# บทที่ 3
# วิธีการที่ใช้ในการศึกษา

## เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1. เครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ (rotary evaporator, Heidolph WB 2000, Germany)
2. เครื่องบดสมุนไพร (blender, waring, Becthai, Thailand)
3. เครื่องเขย่าเพื่อการสกัดแยกสารจากสมุนไพร (shaker, Rargo, baraland, USA)
4. ชุดเครื่องกรอง (sartorins, Forma Scientific, USA)
5. เครื่องทำให้แห้งด้วยแรงสูญญากาศ (Freeze dryer, Dura – Top/Dura stop MP Dura Dry MP, USA)
   ตัวเครื่องทำแห้ง (FTS systems, Dura Dry SN VP95C12, USA)
   เครื่องปั๊มสูญญากาศ (Trivac, VPI 90D, SN VP95C03, USA)
6. กล้องจุลทรรศน์ชนิด 3 มิติ (Stereoscopic microscope SZ-ST, Olympus, Japan)
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, SNR 1113322053 TDNR 2652313, Switzerland)
8. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, SNR 1113321987 TDNR 26212111, Switzerland)
9. ชุดเก็บสารสกัดสมุนไพรเพื่อกันความชื้น (Desiccator)
10. กรวยแยก 500 มิลลิลิตร (Separating funnel, Witeg, Preciso, Germany)
11. 96 well microplates (Nunc, Denmark)
12. Flask ขนาด 2,000 มิลลิลิตร

## สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

1. Methanol (Commercial grade, Thailand)
2. Methanol (AR grade, No.01021132, Thailand)
3. Dimethylsulfoxide (DMSO) (AR grade, No.249K18824931,Merk, Thailand)
4. Dichloromethane (Commercial: Distilled, Thailand)
5. Hexane (Commercial: Distilled, Thailand)
6. เกลือทะเล (Aqua marine, Thailand)
7. Artemia cyst (Sanders® Great salt lake, Brine shrimp company L.C, Produced in USA, importing country Australia)
8. Dried yeast (Thailand)

## วิธีการศึกษา

### 1. การคัดเลือกพืชสมุนไพร

1. ค้นคว้าและรวบรวมเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาวิจัยเรื่องฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic activity) ของพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ โดยใช้วิธี brine shrimp lethality test
2. สำรวจและคัดเลือกพืชสมุนไพร โดยวิธีที่ใช้คัดเลือกพืชในการศึกษาครั้งนี้คือ Chemotaxonomy จึงใช้พืชในวงศ์ Annonaceae และวงศ์ Meliaceae

พืชในวงศ์ Annonaceae ที่ทำการศึกษา ได้แก่

- น้อยหน่า *(Annona squamosa)* เปลือกต้น/ ใบ/ เมล็ด

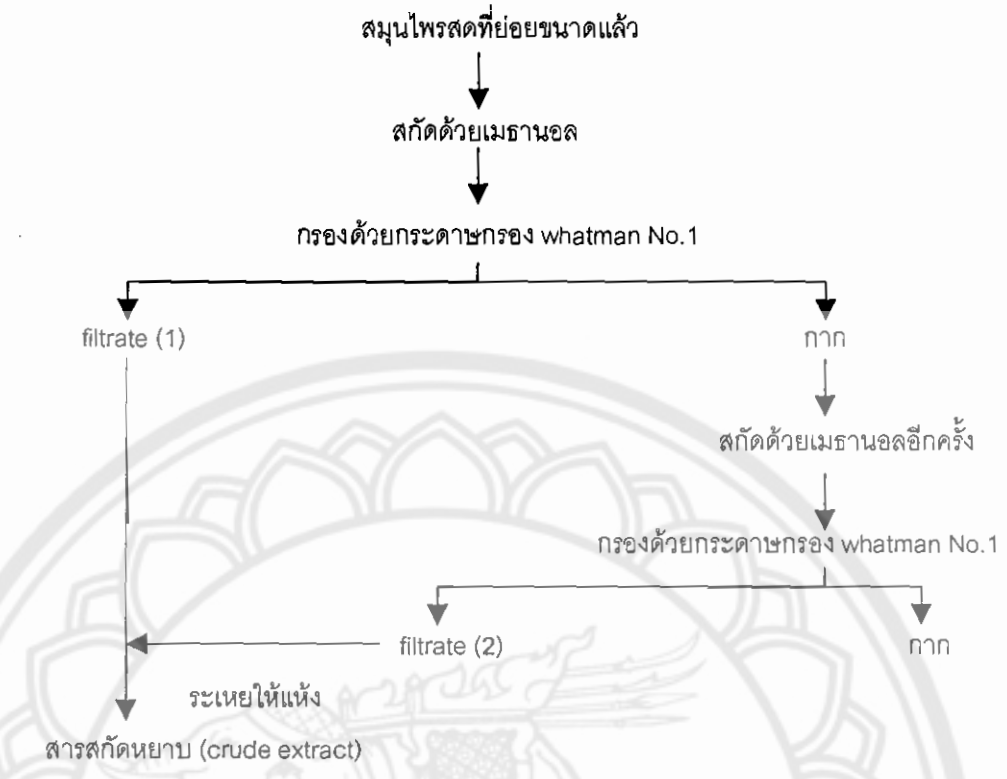
พืชในวงศ์ Meliaceae ที่ทำการศึกษา ได้แก่

- สะเดาอินเดีย *(Azadirachta indica)*
- สะเดาบ้าน *(Azadirachta indica* var. *siamensis)*
- เลี่ยน *(Melia azedarach)*
- กระท้อน *(Sandoricum indicum)*
- มะฮอกกานีใบใหญ่ (*Swietenia macrophylla)*

เปลือกต้น/ ใบ

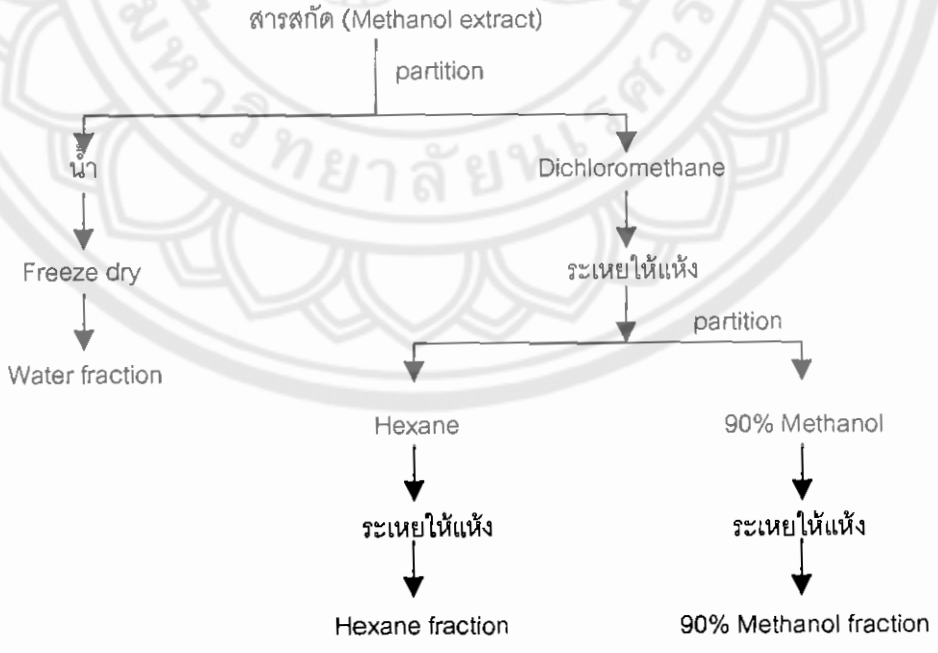
### 2. ขั้นตอนการสกัดสารจากพืชสมุนไพร

1. นำใบสด เปลือกต้น และเมล็ดของพืชที่ได้มาทำความสะอาด ผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นนำมาย่อยขนาดโดยใช้เครื่องบดสมุนไพร ชั่งน้ำหนักให้ได้ประมาณ 200 กรัม
2. หมักสมุนไพรสดที่ย่อยขนาดแล้วด้วยเมทานอล เป็นเวลา 2 วัน
3. กรองเอา filtrate (1) ออกจากกากสมุนไพร
4. นำกากสมุนไพรที่เหลือจากข้อ 3. มาหมักด้วยเมทานอลอีกครั้งเป็นเวลา 2 วัน
5. กรองเอา filtrate (2) ออกจากกากสมุนไพร
6. นำ filtrate (1) และ filtrate (2) มารวมกัน จากนั้นนำไประเหยเอาตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำ
7. เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็น เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้วิธี brine shrimp lethality test




**รูปที่ 3-1** แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากพืชสมุนไพรในวงศ์ Annonaceae และวงศ์ Meliaceae

3. ขั้นตอนการ partition **ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันของพืชสมุนไพรที่มีค่า** $LC_{50}$ < 250 **ไมโครกรัม/มิลลิลิตร**



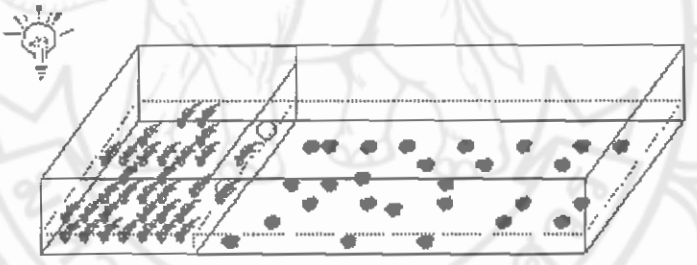

**รูปที่ 3-2** แสดงขั้นตอนการ partition ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันจากพืชสมุนไพร ในวงศ์ Annonaceae และวงศ์ Meliaceae

4. การเตรียมน้ำทะเลเทียม (Artificial seawater) [3,22]

เตรียม artificial seawater ให้มีความเข้มข้น 3.8 % w/v เตรียมโดยชั่งเกลือทะเล 19 กรัม ละลายด้วยน้ำ 500 มิลลิลิตร คนจนเกลือทะเลละลายหมดจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 แล้วเก็บใส่ภาชนะที่มีฝาปิด

5. การเลี้ยง brine shrimp [3-5]

การเพาะเลี้ยง brine shrimp ทำในกล่องรูปทรงสี่เหลี่ยมมุมฉากก้นตื้น มีผนังกั้นแบ่งออกเป็น 2 ช่อง ขนาดไม่เท่ากันเจาะรูตรงผนังกั้นขนาด 2 มิลลิเมตร 2-3 รู ดังรูปที่ 3-3 เติม artificial seawater จากนั้นโปรยไข่ของ brine shrimp ประมาณ 100-200 มิลลิกรัม ไปยังช่องที่มีขนาดใหญ่กว่าแล้วปิดด้วยแผ่นอลูมิเนียมเพื่อทำให้ด้านนั้นมืด ส่วนช่องที่เล็กกว่าจะให้แสงสว่างจากหลอดไฟโดยตรง จากนั้นทำการเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 22-29 oC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังการเพาะบ่ม ไข่จะเริ่มเกิดกระบวนการ embryogenesis และเริ่มเกิดเป็นตัวอ่อนใน 16 ชั่วโมง และไข่เกือบทั้งหมดจะเกิดเป็นตัวอ่อนภายใน 24 ชั่วโมง และการเกิดเป็นตัวอ่อนจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หลังจากการเพาะเลี้ยง 36-48 ชั่วโมง ตัวอ่อนที่ฟักจากไข่แล้วจะเคลื่อนที่เข้าไปสู่ส่วนที่มีแสงสว่าง โดยจะผ่านรูหรือช่องเล็ก ๆ ไปยังส่วนที่มีขนาดเล็กกว่าที่มีแสงสว่างได้ ซึ่งจะทำให้สามารถแยกตัวอ่อนออกจากไข่และเศษไข่ได้ หลังจากการเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง ตัวอ่อนจะต้องการอาหารจากแหล่งอื่น ดังนั้นจะต้องให้อาหารแก่ตัวอ่อนของ brine shrimp ด้วย อาหารที่เหมาะสมที่จะให้แก่ตัวอ่อนคือ ยีสต์



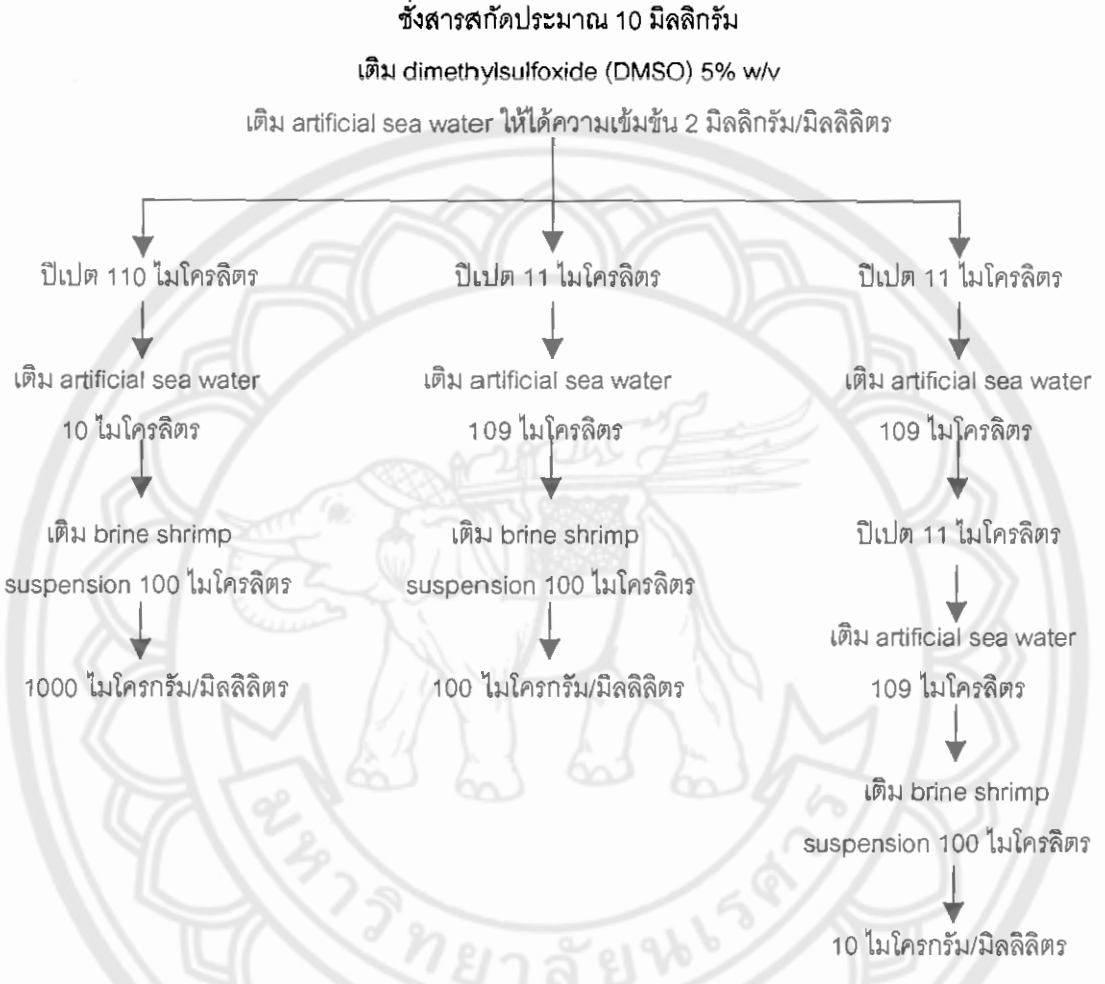
รูปที่ 3-3 การเลี้ยง brine shrimp

6. การเตรียมสารสกัด [3,5,22]

สำหรับการทดสอบใน 96 well microplates จะใช้สารสกัดประมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย artificial sea water ให้ได้ stock solution ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถ้าสารสกัดไม่ละลาย ต้องใช้ตัวทำละลายช่วยในการละลาย ตัวอย่างตัวทำละลาย เช่น dimethylsulfoxide (DMSO) แล้วถ่ายสารจาก stock solution ไปยัง 96 well microplates เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดต่อ 96 well microplates ต่าง ๆ กัน เช่น ที่ความเข้มข้น 10, 100, 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ดังรูปที่ 3-4 ในแต่ละความเข้มข้น จะทำการทดลองแบบ triplicate จากนั้นปิเปต brine shrimp ประมาณ 10-15 ตัว (ใน 100 ไมโครลิตร ของ brine suspension) ใส่ในแต่ละหลุม (well) ดังนั้นจะมีจำนวน brine shrimp ประมาณ 30 ตัว/ความเข้มข้น

**7. การวิเคราะห์ผล** [3,5]

หลังจากการ incubate นาน 24 ชั่วโมง จะนับจำนวน brine shrimp ที่ตายในแต่ละหลุม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เติม methanol เพื่อฆ่า brine shrimp แล้วนับจำนวน brine shrimp ทั้งหมด




**รูปที่ 3-4** แสดงการเตรียมสารสกัดใน 96 well microplates

**8. วิธีการหา ค่า $LC_{50}$ เพื่อวิเคราะห์ผล**

8.1 คำนวณหาร้อยละการตายของ brine shrimp (% Lethality) จากพืชสมุนไพรไทย วงศ์ Annonaceae และวงศ์ Meliaceae โดยใช้สูตร

% การตายของ brine shrimp = % การรอดชีวิตของ brine shrimp ใน control - % การรอดชีวิตของ brine shrimp ในสารสกัด

8.2 นำข้อมูลมาหาค่า $LC_{50}$ (50% of lethality concentration) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการคำนวณ (Zenite Data System 1984)

8.3 นำค่าที่ได้จากกราฟในข้อ 8.2 มาวิเคราะห์ผลว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรแต่ละชนิดมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของ brine shrimp หรือไม่