หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

2.1 วัสดุ สัตว์ทดลอง และเครื่องมือ

2.1.1 ผักคราดหัวแหวน (Spilanthes acmella Murr.)

ได้รับจากสาขาวิจัยการเกษตร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2.1.2 ตัวทำละลายอินทรีย์และสารเคมี

ethyl alcohol จากองค์การสุรา กรมสรรพสามิต ประเทศไทย; diethyl ether จากบริษัท May and Baker ประเทศอังกฤษ ; acetylcholine chloride และ bradykinin triacetate จากบริษัท Sigma ประเทศอังกฤษ ; heparin ของบริษัท Leo ประเทศเดนมาร์ค; pethidine hydrochloride ขององค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย ; oxytocin ของบริษัท Sandoz ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ภายใต้ยี่ห้อการค้า Syntocinon; estradiol ของบริษัท Shering ประเทศเยอรมันนี ภายใต้ยี่ห้อการค้า Progynon; tween 80 จาก Rotex Pharma ประเทศเยอรมันนี ; morphine hydrochloride; สารเคมีที่จำเป็นในการเตรียมสารละลาย De Jalon และ Locke ซึ่งใช้ในการทดลองผลของส่วนสกัดต่อเนื้อเยื่อที่ตัด แยกจากร่างกายสัตว์ทดลอง

2.1.3 สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักร (Swiss Albino mice)JCL/ICR strain และหนูขาว (rat) Wistar strain จากโครงการศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

2.1.4 เครื่องมือ

rotary evaporator ของ Buchi ประเทศสวิสเซอร์แลนด์; complete isolated organ bath, catalogue number FIIO ของบริษัท C.P.Palmer ประเทศ

อังกฤษ; isotonic transducer, catalogue number 810-25900-7, isometric transducer, catalogue number 810-21601-7 และ recorder apparatus ชนิด 400 MD 4C, catalogue number 810-94000-1 ของบริษัท Bioscience ประเทศอังกฤษ; เครื่องกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (electrical stimulator); เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter).

2.2 วิธีทำการวิจัย

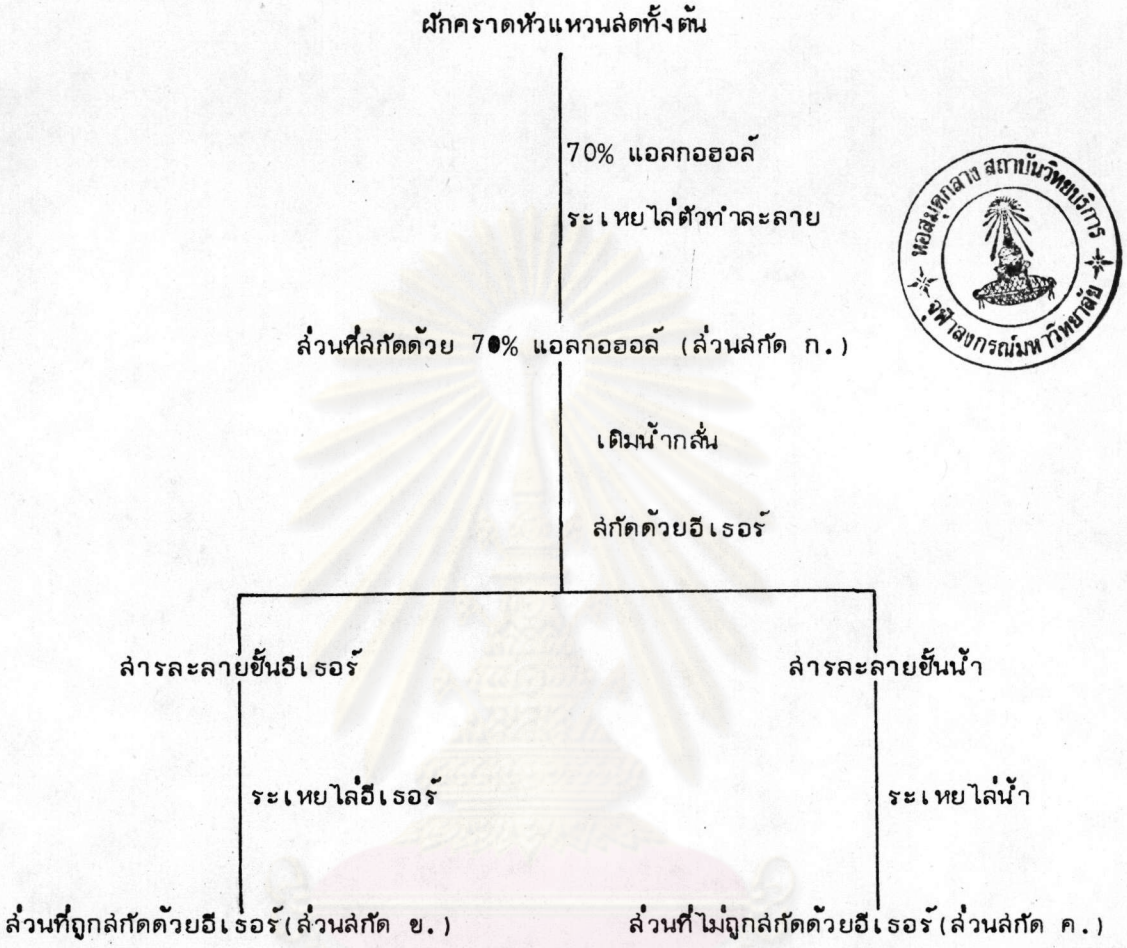
2.2.1 การเตรียมส่วนสกัดชนิดต่าง ๆ ของผักคราดหัวแหวน (รูปที่ 2)

พืชสดทั้งต้นจำนวน 2 กิโลกรัม หั่นเป็นท่อนเล็ก ๆ ด้วยมีด สกัดโดยวิธี cold percolation 3 ครั้งด้วย 70 % แอลกอฮอล์ครั้งละ 5 ลิตร นำสารละลายที่ได้ไประเหยไล่ตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50°c ภายใต้สูญญากาศ ส่วนที่เหลือมีลักษณะข้นเหนียวสีเขียวเข้ม มีรสเผ็ดฉ่าปาก และทำให้รู้สึกชาเมื่อนำมาแตะที่ปลายลิ้น เรียกว่า ส่วนที่สกัดด้วย 70 % แอลกอฮอล์ หรือส่วนสกัด ก.

