

## บทที่ 2

### อุปกรณ์ เครื่องมือ สารเคมี และวิธีการวิจัย

#### 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้

- 2.1.1 Beaker ขนาด 25, 50, 100, 500, 1000 ml
- 2.1.2 Cylinder ขนาด 10,50, 100 ml
- 2.1.3 Test tube
- 2.1.4 ขวดก้านกลม 500 ml
- 2.1.5 ขวดขนาด 30 ml
- 2.1.6 Watch glass
- 2.1.7 Stirring rod
- 2.1.8 Water Bath
- 2.1.9 Wire gauze
- 2.1.10 Funnel
- 2.1.11 pH meter
- 2.1.12 96-well microplate
- 2.1.13 Microcentrifuge tube 1.5 ml
- 2.1.14 Pipette tip blue and yellow
- 2.1.15 Dropper
- 2.1.16 ถังหมัก

#### 2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- 2.2.1 เครื่องชั่งวิเคราะห์ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius CP224S, Göttingen, Germany)
- 2.2.2 Multimode Detector DTX 880 (Beckman coulter made in Ireland)
- 2.2.3 Rotary Evaporator (Buchi made in Switzerland)
- 2.2.4 Micropipette (Piperman made in France)
- 2.2.5 ตู้เย็น (Toshiba GR-A1592)
- 2.2.6 ตู้อบ (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

2.2.7	ตู้ควบคุมอุณหภูมิ	(คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
2.2.8	เตาไฟฟ้า	(คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
2.2.9	Vortex mixer	(คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)
2.2.10	pH meter	(คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

### 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 2.3.1 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
- 2.3.2 Absolute ethanol
- 2.3.3 Ascorbic acid
- 2.3.4 Alpha-tocopherol
- 2.3.5 EDTA
- 2.3.6 Ferrozine
- 2.3.7 Ferric chloride ( $\text{FeCl}_2$ )
- 2.3.8 Linoleic acid
- 2.3.9 Ammonium thiocyanate ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ )
- 2.3.10 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 2.3.11 Reverse osmosis water
- 2.3.12 Glycerin
- 2.3.13 Brown sugar
- 2.3.14 sulforhodamine B
- 2.3.15  $\alpha$ -MEM medium
- 2.3.16 Trichloroacetic acid
- 2.3.17 Glacial acetic acid
- 2.3.18 Tris (hydroxy methyl)-methylamine
- 2.3.19 Fetal bovine serum

## 2.4 วิธีการวิจัย

### 2.4.1 เตรียมตัวอย่างพืช

พืชสมุนไพรที่คัดเลือกมาทำการวิจัยจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ บอระเพ็ด ลิ้นจี่ ลำไย ว่านชักมดลูก มังคุด และ ตะลิงปลิง ซึ่งมีรายงานวิจัยแล้วว่าสารสกัดของพืชดังกล่าว มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านมะเร็งมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ โดยพืชดังกล่าวจะถูกนำมาทำความสะอาดด้วยวิธีการที่เหมาะสม เช่น ล้างน้ำสะอาด ลดขนาด และนำไปหมัก

### 2.4.2 การหมักพืชสมุนไพร

นำพืชสมุนไพรมาหมักโดยใช้วิธีการมาตรฐาน คือ ใช้น้ำแบบ Reverse osmosis, น้ำตาลแดง ในการหมัก ในอัตราส่วน พืช: น้ำ : น้ำตาล เท่ากับ 1 : 10 : 1 (สำหรับว่านชักมดลูกและบอระเพ็ด) และ 3 : 10 : 1 (สำหรับมังคุด ลิ้นจี่ ลำไย และ ตะลิงปลิง) หรือ อัตราส่วนอื่นๆ ที่ชาวบ้านใช้จริงโดยทำการเก็บตัวอย่าง ที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 เดือน โดยทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมดอย่างน้อย 18 ตัวอย่าง

### 2.4.3 การทดสอบสมบัติทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมัก

นำน้ำหมักที่ได้ในแต่ละช่วงเวลามาทดสอบดังหัวข้อต่อไปนี้ โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์น้ำหมักที่มีจำหน่ายในท้องตลาดที่ผู้บริโภคนิยมใช้

- ทางกายภาพ สังเกตสี กลิ่น รส และปริมาณฟองก๊าซ
- ทางเคมี วัดค่าความเป็นกรด ต่าง
- ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีต่างๆมีกลไกที่แตกต่างกัน เช่น 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, lipid peroxidation inhibition และ metal chelating เป็นต้น

#### 2.4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ Free radical scavenging โดยวิธี DPPH scavenging

- การเตรียมสารละลายต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน  
นำสารมาตรฐาน Ascorbic acid มาละลายใน 95%ethanol ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.001-0.5 mg/ml โดยเตรียมให้ได้อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น
- การเตรียมตัวอย่างสารสกัดเห็ด  
นำสารสกัดเห็ดมาละลายในน้ำให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05-500 mg/ml
- การเตรียมสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา  
นำ 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) มาละลายใน 95%ethanol ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 mg/ml
- ขั้นตอนการทดลอง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ



เติมสารละลาย ลงใน 96-well microplate ดังแสดงในตาราง

	A	B	C	D
EtOH	50µl	DPPH 50µl	EtOH 50µl	DPPH 50µl
EtOH	100µl	EtOH 100µl	Sample 100µl	Sample 100µl



บ่มที่อุณหภูมิ 28±2°C เป็นเวลา 30 นาที



วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm



คำนวณ % Free radical scavenging activity จากสมการ

$$\% \text{ free radical scavenging activity} = \frac{(A-B)}{(A)} \times 100$$

โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Samples



คำนวณค่า Concentration providing 50% scavenging (SC<sub>50</sub>)

ผลการทดสอบฤทธิ์ Free radical scavenging โดยวิธี DPPH scavenging

#### 2.4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ Metal ion chelating

- การเตรียมสารละลายต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน  
นำสารมาตรฐาน EDTA มาละลายใน DMSO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.01-2.5 mg/ml โดยเตรียมให้ได้อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น
- การเตรียมตัวอย่างสารสกัดเห็ด  
นำสารสกัดเห็ดทั้ง 4 ตัวอย่างมาละลายใน 95% ethanol หรือให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05-500 mg/ml
- การเตรียมสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา  
สำหรับปฏิกิริยา metal ion chelating จะมีการใช้ ferrozine ในปฏิกิริยา จะต้องนำ ferrozine มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 mM
- ขั้นตอนการทดลอง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ

↓  
 เติมนสารละลาย ลงใน 96-well microplate ดังแสดงในตาราง

A		B		C		D	
ferrozine	10 µl	ferrozine	10 µl	ferrozine	10 µl	ferrozine	10 µl
DMSO	100µl	DMSO	100µl	sample	100µl	sample	100µl
Distilled water	50µl	Distilled water	50µl	Distilled water	50µl	Distilled water	50µl
Distilled water	10µl	FeCl <sub>2</sub>	10µl	Distilled water	10µl	FeCl <sub>2</sub>	10µl

↓  
 บ่มที่อุณหภูมิ 28±2°C เป็นเวลา 10 นาที

↓  
 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

↓  
 คำนวณ % inhibition of activity จากสมการ

$$\% \text{ metal ion chelating activity} = \frac{(A-B)}{(A)} \times 100$$

โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Samples

↓  
 คำนวณค่า Concentration providing 50% metal ion chelating activity(MC<sub>50</sub>)

#### 2.4.3.3 การทดสอบฤทธิ์ Inhibition of lipid peroxidation

- การเตรียมสารละลายต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน  
 นำสารมาตรฐาน Alpha-tocopherol มาละลายใน 95%ethanol ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.001-0.5 mg/ml โดยเตรียมให้ได้อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น
- การเตรียมตัวอย่างสารสกัดเห็ด  
 นำสารสกัดเห็ดทั้ง 40 ตัวอย่างมาละลายใน 95%ethanol หรือน้ำให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05-500 mg/ml
- การเตรียมสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา  
 สำหรับปฏิกิริยา Inhibition of lipid peroxidation จะมีการใช้ linoleic acid emulsion, ammonium thiocyanate และ ferrous chloride ในปฏิกิริยา จะต้องนำ linoleic acid มาละลายใน 50% DMSO เพื่อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5µl/ml ส่วน ammonium thiocyanate นำมาละลายน้ำให้มีความ

เข้มข้นเท่ากับ 5 mM และ ferrous chloride เตรียมใน 2.4% HCl ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 mM

- ขั้นตอนการทดลอง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารสกัดสมุนไพรที่มีความเข้มข้นต่างๆ



เติมสารละลาย ลงใน 96-well microplate ดังแสดงในตาราง

A		B		C		D	
linoleic acid	50 µl						
EtOH	100µl	EtOH	100µl	sample	100µl	sample	100µl
NH <sub>4</sub> SCN	50 µl						
Distilled water	50µl	FeCl <sub>2</sub>	50µl	Distilled water	50µl	FeCl <sub>2</sub>	50µl



บ่มที่อุณหภูมิ 37±2°C เป็นเวลา 60 นาที



วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 nm



คำนวณ % inhibition of activity จากสมการ

$$\% \text{ inhibition of lipid peroxidation activity} = \frac{(A-B)}{(A)} \times 100$$



โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ blank และ B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Samples  
คำนวณค่า Concentration providing 50% inhibition of lipid peroxidation (IPC<sub>50</sub>)

## 2.4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ

### 2.4.4.1 การหาปริมาณ phenolic content

- การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้ Gallic acid เป็นสารมาตรฐาน และเตรียมสารละลายมาตรฐานอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น

- การเตรียมตัวอย่างสารสกัดแห้ง

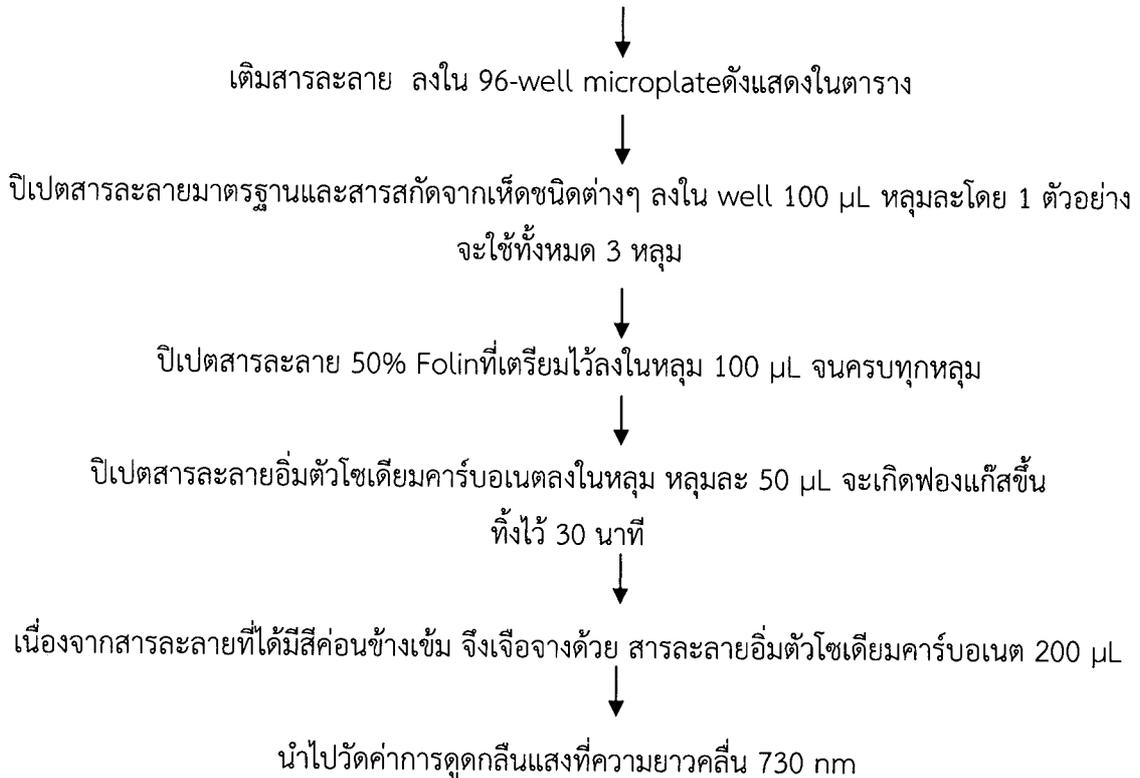
นำสารสกัดแห้งทั้ง 36 ตัวอย่างมาละลายใน 95% ethanol หรือน้ำ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05-500 mg/ml

- การเตรียมสารเคมีที่ใช้ทำปฏิกิริยา

เตรียมสารละลาย 50% Folin และ สารละลายโซเดียม คาร์บอเนต

- ขั้นตอนการทดลอง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน และสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ



#### 2.4.5 คัดเลือกน้ำหมักและทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง

คัดเลือกน้ำหมักที่มีสมบัติทางกายภาพ เคมี และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด อย่างน้อย 3 ชนิด โดยใช้ผลทางสถิติ one-way ANOVA มาทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ในหลอดทดลอง อย่างน้อย 3 cell lines เช่น มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งลำไส้ใหญ่ และ มะเร็งตับ เป็นต้น นอกจากนี้ยังทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติของร่างกาย เช่น เซลล์ผิวหนัง (skin fibroblast) หรือเซลล์จากทางเดินอาหาร เป็นต้น ด้วยวิธี sulforhodamine B colorimetry assay เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (ยารักษา มะเร็ง) และน้ำหมักที่ชาวบ้านนิยมบริโภคและมีการจำหน่ายในราคาแพงตามที่โฆษณา ทั้งน้ำหมักแบบพืชเดี่ยว และน้ำหมักที่ใช้พืชผสม โดยมีวิธีการดังนี้

##### 2.4.5.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่าง

- ละลายสารมาตรฐาน ascorbic acid ใน  $\alpha$ -MEM medium ให้มีความเข้มข้น 1, 10, 100, 500 และ 1,000 mg/ml
- นำสารสกัดพืชชนิดต่างๆ มาละลายด้วย  $\alpha$ -MEM medium ให้มีความเข้มข้น 1, 10, 100, 500 และ 1,000 mg/ml

