บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง สมุนไพร เคมีภัณฑ์ และเครื่องมือ

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาว (rat) Wistar strain เพศผู้ น้ำหนัก 200-250 กรัม

1.2 สมุนไพร

Curcuma longa Linn.

1.3 เคมีภัณฑ์และแหล่งที่มา

: 100% acetic acid (J.T.Baker Chemical Co.)

: chromatographic materials เช่น silica gel No. 9385, Sephadex®LH-20 , Silica gel GF_{254} plate

: cimetidine (Sigma)

: 1%formaldehyde (Carlo erba)

: hematoxylin-eosin

: 1%methylcellulose 1200 (Vidhyasom Co.,LTD)

: organic solvents เช่น chloroform , ethanol , hexane , methanol

: pentobarbital sodium (Sigma)

: 0.9%sodium chloride (Riedel-de Haen)

1.4 เครื่องมือ

: ชุดผ่าตัดเล็ก

: slides เครื่องแก้ว อุปกรณ์และเครื่องมือในการย้อมสีเนื้อเยื่อและสกัดสาร

: feeding tube

: stereoscope และ microscope

: column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.5, 5 และ 2 ซม.

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การสกัดแยกสารประกอบ curcuminoids จากผงขมิ้นชัน

2.1.1 การสกัดสารประกอบ curcuminoids จากผงขมิ้นชัน

นำผงขมิ้นชันแห้งบดละเอียด 1 กิโลกรัม มาหมักใน ethanol จำนวน 4 ลิตร (x 3) เป็นเวลา 3 วัน กรองและนำสิ่งสกัดที่ได้มารวมกันและระเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำสิ่งสกัดที่ได้มาละลายใน hexane และ chloroform/methanol (1:1) ตามลำดับ กรองตะกอนออก นำเฉพาะสารละลายใน chloroform/methanol (1:1) มาระเหยให้แห้งโดยวิธีการเดิม

2.1.2 การแยกสารประกอบ curcuminoids จากขมิ้นชันและการทำให้บริสุทธิ์

นำสิ่งสกัดที่ได้จากข้อ 2.1.1 ครั้งละ 10 กรัมมาแยกสารประกอบ curcuminoids 3 ชนิดได้แก่ curcumin demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin โดยใช้เทคนิค vacuum chromatography และใช้ silica gel เป็นตัวดูดซับ (adsorbent) ซึ่งบรรจุใน column ให้มีความสูง 5 ซม. และใช้ chloroform/methanol เป็นตัวชะ (eluent) โดยใช้ระบบการชะแบบ stepwise elution ดังในตารางที่ 1 และรับ eluent fraction ละประมาณ 200 มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 ระบบตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวชะใน silica gel vacuum chromatography

ลำดับที่ในการชะ	ตัวทำละลาย	ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)
1	Chloroform	500
2	chloroform/methanol (9:1)	1000
3	chloroform/methanol (8:2)	1000

ได้สารทั้งหมด 19 fractions แล้วนำแต่ละ fractions มาทำ TLC chromatogram (Silica gel $60F_{254}$; chlorom/methanol 9 :1) และทำการรวม fractions ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การรวม fractions ที่ได้จากการแยกสารสกัดขมิ้นด้วย vacuum chromatography

Fractions ที่รวมกัน	ชื่อ fractions
1 – 2	A
3 – 7	B
8 – 9	C
10 – 15	D
17 – 19	E

นำ fraction B มาแยกต่อด้วย silica gel column chromatography (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ซม. บรรจุตัวดูดซับสูง 13 ซม.) โดยใช้ chloroform/methanol (99:1) เป็นตัวชะ รับ eluent fraction ละ 100 มิลลิลิตร ได้สาร 30 fractions แล้วนำแต่ละ fractions มาทำ TLC chromatogram (Silica gel $60F_{254}$; chloroform/methanol 9 :1) และทำการรวม fractions ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การรวม fractions ที่ได้จากการแยก fraction B ด้วย silica gel column chromatography

fractions ที่รวมกัน	ชื่อ fractions
1	B1
2 – 10	B2
11 – 14	B3
15 – 23	B4
24 – 30	B5

นำ Fraction B2 มาตกผลึกใน chloroform/methanol ได้ผลึกสีเหลืองเข้ม (Cu1)

นำ Fraction B4 มาตกผลึกใน chloroform/methanol ได้ผลึกสีเหลืองเข้ม (CU2)

นำ fraction D มาแยกต่อด้วย Sephadex LH-20 column chromatography โดยใช้ methanol เป็นตัวชะ และรับ eluent fraction ละ 50 มิลลิลิตร ได้สาร 11 fractions นำแต่ละ fractions มาทำ TLC chromatogram (Silica gel $60F_{254}$; chloroform/methanol 9 :1) และทำการรวม fractions ดังแสดงใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การรวม fractions ที่ได้จากการแยก fraction D ด้วย Sephadex LH-20 column chromatography

fractions ที่รวมกัน	ชื่อ fractions
1 - 3	D1
4 – 5	D2
6 – 7	D3
8 – 9	D4
10 – 11	D5

นำ fraction D3 มาตกผลึกใน methanol ได้ผลึกสีเหลือง (CU3)

2.1.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ curcuminoids

พิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ curcuminoids ทั้งสามชนิดที่แยกได้จากผงขมิ้นชันโดย ใช้เทคนิค IR spectroscopy และการหาจุดหลอมเหลวเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่มีรายงาน (Kosuge, *et al.*, 1985; Roughley and Whiting, 1973)

2.2 การเตรียมยาน้ำแขวนตะกอนของสารบริสุทธิ์ curcumin desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin

เติมสารบริสุทธ์ curcumin หรือ desmethoxycurcumin หรือ bisdesmethoxycurcumin ลงไปกระจายในสารแขวนตะกอน 1%methylcellulose 1200 ผสมให้เข้ากัน โดยให้มีความเข้มข้นของสารสำคัญแต่ละชนิดในขนาดต่ำกว่า 50 mg/kg/ml ใช้ยาน้ำแขวนตะกอนที่ได้ภายใน 24 ชั่วโมง

2.3 การเตรียมยาน้ำแขวนตะกอน cimetidine

บดตัวยา cimetidine ขนาด 400 มิลลิกรัมให้ละเอียด จากนั้นนำไปบดรวมกับสารแขวนตะกอน 1%methylcellulose 1200 ทีละน้อยจนได้ยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้นของยา cimetidine เท่ากับ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้ยาน้ำแขวนตะกอนที่ได้ภายใน 24 ชั่วโมง

2.4 ศึกษาผลของ acetic acid ต่อการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูขาว

ในการศึกษาใช้วิธี topical application (cup method) ของ Okabe และคณะ ดังนี้

เตรียมหนูขาวโดยไม่ต้องอดอาหารก่อน เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เวลา 10.00 นาฬิกา จนถึง 17.00 นาฬิกา ซึ่งเป็นช่วงที่อาหารในกระเพาะของหนูถูกส่งต่อไปยังลำไส้เล็กเกือบหมดแล้ว (กระเพาะอาหารว่าง) ทำให้หนูสลบด้วยการฉีด pentobarbital sodium ในขนาด 50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/มิลลิลิตร เข้าช่องท้อง จากนั้นผ่าตาม middle epigastric incision วาง cylindrical plastic mold ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรบนผนังกระเพาะอาหารส่วน antrum ด้าน anterior wall กด cylindrical plastic mold ให้แนบติดผนังกระเพาะอาหาร แล้วหยด 100% กรดแอซีติก ในขนาด 0.06 มิลลิลิตรลงใน cylindrical plastic mold ทิ้งไว้ 60 วินาทีแล้วดูดเอากรดแอซีติกออก เย็บแผลผ่าตัดให้สนิทเรียบร้อย ทายาฆ่าเชื้อติดต่อกันทุกวันจนแผลที่เย็บเชื่อมสนิท หลังจากนั้นฆ่าหนูในวันที่ 4 และ 14 ภายหลังการผ่าตัด ตัดแยกส่วนกระเพาะอาหารออกมาแช่ใน 1% formaldehyde เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นผ่าเปิดกระเพาะอาหารตามแนว greater curvature ศึกษาการหายกลับคืนสภาพเดิมของแผล

2.5 ศึกษาฤทธิ์ของสาร curcumin desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในการรักษาแผลที่เกิดจากการชักนำด้วย acetic acid

หลังจากการชักนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูขาวตามวิธีการในข้อ 2.4 แล้ว แบ่งหนูขาวออกเป็น 7 กลุ่มหลัก ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่ม water control ที่ไม่ได้รับยา หรือ 1% methylcellulose 1200 ได้รับเฉพาะน้ำและอาหาร ทำการฆ่าหนูในวันที่ 4 ภายหลังการผ่าตัด (n = 20) ⟶ $outcome_{control1}$

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่ม water control ที่ไม่ได้รับยา หรือ 1% methylcellulose 1200 ได้รับเฉพาะน้ำและอาหาร ทำการฆ่าหนูในวันที่ 14 ภายหลังการผ่าตัด (n = 20) ⟶ $outcome_{control2}$

หนูกลุ่มที่ 3 – 7 เป็นกลุ่ม treatment ที่ได้รับยาทางหลอดอาหารโดยเริ่มให้ในวันที่ 4 หลังจากการผ่าตัด ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 10 วัน และทำการฆ่าหนูในวันที่ 14 ภายหลังการผ่าตัด หนูแต่ละกลุ่มได้รับชนิดยาแตกต่างกันดังนี้

กลุ่มที่ 3 ให้ 1% methylcellulose 1200 (n=20)

กลุ่มที่ 4 ให้ยาน้ำแขวนตะกอนสาร curcumin โดยทดสอบผลของสารสำคัญในความเข้มข้นที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น (n = 20 /การทดสอบสารสำคัญแต่ละความเข้มข้น)

กลุ่มที่ 5 ให้ยาน้ำแขวนตะกอนสาร desmethoxycurcumin โดยทดสอบผลของสารสำคัญในความเข้มข้นที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น (n=20/การทดสอบสารสำคัญแต่ละความเข้มข้น)

กลุ่มที่ 6 ให้ยาน้ำแขวนตะกอนสาร bisdesmethoxycurcumin โดยทดสอบผลของสารสำคัญในความเข้มข้นที่แตกต่างกันอย่างน้อย 2 ความเข้มข้น (n = 20 / การทดสอบสารสำคัญแต่ละความเข้มข้น)

กลุ่มที่ 7 ให้ยาน้ำแขวนตะกอน cimetidine (n = 20)

ศึกษาการหายกลับคืนสภาพเดิมของแผล โดยวิธี

ก. macroscopical examination : วัดพื้นที่ของแผลที่เกิดในหน่วยตารางมิลลิเมตร (ulcer index,UI)

$$\% \text{ curation} = \frac{UI_{(control)} - UI_{(treatment)}}{UI_{(control)}} \times 100$$

ข. histological examination : gross section บริเวณตำแหน่งตรงกลางของแผล นำไปแช่ใน 1% formaldehyde แล้วย้อมสีด้วย hematoxylin-eosin วัดค่า parameter เหล่านี้

$$\% \text{ mucosal regeneration index} = \frac{\text{regeneration of the mucosal layer (mm)}}{\text{defect of the mucosa (mm)} + \text{regeneration of the mucosal layer}} \times 100$$

$$\% \text{ healing index} = 1 - \left[\frac{\text{defect of the mucosa (mm)}}{\text{distance of ruptured muscularis mucosa (mm)}} \right] \times 100$$

โดย outcome ของกลุ่ม control = $\text{outcome}_{\text{control2}}$ - $\text{outcome}_{\text{control1}}$

outcome ของกลุ่ม treatment = $\text{outcome}_{\text{treatment}}$ - $\text{outcome}_{\text{control1}}$

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลจะแสดงผลในรูปของ mean และ standard error of mean (SE) เป็นค่า ulcer index , %curation %mucosal regeneration index และ %healing index

ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม control และกลุ่ม treatment โดยใช้สถิติ ANOVAเมื่อ p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