

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 ขอบเขตงานวิจัย

เนื่องจากไม่มีผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด genistein ในสัตว์ทดลอง ส่งผลให้งานวิจัยนี้ไม่สามารถทำการศึกษาทางคลินิกได้อย่างสมบูรณ์ ขอบเขตงานวิจัยจึงปรับเปลี่ยนเป็นสองส่วน ดังนี้

1. การกำหนดรูปแบบการศึกษา genistein ทางคลินิก
2. การพัฒนาและตรวจสอบวิธีวิเคราะห์สาร genistein ในร่างกาย

เพื่อเตรียมการในกรณีที่มีการศึกษาพิษวิทยาของสารสกัด genistein ในสัตว์ทดลอง และพิสูจน์ได้ว่าสารสกัดดังกล่าวมีความปลอดภัยที่จะสามารถทำการศึกษาทางคลินิกได้จริง จะได้มีวิธีการที่สามารถทำการศึกษาต่อไปได้ ดังนี้

3.2 การกำหนดรูปแบบการศึกษา genistein ทางคลินิก

3.2.1 ข้อกำหนดเบื้องต้น

1. ผู้ที่บริโภคนมถั่วเหลืองเป็นประจำ หมายถึง ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง 3-5 ครั้ง/สัปดาห์ ผู้ที่ไม่บริโภคถั่วเหลือง หมายถึง ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองน้อยกว่า 2 ครั้ง/สัปดาห์ เกณฑ์การจำแนกสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างศึกษาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มผู้บริโภคนมถั่วเหลือง-ไม่บริโภค (ร้อยละ 36.73) และกลุ่มผู้บริโภคนมถั่วเหลือง-ทุกวัน (ร้อยละ 63.27) โดยพิจารณาจากผลการเก็บข้อมูลการรับประทานนมถั่วเหลืองของนักศึกษาเกษตรศาสตร์ชั้นปีที่ 4 (20/02/2006) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการสำรวจการรับประทานนมถั่วเหลืองของนักศึกษาชั้นปีที่ 4 ปี 2549

จำนวนมือในการบริโภคนมถั่วเหลือง / สัปดาห์	ความถี่ (ร้อยละ)
ไม่บริโภค	26 (26.53)
1 - 2	10 (10.20)
3 - 5	42 (42.86)
6 - 7	20 (20.41)
รวม	98 (100)

2. อาสาสมัครที่บริโภคน้ำนมถั่วเหลืองทุกวัน ล้างหน้าก่อนวันศึกษาวิจัย 3 เดือน ถูกจัดอยู่ในกลุ่มบริโภคเป็นประจำ ขณะที่ผู้ที่ไม่บริโภคภายใน 3 เดือนก่อนศึกษาจัดอยู่ในประเภทผู้ที่ไม่บริโภค ทั้งนี้ผู้วิจัยจะไม่พิจารณาสาร isoflavone ที่อาจได้รับจากอาหารชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีรายงานว่าปริมาณ isoflavone ในอาหารทั่วไปมีปริมาณที่ต่ำและไม่เพียงพอที่จะตรวจพบได้ในกระแสเลือดเมื่อเทียบกับปริมาณสาร isoflavone ที่มีในถั่วเหลือง (Aisling Ahern S, 2002)

3. ให้ถือว่าอาสาสมัครผู้เข้าร่วมการทดลองเป็นผู้มีสุขภาพดี ถึงแม้จะไม่ได้ทำการตรวจสุขภาพตามเกณฑ์การคัดเลือกที่กำหนด เนื่องจากผู้วิจัยเป็นอาสาสมัครเองและเป็นผู้มีสุขภาพดีมาตลอด

4. ปริมาณน้ำนมถั่วเหลืองที่ให้บริโภค คำนวณจากผลการศึกษาปริมาณ genistein ในน้ำนมถั่วเหลืองกลั่นโดยใช้วิธีการสกัด (acid hydrolysis) และวิธีตรวจวิเคราะห์เดียวกันกับวิธีที่ใช้ในโครงการวิจัยย่อยที่ 2 ของชุดโครงการเดียวกัน (โดย จารุวรรณ ธนวิรุพห์) ซึ่งพบว่า น้ำนมถั่วเหลือง 1 มิลลิลิตร มีปริมาณ genistein ก่อนและหลังการทำ in vitro acid hydrolysis ที่อุณหภูมิประมาณ 80° C มีค่าประมาณ 4 และ 15 µg, ตามลำดับ (จารุวรรณ ธนวิรุพห์ และนัททิ พัชรวานิช, 2549) และเมื่อพิจารณาตามอุณหภูมิร่างกายของมนุษย์ จึงตั้งสมมติฐานว่า การรับประทานน้ำนมถั่วเหลือง 1 ml จะให้ปริมาณ genistein ในร่างกายประมาณ 4 µg

5. การวิเคราะห์ปริมาณ genistein ในกระแสเลือดวิเคราะห์ในเบื้องต้น ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นโดยใช้เครื่อง HPLC (สารนิพนธ์ คณะเภสัชศาสตร์ ม.อุบลราชธานี 2549, จารุวรรณ ธนวิรุพห์)

3.3 รูปแบบการศึกษา

การศึกษาเชิงทดลอง (Experimental study)

3.4 หมวดการทดลองทางคลินิก

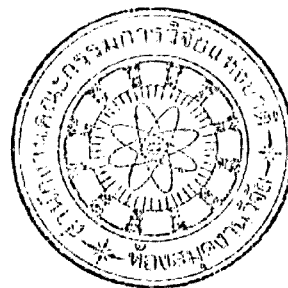
3.4.1 กลุ่มตัวอย่าง อาสาสมัครสุขภาพดี 2 คน

3.4.2 เครื่องมือ

สารเคมี น้ำนมถั่วเหลือง

อุปกรณ์

1. Syringe ขนาด 3 ml , 5 ml , needle เบอร์ 20
2. หลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว (Lithium heparin) 4.5 ml
3. สำลี
4. แอลกอฮอล์



ดำเนินการทดลองโดย	ผู้วิจัยและผู้ช่วย
วันที่	15.07.2555
เลขที่บันทึก	243947
ชื่อผู้บันทึก	

5. เครื่องวัดความดันแบบปรอท
6. เครื่องวัดอุณหภูมิ

3.5 หมวดการทดลองทางเคมี

สารเคมี

1. ACN ชนิด HPLC grade
2. Phosphoric acid ชนิด HPLC grade
3. Genistein standard จากบริษัท SIGMA- ALDRICH
4. Fluorescence standard จากบริษัท SIGMA- ALDRICH

อุปกรณ์

1. เครื่อง Centrifuge รุ่น 4236 A CWS[®] (cool working system) Class I (Cenelec HD 250) , Italy
2. Centrifuge tube ขนาด 15 ml
3. Appendrof ขนาด 1.5 ml
4. เครื่อง HPLC : รุ่น Shimadzu Class - VP

Column : ระบบ reverse phase C₁₈

Wave length: 255 nm

Flow rate = 1 ml/min

Run time 65 นาที

Retention time genistein 36 นาที

Retention time fluorescein 42 นาที (internal standard)

Mobile phase: gradient

เวลาที่ 0-3 นาที ACN : Phosphoric acid 10% : 90%

เวลาที่ 3-43 นาที ACN : Phosphoric acid 35% : 65%

เวลาที่ 43-50 นาที ACN : Phosphoric acid 50% : 50%

เวลาที่ 50-65 นาที ACN : Phosphoric acid 10% : 90%

3.6 ขั้นตอนการวิจัย

3.6.1 การวิจัยทางคลินิก

1. ผู้เข้าร่วมการวิจัยบันทึกแบบฟอร์มการรับประทานอาหารประจำวัน เป็นเวลา 3 เดือน ก่อนการศึกษา เพื่อยืนยันการเป็นตัวแทนของกลุ่มศึกษาแต่ละกลุ่ม (กลุ่มบริโภคน้ำผลไม้เป็นประจำ และกลุ่มผู้ไม่บริโภคน้ำผลไม้)

2. ให้อาสาสมัครรับประทานน้ำนมถั่วเหลือง ครั้งละ 4 ถ้วย ก่อนวันศึกษาทางคลินิก นาน 40 ชั่วโมง โดยรับประทานทุก 8 ชั่วโมง เพื่อให้ระดับ genistein ถึงระดับ steady state

3. อาสาสมัครเข้ารับการศึกษาก่อนวันศึกษาทางคลินิกในโรงพยาบาล โดยอาสาสมัครอดอาหาร ข้ามคืนเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง จากนั้นรับประทานน้ำนมถั่วเหลืองจำนวน 8 ถ้วย ในวันทำการศึกษา (ในช่วงเวลา 6.30-7.30 น.)