แบ่งส่วนสกัด ก.ที่ได้นำมาเติมน้ำกลั่น และสกัดต่อด้วยอีเธอร์ จนสารละลายในชั้นอีเธอร์หมดสีเขียว นำสารละลายชั้นอีเธอร์ไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°c เพื่อกำจัดอีเธอร์ออก นำส่วนที่เหลือไปใส่ใน desicator ภายใต้สภาวะสูญญากาศค้างคืน เพื่อกำจัดอีเธอร์จำนวนเล็กน้อยที่อาจหลงเหลืออยู่ สิ่งที่ได้มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเขียวเข้ม มีรสเผ็ดฉ่าปาก และเมื่อนำมาแตะที่ปลายลิ้นจะทำให้รู้สึกชาเช่นเดียวกับส่วนสกัด ก. ส่วนสกัดนี้เรียกว่าส่วนที่ถูกสกัดด้วยอีเธอร์ หรือส่วนสกัด ข.

นำสารละลายชั้นน้ำไประเหยไล่น้ำออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ภายใต้สูญญากาศที่อุณหภูมิ 70°c สิ่งที่ได้เรียกว่า ส่วนที่ไม่ถูกสกัดด้วยอีเธอร์ หรือส่วนสกัด ค.

นำส่วนสกัด ก. ส่วนสกัด ข. และส่วนสกัด ค. ไปทดสอบผลทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นต่อไป



หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2. แสดงการเตรียมส่วนสกัดชนิดต่าง ๆ ของผักคราดหัวแหวน

2.2.2 การเตรียมสารละลายของส่วนสกัดชนิดต่าง ๆ และตัวยามาตรฐานเปรียบเทียบเพื่อใช้ในการศึกษาผลเบื้องต้นทางเภสัชวิทยา

2.2.2.1 การเตรียมสารละลายของส่วนสกัด ก.

ชั่งส่วนสกัด ก. 2กรัม และ tween 80 0.1 กรัมในโกร่ง บดให้ผสมกันดี เติมแอลกอฮอล์ 20 % ลงในโกร่งทีละน้อย และบดให้เข้ากันทุกครั้งที่เติมเป็นจำนวน 10 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อย และคนให้เข้ากันทุกครั้งที่เติม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 20 มล. สารละลายที่ได้มีตะกอนละเอียดแขวนลอยอยู่บ้าง มีความเข้มข้นของส่วนสกัด ก. 10 % ใน 0.5 % tween 80 ใน 10 % แอลกอฮอล์ แบ่งสารละลายนี้ไปตรวจหาปริมาณของ Na^+ K^+ และ Ca^{++} โดยใช้วิธี atomic absorption ส่วนที่เหลือเก็บในขวดที่มีฝาปิดสนิทในตู้เย็นเป็น stock solution เมื่อจะทำการทดลองนำสารละลายนี้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะสมที่จะให้แก่สัตว์ทดลอง

2.2.2.2 การเตรียมสารละลายของส่วนสกัด ข.

ชั่งส่วนสกัด ข. จำนวน 0.6 กรัม และ tween 80 0.6 กรัม ในโกร่ง บดให้ผสมกันดี เติมน้ำกลั่นลงไปทีละน้อยและบดให้เข้ากันทุกครั้งที่เติม ปรับปริมาตรจนครบ 20 มล.ด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายของส่วนสกัด ข.ที่มีความเข้มข้น 3 % ในสารละลายของ 3 % tween 80 ในน้ำกลั่น ส่วนหนึ่งแบ่งไปตรวจหาปริมาณของ Na^+ K^+ และ Ca^{++} โดยใช้วิธี atomic absorption ส่วนที่เหลือเก็บในขวดที่มีฝาปิดสนิทในตู้เย็นเป็น stock solution เมื่อจะทำการทดลองนำสารละลายนี้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะสมที่จะให้แก่สัตว์ทดลอง

2.2.2.3 การเตรียมสารละลายของส่วนสกัด ค.

ชั่งส่วนสกัด ค. จำนวน 10 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยสารละลาย normal saline จนครบ 20 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 50 % ของส่วนสกัด ค.ในสารละลาย normal saline เก็บสารละลายในขวดที่มีฝาปิดสนิทในตู้เย็นเป็น stock solution เมื่อจะทำการทดลองนำสารละลายนี้มาเจือจางด้วยสารละลาย

normal saline เพื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะสมที่จะให้แก่สัตว์ทดลอง

2.2.2.4 การเตรียมสารละลายของ morphine hydrochloride

ชั่ง morphine hydrochloride จำนวน 40 มก. ละลายด้วยสารละลาย normal saline และปรับปริมาตรจนครบ 10 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 4 มก./มล. ใส่ขวดปิดฝาสนิทเก็บในตู้เย็น

2.2.2.5 การเตรียมสารละลายของ pethidine hydrochloride

ดูด (pipet)สารละลายของ pethidine hydrochloride ซึ่งบรรจุในหลอด (ampule) ที่มีความเข้มข้น 50 มก./มล. มา 1 มล. ใส่ในขวดแก้วที่มีขีดบอกปริมาตร 10 มล. (volumetric flask) เติมสารละลาย normal saline ลงไปจนถึงขีดบอกปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 5 มก./มล. เก็บในตู้เย็นในลักษณะที่จุกปิดสนิท เมื่อจะทำการทดลองนำสารละลายนี้มาเจือจางด้วยสารละลาย normal saline เพื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะสมที่จะให้แก่สัตว์ทดลอง

2.2.3 การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของส่วนสกัดชนิดต่าง ๆ ของผักคราดหัวแหวนและ pethidine hydrochloride

สำหรับการทดลองแต่ละตัวอย่างใช้หนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนัก 25-30 กรัม ได้รับอาหารและน้ำตลอดเวลาจนกระทั่งถึงเวลาทดลอง แบ่งสัตว์ทดลองเป็นกลุ่ม ๆ ละ 3 ตัว ให้ตัวอย่างส่วนสกัดและ Pethidine hydrochloride แก่สัตว์ทดลองโดยการฉีดเข้าทางช่องท้องในขนาดต่าง ๆ กัน โดยมีช่วงระยะการเพิ่มของขนาดที่ให้คงที่ สัตว์ทดลองกลุ่มที่เป็น control ได้รับเพียงตัวทำละลาย สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นอย่างใกล้ชิดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ถ้าสัตว์ทดลองตาย บันทึกสาเหตุของการตายและจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายในแต่ละกลุ่มภายในเวลา 72 ชั่วโมงหลังจากได้รับส่วนสกัด รวมทั้งบันทึกขนาดของส่วนสกัดที่มากที่สุดที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 0 % และขนาดที่น้อยที่สุดที่ทำให้สัตว์ทดลองในกลุ่มตาย 100 % จากนั้นทำการทดลองตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้นทุกประการ แต่ใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละ 6 ตัว ให้ส่วนสกัดแก่สัตว์ทดลองด้วยขนาดที่อยู่ระหว่างขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 0 % และ 100% จำนวนสัตว์ทดลองที่ตายในแต่ละกลุ่ม นำมาคำนวณค่า LD_{50} และช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% โดยใช้วิธี

ของ Litchfield และ Wilcoxon[22]

2.2.4 การศึกษาผลต่อการลดความเจ็บปวดของส่วนสกัดชนิดต่าง ๆ ของผักคราดหัวแหวน

2.2.4.1 การศึกษาผลต่อการลดความเจ็บปวดด้วยวิธี Haffner's tail clip

การทดลองดัดแปลงจากวิธีของ Bianchi และ David[23] สำหรับแต่ละตัวอย่างให้หนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนัก 20-25 กรัม ได้รับอาหารและน้ำตลอดเวลาจนกระทั่งถึงเวลาทดลอง ก่อนการทดลองสัตว์ทดลองจะถูกทดสอบความไวของปฏิกริยาโต้ตอบต่อความเจ็บปวด (sensitivity) โดยใช้ artery clip หนีบบริเวณโคนหาง สัตว์ทดลองที่ไม่แสดงอาการพยายามกัด clip ออกจากหางภายใน 15 วินาที จะถูกคัดออกจากการทดลอง

แบ่งสัตว์ทดลองเป็นกลุ่ม ๆ ละ 4 ตัว ให้ตัวอย่างส่วนสกัดและ pethidine hydrochloride โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องในขนาดต่าง ๆ กัน สัตว์ทดลองกลุ่มที่เป็น control ได้รับเพียงตัวทำละลาย หลังจากสัตว์ทดลองได้รับส่วนสกัดไปแล้ว 5 10 15 20 และ 30 นาที ใช้ artery clip หนีบที่บริเวณโคนหางสัตว์ทดลองทีละตัวตามลำดับ บรรทัดฐานที่ใช้ตัดสินว่าสัตว์ทดลองไม่เกิดอาการเจ็บปวดจาก artery clip (positive analgesic response) คือ สัตว์ทดลองไม่แสดงปฏิกริยาโต้ตอบต่อ artery clip ภายใน 15 วินาที บันทึกจำนวนสัตว์ทดลอง ที่ไม่แสดงปฏิกริยาโต้ตอบในแต่ละกลุ่มที่ช่วงเวลาต่าง ๆ นำมาคำนวณค่า ED_{50} และช่วงความเชื่อมั่นที่ 95 % ตามวิธีของ Litchfield และ Wilcoxon[22]

2.2.4.2 การศึกษาผลต่อการลดความเจ็บปวดโดยอาศัยคุณสมบัติในการยับยั้งอาการบิดของลำตัว (writhe) ที่ทำให้เกิดขึ้นในหนูถีบจักรด้วย acetylcholine (acetylcholine-induced writhing test in mice)

การทดลองตามวิธีของ Collier[24] และคณะ สำหรับตัวอย่างแต่ละตัวอย่างใช้หนูถีบจักรเพศเมียน้ำหนัก 20-30 กรัม ได้รับอาหารและน้ำตลอดเวลาจนกระทั่งถึงเวลาทดลอง ก่อนการทดลองอย่างน้อย 20 นาที สัตว์ทดลองจะถูกทดสอบความไวของปฏิกริยา

010390

โต้ตอบต่อความเจ็บปวด โดยการฉีดสารละลายของ acetylcholine chloride (เข้มข้น 0.032 % ของ acetylcholine base ในสารละลายของ normal saline) เป็นจำนวน 1 มล./100 กรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง เข้าทางช่องท้อง แล้ววางสัตว์ทดลองลงในกล่องอลูมิเนียมขนาด 10x15x4 ลบ.นิ้ว ซึ่งเปิดฝาด้านบนไว้กล่องละ 1 ตัว สังเกตอาการบิดของลำตัวในช่วงเวลา 2 นาที หลังจากสัตว์ทดลองได้รับ acetylcholine สัตว์ทดลองที่ไม่แสดงอาการบิดของลำตัวจะถูกคัดจากการทดลอง

แบ่งสัตว์ทดลองเป็นกลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ให้ตัวอย่างล่วนสกัดและ pethidine hydrochloride โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องและใต้ผิวหนังในขนาดต่าง ๆ กัน สัตว์ทดลองกลุ่มที่เป็น control ได้รับเพียงตัวทำละลาย หลังจากนั้น 5 หรือ 10 นาทีสำหรับกลุ่มที่ได้รับตัวอย่างโดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง และ 20 นาทีสำหรับกลุ่มที่ได้รับตัวอย่างโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ฉีด acetylcholine chloride ขนาด 3.2 มก./กก. เข้าทางช่องท้องของสัตว์ทดลองคนละด้านกับที่ฉีดตัวอย่าง (ในกรณีที่ให้ตัวอย่างเข้าทางช่องท้อง) แล้ววางสัตว์ทดลองลงในกล่อง ๆ ละ 1 ตัว สังเกตอาการบิดของลำตัวในช่วงเวลา 2 นาทีหลังจากได้รับ acetylcholine สัตว์ทดลองที่ไม่แสดงอาการบิดของลำตัวถือว่าไม่เกิดความเจ็บปวดจาก acetylcholine (แสดง positive analgesic response)

ฉีด acetylcholine ซ้ำและสังเกตอาการเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้นที่ทุก 20 นาที หลังจากการฉีด acetylcholine ครั้งก่อน เพื่อศึกษาช่วงระยะเวลาการออกฤทธิ์ของตัวอย่าง (duration of action) บันทึกจำนวนสัตว์ทดลองที่ไม่แสดงอาการบิดของลำตัวในแต่ละกลุ่ม ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ นำมาคำนวณค่า ED_{50} และช่วงความเชื่อมั่น ที่ 95 % ตามวิธีของ Litchfield และ Wilcoxon[22]

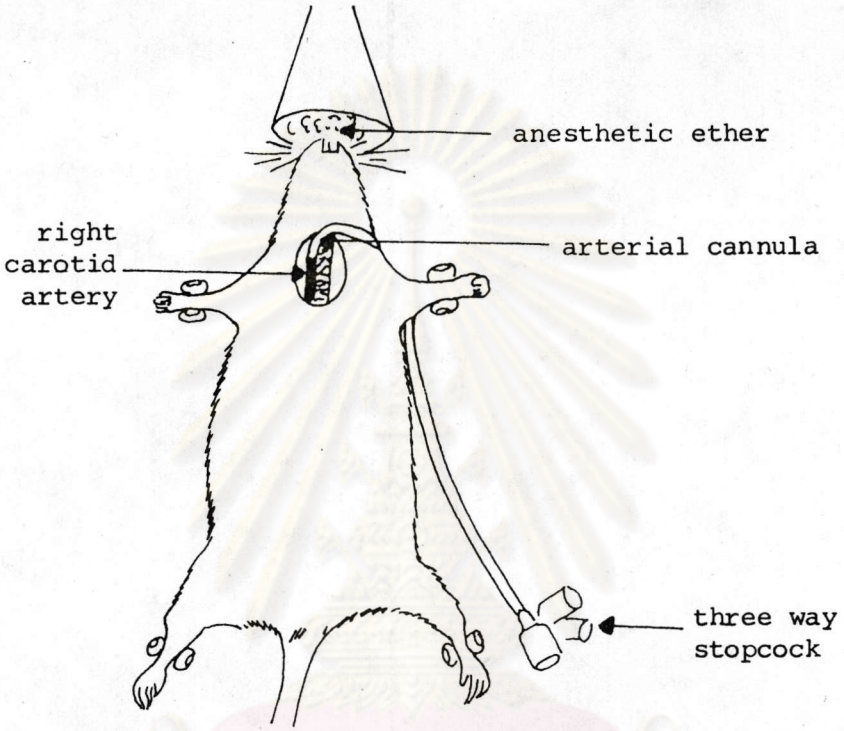
2.2.4.3 การศึกษาถึงผลต่อการลดความเจ็บปวดโดยอาศัยคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกริยาโต้ตอบต่อความเจ็บปวดที่ทำให้เกิดขึ้นในหนูขาวด้วย bradykinin ที่ฉีดเข้าสู่ carotid artery (blockade of the intraarterial bradykinin evoked pain response in the rat)

การทดลองทำตามวิธีของ Botha และคณะ[25] ตัวอย่างส่วนสกัด ข. ส่วนสกัด ค. และ morphine hydrochloride แต่ละตัวอย่างใช้หนูขาวเพศผู้น้ำหนัก 150-250 กรัม ได้รับอาหารและน้ำตลอดเวลาจนกระทั่งถึงเวลาทดลอง

ทำให้สัตว์ทดลองสลบด้วยอีเธอร์ และวางให้อยู่ในลักษณะนอนหงายบนกระดานผ่าตัด ขาทั้ง 4 และหัวถูกตรึงไว้ ใช้กรรไกรขลิบหนังด้านหน้าบริเวณคอ แล้วเปิดกล้ามเนื้อใต้ผิวหนังโดยใช้ปากคีบลงไปจนถึง carotid artery ด้านขวา แยกเส้นประสาทและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกจาก carotid artery ด้วยปากคีบให้ได้เส้นเลือดยาวประมาณ 2 ซม. ขลิบผนังเส้นเลือดให้ยาดออกเล็กน้อยด้วยกรรไกรตัดเส้นเลือด arterial cannula ทำด้วยสาย polyethylene บรรจุสายpolyethylene ด้วยสารละลายของ heparin ในสารละลาย normal saline (เข้มข้น 50 หน่วย/มล.)ให้เต็มเพื่อใช้ป้องกันการแข็งตัวของเลือด ล่อดปลายข้างหนึ่งเข้าใน carotid artery ตรงตำแหน่งที่ขลิบและในทิศทางที่พุ่งเข้าสู่หัวใจ ใช้ด้วยผูกสาย polyethylene ส่วนที่ล่อดเข้าไปกับเส้นเลือดให้แน่น ปลายอีกข้างหนึ่งของสาย polyethylene ล่อดผ่านไปใต้ผิวหนัง ผ่านทะลุออกจากผิวหนังบริเวณสะดุกล่ะปักและต่อเข้ากับ three way stopcock ซึ่งถูกยึดกับผิวหนังไว้ด้วยเทป เย็บปิดแผลบริเวณที่ผ่าตัดด้วยไหมเย็บแผล (รูปที่ 3)

เมื่อต้องการทดสอบปฏิกริยาโต้ตอบของสัตว์ทดลองต่อ bradykinin กระบอกฉีดยาที่บรรจุสารละลายของ bradykinin 0.2 มล.และกระบอกฉีดยาที่บรรจุสารละลาย normal saline จะถูกต่อเข้ากับ three way stopcock อย่างระมัดระวังโดยมิให้มีฟองอากาศอยู่ภายใน ฉีด bradykinin เข้าสู่เส้นเลือด ด้วยความเร็วคงที่ทุกครั้งคือ ประมาณ 2 วินาที/0.2 มล. แล้วฉีดสารละลาย normal saline จำนวน 0.2 มล.ตามทันที ทั้งนี้เพื่อไล่ bradykinin ที่อาจติดค้างอยู่ในสาย polyethylene ให้เข้าสู่เส้นเลือดทั้งหมด

ประมาณ 1 ชั่วโมงหลังการผ่าตัด เมื่อสัตว์ทดลองฟื้นจากการสลบและมีอาการทั่วไปเป็นปกติดีแล้ว จึงเริ่มทำการทดลองหาขนาดต่ำสุด (threshold) ที่ทำให้สัตว์



รูปที่ 3. แสดงการเตรียมหนูขาวเพื่อใช้ในการทดลองศึกษาผลของส่วนสกัดของผักคราดหัวแหวน ต่อการลดความเจ็บปวดโดยอาศัยคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกริยาโต้ตอบต่อความเจ็บปวดที่ทำให้เกิดขึ้นในหนูขาวด้วย bradykinin ที่ฉีดเข้าสู่ carotid artery

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทดลองแสดงปฏิกริยาโต้ตอบต่อ bradykinin ในสัตว์ทดลองแต่ละตัว

ปฏิกริยาโต้ตอบต่อ bradykinin ซึ่งถูกฉีดเข้าสู่ carotid artery ข้างขวาประกอบด้วย อาการบิด หมุนคอในทิศทางตามเข็มนาฬิกา พร้อมกับยกขาหน้าข้างขวาขึ้น

ให้ bradykinin แก่สัตว์ทดลองทุก 10 นาที ในขนาดเริ่มต้น 0.1 มคก. และเพิ่มขึ้นทีละ 0.05 มคก. จนถึง 0.2 มคก. ต่อจากนั้นเพิ่มขึ้นทีละ 0.1 มคก. ในทุก ๆ ขนาดที่ให้ กำหนดให้ปริมาตรของสารละลาย bradykinin ในสารละลาย normal saline ที่ให้แก่สัตว์ทดลองคงที่ทุกครั้ง คือ 0.2 มล. เมื่อสัตว์ทดลองเริ่มแสดงปฏิกริยาโต้ตอบต่อ bradykinin ที่ให้ขนาดใด ให้ bradykinin ขนาดนั้นซ้ำอีก 2 ครั้ง ถ้าปฏิกริยาโต้ตอบยังคงเกิดขึ้นอีกทั้ง 2 ครั้ง แสดงว่าขนาดของ bradykinin นั้นเป็นขนาดต่ำสุดที่ทำให้เกิดปฏิกริยาโต้ตอบ สัตว์ทดลองที่มีขนาดต่ำสุดที่ทำให้เกิดปฏิกริยาโต้ตอบต่อ bradykinin สูงกว่า 0.5 มคก. จะถูกคัดออกจากการทดลอง

เมื่อได้ขนาดต่ำสุดที่ทำให้เกิดปฏิกริยาโต้ตอบต่อ bradykinin ในสัตว์ทดลองแต่ละตัวแล้ว ฉีดตัวอย่างส่วนสกัดและ morphine hydrochloride แก่สัตว์ทดลองเข้าทางช่องท้องในขนาด 1 มล./100 กรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง ต่อจากนั้น 10 นาที ฉีด bradykinin เข้าทางcarotid artery โดยใช้ขนาดต่ำสุดที่ทำให้เกิดปฏิกริยาโต้ตอบให้ซ้ำทุก 10 นาทีจนปฏิกริยาโต้ตอบหายไป และจนกว่าปฏิกริยาโต้ตอบจะกลับมาอีกครั้งหนึ่ง ทั้งนี้เพื่อหาระยะเวลาเริ่มออกฤทธิ์และช่วงระยะเวลาการออกฤทธิ์

2.2.5 การทดลองศึกษาผลของส่วนสกัด และ pethidine hydrochloride ต่อความประสานกันในการทำงานของกล้ามเนื้อลาย (disco-ordination test)

การทดลองทำตามวิธีของ Hall & Fieller[26] และ Collier[27] แต่ละตัวอย่างใช้หนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนัก 20-30 กรัม ได้รับอาหารและน้ำตลอดเวลาจนกระทั่งถึงเวลาทดลอง แบ่งสัตว์ทดลองเป็นกลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว ให้ตัวอย่างส่วนสกัดและ pethidine

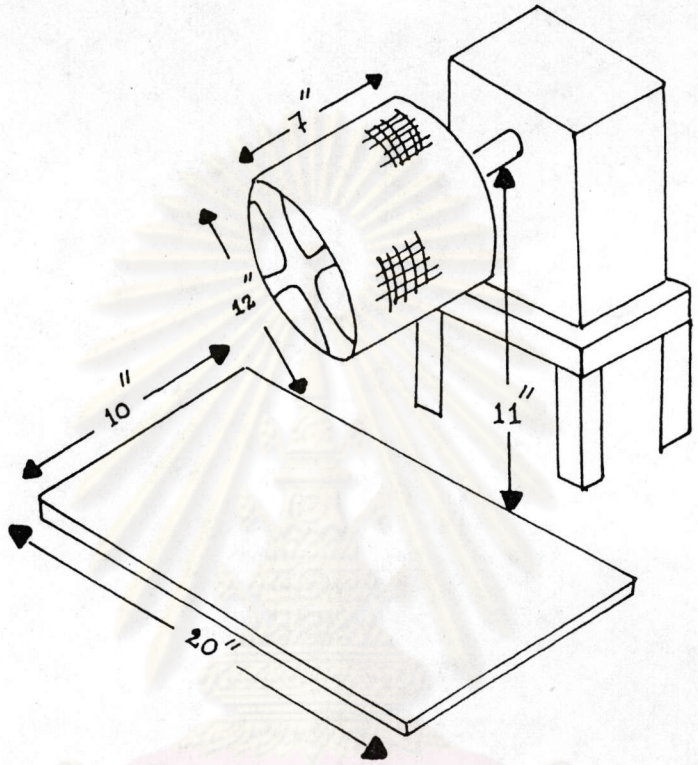
hydrochloride โดยการฉีดเข้าทางช่องท้องในขนาดต่าง ๆ กัน สัตว์ทดลองกลุ่มที่เป็น control จะได้รับเพียงตัวทำละลาย หลังจากนั้น 5 นาที (สำหรับส่วนสกัดของผักคราดหัวแหวน) หรือ 10 นาที (สำหรับ pethidine hydrochloride) วางสัตว์ทดลองลงบนผิวของวัตถุทรงกระบอกที่หุ้มด้วยลวดตาข่ายขนาด 0.25 นิ้ว × 0.25 นิ้ว เส้นผ่าศูนย์กลางของวัตถุทรงกระบอกยาว 12 นิ้วและสูง 7 นิ้ว วางอยู่ในแนวนอนและหมุนรอบแกนนอนด้วยความเร็ว $1\frac{1}{6}$ รอบ/วินาที หรือคิดเป็นความเร็วพื้นที่ผิว 18.6 มม./วินาที (รูปที่ 4)

วางสัตว์ทดลองลงบนวัตถุทรงกระบอกนี้ทีละตัว โดยหันหน้าในทิศทางตรงกันข้ามกับทิศทางของการหมุน และให้อยู่บนวัตถุทรงกระบอกนานตัวละ 1 นาที สัตว์ทดลองที่มีการทำงานของกล้ามเนื้อไม่ประสานกันจะไม่สามารถเกาะอยู่บนลวดตาข่ายได้ และตกลงสู่ที่รองรับซึ่งมีขนาดกว้าง 10 นิ้ว ยาว 20 นิ้ว และอยู่ต่ำจากแกนหมุนของวัตถุทรงกระบอก 11 นิ้ว

นับจำนวนสัตว์ทดลองที่ตกลงสู่ที่รองรับในแต่ละกลุ่มนำมาคำนวณค่า FD_{50} (median effective dose for disco-ordination) และช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% โดยใช้วิธีของ Litchfield และWilcoxon[22]

2.2.6 การศึกษาผลเบื้องต้นของส่วนที่ถูกสกัดด้วยอีเธอร์ (ส่วนสกัด ข.) ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนที่ตัดแยกจากตัวหมูยาว

เตรียมหัวใจห้องบนของหมูยาวโดยทำให้หมูยาวสลบด้วยวิธีใช้แท่งโลหะหนักตีบริเวณรอยต่อระหว่างคอกับส่วนหัว เปิดหน้าอกตัดหัวใจออกจากตัวด้วยความรวดเร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ นำไปแช่ใน petri dish ซึ่งบรรจุสารละลาย Locke (ส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 1) ที่อุณหภูมิห้อง และมีก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่าง ไขมัน เส้นเลือด และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกจากกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ด้วยความระมัดระวัง ใช้ด้ายผูกที่ปลายแหลมของหัวใจห้องบนทั้ง 2 ปลาย ปลายละเส้น นำไปแขวนในกระเปาะแก้ว (chamber) ที่แช่อยู่ใน isolated organ bath และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37° c ในกระเปาะแก้วบรรจุสารละลาย Locke จำนวน 25 มล. มีก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์



รูปที่ 4. แสดงลักษณะและขนาดของ electrical rotating drum ซึ่งใช้ในการทดลองศึกษาผลของส่วนสกัดของผักคราดหัวแหวนต่อความประสานกันในการทำงานของกล้ามเนื้อลาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ Locke Solution

สารเคมี	จำนวนกรัม/ลิตร
NaCl	9.0
KCl	0.42
$CaCl_2$	0.24
$NaHCO_3$	0.15
Glucose	1.0
Aerating gas pure O_2	
pH	7.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผ่านตลอดเวลา ด้ายเส้นหนึ่งผูกติดกับขอแก้วซึ่งจุ่มไว้บริเวณก้นกระเปาะแก้ว ส่วนอีกเส้นหนึ่งโยงให้ตึงผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งต่อเข้ากับ recorder เพื่อบันทึกการทำงานของหัวใจลงบนกระดาษ

ให้กล้ามเนื้อหัวใจพักจนกระทั่งมีความแรง และจังหวะการเต้นคงที่ แล้วจึงเติมส่วนสกัดหรือตัวทำละลายจำนวน 0.05 มล.ลงในกระเปาะแก้ว (รูปที่ 5)

2.2.7 การศึกษาผลเบื้องต้นของส่วนที่ถูกสกัดด้วยอีเธอร์ (ส่วนสกัด ย.)ต่อการทำงานของหัวใจห้องบนขวา (spontaneously beating preparation)

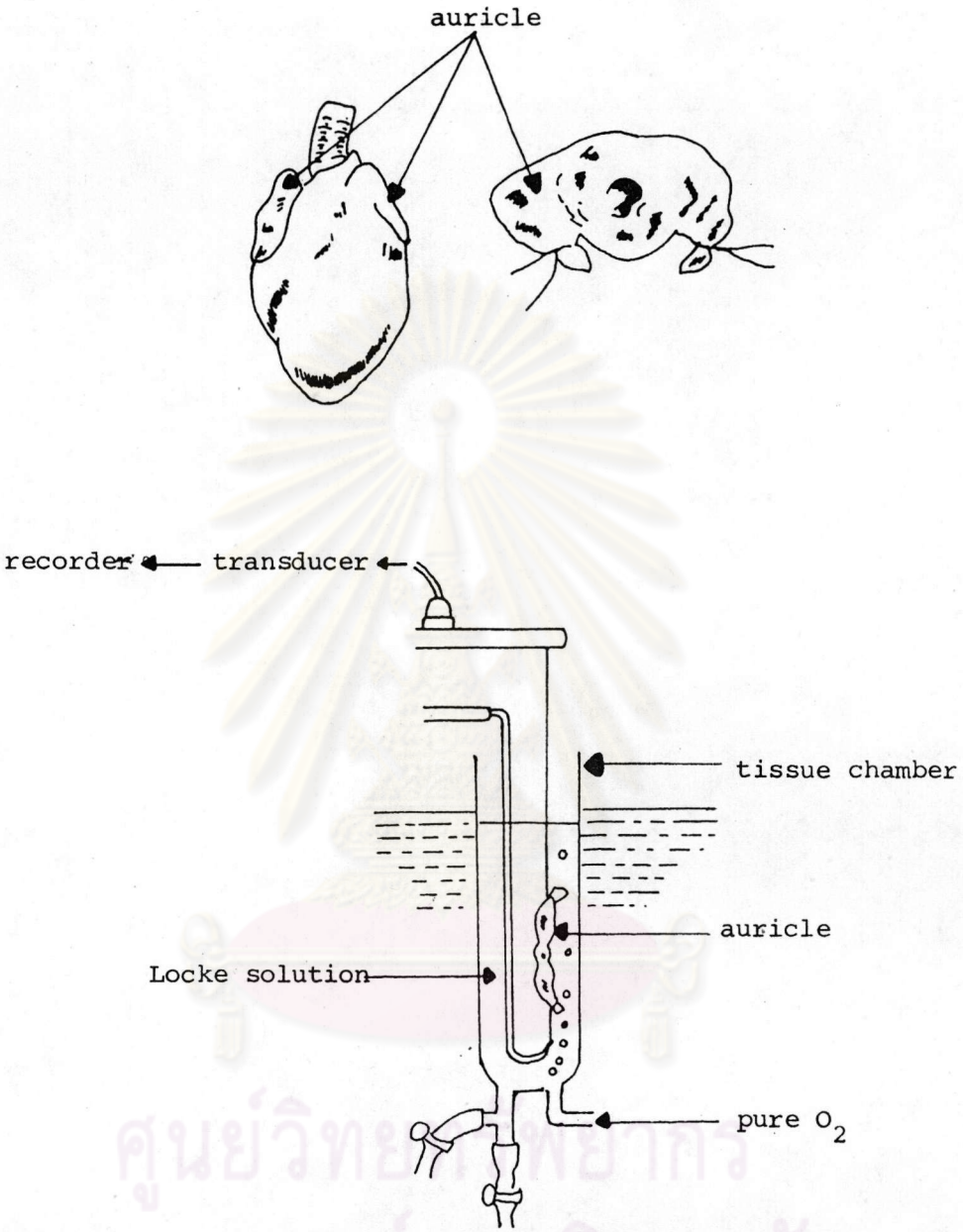
เตรียมกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนด้วยวิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วทุกประการ ตัดแยกหัวใจห้องบนขวาออกจากห้องซ้ายอย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันมิให้เนื้อเยื่อบริเวณที่เป็น pace maker ถูกทำลาย ใช้ด้ายผูกที่ปลายแหลมของหัวใจห้องบนขวาทั้ง 2 ปลาย ปลายละเส้น แล้วดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับในการทดลองศึกษาผลต่อหัวใจห้องบนทุกประการ

2.2.8 การศึกษาผลเบื้องต้นของส่วนที่ถูกสกัดด้วยอีเธอร์ (ส่วนสกัด ย.)ต่อความแรงในการบีบตัวของหัวใจห้องบนซ้ายซึ่งถูกกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electrical driven preparation)

นำปลายข้างหนึ่งของหัวใจห้องบนซ้ายที่ถูกตัดแยกออกจากห้องขวาเกี่ยวเข้ากับขั้วไฟฟ้า และจุ่มลงบริเวณก้นกระเปาะแก้วซึ่งบรรจุสารละลาย Locke จำนวน 25 มล. ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37°c และมีก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ผ่านตลอดเวลา ปลายอีกข้างหนึ่งผูกด้วยด้ายโยงให้ตึงและผูกติดกับ isometric transducer ซึ่งต่อเข้ากับ recorder

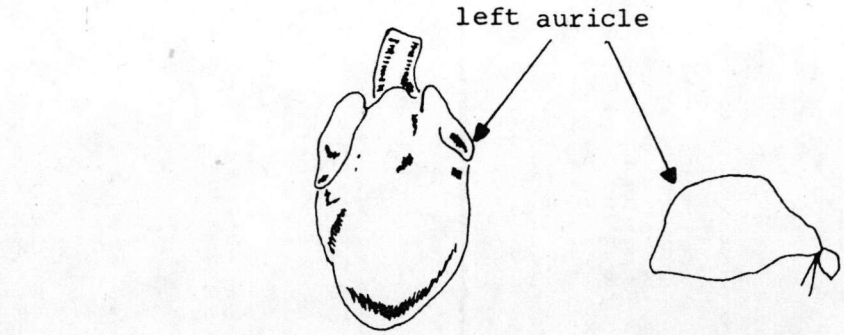
ขั้วไฟฟ้าต่อเข้ากับเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (electrical stimulator)กระตุ้นหัวใจด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีลักษณะเป็น square wave pulse ช่วงละ 2 millisecond ความถี่ 240 ครั้ง/นาที และความต่างศักดิ์ไฟฟ้า 5 โวลท์

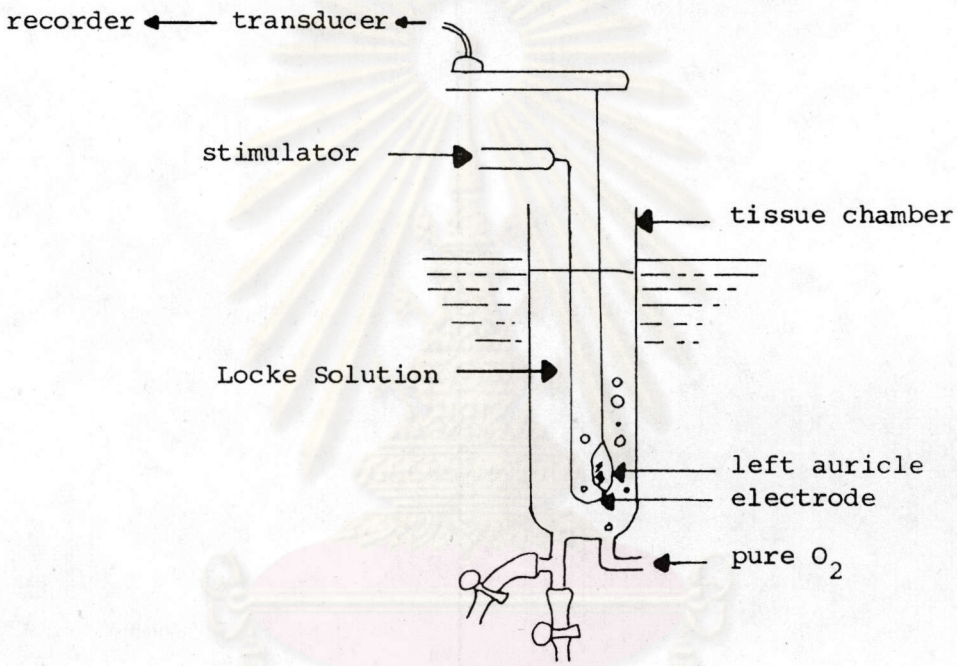
ให้เนื้อเยื่อพักจนความแรงในการบีบตัวคงที่ แล้วจึงเติมส่วนสกัดหรือตัวทำละลายจำนวน 0.05 มล. ลงในกระเปาะแก้ว (รูปที่ 6)



รูปที่ 5. แสดงการเตรียม isolated rat auricle

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6. แสดงการเตรียม isolated rat left auricle

2.2.9 การศึกษาผลเบื้องต้นของส่วนที่ถูกสกัดด้วยอีเธอร์ต่อการหดตัวของมดลูกหนูขาวที่ตัดแยกจากตัวสัตว์ทดลอง

เตรียมมดลูกหนูขาว โดยใช้หนูขาวเพศเมียน้ำหนักประมาณ 150-200 กรัม หนึ่งวันก่อนการทดลอง ฉีด estradiol benzoate ในขนาด 0.1 มก./กก.น้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง[28] ให้แก่สัตว์ทดลองโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เพื่อทำให้มดลูกอยู่ในระยะ estrous

วันต่อมา ทำให้สัตว์ทดลองหมดความรู้สึกโดยใช้แท่งเหล็กตีบริเวณรอยต่อระหว่างคอกับส่วนหัว แล้วเปิดหน้าท้อง ตัดมดลูก (uterine horn) ออกจากตัวทั้ง 2 ข้าง นำมาแช่ใน petri dish ซึ่งบรรจุสารละลาย De Jalon (ส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 2) และมีก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกจากกล้ามเนื้อมดลูกอย่างระมัดระวัง แล้วตัดมดลูกให้ได้ความยาวประมาณชิ้นละ 1.5-2 ซม. ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้าง โดยปล่อยให้ปลายเปิด นำไปแขวนในกระเปาะแก้วที่แช่อยู่ใน isolated organ bath และควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 32°c ในกระเปาะแก้วบรรจุสารละลาย De Jalon ซึ่งมีก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ผ่านตลอดเวลา ด้ายเส้นหนึ่งผูกกับขอแก้วซึ่งจุ่มไว้บริเวณก้นกระเปาะแก้ว ส่วนอีกเส้นหนึ่งโยงให้ตึงผูกติดกับ isotonic transducer ซึ่งต่อเข้ากับ recorder (รูปที่ 7)

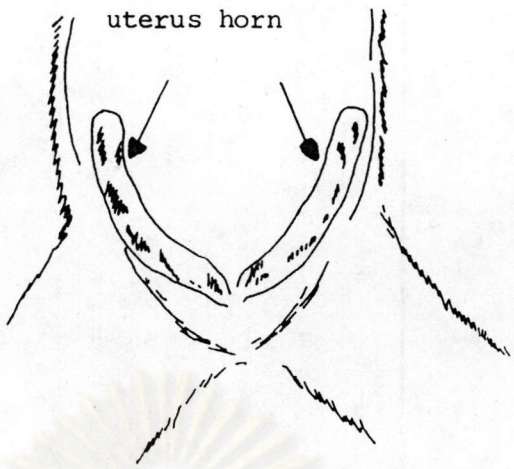
ให้เนื้อเยื่อพักประมาณ 30-60 นาที จนลักษณะของ spontaneous contraction หายไป แล้วจึงดำเนินการทดลองเป็นลำดับดังนี้

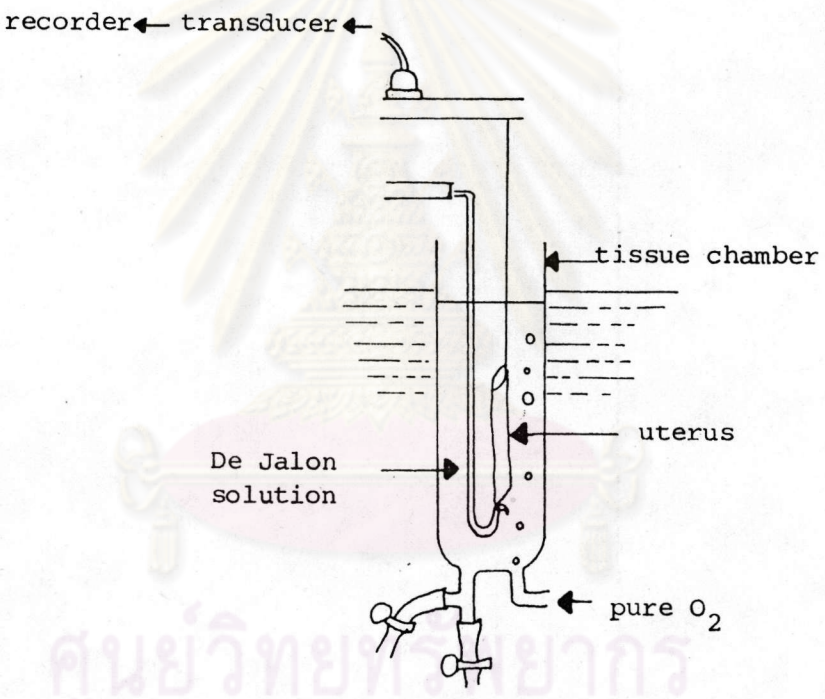
1. เติม oxytocin ขนาด $4x10^{-5}$ หน่วยมาตรฐานสากล (international unit)./มล. ลงในกระเปาะแก้ว ให้ออกฤทธิ์อยู่นาน 5 นาที แล้วล้างออก พัก 6 นาที

2. เติมส่วนสกัด ข.ขนาด 10 มคก./มล.ลงในกระเปาะแก้ว ต่อจากนั้น 2 นาที เติม oxytocin และให้ออก ฤทธิ์อยู่นาน 5 นาที ล้างออก พัก 6 นาที

3. ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1 และ 2 แต่ใช้ตัวทำละลายแทนส่วนสกัด ข.

4. ดำเนินการทดลองข้อ 1 ซ้ำ





รูปที่ 7. แสดงการเตรียม isolated rat uterus

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของ De Jalon solution

สารเคมี	จำนวนกรัม/ลิตร
NaCl	9.0
KCl	0.42
$CaCl_2$	0.06
$NaHCO_3$	0.50
Glucose	0.50
Aerating gas pure O_2	
pH	7.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย