ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และตรวจนับปริมาณเซลล์ HEK293T

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การเตรียมอุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับใช้ในปฏิบัติการเกี่ยวกับเซลล์เพาะเลี้ยง

1. นำอุปกรณ์ทั้งหมดที่จะใช้ในการทดลอง ซึ่งได้แก่ yellow tips, blue tips, ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร, pasture pipettes, หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร, ขวดแก้วทนความร้อนสูง (Schott duran) ขนาด 1,000, 500, และ 250 มิลลิลิตร, และหลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร มาล้างทำความสะอาด และล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นน้ำสุดท้าย จากนั้นนำอุปกรณ์ทั้งหมด เข้าตู้อบแห้งที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50°C นาน 48 ชั่วโมง

2. เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำอุปกรณ์ทั้งหมดออกจากตู้อบแห้ง ทำการตรวจสอบอุปกรณ์ทุกชิ้นให้เรียบร้อยว่าแห้งสนิท แล้วทำการเตรียมอุปกรณ์เหล่านี้ เพื่อจะนำไปทำการฆ่าเชื้อ ดังนี้

2.1 หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร ให้ปิดฝาหลอดพอหลวม ๆ เล็กน้อยแล้วบรรจุลงถุงทนความร้อน (polypropylene) ขนาด 8 x 12 นิ้ว ปิดปากถุงให้สนิท

2.2 pasture pipettes ให้บรรจุสำลีที่ปลายส่วนต้นของ pasture pipette แต่ละอัน จัด pasture pipettes เป็นกลุ่ม กลุ่มละ 5-6 อัน ห่อ pasture pipettes แต่ละกลุ่มด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ นำห่อ pasture pipettes ทั้งหมดบรรจุลงถุงทนความร้อน (polypropylene) ขนาด 8 x 12 นิ้ว ปิดปากถุงให้สนิท

2.3 ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร ให้บรรจุสำลีที่ปลายส่วนต้นของปิเปตแต่ละอัน แล้วบรรจุลงกล่องโลหะสเตนเลส ปิดฝากล่องให้สนิท โดยอย่าให้รูเล็ก ๆ ทางส่วนบนด้านข้างของตัวกล่องบรรจุเปิดออกสู่ภายนอก

2.4 yellow tips และ blue tips ให้ทำการบรรจุ yellow tips และ blue tips ให้เต็มกล่องบรรจุ ติดเทปกาวตรงรอยต่อของฝากล่องด้านหลังกับตัวกล่องบรรจุแต่ละกล่อง และติดเทปกาว 1-2 แถบตรงรอยต่อของฝากล่องด้านหน้ากับตัวกล่องบรรจุแต่ละกล่อง เพื่อป้องกันไม่ให้กล่องถูกเปิดออกก่อนที่จะนำไปใช้งาน

2.5 หลอดเอปเพนดอร์ฟขนาด 1.5 มิลลิลิตร ให้บรรจุลงในขวดแก้วทนความร้อนปิดฝาขวดพอหลวมเล็กน้อย ติดเทปกาวตรงรอยต่อของฝาขวดกับตัวขวด เพื่อป้องกันไม่ให้ขวดถูกเปิดออกก่อนที่จะนำไปใช้งาน

2.6 ขวดแก้วทนความร้อนสูง (Schott duran) ขนาด 1,000, 500, และ 250 มิลลิลิตร ให้ปิดฝาขวดแต่ละใบพอหลวมเล็กน้อย ติดเทปกาวตรงรอยต่อของฝาขวดกับตัวขวด เพื่อป้องกันไม่ให้ขวดถูกเปิดออกก่อนที่จะนำไปใช้งาน

3. ติดแถบ autoclave tape ที่ตัวถุง กล่องบรรจุ และตัวขวดแก้ว นำอุปกรณ์ทั้งหมดไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เสร็จแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นนำอุปกรณ์ทั้งหมดเข้าตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมงให้นำอุปกรณ์ทั้งหมดเก็บเข้าในตู้ให้เรียบร้อย เพื่อรอการใช้งาน

2. การเตรียมสารเคมีพื้นฐานสำหรับใช้ในปฏิบัติการเกี่ยวกับเซลล์เพาะเลี้ยง

1. การเตรียมสารละลาย Phosphate buffer saline ความเข้มข้น 1 เท่า (1X)

1.1 ชั่ง KH_2PO_4 0.24 กรัม, Na_2HPO_4 1.44 กรัม, NaCl 8.0 กรัม, และ KCl 0.20 กรัม นำมาเติมรวมกันในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 700 มิลลิลิตร คนให้สารทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ตรวจวัดค่า pH ของสารละลายและปรับให้ได้ pH 7.4 โดยใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์

1.2 ถ่ายสารละลายลงในขวดสำหรับปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ทำการปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ถ่ายสารละลาย Phosphate buffer saline ความเข้มข้น 1 เท่าที่ได้นี้ ลงในขวดแก้วทนความร้อนสูง ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ใน Phosphate buffer saline

2.1 ชั่ง EDTA จำนวน 0.14 กรัม เติมลงบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติม Phosphate buffer saline ความเข้มข้น 1 เท่าในข้อ 1. ลงไป 200 มิลลิลิตร คนให้ EDTA ละลายจนหมด จากนั้นเทสารละลายจากบีกเกอร์ลงในขวดสำหรับปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร

2.2 ทำการปรับปริมาตรจนครบ 500 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย Phosphate buffer saline ความเข้มข้น 1 เท่า ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ถ่ายสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ใน Phosphate buffer saline ที่ได้นี้ลงในขวดแก้วทนความร้อนสูง (Schott duran) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

3. การเตรียมเอทานอลเข้มข้น 70% โดยเติมเอทานอลเข้มข้น 95% ลงในขวดสำหรับปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 737 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ถ่ายสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% ที่ได้นี้ลงในกระบอกสำหรับฉีดสเปรย์จนเต็ม และแบ่งส่วนที่เหลือเก็บในขวดแก้วธรรมดา

4. การเตรียมสารละลาย MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) สำหรับเป็นสารละลายตั้งต้น (stock solution เข้มข้น 0.5%)

4.1 เตรียมตู้ลามินาร์โฟล์ปลอดเชื้อ ตามวิธีการในข้อ ก 1. ของหัวข้อ 3.6.1.1 ในบทที่ 3 จากนั้นนำอุปกรณ์ที่จะใช้ ฉีดสเปรย์ด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% และเช็ดตามด้วยผ้าสะอาดชุบเอทานอลเข้มข้น 70% ก่อนนำเข้าไปภายในตู้ลามินาร์โฟล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 ชั่งสาร (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) จำนวน 0.2 กรัม เติมลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติม Phosphate buffer saline ความเข้มข้น 1 เท่าในข้อ 1. ลงไปจำนวน 40 มิลลิลิตร คนจนกว่า MTT จะละลายหมด นำบีกเกอร์บรรจุสารละลาย MTT เข้าไปในตู้ลามินาร์โฟล์ ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

4.3 ทำการกรองสารละลาย MTT ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารละลาย MTT ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ติดแผ่นฟาราฟินตรงบริเวณรอยต่อของฝากับตัวหลอดเซนตริฟิวจ์และห่อหลอดเซนตริฟิวจ์ด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ เสร็จแล้วนำหลอดเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุสารละลาย MTT เข้มข้น 0.5% ซึ่งผ่านการกรองแล้วนี้ ไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C

5. การเตรียมสารละลาย Trypan blue เข้มข้น 0.2% โดยชั่ง Trypan blue จำนวน 0.1 กรัม เติมลงในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติม Phosphate buffer saline ความเข้มข้น 1 เท่าในข้อ 1. ลงไปจำนวน 50 มิลลิลิตร คนให้ Trypan blue ละลายหมด ถ่าย Trypan blue เข้มข้น 0.2% ที่ได้ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่ผ่านการล้างสะอาดดีแล้ว เก็บในตู้ ณ อุณหภูมิห้อง

6. การเตรียมสารละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 99.95% สำหรับใช้เป็นตัวทำละลายผลึกสี formazan ในขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษของซิตรินินต่อเซลล์ HEK293T โดยเติม DMSO เข้มข้น 99.95% ลงใน หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่ผ่านการล้างทำความสะอาดแล้ว และห่อหลอดเซนตริฟิวจ์ด้วยอะลูมิเนียมฟรอยด์ แล้วจึงนำหลอดเซนตริฟิวจ์ไปเก็บในตู้ทึบที่อุณหภูมิห้อง

ติดแถบ autoclave tape ตรงด้านข้างของขวดที่บรรจุสารละลาย Phosphate buffer saline ความเข้มข้น 1 เท่า และขวดบรรจุสารละลาย EDTAเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ใน Phosphate buffer saline จากนั้นนำขวดทั้งสองไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เสร็จแล้วทิ้งไว้ให้เย็นพร้อมกับใช้แผ่นฟาราฟินปิดผนึกที่บริเวณรอยต่อของฝาขวดกับตัวขวด นำขวดทั้งสองเข้าเก็บในตู้ที่อุณหภูมิห้อง

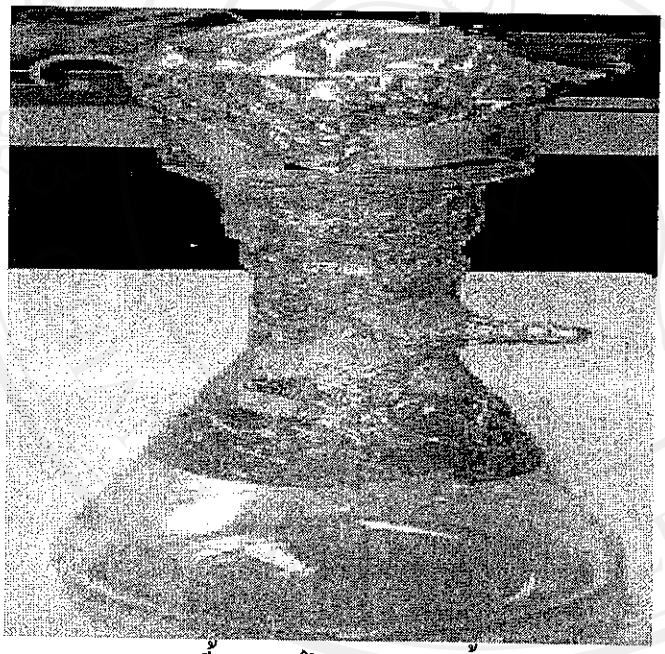
3. การเตรียมชุดกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปลอดเชื้อ

1. ทำการล้างชุดกรอง ซึ่งประกอบด้วย ถ้วยรองรับสารก่อนกรองลงมา ฐานสำหรับทำการกรอง และขวดรูปชมพู่ที่ใช้รองรับสารซึ่งผ่านการกรองลงมาให้สะอาด และล้างชุดกรองทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นเป็นน้ำสุดท้าย จากนั้นนำอุปกรณ์ทั้งหมดเข้าตู้อบแห้งที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 50°C นาน 48 ชั่วโมง

2. นำชุดกรองทั้งหมดออกมาจากตู้อบแห้ง ทำการประกอบฐานสำหรับทำการกรองเข้ากับขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่จะใช้รองรับสารซึ่งผ่านการกรองลงมา นำแผ่นเยื่อกรองที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอนวางบนฐานสำหรับทำการกรอง ปิดทับด้วยถ้วย (polypropylene) รองรับสารก่อนกรองลงมา ให้อุดสำลีตรงข้อต่อของขวดรูปชมพู่ที่ใช้รองรับสารซึ่งผ่านการกรองลงมา หุ้มอะลูมิเนียมฟอยล์ตรงส่วนข้อต่อดังกล่าว และส่วนถ้วย (polypropylene) รองรับสารก่อนกรองลงมา ดังแสดงในภาพที่ ก-1. ให้ติดแถบ autoclave tape ที่ตัวขวดรูปชมพู่ บรรจุชุดกรองที่ทำการประกอบเสร็จแล้วนี้ลงในถุงทนความร้อน (polypropylene) ขนาด 14 x 20 นิ้ว จากนั้นสวมถุงทนความร้อน (polypropylene) ขนาด 8 x 12 นิ้ว บริเวณส่วนบนของชุดกรอง ให้ครอบปิดส่วนบนของถุงทนความร้อน (polypropylene) ขนาด 14 x 20 นิ้ว เสร็จแล้วนำห่อบรรจุชุดกรองไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นให้นำเข้าตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C นาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่ ก-1 การเตรียมชุดกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทำการฆ่าเชื้อ

4. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเซลล์ (Rosswell Park Memorial Institute 1640 : RPMI-1640) (อ้างใน www.safcbiosciences.com)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ถูกพัฒนาขึ้นที่สถาบัน Rosswell Park Memorial ในปี 1966 โดย Moore และคณะ ซึ่งปรับปรุงมาจากอาหารเลี้ยงเซลล์ MacCoy's 5A โดยในสูตรของ RPMI-1640 จะช่วยทำให้เซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งมีการเจริญในสภาพแขวนลอย (suspension culture) มีการเจริญได้ นอกจากนี้ยังใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีการเจริญ โดยมีการเกาะยึดกับพื้นผิวได้หลายชนิด RPMI-1640 ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้องมีการเติมซีรั่มลงไปด้วย แต่ก็มีรายงานถึงการใช้ RPMI-1640 เพียงอย่างเดียวในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์หลายชนิด โดยไม่ต้องมีการเติมซีรั่ม RPMI-1640 ยังมีการใช้อย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงเซลล์ลูกผสม (hybrid cells) และการตัดต่อเซลล์

คำเตือนในการใช้ การปฏิบัติในการจับถือ หรือการเติมสารเคมีบางชนิดลงใน RPMI-1640 ควรใช้เทคนิควิธีการปลอดเชื้อ ให้ใช้ผลิตภัณฑ์นี้ตามคำแนะนำของผู้ผลิต และไม่ใช้ผลิตภัณฑ์นี้ในการรักษาพยาบาล หรือใช้กับมนุษย์

การจัดเก็บ ให้เก็บ RPMI-1640 นี้ไว้ที่อุณหภูมิ 2-8°C ในสภาพที่ป้องกันแสงสว่างได้ ไม่ทำการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง เมื่อ RPMI-1640 นี้หมดอายุจะไม่นำมาใช้

ข้อแนะนำเกี่ยวกับการเสื่อมสภาพของอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่เตรียมขึ้นนี้ควรมีความใส และปลอดจากตะกอนหรืออนุภาคที่ทำให้เกิดความขุ่น ไม่ควรใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว เมื่อมีความขุ่นหรือปรากฏการตกตะกอน สิ่งที่ควรระวังอื่น ๆ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของสี หรือค่า pH และการเปลี่ยนแปลงที่มีการเสื่อมสลายทางกายภาพ

5. ซีรั่ม (Serum) (อ้างใน Freshney R.I., 2000)

ในซีรั่มมีปัจจัยหลายอย่างที่ช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ปัจจัยที่ช่วยในการเกาะยึดของเซลล์กับพื้นผิว และองค์ประกอบที่ต่อต้านการทำงานของ trypsin ซึ่งช่วยทำให้เซลล์สามารถเกาะยึดกับพื้นผิวได้ดีขึ้น นอกจากนี้ซีรั่มยังเป็นแหล่งของแร่ธาตุ ไขมันชนิดต่าง ๆ และฮอร์โมนหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่มักจับกับโปรตีน ซีรั่มที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนมาก มักเป็นซีรั่มที่ได้จากลูกวัว หรือวัว และจากตัวอ่อนของวัว ซีรั่มจากม้าและมนุษย์ โดยซีรั่มจากลูกวัว (Calf serum) และซีรั่มจากตัวอ่อนของวัว (Fetal bovine serum) มีการใช้กันอย่างแพร่หลายมาก โดยเฉพาะซีรั่มจากตัวอ่อนของวัว เป็นที่ต้องการอย่างมากในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์หลายชนิด และในการทำโคลนนิ่ง (cloning) ในบางครั้งซีรั่มจากมนุษย์ถูกใช้ในการทำการเชื่อมต่อของเซลล์ (conjugation) ในเซลล์ไลน์บางชนิดที่มีต้นกำเนิดมาจากมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามซีรั่มจากมนุษย์ที่จะนำไปใช้ จะต้องผ่านการตรวจหาไวรัส เช่น HIV และ Hepatitis B นักวิจัยบางคนสามารถใช้ซีรั่มจากม้าแทนซีรั่มจากลูกวัวได้ ถ้าซีรั่มนั้นได้มาจากม้าในฟาร์มที่เลี้ยงในระบบปิด และมีความคงตัวของคุณภาพซีรั่มที่ผลิตในแต่ละชุดสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ก-1 องค์ประกอบในสูตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640

Ingredient	ปริมาณ (มิลลิกรัม/ลิตร)
Inorganic salts :	
Calcium nitrate tetrahydrate	100.00
Magnesium sulfate anhydrous	48.84
Potassium chloride	400.00
Sodium chloride	6,000.00
Sodium phosphate dibasic anhydrous	800.00
Vitamins :	
Biotin	0.20
D-calcium pantothenate	0.25
Choline chloride	3.00
Cyanocobalamin	0.005
Folic acid	1.00
i-inositol	35.00
Niacinamide	1.00
PABA	1.00
Pyridoxine HCl	1.00
Riboflavin	0.20
Tiamine HCl	1.00
Amino acids :	
L-arginine HCl	241.80
L-asparagine monohydrate	56.80
L-aspartic acid	20.00
L-cystine 2HCl	65.15
L-glutamic acid	20.00
Glycine	10.00
L-histidine HCl monohydrate	20.20
Hydroxy L-proline	20.00
L-isoleucine	50.00
L-leucine	50.00
L-lysine HCl	40.00
L-methionine	15.00
L-phenylalanine	15.00
L-proline	20.00
L-serine	30.00
L-threonine	20.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ก-1 (ต่อ)

Ingredient	ปริมาณ (มิลลิกรัม/ลิตร)
Amino acids :	
L-tryptophan	5.00
L-tyrosine 2Na dehydrate	28.83
L-valine	20.00
Other :	
Dextrose anhydrous	2,000.00
L-glutathione reduced	1.00
Phenol red sodium salt	5.31

ตารางที่ ก-2 องค์ประกอบของซีรั่ม

องค์ประกอบ	ช่วงของความเข้มข้น[a]
Proteins and Polypeptides :	40-80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Albumin	20-50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Fetulin[b]	10-20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Fibronectin	1-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Globulins	1-15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Protease inhibitors : α1-antitrypsin, α2-macroglobulin	0.5-2.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Transferrin	2-4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Growth factors : EGF, PDGF, IGF-1 and 2, FGF, IL-1, IL-6	1-100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร
Amino acids	0.01-1.0 ไมโครโมลาร์
Lipids :	2-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Cholesterol	10 ไมโครโมลาร์
Fatty acids	0.1-1.0 ไมโครโมลาร์
Linoleic acid	0.01-0.1 ไมโครโมลาร์
Phospholipids	0.7-3.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Carbohydrates :	1.0-2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Glucose	0.6-1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Hexamine[c]	6-1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Lactic acid[d]	0.5-2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
Pyruvic acid	2-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Polyamides : Putrescine, Spermidine	0.1-1.0 ไมโครโมลาร์
Urea	170-300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ก-2 (ต่อ)

องค์ประกอบ	ช่วงของความเข้มข้น[a]
Inorganics :	0.14-0.16 โมลาร์
Calcium	4-7 มิลลิโมลาร์
Chlorides	100 ไมโครโมลาร์
Iron	10-50 ไมโครโมลาร์
Potassium	5-15 มิลลิโมลาร์
Phosphate	2-5 มิลลิโมลาร์
Selenium	0.01 ไมโครโมลาร์
Sodium	135-155 มิลลิโมลาร์
Zinc	0.1-1.0 ไมโครโมลาร์
Hormones :	0.1-200 นาโนโมลาร์
Hydrocortisone	10-200 นาโนโมลาร์
Insulin	1-100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร
Triiodothyronine	20 นาโนโมลาร์
Thyroxine	100 นาโนโมลาร์
Vitamins :	10 นาโนกรัม-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Vitamin A	10-100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร
Folate	5-20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

หมายเหตุ a ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวนี้ได้มาจาก Evans and Sanford (1978), Bergman et al., (1962), และ Cartwright and Shah (1994)

b พบในซีรั่มจากตัวอ่อนเท่านั้น

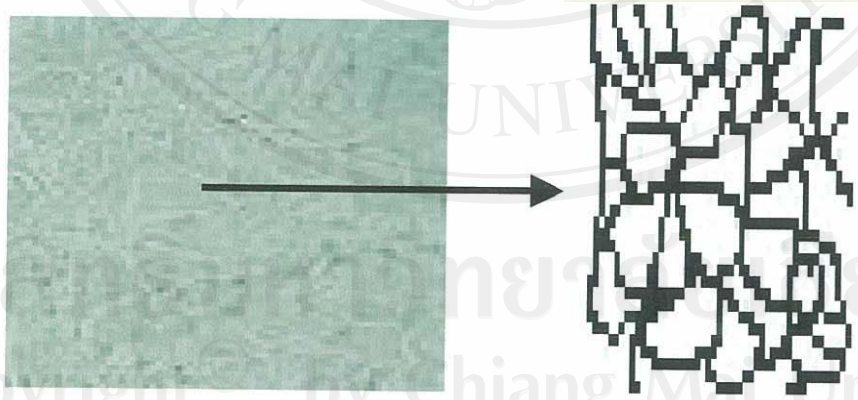
c มีปริมาณสูงสุดในซีรั่มจากมนุษย์

d มีปริมาณสูงสุดในซีรั่มจากตัวอ่อน

ซีรั่มจากตัวอ่อนของวัว (Fetal bovine serum) ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีการผลิตที่ประเทศออสเตรเลีย โดยผ่านกระบวนการกรองเพื่อทำให้ปลอดเชื้อ ด้วยแผ่นเยื่อกรองชนิดพิเศษซึ่งมีขนาดรูกรอง 0.1 ไมครอน ซีรั่มดังกล่าวนี้ผ่านการตรวจสอบแล้วว่าปลอดจากเชื้อไวรัส ไมโคพลาสมา แบคทีเรีย และ endotoxins สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีการเจริญเติบโต ทำให้เซลล์มีประสิทธิภาพในการเจริญเกาะกันเป็นโคโลนี (Plating efficacy) และมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ในการทำโคลนนิ่ง สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ได้เป็นเวลานาน 5 ปี

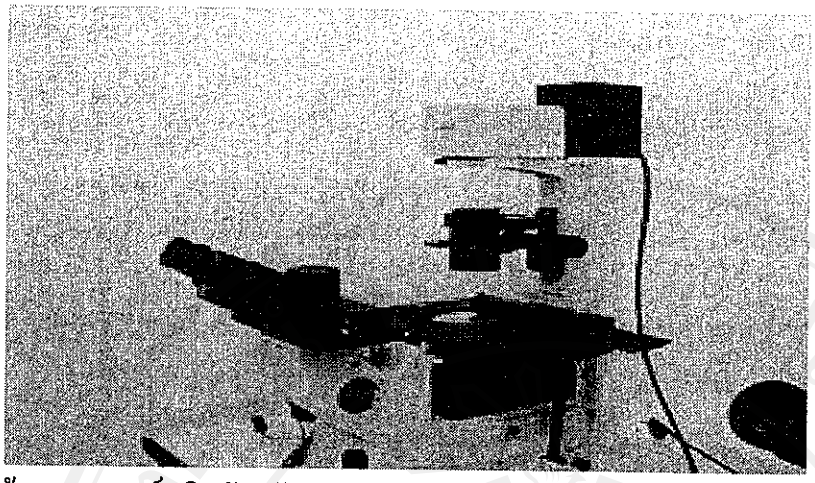
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ ก-2 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ HEK293T ที่มีการเจริญในอาหาร Complete RPMI-1640 บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% เป็นเวลา 18 ชั่วโมง(ที่กำลังขยาย40เท่า)

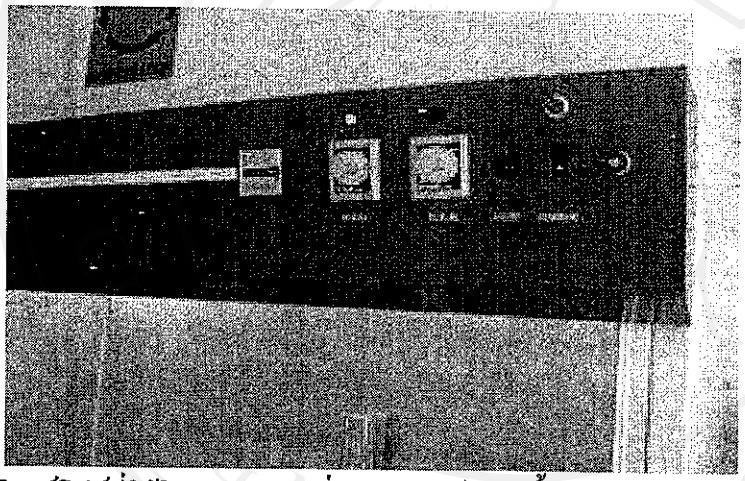


ภาพที่ ก-3 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ HEK293T ที่มีการเจริญในอาหาร Complete RPMI-1640 บ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% เป็นเวลา 96 ชั่วโมง(ที่กำลังขยาย40เท่า)

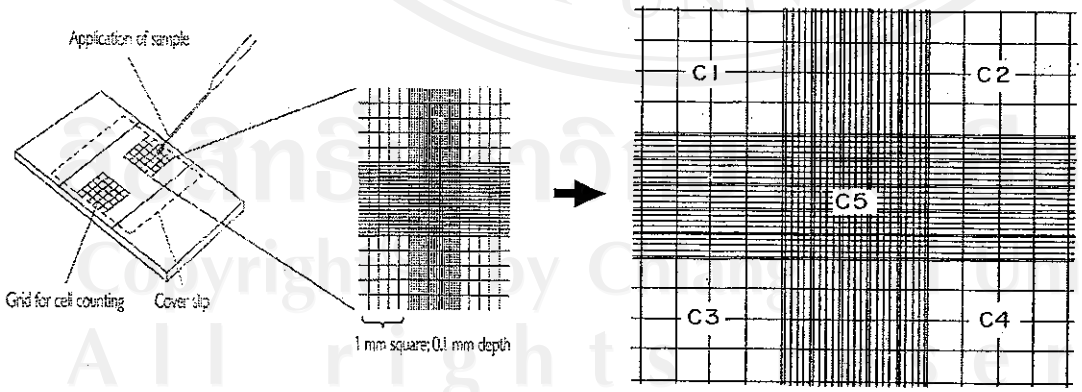
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ก-4 กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope)



ภาพที่ ก-5 ตู้ลามินาร์โฟล์ที่ใช้ในปฏิบัติการเกี่ยวกับเซลล์เพาะเลี้ยง



ภาพที่ ก-6 ชุดตรวจนับปริมาณเซลล์ (Hemocytometer) และแสดงพื้นที่สำหรับใช้ตรวจนับเซลล์ (C1, C2, C3, และ C4) (ที่มา Kuchler R.J., 1977)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

การเตรียมข้าวแดง เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK293T และการคำนวณปริมาณข้าวแดงในสารละลายทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

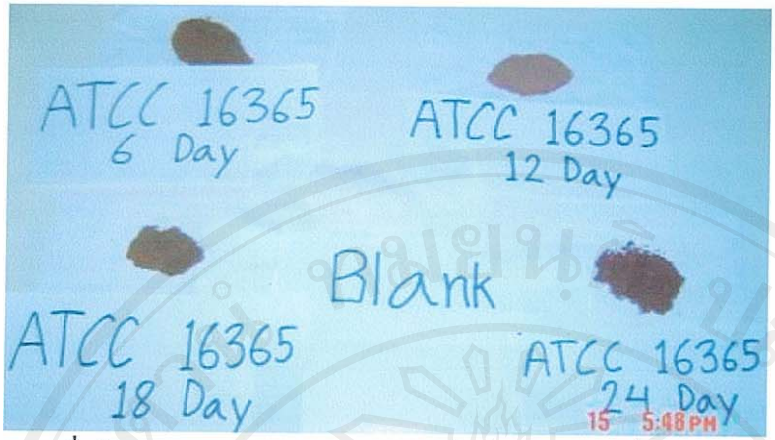
1. การเตรียมข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน (ดัดแปลงจาก จุลยุทธ บุญสร้างสม, 2546)

การเตรียมเชื้อรา เก็บรักษาเชื้อรา *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 โดยเขี่ยเชื้อราดังกล่าวบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ให้เชื้อราเจริญที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 3 สัปดาห์ (Blanc et al., 1995a)

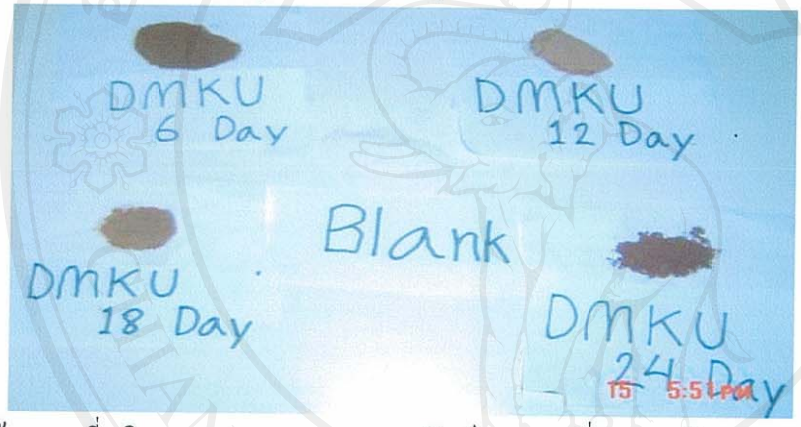
การเตรียมข้าว ชั่งข้าวสารซึ่งเป็นข้าวเจ้าชัยนาท 123 จำนวน 50 กรัมใส่ในถุงโพลิเอทธิลีนขนาด 8 x 12 นิ้ว เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วสวมคอขวดพลาสติกที่ปากถุงด้วยก้อนสำลี หุ้มอีกชั้นด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 4 ชั่วโมงเพื่อให้น้ำซึมเข้าไปในเมล็ดข้าวอย่างทั่วถึง เมื่อถึงกำหนดเวลา นำถุงข้าวไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จะได้ถุงข้าวสุกสำหรับเตรียมหมักข้าวแดง (ดัดแปลงจาก เรณู ปิ่นทองและคณะ, 2543)

การหมักข้าวแดง นำเชื้อราโมแนสคัสทั้ง 3 สายพันธุ์ที่เลี้ยงบน PDA ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 10 วัน มาทำการตัดเจาะด้วยแท่งเหล็กไร้สนิมกลวงปลายกลม ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 11.5 มิลลิเมตร โดยทำการกดตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา จะได้ชิ้นวุ้นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11.5 มิลลิเมตร เปิดถุงข้าวสุกที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการตักชิ้นวุ้นด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ วางบนข้าวสุกจำนวน 2 ชิ้น แล้วทำการหมักที่อุณหภูมิ 28-30°C โดยทุกขั้นตอนทำแบบปลอดเชื้อ (ดัดแปลงจาก เรณู ปิ่นทองและคณะ, 2543) ทำการเก็บตัวอย่างข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้ ทุก ๆ 3 วัน จนครบ 30 วัน นำตัวอย่างข้าวแดงที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอบต่อที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้เป็นเมล็ดข้าวแดงอบแห้ง ทำการปั่นละเอียดตัวอย่างข้าวแดงจนเป็นผง บรรจุในถุงโพลิโพรไพลีนขนาด 6 x 6 นิ้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ข-1 ข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน เปรียบเทียบกับข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุม



ภาพที่ ข-2 ข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน เปรียบเทียบกับข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุม

ภาพที่ ข-3 ข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน เปรียบเทียบกับข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การคำนวณปริมาณข้าวแดงที่ใช้ในการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640 ในแต่ละความเข้มข้น ซึ่งใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HEK293T

จากการเตรียมสารละลายของข้าวแดงในเมทานอลในข้อ1-4 ของหัวข้อ 3.6.3.1 ในบทที่ 3 โดยใช้ข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ตัวอย่างละ 1 กรัม มาผสมกับเมทานอลจำนวน 8 มิลลิลิตร แล้วแบ่งสารละลายข้าวแดงที่ได้ตัวอย่างละ 3.5 มิลลิลิตร มาเตรียมเป็นสารสกัดข้าวแดงสำหรับตรวจกับเซลล์ HEK293T

- นั่นคือสารละลายในเมทานอล 8 มิลลิลิตร มาจากข้าวแดงจำนวน 1 กรัม
- ถ้าสารละลายในเมทานอลจำนวน 3.5 มิลลิลิตร ควรจะมีข้าวแดงในปริมาณเท่ากับ 3.5/8=0.4375 กรัม

หลังจากที่นำสารละลายของข้าวแดงในเมทานอลแต่ละตัวอย่างดังกล่าวไปทำการระเหยแห้งและละลายซ้ำด้วย DMSO ตัวอย่างละ 1,500 ไมโครลิตร ได้เป็นสารสกัดข้าวแดงตามวิธีการในข้อ 5-6 ของหัวข้อ 3.6.3.1 ในบทที่ 3

- สารสกัดข้าวแดงจำนวน 1,500 ไมโครลิตร มีข้าวแดงอยู่ 0.4375 กรัม
- เมื่อนำสารสกัดข้าวแดงไปใช้จำนวน 28 ไมโครลิตรตามวิธีการในข้อ ก 6.1 ของหัวข้อ 3.6.3.3 ในบทที่ 3 จะมีข้าวแดงอยู่ (0.4375 x 28) / 1,500 = 0.008167 กรัม

เมื่อนำสารสกัดข้าวแดงจำนวน 28 ไมโครลิตรนี้ ไปเจือจางกับ Complete RPMI-1640 จนได้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงปริมาณ 700 ไมโครลิตรซึ่งมี DMSO 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย (มีข้าวแดง 0.008167 กรัม) ทำการแบ่งสารละลายนี้มา 350 ไมโครลิตรเจือจางลงใน Complete RPMI-1640 จำนวน 350 ไมโครลิตรตามวิธีการในข้อ ก 6.1 ของหัวข้อ 3.6.3.3 ในบทที่ 3 จะได้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย

- ซึ่งมีปริมาณข้าวแดงมากที่สุดเท่ากับ 0.008167 / 2 = 0.0040835 กรัม
- นั่นคือในสารละลายใหม่ 700 ไมโครลิตร จะมีปริมาณข้าวแดง 0.0040835 กรัม

เมื่อนำสารละลายของสารสกัดข้าวแดงนี้จำนวน 100 ไมโครลิตร เติมลงในหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุมซึ่งมีสารละลายเซลล์ HEK293T อยู่แล้ว100 ไมโครลิตรตามวิธีการในข้อ ข 1.1 ของหัวข้อ 3.6.3.3 ในบทที่ 3

- สารละลายของสารสกัดข้าวแดงนี้ 100 ไมโครลิตร จะมีปริมาณข้าวแดงเท่ากับ 0.0040835 x 100 /700= 0.0005834 กรัม เมื่อถูกเจือจางลงครึ่งหนึ่งในหลุมที่มีเซลล์ HEK293T โดยมีปริมาณสารละลายรวมกัน 200 ไมโครลิตร จะเหลือข้าวแดงในปริมาณ = 0.0005834 / 2 = 0.0002917 กรัม
- ถ้าเป็นสารละลายรวมในปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร (1 มิลลิลิตร) จะมีข้าวแดงในปริมาณ = (1,000/200) x 0.0002917 = 0.00145839 กรัมซึ่งเท่ากับ 1,458.39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ 1,458.39 ppm นั่นคือ สารละลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของสารสกัดข้าวแดงเข้มข้นสูงสุดซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย จะมีปริมาณข้าวแดงเท่ากับ 1,458.39 ppm และจากการเจือจางลงทีละ 2 เท่า (two-fold dilution) ในการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงความเข้มข้นที่ 2, 3, และ 4 ซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย แล้วนำไปเติมลงในหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุมซึ่งมีสารละลายเซลล์ HEK293T ตามวิธีการในข้อ ก 6.1 และ ข 1.1 ของหัวข้อ 3.6.3.3 ในบทที่ 3 จะได้ปริมาณข้าวแดง ณ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 729.19, 364.59, และ 182.29 ppm ตามลำดับ

3. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640

จากการเตรียมสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วัน ในข้อ 5-6 ของหัวข้อ 3.6.3.1 ในบทที่ 3 ทำการหาความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงแต่ละตัวอย่างดังกล่าวใน Complete RPMI-1640 ได้ดังนี้

- สมมติให้น้ำหนักแห้งของสารสกัดข้าวแดงก่อนเติม DMSO เป็น a กรัม เมื่อเติม DMSO จำนวน 1,500 ไมโครลิตร (1.5 มิลลิลิตร) ได้ความเข้มข้นของสารสกัดข้าวแดงเท่ากับ a กรัม/1.5 มิลลิลิตร หรือ (1,000 x a มิลลิกรัม)/ 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งน้ำหนักแห้งและความเข้มข้นของสารสกัดข้าวแดงดังกล่าวได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.3 ของบทที่ 3 แล้ว

นำสารสกัดข้าวแดงนี้จำนวน 28 ไมโครลิตร ไปเจือจางกับ Complete RPMI-1640 จนได้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงปริมาณ 700 ไมโครลิตรซึ่งมี DMSO 2% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย ตามวิธีการในข้อ ก 6.1 ของหัวข้อ 3.6.3.3 ในบทที่ 3

- สารสกัดข้าวแดง 1,500 ไมโครลิตร มีความเข้มข้น (1,000 x a มิลลิกรัม) / 1.5 มิลลิลิตร ถ้าสารสกัดข้าวแดง 28 ไมโครลิตร จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 28(1,000 x a) มิลลิกรัม / 1.5 มิลลิลิตร
- นั่นคือในสารละลายของสารสกัดข้าวแดงจำนวน 700 ไมโครลิตร จะมีความเข้มข้นสารสกัดข้าวแดงเท่ากับ 28(1,000 x a) มิลลิกรัม / (700 x 1.5) มิลลิลิตร

ทำการแบ่งสารละลายนี้มา 350 ไมโครลิตรเจือจางลงใน Complete RPMI-1640 จำนวน 350 ไมโครลิตร จะได้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย

- นั่นคือเป็นการเจือจางลง 2 เท่า ซึ่งสารละลายของสารสกัดข้าวแดงนี้จะมีความเข้มข้นเท่ากับ 28(1,000 x a) มิลลิกรัม / (700 x 1.5 x 2) มิลลิลิตร

จากนั้นทำการเตรียมสารละลายของสารสกัดข้าวแดงความเข้มข้นที่ 2, 3, และ 4 ซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายด้วยการเจือจางลงทีละ 2 เท่า (two-fold dilution) ตามวิธีการในข้อ ก 6.1 ของหัวข้อ 3.6.3.3 ในบทที่ 3 จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 28(1,000 x a) มิลลิกรัม / (700 x 1.5 x 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มิลลิลิตร, 28(1,000 x a) มิลลิกรัม / (700 x 1.5 x 8) มิลลิลิตร, และ 28(1,000 x a) มิลลิกรัม / (700 x 1.5 x 16) มิลลิลิตร เมื่อนำสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทั้ง 4 ความเข้มข้นดังกล่าวซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายจำนวน 100 ไมโครลิตร ไปเติมลงในหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ซึ่งมีสารละลายเซลล์ HEK293T อยู่แล้ว 100 ไมโครลิตรตามวิธีการในข้อ ข 1.1 ของหัวข้อ 3.6.3.3 ในบทที่ 3 สารละลายของสารสกัดข้าวแดงทั้ง 4 ความเข้มข้นนี้ก็จะถูกเจือจางลงครึ่งหนึ่ง สำหรับความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640 ในช่วงก่อนและหลังเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.8 ของบทที่ 3

4. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ใน Complete RPMI-1640

จากสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 10,000 ppm ใน DMSO จำนวน 100 ไมโครลิตร จากข้อ ก 1. ของหัวข้อ 3.6.3.3 ในบทที่ 3 แบ่งมาใช้จำนวน 14 ไมโครลิตรในการเจือจางกับ Complete RPMI-1640 ได้เป็นสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายจำนวน 700 ไมโครลิตรตามวิธีการในข้อ ก 9. ของหัวข้อ 3.6.3.3 ซึ่งหาความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐานนี้ได้จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$ โดยที่ N_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายเริ่มต้นซึ่งเท่ากับ 10,000 ppm, V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายเริ่มต้นที่นำมาใช้เท่ากับ 14 ไมโครลิตร, N_2 คือ ความเข้มข้นของสารละลายสุดท้าย, V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายสุดท้ายเท่ากับ 700 ไมโครลิตร เมื่อแทนค่าในสูตรจะได้ N_2 เท่ากับ 200 ppm

จากสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 200 ppm ใน Complete RPMI-1640 แบ่งมา 350 ไมโครลิตรเจือจางลงใน Complete RPMI-1640 ซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายจำนวน 350 ไมโครลิตร เป็นการเจือจางลง 2 เท่า ได้สารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 100 ppm ซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้าย จากนั้นทำการเตรียมสารละลายซิตรินินมาตรฐานความเข้มข้นที่ 3, 4, 5, และ 6 ซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายด้วยการเจือจางลงทีละ 2 เท่า (two-fold dilution) ตามวิธีการในข้อ ก 9. ของหัวข้อ 3.6.3.3 ในบทที่ 3 จะได้ความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐานเท่ากับ 50, 25, 12.5, และ 6.25 ppm ตามลำดับ

เมื่อนำสารละลายซิตรินินมาตรฐานทั้ง 6 ความเข้มข้นดังกล่าวซึ่งมี DMSO 1% ณ ความเข้มข้นสุดท้ายจำนวน 100 ไมโครลิตร ไปเติมลงในหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุมที่มีสารละลายเซลล์ HEK293T อยู่แล้ว 100 ไมโครลิตร สารละลายทั้ง 6 ความเข้มข้นนี้ก็จะถูกเจือจางลงครึ่งหนึ่ง สำหรับความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ในช่วงก่อนและหลังเติมลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.9 ของบทที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ค

การทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT Bioassay และผลการทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. แผนภูมิแสดงการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์ HEK293T โดยวิธีการ MTT Bioassay

ทำการถ่ายเซลล์ HEK293T จากขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ ลงเพาะเลี้ยงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุม โดยให้ในแต่ละหลุมมีเซลล์ HEK293T จำนวน 5,000 เซลล์

↓ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% นาน 24 ชั่วโมง

เตรียมสารละลายของสารทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Complete medium) โดยเจือจางลงทีละ 2 เท่า หรือ 10 เท่า ทำการเตรียมสารละลายทดสอบดังกล่าวนี้ อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น

↓

เติมสารละลายทดสอบลงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมที่เตรียมขึ้น โดยเติมสารละลายทดสอบความเข้มข้นละ 3 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร

↓ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% นาน 72 ชั่วโมง

ดูดสารละลายภายในหลุมของถาดทดสอบนี้ ซึ่งได้มีการเติมสารละลายทดสอบออกไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร แล้วทำการเติมสารละลาย MTT ลงในแต่ละหลุมดังกล่าวนี้ หลุมละ 15 ไมโครลิตร

↓ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% นาน 2 ชั่วโมง

ทำการคว่ำถาดทดสอบ แล้วเติม DMSO เข้มข้น 99.95% ลงในแต่ละหลุมของถาดทดสอบ เพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้น

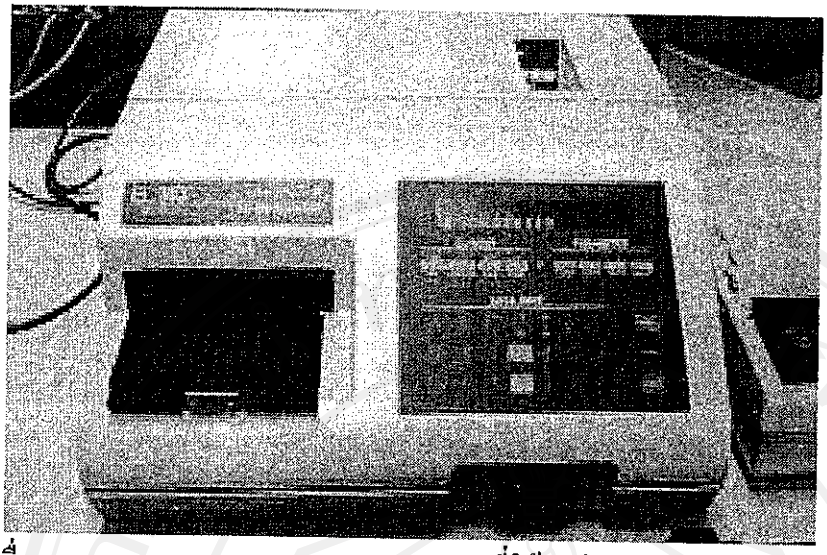
↓

นำถาดทดสอบชนิด 96 หลุมนี้ ไปวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต 550 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับที่ความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต 630 นาโนเมตร (ค่า O.D. อ้างอิง)

↓

ทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในหลุมที่มีการเติมสารละลายทดสอบ จากสูตร $\frac{\text{ค่า O.D. ของหลุมที่เติมสารละลายทดสอบ}}{\text{ค่า O.D. ของหลุมที่ใช้เป็นตัวควบคุม}} \times 100$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ ค-1 เครื่อง Biokinetic Reader (ELISA Reader) ที่ใช้วัดค่า O.D. ในแต่ละหลุมของถาดทดสอบชนิด 96 หลุม

2. การใช้เครื่อง Biokinetic Reader ในการวัดค่า O.D. ของถาดทดสอบชนิด 96 หลุม

1. เปิดเดินเครื่อง ELISA reader (Bio Kinetic Reader) กดปุ่ม Stop เพื่อให้ช่องสำหรับใส่ถาดทดสอบชนิด 96 หลุมเปิดออก พร้อมกับเปิดเครื่องพิมพ์ที่เชื่อมต่อกับเครื่อง ELISA reader

2. กดปุ่ม Escape เพื่อเข้าสู่โปรแกรมการทำงาน โดยดูที่หน้าจอของเครื่อง ELISA reader และกดที่ปุ่มเลข 9 เพื่อเข้าสู่โปรแกรมการทำงานชื่อ File 9 แล้วกดปุ่ม Prompt เพื่อดูรายละเอียดภายในโปรแกรม File 9 ที่สำคัญคือ No heading, No shaking, Dual wavelength, Filter W1 = 550, Filter W2 = 630, No I.D., Print densities, 8 x 12 Format ถ้ารายละเอียดดังกล่าวถูกต้องทั้งหมด ให้กดปุ่ม Prompt เพื่อดูรายละเอียดอื่นต่อไป ถ้ารายละเอียดที่สำคัญบางอย่างไม่ถูกต้อง ให้กดปุ่ม Option เพื่อเลือกรายละเอียดที่ถูกต้อง แล้วกดปุ่ม Enter ตามด้วยปุ่ม Prompt เพื่อดูรายละเอียดอื่น ๆ ต่อไป สุดท้ายจะกลับมาที่หน้าจอ File 9 ตามเดิม

3. เปิดฝาถาดทดสอบชนิด 96 หลุม เช็ดพื้นด้านล่างของถาดทดสอบด้วยกระดาษทิชชู่ให้สะอาด แล้วจึงใส่ถาดทดสอบชนิด 96 หลุมลงในช่องที่เปิดรอไว้ แล้วกดปุ่ม Start เพื่อให้ช่องสำหรับใส่ถาดทดสอบปิด เครื่อง ELISA reader จะทำการอ่านค่า O.D. ในแต่ละหลุมของถาดทดสอบ แล้วสั่งพิมพ์ออกมาทางเครื่องพิมพ์ เมื่อช่องสำหรับใส่ถาดทดสอบเปิดออกอีกครั้ง ให้นำเอาถาดทดสอบชนิด 96 หลุมนี้ออกมา กดปุ่ม Start เพื่อให้ช่องดังกล่าวปิด พร้อมกับปิดเดินเครื่อง ELISA reader และเครื่องพิมพ์ ปิดฝาถาดทดสอบชนิด 96 หลุมนี้ให้เรียบร้อยแล้วนำไปทิ้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ค-1 ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น 0, 1, 2, 3, และ 4% ใน Complete RPMI-1640

ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO (%)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	100	100	100
1	86.054	85.022	87.086
2	60.346	54.489	54.393
3	19.923	14.594	10.129
4	6.577	10.898	9.602

ตารางที่ ค-2 ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายซิตรินินมาตรฐาน ใน Complete RPMI-1640 ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลายซิตรินินมาตรฐาน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
0	100	100	100
3.125	86.616	94.039	83.518
6.25	89.305	84.220	89.597
12.50	37.405	37.639	38.399
25.00	12.624	8.007	9.936
50.00	3.624	4.909	4.851
100.00	3.507	3.916	3.273

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ค-3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จากการเติมสารละลายของสารสกัดข้าวแดง ที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน Complete RPMI-1640

ระยะหมัก (วัน)	ช่วงความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	*M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365			*M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU			*M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
6	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0.45-0.47		85.925	87.198	92.402	93.337	93.220		87.366	86.510
	0.89-0.94	85.121	88.003	85.188	92.402	91.701	93.980	89.793		86.153
	1.77-1.87	81.702	83.981	79.357	88.369		88.545	82.370	77.445	74.661
	3.54-3.74	77.078	78.887	77.145	81.297	80.538	86.733	82.655		81.799
12	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0.45-0.47	88.874		83.646		92.402	91.701	92.220	100.642	94.004
	0.89-0.94	84.853	90.550	83.244	96.902	95.383	90.707	96.003	92.862	91.577
	1.77-1.87	87.601		90.013	93.629	96.493	91.350	87.580	84.297	
	3.54-3.74	72.654		70.643		94.857	95.967	20.771	26.053	24.411
18	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0.45-0.47	88.137	85.121		93.279	85.447		92.434	93.433	90.721
	0.89-0.94	82.306		83.847	76.096		77.089	89.151	87.509	84.868
	1.77-1.87	83.780	87.198	84.048		89.772	93.863	77.873	84.582	80.371
	3.54-3.74	77.882	80.898	79.960	96.493		92.402	56.031	63.740	58.887

ตารางที่ ค-3 (ต่อ)

ระยะหมัก (วัน)	ช่วงความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	*M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365			*M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU			*M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
24	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0.45-0.47	98.123	100.603	108.579		90.006	100.468	82.869	82.441	85.796
	0.89-0.94	91.287	91.086	96.113	89.831	95.733	98.247	75.232	78.230	
	1.77-1.87	86.729	87.668	88.941	91.818	92.110	96.786	47.181	48.251	
	3.54-3.74	62.601	63.807	65.214	57.335		54.004	6.353	5.139	8.280

หมายเหตุ : 1). ค่าของข้อมูลที่ไม่แสดงในตารางนี้ เป็นค่าที่มีความเบี่ยงเบนจากค่าอื่น ๆ ที่อยู่ในซ้ำเดียวกันสูง จึงทำการตัดค่าดังกล่าวออกไป และไม่นำค่าข้อมูลดังกล่าวมาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

2). ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่อยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาจากข้าวแดงในปริมาณ 182.29, 364.59, 729.19, และ 1,458.39 ppm ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ง

การใช้โปรแกรม ED50V1.0 ในการคำนวณค่า Effective dose 80 (ED_{80}) ของสารทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. โปรแกรม ED50V1.0 (อ้างใน Vargus M.H., 2000)

