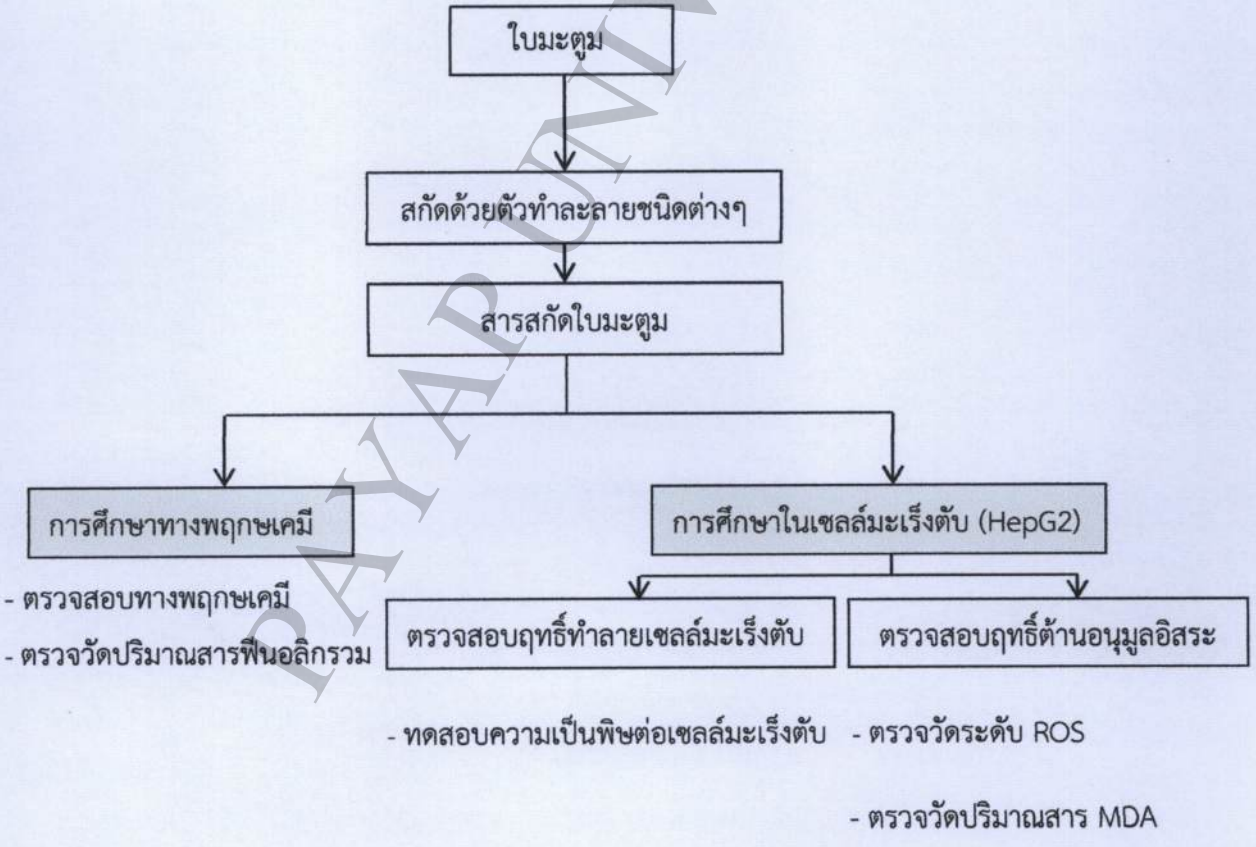
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ มุ่งเน้นศึกษาใบมะตูมซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งตับ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งตับ ทั้งนี้เพื่อช่วยลดปริมาณการใช้ยารักษาโรคมะเร็ง ลดค่าใช้จ่ายและผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์



PAYAP UNIVERSITY

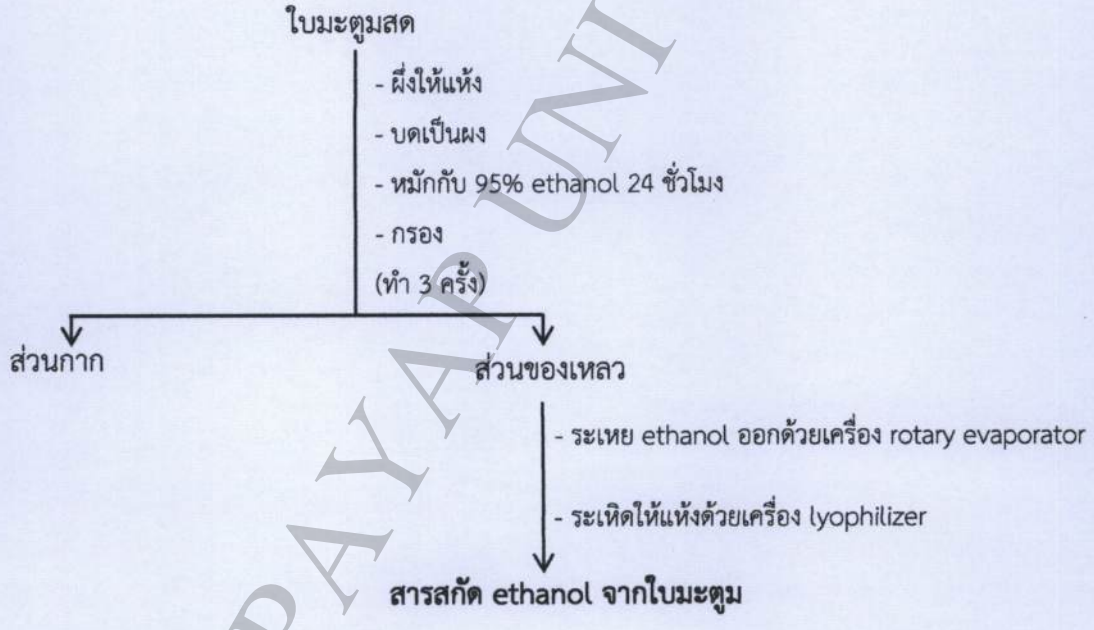
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

3.2.1 สืบค้นจากงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศที่มีรายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะตูม

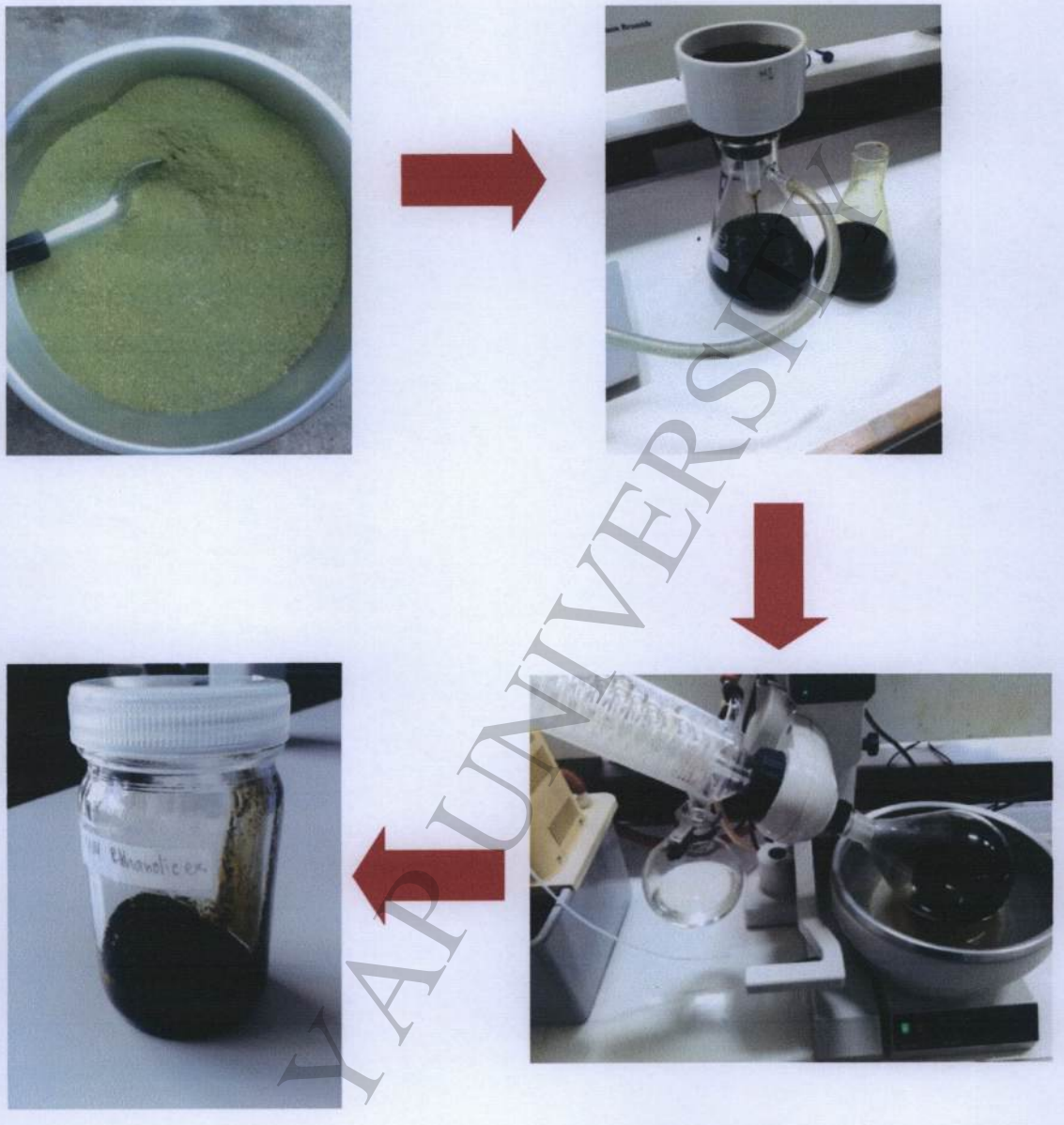
ทำการสืบค้นผลงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศที่มีการรายงาน เพื่อหาข้อมูลถึงส่วนประกอบที่สำคัญในใบมะตูม, วิธีการสกัดที่เหมาะสม, ฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบมะตูม

3.2.2 การเตรียมสารสกัด

1) การเตรียมสารสกัดเอทานอลจากใบมะตูม



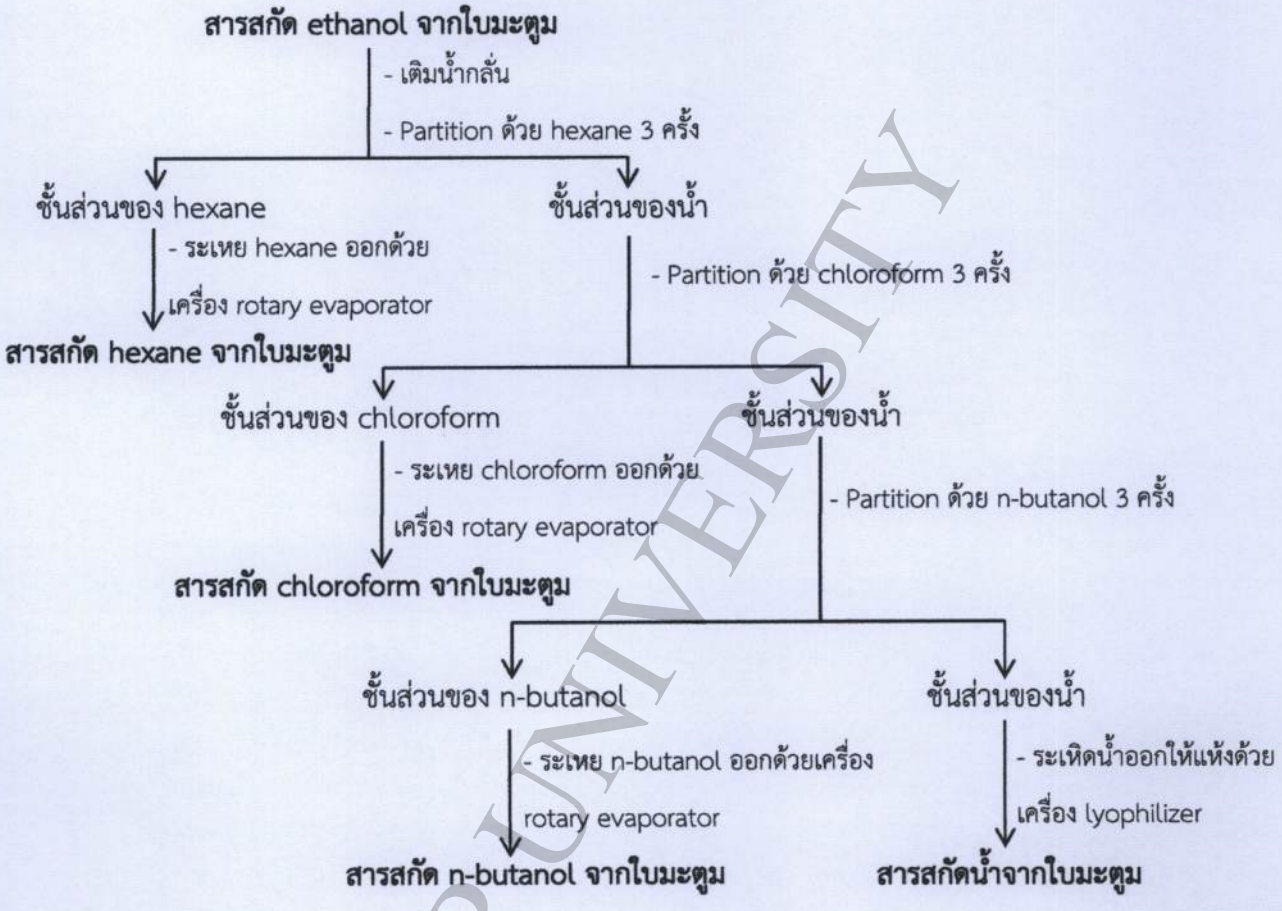
PAYAP UNIVERSITY



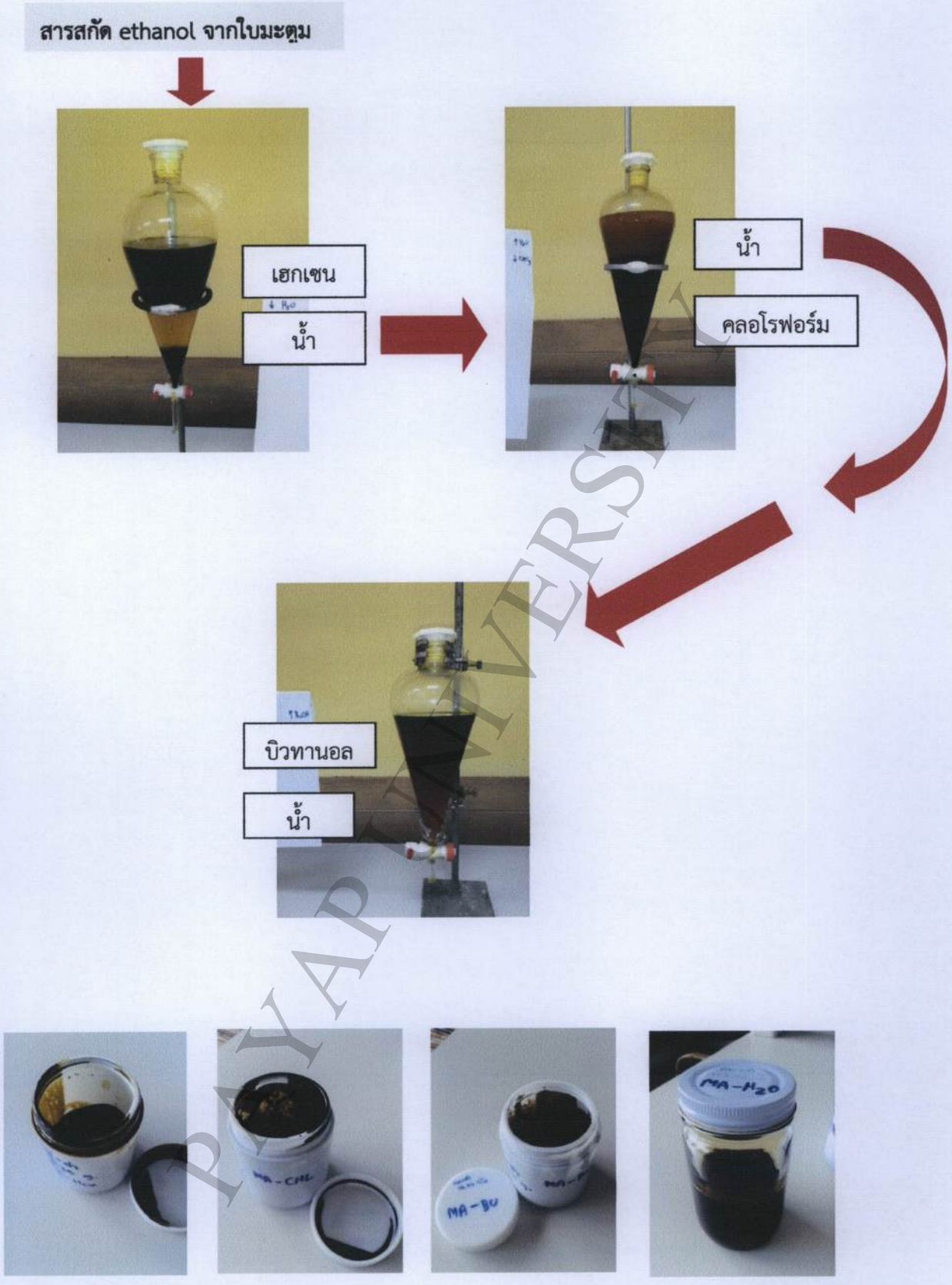
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดเอทานอลจากใบมะตูม

PAYAP UNIVERSITY

2) การเตรียมสารสกัด fractions อื่นๆ จากใบมะตูม



PAYAP UNIVERSITY



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดเฮกเซน, คลอโรฟอร์ม, บิวทานอล และน้ำจากใบมะตูม ตามลำดับ

PAYAP UNIVERSITY

3.2.3 การศึกษาทางพฤกษเคมีของสารสกัดใบมะตูม

1) การตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดใบมะตูม

(1) กลุ่ม alkaloids

- ชั่งผงใบมะตูมแห้งจำนวน 25 กรัม ต้มกับ 95% ethanol จำนวน 200 มิลลิลิตร ใน conical flask ขนาด 500 มิลลิลิตร บนหม้ออังไอน้ำนาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรอง ล้างกากที่เหลือด้วย 95% ethanol ปริมาณพอเหมาะและนำน้ำยาสกัด 95% ethanol ที่ได้มารวมกัน
- ระเหยน้ำยาสกัด 95% ethanol ที่ได้บนหม้ออังไอน้ำจนได้สารข้นเหนียว
- เติมกรดเกลือเข้มข้น 2 นอร์มอล 20 มิลลิลิตร ลงไปในสารสกัดที่ได้ คน และอุ่นบนหม้ออังไอน้ำประมาณ 10 นาที เพื่อให้สาร alkaloid ละลายในกรดจนหมด และกรอง
- นำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบโดยน้ำยาทดสอบ alkaloid คือ Dragendorff's reagent (เตรียมโดยละลาย basic bismuth nitrate 0.85 กรัม ในน้ำ 40 มิลลิลิตร และ glacial acetic acid 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายที่เตรียมโดยละลาย potassium iodide 8 กรัม ในน้ำ 20 มิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น (blank) และน้ำยามาตรฐาน quinine sulfate solution สังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น หากปรากฏตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบสาร alkaloids

(2) กลุ่ม coumarins

การตรวจสอบโดยอาศัยปฏิกิริยาการเรืองแสง (Photo effect)

บดตัวอย่างใบมะตูมประมาณ 2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตรให้ชื้น นำกระดาษกรองชุบสารละลาย 20% NaOH ปิดปาก Erlenmeyer flask ให้สนิท นำ Erlenmeyer flask ไปแช่ในหม้ออังไอน้ำ 5

PAYAP UNIVERSITY

นาที ถอดกระดาษกรองออกวางในกระจกนาฬิกา นำไปส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร อนุพันธ์ของ coumarins เช่น umbelliferone, esculetin, scopoletin จะเรืองแสงสีฟ้า ส่วน coumarin เองจะเรืองแสงสีเขียวอมเหลือง

(3) กลุ่ม flavonoids

- บดผงใบมะตูมแห้ง 3 กรัม ในโกร่งกับ petroleum ether 15 มิลลิลิตร บดซ้ำจนไม่มีสีออกมาในชั้นของ petroleum ether
- บดกากที่ได้กับ 80% ethanol 30 มิลลิลิตร กรองเก็บ filtrate ที่ได้ไปทดสอบ
- แบ่งสารละลายเก็บไว้เป็น blank

การตรวจสอบ flavonoids

- Cyanidin reaction ใช้ตรวจ gamma-benzopyrone nucleus

ถ่ายสารสกัด 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ใส่วงลวดแมกนีเซียม 3-4 อัน (0.1 กรัม) แล้วจึงเติม conc. HCl 10 หยด สังเกตสีส้มถึงแดงที่เกิดขึ้น (shinoda test) ทิ้งให้หลอดทดลองเย็น เจือจางด้วยน้ำปริมาตรเท่าตัว เติม octyl alcohol 1 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น สังเกตสีแต่ละชั้นและบันทึกผล

- พวก flavonol, flavononol และ xanthone ให้สีแดงถึงม่วง
- พวก flavones, chalcone และ aurone ให้สีส้ม

PAYAP UNIVERSITY

(4) กลุ่ม tannins

การเตรียมน้ำยาสกัด

ชั่งตัวอย่างใบมะตูมประมาณ 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำลงไปประมาณ 100 มิลลิลิตร นำมาต้มจนเดือด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและนำไปกรอง เก็บน้ำยาสกัดที่กรองได้เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

การตรวจสอบ tannins

แบ่งน้ำยาที่สกัดได้ ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 6 มิลลิลิตร หยดน้ำยาที่ใช้ทดสอบในข้อ 1-4 ลงไป 2-10 หยด สังเกตสีและตะกอนที่เกิดขึ้น

1. 0.5% gelatin solution

2. 1% lead acetate solution

3. 1% quinine sulfate solution

4. Ferric chloride T.S.

หากปรากฏสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบ tannins

2) การตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolic compounds)

ตรวจวัดหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมโดยวิธีการ Folin-Ciocalteu method ใช้น้ำยา Folin-Ciocalteu ที่ประกอบด้วยสาร phosphomolybdic acid/phosphotungstic acid ถูกรีดิวซ์ด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอลิกภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง ให้เปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์สีน้ำเงิน (molybdenum-blue/tungsten blue product) โดยทำการทดสอบดังนี้

PAYAP UNIVERSITY

น้ำยาเคมี/สารทดสอบ	Blank	สารมาตรฐาน	สารทดสอบ
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	0.5	0.4	0.4
สารละลาย gallic acid (มิลลิลิตร)	-	0.1	-
สารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)	-	-	0.1
น้ำยา Folin-Ciocalteu (มิลลิลิตร)	0.1	0.1	0.1
สารละลาย 7% sodium carbonate (มิลลิลิตร)	1.0	1.0	1.0
เขย่าให้ผสมกันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำสารผลิตภัณฑ์สีน้ำเงินที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร			

คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ความเข้มข้นต่างๆ และแสดงค่าปริมาณสารฟีนอลิกรวมเป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก/กรัมของสารสกัด (mg gallic acid equivalent (mg GAE)/กรัมของสารสกัด)

3.2.4 การศึกษาในเซลล์มะเร็งตับ

1) การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ

เซลล์มะเร็งตับที่ใช้ในการตรวจสอบ คือ human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2 cell) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับเริ่มจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ในขวดเพาะเชื้อ เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle ที่ประกอบด้วย penicillin-streptomycin 100 IU/ml และ fetal bovine serum 10% (*v/v*) เป็นเวลา 3-7 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และ CO_2 5% จนกว่าจะได้ปริมาณเซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มที่ (70-80% confluent)

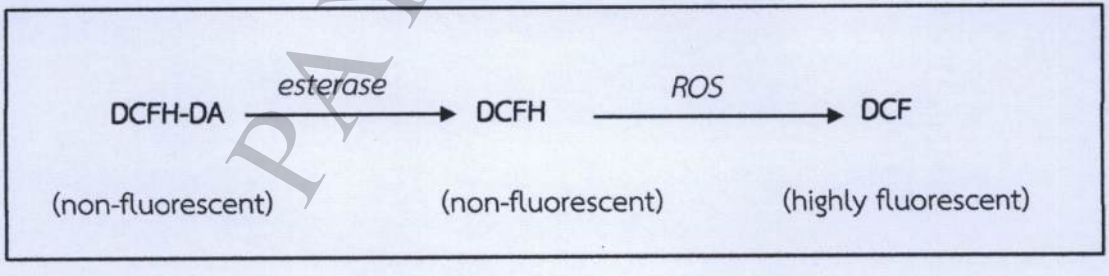
PAYAP UNIVERSITY

2) การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบมะตูมต่อเซลล์มะเร็งตับ

ในการทดลองนี้จะศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดใบมะตูมต่อเซลล์มะเร็งตับ ด้วยวิธี MTT assay โดยมีหลักการคือ สาร MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) จะถูกรีดิวซ์ได้โดยเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นผลึกสีม่วง formazan ซึ่งสามารถละลายได้ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง 500-600 นาโนเมตร เพื่อนำไปหาการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยจะทำการ incubate เซลล์มะเร็งตับจำนวน 3,000 cells/well ด้วยสารสกัดใบมะตูมที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C และ 5% CO_2 การทดสอบจะทำซ้ำกัน 3 ครั้งในแต่ละการทดลอง และทำทั้งสิ้น 3 การทดลอง เพื่อวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% (inhibition concentration ที่ 50% ; IC_{50})

3) การตรวจวัดระดับ ROS ในเซลล์ด้วยวิธี dichlorofluorescein fluorescent technique

เอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) ในเซลล์ที่มีชีวิตจะไฮโดรไลซ์สาร 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ที่แพร่ซึมเข้าไปในเซลล์ให้กลายเป็นสาร 2'-7'-dichlorofluorescein (DCFH) ก่อน จากนั้นอนุมูลอิสระที่มีอยู่ภายในเซลล์จะออกซิไดซ์สาร DCFH ให้กลายเป็นสาร oxidized dichlorofluorescein (DCF) ที่มีคุณสมบัติเรืองแสงได้ ซึ่งความเข้มของการเรืองแสงจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเซลล์ แสดงค่าที่ได้เป็น fluorescence intensity (FI) unit



PAYAP UNIVERSITY

ในการวิเคราะห์จะเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับจำนวน 5,000 cells/well ใน 96-well plate จากนั้นเติมสารสกัดใบมะตูมที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป (0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างและเติมสาร DCFH-DA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ลงไป ตั้งทิ้งไว้ในตู้อบ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ล้าง หลังจากนั้นเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดสารอนุมูลอิสระด้วยสาร hydrogen peroxide (H_2O_2) ความเข้มข้น 125 ไมโครโมลาร์และบ่มไว้ในตู้อบ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดการเรืองแสงของเซลล์ด้วยเครื่องสเปคโตรฟลูโอโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) โดยใช้ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength) เท่ากับ 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นฟลูออเรสเซนซ์ (emission wavelength) เท่ากับ 530 นาโนเมตร และคำนวณค่าที่วัดออกมาเป็น Fluorescence intensity (FI) unit

4) การวัดปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์

สารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันที่เรียกว่าปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) โดยกลุ่มสารประกอบออกซิเจนไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species, ROS) และสามารถทำปฏิกิริยากับกรดไธโอบาบิทูริก (thiobabituric acid, TBA) ที่อุณหภูมิสูงเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน MDA-TBA complex หรือ thiobabituric acid-reactive substance (TBARS) ซึ่งมีสีชมพูอมส้มและมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

ในการทดลองจะเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับจำนวน 1,000,000 cells/well ใน 6-well plate จากนั้นเติมสารสกัดใบมะตูมที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงไป บ่มไว้ในตู้อบ 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างและทำการแตกเซลล์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วน supernatant เพื่อวัดหาปริมาณโปรตีนรวม และส่วน pellet นำไปทำปฏิกิริยากับกรดไธโอบาบิทูริกที่อุณหภูมิสูง และนำไปวัดหาปริมาณสารประกอบเชิงซ้อน MDA-TBA complex หรือ thiobabituric acid-reactive substance (TBARS) ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความ

PAYAP UNIVERSITY

ยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

5) การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลเชิงปริมาณถูกแสดงค่าเป็น mean±SEM ค่าสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ One-way ANOVA และ Newman-Keul Test เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง ซึ่งค่า $p < 0.05$ แสดงถึงนัยสำคัญทางสถิติ

PAYAP UNIVERSITY