บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมี

- Chloroform
- Ethyl acetate
- Ethyl alcohol
- *n*-Hexane
- Methanol
- Petroleum ether
- Cab-O-Sil®
- Chlorpyrifos

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- Analytical balance
- Beaker
- Blender
- Condenser
- Cylender
- Erlenmyer flask
- Grinder machine
- Heating mantle
- Hot air oven
- Rotary evaporator
- Round bottom flask
- Separatory funnel
- Soxhlet' apparatus
- Spray dryer

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่าง ๆ ของสังหยูใบเขียวและใบแดง โดยแยกสารสกัดหยาบของสังหยูด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและติดตามฤทธิ์ (bioassay guided isolation) ด้วยฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชัน

1) เก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างสังหยู จากส่วนต่าง ๆ สังหยูใบเขียว ได้แก่ ใบ รากปม รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้ สังหยูใบแดง ได้แก่ ใบ รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้ นำวัตถุดิบสมุนไพรมาคัดเลือกตามส่วนที่ใช้

หมายเหตุ * ใบ คือ ใบที่เจริญเติบโตเต็มที่ รากปม คือ รากที่เปลี่ยนรูปร่างไปมีลักษณะปูดเป็นปม รากใหญ่ คือรากที่ไม่เปลี่ยนรูปเป็นลักษณะปม และมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 เซนติเมตร กิ่ง คือ ส่วนของไม้ที่ยื่นออกจากลำต้นที่ตั้งตรงจากพื้นดิน (ขนาดเล็ก มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2 เซนติเมตร ขนาดใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 เซนติเมตร) เปลือก คือ ส่วนผิวที่ลอกออกจากกิ่งและลำต้น แก่นหรือเนื้อไม้ คือ ส่วนของลำต้นที่ตั้งตรงจากพื้นดินและลอกเปลือกออกเหลือแต่ส่วนเนื้อไม้

** สังหยูใบแดง มีปริมาณรากปมน้อย ไม่ถึง 1 กิโลกรัม จึงไม่เพียงพอสำหรับทำการศึกษา

2) การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร

นำมาลดขนาด และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50^{O}C จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดสมุนไพร

3) การเตรียมสารสกัด

สกัดสังหยูใบเขียวและใบแดง ด้วย 95 % Ethanol ด้วยการสกัดต่อเนื่อง กากนำมาสกัดด้วยน้ำ ด้วยวิธีการ reflux สารสกัดที่ได้ นำมาทำให้แห้งด้วย rotary evaporator หรือ spray dryer ตามความเหมาะสม

4) การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ควบคู่กับการตรวจสอบฤทธิ์

สารสกัดในส่วนของ 95 % Ethanol และสารสกัดน้ำ นำมาแยกสารสำคัญควบคู่กับการตรวจสอบฤทธิ์ โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี หรือการสกัดแยกด้วย partition technique

หมายเหตุ ในการแยกสารให้ได้สารบริสุทธิ์และพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารออกฤทธิ์มีปัจจัยหลายประการที่อาจทำให้ผลการศึกษาไม่แล้วเสร็จในเวลาเพียง 1 ปี ดังนั้นในการศึกษานี้ ในปีที่ 1 จะได้ส่วนสกัดที่ให้ฤทธิ์ที่ดี โดยอย่างน้อยทราบถึงกลุ่มสาร และ finger print ของส่วนสกัดที่ให้ฤทธิ์ที่ดี

3.2.2 ศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชัน และฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (in vitro)

จากส่วนต่างๆ ของสังหยู ชนิดใบเขียว ได้แก่ ใบ รากปม รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้ ชนิดใบแดง ได้แก่ ใบ รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้ ในห้องปฏิบัติการ

1) การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

1.1) การทดลองฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH[5]

เตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำสารทดสอบทุกความเข้มข้นในปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย DPPH (90 µM) 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้มาเติม 95% methanol จนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนผสมที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm ด้วยเครื่อง UV-visible spectrometer โดยให้น้ำกลั่น (Deionized water) เป็น blank และ gallic acid เป็น positive control นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารทดสอบต่อการต้านออกซิเดชัน

1.2) การทดลองฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี superoxide radical[6]

เตรียมสาร nitroblue tetrazolium (NBT) 360 µM, b-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) 720 µM และ phenazine metrosulphate (PMS) 30 µM โดยเตรียมสารทั้งหมดใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) จากนั้นเตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำสารทดสอบทุกความเข้มข้นในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเติมด้วย NBT, NADH และ PMS อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร เก็บส่วนผสมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนผสมที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 560 nm ด้วยเครื่อง UV-visible spectrometer โดยให้น้ำกลั่น (Deionized water) เป็น blank และ gallic acid เป็น positive control นำผลที่ได้ไปคำนวณหาคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารทดสอบต่อการต้านออกซิเดชัน

2) การศึกษาผลของสารทดสอบต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

2.1) โดยวิธี Cell proliferation assay[7]

สารสกัดที่เลือกมาศึกษา cell proliferation assay ได้แก่สารที่มีฤทธิ์ antioxidant ที่ดีในห้องปฏิบัติการ DPPH และ superoxide radical ได้แก่ crude extract, Ethanol extract, fraction 5, fraction 9, fraction 10 และ fraction 11 วิธีการทดสอบความสามารถของสารสกัดในยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ LX-2 ทำได้โดย เลี้ยงเซลล์ LX-2 จำนวน $1x10^4$ เซลล์ใน 96-well plate โดยใช้ DMEM medium (ที่มี 2% (v/v) FBS, 2 mM l-glutamine, 100 U/ml penicillin, และ 100 µg/ml streptomycin) ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสและมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารสกัดที่ต้องการทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ลงไป บ่มเซลล์ต่ออีกที่ 37 °C ใน 5% CO_2 incubator เมื่อครบเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ดูดสารสกัดออก เติมสี Alamar blue ในแต่ละหลุม ให้มี final concentration 2 ug/mL บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำเพลทไปวัด OD ที่ 562 nm และ 620 nm โดยใช้ microplate reader

2.2) โดยวิธี Apoptosis analysis[8]

จากผลการทดลองที่ได้จาก cell proliferation assay เลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่เริ่มทำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมาทดสอบต่อ โดยในเบื้องต้นได้เลือกความเข้มข้นในช่วง 25- 100 ug/mL มาทดสอบ (เพราะเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ในเรื่อง cytotoxicity assay) โดยมีวิธีทดลองคือเลี้ยงเซลล์ LX-2 จำนวน $3x10^5$ เซลล์ใน 6-well plates หลังจากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบลงไปและบ่มรวมกับ TGF (5 ng/mL) บ่มเซลล์ไว้ที่ 37 °C ใน 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดน้ำเลี้ยงเซลล์ใส่ใน tube ล้างเซลล์โดยใช้ PBS ที่เย็น จากนั้นเติม trypsin เพื่อให้เซลล์หลุดจากเพลท ดูด cells suspension ใส่ใน tube ที่มี culture suppernate อยู่ แล้วจึงปั่นล้างเซลล์และทิ้งส่วน supernatant ไป ทำการย้อมเซลล์โดยใช้วิธี AV-PI staining โดยใช้น้ำยา Annexin V/propidium iodide Apoptosis assay (immunotool) หลังจากทิ้งส่วน supernatant ไปแล้ว เติม binding buffer ลงไป 90 µL ทำการ resuspend เซลล์ แล้วเติม annexin V และ PI อย่างละ 5 µL ผสมให้เข้ากันเบาๆ บ่มส่วนผสมทั้งหมดในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที แล้วนำเข้าเครื่อง flow cytometer ประเมินผลของสารสกัดต่ออัตราการเกิด apoptosis

3.2.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลงของสมุนไพรกลุ่มขับสารพิษในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

จากสังหยูใบเขียวในส่วนที่สามารถใช้ทดแทนรากได้ โดยนำผลการศึกษาจากข้อ 3.2.2

<u>การศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลง</u>[9]

1) <u>สัตว์ทดลอง</u>

ใช้หนูแรทพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ อายุ 4 สัปดาห์ น้ำหนัก 180-200 g จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จ.นครปฐม เลี้ยงสัตว์ทดลองในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 $\pm$ 1 °C ได้รับแสงสว่าง-มืด 12 ชั่วโมง สัตว์ทดลองได้รับอาหารและน้ำตามปกติ โดยเลี้ยงไว้อย่างน้อย 7 วันก่อนทำการทดลอง

2) <u>การขออนุญาตใช้สัตว์ทดลอง</u>

การขอใช้สัตว์ทดลองในโครงการวิจัยนี้ ได้ขอรับการพิจารณาจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หมายเลข 49/2559 วันที่ 16 ธันวาคม 2559 ถึง 16 ธันวาคม 2562

3) <u>การแบ่งกลุ่มหนูแรทเพื่อทำการทดลอง</u> ดังนี้

3.1) แบ่งหนูแรทเพศผู้ออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว (ต่อ 1 ตัวอย่าง) ดังนี้

<u>กลุ่มที่ 1</u> กลุ่มควบคุมปกติ ได้รับน้ำกลั่น 2 mg/kg

<u>กลุ่มที่ 2</u> กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่น 2 mg/kg และได้รับยาฆ่าแมลง Chlorpyrifos (กลุ่ม organophosphate) ทุกวันจนครบ 16 วัน (อ้างอิงจากรายงานวิจัย ปี 2560)

<u>กลุ่มที่ 3-5</u> กลุ่มทดสอบ ได้รับสารสังหยูใบเขียวขนาดต่างๆ 3 ขนาด (มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) และได้รับยาฆ่าแมลง ทุกวันจนครบ 16 วัน

3.2) ป้อนสารสกัด 30 นาทีก่อนป้อนยาฆ่าแมลง Chlorpyrifos กลุ่ม Organophosphate ขนาด 16 mg/kg ทุกวันเป็นเวลา 16 วัน

3.3) ทำการอดอาหารหนูแรทเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และสลบหนูแรทด้วย pentobarbital sodium injection ขนาด 50 mg/kg (ทางช่องท้อง)

3.4) เก็บเลือดจากหัวใจใน EDTA tube และ non-EDTA tube เพื่อนำไปประเมินผล

3.5) เก็บตับและไตใน 10% neutral buffer formalin เพื่อส่งตรวจทางพยาธิวิทยา

4) <u>วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลง</u>

4.1) การตรวจ oxidative stress biomarkers ได้แก่ plasma malondialdhyde (MDA), reduced glutathione (GSH) และ superoxide dismutase (SOD) โดยใช้ assay kit

4.2) การตรวจวัด AChE activity

4.3) การตรวจค่าทางโลหิตวิทยา เช่น red blood cell (RBC), white blood cell (WBC), hemoglobin, hematocrit, platelet, mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV) และ mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)

4.4) การตรวจค่าเคมีคลินิก เช่น blood urea nitrogen (BUN), creatinine, asparate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP)

4.5) การตรวจทางจุลกายวิภาคและพยาธิวิทยาของตับและไต

หมายเหตุ ทั้งนี้หากผลการทดสอบฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชันและฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (ข้อ 3.2.2) ได้ผลไม่ดีเท่าส่วนราก จะไม่มีการดำเนินการศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลง

3.2.4 ศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (180 วัน) ในสัตว์ทดลองของสารสกัดสังหยูใบเขียว

1) <u>สัตว์ทดลอง</u>

หนูแรทพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้และเพศเมียน้ำหนัก 180-200 กรัม จากบริษัท โนมุระสยามอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด กทม. นำมาเลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อมให้มีอุณหภูมิ 25 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมแสงสว่าง-มืด 12 ชั่วโมง ให้อาหารและน้ำไม่จำกัดปริมาณ เลี้ยงสัตว์ทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง

2) <u>การขออนุญาตใช้สัตว์ทดลอง</u>

การขอใช้สัตว์ทดลองในโครงการวิจัยนี้ ได้ขอรับการพิจารณาจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หมายเลข 35/2559 วันที่ 12 ธันวาคม 2559 ถึง 12 ธันวาคม 2562

3) <u>การทดสอบความเป็นพิษระยะยาว 180 วัน</u>

3.1) แบ่งหนูแรทแต่ละเพศตามหลักการทดลองดังนี้

แบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่ม (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว ส่วนกลุ่มติดตามผลทั้ง 2 กลุ่ม เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว) ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่น 2 mg/kg เป็นเวลา 180 วัน

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุมกลุ่มติดตามผล ได้รับน้ำกลั่น 2 mg/kg เป็นเวลา 180 วัน และเลี้ยงต่ออีก 28 วันโดยไม่ได้รับน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดสอบ ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว ขนาด 150 mg/kg เป็นเวลา 2 วัน ตามด้วยสารขนาด 50 mg/kg เป็นเวลา 2 วัน สลับไปเรื่อยๆ จนครบ 180 วัน

กลุ่มที่ 4 กลุ่มทดสอบ ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว ขนาด 750 mg/kg เป็นเวลา 2 วัน ตามด้วยสารขนาด 250 mg/kg เป็นเวลา 2 วัน สลับไปเรื่อยๆ จนครบ 180 วัน

กลุ่มที่ 5 กลุ่มทดสอบ ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว ขนาด 3,750 mg/kg เป็นเวลา 2 วัน ตามด้วยสารขนาด 1,250 mg/kg เป็นเวลา 2 วัน สลับไปเรื่อยๆ จนครบ 180 วัน

กลุ่มที่ 6 กลุ่มติดตามผล ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว ขนาดสูงสุด 3,750 mg/kg เป็นเวลา 2 วัน ตามด้วยสารขนาด 1,250 mg/kg เป็นเวลา 2 วัน สลับไปเรื่อยๆ จนครบ 180 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วันโดยไม่ได้รับสารสกัด

3.2) ป้อนสารสกัดให้หนูแรททางปากติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 180 วัน ระหว่างการทดลองสังเกตและบันทึกอาการเปลี่ยนแปลง น้ำหนักตัวของหนูแรททุกวัน หากมีหนูแรทตายระหว่างการทดลองจะทำการผ่าพิสูจน์ซาก

3.3) เมื่อครบกำหนด 180 วัน ทำการเก็บเลือดเพื่อตรวจค่าทางโลหิตวิทยา และค่าทางชีวเคมี และผ่าพิสูจน์ซากหาความผิดปกติของอวัยวะภายในต่างๆ (ปอด หัวใจ ตับ ตับอ่อน ไต กระเพาะอาหาร ลำไส้ ม้าม ต่อมหมวกไต รังไข่ มดลูก อัณฑะ ตา สมอง กล้ามเนื้อและเส้นประสาท) ด้วยตาเปล่าและส่งชิ้นเนื้อตรวจทางพยาธิวิทยา

3.4) ส่วนหนูแรทกลุ่มติดตามผลทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อครบกำหนดจะเก็บเลือดและเก็บอวัยวะภายในสำหรับส่งชิ้นเนื้อตรวจทางพยาธิวิทยา

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลของผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean ± Standard deviation of Mean, S.E.M) การเปรียบเทียบผลการทดลองภายในกลุ่มวิเคราะห์โดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และ post hoc least-significant difference (LSD) test โดยที่ P values น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

3.3 สถานที่ดำเนินการวิจัย

พื้นที่เก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรสังหยูใบเขียวและใบแดง โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงป่ากล้วย

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยสมุนไพรภาคเหนือ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่