

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ภูมิหลังและความสำคัญ

สารออกฤทธิ์ต่อต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสหรือสารที่มักใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางกลุ่มเพื่อทำให้ผิวขาวกระจ่างใส หรือกลุ่มไวท์เทนนิ่ง ได้แพร่หลายเป็นอย่างมาก สารออกฤทธิ์สำคัญที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ป้องกันฝ้าและไวท์เทนนิ่ง คือ สารที่ทำให้สีผิวจางลง (bleaching agents) เช่น อาร์บูติน (arbutin) และกลาบรีดิน (glabridin) วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก (vitamin C or ascorbic acid) และกรดโคจิก (kojic acid) เป็นต้น ในงานวิจัยที่มีการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูงจึงได้รับความนิยมมากขึ้น เพื่อทำการวิเคราะห์วิเคราะห์สารออกฤทธิ์ต่อต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสกลุ่มนี้ทั้งในด้านเชิงคุณภาพวิเคราะห์และปริมาณวิเคราะห์

เอนไซม์ เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) (EC 1.14.18.1) เป็นเอนไซม์ประเภทออกซิจีเนส ซึ่งเป็นตัวการในการเกิดการสร้างสารเมลานินบนผิวหนัง และทำให้เกิดรอยคล้ำบนใบหน้านั่นเอง สารออกฤทธิ์เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสนี้จะหาได้ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติซึ่งมีอยู่หลายกลุ่ม เช่นกลุ่มโพลีฟีนอล ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และคูมาริน เป็นต้น ในการสกัดสารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติแต่ละชนิดจะต้องคัดเลือกกลุ่มสารเพื่อเลือกตัวทำลายที่เหมาะสมในการสกัด มีความยุ่งยากหลายขั้นตอน รวมไปถึงจะต้องมีการทดสอบกลุ่มสารแต่ละชนิดด้วยวิธีทดสอบที่แตกต่างกันทางด้านเคมี

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงต้องการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารเพื่อกลุ่มยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติด้วยกระบวนการทางโครมาโทกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง (HPLC) ในครั้งเดียวกัน โดยจะมีประโยชน์ในการลดเวลาของการวิเคราะห์แบบที่ต้องการวิธีการเฉพาะหลายขั้นตอน และยังคงลดความยุ่งยากในการวิเคราะห์อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนากระบวนการวิเคราะห์เชิงโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงเพื่อการวิเคราะห์สารกลุ่มยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พร้อมกันหลายชนิด
2. นำวิธีการที่พัฒนาแล้วสามารถใช้ในการวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ต่อต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง
2. สามารถประยุกต์องค์ความรู้ที่ได้รับไปใช้ในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ต่อต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ผสมกันด้วยวิธีการโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูงได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. ในการวิจัยจะหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ต่อต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสแต่ละชนิด
2. สารออกฤทธิ์ต่อต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดำเนินการวิเคราะห์ได้แก่ วิตามินซี อาร์บูติน และกรดโคจิก

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1. โครมาโตกราฟี (Chromatography) หมายถึง เทคนิคในการแยกสารและทำสารให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยความแตกต่างในการกระจายตัวของสารระหว่างวัฏภาค 2 ชนิด ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน คือ วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase)
2. โครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC) หมายถึง เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์และแยกสารเคมีเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ
3. เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase Enzyme) คือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสีผิวคล้ำเมื่อผิวหนังได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต

4. คอลัมน์ (Column) หมายถึง ส่วนที่บรรจุอนุภาคของของแข็งขนาดเล็กๆที่มีพรุนผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 150 ไมครอนในหลอดยาวเล็ก ๆ ของแข็งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ส่วนใหญ่จะเป็นซิลิกาเจล และได้มีการพัฒนาลักษณะของแข็งซิลิกาเจลให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น มีชนิดของคอลัมน์ที่หลากหลาย สามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ คอลัมน์ทำหน้าที่แยกสารผสมในระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) หรือเรียกว่าทำหน้าที่เป็นเฟสคงที่

5. เฟสเคลื่อนที่ (Mobile Phase) หมายถึง ตัวทำละลายที่ใช้พาสารที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ผ่านไปยังคอลัมน์ในระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งจะมีคุณสมบัติความมีขั้วทางเคมีที่ตรงกันข้ามกับความมีขั้วของคอลัมน์หรือเฟสคงที่

6. เฟสอยู่กับที่ (Stationary Phase) หมายถึง อนุภาคของแข็งซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ทำหน้าที่เป็นตัวกลางสำหรับแยกสารในระบบโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

7. แคพาซิตีแฟกเตอร์หรือรีเทนชันแฟกเตอร์ (Capacity factor หรือ Retention factor) หมายถึง ค่าที่บอกตำแหน่งของพีคของสารที่ต้องการวิเคราะห์ว่าออกมาช้าหรือเร็ว ถ้าค่า k' มาก แสดงว่าสารออกมาช้า แต่ถ้าค่า k' ต่ำ แสดงว่าออกมาเร็ว

8. รีเทนชันไทม์ (Retention time (t_r)) หมายถึงระยะเวลาที่เฟสเคลื่อนที่ชะสารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ซึ่งเป็นเวลาที่พีคปรากฏอยู่บนโครมาโทแกรม (เวลาเริ่มฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์จนถึงเวลาที่ตำแหน่งจุดยอดของพีคบนโครมาโทแกรม

9. รีโซลูชัน (Resolution ; R_s) หมายถึง ค่าที่บอกให้ทราบว่าพีคของสารสองชนิดที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันได้ดีหรือไม่ (ระยะเวลาที่สารเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และความกว้างของพีคทั้งสอง) ถ้าค่า R_s สูงกว่า 1.5 แสดงว่าพีคทั้งสองแยกออกจากกันได้ดี

10. เซพาเรชันแฟกเตอร์ (Separation factor , α) หมายถึงค่าที่บอกถึงระยะห่างของพีคที่อยู่ติดกันว่าห่างจากกันมากหรือน้อย ถ้าระยะห่างมาก นั่นคือพีคทั้งสองต้องใช้เวลาในการแยกออกจากกันมากเช่นกัน แต่ถ้าน้อยเกินไปแสดงว่าพีคทั้งสองอาจออกมาในเวลาใกล้เคียงกันมากเกินไปและอาจถ้าค่า ของ α ควรมีค่ามากกว่า

11. ลิมิตออฟดีเทคชัน (Limit of Detection ; LOD) หมายถึง ค่าความเข้มข้นที่วัดสัญญาณได้เท่ากับสัญญาณของแบลด์ครวมกับ 3 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เกิดจากการวัดสัญญาณของแบลด์

12. ลิมิตออฟควอนติเตชัน (Limit of Quantitation ; LOQ) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายมาตรฐานที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน มีค่าเท่ากับ 10 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

13. พื้นที่ใต้พีค (Peak area) คือค่าบอกจำนวนพื้นที่ที่เกิดจากพีคของสารที่ถูกวิเคราะห์ สารที่ถูกวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นมากจะส่งผลให้พื้นที่ใต้พีคมากเช่นกัน