บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างว่านสาวหลงจากทั้งหมด 5 แหล่ง ในช่วงเดือน พฤษภาคม ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2549 ประกอบด้วย

อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ (CM1)

อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ (CM2)

อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ (CM3)

อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน (LPN)

อำเภอสอง จังหวัดแพร่ (PRA)

ตัวอย่างพืชส่วนหนึ่งนำไปปลูกในพื้นที่เดียวกันในอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ เพื่อนำไปตรวจสอบชนิด และตัวอย่างอีกส่วนนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหย

2. สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

2.1 สารเคมี

1. Absolute ethanol	Merck
2. Acetone	Merck
3. 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	Wako
4. Chloroform	Analar
5. Diazepam	Thai Government Pharmaceutical Organization
6. Dipotassium peroxidodisulphate	CARLO ERBA
7. Ethanol	Merck
8. Ethyl acetate	Analar
9. Glacial acetic acid	Merck
10. Hydrochloric acid	Merck
11. 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid	Aldrich
12. Iron (III) chloride hexahydrate	Sigma
13. Iron (II) sulfate heptahydrate	Scharlau
14. Nitric acid	Univar
15. Pentobarbital	Ceva
16. Silver nitrate	Analar
17. Sodium acetate trihydrate	Fisher

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

18. Sodium chloride	Merck
19. Sodium sulphate anhydrous	Univar
20. 2,4,6,-Tri(2-pyridyl)s-triazine	Fluka
21. Toluene	Fisher
22. 082 C.P. Mice feed	S.W.T.

2.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย
   - condenser
   - clevenger apparatus ชนิดเบากว่าน้ำ
   - round bottom flask
   - heating mantle (ELECTROMANTLE EM 0500/C MR1, ISOPAD U2/102)
2. เครื่องชั่งวิเคราะห์
   - OHAUS ARC 120
   - SARTORIUS ME 2155
3. Micropipet
   - GILSON MODEL PIPETMAN P20, P200, P1000
4. Ultraviolet-Visible Spectrophotometer
   - SPECTRONIC GENESYS2
5. Vortex mixer
   - SUPER-MIXER 1291
6. Polarimeter
   - KRUSS Automatic Digital Polarimeter P3001 RS
7. Refractometer
   - KRUSS Electronic ABBE-Refractometer AR2008
8. Infra-Red Spectrophotometer
   - NICOLET NEXUS A70 FT-IR
9. Gas Chromatography
   - Shimadzu GC-14B
10. Gas Chromatography/Mass Spectrometry
    - Shimadzu GCMS QP 2010 Plus
11. OPTO-VARIMEX
    - OPTO-VARIEX model 0043-501L
12. Beaker
13. Volumetric flask
14. Cylinder
15. Burette
16. Pipette

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. วิธีการทดลอง

3.1. การตรวจสอบชนิดพืช

3.1.1. ตัวอย่างที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ จัดทำตัวอย่างพืชแห้ง (Herbarium specimen) เก็บไว้ ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.1.2. ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆนำไปปลูกในบริเวณเดียวกัน ในอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อโตเต็มที่ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อส่งตรวจ

3.1.3. ตัวอย่างจากข้อ 3.1.1. และ 3.1.2. นำไปเทียบตัวอย่างพืชแห้ง ณ หอพรรณไม้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และตรวจสอบ โดยนักพฤกษศาสตร์

3.2. การกลั่นน้ำมันหอมระเหย

นำพืชตัวอย่างล้างให้สะอาด แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ใบ ก้านใบ และลำต้นใต้ดิน ทำการลดขนาดโดยการหั่นให้มีขนาดครึ่งนิ้ว จากนั้นสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีกลั่นด้วยน้ำ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แยกเฉพาะน้ำมันหอมระเหยออกมา และใช้ sodium sulphate anhydrous กำจัดน้ำที่เหลือ

3.3. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ

3.3.1. Determination of relative density (อ้างอิงจาก ISO 279 second edition 1998)

1. ทำความสะอาด pycnometer แล้วล้างด้วยเอทานอล ทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนักของ pycnometer เปล่าด้วยเครื่องชั่งวิเคราะห์
2. เติมน้ำกลั่นลงใน pycnometer จนเต็ม แล้วชั่งน้ำหนัก ทำความสะอาด และทำให้แห้ง
3. ทำซ้ำข้อ 1-2 โดยเปลี่ยนจากน้ำกลั่นเป็นน้ำมันหอมระเหย
4. คำนวณค่า Relative density

ตามสมการ $$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

เมื่อ m_0 = น้ำหนักของ pycnometer เปล่า (g)
m_1 = น้ำหนักของ pycnometer ที่บรรจุน้ำกลั่น (g)
m_2 = น้ำหนักของ pycnometer ที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย (g)

3.3.2. Determination of refractive index (อ้างอิงจาก ISO 280 second edition 1998)

1. ทำความสะอาด upper และ lower prism ด้วยเอทานอล 3-4 หยด
2. หยดน้ำมันหอมระเหย 2-3 หยดลงบน lower prism หมุนปิด refractometer ด้วย upper prism และ clamp ให้เข้าล็อค อ่านค่าที่ได้ บันทึกอุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3. Determination of optical rotation (อ้างอิงจาก ISO 592 second edition 1998)

1. เปิดเครื่อง polarimeter ประมาณครึ่งชั่วโมง
2. เตรียมน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นที่เหมาะสม
3. บรรจุน้ำมันหอมระเหยลงในหลอดขนาด 100 mm อ่านค่าที่ได้ และทำความสะอาดด้วยเอทานอล
4. คำนวณ specific rotation ตามสมการ

$$[\alpha] = \frac{\alpha_D^t}{c}$$

เมื่อ α_D^t = ค่า optical rotation ที่อ่านได้จากเครื่อง

c = ค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (g/ml)

3.3.4. Evaluation of miscibility in ethanol (อ้างอิงจาก ISO 875 second edition 1999)

1. เตรียม standard solution of opalescence โดยเติม silver nitrate 0.1 M 0.5 ml ลงใน sodium chloride solution 0.0002 M 50 ml แล้วหยด conc. nitric acid 1 หยด คนให้เข้ากัน เพื่อเตรียมเป็นสารละลายความขุ่นมาตรฐาน
2. เตรียมสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วบรรจุลงในบิวเรต
3. ปิเปตน้ำมันหอมระเหย 1 ml ลงใน volumetric flask
4. ปล่อยสารละลายเอทานอลลงใน volumetric flask ทีละ 0.1 ml จนเกิดการละลายที่สมบูรณ์ จดปริมาตรสารละลายเอทานอลที่ใช้
5. ปล่อยสารละลายเอทานอลลงใน volumetric flask ทีละ 0.1 ml จนสารละลายขุ่น จดปริมาตรสารละลายเอทานอลที่ใช้
6. ปล่อยสารละลายเอทานอลลงใน volumetric flask ทีละ 0.1 ml จนสารละลายใสอีกครั้ง จดปริมาตรสารละลายเอทานอลที่ใช้

3.3.5. Determination of water (อ้างอิงจาก THP vol.II 2000)

โดยใช้วิธี Azeotropic Distillation เติม toluene 200 ml และน้ำกลั่น 2 ml ลงใน round bottom flask ทำการกลั่นประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง อ่านปริมาตรน้ำที่ได้ จากนั้นเติมตัวอย่างพืชให้มีปริมาตรน้ำ 2-3 ml กลั่น toluene ด้วยอัตรา 2 หยดต่อวินาที จนน้ำกลั่นออกมาหมด จากนั้นเพิ่มเป็น 4 หยดต่อวินาที เมื่อน้ำกลั่นออกมาหมดให้ล้างภายใน condenser ด้วย toluene เล็กน้อย กลั่นต่ออีก 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านปริมาตรน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาตรน้ำ คำนวณจากสมการ

$$\frac{100(n'-n)}{p}$$

เมื่อ p = น้ำหนักของตัวอย่าง (g)

n = ปริมาตรน้ำที่อ่านได้ก่อนใส่ตัวอย่าง (ml)

n′ = ปริมาตรน้ำทั้งหมดแล้วหลังกลั่นทั้ง 2 ครั้ง (ml)

3.3.6. Determination of volatile oil (อ้างอิงจาก THP vol.II 2000)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างใส่ใน round bottom flask ทำการกลั่นเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง อ่านค่าปริมาตรน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้

3.3.7. IR Spectroscopy

ทำความสะอาด KBr disc ด้วย acetone ทำให้แห้ง จากนั้นหยดน้ำมันหอมระเหยแล้วประกบให้เข้ากัน และนำไปวัดค่า Transmittance

3.3.8. Gas Chromatography/Mass Spectrometry

เตรียมสารละลายของน้ำมันหอมระเหยใน absolute alcohol ความเข้มข้น 0.5 % ฉีดลงในเครื่อง GC ปริมาตร 1 µl โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

Instrument model	Shimadzu GC-MS QP 2010 Plus
Column	DB-5 length 30.0 m film thickness 0.25 µm inner diameter 0.25 mm
Carrier gas	He
Injector temperature	180.0 °C
Detector	EI-MS, 70 eV
Split ratio	1:100

