บทที่ 3

วัสดุและวิธีวิจัย

วัสดุ

1. ตัวอย่าง

1.1 ยาบำรุงเลือดแผนโบราณ สุ่มซื้อจากร้านขายยาในกรุงเทพมหานครและนครราชสีมา 19 ชื่อการค้า ๆ ละ 3 ตัวอย่าง (ตารางที่ 15)

1.2 สมุนไพรบำรุงเลือด ซื้อจากร้านขายยาในกรุงเทพมหานคร 3 ร้าน ร้านละ 30 ชนิด เป็นชนิดที่นิยมใช้เป็นส่วนประกอบในยาบำรุงเลือดแผนโบราณซึ่งรวบรวมโดยกองวิจัยทางแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข แสดงในภาคผนวก (กองวิจัยทางแพทย์, 2529) (ตารางที่ 13)

2. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็ก

2.1 สารละลายมาตรฐานเหล็กสำหรับ Atomic absorption spectrophotometry, Fe 1.000 มก./มล. ของ Farmitalia Carlo Erba

2.2 Hydrochloric acid 37%, A.R. ของ E. Merk

2.3 Nitric acid 70%, A.R. ของ British Drug House

3. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดโฟลิก

3.1 Ascorbic acid, A.R. ของ E. Merk

3.2 Chicken Pancreas ของ Difco Laboratories

3.3 Concentrated sulfuric acid, Lab. grade

3.4 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), A.R.

3.5 Ethanol

3.6 Pteroylglutamic acid No. F-7876 (Sigma Chemical Co.)

3.7 Lysol

3.8 Potassium dichromate, Lab. grade

3.9 Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), A.R.

3.10 Sodium hydroxide, A.R.

3.11 Tween 80

3.12 Gardinol Type Detergents (Teepol)

4. เชื้อ *Lactobacillus casei*, ATCC (American Type Culture Collection) No. 7469, จาก The American Type Collection, 2112 M. Street, Washington, D.C.

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Bacto Micro Inoculum Broth) ของ Difco Laboratories

6. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิเคราะห์กรดโฟลิก (Folic acid Casei Medium) ของ Difco Laboratories

7. เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ธาตุเหล็ก
   - 7.1 เครื่องชั่งของ Mettler H 311
   - 7.2 Atomic absorption spectrophotometer ของ Shimadzu AA-650
   - 7.3 เตาเผา (Muffle furnace) ของ Gallen Kamp
   - 7.4 เครื่องอังน้ำ ของ Herreus
   - 7.5 เตาไฟฟ้า

8. เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดโฟลิก
   - 8.1 เครื่องชั่ง ของ Mettler H 16
   - 8.2 หม้อนึ่งอัดไอ (Prestige)
   - 8.3 Automatic syringe
   - 8.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง ของ International Portable Refrigerated Centrifuge, Model PR-2
   - 8.5 ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง
   - 8.6 ตู้บ่มเชื้อของ Thelco, Model 6M
   - 8.7 ตู้อบ ของ Thelco, Model 17
   - 8.8 Micropipetting system ของ Eppendorf
   - 8.9 เครื่องผสม ของ Vortex-Genie Scientific Industries Supplies
   - 8.10 Nephelometer ของ Bausch & Lomb.

8.11 pH meter ของ Beckman

<u>วิธีดำเนินการวิจัย</u>

1. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็ก (Clegg et al., 1981; Wattanapenpaiboon, 1986)

น้ำที่ใช้ตลอดการวิเคราะห์ เป็นชนิดที่กำจัดไอออนและกลั่น 2 ครั้ง เครื่องแก้วและภาชนะใส่ตัวอย่างจะต้องผ่านการแช่ใน 10% ของกรดไฮโดรคลอริกค้างคืนและล้างหลาย ๆ ครั้งด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนและกลั่น 2 ครั้ง เพื่อไม่ให้มีธาตุเหล็กปนเปื้อน

1.1 ตัวอย่างที่เป็นผงแห้ง

ชั่งผงยาที่บดละเอียดแล้ว ให้ได้น้ำหนักแน่นอน ประมาณ 2 กรัมใส่ในถ้วยกระเบื้อง นำไปเผาบนเตาไฟฟ้าจนหมดควัน หลังจากนั้นนำไปเผาต่อในเตาเผาอุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีเทา (ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง) เถ้าที่ได้นำมาละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 10% 5 มล. แล้วกรองผ่านกระดาษกรองชนิดไม่มีเถ้า (Whatman # 42) ลงในขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 50 มล. เติมน้ำจนครบ 50 มล. เก็บสารละลายในขวดโพลีเอทิลีน (polyethylene) แล้วนำไปวัดหาปริมาณธาตุเหล็กด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer

1.2 ตัวอย่างที่เป็นยาน้ำ

ปิเปตต์ตัวอย่างที่เขย่าให้น้ำยาเข้ากันดีแล้ว 50 มล. ใส่ในบีกเกอร์ นำไประเหยจนแห้งบนเครื่องอังน้ำ เติมกรดไนตริกเข้มข้นลงในตัวอย่างที่แห้งแล้ว 4 มล. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 4 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็น นำสารละลายที่ได้ ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มล. เติมน้ำจนครบ 50 มล. ถ้าสารละลายขุ่นก็กรองด้วยกระดาษกรองชนิดไม่มีเถ้า (Whatman # 42) เก็บสารละลายในขวดโพลีเอทิลีน นำไปวัดหาปริมาณธาตุเหล็กด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer

1.3 สารละลายมาตรฐานของธาตุเหล็ก

เตรียมจากสารละลายสต๊อกของสารละลายเหล็กเข้มข้น 1000 ส่วนในล้านส่วนใน 10% ของกรดไนตริก ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน ตรวจวัดโดยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer ภายใต้สภาวะดังนี้

Lamp Fe Current	8 mA.
Wavelength	248.3 nm.
Spectral band pass	0.2 nm.

Air/Acetylene	10	L/min/2 L/min
Burner height	2	mm.
Flame stoichiometry	oxidizing	

สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเหล็กในสารละลายและค่าการดูดกลืนแสง แล้วหาความเข้มข้นของสารละลายเหล็กตัวอย่างโดยอาศัยกราฟมาตรฐานนี้

2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดโฟลิก (สุวิทย์ อารีกุล, 2529; Jansuittivechakul, 1979)

น้ำที่ใช้ตลอดการวิเคราะห์เป็นชนิดที่ปราศจากไอออน และกลั่น 2 ครั้ง เครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ในการวิเคราะห์ จะต้องผ่านการต้มในสารละลายของสารซักฟอก (Teepol) 1:200 นาน 30 นาที แล้วแช่ในสารละลายคลีนซิง (cleansing solution) ค้างคืน ล้างหลาย ๆ ครั้งด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนและกลั่น 2 ครั้ง เพื่อให้ปราศจากโฟเลต และโลหะหนัก ซึ่งอาจมีผลต่อการเกิดออกซิเดชั่นของกรดแอสคอบิกในสารละลายบัฟเฟอร์

2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (Maintenance medium)

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 18.5 ก. ในน้ำ 500 มล. โดยอุ่นเล็กน้อย กรองผ่านกระดาษกรอง ปิเปตต์สารละลายนี้ใส่ในหลอดที่มีฝาปิด 50 หลอด ๆ ละ 10 มล. ปิดฝาหลอด แล้วนำไปนึ่งภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 อุณหภูมิ 121°ซ นาน 5 นาที ทิ้งให้เย็น ปิดฝาให้แน่นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ 37°ซ ค้างคืน ตรวจดูตอนเช้าวันรุ่งขึ้นถ้าสารละลายใสแสดงว่าไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อนนำไปเก็บในตู้เย็น (4°ซ)

2.2 การเตรียมสต๊อกคัลเจอร์ (Stock culture)

เพาะเลี้ยง *Lactobacillus casci* ATCC No. 7469 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บในตู้เย็น (4°ซ) ทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ทุก 2 สัปดาห์ โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เติมเชื้อตั้งต้น (liquid culture) 1 หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 18 ชั่วโมง แล้วเก็บในตู้เย็น (4°ซ)

2.3 การเตรียมอินนอกคุลัม (innoculum)

เตรียมในตอนบ่ายก่อนวันวิเคราะห์ 1 วัน โดยเติมสต๊อกคัลเจอร์ 1 หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มล. บ่มเชื้อที่ 37°ซ นาน 18 ชั่วโมง ใช้เชื้อที่บ่ม 18 ชั่วโมงนี้ 0.5 มล. เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มล. บ่มที่ 37°ซ นาน 6 ชั่วโมง อินนอกคุลัมที่ใช้ในการวิเคราะห์ เรียกว่า "L.C." (*Lactobacillus casei*) จะเตรียมโดยเติม 0.05 มล. ของเชื้อที่บ่ม 6 ชั่วโมงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้วิเคราะห์ (basal medium) 18 มล. ใช้อินนอกคุลัมครั้งละ 1 หยด เติมในแต่ละขวดที่ใช้วิเคราะห์

2.4 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีกรดแอสคอบิก

สารละลายนี้จะต้องเตรียมขึ้นใหม่ ๆ ทุกครั้ง ทำโดยละลายกรดแอสคอบิก 150 มก. ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 6.1 100 มล.

2.5 การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.1

2.5.1 สารละลายกรด 0.2 โมล เตรียมโดยละลายโซเดียม-ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต ไดไฮเดรต ($NaH_2PO_4.2H_2O$) 31.2 ก. ในน้ำแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1 ล.

2.5.2 สารละลายด่าง 0.2 โมล เตรียมโดยละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 28.4 ก. ในน้ำแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1 ล.

นำสารละลายข้อ 2.5.1 มา 212.5 มล. ผสมกับสารละลายข้อ 2.5.2 37.5 มล. แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ล. ด้วยน้ำ สารละลายควรมี พีเอช 6.1 เก็บสารละลายนี้ที่อุณหภูมิห้อง

2.6 การเตรียมคอนจูเกส (conjugase)

ใช้ตับอ่อนของไก่ที่แห้งสนิท (desiccated chicken pancreas) ของ "Difco" 300 มก. ละลายในน้ำ 100 มล. นำไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยง 2,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนใส

2.7 การเตรียมสารละลายคลีนชิง

ใช้โพแทสเซียมไดโครเมต 10 ก. ละลายในน้ำ 75 มล. และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 มล. ลงช้า ๆ ผสมให้เข้ากัน

2.8 การเตรียมตัวอย่าง

2.8.1 ตัวอย่างที่เป็นยาน้ำ

ปิเปตต์ตัวอย่างที่เขย่าให้น้ำยาเข้ากันดีแล้ว 2 มล. มาเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีกรดแอสคอบิก จนได้ปริมาตร 20 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 อุณหภูมิ 121°ซ นาน 5 นาที นำไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 2,500 รอบ/นาทีนาน 10 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนใสมา 5 มล. เรียกว่าส่วน "อ" (อิสระ) นำไปแช่แข็งจนกว่าจะใช้วิเคราะห์ ส่วนใสอีก 9 มล. นำมาเติมคอนจูเกส 1 มล. และโทลูอีน 0.5 มล. เพื่อปิดฝาหน้าของสารละลาย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 16 ชม. แล้วนำมาต้มบนเครื่องอังน้ำ นาน 10 นาที และปั่น 2,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสมาแช่แข็งจนกว่าจะใช้วิเคราะห์ เรียกส่วนนี้ว่า "ส"(สังยุค) ในการวิเคราะห์

2.8.2 ตัวอย่างที่เป็นผงแห้ง

นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดชั่งตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 ก. เจือจางด้วยน้ำ 20 มล. นำไปปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 2,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที ปิเปตต์ส่วนใสมา 2 มล. แล้วดำเนินการต่อไปเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างที่เป็นยาน้ำ

2.9 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดโฟลิก (เข้มข้นเป็น 2 เท่า)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อ Folic Acid Casei Medium 9.4 ก. มาละลายในน้ำ 100 มล. เติม Tween 80 1 หยด (เพื่อลดแรงตึงผิวของสารละลาย) อุ่นสารละลายนาน 1 นาที แล้วปล่อยให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง เติมกรดแอสคอบิก 50 มก. คนให้ละลาย แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง ใช้ automatic syringe แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ลงในหลอดที่ใช้วิเคราะห์ หลอดละ 3 มล.

2.10 การเตรียมสารละลายกรดโฟลิกมาตรฐาน (1.0×10^{-5} ก./มล.)

ชั่งกรดโฟลิกมาตรฐาน 100 มก. นำมาละลายในน้ำ 20 มล. แล้วค่อย ๆ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปช้า ๆ จนได้สารละลายสีเหลืองใส ปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 100 มล. จะได้สารละลายเข้มข้น 1.0×10^{-3} ก./มล. นำสารละลายนี้มา 1 มล. ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล. ปรับปริมาตรด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ 20% ให้เป็น 100 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1.0×10^{-5} ก./มล. แบ่งสารละลายนี้ใส่หลอดเล็ก ๆ 60 หลอด เก็บที่ -20°ซ

2.11 การเตรียมสารละลายกรดโฟลิกมาตรฐาน 1.0 x 10^{-9} ก./มล. และ 1.0 x 10^{-10} ก./มล. (สารละลายนี้ต้องเตรียมขึ้นใหม่ ๆ ก่อนใช้)

นำสารละลายกรดโฟลิกมาตรฐาน (1.0 x 10^{-5} ก./มล.) ที่แช่แข็งไว้เมื่อปล่อยให้ละลายแล้ว ปิเปตต์มา 1 มล. ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล. เติมน้ำให้ครบ 100 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1.0 x 10^{-7} ก./มล.

สารละลายกรดโฟลิกเข้มข้น 1.0 x 10^{-9} ก./มล. เตรียมโดยปิเปตต์สารละลายกรดโฟลิกเข้มข้น 1.0 x 10^{-7} ก./มล. 1 มล. ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มล. เติมน้ำให้ครบ 100 มล. แล้วปิเปตต์สารละลายที่มีความเข้มข้น 1.0 x 10^{-9} ก./มล. นี้มา 10 มล. เติมน้ำให้ครบ 100 มล. ในขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1.0 x 10^{-10} ก./มล.

2.12 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดโฟลิก

2.12.1 เตรียมขวดสำหรับวิเคราะห์สารละลายกรดโฟลิกมาตรฐานโดยให้หมายเลขและเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยการเติมน้ำ เติมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 1.0 x 10^{-9} ก./มล. และ 1.0 x 10^{-10} ก./มล. ตามปริมาตรที่แสดงในตารางที่ 6

2.12.2 ให้หมายเลขขวดที่ใช้วิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง และเติมน้ำตามปริมาตรที่แสดงในตารางที่ 7

2.12.3 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ (ดูข้อ 2.9) โดยใช้ automatic syringe ขวดละ 3 มล.

2.12.4 เตรียมหลอดสารละลายเชื้อ โดยใช้หลอดขนาด 25 มล. เติมน้ำ 9 มล. และอาหารเลี้ยงเชื้อที่เข้มข้น 2 เท่า อีก 9 มล. ทำเครื่องหมาย "L.C."

2.12.5 ปิดฝาขวดที่ใช้วิเคราะห์ทั้งหมด รวมทั้งหลอด "L.C." นำไปนึ่งในหม้อนึ่งอัดไอ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 อุณหภูมิ 121°ซ นาน 5 นาที ปล่อยให้เย็น ปิดฝาให้แน่น

2.12.6 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่แช่แข็งไว้ แล้วปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ด้วยไมโครปิเปตต์ เติมลงในขวดที่ใช้วิเคราะห์โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

2.12.7 เตรียมอินนอกคูลัมโดยใช้เชื้อที่บ่มนาน 6 ชม. (ดูข้อ 2.3) เติมลงในขวด "L.C." ใช้อินนอกคูลัมนี้เติมลงในขวดที่ใช้วิเคราะห์ขวดละ 1 หยด ยกเว้นขวดควบคุมโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37°ซ นาน 40-48 ชม.

ตารางที่ 6 ปริมาตรสารละลายในขวดวิเคราะห์มาตรฐาน

หมายเลข	จำนวนขวด	ความเข้มข้นสุดท้าย นิโคกรัม/มล.	สารละลายมาตรฐานกรดโฟลิก (มล.)		ปริมาตรน้ำ มล.
			1.0×10^{-10} ก./มล.	1.0×10^{-9} ก./มล.	
ควบคุม	1	0	-	-	3.0
0	3	0	-	-	3.0
1	3	5	0.3	-	2.7
2	3	10	0.6	-	2.4
3	3	20	1.2	-	1.8
4	3	40	2.4	-	0.6
5	3	70	0.2	0.4	2.4
6	3	100	-	0.6	2.4
7	3	150	-	0.9	2.1
8	3	200	-	1.2	1.8
9	3	400	-	2.4	0.6

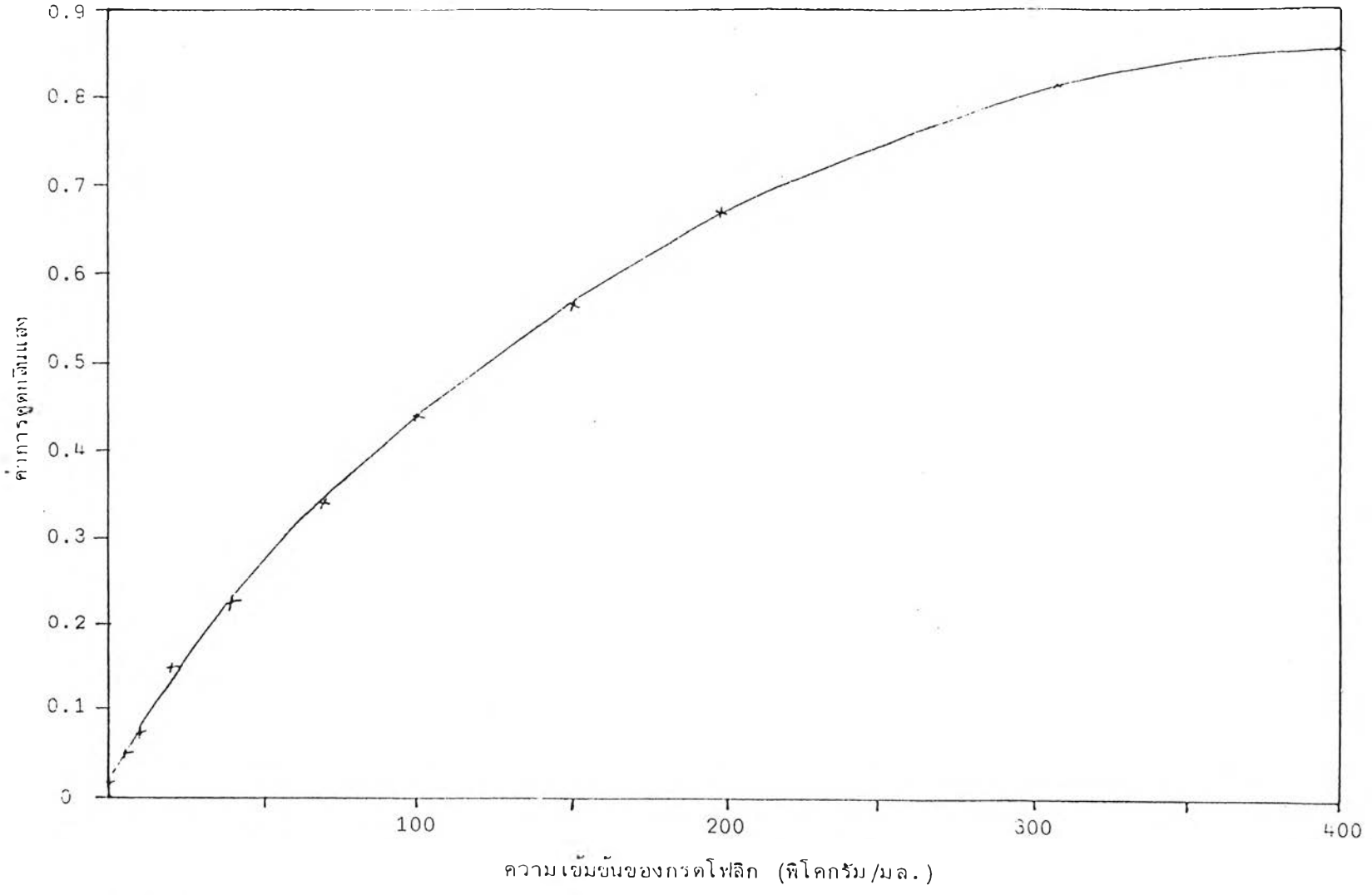
ตารางที่ 7 ปริมาตรสารละลายในขวดวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ขวดหมายเลข (ซ้ำสอง)	ปริมาตรน้ำ (มล.)	ตัวอย่างที่เตรียมโดยไม่ใส่คอนจูเกส (มล.)	ตัวอย่างที่เตรียมโดยใส่คอนจูเกส (มล.)
1	อ1	2.95	0.05	-
	อ1	2.90	0.10	-
	ส1	2.95	-	0.05
	ส1	2.90	-	0.10
2	อ2	2.95	0.05	-
	อ2	2.90	0.10	-
	ส2	2.95	-	0.05
	ส2	2.90	-	0.10
.				
.				
.				

หมายเหตุ : เติมตัวอย่างหลังจากนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์แล้ว

2.18.8 วัดความขุ่น (ค่าการดูดกลืนแสง) ของเชื้อที่เจริญแต่ละขวดโดยใช้เครื่อง Nephelometer ที่ความยาวคลื่น 645 นาโนเมตร

2.12.9 สร้างกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย แล้วหาความเข้มข้นของกรดโฟลิกในตัวอย่างโดยอาศัยกราฟมาตรฐานนี้



ภาพที่ 4 กราฟมาตรฐานกรดโฟลิก