บทที่ 3

ระเบียบวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นศึกษาวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) ในห้องปฏิบัติการ วัตถุประสงค์เพื่อวัดปริมาณสารสำคัญ ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็ง และพิษวิทยาของสารสกัดหยาบจากพืชตระกูล *Euphorbiaceae* ในพื้นที่ลุ่มน้ำลี้ จังหวัดลำพูน โดยผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

ประชากรและพื้นที่วิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาพืชตระกูล Euphorbiaceae ในพื้นที่ลุ่มน้ำลี้ จังหวัดลำพูน โดยพื้นที่ที่เก็บสมุนไพรจะอยู่ในอำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน ได้แก่ เปล้าใหญ่ (Croton persimilis Müll.Arg.) และมะเม่าควาย (Antidesma puncticulatum Miq.)

1. เปล้าใหญ่ (Croton persimilis Müll.Arg.) จะเก็บในช่วงเดือนกรกฎาคม – สิงหาคม 2561 ใช้เฉพาะส่วนใบในการศึกษาครั้งนี้
2. มะเม่าควาย (Antidesma puncticulatum Miq.) จะเก็บในช่วงเดือนสิงหาคม – กันยายน 2561 ใช้เฉพาะผลสุกในการศึกษาครั้งนี้

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือที่ใช้ในการวัดปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบจากพืชตระกูล *Euphorbiaceae* ในพื้นที่ลุ่มน้ำลี้ จังหวัดลำพูน

1.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากใบของเปล้าใหญ่ และผลของมะเม่าควาย

1.1.1 ตัวอย่าง ใบเปล้าใหญ่และผลมะเม่าควาย

1.1.2 Rotary evaporator: Rotavapor รุ่น R-300 (Electronic lift) บริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

1.1.3 Ultrasonic bath S300H บริษัท S300H, ประเทศประเทศเยอรมัน

1.1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

1.1.5 กระดาษกรอง No.1 (Whatman No.1 Filter paper)

1.1.6 Distilled water

1.1.7 Ethanol 95 %, commercial grade, ประเทศไทย

1.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดใบเปล้าใหญ่และผลมะเม่าควาย

1.2.1 ตัวอย่างสารสกัดใบเปล้าใหญ่และผลมะเม่าควาย

1.2.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

1.2.3 Distilled water

1.2.4 Vortex Shaker บริษัท Genie ประเทศอเมริกา

1.2.5 Auto pipette

1.2.6 Centrifuge บริษัท Hettich ประเทศ เยอรมัน

1.2.7 Petroleum ether บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

1.2.8 Chloroform บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย

1.2.9 Sulfuric acid (10% H2SO4) บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส

1.2.10 Ethanol 95 %, commercial grade, ประเทศไทย

1.2.11 ลวดแมกนีเซียม บริษัท Scitrader ประเทศไทย

1.2.12 Hydrochloric acid (HCl) บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส

1.2.13 Dragendoff's reagent บริษัท LOBA CHEMIE PVT. LTD. ประเทศอินเดีย

1.2.14 Ferric chloride (1% $FeCl_3$) บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic content)

1.3.1 ตัวอย่างสารสกัดใบเปล้าใหญ่และผลมะเม่าควาย

1.3.2 สารมาตรฐาน Gallic acid บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส

1.3.3 Ethanol 99 %, บริษัท RCI Labscan, ประเทศไทย

1.3.4 Folin-Ciocalteu's phenol บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศฝรั่งเศส

1.3.5 Dimethyl sulfoxide (DMSO) บริษัท VWR International ประเทศอเมริกา

1.3.6 96 Well plate บริษัท Corning ประเทศอเมริกา

1.3.7 Microplate Reader บริษัท Tecan Trading AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

1.3.8 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

1.3.9 Distilled water

1.3.10 Vortex Shaker บริษัท Genie ประเทศอเมริกา

1.3.11 Auto pipette

2. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบจากพืชตระกูล *Euphorbiaceae* ในพื้นที่ลุ่มน้ำลี้ จังหวัดลำพูน

2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี DPPH assay

2.1.1 DPPH

2.1.2 L-ascorbic acid

2.1.3 Auto pipette

2.1.4 96 Well plate บริษัท Corning ประเทศอเมริกา

2.1.5 Microplate Reader บริษัท Tecan Trading AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

2.1.6 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี FRAP assay

2.2.1 Acetate buffer

2.2.2 HCl

2.2.3 TPTZ

2.2.4 Ferric chloride

2.2.5 Ferrous sulphate

2.2.6 Auto pipette

2.2.7 96 Well plate บริษัท Corning ประเทศอเมริกา

2.2.8 Microplate Reader บริษัท Tecan Trading AG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

2.2.9 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง, ยี่ห้อ Mettler Toledo, รุ่น AG 204, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

การดำเนินการวิจัย

1. การวัดปริมาณสารสำคัญของสารสกัดหยาบจากพืชตระกูล *Euphorbiaceae* ในพื้นที่ลุ่มน้ำลี้ จังหวัดลำพูน

1.1 วิธีการสกัดสารสกัดหยาบ

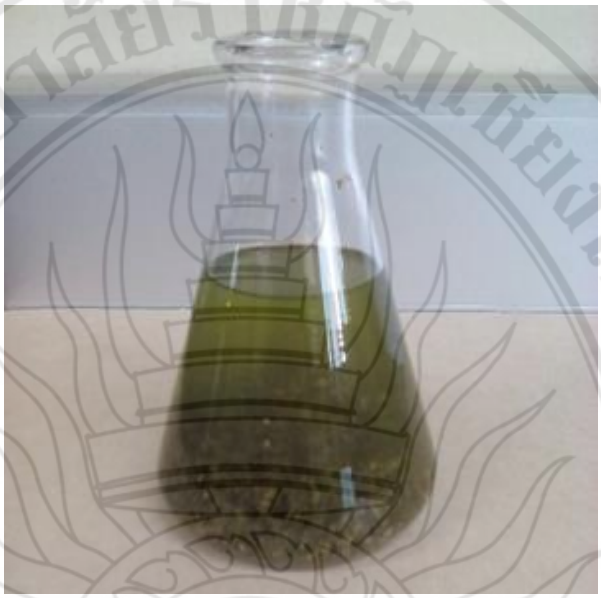
1.1.1 การสกัดใบเปล้าใหญ่ด้วย 95% Ethanol ด้วยการ Sonicate โดยการใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1.2 นำตัวอย่างเปล้าใหญ่ มาบดให้เป็นผง

ภาพที่ 3.1 เปล้าใหญ่ที่ใช้ในการสกัด

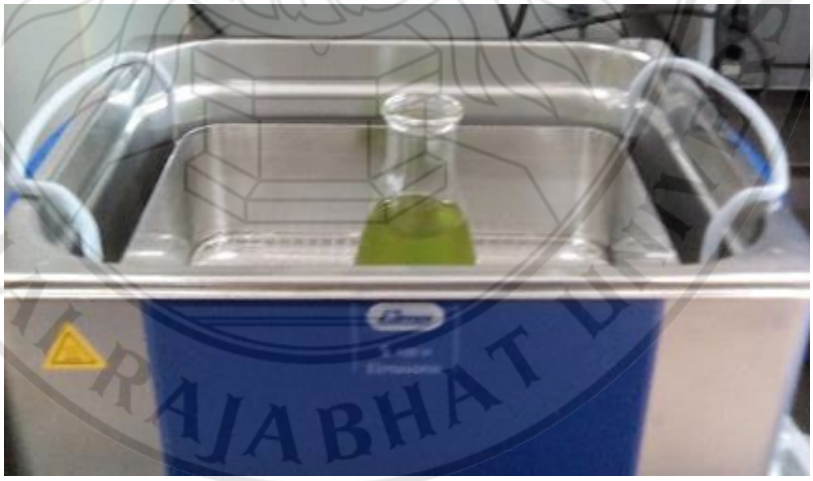
1.1.3 นำตัวอย่างเปล้าใหญ่ ที่ได้มาวัดความชื้น

1.1.4 ชั่งตัวอย่างเปล้าใหญ่ 100 กรัม แล้วเติม 95% Ethanol ในอัตราส่วน 1 กรัม : 20 มิลลิลิตร



ภาพที่ 3.2 แสดงตัวอย่างเปล้าใหญ่ 100 กรัม เมื่อเติม 95% Ethanol

1.1.5 Sonicate ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วตั้งไว้ อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.3 Sonicate เปล้าใหญ่ 45 องศาเซลเซียส

1.1.6 ทำการกรองแยกสารสกัดออกจากกาก ด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1 Filter paper)

ภาพที่ 3.4 กรองผ่านกระดาษกรอง

1.1.7 นำกากที่ได้จากการกรองไปทำการสกัดซ้ำด้วยวิธีข้างต้นอีก 4 รอบ ด้วย 95% Ethanol เก็บสารสกัดที่กรองได้มาผสมรวมกันทั้ง 5 ครั้ง

1.1.8 นำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ด้วยอุณหภูมิ 46 °C

ภาพที่ 3.5 ระเหยแห้งด้วย Rotary evaporator

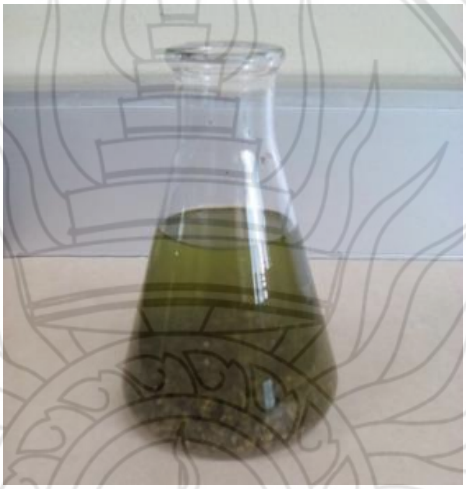
1.1.9 จัดเก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดแล้วสีชา เก็บไว้ที่ -20 °C

1.2 การสกัดใบเปล้าใหญ่ด้วย 95% Ethanol ด้วยการ Stirring โดยการใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.2.1 นำตัวอย่างเปล้าใหญ่ มาบดให้เป็นผง

1.2.2 นำตัวอย่างเปล้าใหญ่ ที่ได้มาวัดความชื้น

1.2.3 ชั่งตัวอย่างเปล้าใหญ่ 50 กรัม แล้วเติม 95% Ethanol ในอัตราส่วน 1 กรัม : 20 มิลลิลิตร



ภาพที่ 3.6 ตัวอย่างเปล้าใหญ่ เมื่อเติม 95% Ethanol

1.2.4 Stirring 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วตั้งไว้อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 3.7 ตัวอย่างเมื่อ Stirring 6 ชั่วโมง

1.2.5 ทำการกรองแยกสารสกัดออกจากกาก ด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1 Filter paper)

ภาพที่ 3.8 กรองผ่านกระดาษกรอง

1.2.6 นำกากที่ได้จากการกรองไปทำการสกัดซ้ำด้วยวิธีข้างต้นอีก 4 รอบ ด้วย 95% Ethanol เก็บสารสกัดที่กรองได้มาผสมรวมกันทั้ง 5 ครั้ง

1.2.7 นำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ด้วยอุณหภูมิ 46 °C

ภาพที่ 3.9 ทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator

1.2.8 จัดเก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดแล้วสีชา เก็บไว้ที่ -20 °C

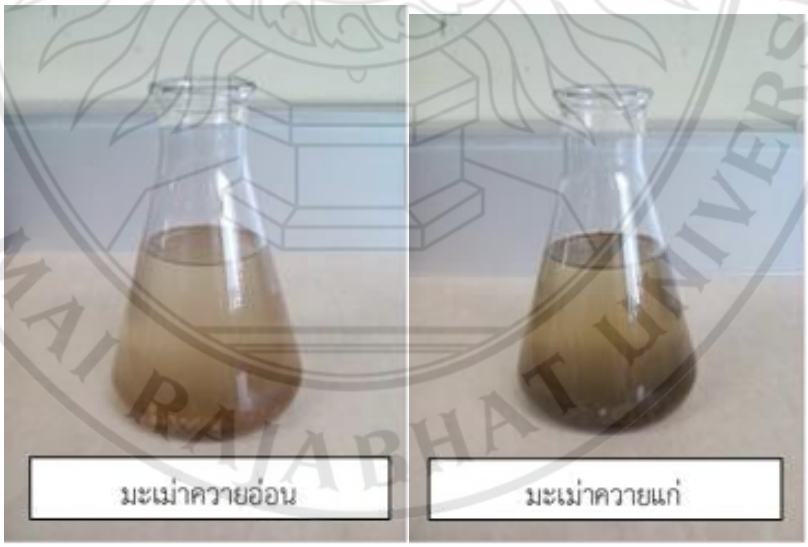
1.3 การสกัดผลมะเม่าควายอ่อนและแก่ ด้วย 95% Ethanol ด้วยการ Stirring โดยการใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.3.1 นำตัวอย่างผลมะเม่าควายอ่อนและแก่ มาบดให้เป็นผง

ภาพที่ 3.10 หมากเม่าอ่อน และหมากเม่าแก่ที่ใช้ในการสกัด

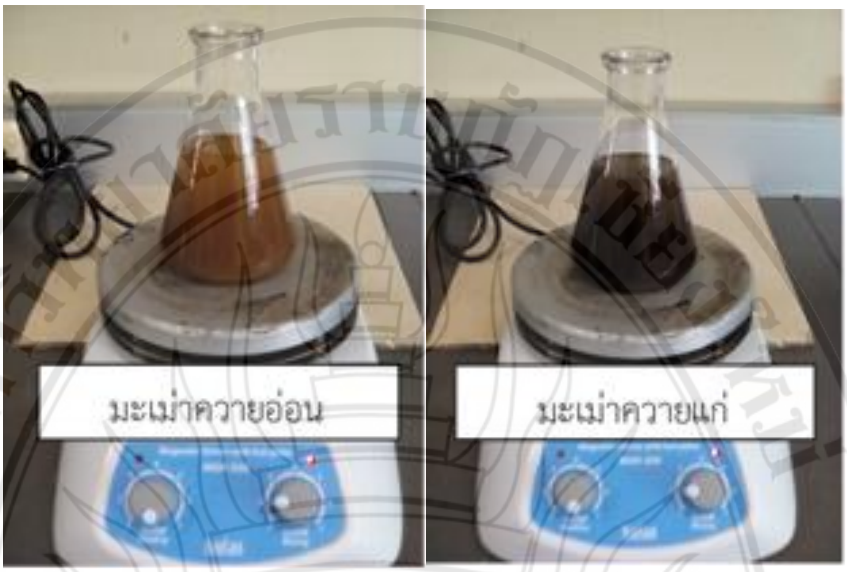
1.3.2 นำตัวอย่างผลมะเม่าควายอ่อนและแก่ ที่ได้มาวัดความชื้น

1.3.3 ชั่งตัวอย่างมะเม่าควายอ่อน120 กรัม และมะเม่าควายแก่ 150 กรัม แล้วเติม Solvent 95% Ethanol ในอัตราส่วน 1 กรัม : 20 มิลลิลิตร



ภาพที่ 3.11 แสดงตัวอย่างมะเม่าควาย เมื่อเติม solvent 95% Ethanol

1.3.4 Stirring เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วตั้งไว้ อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.12 ตัวอย่างมะเม่าควาย ขณะ Stirring

1.3.5 ทำการกรองแยกสารสกัดออกจากกาก ด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1 Filter paper)

ภาพที่ 3.13 ตัวอย่างมะเม่าควาย ขณะกรอง

1.3.6 นำกากที่ได้จากการกรองไปทำการสกัดซ้ำด้วยวิธีข้างต้นอีก 4 รอบ ด้วย 95% Ethanol เก็บสารสกัดที่กรองได้มาผสมรวมกันทั้ง 5 ครั้ง

1.3.7 นำสารที่กรองได้ไประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ด้วยอุณหภูมิ 46 °C

ภาพที่ 3.14 การระเหยแห้งตัวอย่างมะเม่าควาย ด้วย evaporator

1.3.8 จัดเก็บสารสกัดที่ได้ใส่ขวดแล้วสีชา เก็บไว้ที่ -20 °C

1.3.9 คำนวณปริมาณของผลิตภัณฑ์ (% yield)

จากสูตร Yield Crude Extract $= \frac{a}{b} \times 100\%$

a = น้ำหนักสารที่สกัดได (กรัม)

b = ปริมาณสมุนไพรแห้งที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

1.4 วิธีการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดใบเปล้าใหญ่และผลมะเม่าควาย

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบด้วยเอทานอลจากใบเปล้าใหญ่และผลมะเม่าควายโดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ซาโปนิน (Saponin) แอลคาลอยด์ (Alkaloid) และ แทนนิน (Tanin) โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสี ตะกอน หรือฟอง ดังนี้

1.4.1 การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์

ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม เติมChloroform 5 มิลลิลิตร นำไป centrifuge 6000 rpm 5 นาที แล้วดูดเฉพาะส่วนใน 1 มิลลิลิตร แล้ว เติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์ปีนอย (Ayoola et al., 2008)

1.4.2 การทดสอบฟลาโวนอยด์

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

1.4.3 การตรวจสอบซาโปนิน

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

1.4.4 การตรวจสอบแอลคาลอยด์

ชั่งตัวอย่าง 0.2 กรัม เติม 10% Sulfuric acid 15 มิลลิลิตร 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)

1.4.5 การตรวจสอบแทนนิน

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

1.5 วิธีการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total Phenolic content)

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

1.5.1 เตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid โดยเตรียม Stock Gallic acid 400 มิลลิกรัม/ลิตร (mg/L) เตรียมสารมาตรฐาน Gallic acid ให้ได้ความเข้มข้น 0, 12.5 , 25, 50, 100, 200, 400 มิลลิกรัม/ลิตร (mg/L)

1.5.2 เตรียม working Folin-Ciocalteu reagent โดยการเติม Folin-Ciocalteu reagent 2 มิลลิลิตร แล้วเติม น้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร

1.5.3 เตรียม Stock ตัวอย่างสารสกัด ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml) จากนั้นเตรียม Working สารสกัด ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml)

1.5.4 เติมน้ำกลั่น 75 ul. เติม working สารสกัด/ STD 25 ไมโครลิตร (μl) และเติม working F-C reagent 20 ไมโครลิตร (μl) ลงใน 96 well plate

1.5.5 ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ 6 นาที

1.5.6 เติม 7% Na_2CO_3 100 ไมโครลิตร (μl) เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที

1.5.7 วัดค่าการดูดกลืนแสง 765 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง Microplate reader

1.5.8 คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากสมการของกราฟมาตรฐานของแกลลิก แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g crude extract) ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2. การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็ง และพิษวิทยาต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากพืชตระกูล *Euphorbiaceae* ในพื้นที่ลุ่มน้ำลี้ จังหวัดลำพูน

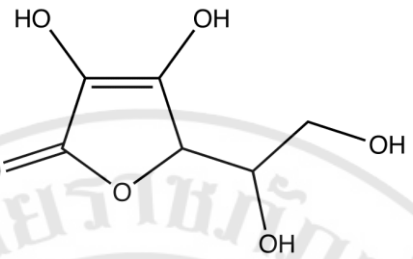
2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี DPPH assay

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายนี้มีสีม่วง ซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (nm) $DPPH^{\bullet}$ จะเกิดปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระแล้วรับ hydrogen จากสารต้านอนุมูลอิสระ แล้วได้สาร DPPH-H ที่มีสีจางลง หรือ สีใส

$DPPH^{\bullet} + AH$----------$DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$

$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet}$---------- DPPH-R

ตัวเปรียบเทียบเชิงบวก ของวิธีการศึกษานี้ คือ ascorbic acid (แสดงดังภาพที่ 15)



ภาพที่ 3.15 โครงสร้างทางเคมีของ ascorbic acid

ผลลัพธ์ที่สนใจคือ ค่าความเข้มข้นที่สารทดสอบที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้คิดเป็นร้อยละ 50 (IC_{50})

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) เตรียมตัวอย่างสารสกัดโดยชั่ง 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
   % inhibition = [(Ac - As) / Ac] × 100

การแปลผลการศึกษา หาค่าความเข้มข้นที่สารทดสอบที่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้คิดเป็นร้อยละ 50 หากมีค่า IC_{50} น้อย แสดงว่าสารทดสอบมีประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ดี โดยมีกลไกออกฤทธิ์แบบแลกเปลี่ยน hydrogen ได้ดี ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี FRAP assay

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

$$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+} \underset{-e}{\overset{+\text{antioxidant}}{\rightleftharpoons}} [Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$$

ภาพที่ 3.16 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 (μg/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 หากพบว่ามีการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัสมาก หมายความว่า สารทดสอบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาก และมีกลไกการออกฤทธิ์แบบให้อิเลคตรอนได้ดี

2.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดจากใบเปล้าใหญ่และผลมะเม่าควาย ในหลอดทดลอง

2.3.1 เซลล์เพาะเลี้ยงและการเตรียมเซลล์มะเร็งที่จะใช้ทดสอบ

ในการทดสอบจะใช้เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ ($CaCO_2$) เซลล์มะเร็งตับ ($HepG_2$) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบสมบูรณ์ ที่ประกอบด้วย DMEM ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10, penicillin ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงภายในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 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

2.3.2 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งด้วยสารสกัดจากใบเปล้าใหญ่และผลมะเม่าควายในหลอดทดลอง ด้วยวิธี MTT Assay

ซึ่งเป็นการทดสอบการมีชีวิตรอด (cell viability test) ของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ ($CaCO_2$) เซลล์มะเร็งตับ ($HepG_2$) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-H187) หลังจากได้รับสารสกัด ซึ่งทดสอบโดยการใช้วิธี MTT ซึ่งวิธีนี้ถูกปรับปรุงมาจากวิธีที่คณะของ Mossmann เคยทำ (Mossmann, 1983). หลักการคือ สาร MTT ได้เข้าสู่เซลล์และผ่านเข้าไปใน mitochondria แล้วซึ่งจะทำให้กลายเป็นสารที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ และกลายเป็นสารที่มีสี (สีม่วงเข้ม) เป็นผลมาจากการสารสร้างผลิตภัณฑ์ formazan ซึ่ง formazan ที่อยู่ในเซลล์จะถูกละลายด้วย DMSO และสารลาย formazan นี้จะถูกนำไปวัดโดยการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดยเครื่อง micro-plate multi-detection instrument

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

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

3) สารละลายสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่ต่างๆจะถูกเติมลงไปใน 96-well plates ซึ่งมีเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เลี้ยงอยู่ให้ได้ปริมาตรของระบบที่สภาวะสุดท้ายในแต่ละหลุมคือ 200 µl ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ต้องน้อยกว่า 0.1% (v/v)

4) ซึ่งสำหรับการทดลองนี้จะมีชุดควบคุมเชิงบวกคือ Triton X100 ในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบสมบูรณ์, ชุดควบคุมเชิงลบคืออาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM แบบสมบูรณ์

5) หลังจากนั้นเซลล์มะเร็ง ใน 96-well plates จะถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเพาะที่มี CO_2 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 µl ลงไปในทุกหลุมของ 96-well plates

7) จากนั้นนำไปบ่มเพาะต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 4 ชั่วโมง

8) เมื่อครบ 4 ชั่วโมงแล้ว เทอาหารเลี้ยงเซลล์และของเหลวทั้งหมดออกจาก 96-well plates

9) เติม DMSO 100 µl 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 IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของของเซลล์มะเร็งได้ 50%) คำนวนได้จาก logdose–response curve ที่ได้จากโปรแกรม Calcusyn™ version 1.1 (BioSoft, Cambridge, UK).

2.3.3 เซลล์เพาะเลี้ยงและการเตรียมเซลล์ปกติ (hTERT-HME1) ที่จะใช้ทดสอบ

ในการทดสอบจะใช้เซลล์ปกติ (hTERT-HME1) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แบบสมบูรณ์ ที่ประกอบด้วย DMEM ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum (FBS) ร้อยละ 10, penicillin ความเข้มข้น 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร, streptomycin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงภายในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 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

2.3.4 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ปกติ (hTERT-HME1) ด้วยสารสกัดจากใบเปล้าใหญ่และผลมะเม่าควายในหลอดทดลอง ด้วยวิธี MTT Assay

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

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

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

3) สารละลายสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่ต่างๆจะถูกเติมลงไปใน 96-well plates ซึ่งมีเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เลี้ยงอยู่ให้ได้ปริมาตรของระบบที่สภาวะสุดท้ายในแต่ละหลุมคือ 200 µl 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 CO_2 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 µl ลงไปในทุกหลุมของ 96-well plates

7) จากนั้นนำไปบ่มเพาะต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอีก 4 ชั่วโมง

8) เมื่อครบ 4 ชั่วโมงแล้ว เทอาหารเลี้ยงเซลล์และของเหลวทั้งหมดออกจาก 96-well plates

9) เติม DMSO 100 µl 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 IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของของเซลล์มะเร็งได้ 50%) คำนวนได้จาก logdose–response curve ที่ได้จากโปรแกรม Calcusyn™ version 1.1 (BioSoft, Cambridge, UK).

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผู้วิจัยตรวจสอบความถูกต้องสมบูรณ์ของข้อมูลในแบบสอบถาม บันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ

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

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

3. การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์มะเร็ง นำเสนอโดยใช้ ค่า IC_{50} (ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของของเซลล์มะเร็งได้ 50%) คำนวนได้จาก logdose–response curve ที่ได้จากโปรแกรม Calcusyn™ version 1.1 (BioSoft, Cambridge, UK).