Column temperature programme

	Rate (°C/min)	Temperature(°C)	Hold time (min)
1	----	60.0	0.00
2	7.0	150.0	1.00
3	10.0	230.0	3.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.9. Gas Chromatography

เตรียมสารละลายของน้ำมันหอมระเหยใน absolute alcohol ความเข้มข้น 0.5 % ฉีดลงในเครื่อง GC ปริมาตร 3 µl โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

Instrument model	Shimadzu GC 14 B
Column	DB-1 length 30.0 m film thickness 1.50 µm inner diameter 0.53 mm
Carrier gas	N_2
Injector temperature	150.0 °C
Detector temperature	270.0 °C

Column temperature programme

	Rate (°C/min)	Temperature(°C)	Hold time (min)
1	----	50.0	5.00
2	0.5	58.0	0.00
3	0.8	65.0	0.00
4	10.0	150.0	0.00
5	5.0	250.0	5.00

3.3.10. Thin Layer Chromatography

1. อบแผ่น TLC ที่อุณหภูมิ 105 °C 1 ชั่วโมง
2. ทิ้งไว้ให้เย็นเตรียม developing solvent 2 ระบบ คือ toluene : ethyl acetate อัตราส่วน 93 : 7 และ 100 % Chloroform
3. หยดน้ำมันหอมระเหยลงบน TLC จากนั้นจุ่มลงใน developing solvent ที่อิ่มตัวอยู่ภายใน tank รอจน developing solvent เคลื่อนที่มาจนถึงระยะทางที่กำหนด นำ TLC ออกมาจาก tank ทิ้งไว้ให้แห้ง
4. นำ TLC มาตรวจสอบภายใต้แสง UV ความยาวคลื่น 254 nm จากนั้นนำไปพ่นด้วยน้ำยาฉีดพ่น anisaldehyde in sulfuric acid อบที่ 110 °C 10 นาที
5. คำนวณค่า R_f ที่ได้

3.4. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.4.1. ABTS Method

1. เตรียม $ABTS^{\bullet+}$ stock solution โดยผสม ABTS 7 mM กับ $K_2S_2O_8$ 2.45 mM ในอัตราส่วน 1 : 0.5 mole/mole ตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างสมบูรณ์
2. เตรียม working solution $ABTS^{\bullet+}$ โดยนำมาเจือจางด้วย absolute alcohol แล้วนำไปวัดค่า absorbance ที่ 734 nm ให้ได้ค่าประมาณ 0.7-0.9
3. เตรียมสารมาตรฐาน Trolox ให้มีความเข้มข้น 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 และ 0.1 mM และนำไปวัดค่า absorbance ที่ 734 nm เพื่อเตรียมกราฟมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. วัดค่า absorbance ของสารละลายตัวอย่าง และคำนวณหาค่า %Inhibition เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(A_{\text{reagent}} - A_{\text{standard}})}{A_{\text{reagent}}} \times 100$$

เมื่อ $A_{reagent}$ = ค่า Absorbance ของ working solution $ABTS^{\bullet+}$

$A_{standard}$ = ค่า Absorbance ของตัวอย่าง

3.4.2. FRAP Method

1. เตรียม working FRAP reagent โดยทำการผสม 300 mM acetate buffer pH 3.6 : 10 mM TPTZ : 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 10 : 1 : 1
2. เตรียมสารมาตรฐาน $FeSO_4$ ที่ความเข้มข้น 1000, 500, 250, 100 และ 50 µM และนำไปวัดค่า absorbance ที่ 593 nm
3. วัดค่า absorbance ของสารละลายตัวอย่าง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน $FeSO_4$

3.5. ศึกษาฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลางของน้ำมันหอมระเหยในสัตว์ทดลอง

3.5.1. การศึกษา Open field test

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นหนูขาว สายพันธุ์ Sprague Dawley (สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม) เพศผู้ น้ำหนัก 200-250 กรัม เลี้ยงสัตว์ทดลองให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่ 3-5 วัน ก่อนทำการทดลอง ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองถูกควบคุมอุณหภูมิที่ 25.0±5.0 ^{0}C และมีการเปิด-ปิดแสงสว่างช่วงละ 12 ชั่วโมง โดยจะเปิดให้แสงสว่างระหว่างเวลา 07.00-19.00 น. ให้สัตว์ทดลองได้รับน้ำและอาหารไม่จำกัด ในการทดลองทำการชั่งน้ำหนักของหนูทดลอง แบ่งหนูออกเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่าง เตรียมกล่อง animal activity cage ขนาด 17 x 17 x 8.5 นิ้ว ส่วนพื้นจะมีหลุมสำหรับใส่สำลี 4 หลุม ไว้สำหรับหยดตัวอย่าง ภายในจะมีหลอดไฟขนาด 40 วัตต์ อยู่สูงจากพื้น 40 เซนติเมตร ทำการทดลองในตอนกลางวัน ทำในที่มืด และเปิดเฉพาะหลอดไฟที่ติดตั้งไว้ โดยเครื่อง OPTO-VARIMEX จะประกอบด้วย infrared sensor 15 อัน ห่างกันประมาณอันละ 1 นิ้ว เมื่อสัตว์ทดลองเคลื่อนที่ผ่านลำแสง infrared เครื่องจะทำการแปรผลออกมาเป็นค่า time distance traveled

