

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย



๑. รายการสมุนไพรรและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

๑.๑ สมุนไพรรและยาที่ใช้ทดลอง

- ๑.๑.๑ ช้ดมอญ (Sida rhombifolia Linn) ช้จากร้านเด็กจ้ไอสด
- ๑.๑.๒ หญ้าพันงูขาว (Achyranthes aspera Linn) ช้จากร้านเด็กจ้ไอสด
- ๑.๑.๓ เทียนค้ (Nigella sativa Linn.) ช้จากร้านเด็กจ้ไอสด
- ๑.๑.๔ ผ้ยขาว (Gossypium hirsutum var. punctatum Hutch.)
(เก็บจากคณะเภลัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- ๑.๑.๕ ตะไคร้หอม (Cymbopogon nardus Rendle) เก็บจากจังหวัดสระบุรี
- ๑.๑.๖ Oxytocin (Syntocinon), Sandoz.
- ๑.๑.๗ Diethylstilboestrol, (Sigma Chemical Company)
- ๑.๑.๘ Anesthetic Ether, (May and Baker Ltd.)
- ๑.๑.๘ Sodium Chloride, (May and Baker Ltd.)
- ๑.๑.๑๐ Potassium Chloride, (May and Baker Ltd.)
- ๑.๑.๑๑ Calcium Chloride, anhydrous, analytic reagent,
(Mallinekrodt Chemical Works).
- ๑.๑.๑๒ Sodium Bicarbonate, (May and Baker Ltd.)
- ๑.๑.๑๓ Dextrose, (May and Baker Ltd.)
- ๑.๑.๑๔ 70% Ethyl Alcohol ช้เตรียมจาก 95% Ethyl Alcohol,
(องค์การเภลัชกรรม)

- ๑.๑.๑๔ Chloroform, (Hopkin & Williams)
- ๑.๑.๑๖ Dragendorff's reagent.
- ๑.๑.๑๗ Wagner's reagent.
- ๑.๑.๑๘ Kraut's reagent.
- ๑.๑.๑๙ Marme's reagent.
- ๑.๑.๒๐ Mayer's reagent.
- ๑.๑.๒๑ Valser's reagent.
- ๑.๑.๒๒ Hager's reagent.
- ๑.๑.๒๓ Dragendorff's spray reagent.



๑.๒ เครื่องมือที่ใช้ทดลอง

- ๑.๒.๑ Flame Photometer ของ Coleman, Model 51 and 51 Ca.
- ๑.๒.๒ pH meter ของ Chemtrix, Type 40.
- ๑.๒.๓ Isolated Organ Bath, Scientific & Research Instruments Ltd.
- ๑.๒.๔ Electric Kymograph, Scientific & Research Instruments Ltd.
- ๑.๒.๕ Churchill pump, Churchill Instrument Co. Ltd.
- ๑.๒.๖ Microscope, Olympus.
- ๑.๒.๗ Hot Air Oven, Termaks.
- ๑.๒.๘ Eppendorf pipette ขนาด 50 μ l, 100 μ l, 200 μ l.
- ๑.๒.๙ Filter paper, Whatman No. 1.

๒. วิธีทำการวิจัย

๒.๑ วิธีการเลือกสมุนไพรที่จะนำมาวิจัย

รวบรวมรายชื่อสมุนไพรที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรีย จากตำราแพทย์แผนโบราณของไทยและวารสารทางวิทยาศาสตร์ทั้งของไทยและต่างประเทศได้รายชื่อสมุนไพรมากมาย เลือกสมุนไพรที่นิยมใช้กันมาก หาง่าย และมีปลูกในประเทศไทยมาทดสอบขึ้นต้นแบบ *in vitro* และคัดเอาเฉพาะสมุนไพรที่มีแนวโน้มว่าอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียไป ได้แก่ ชักมอญ (*Sida rhombifolia* Linn.), ตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* Rendle), ฝ้ายขาว (*Gossypium hirsutum* Linn.), หญ้าพันงูขาว (*Achyranthes aspera* Linn.), และ เทียนดำ (*Nigella sativa* Linn.) (รูปที่ ๑-๔) สำหรับส่วนที่นำมาใช้ วงศ์ และสรรพคุณที่เชื่อถือสรุปไว้ในตารางที่ ๑

