



## วิธีดำเนินการวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
ห้องสมุดงานวิจัย  
วันที่..... 10 มี.ค. 2555  
เลขทะเบียน..... 245687  
เลขเรียกหนังสือ.....

### สารเคมีและแหล่งที่มา

- 2,4-dinitrophenylhydrazine (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Aluminium chloride (Ajax Finechem)
- Catalase assay kit (Cayman, U.S.A.)
- Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Fluka, Switzerland)
- Gallic acid (Fluka, Switzerland)
- Glucose (Merck, Germany)
- Glutathione assay kit (Cayman, U.S.A.)
- Glutathione peroxidase assay kit (Cayman, U.S.A.)
- HDL cholesterol kit (Human Gesellschaft, Germany)
- Heparin (Leo Pharmaceutical, Denmark)
- Naringenin (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- n-Butanol (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- o-Dianisidine dihydrochloride (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Pentobarbital sodium (Nembutal<sup>®</sup>, Sanofi, France)
- PGO enzyme (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Potassium acetate (Carla erba, Italy)
- Potassium hydroxide (Merck, Germany)
- Quercetin (Chemical fine, U.S.A.)
- Rat insulin enzyme immunoassay kit (SPI-bio, U.S.A.)
- Rosiglitazone (Avandia<sup>®</sup>)
- Sodium carbonate (Carla erba, Italy)
- Sodium chloride (Merck, Germany)
- Sodium dodecyl sulfate (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Superoxide dismutase assay kit (Cayman, U.S.A.)
- Thiobarbituric acid (TBA) reagent (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Total cholesterol kit (Human Gesellschaft, Germany)
- Triglyceride kit (Human Gesellschaft, Germany)

### สัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 100-150 กรัม จำนวน 36 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม พักสัตว์ทดลองก่อน

ทำการศึกษาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ความชื้น แสงสว่าง ให้เหมาะสม และมีการปรับสัดส่วนของอาหารระหว่างอาหารสำเร็จรูป (CP) ต่ออาหารสูตรมาตรฐาน (normal diet) ในระหว่างการพักเลี้ยงโดยปรับสัดส่วนจากเท่ากับ 50:50 เป็น 25:75 และ 0:100 ตามลำดับ และให้น้ำไม่จำกัดปริมาณ

หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาในการพักเลี้ยง แบ่งกลุ่มการทดลองอย่างสุ่มออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว เพื่อให้ได้รับอาหารสำหรับการทดลอง ตลอดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ โดยมีกลุ่มควบคุม 1 กลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรมาตรฐาน ส่วนอีก 5 กลุ่มที่เหลือได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณสูง มี 4 กลุ่มในจำนวนนี้เสริมด้วยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นหรือยา (รายละเอียดในการทดลองที่ 2) โดยจะทำการเตรียมอาหารเองและผสมอาหารตามสูตรทุกสัปดาห์ ดังส่วนประกอบของอาหารสำหรับการทดลองที่แสดงไว้ในตารางแสดงสูตรอาหารปกติและอาหารที่มีฟรุกโตสสูง

### สมุนไพรรและแหล่งที่มา

ทำการต้มเมล็ดองุ่นอบแห้ง จากบริษัทสยามไวน์เนอร์ จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อล้างสิ่งสกปรกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงบดหยาบด้วยเครื่องบดไฟฟ้า จากนั้นสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer เก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้ (Saito et al., 1998)

### การทดลองที่ 1 การตรวจหาสารประกอบเคมีในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

#### 1.1 ตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic compounds)

ซึ่งนำนักสารสกัดจากเมล็ดองุ่น นำไปละลายในน้ำ เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อทำเป็น standard curve นำสารละลายมา 1 มิลลิลิตร เติม Folin-Ciocalteu's phenol reagent 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม 2% sodium carbonate solution (w/v) 15 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง นำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของ total phenolic compounds เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid (Asami et al., 2003)

#### 1.2 การตรวจหาปริมาณสารฟลาโวนส์ (flavones) และฟลาโวนอล (flavonols) โดยวิธี Aluminum chloride colorimetric method

นำสารมา 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ละลายใน 80% ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทำเป็น standard curve นำสารละลายที่เตรียมมาเติมสาร 95%

ethanol, 10% aluminum chloride, 1 M potassium acetate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของ flavones และ flavonols เปรียบเทียบกับ quercetin (Chang et al., 2002)

### 1.3 ตรวจหาปริมาณ proanthocyanidin โดย vanillin colorimetric method

นำสารมา 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ 1 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายมาตรฐาน catechin ละลายใน 80% ethanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทำเป็น standard curve นำสารละลายที่เตรียมมาเติมสาร Vanillin ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของ proanthocyanidin เปรียบเทียบกับ catechin (Kumazawa et al., 2002)

