บทที่ 3
วัสดุและวิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวใหญ่สายพันธุ์ Wistar (*Rattus norvegicus*) จากสำนักทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ดังนี้

1.1 เพศผู้อายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-240 กรัม

1.2 เพศเมียอายุ 7 สัปดาห์ น้ำหนัก 140-190 กรัม

2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง

2.1 กรงสแตนเลสขนาด 15 x 30 x 15 เซนติเมตร

2.2 ขี้เลื่อย

2.3 ขวดใส่น้ำ

2.4 อาหารชนิดเม็ด (CP. Mice feed) No.082 ของบริษัทกรุงเทพอาหารสัตว์จำกัด

3. สารที่ให้กับสัตว์ทดลอง

3.1 น้ำกลั่น (Distilled water)

3.2 สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากสาหร่ายไก

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากสาหร่ายไก

4.1 ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert

4.2 เครื่องระเหย Rotary evaporator ยี่ห้อ BUCHI Rotavapor รุ่น R-114

4.3 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AG285

4.4 กระดาษกรอง ยี่ห้อ Whatman เบอร์ 41

4.5 กระดาษชั่งสาร

4.6 บีกเกอร์

4.7 โกร่งบดยา

4.8 สาหร่ายไกแห้งบดจากตำบลป่าคา อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน

4.9 maltodextrin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.10 แอลกอฮอล์ 95%

5. อุปกรณ์ที่ใช้ป้อนสารแก่สัตว์ทดลอง

5.1 กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร

5.2 หลอดสำหรับป้อนสารสกัด (feeding tube) ซึ่งทำมาจากเข็มฉีดยาเบอร์ 18 ที่ตัดปลาย ลบคมให้ทู่แล้วทำให้โค้งเพื่อสะดวกในการป้อน

6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบผลทางเคมีเทคนิค

6.1 หลอดทดลอง

6.2 เข็มฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร

6.3 parafilm

6.4 อุปกรณ์ผ่าตัด

6.5 normal saline 0.85%

6.6 EDTA

6.7 chloroform

6.8 เครื่อง automate (รุ่น Synchron C5X; Beckman)

6.9 BUN reagent

6.10 Picric acid

6.11 NaOH

7. สถานที่ในการทำวิจัย

หน่วยวิจัยสมุนไพรที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่และภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95% จากสาหร่ายไก

นำสาหร่ายไกตากแห้งที่บดปั่นแล้วหนัก 200 กรัมมาหมักด้วยแอลกอฮอล์ 95% ปริมาณ 2 ลิตร นาน 1 สัปดาห์ แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองได้สารสีเขียวเข้ม นำน้ำที่สกัดได้นี้ไปทำการระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Rotary evaporator) โดยใช้อุณหภูมิ 60 °c ความดัน 100-200 มิลลิบาร์ จนกระทั่งได้สารสกัดข้นหนืด หลังจากนั้นนำสารสกัดดังกล่าวไปผสมกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

maltodextrin ในอัตราส่วน 1:2 ในโกร่ง ทำการผสมสารดังกล่าวให้เข้ากันแล้วนำไปอบในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 50 °c จนสารสกัดแห้ง นำไปบดด้วยโกร่งอีกครั้งแล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักที่ได้เก็บไว้เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณที่จะใช้ในการละลายน้ำเพื่อป้อนให้แก่สัตว์ทดลอง สารสกัดที่ได้นี้จะทำการเก็บรักษาไว้ในขวดสีชามีฝาปิดเพื่อป้องกันแสงแดดและความชื้น

การเตรียมสารสกัดเพื่อป้อนให้กับหนู

ในการวิจัยนี้ต้องการให้หนูกินสาหร่ายไกในปริมาณดังนี้

1. 0.5 กรัม/กิโลกรัม/วัน ซึ่งเป็นปริมาณเท่ากับปริมาณที่คนหนัก 60 กิโลกรัมกินต่อวัน (คนกินสาหร่ายไกเฉลี่ยวันละ 30 กรัมต่อน้ำหนักตัว 60 กิโลกรัม)
2. 1.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน ซึ่งเป็นปริมาณ 2 เท่าของปริมาณที่คนหนัก 60 กิโลกรัมกินต่อวัน
3. 25.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน ซึ่งเป็นปริมาณ 50 เท่าของปริมาณที่คนหนัก 60 กิโลกรัมกินต่อวัน

เมื่อชั่งสารสกัดได้ตามปริมาณที่ต้องการแล้วจะเติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรเพื่อใช้ในการป้อนหนู 1 ตัว แต่ในการเตรียมสารแต่ละครั้งจะเตรียมไว้สำหรับหนู 5 ตัวในเวลา 4 วัน โดยทำการเก็บรักษาไว้ในขวดสีชามีฝาปิดที่อุณหภูมิ 4 °c

วิธีป้อนสารให้กับหนู

การป้อนน้ำกลั่นและสารสกัดจะใช้เข็มสำหรับป้อนต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร โดยดูดสารขึ้นมา 0.5 มิลลิลิตร ใช้นิ้วโป้งและนิ้วชี้ของมือซ้ายรวบบริเวณต้นคอของหนูไว้ ส่วนนิ้วที่เหลือให้รวบหนังบริเวณด้านหลังพร้อมกับพยุงและบังคับหนูให้อยู่นิ่ง ซึ่งจะทำให้หนูอยู่ในลักษณะอ้าปากเล็กน้อย ทำการสอดเข็มเข้าไปทางมุมปากด้านซ้ายซึ่งเป็นหลอดอาหาร โดยสอดให้ลึกพอประมาณแล้วจึงกดปลายกระบอกฉีดยาเพื่อป้อนสารเข้าไปอย่างรวดเร็วและต้องระมัดระวังไม่ให้สอดเข็มผิดเข้าไปในหลอดลมซึ่งอาจทำให้หนูสำลักจนตายได้

2. การตรวจสอบผลของสารสกัด จากสาหร่ายไกที่มีต่อร่างกายของหนู

2.1 การให้สารสกัดสาหร่ายไกในปริมาณสูงเพียงครั้งเดียว

แบ่งหนูเพศผู้ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว เพื่อทำการป้อนสารสกัดดังนี้

กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่นปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร/ตัว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่ม 2 ป้อนสารสกัดสาหร่ายไกปริมาณ 25.0 กรัม/กิโลกรัม/ตัว เพียงครั้งเดียวซึ่งเป็นปริมาณ 50 เท่าของปริมาณที่คนหนัก 60 กิโลกรัมกินต่อวัน

ส่วนหนูเพศเมียซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ก็ให้ทำการป้อนสารสกัด ในลักษณะเดียวกัน

เมื่อทำการป้อนสารสกัดสาหร่ายไกแก่หนูขาวแล้วให้สังเกตอาการที่เปลี่ยนแปลงของหนูขาวในช่วงเวลา 5 นาที, 15 นาที, 30 นาที, 1 ชั่วโมง, 2 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมง เพื่อดูว่าหนูมีพฤติกรรมที่ผิดไปจากปกติหรือมีการตายหรือไม่ โดยการสังเกตจะอาศัยตาม standard working sheet ที่ดัดแปลงมาจาก standardized work sheet สำหรับทำการ Hippocratic screening test (วิรวรรณ, 2545) ดังตารางที่ 1 หลังจากนั้นทำการสังเกตอาการทุกวันและชั่งน้ำหนักตัวทุก 2 วัน เป็นเวลา 7 วัน โดยหนูที่มีชีวิตอยู่ถึงวันที่ 7 จะนำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อนำมาหารปริมาณน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นจากวันแรกของการทดลอง แล้วทำการสลบหนูด้วย chloroform ผ่าตัดเพื่อสังเกตความผิดปกติของอวัยวะภายในด้วยตาเปล่าและนำ ตับ ไต หัวใจ ม้าม รังไข่และอัณฑะไปชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

2.2 หนูที่ใช้สำหรับทดสอบการได้รับสารสกัดสาหร่ายไกติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน

แบ่งหนูเพศผู้ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัว เพื่อทำการป้อนสารสกัดดังนี้

กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่นปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

กลุ่ม 2 ป้อนสารสกัดสาหร่ายไกขนาด 0.5 กรัม/กิโลกรัม/วัน ซึ่งเป็นปริมาณเท่ากับปริมาณที่คนหนัก 60 กิโลกรัมกินต่อวัน

กลุ่ม 3 ป้อนสารสกัดสาหร่ายไกขนาด1.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน ซึ่งเป็นปริมาณ 2 เท่าของปริมาณที่คนหนัก 60 กิโลกรัมกินต่อวัน

ส่วนหนูเพศเมียแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัวแล้วทำการป้อนสารในปริมาณเดียวกัน

เมื่อครบกำหนด 60 วันของการให้สารสกัด นำหนูออกมาผ่าตัดเพื่อบันทึกผลดังนี้

สลบหนูด้วย chloroform ผ่าตัดเพื่อทำการเจาะเลือดจากหัวใจส่วน ventricle ซ้าย ให้ได้ปริมาณมากที่สุด โดยแบ่งเลือดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจะใช้ในการตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ปริมาณเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total White blood cell count) และปริมาณเม็ดเลือดขาวแยกชนิด (Differential cell count) ส่วนเลือดส่วนที่ 2 ไม่ต้องใส่ EDTA ทิ้งไว้ให้เลือดแข็งตัว ซึ่งเลือดส่วนนี้จะใช้ในการตรวจสอบการทำงานของตับและไต โดยจะทำการส่งตรวจที่ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยตรวจหาค่าดังนี้

1. Blood urea nitrogen (BUN)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Creatinine (Cre)
3. alanine aminotransferease (ALT)
4. aspatate aminotransferase (AST)

การตรวจสอบผลทางโลหิตวิทยา

1. การตรวจหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit)

นำเลือดส่วนที่หนึ่งมา 1 มิลลิลิตรไปใส่หลอดทดลองที่มี EDTA 0.2 มิลลิลิตร ใช้ redtip capillary จำนวน 2 หลอดดูดเลือดให้ได้ประมาณ 2/3 ของหลอดแล้วปิดปลายหลอดด้วยดินน้ำมัน ปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่อง centrifuge hematocrit ด้วยใช้ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงนำมาอ่านด้วย microcapillary reader บันทึกปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ค่าที่ได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

2. การตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาว (White blood cell count)

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวจะใช้เลือดที่เหลือจากการวัดปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมาตรวจนับเม็ดเลือดขาวโดยรวมโดยผสมเลือด 20 ไมโครลิตรกับ White blood cell count reagent 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากันอย่างน้อย 3 นาที จากนั้นหยดส่วนผสมลงใน haemacytometer chamber ที่วางอยู่ในจานแก้วที่มีกระดาษเปียกน้ำ ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดขาวจมตัวอยู่ในระดับเดียวกัน จากนั้นนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 40x นับจำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวน 4 ตาราง/ข้าง แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณเม็ดเลือดขาวที่แท้จริง

3. การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวแยกชนิด

ใช้เลือดที่เหลือจากการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยรวมแล้ว นำไปทำ blood smear แล้วทิ้งสไลด์ไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นจึงทำการย้อมสีต่อ โดยใช้ Wright's stain หลังจากนั้นนำสไลด์มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 40x นับจำนวนเม็ดเลือดขาวแยกชนิด โดยนับจำนวนเม็ดเลือดขาวจำนวน 100 เซลล์ต่อ 1 สไลด์ของ blood smear ทำให้ครบ 3 สไลด์ ต่อหนู 1 ตัว

3. การใช้สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้การทดสอบ parametric แบบ t-testc และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และการทดสอบ non-paramatric แบบ Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance test ในโปรแกรม SPSS For windows version 6.0 ในการแสดงผลจะแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean ± standard deviation)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดสาหร่ายไกในปริมาณสูงสุดเพียงครั้งเดียว

date	Quailitative and semi-quantitation and toxicity report of												
Vehicle of sample :						Test animal :							
Concentration :			Sex :			Mark :			Color mark :				
Group :			No.			Weight :							
Route of exposure :			Time :			Evaluated by :							
Body weight (g) day 1-8													
time:						time:							
Parameter	response					Parameter	Response						
CNS						**EARS,ORAL**							
Motor activity						Blanching							
Ataxia						Hyperemia							
Loss.righting reflex						Cyanosis							
Analgesia						**GENERAL**							
Paralysis:legs						Salivation							
Fine body tremor						Tail erection							
Coarse body tremors						Pilomotor erection							
Clonic convulsions						Micturation							
Tonic convulsions						Diarrhea							
Mixed type convulsion						Circuling motion							
EYES						Head tap : aggress							
Enopthalmos						Head tap : passive							
Exopthalmos						Head tap : fearful							
Palpebral ptosis						Body touch : aggress							
Lacrimation						Body touch : passive							
Bloody tears						Body touch : fearful							
Deate and autopsy notes													

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved