

บทที่ 3

ระเบียบวิจัย

การศึกษานี้เป็นศึกษาวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) ในห้องปฏิบัติการมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์สารสกัดของเมล็ดและเปลือกมะม่วงเพื่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด และพิษวิทยาระดับเฉียบพลันของสารสกัดของเมล็ดและเปลือกมะม่วงในจานทดลองและในสัตว์ทดลอง และเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต้นแบบจากเมล็ดและเปลือกมะม่วงเชิงสร้างสรรค์และการสร้างทุนทางปัญญาในการใช้ประโยชน์จากเมล็ดและเปลือกมะม่วงสำหรับผู้ประกอบการวิสาหกิจชุมชนพัฒนาผลิตภัณฑ์ พืชผัก และผลไม้ตำบลบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน โดยผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

ประชากรและพื้นที่วิจัย

การศึกษานี้จะทำการศึกษามะม่วงพันธุ์เขียวมรกต วิสาหกิจชุมชนพัฒนาผลิตภัณฑ์ พืชผัก และผลไม้ตำบลบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน โดยพื้นที่ที่เก็บสมุนไพรจะอยู่ในอำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ระยะที่ 1 การศึกษาฤทธิ์สารสกัดและพิษวิทยาของเมล็ดและเปลือกมะม่วงเพื่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดในจานทดลองและในสัตว์ทดลอง

1. เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบจากเมล็ดและเปลือกมะม่วง

- 1.1 ตัวอย่าง เปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต
- 1.2 Rotary evaporator: Rotavapor รุ่น R-300 (Electronic lift) บริษัท Buchi ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์
- 1.3 Hotplate Stirrers บริษัท Stuart, ประเทศประเทศจีน
- 1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์
- 1.5 กระดาษกรอง No.1 (Whatman No.1 Filter paper)
- 1.6 Distilled water
- 1.7 Ethanol 95 %, commercial grade, ประเทศไทย

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ และการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วง

- 2.1 ตัวอย่างสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต
- 2.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 2.3 Distilled water
- 2.4 Vortex Shaker บริษัท Genie ประเทศอเมริกา
- 2.5 Auto pipette
- 2.6 Centrifuge บริษัท Hettich ประเทศ เยอรมัน
- 2.7 Petroleum ether บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย
- 2.8 Chloroform บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย
- 2.9 Sulfuric acid (10% H₂SO₄) บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 2.10 Ethanol 95 %, commercial grade, ประเทศไทย
- 2.11 ลวดแมกนีเซียม บริษัท Scitrader ประเทศไทย
- 2.12 Hydrochloric acid (HCl) บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 2.13 Dragendoff's reagent บริษัท LOBA CHEMIE PVT. LTD. ประเทศอินเดีย
- 2.14 Ferric chloride (1% FeCl₃) บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 2.15 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง U/HPLC ใช้เครื่องรุ่น Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 U/HPLC, Diode Array Detector (DAD) บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศอเมริกา
- 2.16 Column-Hypersil BDS C-18 (100 x 4.6 mm i.d., 3µm) บริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศอเมริกา

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic content)

- 3.1 ตัวอย่างสารสกัดใบเปิ้ล้าใหญ่และผลมะเฒ่าควาย
- 3.2 สารมาตรฐาน Gallic acid บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 3.3 Ethanol 99 %, บริษัท RCI Labscan, ประเทศไทย
- 3.4 Folin-Ciocalteu's phenol บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 3.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริษัท VWR International ประเทศอเมริกา
- 3.6 96 Well plate บริษัท Corning ประเทศอเมริกา
- 3.7 Microplate Reader บริษัท Tecan Trading AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.8 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 3.9 Distilled water
- 3.10 Vortex Shaker บริษัท Genie ประเทศอเมริกา
- 3.11 Auto pipette

4. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านอนุมูลอิสระ และลดระดับน้ำตาลในเลือดในหลอดทดลองของสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วง

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี DPPH assay

- 4.1.1 ตัวอย่างสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียววรกต
- 4.1.2 สารมาตรฐาน L-ascorbic acid บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 4.1.3 Ethanol 99 %, บริษัท RCI Labscan, ประเทศไทย
- 4.1.4 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 4.1.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริษัท VWR International ประเทศอเมริกา
- 4.1.6 96 Well plate บริษัท Corning ประเทศอเมริกา
- 4.1.7 Microplate Reader บริษัท Tecan Trading AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 4.1.8 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 4.1.9 Distilled water
- 4.1.10 Vortex Shaker บริษัท Genie ประเทศอเมริกา
- 4.1.11 Auto pipette

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี FRAP assay

- 4.1.12 ตัวอย่างสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียววรกต
- 4.1.13 สารมาตรฐาน Ferrous sulphate บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 4.1.14 Ethanol 99 %, บริษัท RCI Labscan, ประเทศไทย
- 4.1.15 sodium acetate 3H₂O บริษัท Ajax Finechem , ประเทศนิวซีแลนด์
- 4.1.16 Glacial acetic acid บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 4.1.17 Conc. HCl 37% บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 4.1.18 TPTZ บริษัท Tokyo chemical industry , ประเทศญี่ปุ่น
- 4.1.19 Ferric chloride บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส
- 4.1.20 Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริษัท VWR International ประเทศอเมริกา
- 4.1.21 96 Well plate บริษัท Corning ประเทศอเมริกา
- 4.1.22 Microplate Reader บริษัท Tecan Trading AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 4.1.23 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
- 4.1.24 Distilled water
- 4.1.25 Vortex Shaker บริษัท Genie ประเทศอเมริกา
- 4.1.26 Auto pipette

4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการลดระดับน้ำตาลในเลือดในหลอดของสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วง

- 4.3.1 ตัวอย่างสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต
- 4.3.2 96 Well plate บริษัท Corning ประเทศอเมริกา
- 4.3.3 Microplate Reader: Varioskan flash บริษัท Thermo Electron Corporation, ประเทศ Finland
- 4.3.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
- 4.3.5 Vortex Shaker บริษัท Genie ประเทศอเมริกา
- 4.3.6 Auto pipette
- 4.3.7 โปรแกรม Calcsyn™ version 1.1 (BioSoft, Cambridge, UK)
- 4.3.8 Acarbose บริษัท Sigma-Aldrich, Germany
- 4.3.9 Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริษัท VWR International ประเทศอเมริกา
- 4.3.10 alpha-glucosidase บริษัท Sigma, Germany
- 4.3.11 *p*-nitrophenyl-alpha-D-glucopyranoside บริษัท Sigma, Switzerland
- 4.3.12 alpha-amylase บริษัท Fluka, Germany
- 4.3.13 Starch บริษัท Sigma, Germany
- 4.3.14 UV/VIS spectrophotometer T80 (Oasis Scientific Inc., U.S.A.)

4.4 ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงต่อเซลล์ปกติ (hTERT-HME1) ในจานทดลอง

- 4.4.1 ตัวอย่างสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต
- 4.4.2 เซลล์ปกติ (hTERT-HME1)
- 4.4.3 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), บริษัท Gibco BRL Life Technologies, ประเทศ USA
- 4.4.4 Fetal bovine serum, บริษัท Gibco BRL Life Technologies, ประเทศ USA
- 4.4.5 Streptomycin-Penicillin, บริษัท Gibco BRL Life Technologies, ประเทศ USA
- 4.4.6 0.25% trypsin-EDTA, บริษัท Gibco BRL Life Technologies, ประเทศ USA
- 4.4.7 PBS (Phosphate buffer saline), บริษัท Gibco BRL Life Technologies, ประเทศ USA
- 4.4.8 Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริษัท VWR International ประเทศอเมริกา
- 4.4.9 Doxorubicin, บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศ USA
- 4.4.10 Cisplatin บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศ USA
- 4.4.11 5-Fluorouracil บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศ USA
- 4.4.12 MTT reagent, บริษัท Invitrogen Life Technologies Inc., ประเทศ USA
- 4.4.13 Ethanol 99 %, บริษัท RCI Labscan, ประเทศไทย

- 4.4.14 96 Well plate บริษัท Corning ประเทศอเมริกา
- 4.4.15 Microplate Reader: Varioskan flash บริษัท Thermo Electron Corporation, ประเทศ Finland
- 4.4.16 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์
- 4.4.17 Distilled water
- 4.4.18 Vortex Shaker บริษัท Genie ประเทศอเมริกา
- 4.4.19 Auto pipette
- 4.4.20 ตู้บ่มเพาะที่มี CO₂ 5% (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland)
- 4.4.21 โปรแกรม Calcsyn™ version 1.1 (BioSoft, Cambridge, UK)
- 4.4.22 Triton X100 บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศ USA

5 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดของเมล็ดและเปลือกมะม่วงเพื่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูทดลอง

5.3 วัตถุดิบ

สารสกัดจากเมล็ดเนื้อในมะม่วง

5.4 สัตว์ทดลอง

หนูแรทสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 8-12 สัปดาห์ น้ำหนัก 160-180 กรัม ซื้อจากบริษัท Nomura Siam International, Bangkok, Thailand และพักในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิประมาณ 22±1 องศาเซลเซียสโดยให้กลางวัน:กลางคืน เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้การพักสัตว์ทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลอง และให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปและน้ำที่เพียงพอตลอดเวลา

ระยะที่ 2 สร้างผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต้นแบบจากเมล็ดและเปลือกมะม่วงเชิงสร้างสรรค์

1. เปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต
2. ผักส่วนผสม ได้แก่ ผักบุ้ง ข้าวโพดหวาน มันฝรั่ง และมันเทศ
3. เครื่องบด
4. ตู้อบลมร้อน
5. ตะแกรงขนาด 100 mesh
6. เครื่องปรุงรส
7. เครื่องวัดสี ยี่ห้อ Hunter lab
8. เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) โดยใช้หัววัดแบบเนียน รหัส HDP/BS

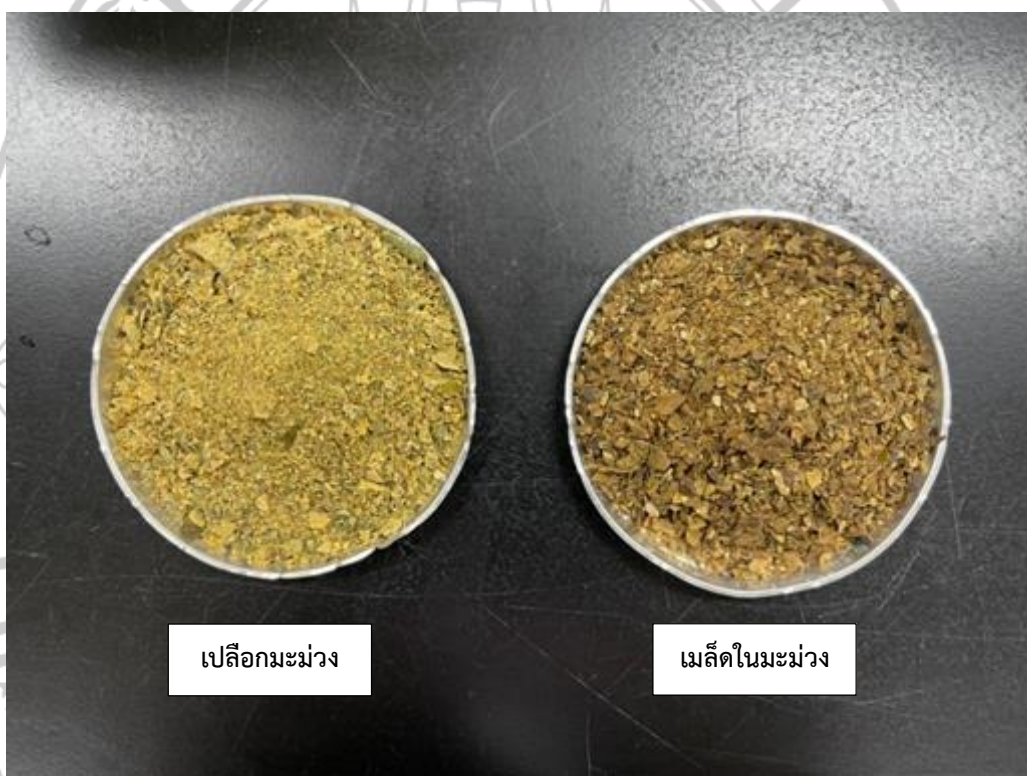
การดำเนินการวิจัย

ระยะที่ 1 การศึกษาฤทธิ์สารสกัดและพิษวิทยาของเมล็ดและเปลือกมะม่วงเพื่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดในจานทดลองและในสัตว์ทดลอง

1. การสกัดสารสกัดหยาบจากเมล็ดและเปลือกมะม่วง

การสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต ด้วย 95% Ethanol ด้วยการ Stirring และทำให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 1) นำตัวอย่างเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต ที่อบแห้งมาบดให้เป็นผง



ภาพที่ 3.1 เปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต

- 2) นำตัวอย่างที่ได้มาวัดความชื้น
- 3) ชั่งตัวอย่าง 150 g. แล้วเติม 95% Ethanol ในอัตราส่วน 1 : 5

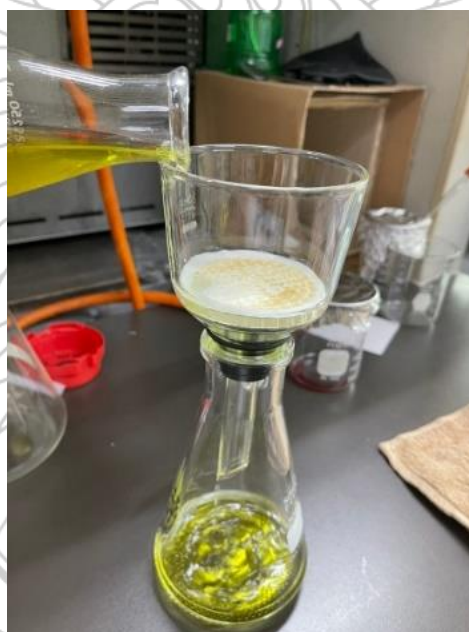
เมล็ด

เปลือกมะม่วง



ภาพที่ 3.2 แสดงตัวอย่างเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียววรกต 150 g. เมื่อเติม 95% Ethanol

- 4) กวนเป็นเวลา 30 นาที แล้วตั้งไว้ อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง
- 5) ทำการกรองแยกสารสกัดออกจากกาก ด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1 Filter paper)



ภาพที่ 3.3 กรองผ่านกระดาษกรอง

- 6) นำกากที่ได้จากการกรองไปทำการสกัดซ้ำด้วยวิธีข้างต้นอีก 3 รอบ ด้วย 95% Ethanol เก็บสารสกัดที่กรองได้มา pool รวมกันทั้ง 4 ครั้ง
- 7) นำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ด้วยอุณหภูมิ 46 °C



ภาพที่ 3.4 ระเหยแห้งด้วย Rotary evaporator

8) จัดเก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดแล้วสีชา เก็บไว้ที่ -20°C

2. การวัดปริมาณสารสำคัญของสารสกัดของเมล็ดและเปลือกมะม่วง อันได้แก่ Gallic acid และ Mangiferin

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณ Gallic acid ในสารสกัดเปลือกและสารสกัดเมล็ดในของมะม่วง

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ Gallic acid ในสารสกัดเปลือกมะม่วงและสารสกัดเมล็ดในของมะม่วง โดยเจือจางให้สารสกัดมีความเข้มข้น 20 mg/mL ในเอทานอล แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง U/HPLC ใช้เครื่องรุ่น Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 U/HPLC, Diode Array Detector (DAD) ใช้ Column-Hypersil BDS C-18 ($100 \times 4.6\text{ mm i.d.}, 3\mu\text{m}$) อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 1 mL/min , ปริมาตรที่ใช้ฉีดเท่ากับ $20\text{ }\mu\text{L}$ เวลาที่ใช้ทดลอง 25 นาทีต่อตัวอย่าง วิเคราะห์โดย Diode Array Detector (DAD) ความยาวคลื่น 254 nm ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ (A) 0.5% acetic acid in water และ (B) methanol โดยมีการปรับอัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ทั้ง 2 ชนิด เป็นแบบ Gradient elution ที่เวลาต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงอัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ทั้ง 2 ชนิด เป็นแบบ Gradient elution ที่เวลาต่างๆ ของการวิเคราะห์ปริมาณ Gallic acid ด้วย HPLC

Time (min)	(A) 0.5% acetic acid in water	(B) methanol
0	100%	0%
5	100%	0%
8	65%	35%
25	65%	35%

*Peak identification retention time 3.9 min = Gallic acid

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณ Mangiferin ในสารสกัดเปลือกและสารสกัดเมล็ดในของมะม่วง

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ Mangiferin ในสารสกัดเปลือกมะม่วงและสารสกัดเมล็ดในของมะม่วง โดยเจือจางให้สารสกัดมีความเข้มข้น 20 mg/mL ในเอทานอล แล้ววิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง U/HPLC ใช้เครื่องรุ่น Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 U/HPLC, Diode Array Detector (DAD) ใช้ Column-Hypersil BDS C-18 (100 x 4.6 mm i.d., 3µm) อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที, ปริมาตรที่ใช้ ฉีด เท่ากับ 20 µL เวลาที่ใช้ทดลอง 20 นาทีต่อตัวอย่าง วิเคราะห์โดย Diode Array Detector (DAD) ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ (A) 0.5% acetic acid in water และ (B) methanol โดยมีการปรับอัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ทั้ง 2 ชนิด เป็นแบบ Gradient elution ที่เวลาต่าง ๆ ดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงอัตราส่วนของตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ทั้ง 2 ชนิด เป็นแบบ Gradient elution ที่เวลาต่างๆ ของการวิเคราะห์ปริมาณ Mangiferin ด้วย HPLC

Time (min)	(A) 0.5% acetic acid in water	(B) methanol
0	75%	25%
10	0%	100%
15	0%	100%
20	75%	25%

*Peak identification: retention time 5.9 min = Mangiferin

3. การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วง

การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นเพื่อหาส่วนผสมสำคัญของสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต ได้แก่ เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แอลคาลอยด์ และแทนนิน ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสี ตะกอน หรือฟอง ดังนี้

3.1 การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์

ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม เติม Chloroform 5 มิลลิลิตร นำไป centrifuge 6000 rpm 5 นาที แล้วดูเฉพาะส่วนใน 1 มิลลิลิตร แล้ว เติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์ (Ayoola et al., 2008)

3.2 การทดสอบฟลาโวนอยด์

ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม เติม 50% Ethanol 3 มิลลิลิตร นำไป centrifuge 6000 rpm 5 นาที แล้วดูเฉพาะส่วนใน 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดแมกนีเซียม 5 มิลลิเมตร 2 ชิ้น หยด Hydrochloric acid 3 หยด แล้วนำไปให้ความร้อนใน water bath 45 องศาเซลเซียส 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์ (Ayoola et al., 2008)

3.3 การตรวจสอบซาโปนิน

ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิตร นำไปความร้อนใน water bath 45 องศาเซลเซียส 5 นาที นำไป centrifuge 6000 rpm 5 นาที แล้วดูดเฉพาะส่วนใน 1 มิลลิตร เติมน้ำกลั่น 2 ml. แล้วเขย่าขึ้นลงอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน (Ayoola et al., 2008)

3.4 การตรวจสอบแอลคาลอยด์

ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม เติม 10% Sulfuric acid 15 มิลลิตร นำไปความร้อนใน water bath 45 องศาเซลเซียส 5 นาที นำไป centrifuge 6000 rpm 5 นาที แล้วดูดเฉพาะส่วนใน 1 มิลลิตร แล้วหยด Dragendoff's reagent 5 หยด ถ้าปรากฏตะกอนสีส้มแสดงว่าพบแอลคาลอยด์ (Ayoola et al., 2008)

3.5 การตรวจสอบแทนนิน

ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิตร นำไปความร้อนใน water bath 45 องศาเซลเซียส 5 นาที นำไป centrifuge 6000 rpm 5 นาที แล้วดูดเฉพาะส่วนใน 1 มิลลิตร เติม 1% Ferric chloride 5 หยด ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำ หรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน (Ayoola et al., 2008)

3.6 การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic content)

การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic content) โดยใช้สาร Folin Ciocalteu reagent ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ (Thomas et al., 2012)

- 1) เตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid โดยเตรียม Stock Gallic acid 400 mg/L เตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid ให้ได้ความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 mg/L.
- 2) เตรียม working Folin-Ciocalteu reagent โดยการเติม Folin-Ciocalteu reagent 2 ml. แล้วเติมน้ำกลั่น 2 ml
- 3) เตรียม Stock ตัวอย่างสารสกัด ความเข้มข้น 10 mg/ml จากนั้นเตรียม Working สารสกัด ความเข้มข้น 1 mg/ml
- 4) เติมน้ำกลั่น 75 ul. เติม working สารสกัด/ STD 25 ul. และเติม working F-C reagent 20 ul. ลงใน 96 well plate
- 5) Mix ให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 6 นาที
- 6) เติม 7% Na_2CO_3 100 ul. เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที
- 7) วัดค่าการดูดกลืนแสง 765 nm. ด้วยเครื่อง Microplate reader
- 8) คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสมการของกราฟมาตรฐานของแกลลิก แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปแบบมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g crude extract) ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

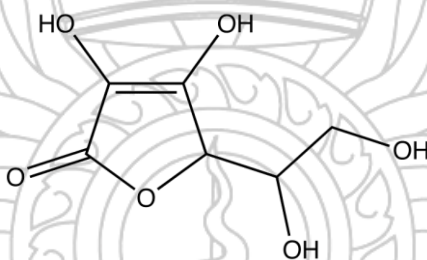
4. การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านอนุมูลอิสระ และลดระดับน้ำตาลในเลือดในหลอดทดลองของสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วง

4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี DPPH assay

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (nm) DPPH[•] จะเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระแล้วรับ hydrogen จากสารต้านอนุมูลอิสระ แล้วได้สาร DPPH-H ที่มีสีจางลง หรือ สีใส



ตัวเปรียบเทียบเชิงบวก ของวิธีการศึกษานี้ คือ ascorbic acid (แสดงดังภาพที่ 3.5)



ภาพที่ 3.5 โครงสร้างทางเคมีของ ascorbic acid

ผลลัพธ์ที่สนใจคือ ค่าความเข้มข้นที่สารทดสอบที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้คิดเป็นร้อยละ 50 (IC₅₀)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี DPPH assay นี้ดัดแปลงจากวิธีการของ (Thomas et al., 2012)

- 1) เตรียม Stock DPPH (400 uM) จากนั้นเตรียมเตรียม Working DPPH (200 uM)
- 2) เตรียม stock สารมาตรฐาน L-ascorbic acid 10 mg/ml จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ให้ได้ความเข้มข้น 1, 5, 10, 25, 50, 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (μg/ml)
- 3) เตรียมตัวอย่างสารสกัดโดยซัง ตัวอย่างสารสกัด ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml) จากนั้นเตรียมตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1000, 800, 400, 200, 100, 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (μg/ml)
- 4) ทำการทดสอบโดย ปิเปต STD/sample 50 ul แล้วเติม DPPH working reagent 100 ไมโครลิตร (μl)
- 5) เขย่าเบาๆ แล้วบ่มไว้ในที่มืด 30 นาที
- 6) วัดค่าการดูดกลืนแสง 517 nm

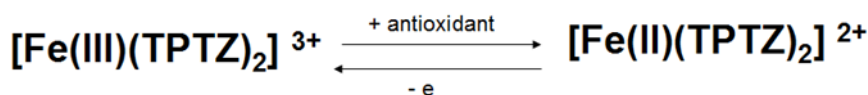
7) นำค่าที่ได้มาคำนวณค่า ร้อยละการยับยั้ง DPPH (% inhibition) โดยคำนวณจาก

$$\% \text{ inhibition} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

การแปลผลการศึกษา หาค่าความเข้มข้นที่สารทดสอบที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง สารอนุมูลอิสระได้คิดเป็นร้อยละ 50 หากมีค่า IC_{50} น้อย แสดงว่าสารทดสอบมีประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ดี โดยมีกลไกออกฤทธิ์แบบแลกเปลี่ยน hydrogen ได้ดี ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครึ่งทำ 3 ซ้ำ

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี FRAP assay

เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารต้านออกซิเดชันที่สามารถให้อิเล็กตรอน โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเป็นสารทดสอบ อะตอมเหล็กจะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านออกซิเดชัน ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส ซึ่งมีสีน้ำเงิน และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 593 nm. (แสดงดังภาพที่ 16)



ภาพที่ 3.6 หลักการของ FRAP assay

ผลลัพธ์ที่สนใจ คือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบ และกลไกการต้านภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัสเป็นดัชนีชี้วัด

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี FRAP assay ดัดแปลงจากวิธีการของ (Yang et al., 2011)

- 1) เตรียม Acetate buffer : 300 มิลลิโมลาร์ (mM) pH 3.6
- 2) เตรียม Dilute HCl : 40 มิลลิโมลาร์ (mM)
- 3) เตรียม TPTZ : 10 มิลลิโมลาร์ (mM) ใน 40 มิลลิโมลาร์ (mM) HCl 10 มิลลิลิตร (ml)
- 4) เตรียม Ferric chloride : 20 มิลลิโมลาร์ (mM)
- 5) เตรียม FRAP reagent โดยปิเปต Acetate buffer : TPTZ : Ferric chloride อัตราส่วน (10 : 1 : 1)
- 6) เตรียม STD : Ferrous sulphate : 10 มิลลิโมลาร์ (mM) จากนั้นเตรียมสารมาตรฐาน Ferrous sulphate ให้ได้ความเข้มข้น 2000, 1000, 500, 250, 125, 50, 0 มิลลิโมลาร์ (mM)
- 7) เตรียมตัวอย่างสารสกัดความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)
- 8) จากนั้นทำการทดสอบโดย ผสม FRAP reagent 270 ไมโครลิตร (μl) และ STD/sample มา 30 ไมโครลิตร (μl) เขย่าเบาๆ แล้วบ่มไว้ในที่มืด 30 นาที

9) วัดค่าการดูดกลืนแสง 593 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัสในสารละลาย โดยการแทนที่สมการจากกราฟมาตรฐานของเหล็กเฟอร์รัส

การแปลผลการศึกษา หากพบว่ามีสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัสมาก หมายความว่า สารทดสอบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาก และมีกลไกการออกฤทธิ์แบบให้อิเลคตรอนได้ดี

4.3 การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการลดระดับน้ำตาลในเลือดในหลอดทดลองของสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วง

4.3.1 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงในหลอดทดลอง (Alam, *et al*, 2017)

นำตัวอย่าง สารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกต ละลายใน 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml สำหรับสารมาตรฐาน acarbose ละลายใน phosphate buffer ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5 และ 5 mg/ml จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase โดยใช้ *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranose เป็นซับสเตรท แล้วจึงตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดปริมาณของ *p*-nitrophenol ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 415 nm. คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ แล้วนำไปสร้างกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์และความเข้มข้นของตัวอย่าง จากนั้นหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50})

4.3.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase ของสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงในหลอดทดลอง (Keerthana . *et al*, 2013)

นำตัวอย่างสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงเขียวมรกตมาละลายใน 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 mg/ml สำหรับสารมาตรฐาน acarbose ละลายใน phosphate buffer ให้มีความเข้มข้น 0.00025, 0.0025 0.025, 0.25 และ 2.5 mg/ml จากนั้น นำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -amylase โดยใช้ starch เป็นซับสเตรท แล้วตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดปริมาณของ reducing sugar โดยวิธี DNS ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นเท่ากับ 540 nm คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ แล้วนำไปสร้างกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์และความเข้มข้นของตัวอย่าง จากนั้นหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50})

4.3.3 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ปกติด้วยสารสกัดเปลือกและเมล็ดในของมะม่วงในหลอดทดลอง ด้วยวิธี MTT Assay

ซึ่งเป็นการทดสอบการมีชีวิตรอด (cell viability test) ของเซลล์ปกติ (hTERT-HME1) หลังจากได้รับสารสกัด ซึ่งทดสอบโดยใช้วิธี MTT ซึ่งวิธีนี้ถูกปรับปรุงมาจากวิธีที่คณะของ Mossmann เคยทำ (Mossmann, 1983). หลักการคือ สาร MTT ได้เข้าสู่เซลล์และผ่านเข้าไปใน mitochondria แล้วซึ่งจะทำให้กลายเป็นสารที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ และกลายเป็นสารที่มีสี (สีม่วงเข้ม) เป็นผลมาจากการสร้างผลิตภัณฑ์ formazan ซึ่ง formazan ที่อยู่ในเซลล์จะถูกละลายด้วย DMSO และสารละลาย formazan นี้จะถูกนำไปวัดโดยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดยเครื่อง micro-plate multi-detection instrument ในการทดสอบจะใช้เซลล์ปกติ (hTERT-HME1)

เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบสมบูรณ์ ที่ประกอบด้วย DMEM ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10, penicillin ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงภายในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 2 วัน ในระหว่างการเพาะเลี้ยง จากนั้นเมื่อเซลล์โตได้เซลล์ประมาณ 80% (80% confluent) ก็ทำการเก็บเซลล์ โดยใช้สารละลาย 0.25% trypsin-EDTA ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์แบบสมบูรณ์ ซึ่งเซลล์จะหลุดออกจากขวดเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาทำการปั่นเซลล์ด้วยความแรง 1,300 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที และดำเนินการดังนี้

1) หลังจากเก็บเซลล์มาแล้วเซลล์แขวนลอย ก็จะถูกนำไปเพาะเลี้ยงต่อใน 96-well plates ซึ่งมีความหนาแน่น 1.5×10^4 cells/well โดยที่มีปริมาตรของระบบที่สภาวะสุดท้ายในแต่ละหลุมคือ 100 μ l ทำการบ่มเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) จากนั้นสารสกัด ซึ่งถูกละลายใน 50% DMSO และถูกเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์แบบสมบูรณ์ให้ได้ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ให้การสัมผัสกับเซลล์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

3) สารละลายสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่ต่างๆจะถูกเติมลงไป ใน 96-well plates ซึ่งมีเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เลี้ยงอยู่ให้ได้ปริมาตรของระบบที่สภาวะสุดท้ายในแต่ละหลุมคือ 200 μ l ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ต้องน้อยกว่า 0.1% (v/v)

4) ซึ่งสำหรับการทดลองนี้จะมีชุดควบคุมเชิงบวกคือ Triton X100 ในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบสมบูรณ์, ชุดควบคุมเชิงลบคืออาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM แบบสมบูรณ์

5) หลังจากนั้นเซลล์ปกติ (hTERT-HME1) ใน 96-well plates จะถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเพาะที่มี CO₂ 5% (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง

6) เมื่อครบเวลาตามที่ต้องการทำการแล้วเติมสาร MTT (5 mg/ml) ใน 0.1 mM PBS pH 7.4 ปริมาณ 20 μ l ลงไปในทุกหลุมของ 96-well plates

7) จากนั้นนำไปบ่มเพาะต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 4 ชั่วโมง

8) เมื่อครบ 4 ชั่วโมงแล้ว เทอาหารเลี้ยงเซลล์และของเหลวทั้งหมดออกจาก 96-well plates

9) เติม DMSO 100 μ l ลงในทุกหลุมของ 96-well plates

10) นำไปวัดโดยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดยเครื่อง micro-plate multi-detection instrument, Varioskan flash (Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland)

11) สำหรับการทดลองนี้ ทดลองซ้ำสามครั้ง (ในแต่ละครั้งก็ทำอีก 3 ครั้ง) และค่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่จะถูกคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่สัมผัสกับสารสกัดเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่สัมผัสกับสารสกัด (ชุดควบคุมเชิงลบ) จากนั้นนำมาหาค่า IC₅₀ (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ 50%) คำนวณได้จาก logdose-response curve ที่ได้จากโปรแกรม CalcuSyn™ version 1.1 (BioSoft, Cambridge, UK).

5. การศึกษาฤทธิ์และความเป็นพิษสารสกัดของเมล็ดและเปลือกมะม่วงเพื่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูทดลอง

หนูที่ใช้ในการทดลองจะถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด streptozotocin (STZ) ขนาด 60 มก. /กก. น้ำหนักตัว ที่ละลายใน 0.1 M บัฟเฟอร์ซิเตรต (pH 4.5) เข้าไปในช่องท้อง และหนูปกติได้รับบัฟเฟอร์ซิเตรตเท่านั้น หลังจากเหนี่ยวนำหนูให้เป็นเบาหวานโดยใช้ STZ เป็นเวลา 3 วัน จะทำการเจาะเลือดที่หางหนู เพื่อวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด หนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 200 มก. /ดล ถูกพิจารณาว่าเป็นเบาหวาน และถูกนำมาใช้ในการศึกษา โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1: หนูควบคุมปกติ และได้รับน้ำ 1 มล/กก น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 2: หนูเบาหวาน และได้รับน้ำ 1 มล/กก น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 3: หนูเบาหวานและได้รับสารสกัดเมล็ดเนื้อในมะม่วง ขนาด 250 มก./กก น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 4: หนูเบาหวานและได้รับสารสกัดเมล็ดเนื้อในมะม่วง ขนาด 500 มก./กก น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 5: หนูเบาหวานและได้รับสารสกัดเมล็ดเนื้อในมะม่วง ขนาด 1000 มก./กก น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 6: หนูเบาหวานและได้รับสารมาตรฐาน glibenclamide ขนาด 5 มก. /กก น้ำหนักตัว

ทุกกลุ่มการทดลองจะได้รับการป้อนสารสกัด หรือสารมาตรฐาน เป็นระยะเวลา 30 วัน

5.1 การวัดระดับน้ำตาลในเลือด

หลังจากงดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการเจาะเลือดจากปลายหางหนูเพื่อวัดระดับน้ำตาลในเลือด ทุก 1 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยใช้เครื่อง glucometer (Roach, USA)

5.2 การวัดความทนต่อน้ำตาล ด้วยวิธี oral glucose tolerance test (OGTT)

หลังจากงดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการให้น้ำตาลกลูโคสขนาด 2 g/kg ด้วยวิธี oral gavage หลังจากนั้นวัดระดับน้ำตาลในเลือดทุก 30 นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5.3 การวัดระดับอินซูลินในเลือด

หลังจากสิ้นสุดการทดลอง เจาะเลือดจากหัวใจของหนูและปั่นแยกซีรัมด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 4,000 g, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำซีรัมมาวัดระดับ insulin โดย Rat insulin Elisa kit (Merck, USA)

5.4 การศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อตับอ่อน

ตับอ่อนจะถูกนำมาทำการคงสภาพของเนื้อเยื่อใน 10% neutral buffered formalin ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการ processed และ embedded ใน paraffin block ทำการตัดเนื้อเยื่อความหนา 5 μ m และนำมาย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) เพื่อทำการศึกษายพาสภาพของเนื้อเยื่อตับอ่อนภายใต้กล้อง light microscope

5.5 การวัดระดับ lipid peroxidation

Malondialdehyde (MDA) คือ biomarker ของภาวะเครียดออกซิเดชัน ในการศึกษาครั้งนี้ทำการวัดระดับของ MDA ในซีรัม ด้วยวิธี TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance assay) เพื่อประเมินภาวะเครียดออกซิเดชัน

5.6 การวัดความเป็นพิษของตับและไต

การทำงานของตับถูกทำการศึกษาโดยการวัดระดับของเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) และ aspartate aminotransferase (AST) ในเลือด ด้วยวิธี enzymatic colorimetric method และความเป็นพิษของไตทำการศึกษาโดยการวัดระดับของ BUN และ Creatinine ในเลือด ด้วยวิธี enzymatic colorimetric method

ระยะที่ 2 เพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพต้นแบบจากเมล็ดและเปลือกมะม่วงเชิงสร้างสรรค์ และการสร้างทุนทางปัญญาในการใช้ประโยชน์จากเมล็ดและเปลือกมะม่วงสำหรับผู้ประกอบการ วิสาหกิจชุมชนพัฒนาผลิตภัณฑ์ พืชผัก และผลไม้ตำบลบ้านไธสง จังหวัดลำพูน

1. การเตรียมผงเปลือกมะม่วงและผงเมล็ดมะม่วง

ล้างเปลือกและเมล็ดมะม่วงด้วยน้ำสะอาด และแช่ในน้ำเกลือความเข้มข้น 2% เป็นเวลา 5 นาที เพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาล จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง สะเด็ดน้ำ และนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดเป็นผงด้วยเครื่องบด และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh เก็บใส่ถุง และใส่ตู้ดูดความชื้นเพื่อทำการวิเคราะห์ค่าสีและปริมาณน้ำอิสระต่อไป

2. การเตรียมโยอาหารแผ่นผสมเปลือกมะม่วง

เตรียมผักบุง เริ่มจากคัดแยกผักบุงล้างน้ำให้สะอาด และหั่นผักบุงเป็นท่อนๆ ให้ความร้อนโดยการลวกน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นแช่น้ำเย็น สะเด็ดน้ำและพักไว้ จากนั้นเตรียมข้าวโพดหวาน ทำโดยนำข้าวโพดหวานแช่แข็งมาให้ความร้อนด้วยไอน้ำ 10 นาที ปั่นข้าวโพดให้ละเอียดและพักไว้ และเตรียมมันฝรั่งและมันเทศ ทำโดยปอกเปลือกมันฝรั่งและมันเทศออก จากนั้นหั่นมันฝรั่งและมันเทศเป็นชิ้นๆ นำไปให้ความร้อนด้วยไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที หรือจนกว่าจะนิ่ม และบดมันฝรั่งและมันเทศให้ละเอียด จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาเตรียมโยอาหารแผ่นผสมผงเปลือกมะม่วง เตรียมโดยตวงผักบุง ข้าวโพดหวาน มันฝรั่ง มันเทศ ผงเปลือกมะม่วง และเครื่องปรุงรสต่างๆ จากนั้นนำผักทั้ง 4 ชนิดรวมถึงผงเปลือกมะม่วง เครื่องปรุงรส เข้าเครื่องปั่นผสม เทใส่ถาดรองอบ เคลือบผักบุดให้มีความหนาประมาณ 1 มิลลิเมตร จากนั้นใช้มีดทำรอยไว้ให้เป็นแผ่นสี่เหลี่ยมผืนผ้า นำเข้าอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-8 ชั่วโมง นำมาตัดตามรอยที่ทำไว้ และบรรจุใส่ถุงซิปล็อคเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

3. การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพและเคมีของผงเปลือกมะม่วงและเมล็ดมะม่วง และโยอาหารแผ่น

3.1 วัดค่าสีของโยอาหารแผ่น ด้วยเครื่องวัดสี ยี่ห้อ Hunter lab โดยวัดในระบบ CIE L*, a* และ b* ซึ่งค่า L* คือ ค่าความสว่าง ค่า +a* คือ ค่าสีแดง ค่า -a* คือ ค่าสีเขียว ค่า +b* คือ ค่าสีเหลือง ค่า -b* คือ ค่าสีน้ำเงิน ค่า Chroma (Co) คือ ค่าความเข้มของเฉดสี ค่า Hue (ho) คือ ค่ามุมของสี และค่าความแตกต่างของสี (ΔE) โดยทำการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ

3.2 วิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) โดยใช้หัววัดแบบเนียน รหัส HDP/BS โดยวัดค่าแรงกดแตก (compression force) เพื่อให้ได้กราฟระหว่างแรงและระยะเวลา และรายงานค่าแรงสูงสุดซึ่งแสดงถึงความแข็ง (hardness/firmness) และจำนวนพีกซึ่งแสดงถึงความกรอบ (crispness)

3.3 ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Total Carbohydrate) วิเคราะห์ตามวิธีการของ Method of Analysis for Nutrition Labeling, AOAC, 1993, Chapter 6 (Sullivan D. M. & Carpenter D. E. , 1993)

3.4 ปริมาณโปรตีน (Protein) วิเคราะห์ตามวิธีการของ In-house method: TM-PM-079 based on AOAC Official Methods of Analysis 21st ed., 2019, method 920.152

3.5 ปริมาณไขมัน (Total Fat) วิเคราะห์ตามวิธีการของ In-house method: TM-PM-078 based on AOAC Official Methods of Analysis 21st ed., 2019, method 922.06

3.6 ความชื้น (Moisture) วิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC Official Method of Analysis 21st ed., 2019, method 925.10

3.7 เถ้า (Ash) วิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC Official Method of Analysis 21st ed., 2019, method 940.26

3.8 ปริมาณใยอาหาร (Total Dietary Fiber) วิเคราะห์ตามวิธีการของ In-house method: TM-PM-129 based on AOAC Official Methods of Analysis 21st ed., 2019, method 985.29

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผู้วิจัยตรวจสอบความถูกต้องสมบูรณ์ของข้อมูลในแบบสอบถาม บันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ

1. ข้อมูลการวัดปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบ นำเสนอโดยใช้ปริมาณของผลิตภัณฑ์ (% yield) ปริมาณสารพิษเคมีเบื้องต้น 5 ชนิด ได้แก่ เทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แอลคาลอยด์ และแทนนิน และ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร นำเสนอโดยใช้ร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) โดยคำนวณจาก $\% \text{ inhibition} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$

3. การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์มะเร็ง นำเสนอโดยใช้ ค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 50%) คำนวณได้จาก logdose-response curve ที่ได้จากโปรแกรม Calcsyn™ version 1.1 (BioSoft, Cambridge, UK)

4. ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติในแต่ละกลุ่มการทดลองโดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบพหุคูณแบบ Turkey's test ถ้า $p < 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