

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### การเตรียมตัวอย่าง

นำข้าวเหนียวดำสายพันธุ์ลิ้มผิวที่หาซื้อได้จากท้องตลาด 3 ตราสินค้ามาผสมให้เข้ากันเป็นตัวอย่างแบบผสมรวม (composite sample) แล้วนำมาหุงในหม้อหุงข้าวไฟฟ้า (พานาโซนิค SRDF 101) ในอัตราส่วนข้าว 1 ส่วนต่อน้ำ 2 ส่วน เมื่อข้าวสุกนำมาผึ่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้เรียกว่า “ข้าวเหนียวดำสุก” นำข้าวเหนียวดำสุกที่ผึ่งให้เย็นมาหมักกับลูกแป้งข้าวหมาก ในอัตราส่วนร้อยละ 0.2 ต่อข้าวเหนียวดำดิบในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ตัวอย่างที่ได้เรียกว่า “ข้าวหมาก” นำตัวอย่างข้าวที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในถุงสุญญากาศที่ 4 องศาเซลเซียส (Plaitho และคณะ, 2013)

#### การสกัดสารตัวอย่าง

การเตรียมสารสกัดข้าวเหนียวดำสุกหรือข้าวหมากดัดแปลงมาจาก Muangnoi และคณะ (2012) โดยนำตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับ 90 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วสกัดด้วยความถี่สูงในเครื่อง ultrasonic bath (Mettler Electronics Corp, Anaheim, CA, USA) นาน 10 นาที จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปแยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (Becton Dickinson Dynac Centrifuge, Sparks, MD, USA) ที่ความเร็ว 5,600xg ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กรองแยกส่วนใสด้วยกระดาษกรอง นำกากที่เหลือสกัดซ้ำในวิธีเดิมอีก 1 ครั้ง นำของเหลวใสที่ได้ทั้ง 2 ครั้งรวมกัน ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายภายใต้สุญญากาศที่ความร้อน 45 องศาเซลเซียส เมื่อได้ตัวอย่างแห้งแล้วจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปเก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียส

#### การเตรียมตัวอย่างข้าวหมากที่ผ่านการจำลองภาวะการย่อยในร่างกายมนุษย์

นำตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับ 120 มิลลิโมลาร์ NaCl ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปผ่านการจำลองสภาวะการย่อยในร่างกายมนุษย์ทั้งในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กตามวิธีของ Ferruzzi และคณะ (2006) และ Dawilai และคณะ (2013) โดยปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายตัวอย่างให้ได้ 2.0 ด้วย 1 โมลาร์ HCl เติมน้ำเปปซิน 2 มิลลิลิตร (เปปซิน 40 มิลลิกรัมละลายใน 0.1 โมลาร์ HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) นำไปย่อยในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 5.3 ด้วย 0.9 โมลาร์ NaHCO<sub>3</sub> เติมน้ำสารละลายผสมของสารสกัดน้ำดี (bile extract) และแพนครีเอติน (pancreatin) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (ประกอบด้วยน้ำดี 12 มิลลิกรัม และแพนครีเอติน 10 มิลลิกรัม ละลายใน 0.1 โมลาร์ NaHCO<sub>3</sub> ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 7.0 ด้วย 1 โมลาร์ NaOH จากนั้นนำไปย่อยในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

แบบเขย่าได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ของเหลวที่ผ่านการกรองจะเรียกว่า micellarized fraction และนำไปไล่อากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน ปิดฝาด้วยแผ่นพาราฟิล์ม แล้วจึงนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### การหาปริมาณวิตามินอีและแกมมาโอโรซานอล

นำตัวอย่าง 1 กรัม สกัดด้วยเมทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยด้วยความถี่สูงนาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 825 x g นาน 10 นาที กรองของเหลวด้วยกระดาษกรอง นำกากที่เหลือสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง นำส่วนที่เป็นของเหลวทั้ง 2 ครั้งมารวมกัน กรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูป PTFE ขนาดรูกรอง 0.45 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยหาวิตามินอีและแกมมาโอโรซานอลด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) โดยใช้คอลัมน์ Water Resolve C<sub>18</sub> column 90Å (5 ไมโครเมตร, 3.9x150 มิลลิเมตร) วิเคราะห์วิตามินอีและแกมมาโอโรซานอลโดยใช้อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile), เมทานอล และน้ำ เป็นเฟสเคลื่อนที่แบบ gradient elution อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที สภาพของเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย อะซิโตนไนไตรล์, เมทานอล และน้ำ เริ่มแรกใช้เฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วน 60:35:5 นาน 5 นาที และเปลี่ยนอัตราส่วนเป็น 60:40:0 นาน 5 นาที จากนั้นเปลี่ยนอัตราส่วนเป็น 22:78:0 นาน 60 นาที ฉีดตัวอย่างในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตรวจวัดวิตามินอีและอนุพันธ์ของวิตามินอีด้วย fluorescence detector ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น 298 นาโนเมตร และความยาวคลื่นกระจาย 328 นาโนเมตร และตรวจวัดแกมมาโอโรซานอลด้วย photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 325 นาโนเมตร บ่งชี้ปริมาณวิตามินอีและ แกมมาโอโรซานอลด้วยการเปรียบเทียบ retention time ของตัวอย่างกับ สารมาตรฐานตามวิธีของ Moongngarm และ Saetung (2010) รายงานผลวิตามินอีเป็นไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 100 กรัม และแกมมาโอโรซานอลรายงานเป็นไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวอย่างแห้ง 1 กรัม

### การหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol) ทำโดยปิเปตปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงหลอดทดลอง เติมสารสกัดตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายอิมิตัว Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที (Amarowicz และคณะ, 2004) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Japan) คำนวณปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ความเข้มข้น 25 - 800 มิลลิกรัมต่อลิตร รายงานผลเทียบเป็นมิลลิกรัมของกรดแกลลิกในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม

### การหาปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด

นำตัวอย่าง 3 กรัมมาสกัดด้วยเอทานอลที่ถูกปรับให้มีความเป็นกรด (95 เปอร์เซ็นต์เอทานอล และ 1.0 นอร์มัล HCl, 85:15 v/v) ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรด-ต่าง (pH) ให้ได้ 1 ด้วย 4 นอร์มัล HCl นำไปสกัดในอ่างอุณหภูมิต่ำที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปรับความเป็นกรด-ต่าง (pH) ให้ได้ 1 อีกครั้งด้วย 4 นอร์มัล HCl นำไปสกัดต่อในอ่างอุณหภูมิต่ำที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว  $2,500 \times g$  นาน 10 นาที กรองของเหลว ด้วยกระดาษกรอง และเทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยสารละลาย เอทานอลที่ถูกปรับให้มีความเป็นกรด ให้ได้ 50 มิลลิลิตร (Abdel-Aal และ Hucl, 1999) วิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินใช้วิธีพีเอช-ดิฟเฟอเรนเชียล (pH-differential) เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินที่ความเป็นกรด-ต่าง 1.0 และ 4.5 เนื่องจากที่ความเป็นกรด-ต่าง 1 แอนโทไซยานินอยู่ในรูปออกโซเนียม (oxonium) ซึ่งมีสี ที่ความเป็นกรด-ต่าง 4.5 แอนโทไซยานินอยู่ในรูปเฮมิคีทอล (hemiketal) ซึ่งไม่มีสี การทดสอบทำโดยนำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.025 โมลาร์ KCl (ความเป็นกรด-ต่าง (pH) 1.0) หรือสารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.4 โมลาร์  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (ความเป็นกรด-ต่าง (pH) 4.5) ผสมให้เข้ากัน ตั้งในที่มืด 20 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 และ 700 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Sunrise, Tecan Co., Austria) (Lee และคณะ, 2005) รายงานผลเทียบกับมิลลิกรัมของ cyanidin 3-glucoside ในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 1 กรัม เนื่องจาก cyanidin 3-glucoside เป็นแอนโทไซยานินที่พบมากที่สุดในช่วงเหี่ยวดำ (Sompong และคณะ, 2011)

### การทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระทำได้ด้วยการทดสอบ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และ Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

**การทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH** เป็นการวัดความสามารถของตัวอย่างในการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> การทดสอบทำโดยปิเปตสารสกัดตัวอย่างหรือสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Trolox) ปริมาตร 22 ไมโครลิตร ลงใน 96-well flat bottom microplate เติมสารละลาย 150 ไมโครโมลลาร์ DPPH (DPPH ละลายใน 80 เปอร์เซ็นต์เมทานอล) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที (Fukumoto และ Mazza (2000) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Sunrise, Tecan Co., Austria) นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้น 0.08-1.28 มิลลิโมล รายงานผลเป็นมิลลิโมลของ Trolox ในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม

**การทดสอบศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP** เป็นการวัดความสามารถของตัวอย่างในการรีดิวซ์สารประกอบ  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ ให้อยู่ในรูปของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ โดยปิเปตสารสกัด

ตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานของ  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน 96-well flat bottom microplate ปิเปตสารละลาย FRAP reagent (สารละลาย FRAP reagent ประกอบด้วย 300 มิลลิโมล acetate buffer (pH 3.6), 20 มิลลิโมล  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  และ 10 มิลลิโมล TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) ในอัตราส่วน 10:1:1 อุณหภูมิห้อง 37 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใช้) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 8 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Griffin และ Bhagooli, 2004) ด้วยเครื่อง microplate reader (Sunrise, Tecan Co., Austria) นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่างมาคำนวณหาค่า FRAP โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้น 62.5-1000 ไมโครโมล และรายงานผลเป็นมิลลิโมลของ  $\text{Fe}^{2+}$  ในตัวอย่างน้ำหนักแห้ง 100 กรัม

### เซลล์ลำไส้ (Caco-2)

เซลล์มะเร็งลำไส้ (Caco – 2 cell) (ATCC, Rockville, MD, USA) ถูกเลี้ยงใน 6 well plate โดยมีความเข้มข้น  $4 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานที่ประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), heat inactivated fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 (v/v), กรดอะมิโนไม่จำเป็นความเข้มข้นร้อยละ 10, กรดอะมิโนแอล-กลูตามีน (L-glutamine) ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลต่อลิตร, ยาฆ่าเชื้อรา (amphotericin B) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, ยาปฏิชีวนะ (gentamicin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร, สารละลายบัฟเฟอร์ (4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazine ethanesulfonic acid; HEPES) ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลต่อลิตร,  $\text{NaHCO}_3$  ความเข้มข้น 44 มิลลิโมลต่อลิตร นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 (v/v) (Han และคณะ, 1994) เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน เมื่อเซลล์เจริญเต็มที่ (ประมาณ 4-5 วัน) จะลดความเข้มข้นของ heat inactivated fetal bovine serum ในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้เหลือร้อยละ 7.5 v/v และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน เซลล์ที่นำไปใช้ทดสอบจะมีอายุ 11-14 วันหลังจากเจริญเต็มที่เนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์มีคุณสมบัติทางชีวภาพใกล้เคียงกับเซลล์ลำไส้ คือ มีไมโครวิลไล และเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในการดูดซึมสาร (Garrett และคณะ, 1999)

**การหาปริมาณ และเวลาที่เหมาะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ที่ใช้เหนี่ยวนำให้เซลล์ลำไส้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน**

การหาปริมาณและเวลาที่เหมาะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ที่ใช้เหนี่ยวนำให้เซลล์ลำไส้เกิดอนุมูลอิสระจากภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ทำได้โดยการวัดปริมาณอินเตอร์ลิวคิน 8 (interleukin-8; IL-8) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ทางเคมี (chemokines marker) ที่เซลล์จะหลั่งออกมาเมื่อเกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมที่ส่งผลให้เซลล์ลำไส้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันต้องเป็นความเข้มข้นและช่วงเวลาที่น้อยที่สุดที่ทำให้เซลล์ลำไส้มีการหลั่ง IL-8 ออกมาอย่างแตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (กลุ่มควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ตามการศึกษาของ Katayama และ Mine (2007) และ Wijeratne และคณะ (2005)

การหาปริมาณและเวลาที่เหมาะสมของ  $H_2O_2$  ที่ใช้เหนี่ยวนำให้เซลล์ลำไส้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ทำได้โดยนำ  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 5, หรือ 10 มิลลิโมลลาร์ผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน 1 ครั้ง จากนั้นจึงเติม  $H_2O_2$  แต่ละความเข้มข้นลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังนี้

กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ไม่ได้รับ $H_2O_2$ (กลุ่มควบคุม)
กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ได้รับ $H_2O_2$ ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลลาร์
กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ได้รับ $H_2O_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลลาร์
กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ได้รับ $H_2O_2$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์
กลุ่มที่ 5	กลุ่มที่ได้รับ $H_2O_2$ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลลาร์
กลุ่มที่ 6	กลุ่มที่ได้รับ $H_2O_2$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลลาร์