ในกลุ่มตัวอย่างจะทำการหยดน้ำมันหอมระเหยตัวอย่างลงในหลุมสำลี หลุมละ 100 µl ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำหนูทดลองวางลงตรงกลางกล่อง animal activity cage และบันทึกค่าการเคลื่อนที่ (distance traveled) ของหนูทดลองด้วยเครื่อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คอมพิวเตอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับหนูกลุ่มควบคุมจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม

3.5.2. การศึกษา Locomotor activity

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นหนูขาว สายพันธุ์ Sprague Dawley (สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม) เพศผู้ น้ำหนัก 200-250 กรัม เลี้ยงสัตว์ทดลองให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่ 3-5 วัน ก่อนทำการทดลอง ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองถูกควบคุมอุณหภูมิที่ 25.0±5.0 ^{0}C และมีการเปิด-ปิดแสงสว่างช่วงละ 12 ชั่วโมง โดยจะเปิดให้แสงสว่างระหว่างเวลา 07.00-19.00 น. ให้สัตว์ทดลองได้รับน้ำและอาหารไม่จำกัด ในการทดลองทำการชั่งน้ำหนักของหนูทดลอง แบ่งหนูออกเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่าง เตรียมกล่อง animal activity cage ขนาด 17 x 17 x 8.5 นิ้ว ส่วนพื้นจะมีหลุมสำหรับใส่สำลี 4 หลุม ไว้สำหรับหยดตัวอย่าง ทำการทดลองในตอนกลางคืน โดยเครื่อง OPTO-VARIMEX จะประกอบด้วย infrared sensor 15 อัน ห่างกันประมาณอันละ 1 นิ้ว เมื่อสัตว์ทดลองเคลื่อนที่ผ่านลำแสง infrared เครื่องจะทำการแปรผลออกมาเป็นค่า time distance traveled

ในกลุ่มตัวอย่างจะทำการหยดน้ำมันหอมระเหยตัวอย่างลงในหลุมสำลี หลุมละ 100 µl ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำหนูทดลองวางลงตรงกลางกล่อง animal activity cage และบันทึกค่าการเคลื่อนที่ (distance traveled) ของหนูทดลองด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับหนูกลุ่มควบคุมจะใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม

3.5.3. การศึกษา Pentobarbital induced sleeping time

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นหนูถีบจักร สายพันธุ์ ICR mouse (สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม) เพศผู้ น้ำหนัก 30-40 กรัม เลี้ยงสัตว์ทดลองให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่ 3-5 วัน ก่อนทำการทดลอง ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองถูกควบคุมอุณหภูมิที่ 25.0±5.0 ^{0}C และมีการเปิด-ปิดแสงสว่างช่วงละ 12 ชั่วโมง โดยจะเปิดให้แสงสว่างระหว่างเวลา 07.00-19.00 น. ให้สัตว์ทดลองได้รับน้ำและอาหารไม่จำกัด ชั่งน้ำหนักของหนูทดลอง แบ่งหนูออกเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มตัวอย่าง โดยเตรียมกล่องขนาด 17 x 17 x 8.5 นิ้ว ส่วนพื้นจะมีหลุม สำหรับใส่สำลี 4 หลุม ไว้สำหรับหยดตัวอย่าง ในกลุ่มตัวอย่างจะทำการหยดน้ำมันหอมระเหยตัวอย่างลงในหลุมสำลี หลุมละ 100 µl ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำหนูทดลองวางลงในกล่อง ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วทำการฉีด Pentobarbital sodium เข้าช่องท้อง (35 mg/kg i.p.) บันทึกระยะเวลาที่หนูเริ่มสูญเสีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

righting reflex 3 ครั้งติดต่อกัน และใช้น้ำกลั่น และ Diazepam (2 mg/kg i.p.) ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยามาตรฐานตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved