

## วิธีการดำเนินการวิจัย

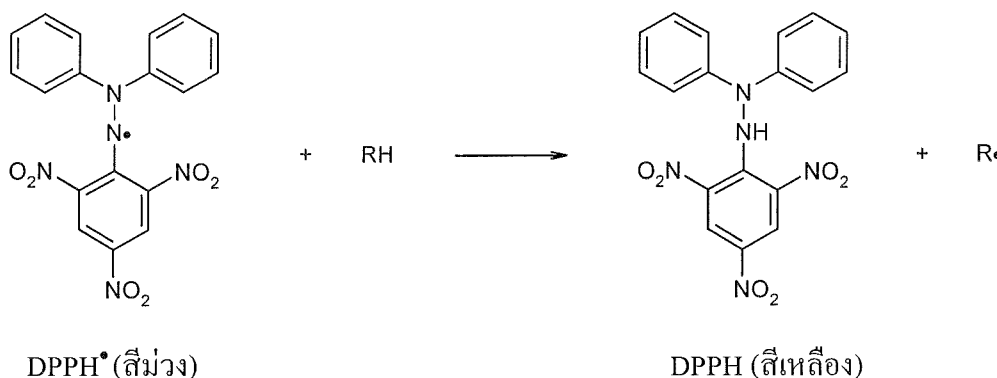
### ระเบียบวิธีวิจัย

#### 1. การสกัดสารสำคัญจากเปลือกกรากส่องฟ้าแดง

สกัดเปลือกกรากต้นส่องฟ้าแดงให้ได้สารสกัดบริสุทธิ์ตามวิธีที่รายงานแล้วโดย จินดา หวังบุญสกุล<sup>2</sup> แล้วพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเทียบกับสารสกัดบริสุทธิ์ที่มีอยู่ และด้วยเครื่อง NMR IR และ Mass spectrophotometer

#### 2. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกกรากส่องฟ้าแดงในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay<sup>16</sup>

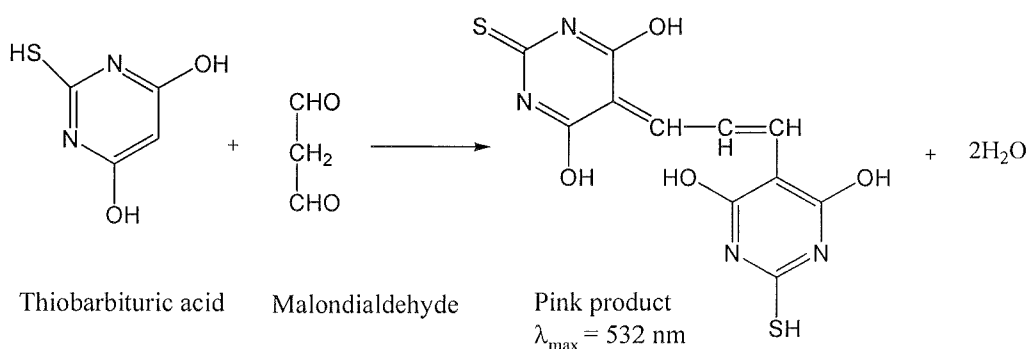
ในการทดลองนี้ใช้อนุมูล 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) เป็น substrate เพื่อใช้ในการประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกกรากส่องฟ้าแดง DPPH<sup>•</sup> เป็นอนุมูลอิสระในโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 nm ความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระจะถูกประเมินโดยทำการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ DPPH<sup>•</sup> ได้เป็น DPPH ซึ่งมีสีเหลืองดังรูป แล้วทำการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยใช้เครื่องสเปกโตรมิเตอร์วัดการลดลงของสี



#### 3. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกกรากส่องฟ้าแดงในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation โดยวิธี thiobarbituric acid<sup>17</sup>

ความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งขบวนการเกิด lipid peroxidation ของเซลล์สมองหนูถูกทดสอบโดยวิธี thiobarbituric acid assay โดยการกระตุ้นสมองหนูป้อนซึ่งถือเป็นแหล่งของไขมันให้เกิด autooxidation เพื่อให้เกิด lipid radical (ROO<sup>•</sup>, RO<sup>•</sup>) แล้วเปลี่ยนไปเป็น malondialdehyde ในที่สุด ขบวนการเกิด lipid peroxidation จะถูกประเมินโดยการวัดปริมาณของ malondialdehyde ที่เกิดขึ้น ซึ่งวิเคราะห์โดยการวัดปริมาณ product สีม่วงที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง malondialdehyde และ thiobarbituric acid ที่ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 532 nm ดังรูป

แผนงานที่ 2 ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและฤทธิ์ฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองของสารประกอบทางเคมีจากกรากส่องฟ้าแดง



#### 4. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกรากสอ่งฟ้าแดงต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ scopolamine ในหนูทดลองโดยวิธี Water Maze<sup>18</sup>

ผลของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ scopolamine ในหนูได้ถูกทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา คือ Morris Water Maze หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องโดย scopolamine และได้รับสารสกัดได้ถูกนำมาทดสอบการเรียนรู้จดจำตำแหน่งโดยให้หนูว่ายน้ำในอ่างน้ำ (water maze) แล้วให้หนูฝึกหาแผ่นรอง (platform) ที่จะเอาไว้ยืนพักเหนื่อย ประเมินความสามารถในการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำโดยการเปรียบเทียบระยะเวลาในการหาตำแหน่งของแผ่นรองก่อนและหลังการได้รับสารสกัด

#### 5. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกรากสอ่งฟ้าแดงต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ scopolamine ในหนูทดลองโดยวิธี Y-maze

ผลของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ Scopolamine ในหนูได้ถูกทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา คือ Y-maze หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องโดยการฉีด Scopolamine เข้าทาง Intraperitoneal (i.p.) และได้รับสารสกัดจะถูกนำมาทดสอบภาวะความจำบกพร่องด้วย Y-maze apparatus โดยหนูจะถูกปล่อยจากปลายแขนข้างหนึ่งของ Y-maze แล้วปล่อยให้หนูอยู่ในอุปกรณ์เป็นเวลา 8 นาที ทำการบันทึก alternation behavior (%) ของหนูทดลองเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง

#### 6. การศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกรากสอ่งฟ้าแดงต่อภาวะความจำเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการฉีด Amyloid- $\beta_{25-35}$ protein เข้าทาง intracerebroventricle ในหนู โดยวิธี Y-maze

ผลของสารสกัดต่อการฟื้นฟูประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องอันเนื่องมาจากการได้รับ Amyloid- $\beta_{25-35}$  ในหนูได้ถูกทดสอบโดยใช้โมเดลศึกษา คือ Y-maze หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องโดยการฉีด Amyloid- $\beta_{25-35}$  เข้าทาง Intracerebroventricular (i.c.v.) และได้รับสารสกัดจะถูกนำมาทดสอบภาวะความจำบกพร่องด้วย Y-maze apparatus โดยหนูจะถูก

ปล่อยจากปลายแขนข้างหนึ่งของ Y-maze แล้วปล่อยให้หนูอยู่ในอุปกรณ์เป็นเวลา 8 นาที ทำการบันทึก alternation behavior (%) ของหนูทดลองเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง

#### การทดสอบทางสถิติ

การศึกษาฤทธิ์ต่างๆ ของสารสกัดจากเปลือกรากส่องฟ้าลงในสัตว์ทดลองครั้งนี้ จะใช้ ANOVA test เพื่อดูความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุม ยามาตรฐานและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด

#### สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น