เมื่อเติม  $H_2O_2$  แต่ละความเข้มข้นแล้วจะนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30, 60 และ 120 นาที จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยนำเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน และนำไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และมี  $CO_2$  ร้อยละ 5 (v/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปหาปริมาณ IL-8 ที่เซลล์หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี the enzyme-linked immune- sorbent assay (ELISA) (Katayama และ Mine, 2007) ส่วนเซลล์ลำไส้จะนำมาล้างด้วย cold phosphate buffer saline (cold PBS) (ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 ใน acetic acid เข้มข้นร้อยละ 10) 1 ครั้ง แล้วเติม cold PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลุม ทำการตรึงเซลล์ (fixed cell) โดยเติม trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม นำไปแช่ในตู้ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง ย้อมเซลล์ด้วยสี sulforhodamine B (SRB) นาน 20 นาที ล้างเซลล์ด้วย acetic acid เข้มข้นร้อยละ 1 ทั้งหมด 4 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง ละลายสีที่ใช้ย้อมโปรตีนในเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris[hydroxy- methyl]aminomethane ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลุม เขย่า 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของสี การคำนวณปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตใช้การเทียบบัญชีไตโรยางค์ของค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์แต่ละกลุ่มเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต เท่ากับ 100 โดยจะต้องมีเซลล์ที่มีชีวิตไม่น้อยกว่าร้อยละ 90 (Houghton และคณะ, 2007)

## การทดสอบความเป็นพิษของข้าวเหนียวดำสุกและข้าวหมาก

การทดสอบความเป็นพิษของข้าวเหนียวดำสุกและข้าวหมาก ทำโดยนำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน 1 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานที่ผสมสารสกัดตัวอย่างของข้าวเหนียวดำสุก หรือข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อยที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน (กลุ่มควบคุม)
กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
กลุ่มที่ 5	กลุ่มที่ได้รับสารสกัดตัวอย่างความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และมี CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 (v/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และมี CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 (v/v) นาน 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างเซลล์ด้วย cold PBS 1 ครั้ง แล้วเติม cold PBS 2 มิลลิลิตรต่อหลุม ทำการตรึงเซลล์ (fixed cell) โดยเติม trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลุม นำไปแช่ในตู้ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง ย้อมเซลล์ด้วยสี SRB นาน 20 นาที ล้างเซลล์ด้วย acetic acid เข้มข้นร้อยละ 1 ทั้งหมด 4 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง ละลายสีที่ใช้ย้อมโปรตีนในเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris[hydroxymethyl]aminomethane buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต่อหลุม เขย่า 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) การคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ ทำโดยเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน(กลุ่มควบคุมผลลบ) โดยความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างที่จะนำไปศึกษาต่อไปต้องเป็นความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ถ้าได้ โดยจะต้องมีเซลล์ที่มีชีวิตมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Katayama และ Mine, 2007; Houghton และคณะ, 2007 และ Wijeratne และคณะ, 2005)

## การป้องกันการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันในเซลล์ลำไส้ (Caco-2)

นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐาน 1 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเซลล์มาตรฐานที่ผสมข้าวเหนียวดำ หรือข้าวหมากที่ความเข้มข้น 5, 10 หรือ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของข้าวหมากที่ไม่ผ่านการย่อยจะนำ micellarized fraction (มีสารสกัดและเอนไซม์ที่ใช้ย่อยผสมอยู่) ที่ได้มาเจือจางเพื่อให้ความเข้มข้นลดลงจากความเข้มข้นเริ่มต้น 4 เท่า เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษกับเซลล์ (Garrett และคณะ, 1999) และใช้ความเข้มข้นนั้นเพียงความเข้มข้นเดียว เนื่องจากเป็นการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยจึงใช้ความเข้มข้นที่ได้จากการย่อยจริง ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นของตัวอย่าง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ไปเลี้ยงใน

ตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และมี CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 (v/v) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์ นำเซลล์ไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส และมี CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5 (v/v) นาน 30 นาที เก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปหาปริมาณ IL-8 ที่เซลล์หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธี ELISA (Katayama และ Mine, 2007) โดยรายงานผลเป็นปริมาณ IL-8 ในหน่วยพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง IL-8 (%IL-8 inhibition) จากสมการ

$$\% \text{ IL-8 inhibition} = \frac{(\text{IL-8 conc. of H}_2\text{O}_2 \text{ group} - \text{IL-8 conc. of sample group}) \times 100}{\text{IL-8 conc. of H}_2\text{O}_2 \text{ group}}$$

### การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์ทั้งหมดแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากแต่ละการศึกษาด้วย one-way ANOVA และ Duncan Multiple Range Test ยกเว้นเว้นการทดสอบความเป็นพิษ และการยับยั้งการหลั่ง IL-8 ของสารสกัดตัวอย่าง รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง IL-8 ตามลำดับ การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมสำเร็จรูป โดยใช้ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดมาจากการทดลอง 3 ซ้ำ