วัสดุและวิธีการวิจัย

ใบราตรี (Cestrum nocturnum Linn. ; วงศ์ Solanaceae)

ใบราตรีที่ใช้ในการวิจัยนี้เก็บได้จากต้นเดียวกันตลอดการทดลอง ใบราตรีที่ใช้เป็นใบที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป เก็บระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงพฤษภาคม นำมาล้างให้สะอาด ตากในที่ร่มจนแห้งประมาณ 3 วัน บดให้ละเอียด เก็บในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้องพร้อมที่จะใช้ทำการวิจัย ส่วนตัวอย่างของกิ่ง ใบ และดอก ได้นำไปทำเป็น Herbarium เพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานต่อไป.

การเตรียมน้ำสกัดใบราตรี

น้ำสกัดใบราตรีที่ใช้ เตรียมโดยวิธีการหมัก (marceration) ซึ่งดัดแปลงมาจากการเตรียมน้ำสกัดสมุนไพรตามวิธีของ วิบูลย์ และ อัมพวัน (2521) ดังมีรายละเอียดดังนี้.

การสกัดโดยใช้น้ำ : ชั่งผงใบราตรีหนัก 10 กรัม เทลงใน flask เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเขย่าให้เข้ากัน หมักทิ้งไว้ 1 คืน กรองผ่านผ้าก๊อส นำน้ำสกัดที่ได้ไปปั่นเพื่อแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่อง centrifuge Model CL (International Equipment Co., Needham HTS., Mass., U.S.A.) ซึ่งใช้ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ปั่นเป็นเวลานาน 30 นาที จะได้น้ำสกัดซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลแก่ วัด pH ได้ประมาณ 6.8.

การสกัดโดยใช้น้ำร้อน : ชั่งผงใบราตรีหนัก 10 กรัม เทลงใน flask เติมน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียสลงไป 50 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเขย่าให้เข้ากัน หมักทิ้งไว้ 1 คืน กรองผ่านผ้าก๊อส นำน้ำสกัดที่ได้ไปปั่นเพื่อแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่อง centrifuge เช่นเดียวกับการสกัดโดยใช้น้ำ จะได้น้ำสกัดซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีเขียวขี้ม้า วัด pH ได้ประมาณ 6.8 เช่นเดียวกัน.

หมายเหตุ

คำว่า น้ำสกัด ในที่นี้ หมายถึง สารสกัดที่ได้จากใบราตรี โดยใช้น้ำ, น้ำร้อน และ 95% Ethanol.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดโดยใช้ organic solvent : ชั่งผงใบราตรีหนัก 10 กรัม เทลงใน flask เติม 95% Ethanol ลงไป 50 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเขย่าให้เข้ากัน หมักทิ้งไว้ 1 คืน กรองผ่านผ้าก๊อส นำน้ำสกัดที่ได้ไปปั่นเพื่อแยกตะกอนออกโดยใช้เครื่อง centrifuge เช่นเดียวกับการสกัดโดยใช้น้ำ จะได้น้ำสกัดซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีเขียวแก่ วัด pH ได้ประมาณ 7.0.

ในกรณีที่ต้องการน้ำสกัดใบราตรีที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น ให้นำน้ำสกัดที่เตรียมได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยตั้งบนหม้ออังไอน้ำ ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ แล้วเก็บในภาชนะที่สะอาดและมีฝาปิด เก็บไว้ในตู้เย็นพร้อมที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป.

สัตว์ทดลอง

ในการศึกษาการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำสกัดใบราตรี ใช้หนูขาวพันธุ์ Sprauge Dawley เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 160-350 กรัมตลอดการทดลอง.

Isotonic physiological salt solutions

น้ำยา Krebs (Krebs' solution) : เป็น isotonic physiological salt solution ใน 5,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารเคมีดังต่อไปนี้

NaCl	34.5	กรัม
$NaHCO_3$	10.5	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
KCl 10%	17.5	มิลลิลิตร
$MgSO_4.7\ H_2O$ 10%	14.5	มิลลิลิตร
KH_2PO_4 10%	8.0	มิลลิลิตร
$CaCl_2$ (ไม่ล่าร์)	12.6	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การใช้น้ำยา Krebs ซึ่งเหมาะสมสำหรับการทดลองที่ใช้ส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว (Perry, 1970) และต้องเติมออกซิเจนอย่างสม่ำเสมอลงในน้ำยา Krebs ตลอดระยะเวลาการทดลอง นอกจากนี้ให้ควบคุมอุณหภูมิของน้ำยา Krebs ให้คงที่ที่ 30 องศาเซลเซียสโดยใช้ thermoregulator (type 850062, B. Braun, Germany).

น้ำยา Tyrode (Tyrode's solution) : เป็น isotonic physiological salt solution ใน 5,000 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสารเคมีดังต่อไปนี้.

NaCl	40.9	กรัม
$NaHCO_3$	5.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
KCl 10%	10.0	มิลลิลิตร
$MgSO_4,7H_2O$ 10%	13.0	มิลลิลิตร
$NaH_2PO_4,2H_2O$ 5%	6.5	มิลลิลิตร
$CaCl_2$ (โมล่าร์)	9.0	มิลลิลิตร

การเตรียมส่วนของเส้นประสาทไซอะติก-กล้ามเนื้อแกสตรอกนีเมียสในหนูขาว (rat sciatic nerve - gastrocnemius preparation, in situ) เพื่อบันทึกการหดตัว (neurally - evoked twitch) ของกล้ามเนื้อลาย.

วิธีเตรียมส่วนของเส้นประสาทไซอะติก-กล้ามเนื้อแกสตรอกนีเมียสในหนูขาวเพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลายนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Mc.Loed (1970) คือ ทำการสลบหนูขาวโดยฉีด chloralose เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) ในขนาด 100 - 120 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สอด endotracheal tube (polyethylene tube ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 มิลลิเมตร) เข้าในหลอดลมเพื่อให้สัตว์ทดลองหายใจได้สะดวก สอดเส้นเลือดแดงที่ขาขวา (right femeral artery) ด้วย polyethylene tube

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร) ซึ่งบรรจุด้วยน้ำเกลือนอร์มัลให้เต็มสอดเข้าไปจนถึงทางแยก (bifurcation) ของ abdominal aorta เพื่อป้องกันการไหลย้อนกลับของน้ำสกัดใบราตรีหรือยาที่จะฉีดเข้าไปทางเส้นเลือดแดงที่ขา และเพื่อให้น้ำยาที่ใช้ทดสอบออกฤทธิ์ได้ทันทีที่บริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลาย (neuromuscular synapse) ต่อปลายของ polyethylene tubeเข้ากับ Luer-Loke three way stopcock (Beckton,Dickinson & Co., U.S.A.) สำหรับให้น้ำยาที่ต้องการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 2.

เปิดหาเส้นประสาทไซอะติกข้างซ้ายให้ยาวที่สุดเท่าที่จะยาวได้ ผูกเส้นประสาทไซอะติกให้อยู่ใกล้ปลาย proximal มากที่สุดด้วยด้ายสองเส้นให้ห่างกัน 2 มิลลิเมตร ใช้กรรไกรตัดเส้นประสาทส่วนที่อยู่ระหว่างด้ายทั้งสองให้ขาดออกจากกันเพื่อป้องกันการผ่านของกระแสไฟฟ้าจากการกระตุ้นเข้าสู่ประสาทส่วนกลาง ในการแยกเส้นประสาทไซอะติกควรทำให้ชุ่มตลอดระยะเวลาการทดลองด้วย liquid paraffin การวัดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายทำได้โดยกระตุ้นเส้นประสาทไซอะติกด้วย stainless steel bipolar stimulating electrodes ซึ่งต่ออยู่กับ S5 stimulator (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A.) ผูก achilis tendon ข้างซ้ายแล้วต่อเข้ากับ force displacement transducer FT-03C (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A.) บันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลายโดย Grass 79 D polygraph (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A.) การหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่ได้จากการกระตุ้นเส้นประสาทไซอะติกด้วยไฟฟ้านี้ใช้ supramaximal voltage, frequency 0.3 Hz และ duration 0.5 msec การหดตัวของกล้ามเนื้อลายนี้อาจเรียกว่า neurally - evoked twitch ก่อนเริ่มทำการทดลองแต่ละครั้งปรับความตึงตัว (tension) ของ achilis tendon ให้ได้ 2 กรัมทุกครั้ง.

วิธีการเตรียมส่วนของเส้นประสาทไซอะติก-กล้ามเนื้อแกสตรอกนีเมียสในหนูขาวเพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่แสดงไว้ในรูปที่ 2. นั้นเป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาผลของน้ำสกัดใบราตรีต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลายและศึกษาผลของน้ำสกัดนี้ต่อ post-tetanic potentiation (PTP).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการศึกษาผลของน้ำสกัดใบราตรีและยาต่อ PTP นั้นทำได้โดยฉีดน้ำสกัดใบราตรีหรือยาเข้าทางเส้นเลือดแดงที่ขาของหนูขาว หลังจากเกิดการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายร้อยละ 50 แล้วทำการกระตุ้นเส้นประสาทไซอะติกด้วย frequency 20 Hz นาน 10 วินาที หรือการทำให้เกิด repetitive stimulation แล้วเปรียบเทียบการหดตัวของกล้ามเนื้อลายก่อนและหลังการกระตุ้นนี้.

