

ระเบียบวิธีการวิจัย/การทดลอง

1. เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 เครื่องมือ/อุปกรณ์

- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- กรวยแก้ว
- ขวดแก้วสีชา
- เครื่องแก้ว
- เครื่องบด
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- เครื่องชั่งวิเคราะห์ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- ตู้อบ (hot air oven)
- ถังหมัก
- ผ้าขาวบาง
- สำลี
- Column
- Chromatographic Column
- Microplate reader
- Soxhlet apparatus
- Spatula
- TLC tank
- 96 well plate

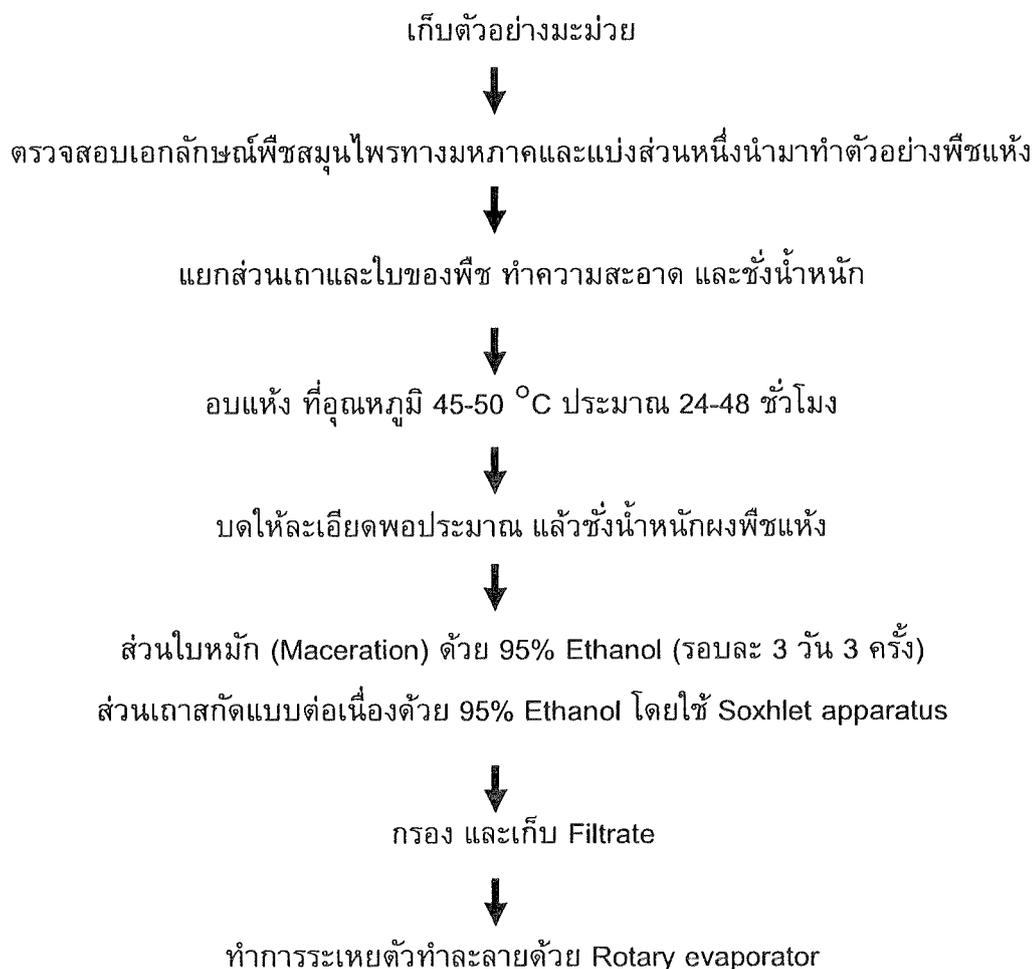
1.2 สารเคมี

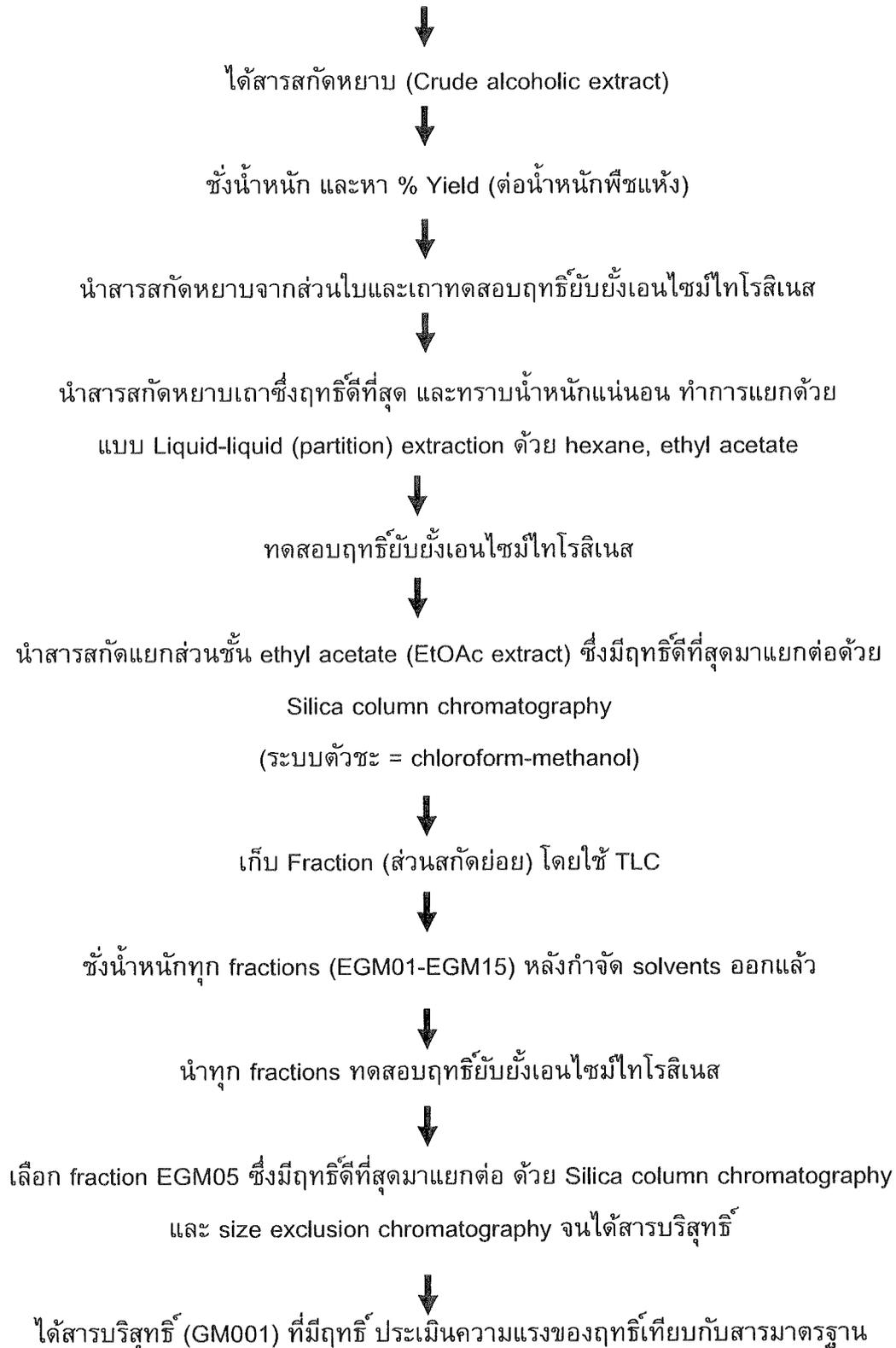
- Absolute ethanol
- Acetone
- Hexane
- Chloroform
- Ethyl acetate
- Isopropyl alcohol (IPA)

- L-DOPA
- Methanol
- Mushroom tyrosinase enzyme
- Na_2HPO_4
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Sephadex LH-20
- Silica gel 60
- Standard kojic acid
- 10% sulphuric acid
- TLC alumina sheet
- 95 % Ethanol

2. แผนการดำเนินงาน

2.1 ขั้นตอนการดำเนินงานโดยรวม





2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร

ตัวอย่างมะม่วงเก็บจากพื้นที่บ้านแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ เมื่อวันที่ 6 มิถุนายน 2552 ส่วนหนึ่งนำมาทำตัวอย่างพืชแห้ง (Herbarium specimen) เก็บไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และทำการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ (identify) โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชแห้งที่เก็บไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืช และเทียบจากข้อมูลอนุกรมวิธานพืช (Flora of Thailand และ Flora of China)

2.2.2 การสกัดและแยกสารสำคัญ

2.2.2.1 การเตรียมพืชตัวอย่าง

พืชที่ใช้เป็นพืชสด ส่วนที่ใช้คือ ส่วนเถาและใบ นำมาล้างน้ำ คัดส่วนที่เสียออก ผึ่งลมพอให้แห้ง แล้วจึงนำตัวอย่างส่วนใบไปอบที่อุณหภูมิ 45-50 °C ประมาณ 24 ชั่วโมง สำหรับตัวอย่างส่วนเถานำมาสับเป็นชิ้นก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 45-50 °C ประมาณ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำพืชอบแห้งทั้ง 2 ส่วน ไปบดลดขนาดให้ได้เป็นผงหยาบๆ ซึ่งน้ำหนักแห้งของผงพืชที่ได้ แล้วบันทึกผล

2.2.2.2 การสกัดสารสำคัญ

ทำการสกัดผงใบมะม่วงปริมาณ 309.57 กรัม ด้วยวิธีหมัก (maceration) ด้วยแอลกอฮอล์ 70% รอบละ 3 วัน จำนวน 3 ครั้ง ส่วนผงเถามะม่วงปริมาณ 500 กรัม ทำการสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet apparatus ด้วยแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 1 วัน รวมสารสกัดแต่ละส่วนที่ได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหยภายใต้ความดัน (Rotary evaporator) จนได้สารสกัดหยาบ (crude extracts) ที่มีลักษณะขุ่นหนืด สีเขียวถึงดำ กลิ่นหอมอ่อนๆ ซึ่งน้ำหนัก หาปริมาณผลผลิต (% yield)

2.2.2.3 การสกัดแยกส่วนของสารสกัดหยาบส่วนเถา

นำสารสกัดหยาบส่วนเถาปริมาณ 80 กรัม กระจายใน 20% แอลกอฮอล์ในน้ำแล้วจึงทำการสกัดแยกส่วน (partition extraction) ด้วย hexane และ ethyl acetate (EtOAc) จนได้สารสกัดแยกส่วนชั้น hexane (partitioned hexane extract) สารสกัดแยกส่วน ethyl acetate (partitioned EtOAc extract) และสารสกัดชั้นน้ำ (aqueous extract) ซึ่งน้ำหนัก หาปริมาณผลผลิต (% yield) จากนั้น นำสารสกัดแยกส่วนทั้ง 3 ส่วนนี้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อไป

2.2.2.4 การทำสารสำคัญให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดแยกส่วน ethyl acetate (partitioned EtOAc extract) ปริมาณ 5 กรัม แยกด้วย silica (7734) column chromatography ที่มีตัวชะเป็น chloroform : methanol แบบ Gradient technique จนได้ fraction ทั้งหมด 15 fractions ให้ชื่อว่า EGM01 ถึง EGM15 นำทุก fractions ไป

ระเหยตัวทำละลายจนแห้ง ชั่งน้ำหนัก หาปริมาณผลผลิต (% yield) และนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า fraction EGM05 มีฤทธิ์ดีที่สุด จึงทำการแยก EGM05 ปริมาณ 350 มิลลิกรัม ด้วย silica (7734) column chromatography ที่มีตัวชะเป็น chloroform : methanol แบบ Gradient technique จนได้ fraction จำนวน 7 fractions ให้ชื่อว่า fraction EGM051 ถึง EGM057 โดยมี fraction EGM052 ที่มีองค์ประกอบหลักที่ให้ฤทธิ์อยู่ในปริมาณมาก (327.7 มิลลิกรัม) จึงนำ fraction EGM052 ปริมาณ 327.7 มิลลิกรัม ไปแยกด้วย silica (9385) column chromatography ที่มีตัวชะเป็น hexane:EtOAc:acetone แบบ Gradient technique จนได้ fraction จำนวน 12 fractions ให้ชื่อว่า fraction EGM052-1 ถึง EGM052-12 โดยที่ fraction EGM052-3 ถึง EGM052-7 มีรูปแบบ chromatogram เหมือนกันจึงนำมารวมกันได้ปริมาณ 186.8 มิลลิกรัม แล้วนำไปแยกด้วย เทคนิค size exclusion chromatography ที่มี Sephadex LH-20 เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และ acetone เป็นตัวชะ (eluent) จนได้สารบริสุทธิ์ ชื่อว่า GM001 ปริมาณ 184.1 มิลลิกรัม

2.2.3 การตรวจสอบชนิดสารองค์ประกอบด้วยวิธีทางเคมี

ทำการตรวจสอบชนิดของกลุ่มสารที่เป็นองค์ประกอบและสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดแยกส่วนชั้น ethyl acetate ด้วยวิธีทางเคมี ดังนี้

2.2.3.1 การตรวจสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์

วิธีที่ใช้ในการทดสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์คือตรวจสอบผลการทำให้เกิดตะกอนด้วย reagent ดังนี้

- 1) Mayer's reagent: ผลบวก(+) คือ เมื่อเติมแล้วเกิดตะกอนสีขาวนวล
- 2) Dragendorff's reagent: ผลบวก คือ เมื่อเติมแล้วเกิดตะกอนสีส้ม

2.2.3.2 การตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยทดสอบด้วยวิธี Shinoda's test

2.2.3.3 การตรวจสอบสารกลุ่มคูมารินส์

นำสารสกัดใส่หลอดทดลองแล้วเติมน้ำพอเปียกและปิดปากด้วยจุกคอร์กที่มีกระดาษ กรองซูป ด้วย NaOH และนำไปให้ความร้อน 3-5 นาที นำมาส่องดูภายใต้แสงยูวีความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร นาน 1 นาทีโดยผลบวก คือ กระดาษกรองเรืองแสงสีเขียวอมฟ้า

2.2.3.4 การตรวจสอบสารกลุ่มซาโปนิน

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบสารกลุ่มซาโปนิน

- 1) Froth test เขย่าแรงๆ นาน 1 นาที : ผลบวก คือ เกิดฟองรูปร่างผึ่งที่คงทนนานกว่า 15 นาที
- 2) ต้มกับกรดเกลือเจือจาง แล้วเขย่าแรงๆ นาน 1 นาที : ผลบวก คือ ไม่เกิดฟองรูปร่างผึ่ง

2.2.3.5 การตรวจสอบสารกลุ่มแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

ทดสอบด้วยวิธี Borntrager's test : ผลบวก คือ เกิดสีชมพูอมแดงในชั้นของต่าง (ชั้นบนของสารละลาย)

2.2.3.6 การตรวจสอบสารกลุ่มแทนนิน

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบสารกลุ่มแทนนิน

- 1) เดิม 1% เจลาติน 2-3 หยด : ผลบวก คือ เกิดตะกอนขุ่นขาว
- 2) Ferric chloride (FeCl_3) TS : ผลบวกแบ่งเป็น
 - เกิดตะกอนสีน้ำเงิน แสดงว่ามี hydrolysable tannin หรือมี tannin ทั้งสองชนิด
 - เกิดตะกอนสีเขียว แสดงว่ามี condense tannin
- 3) Vanillin-HCl test : ผลบวก คือ เกิดตะกอนสีชมพูแดง แสดงว่ามี condense tannin
- 4) เดิมน้ำปูนใส : ผลบวก คือ เกิดตะกอน และตะกอนอาจมีสีเทาแกมน้ำเงิน แสดงว่ามี hydrolysable tannin
- 5) เดิม 10% กรดกำมะถัน และ น้ำยา 10% ตะกั่วอะซิเตด : ผลบวก คือเกิดตะกอนภายใน 15 นาที

2.2.3.7 การตรวจสอบสารกลุ่ม stibenoids

ทดสอบโดยวิธี phosphoric acid – vanillin test : ผลบวกคือ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูแล้วค่อยๆเข้มขึ้นเป็นสีม่วงแดง

2.2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดำเนินการตามขั้นตอน ดังนี้

- 1) เตรียม 20 mM Phosphate buffer pH 6.8
- 2) เตรียมสารละลาย Mushroom tyrosinase enzyme 240 unit/mL ใน phosphate buffer
- 3) เตรียม 0.85 mM L-DOPA ใน phosphate buffer
- 4) เตรียมสารละลายมาตรฐาน kojic acid และ สารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบใน Absolute ethanol ณ ความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ
- 5) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ด้วยวิธี enzyme-inhibitor pre-incubation method โดยเติมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบลงใน microplate โดยแบ่งชุดทดสอบออกเป็น 4 ชุด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชุดทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase

ชุดทดสอบ	20 mM Phosphate buffer pH 6.8 (μL)	Mushroom tyrosinase enzyme solution (240 units/mL) (μL)	Test sample หรือ Standard (μL)	Abs. ethanol (μL)
A (control)	80	40	-	40
B (blank of control)	120	-	-	40
C (test sample หรือ standard)	80	40	40	-
D (blank of test sample)	120	-	40	-

ผสมสารในแต่ละหลุมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-Dopa (0.85 mM) จำนวน 40 μL ลงในทุกหลุมทิ้งไว้ 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณหาร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase จากสูตร

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

เมื่อ

A = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มี สารตัวอย่าง/สารมาตรฐาน แต่มีเอนไซม์

B = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มี สารตัวอย่าง/สารมาตรฐาน และเอนไซม์

C = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมี สารตัวอย่าง/สารมาตรฐาน และเอนไซม์

D = ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมี สารตัวอย่าง/สารมาตรฐาน แต่ไม่มีเอนไซม์

หาร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐาน และ สารตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