๒.๒ วิธีสกัดสมุนไพร

๒.๒.๑ วิธีสกัดด้วยน้ำ (Aqueous extract)

ซึ่งสมุนไพรซึ่งหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตากแห้ง ๑๐๐ กรัม เติมน้ำ ๔๐๐ มล. นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา ๑๕ นาที กรองผ่านสำลีและกระดาษกรอง (Whatman, No.1) จนได้น้ำยาใส นำน้ำยาสกัดที่ได้มาระเหยบน *water bath* เพื่อให้เหลือปริมาตร ๑๐๐ มล. เก็บน้ำยาสกัดในขวดแก้วปิดจุกสนิทที่ 4°C และใช้ภายใน ๗๒ ชม.

๒.๒.๒ วิธีสกัดด้วยแอลกอฮอล์ (Alcohol extract)

นำสมุนไพรซึ่งหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ มาอบด้วย Hot Air Oven (termaks) อุณหภูมิไม่เกิน 60°C นานไม่เกิน ๒ ชม. แล้วนำมาบดเป็นผงละเอียด ซึ่งผงยาสมุนไพรที่บดแล้วมา ๑๐๐ กรัม หมักใน 70% Ethanol (๔๔) ๔๐๐ มล. เป็น

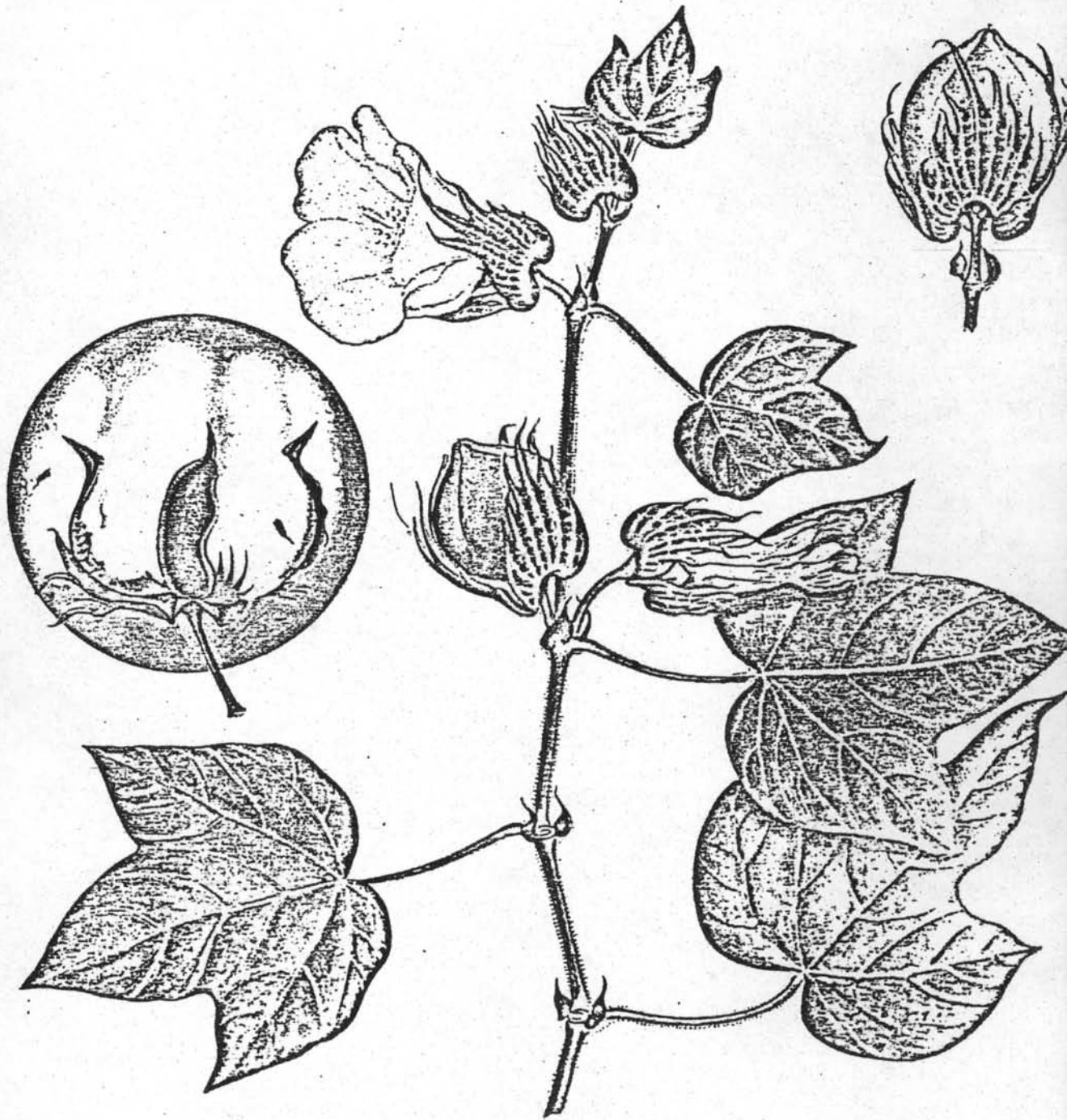


ပုံ ၁ စုံတော့ *Sida rhombifolia* Linn., Malvaceae

A, Upper part with flowers and fruits.
Flowers pale orange.