<u>การเตรียมส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว (isolated rat phrenic nerve - hemidiaphragm preparation) เพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย.</u>

<u>การบันทึก neurally - evoked twitch.</u>

วิธีเตรียมส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวเพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลายนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Bülbring (1946) และ Chantaratham (1974) คือ ทำให้หนูเสียชีวิตโดยวิธี decapitation พยายามทำให้เลือดไหลออกจากตัวหนูขาวให้มากที่สุดเพื่อสะดวกในการแยกเส้นประสาทฟรีนิค เปิดช่องอกของหนูขาวแล้วแยกกล้ามเนื้อกระบังลมซ้ายและขวาออกจากตัวหนูขาวแล้วค่อย ๆ แยกเส้นประสาทฟรีนิคออกจากเนื้อเยื่อโดยรอบ ตัดกล้ามเนื้อกระบังลมให้ได้รูปลักษณะคล้ายพัดและมีเส้นประสาทฟรีนิคติดอยู่ จากนั้นรีบนำไปใส่ในภาชนะแก้วที่มีน้ำยา Krebs และออกซิเจน ผูกส่วนยอดของกล้ามเนื้อกระบังลมส่วนตรงกลางฐาน (ซึ่งอยู่ในแนวเดียวกับส่วนยอด) ของกล้ามเนื้อกระบังลมให้ผูกเป็นห่วงสำหรับนำไปคล้องกับ glass rod ใน tissue chamber แก้ว 2 ชั้นซึ่งบรรจุน้ำยา Krebs ในปริมาตร 70 มิลลิลิตร ให้ออกซิเจนอย่างสม่ำเสมอเข้าไปในน้ำยา Krebs และควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 30 องศาเซลเซียสโดยใช้ thermoregulator ทั้งนี้เพื่อให้ได้ส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวไว้ใช้ในการทดลองนานขึ้น (อัมพวัน, 2522) ผูกส่วนยอดของกล้ามเนื้อกระบังลมเข้ากับ force displacement transducer FT-03C (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A.) เพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลม คล้องเส้นประสาทฟรีนิคด้วย stainless steel bipolar stimulating electrodes ซึ่งต่ออยู่กับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

S5 stimulator (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A.) บันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลมที่เกิดจากการกระตุ้นเส้นประสาทฟรีนิคด้วยไฟฟ้าขนาด supra-maximal voltage, frequency 0.4 Hz และ duration 0.6 msec ด้วย Grass 79D polygraph.

ก่อนเริ่มทำการทดลองแต่ละครั้งปรับความตึงตัว (tension) ของกล้ามเนื้อกระบังลมให้ได้ 2 กรัม บันทึกการเปลี่ยนแปลงการหดตัวของกล้ามเนื้อกระบังลมภายหลังให้น้ำสกัดใบราตรีและยาเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวด้วยน้ำยา Krebs 3 ครั้งและพักไว้ 30 นาที ก่อนใช้ในการทดลองครั้งต่อไป.

วิธีเตรียมส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว เพื่อบันทึกการหดตัว (neurally - evoked twitch) ของกล้ามเนื้อลาย แสดงไว้ในรูปที่ 3. วิธีนี้ใช้ในการศึกษาผลของน้ำสกัดใบราตรีต่อการหดตัว (neurally - evoked twitch) ของกล้ามเนื้อลายและศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของน้ำสกัดใบราตรีที่บริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลาย.

<u>การบันทึกการหดตัว (contraction) ของกล้ามเนื้อลายที่เกิดจาก acetylcholine และ succinylcholine.</u>

วิธีเตรียมส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว เพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่เกิดจาก acetylcholine และ succinylcholine นี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ วินูลย์ และ อัมพวัน (2521) วิธีการทำได้เช่นเดียวกับการบันทึก neurally-evoked twitch แต่การบันทึกนี้ใช้ส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวที่เตรียมขึ้นใหม่โดยไม่ได้ให้ยามาก่อน การบันทึกใช้ sensitivity ของ polygraph สูง ๆ ประมาณ 0.05 มิลลิโวลท์ต่อ 1 เซนติเมตร และไม่กระตุ้นเส้นประสาทฟรีนิคด้วยไฟฟ้าเลย ในการทดลองนี้ได้ศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อลายที่เกิดจาก acetylcholine และ succinylcholine ว่ามี interaction กับน้ำสกัดใบราตรีหรือไม่ เพื่อเป็นการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำสกัดใบราตรี.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การบันทึก directly - evoked twitch.

วิธีเตรียมส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวเพื่อบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อลายนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Bülbring (1946) และ Chantaratham (1974) วิธีการทำได้เช่นเดียวกับการบันทึก neurally - evoked twitch แต่การบันทึกนี้ใช้ stainless steel bipolar stimulating electrodesกระตุ้นกล้ามเนื้อกระบังลมโดยตรง การเตรียมนี้ทำได้โดยเกี่ยวปลายหนึ่งของ electrode ที่บริเวณส่วนฐาน (ซึ่งอยู่ในแนวเดียวกับส่วนยอด) ของกล้ามเนื้อกระบังลม อีกปลายหนึ่งของ electrode เสียบเข้ากล้ามเนื้อกระบังลมให้อยู่ในแนวนอนและชิดกับส่วนฐานดังแสดงในรูปที่ 4. ก่อนทำการทดลองแต่ละครั้งทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของบริเวณปลายประสาทและกล้ามเนื้อลายอย่างสมบูรณ์ (complete neuromuscular blockade) โดยให้ pancuronium ในขนาด 0.0050 มิลลิโมล เพื่อป้องกันการหดตัวของกล้ามเนื้อลายซึ่งอาจเป็นผลจากการที่เส้นประสาทฟรีนิคถูกกระตุ้น.

วิธีการเตรียมส่วนของกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวเพื่อบันทึกการหดตัว (directly-evoked twitch) ของกล้ามเนื้อลายซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 4. นั้น ใช้ในการศึกษาการออกฤทธิ์ของน้ำสกัดใบราตรีต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย.

การเตรียมส่วนของเส้นประสาทไซอะติกของหนูขาว (isolated rat sciatic nerve preparation) เพื่อบันทึก nerve action potentials.

การเตรียมส่วนของเส้นประสาทไซอะติกของหนูขาวเพื่อบันทึก nerve action potentials ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Chantaratham (1974) คือ ทำการสลบหนูขาวด้วย pentobarbital sodium ในขนาด 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เปิดหาเส้นประสาทไซอะติกให้ได้ความยาวมากที่สุดเท่าที่จะยาวได้ ผูกปลายทั้งสองของเส้นประสาทไซอะติกด้วยด้ายจากนั้นแยกเส้นประสาทไซอะติกออกจากตัวหนูขาว รีบนำไปใส่ในภาชนะแก้วที่มีน้ำยา Tyrode และออกซิเจน ค่อย ๆ วางเส้นประสาทไซอะติกลงบน stainless steel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

stimulating และ recording electrodes ซึ่งอยู่ใน three - compartment chamber (ส่วนกลาง chamber บรรจุน้ำยา Tyrode หรือน้ำสกัดใบราตรี) โดยให้ส่วน proximal end ของเส้นประสาทไซอะติกวางพาดอยู่บน bipolar stimulating electrodes ซึ่งต่ออยู่กับ S4 stimulator (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A.) และส่วน distal end วางพาดอยู่บน bipolar recording electrodes บันทึก amplitude ของ nerve action potentials ที่เกิดจากการกระตุ้นเส้นประสาทไซอะติกด้วยไฟฟ้าขนาด supramaximal voltage, frequency 0.6 Hz และ duration 0.6 msec ด้วย cathode ray oscilloscope (type 502, Tektronix Inc., Portland, Oregon, U.S.A.).

วิธีเตรียมส่วนของเส้นประสาทไซอะติกของหนูขาวเพื่อบันทึก nerve action potentials แสดงไว้ในรูปที่ 5. วิธีนี้ใช้ในการศึกษาผลโดยตรงของน้ำสกัดใบราตรีต่อเส้นประสาท.

<u>การศึกษาอาการพิษและการหา LD_{50} ของน้ำสกัดใบราตรีในหนูขาว</u>.

ในการศึกษาอาการพิษและหา LD_{50} ของน้ำสกัดใบราตรี ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Loomis, 1978 คือ ใช้หนูขาวพันธุ์ Sprauge Dawley เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 160-220 กรัม ซึ่งเพาะพันธุ์และเลี้ยงในสิ่งแวดล้อมเดียวกันตลอดการทดลอง หนูขาวที่ใช้ในการทดลองแล้วครั้งหนึ่งจะไม่ใช้ซ้ำอีกเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด biological variation ซึ่งมีอิทธิพลต่อผลของ toxicity test (Loomis, 1978).

การหา LD_{50} ของน้ำสกัดใบราตรี ทำได้โดยแบ่งหนูขาวออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ฉีดน้ำสกัดใบราตรีที่สกัดด้วยน้ำ (R_C) เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) ในขนาด 1.2, 1.8, 2.4, 3.6 และ 4.8 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สังเกตอาการของหนูขาวภายหลังฉีดน้ำสกัด R_C นาน 6 ชั่วโมง นับจำนวนหนูขาวที่ตายภายใน 24 ชั่วโมง แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

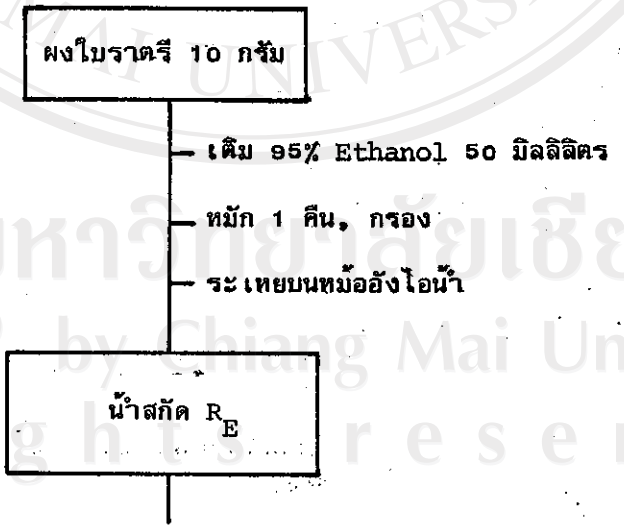
คิดเป็นร้อยละของจำนวนหนูขาวที่ทำการทดลองแต่ละกลุ่ม จากนั้นนำไปหา LD_{50} โดยวิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Litchfield และ Wilcoxon (1949).

<u>การศึกษาและทดสอบเบื้องต้นของกลุ่มสารสำคัญในน้ำสกัดใบราตรี</u>.

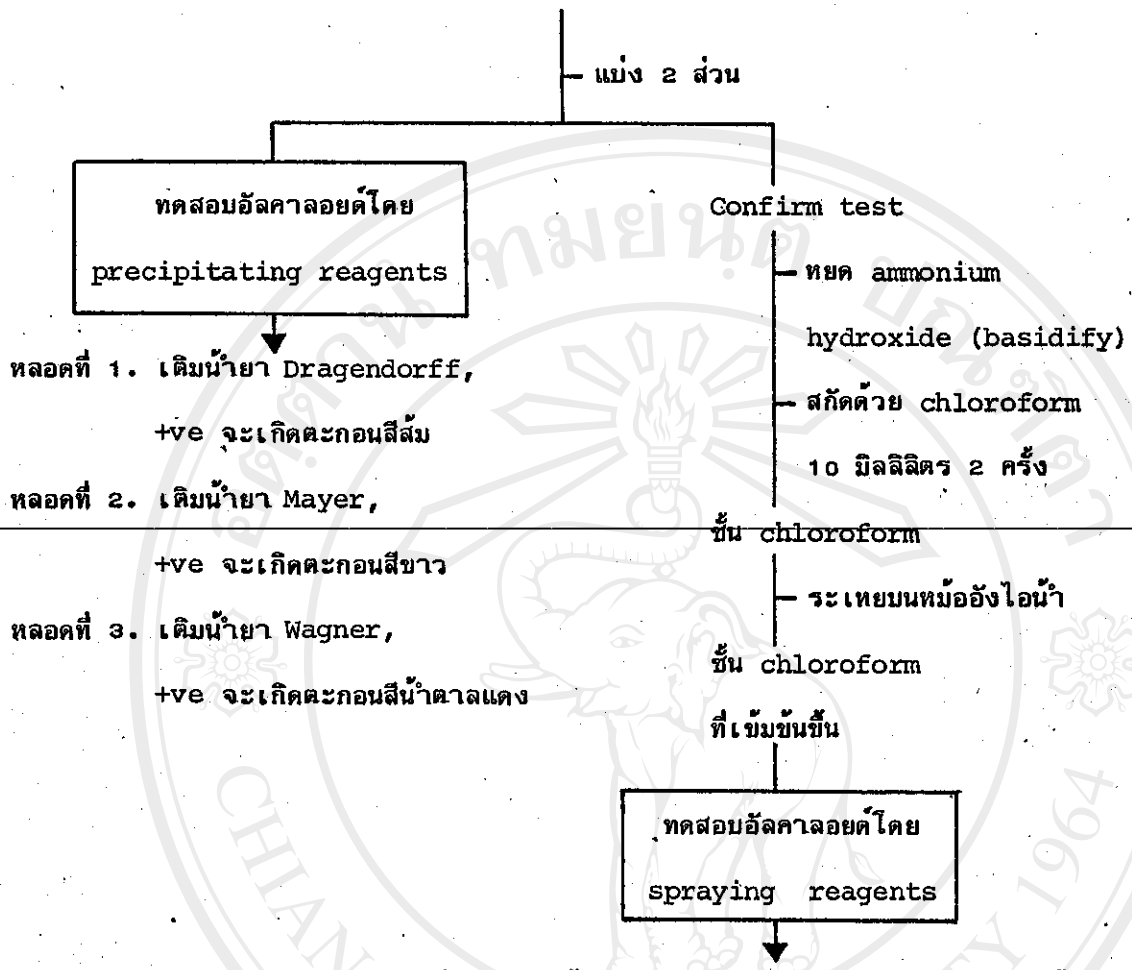
ในการศึกษากลุ่มสารสำคัญในพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยานั้น กลุ่มสารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายชนิดเช่น อัลคาลอยด์ (alkaloids), แซ็พโพนิน (saponins), แอนทราควิโนน (anthraquinones), แทนนิน (tannins), เทอร์ปีน (terpines), คูมาริน (coumarins) และอื่น ๆ ราตรีเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและศึกษาสารสำคัญในพืชสมุนไพรชนิดนี้ ในการศึกษาและทดสอบเบื้องต้นของกลุ่มสารสำคัญในน้ำสกัดใบราตรีนั้นได้ทำการทดสอบหา อัลคาลอยด์, แซ็พโพนิน, แอนทราควิโนน และแทนนิน โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. <u>วิธีการทดสอบหาอัลคาลอยด์ในน้ำสกัดใบราตรี</u>

การทดสอบเบื้องต้นสำหรับอัลคาลอยด์ในน้ำสกัดใบราตรี ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ กำจร, 2523 ดังมีรายละเอียดแสดงในแผนผังดังนี้.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



น้ำยาเคมี (reagents) ที่ใช้ในการทดสอบอัลคาลอยด์ มีดังนี้คือ

Precipitating reagents :

น้ำยา Dragendorff

เตรียมโดยละลาย bismuth nitrate 8.0 กรัม ใน 30% nitric acid 12 มิลลิลิตร แล้วผสมกับสารละลายของ potassium iodide (potassium iodide 27.2 กรัมละลายในน้ำ 50 มิลลิลิตร) จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำยา Mayer

เตรียมโดยละลาย mercuric chloride 1.36 กรัมในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร แล้วผสมกับสารละลายของ potassium iodide (potassium iodide 5 กรัมในน้ำ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร.

น้ำยา Wagner

เตรียมโดยละลาย potassium iodide 2.0 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วเติม iodine 1.27 กรัม เมื่อ iodine ละลายหมดแล้วให้เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร.

Spraying reagents :

น้ำยา Dragendorff

สารละลาย ก. : ละลาย 0.6 กรัมของ bismuth subnitrate ในส่วนผสมของ 2 มิลลิลิตรของ hydrochloric acid ที่เข้มข้น และน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร.

สารละลาย ข. : ละลาย 6 กรัมของ potassium iodide ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร.

นำสารละลาย ก. และ ข. มาผสมกัน แล้วเติม 7 มิลลิลิตรของ hydrochloric acid ที่เข้มข้น และน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 400 มิลลิลิตร.

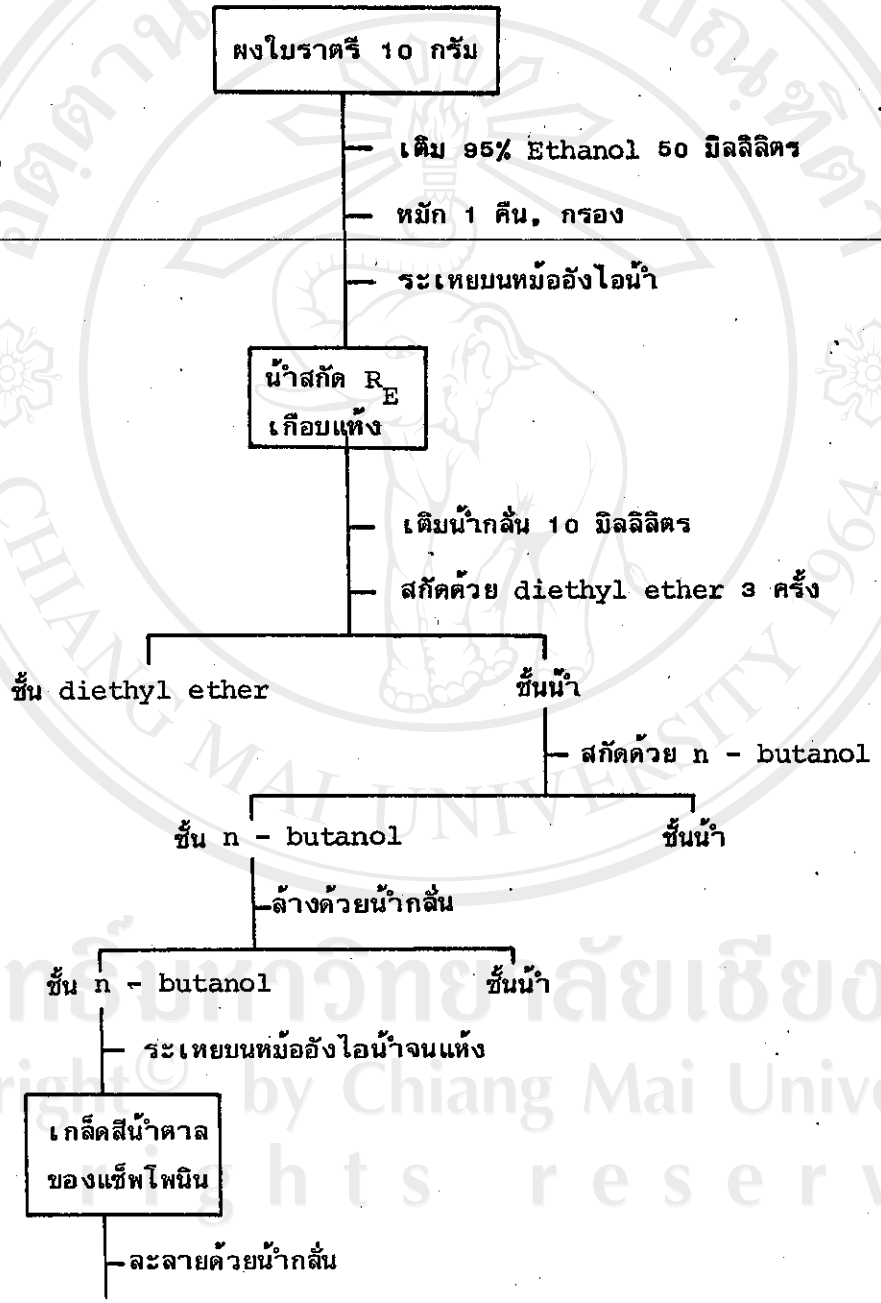
น้ำยา iodoplatinate

เตรียมโดยผสม 5% platinic chloride 10 มิลลิลิตร และ 2% potassium iodide 240 มิลลิลิตรใน hydrochloric acid ที่เข้มข้น 5 มิลลิลิตร.

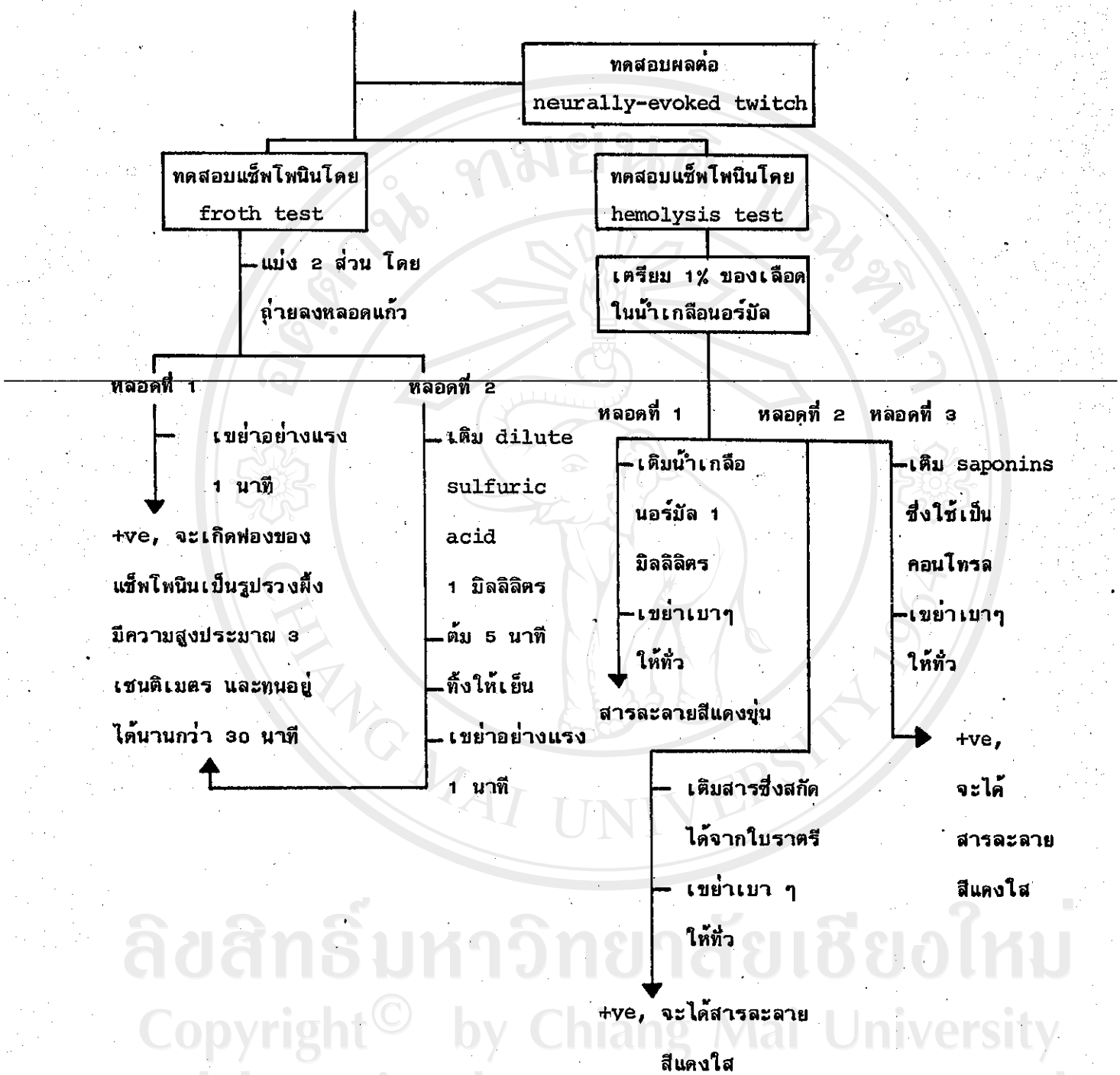
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. <u>วิธีทดสอบหาแซ็พโพนินในน้ำสกัดใบราตรี</u>

การทดสอบเบื้องต้นสำหรับแซ็พโพนินในน้ำสกัดใบราตรี ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ ลิวรรณ, 2522 และ กำจร, 2523 ดังมีรายละเอียดแสดงเป็นแผนผังดังนี้



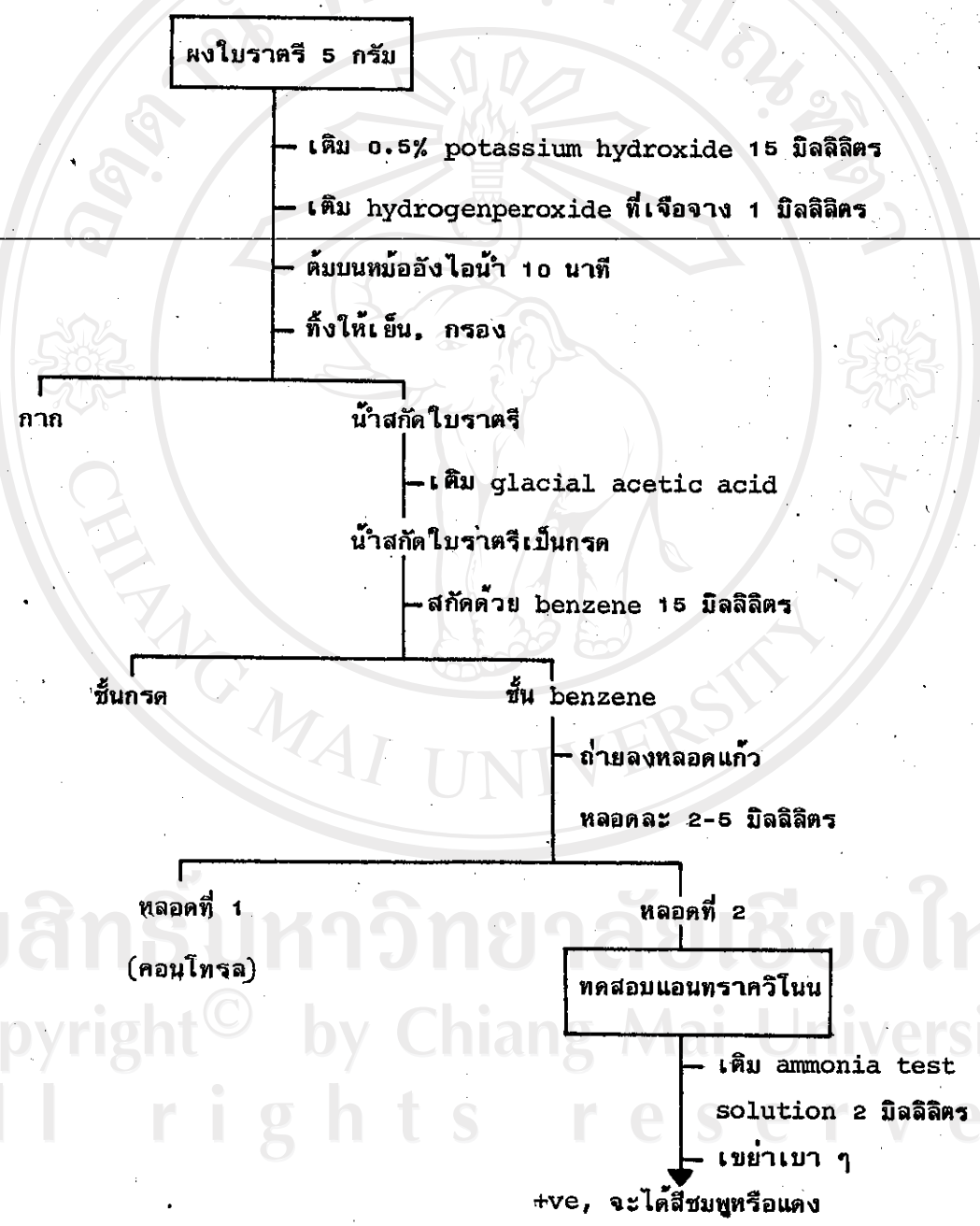
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. <u>วิธีการทดสอบหาแอนทราควิโนนในน้ำสกัดใบราตรี</u>

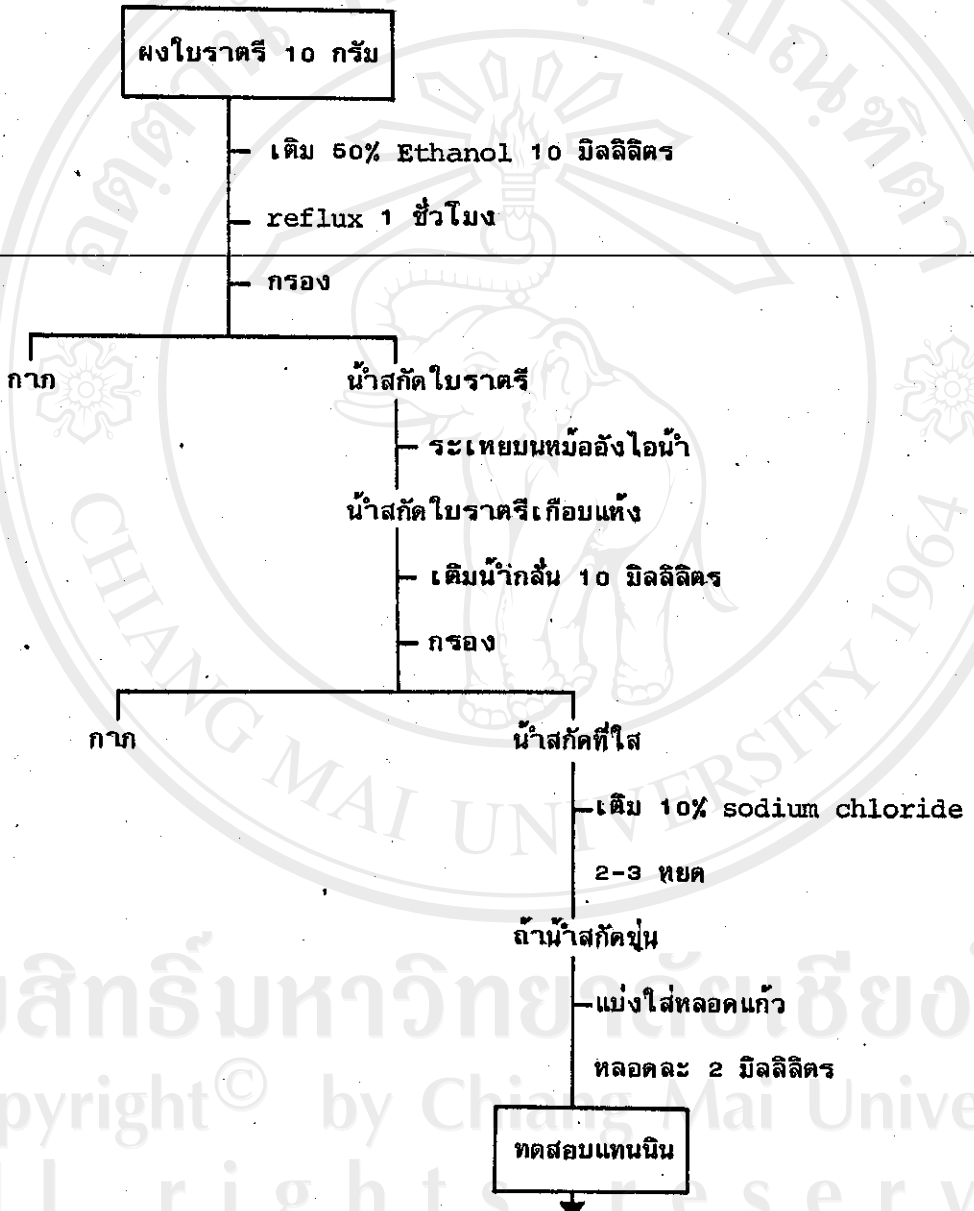
การทดสอบเบื้องต้นสำหรับแอนทราควิโนนในน้ำสกัดใบราตรี ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ กำจร, 2523 ดังมีรายละเอียดแสดงเป็นแผนผังดังนี้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. <u>วิธีการทดสอบหาแทนนินในน้ำสกัดใบราตรี</u>

การทดสอบเบื้องต้นสำหรับแทนนินในน้ำสกัดใบราตรี ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ กำจร, 2523 ดังมีรายละเอียดแสดงเป็นแผนผังดังนี้



หลอดที่ 1. เติม 1% ferric chloride 2-3 หยด, +ve จะเห็นสีน้ำเงินเขียว

หลอดที่ 2. เติม bromine water5-6 หยด, +ve จะเกิดตะกอนเบาสีอ่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีการแยกสารสำคัญในน้ำสกัดใบราตรีโดย Thin-Layer Chromatography (TLC).

Thin-Layer Chromatography เป็นวิธีการขั้นต้นที่ใช้แยกสารสำคัญต่าง ๆ ในน้ำสกัดสมุนไพร หรือสารผสมอื่น ๆ ในการศึกษานี้ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Stahl (1969) และ Harborne (1973) ทำได้โดยหยดน้ำสกัดใบราตรีลงบนแผ่น TLC ซึ่งเป็นอะลูมิเนียมเคลือบด้วย silica gel G 60 (E.Merck, Darmstadt) เป่าให้แห้งเพื่อให้ได้น้ำสกัดติดบนแผ่น TLC นำไปวางในภาชนะปากกว้างที่บรรจุด้วยตัวทำละลายที่ใช้คือ methanol และ ammonium hydroxide ในอัตราส่วน 200 ต่อ 3 ปิดฝาภาชนะปากกว้างนี้ให้สนิท ทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายดังกล่าวซึ่งใช้เป็นตัวพาและแยกสารสำคัญในน้ำสกัดใบราตรีเคลื่อนที่ขึ้นไปถึงระยะที่กำหนดไว้เท่ากับ 12 เซนติเมตร จะได้แถบสีของสารแต่ละชนิดแยกจากกัน นำแผ่น TLC ออกจากภาชนะปากกว้าง ผึ่งจนแห้ง แล้วพ่นด้วยน้ำยา Dragendorff หรือน้ำยา iodoplatinate ซึ่งเป็นน้ำยาเคมีที่ใช้ทดสอบอัลคาลอยด์ ถ้าสารนั้นเป็นอัลคาลอยด์จริงจะเห็นจุดสีส้มหรือสีม่วงน้ำเงินตามลำดับ บันทึกตำแหน่ง สี และหาค่า R_f (R_f หมายถึง อัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่) ผลที่ได้จากวิธี TLC ซึ่งใช้ในการแยกและพิสูจน์สารสำคัญในน้ำสกัดใบราตรีนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการแยกหาสารสำคัญต่าง ๆ ในปริมาณมาก ๆ ได้โดยใช้วิธี Column Chromatography.