### 1.4 การวิเคราะห์สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเมล็ดองุ่น

นำสารสกัดเมล็ดองุ่น 200 ไมโครกรัม ละลายในน้ำกลั่น และปั่นแยกสารที่ไม่ละลายทิ้งไป นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบสารโพลีฟีนอลโดย HPLC ใช้คอลัมน์ชนิด Intertsil® ODS-3, 250 x 4.6 mm I.D. (5 µm) เป็นชนิด Reverse phase C<sub>18</sub> ใช้อัตราการไหล 1.5 ml/min ใช้ตัวชะชนิด A คือ สารผสมระหว่างน้ำกับกรดฟอสฟอริก (1000:1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร) ตัวชะชนิด B คือ สารผสมระหว่างอะซีโตไนไตรล์กับกรดฟอสฟอริก (1000:1 โดยปริมาตรต่อปริมาตร) ขั้นตอนการแยกใช้ ตัวชะ A ในสัดส่วน 100% เป็นเวลา 10 นาที และตามด้วย ตัวชะ A 85% กับ ตัวชะ B 15% และคงที่ในสัดส่วนดังกล่าวเป็นเวลา 10 นาที และปรับสัดส่วนตัวชะเป็น A 70% และ ตัวชะ B 30% เป็นเวลา 5 นาที และปรับเป็นตัวชะ B 100% เป็นเวลา 5 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร คำนวณหาสัดส่วนขององค์ประกอบหลัก เปรียบเทียบค่า retention time ของสารที่แยกแต่ละชนิดกับ สารละลายมาตรฐานที่พบในสารสกัดเมล็ดองุ่น คำนวณความเข้มข้นของสารที่พบแต่ละชนิดโดยใช้กราฟมาตรฐานของสารบริสุทธิ์แต่ละชนิด

### **การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาเบาหวานชนิดที่ 2 ของสารสกัดเมล็ดองุ่นในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยน้ำตาลฟรุกโตส**

หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 120-150 กรัม แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารปกติ

กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสสูง (ตามตารางสูตรอาหาร)

กลุ่มที่ 3 ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสสูง ที่ผสมด้วย 0.5% สารสกัดเมล็ดองุ่น

กลุ่มที่ 4 ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสสูง ที่ผสมด้วย 1.0% สารสกัดเมล็ดองุ่น

กลุ่มที่ 5 ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสสูง ที่ผสมด้วย 2.0% สารสกัดเมล็ดองุ่น

กลุ่มที่ 6 ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสสูง ที่ผสมด้วย 4 mg/kg rosiglitazone ในสัปดาห์ที่ 5

ตารางแสดงสูตรอาหารปกติและอาหารที่มีฟรุกโตสสูง (กรัม/กิโลกรัม) (Guo et al., 2006)

Ingredient	Control diet	High-fructose diet
Casein (vitamin free)	200	200
Cornstarch	530	-
Sucrose	100	-
Fructose	-	630
Soybean oil	70	70
Mineral mix	35	35
Vitamin mix	10	10
Fiber	50	50
Methionine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5

ทุกสัปดาห์เก็บเลือดเพื่อตรวจน้ำตาล ซึ่งนำหนักหนูขาวทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ก่อนวันสุดท้ายของการทดลอง จะเลือดสัตว์ทดลองและนำไปตรวจ ค่าระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับฮอร์โมนอินซูลินหลังอดอาหาร เพื่อนำไปคำนวณค่า Homeostatic model assessment (HOMA-IR) ตามสมการ (Hermans et al., 1999) ซึ่งเป็นค่าดัชนีที่ใช้ประเมินภาวะดื้ออินซูลิน ดังนี้

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{IU/mL})}{22.5}$$

โดย 1  $\mu\text{IU/mL}$  = 6.945 pmol/L (SI units)

จากนั้นตรวจสอบการขจัดกลูโคสออกจากเลือดของสัตว์ทดลองโดยวิธี oral glucose tolerance test (OGTTs) การประเมินดังกล่าวจะสามารถยืนยันฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการเพิ่มประสิทธิภาพของการขจัดน้ำตาลกลูโคสจากเลือดและลดภาวะดื้ออินซูลิน โดยสัตว์ทดลองในแต่ละตัวจะได้รับน้ำตาลกลูโคส 2g/kg จะเลือดก่อนและหลังการให้น้ำตาลกลูโคสที่เวลา 15, 30, 60, 90 และ 120 นาที นำไปตรวจระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับฮอร์โมนอินซูลิน

แสดงผลในรูปกราฟระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับฮอร์โมนอินซูลิน ณ เวลาต่างๆ คำนวณค่า AUC ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

ในวันสุดท้าย เก็บเลือดจากหนูขาวทุกกลุ่มเพื่อนำมาตรวจ triglyceride, cholesterol, HDL, นำค่าน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินไปคำนวณ insulin sensitivity วัดระดับฮอร์โมนอินซูลินด้วยเทคนิค ELISA จากนั้นเก็บอวัยวะ ได้แก่ ตับ กล้ามเนื้อ เพื่อศึกษาต่อไป

### **การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ**

จากการทดลองที่ 2 นำตับของหนูขาวทุกกลุ่มมาศึกษาในระดับของ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase โดยนำตับ 1 กรัม มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันใน 50 mM phosphate buffer (pH 7.8) นำไปปั่นที่ 4°C ความเร็ว 1,000g 10 นาทีและเพิ่มความเร็วขึ้นเป็น 2,300g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:10 วิเคราะห์ SOD ตามรายละเอียดของ Marklund and Marklund (1974) วิเคราะห์ catalase ตามรายละเอียดของ Aebi (1984) วิเคราะห์ glutathione peroxidase ตามรายละเอียดของ Beutler (1984) รายงานผลในหน่วย units/mg protein วัดปริมาณโปรตีนด้วยเทคนิคของ Bradford (1976) วัดปริมาณ GSH ตามเทคนิคของ Sedlak และ Lindsay (1968) และ วัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ด้วยเทคนิคของ Uchiyama และ Mihara (1978)

### **การวิเคราะห์ผลทางสถิติ**

วิเคราะห์ข้อมูลด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองใช้ post hoc range test โดยใช้ Least Significance Difference (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  โดยใช้ mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.) ในการนำเสนอข้อมูล