บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ชีวปริมาณออกฤทธิ์ และฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดลเมื่อผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ กลุ่มตัวอย่าง (sample) คือ สารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดลที่ผ่านการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ งานวิจัยได้ออกแบบการทดลองโดยนำสารสกัดหยาบจากกากกาแฟเติมลงในอาหารโมเดลที่มีองค์ประกอบของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และแร่ธาตุ แล้วผ่านระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์เริ่มตั้งแต่ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ชีวปริมาณออกฤทธิ์ และฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์ในตัวอย่างที่ผ่านการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ทั้ง 3 อวัยวะแล้ว แสดงดังภาพที่ 3.1 จากนั้นจึงวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ภาพที่ 3.1 ภาพรวมงานวิจัย

3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย

1) การเตรียมตัวอย่างกากกาแฟบดแห้ง นำกากกาแฟสด ทำแห้งด้วยวิธีการอบแห้ง (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้ค่าความชื้นน้อยกว่า 5% จากนั้นลดขนาดตัวอย่างด้วยวิธีการบด (grinder) และร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 850 μm เก็บส่วนที่ผ่านตะแกรง ส่วนนี้เรียกว่ากากกาแฟบดแห้ง ใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการสกัดเพื่อได้เป็นสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ

2) การสกัดสารจากกากกาแฟ นำกากกาแฟบดแห้ง สกัดในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% ในสัดส่วน 1 : 50 ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบของการเขย่า 180 rpm เป็นเวลา 90 นาที นำส่วนผสม (mixture) ที่ได้ลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำแข็ง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการกรองสารละลายส่วนใส (supernatant) ด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 ทำการกำจัดเอทานอลด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และทำแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการศึกษาระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์

3) การเตรียมตัวอย่างอาหารโมเดล การเตรียมอาหารโมเดลดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang et al. (2019) นำเคซีนความเข้มข้น 1% ละลายใน 10mM phosphate buffer (pH 7.0) กวนผมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นค่อยเติมน้ำมันข้าวโพดปริมาณ 7.64% แล้วทำการโฮโมจิไนซ์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติมเคซีนความเข้มข้น 6.68% กวนผสมต่อไปอีก 30 นาที จากนั้นเติมเพกติน แป้งข้าวโพด ซูโครส และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.7, 5.15, 4.57, และ 0.534% ตามลำดับ

4) ระบบการย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ (simulated *in vitro* gastrointestinal digestion: GID) ดัดแปลงวิธีการของ Mineku et al. (2014) ตัวอย่างอาหารจะผ่านการย่อยเป็น 3 ขั้นตอน ประกอบด้วยการย่อยอาหารในปาก (oral phase) กระเพาะอาหาร (gastric phase) และระบบลำไส้เล็ก (intestinal phase) โดยลำดับ

ตัวอย่างสำหรับการศึกษาผลขององค์ประกอบของอาหารต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากกาแฟ ประกอบด้วย **(1)** อาหารโมเดล (Food model) **(2)** อาหารโมเดลที่เติมสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ 5% (Food model+SCG) **(3)** อาหารโมเดลที่ไม่มีเคซีน (Food model w/o protein) **(4)** อาหารโมเดลที่ไม่มีเคซีน และเติมสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ 5% (Food model w/o protein+SCG) **(5)** อาหารโมเดลที่ไม่มีเพกตินและแป้งข้าวโพด (Food model w/o carbohydrate) **(6)** อาหารโมเดลที่ไม่มีเพกตินและแป้งข้าวโพด และเติมสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ 5% (Food model w/o carbohydrate+SCG) **(7)** อาหารโมเดลที่ไม่มีน้ำมันข้าวโพด (Food

model w/o fat) **(8)** อาหารโมเดลที่ไม่มีน้ำมันข้าวโพด และเติมสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ 5% (Food model w/o fat+SCG)

ตัวอย่างสำหรับการศึกษาผลของวิธีการให้ความร้อนต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกากกาแฟหยาบในอาหารโมเดล ประกอบด้วย **(1)** น้ำปราศจากไอออน (DI) **(2)** สารสกัดจากกากกาแฟ (SCG) **(3)** อาหารโมเดลที่ให้ความร้อนโดยวิธีการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Food model/boil) **(4)** อาหารโมเดลที่เติมสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ 5% และให้ความร้อนโดยวิธีการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Food model+SCG/boil) **(5)** อาหารโมเดลที่ให้ความร้อนโดยวิธีการอบที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Food model/oven) **(6)** อาหารโมเดลที่เติมสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ 5% และให้ความร้อนโดยวิธีการอบที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Food model+SCG /oven) **(7)** อาหารโมเดลที่ให้ความร้อนโดยวิธีนึ่งในหม้อนึ่งแรงดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Food model/autoclave) **(8)** อาหารโมเดลที่เติมสารสกัดหยาบจากกากกาแฟ 5% และให้ความร้อนโดยวิธีนึ่งในหม้อนึ่งแรงดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Food model/autoclave)

จากนั้นทดสอบการย่อยอาหารในปาก (oral phase) โดยผสมตัวอย่างในอัตราส่วน 1 : 1 กับ SSF (simulated salivary fluid : 1X ประกอบด้วย 15.1mM KCl, 3.7mM KH_2PO_4, 13.6mM $NaHCO_3$, 0.15mM $MgCl_2(H_2O)_6$, 0.06mM $(NH_4)_2CO_3$) ที่มีเอนไซม์ α-amylase (final activity ในสารผสม คือ 75 u/ml) และเติม $CaCl_2$ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.75 μM บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7 พร้อมกวนผสมตลอดเวลา เป็นเวลา 2 นาที ทั้งตัวอย่างอาหารจำลองและ SSF ต้องอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนการผสมกัน ทั้งนี้เอนไซม์ **α**-amylase จาก *Aspergillus oryzae* (EC3.2.1.1) วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) โดยใช้แป้งมันฝรั่ง (potato starch) เป็นสารตั้งต้น วิเคราะห์ที่สภาวะ pH 6.9 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส รายงานค่ากิจกรรม 1 (unit activity: U) เป็นมิลลิกรัมมอลโทส (moltose) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาในเวลา 3 นาที

นำส่วนการย่อยจำลองในปากที่ได้ ทดสอบในระบบกระเพาะอาหาร (gastric phase) โดยผสมตัวอย่างในอัตราส่วน 1 : 1 กับ SGF (simulated gastric fluid : 1X ประกอบด้วย 0.69 mM KCl, 0.9mM KH_2PO_4, 25mM $NaHCO_3$, 47.5mM NaCl, 0.1mM $MgCl_2(H_2O)_6$, 0.5mM $(NH_4)_2CO_3$) ที่มีเอนไซม์ porcine pepsin (final activity ในสารผสม คือ 2,000 U/ml) เติม $CaCl_2$ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.075 mM และเติม 1 M HCl จนได้ค่า pH 3.0 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 3 พร้อมกวนผสมตลอดเวลา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทั้งนี้เอนไซม์ porcine pepsin (EC 3.4.23.1) วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยสารตั้งต้นคือ ฮีโมโกลบินในเลือดจากโค (bovine blood haemoglobin) วิเคราะห์ที่สภาวะ pH 2.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รายงานค่า

กิจกรรม 1 U เป็นค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (ΔA_{280}) 0.001 ต่อนาที ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (trichloroacetic acid : TCA)

จากนั้นทดสอบในระบบลำไส้เล็ก (intestinal phase) โดยผสมตัวอย่างในอัตราส่วน 1 : 1 กับ SIF (simulated Intestinal fluid : 1X ประกอบด้วย 6.8mM KCl, 0.8mM KH_2PO_4, 85mM $NaHCO_3$, 38.4mM NaCl, 0.33mM $MgCl_2(H_2O)_6$) เติมแพนคลีเอทินจากสุกร (pancreatin) (ให้ได้final activity ของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) คือ 100 U/ml) เกลือน้ำดี (bile salt) ความเข้มข้นสุดท้าย 10 mM และเติม $CaCl_2$ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.3 mM จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH 7 พร้อมกวนผสมตลอดเวลา เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทั้งนี้เอนไซม์ทริปซิน (EC 3.4.21.4) วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ด้วยสารตั้งต้น คือ *p*-toluene-sulfonyl-L-arginine methyl ester (TAME) ที่สภาวะ pH 8.1 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รายงานค่ากิจกรรม 1 U เป็นการย่อย 1 μmol TAME ต่อนาที ส่วนเกลือน้ำดีวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นด้วยชุดทดสอบ bile acid assay kit (MAK309) ตรวจวัดค่าการเรืองแสงด้วย fluorescene multiwell plate reader

นำตัวอย่างให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายส่วนใสเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

5) วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลลิกที่สกัดได้ทั้งหมด นำตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมด (total phenol content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (FTC) โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) และกรดคลอโรเจนิก (CGA) เป็นสารละลายมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

6) วิเคราะห์ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ค่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

(1) ABTS radical scavenging assay (ABTS) อนุมูลอิสระในรูปประจุบวก $ABTS^+$ จากปฏิกิริยา persulphate oxidation ใช้เป็นสารละลายตั้งต้น (7 mM ABTS และ 2.45 mM potassium persulphate ใน 10mM phosphate buffer, pH 7.4) จากนั้นเจือจางสารละลายตั้งต้นก่อนการวิเคราะห์ด้วย 10mM phosphate buffer (pH 7.4) ให้ได้ค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ค่าความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรคือ 0.7±0.02 นำตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย ABTS ปริมาตร 1,980 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 734 นาโนเมตร ตัวอย่างควบคุมใช้ 10mM phosphate buffer (pH 7.4) ที่ไม่มี ABTS รายงานเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (μmol Trolox equivalents per gram, μmol Trolox/g)

(2) DPPH radical scavenging assay (DPPH) เตรียมอนุมูลอิสระในรูป $DPPH^{\bullet}$ ในสารละลายเอทานอลทันทีก่อนการวิเคราะห์ นำตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย 200μM DPPH ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 517 นาโนเมตร ตัวอย่างควบคุมใช้เอทานอลที่ไม่มี DPPH รายงานเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (μmol Trolox equivalents per gram, μmol Trolox/g)

(3) ferric reducing antioxidant power assay (FRAP) วัดความสามารถในการริดิวซ์เฟอริคไอออน (Fe^{3+}) เป็นเฟอริคไอออน (Fe^{2+}) ณ สภาวะที่เป็นกรดทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน ferrous-tripyridyltriazine complex นำตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร (10 parts 300mM sodium acetate buffer at pH 3.6, 1 part 10 mM TPTZ in 40 mM HCl, และ 1 part 20 mM $FeCl_3 \bullet 6H_2O$) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ตัวอย่างควบคุมวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างยกเว้นไม่เติมตัวอย่าง รายงานค่าเป็น μmol Fe^{2+}/g

(4) metal chelating ability ปฏิกิริยาปริมาตร 2 มิลลิตรประกอบด้วยตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร, $FeCl_2$ 100 ไมโครลิตร, 3-(2-pyridyl)-5,6-bis (4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferro- zine) 400 ไมโครลิตร, และน้ำกลั่นกำจัดไอออน บ่มในสภาวะไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ 562 นาโนเมตร ตัวอย่างควบคุมวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่างยกเว้นไม่เติมตัวอย่าง รายงานค่าเป็น μmol EDTA/g

7) การวิเคราะห์ชีวปริมาณออกฤทธิ์ด้วยวิธีการ *in vitro* bioavailability simulation ดัดแปลงวิธีการจาก Dias et al. (2016) นำถุงไดอะไลซิส (molecular weight cut-off 7000Da) ที่มีสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS : 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4, 1.8mM KH_2PO_4) แช่ลงในภาชนะที่มีตัวอย่างที่ผ่านการย่อยจากการจำลองในลำไส้เล็กในอัตราส่วน 1 : 1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พร้อมเขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วรอบ 100 rpm ให้ส่วนของสารละลายในภาชนะให้เป็นส่วนของสารที่คงอยู่ในลำไส้ (OUT) และสารละลายในถุงไดอะไลซิสเป็นส่วนของซีรัม (serum) (IN)

8) การระบุชนิดสารสำคัญในสารสกัดจากกากกาแฟ ระบุชนิดและปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่อง Quality Attributes (CQA)-ultrahigh-pressure liquid chromatography (UHPLC) เชื่อมกับคอลัมน์ Zorbax SB-C18 1.8 μm column (2.1 mm i.d. × 150 mm) สารมาตรฐานประกอบด้วย 3- caffeoylqunic acid (3-CQA), 4 - caffeoylqunic acid (4-CQA), 5-

caffeoylqunic acid (5-CQA), 3,4-dicaffeoylqunic acid (3,4-diCQA), 3,5-dicaffeoylqunic acid (3,5-diCQA), 4,5-dicaffeoylqunic acid (4,5-diCQA), caffeic acid, และ caffeine จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารโดยเปรียบเทียบกับสมการเส้นตรงของสารมาตรฐาน ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ

9) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์ของสารสกัดหยาบจากกากกาแฟในอาหารโมเดล การศึกษาได้เลือกใช้เซลล์มะเร็งชนิด HepG2 และ SHSY-5Y ซึ่งเป็นเซลล์เยื่อบุ (epithelial-like) ของตับและเซลล์ประสาทจากไขกระดูก ตามลำดับ โดยเป็นการศึกษาภายนอกร่างกายมนุษย์ (*in vitro*) เพื่อสะท้อนฤทธิ์ของสารสกัดจากกากกาแฟหยาบต่อเซลล์ที่ได้มนุษย์ ทั้งนี้ในการวิจัยได้เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้งสองเพื่อให้เทียบเคียงกับเซลล์ปกติ

การศึกษาผลของฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์ด้วยการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) เพื่อหาค่า half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) ค่า IC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ลดจำนวนลงไปร้อยละ 50 หากค่า IC_{50} ต่ำ หมายถึง สารในตัวอย่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์มาก หรือมีฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์สูง ในทางตรงข้ามหากค่า IC_{50} สูง หมายถึง สารในตัวอย่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อย หรือมีฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์ต่ำ โดยใช้เซลล์ HepG2 และ SHSY-5Y ดำเนินการทดลองโดยบ่มเซลล์ HepG2 ปริมาณ 7,000 cells/well และเซลล์ SHSY-5Y ปริมาณ 10,000 cells/well ลงใน 96 well/plate ที่มีอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 90 %, Fetal bovine serum (FBS), 10%, Antibiotic 1% บ่ม 24 ชั่วโมง ในตู้ CO_2 incubator ที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นบ่มกับสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 0, 0.0039, 0.0078, 0.0156, 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 และ 4 mg GAE/ml ตามลำดับ ใน DMEM 100 % และเติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 100 µL จากนั้นทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณหา % cell viability

การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย dichlorofluorescein (DCF) assay โดยใช้เซลล์ HepG2 และเซลล์ SHSY-5Y ดำเนินการทดลองโดยบ่มเซลล์ HepG2 5,000 cells/well หรือเซลล์ SHSY-5Y ปริมาณ 10,000 cells/well ใน 96 well/plate ใน DMEM 90 %, FBS 10%, Antibiotic 1% บ่ม 24 ชม. ในตู้ CO_2 incubator ที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ H_2O_2 1 mM เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระ และใช้ N-acetylcysteine (NAC) 10 mM เป็นตัวควบคุมการยับยั้งอนุมูลอิสระ จากนั้นเติมตัวอย่างที่ทดสอบแต่ละความเข้มข้น 100 µl และบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย DCF assay

10) วิเคราะห์ผลทางสถิติ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการวิจัยแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)