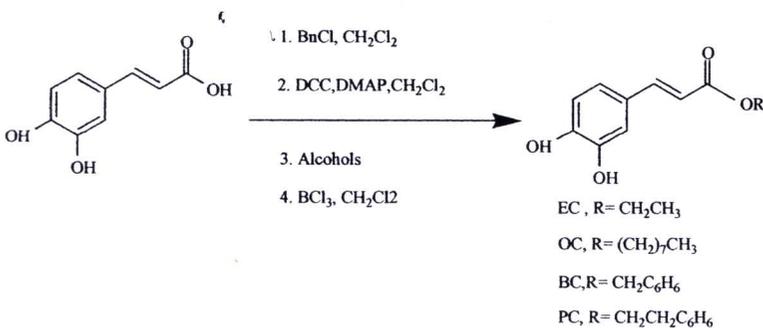


วิธีวิจัย

1. การสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดกาเฟอิก

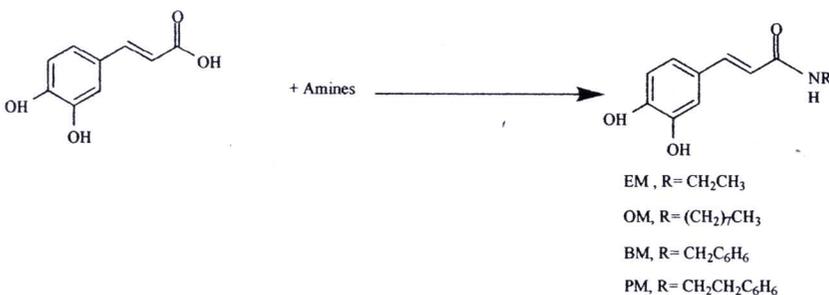
การสังเคราะห์อนุพันธ์ที่อยู่ในรูปเอสเทอร์ สังเคราะห์โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเอซิดคลอไรด์จากนั้นค่อยเปลี่ยนเป็นเอสเทอร์ และใช้ benzotriazol-1-yloxy-tris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP) เป็นสารเชื่อมระหว่างกรดกาเฟอิกและแอลกอฮอล์ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมาหาโครงสร้างของสารสังเคราะห์โดยใช้ IR NMR และ MS กลไกการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอสเทอร์กรดกาเฟอิก

2. การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของกรดกาเฟอิก

การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์สังเคราะห์โดยใช้ DCC เป็น coupling reagent โดยรีฟลักซ์ใน tetrahydrofuran 50°C 7 ชั่วโมง หลังจากนั้นระเหยเอาตัวทำละลายออก จากนั้นทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมาหาโครงสร้างของสารสังเคราะห์โดยใช้ IR NMR และ MS กลไกการสังเคราะห์แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 การสังเคราะห์อนุพันธ์เอไมด์ของกรดกาเฟอิก

3. การศึกษาสมบัติของกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์ต่อการกำจัดอนุมูลอิสระ

3.1 การศึกษาการกำจัดอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH)

นำกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์มาละลายในเมทานอลให้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำมา 0.2 มิลลิลิตรผสมกับ 0.1 มิลลิลิตร 0.16 mM DPPH จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 3 มิลลิลิตรด้วยเมทานอล จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตรโดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน

3.2 การศึกษาการยับยั้งการแตกของเม็ดเลือดแดงเมื่อเหนี่ยวนำด้วย AAPH

เตรียมเม็ดเลือดแดงโดยเจาะเลือดจากอาสาสมัครไว้ในหลอดเลือดที่กั้นเลือดแข็งตัวนำมาปั่นแยกเม็ดเลือดแดงที่ 2,500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที นำเม็ดเลือดแดงมาล้างอีก 3 ครั้งด้วย PBS บัฟเฟอร์ pH 7.4 จากนั้นนำมาเตรียมสารละลายเม็ดเลือดแดงเข้มข้น 5% (v/v) แบ่งสารละลายเม็ดเลือดแดงมาเติมสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยละลายในสารละลาย DMSO จากนั้นเติมสารละลาย AAPH บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วคำนวณการยับยั้งร้อยละการแตกของเม็ดเลือดแดง

3.3 การศึกษาการยับยั้งการเกิดลิปิด เปอร์ออกซิเดชันโดยใช้กรดไลโนเลอิก

เตรียมสารละลายกรดไลโนเลอิก โดยละลายในบอเรตบัฟเฟอร์ แล้วนำมา 30 ไมโครลิตร เติม 2.81 มิลลิลิตร 0.05 phosphate buffer pH 7.4 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลาย AAPH 40 mM จำนวน 150 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารต้านสังเคราะห์โดยละลายในเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการยับยั้ง

3.4 การศึกษาการกำจัดอนุมูล superoxide anion

Superoxide radicals ถูกสร้างขึ้นในสารละลาย 3 มิลลิลิตร Tris-HCl buffer 16 mM pH 8 ประกอบด้วย 1 มิลลิลิตร 50 μ M NBT, 1 มิลลิลิตร 78 μ M NADH และสารละลายที่สังเคราะห์ขึ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเติม PMS เพื่อเริ่มปฏิกิริยา บ่มต่อที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5

นาที่ แล้วนำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรจากนั้นคำนวณการยับยั้งการเกิด superoxide radical

4. การศึกษาผลของกรดกาเฟอิกและอนุพันธ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์เฟส 2 ในเซลล์มะเร็งชนิด Hep G2

4.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับชนิด Hep G2

เซลล์ Hep G2 เลี้ยงใน DMEM supplement มี 10% Serum Plus, a serum substitute, penicillin 50 IU/ml และ streptomycin 50µg/ml. นำมาบ่มในตู้บ่มที่มีความชื้นเท่าบรรยากาศ และมี 5% CO₂, 37 องศาเซลเซียส

4.2 การวิเคราะห์กัมมันตภาพเอนไซม์ กลูตาไทโอน รีดักเทส

นำเซลล์ Hep G2 จำนวน 2×10^6 เซลล์ มาเติมสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS และทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายดิจิโทนิน เข้มข้น 0.8 % (w/v) จากนั้นนำส่วนบนไปหาปริมาณกัมมันตภาพเอนไซม์กลูตาไทโอน รีดักเทส ด้วย 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer

4.3 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ UDP glucuronosyl transferase

นำเซลล์ Hep G2 จำนวน 2×10^6 เซลล์ มาเติมสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเซลล์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS และทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายดิจิโทนิน เข้มข้น 0.8 % (w/v) จากนั้นนำส่วนบนไปหาปริมาณกัมมันตภาพเอนไซม์ UDP glucuronosyl transferase โดยใช้ 1-naphthol เป็นสารตั้งต้นจากนั้นหาปริมาณ 1-naphthol- β -D-glucuronide นำไปวัดการดูดกลืนแสง excitation 293 นาโนเมตรและ emission 335 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrofluorometer



4.4 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ N-acetyltransferase

นำเซลล์ Hep G2 จำนวน 5×10^7 เซลล์ มาเติมสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดั่งเซลล์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS และทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายดิจิโทนิน เข้มข้น 0.8 % (w/v) จากนั้นนำส่วนบนไปหาปริมาณกัมมันตภาพเอนไซม์ N-acetyltransferase โดยใช้ arylamine เป็นสารตั้งต้น

4.5 การศึกษากัมมันตภาพเอนไซม์ quinine reductase

นำเซลล์ Hep G2 จำนวน 5×10^7 เซลล์ มาเติมสารสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดั่งเซลล์ออกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS และทำให้เซลล์แตกด้วยสารละลายดิจิโทนิน เข้มข้น 0.8 % (w/v) จากนั้นนำส่วนบนไปหาปริมาณกัมมันตภาพเอนไซม์ quinine reductase โดยวัดจากการเปลี่ยนแปลงของ menadiol เป็น menadiol

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจะแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ยร่วมกับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ ONE WAY ANOVA ตามด้วย BONFERINI ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติน้อยกว่า 0.05 ($P < 0.05$)

