บทที่ 2

วิธีทำการวิจัย

วัสดุ เมล็ดมันแกว ได้จากร้านขายเมล็ดพันธุ์พืช และได้รับความกรุณา พิสูจน์เอกลักษณ์โดยอาจารย์ชั้นพิเศษ ดร.พยอม ตันติวัฒน์ หัวหน้าแผนกวิชาเภสัชพฤกษศาสตร์

สารเคมี

1. Petroleum ether (MAY & BAKER LTD.)
2. Ether (MAY & BAKER LTD.)
3. Chloroform (MAY & BAKER LTD.)
4. Ethyl acetate (J.T.BAKER CHEMICAL CO.,)
5. Ethyl alcohol (MAY & BAKER LTD.)
6. Methyl alcohol (E.MERCK)
7. Methylene chloride (Dichloromethane) (MAY & BAKER LTD.)
8. Acetone (J.T.BAKER CHEMICAL CO.,)
9. Benzene (MALLINCKRODT CHEMICAL WORKS)

น้ำยา

1. Tyrode's Solution มีส่วนประกอบดังในตารางที่ 1

เครื่องมือ

1. Soxhlet Apparatus
2. Multipen - Recorder (RIKA - DENKI)
3. Spectrophotometer - DB and Recorder - Linear (BECKMAN Instrument, Inc.)

ตารางที่ 1

Tyrode's Solution

ส่วนประกอบ	จำนวนกรัม/1000 ม.ล.
NaCl	8.0 กรัม
KCl 10 %	2.0 ม.ล.
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 10 %	2.6 ม.ล.
NaH_2PO_4 5 %	1.0 ม.ล.
Glucose	1.0 กรัม
$NaHCO_3$	1.0 กรัม
$CaCl_2$ (1 molar)	1.8 ม.ล.
Aerating gas : pure oxygen gas	

สัตว์ทดลอง

1. หนูขาว (albino rat) เป็นพันธุ์ที่ผสมโดย ศาสตราจารย์นายแพทย์วิเชียร คีลกสัมพันธ์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลฯ

2. ปลาทอง

วิธีการ

การเตรียมเมล็ดมันแกว (seed preparation)

นำเมล็ดมันแกวมาคัดเลือกเอาเมล็ดที่สมบูรณ์ จำนวนหนึ่ง นำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้เย็น บดด้วยเครื่องบดไฟฟ้าเพื่อเตรียมสกัดต่อไป

น้ำหนักเมล็ดมันแกวก่อนอบแห้ง 98.5 กรัม

น้ำหนักของเมล็ดมันแกวภายหลังอบ 95.0 กรัม
น้ำหนักที่สูญไปคิดเป็นร้อยละ 3.6
น้ำหนักของเมล็ดมันแกวโดยเฉลี่ยต่อ 1 เมล็ด เท่ากับ 0.1561 กรัม

การสกัด

โดยที่การสกัดเพื่อต้องการจะให้ได้ active principle ซึ่งอาจเป็นสารชนิดใดก็ตาม และสิ่งที่มีภายในเมล็ดมีลักษณะเป็น oily seed จำเป็นต้องใช้การสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ทั้งที่เป็น non-polar solvents และ polar solvents เพื่อที่จะสกัดให้ได้สารซึ่งเป็น active principle ที่ออกมาในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ เพื่อนำไปทดลองดูการออกฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยา และพิษวิทยาในสัตว์ทดลองต่อไป

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย

1.1 น้ำ เป็นตัวทำละลาย

ก. นำเมล็ดมันแกวที่อบแห้งมา ปอก หั่น และ บดในโกร่ง

1 เมล็ด บดกับน้ำ 2.0 ม.ล.
2 เมล็ด บดกับน้ำ 2.8 ม.ล.
3 เมล็ด บดกับน้ำ 3.0 ม.ล.

จากการเตรียมจะได้น้ำละลายสีเหลืองนวล ขุ่น นำมาให้กับหนูขาวด้วย stomach needle tube

ข. นำผงของเมล็ดมันแกวที่เตรียมอบแห้งไว้ จำนวน 7.5 กรัม มาบดละลายกับน้ำ จำนวน 50 ม.ล. กรองเอากากออกด้วยกระดาษกรอง น้ำละลายที่ได้มีลักษณะเป็นสีเหลืองนวลขุ่น นำมาให้กับหนูขาวและปลาทอง

1.2 สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆกัน

1.2.1 Petroleum ether (boiling point 40° - 60°C)

ใช้ผงของเมล็ดมันแกวที่เตรียมไว้แล้ว จำนวน 15 กรัม นำมาสกัดด้วย petroleum ether จำนวน 150 ม.ล. นาน 14 ชั่วโมง ด้วย Soxhlet apparatus นำส่วนสกัดที่ได้มาระเหยและอบให้แห้งในตู้สูญญากาศ

สิ่งสกัดที่ได้เป็นน้ำมันประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์

1.2.2 Ethyl acetate (boiling point 76.1° - 76.4°C)

ใช้ผงจากเมล็ดมันแกวที่เตรียมไว้แล้ว จำนวน 15 กรัม สกัดด้วย ethyl acetate จำนวน 150 ม.ล. ด้วย Soxhlet apparatus นาน 14 ชั่วโมง นำส่วนสกัดที่ได้มาทำให้แห้ง ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง และเข้าอบในตู้สูญญากาศ สิ่งสกัดที่ได้เป็นน้ำมันประมาณ 26 เปอร์เซ็นต์

1.2.3 Ether (boiling point 35°C)

ใช้ผงจากเมล็ดมันแกวที่เตรียมไว้แล้ว จำนวน 15 กรัม สกัดด้วย ether จำนวน 150 ม.ล. ด้วย Soxhlet apparatus นาน 14 ชั่วโมง นำส่วนสกัดตั้งทิ้งไว้ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง และนำมาอบในตู้สูญญากาศ ได้สิ่งสกัดเป็นน้ำมันประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

นำน้ำมันที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด เตรียมไว้ให้สัตว์ทดลองต่อไป

1.3 การสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ กัน ภายหลังการสกัดเอาไขมันออก

เนื่องจากในการสกัด พบว่าเมล็ดมันแกวนี้มีน้ำมันอยู่ในปริมาณมาก ต้องทำการสกัดเอาไขมันออกก่อนโดยใช้ผงเมล็ดมันแกว 30 กรัม เท่า ๆ กันในแต่ละตัวทำละลายโดย ทำการสกัดไขมันออกโดย petroleum ether จำนวน 150 ม.ล. ด้วย Soxhlet apparatus นาน 14 ชั่วโมง นำ thimble ซึ่งบรรจุผงเมล็ดมันแกวมาทำให้แห้งก่อน สกัดต่อด้วย

1.3.1 Chloroform (boiling point 61°C)

ใช้ chloroform จำนวน 150 ม.ล. นาน 14 ชั่วโมง รินส่วนสกัดที่ได้มาทำให้มีปริมาณ 150 ม.ล. นำมาแบ่งใส่ในหลอดแก้ว หลอดละ 10 ม.ล. ทำให้แห้งช้า ๆ ในอุณหภูมิห้อง และนำมาอบในตู้อบสูญญากาศ เก็บไว้ให้สัตว์ทดลอง

จากการสกัดได้ crude extract ประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์

1.3.2 Methyl alcohol (boiling point 64.6°C)

ใช้ methyl alcohol จำนวน 150 ม.ล. นาน 14 ชั่วโมง รินส่วนสกัดที่ได้มาทำให้มีปริมาณ 150 ม.ล. นำมาแบ่งใส่หลอดแก้ว หลอดละ 10 ม.ล. ทำให้แห้งช้า ๆ ในอุณหภูมิห้อง และนำมาอบให้แห้งในตู้สูญญากาศ เก็บไว้ให้สัตว์ทดลอง

จากการสกัดได้ crude extract ประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์

1.3.3 Ethyl alcohol (boiling point 78°C)

ใช้ ethyl alcohol จำนวน 150 ม.ล. นาน 14 ชั่วโมง รินส่วนสกัดที่ได้มาทำให้มีปริมาณ 150 ม.ล. นำมาแบ่งใส่หลอดแก้ว หลอดละ 10 ม.ล. ทำให้แห้งช้า ๆ ในอุณหภูมิห้อง และนำมาอบให้แห้งในตู้อบสูญญากาศ เก็บไว้ให้สัตว์ทดลอง

จากการสกัดได้ crude extract ประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์

1.3.4 Methylene chloride (Dichloromethane) (boiling point 39° - 40° C)

ใช้ methylene chloride จำนวน 150 ม.ล. นาน 14 ชั่วโมง รินส่วนสกัดที่ได้มาทำให้มีปริมาณ 150 ม.ล. นำมาแบ่งใส่ในหลอดแก้ว หลอดละ 10 ม.ล. ทำให้แห้งในอุณหภูมิห้องและนำมาอบให้แห้งในตู้อบสูญญากาศ เก็บไว้ให้สัตว์ทดลอง

จากการสกัดได้ crude extract ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

1.3.5 Acetone (boiling point 56.1°C)

ใช้ acetone จำนวน 150 ม.ล. นาน 14 ชั่วโมง รินส่วนสกัดมาทำให้มีปริมาณ 150 ม.ล. และนำมาแบ่งใส่ในหลอดแก้ว หลอดละ 10 ม.ล. นำมาทำให้แห้งในอุณหภูมิห้องและนำมาอบให้แห้งในตู้สูญญากาศ เก็บไว้ให้สัตว์ทดลอง

จากการสกัดได้ crude extract ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์

2. นำสิ่งสกัดที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ กัน มาทดลองกับสัตว์ทดลอง (หนูขาวและปลาทอง

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัด ซึ่งได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ กัน กับสัตว์ทดลอง สิ่งสกัดที่ได้ส่วนใหญ่ไม่ละลายในน้ำ ก่อนการที่จะนำมาให้สัตว์ทดลอง ใช้สิ่งสกัดจำนวน 10 ม.ล. แขวนตะกอนในน้ำ 2 ม.ล.

2.1 นำสิ่งสกัดที่ได้จากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ มาทดลองกับหนูขาว การทดลองใช้หนูขาวน้ำหนักระหว่าง 200 – 350 กรัม การให้สิ่งสกัดกับหนูขาว คิดเทียบให้ในปริมาณที่เท่า ๆ กัน โดยให้ด้วย stomach needle tube

2.1.1 ทดสอบสิ่งสกัดที่ใช้น้ำสกัด (ก) ให้กับหนูจำนวน3 ตัว โดยคิดเทียบให้ในขนาด 1, 2, 3 เมล็ด หรือเท่ากับ 2.0, 2.8, และ 3.0 ม.ล.

2.1.2 ทดสอบสิ่งสกัดที่ใช้น้ำสกัด (ข) ให้กับหนู โดยเตรียมสกัดจากผงเมล็ดมันแกวหนัก 7.5 กรัม ใช้น้ำ 50 ม.ล. แบ่งให้หนูในขนาด 3.0 ม.ล., 4.0 ม.ล., 5.0 ม.ล. 6.0 ม.ล. และ 7.0 ม.ล. ตามลำดับ

2.1.3 นำสิ่งสกัดที่ใช้สกัดโดยตรงด้วย petroleum ether,ethyl acetate และ ether กับหนูโดยให้ในขนาด 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 ม.ล. (1 ม.ล. ของน้ำมัน ได้จากเมล็ดมันแกว 3 กรัม)

2.1.4 นำสิ่งสกัดที่ใช้ chloroform เป็นตัวทำละลาย หลังการสกัดไขมันออกแล้ว กับหนูขาว จำนวน 10 ม.ล.

2.1.5 นำสิ่งสกัดที่ใช้ methyl alcohol เป็นตัวทำละลาย หลังการสกัดไขมันออกแล้วกับหนูขาว จำนวน 10 ม.ล.

2.1.6 ทดสอบสิ่งสกัดที่ใช้ ethyl alcohol เป็นตัวทำละลาย หลังการสกัดไขมันออกแล้วกับหนูขาว จำนวน 10 ม.ล.

2.1.7 นำสิ่งสกัดที่ใช้ methylene chloride เป็นตัวทำละลาย หลังการสกัดไขมันออกแล้วกับหนูขาว จำนวน 10 ม.ล.

2.1.8 นำสิ่งสกัดที่ใช้ acetone เป็นตัวทำละลาย หลังการสกัดไขมันออกแล้วกับหนูขาว จำนวน 10 ม.ล.

2.2 การทดสอบสิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ กับปลาทอง การทดลองใช้ปลาทองมีอายุ ระหว่าง 3 – 4 เดือน

โดยใช้สิ่งสกัด แขวนตะกอนในน้ำยสมผงในอ่างปลา ใช้สิ่งสกัดที่ได้จำนวน 2 ม.ล. ในน้ำ 1000 ม.ล.

2.2.1 การทดสอบสิ่งสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจำนวน 2 ม.ล. (ผงเมล็ดมันแกว 7.5 กรัม ใช้น้ำ 50 ม.ล.) กับปลาทอง

2.2.2 การทดสอบสิ่งสกัดที่ใช้ petroleum, ethyl acetate, ether เป็นตัวทำละลาย จำนวน 2 ม.ล. กับปลาทอง

2.2.3 การทดสอบสิ่งสกัดที่ใช้ chloroform เป็นตัวทำละลาย ภายหลังการสกัดไขมันออก จำนวน 2 ม.ล. กับปลาทอง

2.2.4 การทดสอบสิ่งสกัดที่ใช้ methyl alcohol เป็นตัวทำละลาย ภายหลังการสกัดไขมันออก จำนวน 2 ม.ล. กับปลาทอง

2.2.5 การทดสอบสิ่งสกัดที่ใช้ ethyl alcohol เป็นตัวทำละลาย ภายหลังการสกัดไขมันออก จำนวน 2 ม.ล.กับปลาทอง

2.2.6 การทดสอบสิ่งสกัดที่ใช้ methylene chloride เป็นตัวทำละลาย ภายหลังการสกัดเอาไขมันออก จำนวน 2 ม.ล.กับปลาทอง

2.2.7 การทดสอบสิ่งสกัดที่ใช้ acetone เป็นตัวทำละลาย ภายหลังการสกัดเอาไขมันออก จำนวน 2 ม.ล. กับปลาทอง

2.3 การทดสอบสิ่งสกัด หลังการสกัดไขมันออกและสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ กับ isolated organ (guinea - pig ileum) เพื่อทดสอบการออกฤทธิ์ของสิ่งสกัดเปรียบเทียบกับ acetylcholine ที่มีต่อ isolated organ[8]

น้ำยาสำหรับแช่ tissue ใส่ใน organ bath ใช้น้ำยา Tyrode จำนวน 5 ม.ล. ให้อิ่มตัวด้วย ออกซิเจน อุณหภูมิ organ bath 36° C เมื่อมีการหดตัวของลำไส้ แล้วบันทึกผลลงใน Multipen-Recorder "Rika - Denki" โดยผ่าน HSE - DC-Measuring bridge การทดลองใช้ acetylcholine 1 : 1000 0.2 ม.ล. กับ tissue บันทึกการหดตัวของ ileum ล้างออกให้ระยะพัก 3 นาที ให้สิ่งสกัด 0.1 ม.ล. บันทึกการหดตัวของ ileum ล้างออกให้ระยะพัก 3 นาที เช่นเดียวกันต่อไปให้ acetylcholine ในขนาดเท่าเดิม เพื่อดูผลของ acetylcholine ที่ให้ตามหลังสิ่งสกัดในขนาดเท่าเดิม

ในการทดลองได้ใช้สิ่งสกัดที่ทำการสกัดเอาไขมันออกและสกัดต่อโดย ใช้การสกัดด้วย chloroform ด้วย methyl alcohol, ด้วย ethyl alcohol, ด้วย methylene chloride และด้วย acetone ในขนาดเท่า ๆ กัน 0.1 ม.ล. ให้กับ tissue บันทึกการหดตัวที่เกิดขึ้นพร้อมกับเปรียบเทียบกับ acetylcholine

3. <u>ทดสอบคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสิ่งสกัด ที่สกัดเอาไขมันออก</u>

3.1 การทดสอบ saponins[4]

3.1.1 General properties

นำสิ่งสกัดที่ได้หลังจากการสกัดเอาไขมันออก และสกัดด้วย chloroform ด้วย methyl alcohol, ด้วย ethyl alcohol ด้วย methylene chloride และ

ด้วย acetone นำแต่ละสิ่งสกัดมาแยกใส่หลอดแก้ว เติมน้ำลงในหลอดแก้วที่มีสิ่งสกัดอยู่ เขย่าดูผลที่ปรากฏขึ้น

3.1.2 Hemolysis properties

นำสิ่งสกัดที่ได้หลังจากการสกัดไขมันออก และสกัดด้วย chloroform, ด้วย methyl alcohol, ด้วย ethyl alcohol, ด้วย methylene chloride และด้วย acetone นำแต่ละสิ่งสกัดมาทำเป็นน้ำยาแขวนตะกอนในน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาเติมลงในหลอดแก้วซึ่งใส่ washed red cells ซึ่งผสมในน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ดูการเปลี่ยนแปลงหลังตั้งชั่วโมง

3.1.3 Emulsifying properties

นำสิ่งสกัดที่ได้หลังจากการสกัดไขมันออก และสกัดด้วย chloroform, ด้วย methyl alcohol, ด้วย ethyl alcohol, ด้วย methylene chloride และด้วย acetone มาแขวนตะกอนในน้ำกลั่นแล้วเติมน้ำมันมะพร้าวในอัตราส่วน 1:2 สังเกตผลเมื่อเขย่า

006086

3.3 การทดสอบ alkaloids[4]

นำสิ่งสกัดที่ได้หลังจากการสกัดไขมันออกและสกัดด้วย chloroform, ด้วย methyl alcohol, ด้วย ethyl alcohol, ด้วย methylene chloride และด้วย acetone โดยใช้ alkaloid precipitating reagent คือ Mayer's reagent

3.3 การทดสอบสิ่งสกัดด้วย Thin-layer Chromatography (TLC.)

ใช้วิธีทดสอบสิ่งสกัดจากเมล็ดมันแกวด้วย TLC. เพื่อเป็นแนวทางในการบ่งคุณสมบัติและปริมาณของสารในสิ่งสกัดควบคู่ไปกับการสกัดทุกขั้นตอน

3.3.1 การทดสอบสิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดด้วย petroleum ether, ด้วย ethyl acetate และด้วย ether เนื่องจากสิ่งสกัดมีลักษณะเป็นน้ำมัน จึงได้ทำการทดสอบหาส่วนของ triglycerides ที่มีในเมล็ดมันแกว เปรียบเทียบกับน้ำมันที่ได้จาก seed oil (olive oil)

i 18064887

Coating plate : Silica gel G

Solvent : Petroleum ether - ether - acetic acid

70 + 30 + 2

เวลา : 35 นาที

Indicator : Charring with chrommic sulphuric acid solution[10] (saturated potassium dichromate in concentrated sulphuric acid)

3.3.2 ทดสอบสิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดด้วย chloroform, ด้วย methyl alcohol, ด้วย ethyl alcohol, ด้วย methylene chloride และด้วย acetone เนื่องจากสิ่งสกัดมีลักษณะคล้าย resin จึงพิจารณาเลือกใช้การทดสอบในแบบ terpene บน TLC.[11]

Coating plate : Silica gel G

Solvents : Benzene - methanol

95 + 5

เวลา : 40 นาที

Indicator spray : 10% antimony trichloride in chloroform[10]

heat 110° เซลเซียส นาน 10 นาที

ทดสอบ chromatogram ที่ได้ภายใต้ ultraviolet light

3.3.3 การทดสอบสิ่งสกัดจากตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ นำมาเปรียบเทียบกับ rotenone เนื่องจากในการให้สิ่งสกัดในปลาพบอาการเฉื่อยปรากฏขึ้นคล้ายกับอาการที่เมื่อได้รับ rotenone ที่ให้กับปลา การทดสอบนี้ใช้วิธี TLC. เช่นเดียวกับ 3.3.2 โดย mixture ของสิ่งสกัดทำ TLC. เทียบกับ pure rotenone เพื่อดู zone ที่ปรากฏขึ้น

3.4 ทดสอบสิ่งสกัดด้วย ultraviolet absorption spectrophotometer ละลายสิ่งสกัดที่ได้จาก chloroform, จาก methyl alcohol, จาก ethyl alcohol, จาก methylene chloride, และจาก acetone จำนวน 0.1 - 1.0 ม.ก. ละลายใน alcohol 100 ม.ล. เพื่อดู absorption peak ของสิ่งสกัดในช่วงรังสี ultraviolet 200 - 340 nm