

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### รูปแบบงานวิจัย

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบพลูต่อ BALB/3T3 โคลน A31 ในหลอดทดลอง

#### แนวทางการดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสารชั้นน้ำจากใบพลูด้วยเครื่อง discontinuous steam distillation extractor โดยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำ
2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดชั้นน้ำจากใบพลูที่ยังไม่ผ่านการแยกองค์ประกอบต่อเซลล์ในหลอดทดลองด้วยวิธีเอ็มทีที
3. การสกัดสารด้วยตัวทำละลายเมธานอลโดยวิธี liquid-solid extraction และแยกองค์ประกอบด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี
4. นำสารที่ผ่านการสกัดสารด้วยตัวทำละลายและแยกองค์ประกอบโดยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีในแต่ละขั้นตอนมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31 ในหลอดทดลองด้วยวิธีเอ็มทีที โดยเลือกสารใน fraction ที่ทำให้เซลล์ตายมากที่สุดซึ่งพิจารณาจากค่า  $IC_{50}$  จากนั้นทำการแยกองค์ประกอบและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองซ้ำ จนได้สารใน fraction ที่มีความบริสุทธิ์มากที่สุดที่มีผลทำให้เซลล์ตาย
5. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี โดยการนำสารใน fraction ที่บริสุทธิ์และมีผลทำให้เซลล์ตายมาทำการวิเคราะห์เพื่อหาชนิดและโครงสร้าง

## เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

### อุปกรณ์สำหรับงานเลี้ยงเซลล์และทดสอบความเป็นพิษ

1. 96 Well Cell Culture Cluster, Flat Bottom with Lid, Tissue Culture Treated, Non-Pyrogenic, Polystyrene, Sterile, Corning Incorporation, Croning, NY 14831, USA
2. Cell Culture Dish, 60 mm x 15 mm Style, Treated, Non-Pyrogenic, Polystyrene, Sterile, Corning Incorporation, Croning, NY 14831, USA
3. Cell Culture Dish, 100 mm x 20 mm Style, Treated, Non-Pyrogenic, Polystyrene, Sterile, Corning Incorporation, Croning, NY 14831, USA
4. Centrifuge Tube, Corning Incorporation, Croning, NY 14831, USA
5. Disposable Syringe 10 ml, Sterile in Unopened, Undamaged Package, Non-Toxic, Pyrogen-Free, Sterile, NIPRO (Thailand) CORP, LTD, Phra Nakhon Si Ayutthaya, Thailand
6. Inverted Microscope (Phase Contrast), Nikon
7. Microtubes, TUBE-170-C, 1.7 ml, ExtraGene, Inc. 1424 Yukon St, Davis, California 95616
8. Precision Pipette Tip, For use with 2, 10 and 20  $\mu$ l TYS Pipette, Bioclone, USA
9. Precision Pipette Tip, For use with 100 and 200 microlitter TYS Pipette, Bioclone, USA
10. Precision Pipette Tip, RC-L 1,000, For use with 1,000 microlitter TYS Pipette, Bioclone, USA
11. Microplate Reader, PACKARD, Spectracount, Perkin Elmer, Germany
12. Carbon dioxide Incubator, Thermoferment 311, USA
13. Laminar-flow hood/cabinet
14. Centrifuges, Thermo-IEC
15. Hemocytometer

### เครื่องมือกลั่นและระเหยตัวทำละลาย

1. Rotary Evaporation BUCHI Rotavapor
2. Freeze-dry Evaporator
3. High vacuum pump

### เครื่องมือสกัดสาร

Discontinuous steam distillation extractor

### เครื่องมือพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี

1. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Spectrum GX, Perkin Elmer System 2000, Germany
2. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), Bruker Advance 400, Switzerland
3. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS), HP-5MS, Hewlett Packard
4. High performance liquid chromatography (HPLC), 1100 series, Agilent Technologies

### สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีสำหรับงานแยกองค์ประกอบสารเคมี

1. Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), Commercial grade, Merck, Germany
2. Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), HPLC Grade, Merck, Germany
3. Acetone ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), Commercial grade, Merck, Germany
4. Ethyl Acetate ( $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ), Commercial grade, Merck, Germany
5. Aluminium oxide 90 active, neutral, Merck, Darmstadt, Germany

6. Sodium sulfate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), Univar, Wellington, Auckland, New Zealand

7. Reverse phase C18 column for HPLC technique, Phenomenex RP-18 column (250 x 4.60 mm i.d., 5 micron particle size)

#### สารเคมีสำหรับงานเลี้ยงเซลล์

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Hyclone, Logan, Utah
2. Newborn Calf Bovine Serum (NBCS), Hyclone, Logan, Utah
3. Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) 95%, Commercial, MERCK, Germany
4. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ประกอบด้วย
  - 4.1 KCl, Asia Pacific Specialty Chemical Limited ACN, Seven Hills, Australia
  - 4.2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck, Darmstadt, Germany
  - 4.3 NaCl, Merck, Darmstadt, Germany
  - 4.4  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Asia Pacific Specialty Chemical Limited ACN, Seven Hills, Australia
5. Trypsin, 0.05% (1X) with EDTA 4Na, liquid, Invitrogen, California, USA
6. Isopropyl alcohol, Merck, Germany
7. 0.4% tryphan blue (Sigma, Darmstadt, Germany) in PBS

#### สารเคมีสำหรับงานทดสอบความเป็นพิษ

1. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) for cell culture tested, Sigma, Darmstadt, Germany
2. Dimethyl sulfoxide (DMSO), Merck, Hohenbernn, Germany

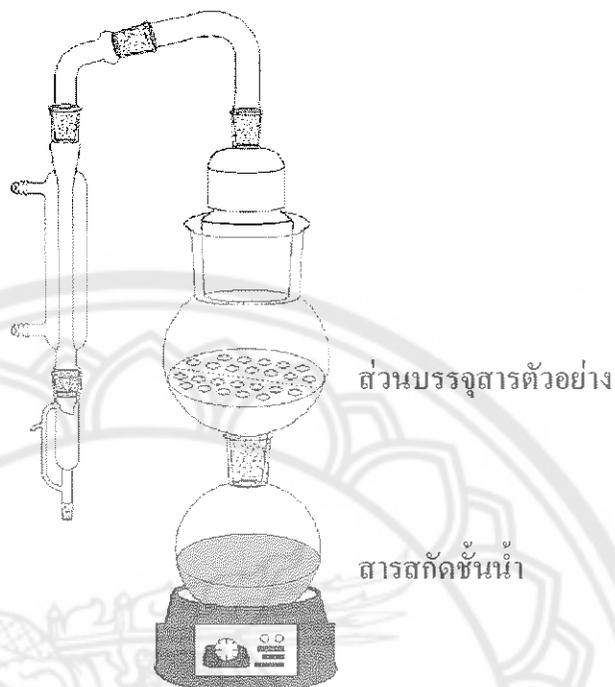
## ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

### ตอนที่ 1 การสกัดและการแยกองค์ประกอบสารสกัดจากใบพลู

#### 1. การสกัดสารจากใบพลู (*Piper betle* L. extraction)

##### วิธีการทดลอง

1. ตั้งชุด Discontinuous steam distillation extractor โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นต่อส่วนของเครื่องแก้วซึ่งออกแบบมาเพื่อใส่สารตัวอย่างเข้ากับขวดก้นกลมที่เตรียมไว้
2. ชั่งน้ำหนักใบพลูสดจำนวน 200 กรัม หนักให้เป็นชิ้นเล็กๆ
3. นำใบพลูสดที่เตรียมจากข้อที่ 2 บรรจุลงในช่องใส่สารตัวอย่าง
4. ทำการประกอบชุดสกัดจนสมบูรณ์ ดังภาพ 11
5. ให้ความร้อนจนกระทั่งน้ำเดือด ใอน้ำบางส่วนจะทำหน้าที่ชะสารมีขี้ผึ้งบางชนิดลงสู่ขวดก้นกลมและไอน้ำอีกส่วนหนึ่งจะเป็นตัวพาน้ำมันหอมระเหยแยกเก็บในภาชนะอีกแห่งหนึ่ง
6. การสกัด 1 ชุด/ 1 ครั้ง ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 3 ชั่วโมง ทำการสกัดจนน้ำหนักใบพลูสดครบ 1,000 กรัม
7. ระเหยน้ำออกจากสารสกัดขึ้นน้ำด้วยเครื่อง BUCHI Rotavapor
8. ทำให้สารสกัดขึ้นน้ำแห้งเป็นผงโดยเครื่อง Freeze-dry
9. นำผงแห้งของสารสกัดขึ้นน้ำจากใบพลู ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองด้วยวิธีเอ็มทีที (ดูหัวข้อการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบพลูที่มีต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay)



ภาพ 11 ชุดสกัด Continuous-infusion steam distillation extractor

## 2. การสกัดของแข็งโดยใช้ตัวทำละลาย (Extraction of solid; Solid-liquid extraction)

### วิธีการทดลอง

2.1 ชั่งผงของสารสกัดชั้นน้ำ 1.00 กรัม ลงในบีกเกอร์

2.2 เติมตัวทำละลายเมทานอลลงไปเพื่อละลายสารบางชนิดที่มีความสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ จะได้สาร 2 กลุ่ม ได้แก่ ตะกอนของสารที่ไม่ละลายในเมทานอล (precipitate) และสารละลายเมทานอลที่มีสารซึ่งละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์อยู่ (supernatant)

2.3 นำสารทั้งสองกลุ่มที่แยกได้จากข้อ 2 ระเหยตัวทำละลายเมทานอลออก ด้วยเครื่อง Rotary Evaporation BUCHI Rotavapor และ High vacuum pump

2.4 นำสารทั้งสองกลุ่มที่ผ่านกระบวนการในข้อที่ 3 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองด้วยวิธีเอ็มทีที (ดูหัวข้อการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบพลูที่มีต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay)

2.5 นำสารซึ่งผ่านการทดสอบในข้อ 4 ที่แสดงค่า  $IC_{50}$  ต่ำกว่า นำไปแยกองค์ประกอบโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี เพื่อทำการทดสอบความเป็นพิษในขั้นต่อไป

3. การแยกองค์ประกอบสารอินทรีย์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี (Isolation of organic components by chromatography technique)

วิธีการทดลอง

3.1 เลือกคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.50-1.00 เซนติเมตร

3.2 เตรียมอะลูมินา 90 นิวทรัล (aluminar 90 neutral) บรรจุลงสู่คอลัมน์เพื่อใช้ในการแยกองค์ประกอบของสารสีเหลือง (carotenoid) ออกจากสารตัวอย่าง

3.3 บรรจุสารตัวอย่างลงในคอลัมน์ จากนั้นทำการชะด้วยตัวทำละลายเมทานอล สารสีเหลืองจะถูกยึดเหนี่ยวไว้โดยอะลูมินา 90 นิวทรัลคอลัมน์ ส่วนสารชนิดอื่นที่ไม่ถูกยึดเหนี่ยวโดยอะลูมินา 90 นิวทรัล จะถูกชะออกจากคอลัมน์ (Fraction I)

3.4 ส่วนของสารสีเหลืองที่ถูกยึดเหนี่ยวไว้ในคอลัมน์สามารถชะออกด้วยน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่าเมทานอล (Fraction II)

3.5 นำสาร Fraction I จากข้อที่ 3 และสาร Fraction II จากข้อที่ 4 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองด้วยวิธีเอ็มทีที สารใน Fraction ที่มีผลทำให้เซลล์ตายและให้ค่า  $IC_{50}$  ต่ำกว่า จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการแยกองค์ประกอบและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองในขั้นต่อไป (ดูหัวข้อการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบพลูที่มีต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay)

3.6 นำ Fraction ของสารที่ผ่านการทดสอบความเป็นพิษแล้วจากข้อที่ 5 มาทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตตและนำสารที่สกัดได้เข้าสู่กระบวนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง (ดูหัวข้อการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบพลูที่มีต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay)

3.7 นำสารใน Fraction สุดท้ายที่ทำการ purify ได้และมีผลต่อการตายของเซลล์ไปทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคคลิควิดโครมาโตกราฟี จะทราบองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดใน Fraction ที่สนใจ ในกรณีที่สกัดจนได้สารที่มีความบริสุทธิ์สูง สามารถทำการยืนยันโครงสร้างได้ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีและแมสสเปกโทรสโกปีเพื่อหาชนิดของสารเคมีที่มีผลต่อการตายของเซลล์ได้

## ตอนที่ 2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดจากใบพลู

เพื่อเป็นการยืนยันโครงสร้างและองค์ประกอบของสารสำคัญจากใบพลูที่ผ่านการแยกองค์ประกอบ รวมทั้งทดสอบด้านความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง จึงเลือกใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี 3 เทคนิค คือ เทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี เทคนิคนิวเคลียร์ แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโทรสโกปี และเทคนิคแมสสเปกโทรสโกปี

## ตอนที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ BALB/3T3 โคลน A31

โดยวิธี 4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide (MTT)

### 1. การเลี้ยงเซลล์ (Cell culture) และการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อช่วง (Subculture)

#### วิธีการทดลอง

- 1.1 นำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์
- 1.2 ล้างเซลล์ด้วย Dulbecco's Phosphate Buffer Saline 2-5 มิลลิลิตร 1 ครั้ง เพื่อล้างอาหารออกจากเซลล์
- 1.3 เติม 0.5-1 มิลลิลิตร ของร้อยละ 0.25 ทริปซินในสารละลาย EDTA 0.53 มิลลิโมลาร์ (0.25 percentage of Trypsin-EDTA) ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดจากการยึดเกาะบนภาชนะเลี้ยง
- 1.4 ดูดเซลล์ลงสู่หลอดปั่นเหวี่ยง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณเท่ากับปริมาณของ Trypsin-EDTA ใช้ปิเปตกระจายสารและเซลล์ให้เข้ากัน ทำการปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาที ที่ 1,000 รอบต่อนาที
- 1.5 ดูดอาหารเหนือเซลล์ที่ตกตะกอนออก จากนั้นเติมอาหารใหม่แทนที่ ใช้ปิเปตกระจายเซลล์ให้ทั่วในอาหาร
- 1.6 นับเซลล์ด้วยเครื่องฮีโมไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) ดูดอาหารตามจำนวนเซลล์ที่ต้องการผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ลงสู่จานเลี้ยงเซลล์ขนาดที่ต้องการ

เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (ร้อยละ 5 คาร์บอนไดออกไซด์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Theiszová, et al., 2005) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อช่วง 3 ครั้งต่อสัปดาห์ ภาชนะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ คือ จานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร จำนวนเซลล์

ที่ใช้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อช่วงทุก 2 วัน คือ  $1.8 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ  $1.08 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อต้องการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อช่วงทุก 3 วัน

## 2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบพลูที่มีต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay (Freshney, 2005)

### วิธีการทดลอง

- 2.1 นำเซลล์เลี้ยงไว้ในจานเลี้ยงเซลล์มาทำการ trypsinization
- 2.2 ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ที่ 1,000 รอบต่อนาที (rpm) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายออกแล้วเติมอาหารเลี้ยงลงไปใหม่ ทำการกระจายเซลล์ให้ทั่วในอาหาร
- 2.3 ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer
- 2.4 เจือจางเซลล์ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เป็น  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อหยอด 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม จะมีความหนาแน่นของเซลล์เป็น  $1 \times 10^4$  เซลล์ ซึ่งตามยาวจะมี 12 ช่อง ตามขวางจะมี 8 ช่อง หลุมนอกสุดรอบจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุมใส่ Dulbecco' s Phosphate Buffer Saline เพื่อรักษาความชื้น ดูดเซลล์แขวนลอยลงใน 54 หลุม จำนวน 9 แถว ตั้งแต่แถวที่ 3(B-G) ถึงแถวที่ 11(B-G)
- 2.5 หลุมที่ 2(B-G) เติม 100 ไมโครลิตร ของอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียวเพื่อใช้เป็น Blank
- 2.6 นำจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

### 2.1 การทดสอบความเป็นพิษ (Cytotoxicity)

เลี้ยงเซลล์จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม โดยในแต่ละหลุมจะมีความหนาแน่นของเซลล์เป็น  $1 \times 10^4$  เซลล์ต่อ 100 ไมโครลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ ภายหลังบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากแต่ละหลุมและทำการหยอดสารทดสอบซึ่งเตรียมได้จากการละลายสารสกัดจากใบพลูลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นในช่วง  $10^{-5}$  ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยกำหนดให้กลุ่มที่มีเพียงอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม (untreated control) การทดสอบสารใช้เวลา 24 ชั่วโมง

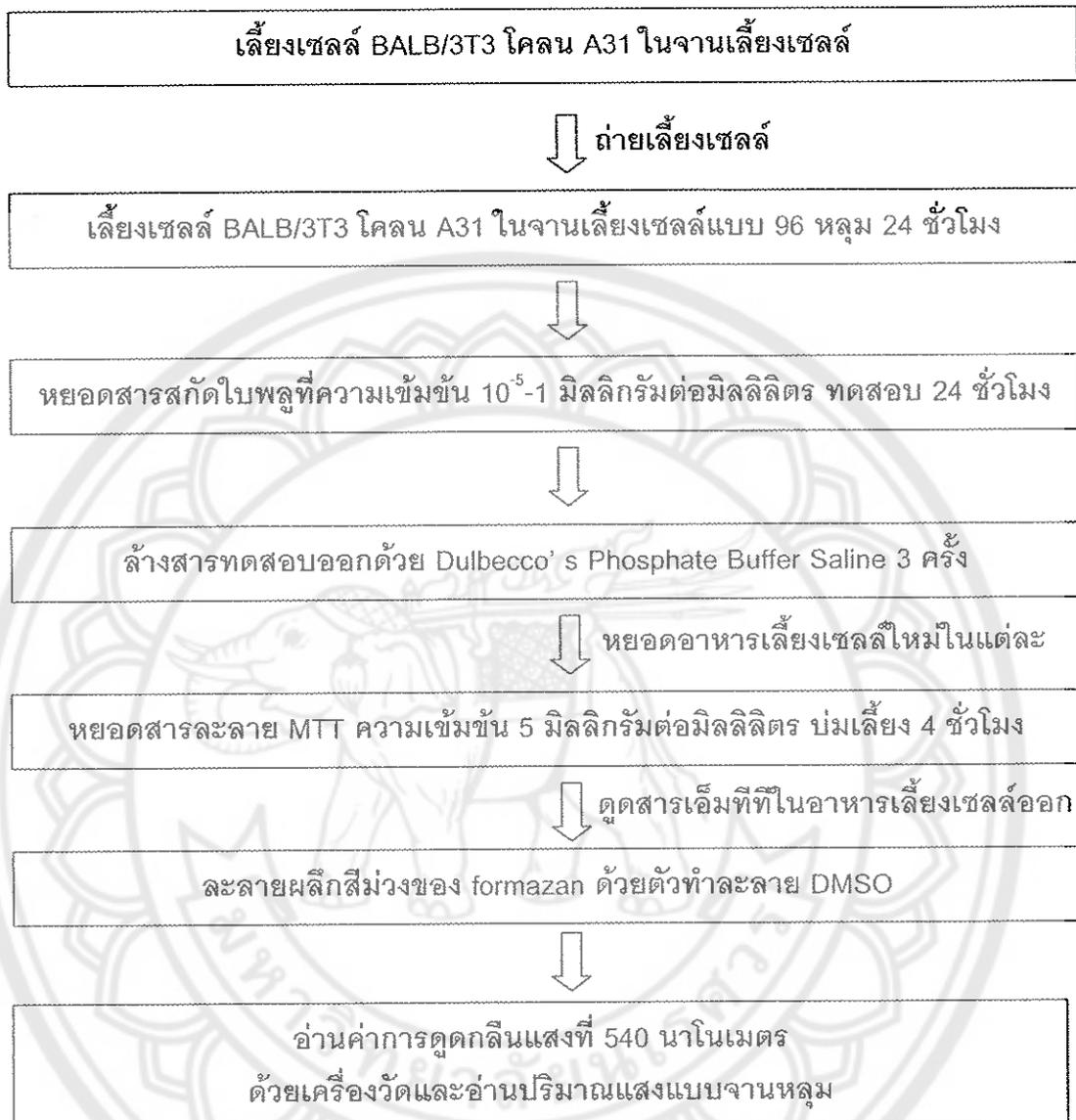
## 2.2 MTT assay

หลังจากทำการทดสอบสาร ล้างสารทดสอบออกด้วย Dulbecco' s Phosphate Buffer Saline เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่จำนวน 100 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตรของสารละลาย เอ็มที่ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปั่นเลี้ยงเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ละลายผลิตภัณฑ์ม่วงของ formazan ด้วย 100 ไมโครลิตร DMSO และอ่าน ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 540 นาโนเมตร โดยร้อยละของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต คำนวณได้จากค่า การดูดกลืนแสงจากกลุ่มที่ทำการทดสอบด้วยสาร (Abs. treated control) หารด้วยค่าการดูดกลืน แสงจากกลุ่มที่ไม่ได้ทำการทดสอบสาร (Abs. untreated control) คูณด้วย 100 ทำการวาดกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสาร (แกน Y) กับความเข้มข้น (แกน X) โดยให้แกน Y เป็นร้อยละของการรอดชีวิต (cell viability) และแกน X เป็นค่าความเข้มข้นของความเป็นพิษ (Theiszová, et al., 2005; Freshney, 2005)

$$\text{Percentage of cell viability} = (\text{Abs. treated control} / \text{Abs. untreated control}) \times 100$$

ค่าความเข้มข้นของสารเคมีที่มีผลให้ร้อยละ 50 ของเซลล์ถูกยับยั้งการเจริญ IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration at 50% growth) หาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้น (แกน x) กับร้อยละของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (แกน y) โดยผลต่างระหว่างร้อยละของเซลล์ที่รอด สูงสุด (top of curve) กับครึ่งหนึ่งของค่าร้อยละของเซลล์ที่รอดสูงสุด (top of curve) หักออกจาก ค่าร้อยละของเซลล์ที่รอดต่ำสุด (bottom of curve) คือ ร้อยละ 50 ของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ที่สัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นที่จุดตัดบน แกน x (Krippendorff, et al., 2006)

$$\text{Inhibitory concentration at 50\% growth} = \text{Top of curve} - (\text{Top of curve} - \text{Bottom of curve}) / 2$$



ภาพ 12 แสดงขั้นตอนการทดสอบสารสกัดจากใบพลูด้วยวิธีการวิเคราะห์โดยสาร MTT