##### 2.4.5.2 การเตรียมสารละลายต่างๆ

- 50% TCA

Trichloroacetic acid	500 g
Distilled water	1,000 ml

นำ trichloroacetic acid มาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml แล้วใส่ในขวดที่ปิดสนิทและนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น

- 0.4% w/v sulforhodamine B (SRB)

Sulforhodamine B	1 g
1% acetic acid	250 ml

นำ sulforhodamine B มาละลายใน 1% acetic acid แล้วใส่ในขวดที่ปิดสนิท และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น

- 1% acetic acid

Glacial acetic acid	10 ml
Distilled water	990 ml

นำ glacial acetic acid มาผสมกับน้ำกลั่นแล้วเก็บในขวดที่ปิดสนิท

- 10 mM Tris Base (Tris)

Tris (hydroxy methyl)-methylamine	1.211 g
Distilled water	1000 ml

นำ tris (hydroxyl methyl)-methylamine มาละลายในน้ำกลั่นและปรับ pH ให้เป็น 10.5 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml แล้วใส่ในขวดที่ปิดสนิทแล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น

- Complete medium : MEM medium

Incomplete medium (MEM)	100 ml
Fetal bovine serum	10 ml
Pen-strep	1 ml

นำ incomplete medium, fetal bovine serum, pen-strep และ l-glutamine มาผสมกัน จากนั้นเก็บใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วปิดฝาให้สนิทและเก็บในตู้เย็น (สามารถเก็บไว้ใช้ได้ประมาณ 1 เดือน)

### 2.4.5.3 การเตรียมเซลล์

1. นำ cryo-tube ที่มีเซลล์มาละลาย
2. นำเซลล์จาก cryo-tube มา 1 ml ใส่ใน culture flask ขนาด 5 ml แล้วเติม complete medium ปริมาตร 5 ml ลงไปใน culture flask
3. นำไป incubate ในตู้ 5% CO<sub>2</sub> incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำ culture flask มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์มีการเจริญจนเกือบเต็ม

พื้นที่ของ culture flask หรือ 80% ของพื้นที่ ให้ใช้ pipette ขนาด 5 ml นำ media มาชะให้เซลล์หลุดออกจากกัน culture flask

5. นำ cell suspension มา 2.5 ml ใส่ใน culture flask แล้วนำ complete medium ใส่ลงไป culture flask ปริมาตร 2.5 ml
6. นำไป incubate ในตู้ 5% CO<sub>2</sub> incubator อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 คืน

#### 2.4.5.4 วิธีการทดสอบ

1. นำ culture flask มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อ cell มีการเจริญได้ประมาณ 80% ของพื้นที่ ให้ดูดชะ cell ให้หลุดออกจากกัน flask
2. นำ cell suspension ที่ได้มาใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 ml แล้วนำไป centrifuge ที่ 1,500 rpm, 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
3. นำ supernatant ทิ้งไป แล้วเติม complete medium ลงไป 1 ml แล้วเขย่าให้เข้ากัน และนำไปนับจำนวน cell โดยใช้ haemocytometer แล้วนำ cell suspension ใส่ลงไป 96-well plate ให้มีจำนวน cell เท่ากับ 10,000 cells/well
4. เติม complete medium ลงไปให้มี final volume เท่ากับ 200 µl
5. นำไป incubate ในตู้ CO<sub>2</sub> incubator อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. เติมสารละลายความเข้มข้นต่างๆลงไป well
7. นำไป incubate ในตู้ CO<sub>2</sub> incubator อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
8. เติม 50% TCA ลงไป 50 µl/well แล้วนำไป incubate ที่ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
9. ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
10. เติม 0.4% SRB ลงไป 100 µl/well แล้วทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
11. นำ 0.4% SRB ออก แล้วล้างด้วย 1% acetic acid 7-8 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
12. เติม tris solution 100 µl เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่า OD ที่ 540 nm

#### 2.4.5.5 วิธีคำนวณ

- Inhibition concentration ที่ 50 % หรือ ค่า IC<sub>50</sub> เป็นการประมาณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ที่ทดสอบตายไป 50 % ซึ่งได้จากสมการของกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและค่า % cell viability
- การคำนวณ cell viability

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{Treated}}{\text{Control}} \times 100$$

เมื่อ Treated cell = ค่า OD ของกลุ่มตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง  
Control cell = ค่า OD ของกลุ่มควบคุม

จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % cell viability และความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อนำมาเปรียบเทียบการรอดชีวิตของเซลล์จากความเป็นพิษของสารสกัด

2.4.6 เขียนรายงาน / เสนอผลงานวิจัย / ตีพิมพ์ผลงานวิจัย / ถ่ายทอดความรู้