

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

ข.1 การเตรียมสารเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

ข.1.1 การเตรียมสารตัวอย่าง

ข.1.1.1 เตรียมสารละลายของสารที่สกัดได้จากเฟิน โดยชั่งส่วนสกัดมา 2 มิลลิกรัม มาละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 0.2 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข.1.1.2 เตรียมสารละลายเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากสารละลายเข้มข้นที่เตรียมในข้อ ข.1.1.1

ข.1.2 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.9 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ข.1.2.1. ชั่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 2.84 กรัม ละลายในน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ข.1.2.2. ชั่งโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 2.72 กรัม ละลายในน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ข.1.2.3. นำสารละลายทั้ง 2 เติรวมกันแล้วปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 6.90 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ข.1.3. การเตรียมซับสเตรท (substrate)

ชั่งพารา-ไนโตรฟีนิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (PNP-G) 30.1 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.90 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ข.1.4. การเตรียมเอนไซม์

ข.1.4.1. เตรียม stock solution ของเอนไซม์ โดยชั่งเอนไซม์มา 1 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.90 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร

ข.1.4.2. เตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสความเข้มข้น 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยเปิดเอนไซม์ความเข้มข้นเท่ากับ 5.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 175 ไมโครลิตร แล้วทำเป็นสารละลาย 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.90

ข.1.5. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 10.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

ข.2 วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

ข.2.1 เตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดหยาบหนัก 2 มิลลิกรัม ละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ข.2.2 เปิดสารตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท (microplate) จากนั้นใส่เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส 1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ข.2.3 เติมน้ำตาลละลายพารา-ไนโตรฟีนอล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งทำหน้าที่เป็นซับสเตรตลงไป ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 20 นาทีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ข.2.4 หยุดปฏิกิริยาด้วยโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องยูวีวิซิบิลแอมซอร์บแนนซ์ สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ไมโครเพลทรีดเดอร์ (UV/Vis absorbance spectrophotometer microplate reader) ใช้ DMSO เป็นแบลนด์ (Blank) จากนั้นเติมน้ำตาลละลายชนิดเดียวกันลงไปเหมือนกับการทดลองข้างต้น ดังแผนภาพที่ 3.3 ในบทที่ 3 ใช้อะคาร์โบส (Acarbose) เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