บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่าง

สละพันธุ์สุมาลีและพันธุ์เนินวง จากพื้นที่ตำบลบางกะจะ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี

3.2 เครื่องมือ

1. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporation) (BÜCHI R-124)
2. เครื่องวัด pH (pH mater) (Hana Hi, 9321)
3. เครื่องชั่งสารทศนิยม 2 ตำแหน่ง (2-decimal balance) (precisa 1620 C)
4. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4-decimal balance) (Sartorius BP 210 S)
5. เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader) (Metertech, TA/WAN M965^{+}
6. เครื่องกรองสุญญากาศ (Vacuum Pump)
7. เครื่องยูวี (UV-Vis spectrophotometer) (Genesys 10 Series)
8. ไมโครปิเปต(micro pipette) (M965 Metertech, TA/WAN)
9. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) (MEMMERT)
10. เครื่องเขย่าสาร(Vortex Mixer) (SCIENCETIFIC INDUSTIES)
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centifuge)
12. เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส (Gel electrophoresis)
13. หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 20 W
14. เครื่องกวนสารพร้อมเตาให้ความร้อน (Hot plate and Magnatic Stirrer)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.3 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

1. บีกเกอร์(beaker)
2. กระบอกตวง (graduated cylinder)
3. แท่งแก้วคนสาร (stirrer)
4. ปิเปต(pipette)

5. หลอดหยดสาร (dropper)

6. ช้อนตักสาร (spatula)

7. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman NO.1)

8. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)

9. จาน 96 หลุม (96-well microplates)

10. หลอดทดลอง (test tube)

11. หลอดหยดสาร (dropper)

3.4 สารเคมี

1.โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(Sodium dihydrogen phosphate, Na_2HPO_4), Analytical reagent grade,La Jota, Spain

2. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Di-sodium hydrogen phosphate, NaH_2PO_4), Analytical reagent grade, Ajax chemical, Australia

3. เอนไซม์ไทโรซิเนส(Tyrosinasefrommushroom), Sigma alorich, China

4. สารแอลโดปา3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine(L-DOPA), Sigma alorich, China

5. กรดโคจิก (5-Hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyran-4-one, kojic acid),Millipore Corporation, USA

6. เอทานอล(Ethanol, C_2H_5OH), commercial grade, DENATURED

7.วิตามินซี (Ascorbic acid, $C_6H_8O_6$)ACS, Riedel-de Haen, China

8. 2, 2 ไดฟีนิล-1-ไพคริล-ไฮดาซิล(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) Sigma IIalorich, China

8. คลอโรฟอร์ม(trichloromethane, CH_3Cl), AR Grade, FISHER SCIENTIFIC

9. ปิโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether), Analytical reagent grade, Merck, USA

10. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4), AR Grade, Univar, Australia

11. กรดไฮโดรคลอริก(Hydrochloric acid, HCl), commercial grade, Zen point

12. โซเดียมคลอไรด์(SodiumChloride, NaCl), Analytical reagent grade, Univar, Australia

13. เฟอริกคลอไรด์(Ferric Chloride, $FeCl_3$), AR Grade, RIEDEL- DE HAEN, China

14. เจลาติน (Gelatin), Food additive, Mcgarrett, Thailand

15. คอปเปอร์ซัลเฟต(Copper sulfate, $CuSO_4$), AR Grade, Ajax chemical, Australia

16. แอมโมเนีย (Ammonia, NH_3), AR Grade,Ajax chemical, Australia
17. ลวดแมกนีเซียม (Magnesium ribbon)
18. Tris (hydroxymethyl) aminomethane บริษัท Pharmacia Biotech.
19. Hydrochloric acid บริษัทห้างหุ้นส่วนจำกัด เคมีกิจ, AR grade
20. Ammonium Sulfate, Ar grade
21. Bovine serum albumin standard บริษัท Himedia Technology
23. Sodium carbonate บริษัทห้างหุ้นส่วนจำกัด เคมีกิจ
24. Sodium hydroxide บริษัทห้างหุ้นส่วนจำกัด เคมีกิจ
25. Copper sulfate Hydrate บริษัทห้างหุ้นส่วนจำกัด เคมีกิจ
26. Sodium potassium tartrate บริษัท Ajax Finechem, Ar grade
27. Folin-ciocateau reagen บริษัท Fluka
28. Ethylene diamine tetraacetic acid บริษัท Ajax Chemicals, AR grade
29. Nitro blue Tetrazolium chloride บริษัท Alfa Aesar, Ar grade
30. Riboflavin, Ar grade
31. 30% Acrylamide/Bis-acrylamide บริษัท bio-rad laboratory
32. Bromophenol blue, Ar grade
33. Ammonium peroxydi-sulfate บริษัท Alfa Aesar
34. TEMED, Ar grade
35. Coomassie brinllient blue R-250, Ar grade
36. Bradford dye reagent บริษัท Alfa Aesar
37. Grycerine
38. Grycine บริษัท Ajax Finechem, Ar grade
39. Methanol บริษัทห้างหุ้นส่วนจำกัด เคมีกิจ
40. Acetic acide บริษัทห้างหุ้นส่วนจำกัด เคมีกิจ
41. Hydrogen peroxide, Ar grade
43. Potassium Cyanide, Ar grade
44. Molecular weight marker

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.5 การเตรียมสารสกัดเอทานอลและการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.5.1 การเตรียมสารสกัดเอทานอล

นำสละพันธุ์สุมาลีและพันธุ์เนินวงอย่างละ 2 กิโลกรัม มากำจัดหนามออกและแยกส่วนเปลือก เนื้อ และเมล็ดออกจากกัน นำทั้ง 3 ส่วนมาชั่งน้ำหนักและจดบันทึกน้ำหนัก นำส่วนเปลือกไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้ ส่วนของเมล็ดนำมาหั่นและปั่นให้ละเอียด ในส่วนของเนื้อผลสละนำมาบดให้ละเอียด ตัวอย่างทั้ง 6 ตัวอย่างที่เตรียมไว้ข้างต้น นำมาสกัดด้วยเอทานอล ร้อยละ 95 โดยปริมาตร 1 ลิตร ในโหลแก้วปิดสนิท หมักทิ้งไว้ 2-3 วัน กรองตัวอย่างด้วยผ้าขาวบางและกรองซ้ำอีกครั้งผ่านกระดาษกรอง what man เบอร์ 1 ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศลดความดันแล้วนำกากที่เหลือนำมาหมักต่อด้วยเอทานอลซ้ำอีกครั้ง นำสารสกัดเอทานอลที่ได้จากการกรองครั้งแรกและครั้งที่ 2 มารวมกันแล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จะได้เป็นสารสกัดหยาบทั้งหมด 6 ชนิด ชั่งน้ำหนักสารสกัดทั้ง 6 ชนิดและบันทึกน้ำหนัก และคำนวณหาร้อยละผลผลิต (% yield)

3.5.2 การทดสอบพฤกษเคมีเบื้องต้น

1) อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 2โดยปริมาตร 15 มิลลิลิตรนำไปอุ่น 2-3 นาที จากนั้นไปกรอง นำส่วนสารละลายมาทดสอบด้วยน้ำยาดราเจนดอร์ฟ(Dragendorff'sreagrnt) หากปรากฏตะกอนสีส้มแสดงว่าพบ อัลคาลอยด์

2) แทนนิน (Tanins) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตรอุ่น 15 นาที ถ้าขุ่นให้หยด สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร 4-5 หยด จากนั้นนำไปกรอง นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาทดสอบกับสารละลายเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตรหากปรากฏตะกอนสีขาวขุ่น แสดงว่าพบ แทนนิน

3) สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic Compounds) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตร อุ่น 15 นาที ถ้าขุ่นให้หยด สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ10 โดยมวลต่อปริมาตร4-5 หยดจากนั้นนำไปกรอง นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาทดสอบกับสารละลายเฟอริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร หากปรากฏสีเขียวปนดำหรือเขียวปนน้ำตาล แสดงว่าพบ สารประกอบฟีนอลิก

4) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50โดยปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ลวดแมกนีเซียมขิ้นเล็กๆ ลงไป 2-3 ชิ้น จากนั้นนำไปต้ม และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ถ้าได้สารละลายสีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบ ฟลาโวนอยด์

5) ซาโปนิน(Saponins) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัมเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด จากนั้นไปกรอง และนำสารละลายที่ได้จากการกรองมาเติมน้ำกลั้น 2-3 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง หากมีฟองเกิดขึ้น แสดงว่าพบ ซาโปนิน

6) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัมสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 2 ครั้ง (3-5 มิลลิลิตร) จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่า ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลาย แสดงว่าพบ เทอร์พีนอยด์

7) แอนทราควิโนน (Anthraquinones) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร5 มิลลิลิตรนำไปอุ่น 5 นาที กรองแล้วปล่อยให้สารลายเย็นที่อุณหภูมิห้อง สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 2-3 หยดสังเกตสีชมพูแดงที่เกิดขึ้น แสดงว่าพบ แอนทราควิโนน

8) คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac Glycosides) แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ส่วนตามโครงส้างพื้นฐานของ คาร์ดิแอกไกลโคไซด์คือส่วนสเตียรอยด์ (Steroids) และน้ำตาลดีออกซี (Deoxy-Sugar)

สเตียรอยด์ (Steroids) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัมสกัดสีออกด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตร2-3 ครั้ง ทดสอบ สเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann test) โดยการเติมกรดอะซิติก3 หยด และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น3 หยด หากปรากฏสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว แสดงว่าพบ สเตียรอยด์

น้ำตาลดีออกซี (Deoxy-Sugar) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดสีออกด้วย สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตร2-3 ครั้ง ทดสอบน้ำตาลดีออกซีด้วยการทดสอบ เคลเลอร์-คีเลียนี (Keller-Kiliani test) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะซิติก1 มิลลิลิตร สารละลายเฟอริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร1-2 หยด ผสมให้เข้ากัน เอียงหลอดทดลอง ค่อยๆ รินกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ลงไปตามผนังด้านในของหลอดทดลองให้เกิดการแยกชั้น หากปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลแดงตรงรอยต่อระหว่างสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบ น้ำตาลดีออกซี

9) อิริดอยด์ไกลโคไซด์ (IridoidGlycosides) ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม สกัดสีออกด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 โดยปริมาตร 2-3 ครั้ง เติมกรดอะซิติก 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 2 โดยมวลต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตรและเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร ถ้าสารละลายกลายเป็นสีน้ำตาลหรือสีน้ำเงิน แสดงว่าพบอิริดอยด์ไกลโคไซด์

3.5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี DPPH เทียบกับสารละลายมมาตรฐานวิตามินซี โดยเริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยแบ่งเป็นส่วน เปลือก เมล็ด และเนื้อ โดยชั่งสารสกัดหยาบของสละชนิดละ 0.040 กรัม ละลายด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นจะเป็นสารละลายเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตรซึ่งสารสกัดหยาบจากเปลือกสละทั้งสองพันธุ์เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.003125, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05มิลลิกรัม/มิลลิลิตรส่วนสารสกัดหยาบจากเมล็ดสละทั้งสองพันธุ์เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและสารสกัดหยาบจากเนื้อสละทั้งสองพันธุ์เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 2, 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำโดยชั่งสาร 0.001 กรัม ละลายด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปรับปริมาตรเป็น10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นจะเป็นสารละลายเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ให้ได้ความเข้มข้น 0.0003125, 0.000625, 0.00125, 0.0025, 0.005, 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายอยู่ใน Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) จากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมห้องโดยวางทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องยูวี (UV-Vis spectrophotometer) คำนวณหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ จากสูตรคำนวณดังนี้

ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ = [(A-B) – (C-D)] / (A-B) x 100

โดย A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH (control)

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล (blank of control)

C คือ ค่าการดูดกลืนของสารละลายตัวอย่างผสม DPPH (test sample)

D คือ ค่าการดูดกลืนของสารละลายตัวอย่าง (blank of sample)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

การหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50) ใช้โปรแกรม Excel สร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (แกน x) กับ ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (แกน y) คำนวณโดยแทนค่า y = 50 ลงในสมการกราฟเส้นตรง จะหาได้ค่า x จะเป็นค่า IC_{50}

3.5.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้วิธี dopachrome method เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) โดยเริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายตัวอย่างเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยแบ่งเป็นส่วนเปลือก เมล็ด และเนื้อ ชั่งสารสกัดหยาบของสละชนิดละ 0.020 กรัม ละลายด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรเขย่า 30 นาที เพื่อช่วยการละลาย ปรับปริมาตรเป็น10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นจะได้สารละลายเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรให้ได้ความเข้มข้น0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับการเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำโดยชั่งกรดโคจิก 0.010 กรัม ละลายด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตรเขย่า 30 นาที เพื่อช่วยการละลาย ปรับปริมาตรเป็น10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะเป็นสารละลายเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ20 โดยปริมาตร ให้ได้ความเข้มข้น 0.00125, 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส นำสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่างๆมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกโดยเติมลงในจาน 96 หลุมโดยมีรายละเอียดดังนี้ โดยเติมสารละลาย A, B, C และ D แยกกันลงใน 96-well microplates (ทำการทดลองซ้ำ3 ครั้ง) ดังนี้

A :ชุดควบคุม (control)

- สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส	50	ไมโครลิตร
-โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น0.02 โมลาร์ (pH 6.8)	150	ไมโครลิตร
-สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร	50	ไมโครลิตร

B :แบลงค์ของชุดควบคุม (blank of A)

- โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น0.02 โมลาร์ (pH 6.8)	150	ไมโครลิตร
-สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร	50	ไมโครลิตร

C :ชุดทดสอบ (test sample)

- สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส	50	ไมโครลิตร
- โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น0.02 โมลาร์ (pH 6.8)	150	ไมโครลิตร
- สารละลายตัวอย่างในสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร	50	ไมโครลิตร

D :แบลงค์ของชุดทดสอบ (blank of C)

- โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น0.02 โมลาร์ (pH 6.8)	150	ไมโครลิตร
- สารละลายตัวอย่างในสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร	50	ไมโครลิตร

จากนั้นเขย่าให้สารละลายผสมกันดี แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA (3.2 มิลลิโมลาร์) 50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากัน แล้ววัดการ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์(Microplate Reader) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 3นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่นเดิมc นำค่าที่วัดได้ไปคำนวนหาร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสตามสูตรดังนี้

ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส = [(A-B) – (C-D)] / (A-B) x 100

โดย A, B C และ D คือ ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ระหว่างค่าที่วัดได้ก่อนการบ่ม (A_0) และหลังบ่มแล้ว 3นาที (A_3) (A_3min – A_0 min) สำหรับการหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ร้อยละ 50) ใช้โปรแกรม Excel สร้างกราฟเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่าง (แกนx) กับ ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (แกนy) คำนวณโดยแทนค่า y = 50 ลงในสมการกราฟเส้นตรง จะหาได้ค่า x จะเป็นค่า IC_{50}

3.6 การเตรียมสารสกัดหยาบโปรตีนจากสละและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.6.1 การเตรียมสารสกัดหยาบโปรตีนจากสละ

นำตัวอย่างสละมาแยกส่วน เปลือก เนื้อ เมล็ด นำทั้ง 3 ส่วน มาหั่นให้ละเอียด นำมาชั่งน้ำหนักอย่างละ 500 กรัม ด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นรวมกับสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.4 เข้มข้น 0.02 M ด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด จากนั้นทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง กรองแยกกากด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายส่วนใส มาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 ℃ เป็นเวลา 15 นาที ส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงนำมาเติมแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อตกตะกอนโปรตีน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง จะได้ส่วนที่เป็นตะกอนโปรตีน นำสารสกัดหยาบโปรตีนมาไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์ บัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.4 เข้มข้น 0.02 M เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดโปรตีนหลังการไดอะไลซีสนำมาหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้วิธี Bradford assay โดยเริ่มต้นจากการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งสารโปรตีนโบวินซีรั่มอัลบูมิน(BSA) น้ำหนัก 0.0025 กรัมละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร แล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาสร้างกราฟมาตรฐานความเข้มข้นของโปรตีนโดยปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน เข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำมาอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง หลอดที่ความเข้มข้น 0 เป็น Blank ทำเพียงหลอดเดียว จากนั้นเติมสารละลาย Bradford dye reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง ผสมกันด้วยเครื่องเขย่าสาร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟ

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

มาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง โดยให้แกน X เป็นปริมาณของ BSA (ไมโครกรัม) และแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างทำโดยนำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Bradford dye reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม 2-3 วินาที วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาระดับความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของโปรตีนในเบื้องต้นของสารสกัดหยาบ ทำโดยเตรียมเจลสำหรับรันอิเล็กโตรโฟรีซีสตามตารางที่ 1 จากนั้นนำสารสกัดจากเมล็ดสละผสมกับ Sample buffer (0.3125 M Tris, 10% SDS , 50% glycerol, 0.05% bromphenol blue, 2-Mercaptoethanol) ไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการแยกวิเคราะห์ด้วยกระแสไฟฟ้าโดยตั้งกระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมป์ และ Running Buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนสีของโปรตีนวิ่งจนเหลือประมาณ 1 เซนติเมตร นำเจลย้อมด้วยสี Coomassie blue R-250

ตารางที่ 3.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับระบบที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ

สารเคมี	ปริมาณสารเคมีส่วนบนขนาด 12 %	ปริมาณสารเคมีส่วนบนขนาด 4.0 %
30% Acrylamide/Bis	4.0 mL	0.05 mL
10% SDS	0.1 mL	0.1 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 mL	-
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	-	2.5 mL
Water	3.35 mL	6.1 mL
TEMED	0.005 mL	0.01 mL
10% Ammonium persulfate	0.05 mL	0.05L

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.6.2 ตรวจสอบหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ซูปเปร์ออกไซม์ดิสมิวเทส (SOD) โดยใช้เครื่องเทคนิคการเกิดสีในหลอดทดลอง

นำตัวอย่างของแต่ละส่วนอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร และหลอดที่ไม่ผสมตัวอย่างให้เป็น Blank ทำเพียงหลอดเดียว ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 67 mMphostphat buffer (pH 7.8) ปริมาตร 2.75 มิลลิลิตร 0.01 M EDTAและ1.5 mM NBT ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที นำ 1.2 mM riboflavin ปริมาตร 0.05 mL ผสมกันด้วยเครื่องเขย่าสาร ทำซ้ำกัน 2 ชุด ชุดที่ 1 นำไปไว้ในที่มืด และชุดที่ 2 นำไปวางไว้ในที่มีแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์20 วัตต์ในกล่องที่ปิดมิดชิด เป็นเวลา 15 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร หาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 50% ของกิจกรรมการทำงานของ SOD จากสูตร

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

โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Control Blank

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Sample Blank

D คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Sample

การทดสอบเสถียรภาพทนความร้อน นำสารสกัดจากเมล็ดสละความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 80, 90, 100 องศาเซลเซียส ที่อุหภูมิห้อง ที่อุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส นำมาบ่มเป็นเวลา 30 นาที และตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง รวมทั้งหมด 6 หลอดทดลอง

3.6.3 ตรวจสอบหากิจกรรมการทำงานของ SOD โดยใช้วิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

ทำการเตรียมเจลสำหรับการรันอิเล็กโตรโฟรีซีสเริ่มต้นจากการปิเปตสารละลายส่วนล่างตามตารางที่ 2 โดยนำ 3% Acrylamide/Bis, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) และน้ำตามอัตราส่วนดังตารางลงในบีกเกอร์ นำมากวนด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กแล้วเติม TEMED และ10% Ammonium persulfats ลงไปกวน จากนั้นนำมาใส่ลงแผ่นกระจกซึ่งให้เหลือจากขอบบน 1 เซนติเมตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้เต็มแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เมื่อครบเวลาเทน้ำกลั่นออก แล้วปิเปตสารละลายส่วนบนตามตารางโดยนำ 3% Acrylamide/Bis, 1.5 M Tris-HCl (pH 6.8) และน้ำตามอัตราส่วนดังตารางลงในบีกเกอร์ นำมากวนด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กแล้วเติม TEMED และ10% Ammonium persulfatsลงไปกวนต่อประมาณ 30 วินาที จากนั้นนำมาใส่ในกระจกให้เต็ม แล้วทำการนำหวีมาปิด

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ไว้ ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงนำหวี แล้วทำการเก็บเจลเพื่อเก็บไว้ในการทดสอบ

ตารางที่ 3.2 การเตรียมสารเคมีสำหรับระบบที่ทำให้โปรตีนไม่เสียสภาพ

สารเคมี	ปริมาตรสารเคมีส่วนบนขนาด 12.5%	ปริมาตรสารเคมีส่วนบนขนาด 4.5%
30% Acrylamide/Bis	7.5 mL	0.9 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	4.5 mL	-
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	-	1.5 mL
Water	6 mL	3.6 mL
TEMED	0.01 mL	0.01 mL
10% Ammonium persulfats	0.08 mL	0.02 mL

จากนั้นนำสารตัวอย่าง 0.01 มิลลิลิตร ผสมกับมาร์คเกอร์เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นนำมาใส่ลงในแต่ช่องส่วนบนของเจลที่เตรียมไว้ ทำการแยกวิเคราะห์ด้วยกระแสไฟฟ้าโดยตั้งกระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมป์ และ Running Buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนสีของโปรตีนบอกขนาดวิ่งจนเหลือประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำมาย้อมสีเจลดังต่อไปนี้

1) สำหรับเจลที่ย้อมสี Coomassie Brinllient blue R-25 โดยนำเจลที่รันได้มาแช่ในสารละลาย เป็นเวลา 1 ชั่วโมงจากนั้นนำมาแช่ CBB Destaining Solution เป็นเวลาอีก 30 นาที

2) สำหรับเจลที่ย้อมกิจกรรมเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส โดยนำเจลที่รันมาแช่ riboflavin-NBT (5 mg riboflavin, 12.5 mg NBT) เป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด เมื่อครบเวลากำหนดเปลี่ยนเป็นร้อยล่ะ 0.1 TEMED เป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด จากนั้นนำไปวางไว้ในที่มีแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 20 W ในกล่องที่ปิดมิดชิดเป็นเวลาอีก 15 นาที เมื่อครบเวลาเจลใสจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงและมีแถบสีขาว

3) สำหรับเจลที่ย้อม Hydrogen peroxide โดยนำเจลที่รันมาแช่ 8 mM H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเปลี่ยนไปเป็น riboflavin-NBT (5 mg riboflavin, 12.5 mg NBT) เป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด เมื่อครบกำหนดเวลาเวลาเปลี่ยนเป็นร้อยล่ะ 0.1 TEMED เป็นเวลอีก 15 นาที ในที่มืด

จากนั้นนำไปวางไว้ในที่มีแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ 20 วัตต์ในกล่องที่ปิดมิดชิดเป็นเวลาอีก 15 นาที เมื่อครบเวลาเจลใสจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงและมีแถบสีขาว

4) สำหรับเจลที่ย้อม Potassium Cyanide โดยนำเจลที่รันมาแช่ (0.0026 g, riboflavin-NBT 5 mL) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเปลี่ยนไปเป็น riboflavin-NBT (5 mg riboflavin, 12.5 mg NBT) เป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด เมื่อครบกำหนดเวลาเปลี่ยนเป็นร้อยล่ะ 0.1 TEMED เป็นเวลา 15 นาที ในที่มืด จากนั้นนำไปวางไว้ในที่มีแสงจากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์20 วัตต์ในกล่องที่ปิดมิดชิดเป็นเวลาอีก 15 นาที เมื่อครบเวลาเจลใสจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงและมีแถบสีขาว

สำหรับการทดสอบเสถียรภาพทนความร้อนทดโดยนำสารสกัดตัวอย่างจากเมล็ดสละปริมาตร 15 ไมโครกรัม มาผสมกับมาร์คเกอร์นำไปต้มที่อุณหภูมิที่ 30 40 50 60 70 80 90 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำมาแช่ในอ่างน้ำเย็น แล้วทำการแยกวิเคราะห์ด้วยกระแสไฟฟ้าโดยตั้งกระแสไฟฟ้า 40มิลลิแอมป์ และRunning Buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนสีของโปรตีนวิ่งจนเหลือประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นย้อมสี Coomassiebrinllient blue R-250 และย้อมกิจกรรมเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี