บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง เคมีภัณฑ์และเครื่องมือ

1.1 สัตว์ทดลอง

กระต่าย เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 1.5-2 กก. จากฟาร์มผู้เลี้ยง

หนูตะเภา เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 400-700 กรัม จากฟาร์มผู้เลี้ยง

หนูถีบจักร (mice) น้ำหนักประมาณ 20-25 กรัม จากโครงการศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

1.2 ยาและเคมีภัณฑ์

andrographolide สกัดจากใบของ *A. paniculata* ซึ่งเป็นงานวิจัยของ ผศ. ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

acetylcholine chloride (MW = 181.66)

atropine sulfate (MW = 694.85)

histamine dihydrochloride (MW = 184.1)

chlorpheniramine maleate (MW = 390.87)

verapamil hydrochloride (Isoptin, MW = 454.59)

$BaCl_2.2H_2O$ (MW = 244.31)

สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียม Tyrode's solution และ potassium - depolarizing Tyrode's solution ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 สารเคมีทั้งหมดเป็น analytical grade

NaCl (MW = 58.44), $NaHCO_3$ (MW = 84.01), KCl (MW = 74.56)

$CaCl_2.2H_2O$ (MW = 147.02), $MgCl_2.6H_2O$ (MW = 203.30)

NaH_2PO_4 (MW = 119.98), D(+)-glucose (MW = 147.02)

1.3 เครื่องมือ

organ bath ประกอบด้วยท่อแก้ว 2 ชั้น ชั้นในสำหรับบรรจุ physiological solution มีความจุ 25 มล. ชั้นนอกบรรจุน้ำกลั่นที่อุ่นและไหลเวียนตลอดเวลา เพื่อควบคุมอุณหภูมิของสารละลายในท่อแก้วชั้นในให้คงที่ที่ 37°C ดังแสดงในรูปที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของ physiological solution

	Tyrode's solution g / litre	potassium-depolarizing Tyrode's solution g / litre
NaCl	8.00	1.58
KCl	0.20	7.46
$MgCl_2.6H_2O$	0.21	0.25
$CaCl_2.2H_2O$	0.26	-
NaH_2PO_4	0.05	-
$NaHCO_3$	1.00	1.26
Glucose	1.00	1.98
aerating gas 95% O_2 + 5% CO_2		

Thermoregulating water pump (Churchill type) เป็นเครื่องช่วยควบคุมอุณหภูมิของน้ำกลั่นให้ได้ 37°C, และทำให้น้ำกลั่นไหลเวียนในท่อแก้วชั้นนอกของ organ bath

oscillograph recorder, semiisotonic transducer, isometric transducer และ electrical stimulator ของบริษัท Harvard Apparatus

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมสารละลายของ andrographolide

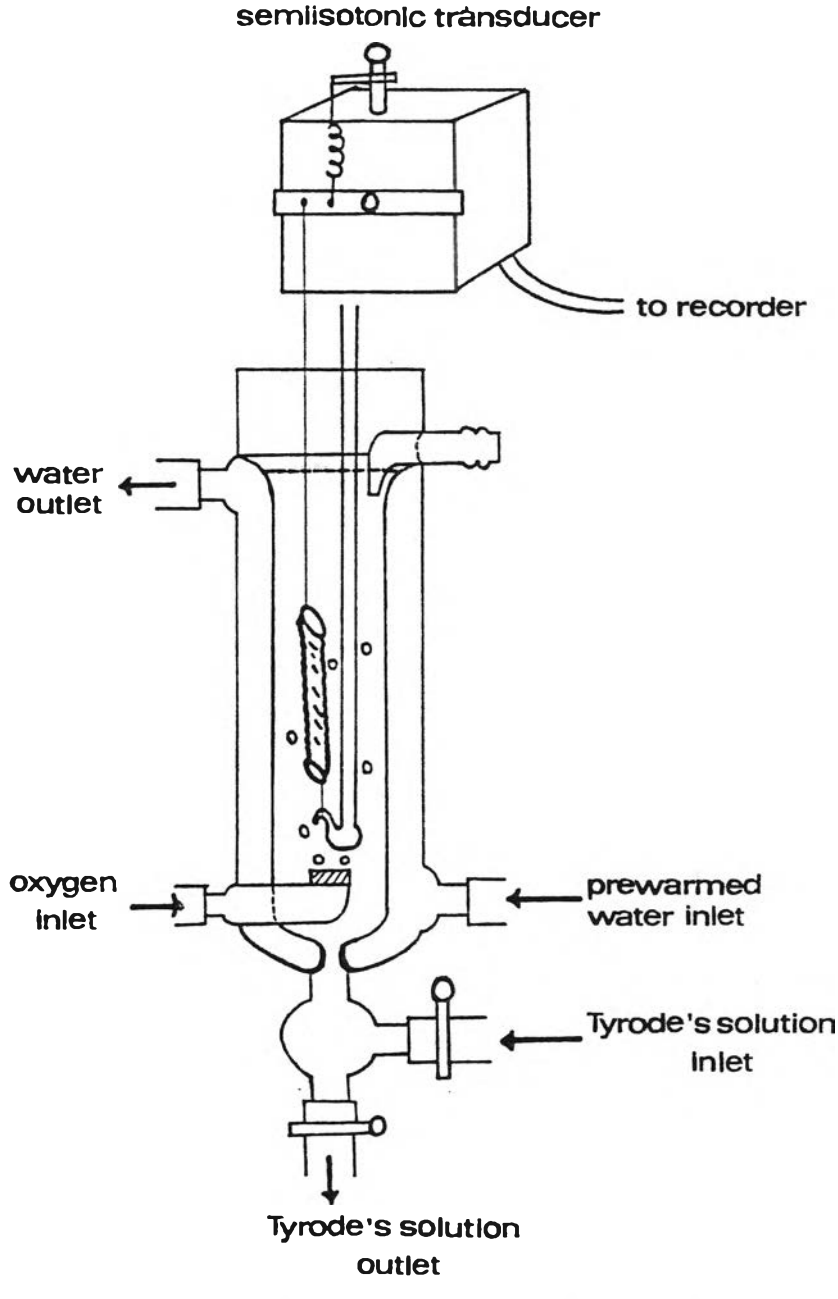
ชั่ง andrographolide 20 มก. ละลายใน absolute ethanol ปรับปริมาตรจนครบ 4 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 5 มก./มล. ใส่ในขวดปิดฝาให้สนิท

