บทที่ 2

การดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาว (albino rat) เพศผู้พันธุ์ wistar มีน้ำหนักระหว่าง 200 - 250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

2. วิธีดำเนินการวิจัย

แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ

2.1 การวิจัยในหนูขาว (In vivo)

2.2 การวิจัยในหลอดทดลอง (In vitro)

2.1 การวิจัยในหนูขาว

2.1.1 การวิจัยผลเฉียบพลันของใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide ต่อระดับเอธานอลในเลือด

แบ่งหนูขาวออกเป็น 4 กลุ่มๆละ 5 ตัว ทำซ้ำ 2 ครั้งดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ได้รับสารใด ๆ

กลุ่มที่ 2 ได้รับสารแขวนตะกอนของทรากาคานท์ (Tragacanth) ซึ่งเตรียมในความเข้มข้น 1% ในปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักหนู 200 กรัม ทางปากครั้งเดียว (ในการทดลองนี้ใช้สารทรากาคานท์เป็นสารช่วยแขวนตะกอนผงใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide)

กลุ่มที่ 3 ได้รับสารแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรซึ่งเตรียมในความเข้มข้น 10% w/v โดยหนูขาวแต่ละตัวได้รับในขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทางปากครั้งเดียว

(หมายเหตุ : ใบฟ้าทะลายโจรที่ใช้ตลอดการวิจัยนี้เก็บมาจาก อำเภอบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2532)

กลุ่มที่ 4 ได้รับสารแขวนตะกอนของสาร Andrographolide ซึ่งเตรียมในความเข้มข้น 0.1% w/v โดยหนูขาวแต่ละตัวจะได้รับในขนาด 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทางปากครั้งเดียว

ภายหลังที่หนูขาวแต่ละกลุ่มได้รับสารแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงให้เอธานอล ความเข้มข้น 10% w/v ในขนาด 1 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากนั้นรอ 1 ชั่วโมง จึงเก็บเลือดโดยวิธีเจาะจากหัวตาหนูบริเวณ orbital sinus นำเลือดไปตรวจวัดระดับเอธานอลโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography)

2.1.2 การวิจัยผลของการให้ใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide อย่างต่อเนื่องต่อระดับเอธานอลในเลือด

ภายหลังจากการศึกษาผลเฉียบพลันของใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide ต่อระดับเอธานอลในเลือดแล้ว นำหนูขาวทั้ง 4 กลุ่มข้างต้นมาศึกษาต่อดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมไม่ได้รับสารใด ๆ

กลุ่มที่ 2 ได้รับสารแขวนตะกอนของทรากาคานท์ในขนาด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 200 กรัมทางปากวันละหนึ่งครั้งทุกวันเป็นเวลา 14 วัน

กลุ่มที่ 3 ได้รับสารแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรซึ่งเตรียมในความเข้มข้น 10% w/v โดยหนูขาวแต่ละตัวจะได้รับในขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมทางปากวันละหนึ่งครั้งทุกวันเป็นเวลา 14 วัน

กลุ่มที่ 4 ได้รับสารแขวนตะกอนของสาร Andrographolide ซึ่งเตรียมในความเข้มข้น 0.1% w/v โดยหนูขาวแต่ละตัวจะได้รับในขนาด 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมทางปากวันละหนึ่งครั้งทุกวันเป็นเวลา 14 วัน

ในวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง ภายหลังหนูแต่ละกลุ่มได้รับสารแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงฉีดสารละลายเอธานอลความเข้มข้น 10% w/v ในขนาด 1 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัมเข้าทางช่องท้องหนู หลังจากนั้นรอ 1 ชั่วโมง จึงเจาะเลือดจากหัวตาหนูนำไปตรวจวัดระดับเอธานอลในเลือดโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีทำนองเดียวกับข้อ 2.1.1

วิธีการเจาะเลือดจากหัวตาหนูทำได้โดย ขั้นแรกจะสลบหนูด้วยอีเธอร์ และใช้ capillary tube เจาะเข้าไปยังหัวตาหนูบริเวณ orbital sinus ทำให้เส้นเลือดในบริเวณดังกล่าวแตก เลือดจะไหลผ่าน capillary tube ลงสู่ขวดเก็บเลือดซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็ง (Paget and Thomson, 1979) โดยจะเก็บเลือดครั้งละประมาณ 0.5 - 1 มิลลิลิตร ปิดขวดให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C จนถึงเวลานำไปตรวจ

การตรวจวัดระดับเอธานอลในเลือดโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

การตรวจวัดระดับเอธานอลในเลือดโดยวิธีนี้นับเป็นวิธีที่รวดเร็วไม่ต้องสกัดแยกและมีความไวจำเพาะสูง (Mendenhall, MacGee and Green 1980) ใช้ร่วมกับหลัก Headspace Technique (Wallace and Dahl, 1966; Bowman and Ranel, 1980) ซึ่งอาศัยหลักการแบ่งส่วน (Partition) ของสารที่ระเหยได้ในระหว่างของเหลวและอากาศเหนือของเหลวนั้นภายในระบบปิด และนำสารที่มีสถานะเป็นไอ (Vapor phase) ภายหลังเกิดสมดุลแล้วไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือก๊าซโครมาโตกราฟี

การทำให้เกิดภาวะสมดุล (ระหว่างปริมาณเอธานอลในของเหลวตัวอย่างกับในบรรยากาศเหนือของเหลวภายในระบบปิด) อาศัยคุณสมบัติของเอธานอลซึ่งปกติเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี แต่ถ้าหากเติมสารที่สามารถละลายในน้ำได้ดีกว่า (เช่น โซเดียมคลอไรด์) ลงไปด้วย สารนี้ก็จะไปแย่งละลายในน้ำและไล่เอธานอลออกจากน้ำเข้าสู่บรรยากาศในภาชนะ จนในที่สุดเกิดภาวะสมดุลระหว่างเอธานอลในบรรยากาศเหนือสารละลายกับในสารละลาย เอธานอลก็จะหยุดระเหยขึ้นมา

อุณหภูมิและความเข้มข้นของสารเร่งที่เติมลงไปนั้นจะมีผลต่อการเกิดภาวะสมดุล ดังนั้นเพื่อให้ผลเที่ยงตรงจึงต้องแก้ไขโดยการควบคุมอุณหภูมิและปริมาณของสารเร่งที่เติมให้คงที่ในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง การควบคุมปริมาณของสารเร่งดังกล่าวทำได้โดยการเติมสารให้เกินจุดอิ่มตัวของสาร

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์สำหรับการตรวจวัดระดับเอธานอลในเลือดโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟีประกอบด้วย

1. เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี : Pye Unicam รุ่น PU 4500 ของบริษัท Philips ประเทศอังกฤษ
2. ปิเปตชนิดอัตโนมัติ (Automatic Pipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร : SMI รุ่น F Series
3. หลอดแก้วชนิดใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง (Disposible Glass) สำหรับใช้กับปิเปตชนิดอัตโนมัติ SMI
4. กระบอกฉีดยาชนิดกันการรั่วของก๊าซได้ (Gas Tight Syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็ม
5. ขวดยาฉีด (Vial) ขนาด 20 มิลลิลิตรพร้อมฝาจุกยาง
6. แผ่นพาราฟิล์ม : Whatman

7. ลูกยางกั้นแบบแซนวิช (Sanwich Septum) สำหรับใช้กับส่วนที่ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ประกอบด้วย

1. สารละลายเอธานอลสำหรับเก็บไว้ใช้ชนิดมีใบรับรอง (Certificated Ethanol Stock Solution) ความเข้มข้น 0.10 และ 0.15 กรัมต่อมิลลิลิตร
2. ไอโซบิวทานอล (Isobutanol) ของบริษัท May & Baker Ltd. ประเทศอังกฤษ
3. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride) ของบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี

<u>สภาวะการทำงานของเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี</u>

1. คอลัมน์ (Column) : ใช้ชนิด Porapak Q 80-100 mesh
   อุณหภูมิของคอลัมน์ : 180°C
2. ดีเทคเตอร์ (Detector) : ชนิด Flame Ionize Detector (FID)
   อุณหภูมิของดีเทคเตอร์ : 200°C
3. อินเจคเตอร์ (Injector)
   อุณหภูมิของอินเจคเตอร์ : 190°C
4. อัตราการไหลของก๊าซ : ไฮโดรเจน อัตราเร็ว 43 มิลลิลิตรต่อนาที
   : ไนโตรเจน อัตราเร็ว 50 มิลลิลิตรต่อนาที
   : อากาศ อัตราเร็ว 100 มิลลิลิตรต่อนาที
5. ความเร็วของกระดาษบันทึก: 0.25 เซนติเมตรต่อนาที

<u>วิธีการตรวจวัดระดับเอธานอลในเลือดโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี</u>

1. การเตรียมสารละลายเอธานอลมาตรฐาน (Standard Ethanol Solution) และสารละลายมาตรฐานภายใน (Internal Standard Solution)

   1.1 สารละลายเอธานอลมาตรฐาน

   เตรียมสารละลายเอธานอลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 100 และ 150 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ โดยใช้สารละลายเอธานอลสำหรับเก็บไว้ใช้ชนิดมีใบรับรองที่มีความเข้มข้น 0.10 และ 0.15 กรัม ใน 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ มาละลายในน้ำกลั่นและเติมน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร

1.2 สารละลายมาตรฐานภายใน (ในที่นี้ใช้ไอโซบิวทานอลเป็นสารมาตรฐานภายใน)

เตรียมสารละลายไอโซบิวทานอล ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ โดยละลายไอโซบิวทานอล 2.5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

2. การวิเคราะห์ (ดูตารางที่ 1 ประกอบ)

2.1 ใช้ปิเปตดูดสารละลายมาตรฐานภายใน 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวด ก, ขวด ข และ ขวด ค

2.2 ใช้ปิเปตดูดสารละลายเอธานอลมาตรฐานความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตรใส่ลงในขวด ก ส่วนขวด ข จะใส่สารละลายเอธานอลมาตรฐานความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เช่นเดียวกัน

ใช้ปิเปตดูดเลือดที่ต้องการตรวจในปริมาณ 200 ไมโครลิตรใส่ลงในขวด ค.

2.3 เติมโซเดียมคลอไรด์ประมาณ 200 มิลลิกรัม ลงในแต่ละขวด ปิดฝาให้สนิท พร้อมทั้งพันรอบจุกยางด้วยแผ่นพาราฟิล์ม จับขวดหมุนให้สารเข้ากัน แล้วนำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเครื่องมือวิเคราะห์ (20-25 องศาเซลเซียส) อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดภาวะสมดุล

2.4 ใช้กระบอกฉีดยาชนิดกันการรั่วของก๊าซได้ ดูดอากาศที่อยู่เหนือสารละลายในแต่ละขวดจำนวน 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าเครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (ซึ่งอุ่นเครื่องตามสภาวะที่กำหนดแล้วอย่างน้อย 30 นาที)

2.5 บันทึกความสูงของยอดแหลมของกราฟ

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ระดับของเอธานอลในเลือดโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี

ขวด	ปริมาตร (ไมโครลิตร)				ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิกรัม)
	สารมาตรฐานภายใน	สารมาตรฐาน 150 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์	สารมาตรฐาน 100 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์	ตัวอย่างเลือด	
ก	200	200	-	-	200
ข	200	-	200	-	200
ค	200	-	-	200	200

การหาค่าความเข้มข้นของเอธานอลในเลือด (ชวด ค) ทำได้โดยเปรียบเทียบค่าอัตราความสูงของยอดแหลมของกราฟ (Peak height ratio) ระหว่างเอธานอลกับไอโซบิวทานอลของตัวอย่างเลือด กับอัตราความสูงของยอดแหลมของกราฟระหว่างเอธานอลกับไอโซบิวทานอลของสารมาตรฐาน (ชวด ก) โดยตรง ส่วนชวด ข มีไว้สำหรับควบคุมคุณภาพ (Quality Control) (งานพิษวิทยา สถาบันนิติเวชวิทยา)

<u>หมายเหตุ</u> ตัวอย่างโครมาโตแกรมของการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอธานอลโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟี ดูได้จากภาคผนวก ก.

2.2 <u>การวิจัยในหลอดทดลอง</u> (In Vitro) แบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ

2.2.1 การวิจัยผลของใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide ต่อสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH (Alcohol dehydrogenase)

2.2.2 การวิจัยผลของใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide ต่อสมรรถภาพของเอ็นไซม์ MEOS (Microsomal ethanol oxidizing system)

2.2.1 <u>การวิจัยผลของใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide ต่อสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH</u>

2.2.1.1 การวิจัยผลเฉียบพลันของใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide ต่อสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH

แบ่งหนูขาวออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัวและทำซ้ำ 2 ครั้ง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้รับสารแขวนตะกอนของทรากาคานท์ในขนาด 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักหนู 200 กรัมทางปากครั้งเดียว

กลุ่มที่ 2 ได้รับสารแขวนตะกอนของผงใบฟ้าทะลายโจรซึ่งเตรียมในความเข้มข้น 10% w/v โดยหนูแต่ละตัวจะได้รับในขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมทางปากครั้งเดียว

กลุ่มที่ 3 ได้รับสารแขวนตะกอนของสาร Andrographolide ซึ่งเตรียมในความเข้มข้น 0.1% w/v โดยหนูแต่ละตัวจะได้รับในขนาด 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมทางปากครั้งเดียว