4. หลังจากได้รับน้ำนมถั่วเหลือง อาสาสมัครต้องอยู่ในสภาพนิ่งตรง

5. อนุญาตให้บริโภคน้ำและอาหารได้ที่เวลา 2 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับหลังจากบริโภคผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองเข้าไปแล้ว

6. เก็บตัวอย่างเลือดครั้งละ 5 ml ที่เวลา 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 และ 36 ชั่วโมง หลังจากบริโภคผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลือง ซึ่งขณะที่ทำการเจาะเลือดอาสาสมัครจะต้องอยู่ที่โรงพยาบาลโดยอยู่ในการควบคุมของแพทย์ และพยาบาลผู้ทำการเจาะเลือด หลังจากเจาะเลือดแต่ละครั้ง อาสาสมัครจะได้รับการตรวจวัดความดัน ชีพจร และอุณหภูมิทุกครั้ง

7. ตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บในหลอดที่บรรจุ heparin และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm นาน 20 นาที เพื่อแยกเก็บพลาสมา และเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

8. อาสาสมัครต้องงดจากอาหารพวกกาแฟและแอลกอฮอล์รวมถึงผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง (ยกเว้นผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองที่ใช้ในการศึกษานี้) ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นของการศึกษาจนถึงระยะเวลาเสร็จสิ้นจากการทดลอง

9. นำตัวอย่างเลือดวิเคราะห์หาปริมาณ genistein โดยวิธี HPLC

10. คำนวณค่าพารามิเตอร์เภสัชจลนศาสตร์ ($C_{\max}$, $t_{\max}$, AUC, $t_{1/2}$) เปรียบเทียบผล

3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณ genistein ในเลือด

1. การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร (Recovery study)

เป็นการเปรียบเทียบปริมาณสารสกัด genistein จาก plasma กับสาร genistein ที่เตรียมขึ้นในความเข้มข้นต่ำ (2.858 mcg/ml) และ spiked ลงไปใน plasma ที่สกัดโปรตีนออกแล้ว หากสารที่สกัดได้ มีปริมาณใกล้เคียงกับสารที่ไม่ผ่านวิธีการสกัด วิธีการสกัดนี้ย่อมเป็นที่น่าเชื่อถือ การเตรียมพลาสมาที่สกัดโปรตีนออกแล้ว (plasma free protein)

1. เก็บสารละลายส่วนใส ด้านบน (พลาสมา) จากหลอดเก็บเลือดที่มี heparin เป็นสารป้องกันการแข็งตัว บันทึกปริมาตร
2. เติม 90% ACN เท่ากับจำนวนส่วนใสที่วัดได้
4. vortex 15 นาที
5. centrifuge 3000 rpm 30 นาที
6. เก็บเฉพาะส่วนใส วัดปริมาตร

Pre-extraction

1. เติม genistein 20 $\mu\text{g/ml}$ และ fluorescein 32 $\mu\text{g/ml}$ อย่างละ 1 ml ลงใน plasma free protein ปริมาตร 5 ml
2. นำสารละลายกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.45 μm แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC 20 μl (n=2)

Post-extraction

1. เติม genistein 20 $\mu\text{g/ml}$ และ fluorescein 32 $\mu\text{g/ml}$ อย่างละ 1 ml ลงใน whole blood ปริมาตร 5 ml
2. เติม 7 ml 90 % ACN เพื่อทำการตกตะกอนโปรตีน
3. vortex 15 นาที
4. นำไป centrifuge 3000 rpm 30 นาที
5. วัดปริมาตรส่วนใส
6. นำสารละลายกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.45 μm และฉีดเข้าเครื่อง HPLC 20 μl (n=2)

2. การเตรียม plasma genistein standard curve

เตรียม plasma genistein standard ที่ความเข้มข้น 16 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ (จาก Stock solution 32 $\mu\text{g/ml}$ โดยวิธี serial dilution) โดยมี fluorescein 320 $\mu\text{g/ml}$ เป็น internal standard

3. การวิเคราะห์ปริมาณ genistein ในตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร

การวิเคราะห์สารตัวอย่าง

1. Pipett plasma ที่ได้จากการศึกษา ณ เวลา ต่างๆ (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36 hr) หลอดละ 2 ml
2. เติม 90%ACN ในปริมาตร 2 ml ทุกหลอด

3. นำไป vortex 1-2 นาที และ centrifuge 3000 rpm 20 นาที
4. Pipett 300 μ l ของส่วนใสลงใน Eppendorf ขนาด 1.5 ml (เก็บส่วนที่เหลือเข้าตู้เย็น)
5. Pipett 300 μ l ของ fluorescein 320 μ g/ml ผสมลงไป
6. เขย่าด้วยมือเบาๆ
7. กรองสารละลายผ่านหัวกรองขนาด 0.45 μ m
8. ฉีดเข้า HPLC 100 μ l (n=3) (เก็บส่วนที่เหลือเข้าตู้เย็น)

3.6.3 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ *genistein* ในกระแสดเลือด

สารเคมี

1. Methanol ชนิด HPLC grade
2. Boric acid ชนิด ACS for analysis
3. Genistein standard จากบริษัท SIGMA-ALDRICH
4. Sodium hydroxide ชนิด ACS ISO for analysis

เครื่องมือ

1. Capillary Electrophoresis โดยสภาวะในการตรวจวัดเป็นดังนี้

- ใช้ Capillary Zone Electrophoresis (CZE)
- Column : fused-silica capillary 57 cm (50 cm. to detector)x50 μ m i.d.
- Buffer solution : 0.1 M Borate (pH 9.5) -5% Methanol
- Voltage : +18 kV
- Pressure injection : 50 nbar
- Operate temperature : 25°C
- Detected wavelength : 214 nm

2. High Performance Liquid Chromatography โดยสภาวะในการตรวจวัดเป็นดังนี้

- Mobile phase 0.2% acetic acid : acetonitrile (1:1)
- Column : Atlantis dC 18 Reverse-phase chromatography (150mm x 2.1mm, ID 5mm)
- Flow rate 0.4 mL/min
- อุณหภูมิของคอลัมน์ 40°C
- Run time 15 นาที

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายมาตรฐาน genistein ความเข้มข้น 500 ppm (mg/L) ใน methanol สำหรับการวิเคราะห์ด้วย CE

ชั่ง genistein ($C_{15}H_{10}O_5$, Mw = 270.24 g/mol) มาอย่างละเอียด 0.0250 g ใส่ในปิเปตเตอร์ ขนาด 25 mL ละลายด้วย methanol เทสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด 50 mL และปรับปริมาตรให้ได้ 50 mL ด้วย methanol จนครบปริมาตร

2. สารละลายบัฟเฟอร์

a) สารละลาย stock borate buffer ความเข้มข้น 1.0 M ปริมาตร 100 mL

ชั่ง boric acid (H_3BO_3 , Mw = 61.81 g/mol) มาอย่างละเอียด 6.1810 g ใส่ลงในปิเปตเตอร์ขนาด 100 mL ละลายด้วย deionized water จากนั้นเทสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL ด้วย deionized water จนครบปริมาตร

b) สารละลาย borate buffer pH 9.5 ความเข้มข้น 100 mM ปริมาตร 100 mL

pipette สารละลาย stock standard buffer ความเข้มข้น 1.0 M มา 10 mL ใส่ในปิเปตเตอร์ขนาด 100 mL เติม deionized water ลงไปประมาณ 80 mL ปรับ pH ให้ได้ 9.5 ด้วย 3M NaOH solution จากนั้นเทสารละลายลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL ด้วย deionized water จนครบปริมาตร

3. สารละลาย standard genistein สำหรับการ external calibration method

สารละลาย standard genistein สำหรับการ external standard curve ความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 60 ppm ตามลำดับ โดยเตรียมจากการ pipette สารละลาย stock genistein 500 ppm ใน methanol ตามปริมาตรที่คำนวณได้ใส่ใน volumetric flask ขนาด 5 mL จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 5 mL ด้วย 100 mM borate buffer pH 9.5 จนครบปริมาตร

4. การเตรียมตัวอย่างสำหรับ HPLC

เติมสารละลายมาตรฐาน ความเข้มข้น 2 ppm ลงในหลอดขนาด 400 μ L จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 5 mL ด้วยน้ำ DI และทำการเตรียม plasma standard โดยวิธี serial dilution ดังนี้

4.1 Stock genistein standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 20 mL ชั่ง genistein std. 2 mg ละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรด้วย methanol ในขวดปริมาตรขนาด 20 mL

4.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน genistein ความเข้มข้น 20 mg/L ปริมาตร 20 mL.: Pipet stock std.solⁿ 4 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20 mL

4.3 เตรียม Plasma genistein standard solution

4.3.1 pipet genistein solⁿ ในข้อ 4.2 320 μ L + plasma 180 μ L ได้ plasma std. ความเข้มข้น 16 mg/L

4.3.2 pipet genistein solⁿ ในข้อ 3.1 250 μ L + plasma 250 μ L ได้ plasma std. ความเข้มข้น 8 mg/L

4.3.3 pipet genistein solⁿ ในข้อ 3.2 250 μ L + plasma 250 μ L ได้ plasma std. ความเข้มข้น 4 mg/L

4.3.4 pipet genistein solⁿ ในข้อ 3.3 250 μ L + plasma 250 μ L ได้ plasma std. ความเข้มข้น 2 mg/L

4.3.5 pipet genistein solⁿ ในข้อ 3.4 250 μ L + plasma 250 μ L ได้ plasma std. ความเข้มข้น 1 mg/L

4.3.6 pipet genistein solⁿ ในข้อ 3.5 250 μ L + plasma 250 μ L ได้ plasma std. ความเข้มข้น 0.5 mg/L

4.3.7 pipet genistein solⁿ ในข้อ 3.6 250 μ L + plasma 250 μ L ได้ plasma std. ความเข้มข้น 0.25 mg/L

4.4 นำ plasma std. แต่ละความเข้มข้นมาเติม IS (fluorescence) ความเข้มข้น 5 mg/L ปริมาตร 1000 μ L

4.5 เขย่า 1-2 นาที และกรองผ่านหัวกรอง 0.45 μ m

4.6 นำไปฉีดเข้า HPLC 20 μ L (n=3)

4.7 การวิเคราะห์ปริมาณ genistein ในตัวอย่างเลือดอาสาสมัครเพื่อทดสอบเทคนิคที่พัฒนาโดย pipet 500 μ L ของส่วนใสลงใน Eppendorf ขนาด 1.5 mL เติม 1000 μ L ของ fluoresceine 5 mg/L เขย่า กรองผ่านหัวกรอง 0.45 μ m นำไปฉีดเข้า HPLC 20 μ L (n=3)

5. สารละลาย standard genistein สำหรับ internal calibration method HPLC

สารละลาย standard genistein สำหรับ external standard curve ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 ppm ตามลำดับ โดยเตรียมจากการ pipette สารละลาย stock genistein 100 ppm ตาม

ปริมาตรที่คำนวณได้ และเติม 100 M Fluorecien 200 μL ใส่ใน volumetric flask ขนาด 10 mL. จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 10 mL ด้วยน้ำ DI

6. การเตรียมตัวอย่างสำหรับ CE โดยการทำให้ plasma standard วิธี serial dilution

6.1 Stock genistein standard solution ความเข้มข้น 100 mg/L ปริมาตร 20 mL. ชั่ง genistein std. 2 mg ละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรด้วย methanol ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20 mL

6.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน genistein ความเข้มข้น 20 mg/L ปริมาตร 20 mL.: Pipet stock std.solⁿ 4 mL ปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ในขวดปรับปริมาตรขนาด 20 mL

6.3 เตรียม Plasma genistein standard solution

6.3.1 pipet genistein solⁿ ในข้อ 6.2 320 μL + plasma 180 μL ได้ plasma std. ความเข้มข้น 16 mg/L

6.3.2 pipet genistein solⁿ ในข้อ 6.2 250 μL + plasma 250 μL ได้ plasma std. ความเข้มข้น 8 mg/L

6.3.3 pipet genistein solⁿ ในข้อ 6.2 250 μL + plasma 250 μL ได้ plasma std. ความเข้มข้น 4 mg/L

6.3.4 pipet genistein solⁿ ในข้อ 6.2 250 μL + plasma 250 μL ได้ plasma std. ความเข้มข้น 2 mg/L

6.3.5 pipet genistein solⁿ ในข้อ 6.2 250 μL + plasma 250 μL ได้ plasma std. ความเข้มข้น 1 mg/L

6.3.6 pipet genistein solⁿ ในข้อ 6.2 250 μL + plasma 250 μL ได้ plasma std. ความเข้มข้น 0.5 mg/L

6.3.7 pipet genistein solⁿ ในข้อ 3.6 250 μL + plasma 250 μL ได้ plasma std. ความเข้มข้น 0.25 mg/L

6.4 กรองผ่านหัวกรอง 0.45 μm ลงใน CE Vials

6.5 นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CE ซึ่งมี Condition ในการทดลองดังนี้

Parameters	Conditions used
Fused - silica capillary	50 μm x 64 cm
Effective length	55.5 cm

Electrolyte	100 mM borate buffer
pH	9.5
Inject sample	Voltage 5 kV
Sample injection time	20 sec
Applied voltage	+18 kV
Temperature	25 °C
Detector	UV - Visible detector
Signal wavelength	214 nm
Reference wavelength	280 nm