โปรแกรม ED50V1.0 เป็นโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นโดย Mario H. Vargus ซึ่งทำงานอยู่ในหน่วยงานวิจัยของสถาบันแห่งชาติ de Enfermedades Resiratorias ประเทศเม็กซิโก โปรแกรมนี้เป็นเครื่องมือที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านเภสัชวิทยา มีลักษณะเป็นเอกสารการทำงานของโปรแกรม Microsoft Excel 97 ซึ่งใช้ทำการบันทึกข้อมูล ทำการสร้างและวิเคราะห์กราฟที่แสดงถึงการตอบสนองต่อขนาดของสารเคมีที่ให้ (Dose-response curve) โดยข้อมูลชุดหนึ่งสามารถสร้างกราฟดังกล่าวได้ถึง 10 กราฟ และแต่ละกราฟสามารถแสดงจุดข้อมูลได้ถึง 30 จุด โดยในแต่ละจุดเป็นการประมวลผลร่วมกันของแกน X และ Y ทั้งนี้ยังรวมข้อมูลที่ได้รับการปรับปรุงให้ถูกต้องไว้ด้วย จากแต่ละกราฟเหล่านี้โปรแกรมจะคำนวณหาจุดตัดได้ 3 จุดซึ่งจะได้เป็นค่า Effective dose (ED), Inhibition concentration (IC), และ Lethal dose (LD) เป็นต้น และจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ยด้วย เอกสารการทำงานของโปรแกรม ED50V1.0 นี้ สามารถใช้งานได้ดีกับโปรแกรม Microsoft Excel ตั้งแต่เวอร์ชั่น 4.0 ขึ้นไป โดยต้องยอมรับเงื่อนไขการทำงานของโปรแกรม ED50V1.0 ก่อน เพื่อให้เอกสารการทำงานของโปรแกรม ED50V1.0 สามารถใช้งานได้อย่างสมบูรณ์ ควรทำการดาวน์โลดหรือทำสำเนาแฟ้มข้อมูลที่ชื่อ README.TXT และ ED50V10.XLS มาด้วยพร้อมกัน จากนั้นจึงทำการเปิดแฟ้มข้อมูลที่ชื่อ ED50V10.XLS เพื่อใช้งานต่อไป

ส่วนประกอบสำคัญของหน้าต่างโปรแกรมมีดังนี้

<u>ส่วนที่ 1</u> มีลักษณะเป็นเอกสารการทำงานของโปรแกรม Microsoft Excel ประกอบด้วย ส่วนที่ 1.1 เป็นคอลัมน์ที่ชื่อว่า Dose สำหรับให้เติมข้อมูลขนาดความเข้มข้นของสารทดสอบ (เป็นข้อมูลในแกน X) และส่วนที่ 1.2 เป็นกลุ่มคอลัมน์ที่มีชื่อว่า Response Group มีทั้งหมด 10 คอลัมน์ สำหรับให้เติมข้อมูลค่าเปอร์เซ็นต์การตาย หรือค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ใช้ทำการทดสอบ จะทำการเติมข้อมูลลงในคอลัมน์ส่วนที่ 1.2 นี้ตามจำนวนซ้ำของการทดลองเช่น ถ้าทำการทดลอง 3 ซ้ำ ก็เติมข้อมูล 3 คอลัมน์ เป็นต้น

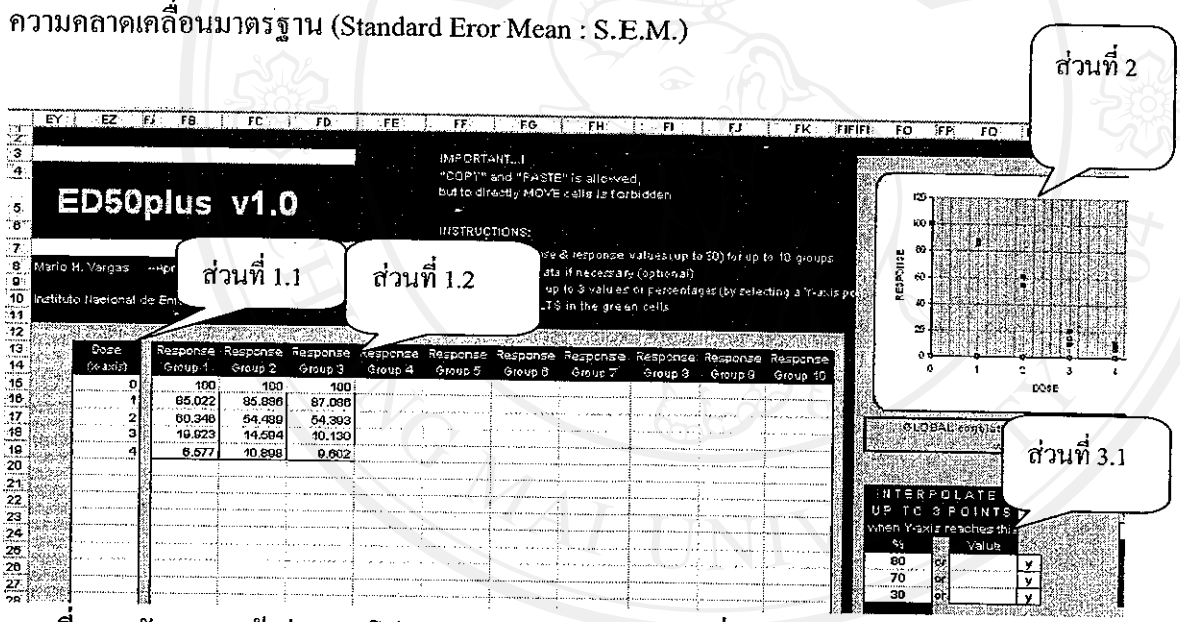
<u>ส่วนที่ 2</u> เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า X (คือขนาดความเข้มข้นของสารทดสอบ) และค่า Y (คือค่าเปอร์เซ็นต์การตาย หรือค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ใช้ทำการทดสอบ) หรือเรียกว่า Dose-Response Curve ซึ่งจำนวนกราฟของชุดข้อมูลที่ปรากฏขึ้นในส่วนที่ 2 นี้จะเป็นไปตามจำนวนซ้ำของการทดลอง และกราฟจะปรากฏขึ้นโดยอัตโนมัติเมื่อทำการเติมข้อมูลในส่วนที่ 1 เสร็จแล้ว

<u>ส่วนที่ 3</u> แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ 3.1 เป็นตารางที่มีชื่อว่า INTERPOLATE UP TO 3 POINTS when Y-axis reaches this ซึ่งประกอบด้วย 2 คอลัมน์ คอลัมน์ทางซ้ายให้เติมตัวเลขเป็นค่า Y (คือค่าเปอร์เซ็นต์การตาย หรือค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ใช้ทำการทดสอบ)

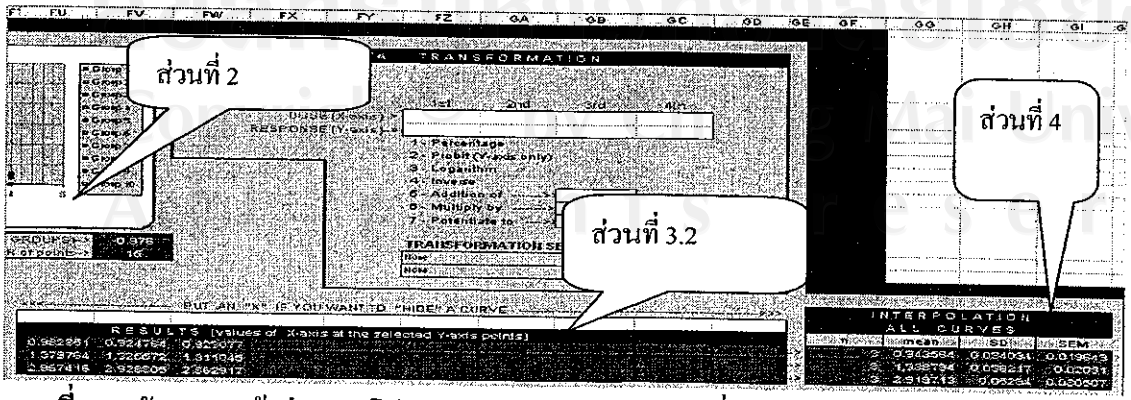
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถเติมตัวเลขในคอลัมน์นี้ได้ 3 ค่า ส่วนคอลัมน์ทางขวาไม่ต้องเติมข้อมูล ส่วนที่ 3.2 เป็นตารางชื่อว่า RESULTS (values of X-axis at the selected Y-axis points) ค่าขนาดความเข้มข้นของสารทดสอบ (ค่า X) ซึ่งทำให้เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบมีการรอดชีวิต หรือมีการตายไปตามจำนวนเปอร์เซ็นต์ที่ระบุไว้ในส่วนที่ 3.1 จะปรากฏขึ้นโดยอัตโนมัติในส่วนที่ 3.2 นี้ซึ่งเป็นไปตามจำนวนซ้ำของการทดลอง

<u>ส่วนที่ 4</u> เป็นตารางชื่อว่าINTERPOLATION ALL CURVES แสดงค่าขนาดความเข้มข้นของสารทดสอบ (ค่า X) ซึ่งทำให้เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบมีการรอดชีวิต หรือมีการตายไปตามจำนวนเปอร์เซ็นต์ที่กำหนดไว้ หรืออาจจะเรียกได้ว่าเป็น Effective dose (ED), Inhibition concentration (IC), หรือ Lethal dose (LD) ที่ Y% ก็ได้ โดยจะแสดงค่าดังกล่าวในลักษณะของค่าเฉลี่ยเลขคณิต (Mean) พร้อมกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation : S.D.) และค่าเฉลี่ยความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Eror Mean : S.E.M.)



ภาพที่ ง-1 ลักษณะหน้าต่างของโปรแกรม ED50V1.0 ในส่วนที่ 1.1, 1.2, 2, และ 3.1



ภาพที่ ง-2 ลักษณะหน้าต่างของโปรแกรม ED50V1.0 ในส่วนที่ 3.2 และ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ง-1 ค่าความเข้มข้นของสารละลาย DMSO และสารละลายซิตรินินมาตรฐานใน Complete RPMI-1640 ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% (ED_{80})

สารละลายทดสอบ	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.
สารละลาย DMSO (ความเข้มข้นเป็น %)	0.982851	0.924764	0.923077	0.943564	0.034034
สารละลายซิตรินินมาตรฐาน (ความเข้มข้นเป็น ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	6.844307	6.869331	7.752031	7.155223	0.517002

ตารางที่ ง-2 ค่าความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365, DMKU, และ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6, 12, 18, และ 24 วันใน Complete RPMI-1640 ซึ่งทำให้เซลล์ HEK293T มีการรอดชีวิตอยู่ที่ 80% (ED_{80} : หน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

สายพันธุ์ของ *M. purpureus*	ระยะหมัก (วัน)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ค่าเฉลี่ย	S.D.
ATCC 16365	6	2.672974	3.035476	2.49905	2.735833	0.273682
	12	2.540186	1.989418	2.362729	2.297444	0.281128
	18	2.657702	3.563865	3.006793	3.07612	0.457042
	24	2.092624	2.140495	1.795433	2.009517	0.186941
DMKU	6	3.805123	3.664473	5.314763	4.261453	0.9149
	12	5.659266	31.62578	87.2460	41.51035	41.68186
	18	-16.48912	3.982655	60.58182	16.02512	39.92177
	24	1.956196	5.684946	2.054846	3.231996	2.12489
FTCMU 3385	6	3.626408	1.537312	2.844922	2.669547	1.055532
	12	1.318295	1.362197	1.122697	1.26773	0.127505
	18	1.641183	2.005782	1.662535	1.769833	0.204616
	24	0.676147	0.70578	0.756442	0.71279	0.040604

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก จ

การใช้โปรแกรม SigmaPlot 8.0 for window

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรแกรม SigmaPlot 8.0 for window

โปรแกรม SigmaPlot 8.0 for window ถูกพัฒนาขึ้นโดยบริษัท SPSS Science เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลและกราฟ สามารถใช้สร้างกราฟที่มีความเหมาะสมต่อข้อมูล เพื่อนำเสนอผลการวิจัยได้ ผู้ใช้โปรแกรมนี้สามารถสร้างกราฟในลักษณะ 2 มิติหรือ 3 มิติได้อย่างรวดเร็ว โดยอาศัยคำสั่ง SigmaPlot's award-winning interface. โปรแกรม SigmaPlot อนุญาตให้ผู้ใช้งานสามารถสร้างกราฟได้ในทุก ๆ รายละเอียด เช่น การเพิ่มแกนหลายแกนในกราฟชุดเดียวกัน การเติมเส้นแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (error bar) และการนำเสนอเพื่อสื่อความหมายทางด้านวิทยาศาสตร์ได้อย่างชัดเจน โปรแกรม SigmaPlot มีเครื่องมือที่ช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งทำให้นักวิทยาศาสตร์หรือวิศวกร สามารถวิเคราะห์ข้อมูลการทำงานได้ง่ายขึ้น โดยมีตั้งแต่การวิเคราะห์พื้นฐานทางสถิติจนถึงการคำนวณทางคณิตศาสตร์ขั้นสูง ผู้ใช้โปรแกรมนี้สามารถหาสมการของกราฟโดยใช้คำสั่ง Regression Wizard หรือใช้คำสั่ง Function Plotter นอกจากนี้คำสั่งในการสร้างกราฟของโปรแกรม SigmaPlot ยังสามารถใช้สร้างกราฟโดยตรงภายในโปรแกรม Microsoft Excel โดยไม่ต้องทำการถ่ายโอนข้อมูลหรือตัดปะข้อมูล

1. การใช้โปรแกรม SigmaPlot 8.0 for window ในการสร้างกราฟ สามารถทำได้ดังนี้

1.1 ทำการเติมข้อมูลลงในหน้าต่าง Data view ของโปรแกรม โดยข้อมูลชุดหนึ่งให้ทำการแยกเป็น 3 คอลัมน์คือ ค่าขนาดความเข้มข้นของสารทดสอบ (ค่า X), ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด หรือค่าเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ (ค่า Y), และค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด หรือค่าเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

1.2 ให้เลือกปุ่มคำสั่ง Graph แล้วเลือกคำสั่ง Create Graph ในช่อง Graph types ให้เลือก Line and Scatter Plot จากนั้นให้เลือก Multiple Error Bars ในกรณีที่มีข้อมูลหลายชุด แต่ถ้ามีข้อมูลเพียงชุดเดียวให้เลือก Simple Error Bar

1.3 จากนั้นเลือก XY pairs แล้วจะปรากฏหน้าต่างให้สำหรับเติมข้อมูลค่า X, Y, และ Error bar ให้เลือกคอลัมน์ของข้อมูลที่จะใช้เป็นค่า X, Y, และ Error bar ในข้อมูลแต่ละชุด สุดท้ายให้กดที่ปุ่ม Finish จะได้กราฟออกมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ ANOVA ของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T แบบ 3 x 4 x 5 Factorial in CRD.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ ANOVA ของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T

แบบ 3 x 4 x 5 Factorial in CRD.

ในการวิเคราะห์ ANOVA ของงานวิจัยค้นคว้าอิสระนี้ ที่เลือกการวิเคราะห์เป็นแบบ3x4x5 Factorial in CRD นั้น เนื่องจากการวางแผนการทดลองที่ประกอบด้วยปัจจัย3อย่าง โดยปัจจัยอย่างที่ 1 (สายพันธุ์ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดง) มี 3 ระดับ ปัจจัยอย่างที่ 2 (ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง) มี 4 ระดับ และปัจจัยอย่างที่ 3 (ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640) มี 5 ระดับ จัดเป็นการวิเคราะห์แบบ Factorial Experiment ที่มีจำนวนระดับในแต่ละปัจจัยต่างกัน (สุรพล อุปดิสสกุล, 2536) ซึ่งการวิเคราะห์แบบนี้ จะช่วยให้ศึกษาผลของปัจจัยในแต่ละระดับได้ สำหรับหน่วยทดลองที่ใช้นั้นเป็นเซลล์ HEK293T ซึ่งมาจากแหล่งเดียวกัน เพาะเลี้ยงในสภาวะอย่างเดียวกัน ใช้อาหารชนิดเดียวกัน และทำการถ่ายลงเพาะเลี้ยงในถาดทดสอบชนิด 96 หลุมครั้งเดียวกัน จัดเป็นหน่วยทดลองที่มีความสม่ำเสมอ การตรวจหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ในแต่ละชุดการทดลอง ทำโดยการตรวจสอบการรอดชีวิตของเซลล์ HEK293T จากหลุมในถาดทดสอบจำนวน 3 หลุมต่อ 1 ชุดการทดลอง ซึ่งถือว่าเป็นการทำซ้ำ และเป็นการสุ่มหลุมในถาดทดสอบออกมาแบบสุ่มตลอด จึงจัดได้ว่าเป็นการวิเคราะห์แบบ Completely Random Design (CRD)

1. การวิเคราะห์เพื่อหาความแปรปรวนระหว่างชุดข้อมูล (Analysis of varience) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลในปัจจัยแต่ละอย่าง ทำการวิเคราะห์ ANOVA เป็นแบบ 3 x 4 x 5 Factorial in CRD ดังนี้

1.1 กรอกข้อมูลของปัจจัยทั้ง 3 อย่างคือ สายพันธุ์ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดง ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง และความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640 เป็นแบบ Code Model ดังนี้

- สายพันธุ์ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดงคือ สายพันธุ์ ATCC 16365 ให้ Code เป็น 1, สายพันธุ์ DMKU ให้ Code เป็น 2, และสายพันธุ์ FTCMU 3385 ให้ Code เป็น 3
- ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดงคือ ระยะหมัก 6 วันให้ Code เป็น 1, ระยะหมัก 12 วันให้ Code เป็น 2, ระยะหมัก 18 วันให้ Code เป็น 3, และระยะหมัก 24 วันให้ Code เป็น 4
- ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640 คือ ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดข้าวแดงให้ Code เป็น 1 ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงอยู่ในช่วง 0.45-0.47 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรให้Codeเป็น2 ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงอยู่ในช่วง 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรให้ Code เป็น 3 ความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงอยู่ในช่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรให้ Code เป็น 4 และความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรให้ Code เป็น 5

1.2 กรอกข้อมูลค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ที่ได้จากตารางที่ ค-3 ลงในหน้า Data view โดยกรอกให้มี 3 ซ้ำ รวมแล้วจะมีข้อมูลทั้งหมด 180 ชุด

1.3 เลือกใช้คำสั่งในโปรแกรม SPSS คือ

Analyze ⟶ General Linear Model ⟶ Univariate

1.4 ทำการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T โดยกำหนดค่าที่ต้องการวิเคราะห์เป็น Dependent variable และเลือกปัจจัยทุกอย่างคือ สายพันธุ์ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดง ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง และความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640 เป็น Fixed Factor

1.5 กำหนด Model เป็นแบบ Custom และกำหนด Build Term ประกอบด้วยค่าของ Main Effect แต่ละอย่าง, ค่าของ 2 way Interaction, และค่าของ 3-way Interaction

1.6 เลือกวิธีการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยใน Post Hoc เป็นวิธี Duncan

ตารางที่ ฉ-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Factorial in CRD. ของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CELL

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	50725.217[a]	59	859.749	146.868	.000
Intercept	1123704.312	1	1123704.312	191958.6	.000
STRAIN	4364.814	2	2182.407	372.813	.000
TIME	1676.344	3	558.781	95.455	.000
CONC	19739.373	4	4934.843	843.003	.000
STRAIN * TIME	3289.426	6	548.238	93.654	.000
STRAIN * CONC	6209.564	8	776.196	132.595	.000
TIME * CONC	6754.239	12	562.853	96.150	.000
STRAIN * TIME * CONC	4450.611	24	185.442	31.678	.000
Error	579.535	99	5.854		
Total	1226030.506	159			
Corrected Total	51304.752	158			

a. R Squared = .989 (Adjusted R Squared = .982)

การวิเคราะห์ ANOVA แบบ Factorial in CRD. ของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T เป็นการวิเคราะห์เพื่อศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง ที่มีต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (%cell viability) ของเซลล์ดังกล่าว จากสมมติฐานที่กำหนด คือ

H_0 : ปัจจัยที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด มีอิทธิพลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ได้เท่ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

H_1 : มีปัจจัยที่ใช้ในการทดลองอย่างน้อย 1 คู่ ที่มีอิทธิพลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ไม่เท่ากัน

ค่าที่ได้จากตารางนี้สามารถสรุปได้ว่า ปัจจัยที่ใช้ในการทดลองทุกปัจจัย ล้วนมีอิทธิพลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เป็นการยอมรับสมมติฐาน H_1 จากการยอมรับสมมติฐาน H_1 จึงทำการศึกษาเพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปัจจัยแต่ละอย่างแบบ Duncan แสดงดังตารางที่ ฉ-2 ถึง ฉ-8

ตารางที่ ฉ-2 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ซึ่งได้รับอิทธิพลจากสายพันธุ์ของ *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดง

CELL

Duncan[a,b,c]

STRAIN	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
FTCMU 3385	54	78.49100		
ATCC 16365	54		87.69613	
DMKU	51			92.01361
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 5.854.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 52.962.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

ค่าที่แสดงในตารางนี้สามารถแบ่งกลุ่มของข้อมูลได้ 3 กลุ่มซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบว่า สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก*M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ใน Complete RPMI-1640 มีอิทธิพลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มากที่สุด นั่นคือจะมีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีค่าสูงที่สุด และค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะลดลง เมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ตามลำดับ

ตารางที่ ฉ-3 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ซึ่งได้รับอิทธิพลจากระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง

CELL

Duncan[a,b,c]

TIME	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
24 day	41	81.14295		
18 day	39		87.10815	
12 day	39		87.22792	
6 day	40			88.52077
Sig.		1.000	.826	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 5.854.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 39.733.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าที่แสดงในตารางนี้สามารถแบ่งกลุ่มของข้อมูลได้เป็น 3 กลุ่มซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบว่า สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12 และ 18 วันใน Complete RPMI-1640 มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ไม่แตกต่างกันจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน สำหรับสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6 วัน จะมีอิทธิพลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มากที่สุด นั่นคือจะมีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีค่าสูงที่สุด และค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะลดลง เมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12 หรือ 18 วัน และที่ระยะหมัก 24 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ ฉ-4 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ซึ่งได้รับอิทธิพลจากความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640

CELL

Duncan[a,b,c]

CONC	N	Subset 1	2	3	4	5
3.54-3.74 mg/ml	31	63.88755				
1.77-1.87 mg/ml	31		84.14077			
0.89-0.94 mg/ml	32			88.47022		
0.45-0.47 mg/ml	29				91.27152	
0 mg/ml	36					100.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 5.854.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 31.640.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

ค่าที่แสดงในตารางนี้สามารถแบ่งกลุ่มของข้อมูลได้เป็น 5 กลุ่มซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบว่า ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดข้าวแดง จะมีอิทธิพลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มากที่สุด กล่าวคือจะมีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีค่าสูงสุด และค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะลดลง เมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47, 0.89-0.94, 1.77-1.87, และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ฉ-5 ผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ซึ่งได้รับอิทธิพลจากปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640 และสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดง

CELL

Duncan[a,b,c]

C_S	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7
53.00	11	39.46536						
51.00	11		73.34264					
43.00	10		74.46110					
52.00	9			82.18067				
41.00	11				85.54709			
33.00	10				87.13780			
31.00	11				87.41800			
23.00	11					89.85509		
32.00	11					90.73373	90.73373	
21.00	9					91.80067	91.80067	
42.00	10						92.27350	
22.00	9						92.47356	
11.00	12							100.0000
12.00	12							100.0000
13.00	12							100.0000
Sig.		1.000	.292	1.000	.097	.084	.137	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 5.854.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.498.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

ค่าที่แสดงในตารางนี้สามารถแบ่งกลุ่มของข้อมูลได้เป็น 7 กลุ่มซึ่งมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบว่า ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดข้าวแดงเลยนั้น (อยู่ในกลุ่มที่ 7) จะมีอิทธิพลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มากที่สุด กล่าวคือจะมีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีค่าสูงที่สุด และค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะลดลง เมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47 และ 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสายพันธุ์ DMKU ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 6) ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสารละลายของสารสกัดข้าวแดง 2 ตัวอย่างหลังนี้ (อยู่ในกลุ่มที่ 6) มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 5) แต่การใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงทั้ง 3 ตัวอย่างนี้ (อยู่ในกลุ่มที่ 5) มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T แตกต่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สายพันธุ์ ATCC 16365 และ FTCMU 3385 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 4)

จากนั้นค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะมีการลดลง เมื่อมีการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 3) สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรซึ่งมีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 2) สำหรับการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 1) มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T น้อยที่สุด

ตารางที่ ฉ-6 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ซึ่งได้รับอิทธิพลจากปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดงและระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง

CELL

Duncan[a,b,c]

S T	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7	8
34.00	13	63.05938							
32.00	14		79.31571						
33.00	15			83.97333					
11.00	14				86.39893				
13.00	13				87.16746				
31.00	12				87.39350				
12.00	12				87.67317	87.67317			
14.00	15					89.38340	89.38340		
24.00	13						89.71831	89.71831	
23.00	11						91.31282	91.31282	
21.00	14							91.60886	
22.00	13								95.33777
Sig.		1.000	1.000	1.000	.224	.073	.055	.060	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 5.854.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 13.145.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

ค่าที่แสดงในตารางนี้สามารถแบ่งกลุ่มของข้อมูลได้เป็น 8 กลุ่มซึ่งมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบว่า สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
© by Chiang Mai University
All rights reserved

สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 12 วันใน Complete RPMI-1640 (อยู่ในกลุ่มที่ 8) จะมีอิทธิพลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มากที่สุด กล่าวคือจะมีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีค่าสูงที่สุด แล้วค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะมีการลดลง เมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกันนี้ที่ระยะหมัก 6, 18, และ 24 วัน (อยู่ในกลุ่มที่ 7) แต่พบว่าการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ DMKU ที่ระยะหมัก 18 และ 24 วัน มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 24 วัน (อยู่ในกลุ่มที่ 6) แล้วค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีการลดลงเล็กน้อย เมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC 16365 ที่ระยะหมัก 12 วัน (อยู่ในกลุ่มที่ 5) โดยที่มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกันที่ระยะหมัก 24 วัน และการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ ATCC16365 ที่ระยะหมัก 12 วันนี้มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกันที่ระยะหมัก 6 และ 18 วัน และสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 6 วัน (อยู่ในกลุ่มที่ 4)

จากนั้นค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะมีการลดลง เมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์ FTCMU 3385 ที่ระยะหมัก 18 วัน (อยู่ในกลุ่มที่ 3) และเมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ผลิตจาก *M. purpureus* สายพันธุ์เดียวกันนี้ที่ระยะหมัก 12 และ 24 วัน (อยู่ในกลุ่มที่ 2 และ 1 ตามลำดับ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ฉ-7 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ซึ่งได้รับอิทธิพลจากปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง และความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640

CELL

Duncan[a,b,c]

C T	N	Subset 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
54.00	8	40.34163									
52.00	7		57.90800								
53.00	8			75.78663							
44.00	8				79.93550						
51.00	8				80.76650	80.76650					
41.00	8				82.05375	82.05375					
33.00	7					82.98086	82.98086				
43.00	8						85.18588				
31.00	8							89.04263			
21.00	7							89.41829	89.41829		
34.00	8							89.46988	89.46988		
23.00	7							89.79600	89.79600		
42.00	7							90.13757	90.13757		
32.00	9							91.34233	91.34233	91.34233	
22.00	7								91.92700	91.92700	
24.00	8									93.61063	
11.00	9										100.0000
12.00	9										100.0000
13.00	9										100.0000
14.00	9										100.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	.104	.089	.073	.102	.074	.081	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 5.854.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.881.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

ค่าที่แสดงในตารางนี้สามารถแบ่งกลุ่มของข้อมูลได้เป็น 10 กลุ่มซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยพบว่า ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดข้าวแดงเลยนั้น (อยู่ในกลุ่มที่ 10) จะมีอิทธิพลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มากที่สุด กล่าวคือ จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T มีค่าสูงที่สุด แล้วค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์HEK293T จะมีการลดลงเมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 24 วันที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12 วันที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47 และ 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 9) โดยสารละลายของสารสกัดข้าวแดง 2 ตัวอย่างหลังนี้ มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 12 วันที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 18 และ 6 วันที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.45-0.47 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 24 วันที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 8) และเมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงทั้ง 4 ตัวอย่างหลังนี้ มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6 วันที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 7)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะมีการลดลง เมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 18 วันที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.77-1.87 และ 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 6) และสารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมักนี้ที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.89-0.94 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 6 วันที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.77-1.87 และ 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 5) โดยสารละลายของสารสกัดข้าวแดงทั้งสองตัวอย่างนี้ มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 24 วันที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.77-1.87 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 4) จากนั้นค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T จะมีการลดลง เมื่อใช้สารละลายของสารสกัดข้าวแดงที่ระยะหมัก 18, 12, และ 24 วันที่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 3.54-3.74 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (อยู่ในกลุ่มที่ 3, 2, และ 1 ตามลำดับ)

ตารางที่ ฉ-8 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ HEK293T ซึ่งได้รับอิทธิพลจากปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างสายพันธ์ของเชื้อรา *M. purpureus* ที่ใช้ในการผลิตข้าวแดง ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักข้าวแดง และความเข้มข้นของสารละลายของสารสกัดข้าวแดงใน Complete RPMI-1640

CELL

Duncan[a,b,c]

		Subset					
C_S_T	N	1	2	3	4	5	6
534.00	3	6.59067					
532.00	3		23.74500				
434.00	2			47.71600			
524.00	2				55.66950		
533.00	3				59.55267		
514.00	3					63.87400	
512.00	2						71.64850
323.00	76.59250						
334.00	76.73100						
511.00	77.70333	77.70333					
431.00	78.15867	78.15867	78.15867				
513.00	79.58000	79.58000	79.58000	79.58000			
433.00	80.94200	80.94200	80.94200	80.94200	80.94200		
411.00		81.68000	81.68000	81.68000	81.68000	81.68000	
531.00		82.22700	82.22700	82.22700	82.22700	82.22700	82.22700
521.00			82.85600	82.85600	82.85600	82.85600	82.85600
313.00				83.07650	83.07650	83.07650	83.07650

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ฉ-8 (ต่อ)

234.00				83.70200	83.70200	83.70200	83.70200
413.00					85.00867	85.00867	85.00867
432.00						85.93850	85.93850
311.00						86.10400	86.10400
312.00						86.21567	86.21567
212.00						86.26000	86.26000
211.00						86.56150	86.56150
213.00						86.62900	86.62900
231.00							86.92300
333.00							87.17600

211.00	86.56150	86.56150	86.56150				
213.00	86.62900	86.62900	86.62900				
231.00	86.92300	86.92300	86.92300	86.92300			
333.00	87.17600	87.17600	87.17600	87.17600	87.17600		
414.00	87.77933	87.77933	87.77933	87.77933	87.77933	87.77933	
331.00	87.97300	87.97300	87.97300	87.97300	87.97300	87.97300	87.97300
421.00		88.45700	88.45700	88.45700	88.45700	88.45700	88.45700
412.00		88.80700	88.80700	88.80700	88.80700	88.80700	88.80700
223.00			89.36300	89.36300	89.36300	89.36300	89.36300
423.00				91.81750	91.81750	91.81750	91.81750
222.00					92.05150	92.05150	92.05150
233.00						92.19600	92.19600
321.00						92.69433	92.69433
314.00							92.82867
221.00							92.98633

314.00	92.82867	92.82867	92.82867		
221.00	92.98633	92.98633	92.98633		
332.00	93.48067	93.48067	93.48067		
424.00	93.57133	93.57133	93.57133		
422.00	93.82400	93.82400	93.82400		
322.00		94.33067	94.33067		
523.00		94.44750	94.44750		
324.00			94.60367		
224.00			95.23700	95.23700	
522.00			95.41200	95.41200	
232.00			95.62200	95.62200	
111.00				100.00000	100.00000
112.00				100.00000	100.00000
113.00				100.00000	100.00000

C_S_T	Subset				
	21	22	23	24	25
114.00				100.00000	100.00000
121.00				100.00000	100.00000
122.00				100.00000	100.00000
123.00				100.00000	100.00000
124.00				100.00000	100.00000
131.00				100.00000	100.00000
132.00				100.00000	100.00000
133.00				100.00000	100.00000
134.00				100.00000	100.00000
214.00					102.43500
Sig.	.052	.050	.153	.072	.358

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ ฉ-8 (ต่อ)

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares
The error term is Mean Square(Error) = 5.854.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.553.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c. Alpha = .05.

ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นข้อมูลดิบที่ได้จากการทดลองจริง 3 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำของการทดลองจะพบว่ามีความคลาดเคลื่อนของข้อมูลอยู่เช่น ค่าจากซ้ำที่ 1 อาจมากกว่าซ้ำที่ 2 หรือน้อยกว่าซ้ำที่ 3 มาก อาจเป็นผลเนื่องมาจากการทดลอง หากนำค่าดังกล่าวมาหาค่าเฉลี่ยอาจทำให้ความคลาดเคลื่อนนั้นหายไป จึงไม่เหมาะสมที่จะนำค่าเฉลี่ยมาทำการวิเคราะห์ เพราะจะทำให้การวิเคราะห์ไม่ละเอียดพอ การวิเคราะห์จากค่าข้อมูลดิบ ควรจะรวมเอาความคลาดเคลื่อนดังกล่าวเข้าไปด้วย จะทำให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

การกรอกข้อมูลในหน้า Data view มีการกรอกข้อมูลของซ้ำเข้าไป ทำให้จำนวนข้อมูลทั้งหมดเพิ่มจาก 60 เป็น 180 แต่ที่ไม่ได้กำหนด Rep เข้าไปเป็น Fixed Factor ในการวิเคราะห์เนื่องจาก Rep เป็นการทำซ้ำที่เกิดจากการเก็บข้อมูลแบบสุ่มตลอด ไม่ใช่ Block จึงไม่นำ Rep เข้ากำหนดใน Fixed Factor ด้วย (อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, 2544) แต่ถ้าหากนำ Rep เข้ากำหนดใน Fixed Factor ด้วยแล้ว จะพบว่า Rep ไม่มีอิทธิพลต่อค่าที่วิเคราะห์ การนำ Rep เข้าทำการวิเคราะห์จะทำให้ค่า F ในตารางวิเคราะห์ ANOVA ลดลง เพราะมีอีก 1 ปัจจัยที่ต้องนำเข้าการวิเคราะห์ และมีผลทำให้ความมีนัยสำคัญของปัจจัยอื่น ๆ ลดลง ดังนั้นจึงไม่นำ Rep เข้ากำหนดใน Fixed Factor.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ช

การใช้โปรแกรม Chromeleon ในการควบคุมการทำงานของระบบ HPLC และการคำนวณปริมาณซิตรินินทั้งหมดที่มีอยู่ในข้าวแดงแต่ละตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของซิตรินินสำหรับใช้ในการวิเคราะห์

1.1 ทำการเปิดเดินเครื่อง HPLC ทั้งระบบ และเปิดเดินเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ควบคุมการทำงานของระบบ HPLC

1.2 นำขวดสีชาบรรจุสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ และขวดบรรจุเฟสเคลื่อนที่ (ในข้อ 4. ของหัวข้อ 3.6.4.2 ในบทที่ 3) ออกจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นำมาตั้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องจนมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลายซิตรินินมาตรฐานในเฟสเคลื่อนที่แต่ละความเข้มข้นจำนวน 1,000 ไมโครลิตร ใส่ในขวดไวเอิล (vial) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละขวดปิดฝาให้แน่น

1.3 ทำการดูดเฟสเคลื่อนที่ เมทานอลเข้มข้น 99.95% และอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น 99.95% สารละ 4 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดไวเอิลขนาด 5 มิลลิลิตรอย่างละขวด ปิดฝาให้แน่น จากนั้นนำขวดไวเอิลบรรจุสารในข้อ 1.2 และ 1.3 นี้ทั้งหมด ไปใส่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของแท่นสำหรับวางขวดไวเอิลซึ่งอยู่ภายใต้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมี (Injection) ของระบบ HPLC

1.4 ทำการถ่ายเฟสเคลื่อนที่ลงในขวด ซึ่งอยู่ด้านบนของส่วนที่ทำการฉีดสารเคมี ซึ่งขวดดังกล่าวจะมีท่อยางขนาดเล็ก ต่อเข้ากับส่วนที่ตรวจจับสารเคมีเป้าหมาย (Detection) ของระบบ HPLC เพื่อส่งเฟสเคลื่อนที่ผ่านเข้าคอลัมน์และเครื่อง detector ตลอดเวลา และที่ฐานของส่วนที่ตรวจจับสารเคมีเป้าหมาย จะมีท่อยางขนาดเล็ก สำหรับเป็นทางออกของสารละลายหรือเฟสเคลื่อนที่ที่ผ่านการตรวจวิเคราะห์ ลงสู่ขวดบรรจุสารเคมีใช้แล้ว

1.5 เมื่อจะเริ่มการทำงานของระบบการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีการ HPLC ให้คลิกเมาส์ที่เมนูการทำงาน Server Monitor ในหน้าจอของคอมพิวเตอร์ ก็จะปรากฏแถบข้อความ Chromeleon Server is not running. ให้คลิกเมาส์ที่ปุ่ม Start ของแถบข้อความนี้แล้วแถบข้อความก็จะเปลี่ยนเป็น Chromeleon Server is running idle. ต่อจากนั้นให้คลิกเมาส์ที่เมนูการทำงาน Chromeleon หน้าจอของคอมพิวเตอร์จะเข้าสู่หน้าจอชื่อ ADMIN_local\\panel-Browser ให้เลือกไปที่ folder ชื่อ panel แล้วตามด้วยเมนู HPLC panel pan สุดท้ายก็จะเข้าสู่หน้าจอชื่อ Chromeleon-Control Panel HPLC panel ซึ่งควบคุมการทำงานของระบบ HPLC ทั้งหมด

1.6 ในหน้าจอ Chromeleon-Control Panel HPLC panel จะประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ คือ

1.6.1 Pump ซึ่งมีเครื่องหมาย √ อยู่ที่ช่อง connect ให้ปรับอัตราการไหลของสารละลายในช่อง Flow : เป็น 1.00 ml/min

1.6.2 Autosampler ซึ่งมีเครื่องหมาย √ อยู่ที่ช่อง connect ส่วนนี้ประกอบด้วยเมนู Inject และ Wash ในเมนูทั้งสองนี้มีช่อง Pos : และ Vol : ให้ปรับปริมาณการฉีดสารเคมีเข้าสู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คอลัมน์ (inject) ในช่อง Vol : เป็น 20.00 µL และปรับปริมาณการใช้สารละลายในการล้าง (wash) ในช่อง Vol : เป็น 100.00 µL

1.6.3 Detector ซึ่งมีเครื่องหมาย√ อยู่ที่ช่อง connect ส่วนนี้ประกอบด้วยเมนู Wavelength : มีช่องสำหรับปรับความยาวคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลตที่จะใช้อยู่ 4 ช่อง โดยให้ปรับในช่องที่ 1 เป็น 340 nm ส่วนในช่องที่ 2-4 ไม่ต้องปรับ (ช่องที่ 2-4 จะปิดเอง) มีช่อง Lamp intensity ซึ่งบอกถึงระดับความเข้มของแสงอัลตร้าไวโอเลต ที่ใช้ในการตรวจจับสารเคมีที่ต้องการ ถ้าตัวเลขในช่องนี้สูงมาก ๆ แสดงว่าหลอดกำเนิดแสงอัลตร้าไวโอเลตยังทำงานได้ดี จะสามารถตรวจจับสารเคมีได้ดีด้วย ในจอภาพด้านล่างสุดของส่วน Detector จะใช้แสดงเส้นสัญญาณการตรวจจับสารเคมีที่ต้องการ โดยแกนแนวตั้งเป็นปริมาณความเข้มของสัญญาณ (mAU) และแกนแนวนอนเป็นช่วงเวลา (min)

1.6.4 Audit trail เป็นช่องข้อความบอกถึงลำดับเหตุการณ์ที่ได้กระทำตามช่วงเวลา ซึ่งจะแสดงขึ้นมาเองโดยอัตโนมัติ

1.7 ไปที่เมนู Inject ของส่วน Autosampler ให้ปรับ Pos : ไปยังตำแหน่งของขวดไวเอิล ขนาด 5 มิลลิลิตรบรรจุเฟสเคลื่อนที่ แล้วคลิกเมาส์ที่ปุ่ม Inject เพื่อให้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมีของระบบ HPLC ดูดเฟสเคลื่อนที่ขึ้นมา 20 ไมโครลิตร ฉีดผ่านคอลัมน์เข้าสู่เครื่อง detector จะปรากฏเส้นสัญญาณในจอภาพด้านล่างสุดของส่วน Detector โดยในช่วงแรก ๆ เส้นสัญญาณดังกล่าว จะมีความเข้มของสัญญาณไม่คงที่ตามช่วงเวลาที่ผ่านไป และมีพีค (peak) ของสัญญาณแสดงขึ้นมาหลายอัน ส่วนตัวเลขในช่อง Lamp intensity จะมีค่าสูงขึ้นเรื่อย ๆ รอให้เส้นสัญญาณดังกล่าวปรากฏไปจนหมด ณ ช่วงเวลาสุดท้าย (ที่ 4 นาที)

1.7.1 ปรับ Pos : ไปยังตำแหน่งของขวดไวเอิลขนาด 5 มิลลิลิตรบรรจุเฟสเคลื่อนที่ คลิกเมาส์ที่ปุ่ม Inject เพื่อให้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมีดูดเฟสเคลื่อนที่ขึ้นมา 10 ไมโครลิตร แล้วปรับ Pos : ไปยังตำแหน่งของขวดไวเอิลขนาด 5 มิลลิลิตรบรรจุอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น 99.95% คลิกเมาส์ที่ปุ่ม Inject เพื่อให้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมีดูดอะซิโตไนไตรล์ขึ้นมา 10 ไมโครลิตร ฉีดผ่านคอลัมน์เข้าสู่เครื่อง detector จะปรากฏเส้นสัญญาณในจอภาพด้านล่างสุดของส่วน Detector ซึ่งมีความเข้มของสัญญาณไม่คงที่ และมีพีคปรากฏขึ้นมาหลายอันเช่นกัน รอให้เส้นสัญญาณดังกล่าวปรากฏไปจนหมด ณ ช่วงเวลาสุดท้าย (ที่ 12 นาที)

1.7.2 ปรับ Pos : ไปยังตำแหน่งของขวดไวเอิลขนาด 5 มิลลิลิตรบรรจุเฟสเคลื่อนที่ คลิกเมาส์ที่ปุ่ม Inject เพื่อให้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมีดูดเฟสเคลื่อนที่ขึ้นมา 20 ไมโครลิตร ฉีดผ่านคอลัมน์เข้าสู่เครื่อง detector จะปรากฏเส้นสัญญาณซึ่งมีความเข้มของสัญญาณไม่คงที่เช่นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในจอภาพด้านล่างสุดของส่วน Detector รอให้เส้นสัญญาณดังกล่าวปรากฏไปจนหมด ณ ช่วงเวลาสุดท้าย (ที่ 15 นาที)

1.7.3 ไปที่เมนู Wash ของส่วน Autosampler ให้ปรับ Pos : ไปยังตำแหน่งของขวดไวเอิลขนาด 5 มิลลิลิตรบรรจุอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น 99.95% แล้วคลิกเมาส์ที่ปุ่ม Wash เพื่อให้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมีของระบบ HPLC ดูดอะซิโตไนไตรล์ขึ้นมา 100 ไมโครลิตร ฉีดผ่านคอลัมน์เข้าสู่เครื่อง detector เพื่อล้างเอาเฟสเคลื่อนที่ออกไป จากนั้นให้ทำซ้ำอีกหลาย ๆ ครั้ง จนกว่าความเข้มของเส้นสัญญาณ จะคงที่ที่ระดับ 0 mAU (ใช้เวลานานประมาณ 3-4 ชั่วโมง)

1.8 ไปที่เมนู Inject ของส่วน Autosampler ให้ปรับ Pos : ไปยังตำแหน่งของขวดไวเอิลขนาด 1.5 มิลลิลิตรบรรจุสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ แล้วคลิกเมาส์ที่ปุ่ม Inject เพื่อให้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมีของระบบ HPLC ดูดสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1 ppm ขึ้นมา 20 ไมโครลิตร ฉีดผ่านคอลัมน์เข้าสู่เครื่อง detector จะปรากฏเส้นสัญญาณในจอภาพด้านล่างสุดของส่วน Detector พีคของสัญญาณที่ปรากฏในช่วงแรกๆมักเป็นของตัวทำละลายในเฟสเคลื่อนที่ หรืออะซิโตไนไตรล์ จนถึงที่ช่วงเวลาระหว่างที่ 1- 1.5 นาที จะปรากฏพีคของซิตรินินขึ้น ระบบ HPLC จะทำการบันทึกและประมวลผล รอให้เส้นสัญญาณนี้หมดลง ณ ช่วงเวลาสุดท้าย (ที่ 3 นาที) จากนั้นไปที่เมนู Wash ของส่วน Autosampler ให้ปรับ Pos : ไปยังตำแหน่งของขวดไวเอิลขนาด 5 มิลลิลิตรบรรจุอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น 99.95% แล้วคลิกเมาส์ที่ปุ่ม Wash เพื่อให้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมีของระบบ HPLC ดูดอะซิโตไนไตรล์ขึ้นมา 100 ไมโครลิตร ฉีดผ่านคอลัมน์เข้าสู่เครื่อง detector เพื่อล้างสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ออกไปจากระบบ HPLC

1.9 ให้ปฏิบัติอย่างเดียวกันตามวิธีการในข้อ 1.8 กับการตรวจวิเคราะห์หาซิตรินินในสารละลายซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 2, 3, 4, และ 5 ppm ในเฟสเคลื่อนที่ สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินมาตรฐานแสดงในตารางที่ 4.4.1 ของบทที่ 4

2. การตรวจหาปริมาณซิตรินินในสารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมและข้าวแดงในเมทานอล

2.1 นำสารละลายของข้าวที่เป็นชุดควบคุมในเมทานอล สารละลายของข้าวที่เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอลซึ่งมีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm และสารละลายของข้าวแดงในเมทานอลทุกตัวอย่าง ในข้อ 3. ของหัวข้อ 3.6.4.3 และข้อ 4. ของหัวข้อ 3.6.3.1 ออกจากตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นำมาตั้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องจนมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลายแต่ละตัวอย่างมา 1,000 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดไวเอิล (vial) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตัวอย่างละขวดปิดฝาให้แน่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 นำขวดไวเอิลทั้งหมด ไปใส่ในตำแหน่งต่าง ๆ ของแท่นสำหรับวางขวดไวเอิล ซึ่งอยู่ภายใต้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมี (Injection) ของระบบ HPLC

2.3 ไปที่เมนู Inject ของส่วน Autosampler ให้ปรับ Pos : ไปยังตำแหน่งของขวดไวเอิลขนาด 1.5 มิลลิลิตรบรรจุสารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอล แล้วคลิกเมาส์ที่ปุ่ม Inject เพื่อให้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมีของระบบ HPLC ดูดสารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมนี้ขึ้นมา 20 ไมโครลิตร ฉีดผ่านคอลัมน์เข้าสู่เครื่อง detector จะปรากฏเส้นสัญญาณในจอภาพด้านล่างสุดของส่วน Detector พีคของสัญญาณที่ปรากฏในช่วงแรก ๆ มักเป็นของตัวทำละลายคือเมทานอล จนถึงที่ช่วงเวลาระหว่างที่ 1-1.5นาที ไม่ปรากฏพีคของซิตรินินขึ้น ระบบ HPLC จะทำการบันทึกและประมวลผล รอให้เส้นสัญญาณนี้หมดลง ณ ช่วงเวลาสุดท้าย (ที่ 3 นาที) จากนั้นไปที่เมนู Wash ของส่วน Autosampler ให้ปรับ Pos : ไปยังตำแหน่งของขวดไวเอิลขนาด 5 มิลลิลิตรบรรจุเมทานอลเข้มข้น 99.95% แล้วคลิกเมาส์ที่ปุ่ม Wash เพื่อให้ส่วนที่ทำการฉีดสารเคมีของระบบ HPLC ดูดเมทานอลขึ้นมา 100 ไมโครลิตร ฉีดผ่านคอลัมน์เข้าสู่เครื่อง detector เพื่อล้างเอาสารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอล ออกไปจากระบบ HPLC

2.4 ให้ปฏิบัติอย่างเดียวกันตามวิธีการในข้อ 2.3 กับการตรวจวิเคราะห์หาซิตรินินในสารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอล ซึ่งมีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm และสารละลายของข้าวแดงในเมทานอลทุกตัวอย่าง ถ้าในตัวอย่างมีซิตรินิน พีคของซิตรินินจะปรากฏที่ช่วงเวลาระหว่างที่ 1- 1.5 นาที

2.5 เมื่อทำการวิเคราะห์สารละลายของตัวอย่างข้าวทั้งหมดเสร็จแล้ว ให้ปิดเดินเครื่อง HPLC ทั้งระบบ และปิดเดินเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ควบคุมการทำงานของระบบ HPLC สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณซิตรินินในสารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอล สารละลายของข้าวที่ใช้เป็นชุดทดสอบควบคุมในเมทานอล ซึ่งมีซิตรินินมาตรฐานเข้มข้น 1.25 ppm และสารละลายของข้าวแดงในเมทานอลทุกตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 4.4.2 ของบทที่ 4

3. การคำนวณหาปริมาณซิตรินินทั้งหมดที่มีอยู่ในข้าวแดงแต่ละตัวอย่าง

1. ปริมาณซิตรินินในสารละลายของข้าวแดงทุกตัวอย่างในเมทานอล ที่อ่านได้จากผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.4.2 ของบทที่ 4 มีหน่วยเป็น ppm หรือ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือ ไมโครกรัม/1,000 ไมโครลิตร ปริมาณสารละลายข้าวแดงที่ถูกฉีดเข้าสู่ HPLC column เท่ากับ 20 ไมโครลิตร สมมติว่ามีปริมาณซิตรินินที่อ่านได้เท่ากับ X ppm หรือ X ไมโครกรัม/1,000 ไมโครลิตร ปริมาณสารละลายข้าวแดงที่เตรียมขึ้น 8 มิลลิลิตร (8,000 ไมโครลิตร) จะมีปริมาณซิตรินินเท่ากับ (X ไมโครกรัม / 1,000 ไมโครลิตร) x 8,000 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. จากหัวข้อ 3.6.3.1 ในบทที่ 3 การเตรียมสารละลายข้าวแดงในเมทานอล ใช้ตัวอย่างข้าวแดง 1 กรัม นำมาสกัดด้วยเมทานอลจำนวน 8 มิลลิลิตร ซึ่งก็คือตัวอย่างข้าวแดง 1 กรัม มีปริมาณซิตรินิน เท่ากับ (X ไมโครกรัม / 1,000 ไมโครลิตร) x 8,000 ไมโครลิตร ดังนั้นในตัวอย่างข้าวแดง 1 กิโลกรัมหรือ 1,000 กรัม จะมีปริมาณซิตรินินเท่ากับ (X ไมโครกรัม / 1,000 ไมโครลิตร) x 8,000 ไมโครลิตร x 1,000 กรัม หรือเท่ากับ 8 x X มิลลิกรัม

3. นั่นคือปริมาณของซิตรินินในตัวอย่างข้าวแดงเท่ากับ 8 x X มิลลิกรัม / กิโลกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายกุลชัย นาคบุปผา

วัน เดือน ปีเกิด 26 กรกฎาคม 2522

ประวัติการศึกษา สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนปรินส์รอยแยลส์วิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540
สำเร็จการศึกษาปริญญาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปีการศึกษา 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved