บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

(1) บีกเกอร์ (beaker)

(2)ปิเปต (pipette)

(3) แปรงล้าง(test tube brush)

(4) กระดาษกรองเบอร์ 3(Filter paper number3)

(5) ขวดวัดปริมาตร(Volumetric flask)

(6) โกร่งบด (Mortar)

(7) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

(8) แท่งแก้วคน (Stirring rod)

(9) ลูกยาง(Bubble)

(10) กระบอกตวง (Graduated cylinder)

(11) ขาตั้ง (Stand)

(12) หลอดหยด(Dropper)

(13) กระดาษกรองไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร(Nylon membrane filter 0.45 micrometer)

(14) ขวดน้ำกลั่น (Wash bottle)

(15) กระจกนาฬิกา (Watch glass)

(16) แผ่นแก้ว (glass)

3.1.2 เครื่องมือ

(1) เครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) ยี่ห้อ SHIMADZU ประเทศญี่ปุ่น

(2) เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography) ยี่ห้อ Agilent

(3) เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ MALDI-TOF ยี่ห้อ Bruker Daltonics

(4) เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ ESI – MS ยี่ห้อ Quattro micro API

(5)เฟสของแข็ง (C_{18} –Vertipak) ยี่ห้อ vertical บริษัท SC Seince

(6) แผ่น TLC (TLC silica gel 60 F_{254}) ยี่ห้อ Merck บริษัท SC Seince

(7) ตู้อบ (Hot air oven) ยี่ห้อMemmertประเทศเยอรมัน

(8) เครื่องบด(Blender) ยี่ห้อ House worth

(9) เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) ยี่ห้อ Memmertประเทศเยอรมัน

(10) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmertประเทศเยอรมัน

(11) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ Hettichประเทศเยอรมัน

(12) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง(4 Digit Balance) ยี่ห้อ Mettler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

(13) เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (3 Digit Balance) ยี่ห้อ Mettler Toledo ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

(14) เครื่องดูดควัน (Hoods)ยี่ห้อToplab ประเทศไทย

3.1.3 สารเคมี

(1) สารมาตรฐานอาร์บูติน(Arbutinstandand)ยี่ห้อ sigma

(2) เมทานอล (MethanolHPLC grade) ยี่ห้อ Lab Scan

(3) เอทิลอะซิเตต(Ethyl acetate)ยี่ห้อ Lab Scan

(4) อะซีโตไนไทรล์ (Acetonitrile HPLC grade) ยี่ห้อ Lab Scan

(5) น้ำกลั่นสองขั้นตอน (Deionize water HPLC grade)ยี่ห้อ Lab Scan

(6) ซิลิกา (Silica gel 60 G for thin-layer chromatography)ยี่ห้อ Merck

(7) ไดคลอโรมีเทน (Dichioromethane) ยี่ห้อ Fluka

(8) ซิลิกา (Silica gel 60 G for thin-layer chromatography) ยี่ห้อ Merck

(9) ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium Hydrogen Phosphate) ชนิด AR grade ยี่ห้อ Univar

(10) โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium Hydrogen Phosphate) ชนิด AR grade ยี่ห้อ Univar

(11) เอนไซม์ไทโรซิเนส(Tyrosinase) ชนิด AR grade ยี่ห้อ Sigma

(12) ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะลานิน หรือแอล-โดพา (L-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA) ชนิด AR grade ยี่ห้อ Sigma

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเปรียบเทียบการสกัดสารอาร์บูตินจากส่วนต่างๆของเม่าด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี(TLC)

3.2.1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

(1) นำส่วนของพืชเม่าที่คัดเลือกทำการสกัดทั้ง 5 ส่วนคือ ใบเม่าอ่อน ใบเม่าแก่ ผลเม่าเขียว ผลเม่าแดง ผลเม่าดำ จากนั้นล้างส่วนของพืชตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่าง ตากให้สะเด็ดน้ำ ชั่งน้ำหนักบันทึกผลน้ำหนักที่ได้ จากนั้นนำส่วนของพืชตัวอย่างนั้นไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ แล้วบดด้วยเครื่องบดให้ละเอียด

(2) นำใบเม่าอ่อน ในข้อ (1) ที่บดละเอียดมาประมาณ 1000 กรัม ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน แช่ด้วยเมทานอล1500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน กรองเพื่อแยกส่วนสกัดหยาบเมทานอลและกากออกจากกัน

(3) นำส่วนสกัดหยาบเมทานอลที่ได้มาระเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน จะได้ส่วนสกัดหยาบ ชั่งน้ำหนักและบันทึกผลที่ได้

(4) ทำซ้ำในข้อ (2) – (3) โดยเปลี่ยนส่วนตัวอย่างของพืชเป็น ใบเม่าแก่ ผลเม่าเขียว ผลเม่าแดง ผลเม่าดำ

3.2.1.2 การสกัดแยกอาร์บูตินด้วยทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี(thin layer chromatography : TLC)

(1) ชั่งส่วนสกัดหยาบใบเม่าอ่อนปริมาณ 1.0 กรัม จากนั้นทำการจุด(spot) สารมาตรฐานอาร์บูตินที่จุดแรก และส่วนสกัดหยาบที่จุดต่อไปเรื่อยๆลงบนแผ่น TLC ด้วยหลอดคาปิลลารี จะต้องมีขนาดและความสม่ำเสมอกัน ทิ้งไว้ให้แห้ง จุ่มลงในเฟสเคลื่อนที่ (อะซิโตไนไทรล์100%) จะสามารถเห็นสารที่แยกออกจากกันบนแผ่น TLC ได้ ด้วยการส่องแผ่น TLC ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งจะเห็นเป็นจุดสีดำบนพื้นแผ่น TLC

(2) แยกเอาสารออกจากแผ่น TLC หลังจากส่องด้วยแสงยูวี โดยวงกลมตรงตำแหน่งสารตัวอย่างไว้ ขูดเอาส่วนที่ทำเครื่องหมายวงกลมออกจากแผ่น TLC ทำการชั่งน้ำหนักบันทึกผลที่ได้คำนวณหาค่า R_f (ratio-to front)

(3) ทำการแยกซิลิกาออกโดยละลายสารด้วยเมทานอลแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่

1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทเอาสารละลายส่วนใสในบีกเกอร์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว และนำสารที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องอังน้ำ ที่อุณหภูมิ 80 °C ทำการชั่งน้ำหนักและเก็บสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงต่อไป

(4) ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 3.2.1.2 (1) - (3) โดยเปลี่ยนสารตัวอย่างเป็นใบเม่าแก่ ผลเม่าเขียวผลเม่าแดง ผลเม่าดำ

3.2.1.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

<u>ตั้งสภาวะเครื่อง HPLC เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ใช้</u>

คอลัมน์	Inertsil ODS-3 4.6 × 250 มิลลิเมตร5 ไมโครเมตร
ดีเทคเตอร์Diode Array	Detector ; SPD – M10A
อุณหภูมิ	35 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	1.00 มิลลิลิตร/นาที
ความดัน	120-150 บาร์
ความยาวคลื่น	224 นาโนเมตร
ปริมาตรที่ฉีด	20 ไมโครลิตร
เฟสเคลื่อนที่	อะซิโตไนไตรล์:น้ำ 80:20 (ร้อยละโดยปริมาตร)

<u>การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ</u>

(1) เตรียมเฟสเคลื่อนที่ อะซิโตไนไทรล์ต่อน้ำที่อัตราส่วน 80 : 20 ร้อยละโดยปริมาตร และทำกรองด้วยกระดาษกรองไนลอนเมมเบรน 0.45 ไมครอน

(2) นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัดแยกในข้อ 3.2.1.2 นำไปกรองด้วยชุดกรองสารมาตรฐานโดยใช้กระดาษกรองไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร

(3) เตรียมสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินโดยการชั่ง 0.010 กรัมลงในบีกเกอร์ขนาด 50มิลลิลิตรแล้วละลายด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตรเทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นสำหรับ HPLC จะได้สารละลายมาตรฐานอาร์บูตินที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

(4) ฉีดสารตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตรเพื่อเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์กับสารมาตรฐานอาร์บูติน ซึ่งถ้ามีสารอาร์บูตินในสารตัวอย่าง จะสังเกตเห็นว่ามีพีกที่รีเทนชันไทม์เดียวกับสารมาตรฐาน

(5) แบ่งสารตัวอย่างในข้อ 3.2.1.3 (2) มาปริมาณ 3-4 มิลลิลิตร และเติมสาร

มาตรฐานอาร์บูตินในข้อ 3.2.1.3 (3) ลงในสารตัวอย่างประมาณ 0.5 - 1 มิลลิลิตร

(6) ฉีดสารที่ได้ในข้อ 3.2.1.3 (5) ใน HPLC เพื่อสังเกตพื้นที่ใต้พีกและความสูงของพีกที่รีเทนชันไทม์เดียวกับสารมาตรฐานอาร์บูตินว่าเพิ่มขึ้นสูงหรือไม่

<u>การวิเคราะห์เชิงปริมาณ</u>

(1) ปิเปตสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินในข้อการ 3.2.1.3 วิเคราะห์เชิงคุณภาพ (3) มา 1, 2, 4, 6, 8, 10 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล จะได้ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80, 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

(2) จากนั้นก็กรองสารมาตรฐานด้วยชุดกรองสารมาตรฐานด้วยกระดาษกรองไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บใส่ขวดเก็บสารที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอล์ย

(3) นำสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินแต่ละความเข้มข้น และสารตัวอย่างที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.1.3 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (2) มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (อย่างน้อย 3 ซ้ำ) เพื่อหาปริมาณพื้นที่ใต้พีกและรีเทนชันไทม์นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีก

3.2.2 การวิเคราะห์สารอาร์บูตินจากใบเม่าแก่

3.2.2.1 การเตรียมสารตัวอย่างสกัดหยาบ

(1) นำใบเม่าแก่ ที่อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ แล้วบดด้วยเครื่องบดให้ละเอียดมาประมาณ 1,000 กรัม (โดยชั่งน้ำหนักที่แน่นอน) แช่ด้วยเมทานอล 2,500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน กรองเพื่อแยกส่วนสกัดหยาบเมทานอลและกากออกจากกัน

(2) นำส่วนสกัดหยาบเมทานอลที่ได้มาระเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนจะได้สารสกัดหยาบ ชั่งน้ำหนักและบันทึกผลที่ได้และนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์การต่อต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.2.2.2 การสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction)

(1) นำสารสกัดหยาบใบเม่าแก่ จากข้อ 3.2.2.1 ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร(ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน) นำมาละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงเป็นเวลา 30 นาที

(2) เตรียมเฟสของแข็ง C_{18}-Discovery ให้อิ่มตัวด้วยเมทานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตามด้วยน้ำ 3 มิลลิลิตรทิ้งสารละลายที่ชะ

(3) เทสารตัวอย่างที่ได้ใส่ในเฟสของแข็ง C_{18}-Discovery โดยปรับอัตราการไหลเป็น 3 มิลลิลิตร/นาที จนครบปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำสารตัวอย่างเทซ้ำจนครบ 10 ครั้งแล้วทิ้งสารละลายที่ชะ

(4)ชะสารปนเปื้อนด้วย เอทิลอะซิเตตปริมาตร 15 มิลลิลิตรแล้วทิ้งสาร ละลายที่ชะได้

(5) ชะสารที่ต้องการด้วยเฟสเคลื่อนที่สำหรับการชะที่อัตราส่วนเมทานอล : ไดคลอโรมีเทน 50:50(ร้อยละโดยปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออก แล้วเก็บใส่ขวดขนาดเล็กจะได้สารสกัดที่ได้จากเทคนิคการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (SPE) ชั่งน้ำหนักและบันทึกผลที่ได้และนำไปทำให้บริสุทธิ์อีกรอบด้วยเทคนิคพรีพาราทีฟทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

3.2.2.3สารสกัดด้วยเทคนิคพรีพาราทีฟทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

(1) เตรียมตัวทำละลายที่ใช้ไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอลในอัตราส่วน 50 : 50 โดยปริมาตร ใส่ลงในภาชนะแก้ว ปิดฝาด้วยแผ่นกระจกให้สารละลายภายในอิ่มตัว

(2) นำแผ่นโครมาโทแพลตที่เตรียมไว้ขนาด 20 x 20 เซนติเมตรจากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างที่ได้จากเทคนิคเฟสของแข็งจากข้อ 3.2.2.2 และสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินจำนวน 0.1 กรัม ละลายในเมทานอล1 มิลลิลิตร นำไปจุดลงบนแผ่นโครมาโทเพลต โดยจุด สารอาร์บูตินไว้ที่จุดแรก และจุดสารสกัดตัวอย่างต่อเนื่องไปเรื่อย ๆ จนสารสกัดตัวอย่างหมด ทิ้งไว้ให้แห้ง

(3) นำแผ่นโครมาโทเพลตที่ได้จุ่มลงในเฟสเคลื่อนที่ ที่เตรียมไว้ ให้เฟสเคลื่อนที่ขึ้นไปยังจุดสิ้นสุด แล้วนำออกมาผึ่งให้แห้ง

(4) แผ่นโครมาโทเพลตไปส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต จะเห็นเป็นจุดสีดำบนแผ่นโครมาโทเพลต วัดระยะทางการเคลื่อนที่และหาค่า R_f

(5)ขูดซิลิกาจากแผ่นโครมาโทเพลต เอาเฉพาะส่วนของสารสกัดที่มีค่าR_fเท่ากับสารมาตรฐานอาร์บูติน ละลายด้วยเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิคพรีพาเรทีฟทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (PTLC)เก็บสารที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในข้อ 3.2.2.4 และพิสูจน์เอกลักษณ์ในข้อ 3.2.3

3.2.2.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

<u>การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์</u>

(1)ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 0.44 กรัม และ ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 0.39 กรัม

(2)ละลายสารทั้งสองด้วยน้ำกลั่นแล้วเทผสมกันลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์(pH 6.8)

การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส

(1)ชั่ง เอนไซม์ไทโรซิเนส จำนวน 0.4 มิลลิกรัม

(2)ละลายด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (pH 6.8) ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลาย แอล-โดพา (L-DOPA)

(1)ชั่ง แอล-โดพา จำนวน 0.64 มิลลิกรัม

(2)ละลายด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (pH 6.8) ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

(1)ชั่งสารสกัดหยาบในข้อ 3.2.2.1 จำนวน 0.05 กรัม ละลายด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร

(2)เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัม/ลิตร จากสารละลายตัวอย่างเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร

(3) ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนสารตัวอย่างเป็นสารสกัดจากข้อ 3.2.2.3และสารมาตรฐานอาร์บูติน

การเตรียมสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

(1)ชั่งสารมาตรฐานอาร์บูติน จำนวน 0.05 กรัม ละลายด้วย เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารมาตรฐานอาร์บูตินที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร

(2)เตรียมสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินที่ความเข้มข้น 20 30 50 100 และ 150 มิลลิกรัม/ลิตรจากสารละลายมาตรฐานอาร์บูตินความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร

ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

(1) นำสารตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่างที่เตรียมตามความเข้มข้นต่าง ๆ มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เทียบกับสารละลายมาตรฐานอาร์บูติน ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงการเติมสารต่าง ๆ ในการเตรียมสารละลายตัวอย่าง

หลอด	สารที่เติม	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
A (Control)	-สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส -โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (pH 6.8) -เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20	400 800 400
B (Blank of control)	-โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02โมลาร์ (pH 6.8) -เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20	1,200 400
C (Test of sample)	-สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส -โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02 โมลาร์ (pH 6.8) -สารตัวอย่างหรือสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	400 800 400
D (Blank of sample)	-โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.02โมลาร์ (pH 6.8) -เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20	1,200 400

ที่มา : วิธีการดัดแปลงมาจากบุปผาชาติ พดด้วง และมณีรัตน์ มีพลอย, 2549, อาคม สอนสุทธิ์, 2549

(2) เขย่าสารละลายผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(3) เติมสารละลาย แอล-โดพา ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในทุกหลอดทดลอง เขย่าแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ทันที

(4) บ่มสารผสมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 2 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรและคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดังสมการที่ (3.1)และ (3.2)

$$\text{ค่าการดูดกลืนแสง} = (A_2 - A_0) \qquad (3.1)$$

$$\text{ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100 \qquad (3.2)$$

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรก่อนการบ่ม

A_2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตรหลังการบ่ม 2 นาที

A คือ ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ก่อนการบ่มและหลังการบ่ม 2 นาที ของ Control (A_2-A_0)

B คือ ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ก่อนการบ่มและหลังการบ่ม 2 นาที ของ Blank of control (A_2-A_0)

C คือ ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ก่อนการบ่มและหลังการบ่ม 2 นาที ของ Test of sample (A_2-A_0)

D คือ ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ก่อนการบ่มและหลังการบ่ม 2 นาที ของ Blank of sample(A_2-A_0)

3.2.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารสกัดอาร์บูตินจากใบเม่าแก่

3.2.3.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง(High Performance Liquid Chromatography : HPLC)

<u>การเตรียมสารมาตรฐานอาร์บูติน</u>

(1) ชั่งสารมาตรฐานอาร์บูติน 0.1 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วละลายด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร เทลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 50มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล จะได้สารมาตรฐานอาร์บูตินที่มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร

(2) ปิเปตต์สารมาตรฐานอาร์บูติน1 3 5 7 และ 10 มิลลิลิตรลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล จะได้ความเข้มข้น 100 300 500 700 และ 1000 มิลลิกรัม/ลิตรตามลำดับ

(3) กรองสารมาตรฐานด้วยชุดกรองสารมาตรฐานด้วยกระดาษกรองไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และเก็บใส่ขวดเก็บสารที่หุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียม และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอาร์บูติน

<u>การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของสารตัวอย่าง</u>

(1) วิเคราะห์สารตัวอย่าง โดยฉีดสารตัวอย่าง และเปรียบเทียบค่ารีเทนชันไทม์กับสารมาตรฐานอาร์บูติน

(2) พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการเติมสารมาตรฐานอาร์บูตินลงไปในสาร

ตัวอย่างเพื่อลด matrix effect ในสารตัวอย่าง

<u>การวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารตัวอย่างด้วยวิธีStandard addition</u>

(1) ปิเปตต์สารมาตรฐานอาร์บูตินที่เตรียมไว้ จำนวน 0.5 มิลลิลิตร และเติมสารตัวอย่าง ลงไปปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในขวดเก็บสารขนาดเล็กสำหรับการวิเคราะห์

<u>ตั้งสภาวะเครื่อง HPLC เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ใช้</u>

คอลัมน์ VertiSep™pHendure C_{18} 4.6 × 150 มิลลิเมตร5 ไมโครเมตร

ดีเทคเตอร์ Diode Array Detector; SPD-M10A

อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล 1.00 มิลลิลิตร/นาที

ความดัน 120-150 บาร์

ความยาวคลื่น 272 นาโนเมตร

เฟสเคลื่อนที่อะซิโตไนไตรล์: 0.05 โมลาร์แอมโมเนียมอะซีเตต90:10 (ร้อยละโดยปริมาตร)

(2) ทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้นมาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะ ตามสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ เพื่อหาปริมาณพื้นที่ใต้พีกและรีเทนชันไทม์นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีก

3.2.3.2 การวิเคราะห์สารสกัดอาร์บูตินด้วยเทคนิคแมสโครมาโทกราฟี

นำสารตัวอย่างสกัดจากใบเม่าแก่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง

1. Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) และ Time of Flight (TOF) mass spectrometer (MALDI-TOF MS)โดยใช้ dithranolเป็น matrix
2. Electrospray Ionization mass spectrometer (ESI- MS)