บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างมะม่วงหาวมะนาวโห่

ตัวอย่าง ผล และ ใบ ของมะม่วงหาวมะนาวโห่ ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เก็บจาก อำเภออัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม เดือนพฤศจิกายน 2557

ตัวอย่างผลแบ่งตามระยะการสุก 2 ระยะคือ ผลกึ่งสุกหรือผลห่ามมีสีแดง (half-ripened) และผลสุก มีสีดำ (fully-ripened)

(a) (b)

ภาพที่ 3.1 ผลของมะม่วงหาวมะนาวโห่ (a) = ผลกึ่งสุก (b) = ผลสุก

3.2 วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี

3.2.1 สารเคมี

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Ethanol (absolute, 70% ethanol)

Ethyl acetate

Hexane

Methanol

L-dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)

Folin-Ciocalteu Reagent

Gallic acid

Kojic acid

sodium carbonate

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase mushroom)

3.2.2 วัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์

เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง (2 and 4-decimal balance)
ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Freezer -20 $^{\circ}$C)

ตู้อบอุณหภูมิสูง (hot air oven)

เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator)

เครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น (lyophilizer)

เครื่องเขย่า (shaker)

อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

ไมโครเวฟ (microwave)
เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
แท่นให้ความร้อน (hot plate)

เครื่องผสมสาร (magnetic stirrer)
เครื่องปั่นผลไม้ (blender)

กล้องถ่ายรูป (camera)
ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 20, 100, 1000 ไมโครลิตร
Microcentrifuge tube (1.5 ml)

96-well microplates

96-well Microplate Readers

3.3 การสกัดสารสำคัญจากมะม่วงหาวมะนาวโห่

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างผล นำผลมาล้างให้สะอาด วางจนสะเด็ดน้ำ นำมาผ่าซีก แกะเมล็ดออก นำส่วนเนื้อและน้ำไปปั่นให้ละเอียด จากนั้นนำส่วนเนื้อผลไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล เอทิลอะซิเทต และ เฮกเซน โดยใช้ปริมาณตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาการสกัด 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองกากออก นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวอย่างไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่ให้ถูกแสง เก็บไว้ใช้ทำการทดลองต่อไป

ภาพที่ 3.2 เมล็ดมะม่วงหาวมะนาวโห่

3.3.2 การเตรียมตัวอย่างใบ นำใบมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อน (oven) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักแห้งที่ได้ นำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เมทานอล เฮกเซน และเอทิลอะซิเทต โดยใช้ปริมาณตัวอย่างต่อตัวทำละลาย เท่ากับ 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาการสกัด 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองกากออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 อีกครั้งหนึ่ง นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละตัวอย่างไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่ได้เก็บไว้ใช้ทำการทดลองต่อไป

ภาพที่ 3.3 ใบและต้นมะม่วงหาวมะนาวโห่

3.3.3 การเตรียมตัวอย่างน้ำจากผล นำเนื้อผลมาปั่นแล้วคั้นส่วนน้ำ กรองกากออกแล้วนำน้ำที่แยกได้ไปทำให้แห้ง โดยเครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น (lyophilizer)

3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Compound)

(วิธีของ Singleton และคณะ, 1999)

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ใช้ Folin-Ciocalteu method ซึ่งมีหลักการ คือ การเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ของสารโมลิบโดทังสเตตไอออน (Molybdotungstate ion) รีเอเจนท์ซึ่งประกอบด้วย โซเดียมทังสเตต (Sodium tungstate) โซเดียมโมลิบเดต (Sodium bolybdate) กรดฟอสฟอริก (Phosphoric acid) และ โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) โดยเมื่อไอออน Mo(VI) ซึ่งมีสีเหลืองได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกจะไปรีดิวซ์ phosphotungstic acid และ phosphomolybdic acid ในตัวกลางที่เป็นเบส ได้สารสีน้ำเงิน molybdenum oxide (Mo(V)) และ tungsten oxide วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐาน gallic acid และรายงานค่าปริมาณในรูปของมิลลิกรัมของกรดแกลลิค (Gallic acid equivalent, mg/g GAE)

3.4.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 7% w/v Na_2CO_3

ชั่งสาร Na_2CO_3 7 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตร ครบ 100 มิลลิลิตร

3.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางสารละลายกรดแกลลิกให้มีความเข้มข้น 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.4.3 การทำกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแกลลิก นำสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสม ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที แล้วจึงเติมสารละลาย7% w/v Na_2CO_3 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิก และค่าการดูดกลืนแสง หาสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน สำหรับใช้ในคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

3.4.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดในแต่ละตัวทำละลาย โดยทำการเตรียมตัวอย่างสารสกัดโดยการเจืองจางด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ผสมสารต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3 โดยใช้สารสกัดแทนสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัด (mg of gallic acid/g of dry weight) โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานข้อ 3.4.3

คำนวณปริมาณสารประกอบฟีโนลิคโดยรวม จากสมการ

$$C = cV/M$$

เมื่อ

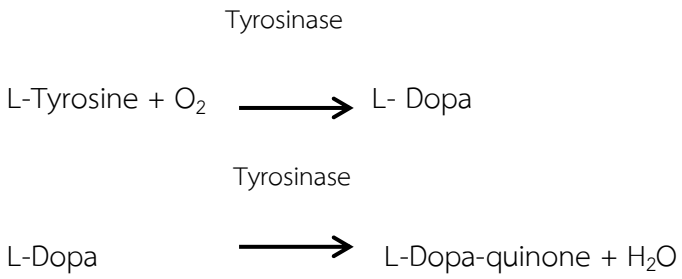
C = ปริมาณสารประกอบฟีโนลิคที่เทียบจากกราฟ gallic acid (mg/g)
c = ความเข้มข้นของ gallic acid (mg/ml)
V = ปริมาณของสารสกัด (ml)
M = น้ำหนักของสารสกัด (g)

3.5 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสในสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ ด้วยวิธี dopachrome

สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสส่วนมากมักเป็นสารประเภทฟีนอลิกซึ่งมีความสามารถเป็น chelating agent โดยจะเข้าไปจับกับทองแดงซึ่งทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในโมเลกุลของเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ตามปกติ ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่ ด้วยวิธี Dopachrome โดยใช้ L-dopa เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ เอนไซม์ไทโรสิเนสจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน L-dopaไปเป็นสารประกอบโดปาควิโนน (Dopaquinone) ดังแสดงในสมการ และถูกเปลี่ยนเป็นโดปาโครม (Dopachrome) ซึ่งมีสีส้มแดง ดังแสดงในภาพที่ 3.4 สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นสามารถดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ดังนั้นเมื่อมีสารในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ ไทโรซิเนส จะส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารโดปาโครมในปริมาณที่ลดลง แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารที่ใช้ในการทดสอบ



ภาพที่ 3.4 แสดงกลไกการสังเคราะห์ เมลานินโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส (Ribeiro และคณะ 2015)

3.5.1 การเตรียมสารเคมี

1) เตรียม 100 mM phosphate buffer โดยเตรียมสารละลาย 100 mM $NaH_2PO_4.H_2O$ และ สารละลาย 100 mM Na_2HPO_4 โดยละลายในน้ำกลั่น 100 ml นำสารละลายทั้ง 2 ชนิด มาผสมและปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.8 (สำหรับใช้ในการละลายsubstrate) และ pH 6.5 (สำหรับใช้ในการละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส)

2) เตรียม L-DOPA solution ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร ในสารละลาย 100 mM phosphate buffer pH 6.8

3) สารละลาย Tyrosinase จาก Mushroom ความเข้มข้น 200 unit/ml ใน 100 mM phosphate buffer pH 6.5

4) สารละลาย Kojic acid (positive control) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตรในน้ำกลั่น (stock 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการเจือจางสารละลายกรดโคจิก ให้มีความเข้มข้น 0.0078125, 0.015625,0.03125, 0.0625, 0.125 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5) ละลายสารสกัด ให้มีความเข้มข้น 0.78125, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/ml ใน dimethylsulfoxide

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Dopachrome method)

ทำการทดสอบด้วยวิธี Dopachrome method โดยทดสอบใน 96 well plate และอ่านผลด้วยเครื่องMicroplate reader ซึ่งจะประกอบด้วย Control, Blank control, Test sample และ Blank control (ตารางที่ 1) ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลุมของ 96 well plate แล้วตั้งทิ้งไว้ที่ 37 °C

นาน 10 นาที เติมสารละลาย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร L-Dopa 20 ในแต่ละหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader นำค่าที่ได้คำนวณหาเปอร์เซนต์การยับยั้ง (%) แต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ย

ตารางที่ 3.1 แสดงการเติมสารละลายในหลอดทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

หลอดทดสอบ	Phosphate buffer pH 6.8 (μl)	DMSO (μl)	Test sample (μl)	Tyrosinase solution 200 units/mM	L-Dopa (μl)
A (control	80	40	-	40	40
B (Blank control)	120	40	-	40	-
C (Test sample)	80	-	40	40	40
D (Blank sample)	120	-	40	-	40

ลำดับการเติมสาร มีดังนี้

1. เติม Sample 40 μl ในช่องของ sample และ blank sample (ดังแสดงในตารางที่ 3.1)
2. เติม Solvent (DMSO) 40 μl ในช่องของ control และ blank control (ดังแสดงในตารางที่ 3.1)
3. เติม buffer pH 6.8 ในทุกช่อง ปริมาตรดังแสดงในตารางที่ 3.1
4. เติมสารละลาย L-dopa หรือ L-Tyrosine 40 μl ยกเว้น blank control และทำการบ่มเพาะไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 10 นาที
5. เติมสารละลาย Tyrosinase 40 μl ยกเว้นช่อง blank sample และทำการบ่มเพาะไว้ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 20 นาที
6. ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm

สมการแสดงการคำนวณ

$$\% \text{ Tyrosinase Inhibition} = [(A-B)-(C-D) / (A-B)] \times 100$$

A หมายถึง Control

B หมายถึง Blank control

C หมายถึง Test sample

D หมายถึง Blank sample

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการหาค่าเฉลี่ยเลขคณิต และการหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)