บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (albino rat) เพศผู้ พันธุ์ Wistar ขนาดน้ำหนักระหว่าง 160-180 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย

2. วิธีดำเนินการวิจัย

แบ่งเป็น 4 ขั้นตอนคือ

2.1 การศึกษาขนาด และระยะเวลาที่เหมาะสมของเอธานอลในการทำให้เกิดพิษต่อตับในหนูขาว

2.1.1 Subacute hepatotoxicity

- หลักการ : ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 20 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว โดยให้สัตว์ทดลองได้รับเอธานอล ขนาดต่าง ๆ คือ 2, 3 และ 4 กรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก ทุกวัน ๆ ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ทางปาก
กลุ่มที่ 2 เอธานอล ขนาด 2 กรัมต่อกิโลกรัม
กลุ่มที่ 3 เอธานอล ขนาด 3 กรัมต่อกิโลกรัม
กลุ่มที่ 4 เอธานอล ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ข้อกำหนด : หลังจากให้เอธานอลไปแล้วที่ 7, 14 และ 21 วัน ทำการเจาะเลือดจากหนูทุกตัว นำไปวัดระดับ SGOT และ SGPT อาศัยหลักการวิเคราะห์โดยวิธีเทียบสี (Reitman and Frankel, 1957) สำหรับที่ 21 วัน หลังเจาะเลือด ฆ่าหนูโดยวิธี cervical dislocation แล้วเปิดช่องท้องนำตับส่วนหนึ่งมา homogenize กับ normal saline แล้วนำไป centrifuge รินเอาส่วนใสไปวัดระดับ triglyceride อาศัยหลักการวิเคราะห์โดยวิธีเทียบสี (Mendez, Franklin and Gahagan, 1975) และตัดชิ้นเนื้อตับออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งแช่ใน 10% formaline v/v ส่งทำ histopathological examination อีกส่วนหนึ่งแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer ส่งทำ electron microscope

2.1.2 Acute hepatotoxicity

- หลักการ : ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 25 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว โดยให้สัตว์ทดลองได้รับเอธานอลขนาด 3, 4, 5 และ 6 กรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก 1 ครั้ง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ทางปาก 1 ครั้ง

กลุ่มที่ 2 ให้เอธานอล ขนาด 3 กรัมต่อกิโลกรัม

กลุ่มที่ 3 ให้เอธานอล ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัม

กลุ่มที่ 4 ให้เอธานอล ขนาด 5 กรัมต่อกิโลกรัม

กลุ่มที่ 5 ให้เอธานอล ขนาด 6 กรัมต่อกิโลกรัม

- ข้อกำหนด : หลังจากให้เอธานอลไปแล้ว 2 ชั่วโมง จึงทำการเจาะเลือดจากหนูทุกตัว นำไปวัดระดับ SGOT และ SGPT แล้วเก็บหนูไว้ทำการศึกษาในหัวข้อที่ 2.2.1 ต่อไป โดยทิ้งไว้ 7 วัน

2.2 การศึกษาขนาดและระยะเวลาที่เหมาะสม ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ที่สามารถมีฤทธิ์ป้องกันตับจากพิษของเอธานอล พร้อมกับศึกษาฤทธิ์ของสารแอนโดรกราโฟไลด์ต่อเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในหนูขาว

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.1 หาระยะเวลาที่เหมาะสม

- หลักการ : ใช้สัตว์ทดลองต่อจากการศึกษาข้อย่อยที่ 2.1.2 จำนวน 25 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว เช่นเดิม โดยให้สัตว์ทดลองได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ในรูปของสารแขวนตะกอน ใน 60% sucrose w/v ในขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดทางช่องท้อง 1 ครั้ง ก่อนได้รับเอธานอลขนาดต่างๆ คือ 3, 4, 5 และ 6 กรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้สารแอนโดรกราโฟไลด์ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 ให้สารแอนโดรกราโฟไลด์ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล 3 กรัมต่อกิโลกรัม

กลุ่มที่ 3 ให้สารแอนโดรกราโฟไลด์ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล 4 กรัมต่อกิโลกรัม

กลุ่มที่ 4 ให้สารแอนโดรกราโฟไลด์ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล 5 กรัมต่อกิโลกรัม

กลุ่มที่ 5 ให้สารแอนโดรกราโฟไลด์ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล 6 กรัมต่อกิโลกรัม

- ข้อกำหนด : หลังจากให้เอธานอลไปแล้ว 2 ชั่วโมง ทำการเจาะเลือดหนูทุกตัว นำไปวัดระดับ SGOT และ SGPT หลังจากนั้นที่ 48 ชั่วโมง หลังให้สารแอนโดรกราโฟไลด์ ให้เอธานอลซ้ำไปอีก 1 ครั้ง ตามขนาดต่าง ๆ แล้วทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จึงทำการเจาะเลือด นำไปวัดระดับ SGOT และ SGPT ฆ่าหนูโดยวิธี cervical dislocation นำตับไปวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ แอลกอฮอล์-ดีไฮโดรจีเนส (Lumeng, Bosron and Li, 1979)

2.2.2 หาขนาดที่เหมาะสม

- หลักการ : ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 25 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว โดยให้สัตว์ทดลองได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ ขนาดต่าง ๆ คือ 20, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางช่องท้อง ก่อนได้รับเอธานอลขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้เอธานอล 4 กรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก 1 ครั้ง

กลุ่มที่ 2 สารแอนโดรกราโฟไลด์ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล 48 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 3 สารแอนโดรกราโฟไลด์ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล 48 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 4 สารแอนโดรกราโฟไลด์ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล 48 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 5 สารแอนโดรกราโฟไลด์ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล 48 ชั่วโมง

- ข้อกำหนด : ก่อนให้เอธานอล ทำการเจาะเลือดหนูทุกตัว แล้วนำซีรั่มไปวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส พร้อมกับวัดระดับ SGOT และ SGPT

หลังให้เอธานอล แล้ว 2 ชั่วโมง ทำการเจาะเลือด นำไปวัดระดับ SGOT และ SGPT ฆ่าหนูทุกตัว นำตับไปวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และตัดชิ้นเนื้อตับ แช่ใน 10% formaline v/v

2.3 การศึกษาขนาดที่เหมาะสมของสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรที่สามารถมีฤทธิ์ป้องกันพิษของเอธานอลต่อตับ พร้อมกับศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในหนูขาว

- หลักการ : ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 30 ตัว แบ่งเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว โดยให้สัตว์ทดลองได้รับสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรขนาดต่าง ๆ

คือ 300, 500, 800 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก 1 ครั้ง ก่อนให้เอธานอลขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้เอธานอล ขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก 1 ครั้ง

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม ให้สารสกัดด้วยน้ำ ขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก 1 ครั้ง

กลุ่มที่ 3 สารสกัดด้วยน้ำ ขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล

กลุ่มที่ 4 สารสกัดด้วยน้ำ ขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล

กลุ่มที่ 5 สารสกัดด้วยน้ำ ขนาด 800 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล

กลุ่มที่ 6 สารสกัดด้วยน้ำ ขนาด 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ก่อนให้เอธานอล

- ข้อกำหนด : หลังให้เอธานอลแล้ว 2 ชั่วโมง ทำการเจาะเลือดหนูทุกตัว นำไปวัดระดับ SGOT และ SGPT ฆ่าหนูทุกตัว นำตับไปวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และตัดชิ้นเนื้อแช่ใน 10% formaline v/v

2.4 การศึกษาเปรียบเทียบผลในการป้องกันพิษของเอธานอลต่อตับของสารแอนโดรกราโฟไลด์และสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในหนูขาว

- หลักการ : ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 24 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว โดยให้สัตว์ทดลองได้รับสารแอนโดรกราโฟไลด์ ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางช่องท้อง หรือสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน แล้วให้เอธานอลขนาด 4 กรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก 1 ครั้ง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ทางปาก วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน ก่อนให้เอธานอล

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม ให้ 60 % sucrose w/v จำนวน 0.3 มิลลิลิตร ทางช่องท้อง วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน ก่อนให้เอธานอล

กลุ่มที่ 3 สารแอนโดรกราโฟไลด์ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางช่องท้อง วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน ก่อนให้เอธานอล

กลุ่มที่ 4 สารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรฟ้าทะลายโจรขนาด 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทางปาก วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน ก่อนให้เอธานอล

- ข้อกำหนด : หลังได้รับเอธานอลแล้ว 2 ชั่วโมง ทำการเจาะเลือด นำไปวัดระดับ SGOT และ SGPT ฆ่าหนู ตัดตับออกมาแช่ใน 10% formaline v/v

การเตรียมสารแขวนตะกอนแอนโดรกราโฟไลด์ และสารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

สารแขวนตะกอนของสารแอนโดรกราโฟไลด์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้
   1.1 โกร่งบดยา
   1.2 Hot plate
   1.3 Volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร

2. สารเคมี

2.1 สารแอนโดรกราโฟไลด์ จากภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีค่า R_f = 0.6 ใน solvent system ของ methanol ต่อ chloroform = 1:9 และจุดหลอมเหลว (melting point) = 225-228°C

2.2 Saccharose จาก บริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี

3. วิธีการ

3.1 เตรียม 60% sucrose w/v โดยชั่ง sucrose มา 30 กรัม เติมน้ำให้มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

3.2 บดสารแอนโดรกราโฟไลด์ ให้ละเอียด แล้วนำไปแขวนตะกอนใน 60% sucrose ให้เป็น 5% andrographolide w/v in 60% sucrose w/v

สารสกัดด้วยน้ำของสมุนไพรฟ้าทะลายโจร

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1.1 กระบอกตวง ขนาด 10 มิลลิลิตร

1.2 Hot plate

2. ผงใบสมุนไพรฟ้าทะลายโจร จาก ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิธีการ

3.1 ต้มผงใบสมุนไพรฟ้าทะลายโจรในน้ำ โดยใช้อัตราส่วนผงใบสมุนไพรฟ้าทะลายโจรต่อน้ำ เท่ากับ 1:10 เป็นเวลา 15 นาที

3.2 กรองเอากากผงใบออก เก็บส่วนที่เป็นน้ำ นำไปใช้ต่อไป

การเตรียมเอธานอลสำหรับทำให้เกิดพิษต่อตับในหนูขาว

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1.1 Volumetric flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร

1.2 กระบอกตวงขนาด 250 มิลลิลิตร

2. สารเคมี

Ethanol จาก บริษัท E.Merck ประเทศเยอรมณี

3. วิธีการ

เตรียมเอธานอลให้เป็น 15% ethanol w/v

การเตรียมซีรั่มเพื่อวิเคราะห์ระดับ SGOT และ SGPT

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1.1 ขวดโหลดมยาสลบหนู

1.2 บีกเกอร์ขนาด 5 มิลลิลิตร 2 ใบ, ขนาด 50 มิลลิลิตร 2 ใบ

1.3 Capillary tube ชนิด heparinized

1.4 Centrifuge tube, Microcentrifuge tube

1.5 Laboratory centrifuge (model H-103N จาก บริษัท Kokusan Enshinki ประเทศญี่ปุ่น)

1.6 สำลี

2. สารเคมี

Diethylether จาก บริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี

3. วิธีการ

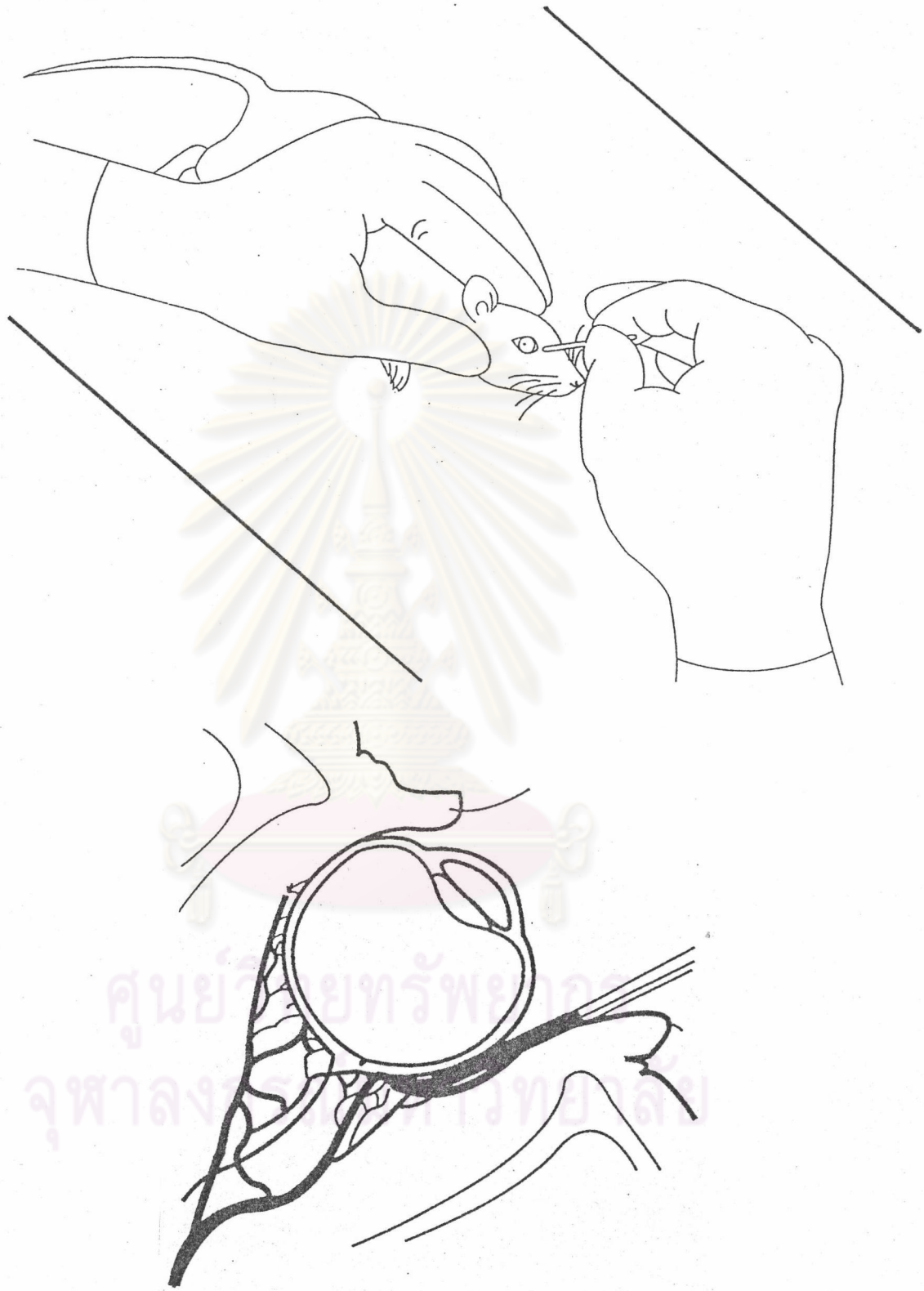
3.1 ทำให้หนูสลบ โดยใส่ลงในขวดโหลดมยาสลบที่มี diethylether

3.2 หลังจากหนูสลบแล้ว นำออกมาจากขวดโหล แล้วทำการเจาะเลือดจาก retro-orbital plexus บริเวณมุมหัวตาของหนู โดยใช้ capillary tube ชนิด heparinized ดังรูปที่ 6

3.3 รองรับเลือดจากปลาย capillary tube ให้ได้ 2 มิลลิลิตร ต่อหนู 1 ตัว

3.4 นำไป centrifuge ที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

3.5 นำส่วนใสที่เป็นซีรั่ม แยกใส่ใน microcentrifuge tube แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในระดับ 4°C ถ้ายังไม่นำไปวิเคราะห์ควรเก็บไว้ในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4-8°C เก็บไว้ได้ประมาณ 3-5 วัน โดยที่ไม่ทำให้ระดับของ SGOT และ SGPT เปลี่ยนแปลง



รูปที่ 6 แสดงการเจาะเลือดจาก retro-orbital plexus
(Gad and Chengelis, 1992)

การเตรียมส่วนของเหลวจากตับของหนูขาว เพื่อวิเคราะห์ระดับ hepatic triglyceride

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้
   1.1 Glass homogenizer
   1.2 Motor homogenizer (รุ่น RZR2 จาก บริษัท Heidolph ประเทศ เยอรมนี)
   1.3 Laboratory centrifuge (model H-103N จาก บริษัท Kokusan Enshinki ประเทศญี่ปุ่น)
   1.4 Centrifuge tube และ microcentrifuge tube
   1.5 บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ตามจำนวนของตัวอย่าง
2. สารเคมี

   Sodium chloride จาก บริษัท E.Merck ประเทศเยอรมนี ทำให้เป็น 0.9% normal saline w/v
3. วิธีการ
   3.1 ฆ่าหนูโดยวิธี cervical dislocation
   3.2 เปิดช่องท้องนำตับออกมาแช่ใน 0.9% normal saline ในบีกเกอร์ แล้วล้างเลือดออกประมาณ 2-3 ครั้ง
   3.3 ชั่งตับหนูมา 0.5 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไป homoginize ด้วย 0.9% normal saline 5 มิลลิลิตร ใน glass homogenizer
   3.4 นำ homogenate ที่ได้ไป centrifuge ที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
   3.5 แยกเอาส่วนใสออกมาเก็บใน microcentrifuge tube

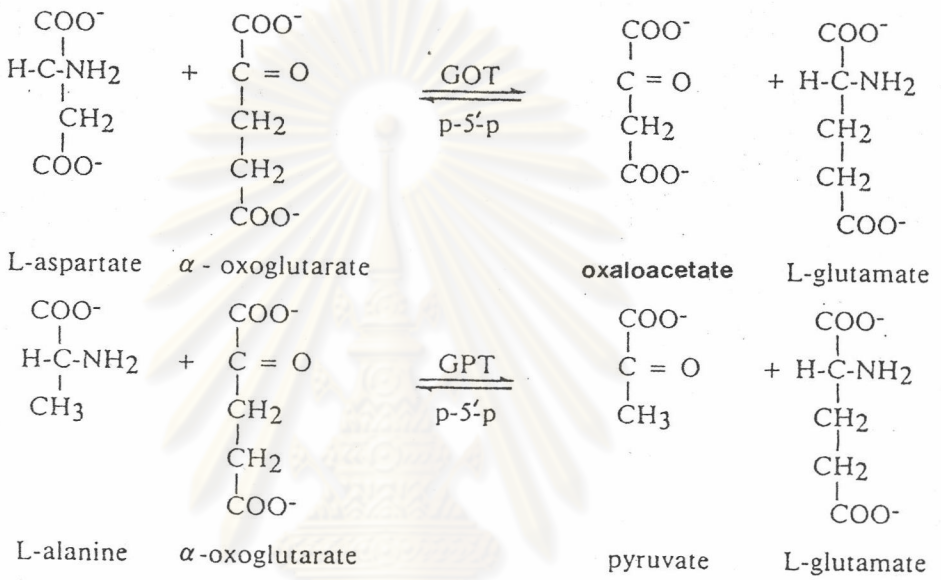
การวิเคราะห์ระดับ SGOT และ SGPT ในซีรั่ม

หลักการ

ทรานสะมิเนส (transaminases) เป็นเอ็นไซม์กลุ่มซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่อะมิโนของกรดอะมิโน ไปยังแอลฟา-โอโซเอซิด (α-oxoacid) และ

จากแอลฟา-โอโซแอซิดไปยังกรดอะมิโน เอ็นไซม์กลุ่มนี้ประกอบด้วย aspartate aminotransferase (AST; aspartate transaminase) และ alanine aminotransferase (ALT; alanine transaminase) หรือรู้จักกันทั่วไปเป็น glutamic oxaloacetate transaminase (GOT) และ glutamic pyruvate transaminase (GPT) ตามลำดับ โดยมี pyridoxal-5'-phosphate (p-5'-p) เป็นโคเอ็นไซม์ (coenzyme) และความจำเพาะของเอ็นไซม์แต่ละชนิด ถูกกำหนดโดยกรดอะมิโนที่เป็นตัวให้หมู่อะมิโน เช่นเอ็นไซม์ GOT จะมีแอสปาร์เตท เป็นตัวให้หมู่อะมิโน และเอ็นไซม์ GPT จะมีอะลานีนเป็นตัวให้หมู่อะมิโน ดังปฏิกิริยาข้างล่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดงปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ GOT และ GPT
(ทวีสุข กรรณล้วน และ วิไลรัตน์ นุชประมูล, 2529)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากเอ็นไซม์ GOT มีมากในเซลล์หัวใจ ตับ กล้ามเนื้อและไต ส่วนเอ็นไซม์ GPT มีมากในเซลล์ตับ รองลงมาคือไต หัวใจ และกล้ามเนื้อ โดยเอ็นไซม์ทั้งสองมีทั้งในส่วนของไซโตพลาสมและไมโตคอนเดรียของเซลล์ดังกล่าว ดังนั้นการวิเคราะห์หาระดับเอ็นไซม์ GOT และ GPT ในซีรั่มสามารถช่วยในการวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวกับตับและหัวใจ โดยตับจะมีเอ็นไซม์ GPT มากกว่า GOT ในภาวะปกติที่เซลล์ตับไม่ถูกทำลาย ระดับของ GOT และ GPT ในซีรั่มจะมีน้อยมาก (ทวีสุข กรรณล้วน และวิไลรัตน์ นุชประมูล, 2529) แต่ถ้ามีการทำลายของเซลล์ตับ ไม่ว่าจะเป็นจากสารพิษ เชื้อไวรัส ก็ตาม จะทำให้เอ็นไซม์ทั้ง 2 ชนิด ถูกขับออกมาในซีรั่ม ทำให้ระดับเอ็นไซม์ทั้งสองสูงขึ้นในซีรั่ม แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ และพยาธิสภาพของโรคนั้น ๆ ต่อตับด้วย เช่น ในคนที่มีภาวะตับอักเสบแบบเฉียบพลัน จะมีระดับของ GPT สูงขึ้นมากกว่า GOT แต่ในหนูพบว่าเมื่อทำให้เกิดภาวะตับอักเสบแบบเฉียบพลันแล้ว ระดับเอ็นไซม์ทั้งสองในซีรั่มจะเพิ่มสูงขึ้นจากภาวะปกติ และการที่ระดับของเอ็นไซม์ทั้งสองชนิดจะสูงขึ้นมากน้อยขึ้นอยู่กับ สภาพของเซลล์ที่ถูกทำลายและระยะเวลาที่เป็น (สุพิศ จินดาวณิค, 2523)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับค่าปกติของระดับ GOT และ GPT ในซีรั่มของหนูขาว พันธุ์ Wistar เพศผู้ จะมีค่า SGOT = 62.5 $\pm$ 8.4 IU/l และ SGPT = 25.2 $\pm$ 2.05 IU/l (Gad and Chengelis, 1992)

หลักการที่ใช้สำหรับวิเคราะห์เอ็นไซม์ GOT และ GPT ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือหลักการวิเคราะห์โดยวิธีวัดเทียบสี (colorimetric method) ของ Reitman and Frankel เนื่องจากเอ็นไซม์ GOT และ GPT ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนไปยังแอลฟา-โอโซเอซิด แล้วทำให้ได้กรดอะมิโนและแอลฟา-โอโซเอซิดตัวใหม่ ดังปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นในระบบการวิเคราะห์เอ็นไซม์ GOT และ GPT นี้จะประกอบด้วยกรดอะมิโน 2 ตัว และโอโซเอซิด 2 ตัว หลักการของวิธีนี้ทำได้โดยหาปริมาณของโอโซเอซิดที่ใช้ในปฏิกิริยาหรือหาปริมาณของโอโซเอซิดที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ซึ่งการหาปริมาณของ

โอโซเอซิดที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถหาได้โดย ให้โอโซเอซิดทำปฏิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine จะได้สาร phenylhydrazone ของโอโซเอซิด ซึ่งมีสีในภาวะด่าง เนื่องจากในการเร่งปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ GOT จะมีโอโซเอซิดเกี่ยวข้อง 2 ตัว คือ α-oxoglutarate และ oxaloacetate ส่วนการเร่งปฏิกริยาของเอ็นไซม์ GPT จะมีโอโซเอซิดเกี่ยวข้อง 2 ตัว คือ α-oxoglutarate และ pyruvate ซึ่งโอโซเอซิดทั้ง 2 ตัว ของแต่ละปฏิกิริยาสามารถทำปฏิกิริยากับ 2,4-dinitrophenylhydrazine ดังนั้นการวิเคราะห์เอ็นไซม์ GOT วัดสีที่เกิดจาก phenylhydrazone ของ oxaloacetate ส่วนการวิเคราะห์เอ็นไซม์ GPT จะวัดสีจาก phenylhydrazone ของ pyruvate โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร

ปัจจุบันนี้ การวิเคราะห์ระดับ SGOT และ SGPT ทางคลินิก มี reagent สำเร็จรูปที่เตรียมโดยบริษัทต่าง ๆ เพื่อความสะดวก รวดเร็ว ในการวิเคราะห์ระดับ SGOT และ SGPT ทางคลินิก โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์โดยวิธีวัดเทียบสีของ Reitman and Frankel เช่น reagent ของบริษัทคลินิคอลไดแอกโนสติกส์ ซึ่งมีการใช้วิเคราะห์ระดับ SGOT และ SGPT ทางคลินิกของโรงพยาบาลต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย และยังมีการนำมาใช้วิเคราะห์ระดับ SGOT และ SGPT ในหนูขาวได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือก reagent จาก บริษัทคลินิคอลไดแอกโนสติกส์ ในการวิเคราะห์ระดับ SGOT และ SGPT

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้
   - 1.1 Spectrophotometer (Ultraspec II LKB Biochem Ltd. ประเทศอังกฤษ)
   - 1.2 Disposable cuvettes ทรงสี่เหลี่ยมขนาด 1x1x3 เซนติเมตร
   - 1.3 หลอดทดลอง (test tube)
   - 1.4 เครื่องช่วยผสม (laboratory mixer)
   - 1.5 ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipette)
   - 1.6 อ่างน้ำร้อน (water bath)

2. สารเคมี

reagents สำหรับวิเคราะห์ระดับ SGOT และ SGPT จาก บริษัท คลินิคอลไดแอกโนสติกส์ ถนนพิษณุโลก เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร ประกอบด้วย

- GOT, GPT substrate
- Phenylhydrazine
- 0.4 N Sodium hydroxide
- pyruvate standard

3. วิธีการ

3.1 การทำ calibration curve

โดยการเปลี่ยนแปลง จำนวนของ standard pyruvate และ substrate ดังนี้

TUBE NO.	PYRUVATE STANDARD (ml)	GOT หรือ GPT SUBSTRATE (ml)	H_2O (ml)	GOT activity (SFunits/ml)	GPT activity (SF units/ml)
1	0	1.0	0.2	0	0
2	0.1	0.9	0.2	20	25
3	0.2	0.8	0.2	55	50
4	0.3	0.7	0.2	95	83
5	0.4	0.6	0.2	148	126
6	0.5	0.5	0.2	215	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เติม dinitrophenylhydrazine 1 มิลลิลิตร ทุกหลอดทดลอง
- ผสม และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
- เติม 0.4 N NaOH 10 มิลลิลิตร ทุกหลอดทดลอง
- ผสมและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (absorbance) กับเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set ศูนย์
- Plot curve ระหว่าง GOT units หรือ GPT units กับค่าดูดกลืนแสงของแต่ละค่า
- ลากเส้นต่อแต่ละจุด จะได้ calibration curve ของการวิเคราะห์ระดับ SGOT หรือ SGPT

หมายเหตุ :

- calibration curve นี้สามารถใช้ได้ทั้งการวิเคราะห์ SGOT ที่ใช้เวลา incubate นาน 30 นาที หรือ 60 นาที
- ใช้ GOT substrate สำหรับ calibration curve ของ SGOT
- ใช้ GPT substrate สำหรับ calibration curve ของ SGPT

3.2 การวิเคราะห์ระดับ SGOT และ SGPT

3.2.1 SGOT

- ใส่ GOT substrate จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตามจำนวนที่ต้องการทดสอบ
- นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C ในอ่างน้ำร้อนเป็นเวลา 5 นาที
- เติมซีรั่มที่ต้องการวัดลงไป 0.2 มิลลิลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง

- ผสม แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที
- เติม dinitrophenylhydrazine 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 หลอดทดลอง
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที
- เติม 0.4 N NaOH ลงไป 10 มิลลิลิตรต่อ 1 หลอดทดลอง
- ผสม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง จากเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set ศูนย์
- นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ ไปหา GOT activity จาก GOT calibration curve จะได้ค่า SGOT ที่ต้องการวัดในซีรั่ม

3.2.2 SGPT

- ใส่ GPT substrate 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตามจำนวนที่ต้องการทดสอบ
- นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C ในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 5 นาที
- เติมซีรั่ม ที่ต้องการวัดลงไป 0.2 มิลลิลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง
- ผสม แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
- เติม dinitrophenylhydrazine 1 มิลลิลิตร ต่อ 1 หลอดทดลอง
- ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เติม 0.4 N NaOH ลงไป 10 มิลลิลิตร ต่อ 1 หลอดทดลอง
- ผสม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
- นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงจากเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยใช้น้ำเป็น blank สำหรับ set ศูนย์
- นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ ไปหา GPT activity จาก GPT calibration curve จะได้ค่า SGPT ที่ต้องการวัดในซีรั่ม

สิ่งที่ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อน

- hemolyzed serum จะทำให้ได้ค่าที่สูงกว่าความเป็นจริง เนื่องจากเม็ดเลือดแดงมีเอ็นไซม์ GOT เป็น 15 เท่าของที่มีอยู่ในซีรั่ม และเอ็นไซม์ GPT เป็น 7 เท่าของที่มีอยู่ในซีรั่ม
- lipemic serum จะทำให้ได้ค่าที่ได้ผิดไป เนื่องจากความขุ่น
- ซีรั่มควรแยกออกภายใน 2 ชั่วโมงนับจากเจาะเลือดมา และเก็บเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-8°C ถ้ายังไม่ตรวจทันที
- พยายามให้ทุกหลอดทดลอง มีช่วงเวลาที่จะทำปฏิกิริยาเท่ากัน และควรเท่ากันทุกครั้งโดยเฉพาะอย่างยิ่ง SGOT ที่ใช้เวลา incubate นาน 30 นาที มีโอกาสผิดพลาดได้เนื่องจากเหตุนี้มากที่สุด

ข้อแนะนำ :

- ซีรั่มที่ขุ่นมาก ควรทำ serum blank โดยทำเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ทำการทดสอบ แต่ใส่ซีรั่มหลังจากเติม phenylhydrazine เรียบร้อยแล้ว และใช้ serum blank set ศูนย์แทน reagent blank

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ซีรั่มที่มี aldehydes, ketone และ ketoacids สูง จะทำให้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง ซึ่งแก้ไขได้โดยการทำ serum blank
- ตัวอย่างที่มีค่าเอ็นไซม์ GOT และ GPT สูงกว่าค่าที่มีใน calibration curve ให้เจือจางซีรั่มด้วยน้ำกลั่น แล้วคูณค่าที่ได้จากกราฟ ด้วย dilution factor เช่น เจือจางซีรั่มเป็น 1:5 (ซีรั่ม 1 : น้ำ 4) ก็คูณค่าที่อ่านได้จากกราฟด้วย 5 เป็นต้น

การวิเคราะห์ระดับไตรกลีเซอไรด์ในตับ

หลักการ

ไตรกลีเซอไรด์ จัดเป็นไขมันพวก neutral fat เกิดจากการ esterification ระหว่างกลีเซอรอล กับกรดไขมัน (fatty acid) โดยกรดไขมันทั้ง 3 ตัว ที่มีอยู่ใน 1 โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ อาจมีความแตกต่างกันหรือไม่ก็ได้ ส่วนใหญ่กรดไขมันเหล่านี้มักมีลักษณะยาวเป็นลูกโซ่ และมีคาร์บอนอะตอมเป็นจำนวนคู่ กรดไขมันดังกล่าวอาจเป็นทั้งชนิดอิ่มตัว (saturated) เช่น กรดสเตียริค (stearic acid, C_{18}) และกรดปาล์มิติค (palmitic acid, C_{16}) หรือชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated) เช่น กรดโอเลอิค (oleic acid) จะมีบอนด์คู่ 1 บอนด์ กรดไขมันทั้ง 3 ตัวนี้เป็นส่วนประกอบในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ที่พบมากในเนื้อเยื่อไขมัน (ทวีสุข กรรณล้วน และ วิไลรัตน์ นุชประมูล, 2529)

ในภาวะปกติระดับไตรกลีเซอไรด์ในตับจะต่ำมาก แต่ถ้าตับมีพยาธิสภาพจาก hepatotoxin บางชนิด เช่นในกรณีของเอธานอล ซึ่งถูก metabolize ที่ตับ ได้สารพิษต่อตับที่ชื่อว่า "acetaldehyde" ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายเซลล์ตับ มีผลให้การทำหน้าที่ในการเผาผลาญไขมันของตับเสียไป ซึ่งนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพต่อตับที่เรียกว่า "fatty liver" หรือ "steatosis" ทั้งนี้เกิดจากการเพิ่มการนำเข้าของกรดไขมันเข้าสู่เซลล์ตับ การลดกระบวนการ oxidation ของกรดไขมัน การเพิ่มอัตราการ

esterification ของกรดไขมันไปเป็นไตรกลีเซอไรด์ และการลดการขับออกของไตรกลีเซอไรด์จากเซลล์ตับไปยังพลาสม่า (Sherlock, 1989)

ดังนั้นระดับไตรกลีเซอไรด์ในตับ น่าจะเป็นพารามิเตอร์ที่บ่งบอกถึงการถูกทำลายของเซลล์ตับหรือการเกิด fatty liver ในสัตว์ทดลองได้

สำหรับหลักการวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีวัดเทียบสีของ Mendez และคณะ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์หากลีเซอรอล ซึ่งเกิดจากการไฮโดรไลส์ไตรกลีเซอไรด์ ด้วยสารละลายด่าง และเรียกขบวนการนี้ว่า "สะปอนนิฟิเคชั่น" (saponification) จากนั้นกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดส์ด้วยเปอร์ไอโอเดท ได้เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารที่ทำให้เกิดสีได้แก่ อะเซทิลอะซีโตน และแอมโมเนียแล้วได้สารสีเหลือง ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ dihydrolutidine ดังขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาข้างล่างนี้

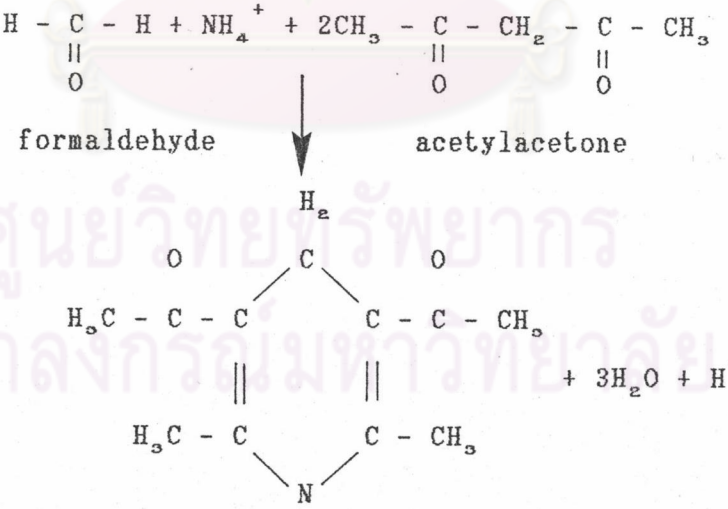
- Saponification

$$\text{triglyceride} \xrightarrow{\text{KOH}} \text{glycerol + free fatty acid}$$

- Oxidation

$$\text{glycerol} \xrightarrow{\text{periodate}} \text{formaldehyde}$$

- Color reaction



3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine

(สารสีเหลือง)

เนื่องจากไขมันชนิดอื่น เช่นฟอสฟอลิปิด มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบพื้นฐาน เช่นเดียวกับไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้นในการวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ จึงจำเป็นต้องกำจัดฟอสฟอลิปิด และสารรบกวนอื่น ๆ เช่น น้ำตาล กรดอะมิโน และโปรตีน ออกก่อน วิธีกำจัดสารรบกวนเหล่านี้ อาจทำได้หลายวิธีเช่น การสกัดไขมันให้ไปอยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ส่วนสารรบกวนอื่น ๆ กำจัดโดยการดูดซับด้วย zeolite mixture หรือ alumina (Al_2O_3) หรืออาจใช้วิธีการแบ่งละลาย (partition) ของไขมันในสารละลายผสมของโนเนน (nonane) ไอโส-โปรปานอล (isopropanol) และกรดกำมะถันเจือจางโดยวิธีนี้สารรบกวนต่างๆ จะอยู่ในชั้นของไอโสโปรปานอล ส่วนไตรกลีเซอไรด์จะอยู่ในชั้นของโนเนน ซึ่งสามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโดยการทำให้เกิดสี แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงหรือค่าเปอร์เซ็นต์แสงผ่านที่ความยาวคลื่น 405 - 415 นาโนเมตร (ทวีสุข กรรณล้วน และวิไลรัตน์ นุชประมูล, 2529)

ปัจจุบันในการวิเคราะห์ระดับไตรกลีเซอไรด์ นิยมใช้ reagents สำเร็จรูป เพื่อความสะดวกรวดเร็วในการรายงานผล ทั้งนี้ยังอาศัยหลักในการวิเคราะห์โดยวิธีวัดเทียบสีของ Mendez และคณะ นอกจากนี้ยังมี reagents ใหม่ๆ ที่อาศัยหลักในการวิเคราะห์โดยวิธีเอ็นไซม์ ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ reagents ของบริษัทคลินิคอลไดแอกโนสติกส์ ซึ่งสามารถใช้วิเคราะห์ระดับ triglyceride ในตับของหนูขาวได้

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้
   - 1.1 Spectrophotometer (Ultrapec II LKB Biochem Ltd. ประเทศอังกฤษ)
   - 1.2 Disposable cuvette ทรงสี่เหลี่ยม ขาด 1x1x3 เซนติเมตร
   - 1.3 หลอดทดลอง (test tube)
   - 1.4 ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipette)
   - 1.5 อ่างน้ำร้อน (water bath)
   - 1.6 เครื่องช่วยผสม (laboratory mixer)

2. สารเคมี

Reagents สำหรับวิเคราะห์ระดับไตรกลีเซอไรด์ จากบริษัทคลินิคอล-ไดแอกโนสติกส์ ถนนพิษณุโลก เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร ประกอบด้วย

- Heptane-Iso-propanol
- Extractor for standard
- Sulfuric acid solution
- Sodium methoxide solution
- Isopropanol
- Sodium periodate ($NaIO_4$)
- Acetylacetone
- Triolein standard 100, 200, 300 mg%

3. วิธีการ

3.1 เตรียมหลอดทดลอง ตามจำนวนที่ต้องการ แล้วใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปหลอดละ 0.5 มิลลิลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง สารละลาย triolein มาตรฐานที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 mg% ที่ความเข้มข้นละ 0.5 มิลลิลิตร และหลอดทดลองที่ใช้สำหรับเป็น blank set 0 1 หลอด

3.2 ทำการวิเคราะห์โดยเติมสารต่าง ๆ ลงไปตามลำดับ ดังนี้

สารและตัวอย่าง	SERUM (ml)	STANDARD (ml)	BLANK (ml)
SERUM	0.5	-	-
STANDARD	-	0.5	-
H_2O	-	0.5	0.5
HEPTANE-ISO-PROPANOL	5.0	-	5.0
EXTRACTOR FOR STANDARD	-	4.5	-
H_2SO_4 SOLUTION	1.0	1.0	1.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- ผสมด้วยเครื่องช่วยผสม 20 นาที หรือเขย่าแรง ๆ 20 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นประมาณ 2 นาที

SUPERNATANT	0.5	0.5	0.5
SODIUM METHOXIDE SOLUTION	0.5	0.5	0.5

- ผสมด้วยเครื่องช่วยผสม แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

ISOPROPANOL	0.5	0.5	0.5
$NaIO_4$	0.5	0.5	0.5

- ผสมด้วยเครื่องช่วยผสม

ACETYLACETONE	1.0	1.0	1.0

- incubate ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60°C นาน 10 นาที (หรือตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที) แล้วยกขึ้นไปแช่ในน้ำเย็น 5 นาที

- นำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 435 นาโนเมตร

- นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปอ่านค่าของ triglyceride จาก standard curve หรือ คำนวณจากค่าของ standard จุดใดจุดหนึ่ง ดังนี้

$$\text{ค่าตัวอย่าง} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน}} \times \text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน}$$

การเตรียมส่วนของเหลวภายในเซลล์ (cytosol) จากตับหนูขาว เพื่อวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1.1 Glass homogenizer

1.2 Motor homogenizer (รุ่น RZR 2 จาก บริษัท Heidolph ประเทศเยอรมนี)

1.3 Automatic high speed refrigerated centrifuge (model CR 20B3 จากบริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น) (ใช้ rotor model RPR 18-3)

1.4 Microcentrifuge tube

1.5 บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร ตามจำนวนของตัวอย่าง

2. สารเคมี

2.1 Hepes (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid) จาก บริษัท Sigma ประเทศอเมริกา

2.2 DL-Dithiothreitol (DL-DTT, Cleland's reagent) จาก บริษัท Sigma ประเทศอเมริกา

2.3 Sodium hydroxide จาก บริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี

3. วิธีการ

ส่วนของเหลวภายในเซลล์ (cytosol) จากตับของหนูขาวเตรียมโดยวิธีการของ Lumeng, Bosron และ Li (1978) ได้อธิบายไว้ โดยมีการดัดแปลงบางส่วนให้เหมาะสม ในขั้นแรกจะเตรียม liver homogenate โดยการฆ่าหนูด้วยวิธีดึงกระดูกคอให้แยกออกจากกัน (cervical dislocation) แล้วเปิดช่องท้องตัดตับออกมาใส่ลงในบีกเกอร์ซึ่งบรรจุสารละลายเย็นจัดของ Hepes ความเข้มข้น 0.05

มิลลิโมล่าร์ ซึ่งปรับ pH ให้ได้ 8.4 ด้วย NaOH และมีสาร DL-dithiothreital ความเข้มข้น 0.33 มิลลิโมล่าร์ ผสมอยู่ (การใส่สาร DL-dithiothreital เป็นการช่วยป้องกันไม่ให้เอ็นไซม์ ADH หมดฤทธิ์) บีกเกอร์ดังกล่าวจะแช่อยู่ในน้ำแข็ง หลังจากนั้นรีบล้างตับที่ตัดออกมาด้วยสารละลายเดียวกันนี้หลาย ๆ ครั้ง เพื่อเอาเลือดออก โดยใช้สารละลายครั้งละประมาณ 20-30 มิลลิลิตร แล้วนำตับที่ตัดออกมาซับน้ำให้แห้ง แล้วตัดออกมาชั่งให้ได้น้ำหนัก 1 กรัม แล้วเติมสารละลายเดียวกันลงไป 4 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรซึ่งคิดเป็น 4 เท่าของน้ำหนักตับ จึงตัดตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไป Homogenize ด้วย glass homogenizer ซึ่งมี pestle ที่เป็นโลหะและหุ้มปลายด้วย teflon และหมุนได้โดยการทำงานของมอเตอร์ ระหว่างการ homogenize จะควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C ขั้นต่อมาจึงปั่นแยกเพื่อเอาของเหลวภายในเซลล์ตับจาก liver homogenate ด้วยวิธี differential centrifugation โดยนำ homogenate ที่เตรียมได้ใส่ลงใน plastic centrifuge tube แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge รินเอาส่วนใสเก็บไว้ใน microcentrifuge tube ซึ่งแช่ไว้ในน้ำแข็ง ก่อนนำไปวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH (ศิริประภา, 2534)

การวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH (Lumeng, Bosron and Li, 1979)

เอ็นไซม์ ADH เป็นเอ็นไซม์หลักที่เร่งปฏิกิริยา :

$$\text{Ethanol} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Acetaldehyde} + NADH + H^+$$

NADH ที่เกิดขึ้นมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorption) ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร ในขณะที่ NAD^+ จะไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงนี้ ดังนั้นการวัดปริมาณ NADH ที่เกิดจากปฏิกิริยา จึงใช้เป็นหลักการในการวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

1.1 flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

1.2 ลูกแก้วขนาดเล็ก

1.3 ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipette)

1.4 อ่างน้ำร้อนชนิดเขย่าตลอดเวลา (Shaking water bath)

1.5 Spectrophotometer (Ultraspec II LKB Biochem Ltd. ประเทศอังกฤษ)

2. สารเคมี

2.1 Trizma base จาก บริษัท Sigma ประเทศอเมริกา

2.2 Hydrochloric acid จาก บริษัท E.Merck ประเทศเยอรมนี

2.3 β-Nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD) จาก บริษัท Sigma ประเทศอเมริกา

2.4 Ethanol จาก บริษัท E.Merck ประเทศเยอรมนี

3. วิธีการ

ส่วน supernatant ที่ได้จากการปั่นแยก liver homogenate จะถูกนำมาวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH โดยที่ reaction mixture ในปริมาตรสุดท้าย 3 มิลลิลิตร ประกอบด้วย :-

- Tris buffer ความเข้มข้น 0.5 โมล่าร์ (ปรับให้มี pH 7.2 ด้วยสารละลาย HCl)
- NAD^+ ความเข้มข้น 2.8 มิลลิโมล่าร์
- Ethanol ความเข้มข้น 5 มิลลิโมล่าร์
- Supernatant ที่จะนำมาวิเคราะห์ในปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร

Reaction mixture จะถูก incubate ใน flask ซึ่งมีลูกแก้วใส่อยู่ เพื่อช่วยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปได้ดียิ่งขึ้น การ incubate จะกระทำที่อุณหภูมิ 37°C

ในอ่างน้ำร้อน ซึ่งเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 15 นาที จึงนำ reaction mixture ดังกล่าวไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer

หมายเหตุ การใส่ Tris (HCl) เพื่อดักจับอะซีตัลดีไฮด์ ดังนั้น การที่อาจมีเอ็นไซม์ aldehyde dehydrogenase ปนเปื้อนมาในส่วนของเหลวภายในเซลล์ที่เตรียมได้ จึงไม่สามารถรบกวนการวิเคราะห์ได้

การหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนในส่วนของเหลวภายในเซลล์ใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งได้มีการดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) โดยจะหาปริมาณของโปรตีนจากการเกิดสี วัดการเกิดเป็นสีน้ำเงิน เมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในสารละลายด่าง เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (co-ordinated complex) ของ copper และ nitrogen atoms ใน peptide chains

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้
   - 1.1 หลอดทดลอง (test tube)
   - 1.2 ปิเปตอัตโนมัติ (autometic pipette)
   - 1.3 เครื่องช่วยผสม (laboratory mixer)
   - 1.4 อ่างน้ำร้อน (water bath)
   - 1.5 Spectrophotometer (Ultraspec. II LKB Biochem Ltd. ประเทศอังกฤษ)
2. สารเคมี
   - 2.1 Copper sulfate จาก บริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
   - 2.2 Potassium tartrate จาก บริษัท Sigma ประเทศอเมริกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 Sodium hydroxide จาก บริษัท E.Merck ประเทศเยอรมนี

2.4 Sodium carbonate จาก บริษัท Sigma ประเทศอเมริกา

2.5 Concentrated Folin-Ciocalteu's phenol reagent จาก บริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี

2.6 Albumin, Bovine จาก บริษัท Sigma ประเทศอเมริกา

3. วิธีการ

3.1 เตรียม alkaline copper reagent ซึ่งประกอบด้วย 1 ส่วน ของ copper sulfate 0.5% ละลายอยู่ใน potassium tartrate 1% และ 10 ส่วนของ sodium carbonate 10% ละลายอยู่ใน sodium hydroxide เข้มข้น 0.5 นอร์มอล

3.2 เตรียม Folin phenol reagent โดยการเจือจาง concentrated Folin-Ciocalteu's phenol reagent ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:10 v/v

3.3 เตรียมตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน โดยการเจือจางส่วนของเหลวภายในเซลล์ตับที่เตรียมได้ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:300 v/v

3.4 เติม alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นปริมาตรที่เท่ากันเป็น blank) ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3.5 เติม Folin-phenol reagent ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายในข้อ 3.4 ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไป incubate ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที

3.6 รอให้ reaction mixture เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer

3.7 คำนวณหาปริมาณโปรตีนของส่วนของเหลวภายในเซลล์ของแต่ละ sample จาก standard curve โดยใช้ bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นสารมาตรฐาน และใช้ dilution factor ประกอบการคำนวณ

การคำนวณสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH

สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH อาจแสดงได้ในหลายลักษณะ เช่น แสดงออกมาในรูปแบบของ total ADH activity คือไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นภายในเวลา 1 นาทีต่อน้ำหนักตับทั้งหมด (μ moles min^{-1} per liver) หรือแสดงออกมาในรูปแบบ ADH specific activity คือไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาทีต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม (μmole min^{-1} g^{-1} liver wet weight) หรือไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นภายในเวลา 1 นาทีต่อปริมาณ DNA 1 มิลลิกรัม (μmole $min^{-1}mg^{-1}$ liver DNA) หรือไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นภายในเวลา 1 นาทีต่อปริมาณโปรตีนในส่วนของเหลวภายในเซล 1 มิลลิกรัม (μmoles $min^{-1}mg^{-1}$ cytosolic protein) เป็นต้น และในงานวิจัยนี้สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH จะแสดงออกมาในรูปของไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นภายในเวลา 1 นาทีต่อปริมาณโปรตีนในส่วนของเหลวภายในเซล 1 มิลลิกรัม เท่านั้น

การคำนวณปริมาณของ NADH ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ทำได้โดยการนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเข้าสมการ ต่อไปนี้

$$E = \epsilon \times C \times L$$

เมื่อ E = optical density หรือ absorbancy

ϵ = molar extinction coefficient (ค่าดูดกลืนแสงของสารเฉพาะแต่ละชนิดซึ่งมีความเข้มข้น 1 M) สำหรับ NADH จะมีค่าเท่ากับ 6.3×10^{3} (Lehninger, ed., 1975)

C = concentration in molar (ความเข้มข้นของสารคิดเป็นโมล่าร์)

L = thickness of the cuvette (ความหนาของ cuvette ที่ใช้บรรจุสารที่จะวัด) โดยทั่วไปแล้ว L = 1 เซนติเมตร

ดังนั้นเมื่อทราบปริมาณของ NADH ที่เกิดจากปฏิกิริยา ซึ่งถูกเร่งด้วย ADH ภายในเวลา 15 นาที และหาปริมาณโปรตีนในส่วนของเหลวภายในเซลในปริมาตรที่เติมลงไปในแต่ละปฏิกิริยาก็จะสามารถคำนวณสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH ออกมาได้ โดยมีหน่วยเป็น μmoles $min^{-1}mg^{-1}$cytosolic protein

การเตรียมชิ้นเนื้อตับของหนูขาวในการส่งทำการทดสอบทาง histopathology และ electron microscope

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้
   1.1 แผ่น froid ขนาด 3 x 4 นิ้ว
   1.2 ใบมีดโกน
   1.3 ขวดใส่ชิ้นเนื้อขนาด 60 ml สำหรับส่งทำการทดสอบทาง histopathology
   1.4 ขวดใส่ชิ้นเนื้อขนาด 5 ml สำหรับส่งทำ electron microscope

2. สารเคมี
   2.1 40% formaldehyde จาก บริษัท Farmitalia Carlo ERBA ประเทศเยอรมนี
   2.2 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer จาก ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิธีการ

3.1 เตรียม 10% formalin จากการเจือจาง 40% formaldehyde ด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:9 v/v บรรจุใส่ขวดใส่ชิ้นเนื้อให้มีปริมาตร 40 มิลลิลิตร สำหรับแช่ชิ้นเนื้อตับส่งทำการทดสอบทาง histopathology

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ใส่ 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer ลงในขวดใส่ชิ้นเนื้อให้มีปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร สำหรับแช่ชิ้นเนื้อตับ ส่งทำ electron microscope

3.3 หลังจากฆ่าหนูโดยวิธีดึงคอให้กระดูกคอแยกจากกันแล้ว เปิดช่องท้องนำตับออกมาตัด section ที่ lobe ล่างซ้าย โดยตัดให้มีขนาดดังนี้

3.3.1 ขนาด 5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร สำหรับส่งทำการทดสอบทาง histopathology

3.3.2 ขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร สำหรับส่งทำ electron microscope

3.4 แช่ชิ้นเนื้อในขวดที่เตรียมไว้ทันที

การทดสอบทาง histopathology

เนื่องจากงานวิจัยนี้ ใช้สัตว์ทดลอง จึงสามารถตัดชิ้นเนื้อตับออกมา แล้วนำไปทดสอบทาง histopathology ซึ่งสามารถนำไปประกอบกับผลทางชีวเคมี และยังเป็นพารามิเตอร์ที่บ่งชี้พยาธิสภาพต่อเซลล์ตับได้เป็นอย่างดี เพราะการทดสอบผลทาง histopothology เป็นการทำให้เห็นลักษณะของการเกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์ตับได้อย่างชัดเจน

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ส่งชิ้นส่วนเนื้อของตับหนู ที่ได้จากงานวิจัยแต่ละขั้นตอนไปทำการทดสอบทาง histopathology ที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง สมลักษณ์ พวงชมภู เป็น pathologist ในการแปลผลทาง histopathology ตลอดงานวิจัย

สำหรับขั้นตอนการทดสอบทาง histopathology แบ่งเป็น 6 ขั้นตอนดังนี้ (Humason, 1979)

1. Fixation เป็นขั้นตอนแรก หลังจากได้ชิ้นเนื้อออกมาจากตัวอย่าง ต้องทำการแช่ชิ้นเนื้อลงใน 10% formaline ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดใส่ชิ้นเนื้อ เพื่อเป็นการคงสภาพส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ของชิ้นเนื้อนั้น ให้คงสภาพเหมือนเดิมทุกประการ

2. Washing and dehydration เป็นการ remove ส่วนเกินของน้ำยาที่ใช้ในการ fixation ออกโดยใช้ alcohol ความเข้มข้นต่าง ๆ เช่น 30%, 50%, 70%, 90% และ absolute alcohol

3. Clearing : เป็นการ remove เอา alcohol ออกแล้วให้ wax infiltration

4. Wax infiltration และ costing เพื่อป้องกันการ callapse และ distortion ของเนื้อเยื่อระหว่างการตัด (sectioning)

5. Section cutting (microtomy) and mounting

6. Staining โดยทั่วไปนิยมใช้ haematoxyline and eosin technique โดยมีจุดประสงค์คือ เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่าง tissue ต่าง ๆ และส่วนประกอบของเซลล์ ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เช่นกรณีของ H&E technique จะเห็น nucleous ของ cell ติดสีของ haematoxylin ออกสีน้ำเงิน และ cytoplasm จะติดสีชมพูของ eosin นอกจากนี้ยังสามารถย้อมพิเศษ เมื่อต้องการรายละเอียดเพิ่มเติมเช่น การย้อม PAS (periodic acid schiff) เพื่อดู glycogen และ soluble polysaccharides, การย้อม Oil red O เพื่อดู lipid เป็นต้น

การทำ electron microscope

กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน เป็นเครื่องมือที่มีความสำคัญมากในปัจจุบัน ในการที่จะทำให้เราสามารถมองเห็นส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ของเนื้อเยื่อต่างๆ ได้อย่างชัดเจน เช่น organelles ต่างๆ ใน cytoplasm ของเซลล์ เนื่องจากมีกำลังขยายเป็นหมื่นเป็นแสนเท่า

ปัจจุบันกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มี 2 ชนิดคือ

1. Transmission electron microscope (TEM) เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน และลำแสงที่ใช้เป็นลำแสงอิเล็กตรอน

2. Scanning electron microscope (SEM) เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด สำหรับศึกษารายละเอียดของโครงสร้างภายนอกหรือผิวของตัวอย่าง

สำหรับงานวิจัยนี้ ได้เลือกการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด TEM ซึ่งสามารถทำให้เรามองเห็นรายละเอียดต่าง ๆ ภายใน cell ได้อย่างชัดเจน ไม่ว่าจะเป็น mitochondria หรือ endoplasmic reticulum หรือ organelles อื่นๆ ในการใช้ยืนยันผลทาง histopathology และผลทางชีวเคมีว่าสอดคล้องไปด้วยกันหรือไม่ และเป็นการบ่งชี้ถึงพยาธิสภาพของ organelles ในเซลล์ตับของหนูขาวได้เป็นอย่างดี

ลักษณะทั่วไปของ TEM จะประกอบไปด้วย 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ (เวคิน, 2524)

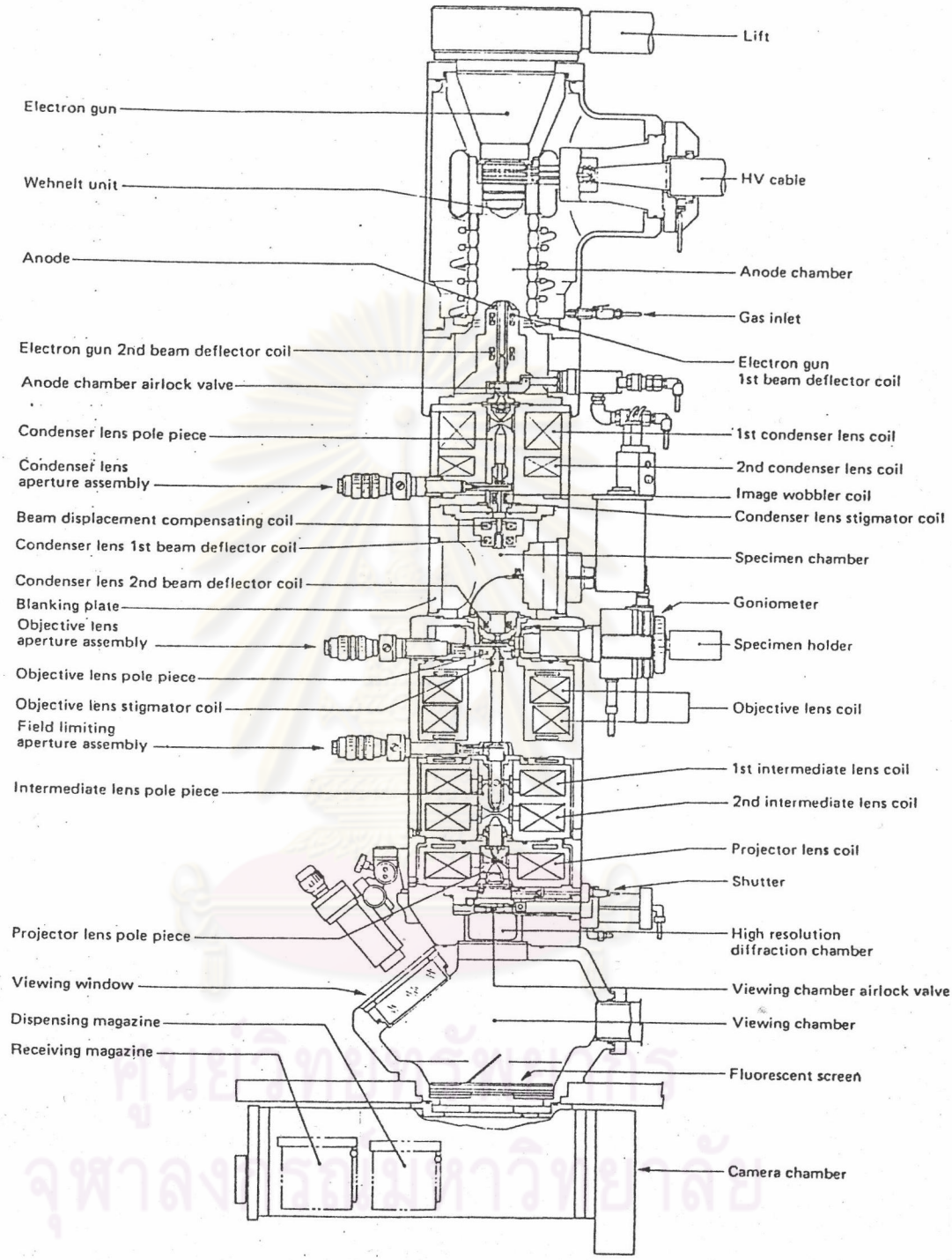
1) ส่วนที่เป็นแท่งหรือท่อกลมใหญ่ ที่เรียกว่า "column"

2) ส่วนที่เป็นตู้อุปกรณ์ไฟฟ้า ที่เรียกว่า "console unit"

แสดงได้ดังรูปที่ 8

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 แสดงลักษณะทั่วไปของเครื่องมือ Transmission electron microscope

สำหรับระบบต่าง ๆ ของ TEM ที่สมบูรณ์แบบจะประกอบด้วยระบบที่สำคัญ 4 ระบบคือ

1. ระบบสูญญากาศ (vacuum system) ประกอบด้วยเครื่องดูดอากาศชนิดกล (mechanical pump) และเครื่องดูดอากาศชนิดไอน้ำมัน (diffusion pump) เป็นระบบที่สำคัญต่อขั้นตอนการผลิตอิเล็กตรอน เพราะขั้นตอนการผลิตอิเล็กตรอนต้องกระทำในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

2. ระบบแสงสว่าง (illuminating system) เป็นระบบที่ให้แสงสว่างซึ่งเกิดจากการผลิตประจุอิเล็กตรอนโดยแหล่งผลิต แล้วรวบรวมประจุอิเล็กตรอนเหล่านั้นให้เป็นลำแสงของอิเล็กตรอนเพื่อส่องไปยังตัวอย่าง ระบบนี้ประกอบด้วย electron gun และ condenser

3. ระบบภาพ (imaging system) เป็นระบบที่ทำให้เกิดภาพ ประกอบด้วยชุดของเลนซ์ 3 ชุดคือ Objective lens, Intermediate lens และ Projector lens

4. ระบบบันทึกภาพหรือถ่ายภาพ (photographic system) เป็นระบบที่อำนวยความสะดวกในการบันทึกรายละเอียดที่ได้รับจากระบบภาพ (imaging system) ไว้บนแผ่นฟิล์มชนิดพิเศษซึ่งใช้ในการบันทึกภาพที่เกิดจากลำแสงของอิเล็กตรอน ประกอบด้วย camera system

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ส่งชิ้นเนื้อตับของหนูขาว ที่ได้จากงานวิจัยในขั้นตอนที่ 1 ไปทำ Trasmission electron microscope ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีเจ้าหน้าที่ประจำเครื่องมือคือ คุณ ศิริเพ็ญ เวชชการัณย์

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับทำ Transmission electron microscope มีดังนี้

1. Primary fixation :โดยการแช่ชิ้นเนื้อใน 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงถึง overnight

2. Buffer wash โดยใช้ 0.1 M phosphate buffer แช่ครั้งละ 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง

3. Post-fixation โดยแช่ใน 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. Wash ด้วย 0.1 M phosphate buffer เป็นเวลา 15 นาที 1 ครั้ง

5. Dehydration

- ใน 35% ethanol เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 ครั้ง
- ใน 70% ethanol เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 ครั้ง
- ใน 95% ethanol เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 ครั้ง
- ใน absolute ethanol เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 ครั้ง

5. Infiltration โดยใช้

- absolute ethanol : spurr resin อัตราส่วน 3:1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- absolute ethanol : spurr resin อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- absolute ethanol : spurr resin อัตราส่วน 1:3 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- spurr resin เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจำนวน 2 ครั้ง

7. Embedding เป็นการนำ tissue ใส่ในแม่พิมพ์ (embedding molds) เททับด้วยพลาสติกเหลวให้เต็ม

8. Polymerization โดยอบที่ 70°C นาน 8 ชั่วโมง

9. Sectioning ด้วย ultramicrotome, thickness 80 นาโนเมตร

10. Staining ด้วย Uranyl acetate, Lead citrate

หลังจากได้ตัวอย่างที่เหมาะสมจึงนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (model IEM-100 SX ประเทศญี่ปุ่น) ที่ 60 KV แล้วถ่ายภาพที่ต้องการ

3. การแสดงผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.1 การแสดงผลการทดลอง

แสดงเป็น 2 ลักษณะ คือ

1) ตาราง

2) แผนภูมิรูปแท่ง และกราฟเส้น

3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1) ค่าเฉลี่ย กับค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($\overline{X} \pm SE$) ใช้ในการนำเสนอข้อมูลของพารามิเตอร์ทางชีวเคมี และ activity ของเอ็นไซม์

2) Pair's t-test สำหรับข้อมูลกลุ่มเดียวกัน ที่เวลาต่างกัน

3) One-way analysis of variance หรือ ANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยได้โดยวิธี Duncan's new multiple range test สำหรับข้อมูลต่างกลุ่ม (มากกว่า 2 กลุ่มที่เวลาเดียวกัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย