

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

สารเคมี

Acetic acid (Carlo, Italy), Acetone (Carlo, Italy), Ammonium hydroxide (Carlo, Italy), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic) (ABTS) (Wako, Japan), Bismuth nitrate (Carlo, Italy), Benzene (Carlo, Italy), Butanol (Carlo, Italy), Calcium hydrochloride (Carlo, Italy), Chloroform (Carlo, Italy), Diethyl ether (Carlo, Italy), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide 98% (MTT) (Sigma, USA), Dulbecco' Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, USA), Ethanol (Merck, Germany), Ethyl acetate (Merck, Germany), Fetal Bovine Serum (Gibco, USA), Folin-Ciocalteu reagent (Carlo, Italy), Formic acid (Merck, Germany), Gallic acid (Carlo, Italy), Ethyl acetate (Merck, Germany), Hexane (Merck, Germany), Hydrogen peroxide (Merck, Germany), L-DOPA 98% (Sigma, USA), L-tyrosine (Sigma, USA), Methanol (Merck, Germany), Melanin synthesis (Sigma, USA), Mushroom tyrosinase (Sigma, USA), Nitric acid (Carlo, Italy), Penicillin/streptomycin solution (Gibco, USA), Potassium hydroxide (Sigma, USA), Potassium iodide (Ajax, Australia), Sodium hydroxide (Merck, Germany), Sulfuric acid (Merck, Germany), 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) (Sigma, USA), Trolox (Sigma, USA), Trypan Blue Stain 0.4% (Gibco, USA), 0.25% Trypsin EDTA (Gibco, USA), Vitamin C (Fluka, Switzerland)

วัสดุและอุปกรณ์

Autoclave (Kokusan Enshinkimod H-88LL: Tomy Seiko co., LTD; Japan), Incubator CO₂ (Shellab Automatic CO₂ 23237C: Gibthai; USA), Laminar air flow (Holten Mod. HBB 2460: Scientific Promotion Co, LTD; USA), Microplate (Eliza Reader) (Biotek/ELX-808 IU; USA), Microscope (Nikon/Alphaphot 2: Iolledo; Switzerland), pH meter (Mettler: Iolledo; Switzerland), Refrigerated Centrifuge (Labofug 200 S Hettich / zentrifugen: Becthai; Germany), Rotary evaporator (Buchi, Switzerland), Spectrophotometer (Novaspec II: Pharmacia LKB Biochrom; England), Thin Layer Chromatography (TLC) plate (silica gel GF254) alumina sheet 20x20 cm (Merck, Germany), TLC tank, Vortex mixer (Thermolyne

USA: Scientific industries, INC BO HEMIA; USA), UV cabinet for inspecting chromatogram (Camag: Germany)

พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรที่นำมาทดสอบฤทธิ์ชีวภาพสำหรับกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเพื่อใช้สำหรับผม หงอกก่อนวัยจำนวน 5 ชนิด คือ อัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว รายละเอียดแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดพืชสมุนไพรทดสอบ

ที่	พืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่ใช้
1	อัญชัน	<i>Clitoria ternatea</i>	ใบ
2	ย่านาง	<i>Tiliacora triandra</i> (Colebr.) Diels	ใบ
3	บัวบก	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb	ใบ
4	หม่อน	<i>Morus alba</i> L.	ใบ
5	กวาวเครือขาว	<i>Pueraria candollei</i> Graham ex Benth. <i>Varmirifica</i> (Airy Shaw et Suvat.) Niyomdham.	หัวใต้ดิน

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงเมลานोไซท์ชนิด mouse melanoma cell lines ($B_{16}F_{10}$) ที่ได้จากหนู mice สายพันธุ์ C57BL6 เซลล์เพาะเลี้ยงได้จาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

การเพาะเลี้ยงเซลล์เมลานोไซท์ $B_{16}F_{10}$ ทำโดยเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco' Modified Eagle Medium (DMEM) ที่เติม 1% penicillin/streptomycin solution และ 10% FBS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 3 วัน

สัตว์ทดลอง

หนู mice พันธุ์ C3H/HeJ Jel เพศผู้และเพศเมีย อายุ 4 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 20-25 g จำนวน 40 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

การเลี้ยงสัตว์ทดลอง ทำโดยเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ให้อาหารสำเร็จรูปตามมาตรฐานของสำนัก

สัตว์ทดลอง และดื่มน้ำตลอดเวลา เปลี่ยนอาหารและน้ำดื่มทุก 2 วัน เปลี่ยนวัสดุรองนอนทุก 3 วัน สภาพที่ใช้ในการเลี้ยง คือ อุณหภูมิ $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 55-60% ระยะเวลาที่สัมผัสแสง คือ มีแสง 12 ชั่วโมง และปิดไฟ 12 ชั่วโมง (Mangal et al., 2011) โดยการวิจัยในสัตว์ทดลองได้รับอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี (Ethics committee) เลขที่ 09/ 2550/ Research

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดพืชสมุนไพร

สกัดพืชสมุนไพรให้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ด้วยตัวทำละลายน้ำ เมทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ดังนี้

- ชั่งผงพืชสมุนไพรแห้งที่บดละเอียดเต็มสารละลายเฮกเซนแล้วสกัดพืชสมุนไพรด้วยเครื่อง soxhlet apparatus เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- กรองสารสกัดหยาบ แล้วระเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส จนสารสกัดหยาบแห้ง บรรจุลงในขวดแก้ว
- บันทึกร้าน้ำหนักสารสกัดหยาบที่แห้งสนิทแล้ว เก็บในตู้เย็น
- สกัดกากผงพืชสมุนไพรต่อด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตทด้วยวิธีเดียวกับการสกัดด้วย

สารละลายเฮกเซน

- สกัดกากผงพืชสมุนไพรต่อด้วยสารละลายเมทานอลด้วยวิธีเดียวกับการสกัดด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตท
- สกัดกากผงพืชสมุนไพรต่อด้วยน้ำกลั่น แต่เมื่อระเหยแห้งไปจนสารสกัดด้วยน้ำไม่สามารถระเหยได้ ให้ใช้วิธีการระเหยแห้งด้วยเครื่อง Freeze dry เป็นเวลา 2 วันเก็บสารสกัดหยาบพืชสมุนไพรทุกชนิดไว้ในตู้เย็น

หมายเหตุ ผลการสกัดสมุนไพรอยู่ในโครงการวิจัยที่ 1 เรื่อง การสกัด แยกบริสุทธิ์ และศึกษาความคงตัวของเคมีของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยเพื่อใช้สำหรับผสมหมอก ภายใต้แผนงานวิจัย เรื่อง การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้เวชสำอางจากสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยที่กักเก็บในอนุภาคนาโน เพื่อใช้สำหรับผสมหมอก

2. การทดสอบฤทธิ์ชีวภาพของสารสกัดสมุนไพร

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity)

2.1.1 DPPH assay (DPPH radical scavenging assay)

วิธีทดสอบดัดแปลงจาก Kriengsak et al (2006) โดยอาศัยหลักความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH ทำโดย

- เตรียมสารละลายของ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) solution ที่ความเข้มข้น 100 μM ในสารละลายเมทานอล เก็บในที่ปราศจากแสง
- เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 5 - 100 $\mu\text{g/ml}$ ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด โดยใช้ DMSO ช่วยในการละลาย
- นำสารละลาย DPPH ปริมาตร 1600 μl และสารสกัดแต่ละตัวอย่างปริมาตร 400 μl ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่ปราศจากแสงเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำโดยใช้ vitamin C และ Trolox ความเข้มข้น 0.25 – 4 $\mu\text{g/ml}$ เป็นสารมาตรฐาน คำนวณค่า % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

เมื่อ Absorbance of control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม

Absorbance of sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน

- แสดงผลเป็นค่า Effective Concentration (EC_{50}) หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50% โดยคำนวณจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับ % inhibition

2.1.2 ABTS assay (ABTS radical scavenging assay)

วิธีทดสอบดัดแปลงจาก Roberta et al (1999) โดยอาศัยหลักการคล้ายกับวิธี DPPH assay คือ สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี จะสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ได้ทำโดย

- เตรียมสารละลาย ABTS solution (ผสม 7 mM ABTS กับ 2.45 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (dipotassium peroxodisulphate) แล้วเจือจางด้วยน้ำ ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7-0.9 โดยใช้อัตราส่วนของ ABTS ต่อ น้ำ เท่ากับ 1:4.2 ml นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm

- เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/ml ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด โดยใช้ DMSO ช่วยในการละลาย
- ผสมสารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้ว 2 ml กับสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 20 μ l และตัวทำละลายแต่ละชนิดปริมาตร 100 μ l ให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมี vitamin C และ Trolox เป็นสารมาตรฐาน
- แสดงผลเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และค่า Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VEAC) ที่คำนวณจากกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร (mM) กับค่า Absorbance ของ vitamin C และ Trolox ในหน่วย mM ของ vitamin C equivalents/ Trolox equivalents ต่อสารสกัดตัวอย่าง 1 mg

2.1.3 FRAP assay (Ferric reducing antioxidant power)

วิธีทดสอบดัดแปลงจาก Ronald et al. (2005) โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ของสาร หากเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดี จะเห็นเป็นสีม่วงอมน้ำเงิน ทำโดย

- เตรียม FRAP reagent จาก 300 mM acetate buffer (pH 3.6) ปริมาตร 50 μ l ผสมกับ 20 mM ferric chloride solution ปริมาตร 5 ml และ 10 mM TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine)solution ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บในที่ปราศจากแสง
- เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด โดยใช้ DMSO ช่วยในการละลาย
- ผสมสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 60 μ l กับ FRAP reagent ปริมาตร 1800 μ l และน้ำกลั่น ปริมาตร 180 μ l ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ferrous sulfate
- แสดงผลเป็นค่า Relative antioxidant activity (FRAP value) ซึ่งคำนวณจากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Absorbance ของ FeSO_4 และความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่าง (μ g/ml)

2.2 การหาปริมาณ Total phenolic compound

วิธีทดสอบดัดแปลงจาก Onanong et al (2011) โดยหาปริมาณ Total phenolic compound ด้วยวิธี Folin-ciocalteu ดังนี้

- เตรียมสารละลาย 2N Folin-ciocalteu reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1
- เตรียม 20% sodium carbonate (Na_2CO_3) ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

- เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/ml ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด โดยใช้ DMSO ช่วยในการละลาย
- เตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น เท่ากับ 2, 4, 6, 8 และ 10 µg/ml
- ผสมสารสกัดตัวอย่างปริมาตรหรือ สารมาตรฐาน ปริมาตร 30 µl กับน้ำกลั่นปริมาตร 470 µl แล้วผสมกับ Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 250 µl และ Na₂CO₃ ปริมาตร 1250µl ตั้งทิ้งไว้ในที่ปราศจากแสงเป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm
- ปริมาณ Total phenolic compound แสดงค่าในหน่วยของ µg GAE /mg dry mass ที่ได้จากรูปมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ Gallic acid และค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดสมุนไพร

2.3 การทดสอบฤทธิ์ป้องกันเซลล์เมลานोไซต์จากสารอนุมูลอิสระชนิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂)(Protective activity of melanocyte from free radical of hydrogen peroxide)

2.3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอนุมูลอิสระ

คัดเลือกความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ที่ทำให้เซลล์ลดจำนวนลง 50% ด้วยวิธี MTT assay (ดัดแปลงจาก Petra et al., 2006) ทำโดย

- เพาะเลี้ยงเซลล์ B₁₆F₁₀ ใน 96 well plate ให้ความหนาแน่นเท่ากับ 1.5×10^3 cells/well บ่มในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับภาชนะ
- เติม H₂O₂ ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 3×10^{-3} , 2×10^{-3} , 1×10^{-3} , 0.5×10^{-3} และ 0.25×10^{-3} M บ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5%
- เติม MTT ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml หลุมละ 50 µl บ่มต่อเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดู supernatant ทั้ง ละลาย formazan crystal ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO ปริมาตร 100 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm

2.3.2 การทดสอบฤทธิ์ป้องกันเซลล์เมลานอไซต์จากสารอนุมูลอิสระ

วิธีทดสอบฤทธิ์ป้องกันเซลล์เมลานอไซต์จากสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ด้วยวิธี MTT assay ดัดแปลงจาก Celia et al. (2001) ดังนี้

- เพาะเลี้ยงเซลล์ B₁₆F₁₀ ใน 96 well plate ให้ความหนาแน่นเท่ากับ 1.5×10^3 cells/well บ่มในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับภาชนะ
- เจือจางสารสกัดตัวอย่างด้วย Completed Medium DMEM (DMEM, 10% FBS และ 1% penicillin/streptomycin solution) แบบ 2-fold dilution ให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 0.75 µg/ml
- เติมสารสกัดตัวอย่างลงใน plate หลุมละ 100 µl แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- เติม H₂O₂ (ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.3.2) หลุมละ 100 µl บ่มต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- เติม MTT ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml หลุมละ 50 µl บ่มต่อเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 2,500 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูด supernatant ทิ้ง ละลาย formazan crystal ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO ปริมาตร 100 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm

2.4 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลานोไซต์ (melanocyte proliferation activity)

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลานอไซต์ (melanocyte proliferation) ด้วยวิธี MTT assay ดัดแปลงจาก Gi et al., 2001; Itoh and Furuichi (2005) ทำโดย

- เพาะเลี้ยงเซลล์ B₁₆F₁₀ ใน 96 well plate ให้ความหนาแน่นเท่ากับ 1.5×10^3 cells/well บ่มในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับภาชนะ
- เจือจางสารสกัดตัวอย่างด้วย Completed medium DMEM (DMEM, 10% FBS และ 1% penicillin/streptomycin solution) แบบ 2-fold dilution ให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 0.75 µg/ml
- เติมสารสกัดตัวอย่างลงใน plate หลุมละ 100 µl แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้งโดยใช้ theophylline (Th) ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นสารมาตรฐาน บ่มเซลล์และสารสกัดตัวอย่าง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
- เติม MTT ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml หลุมละ 50 µl บ่มต่อเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 2500 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูด

supernatant ที่ละลาย formazan crystal ที่เกิดขึ้นด้วย DMSO ปริมาตร 100 μ l วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm แสดงผลเป็นค่า Proliferation Index (P.I.) ที่คำนวณได้จากสมการ

$$\text{Proliferation index (P.I.)} = \frac{\text{mean absorbance of sample}}{\text{mean absorbance of control}}$$

เมื่อ mean absorbance of sample คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน และ mean absorbance of control คือ ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีสารสกัด หรือสารมาตรฐาน

2.5 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase stimulating activity)

2.5.1 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง ด้วยวิธี tyrosinase activity assay ดัดแปลงจาก Ji et al. (2010) ทำโดย

- เตรียม 2 mM L-tyrosine ใน phosphate buffer solution (PBS) pH 6.8
- เตรียมเอนไซม์ mushroom tyrosinase ให้มีความเข้มข้น 100 unit/ml ใน PBS pH 6.8
- ละลายสารสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ แล้วเจือจางด้วย PBS pH 6.8 ให้มีความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 และ 0.75mg/ml ส่วน vitamin C และ Trolox เจือจางให้มีความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156 และ 0.078 mg/ml
- เตรียมสารละลาย A, B และ C โดยเติมสารสกัดตัวอย่าง สารละลาย L-tyrosine เอนไซม์ mushroom tyrosinase และ PBS ตามชนิดและปริมาณที่กำหนดในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารละลาย A, B และ C

A			B			C		
Sample	70	μl	PBS	70	μl	Sample	70	μl
Enzyme	30	μl	Enzyme	30	μl	PBS	30	μl
L-tyrosine	110	μl	L-tyrosine	110	μl	L-tyrosine	110	μl

- เติมสารละลาย A, B และ C ลงในแต่ละหลุมของ 96 – well plate (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) เขย่าให้สารละลายเข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร คำนวณหาค่า stimulation index จากสมการ

$$\text{Stimulation index (SI)} = \frac{\text{Absorbance of A} - \text{Absorbance of C}}{\text{Absorbance of B}}$$

เมื่อ Absorbance of A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่เติมสารสกัดตัวอย่าง tyrosinase และ tyrosine

Absorbance of B คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่เติม tyrosinase กับ tyrosine

Absorbance of C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่เติมสารสกัดตัวอย่าง และ tyrosine

2.5.2 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์เพาะเลี้ยง

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยวิธี DOPA oxidase activity assay ดัดแปลงจาก Ji et al.(2010), Matsuda et al.(2006) และ Jeon et al. (2007) ทำโดย

- เพาะเลี้ยงเซลล์ B₁₆F₁₀ ใน 6 - well plate ให้มีความหนาแน่นเท่ากับ 5×10^6 cells/well บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะติดกับภาชนะ

- เจือจางสารสกัดตัวอย่างด้วย Completed medium DMEM (DMEM, 10% FBS และ 1% penicillin/streptomycin solution) แบบ 2-fold dilution ให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 0.75 µg/ml

- เติมสารสกัดตัวอย่างลงใน plate หลุมละ 100 µl แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ โดยใช้ theophylline (Th) ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นสารมาตรฐานบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างด้วย cool PBS (pH 6.8) 2 ครั้ง และทำการ trypsinization ด้วยการเติม trypsin EDTA เพื่อให้เซลล์หลุดจากการยึดเกาะบนภาชนะ เติม cool PBS (pH 6.8) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- ดูด supernatant ออก ล้างด้วย cool PBS (pH 6.8) และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บเซลล์สำหรับการทดลองที่ 2.6.1 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเมลานิน

- นำส่วน supernatant เติมนลงใน 96-well plate หลุมละ 50 µl

- เติม 0.15 % L-DOPA ปริมาตรหลุมละ 100 µl บ่มสารทดสอบที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm

2.6 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานิน (melanin synthesis stimulating activity)

2.6.1 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินในเซลล์เพาะเลี้ยง

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยวัดปริมาณเมลานิน (melanin content) ด้วยวิธี melanin content measurement assay ดัดแปลงจาก Ji et al.(2010), Matsuda et al.(2006), Jeon et al.(2007), Ohguchi et al.(2006), Yang et al.(2006) ทำโดย

ละลายตะกอนเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานินไซท์ที่ได้จากการทดลองที่ 2.5.2 ด้วย 2N NaOH ปริมาตร 2 ml โดยใช้ melanin synthesis เป็นสารมาตรฐาน

- ปั่นเซลล์ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 409 nm

2.6.2 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินในสัตว์ทดลอง

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเมลานินในสัตว์ทดลองโดยวัดปริมาณเมลานิน (melanin content) ในขนของสัตว์ทดลองที่ให้สารสกัดสมุนไพร ด้วยวิธี melanin content measurement assay ทำโดย

- คัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ชีวภาพที่ดีที่สุด จำนวน 7 ชนิดจากการทดสอบที่ 2.1-2.6 ทั้งฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ป้องกันเซลล์เมลานินไซท์จากสารอนุมูลอิสระชนิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลานินไซท์ และฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อทดสอบในสัตว์ทดลอง

- แบ่งกลุ่มหนู mice สายพันธุ์ C3H/HeJ Jel เป็น 8 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ดมสลบหนูด้วย ketamine โคนขนบริเวณหลัง และหน้าท้อง ให้มีขนาดพื้นที่ 2x2 cm

- ป้อนสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้น 100 mg/ml ปริมาตร 0.2 cc ทางปากทุกวันในเวลาเดียวกันอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ดังนี้

กลุ่มที่ 1 –กลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 –ได้รับสารสกัดด้วยน้ำของใบบัวบก

กลุ่มที่ 3 –ได้รับสารสกัดด้วยเมธานอลของใบบัวบก

กลุ่มที่ 4 –ได้รับสารสกัดด้วยน้ำของย่านาง

กลุ่มที่ 5 –ได้รับสารสกัดด้วยเมธานอลของย่านาง

กลุ่มที่ 6 –ได้รับสารสกัดด้วยน้ำของอัญชัน

กลุ่มที่ 7 –ได้รับสารสกัดด้วยเมธานอลของอัญชัน

กลุ่มที่ 8 –ได้รับสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตของอัญชัน

- สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีขนที่ขึ้นใหม่ทุกสัปดาห์ เมื่อครบเวลาให้โกนขนบริเวณหลัง และท้องแยกกัน
- นำขนน้ำหนัก 50 มิลลิกรัม มาละลายด้วย 1N NaOH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต้มใน water bath อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 nm
- คำนวณปริมาณ melanin content (ug/ml/mg mouse hair) จากกราฟมาตรฐานของสาร standard synthesis melanin แสดงผลเป็นค่า % increasement of melanin content เทียบกับกลุ่มควบคุม คำนวณจากสูตร

$$\% \text{ increasement} = \frac{\text{melanin content of sample} - \text{melanin content of control}}{\text{melanin content of control}} \times 100$$

3. การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening)

3.1 การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาเคมี (Chemical reaction)

เป็นการทดสอบเบื้องต้นโดยใช้ปฏิกิริยาเคมีเพื่อหาสารสำคัญในพืชจำนวน 6 ชนิด คือ anthraquinone, xanthone, tannin, carotenoid, flavones และ alkaloid ดังนี้

3.1.1 Anthraquinone

นำสารสกัดตัวอย่าง 0.05 กรัม ไปต้มกับ 0.5 N KOH ปริมาตร 0.5 ml เป็นเวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นเติม acetic acid 100 μ l นำสารสกัดที่ได้มาสกัดด้วย benzene ปริมาตร 1 ml แล้วนำชั้นของ benzene มาเติม 25% NH_4OH ปริมาตร 1 ml

การแปลผล : ชั้นของ 25% NH_4OH จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูถึงแดง

3.1.2 Xanthone

สกัดสารสกัดตัวอย่าง 0.05 กรัม ด้วยการเติมเมทานอล ปริมาตร 2 ml โดยการอุ่นในอ่างน้ำอุ่น เป็นเวลา 10 นาที นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แยกสารละลายส่วนใสออกมา เติม 5% KOH ปริมาตร 100 μ l

การแปลผล : เกิดตะกอนสีเหลือง

3.1.3 Tannin

สกัดสารสกัดตัวอย่าง 0.05 กรัม ด้วยการเติมเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 2 ml โดยการอุ่นในอ่างน้ำอุ่น เป็นเวลา 10 นาที นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แยกสารละลายส่วนใสออกมา เติม $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (sat.)

การแปลผล : เกิดตะกอนสีเหลืองเทา น้ำเงิน

3.1.4 Carotenoid

สกัดสารสกัดตัวอย่าง 0.05 กรัม ด้วย chloroform ปริมาตร 2 ml นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แยกสารละลายส่วนใสออกมา เติม sulfuric acid เข้มข้น ปริมาตร 100 µl

การแปลผล : สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน หรือสีเขียวอมน้ำเงิน

3.1.5 Flavone

สกัดสารสกัดตัวอย่าง 0.05 กรัม ด้วยเมทานอล ปริมาตร 2 ml โดยการช้อนในอ่างน้ำอุ่นเป็นเวลา 10 นาที นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แยกสารละลายส่วนใสออกมา ใส่หลอด Magnesium ลงไปในส่วนของสารสกัด แล้วเติม conc. HCl ปริมาตร 100 µl

การแปลผล : Flavone จะปรากฏเป็นสีเหลือง Flavonol จะปรากฏเป็นสีแดงจนถึงแดงเข้ม Flavanone จะปรากฏเป็นสีแดงเข้มไปจนถึงสีแดงอมม่วง Flavanonol จะปรากฏเป็นสีแดง

3.1.6 Alkaloid

สกัดสารสกัด 0.05 กรัม ด้วย 2N HCl ปริมาตร 2 ml โดยการช้อนในอ่างน้ำอุ่น เป็นเวลา 10 นาที นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge แยกสารละลายส่วนใสออกมา เติมสาร Dragendorff's reagent ปริมาตร 100 µl

การแปลผล : เกิดตะกอนสีส้ม

3.2 การทำ Thin Layer Chromatography fingerprint (TLC fingerprint)

การทำ TLC fingerprint เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบในการศึกษาครั้งต่อไป โดยเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1 g/ml ด้วยเมทานอล เขย่าเป็นเวลา 5-10 นาที กรองนำส่วนใสมาใช้ในการทำ TLC เตรียมสารละลาย Developing จาก toluene : ethyl acetate : acetone : formic acid อัตราส่วน 20 : 4 : 2 : 1 v/v และเตรียม spray reagent โดย reagent ที่ใช้ คือ 0.5% anisaldehyde in sulfuric acid reagent, 10% ethanolic KOH reagent, Kedde's reagent และ dragendorff's reagent นำสารสกัดที่ได้มา spot ลงแผ่น TLC plate ที่มีขนาด 10 x 10 cm ปริมาตร 5 µl นำแผ่น TLC plate ที่ spot แล้วใส่ใน tank ที่มี mobile phase อิมพัลส์ เมื่อ mobile phase ถึงระดับ solvent front แล้วนำแผ่นออกมาทำให้แห้ง พร้อมถ่ายภาพด้วยเครื่อง TLC plate video store densitometer ภายใต้แสง UV 366, UV 254 และแสงปกติ spray แผ่น TLC plate ด้วย reagent ชนิดต่างๆ นำไปอบที่อุณหภูมิ 100-110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที นำมาถ่ายภาพด้วยเครื่อง TLC plate video

store densitometer เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของแผ่น TLC ก่อนใช้ spray reagent และหลังการใช้ spray reagent ภายใต้แสง UV 366, UV 254 และแสงปกติ

4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

แสดงผลการทดลองในรูปแบบ mean $\pm$ standard deviation (S.D.) และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ Student *t* test ค่า p value ≤ 0.01 : p value ≤ 0.05 ถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