บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

นาโนซีโอไลต์ ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิบูลย์ พันธุ จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี ให้มีรูพรุนขนาดกลาง (2-50 นาโนเมตร) แอนโทไซยานิน สกัดจากดอกอัญชันสีน้ำเงินโดยการสกัดจะมีการตัดหมู่น้ำตาลออกด้วยการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในภาวะกรดจะได้แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) ในที่นี้จะเรียกว่าแอนโทไซยานินจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหน้าผากมนุษย์ (human forehead fibroblast cell, HFF) ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไลรัตน์ ลี้อนันต์ศักดิ์ศิริ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เซลล์มะเร็งอีพิเดอร์มอยด์เคอราติโนไซต์จากมนุษย์ (human epidermoid carcinoma cell, เซลล์เคอราติโนไซต์) จาก American Type Culture Collection (ATCC CRL-1555™, U.S.A.), fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, U.S.A), Dubecco's Modified Eagle medium (DMEM) (JR Scientific, U.S.A.), penicillin/streptomycin (BioWhittaker MD, U.S.A.). trypsin/EDTA solution (Biochrom AG, Berlin, Germany), MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, CAS number 298-93-1, Biobasic, Canada), methanol (HPLC grade, Labscan, Poland) Human IL-1α ELISA Development Kit (Peprotech, USA) FITC Annexin V อะพอพโทซิส Detection Kit I (BD Pharmingen, USA) Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, U.S.A)

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์

96-well plates (NUCN, Denmark), E-plate 96 (Roche Applied Science And Bioscience, USA), pH meter (Microcomputer pH meter TI9000, Trans Instruments, Singapore), เครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader, Bio-Rad, Model 680, USA), HPLC Pump (Waters 590 Programmable (Millipore®, U.S.A.) detector (Waters 470 Scanning Fluorescence Detector, Millipore®, U.S.A.) Column 150 x 4.6 mm, 5 μm (C18, ZORBAX SB-C18®, Agilent®, U.S.A.), Software Clatity getting started (Daraapex®, The Czech Republic), HPLC Pump (Agilent 1100, USA), detector (Agilent 1100, USA), Software HPchem (USA) Ultracentrifuge (Kubota 6200, JI0360-f000, Japan), inverted microscope (Axiovert25, Carl Zeiss Microscopy, U.S.A.), Real-Time Cell Analysis SP instrument รุ่น The xCELLigence system (Roche Applied Science And Bioscience, USA), CO_2 incubator (Waterjacket CO_2 Incubator, USA), Flow cytometry (BD FACSCalibur, USA)

3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย (methods)

วิธีดำเนินงานวิจัยนี้ประกอบด้วยกัน 4 ส่วน คือ การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังโดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง การพัฒนาวิธีวิเคราะห์แอนโทไซยานิน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) การดูดซับแอนโทไซยานินด้วยนาโนซีโอไลต์ และการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารประกอบเชิงซ้อนเมื่อดูดซับแอนโทไซยานินด้วยนาโนซีโอไลต์

3.2.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังโดยใช้เซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

เป็นการศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนังของนาโนซีโอไลต์ แอนโทไซยานินสกัดจากดอกอัญชัน และนาโนซีโอไลต์ที่มีการดูดซับแอนโทไซยานิน มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการเลือกประเภท หรือความเข้มข้นที่เหมาะสมมาเป็นข้อมูลประกอบในการเลือกผลิตภัณฑ์ในขั้นสุดท้าย โดยในที่นี้การเลี้ยงในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์หมายถึงตู้เลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5

3.2.1.1 การเตรียมเซลล์ก่อนการทดสอบ

เซลล์ที่นำมาทดสอบความเป็นพิษของผิวหนังมี 2 ชนิด คือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากหน้าผากมนุษย์ (HFF) และเซลล์มะเร็งอีพิเดอร์มอยด์เคอราติโนไซต์จากมนุษย์ (A431) ขั้นตอนในการเตรียมเซลล์จากเซลล์เพาะเลี้ยงตั้งต้นที่เลี้ยงในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ ถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4 ก่อนแยกเซลล์ออกด้วยทริปซิน (0.25%trypsin) และหยุดปฏิกิริยาของทริปซินด้วยซีรัม (10% FBS) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นถ่ายเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที (rpm) เพื่อแยกสารละลายใสออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ก่อนถ่ายลงถาดเลี้ยงเซลล์เพื่อเพาะต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ที่พร้อมสำหรับการทดสอบประกอบด้วย ซีรัมจากฟีตัสของวัว ร้อยละ 10 และเติมเพนนิซิลลิน - สเตรปโตมัยซินร้อยละ 1 เลี้ยงในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ประมาณ 10,000 เซลล์ เซลล์เคอราติโนไซต์ประมาณ 3,000 เซลล์ต่อหลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม

3.2.1.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง (cytotoxicity test)

เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เคอราติโนไซต์ ที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 3.2.1.1 มาเลี้ยงบนถาดเลี้ยงเซลล์จำนวน 96 หลุมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงเติมสารทดสอบด้วยแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ และสารประกอบเชิงซ้อนนาโนซีโอไลต์ที่ดูดซับแอนโทไซยานิน เปรียบเทียบกับสารควบคุมเชิงลบ (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.4) และใช้สารควบคุมเชิงบวก (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 10)

- วิธีการเอ็มทีที เซลล์ที่เพาะเลี้ยงต่อหลังจากสัมผัสสาร 24 ชั่วโมงแล้วเติมเอ็มทีที (3-(4, 5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ จนได้ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเข้าตู้บ่มเลี้ยงเซลล์นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงเติม DMSO เพื่อละลายผลึกของฟอร์มาซาน (formazan) อ่านค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ซึ่งเป็นผลของปฏิกิริยาด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และนำมาคำนวณหาร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% viability)

$$\%Viability = \frac{OD_{sample}}{OD_{neg}} \times 100$$

- ระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ (xCELLigence system) ศึกษาผลของการเจริญเติบโตของเซลล์หลังจากทดสอบสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับสารควบคุมเชิงลบ (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์)

โดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ จะวัดความต้านทานของระบบอิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งจะมีตัวรับสัญญาณที่อิเล็คโทรด ซึ่งจะใช้วัดการติดตาม และติดตามดูการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซลล์บนอิเล็คโทรดในทุกช่วงเวลา ทดสอบโดยเตรียมเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์ (E-plate 96) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยมีจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ประมาณ 10,000 เซลล์ เซลล์เคอราติโนไซต์ประมาณ 3,000 เซลล์ต่อหลุม นำไปวางบนอุปกรณ์ส่วน RTCA SP station ที่จะอยู่ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงจนเข้าสู่ระยะติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ จากนั้นทำการเติมสารทดสอบ ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม หลังการเทอาหารเก่าออกแล้ว โดยหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมเติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ ติดตามการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง ทำประเมินจากร้อยละจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (%viability) หลังเซลล์สัมผัสกับสารทดสอบ เทียบกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังเซลล์สัมผัสกับสารควบคุมเชิงลบ และสารควบคุมเชิงบวกโดยใช้วิธีเอ็มทีที และประเมินจากข้อมูลที่ได้จากระบบเอ็กเซลลิเจนซ์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ร้อยละ 50 ของเซลล์ทั้งหมด (IC_{50}) โดยโปรแกรม RTCA software ของแต่ละสารที่สัมผัสกับเซลล์

3.2.1.3 การทดสอบฤทธิ์การระคายเคืองต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

โดยวัดระดับของ อินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปอีไลซา (ELISA Development ตรวจสอบKit) โดยวัดหลังจากที่เซลล์รับสัมผัสสารเป็นเวลา 15 นาที และ 48 ชั่วโมง วิธีการจะทำโดยเคลือบพื้นผิวของถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุมด้วยแอนติ้บอดี้ข้ามคืน จากนั้นล้างด้วยวอช บัฟเฟอร์ (wash buffer) เติมแอนติเจน ซึ่งในที่นี้ก็คืออินเตอร์ลิวคิน – 1 แอลฟาที่เซลล์หลังออกมาหลังจากเซลล์สัมผัสกับสารทดสอบเป็นเวลา 15 นาที และ 48 ชั่วโมง ลงไปทำปฏิกิริยา ล้างส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมแอนติ้บอดี้ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ลงไปทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง ซึ่งอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟาจับอย่างจำเพาะกับแอนติบอดีของชุดทดสอบ

การประเมินฤทธิ์ระคายเคืองต่อเซลล์ผิวหนังเพาะเลี้ยง

วัดการปลดปล่อยของสารอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา โดยเปรียบเทียบกับและสารควบคุมเชิงบวก สารควบคุมเชิงบวกที่ใช้ คือ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) หากพบว่ามีการหลั่งของอินเตอร์ลิวคิน-1 แอลฟา มากกว่า 60 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร ก็จะถือว่าสารทดสอบมีฤทธิ์ระคายเคืองต่อผิวหนัง ตาม OECD guideline (OECD, 2008)

สถิติที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ซอฟท์แวร์สถิติโปรแกรม Excel คำนวณผลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลองระหว่างสารทดสอบกับสารควบคุมใช้การทดสอบ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.2.1.4 การศึกษาการชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Ven, Remaekers, Schutte, & Reutelingsperger, 1996)

การศึกษาการชักนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส ของสารทดสอบโดยการเลี้ยงเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางมิลลิเมตร โดยอาหารเลี้ยงเซลล์จะมีสารทดสอบความเข้มข้นที่ IC_{50} บ่มเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จึงนำเซลล์ออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ด้วยทริปซิน (0.25%trypsin) ล้างเซลล์ที่ได้ด้วย

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ใส่ binding buffer 100 ไมโครลิตร เติมสีย้อมแอนเน็กซินไฟว์และโพรพิเดียมไอโอไดด์ อย่างละ 5 ไมโครลิตร ผสมอยู่ให้กับเซลล์แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลีกเลี่ยงจากแสง หลังจากนั้นใส่ binding buffer เพิ่มอีก 400 ไมโครลิตร นำไปตรวจนับเซลล์ด้วยเครื่องโฟลไซโทมิเตอร์ภายใน 1 ชั่วโมง

3.2.2 วิธีวิเคราะห์แอนโทไซยานิน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

โดยหาระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์และการประเมินวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินในสารประกอบเชิงซ้อน และหาปริมาณสารสำคัญของแอนโทไซยานินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง มีขั้นตอนดังนี้

3.2.2.1 การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์

ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC-spectrofluorometry โดยอาศัย HPLC-UV spectrophotometry (Jungmin, Rennaker, & Wrolstad, 2008)

3.2.2.2 การประเมินวิธีวิเคราะห์ โดยจะทำการประเมินตามหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

1. การตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ทำการประเมินความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับพื้นที่ใต้จุดยอดที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (linear regression)

2. การตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจวัด (limit of detection, LOD) และการตรวจสอบขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection, LOD) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้ในการหาปริมาณได้ (Limit of Quantitation, LOQ) โดยฉีดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นละ 3 ครั้งเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้ยอดกับความเข้มข้นจากสมการเส้นตรงจะได้ค่าจุดตัดแกนแนวตั้ง Y(YB) แล้วฉีดสารละลายที่ไร้สารตัวอย่าง(blank) เข้า HPLC เพื่อคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ blank(SB) แล้วนำไปคานวณหาค่า LOD และ LOQ โดยคำนวณจาก LOD = 3SB + YB และ LOQ = 10SB +YB (สุวรรณา วรรัตน์, ฉันทนา อารมณ์ดี, และพิมพ์ใจ วิมุกติพันธ์, 2549)

3. การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (specificity)

เปรียบเทียบระยะเวลาการคงอยู่ (retention time) และพื้นที่ใต้ยอดของโครมาโทแกรมที่ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานเดลฟีนิดิน (delphinidine) และสารละลายแอนโทไซยานิน

4. การตรวจสอบความแม่นยำภายในวันเดียวกัน และความแม่นยำระหว่างวันของวิธีวิเคราะห์ (precision)

วิธีการทดลองความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (within-run precision)

ทำโดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้ยอดจากการฉีดสารละลายแอนโทไซยานิน 5 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 5 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย และร้อยละค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของพื้นที่ใต้ยอด ต้องไม่เกินร้อยละ 5

วิธีการทดลองความแม่นยำระหว่างวัน (between-run precision)

ทำโดยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้ยอดจากการฉีดสารละลายแอนโทไซยานิน 5 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน แล้วหาค่าเฉลี่ย และร้อยละค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนของพื้นที่ใต้ยอด ระหว่างวันที่ทำ การวิเคราะห์ค่าร้อยละค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนต้องไม่เกินร้อยละ 5

5. การตรวจสอบหาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

ทำโดยเติมสารละลายมาตรฐานที่รู้ความเข้มข้นแน่นอน คือ 50 100 และ 150 µg/ml นำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณสารมาตรฐานที่พบเทียบกับปริมาณที่เติมเข้าไป เป็นร้อยละของการกลับคืน (% recovery)

3.2.3 วิธีวัดการดูดซับแอนโทไซยานินด้วยนาโนซีโอไลต์

เขย่าผงนาโนซีโอไลต์ที่ชั่งน้ำหนัก 2 มิลลิกรัม ในแอนโทไซยานินที่ความเข้มข้น 5, 4, 3 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงแยกนาโนซีโอไลต์ออกจากแอนโทไซยานินด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหาความเข้มข้นสมดุลของสารละลาย (คือความเข้มข้นของสารละลายที่ถูกดูดซับ) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูงที่สภาวะที่ได้จากข้อ 3.2.2 นำข้อมูลไปเขียนกราฟตามสมการของแลงเมียร์ ไอโซเทอร์ม (สมการที่ 2) ซึ่งจากสมการจะทำให้สามารถหาปริมาณของแอนโทไซยานินที่ถูกดูดซับด้วยนาโนซีโอไลต์ได้เป็นปริมาณกรัมต่อกรัม ในที่นี้จะเรียกแอนโทไซยานินที่ดูดซับด้วยนาโนซีโอไลต์ ว่าสารประกอบเชิงซ้อน

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยวิธีโอแรค (Oxygen Radical Absorbance Capacity assay, ORAC assay)

เป็นวิธีการตรวจปริมาณรวมของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวัดจากความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในกลไกการทำหน้าที่รับส่งอะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer based assay) หรือคุณสมบัติในการกวาดจับสารอนุมูลอิสระ (free radical scavenging capacity) ที่เกิดขึ้นจากสาร 2,2 -azobis 2-amidino-propane dihydrochloride (AAPH) ซึ่งจะทำลายสีของฟลูโอเรสซีน (fluorescein) โดยทำให้โครงสร้างเปลี่ยนไป ส่งผลให้การเรืองแสงค่อยๆ ลดลง หากในสารทดสอบมีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ก็จะไปมีผลยับยั้งการทำลายสีฟลูโอเรสซีน จึงทำให้สียังคงเรืองแสงอยู่ ความเข้มของการเรืองแสงแปรผันตามปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในสารทดสอบ

วิธีการทดสอบนำแอนโทไซยานิน นาโนซีโอไลต์ และไปละลายด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ดูดสาร 20 ไมโครลิตร ลงในเพลท 96 หลุมสีดำ เติมสารละลายฟลูออเรสซีนที่ความเข้มข้น 120 นาโนโมลาร์ ปริมาณ 120 ไมโครลิตร ผสมเป็นเนื้อเดียวกันและอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที เติมสารละลาย AAPH ความเข้มข้น 40 นาโนโมลาร์ ปริมาณ 60 ไมโครลิตร ผสมและวัดการเรืองแสงทันทีด้วยเครื่องฟลูออเรสเซนซ์ ไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation) เท่ากับ 485 นาโนเมตร และปลดปล่อย (emission) เท่ากับ

520 นาโนเมตร หลังจากนั้นวัดทุกๆ 1 นาทีจนครบ 80 นาที รายงานค่าที่วัดได้เป็นพื้นที่ใต้กราฟด้วยโปรแกรม SoftMaxPro โดยสารควบคุม (blank) และสารละลายมาตรฐานใส่ฟอตเฟสบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 7.4 และ โทรลอกซ์ (trolox) ซึ่งเป็นอนุพันธ์วิตามินอีแทนตัวอย่าง ตามลำดับ ทุกตัวอย่างทำแบบซ้ำ 3 (triplicate) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานโดยความเข้มข้นของโทรลอกซ์ (2.5, 5, 10 , 15 20, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์) เป็นแกนเอ็กซ์ (x) และค่าพื้นที่ใต้กราฟเป็นแกนวาย (y) และทำการคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่างจากค่า พื้นที่ใต้กราฟเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ค่าสารต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ได้แสดงหน่วยเป็นไมโครโมลาร์ โทรลอกซ์ อีควิวาเลนท์ (μM Trolox Equivalents)

การศึกษาความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานิน หลังจากเมื่อมีดูดซับแอนโทไซยานินโดยนาโนซีโอไลต์แล้ว ว่าจะยังคงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระหรือไม่

3.3 สถานที่ทำการวิจัย

3.3.1 ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.3.2 ห้องปฏิบัติการเซลล์เพาะเลี้ยง คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.3.3 อาคารเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา บรมราชินีนาถ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3.4 ห้องปฏิบัติการกลาง จังหวัดขอนแก่น