บทที่ 2
ขั้นตอนและวิธีการศึกษา

แบ่งเป็นการศึกษา 2 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง และส่วนที่สองเป็นการศึกษาในกลุ่มอาสาสมัครผู้สูงอายุ โดยมีรายละเอียดดังนี้ คือ

1. การศึกษาในหลอดทดลอง

1.1. การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ (Bioactive compounds) ในสารสกัดเสาวรสทั้งชนิดเปลือกสีม่วงและสีเหลือง

1.2. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินต่างๆ ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี และเบตา-แคโรทีน ในน้ำเสาวรส โดยการวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ห้องวิจัยของแขนงวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์

1.3. การวิเคราะห์หาปริมาณของ Total phenolic, Total flavonoid และ Total tannin ในน้ำเสาวรส โดยการตรวจวัดด้วยวิธี Spectrophotometry ที่ห้องวิจัยของแขนงวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์

1.4. การตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำเสาวรส ด้วยวิธี ATBS decolorization, H_2O_2 scavenging และ DPPH radical scavenging ที่ห้องวิจัยของแขนงวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ ด้วยวิธี Spectrophotometry

1.5. การตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของน้ำเสาวรส ด้วยวิธี Nitric oxide scavenging ที่ห้องวิจัยของแขนงวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ ด้วยวิธี Spectrophotometry

2. การศึกษาในกลุ่มอาสาสมัครผู้สูงอายุ

2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินต่างๆ ได้แก่ วิตามินเอ วิตามินซี และวิตามินอี ในซีรัม โดยการวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ห้องวิจัยของแขนงวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์

2.2 การตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ATBS decolorization, Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP), Superoxide dismutase activity (SOD activity), Catalase activity, Glutathione (GSH), Malondialdehyde (MDA) ที่ห้องวิจัยของแขนงวิชาเคมีคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ ด้วยวิธี Spectrophotometry

2.3 การตรวจวัดฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ด้วยวิธี Nitric oxide scavenging, วัดระดับ Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) และระดับ Tumor necrotic factor-α (TNF-α) ที่ห้องวิจัยของแขนงวิชาเคมีคลินิกและแขนงวิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ ด้วยวิธี Spectrophotometry

1. การศึกษาในหลอดทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดจากเนื้อเสาวรส

ซื้อผลเสาวรสทั้งชนิดเปลือกสีเหลืองและสีม่วงจากตลาดสดในจังหวัดเชียงใหม่ นำส่วนที่เป็นเนื้อมาสกัดด้วยน้ำและ 80% เอทานอล สำหรับเสาวรสที่สกัดด้วย 80% เอทานอลจะนำไประเหยเอาเอทานอลออกก่อนโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator จากนั้นนำสารสกัดทั้งที่สกัดด้วยน้ำและ 80% เอทานอล (ที่ระเหยเอาเอทานอลออกแล้ว) ไประเหิดแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer เก็บสารสกัดที่ได้หลังการระเหิดแห้งแล้วที่ -20 °C เพื่อเก็บไว้ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์ต่อไป

2. การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ (Bioactive compounds) ในสารสกัดเสาวรสทั้งชนิดเปลือกสีม่วงและสีเหลือง[23]

นำสารสกัดที่ผ่านการระเหิดแห้งแล้วทั้งชนิดเปลือกสีเหลืองและเปลือกสีม่วง ที่สกัดด้วยน้ำและ 80% เอทานอล มาทำการละลายกลับที่ความเข้มข้น 20 mg/ml นำไปผ่าน Solid phase extraction (SPE) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวชะ นำสารที่ได้หลังจากการผ่าน SPE แล้วไประเหยแห้ง แล้วทำการละลายกลับด้วยเมทานอลอีกครั้ง นำสารที่ได้ไปวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ (Bioactive compounds) ที่อยู่ในเสาวรส โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยสารสกัดและสารมาตรฐานจะถูกละลายด้วยเมทานอลและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1100 Series diode-array detector) โดยมี mobile phase เป็น water: 0.4% acetic acid: methanol: acetronitrile อัตราส่วน 70:20:5:5/ v:v:v:v คอลัมน์ชนิด ODS Hypersil (250 × 4 mm, 5 μm) อัตราการไหลเท่ากับ 0.7 ml/min ที่ความยาวคลื่น 250 nm เทียบกับสารมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน เอ วิตามิน ซี วิตามิน อี และเบต้า-แคโรทีน[24, 25]

3.1 วิเคราะห์หาปริมาณของวิตามิน ซี[24] ด้วย HPLC-UV โดยใช้เมทานอล (HPLC grade) เป็น mobile phase โดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 1 ml/min และวัดที่ความยาวคลื่น 254 nm ใช้คอลัมน์ชนิด Reverse phase – C18 (250 × 4.6 × 5.0 mm, 5 μm, Phenomenex) โดยการวิเคราะห์ในตัวอย่างสารสกัดเสาวรสที่ละลายกลับด้วยด้วยน้ำ และทำการกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.25 μm ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในปริมาณ 20 μl ปริมาณของวิตามิน ซี ในสารสกัดเสาวรสจะคำนวณโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามิน ซี

3.2 วิเคราะห์หาปริมาณของวิตามิน เอ และวิตามิน อี[25] ด้วย HPLC-UVการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน เอ จะใช้เมทานอล (HPLC grade) เป็น mobile phase อัตราการไหลเท่ากับ 1 ml/min ที่ความยาวคลื่น 324 nm ด้วยคอลัมน์ชนิด Reverse phase – C18 (250 × 4.6 × 5.0 mm, 5 μm, Phenomenex)

การวิเคราะห์วิตามิน อี จะทำการสกัดสารสกัดเสาวรส (Lyophilized) ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ในปริมาณ 1:1 (v/v) แล้วทำการสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ในปริมาณ 1:1 (v/v) อีกครั้ง นำส่วนบนที่มีวิตามินไปทำการระเหยแห้งด้วยการปั่นที่ความเร็วสูง (Speed vacuum) จนแห้ง จากนั้นนำ mobile phase มาทำการละลายก่อนนำไปกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 μm แล้วจึงฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในปริมาณ 20 μl ใช้เมทานอล (HPLC grade) เป็น mobile phase อัตราการไหลเท่ากับ 1 ml/min ที่ความยาวคลื่น 291 nm ปริมาณของวิตามิน อี และวิตามิน เอ ในสารสกัดเสาวรส จะคำนวณโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามิน เอ และวิตามิน อี

3.3 วิเคราะห์หาปริมาณของเบต้า-แคโรทีน[25]

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของเบต้า-แคโรทีนด้วย HPLC-UV โดยใช้เมทานอล (HPLC grade) เป็น mobile phase อัตราการไหลเท่ากับ 1 ml/min และวัดที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยคอลัมน์ชนิด Reverse phase – C18 (250 × 4.6 × 5.0 mm, 5 μm, Phenomenex) นำสารสกัดเสาวรสไปปั่นและกรองด้วยตัวกรองที่มีขนาด 0.2 μm นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ในปริมาณ 20 μl ปริมาณของเบต้า-แคโรทีนในสารสกัดเสาวรสจะคำนวณโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเบต้า-แคโรทีน

4. การวิเคราะห์หาปริมาณ Total phenolic[26]

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของ total phenolic ด้วย Folin-Ciocalteu reagentโดยใช้สารสกัดเสาวรสที่เจือจางแล้วปริมาณ 50 μl ผสมกับสาร Folin-Ciocalteu reagent (ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:10) จำนวน 2,500 μl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 7.5% w/v) ในปริมาณ 2,000 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 764 nm คำนวณปริมาณฟีนอลรวมในสารสกัดเสาวรส โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid โดยรายงานผลเป็น ไมโครกรัมของ gallic acid ต่อหนึ่งกรัมของสารสกัด (μg GAE/g extract)

5. การวิเคราะห์หาปริมาณ Total flavonoid[27]

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของ total flavonoid ด้วยวิธี aluminium chloride โดยใช้สารสกัดเสาวรส ความเข้มข้น 100 mg/ml ปริมาณ 500 µl ผสมกับเอทานอล จำนวน 1,500 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10% (10% aluminum chloride) ในปริมาณ 100 µl เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 100 µl (1 M CH_3COONa) แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาณ 2,800 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดเสาวรส โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin (ละลายในเมทานอล) โดยรายงานผลเป็น µg ของ quercetin ต่อหนึ่งกรัมของสารสกัด (µg QE/g extract)

6. การวิเคราะห์หาปริมาณ Total tannin[28]

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของ total tannin ด้วย Folin-Denis reagent โดยใช้สารสกัดเสาวรสความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาณ 100 µl ผสมกับสาร Folin-Denis ปริมาณ 500 µl ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3 0.5% w/v) ในปริมาณ 1,000 µl แล้วเติมน้ำกลั่น 3,400 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 755 nm ภายใน 30 นาที คำนวณปริมาณแทนนินรวมในสารสกัดเสาวรส โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน tannic acid โดยรายงานผลเป็น µg ของ tannic acid ต่อหนึ่งกรัมของสารสกัด (µg TE/g extract)

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

7.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant activity)[29]

โดยใช้วิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) decolorization assay โดยเติมสารสกัดเสาวรสที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 10 µl ในสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ radical (เตรียมจากการผสม ABTS (14 mM) และ potassium persulfate (5 mM) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในที่มืดที่ 4 °C) ปริมาณ 990 µl โดยสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ radical ก่อนเติมสารสกัดควรมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 734 nm เท่ากับ 0.7 (คลาดเคลื่อนได้ไม่เกิน ± 0.02) หลังจากที่เติมสารสกัดแล้วทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงทุกๆ 1 นาที ต่อเนื่องเป็นเวลา 3 นาที คำนวณอัตราการลดลงของ (ΔA/min) แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (Total antioxidant capacity) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

7.2 การทดสอบฤทธิ์กำจัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2 scavenging assay)[30]

การทดสอบฤทธิ์กำจัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ของสารสกัดเสาวรสดัดแปลงวิธีมาจากวิธีของ Büyükbalci and Ei โดยใช้สารสกัดเสาวรสที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 100 µl เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (0.003%) ปริมาณ 80 µl ผสมให้เข้ากันแล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 (0.1 mM PBS pH 6.0) ปริมาณ 800 µl เติมเพอร์ออกซิเดส (10 U/ml peroxidase) ปริมาณ 100 µl ผสมให้เข้ากัน สุดท้ายเติมสารละลาย ABTS (0.1% ABTS) ปริมาณ 800 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 10 นาที ครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ผลจะรายงานในรูปของเปอร์เซ็นต์การกำจัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Percentage of H_2O_2 scavenging) เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

7.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[31]

โดยใช้วิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging assayเติมสารสกัดเสาวรสปริมาณ 50 µl ลงในสารละลาย DPPH (6.4 mg DPPH ใน 100 µl เอทานอล) นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm ฤทธิ์ในการกำจัด DPPH radicals จะถูกคำนวณโดยใช้สูตร

$$\text{DPPH}^{\bullet}\ \text{scavenging activity (\%)} = \frac{(\text{Absorbance of blank} - \text{Absorbance of sample}) \times 100\%}{(\text{Absorbance of blank})}$$

7.4 การทดสอบฤทธิ์กำจัด Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$ scavenging activity assay)[32]

ใช้วิธี Deoxyribose methodเป็นการศึกษาความสามารถในการยับยั้ง $OH^{\bullet}$ radical ของสารตัวอย่าง โดยเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution) pH 7.4 ดีออกซีไรโบส (33.6 mM Deoxyribose) และน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 35 µl ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (33.6 nM H_2O_2), 1.2 mM EDTA, 300 µM $FeCl_3$ และสารสกัดที่เจือจางไว้แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 35 µl ตามลำดับ จากนั้นเติม 1.2 mM ascorbic acid 35 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม thiobarbituric acid และ 2.8% w/v trichloroacetic acid ปริมาตร 350 µl ลงไปตามลำดับ ผสมให้เข้ากันและนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 nm ผลรายงานในรูปของเปอร์เซ็นต์การกำจัด hydroxyl radical (Percentage of $OH^{\bullet}$ scavenging) เทียบกับสารมาตรฐาน quercetin

8. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ[33]

โดยวิธี Nitric oxide scavengingการยับยั้ง NO radical ถูกประเมินโดยใช้ปฏิกิริยา Griess Illosvoy ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ถูกดัดแปลงโดยใช้ N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride (0.1% w/v) แทน 1-napthylamine (5%) โดย reaction mixture ปริมาณ 3 ml จะประกอบด้วยโซเดียมไนโตรปรัสไซด์ (10 mM sodium nitroprusside) จำนวน 2 ml PBS pH 7.4 จำนวน 0.5 ml และสารสกัดเสาวรสหรือสารมาตรฐาน จำนวน 0.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 150 นาที เมื่อครบเวลาเติม reaction mixture ปริมาณ 0.5 ml ลงในสารละลายกรดซัลฟานิลิก (1.0 g sulfanilic acid in 2.5% H_3PO_4) ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้เกิด diazotization สมบูรณ์ เมื่อครบเวลาเติม N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride (NED) ปริมาณ 1 ml ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 537 nm ผลจะถูกแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (Percent of inhibition) โดยมี gallic acid เป็นสารมาตรฐาน

2. การศึกษาในกลุ่มอาสาสมัครผู้สูงอายุ

ทำการศึกษาในอาสาสมัครผู้สูงอายุทั้งเพศชายและเพศหญิงที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไป ที่อยู่ในเขตอำเภอเมืองเชียงใหม่ (ภายใต้การดูแลของศูนย์ปิยะมาลย์และบ้านธรรมปกรณ์) และเป็นผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรงไม่มีภาวะของโรคร้ายแรง (จากการตรวจของแพทย์) เริ่มต้นจะทำการตรวจร่างกายของอาสาสมัครโดยแพทย์ จากนั้นจะทำการเจาะเลือดจำนวน 10 ml เพื่อตรวจวัด ความสมบูรณ์ของเลือด (Complete blood cell count; CBC) และตรวจ Blood Chemistry (Glucose, BUN, Creatinine, Cholesterol, Triglyceride, HDL, LDL, Total protein, Albumin, Globulin, Total bilirubin, Direct bilirubin, Indirect bilirubin, AST, ALT, Alkaline phosphatase และ Uric acid) เพื่อใช้ประกอบการตรวจร่างกายเบื้องต้น จากนั้นแบ่งกลุ่มอาสาสมัครออกเป็น 1. เพศชายที่บริโภคน้ำเสาวรสชนิดเปลือกสีม่วง 2. เพศชายที่บริโภคน้ำเสาวรสชนิดเปลือกสีเหลือง 3. เพศหญิงที่บริโภคน้ำเสาวรสชนิดเปลือกสีม่วง 4. เพศหญิงที่บริโภคน้ำเสาวรสชนิดเปลือกสีเหลือง โดยในแต่ละกลุ่มจะมีอาสาสมัครกลุ่มละ 15 คน ให้อาสาสมัครดื่มน้ำเสาวรสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยดื่มวันละ 1 ครั้งหลังจากรับประทานอาหารกลางวันแล้ว ปริมาณที่ดื่ม 1 แก้ว (ประมาณ 125 ml) เมื่อครบเวลาทำการเจาะเลือดจำนวน 10 ml แล้วนำมาตรวจวัดความสมบูรณ์ของเลือด และตรวจ Blood Chemistry

นอกจากนี้เลือดทั้งก่อนและหลังการดื่มน้ำเสาวรสจะนำมาตรวจวัดปริมาณวิตามิน (วิตามินเอ ซี และอี) วัดปริมาณ Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) และ Tumor necrotic factor-α (TNF- α) ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยตรวจวัด ABTS decolorization assay, Glutathione, Superoxide

dismutase activity, Catalase activity, Malondialdehyde และ Ferric reducing antioxidant power assay และศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบโดยวิธี Nitric oxide scavenging

1. การตรวจวัดความสมบูรณ์ของเลือด (Complete blood cell count; CBC)

ตรวจวัดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

2. การตรวจ Blood chemistry

ตรวจวัดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Olympus AU680

3. การตรวจวัดระดับวิตามิน

วิตามิน ซี วิตามิน อี วิตามิน เอ

4. การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ABTS decolorization assay, Glutathione, Superoxide dismutase activity, Catalase activity, Malondialdehyde และ Ferric reducing antioxidant power assay

4.1 ABTS decolorization assay ดังกล่าวข้างต้น

4.2 การตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ Catalase (Erythrocyte catalase assay)

ใช้วิธีของ Aebi[34] เป็นการตรวจหาไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่สลายตัว โดยการนำ Packed red cell ที่ปั่นล้างด้วย 0.85% Normal saline (0.85% NSS) ปริมาตร 200 µl นำมาเติมน้ำกลั่น 1,200 µl ผสมให้เข้ากัน จะได้ lysate ออกมา จากนั้นดูด lysate 10 µl ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 4,990 µl จะได้เป็น diluted lysate ทำการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ catalase โดยใช้ diluted lysate ปริมาตร 2,000 µl ผสมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (0.34% w/v H_2O_2) 1,000 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 240 nm โดยวิธี kinetic method

4.3 การตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์ Superoxide dismutase (Erythrocyte superoxide dismutase assay)

ใช้วิธีของ Xin และคณะ[35] โดยการนำ Packed red cell ที่ปั่นล้างด้วย 0.85% Normal saline (0.85% NSS) ปริมาตร 100 µl นำมาเติมน้ำกลั่น 900 µl ผสมให้เข้ากัน จะได้ lysate ออกมา จากนั้นดูด lysate 60 µl ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 940 µl จะได้เป็น diluted lysate ทำการตรวจวัด

การทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase โดยใช้ diluted lysate ปริมาตร 188 µl ผสมกับ cocktail solution (Na_2CO_3 + $NaHCO_3$ + Xanthine + Iodonitrotetrazolium Violet) ปริมาตร 2,540 µl และ Xanthine Oxidase ปริมาตร 150 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm โดยวิธี kinetic method

4.4 การทดสอบความสามารถในการรีดิวส์ Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} (Ferric reducing antioxidant power assay)

ใช้วิธีของ Benzie และ Strain[36] เป็นการทดสอบความสามารถในการรีดิวส์เฟอร์ริก (Fe^{3+}) เป็นเฟอร์รัส (Fe^{2+}) ใน microplate reader โดยใช้ซีรัม 5 µl ทำปฏิกิริยากับ cocktail solution (300 mM acetate buffer : TPTZ : $FeCl_3.6H_2O$) ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 ปริมาตร 150 µl จากนั้นเติมน้ำกลั่น 15 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm ที่ 0 นาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 µl ที่ 4 นาที คำนวณโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน $FeSO_4$

4.5 การตรวจวัดปริมาณ Reduced glutathione (GSH)

ใช้วิธีของ Beutler และคณะ[37] การตรวจวัดปริมาณรีดิวส์กลูตาไธโอน ใช้ Whole blood ปริมาตร 400 µl ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 µl และ precipitant solution 1,600 µl จะได้ส่วน supernatant จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 จะได้ส่วน clear supernatant ใช้ clear supernatant ปริมาตร 500 µl ผสมกับฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.4 ปริมาตร 500 µl และ DTNB reagent ปริมาตร 500 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nm ภายในเวลา 5 นาที คำนวณโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกลูตาไธโอน

4.6 การวัดปริมาณ Malondialdehyde (MDA)

ใช้วิธีของ Santos และคณะ[38] การวัดปริมาณ malondialdehyde ใช้ซีรัมปริมาตร 250 µl ผสมกับ phosphoric acid (0.44 M H_3PO_4) 750 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม thiobarbituric acid ปริมาตร 250 µl นำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 30 นาที ได้สารประกอบสีชมพู นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 nm คำนวณโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane (TMP)

5. การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านการอักเสบ

วิเคราะห์หาปริมาณ Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) และ Tumor necrotic factor-alpha (TNF-α) โดยใช้ ELISA kit ของ BioLegend's ELISA MAX™ Deluxe Sets

5.1 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Interleukin-6 (IL-6)

โดยใช้หลักการ Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยติด human IL-6 specific monoclonal antibody บน 96-well plate เติมซีรัมต้องการทดสอบลงไป 100 ไมโครลิตรในหลุมทดสอบ IL-6 ในซีรัมจะไปจับกับแอนติบอดี จากนั้นเติม biotinylated anti-human IL-6 detection antibody 100 µl ในทุกหลุมทดสอบ จะเกิด antibody-antigen-antibody เรียกว่า sandwich จากนั้นเติม avidin-horseradish peroxidase 100 µl ลงไปในทุกหลุมทดสอบ และเติม TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) substrate solution 100 µl ลงไปในทุกหลุมทดสอบ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารสีน้ำเงินหากมี IL-6 ในสารตัวอย่าง สุดท้ายเติมสารหยุดปฏิกิริยาลงไป 100 µl ในทุกหลุมทดสอบ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วย microplate reader โดยรายงานผลเป็นพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (pg/ml) เทียบกับ Human IL-6 standard

5.2 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Interleukin-10 (IL-10)

โดยใช้หลักการ Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยติด human IL-10 specific monoclonal antibody บน 96-well plate เติมสารซีรัมที่ต้องการทดสอบลงไป 100 ไมโครลิตรในหลุมทดสอบ IL-10 ในซีรัมจะไปจับกับแอนติบอดี จากนั้นเติม biotinylated anti-human IL-10 detection antibody 100 µl ในทุกหลุมทดสอบ จะเกิด antibody-antigen-antibody เรียกว่า sandwich จากนั้นเติม avidin-horseradish peroxidase 100 µl ลงไปในทุกหลุมทดสอบ และเติม TMB substrate solution 100 µl ลงไปในทุกหลุมทดสอบ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารสีน้ำเงินหากมี IL-10 ในสารตัวอย่าง สุดท้ายเติมสารหยุดปฏิกิริยาลงไป 100 µl ในทุกหลุมทดสอบ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วย microplate reader โดยรายงานผลเป็นพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (pg/ml) เทียบกับ Human IL-10 standard

5.3 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ Tumor necrotic factor-alpha (TNF-α)

โดยใช้หลักการ Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยติด human TNF-α specific monoclonal antibody บน 96-well plate เติมซีรัมที่ต้องการทดสอบลงไป 100 ไมโครลิตรในหลุมทดสอบ TNF-α ในซีรัมจะไปจับกับแอนติบอดี จากนั้นเติม biotinylated

anti-human TNF-α detection antibody 100 µl ในทุกหลุมทดสอบ จะเกิด antibody-antigen-antibody เรียกว่า sandwich จากนั้นเติม avidin-horseradish peroxidase 100 µl ลงไปในทุกหลุมทดสอบ และเติม TMB substrate solution 100 µl ลงไปในทุกหลุมทดสอบ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารสีน้ำเงินหากมี TNF-α ในสารตัวอย่าง สุดท้ายเติมสารหยุดปฏิกิริยาลงไป 100 µl ในทุกหลุมทดสอบ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วย microplate reader โดยรายงานผลเป็นพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (pg/ml) เทียบกับ Human TNF-α standard

6. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

การทดลองทุกการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ ค่าจะแสดงในรูปของ mean ± SD วิเคราะห์ผลทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม SPSS Version 16.0 (ใช้ Wilcoxon)