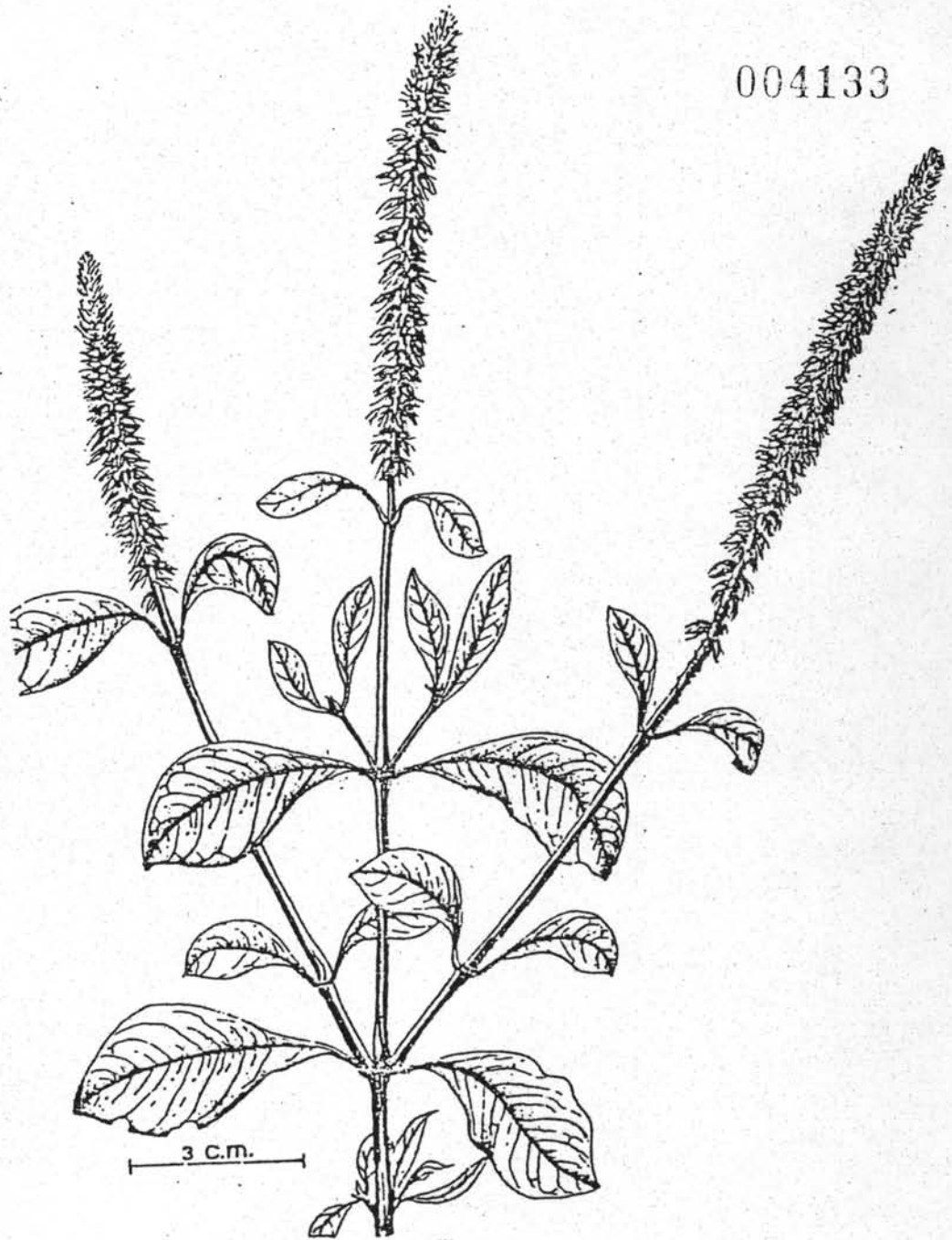


รูปที่ 2 ตะไคร้หอม *Cymbopogon nardus* Rendle Gramineae



รูปที่ 3 ฝ้ายขาว *Gossypium hirsutum* var. *punctatum* (Schum.) Hutch. Malvaceae.

004133

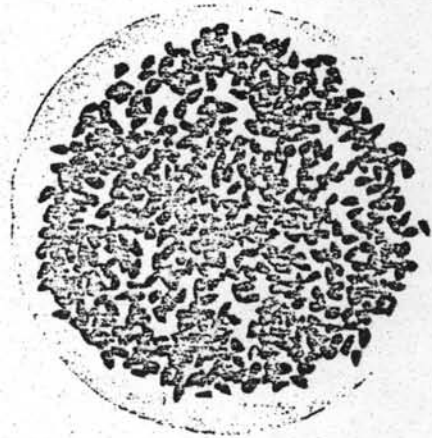


รูปที่ 4 หญ้าพันงูขาว *Achyranthes aspera* Linn.,

Amaranthaceae



NIGELLA SATIVA—FLOWERING BRANCH & FRUIT



NIGELLA SATIVA—SEEDS

รูปที่ 5 เทียนดำ *Nigella sativa* Linn., Ranunculaceae

ตารางที่ ๑. รวบรวมชื่อและส่วนของสมุนไพรที่นำมาศึกษาวิจัย

ชื่อไทย	ชื่ออังกฤษ	ชื่อทางวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้	สรรพคุณ	เอกสารอ้างอิง
ขี้เหล็ก	yellow-Barleria, Common Sida, Canary Island	<i>Sida rhombifolia</i> Linn.	Malvaceae	ทั้งต้น	ทำให้ระดูมาปกติ ไข่ขับ เสียด, รก และทำให้แก้ม แก่ปากมดลูก	๘, ๙, ๑๐, ๑๑, ๑๒, ๑๔, ๑๕, ๔๔, ๔๕, ๔๖
ตะไคร้หอม	citronella grass citronelle, ginger grass	<i>Cymbopogon nardus</i> Pandle	Gramineae	ทั้งต้น	ไข่ขับระดู สตรีมีครรภ์ รับประทานทำให้แท้ง	๘, ๑๑, ๑๓, ๑๕, ๑๕, ๑๗, ๑๘, ๔๔, ๔๕, ๔๖
ฝ้ายขาว	cotton, cotton root bark	<i>Gossypium hirsutum</i> var. (Schum.) Hutch.	Malvaceae	เปลือกกราก	ขับโลหิตระดู ทำให้มดลูก บีบตัวอย่างแรงทำให้แท้ง ไข่ขับน้ำควาปลา	๘, ๙, ๑๕, ๑๖, ๑๗, ๑๘, ๒๐, ๒๑, ๒๓, ๒๔, ๒๗, ๒๘
หญ้าหนักราช	prickly-chaff flowers	<i>Achyranthes aspera</i> Linn.	Amaranthaceae	ทั้งต้น	ขับระดู ช่วยในการคลอด บุตร และขับรกเมื่อรกค้าง ไข่ทำแท้ง	๘, ๙, ๑๑, ๑๒, ๑๕, ๑๖, ๑๘, ๒๕, ๒๖, ๓๖, ๓๗, ๓๘, ๓๙, ๔๐, ๔๔, ๔๕, ๔๖, ๔๗
เทียนดำ	black cummin, black caraway, small fennel	<i>Nigella sativa</i> Linn.	Ranunculaceae	เมล็ด	เพิ่ม menstrual flow ขับระดู ทำให้แท้งและเพิ่ม การหลั่งของน้ำนม	๒, ๖, ๘, ๑๐, ๑๑, ๑๓ ๑๖, ๑๗, ๑๘, ๒๒, ๒๓ ๒๖, ๒๘, ๔๑, ๔๒, ๔๕, ๔๕, ๔๖

เวลา ๓ วัน กรองผ่านสำลีและกระดาษกรอง (Whatman, No.1) จนได้น้ำยาใส แล้วจึงนำน้ำยาสกัดที่ได้มาทำให้ระเหยบน water bath จะกระทั่งเหลือน้ำยาสกัดประมาณ ๑๐๐ มล. ปรับปริมาตรเป็น ๑๐๐ มล. ด้วย 70% ethanol เก็บน้ำยาสกัดในขวดแก้วปิดจุกสนิทที่ 4°C

เมื่อจะนำไปใช้ทดลอง ต้องนำ alcohol extract นี้ไประเหยบน water bath จนข้นเหนียว (syropy liquid) เพื่อกำจัด alcohol และนำมา resuspend ด้วยน้ำกลั่น ๑๐๐ มล. (๓๓) กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman, No.1) เอาเฉพาะส่วนที่ละลายน้ำมาทดลองใน in vitro ส่วนการทดลองแบบ in vivo นั้น จะใช้น้ำยาที่ resuspend ด้วยน้ำกลั่นมาบดให้สัตว์ทดลองโดยตรง (ไม่ต้องกรอง)

๒.๓ การตรวจหา pH และปริมาณของ Na^+ , K^+ , Ca^{++} และตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อหา alkaloids ในน้ำยาสกัดสมุนไพร

๒.๓.๑ นำน้ำยาสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดมาวัด pH ด้วย pH meter (Chemtrix, Type 40) และนำไปตรวจหาปริมาณของ Na^+ , K^+ และ Ca^{++} ด้วย Flame Photometer (Coleman, Model 51 and 51 Ca) น้ำยาสกัดแต่ละชนิดจะวัด ๓ ครั้ง (triplicate) และหาค่าเฉลี่ยสำหรับสมุนไพรที่สกัดด้วยอัลกอฮอล์จะใช้น้ำยาสกัดที่ resuspend ด้วยน้ำกลั่น และกรองใสแล้วมาวัด pH และปริมาณของ electrolytes ต่าง ๆ

การเตรียม simulated electrolytes solution ละลาย NaCl, KCl และ CaCl_2 โดยให้มี Na^+ , K^+ และ Ca^{++} ตามปริมาณที่วัดได้ในน้ำยาสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด เพื่อนำไปใช้ทดลองควบคุมกับน้ำยาสกัดสมุนไพรต่าง ๆ

(๔๔, ๔๐)

๒๓.๒ นำน้ำยาสกัดสมุนไพรที่จะใช้ทดลองมาตรวจหา alkaloids โดยนำน้ำยาสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยอัลกอฮอล์มา ๑๐ มล. (มีปริมาณผงยา ประมาณ ๑๐ กรัม) มาระเหยบน water bath จนได้น้ำยาข้นเหนียว (syrupy liquid) เติมน้ำยา ๔% H_2SO_4 ประมาณ ๑๐ มล. เพื่อละลายตะกอนซึ่งอาจมี alkaloids อยู่ด้วยถ่ายใส่ separatory funnel แล้วสกัด pigment และ resin ออกด้วย chloroform ประมาณ ๒๐ มล. เขย่าเบา ๆ และไขเอาชั้น chloroform ทิ้งไป ทำน้ำยาที่เหลือให้เป็นค่า่งโดยเติมน้ำยา conc. NH_4OH จนได้น้ำยาที่มี pH $\approx 9-10$ และสกัดด้วย chloroform ๒๐ มล. อีกครั้งหนึ่ง แยกเอาส่วนของ chloroform ไประเหยบน water bath จนเกือบแห้ง (เหลือประมาณ ๑ มล.) และหยคน้ำยาสกัด chloroform นี้ลงบนกระดาษกรอง ทิ้งไว้ให้แห้งและพ่น Dragendorff's reagent ทับลงไป ถ้าปรากฏมีสีส้มตรงบริเวณที่หยคน้ำยาสกัดไว้แสดงว่ามี alkaloids อยู่ในน้ำยาสกัดนั้น ๆ ส่วนน้ำยาสกัด chloroform ที่เหลือนำไประเหยบน water bath ค่อยไปจนแห้งและทำให้ละลายใหม่ด้วยน้ำยา ๔% H_2SO_4 ประมาณ ๒ มล. เพื่อจะนำไปทดสอบกับ reagent อื่น ๆ คือ Dragendorff's, Wagner's, Kraut's, Marme's, Mayer's, Valser's, Hager's โดยหยคน้ำยาสกัดที่ได้ลงบนแผ่นกระดาษใส และหยด reagent แต่ละชนิดผสมลงไปตามมีตะกอนเกิดขึ้นแสดงว่ามี alkaloids อยู่ในน้ำยาสกัดนั้น ๆ

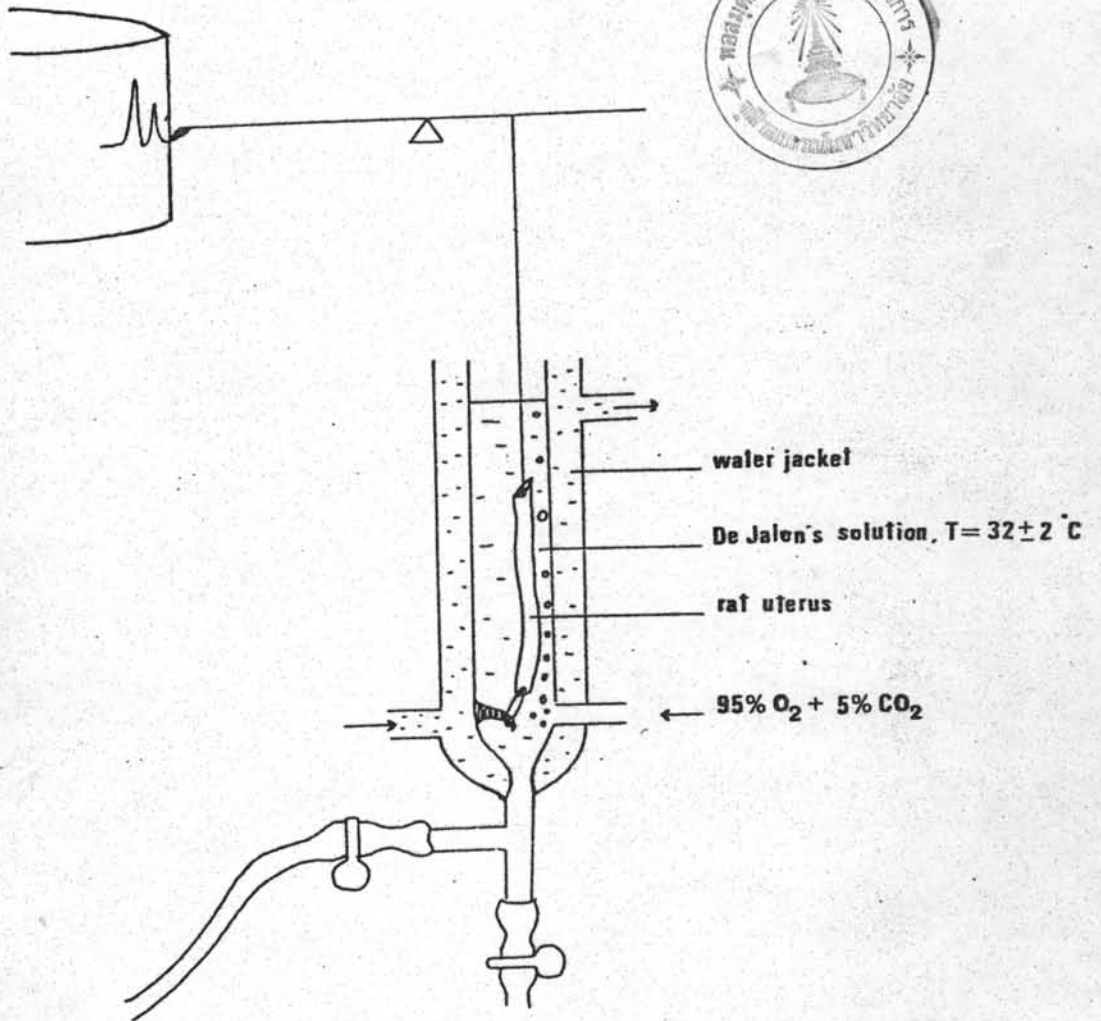
๒.๔ ศึกษาผลของน้ำยาสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดต่อการบีบตัวของมดลูกหนูขาวที่แยกออกจากตัว (isolated rat uterus)

ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Holton (๔๑) โดยใช้หนูขาวน้ำหนัก

๑๕๐-๒๐๐ กรัม ฉีดยา Diethylstilboestrol ในขนาด ๑ มก./กิโลกรัม น้ำหนักตัว^(๕๒) เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ๒๔ ชม. ก่อนทำการทดลอง เพื่อกระตุ้นให้มดลูกอยู่ในระยะ estrus ซึ่งจะมีความไว (sensitivity) ต่อ oxytocin ดีที่สุด^(๕๓-๕๕) ข่าหนูโดยวิธีหักคอ (dislocation) และตัดเอาเฉพาะส่วนมดลูกมาแขวนใน isolated organ bath (ขนาดจ ๑๐ มล.) ซึ่งมีน้ำยา De Jalon (ภาคผนวกที่ ๑) ที่ควบคุมอุณหภูมิ $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ และมีออกซิเจน ๕% และคาร์บอนไดออกไซด์ ๕% ผ่านตลอดเวลา และต่อเข้ากับ lever ซึ่งจัดให้มีความตึงประมาณ ๐.๕ กรัมและมี magnification ๔-๖ เท่า บันทึกการบีบตัวของมดลูกด้วย Electric Kymograph (รูปที่ ๖) ปล่อยให้มดลูกเคยชินกับสภาวะแวดล้อมใหม่ (equilibrate) ประมาณ ๔๕ นาที จึงเริ่มทำการทดลอง

หา dose ที่เหมาะสมของ oxytocin โดยเริ่มให้ oxytocin (Syntocinon, Sandoz) ในขนาดต่ำ ๆ ก่อน และเพิ่มแบบ log. ratio คือเริ่มจาก 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mU/ml ของน้ำยา oxytocin ที่มีความเข้มข้น 10 mU/ml จนได้ maximal response การให้ oxytocin จะให้ทุก ๆ ๓ นาที (Three minutes cycle) เลือก dose ของ oxytocin ที่ทำให้มดลูกบีบตัวได้ 50-80% ของ maximal contraction มาใช้ทดลองกับน้ำยาสัทสมุนไพรร่างต่าง ๆ ต่อไป แต่ก่อนที่จะนำน้ำยาสมุนไพรมาทดลองทุกครั้งจะต้องแสดงให้เห็นว่า ขนาดของ oxytocin ที่เลือกไว้ทำให้มดลูกบีบตัวได้เท่า ๆ กัน หรือต่างกันไม่เกิน $\pm 5\%$ ของแรงบีบตัวนั้น ๆ อย่างน้อย ๒-๓ ครั้ง จึงนำมาศึกษาถึงผลของสมุนไพรรู้ oxytocin response

๒.๔.๑ ศึกษาผลของน้ำยาสัทสมุนไพรรู้ต่อการบีบตัวของมดลูกหนูขาวโดยตรง และผลของน้ำยาสัทสมุนไพรรู้ต่อการออกฤทธิ์ของ oxytocin ที่มดลูกหนูขาว



รูปที่ ๖ แสดงวิธีการแขวนมดลูกหนูขาวใน isolated organ bath

ให้น้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิด ซึ่งมีความเข้มข้นแตกต่างกัน
 ดังแสดงในตารางที่ ๒ สัมผัสกับมดลูกหนูขาวนาน ๑ นาที ก่อนให้ oxytocin
 ในขนาดที่เลือกไว้ บันทึกผลการบีบตัวของมดลูก เมื่อได้ maximal contrac-
 tion แล้วจึงล้างออกทันทีและเพิ่มขนาดของน้ำยาสกัดสมุนไพรรังละเท่าตัว
 โดยเริ่มตั้งแต่ ๐.๑-๓.๒ มล. การทดลองวิธีนี้จะทำให้ทราบผลโดยตรง
 ของน้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดต่อมดลูกหนูขาว พร้อมไปกับผลของน้ำยาสกัดสมุนไพรมะ
 ละชิดต่อการออกฤทธิ์ของ oxytocin เมื่อให้น้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดแล้วจึงทดลอง
 ให้ simulated electrolytes solution ของน้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดชนิด
 นั้น ๆ ตามขนาดและวิธีเดียวกับที่ให้น้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดนั้น ๆ เพื่อเปรียบ
 เทียบผลกับน้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดนั้น ๆ

๒.๔.๒ ศึกษาผลของน้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดต่อการบีบตัวของมดลูกหนูขาวในขณะที่มี
 oxytocin อยู่ด้วย

ให้ submaximal dose ของ oxytocin นาน ๑ นาที ก่อน
 แล้วจึงให้น้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดตามหลัง บันทึกผลการบีบตัวของมดลูก ล้างและเพิ่ม
 ขนาดของน้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดในทำนองเดียวกับ ๒.๔.๑ เพื่อศึกษาผลของ
 สมุนไพรมะละชิดต่อการบีบตัวของมดลูกขณะที่มี oxytocin กระตุ้นอยู่ก่อนแล้ว ในทำ
 นองเดียวกันให้ simulated electrolytes solution ของสมุนไพรมะละชิด
 แต่ละชนิดตามขนาดและความเข้มข้นของน้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดที่ใช้เพื่อเปรียบ
 เทียบผลกับน้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิด

๒.๔ ศึกษาผลของน้ำยาสกัดสมุนไพรมะละชิดต่อการตั้งครรภ์และระยะเวลาในการตั้งครรภ์ของหนูขาว

ใช้หนูขาวตัวเมียที่พิสูจน์แล้วว่าไม่เป็นหมัน น้ำหนักระหว่าง ๑๕๐-๒๐๐ กรัม
 จับให้ผสมกับหนูขาวตัวผู้ที่ไม่เป็นหมันทำ vaginal smear และส่องดูด้วยกล้อง

microscope (Olympus) ทุกเช้า เพื่อตรวจดู stage of estrus และ sperm วันแรกที่ตรวจพบ sperm ใน vagina นับเป็นวันแรกของการตั้งครรภ์ (D₁) ป้อนน้ำยาสกัดสมุนไพรมะเขือเทศให้แก่หนูขาว จนถึงวันที่ ๔ ของการตั้งครรภ์ โดยให้สมุนไพรมะเขือเทศในขนาด ๑-๒ กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (เท่ากับ ๑-๒ มล. ของน้ำยาสกัด 1:5 หรือ 1:10 น้ำหนัก/ปริมาตร) ในขณะที่เดียวกันป้อนน้ำ ๒ มล. แก่หนูขาวในกลุ่ม control ตั้งแต่วันที่ ๑-๔ ของการตั้งครรภ์ควบคู่ไปด้วย สำหรับจำนวนหนูขาวที่ใช้ทดลองในแต่ละกลุ่มบอกไว้ในตารางที่ ๔

เมื่อหนูขาวตั้งครรภ์ครบ ๑๐ วัน จึงนำมาทำให้สลบด้วย anaesthetic ether (May & Baker) เปิดหน้าท้องและนับจำนวนที่ตัวอ่อนในมดลูกแต่ละข้าง (๕๖) บันทึกผลไว้ เย็บปิดหน้าท้อง ปล่อยให้ recover และเลี้ยงจนครบกำหนดคลอด นับระยะเวลาการตั้งครรภ์และจำนวนลูกที่คลอดออกมาทั้งรอดและตาย บันทึกผลไว้