บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทำวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

สุนัขพันธุ์ผสม เพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 10-20 กิโลกรัม จำนวน 40 ตัว จากกองควบคุมโรคพิษสุนัขบ้า กทม. นำมาเลี้ยงในศูนย์สัตว์ทดลองอย่างน้อย 2 สัปดาห์ โดยให้ได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอ

2. เครื่องมือ

- Harvard Universal Oscillograph และ Pressure Transducer รุ่น elcomatic EM 750 Ser No. 2509 และ ECG recorder
- Hemodynamic Profile Computer Model SP 1445 และ Criticath™ 7 F Thermodilution Catheter Model SP 5107 H
- Oscilloscope (Tektronix) Ser. No. B 115507
- Rota Vapour
- Separator
- Blender
- Gas Chromatography (GC)

3. สารทดลอง

3.1 สารเคมี

- Chloroform
- Sodium sulphate anhydrous
- Povidone
- Heparin
- Sodium pentobarbital
- Diallyl disulfide ของ Aldrich Chemical Company

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การเตรียมสารทดลอง

3.2.1 การเตรียมกระเทียมผง (garlic powder) โดยวิธีของ Pantoja et al, 1991

นำกระเทียมสดหนัก 2 กิโลกรัม มาแกะเปลือกออกและสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปอบให้แห้งในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปปั่นให้ละเอียด จะได้กระเทียมผงที่มีน้ำหนักเหลือเพียงหนึ่งในสามของกระเทียมสดเมื่อเริ่มต้น เมื่อจะนำไปใช้จะละลายในน้ำกลั่นจนเข้ากันดีแล้วจึงนำไปทดลอง

3.2.2 การเตรียมกระเทียมสกัดด้วยน้ำ (aqueous extract of garlic) โดยวิธีของ Banerjee, 1976; Foushee et al, 1982

ใช้กระเทียมสดน้ำหนักประมาณ 57 กรัม แกะเปลือกออกและสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปปั่นให้ละเอียด จากนั้นจึงนำไปตำด้วยครกและสาก (Pestle and mortar) เพื่อให้แน่ใจว่าทำให้แต่ละเซลล์แตกดีพอ ระหว่างการตำให้ละเอียดเติม 0.9 % normal saline ลงไปทีละน้อย จนถึงความเข้มข้นสุดท้ายเมื่อนำไปกรองผ่านผ้าสำลีสะอาดแล้ว จะได้กระเทียมสกัดด้วยน้ำจำนวน 25 มล. (กระเทียมสกัดด้วยน้ำ 1 มล. จะมีความเข้มข้นเท่ากับกระเทียมสด 2.28 กรัม) หลังจากนั้นนำไปแช่แข็งไว้เมื่อจะใช้จึงนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง และหลังจากเสร็จการทดลองรีบนำไปแช่แข็งทันที

3.2.3 การเตรียมสารสกัดจากกระเทียม (garlic extract) โดยวิธีของโรงงานเภสัชกรรมทหาร, 2527

- ใช้กระเทียมสด 100 กรัม แยกส่วนที่ฝอเสียทิ้งไป ผสมรวมกับคลอโรฟอร์ม 120 มล. นำไปปั่นด้วย blender จนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
- แยกส่วนกากและตะกอนออกโดยใช้ผ้ากรองพับหนา 4 ทบ separator funnel และกระดาษกรองเบอร์ 1 ตามลำดับ
- แยกน้ำออกโดยใช้สาร sodium sulphate anhydrous
- แยกคลอโรฟอร์มออกโดยใช้เครื่อง rota vapour ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ได้ crude oil สีเหลืองเข้ม

- ทดสอบความบริสุทธิ์ของ crude oil ด้วยวิธี thin-layer chromatography (TLC) เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน diallyl disulfide โดยใช้แผ่นกระจกขนาด 24 x 4.5 x 0.5 เซนติเมตร ฉาบด้วย Siliga Gel 60 Gf 254 และใช้ solvent system ที่ประกอบด้วย methanol : chloroform (3 : 1) เป็นตัวชะ ใช้ UV detector ตรวจสอบหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสาร พบว่าสารสกัดจากกระเทียมเคลื่อนที่ได้ระยะทางมี R_f เท่ากับ 0.74 ซึ่งเท่ากับ diallyl disulfide จากนั้นนำ crude oil มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน diallyl disulfide อีกครั้งด้วยวิธี Headspace Gas-chromatographic analysis (GC) ภายใต้สภาพเดียวกันตลอด พบว่าได้ค่า retention time ของ peak เท่ากับ 4.73 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาหาปริมาณของ diallyl disulfide พบว่ามีปริมาณของ diallyl disulfide อยู่ร้อยละ 71 %

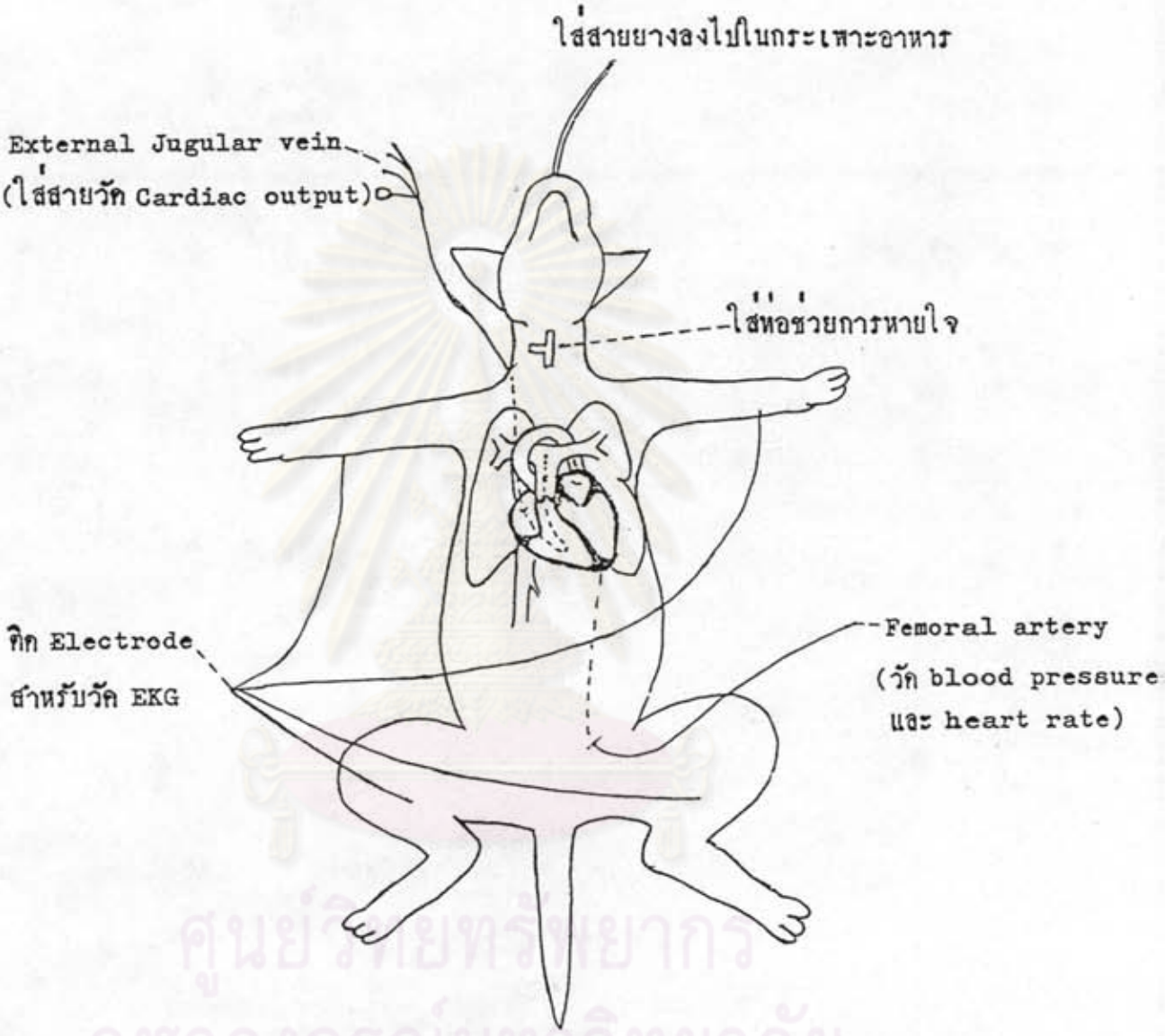
- สารสกัดจากกระเทียมที่ได้นี้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี GC เป็นสารที่ประกอบด้วย diallyl disulfide (ซึ่งเปลี่ยนมาจากอัลลิซิน) เป็นส่วนใหญ่ และเพื่อให้คงสภาพอยู่ได้นานเติม povidone (PVPK 30) เพื่อทำหน้าที่เป็น preservatives การเก็บรักษาโดยวิธีนี้สารสกัดจากกระเทียมจะมีความคงตัวประมาณ 1 ปี และการสกัดโดยใช้คลอโรฟอร์มนี้จะได้สารสกัดจากกระเทียมประมาณ 5 % ของน้ำหนักกระเทียม (โรงงานเภสัชกรรมทหาร, 2527)

4. <u>วิธีการทดลอง</u>

4.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง (รูปที่ 2)

นำสุนัขซึ่งงดอาหารในวันที่จะทำการทดลอง มาทำให้สลบด้วย sodium pentobarbital ขนาด 30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำแล้วทำการผ่าตัดใส่ท่อช่วยการหายใจ เพื่อป้องกันการอุดกั้นทางเดินหายใจ

4.1.1 การวัดความดันเลือดใช้สายยางโพลีเอธิลีนซึ่งบรรจุด้วย heparinized saline เจือจางในอัตราส่วน 1 : 50 จนเต็มใส่เข้าไปทางหลอดเลือดแดงฟีมอรัลข้างขวาไปจนถึงส่วน descending aorta ปลายด้านนอกต่อ

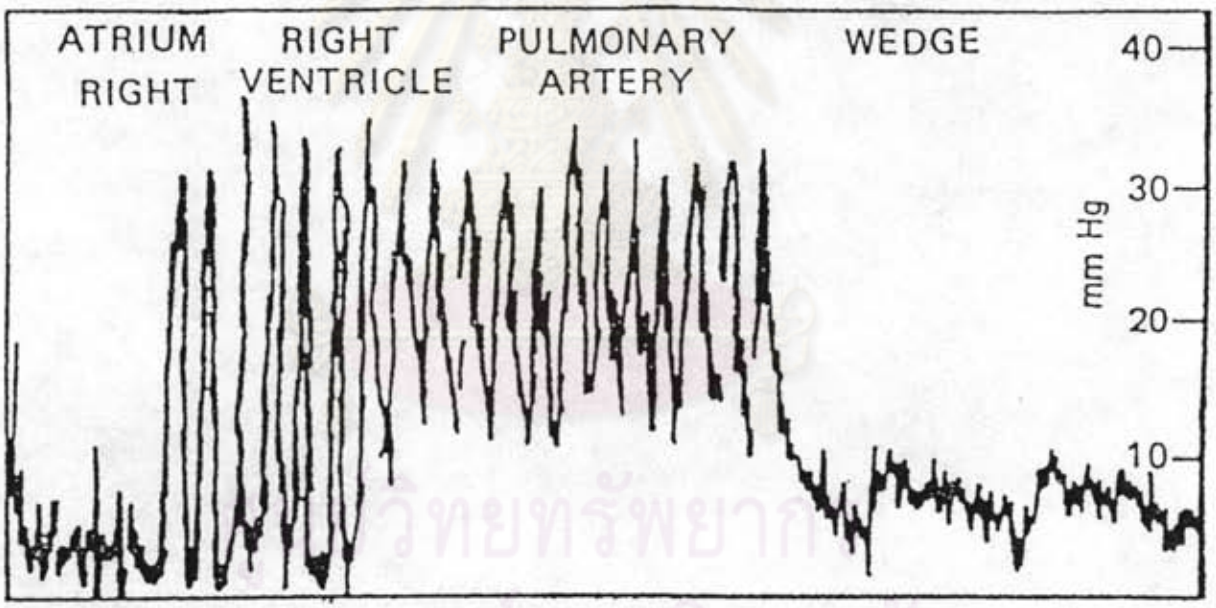


รูปที่ 2 ภาพวาดแสดงตำแหน่งต่าง ๆ ของสัตว์ทดลองที่จะทำการวัดความดันเลือด อัตราการเต้นของหัวใจ คลื่นไฟฟ้าของหัวใจ และ cardiac output

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เข้ากับ pressure transducer แล้วบันทึกสัญญาณด้วยเครื่อง Harvard Universal Oscillograph

4.1.2 การวัด cardiac output ใช้ thermodilution method โดยการสอด Criticath™ 7 F thermodilution catheter ซึ่งต่อเข้ากับเครื่อง Harvard Universal Oscillograph และ Oscilloscope เพื่อใช้ดู pressure ระหว่างสอดสายเข้าทางหลอดเลือดดำจูกูล่าร์ข้างขวาไปจนถึง right atrium ซึ่งจะมีความดันประมาณ 0-8 มิลลิเมตรปรอท จากนั้นจึงดันอากาศประมาณ 1 มิลลิลิตร เข้าไปเพื่อให้บอลลูนที่อยู่ส่วนปลายของสาย (balloon-tipped) โป่งออกแล้วสอดสายต่อเข้าไปอย่างเบา ๆ กระแสของการ

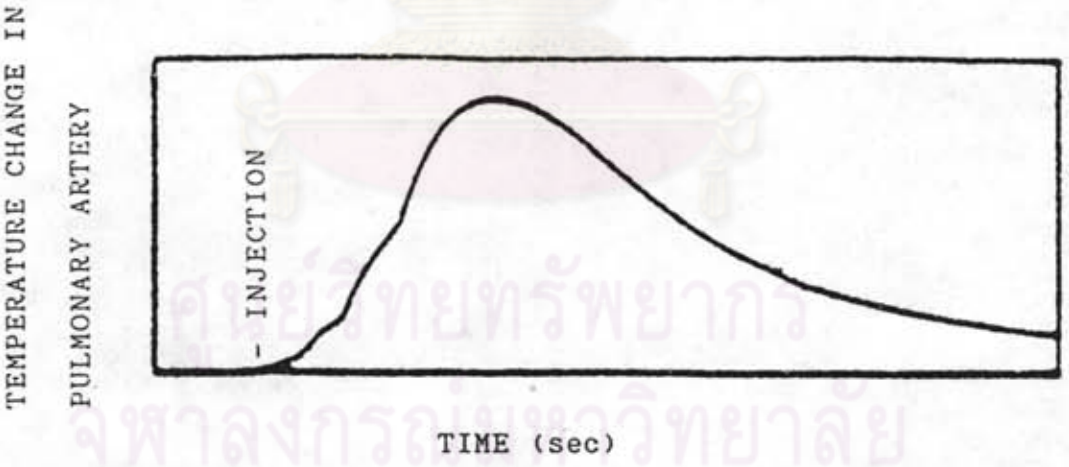


รูปที่ 3 แสดงลักษณะความดันเลือดเมื่อ balloon-tipped catheter สอดผ่าน right atrium, right ventricle และเข้าไปใน pulmonary artery และท้ายสุดเป็นตำแหน่งของ wedge (wedge position)

ไหลของเลือดจะช่วยพาบอลลูนและสาย catheter ผ่านลงไปยัง right ventricle ซึ่งความดันจะเพิ่มขึ้นเป็น 15-40 /0-10 (systolic/diastolic) มิลลิเมตรปรอท และเมื่อปลายสาย catheter ผ่านไปจนถึง pulmonary artery

จะมีความดันประมาณ 15-30/5-18 มิลลิเมตรปรอท ลักษณะความดันเลือดดังแสดงในรูปที่ 3 จากนั้นสอดสาย catheter ต่อเข้าไปอีกเล็กน้อยจะเป็นความดันของ pulmonary capillary wedge pressure ประมาณ 1-10 มิลลิเมตรปรอท (Ettinger and Suter, 1970; Geddes, 1984) ดูดอากาศในบอลลูนออก ที่ตำแหน่งนี้ thermistor จะอยู่ใน pulmonary artery

การวัด cardiac output ใช้ 0.9 % NaCl ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น indicator โดยใช้ syringe ดูด 0.9 % NaCl ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 10 มิลลิลิตร ฉีดเข้าทางสาย proximal ซึ่งจะไปออกใน right atrium ภายในเวลาประมาณ 15 วินาที และที่ส่วนปลาย (distal) ซึ่งอยู่ใน pulmonary artery จะมี thermistor สำหรับวัดอุณหภูมิซึ่งจะลดลงต่ำกว่าอุณหภูมิของร่างกายเมื่อก่อนฉีด indicator บันทึกสัญญาณด้วยเครื่อง Hemodynamic Profile Computer เพื่อคำนวณหาค่า cardiac output (ลิตรต่อนาที) ต่อไป รูปที่ 4 แสดงลักษณะของ thermodilution curve ปกติ



รูปที่ 4 แสดงลักษณะของ Normal thermodilution curve

4.1.3 การวัดคลื่นไฟฟ้าของหัวใจใช้วิธี Bipolar limb lead โดยใช้อิเลคโทรด (electrode) ติดให้แน่นกับขาของสุนัข บันทึกสัญญาณด้วยเครื่อง Harvard Universal Oscillograph โดยใช้ Lead II ของ standard limb lead

limb lead

4.1.4 ใส่สายยางโพลีเอธิลีนเข้าทางปากจนถึงกระเพาะอาหารเพื่อให้กระเทียมผง, กระเทียมสกัดด้วยน้ำ, สารสกัดจากกระเทียมและ diallyl disulfide

4.2 การดำเนินการทดลอง

4.2.1 การให้สารทดลอง

หลังจากเตรียมสัตว์ทดลองเรียบร้อยแล้ว รอประมาณ 30 นาที เมื่อวัดความดันเลือดได้คงที่จึงให้สารทดลองทางสายยางเข้าไปในกระเพาะอาหาร บันทึกการเปลี่ยนแปลงความดันเลือด อัตราการเต้นของหัวใจ คลื่นไฟฟ้าของหัวใจ และ cardiac output ทั้งก่อนและหลังจากให้สารทดลองเป็นเวลา 180 นาที โดยบันทึกความดันเลือด อัตราการเต้นของหัวใจและคลื่นไฟฟ้าของหัวใจ ที่เวลา 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ตามลำดับ ส่วน cardiac output วัดที่ 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ตามลำดับ

4.2.2 การทดลอง

การศึกษาทดลองครั้งนี้ใช้สัตว์ทดลองทั้งหมด 54 ตัว แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมโดยใช้ 0.9 % NaCl จำนวน 0.5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (n = 4)

กลุ่มที่ 2 ศึกษาโดยใช้กระเทียมผงที่เตรียมจากข้อ 3.2.1 ในขนาด 100, 300, 600 และ 1,200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในแต่ละขนาดจะใช้สุนัขจำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 3 ศึกษาโดยใช้กระเทียมสกัดด้วยน้ำที่เตรียมจากข้อ 3.2.2 ในขนาด 25, 50 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แต่ละขนาดจะใช้สุนัขจำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 4 ศึกษาโดยใช้สารสกัดจากกระเทียมที่เตรียมจากข้อ 3.2.3 ในขนาด 16,32 และ 48 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แต่ละขนาดจะใช้สุนัขจำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 5 ศึกษาโดยใช้ diallyl disulfide ในขนาด 34 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (ปริมาณ diallyl disulfide นี้เท่ากับสารสกัดจากกระเทียมจำนวน 48 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยคิดจากเปอร์เซ็นต์ของ diallyl disulfide ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Headspace Gas-chromatographic analysis) (n=5)

5. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

ผลการทดลองใช้ Student's paired t-test วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความดันเลือด อัตราการเต้นของหัวใจ และ cardiac output เมื่อให้สารต่าง ๆ ระหว่างเวลาที่ 0 (ก่อนให้) กับเวลาต่าง ๆ ที่กำหนดและใช้ Student's unpaired t-test เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างเวลาที่ศึกษาของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ให้สารทดลอง ผลการทดลองจะรายงานในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ standard error, SE) ยอมรับค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย