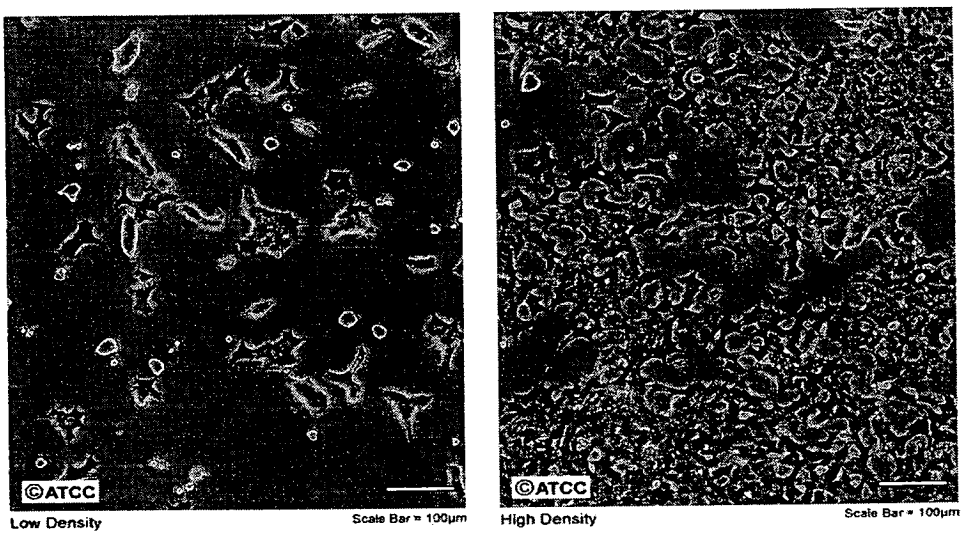
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

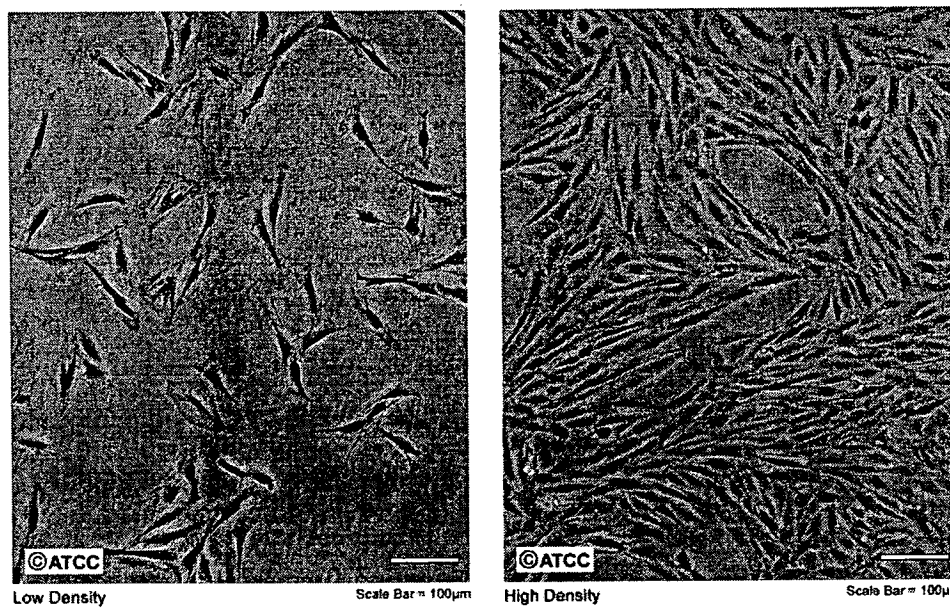
1. เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1.1 เซลล์ตับอ่อนของหนู (RIN-m5F cell) CRL-11605 เป็นเซลล์ที่ได้มาจากการโคลนของกลุ่มเซลล์ตับอ่อนของหนูชนิด RIN-m และได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.สิริชัย อดิศักดิ์วัฒนา คุณสมบัติของเซลล์ชนิดนี้คือ ผลิตอินซูลินและเอนไซม์ L-dopa-decarboxylase และอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ RIN-m5F คือ Roswell Park Memorial Park Institute medium 1640 (RPMI 1640) ของบริษัท Hyclone ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum ของบริษัท Hyclone อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของบริษัท Hyclone และนำเซลล์บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 33 แสดงลักษณะของเซลล์ตับอ่อนของหนูชนิด RIN-m5F มาจาก ATCC

1.2 เซลล์กล้ามเนื้อของหนู (L6 cell) CRL-1458 ได้มาจากการเพาะเลี้ยงครั้งแรก (primary culture) จากต้นขาของหนูโดยรักษาสภาพเซลล์ในเมธิวคลอเลนธีน (methyl cholanthrene) และเซลล์กล้ามเนื้อหนูได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทิภา ปุรินทราภิบาล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose ของบริษัท Hyclone ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum ของบริษัท Hyclone อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของบริษัท Hyclone และนำเซลล์บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ 5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 34 เซลล์กล้ามเนื้อของหนูชนิด L6 มาจาก ATCC

2. สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

สมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย คือ *Daucus carota* Linn. subsp. sativus Thell ซึ่งเพาะปลูกที่ศูนย์พัฒนาการโครงการหุ่งหลวง ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ และยืนยันพันธุ์พืชโดยศาสตราจารย์กสิน สุวตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยซึ่ง Herbarium number ของแครอทคือ 013589 (BCU) และเบบี้แครอท คือ 013513 (BCU)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

-20 °C freezer	Sanyo Electric, ญี่ปุ่น
-80°C deep freezer	Ilshin Lab, เนเธอร์แลนด์
4°C refrigerator	Sharp, ญี่ปุ่น
6 well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
96 well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Analytical balance	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Autoclave	Hirayama, ญี่ปุ่น
Autopipette 0.5-10 µl	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Autopipette 2-20 µl	BIO-RAD, สหรัฐอเมริกา
Autopipette 20-200 µl	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Autopipette 200-1000 µl	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Beaker (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Cell culture flask (25, 75 cm^3)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Centrifuge	Beckman Coulter, สหรัฐอเมริกา
Centrifuge tube (15, 50 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
CO_2 incubator	Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
Cryovial tube 2.0 ml	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Disposable serological pipette (5, 10 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
ELISA plate reader	BioTek, สหรัฐอเมริกา
Flask (50, 100, 250, 500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Glass bottles (500, 1000 ml)	Schott Duran, เยอรมนี
Hemocytometer	Hausser Scientific, สหรัฐอเมริกา
High speed grinder	Rong Tsong Precision Technology Co., จีน
Hot air oven	Memmert, เยอรมนี
Incubator shaker	INFORS HT, สวิตเซอร์แลนด์
Inverted microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Laminar flow cabinet	Labconco, สหรัฐอเมริกา

Light microscope	Olympus, ญี่ปุ่น
Liquid nitrogen tank	Taylor-Wharton, สหรัฐอเมริกา
Magnetic stirrer	Daihan LabTech, เกาหลีใต้
Microcentrifuge	Eppendorf, เยอรมนี
Microcentrifuge tube 1.5 ml	Axigen scientific, สหรัฐอเมริกา
Multichannel pipette 20-200 µl	Gilson, ฝรั่งเศส
Multilabel reader	Perkin Elmer Inc., ฟินแลนด์
pH meter	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
Pipette tips (10, 20, 200, 1000µl)	Sorenson™ Bioscience, Inc., สหรัฐอเมริกา
Plate shaker	Desaga, เยอรมนี
Rotary evaporator	Heidolph Instruments, เยอรมนี
Serological pipette (1, 5, 10, 25 ml)	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Soxhlet extractor	Merck, เยอรมนี
Sterile syringes filter	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
Test sieves no.16	Jayant scientific Ind., อินเดีย
Volumetric flask (100, 1000 ml)	Pyrex, สหรัฐอเมริกา
Vortex mixer	FinePCR, เกาหลีใต้
Waterbath	Memmert, เยอรมนี

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1, 1-dimethylbiguanide, hydrochloride (metformin)	Merck, เยอรมนี
2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)	Merck, เยอรมนี
2-Deoxy-D-glucose 6-phosphate sodium salt (2DG-6 P)	Santa Cruz Biotechnology, สหรัฐอเมริกา
2-deoxy-D-glucose (2DG)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
3-(4, 5-dimethylthianisol-2-yl)-2, 5-diphenyl -2H-tetrazolium bromide (MTT)	Calbiochem, เยอรมนี

3, 5- Di-tert-4-butylhydroxytoluene (BHT)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
3,5 dinitrosalicylic acid(DNS)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Acarbose	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Aluminium chloride	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
α-amylase type VI-B from porcine pancreas	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Ascorbic acid	Merck, เยอรมนี
β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Bovine serum albumin (BSA)	PAA Laboratories, ออสเตรีย
Calcium chloride ($CaCl_2$)	Merck, เยอรมนี
Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Diaphorase from *Clostridium kluyveri*	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, เยอรมนี
DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	Merck, เยอรมนี
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
EDTA-trypsin 0.25% (1X)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Ethanol	Merck, เยอรมนี
Fetal bovine serum (FBS)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Folin Ciocalteu's Phenol Reagent	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Gallic acid	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Glucose	Merck, เยอรมนี
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Glyburide	Merck, เยอรมนี
Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES free acid)	Merck, เยอรมนี
High Range Rat Insulin ELISA kit	Mercodia, สวีเดน
Hydrochloric acid	Merck, เยอรมนี
Insulin human	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา

Krebs-Ringer bicarbonate buffer	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Linoleic acid	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Magnesium sulfate ($MgSO_4$)	Merck, เยอรมนี
Maltose	Merck, เยอรมนี
O-dianisdine dihydrochloride	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Penicillin-Streptomycin solution	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Peroxidase glucose oxidase (PGO) enzyme	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Petroleum ether	Merck, เยอรมนี
Phosphate buffer saline (PBS)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Potassium chloride (KCl)	Merck, เยอรมนี
Potassium persulfate	Merck, เยอรมนี
Potassium sodium tartate ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)	Merck, เยอรมนี
Quercitin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Rat intestinal acetone powder	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Resazurin sodium salt	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Roswell Park Memorial Park Institute medium 1640 (RPMI 1640)	Hyclone, สหรัฐอเมริกา
Silica gel	ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์, ไทย
Sodium acetate (CH_3COONa)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium carbonate (Na_2CO_3)	Merck, เยอรมนี
Sodium chloride (NaCl)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, เยอรมนี
Sodium phosphate dibasic anhydrous (Na_2HPO_4)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sodium phosphate monobasic anhydrous (NaH_2PO_4)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Starch	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Sterile water (deionized water)	General Hospital Products
Sucrose	Merck, เยอรมนี

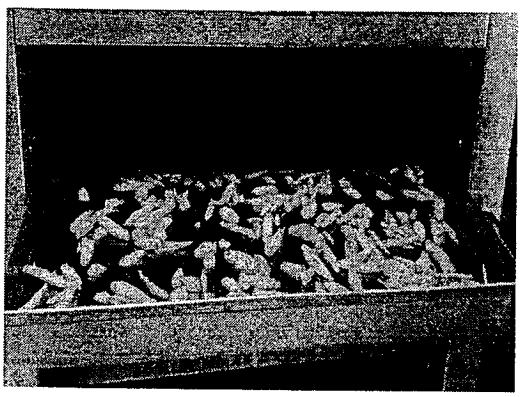
Trans-beta-carotene type I	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
Triethanolamine hydrochloride (TEA)	Merck, เยอรมนี
Trypan blue stain	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
Tween20	Bio Basic, แคนาดา

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดแครอทและเบบี้แครอท

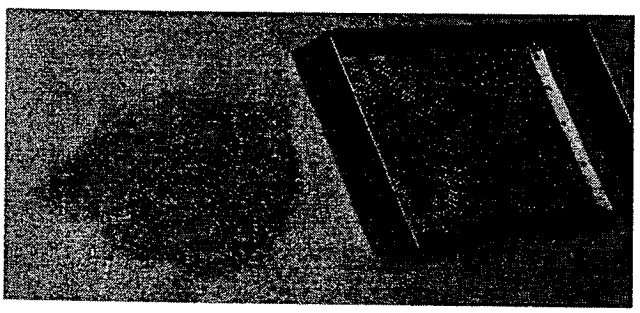
1.1 นำรากของแครอทและเบบี้แครอทสีส้มมาหั่นเป็นชิ้นบางๆแล้วนำเข้าเครื่อง Hot air oven ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเพื่อดึงน้ำออกแล้วจะได้เป็นแครอทและเบบี้แครอทแห้ง แล้วคำนวณเป็นปริมาณน้ำที่ระเหยไป (Moisture content of carrots)

$$\% \text{ Moisture content of carrots} = \frac{\text{weight fresh sample-weight dry sample}}{\text{weight fresh sample}} \times 100$$



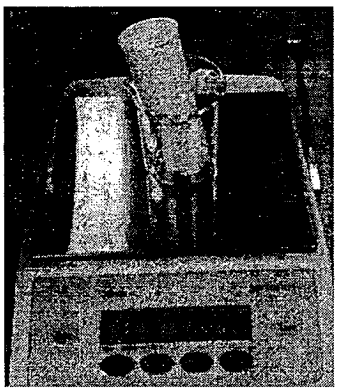
ภาพที่ 35 แสดงถึงรากของแครอทและเบบี้แครอทหลังจากการอบแห้ง

1.2 หลักจากการอบแห้งเสร็จแล้วให้นำรากแครอทและเบบี้แครอทแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นละเอียด จากนั้นนำผงที่ได้มาผ่านตะแกรงหมายเลข 16 เพื่อให้ได้ขนาดของผงที่เท่ากัน



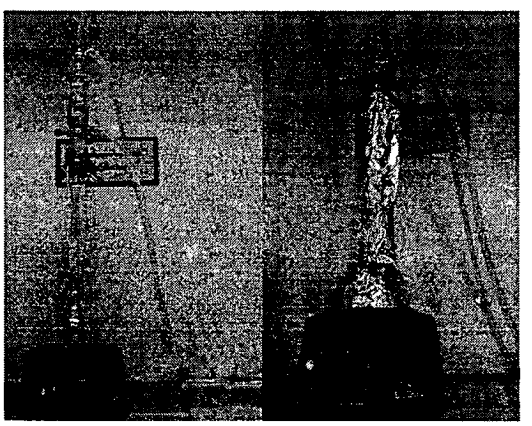
ภาพที่ 36 แสดงถึงลักษะของผลแครอทและเบบี้แครอทที่ผ่านการกรองดวยตะแกรง

1.3 ชั่งน้ำหนักผงแครอทและเบบี้แครอท 10 กรัม แล้วนำไปใส่ใน thimble



ภาพที่ 37 แสดงลักษณะของ thimble สำหรับใส่ผงของรากแครอทและเบบี้แครอท

1.4 สกัดรากของแครอท และเบบี้แครอทด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 300 มิลลิลิตรใน still pot ของเครื่อง Soxhlet extractor โดยสกัดแยกกันทีละครั้ง จากนั้นนำกระดาษฟอยล์มาห่ออุปกรณ์เพื่อป้องกันแสงซึ่งการสกัดทำใน Laminar Flow Cabinet เพราะปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นสารที่ระเหยง่าย



ภาพที่ 38 แสดงถึงลักษณะของเครื่อง Soxhlet extractor

1.5 เมื่อเห็นสารสกัดที่ไหลเวียนอยู่ที่ด้านบนเปลี่ยนเป็นสารละลายใสแล้วให้หยุดการสกัด และนำตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ไประเหยในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนสารละลายที่ได้ให้นำไปเข้าเครื่อง rotary evaporator แล้วนำสารสกัดหยาบที่

ได้ไปละลายด้วย dimethly sulfoxide เพื่อเก็บเป็น stock ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.6 นำตะกอนที่ระเหยเสร็จแล้วมาสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทานอล 300 มิลลิลิตร และตั้งอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นห่อเครื่อง Soxhlet extractor ด้วยกระดาษฟอยล์

1.7 เมื่อสังเกตสารสกัดที่ด้านบนเปลี่ยนสีเป็นสารละลายใส ให้หยุดการสกัดแล้วนำสารละลายไปเข้าเครื่อง rotary evaporator เพื่อระเหยตัวทำลายเอทานอลออก จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดพยาบเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดที่ได้จากการสกัด (% Extractive value)

$$\% \text{ Extractive value} = \frac{\text{Sample after extract}}{\text{Sample before extract}} \times 100$$

1.8 นำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย dimethly sulfoxide เพื่อเก็บเป็น stock ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.8 นำสารสกัดหยาบของแครอทและเบบี้แครอทที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์และเอทานอลมากรองด้วย sterile syringe filter แล้วแบ่งสารสกัดหยาบในหลอดทดลอง ซึ่งห่อด้วยกระดาษฟอยล์จากนั้นนำสารสกัดหยาบไปเก็บที่ตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ของสารสกัดหยาบ จากรากแครอทและเบบี้แครอท

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสมุนไพรที่ต้องการศึกษาโดยอ้างอิงจากวิธีของ Chang et al. (2002) โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นของสารประกอบจำพวกฟีนอลในการเปลี่ยนสารละลาย Folin-Ciocalteau ที่มีสีเหลือง (molybdotungstophosphoric heteropolyanion reagent) ในสภาวะที่เป็นด่างให้สารประกอบเชิงซ้อนเป็นสีน้ำเงิน (molybdotungstophosphate blue) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA plate reader แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิค

$$Na_2WO_4/Na_2MoO_4 \longrightarrow (\text{phenol-}MoW_{11}O_{40})^{-4}$$

$$Mo(VI)\ (\text{yellow}) + e^- \longrightarrow Mo(V)(\text{blue})$$

เตรียมสารละลายกรดแกลลิคที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมสารละลายเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งชั่งกรดแกลลิค 100 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรและแบ่งใส่หลอดแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศา

เซลเซียส เตรียมสารละลาย soudium carbonate (Na_2CO_3) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่ง Na_2CO_3 10.59885 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและเตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ของFolin-Ciocalteau Phenol reagent โดยนำ Folin-Ciocalteau Phenol reagent ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์มา 2 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 18 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเตรียมสารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูด stock ของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มา 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 990 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำมาทำการทดลองตามวิธีของ Folin Ciocalteu's colotimetric (14) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Reagent	Reagent blank (µl)	Standard (µl)	Sample blank (µl)	Sample (µl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	50	50
สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค	-	50	-	-
น้ำกลั่นปราศจากอิออน	50	-	50	-
สารละลาย 10% Folin-Ciocalteau Phenol reagent	50	50	-	50
สารละลาย 1 M Na_2CO_3	50	50	50	50
ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและสารสกัดสมุนไพรที่เทียบกับ blank ที่ 750 นาโนเมตร				

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดไปหักกับค่าของ blank แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกราฟมาตราฐานของสารละลายมาตราฐานกรดแกลลิคซึ่งแสดงค่าเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อสารสกัดหยาบจากสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (mg GAE /g dry weight sample)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอท

เทคนิคการวัดปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ โดย aluminium chloride ($AlCl_3$) จะทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟลาโวนอยด์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีชมพูซึ่งดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตรด้วยเครื่อง ELISA plate reader แล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย quercitin การเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercitin ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรโดยชั่ง quercitin 20 มิลลิลิกรัมละลายในสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรเพื่อเก็บเป็น stock ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเตรียม alimunium chloride ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง aluminium chloride 4 กรัมละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และเตรียม sodium acetate (CH_3COONa) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยชั่ง 3.28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และสุดท้ายเตรียมสารสกัดหยาบจากรากของแครอทและเบบี้แครอทที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 990 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทดสอบ (14) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

Reagent	Reagent blank (µl)	Standard (µl)	Sample blank (µl)	Sample (µl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	50	50
สารละลายมาตรฐาน quercitin	-	50	-	-
สารละลาย 10% $AlCl_3$	10	10	-	10
80% Ethanol	50	-	10	-
95% Ethanol	150	150	150	150
สารละลาย 1 M CH_3COONa	10	10	10	10
ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 415 นาโนเมตร				

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดไปหักกับค่าของ blank แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน quercitin ซึ่งแสดงค่าเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ quercitin ต่อสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอทแห้ง 1 กรัม (mg QE /g dry weight sample)

4. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากรากแครอท และเบบี้แครอทด้วยวิธีการทำลายอนุมูลดีพีพีเอช โดยวิธี DPPH assay

เทคนิคการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลดีพีพีเอช (DPPH$^{\cdot}$) หรือ 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวมีสีม่วงซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร พร้อมที่จะทำปฏิกิริยากับสารที่ให้อิเล็กตรอนหรือสารที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่ออนุมูลดีพีพีเอชรับอิเล็กตรอนแล้วสารละลายสีม่วงจะจางลงแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองดังสมการ

$$DPPH^{\cdot} + RH \longrightarrow DPPH\text{-}H + R^{\cdot}$$

RH = สารที่ให้อิเล็กตรอนหรือสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

เตรียมสารละลายแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแอสคอร์บิค 20 มิลลิกรัมละลายในสารละลายเมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตรเพื่อเก็บเป็น stock ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเตรียม DPPH ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรโดยชั่ง DPPH 4.929 กรัมละลายในสารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง 0.7 ± 0.2 และสุดท้ายเตรียมสารสกัดหยาบจากรากของแครอทและเบบี้แครอทที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลายเมทานอล 990 ไมโครลิตร แล้วนำไปทดสอบตามตารางที่ 5 (15)

ตารางที่ 5 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

Reagent	Control (µl)	Standard blank (µl)	Standard (µl)	Sample blank (µl)	Sample (µl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	-	20	20
สารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid		20	20	-	-
สารละลาย DPPH	180	-	180	-	180
สารละลาย absolute ethanol	20	180	-	180	-
ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร					

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดมาคำนวณหา % Radical scavenging activity

% Radical scavenging activity = $100\times (Abs_{control}-(Abs_{sample}-Abs_{sample\ blank}))/Abs_{control}$

ค่าที่ได้จากการคำนวณ % Radical scavenging assay ไปสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical scavenging activity (แกน Y) และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid (แกน X) และนำค่า % Radical scavenging activity ของสารสกัดสมุนไพรไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid ซึ่งแสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิคต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (mg Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)/g dry weight sample)

5. การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเอบีทีเอสของสารสกัดหยาบ จากรากแครอทและเบบี้แครอทโดยวิธี ABTS assay

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$) หรือ 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical ซึ่งมีสีเขียวปนน้ำเงินให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยการสร้างอนุมูลอิสระอาศัยปฏิกิริยาของสารละลาย ABTS กับ oxidizing agent ซึ่งในที่นี่คือ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เมื่อ ABTS ถูกออกซิไดซ์จะเกิด ABTS free radical ($ABTS^{\bullet+}$) ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร

สมการแสดงปฏิกิริยา ABTS + oxidizing reagent ⟶ $ABTS^{\bullet+}$

$ABTS^{\bullet+}$ (green) + antioxidant ⟶ ABTS (colorless)

เตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้น เข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม โดยชั่งกรดแอสคอร์บิค 20 มิลลิลิกรัมละลายในสารละลายเมทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตรเพื่อเก็บเป็น stock ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและเตรียม ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยชั่ง ABTS 144 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และเตรียม potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยชั่ง potassium persulfate 33.1 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำ ABTS และ potassium persulfate มาผสมกันในอัตราส่วน 8:12 มิลลิลิตรแล้วเก็บในที่มืดเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสารที่ได้คือ $ABTS^{\bullet+}$ เมื่อครบเวลานำไปเจือจางด้วยสารละลายเอทานอลด้วยอัตราส่วนของ $ABTS^{\bullet+}$ 5 มิลลิลิตรในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร100 มิลลิลิตร (ค่าการดูดกลืนแสง 0.7±0.2) และสุดท้ายเตรียมสารสกัดหยาบจากรากของแครอทและเบบี้แครอทที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลายเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 495 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทดสอบ (16) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

Reagent	Control (µl)	Standard blank (µl)	Standard (µl)	Sample blank (µl)	Sample (µl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	-	20	20
สารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid	-	20	20	-	-
สารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ working reagent	180	-	180	-	180
สารละลาย absolute methanol	20	180	-	180	-
ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและสารสกัดสมุนไพรที่เทียบกับ blank ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร					

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดมาคำนวณหา % Radical scavenging activity

% Radical scavenging activity = 100× ($Abs_{control}$-(Abs_{sample}-$Abs_{sample\ blank}$))/$Abs_{control}$

ค่าที่ได้จากการคำนวณ % Radical scavenging assay ไปสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่าง % Radical scavenging activity (แกน Y) และค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน L-ascorbic acid (แกน X) และนำค่า % Radical scavenging activity ของสารสกัดสมุนไพรนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ L-ascorbic acid ซึ่งแสดงผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิคต่อสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (mg Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)/g dry weight sample)

6. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอทโดยวิธี Beta-carotene bleaching assay

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวัดการยับยั้งการฟอกสีของเบต้าแคโรทีนโดยอาศัยปฏิกิริยา coupled auto-oxidation ของ linoleic acid กับ beta-carotene ซึ่ง lipid radical ที่เกิดจากปฏิกิริยา auto-oxidation โดย linoleic acid เป็นไขมันที่ไม่อิ่มตัวจากนั้นถูกเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลอิสระของลิปิด (lipid free radicals) (สมการที่ 1) อนุมูลอิสระนี้มีความไวในการเกิดปฏิกิริยาซึ่งจะไปรวมตัวกับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxide) (สมการที่ 2) โดยอนุมูลอิสระนี้เป็นตัวการทำให้เกิด auto-oxidation อย่างต่อเนื่องโดยไปดึงไฮโดรเจนจากไขมันไม่อิ่มตัวในโมเลกุลอื่นๆ ทำให้เกิดอนุมูลอิสระลิปิดใหม่อย่างต่อเนื่อง (สมการที่ 3) ดังนั้น hydroperoxides สามารถทำลายพันะคู่ของ beta-carotene ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ beta-carotene จากสีส้มเหลืองเป็นไม่มีสีอย่างรวดเร็ว (สมการที่ 4) แต่ถ้าหากมีสารต้านอนุมูลอิสระก็สามารถป้องกันการโจมตีจาก lipid radical และรักษาสีของ beta-carotene ได้ ซึ่งวัดการดูดกลืนแสงด้วย ELISA plate reader ที่ 450 นาโนเมตร (17)

สมการเกิดปฏิกิริยา Auto-oxidation

RH (linoleic acid) $\longrightarrow$ $R^{\bullet}$ (lipid free radical) + $H^{\bullet}$ ----------(1)

$R^{\bullet}$ (lipid free radical) + O_2 $\longrightarrow$ $ROO^{\bullet}$ (lipid peroxide) + $H^{\bullet}$ ----------(2)

$ROO^{\bullet}$ (lipid peroxide) + RH $\longrightarrow$ ROOH (hydroperoxide) + $R^{\bullet}$ (lipid free radical)-----(3)

ROOH (hydroperoxide) + beta-carotene (orange-yellow)$\rightarrow$ beta-carotene (colorless)-(4)

เตรียมสารละลาย 3. 5- Di-tert-4-butylhydroxytoluene (BHT) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยชั่ง BHT 10 มิลลิกรัมละลายใน absolute methanol 10 มิลลิลิตร แล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียม emulsion โดยการชั่ง beta-carotene 10 มิลลิกรัมละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลาย beta-carotene มา 210 ไมโครลิตรผสมกับ linoleic acid 5 ไมโครลิตรและ Tween 20 ปริมาตร 42 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วระเหยสารละลายคลอโรฟอร์มออกด้วย rotary evaporatory ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาผสมกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และเตรียมสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดูดสารสกัดมา 10 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย absolute methanol ปริมาตร 990 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและห่อหลอดทดลองด้วยกระดาษฟอยล์

ตารางที่ 7 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดฤทธิ์ในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมัน

Reagent	Control (µl)	Positive control blank (µl)	Positive control (µl)	Sample blank (µl)	Sample (µl)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	-	20	20
3, 5- Di-tert-4-butylhydroxytoluene (BHT)	-	20	20	-	-
Emulsion (beta-carotene และ linoleic acid)	80	-	80	-	80
สารละลาย absolute methanol	20	80	-	80	-
ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร					

จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปหักกับ blank และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) และเวลา (แกน X) เพื่อติดตามการเปลี่ยนของสี beta-carotene เมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม (control)

7. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอทในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase)

เป็นเทคนิค Colorimetric method โดยสารละลายน้ำตาลมอลโตสและซูโครส ถูกย่อยโดยเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสจะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งวิธีนี้จะตรวจหาปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยใช้สารละลายเอนไซม์ peroxidase glucose oxidase (PGO enzyme) โดยที่มี O-dianisidine dihydrochloride ทำให้เกิดสี ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น ซึ่งสีน้ำตาลที่เข้มขึ้นบ่งบอกถึงปริมาณของกลูโคสที่มาก จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณ % Enzyme inhibition (18)

$$\text{Glucose} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{Gluconic acid} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{O-dianisdine} + HCl \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Oxidized O-dianisdine}$$

เตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดส โดยการชั่ง rat intestinal acetone powder 1 กรัมละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบ ต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดส่วนใสแบ่งใส่หลอดแล้วเก็บที่ตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 6.9 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเตรียมจากการผสมระหว่าง Na_2HPO_4 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 59 มิลลิลิตรและ NaH_2PO_4 0.1 โมลาร์ปริมาตร 41 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาปรับค่า pH 6.9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และเตรียมสารละลายมอลโตสความเข้มข้น 37 มิลลิโมลาร์ โดยชั่งมอลโตส 0.65 กรัมละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายซูโครสความเข้มข้น 120 มิลลิโมลาร์โดยการชั่งซูโครส 2.05 กรัมในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเตรียมสารละลาย PGO enzyme โดยนำ PGO enzyme 1 แคปซูล ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมกับ O-dianisdine dihydrochloride 1.6 มิลลิลิตร ซึ่งมาจากการชั่ง O-dianisdine dihydrochloride 50 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เก็บให้พ้นแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเตรียมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ acarbose ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งละลายใน DMSO

ตารางที่ 8 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์มอลเตส

Reagent	Control Blank (µl)	Control (µl)	Sample Blank (µl)	Sample (µl)
Maltose 37 mM	70	70	70	70
สารสกัดสมุนไพร, acarbose	-	-	10	10
Phosphate buffer pH 6.9	10	10	10	10
DMSO	10	10	-	-
เอนไซม์ α-glucosidase	-	10	-	10
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารมา 10 ไมโครลิตร				
Peroxidase glucosidase (PGO) enzyme	1000	1000	1000	1000
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร				

การทดสอบนี้ใช้ acarbose เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) โดยการเติมสารให้เติมแทนสารสกัดสมุนไพรและทำขั้นตอนอื่นทำเหมือนกับสารสกัดสมุนไพร จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปหักออกด้วย blank แล้วนำมาคำนวณ % Maltase enzyme inhibition

$$\% \text{ Maltase enzyme inhibition} = 100 \times [(Abs_{control}-Abs_{sample})/Abs_{control}]$$

ค่าที่ได้จากการคำนวณนำมาสร้างกราฟ โดยที่ แกน Y คือ % Maltase enzyme inhibition ส่วนแกน X คือความเข้มข้นของสารสกัดของสมุนไพรและสารละลาย acarbose

ตารางที่ 9 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์ซูเครส

Reagent	Control Blank (µl)	Control (µl)	Sample Blank (µl)	Sample (µl)
ซูโครส 37 mM	50	50	50	50
สารสกัดสมุนไพร, acarbose	-	-	10	10
Phosphate buffer pH 6.9	10	10	10	10
DMSO	10	10	-	-
เอนไซม์ α-glucosidase	-	40	-	40
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารมา 10 ไมโครลิตร				
Peroxidase glucosidase (PGO) enzyme	1000	1000	1000	1000
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร				

การทดสอบนี้ใช้ acarbose เป็นกลุ่มควบคุมบวกโดยการเติมสารให้เติมแทนสารสกัดสมุนไพรและทำขั้นตอนอื่นทำเหมือนกับสารสกัดสมุนไพร จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองไปหักออกด้วย blank แล้วนำมาคำนวณ % Sucrase enzyme inhibition

$$\% \text{ Sucrase enzyme inhibition} = 100 \times [(Abs_{control}-Abs_{sample})/Abs_{control}]$$

ค่าที่ได้จากการคำนวณนำมาสร้างกราฟ โดยที่ แกน Y คือ % Sucrase enzyme inhibition ส่วนแกน X คือความเข้มข้นของสารสกัดของสมุนไพรและสารละลาย acarbose

8. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอทในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase)

เป็นเทคนิค Enzymatic assay โดยสารละลายแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งเทคนิคนี้ได้ใช้เอนไซม์ porcine α-amylase และ สารที่ยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสโดยที่มีการเติมสารละลายแป้ง เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ของสารสกัดสมุนไพรที่อาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลสโดยที่มีการเติมสารละลาย 3, 5-dinitrosalicyclic acid (DNS) เพื่อหยุดปฏิกิริยาและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ถ้าสารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้จะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลืองแต่ถ้าไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้จะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีน้ำตาล

$$\text{Starch} + H_2O \xrightarrow{\alpha\text{-Amylase}} \text{Reducing Groups (glucose, maltose)}$$

เตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ (sodium phosphate buffer)ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยชั่ง NaH_2PO_4 0.7198 กรัม และ NaCl 0.1051 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตรแล้วปรับ pH 6.9 และเตรียมเอนไซม์อะไมเลสความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยชั่ง porcine α-amylase 10 มิลลิกรัมละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ของสารละลายแป้งโดยชั่ง แป้ง (starch) 0.2 กรัมละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.9 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจนกระทั่งแป้งเปลี่ยนเป็นสารละลายใสแล้วหยุดการต้ม และนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเตรียมสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทต (potassium sodium tartate) โดยชั่ง โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทต 12 กรัม ผสมกับ 8 มิลลิลิตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 2 โมลาร์โดยชั่ง1.6 กรัมแล้วละลายในน้ำ 20 มิลลิลิตร ซึ่งต้มที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส และเตรียม 3, 5-dinitrosalicyclic acid (DNS) ความเข้มข้น 96 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง DNS 0.438 กรัมละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส แล้วคนให้เข้ากัน และเตรียม DNS color reagent โดยต้มน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต 8 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้ และผสมกับสารละลาย DNS ความเข้มข้น 96 มิลลิโมลาร์ ปริมตาร 20 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเตรียมสารละลาย DMSO ต่อ น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยผสม DMSO 50 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เตรียมสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ acarbose ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (19)

ตารางที่ 10 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งเอนไซม์อะไมเลส

Reagent	Control Blank (µl)	Control (µl)	Sample Blank (µl)	Sample (µl)
DMSO:DW (1:1)	10	10	-	-
สารสกัดสมุนไพร, acarbose	-	-	10	10
α-amylase from porcine pancreas	-	10	-	10
น้ำกลั่น	10	-	10	-
ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที				
1% starch solution	10	10	10	10
ตั้งทิ้งไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที				
DNS color reagent	20	20	20	20
ตั้งทิ้งไว้ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที				
น้ำกลั่น	200	200	200	200
ดูดมา 200 ไมโครลิตร ใส่ในจานหลุม 96 หลุมแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA plate reader				

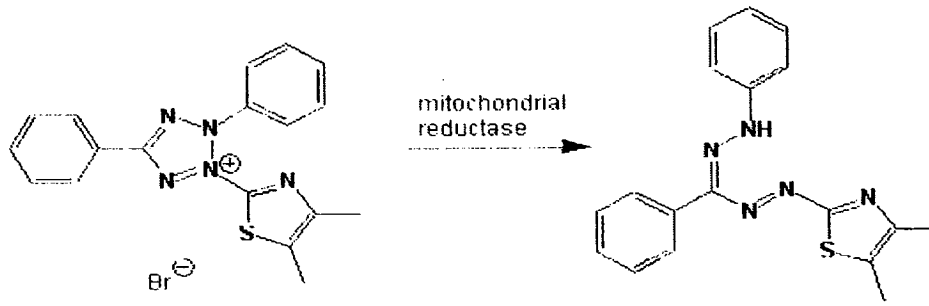
จากนั้นนำค่าที่ได้จากการทดลองหักออกด้วย blank แล้วนำมาคำนวณ % α-amylase enzyme inhibition

$$\% \alpha\text{-amylase enzyme inhibition} = 100 \times [(Abs_{control}-Abs_{sample})/Abs_{control}]$$

ค่าที่ได้จากการคำนวณนำมาสร้างกราฟ โดยที่ แกน Y คือ % α-amylase enzyme inhibition และแกน X คือความเข้มข้นของสารสกัดของสมุนไพรและสารละลาย acarbose

9. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย dimethly sulfoxide (DMSO) และสารสกัดสมุนไพรจากรากแครอทและเบบี้แครอทในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ตับอ่อนและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู โดยวิธี MTT assay

เป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสี (Colorimetric assays) โดยสารสีเหลือง MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) จะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เปลี่ยนเป็นตะกอนของ formazan สีม่วง ซึ่งสามารถละลายตะกอน formazan ด้วยสารตัวทำละลาย เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO) หรืออาจใช้ sodium dodecyl sulfate ที่เจือจางด้วยกรด hydrochloric จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นได้ตั้งแต่ 500-600 นาโนเมตร (194)



ภาพที่ 39 ปฏิกิริยารีดักชั่น (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay (194)

9.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO)ในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ตับอ่อนและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู โดยวิธี MTT assay

9.1.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ตับอ่อนของหนู (RIN-m5F cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (L6 cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/High glucose ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10,000 เซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม และใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.1.2 เตรียมสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 0.0025, 0.05, 0.1, 1 เปอร์เซ็นต์ ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI และ DMEM/High glucose ซึ่งแบ่งเป็น 2 แบบคือ แบบอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างเดียวและแบบอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี fetal bovine serum อยู่ 10

เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร

9.1.3 เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงให้ ใช้ปิเปตต์ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วย phosphate buffer saline 2 ครั้ง ครั้งละ 100 ไมโครลิตร

9.1.4 หลุม blank ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร ซึ่งไม่มีเซลล์ และ untreated cells คือหลุมที่มีเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 แบบ 100 ไมโครลิตร และ positive control ให้เติม 100 เปอร์เซ็นต์ของ DMSO 10 ไมโครลิตรกับอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 แบบ 90 ไมโครลิตร และ หลุมที่เป็น sample ให้เติมสาระลาย สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 0.0025, 0.05, 0.1, 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ 90 ไมโครลิตร ซึ่งความเข้มข้นของ DMSO จะถูกเจือจางลง 10 เท่าในหลุม ทำให้ความเข้มของ DMSO ในหลุมกลายเป็น 0.0025, 0.005, 0.01 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์

9.1.5 นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มเพาะเลี้ยงใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.1.6 เมื่อครบเวลาให้เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุมแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

9.1.7 เมื่อครบเวลาให้นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งไป

9.1.8 เติม DMSO 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนของ formazan และผสมให้เข้ากันด้วย multichannel pipetteและเขย่าจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย microplate shaker เป็นเวลา 5 นาที

9.1.9 วัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร คำนวณหาค่า % cell viability

$$\% \text{ cell viability} = 100 \times [(Abs_{(\text{treated cells})} - Abs_{(\text{blank})})/(Abs_{(\text{untreated cells})} - Abs_{(\text{blank})})]$$

9.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรจากรากแครอทและเบบี้แครอทในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์ตับอ่อนและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู โดยวิธี MTT assay

9.2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์ตับอ่อนของหนู (RIN-m5F cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (L6 cell) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/High glucose ที่มีส่วนประกอบของ fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ยาปฏิชีวนะชนิด penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10,000 เซลล์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม และใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.2.2 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุม blank ซึ่งไม่มีเซลล์และ untreated cells คือหลุมที่มีเซลล์และอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ positive control ให้เติม 100 เปอร์เซ็นต์ของ DMSO 10 ไมโครลิตรกับอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ 90 ไมโครลิตร และเติมสารสกัดสมุนไพรที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 0.78125, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้อบเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

9.2.3 เติม MTT ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุมบ่มเพาะเลี้ยงใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

9.2.4 เมื่อครบเวลาให้นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งไป

9.2.5 เติม DMSO 100 ไมโครลิตรต่อหลุมเพื่อละลายตะกอนของ formazan จากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และคำนวณ % cell viability

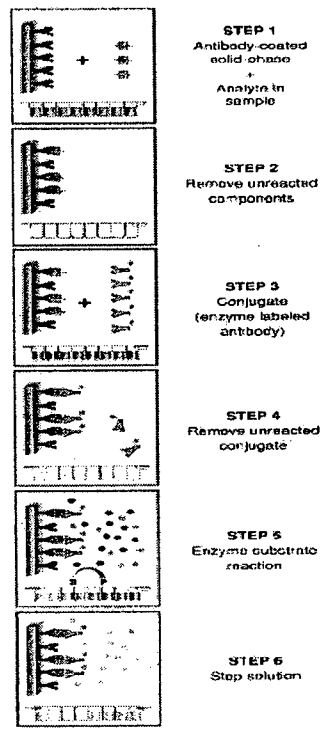
$$\% \text{ cell viability} = 100 \times [(Abs_{(\text{treated cells})} - Abs_{(\text{blank})})/(Abs_{(\text{untreated cells})} - Abs_{(\text{blank})})]$$

ค่าที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดสมุนไพรจากรากแครอทและเบบี้แครอทในการวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่มีค่าไม่แตกต่างจาก untreated cells จะถูกมาใช้ในการ

ทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินและการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ของสารสกัดสมุนไพร

10. การทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนหนู ของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอท

เทคนิค Enzyme linked immonusorbent assay ที่ใช้ในการทดสอบการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยแอนติบอดีต่ออินซูลินถูกเคลือบไว้ที่ก้นหลุม เมื่อใส่สารตัวอย่างที่มีอินซูลินจะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ก้นหลุม หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีตัวที่สองติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase conjugated anti-insulin antibodies) หลังจากนั้นทำการล้างเอาแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์แต่ไม่จับกับอินซูลินออกไป จากนั้นใส่ substrate ชนิด 3, 3',5 5'-tetramethylbenzidine (TMB) ลงไปเพื่อไปจับกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ติดอยู่กับแอนติบอดีและทำปฏิกิริยากับอินซูลิน และสุดท้ายปฏิกิริยาถูกหยุดด้วยกรดแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร



ภาพที่ 40 แสดงถึงหลักการทำงานของ เทคนิค Enzyme linked immonusorbent assay จากบริษัท Mercodia ประเทศสวีเดน

เตรียมเพาะเลี้ยงเซลล์ 5,000 เซลล์ต่อหลุม ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 6 หลุม ให้มีปริมาตรรวม 2 มิลลิลิตร ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มี fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์และเติมน้ำตาล 11.1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและล้างด้วย Kreb's ringer bicarbonate buffer ที่ผสมด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ของ bovine serum albumin 2 มิลลิลิตร 3 ครั้ง เมื่อครบ 3 ครั้งให้เติม Kreb's ringer bicarbonate buffer ที่ผสมด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ของ bovine serum albumin 2 มิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 40 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบเวลาดูดออกแล้วเติมสารดังต่อไปนี้ หลุม untreated cells ให้เติม RPMI 1640 2 มิลลิลิตร, หลุมของสารสกัดสมุนไพรให้เติมสารสกัดละลายใน RPMI 1640 ให้ได้ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 2 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของสารสกัดมาจากการทดสอบด้วยวิธี MTT assay) และหลุม positive control เติม glyburide ให้ได้ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจนปริมาตรสุดท้ายเป็น 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบเวลาให้นำไปปั่นที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตรแล้วใส่หลอดแล้วนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบ Mercodia High Range Insulin ELISA Kit จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (20)

ตารางที่ 11 แสดงถึงขั้นตอนการเติมสารเพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอทในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ตับอ่อนของหนู

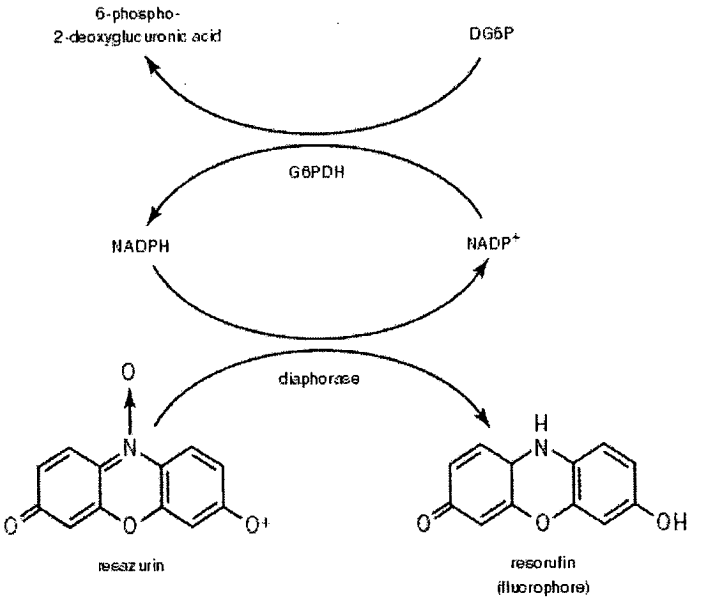
Reagent	Calibrator (µl)	Control (µl)	Sample (µl)
Calibrator 1-5	10	-	-
Enzyme conjugate	50	50	50
เขย่าด้วยเครื่อง microplate shaker ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง			
Wash solution	200	200	200
ล้างด้วย wash solution 6 ครั้งและซับให้แห้ง			
Substrate TMB	200	200	200
เขย่าด้วยเครื่อง microplate shaker 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที			
Stop solution	200	200	200
เขย่าให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิ 18-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร			

จากนั้นนำค่าของ calibrator 1-5 มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอินซูลิน ในหน่วยนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (แกน X) และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร (แกน Y) จากนั้นนำค่าของอินซูลินในสารตัวอย่างมาเทียบเพื่อหาความเข้มข้นของอินซูลิน และนำค่าของอินซูลินของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดและ glyburide มาเทียบกับ untreated cells เป็นจำนวนเท่า

11. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอทในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู

เป็นเทคนิคการทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยการเติม 2-deoxy-D-glucose (2DG) ซึ่งภายในเซลล์จะมีการเติมหมู่ฟอสเฟตทำให้เปลี่ยนเป็น 2-deoxyglucose 6-phosphate (2DG-6P) หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ 2-deoxyglucose 6-phosphate (2DG-6P) เปลี่ยนเป็น 6-phosphoglucoronic-2-deoxyglucuronic acid และในขณะเดียวกันเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนจาก $NADP^+$ เป็น NADPH จากนั้นเอนไซม์ diaphorase เร่งปฏิกิริยาทำให้มีการเปลี่ยน resazurin เป็น resorufin ซึ่งเป็นสารเรืองแสงและเกิดปฏิกิริยาคู่กันคือ diaphorase เปลี่ยน NADPH เป็น $NADP^+$ และปฏิกิริยาลูกโซ่นี้ยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งใช้ 2DG-6P หมดไป และปริมาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorophore) ของ resorufin ขึ้นอยู่กับปริมาณของ

2DG-6P และวัดการเรืองแสงของ resofurin ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (exit) และ 615 นาโนเมตร (emit) โดยเครื่อง Multilabel reader (21)



ภาพที่ 41 แสดงถึงการเกิด resofurin ซึ่งเป็นสารเรืองแสงของปฏิกิริยาการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนู (195)

11.1 เพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อของหนูในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM/High glucose มี fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีจำนวนเซลล์ 4,000 เซลล์ต่อหลุมในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 วัน

11.2 เมื่อครบ 2 วันให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น DMEM/High glucose ที่มี fetal bovine serum อยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเปลี่ยนต่อไปในวันที่ 4 และ 6

11.3 เมื่อถึงวันที่ 7 ให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเติม DMEM/High glucose 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

11.4 ล้างด้วย KRH buffer (HEPES free acid 50 มิลลิโมลาร์, NaCl 137 มิลลิโมลาร์, KCl 4.7 มิลลิโมลาร์, $CaCl_2$ 1.8 มิลลิโมลาร์, $MgSO_4$ 1.3 มิลลิโมลาร์) ซึ่งมี bovine serum albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรเป็นเวลา 2 ครั้ง

11.5 เติม DMEM/High glucose 100 ไมโครลิตร ในหลุม untreated cells, เติมสารสกัดสมุนไพรให้ได้ความเข้มข้น 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในหลุม sample ซึ่งจนได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร, เติม insulin คามเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุม insulin และเติม 1, 1-dimethylbiguanide, hydrochloride (metformin) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

11.6 นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

11.7 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย KRH buffer ซึ่งมี bovine serum albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรเป็นเวลา 2 ครั้ง

11.8 เติม KRH buffer ซึ่งมี bovine serum albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ 2-deoxy-D-glucose ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาที

11.9 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วล้างด้วย KRH buffer ซึ่งมี bovine serum albumin 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตรเป็นเวลา 2 ครั้ง

11.10 เติม NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในตู้ hot air oven ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 50 นาที

11.11 เติม HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อเจือจางด่าง

11.12 เติม TEA buffer pH 8.1 ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

11.13 เตรียม 2-deoxyglucose 6-phosphate (2DG-6P) ที่ความเข้มข้น 0, 1.875, 3.75, 7.5, 15 และ 30 ไมโครโมลาร์ เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

11.14 ดูด lysate จากข้อ 11.12 และ 2DG-6P มา 10 ไมโครลิตรในจานเพาะเลี้ยง 96 หลุมจานใหม่ และเติม assay solution 100 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบของ TEA buffer pH 8.1 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, KCl 50 มิลลิโมลาร์, bovine serum albumin 0.02 เปอร์เซ็นต์, NADP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์, diaphorase 0.2 ยูนิต, resazurin sodium salt 5 ไมโครโมลาร์ และ G6PDH 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

11.15 นำจานปฏิกิริยาไปบ่มที่ตู้ hot air oven ที่อุณหภูมิ 45 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

11.16 วัดค่าแสงฟลูออเรสเซนต์ ที่ความยาวคลื่น ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร (exit) และ 615 นาโนเมตร (emit)

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดของ 2DG-6P มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) และ ความเข้มข้นของ 2DG-6P (แกน X) และนำค่าของ lysate ของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ 2DG-6P และเมื่อได้ค่าแล้วนำมาเทียบกับ untreated cells ให้เป็นจำนวนเท่า

12. การวิเคราะห์ข้อมูล

12.1 การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการลดระดับกลูโคสของสารสกัดหยาบจากรากแครอทและเบบี้แครอท แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean ± SEM) ของการทำการทดลอง 3 ครั้งซึ่งเป็นอิสระต่อกัน

12.2 การทดสอบการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย dimethly sulfoxide (DMSO) และสารสกัดสมุนไพรจากรากแครอทและเบบี้แครอทในการวัดการมีชีวิตรอด (cell viability) ของเซลล์, การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินในเซลล์ตับอ่อน และการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อของหนูซึ่งแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean ± SEM) ของการทำการทดลอง 3 ครั้ง และทำการทดสอบทางสถิติโดยคำนวณหาความแตกต่างระหว่างค่าของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรและยาเปรียบเทียบกับค่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดสมุนไพรและยา (control) โดยใช้สถิติ one way ANOVA และ post hoc Tukey test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)