อุปกรณ์ และวิธีทำการวิจัย

2.1 วัสดุ สัตว์ทดลอง และเครื่องมือ

2.1.1 หัวกลอย (Dioscorea hispida) ซึ่งเก็บมาจาก จังหวัดมหาสารคาม

2.1.2 สัตว์ทดลอง ใช้หนูขาว (Rat, Wistar strain) เพศผู้น้ำหนัก 250 – 350 กรัม

2.1.3 เครื่องมือ

2.1.3.1 Four channel recorder (Devices Co, MX 4 type)

2.1.3.2 Physiological pressure transducer (Bell & Howell Limited)

2.1.3.3 Harvard Apparatus recorder Model 350

2.1.3.4 Harvard Apparatus isometric transducer

2.1.3.5 Harvard Apparatus isotonic transducer

2.1.3.6 Isolated organ/tissue bath (Phipps & Bird, Inc)

2.1.3.7 Polyethylene cannula diameter 0.023" (for vein and artery)

2.1.3.8 Polyethylene cannula, diameter 2.5 mm., length 5 cm. (for trachea)

2.2 วิธีทำการวิจัย

2.2.1 สกัด Dioscorine ออกมาจากหัวกลอย ตามวิธีของ รพีพล ภโววาท[13] โดยนำหัวกลอยสดมาปอกเปลือกฝานเป็นชิ้นบาง ๆ อบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 30 – 40 องศาเซลเซียส แล้วนำมาบดเป็นผง จากนั้นนำผงที่ได้มาหมักใน 95 % อัลกอฮอล์หลาย ๆ ครั้ง จนอัลคาลอยด์

ที่มีอยู่ถูกสกัดออกมาหมด แล้วกรองเอาส่วนอัลกอฮอล์มาระเหย ใต้ความดันต่ำจนให้เหลือเป็นสารเหนียว (Syrupy mass) แล้วจึงนำสารนี้มาละลายใน 5 % acetie acid กรองสารละลายที่ได้แล้วนำมาทำให้เป็นด่างด้วย 10 % Na_2CO_3 แล้วจึงสกัดอัลคาลอยด์ที่มีอยู่ในสารละลายด่างนี้ด้วย chloroform หลาย ๆ ครั้ง จนอัลคาลอยด์หมด นำส่วน chloroform ที่ได้มาระเหยภายใต้ความดันต่ำ จนได้เป็นสารเหนียว แล้วจึงละลายสารเหนียวนี้ใน acetone ที่ปราศจากน้ำ แล้วเติม 5 % hydrobromic acid (ใน acetone) ทีละหยดลงไปจนทำให้สารละลาย acetone มี pH 3- 5 เมื่อทิ้งไว้สักครู่ ก็จะมีการตกผลึกของ Dioscorine hydrobromide (DCR. HBr) นำผลึกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีสคมภ์รงคเลข (Column chromatography) โดยใช้ alumina gel เป็น adsorbent และ chloroform เป็น eluent ทำการ elute ด้วย Chloroform จนกระทั่ง DCR. HBr ถูกชะลงมาหมด (โดยเหลือสารมีสีทิ้งไว้ที่ยอดของ Column) แล้วนำ chloroform eluent มาระเหยใต้ความดันต่ำอีกครั้งหนึ่งจนเข้มข้น แล้วเติม acetone ลงไปในสารละลายเข้มข้นนั้น หลังจากตั้งทิ้งไว้สักครู่ ผลึกสีขาวของ DCR. HBr ก็จะตกตะกอน

นำ DCR. HBr ที่ได้มาตรวจคุณสมบัติและความบริสุทธิ์ โดยวิธีต่อไปนี้

ก. ใช้ Dragedorff's reagent เพื่อพิสูจน์ว่าตัวอย่างเป็นอัลคาลอยด์

ข. นำตัวอย่างมาทำรงคเลขผิวบาง (Thin layer chromatography) โดยใช้ adsorbent และ solvent system ต่าง ๆ กัน แล้วเทียบค่า Rf กับของตัวอย่างแท้ (Authentic sample)

ค. พิสูจน์จาก Infra red spectrum โดยเปรียบเทียบกับอัลคาลอยด์มาตรฐาน โดยใช้เครื่องมือ Infra red spectrophotometer (Perkin Elmer - 283)

ง. หาจุดหลอมเหลวของตัวอย่างที่ได้ (207 °c)

ส่วนใหญ่ของขบวนการเตรียม DCR.HBr นี้ ดำเนินโดย อาจารย์บุญยงค์ ตันติสิระ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวิช ทองโรจน์

เมื่อจะใช้ในการทดลอง จึงนำผลึกนี้มาละลายในน้ำกลั่น

2.2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

Anesthesia ทำให้หนูขาวหมดความรู้สึก โดยใช้ Urethane 10 % ฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 1.5 กรัม ต่อน้ำหนักหนูขาว 1 กิโลกรัม[15]