2.2 ศึกษาฤทธิ์ของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวกระต่าย (isolated rabbit jejunum)

ให้กระต่ายอดอาหารตลอดคืนก่อนทำการทดลอง ให้กินน้ำเพียงอย่างเดียว ทำให้กระต่ายสลบโดยตีบริเวณรอยต่อหัวและคอ แล้วเปิดหน้าท้องแยกลำไส้เล็กส่วน jejunum ใส่ในสารละลาย Tyrode ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 (Perry, 1970) ล้างลำไส้ให้สะอาดด้วยสารละลาย Tyrode ตัดลำไส้ให้ยาวชิ้นละ 1-2 ซม. ใส่ใน petri dish ที่มีสารละลาย Tyrode อยู่และให้ 95% O_2 ผสมกับ 5% CO_2 ตลอดเวลา ตัดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดกับลำไส้ออก ใช้ด้ายผูกปลายลำไส้ทั้งสองด้านให้อยู่ในลักษณะปลายเปิด แล้วนำปลายด้ายด้านหนึ่งผูกติดกับขอแก้ว จุ่มขอแก้วลงใน organ bath ที่บรรจุสารละลาย Tyrode ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37°C และให้ 95% O_2 ผสมกับ 5% CO_2 ผ่านตลอดเวลา ปลายด้ายด้านหนึ่งเกี่ยวกับ semiisotonic transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับ oscillograph recorder ดังแสดงในรูปที่ 3

เมื่อเตรียมลำไส้เรียบร้อยแล้ว incubate ประมาณ 40 นาทีจึงเริ่มการทดลอง โดยบันทึกการหดตัวที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous contraction) ประมาณ 5 นาทีจึงเริ่มให้ยา การให้ยาแบ่งเป็น 2 วิธีคือ

ก. ให้ยาแบบสะสม (cumulative dose) โดยให้สารละลาย andrographolide ในขนาดต่าง ๆ กันไม่ต้องล้างยาเก่าออก การให้ยาแต่ละขนาดห่างกัน 5 นาที ความเข้มข้นของ andrographolide ที่ให้อยู่ระหว่าง 1.14×10^{-5}M - 10.27×10^{-5}M เนื่องจากใช้ absolute ethanol เป็นตัวทำละลายจึงต้องศึกษาผลของ absolute ethanol เปรียบเทียบโดยให้เท่ากับปริมาตรที่ใช้ละลาย andrographolide แต่ละขนาด ความเข้มข้นที่ให้อยู่ระหว่าง 1.37×10^{-2}M - 12.35×10^{-2}M ให้เป็นแบบสะสมเช่นเดียวกัน



รูปที่ 3 แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับการทดลองที่ทำกับลำไส้เล็กของกระต่ายหรือของหนูตะเภาที่แยกจากตัวสัตว์ทดลอง

ข. ให้ยาครั้งเดียว (single dose) การทดลองได้ให้ andrographolide ความเข้มข้น 8×10^{-5} M และ 1×10^{-4} M สำหรับ absolute ethanol ให้ 1.2×10^{-1} M ซึ่งเท่ากับปริมาตรที่ใช้ละลาย andrographolide ขนาด 1×10^{-4} M

2.3 ศึกษาฤทธิ์ของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวหนูตะเภา (isolated guinea pig ileum)

หนูตะเภาที่ใช้ทดลองต้องอดอาหารตลอดคืนก่อนทำการทดลอง ให้กินน้ำเพียงอย่างเดียว ทำให้หนูตะเภาสลบโดยตีบริเวณรอยต่อหัวและคอ จากนั้นเปิดหน้าท้องแยกเอาลำไส้เล็กส่วน ileum ที่อยู่เหนือ ileocaecal junction ประมาณ 10 ซม. ต่อไปเตรียมลำไส้เช่นเดียวกับในข้อ 2.2 ในการทดลองนี้จะถ่วงน้ำหนัก 1 กรัมที่คานของ semiisotonic transducer ตลอดการทดลอง หลังจากเตรียมลำไส้เรียบร้อยแล้ว incubate ประมาณ 40 นาที จึงทำการทดลองดังต่อไปนี้

ก. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้ที่ถูกกระตุ้นโดย agonist ต่าง ๆ ได้แก่ acetylcholine, histamine และ barium chloride รวมทั้งศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของ andrographolide กับ antagonist ของสารกระตุ้นดังกล่าว ได้แก่ atropine, chlorpheniramine และ verapamil

ทำ cumulative dose-response curve ของ agonist โดยใช้เทคนิคของ VanRossum แล้วล้างลำไส้ด้วยสารละลาย Tyrode หลาย ๆ ครั้ง เพื่อล้างเอา agonist ออกให้หมด ให้ลำไส้พักประมาณ 40 นาที ลำไส้จะคลายตัวสู่สภาพเดิมก่อนกระตุ้นโดยสังเกตที่ปลายปากกาของ recorder จะกลับสู่ baseline จากนั้นให้สารละลาย andrographolide ให้ยาสัมผัสกับลำไส้นาน 10 นาทีไม่ต้องล้างออก แล้วทำ cumulative dose-response curve ของ agonist อีกครั้ง เสร็จแล้วนำลำไส้ทิ้งไป เตรียมลำไส้ชิ้นใหม่เมื่อทำการทดลองซ้ำ การประเมินผลการทดลองทำโดยวัดขนาดของการหดตัวของลำไส้เป็น มม. แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของ maximum contraction (ได้จากการทำ cumulative dose-responise curve ครั้งแรก) ความเข้มข้นของ andrographolide ที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 8×10^{-5} M และ 1×10^{-4} M สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบผลของ absolute ethanol 1.2×10^{-1} M, atropine 7.2×10^{-9} M, chlorpheniramine

2.6×10^{-9} M และ verapamil 4.4×10^{-8} M จะกระทำโดยวิธีการเดียวกัน

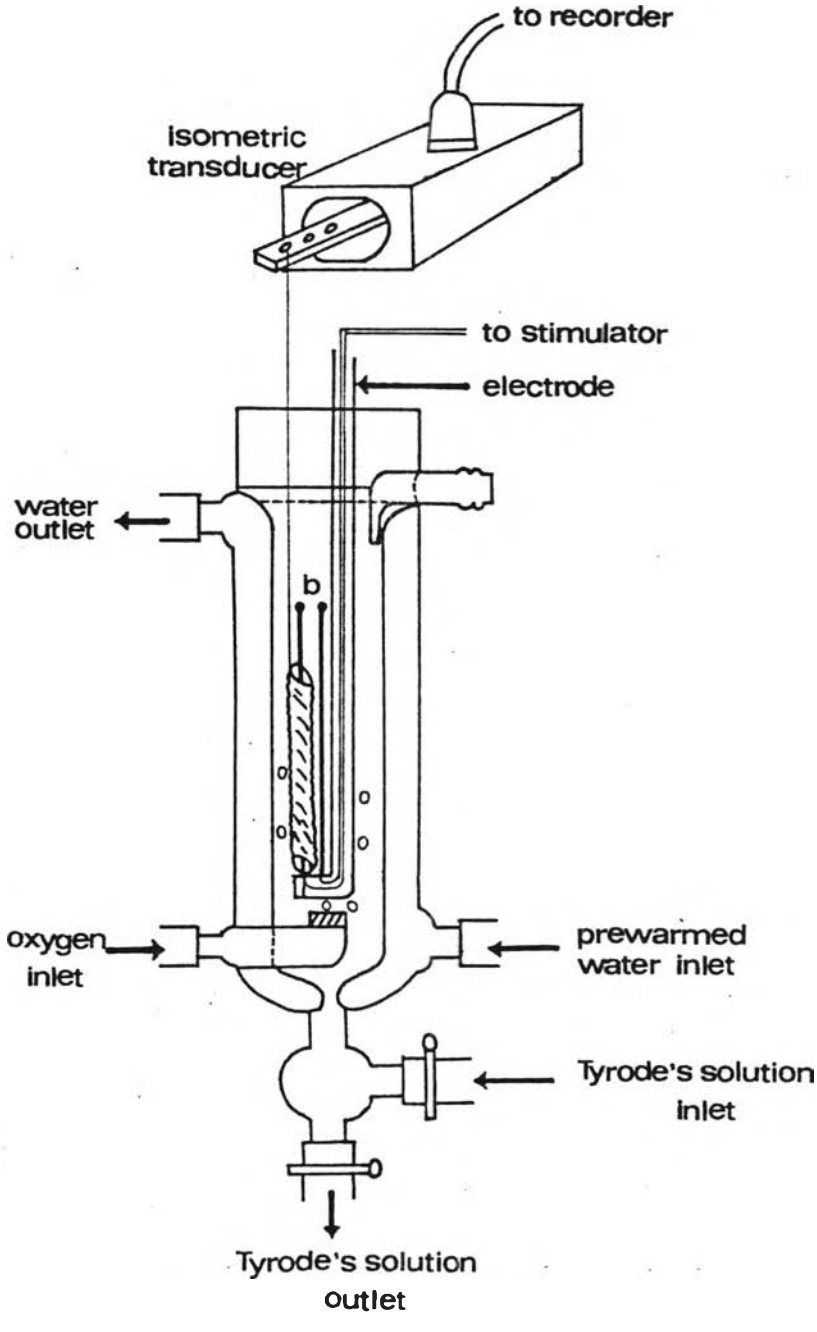
ข. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้ที่ถูกกระตุ้นด้วย calcium chloride ใน potassium-depolarizing Tyrode's solution

หลังจาก incubate ลำไส้ใน normal Tyrode's solution เป็นเวลา 40 นาทีแล้วเปลี่ยนเป็น potassium-depolarizing Tyrode's solution ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 (Van Den Broucke & Lemli, 1980) เมื่อเปลี่ยนสารละลายลำไส้จะถูกกระตุ้นให้หดตัวจาก high potassium ล้างลำไส้ด้วย potassium-depolarizing Tyrode's solution หลาย ๆ ครั้ง ลำไส้จะค่อย ๆ คลายตัวจนกลับสู่สภาพเดิมโดยสังเกตที่กระดาษบันทึกปลายปากกาจะกลับสู่ baseline จากนั้นให้ calcium chloride 1.8 mM ลำไส้จะหดตัว เมื่อหดตัวสูงสุดแล้วให้สารละลาย andrographolide บันทึกผลการทดลองต่ออีกประมาณ 20 นาที ทดสอบผลของ andrographolide สองความเข้มข้นคือ 8×10^{-5} M และ 1×10^{-4} M และศึกษาผลของ absolute ethanol 1.2×10^{-1} M เปรียบเทียบด้วยวิธีการเดียวกัน

ค. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของ andrographolide ต่อการหดตัวของลำไส้ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฟฟ้า

การกระตุ้นลำไส้ด้วยไฟฟ้าเป็นแบบ coaxial stimulation ตามวิธีของ Paton โดยใช้ platinum electrode ที่มี 2 ขั้วขนานกัน เมื่อผูกด้ายที่ปลายทั้งสองด้านของลำไส้แล้ว นำขั้วหนึ่งของ electrode สอดเข้าใน lumen ของลำไส้เพื่อเป็น internal electrode ปลายด้ายด้านหนึ่งผูกที่ขอด้านล่างของ electrode ปลายอีกด้านหนึ่งผูกกับ isometric transducer ซึ่งจะต่อเข้ากับ oscillograph recorder ส่วนของ internal electrode ที่อยู่นอก lumen ของลำไส้จะเป็นฉนวน electrode อีกขั้วหนึ่งอยู่ภายนอกเพื่อเป็น external electrode ดังแสดงในรูปที่ 4

หลังจากเตรียมลำไส้เสร็จ incubate ประมาณ 40 นาที เริ่มกระตุ้นลำไส้ด้วยเครื่องกระตุ้นไฟฟ้า (electrical stimulator) โดยใช้ frequency 0.2 Hz. voltage 10 V. square-wave pulse duration 0.5 msec (Fosbraey &



รูปที่ 4 แสดงการจัดเครื่องมือสำหรับการทดลองที่ต้องกระตุ้นลำไส้เล็กของหนูตะเภาด้วยไฟฟ้าแบบ coaxial stimulation
b เป็นลวด platinum ที่ใช้เป็น internal และ external electrode

012420

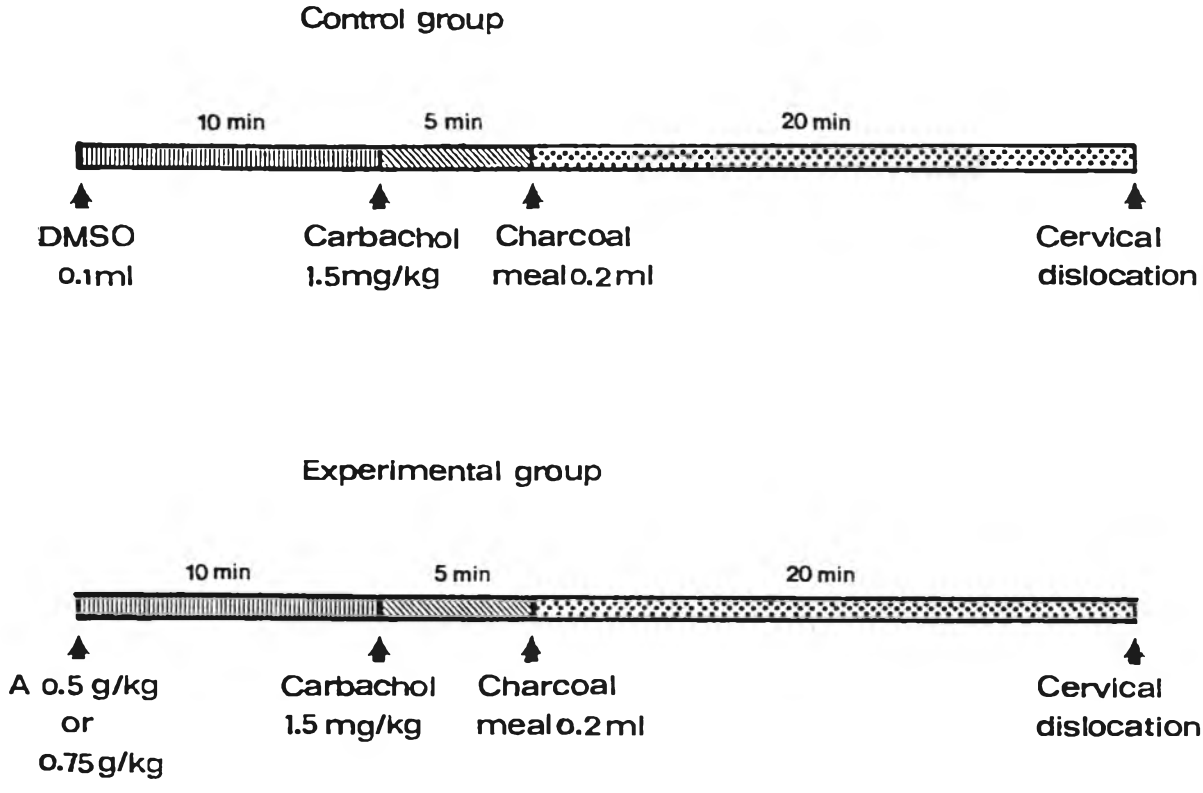
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Johnson, 1980) กระตุ้นนานประมาณ 3 นาที เมื่อหยุดกระตุ้นให้สารละลาย andrographolide หลังให้ยา 10 นาทีเริ่มกระตุ้นด้วยไฟฟ้าอีกครั้ง ความเข้มข้นของ andrographolide ที่ใช้ทดสอบเท่ากับ 8×10^{-5} M และ 1×10^{-4} M และได้ศึกษาผลของ absolute ehtanol 1.2×10^{-1} M และ atropine 7.2×10^{-9} M เปรียบเทียบด้วยวิธีการเดียวกัน

2.4 ศึกษาฤทธิ์ของ andrographolide ต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กในหนูถีบจักร (intact experiment)

ทำการทดลองในหนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนัก 23-25 กรัม แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม แต่ละกลุ่มให้มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน ให้หนูอดอาหารตลอดคืนก่อนทดลองให้กินน้ำเพียงอย่างเดียว วิธีการทดลองได้ทำตามวิธีของ Macht และ Barba-Gose สำหรับ charcoal meal ที่ใช้เป็นตัวชี้บอกถึงความมากน้อยของการเคลื่อนไหวของลำไส้นั้นมีส่วนประกอบดังนี้คือ tragacanth 2 กรัม และ purified animal charcoal 12 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 130 มล. โดยเตรียมเป็น suspension การเตรียมสารละลาย andrographolide ได้เปลี่ยนตัวทำละลายจาก absolute ethanol มาเป็น dimethylsulfoxide (DMSO) ซึ่งมีความสามารถในการทำละลายสูงกว่ามาก จึงสามารถให้สารละลาย andrographolide แก่สัตว์ทดลองด้วยปริมาตรน้อยแต่ความเข้มข้นสูงได้ การทดลองได้ให้ andrographolide ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 และ 0.75 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก. ฉีด carbachol ช่วยกระตุ้นให้ลำไส้เคลื่อนไหวมากขึ้นเพื่อให้เห็นความแตกต่างอย่างเด่นชัดระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง อีกทั้งยังเป็นการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของ andrographolide ต่อ carbachol ด้วย ได้ให้ carbachol ความเข้มข้น 1.5 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. ทั้ง andrographolide และ carbachol ให้หนูด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) ปริมาตรที่ฉีด 0.1 มล.