วิธีแยกสารสำคัญในน้ำสกัดใบราตรีโดย Column Chromatography.

การแยกหาสารสำคัญในน้ำสกัดใบราตรีโดยวิธีนี้ ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Morris (1964) เครื่องมือที่ใช้ (รูปที่ 6) เป็นคอลัมก์แก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร ความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร อุดด้านล่างของคอลัมก์ด้วยใยแก้ว (glass wool) แล้วเติมสารละลายซึ่งประกอบด้วย methanol และ ammonium hydroxide ในอัตราส่วน 200 ต่อ 3 (ใช้เป็น eluent) ลงไปในคอลัมก์เล็กน้อย ผสม silica gel 60 (70-230 mesh ASTM) ซึ่งใช้เป็น adsorbent 40 กรัม ใน eluent ให้เข้ากัน เทลงในคอลัมก์โดยให้เกิดการ pack ของ adsorbent ในคอลัมก์อย่างสม่ำเสมอ ไข eluent ที่อยู่

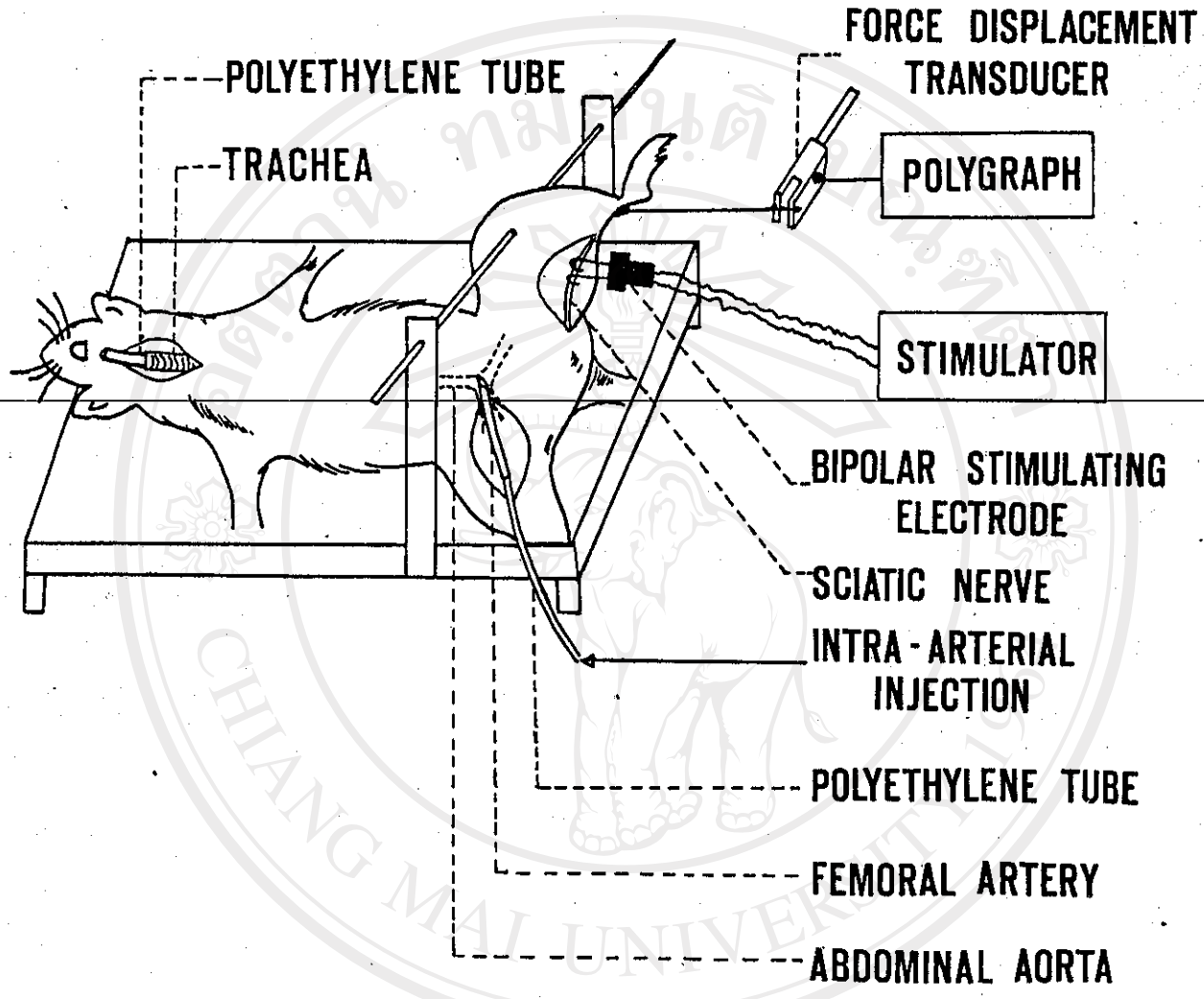
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหนือระดับของ adsorbent ออกจากคอลัมก์ให้หมดแต่อย่าให้ลดต่ำกว่าระดับของ adsorbent ค่อย ๆ เติมน้ำสกัดใบราตรีที่สกัดด้วย 95% Ethanol (R_E) ในปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในคอลัมก์อย่างระมัดระวัง เพื่อไม่ให้กระเทือนผิวของ adsorbent ไข stopcock ให้น้ำสกัดใบราตรีที่อยู่บนผิวของ adsorbent ซึมเข้าไปใน adsorbent จนเกือบหมด รีบเติม eluent ลงในคอลัมก์ eluent จะค่อย ๆ พาสารในน้ำสกัดใบราตรีเคลื่อนลงด้วยอัตราเร็วต่าง ๆ กัน จนในที่สุดได้แถบสีของแต่ละสารแยกออกจากกัน นำสารที่แยกได้แต่ละส่วนไปทดสอบหาว่าเป็นสารชนิดใดและหาค่า R_f โดยวิธี TLC เปรียบเทียบกับ TLC ของน้ำสกัดใบราตรี ทั้งนี้เพื่อตรวจสอบให้แน่ชัดว่าสารที่แยกได้ส่วนใดเป็นอัลคาลอยด์ เพื่อที่จะนำเอาอัลคาลอยด์ที่แยกได้นี้ไปทดสอบว่ามีฤทธิ์ลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลายหรือไม่.

สำหรับการทดสอบว่าน้ำสกัดใบราตรีและสารที่แยกได้มีอัลคาลอยด์อยู่หรือไม่นั้น นอกจากจะทดสอบโดยวิธีพ่นด้วยน้ำยา Dragendorff หรือน้ำยา iodoplatinate ดังกล่าวแล้ว ยังใช้วิธีการทดสอบการตกตะกอน (precipitation test) (กำจร,2523) โดยใช้น้ำยา Dragendorff, Mayer หรือ Wagner ประมาณ 5-6 หยด ค่อย ๆ หยดลงในหลอดแก้วที่บรรจุ 0.5 มิลลิลิตรของน้ำสกัดใบราตรีหรือสารที่แยกได้ ดูผลการเกิดตะกอนทันที ถ้ามีอัลคาลอยด์จะเกิดตะกอนสีส้ม, สีขาว หรือสีน้ำตาลแดง ตามลำดับ ตามวิธีการทดสอบอัลคาลอยด์ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น.

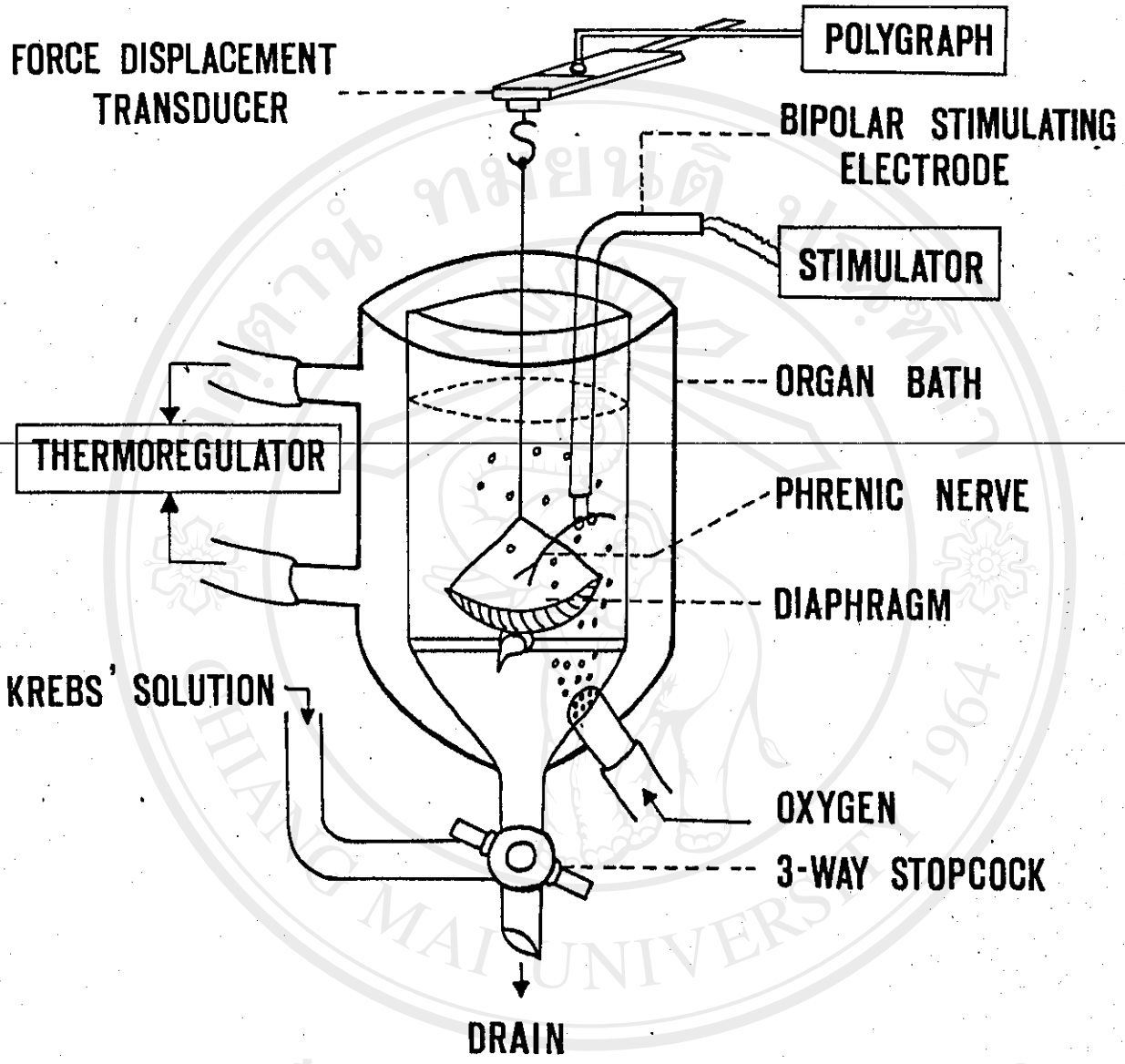
การศึกษาฤทธิ์ของน้ำสกัดใบราตรีในการลดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย ทำได้โดยหยดส่วนของสารที่แยกได้จากวิธี Column Chromatography ดังกล่าวลงในส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว บันทึกผลการหดตัว (neurally - evoked twitch) ของกล้ามเนื้อลายโดยใช้ Grass 79 D polygraph (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A.).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



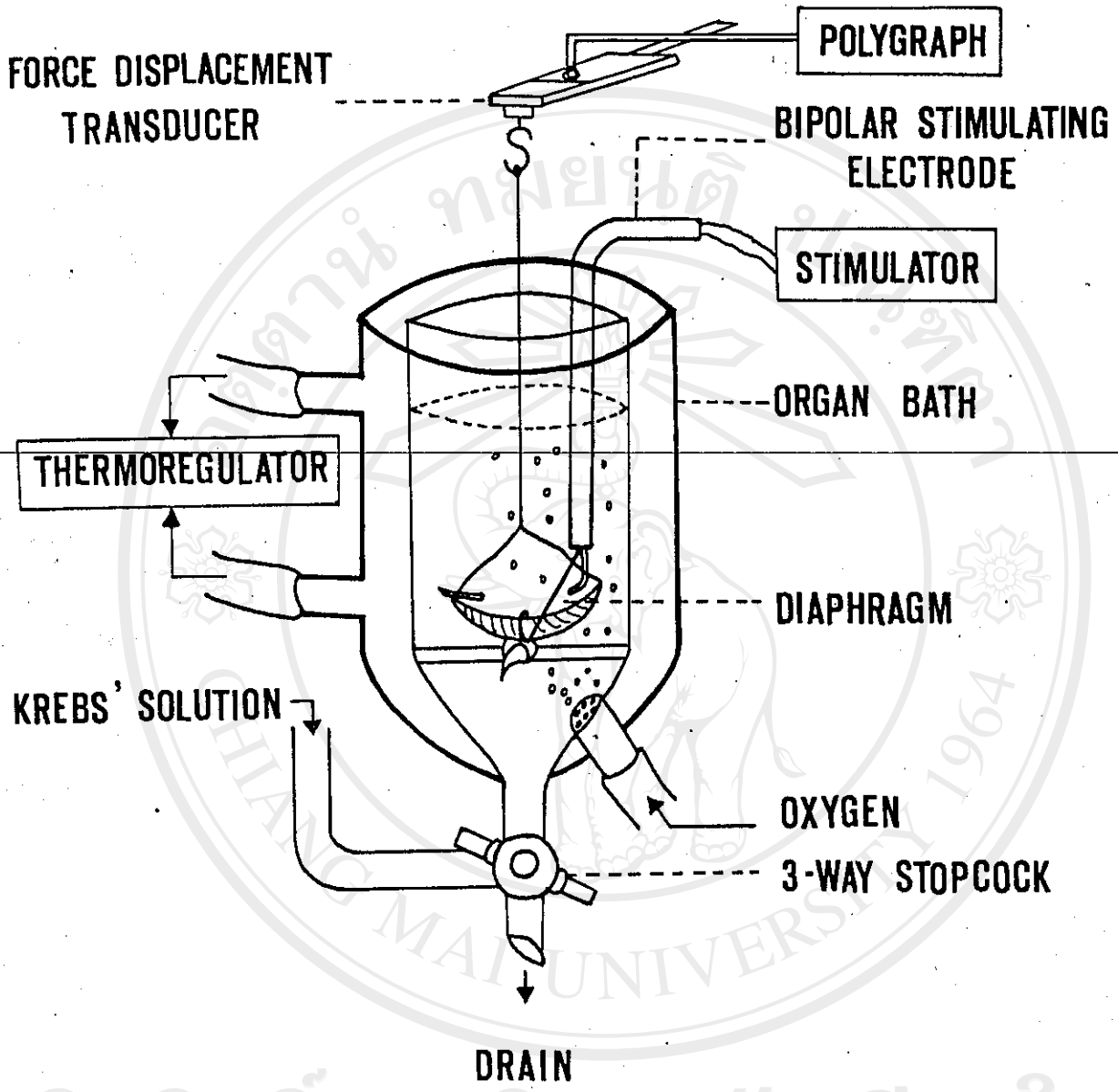
รูปที่ 2. แสดงถึงการบันทึกการหดตัว (neurally-evoked twitch) ของกล้ามเนื้อลาย โดยใช้ส่วนของเส้นประสาทไซอะติก-กล้ามเนื้อแกสตรอกนีเมียสในหนูขาว (rat sciatic nerve-gastrocnemius preparation, in situ).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



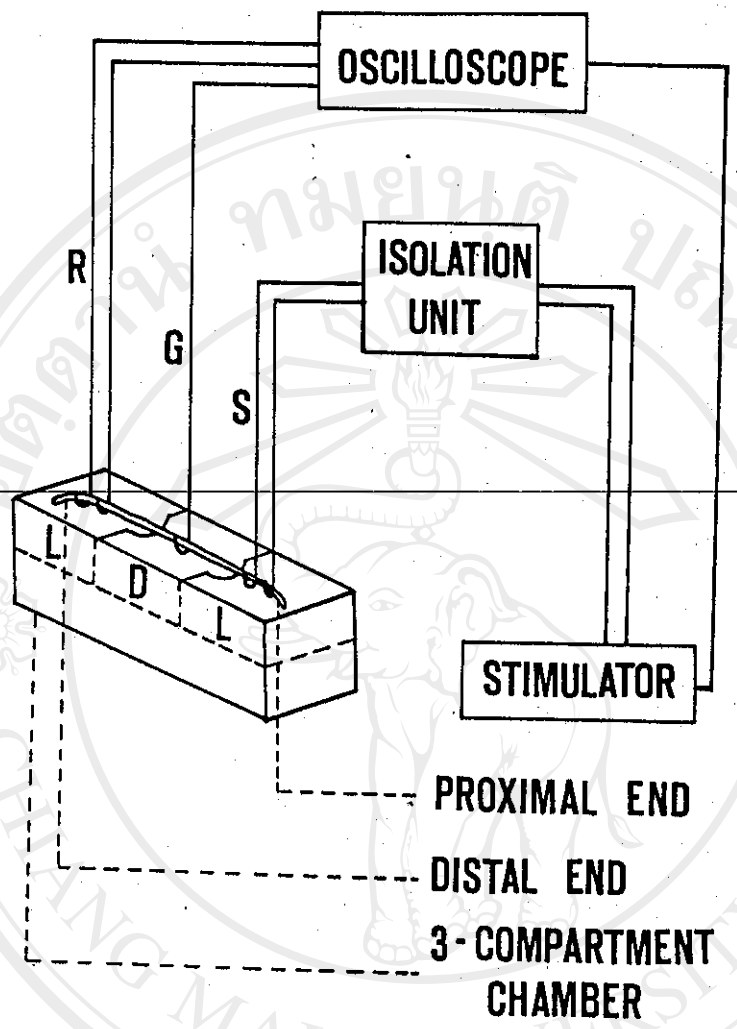
รูปที่ 3. แสดงถึงการบันทึกการหดตัว(neurally-evoked twitch) ของกล้ามเนื้อลาย โดยใช้ส่วนของเส้นประสาทฟรีนิค-กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว (isolated rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 4. แสดงถึงการบันทึกการหดตัว (directly-evoked twitch) ของกล้ามเนื้อลาย โดยใช้ส่วนของกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาว (isolated rat hemidiaphragm preparation).

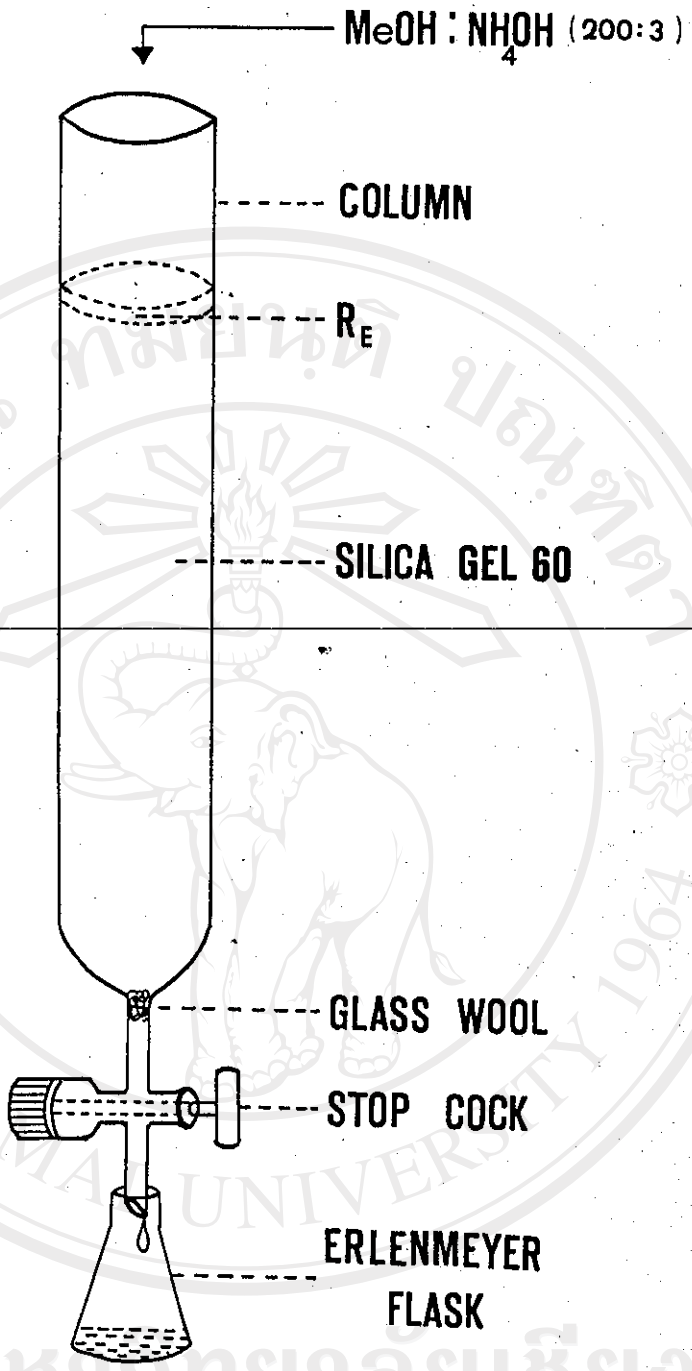
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 5. แสดงถึงการบันทึก nerve action potentials โดยใช้ส่วนของเส้นประสาทไซอะติกของหนูขาว (isolated rat sciatic nerve preparation).

หมายเหตุ S หมายถึง stimulating electrode, G หมายถึง ground, R หมายถึง recording electrode, D หมายถึง drug chamber และ L หมายถึง liquid paraffin chamber.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 6. แสดงถึงการแยกส่วนของน้ำสกัดใบราตรีโดยวิธี Column Chromatography.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยาที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อทางการค้า	น้ำหนักโมเลกุล	ผลิตโดย
Acetylcholine Chloride	-	181.7	Calbiochem, Los Angeles, U.S.A.
Calcium Chloride	-	111.0	City Chemical Corporation, New York, U.S.A.
∝ - Chloralose	-	309.5	Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.
Heparin Sodium	-	-	Nordmark, Hamberg, Germany.
Pancuronium Bromide	Pavulon	750.7	N.V. Organon Oss, Holland.
Pentobarbital Sodium	Vetanacol	248.3	Veterinaria, Zurich, Switzerland.
Physostigmine Salicylate	Eserine Salicylate	413.5	Mann Research Lab., New York, U.S.A.
Succinylcholine Chloride	Kyoraxin	361.3	Kyorin, Tokyo, Japan.
Tetraethylammonium Bromide	-	210.16	BDH Chemical Ltd, Poole, England.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อวิทยาศาสตร์	น้ำหนักโมเลกุล	ผลิตโดย
Ammonium Hydroxide	35.05	E.Merck,Darmstadt,Germany.
Benzene	78.11	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Bismuth Subnitrate	395.00	Thomas Morson & Son. LTD, England.
Bromine	159.84	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Calcium Chloride	110.99	City chemical Corporation, New York, U.S.A.
Chloroform	119.39	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
D (+) - Glucose	180.16	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Diethyl Ether	74.12	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Ethyl Alcohol	46.07	E.Merck,Darmstadt,Germany.
Ferric Chloride	162.22	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Glacial Acetic Acid	60.05	Vidhyasom Co., LTD,Thailand.
Hydrochloric Acid	36.47	J.T.,Baker chemical Co., Phillipsburg, N.J., U.S.A.
Hydrogenperoxide	34.02	องค์การเภสัชกรรม กรุงเทพฯ ประเทศไทย.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อวิทยาศาสตร์	น้ำหนักโมเลกุล	ผลิตโดย
Iodine	253.82	May & Baker. LTD,Dagenham, England
Magnesium Sulfate	246.49	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Mercuric Chloride	271.50	Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis, New York, U.S.A.
Methyl Alcohol	32.01	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
n - Buthyl Alcohol	74.12	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Nitric Acid	63.02	J.T.,Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J., U.S.A.
Platinic Chloride	336.90	BDH Chemicals. LTD, Poole, England.
Potassium Chloride	74.56	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Potassium Dihydrogen Phosphate	136.09	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Potassium Hydroxide	56.11	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Potassium Iodide	166.01	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Saponin	-	The Coleman & Bell Co., Norwood, O., U.S.A.
Silica Gel 60	-	E.Merck,Darmstadt,Germany.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อวิทยาศาสตร์	น้ำหนักโมเลกุล	ผลิตโดย
Sodium Bicarbonate	84.01	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Sodium Chloride	58.44	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Sodium Dihydrogen Phosphate	156.01	May & Baker. LTD,Dagenham, England.
Sulfuric Acid	98.08	J.T.,Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J., U.S.A.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การวิเคราะห์ข้อมูลและการใช้สถิติเพื่อทดสอบข้อมูล

ความสูง (amplitude) ของการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย ที่เกิดจากการกระตุ้นเส้นประสาทไซอะติก, เส้นประสาทฟรีนิค และกล้ามเนื้อกระบังลม รวมทั้งความสูงของ nerve action potentials ที่เกิดจากการกระตุ้นเส้นประสาทไซอะติก ที่เปลี่ยนแปลงไปจากคอนโทรล จะแสดงให้เห็นโดยคิดเป็นร้อยละดังนี้.

ร้อยละของการเพิ่มความสูงของการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย $= \frac{\text{response-control}}{\text{control}} \times 100$

ร้อยละของการลดความสูงของการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย $= \frac{\text{control-response}}{\text{control}} \times 100$

ร้อยละของการเพิ่มความสูงของ nerve action potentials $= \frac{\text{response-control}}{\text{control}} \times 100$

ร้อยละของการลดความสูงของ nerve action potentials $= \frac{\text{control-response}}{\text{control}} \times 100$

ค่าเฉลี่ยของข้อมูลจะแสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดมาตรฐาน (mean ± S.E.) การหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยสองค่าและสามค่า ใช้การทดสอบแบบ student "t" test และ "F" test ตามลำดับ โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$) สถิติที่ใช้ในการทดสอบดัดแปลงจากวิธีการของ เติมศรีและยุพา (2521).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved