บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การจัดทำข้อมูลพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ปกป้องตับ และการคัดเลือกพืชสมุนไพรสำหรับการศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับ

จัดทำตารางสรุปข้อมูลพืชสมุนไพรในหัวข้อต่อไปนี้

2.1.1 พืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทยที่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับ โดยใช้การศึกษา *in vivo*

2.1.2 พืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทยที่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ปกป้องตับ โดยใช้การศึกษา *in vitro*

2.1.3 พืชสมุนไพรในตำรับที่มีสรรพคุณกล่าวอ้างว่าใช้ในการรักษาโรคตับ

2.1.4 พืชสมุนไพรที่มีการกล่าวอ้างว่าใช้ในการรักษาโรคตับ

การคัดเลือกพืชสมุนไพร 5 ชนิด ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ ได้พิจารณาตามข้อมูลที่ได้จากการทบทวนวรรณกรรม และจากงานวิจัยซึ่งคณะผู้วิจัยโครงการนี้ได้ทำการศึกษา (จักรนารายณ์และมะม่วง) ของกลุ่มผู้วิจัยชุดเดียวกันนี้ซึ่งมีงานทดสอบฤทธิ์ปกป้องตับในหนูขาวและ/หรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยังไม่ได้มีการทดสอบฤทธิ์ปกป้องตับโดยใช้การทดลอง *in vitro*

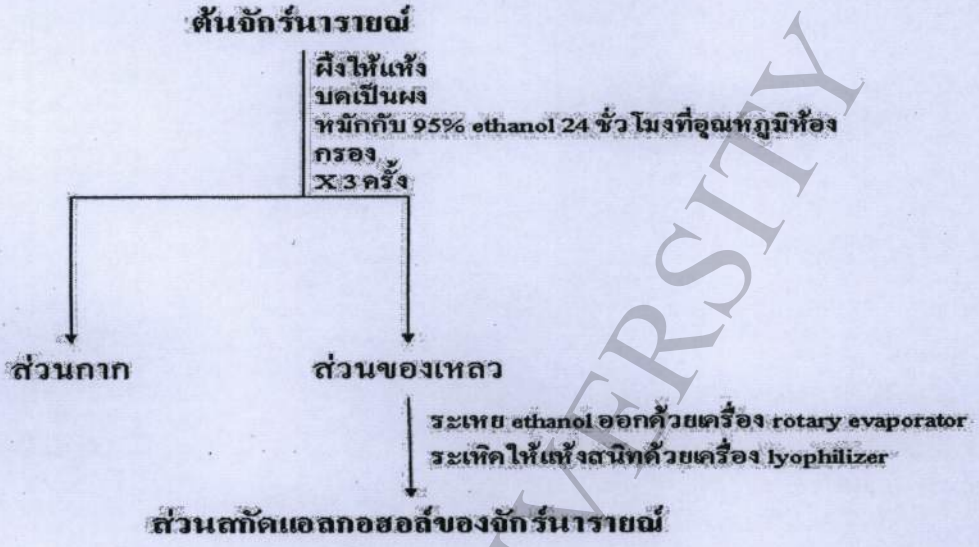
พืชสมุนไพรที่คัดเลือก สำหรับใช้ศึกษาในโครงการวิจัยนี้ ได้แก่ ปัญจขันธ์ จักรนารายณ์ มะม่วง สาหร่ายเตา และ สาหร่ายสไปรูลินา

PAYAP UNIVERSITY

2.2 การเตรียมส่วนสกัด

2.2.1 การเตรียมส่วนสกัดจักรนารายณ์

ขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัดแอลกอฮอล์ของจักรนารายณ์ แสดงไว้ในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัดแอลกอฮอล์ของจักรนารายณ์

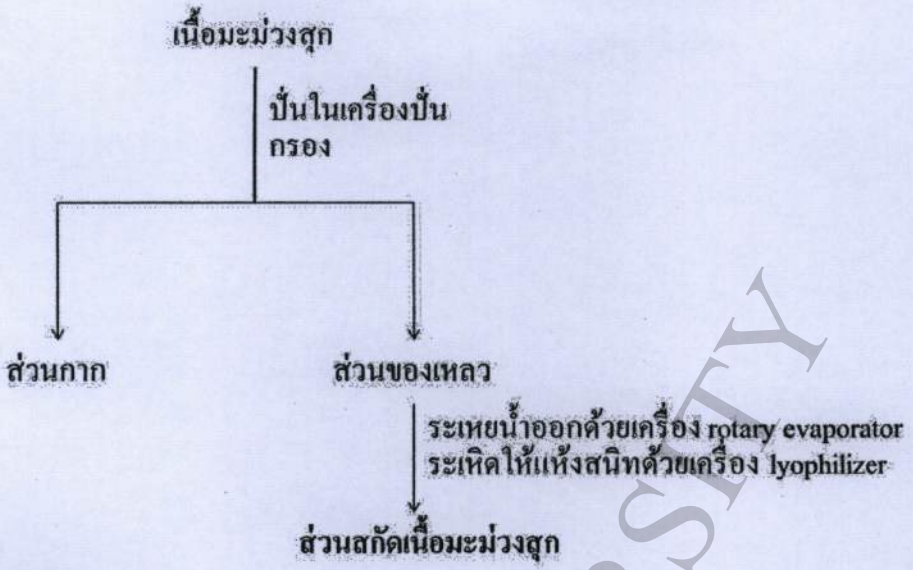
2.2.2 การเตรียมส่วนสกัดปัญจขันธ์

การเตรียมส่วนสกัดแอลกอฮอล์ของปัญจขันธ์ ใช้ขั้นตอนเช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในการเตรียมส่วนสกัดจักรนารายณ์

2.2.3 การเตรียมส่วนสกัดมะม่วงมหาชนก

ขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัด แสดงไว้ในรูปที่ 2.2

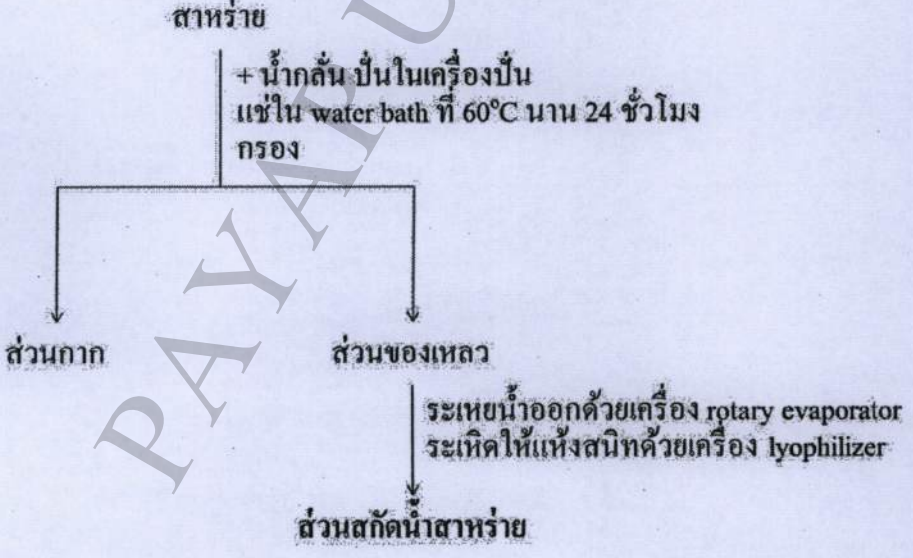
PAYAP UNIVERSITY



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัดมะม่วง

2.2.4 การเตรียมส่วนสกัดสาหร่ายเตา

เตรียมในรูปส่วนสกัดน้ำ ตามขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 ขั้นตอนการเตรียมส่วนสกัดน้ำของสาหร่าย

PAYAP UNIVERSITY

2.2.4 การเตรียมส่วนสกัดสาหร่ายสไปรูลินา

การเตรียมส่วนสกัดน้ำของสาหร่ายสไปรูลินา ใช้ขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 2.3

2.3. การทดสอบฤทธิ์ปกป้องตับ

2.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ตับปฐมภูมิ (primary hepatocyte culture)

เซลล์ที่ใช้ตรวจสอบได้แก่ เซลล์ตับ (Heptatocyte) ได้จากการแยกเซลล์ตับจากหนูทดลองพันธุ์ Wistar rat เพศผู้ น้ำหนัก 150-200 กรัม โดยหนูทดลองจะถูกทำการุณฆาตด้วยการดมสลบด้วยไดเอทิลอีเทอร์ ทำการชะเลือดที่ค้างอยู่ในตับออกด้วยเทคนิค Perfusion โดยการใช้สารละลาย Ca^{2+}-Mg^{2+} free Hank buffer salt solution (HBSS buffer) pH 7.4 อุณหภูมิ 37 °C

หลังจากนั้นจึงทำการย่อยเซลล์ตับ ด้วยเทคนิค Collagenase perfusion technique โดยการฉีดสารละลายเอนไซม์ 0.075% Collagenase ใน HBSS buffer ที่ อุณหภูมิ 37 °C ผ่านเส้นเลือดที่เข้าสู่ตับ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการตัดตับออกมาวางในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลาย เอนไซม์ 0.075% Collagenase ใน HBSS buffer ที่ อุณหภูมิ 37 °C ทำการย่อยให้สมบูรณ์แล้วนำสารละลายเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 50 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์อีกหนึ่งครั้งด้วยสารละลาย HBSS buffer

แบ่งเซลล์บางส่วนไปทำการนับจำนวนเซลล์โดยเทคนิคการย้อมด้วยสี Trypan blue dye exclusion test จากนั้นเซลล์ที่ทราบจำนวนแน่นอนจึงถูกถ่ายมาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อแบบ 6 หลุม แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณเซลล์ 3,000 เซลล์ต่อหลุม ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle ที่ผสมด้วย Fetal bovine serum 10%, dexamethasone 1 mg/ml, insulin 10 mg/ml, และ penicillin-streptomycin 100 IU/ml เลี้ยงปรับสภาพเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ และ CO_2 5 %

2.3.2. การทดสอบฤทธิ์ปกป้องตับ

เซลล์ตับปฐมภูมิที่ทำการเพาะเลี้ยงปรับสภาพเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว จะถูกนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อตับโดยการเติมสารที่มีฤทธิ์ทำลายตับลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยในการ

PAYAP UNIVERSITY

ศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้เลือกใช้สารที่มีพิษต่อตับสองชนิดมาทำการศึกษา ได้แก่ สารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Carbontetrachloride: CCl_4) และ พาราเซตามอล (paracetamol/acetaminophen: PCM)

เซลล์กลุ่มควบคุม เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเติมสารละลาย sterile phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 โดยไม่เติมสารที่มีพิษต่อเซลล์ตับ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 °C, 5% CO_2

ในเซลล์กลุ่มที่เหนี่ยวนำด้วยคาร์บอนเตตระคลอไรด์ จะทำการเติมสารละลายคาร์บอนเตตระคลอไรด์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้มีความเข้มข้นของคาร์บอนเตตระคลอไรด์ 2.5 mM บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 °C, 5% CO_2

ส่วนเซลล์ที่เหนี่ยวนำด้วยพาราเซตามอล จะทำการเติมสารละลายพาราเซตามอลลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ 7 mM บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 °C, 5% CO_2

เซลล์กลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับจะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ร่วมกับการเติมสารสกัดหยาบของพืชที่ต้องการศึกษาที่ละลายด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 400, 200, 100, 50, 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เติมลงในหลุมเซลล์ที่เตรียมไว้

หลังจากครบเวลา ทำการแยกส่วนเซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์

1) ส่วนของเซลล์ จะถูกนำไปนับจำนวนเซลล์มีชีวิต ด้วยเทคนิค MTT cell viability assay โดยการเปลี่ยนอาหารเดิมที่มีสารสกัดอยู่เป็นอาหารใหม่ที่ผสมด้วยสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrasolium bromide (MTT) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในแต่ละหลุมเซลล์ และเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้เกิดผลึก MTT formazan จากนั้นจึงทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT ที่เหลือทิ้ง แล้วละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้นด้วยสารละลาย dimethysulfoxide (DMSO) จำนวน 150ไมโครลิตร ทุกหลุมเซลล์ ทำ การวัดสีม่วงน้ำเงินของ formazan ที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยความเข้มของสีจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต

2) ส่วนของอาหารเลี้ยงเซลล์ จะถูกนำไปวิเคราะห์หากัมมันตภาพเอนไซม์ Aspartate aminotransferase (AST) และเอนไซม์ Alanine aminotransferase (ALT) ด้วยเทคนิค Spectrophotometry โดยใช้ AST/ALT detection kit ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างและทำหน้าที่อยู่ในเซลล์ตับ โดยปกติจะไม่หลุดรอดออกมาจากเซลล์ แต่หากเซลล์ตับถูกทำลายเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะหลุดรอดออกมาจากเซลล์ จึงจะพบค่ากัมมันตภาพเอนไซม์สูงขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์

PAYAP UNIVERSITY

โดยการทดสอบฤทธิ์ปกป้องตับของสารสกัดพืชแต่ละชนิดจะทำซ้ำกันสามครั้งในแต่ละการทดลอง และทำทั้งสิ้นสามการทดลองเพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการป้องกันการตายของเซลล์ และป้องกันการทำลายเซลล์ของสารที่มีพิษต่อตับ

2.4 การทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดต่อเซลล์มะเร็งตับ

2.4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ

เซลล์มะเร็งที่ใช้ตรวจสอบได้แก่ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเริ่มจากการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งในขวดเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle ที่ผสมด้วย Fetal bovine serum 10% และ Penicillin-Streptomycin 100 IU ต่อ มล. เป็นเวลา 3-7 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ และ CO_2 5 % จนกว่าจะได้ปริมาณเซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มที่ (70-80% confluent)

2.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ

เซลล์มะเร็งที่เจริญเติบโตเต็มที่ จะถูกสกัดจากขวดเพาะเชื้อด้วยสารละลาย Trypsin-EDTA จากนั้นเซลล์ที่สกัดได้จะถูกนำมาทดสอบหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธี Trypan blue dye exclusion test จากนั้นเซลล์ที่ทราบจำนวนแน่นอนจึงถูกถ่ายมาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อแบบ 96 หลุม โดยให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นอยู่ที่ 3,000 เซลล์ต่อหลุม ทำการเลี้ยงปรับสภาพในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle ที่ผสมด้วย Fetal bovine serum 10% และ Penicillin-Streptomycin 100 IU ต่อ มล. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ. และ CO_2 5 %

เมื่อครบเวลา นำสารสกัดหยาบที่ละลายด้วยสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 มก./มล. มาเตรียมให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เติมลงในหลุมเซลล์มะเร็งที่เตรียมไว้หลุมละ 200 ไมโครลิตร

โดยมีเซลล์มะเร็งที่เติมเฉพาะตัวทำละลาย DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 1% ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม ทำการเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ และ CO_2 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเดิมที่มีสารสกัดอยู่เป็นอาหารใหม่ที่ผสมด้วยสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrasolium bromide (MTT) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในแต่

PAYAP UNIVERSITY

ละหลุมเซลล์ และเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร MTT ทิ้ง แล้วเติมด้วยสารละลาย dimethysulfoxide (DMSO) จำนวน 150ไมโครลิตร ทุกหลุมเซลล์ ทำ การวัดสีที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

โดยการทดสอบสารสกัดจะทำซ้ำกันสามครั้งในแต่ละการทดลอง และทำทั้งสิ้นสามการทดลองเพื่อวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 % (inhibition concentration ที่ 50 %) (IC 50)

2.5 การศึกษาทางพฤกษเคมีของส่วนสกัดพืชสมุนไพร

ส่วนสกัดพืชสมุนไพร 1 ชนิด ที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีฤทธิ์ปกป้องตับ นำไปศึกษาทางพฤกษเคมี โดย

2.5.1 ตรวจหากลุ่มสารสำคัญ

ใช้วิธีการทดสอบดังที่ระบุในหนังสือ A Thin Layer Chromatography Atlas (1996) ดังนี้

Stationary Phase ที่ใช้ คือ TLC silica gel 60 F254 (Aluminium sheets 5x10 cm) และ Mobile phase ที่ใช้คือ Ethyl acetate : Methanol : Water = 1 : 2 : 1

1) กลุ่ม flavonoids

Detection reagents คือ Natural products polyetheneglycol Reagent (NP/PEG) ซึ่งประกอบด้วย NP (1% methanolic diphenylboric acid-β-ethylamino ester และ 5% ethanolic polyethyleneglycol-400 (PEG)

สเปรย์ plate ด้วย NP (10 มล.) แล้วตามด้วย PEG (8 มล.) สังเกตสีที่เกิดขึ้น

Positive: สีเหลือง / เขียว / ส้ม

PAYAP UNIVERSITY

2) กลุ่ม saponins

Detection reagents คือ Vanillin-sulfuric acid ซึ่งประกอบด้วย solution I (5% Ethanolic sulfuric acid) และ solution II (1% Ethanolic vanillin)

สเปรย์ plate ด้วย 10 มล. solution I แล้วตามทันทีด้วย5-10 มล. solution II. หลังจากนั้นทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ110°C นาน 5-10 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้น

Positive: สีน้ำเงิน

2.5.2 การตรวจคัดกรองทางเคมีเพื่อหากลุ่มสารสำคัญ (Phytochemical screening) ในส่วนสกัดเอธานอลของจักรนารายณ์

1) กลุ่ม alkaloids

Detection reagent คือ Dragendorff's reagent (เตรียมโดย ละลาย basic bismuth nitrate 0.85 กรัม ในน้ำ 40 มล. และ glacial acetic acid 10 มล. จากเติมสารละลายที่เตรียมโดยละลาย potassium iodide 8 กรัม ในน้ำ 20 มล.)

สเปรย์ plate ด้วย Dragendorff's reagent (10 มล.) สังเกตสีที่เกิดขึ้น

Positive: สีส้ม

2) กลุ่ม saponins

Detection reagents คือ Vanillin-sulfuric acid ซึ่งประกอบด้วย solution I (5% Ethanolic sulfuric acid) และ solution II (1% Ethanolic vanillin)

สเปรย์ plate ด้วย 10 มล. solution I แล้วตามทันทีด้วย5-10 มล. solution II. หลังจากนั้นทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ110°C นาน 5-10 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้น

Positive: สีน้ำเงิน

PAYAP UNIVERSITY

3) กลุ่ม flavonoids

Detection reagents คือ Natural products polyetheneglycol Reagent (NP/PEG) ซึ่งประกอบด้วย NP (1% methanolic diphenylboric acid-β-ethylamino ester และ 5% ethanolic polyethyleneglycol-400 (PEG)

สเปรย์ plate ด้วย NP (10 มล.) แล้วตามด้วย PEG (8 มล.) สังเกตสีที่เกิดขึ้น

Positive: สีเหลือง / เขียว / ส้ม

4) กลุ่ม anthaquinones

Detection reagents คือ 10% ethanolic KOH (ละลาย potassium hydroxide 10 กรัม ใน 100 มล EtOH, Borntrager reaction)

สเปรย์ plate ด้วย 10 ml of 10% ethanolic KOH สังเกตสีที่เกิดขึ้น

Positive: สีแดง

5) กลุ่ม anthrones

Detection reagents คือ 10% ethanolic KOH (Borntrager reaction)

สเปรย์ plate ด้วย 10 ml 10% ethanolic KOH สังเกตสีที่เกิดขึ้น ภายใต้ UV-365nm

Positive: สีเหลือง

6) กลุ่ม coumarins

Detection reagents คือ 10% ethanolic KOH (Borntrager reaction)

สเปรย์ plate ด้วย 10 มล. 10% ethanolic KOH สังเกตสีที่เกิดขึ้นภายใต้ UV-365nm.

Positive: เรืองแสงสีเขียวอมเหลือง

PAYAP UNIVERSITY

7) กลุ่ม tannins

Detection reagents คือ 0.1% ferric chloride (ละลาย 0.1 ก ferric chloride ใน100 มล. HCl 0.1% (v/v)

สเปรย์ plate ด้วย 10 มล. 0.1% ferric chloride สังเกตสีที่เกิดขึ้น

Positive: สีน้ำเงินปนดำ

2.5.3 ตรวจเอกลักษณ์โดย 2 เทคนิค

1) Gas chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry (GC/ESI-MS (Bhoopat et al., 2011; Kajdžanoska et al., 2010)

เทคนิค GC-MS สามารถทำนายชนิดขององค์ประกอบสารต่างๆที่มีอยู่ในสารตัวอย่างได้ค่อนข้างแม่นยาโดยเปรียบเทียบ fingerprint ของเลขมวล (mass number, m/z) ของสารที่แยกวิเคราะห์ได้กับข้อมูลที่มีอยู่ library database สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้อย่างถูกต้อง หลักการทางานของเครื่อง GC-MS นั้นเริ่มจากนาตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง GC จากนั้นสารก็จะถูกแยกออกเป็นองค์ประกอบต่าง ๆ เมื่อผ่านเข้าสู่ column ที่อยู่ใน oven จากนั้นองค์ประกอบใดที่ถูกแยกออกมาจาก column ก่อนก็จะผ่านเข้าไปในส่วนของเครื่อง MS ซึ่งมีสภาวะเป็นสุญญากาศก่อน แล้วเข้าไปเจอกับ ion source ซึ่งจะทาหน้าที่ไอออไนซ์โมเลกุลที่ผ่านเข้ามาให้กลายเป็นประจุ จากนั้นประจุเหล่านี้ก็จะเดินทางผ่านเครื่องคัดเลือกและแยกแยะขนาดของประจุ (mass analyzer) เพื่อดูว่าประจุเหล่านั้นประกอบไปด้วยขนาดมวล (mass number) เท่าใด แล้วนาไปเทียบกับข้อมูลอ้างอิงและแปลผลออกมาเป็นชื่อขององค์ประกอบนั้นๆ ละลายสารสกัด 5 มิลลิกรัม ในสารละลาย methanol 5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กรองผ่าน polysulphone membrane (0.45 µm) membrane แล้วนาไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือและสภาวะตามที่กำหนดดังนี้ เครื่องมือ gas chromatography (GC6890 Agilent Technologies, USA) คอลัมน์วิเคราะห์ (HP-5MS, 30m x 0.25 mm ID x 0.25 mm film thick) อุณหภูมิ 270°C, 1.0-µl split ratio (10:1), oven temperature ที่ 50°C (12°C/min) → 260°C (42.5 min) อัตราเร็วการไหลของก๊าซฮีเลียมตัวพา 1.0 mm/min เครื่องมือ mass spectrometer (MSD5973 EI Hewlett Packard, MS Quadrupole 150°C, MS source 230°C) และใช้โปรแกรม ChemStation วิเคราะห์ข้อมูล

PAYAP UNIVERSITY

งานนี้จัดส่งไปทำที่ศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ส่วนการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จัดทำโดย คณะผู้วิจัย (รศ.ดร. สมเดช)

2) High-performance liquid chromatography/diode array detection/electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC/DAD/ESI-MS)

วิธี HPLC-ESI-MS เป็นการวิเคราะห์สารประกอบพฤกษเคมี (phytochemical compounds) หรือสารเมตาโบไลท์มีขั้ว สามารถแยกสารองค์ประกอบต่างๆที่มีขั้วและมีประจุออกจากกันได้ด้วยการใช้ adsorption column ชนิดต่างๆ รวมทั้งสามารถตรวจวัดสารองค์ประกอบต่างๆที่ถูกแยกลาดับผ่านคอลัมน์ออกมาด้วยวิธี diode array detection (DAD) ที่ความยาวคลื่นต่างๆ (200-800 นาโนเมตร) ที่มีหมู่ฟังชั่นหรือหมู่โครโมฟอร์แตกต่างกันและด้วยวิธี mass spectrometry ที่ทำให้ทราบมวลโมเลกุลสารต่างๆเหล่านั้นได้พร้อมกัน โดยระบบเครื่องมือ HPLC/DAD/ESI-MS ซึ่งประกอบด้วย Four high-pressure pumps, autosampler, degasser system, thermostatted column oven, photodiode array (PDA) detector, ion-trap mass spectrometer (MS) detector และ ChemStation software-preinstalled computer ภายใต้สภาวะการแยกวิเคราะห์คือ analytical column (Zorbax SB C18 type, 150mm x 4.6mm, 5-µm particle size) ภายใต้อุณหภูมิการวิเคราะห์ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่สองชนิดต่างกันคือ 0.1% (v/v) formic acid in water (solvent A) และ 90% (v/v) acetonitrile in water (solvent B) ทำการชะแบบ linear-gradient elution ตามโปรแกรมตั้งไว้ ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี DAD ทาการเก็บรวบรวมข้อมูลสเปคตรัมของทุกๆกราฟที่แยกได้ในช่วงความยาวคลื่น 190-600 นาโนเมตร พร้อมบันทึก chromatographic profile ที่สนใจที่ความยาวคลื่น 280, 325 และ 450 นาโนเมตร ส่วนการวิเคราะห์ด้วยวิธี ESI-MS ทำการบันทึกค่ามวลโมเลกุลสารที่ช่วง 250-1200 m/z 7.

2.6 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และ post hoc least-significant difference (LSD) test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ค่า p น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

PAYAP UNIVERSITY

2.7 สารเคมี

Acetaminophen (Sigma, USA), Alanine aminotransferase detection kit (Biotech), Aspartate aminotransferase detection kit (Biotech), Carbontetrachloride (Sigma, USA). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) (Sigma, USA), Dimethysulfoxide (DMSO) (Riedel, USA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco,USA), Fetal bovine serum (Hyclone, USA), Hank buffer salt solution (HBSS) (Gibco, USA), Penisillin-streptomycin (Gibco, USA), Trypsin-EDTA (Gibco, USA),

PAYAP UNIVERSITY