ภายหลังให้ยาแก่หนูแต่ละกลุ่มแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงฆ่าหนูแล้วนำตับออกมาเพื่อจะวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH ซึ่งรายละเอียดและวิธีการภายหลังการฆ่าหนูจนกระทั่งถึงกระบวนการวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH จะได้กล่าวต่อไปในภายหลัง

2.2.1.2 การวิจัยผลของการให้ใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วันและ 14 วัน ต่อสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH

การวิจัยผลของการให้ใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน จะทำโดยแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 4 ตัว (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) และให้ยาด้วยขนาดยา ดังเช่นการวิจัยในหัวข้อ 2.2.1.1 แต่จะให้ยาอย่างต่อเนื่องทุกวัน ๆ ละครั้งเป็นเวลา 7 วัน

ในวันที่ 7 ของการทดลอง ภายหลังให้ยาแก่หนูแต่ละกลุ่มแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงฆ่าหนูและนำตับออกมาเพื่อวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH ทำนองเดียวกับข้อ 2.2.1.1

ในส่วนของการวิจัยผลของการให้ใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide แก่หนูอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วันต่อสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH ก็จะใช้วิธีวิจัยเดียวกันนี้

<u>การเตรียมส่วนของเหลวภายในเซล (Cytosol) จากตับของหนูขาวเพื่อวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH</u>

1. <u>เครื่องมือที่ใช้</u> :
   - 1.1 Glass homogenizer
   - 1.2 Automatic High Speed Refrigerated Centrifuge (Himac SCR 20B/18B ของ Hitachi) (ใช้ Rotor Model RPR 18-3)
   - 1.3 Automatic Preparative Ultracentrifuge (รุ่น 55 P-72 ของบริษัท Hitachi)

2. <u>สารเคมี</u>
   - 2.1 Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
   - 2.2 DL-Dithiothreitol (DL-DTT, Cleland's reagent) จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
   - 2.3 Sodium Hydroxide จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3. <u>วิธีการ</u>

ส่วนของเหลวภายในเซล (Cytosol) จากตับของหนูขาวเตรียมโดยวิธีการซึ่ง Lumeng, Bosron และ Li (1978) ได้เป็นผู้อธิบายไว้โดยมีการดัดแปลงบางส่วนให้เหมาะ

สม ในขั้นแรกจะเตรียม liver homogenate โดยการฆ่าหนูด้วยการทุบหัว และตึงกระดูกที่ต้นคอให้แยกจากกัน แล้วจึงเปิดช่องท้อง ตัดตับออกมาใส่ลงในบีกเกอร์ซึ่งบรรจุสารละลายเย็นจัดของ Hepes ความเข้มข้น 0.05 โมล่าร์ ซึ่งปรับ pH ให้ได้ 8.4 ด้วย NaOH และมีสาร dithiothreitol ความเข้มข้น 0.33 มิลลิโมล่าร์ ผสมอยู่ (การใส่สาร dithiothreitol จะช่วยป้องกันมิให้เอ็นไซม์ ADH หมดฤทธิ์) บีกเกอร์ดังกล่าวจะแช่อยู่ในน้ำแข็ง หลังจากนั้นรีบล้างตับที่ตัดออกมาด้วยสารละลายเดียวกันนี้หลาย ๆ ครั้งเพื่อเอาเลือดออก โดยใช้สารละลายครั้งละประมาณ 20-30 มิลลิลิตร แล้วจึงนำตับที่ตัดออกมานี้มาซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนักบันทึกไว้ แล้วเติมสารละลายเดียวกันนี้ลงไปอีกในปริมาตรซึ่งคิดเป็น 4 เท่าของน้ำหนักตับ ตัดตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไป homogenize ด้วย glass homogenizer ซึ่งมี pestle ที่เป็นโลหะที่หุ้มปลายด้วย teflon และหมุนได้โดยการทำงานของมอเตอร์ ระหว่างการ homogenize จะควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C ขั้นต่อมาจะปั่นแยกเพื่อเอาส่วนของเหลวภายในเซลตับจาก liver homogenate ด้วยวิธี differential centrifugation โดยนำ homogenate ที่เตรียมได้ใส่ลงใน plastic centrifuge tube แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง Refrigerated Centrifuge