การทดลองได้แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และ กลุ่มทดลอง 2 กลุ่ม ขั้นตอนในการให้ยาในกลุ่มควบคุมแสดงในรูปที่ 5 เริ่มด้วยฉีด DMSO 0.1 มล. เข้าช่องท้อง จากนั้น 10 นาทีฉีด carbachol 1.5 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.เข้าช่องท้องเช่นกัน หลังฉีด carbachol 5 นาทีให้ charcoal meal 0.2 มล.ทางปาก โดยใส่เข็ม



รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนการให้ยาในการทดลองที่ต้องการศึกษาผลของ andrographolide ต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้ในหนูถีบจักร (*in vivo*)

ให้ยาทางปากเข้ากระเพาะหนู ปลายของเข็มต่อกับ tuberculin syringe ซึ่งบรรจุ charcoal meal ไว้ แล้วดัน charcoal meal เข้ากระเพาะช้า ๆ หลังจากนั้น 20 นาที ทำให้หนูสลบโดยดึงข้อต่อบริเวณลำคอ จากนั้นเปิดหน้าท้องตัดแยกกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กออกมา วัดระยะทางที่ charcoal เคลื่อนไปตามลำไส้เล็ก (เริ่มวัดจาก gastroduodenal junction) แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของความยาวลำไส้เล็กทั้งหมด (ระยะทางจาก gastroduodenal junction ถึง ileocaecal junction)

สำหรับการให้ยาในกลุ่มทดลองแสดงในรูปที่ 5 เริ่มด้วยการฉีดสารละลาย andrographolide ความเข้มข้น 0.5 หรือ 0.75 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก.เข้าช่องท้อง หลังจากนั้น 10 นาทีฉีด carbachol 1.5 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก.เข้าช่องท้อง หลังฉีด carbachol 5 นาทีให้ charcoal meal 0.2 มล.ทางปากด้วยวิธีการเดียวกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้ charcoal meal ครบ 20 นาที ทำให้หนูสลบโดยดึงข้อต่อบริเวณลำคอ การทดลองขั้นต่อไปทำเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมทุกประการ

2.5 ทดสอบขนาดที่ทำให้เกิดพิษของ andrographolide ในหนูถีบจักร

ทดลองในหนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนัก 20-25 กรัม การให้ andrographolide ได้ให้ 2 วิธีคือ

ก. ฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม แต่ละกลุ่มให้มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน ให้สารละลาย andrographolide แก่หนูแต่ละกลุ่มด้วยขนาด 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก. โดยละลาย andrographolide ใน DMSO ฉีดเข้าช่องท้องด้วยปริมาตร 0.15 มล. ในแต่ละกลุ่มแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มควบคุม (4 ตัว) และกลุ่มทดลอง (9-10 ตัว) หนูในกลุ่มควบคุมฉีด DMSO 0.15 มล.เข้าช่องท้อง หลังฉีด DMSO และ andrographolide สังเกตอาการเปลี่ยนแปลง 7 วัน

ข. ให้ยาทางปาก หนูที่ใช้ทดลองต้องอดอาหารตลอดคืนก่อนทดลองให้กินน้ำเพียงอย่างเดียวเพื่อให้ทางเดินอาหารว่าง ยาจะได้ดูดซึมดีขึ้น เตรียม andrographolide เป็น suspension ความเข้มข้น 0.12 กรัม/มล. ให้ยาแก่หนูทั้งหมด 19 ตัว ทางปากด้วยขนาด 3 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก. วิธีการให้ยาใส่เข็มให้ยาทางปากเข้า

กระเพาะหนู ปลายของเข็มจะต่อกับ tuberculin syringe ซึ่งบรรจุ andrographolide suspension ไว้ ดันยาเข้ากระเพาะช้า ๆ หลังให้ยาสังเกตอาการเปลี่ยนแปลง 3 วัน

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลจะแสดงผลในรูป mean และ standard error of mean (SE) ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติ "Student's t test" เมื่อ P-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การคำนวณหาความเข้มข้นของยาที่ทำให้เกิด 50% inhibition (ID_{50}) โดยเปลี่ยน dose-response curve ให้เป็น linear-regression line (เดิมศรี ชำนิจารกิจ, 2525) ดังสมการ

$$Y' = \log \frac{Y}{100 - Y}$$

Y คือ เปอร์เซ็นต์ inhibition ที่เกิดจากยา ลาก linear-regression line ตัดแกน X ซึ่งเป็นขนาดของยาที่ให้ จุดที่ตัดแกน X คือค่า ID_{50} (เพราะเมื่อ Y = 50%, Y' = 0)

การคำนวณ drug parameter ใช้วิธีคำนวณของ VanRossum ค่า logarithm ของ affinity ของ competitive antagonist แสดงในรูป PA_2 values ซึ่งก็คือค่าของ negative logarithm ของความเข้มข้นของ competitive antagonist ในหน่วย molar ที่ทำให้ต้องเพิ่มความเข้มข้นของ agonist สองเท่าจึงจะได้การตอบสนองเท่าเดิม PA_2 value คำนวณได้จากสมการ

$$PA_2 = - \log [B] + \log \left(\frac{[A_B]}{[A_o]} - 1\right)$$

B คือความเข้มข้นของ competitive antagonist ในหน่วย molar

A_B, A_o คือ ความเข้มข้นของ agonist ในหน่วย molar ที่ทำให้เกิด 50% response เมื่อมี antagonist และไม่มี antagonist ตามลำดับ

logarithm ของ affinity ของ noncompetitive antagonist แสดงในรูป PD_2' values ซึ่งก็คือค่าของ negative logarithm ของความเข้มข้นของ noncompetitive antagonist ในหน่วย molar ซึ่งทำให้ maximum response ที่เกิดจาก agonist ลดลง 50% PD_2' value คำนวณจากสมการ

$$PD_2' = - \log [B'] + \log \left(\frac{E_{Am}}{E_{AmB'}} - 1\right)$$

B' คือ ความเข้มข้น noncompetitive antagonist ในหน่วย molar

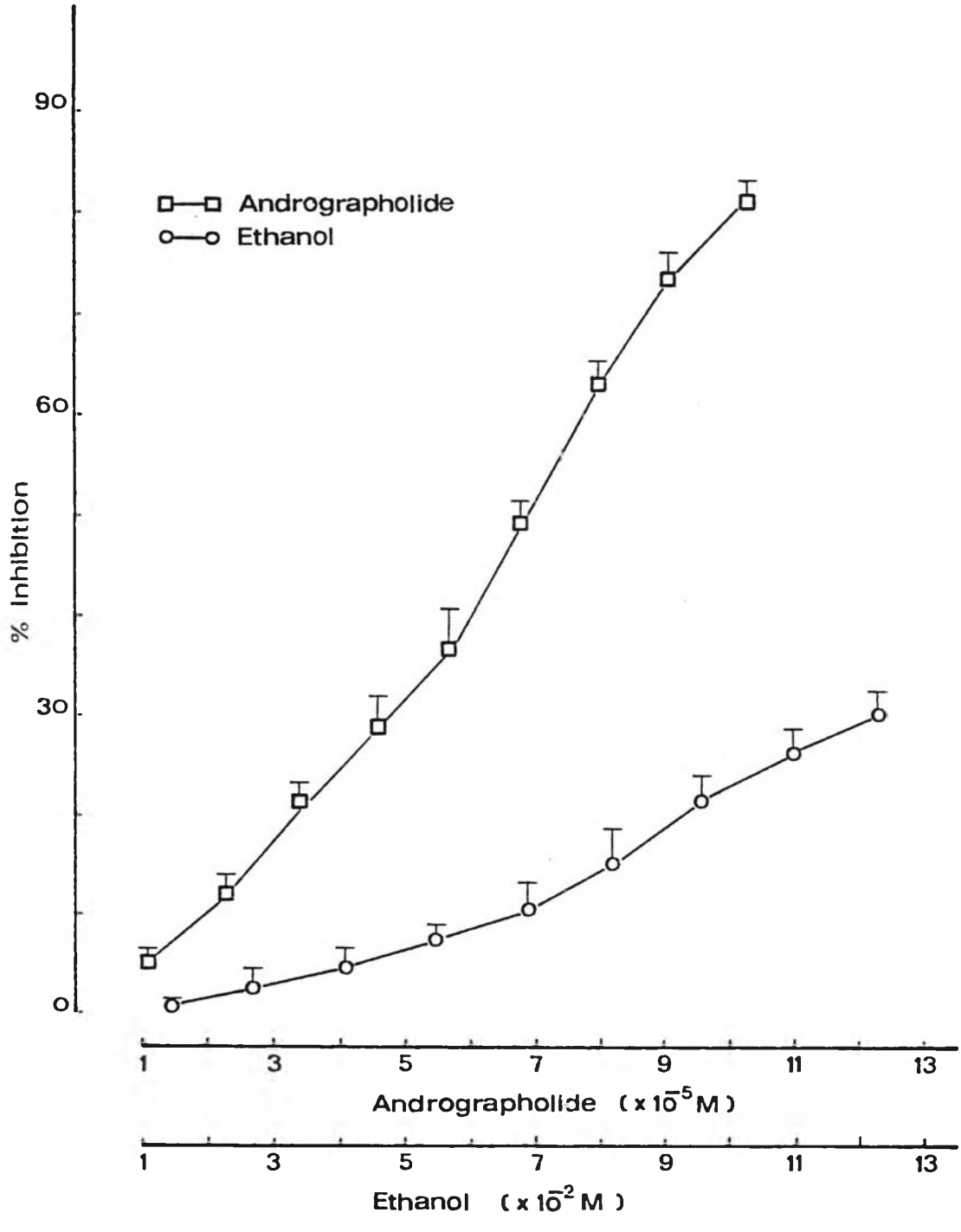
E_{Am}, $E_{AmB'}$ คือ maximum contraction ที่เกิดจาก agonist เมื่อไม่มี antagonist และมี antagonist ตามลำดับ

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

ลำไส้กระต่ายได้แต่น้อยกว่าผลที่เกิดจากสารละลาย andrographolide absolute ethanol ที่ความเข้มข้น 1.37×10^{-2}M ลดแรงหดตัวของลำไส้ได้ 0.81 ± 0.31% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 12.35×10^{-2}M แรงหดตัวของลำไส้ลดลง 30.19 ± 2.33% absolute ethanol มีผลต่อความแรง (amplitude) ของการหดตัว แต่ไม่มีผลต่ออัตราการหดตัวของลำไส้ เมื่อล้าง absolute ethanol ออกโดยใช้สารละลาย Tyrode การหดตัวของลำไส้กลับคืนได้อีกเช่นกัน ใช้สถิติทดสอบความแตกต่างระหว่างผลของ andrographolide และผลของ absolute ethanol ต่อแรงหดตัวของลำไส้ พบว่าทุก ๆ จุดของ dose-response curve ในรูปที่ 6 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การทดลองนี้สามารถคำนวณความเข้มข้นของ andrographolide และ absolute ethanol ที่ทำให้เกิด 50% inhibition (ID_{50}) การคำนวณใช้วิธี intrapolation ของ linear-regression line ที่ได้จาก dose-response curve ในรูปที่ 6 ได้ ID_{50} ของ andrographoline เท่ากับ 6.86×10^{-5}M (SE = 0.24×10^{-5}) และ ID_{50} ของ absolute ethanol เท่ากับ 1.8×10^{-1}M (SE = 0.1)

นอกจากนี้ยังได้ทดสอบผลของ andrographolide ต่อ spontaeous contraction ของลำไส้กระต่ายโดยการให้ยาเพียงครั้งเดียว (single dose) ให้ andrographolide ด้วยความเข้มข้นเท่ากับ 8×10^{-5}M และ 1×10^{-4}M ส่วนความเข้มข้นของ absolute ethanol เท่ากับ 1.2×10^{-1}M ซึ่งเท่ากับปริมาตรของ absolute ethanol ที่ใช้ละลาย andrographolide ความเข้มข้น 1×10^{-4}M ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 7 เมื่อให้ absolute ethanol 1.2×10^{-1}M แรงหดตัวของลำไส้จะเพิ่มขึ้นทันที (รูปที่ 7a) บันทึกผลนาน 5 นาทีแรงหดตัวของลำไส้ลดลงและคงที่อยู่ระดับหนึ่ง absolute ethanol ลดแรงหดตัวของลำไส้ได้ 7.32 ± 3.08% ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งได้แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์ของแรงหดตัวก่อนให้ยา andrographolide สามารถลดแรงหดตัวของลำไส้ได้ตามความเข้มข้นของยาที่ให้ (รูปที่ 7b,c) andrographolide ความเข้มข้น 8×10^{-5}M และ 1×10^{-4}M ลดแรงหดตัวของลำไส้ได้ 36.81 ± 3.75% และ 69.07 ± 4.39% ตามลำดับ (รูปที่ 8) เมื่อทดสอบความแตกต่างทางสถิติพบว่า ผลของ



รูปที่ 6 cumulative dose-response curve ของ andrographolide และ absolute ethanol ได้จากฤทธิ์ยับยั้งต่อ spontaneous contraction ของลำไส้เล็กที่แยกจากตัวกระต่าย ผลแสดงในรูปของ mean และ SE andrographolide (n = 6), ethanol (n = 5)