y = 9.6128x - 21.255$	7.413
N2	$y = 9.5493x - 22.468$	7.589
N3	$y = 9.8064x - 22.056$	7.348
N4	$y = 9.9292x - 26.729$	7.728
N5	$y = 8.3158x - 15.621$	7.891
N6	$y = 10.415x - 30.79$	7.758
Average	$y = 9.5669x - 22.759$	7.605
SD		0.211

ตาราง 20 ค่าการดูดกลืนแสงของการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} ที่ความยาวคลื่น 562 nm ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Sample blank
Control	0.280	0.283	0.282	0.286	0.289	0.284	0
0.05	0.260	0.264	0.256	0.262	0.268	0.266	0.007
0.1	0.201	0.202	0.209	0.199	0.207	0.207	0.016
0.2	0.150	0.152	0.150	0.155	0.152	0.152	0.023
0.3	0.120	0.119	0.117	0.115	0.117	0.122	0.040
0.4	0.105	0.107	0.101	0.106	0.106	0.117	0.046
0.5	0.125	0.130	0.126	0.129	0.125	0.121	0.054
0.7	0.147	0.145	0.144	0.149	0.147	0.146	0.099
1.0	0.166	0.173	0.169	0.156	0.167	0.165	0.112

ตาราง 21 % Inhibition ของการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützting

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Average	SD
0.05	10	9	12	11	10	9	10	1.169
0.1	34	34	32	36	34	33	34	1.329
0.2	55	54	55	54	55	55	55	0.516
0.3	71	72	73	74	73	71	72	1.211
0.4	79	78	80	79	79	75	78	1.751
0.5	75	73	74	74	75	76	75	1.049
0.7	83	84	84	83	83	83	83	0.516
1.0	81	78	80	85	81	81	81	2.280

ตาราง 22 การคำนวณค่า IC_{50} ของการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützting

สมการ	IC_{50}
N1 $y = 187.5x + 15.833$	0.182
N2 $y = 189.05x + 15.783$	0.181
N3 $y = 205.67x + 11.939$	0.185
N4 $y = 188.81x + 16.783$	0.176
N5 $y = 197.23x + 14.764$	0.179
N6 $y = 191.9x + 14.437$	0.185
Average $y = 192.5x + 15.111$	0.181
SD	0.004

ตาราง 23 ค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้ง $O_2^{\bullet}$ radical ที่ความยาวคลื่น 560 nm ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Sample blank
Control	1.216	1.258	1.238	1.272	1.264	1.248	0
0.1	1.11	1.112	1.127	1.118	1.137	1.123	0.004
0.2	1.042	1.043	1.050	1.022	1.056	1.058	0.015
0.3	0.937	0.906	0.879	0.896	0.919	0.913	0.024
0.5	0.837	0.808	0.811	0.853	0.838	0.847	0.032
0.7	0.745	0.738	0.762	0.735	0.743	0.721	0.052
1.0	0.652	0.672	0.689	0.663	0.654	0.619	0.068
2.0	0.671	0.656	0.641	0.657	0.686	0.621	0.072
3.0	0.639	0.630	0.634	0.626	0.646	0.626	0.095
4.0	0.686	0.674	0.666	0.684	0.690	0.680	0.105
5.0	0.649	0.638	0.628	0.608	0.617	0.638	0.143

ตาราง 24 % Inhibition ของ $O_2^{\bullet}$ radical ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta*
(Hassall) Kützing

Sample								
Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Average	SD
0.1	9	12	9	12	10	10	10	1.392
0.2	16	18	16	21	18	16	18	1.893
0.3	25	30	31	31	29	29	29	2.327
0.5	34	38	37	35	36	35	36	1.634
0.7	43	45	43	46	45	46	45	1.634
1.0	52	52	50	53	54	56	53	2.014
2.0	51	54	54	54	51	56	53	1.927
3.0	55	57	56	58	56	57	57	1.056
4.0	52	55	55	54	54	54	54	0.952
5.0	58	61	61	63	63	60	61	1.767

ตาราง 25 การคำนวณค่า IC_{50} ของการยับยั้ง $O_2^{\bullet}$ radical จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับ
ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

	สมการ	IC_{50}
N1	$y = 38.851x + 14.143$	0.923
N2	$y = 31.41x + 21.784$	0.898
N3	$y = 26.913x + 23.305$	0.992
N4	$y = 32.82x + 21.095$	0.881
N5	$y = 35.505x + 18.909$	0.876
N6	$y = 40.139x + 16.339$	0.839
Average	$y = 34.27x + 19.265$	0.897
SD		0.052

ตาราง 26 ค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ ที่ความยาวคลื่น 700 nm ของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

Sample								
Concentration	N1	N2	N3	N4	N5	N6	Average	SD
(mg/ml)								
Control	0.106	0.067	0.098	0.066	0.074	0.102	0.086	0.018
0.1	0.272	0.273	0.294	0.284	0.297	0.281	0.284	0.010
0.2	0.400	0.447	0.432	0.423	0.430	0.475	0.435	0.025
0.3	0.593	0.587	0.645	0.620	0.633	0.643	0.620	0.025
0.4	0.741	0.757	0.785	0.777	0.800	0.781	0.774	0.021
0.5	0.829	0.865	0.937	0.903	0.886	0.948	0.895	0.045
0.6	1.091	1.114	1.230	1.169	1.143	1.165	1.152	0.049
0.7	1.240	1.267	1.305	1.385	1.356	1.369	1.320	0.059
0.8	1.425	1.437	1.443	1.420	1.473	1.470	1.445	0.022
0.9	1.566	1.592	1.620	1.630	1.726	1.673	1.635	0.058
1.0	1.705	1.736	1.858	1.840	1.849	1.883	1.812	0.073

ตาราง 27 การคำนวณความสามารถในการเป็นตัววัดพิษ จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับ
ความเข้มข้นของสารสกัดด้วยน้ำของสาหร่าย *Spirogyra neglecta* (Hassall) Kützing

	สมการ	1.000
N1	$y = 1.6264x + 0.093$	0.558
N2	$y = 1.6644x + 0.0898$	0.547
N3	$y = 1.7184x + 0.1087$	0.519
N4	$y = 1.7425x + 0.0849$	0.525
N5	$y = 1.7735x + 0.083$	0.517
N6	$y = 1.754x + 0.1039$	0.511
Average	$y = 1.7132x + 0.0939$	0.529
SD		0.019

ภาคผนวก จ

ข้อมูลกราฟมาตรฐาน Trolox, Gallic acid และ EDTA ทั้ง 7 วิธี

ตาราง 28 ค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้ง ABTS^{•+} radical ที่ความยาวคลื่น 734 nm ของสารมาตรฐาน

Trolox

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3
Control	0.718	0.681	0.681
0.00050	0.638	0.612	0.636
0.00100	0.565	0.558	0.574
0.00150	0.540	0.495	0.511
0.00200	0.470	0.469	0.479
0.00250	0.420	0.390	0.409
0.00300	0.361	0.348	0.375
0.00350	0.300	0.305	0.328
0.00400	0.243	0.258	0.291
0.00450	0.200	0.180	0.202
0.00500	0.120	0.128	0.140

ตาราง 29 % Inhibition ของ $\text{ABTS}^{+\bullet}$ radical ของสารมาตรฐาน Trolox

Sample					
Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	Average	SD
0.00050	11	10	7	9	2.415
0.00100	21	18	16	18	2.830
0.00150	25	27	25	26	1.383
0.00200	35	31	30	32	2.519
0.00250	42	43	40	41	1.400
0.00300	50	49	45	48	2.568
0.00350	58	55	52	55	3.202
0.00400	66	62	57	62	4.480
0.00450	72	74	70	72	1.620
0.00500	83	81	79	81	1.929

ตาราง 30 การคำนวณค่า IC_{50} ของการยับยั้ง $\text{ABTS}^{+\bullet}$ radical จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

	สมการ	IC_{50}
N1	$y=15639x + 3.3132$	0.003
N2	$y=15523x + 2.3495$	0.003
N3	$y=15405x - 0.2937$	0.003
Average	$y= 15522x + 1.7897$	0.003
SD		0.000

ตาราง 31 ค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้ง DPPH[•] radical ที่ความยาวคลื่น 517 nm ของสารมาตรฐาน Gallic acid

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3
control	1.999	2.006	2.008
0.002	1.712	1.778	1.773
0.004	1.449	1.527	1.474
0.006	1.184	1.251	1.272
0.008	0.976	0.981	0.968
0.01	0.557	0.768	0.733
0.012	0.499	0.634	0.534
0.014	0.425	0.471	0.385
0.016	0.259	0.295	0.285
0.018	0.235	0.240	0.299
0.02	0.242	0.239	0.248

ตาราง 32 % Inhibition ของ DPPH[•] radical ของสารมาตรฐาน Gallic acid

Sample					
Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	Average	SD
0.002	14	11	12	12	1.638
0.004	28	24	27	26	1.890
0.006	41	38	37	38	2.150
0.008	51	51	52	51	0.381
0.01	72	62	63	66	5.574
0.012	75	68	73	72	3.462
0.014	79	77	81	79	2.153
0.016	87	85	86	86	0.899
0.018	88	88	85	87	1.753
0.02	88	88	88	88	0.219

ตาราง 33 การคำนวณค่า IC₅₀ ของการยับยั้ง DPPH[•] radical จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Gallic acid

	สมการ	IC ₅₀
N1	$y = 6395.3x + 2.0644$	0.007
N2	$y = 5887.3x + 1.1366$	0.008
N3	$y = 6205.2x + 0.5046$	0.008
Average	$y = 6162.6x + 1.2352$	0.008
SD		0.000

ตาราง 34 ค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้ง $\text{OH}^\bullet$ radical ที่ความยาวคลื่น 532 nm ของสารมาตรฐาน Trolox

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3
Control	0.363	0.393	0.380
0.1	0.319	0.352	0.343
0.5	0.305	0.328	0.303
1.0	0.274	0.280	0.299
1.3	0.221	0.244	0.237
1.5	0.178	0.188	0.183
2.0	0.157	0.168	0.161
2.5	0.154	0.169	0.157
3.0	0.151	0.169	0.162
3.5	0.150	0.173	0.163
4.0	0.153	0.170	0.164

ตาราง 35 % Inhibition ของ $\text{OH}^\bullet$ radical ของสารมาตรฐาน Trolox

Sample					
Concentration	N1	N2	N3	Average	SD
(mg/ml)					
0.1	12	10	10	11	1.226
0.5	16	17	20	18	2.329
1.0	25	29	21	25	3.731
1.3	39	38	38	38	0.790
1.5	51	52	52	52	0.621
2.0	57	57	58	57	0.443
2.5	58	57	59	58	0.857
3.0	58	57	57	58	0.728
3.5	59	56	57	57	1.355
4.0	58	57	57	57	0.613

ตาราง 36 การคำนวณค่า IC_{50} ของการยับยั้ง $\text{OH}^\bullet$ radical จากสมการเส้นตรง ระหว่าง % Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

	สมการ	IC_{50}
N1	$y = 24.534x + 7.0715$	1.750
N2	$y = 25.155x + 6.0082$	1.749
N3	$y = 24.753x + 7.1812$	1.730
Average	$y = 24.814x + 6.7536$	1.743
SD		0.011

ตาราง 37 ค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้ง Lipid peroxidation ที่ความยาวคลื่น 532 nm ของสาร
มาตรฐาน Trolox

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3
Control	0.509	0.521	0.499
0.01	0.491	0.501	0.486
0.05	0.398	0.403	0.397
0.10	0.271	0.257	0.263
0.15	0.142	0.165	0.149
0.20	0.072	0.084	0.066
0.25	0.047	0.046	0.045
0.30	0.047	0.046	0.046
0.35	0.046	0.047	0.045

ตาราง 38 % Inhibition Lipid peroxidation ของสารมาตรฐาน Trolox

Sample					
Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	Average	SD
0.01	4	4	3	3	0.643
0.05	22	23	20	22	1.114
0.10	47	51	47	48	2.122
0.15	72	68	70	70	1.887
0.20	86	84	87	86	1.480
0.25	91	91	91	91	0.202
0.30	91	91	91	91	0.229
0.35	91	91	91	91	0.010

ตาราง 39 การคำนวณค่า IC_{50} ของการยับยั้ง Lipid peroxidation จากสมการเส้นตรงระหว่าง
% Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

	สมการ	IC_{50}
N1	$y = 447.22x + 0.3955$	0.111
N2	$y = 427.54x + 2.2645$	0.112
N3	$y = 453.78x - 0.8351$	0.112
Average	$y = 442.85x + 0.6083$	0.112
SD		0.001

ตาราง 40 ค่าการดูดกลืนแสงของการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} ที่ความยาวคลื่น 562 nm ของสารมาตรฐาน EDTA

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3
Control	0.313	0.324	0.320
0.02	0.309	0.310	0.313
0.04	0.307	0.304	0.304
0.06	0.235	0.228	0.242
0.08	0.146	0.166	0.168
0.10	0.102	0.101	0.102
0.30	0.027	0.025	0.028
0.60	0.006	0.005	0.008
1.20	0.002	0.003	0.003

ตาราง 41 % Inhibition ของการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} ของสารมาตรฐาน EDTA

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	Average	SD
0.02	1	4	2	3	1.562
0.04	2	6	5	4	2.198
0.06	25	30	24	26	2.889
0.08	53	49	48	50	3.081
0.10	67	69	68	68	1.000
0.30	91	92	91	92	0.565
0.60	98	98	98	98	0.482
1.20	99	99	99	99	0.169

ตาราง 42 การคำนวณค่า IC_{50} ของการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน EDTA

	สมการ	IC_{50}
N1	$y = 1124.6x - 41.821$	0.082
N2	$y = 1035.5x - 34.136$	0.081
N3	$y = 1062.5x - 38.125$	0.083
Average	$y = 1072.4x - 37.93$	0.082
SD		0.001

ตาราง 43 ค่าการดูดกลืนแสงของการยับยั้ง $O_2^{\bullet}$ radical ที่ความยาวคลื่น 560 nm ของสารมาตรฐาน Gallic acid

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3
Control	1.316	1.485	1.226
0.05	1.031	1.133	0.997
0.1	0.931	1.088	0.841
0.2	0.757	0.877	0.713
0.4	0.512	0.564	0.472
0.6	0.325	0.45	0.341
0.8	0.363	0.362	0.308
1	0.272	0.314	0.251
1.2	0.265	0.314	0.214
1.4	0.238	0.246	0.184
1.6	0.241	0.261	0.206

ตาราง 44 % Inhibition ของ $O_2^{\bullet}$ radical ของสารมาตรฐาน Gallic acid

Sample					
Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	Average	SD
0.05	22	24	19	21	2.527
0.1	29	27	31	29	2.000
0.2	42	41	42	42	0.577
0.4	61	62	62	62	0.583
0.6	75	70	72	72	2.659
0.8	72	76	75	74	1.678
1	79	79	80	79	0.354
1.2	80	79	83	80	1.907
1.4	82	83	85	83	1.539
1.6	82	82	83	82	0.577

ตาราง 45 การคำนวณค่า IC_{50} ของการยับยั้ง $O_2^{\bullet}$ radical จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Gallic acid

	สมการ	IC_{50}
N1	$y = 110.97x + 17.814$	0.290
N2	$y = 112.59x + 17.239$	0.291
N3	$y = 115.14x + 16.767$	0.289
Average	$y = 114.41x + 17.051$	0.288
SD		0.001

ตาราง 46 ค่าการดูดกลืนแสงของความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ ที่ความยาวคลื่น 700 nm ของสารมาตรฐาน Gallic acid

Sample Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	Average	SD
0.00	0.159	0.161	0.156	0.159	0.003
0.01	0.336	0.349	0.351	0.345	0.008
0.02	0.524	0.528	0.531	0.528	0.004
0.03	0.717	0.717	0.751	0.728	0.020
0.04	0.919	0.917	0.921	0.919	0.002
0.05	1.109	1.098	1.113	1.107	0.008
0.06	1.293	1.305	1.320	1.306	0.014
0.07	1.478	1.502	1.519	1.500	0.021
0.08	1.695	1.696	1.714	1.702	0.011
0.09	1.945	1.989	1.997	1.977	0.028
0.10	2.229	2.195	2.194	2.206	0.020

ตาราง 47 การคำนวณความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ จากสมการเส้นตรงระหว่าง % Inhibition กับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Gallic acid

	สมการ	1.000
N1	$y=20.177x+0.1188$	0.044
N2	$y=20.175x+0.1237$	0.043
N3	$y=20.235x+0.1307$	0.043
Average	$y=20.195x+0.1244$	0.043
SD		0.001

ภาคผนวก จ

การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry (Lowry, et al., 1951)

Lowry's Method for Protein Determination

วิธีเตรียม solution

1% (w/v) CuSO_4 10 ml

- ชั่ง CuSO_4 0.1 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 10 ml

2% (w/v) Na Tartrate ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$) 10 ml

- ชั่ง $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2$ 0.2 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 10 ml

0.1 M NaOH 50 ml

- ชั่ง NaOH 0.2 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 50 ml

2% (w/v) Na_2CO_3 in 0.1 M NaOH 50 ml

- ชั่ง Na_2CO_3 มา 1 g ละลายด้วย 0.1 M NaOH ปริมาตร 50 ml

Folin-Ciocalteu Reagent (phenol reagent)

- ปิ่เปต 2 N Folin phenol 25 ml ผสมน้ำ 25 ml เก็บในขวดสีชา

Bovine serum albumin (BSA)

- ชั่ง BSA 2 mg ละลายในน้ำ 1 ml

เตรียมแล้วใช้ภายใน 1 ชั่วโมง

Alkaline Copper Reagent 2 ml

ผสม 1% (w/v) CuSO_4 0.02 ml

2% (w/v) Na Tartrate 0.02 ml

2% (w/v) Na_2CO_3 in 0.1 M NaOH 1.96 ml

การเตรียมกราฟมาตรฐาน ปริมาณ BSA และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm

1. การเตรียม BSA ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0 mg/ml ปริมาตร 0.3 ml ตามลำดับ
2. เติมน้ำ Alkaline Copper Reagent 1.5 ml ใน BSA ทุกความเข้มข้น บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3. เติมน้ำ Folin-Ciocalteu Reagent 0.075 ml ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยการ vortex บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm
5. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm

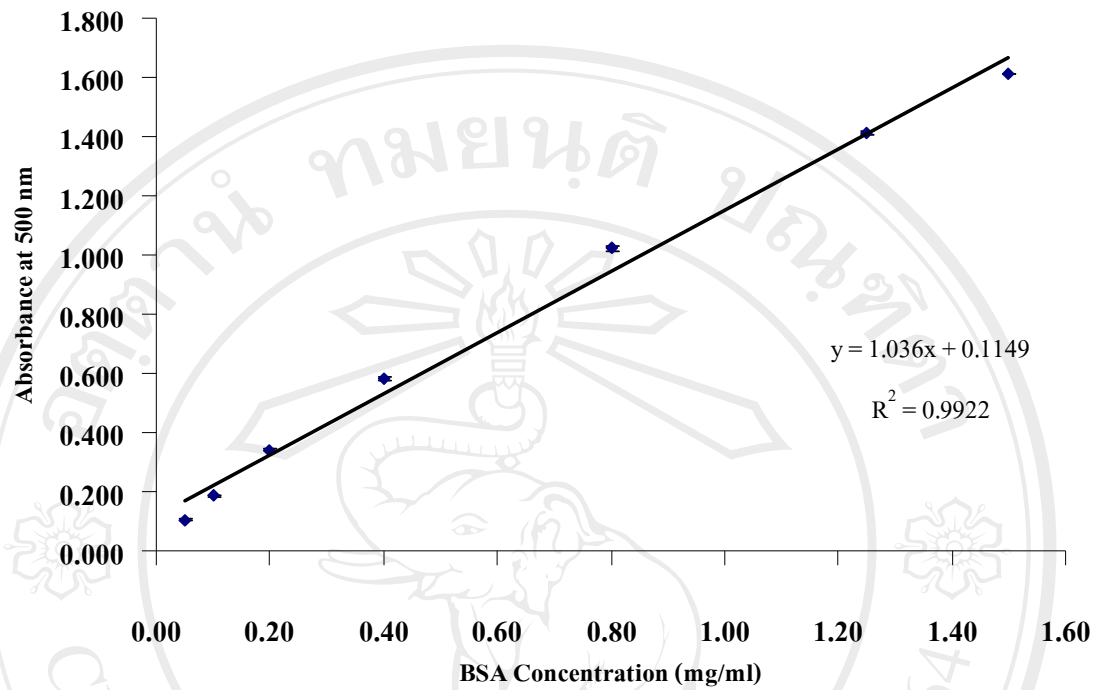
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ตาราง 48 ปริมาณ BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm

BSA Concentration (mg/ml)	N1	N2	N3	Average	SD
0.05	0.105	0.104	0.107	0.105	0.002
0.10	0.181	0.189	0.186	0.185	0.004
0.20	0.343	0.342	0.336	0.340	0.004
0.40	0.584	0.583	0.574	0.580	0.006
0.80	1.025	1.012	1.031	1.023	0.010
1.25	1.408	1.415	1.413	1.412	0.004
1.50	1.613	1.615	1.612	1.613	0.002
1.75	1.755	1.753	1.756	1.755	0.002
2.00	1.855	1.850	1.844	1.850	0.006



ภาพ 47 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว จุติกานต์ ปัญโญใหญ่

ภูมิลำเนา จังหวัดเชียงใหม่

วันเดือนปีเกิด 2 มีนาคม 2526

ประวัติการศึกษา

ประถมศึกษา	โรงเรียนอรพินพิทยา	จังหวัดลำพูน	ปีการศึกษา 2537
มัธยมศึกษาตอนต้น	โรงเรียนสวนบุญโญปถัมภ์ลำพูน	จังหวัดลำพูน	ปีการศึกษา 2540
มัธยมศึกษาตอนปลาย	โรงเรียนสวนบุญโญปถัมภ์ลำพูน	จังหวัดลำพูน	ปีการศึกษา 2543
ปริญญาตรี	สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	จังหวัดเชียงใหม่	ปีการศึกษา 2547
ปริญญาโท	สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	จังหวัดเชียงใหม่	ปีการศึกษา 2550

ที่อยู่ 32 ม.2 ต.หารแก้ว อ.หางดง จ.เชียงใหม่ 50230

โทรศัพท์ 053-464186, 086-5862627

E-mail: mameauw_micro@hotmail.com

รางวัลที่ได้รับ รางวัลการประกวดโปสเตอร์ดีเด่นของการเสนอผลงานแบบโปสเตอร์
ระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2548
เรื่อง การคัดเลือกแอคติโนมัยซีสจากดินรอบรากพืชสมุนไพรที่สามารถสร้างสาร
ปฏิชีวนะยับยั้ง *Candida albicans*