

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์
ไทโรซิเนสโดยวิธีโดพาโครม

THE EFFECIENCY OF CRUDE EXTRACT FROM *Mangifera indica* L. SEED KERNEL
FOR INHIBIT TYROSINASE ACTIVITY BY DOPACHROME

¹⁾ สุพัตรา ฤกษ์สมโภชน์ ²⁾ ศศ.ดร.ศิริกานต์ ผาสุก ³⁾ ศศ. ดร.พิชญ์อร ไหมสุทธิสกุล

¹⁾ Suphattra Ruegsompoch ²⁾ Asst. Prof. Dr.Sirikarn Phasuk ³⁾ Asst. Prof. Dr.Pitchaon Maisuthisakul

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงไซคอนันต์ ศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงไซคอนันต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธีโดพาโครม ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงไซคอนันต์ และเพื่อจัดอบรมเชิงปฏิบัติการเผยแพร่ความรู้ให้กับผู้ที่สนใจ

ทำการทดลองสกัดสารจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงไซคอนันต์ โดยการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการใช้พืชสดและแห้งมาทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธีโดพาโครม การหาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยใช้วิธีสกัด 3 วิธี คือ การสกัดด้วยเอทานอล การรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล และการรีฟลักซ์ด้วย 1.2 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริกในเอทานอล แยกสารสกัดที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารฟีนอลิกสารแต่ละกลุ่มที่แยกได้ แล้วทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด 2 วิธี คือการทดสอบด้วยปฏิกิริยาทางเคมีและการทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

ผลการวิจัย พบว่า เนื้อในเมล็ดมะม่วงแบบสดที่ใช้วิธีการสกัดแบบการรีฟลักซ์ด้วย 1.2 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริกในเอทานอลให้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.26 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 67.43 มิลลิกรัมต่อลิตร กรดแกลลิก และเมื่อนำมาแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ พบว่า สารกลุ่มที่ 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีที่สุดมีค่า IC_{50} ลดลงเท่ากับ 0.10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นเท่ากับ 92.51 มิลลิกรัมต่อลิตรกรดแกลลิก

¹⁾ นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ในพระบรมราชูปถัมภ์

²⁾ อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์
ในพระบรมราชูปถัมภ์

³⁾ อาจารย์คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิชาระบบอุตสาหกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารกลุ่มออกฤทธิ์ ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี พบว่าเป็นสารกลุ่มแทนนิน และการตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบางพบว่า มีกรดแทนนิกเป็นส่วนประกอบ

การจัดโครงการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง สารช่วยให้ผิวขาวและการใช้สารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วง เป็นสารยับยั้งการสร้างเมลานินที่ผิวหนัง ให้กับนักศึกษาจำนวน 30 คน พบว่าการทดสอบวัดความรู้ก่อนและหลังการฝึกอบรมของนักศึกษามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 แสดงว่าการฝึกอบรมทำให้นักศึกษามีความรู้เกี่ยวกับสารช่วยให้ผิวขาวและการใช้สารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงเป็นสารยับยั้งการสร้างเมลานินที่ผิวหนังเพิ่มขึ้น และนักศึกษามีความพึงพอใจในการอบรมอยู่ในระดับมาก

ABSTRACT

The objective of the research is to study the appropriate preparation and extraction condition of crude extract from mango (*Mangifera indica* L.) seed kernel variety ‘Chok-anan’ by measuring tyrosinase inhibition activity and total phenolic content. The selected extract is fractioned to elucidate the chemical compositions which have potent tyrosinase inhibition activity. The research is included transferring to public using training course for students.

The preparation conditions of samples are fresh and dry seed kernel with 95% ethanol and water extraction. The selected condition is used to study further extractions as follows; (1) extraction by ethanol, (2) refluxing with ethanol and (3) refluxing with 1.2 M HCl in ethanol. The Tyrosinase inhibition activity by Dopachrome method and total phenolic content by Folin Ciocalteu’s phenol reagent are determined for evaluating the appropriate extraction condition. After that, the selecting condition is used to extract sample for applying in column chromatography. The Tyrosinase inhibition activity and total phenolic content are evaluated all fraction to select the appropriate fraction. The selected fraction is analyzed the chemical composition including saponin, flavonoids, tannin and anthraquinone by chemical reaction and elucidate the main active component by using thin layer chromatography

The result shows that fresh seed kernel extracting with 1.2 M HCl in ethanol has the appropriate condition to inhibit tyrosinase efficiency ($IC_{50} = 0.26$ mg/ml) and total phenolic content equaled to 67.43 mg of GAE/g of extract 0.2 mg. From column chromatography, we have found that fraction 3 shows the strongest tyrosinase inhibition ($IC_{50} = 0.10$ mg/ml) and fraction 4 shows the highest total phenolic content (92.51 mg of GAE/g of extract 0.2 mg). The active chemical compound of fraction 3 is tannin and the main active compound analyzed by thin layer chromatography is tannic acid. The training seminar is conducted with 30 participants. From the quiz test, the student get significantly higher marks ($p < 0.01$) after attending the seminar and from the questionnaires, they satisfied the seminar.

ความสำคัญของปัญหา

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นผลไม้ที่มีการเพาะปลูกมากที่สุดในประเทศไทย นอกจากจะใช้ในการบริโภคกันภายในประเทศทั้งในรูปผลสดและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ เช่น มะม่วงกระป๋อง มะม่วงกวน มะม่วงแผ่น มะม่วงดอง มะม่วงแช่อิ่ม ทั้งนี้การแปรรูปจะใช้เฉพาะส่วนเนื้อในมะม่วงเท่านั้น ส่วนที่เหลือเป็นของเสียของโรงงานคือเปลือกและเมล็ดของมะม่วงคิดเป็นร้อยละ 36 ของน้ำหนักมะม่วงสด

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เนื้อในเมล็ดมะม่วงมีสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Lupo, 2001; Auger et al., 2004) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโรซิน (tyrosine) ซึ่งเป็นเอมีนที่มีอยู่ตามผิวหนังมนุษย์ไปจนเป็นเม็ดสีเมลานิน (melanin) ทำให้ผิวหนังมีสีเข้มขึ้นหรือสีผิวคล้ำขึ้นนั่นเอง จึงได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาสารกลุ่มนี้มาใช้ในอาหาร และเครื่องสำอางเพื่อทดแทนสารสังเคราะห์ เนื่องจากมีความปลอดภัยในการอุปโภคและบริโภค

จากการค้นคว้าเอกสารรายงานวิจัยและสิทธิบัตร พบว่ายังไม่มีการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเนื้อในเมล็ดมะม่วง ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสกัดสารจากเนื้อในเมล็ดของมะม่วงเพื่อนำมาใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อพัฒนาไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางทดแทนการใช้สารสังเคราะห์เป็นการสนับสนุนการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเพื่อความปลอดภัย ลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศและยังเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกำจัดกากอุตสาหกรรม ทั้งยังสามารถนำไปเป็นวัตถุดิบเพิ่มศักยภาพและเพิ่มมูลค่าสินค้าให้กับมะม่วงอีกด้วย โดยคัดเลือกเมล็ดมะม่วงจากมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์เพราะมีปริมาณของสารฟีนอลิกอยู่สูงและมีการปลูกมาก และผลการวิจัยที่ได้จะนำไปจัดอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง สารช่วยให้ผิวขาวและการใช้สารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงเป็นสารยับยั้งการสร้างเมลานินที่ผิวหนัง ให้กับนักศึกษาเพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาขั้นสูงต่อไป

คำสำคัญ

สารฟีนอลิก เนื้อในเมล็ดมะม่วง เอนไซม์ไทโรซิเนส สารช่วยให้ผิวขาว โดพาโครม มะม่วงโชคอนันต์ เมลานิน IC₅₀

โจทย์วิจัย/ปัญหาวิจัย

วิธีการสกัดและแยกสารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงโชคอนันต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีมีวิธีการหรือแนวทางอย่างไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเนื้อในเมล็ดมะม่วง

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงโซคอนันต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธีโคพาโครม
3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงโซคอนันต์
4. เพื่อจัดอบรมเชิงปฏิบัติการเกี่ยวกับสารช่วยให้ผิวขาวและการใช้สารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วง เป็นสารยับยั้งการสร้างเมลานินที่ผิวหนัง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขั้นตอนการศึกษาข้อมูลพื้นฐาน โดยศึกษาข้อมูล เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปริมาณเนื้อในเมล็ดมะม่วงและปริมาณของสารฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเนื้อในเมล็ดมะม่วงชนิดต่าง ๆ พบว่าเนื้อในเมล็ดมะม่วงที่มีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุด คือ เนื้อในของเมล็ดมะม่วงแก้ว รองลงมาคือเนื้อในของมะม่วงโซคอนันต์ แต่เมื่อดูจากสภาพการบริโภคมะม่วงในปัจจุบันพบว่ามะม่วงแก้วมีปริมาณการบริโภคน้อยมาก ส่วนมะม่วงโซคอนันต์ได้รับความนิยมและการบริโภคมากจึงมีเมล็ดที่เหลือมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกเมล็ดมะม่วงโซคอนันต์เพื่อนำมาทำการทดลองศึกษา
2. ขั้นตอนการวางแผนการทดลอง โดยนำข้อมูลพื้นฐานต่าง ๆ ที่รวบรวมมาหาวิธีการสกัดวิธีการทำให้บริสุทธิ์ และวิธีการต่าง ๆ เพื่อหาโครโมโตกราฟเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิก รวมถึงวิธีการทำให้สารบริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์และโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลิก และการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงโดยวิธีโคพาโครมเทียบกับสารมาตรฐาน
3. ขั้นตอนการทดลองในห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์
 - 1) การเตรียมเนื้อในเมล็ดมะม่วงโซคอนันต์
 - 2) การหาปริมาณเนื้อในเมล็ดมะม่วงที่แยกออกจากเมล็ดมะม่วงโซคอนันต์
 - 3) การสกัดสารจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงเพื่อเลือกกระหว่างพืชสดหรือพืชแห้ง โดยการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด
 - 4) นำเนื้อในเมล็ดมะม่วงที่มีสารยับยั้งเอนไซม์มากที่สุดมาหาวิธีการสกัดเพื่อให้ได้สารที่มีสารยับยั้งเอนไซม์มากที่สุดจาก 3 วิธี โดยการวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด
 - 5) การหาระบบตัวทำละลาย
 - 6) การแยกสารให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์
 - 7) การหาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากกลุ่มสารที่แยกจากโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์
 - 8) การตรวจสอบกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีและโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง

4. ขั้นตอนการจัดโครงการอบรมเชิงปฏิบัติการ โดยดำเนินการเสนอและขออนุมัติโครงการ การจัดโครงการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง สารช่วยให้ผิวขาวและการใช้สารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงเป็นสารยับยั้งการสร้างเมลานินที่ผิวหนัง และได้ดำเนินการจัดอบรมให้กับนักศึกษาระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จำนวน 30 คน โดยได้ให้ผู้เข้ารับการอบรมทำแบบทดสอบวัดความรู้ก่อนและหลังการอบรม และแบบสอบถามความพึงพอใจในการเข้าอบรม

5. การประเมินผลการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ โดยนำผลการตอบแบบสอบถามความพึงพอใจ และแบบทดสอบก่อนและหลังการอบรมเชิงปฏิบัติการ ไปวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัย

1. การหาปริมาณเนื้อในเมล็ดมะม่วงที่แยกออกจากเมล็ดมะม่วงไซคอนันต์ พบว่าในเมล็ดมะม่วงจะมีเนื้อในเมล็ดประมาณร้อยละ 58.38 ที่เหลืออีกร้อยละ 41.62 เป็นส่วนของเปลือกที่ไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์ในการวิจัยนี้

2. การหาความชื้นจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงแห้งมีความชื้นร้อยละ 4.40 ส่วนจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงสดมีความชื้นอยู่ร้อยละ 28.80

3. การนำเนื้อในเมล็ดมะม่วงแบบแห้งและสด มาสกัดเปรียบเทียบกับระหว่างเอทานอลและน้ำ พบว่าได้สารสกัดออกมาทั้งหมด 7 ส่วนมาวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดพบว่า เนื้อเมล็ดมะม่วงสดที่สกัดจากเมทานอลส่วนที่เป็นของแข็งมีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยหา IC_{50} เท่ากับ 4.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 89.64 มิลลิกรัมต่อลิตรกรดแกลลิก ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสารสกัดหยาบ

เนื้อ เมล็ด	ตัวทำ ละลาย	ลักษณะของสารสกัด	ประสิทธิภาพการ ยับยั้งเอนไซม์(IC_{50})	ปริมาณสารฟีนอลิก ทั้งหมด (ppm)
สด	เอทานอล	1. ของแข็งสีเหลือง	4.27	89.64
		2. ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม	6.62	27.68
แห้ง	เอทานอล	3. ของแข็งสีเหลืองอ่อน	22.45	23.87
สด	น้ำ	4. ของแข็งเหนียวสีน้ำตาล	4.33	67.28
		5. ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม	13.31	3.32
แห้ง	น้ำ	6. ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม	7.63	44.63
		7. ของเหลวสีน้ำตาลเข้ม	6.85	8.20

4. การสกัดหาปริมาณสารจากเนื้อเมล็ดมะม่วงสด 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยเอทานอล การรีฟรักซ์ด้วยเอทานอล และการรีฟรักซ์ด้วย 1.2 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริกในเอทานอล พบว่า สารที่สกัดจากวิธีที่ 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ดีที่สุดที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 67.43 มิลลิกรัมต่อลิตรกรดแกลลิก และเมื่อนำวิธีนี้มาเปรียบเทียบระหว่างปรับและไม่ปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อนแยกตัวทำละลายออกมีค่าประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างกันน้อยมาก ผลการทดลองดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากการสกัดสารเปรียบเทียบทั้ง 3 วิธีเทียบกับสารมาตรฐาน

สารตัวอย่าง	ลักษณะของสาร	ประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์(IC_{50}) (mg/ ml)	ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (ppm)
กรดแอสลาจิก	ผงสีขาว	2.43	76.44
กรดเทนนิก	ผงสีเหลือง	8.07	102.89
สารสกัดวิธีที่ 1	ของแข็งสีเหลือง	1.54	59.52
สารสกัดวิธีที่ 2	ของแข็งสีเหลือง	1.97	60.91
สารสกัดวิธีที่ 3	ของแข็งสีดำ	0.26	67.43
	ของแข็งสีดำ	0.27	61.35

5. การทดลองแยกสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์จากเนื้อเมล็ดมะม่วง โดยนำสารสกัดจากเนื้อเมล็ดมะม่วงสดโดยการรีฟรักซ์ด้วย 1.2 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริกในเอทานอล 10 กรัม มาแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ เก็บสารได้ 59 ส่วนทำการรวมกลุ่มสารได้ 7 กลุ่ม จึงนำไปทดสอบหาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ผลการทดลองดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากสารที่แยกผ่านโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ทั้ง 7 กลุ่ม

สารกลุ่มที่	การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50}) (mg/ml)	ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (ppm)
1	-	-
2	2.68	34.32
3	0.10	92.51
4	0.32	126.25
5	0.19	93.99
6	0.15	56.30
7	0.57	34.26

จากตารางจะเห็นว่า สารกลุ่มที่ 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ ร้อยละ 50 (IC_{50}) ได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า สารกลุ่มที่ 4 มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด สูงที่สุดเท่ากับ 126.25 มิลลิกรัมต่อลิตรกรดแกลลิก ส่วนสารกลุ่มที่ 1 ไม่สามารถหาค่าได้จากการทดลองได้

6. การตรวจสอบกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ด้วยปฏิกิริยาทางเคมีในกลุ่มสาร 4 กลุ่มได้แก่ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และแอนทราควิโนนกลัยโคไซด์ พบว่าสารกลุ่มเป้าหมายเป็นสารกลุ่ม แทนนิน สำหรับการตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นบาง พิสูจน์ได้ว่า สารกลุ่มเป้าหมายมีกรดแทนนิกเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากสามารถวิเคราะห์สารเทียบกับสารมาตรฐานกรดแทนนิกแล้วได้ค่า Rf ตรงกันทั้ง 3 ระบบ

อภิปรายผล

1. เนื้อในเมล็ดมะม่วงสดมีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าเนื้อในเมล็ดมะม่วงแบบแห้ง อาจเนื่องจากความร้อนที่ใช้ในการอบแห้งเนื้อในเมล็ดมะม่วงที่ใช้อุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ถึงแม้จะใช้อุณหภูมิไม่สูงนักแต่อาจเนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์เป็นสารกลุ่มแทนนิน ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่สามารถถูกออกซิไดซ์เป็นสารอื่นได้ง่าย

2. การใช้ตัวทำละลายสกัดสารระหว่างเอทานอลและน้ำ พบว่า ที่สกัดจากเอทานอล มีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าที่สกัดจากการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย อีกทั้งการใช้น้ำสกัดใช้เวลากรองสารละลายด้วยชุดกรองสุญญากาศนานถึง 5 ชั่วโมง แต่การใช้เอทานอลใช้เวลาเพียง 5 นาที ดังนั้นการใช้น้ำสกัดจึงไม่เหมาะสมในการทดลองนี้

3. เมื่อนำเนื้อในเมล็ดมะม่วงสดมาหาวิธีสกัดเพื่อให้ได้สารที่มีฤทธิ์มากที่สุดโดยทำการสกัด 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยเอทานอล, การรีฟลักซ์ด้วยเอทานอล และการรีฟลักซ์ด้วย 1.2 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริกในเอทานอล พบว่า สารที่สกัดจากวิธีสุดท้าย สารสกัดหยาบที่ได้มีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ดีที่สุดที่ ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 67.43 มิลลิกรัมต่อลิตรกรดแกลลิก และเพื่อความมั่นใจว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ที่ดีนั้น ไม่ได้มาจากความเป็นกรดที่มาจากตัวทำละลาย จึงทำการเปรียบเทียบระหว่างปรับและไม่ปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ก่อนแยกตัวทำละลายออกพบว่ามีความแตกต่างของ IC_{50} เพียง 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างกันเพียง 0.07 มิลลิกรัมต่อลิตรกรดแกลลิก จึงสรุปได้ว่าวิธีการสกัดโดยการรีฟลักซ์ด้วย 1.2 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริกในเอทานอลสามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีที่สุดและการปรับค่าความเป็นกรดต่าง ไม่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์

4. การทดลองแยกสารกลุ่มที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์จากเนื้อในเมล็ดมะม่วงด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ด้วยระบบตัวทำละลาย คือ เฮกเซน: เมทิลีนคลอไรด์ เมทิลีนคลอไรด์: เอทิลอะซิเตท และ เมทานอล ตามลำดับ เก็บสารได้ 59 ส่วน ทำการรวมกลุ่มสารได้ 7 กลุ่ม และนำสารแต่ละกลุ่มที่แยกได้ไปทำการทดลอง ดังนี้

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่า สารกลุ่มที่ 3 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) ได้สูงที่สุด เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าเมื่อผ่านการแยกสารให้บริสุทธิ์ขึ้นทำให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ดีที่สุดที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4.2 หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า สารกลุ่มที่ 4 มีสูงที่สุด เท่ากับ 126.25 มิลลิกรัมต่อลิตรกรดแกลลิก เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำกว่ามาก เท่ากับ 67.43 มิลลิกรัมต่อลิตรกรดแกลลิก เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของพิชญ์ ไร่มสุทิสกุล (2550: บทคัดย่อ) ซึ่งพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเนื้อในเมล็ดมะม่วง มีตั้งแต่ 65-110 มิลลิกรัมกรดแกลลิก แสดงว่า สารสกัดจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นมีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นมาก

จากผลที่ได้ สารกลุ่มที่ 1 ไม่สามารถหาค่าได้ ทั้งประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด แสดงว่าไม่มีสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ซึ่งสอดคล้องกันที่ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นสารประเภทฟีนอลิก

5. เมื่อนำสารกลุ่มที่ 3 ที่แยกได้จากโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ และมีประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ดีที่สุดมาตรวจสอบหาคุณสมบัติทางเคมี พบว่าเป็นสารกลุ่มแทนนินและการตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง พบว่ามีกรดแทนนิกเป็นส่วนประกอบ สอดคล้องกับงานวิจัยของ ชันเดย์ เอส ออรรบา (2000: บทคัดย่อ) ที่สรุปว่าสารสกัดหยาบจากเนื้อในเมล็ดมะม่วงโดยใช้อีทานอลเป็นตัวทำละลายให้ผลเป็นบวกเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่ใช้ในการตรวจสอบแทนนิน และยังหาปริมาณสารกลุ่มแทนนินทั้งหมดได้เท่ากับร้อยละ 91 (น้ำหนักต่อปริมาณ) และมีปริมาณกรดแทนนิกอยู่เท่ากับ ร้อยละ 46 ของสารกลุ่มแทนนินทั้งหมดอีกด้วย

6. การทดสอบวัดความรู้ก่อนและหลังการฝึกอบรมของนักศึกษา มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 แสดงว่าการฝึกอบรมทำให้นักศึกษามีความรู้เกี่ยวกับความรู้ด้านสมุนไพรและการนำสารสกัดจากพืชมาใช้ในการอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเพิ่มขึ้น เนื่องจากการอบรมนี้เป็นการอบรมเชิงปฏิบัติการ นักศึกษาได้รับฟังบรรยายและทำการทดลองที่สัมพันธ์กับเนื้อหา จึงทำให้มีความรู้มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการใช้วิธีการอบรมเชิงปฏิบัติการ เช่น ฟ็อน นાયเซพันธ์ (2548 : บทคัดย่อ) ทำการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การใช้สารสกัดจากกระพังโหมยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สเตรฟโตค็อกคัส มิวเทนส์ ที่ทำให้เกิดโรคฟันผุเพิ่มขึ้น ให้แก่นักศึกษา ทำให้นักศึกษามีความรู้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ .01 เช่นกัน

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะทั่วไป

1. ส่วนของเมล็ดมะม่วงที่นำมาใช้ในงานวิจัย ได้มาจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมะม่วงกระป๋องซึ่งเป็นส่วนเหลือใช้ จึงทิ้งไว้เป็นกองและอยู่กลางแจ้งจึงเสมือนตากแดดมาแล้วอุณหภูมิอาจอยู่ที่ 40-50 องศาเซลเซียส ซึ่งก็เป็นจุดที่ควรระวังในการรักษาสารสำคัญไม่ให้สลายตัว
2. เนื้อในเมล็ดมะม่วงสดได้จากนำส่วนเมล็ดมาผ่าครึ่งแล้วเอาเนื้อด้านในมาวิเคราะห์ แต่ส่วนเนื้อในเมล็ดมะม่วงแห้งได้จากเอาเนื้อด้านในมาอบที่อุณหภูมิไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส และก่อนนำมาสกัดต้องบดหรือตำให้ละเอียดก่อนเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของการสกัดที่ดี
3. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยควรใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพจะช่วยลดปัญหาต่างๆ ลงได้ เช่นจากงานวิจัยนี้ เครื่องระเหยแห้งแบบใช้ความเย็นได้สารสกัดหยาบอย่างละ 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นของแข็งและส่วนที่เป็นของเหลว ทั้งๆที่ควรจะได้สารสกัดออกมาเพียงส่วนเดียวเพราะส่วนที่เป็นของเหลวคือน้ำนั่นเอง จึงทำให้มีตัวอย่างในการวิเคราะห์มากขึ้นโดยไม่จำเป็น
4. ในการวิจัยได้ทดลองสกัดสารด้วยตัวทำละลายเอทานอลเปรียบเทียบกับน้ำได้พบว่าการใช้น้ำสกัดจะไม่เกิดปัญหาในขั้นตอนของการกรองสารด้วยชุดกรองสูญญากาศซึ่งใช้เวลานานถึง 4 ชั่วโมงในขณะที่ใช้เอทานอลสกัดใช้เวลาเพียง 10 นาที ถึงแม้ว่าจะหาประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์ได้ใกล้เคียงกันก็ตาม นั่นแสดงว่าน้ำไม่เหมาะสมในการทดลองนี้
5. เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นสารกลุ่มแทนนิน ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่สามารถถูกออกซิไดซ์เป็นสารอื่นได้ง่าย ดังนั้นการวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ควรทำการวิจัยภายใต้สภาวะควบคุม เช่น การเตรียมสารควรเตรียมและใช้ในที่มืด สถานที่ในการวิจัยควรควบคุมเรื่องของแสงที่อาจมีผลต่องานวิจัยจึงควรทำการทดลองในห้องมืด และสารกลุ่มแทนนินสามารถสกัดได้จากพืชชนิดอื่นๆ ที่มีรสฝาด เช่น เปลือกมังคุด ทับทิม หรือกล้วยดิบ เป็นต้น ดังนั้น จึงควรวิจัยหาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์จากพืชที่มีสารกลุ่มแทนนินเพิ่มเติม

ข้อเสนอแนะการวิจัย

เพื่อให้การวิจัยในครั้งนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้นควรนำสารที่แยกได้ไปวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างด้วยเทคนิคใหม่ ๆ เช่น NMR, MS และเทคนิคทางกายภาพอื่น ๆ เพื่อให้บริสุทธิ์และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมากขึ้น แต่ทั้งนี้ก็อาจส่งผลกระทบต่อต้นทุนที่อาจเพิ่มขึ้นในทางการค้าด้วย

บรรณานุกรม

- กรมส่งเสริมการเกษตร.2548. ข้อมูลพื้นที่การเพาะปลูกพืชเศรษฐกิจของไทย. กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมการเกษตร.. 526 หน้า.
- ศิริกานต์ ผาสุข. 2545. การพัฒนาและศึกษาผลการใช้บทปฏิบัติการเรื่องการสกัดและแยกองค์ประกอบทางเคมีจากพืชสมุนไพรต่อผลการเรียนวิชาเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติของนักศึกษาสถาบันราชภัฏ ปริญญาโท วิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.
- Lupo, 2001. M. P. Antioxidants and vitamins in cosmetics. **Clinics in Dermatology**. 19, 467-473.
- Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R. and Gordon, M. H. 2006. Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (Cratoxylum formosum Dyer). **Food Chemistry**, 100, 1620-1629.
- Pelillo, M. et.al., G. 2002. Preliminary investigation into development of HPLC with UV and MS-electrospray detection for the analysis of tea catechins. **Food Chemistry**, 78, 369-374.
- Sunday S. Arogba, 2000. Mango (Mangifera indica) Kernel: Chromatographic Analysis of the Tannin, and Stability Study of the Associated Polyphenol Oxidase Activity. **Journal of food Composition and Analysis**. 13: 149-156.
- Yi-Pei Lin et. al., 2007:. Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. **Journal of Phytochemistry**. [online]. 68: 1189-1199 Available: www.sciencedirect.com [2550, มีนาคม 26]