บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การเตรียมสารสกัดย่านาง เครือหมาน้อย และรางจืด

3.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำใบย่านาง รางจืด และเครือหมาน้อย มาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สำหรับรางจืด และ 3 ชั่วโมงสำหรับย่านางและเครือหมาน้อย จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดแล้วบรรจุใส่ถุงพร้อมปิดผนึกแบบสุญญากาศ และเก็บที่อุณหภูมิ 4°C

3.1.2 การเตรียมสารสกัด

ชั่งตัวอย่างย่านาง/ รางจืด/ เครือหมาน้อย 100 mg เติมน้ำร้อน 100°C / เอทานอล / อะซีโตน 12 ml นำไปแช่ด้วย Shaking water bath 25°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 3000 g 3 นาที 4°C เก็บส่วนใสโดยกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วนำตะกอนที่เหลือไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง ปรับปริมาตรส่วนใสให้ครบ 50 ml จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 2 ml ใส่หลอดทดลอง แล้วนำไปทำให้แห้งด้วย Freeze dryer และ Vacuum dryer สำหรับสารสกัดน้ำและสารสกัดเอทานอลกับอะซีโตน ตามลำดับ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.2. การวิเคราะห์ปริมาณของ Total phenolic

โดยการทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลาย น้ำ หรือ อะซีโตน หรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำ 1.58 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex ทิ้งไว้ 5 นาที เติมโซเดียมคาร์บอเนต (20% w/v) 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วจึงเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร และหา Total Phenolic Compound โดยใช้ gallic acid เป็นมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นของ gallic acid ที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานคือ 0 , 50 , 100 , 150 และ 200 ppm ใน 95% เอทานอล ผลการวิเคราะห์รายงานในรูปสมมูลของมิลลิกรัม gallic acid ต่อ100 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง

3.3 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของอนุมูลอิสระ

3.3.1 วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

โดยการทำละลายสารสกัดแห้งด้วยตัวทำละลายน้ำ อะซีโตน หรือเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่าง ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย DPPH 1.90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex แล้วเก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Biochrom, Libra S22 S/N 97765, UK) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และคำนวณหา % inhibition จากสูตร

$$\% \, Inhibittion \, = \left(\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}}\right) \times 100$$

3.3.2 วิธี Ferric-reducing antioxidant power (FRAP)

โดยทำการเตรียมสารละลาย FRAP จากสารละลาย acetate buffer (pH 3.6), TPTZ 10 mMใน HCl เข้มข้น 40 mM และสารละลาย Ferrous chloride เข้มข้น 20 mM ในอัตราส่วน 10:1:1 (v/v) ตามลำดับ สารละลาย FRAP จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน และนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำมาใช้

ในทดสอบด้วยวิธีนี้ จะใช้สารสกัดปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย FRAP ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืดเป็นระยะเวลาเวลา 4 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร โดยทำการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Ferric sulfate ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 100-2000 ?M โดยทำการทดลองจำนวนสามซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

3.3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

เตรียมสารละลาย $ABTS^{\cdot}$ cation radical โดยการผสมสารละลาย ABTS 14 mM 5 ml และ 4.9 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) 5 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนใช้นำสารละลาย $ABTS^{\cdot}$ มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.700 ± 0.020 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากนั้นปิเปตสารละลาย $ABTS^{+}$ 950 ul ผสมกับสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 50 ul โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้ BHT และ Trolox เป็นชุดควบคุม จากนั้นคำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%) ตามสมการ

$$ABTS \; scavenging \; effect \; \% = \left[\frac{(A_0 - A_1)}{A_0}\right] \times 100$$

โดย A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Caco-2 cell) ได้รับจากมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก โดยใช้ passage ที่ 29-32 ทำการเลี้ยงเซลล์ใน 75-T flask (ขนาด 75 cm^2) โดยเซลล์ที่ใช้ในการเลี้ยงเริ่มต้นเท่ากับ $4x10^5$ cells/cm^2 และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ คือ complete medium ที่มีกลูโคสในปริมาณสูง (DMEM) ใช้ 10.0 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), กรดอะมิโนไม่จำเป็น(non-essential amino acid) 10 มิลลิลิตร/ลิตร, แอล-กลูตามีน(L-glutamine) 2.0 มิลลิโมล/ลิตร, แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร, เจนตาไมซิน(gentamicin) 50 มิลลิกรัม/ลิตร, HEPES 15 มิลลิโมล/ลิตร และ โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) 44 มิลลิโมล/ลิตร

3.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

เลี้ยง Caco-2 cell line ใน 96-well plate โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 500 เซลล์/ช่อง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำสารสกัดรางจืดที่เตรียมได้เจือจางด้วยแอทานอล และละลายสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อให้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ ซึ่งอยู่ในช่วง 2 ug/ml ถึง 600 ug/ml โดยใช้ DMSO 0.1% เป็นตัวอย่างควบคุม

ทำการบ่มสารสกัดใน Caco-2 cell line เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาดังกล่าวปิเปตสารสกัดออกจากเซลล์ และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปใหม่ บ่มต่อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบด้วย MTT โดยเติม MTT ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml ใน PBS ปริมาตร 50 µl ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์และ MTT ออก แล้วล้างด้วย DMSO ปริมาตร 200 µl และ Sorensen's Glycine Buffer, pH 10.5 ปริมาตร 25 µl นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร นำไปหาพล็อตกราฟ dose-response โดยพิจารณาที่ความเข้มข้นของสารสกัดจำนวน 8 ระดับ ใช้ค่าเฉลี่ยของแต่ละความระดับเข้มข้น จาก 96-well plate จำนวน 4 ช่อง แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างที่สามารถทำลายเซลล์ได้ 50% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด(ED_{50})