Supernatant ที่ได้ซึ่งประกอบด้วยส่วนของเหลวภายในเซลตับและไมโครโซม จะถูกแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งเก็บไว้ อีกส่วนหนึ่งนำไปปั่นต่อที่ 100,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ซึ่งจะแยกส่วนของเหลวภายในเซลและไมโครโซมออกจากกันโดยที่ส่วนของเหลวภายในเซลจะอยู่ในชั้น Supernatant ส่วนไมโครโซมจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด เก็บส่วน Supernatant มาวิเคราะห์สมรรถภาพเอ็นไซม์ ADH เปรียบเทียบกับสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ส่วน Supernatant ที่ได้จากการปั่นที่ 10,000 g (ทั้งนี้เนื่องจากในบางงานวิจัยจะใช้ Supernatant ที่ได้จากการปั่นที่ 10,000 g แต่บางงานวิจัยจะใช้ Supernatant จากการปั่นที่ 100,000 g ในการวิจัยครั้งนี้ จึงทดลองใช้ทั้งสองวิธีเปรียบเทียบดูว่าสมรรถภาพของเอ็นไซม์ที่วิเคราะห์ได้จะแตกต่างกันหรือไม่)

<u>การวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH</u> (Lumeng, Bosron and Li 1979)

เอ็นไซม์ ADH เป็นเอ็นไซม์หลักที่เร่งปฏิกิริยา :-

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

NADH ที่เกิดขึ้นมีค่าดูดกลืนแสงสูงสุด (Absorption maximum) ที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร ในขณะที่ NAD^+ จะไม่ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงนี้ ดังนั้นการวัดปริมาณ NADH ที่เกิดจากปฏิกิริยาจึงใช้เป็นหลักการในการวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH

1. <u>เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้</u>
   - 1.1 flask ขนาด 25 มิลลิลิตร
   - 1.2 ลูกแก้วขนาดเล็ก
   - 1.3 ปิเปตอัตโนมัติ
   - 1.4 อ่างน้ำร้อนชนิดเขย่าตลอดเวลา (Shaking water bath)
   - 1.5 Spectrophotometer (Ultrospec II LKB Biochrom Ltd. ประเทศอังกฤษ)

2. <u>สารเคมี</u>
   - 2.1 Trizma base จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
   - 2.2 Hydrochloric acid จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี
   - 2.3 β-Nicotinamide adenine dinucleotide (β-NAD) จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
   - 2.4 Ethanol จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี

3. <u>วิธีการ</u>

ส่วน Supernatant ที่ได้จากการปั่นแยก liver homogenate จะถูกนำมาวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH โดยที่ reaction mixture ในปริมาตรสุดท้าย 3 มิลลิลิตร จะประกอบด้วย :-

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

reaction mixture จะถูก incubate ใน flask ซึ่งมีลูกแก้วใส่อยู่เพื่อช่วยให้ปฏิกิริยาดำเนินไปได้ดียิ่งขึ้น การ incubate จะกระทำที่อุณหภูมิ 37°C ในอ่างน้ำร้อนชนิดเขย่าอยู่ตลอดเวลา เป็นเวลา 15 นาที จึงนำ reaction mixture ดังกล่าวไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

หมายเหตุ การใส่ Tris (HCl) เพื่อดักจับอะซีตัลดีไฮด์ ดังนั้นการที่อาจมีเอ็นไซม์ Aldehyde dehydrogenase ปนเปื้อนมาในส่วนของเหลวภายในเซลที่เตรียมได้จึงไม่สามารถรบกวนการวิเคราะห์

การหาปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณของโปรตีนในส่วนของเหลวภายในเซลใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งได้ดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) โดยจะหาปริมาณของโปรตีนจากการเกิดสี วัดการเกิดเป็นสีน้ำเงินเมื่อโปรตีนทำปฏิกิริยากับ Copper sulfate ในสารละลายด่างเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Co-ordinated Complex) ของ Copper และ nitrogen atoms ใน peptide chains

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้
    - 1.1 หลอดทดลอง (Test tube)
    - 1.2 ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette)
    - 1.3 เครื่องช่วยผสม (Laboratory mixer)
    - 1.4 อ่างน้ำร้อน (Water bath)
    - 1.5 Spectrophotometer (Ultropec II LKB Biochem Ltd. ประเทศอังกฤษ)

2. สารเคมี
    - 2.1 Copper sulfate จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
    - 2.2 Potassium tartrate จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
    - 2.3 Sodium hydroxide จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี
    - 2.4 Sodium carbonate จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
    - 2.5 Concentrated Folin-Ciocalteu's phenol reagent จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี
    - 2.6 Albumin, Bovine จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา

3. วิธีการ

3.1 เตรียม alkaline copper reagent ซึ่งประกอบด้วย 1 ส่วนของ 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 ที่เจือจางโดยการเจือจาง Concentrated Folin - Ciocalteu's phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร/ปริมาตร

3.3 เตรียม Sample ที่จะตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยการเจือจางส่วนของเหลวภายในเซลตับที่เตรียมได้ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:300

3.4 เติม Alkaline copper reagent 1 มิลลิลิตร ลงใน Sample 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นปริมาตรที่เท่ากันเป็น Blank) ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที)

3.5 เติม Folin-phenol ragent ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลายในข้อ 3.4 ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที

3.6 รอให้ Reaction mixture เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

3.7 คำนวณหาปริมาณโปรตีนของส่วนของเหลวภายในเซลของแต่ละ Sample จาก Standard curve ซึ่งใช้ Bovine serum albumin ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นสารมาตรฐานและใช้ Dilution factor ประกอบการคำนวณ

<u>การคำนวณสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH</u>

สมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH อาจแสดงได้ในหลายลักษณะ เช่น แสดงออกมาในรูปแบบของ Total ADH activity คือ ไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นภายในเวลา 1 นาที ต่อน้ำหนักตับทั้งหมด (μmoles min^{-1} per liver) หรือแสดงออกมาในรูปแบบ ADH Specific activity คือ ไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นภายใน 1 นาทีต่อน้ำหนักตับ 1 กรัม (μmoles min^{-1} g^{-1} liver wet weight) หรือไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นภายในเวลา 1 นาที ต่อปริมาณ DNA 1 มิลลิกรัม (μmoles min^{-1} mg^{-1} liver DNA) หรือไมโครโมลของ NADH ที่เกิดขึ้นภายในเวลา 1 นาทีต่อปริมาณโปรตีนในส่วนของเหลวภายในเซล 1 มิลลิกรัม (μmoles min^{-1} mg^{-1} cytosolic protein) เป็นต้น ซึ่งในการวิจัยนี้สมรรถภาพของเอ็นไซม์ 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 1M) 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 ที่เกิดจากปฏิกิริยาซึ่งถูกเร่งด้วย ADH ภายในเวลา 15 นาที และหาปริมาณโปรตีนในส่วนของเหลวภายในเซลในปริมาตรที่เติมลงไปในแต่ละปฏิกิริยา ก็จะสามารถคำนวณสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH ออกมาได้โดยมีหน่วยเป็น μmoles min^{-1} mg^{-1} cytosolic protein

2.2.2 <u>การวิจัยผลของใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide ต่อสมรรถภาพของเอ็นไซม์ MEOS</u>

2.2.2.1 การวิจัยผลเฉียบพลันของใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide ต่อสมรรถภาพของเอ็นไซม์ MEOS

2.2.2.2 การวิจัยผลของการให้ใบฟ้าทะลายโจรและสาร Andrographolide อย่างต่อเนื่องต่อสมรรถภาพของเอ็นไซม์ MEOS

การวิจัยในข้อ 2.2.2.1 และ 2.2.2.2 จะดำเนินการวิจัยทำนองเดียวกับการวิจัยผลของใบฟ้าทะลายโจร และสาร Andrographolide ต่อสมรรถภาพของเอ็นไซม์ ADH จะแตกต่างกันในขั้นตอนการเตรียมส่วนประกอบภายในเซลตับเพื่อนำมาวิเคราะห์ ตลอดจนวิธีวิเคราะห์สมรรถภาพเอ็นไซม์ MEOS ดังจะได้กล่าวต่อไป

<u>การเตรียมไมโครโซมจากเซลตับเพื่อวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ MEOS</u>

ไมโครโซมจากตับของหนูขาวจะเตรียมโดยวิธีการซึ่ง Kato (1966) ได้อธิบายไว้ โดยได้ดัดแปลงบางส่วน สำหรับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการปั่นแยกเอาส่วนไมโครโซมของเซลตับจะเหมือนกับกรณีการเตรียมส่วนของเหลวภายในเซลตับ

i17267225

สารเคมีที่ใช้ :- Potassium Chloride (KCl) (จากบริษัท Ajax Chemicals ประเทศ Australia)

วิธีการ

ในขั้นแรกจะเตรียม liver homogenate โดยการฆ่าหนูด้วยการทุบหัวและดึงกระดูกที่ต้นคอให้แยกจากกันแล้วจึงเปิดช่องท้อง ตัดตับออกมาใส่ลงในบีกเกอร์ซึ่งบรรจุสารละลายเย็นจัดของ KCl ความเข้มข้น 0.15 โมล่าร์ (ในบางการทดลอง ก่อนตัดตับออกมาจะมีการ perfuse สารละลาย KCl ผ่านทาง Portal vein ของตับ ซึ่งภายหลังพบว่าการ perfuse ตับดังกล่าวจะทำให้ปริมาณไมโครโซมที่เตรียมได้ลดลงถึงประมาณ 20% (Kato, 1966) หลังจากตัดตับออกมาแล้วรีบล้างด้วยสารละลาย KCl ความเข้มข้น 0.15 โมล่าร์ หลาย ๆ ครั้งเพื่อเอาเลือดออก โดยใช้ครั้งละประมาณ 20-30 มิลลิลิตร นำตับมาซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนักบันทึกไว้ แล้วเติมสารละลายเดียวกันนี้ลงไปในปริมาตรซึ่งคิดเป็น 3 เท่าของน้ำหนักตับ ตัดตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไป homogenize

ขั้นต่อมานำ liver homogenate ที่เตรียมได้ไปปั่นที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง Refrigerated Centrifuge รินชั้น Supernatant ออกมานำไปปั่นต่อที่ 100,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง Ultracentrifuge จะได้ไมโครโซมแยกออกมาในส่วนของตะกอน นำตะกอนดังกล่าวมาเติมสารละลายเย็นจัดของ KCl ความเข้มข้น 0.15 โมล่าร์ ลงไปให้ได้ความเข้มข้นซึ่งสารแขวนตะกอนของไมโครโซม 1 มิลลิลิตร จะเทียบเท่ากับตับหนัก 2.5 กรัม แล้ว homogenize ด้วยมือเบา ๆ ให้เข้ากัน

Kato (1966) ได้เคยทำการทดลองครั้งแรกโดยนำไมโครโซมที่ปั่นแยกได้มาแขวนตัวในสารละลาย KCl แล้วนำไปปั่นซ้ำอีกครั้งที่ 100,000 g เป็นเวลา 30 นาที เพื่อจะกำจัดฮีโมโกลบินซึ่งดูดซับอยู่กับไมโครโซม ซึ่งเขาพบว่า การนำไปปั่นซ้ำดังกล่าวนอกจากจะไม่สามารถกำจัดฮีโมโกลบินได้หมดแล้ว ยังลดสมรรถภาพของเอ็นไซม์ลงไป ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ มา เขาจึงไม่ใช้วิธีปั่นไมโครโซมที่แยกได้ครั้งแรกซ้ำอีกครั้ง

การวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ MEOS

เอ็นไซม์ MEOS จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอธานอลดังนี้ :-

$$CH_3CH_2OH + NADPH + H^+ + O_2 \longrightarrow CH_3CHO + NADP^+ + 2H_2O$$

การวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ MEOS ทำได้โดยการวัดปริมาณ CH_3CHO หรือ Acetaldehyde ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา โดยให้ Acetaldehyde จับกับ Semicarbazide เกิดเป็น Acetaldehyde semicarbazone แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 224 นาโนเมตร

การวิเคราะห์สมรรถภาพของเอ็นไซม์ MEOS ในการวิจัยนี้จะใช้วิธีของ Lieber และ DeCarli (1969) ประกอบกับวิธีของ Gupta และ Robinson (1966) โดยมีการดัดแปลงบางส่วนให้เหมาะสม

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้</u>

1. Widmark's flask
2. ลูกแก้วขนาดเล็ก
3. ปิเปตชนิดอัตโนมัติ
4. หลอดทดลอง
5. อ่างน้ำร้อนซึ่งเขย่าตลอดเวลา
6. Spectrophotometer (Ultrospec II LKB Biochrom Ltd. ประเทศอังกฤษ)

<u>สารเคมีที่ใช้</u>

1. β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADP) จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
2. DL-Isocitric acid (Trisodium salt) จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
3. Isocitric dehydrogenase (Type I from Porcine heart จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา)
4. Sodium azide จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
5. Semicarbazide hydrochloride จากบริษัท Sigma ประเทศอเมริกา
6. Ethylenediamine tetraacetic acid (Titriplex ^{R}) จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี)
7. Magnesium chloride ($MgCl_2$) จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี
8. Trichloroacetic acid จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี
9. Ethanol จากบริษัท E. Merck ประเทศเยอรมนี

วิธีการ

นำสารแขวนตะกอนของไมโครโซม (ซึ่งมีปริมาณโปรตีนประมาณ 3 มิลลิกรัม) มา incubate ใน Widmark's flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ pH 7.4 และมีระบบที่จะให้ NADPH ออกมาใช้ในปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย :-

$NADP^+$ ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมล่าร์

Sodium isocitrate ความเข้มข้น 8 มิลลิโมล่าร์

Enzyme isocitric dehydrogenase ปริมาณ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

นอกจากนี้ใน Incubation medium ยังประกอบด้วย :-

Sodium azide ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมล่าร์

Na_2-EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล่าร์

$MgCl_2$ ความเข้มข้น 5 มิลลิโมล่าร์

Widmark's flask จะมีลักษณะเป็น flask ซึ่งมีจุกแก้วที่ปิดสนิทพอดีกับปาก flask ที่จุกแก้วจะต่อกับแท่งแก้วซึ่งมีลักษณะคล้ายช้อน (โดยส่วนปลายแท่งแก้วจะมีลักษณะเป็นถ้วยเล็ก ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ชี้ลงไปภายใน flask

ภายในถ้วยเล็ก ๆ นี้จะบรรจุ Semicarbazide hydrochloride ความเข้มข้น 15 มิลลิโมล่าร์ (ซึ่งละลายใน Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ pH 7.4) ในปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร

หลังจาก incubate สารต่าง ๆ ที่เติมลงไปใน flask ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที ในอ่างน้ำร้อนซึ่งเขย่าตลอดเวลาแล้ว จึงเริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติมเอธานอลลงไปยัง Incubation medium ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 มิลลิโมล่าร์ และปริมาตรของ Incubation medium ทั้งหมดใน flask เท่ากับ 3 มิลลิลิตร จากนั้นรีบปิดจุก flask และ incubate ต่อในอ่างน้ำร้อนซึ่งเขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 37°C เช่นเดิมนาน 10 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการฉีดสารละลายของ Trichloroacetic acid เข้มข้น 70% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงไปใน Incubation medium เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง จึงเปิด flask นำเอาสารละลายในถ้วยเล็ก ๆ ดังกล่าวไปวิเคราะห์หาปริมาณของ Acetaldehyde ซึ่งความเข้มข้นของ Acetaldehyde ซึ่งจับอยู่กับ Semicarbazide นี้จะหาได้โดยใช้วิธีการของ Gupta และ Robinson (1966) โดยการนำสารละลายในถ้วย

ดังกล่าวปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร มาเจือจางให้เป็น 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายของ Semicarbazide hydrochloride (blank ใช้สารละลายของ Semicarbazide hydrochloride ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแทน) จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 224 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer ซึ่งภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ Acetaldehyde ปริมาณ 0.1 ไมโครโมล จะให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.33 ซึ่งค่าดังกล่าวนี้จะใช้ในการคำนวณหาปริมาณของ Acetaldehyde ต่อไป

หมายเหตุ

- Sodium azide เติมลงไปในปฏิกิริยาเพื่อยับยั้งเอ็นไซม์ Catalase ที่อาจปนเปื้อนมากับไมโครโซม

- Na_2-EDTA เติมลงไปในปฏิกิริยาเพื่อยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation เพื่อให้การวิเคราะห์ได้สมรรถภาพของเอ็นไซม์สูงสุด (Optimal activity)

การคำนวณสมรรถภาพของเอ็นไซม์ MEOS

ในทำนองเดียวกับเอ็นไซม์ ADH สมรรถภาพของเอ็นไซม์ MEOS สามารถแสดงออกมาได้ทั้งในรูปของ Total activity และ Specific activity ซึ่งในการวิจัยนี้จะแสดงออกมาในรูปของ Specific activity โดยเทียบต่อปริมาณโปรตีนในส่วนไมโครโซม ซึ่งจะมีหน่วยเป็น μmoles min^{-1} mg^{-1} microsomal protein

จากค่าการดูดกลืนแสงของ Acetaldehyde ที่จับอยู่กับ Semicarbazide จะสามารถคำนวณหาปริมาณของ Acetaldehyde ที่เกิดขึ้นภายในเวลา 10 นาทีได้ และเมื่อทราบปริมาณโปรตีนในไมโครโซมที่เติมลงไปในปฏิกิริยา ก็จะสามารถคำนวณหา Specific activity ของ MEOS ได้

การแสดงผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การแสดงผลการทดลอง

แสดงออกมาในสองลักษณะคือ ตาราง และแผนภูมิรูปแท่ง ประกอบคำอธิบาย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้ unpaired-t-test กรณีเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลสองกลุ่ม

ใช้ paired-t-test กรณีข้อมูลกลุ่มเดียวกันแต่เปรียบเทียบความแตกต่างของวิธีการที่ใช้ หรือเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลที่เก็บได้ที่เวลาต่างกัน