Tracheal cannulation เนื่องจากการใช้ยาสลบ อาจทำให้เกิดสิ่งขับแยก (secretion) ออกมากในทางเดินอากาศของระบบการหายใจ จึงจำเป็นต้องสอด polyethylene cannula ลงไปในหลอดลม เพื่อช่วยให้สัตว์ทดลองหายใจได้สะดวกและเพื่อให้ง่ายในการขจัดการอุดตัน (obstruction) ซึ่งอาจเกิดจากสิ่งขับแยก (secretion) หรือมีโลหิตไหล

วิธีการทำโดยการให้หนูขาวนอนหงาย แล้วยืดคอให้ยาวที่สุดแล้วจึงผ่าตรงบริเวณคอตามเส้นกลางตัวผ่านผิวหนังและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ลงไปจนกระทั่งถึงหลอดลม จากนั้นใช้เส้นด้าย 2 เส้น สอดผ่านใต้หลอดลม ณ ตำแหน่งที่ห่างจากด้านล่างของต่อมไทรอยด์ ประมาณ 1 เซ็นติเมตร โดยผ่าให้ชิดกับกระดูกอ่อน (cartilage) เพื่อเลี่ยงการตัดบริเวณกล้ามเนื้อ ซึ่งอาจทำให้มีการเสียโลหิต เพราะการตัดผ่านเส้นเลือดในกล้ามเนื้อ เนื่องจากขนาดของหลอดลมในหนูขาวเล็กมาก ฉนั้นถ้ามีโลหิตออกมาเพียงเล็กน้อย ก็อาจเป็นสาเหตุของการอุดตันของทางเดินหายใจได้ ขนาดของ polyethylene cannula ที่ใช้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 มิลลิเมตร ยาว 5 เซ็นติเมตร โดยสอดผ่านบริเวณที่ผ่าตรงไปยังปอด ผนังของหลอดลมถูกผูกยึดติดกับ cannula การแก้ไขในกรณีที่เกิดการอุดตันของทางเดินหายใจ ทำได้โดยใช้ polyethylene cannula เล็ก ๆ ต่อกับเข็มและ syringe เพื่อดูดเอาสิ่งอุดตันออกมา แต่จะต้องระวังไม่สอด polyethylene cannula เข้าไปลึกมาก จนอาจจะทำให้เนื้อเยื่อปอดเกิดบาดแผลได้

Jugular vein cannulation การสอด polyethelene cannula เข้าไปในเส้นโลหิตดำ jugular ที่บริเวณลำคอของหนูขาว เพื่อให้สารละลายของ Dioscorine และยาต่าง ๆ

ทำโดยการแยก Jugular vein ซึ่งอยู่บริเวณลำคอใกล้กับไหล่ของหนูขาว ออกมาให้ชัดเจน จากนั้นจะใช้ด้าย 2 เส้น สอดลอดผ่านใต้เส้นโลหิตดำนี้ เส้นที่หนึ่งซึ่งอยู่ทางด้านหัว จะใช้ผูกรัดเส้นโลหิตให้แน่น เพื่อกันการไหลกลับของโลหิตที่มาจากส่วนศีรษะ จากนั้นใช้กรรไกรขนาดเล็กขลิบผนังของเส้นโลหิตเป็นรูปตัว v แล้วสอด Cannula เข้าไปในเส้นโลหิตดำนั้นในทิศทางที่ตรงไปยังหัวใจ โดยประมาณให้ปลายของ Cannula อยู่บริเวณ Superior vena cava แล้วจึงใช้ด้ายอีกเส้นหนึ่งผูกเพื่อรัดผนึก Cannula ไว้ให้แน่นกับผนังของเส้นโลหิตดำ polyethylene cannula ที่ใช้เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.023" ปลายด้านที่สอดเข้าไปจะตัดให้เฉียงและฝนให้เรียบ เพื่อป้องกันการแทงทะลุผนังเส้นโลหิตอีกด้านหนึ่งของ cannula จะต่อกับ three-way Luer stopcock และ syringe ทั้ง syringe, stopcock และ cannula ได้บรรจุให้เต็มด้วยสารละลาย 0.9 % NaCl

การบันทึกความดันโลหิต (Recording of Systamic Blood Pressure)

ทำโดยการ cannulate เส้นโลหิตแดง carotid โดยใช้วิธีเช่นเดียวกันกับกรณีของ Jugular vein cannula ที่จะ cannulate มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.023" การเตรียม cannula จะทำเหมือนกับอันที่ใช้กับเส้นโลหิตดำ jugular แต่กรณีของเส้นโลหิตแดงนี้จะบรรจุด้วย Heparinized Saline (100 I.U./ml) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของโลหิต ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคต่อการบันทึกความดันโลหิต เมื่อสอด cannula เข้าไปในเส้นโลหิตแดง carotid แล้วปลายของ cannula จะไปอยู่ ณ ตำแหน่งใกล้ aorta ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งของ cannula จะต่อเข้ากับ pressure transducer โดยผ่าน three way stopcock เพื่อบันทึกความดันโลหิตชนิด pulsatile (ทั้ง systolic และ diastolic)

ลงบน Harvard apparatus recorder

เพื่อป้องกันอุบัติเหตุที่ cannula อาจเลื่อนหลุดออกมาได้ จึงได้ใช้ด้ายที่ผูก cannula ทั้งของเส้นโลหิตแดง carotid และเส้นโลหิตดำ jugular เย็บติดกับหนังของหนูขาว

การบันทึกอัตราการหายใจ (Recording of Respiratory Movements)

ให้หนูขาวนอนหงาย แล้วกรีดผิวหนังเป็นช่องเล็ก ๆ ณ ตำแหน่งของ Xyphoid cartilage ใช้ปากคีบหื่อ ๆ พยายามแยกเอา Xyphoid cartilage จากเนื้อเยื่อข้างเคียงแล้วใช้เชือกไหมร้อยด้ายแล้ว แทงทะลุ และผูกเส้นด้ายนั้นกับ Xyphoid cartilage โดยปลายอีกด้านหนึ่งของเส้นด้าย จะต่อเข้ากับ Harvard Apparatus isometric transducer เพื่อบันทึกอัตราการหายใจลงบน Harvard Apparatus recorder โดยวัดแรงกระเพื่อมของ Xyphoid cartilage ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการหายใจ

2.2.3 ศึกษาผลของการฉีดสารละลายของ Dioscorine เข้าเส้นโลหิตดำ (intravenous injection) ต่อความดันโลหิต (Systemic Blood Pressure) และดูลักษณะทางเภสัชวิทยาในแง่ของ dose-response characteristic ของ Dioscorine โดยขนาดของ Dioscorine ที่ให้ใช้ตั้งแต่ 0.5 ถึง 256 µg โดยเพิ่มขึ้นในมาตร logarythm และละลายในน้ำกลั่นในปริมาตร 0.05 – 0.4 ml.

2.2.4 เปรียบเทียบผลของ Dioscorine ก่อนและหลังการให้ alpha-adrenergic blocking agent(Phentolamine) ในหนูขาว โดยทำดังนี้

2.2.4.1 เตรียมหนูขาวเช่นเดียวกันในข้อ 2.2.2

2.2.4.2 ให้ Norepinephrine ในขนาด 5 µg ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และ Dioscorine ในขนาด 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 µg ทางเส้นโลหิตดำ เพื่อบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตหลังการให้ยาแต่ละครั้ง จากนั้นให้ phentolamine ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แล้วให้

Norepinephrine ในขนาดเดิม และ Dioscorine ในขนาด 16 µg ทางเส้นโลหิตดำ แล้วดูผลอันเนื่องมาจาก Norepinephrine และ Dioscorine ครั้งหลังนี้เปรียบเทียบกับผลเมื่อก่อนให้ phentolamine

2.2.5 ผลของการให้ ganglionic blocking agent (Hexamethonium, C_6) ต่อการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตอันเนื่องมาจากการให้ Dioscorine

2.2.5.1 เตรียมหนูขาว เหมือนในข้อ 2.2.2

2.2.5.2 ทำการทดลองโดยมีลำดับดังนี้ ให้ Dioscorine ขนาด 2 µg และ Norepinephrine ขนาด 5 µg ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ทางเส้นโลหิตดำ และบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต จากนั้นให้ Hexamethonium (C_6) ในขนาดทั้งสิ้น 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยแบ่ง C_6 จำนวนนี้ออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆ กัน นำส่วนแรกมาแบ่งออกเป็น 3 ส่วนย่อย และส่วนที่สองแบ่งออกเป็น 2 ส่วนย่อย แล้วแยกส่วนฉีดให้กับหนูขาวทางเส้นโลหิตดำ โดยสลับกับการให้ Dioscorine และ Norepinephrine โดยขนาดเช่นกันกับเมื่อก่อนการให้ C_6 แล้วบันทึกผลของการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต เพื่อเปรียบเทียบกับผลที่เกิดจาก Dioscorine และ Norepinephrine ก่อนการให้ C_6

2.2.6 การศึกษาผลอันเนื่องมาจาก Dioscorine ในหนูขาวที่ถูกกระทำก่อนหน้าการให้ Dioscorine ด้วยการฉีด Reserpine เพื่อทำลายการทำงานของเส้นประสาท adrenergic ทำโดย

2.2.6.1 นำหนูขาวซึ่งมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน (250 – 290 กรัม) มาฉีดด้วย reserpine ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเข้าช่องท้องเป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาทดลอง(10)

2.2.6.2 เตรียมหนูขาวที่ฉีด reserpine จนครบ 2 วันแล้ว ดังในข้อ 2.2.2

2.2.6.3 ใช้ Dioscorine ขนาด 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 และ 256 µg ตามลำดับ ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำในหนูขาว แล้วดูผลต่อความดันโลหิตและการหายใจ

2.2.6.4 นำผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตมาแสดงโดยเขียนเป็นกราฟเปรียบเทียบกับผลการเปลี่ยนแปลงในหนูขาวที่ไม่ได้รับ reserpine ในข้อ 2.2.3

2.2.7 ศึกษาผลของ Dioscorine ต่อกล้ามเนื้อหัวใจ (Isolated heart)

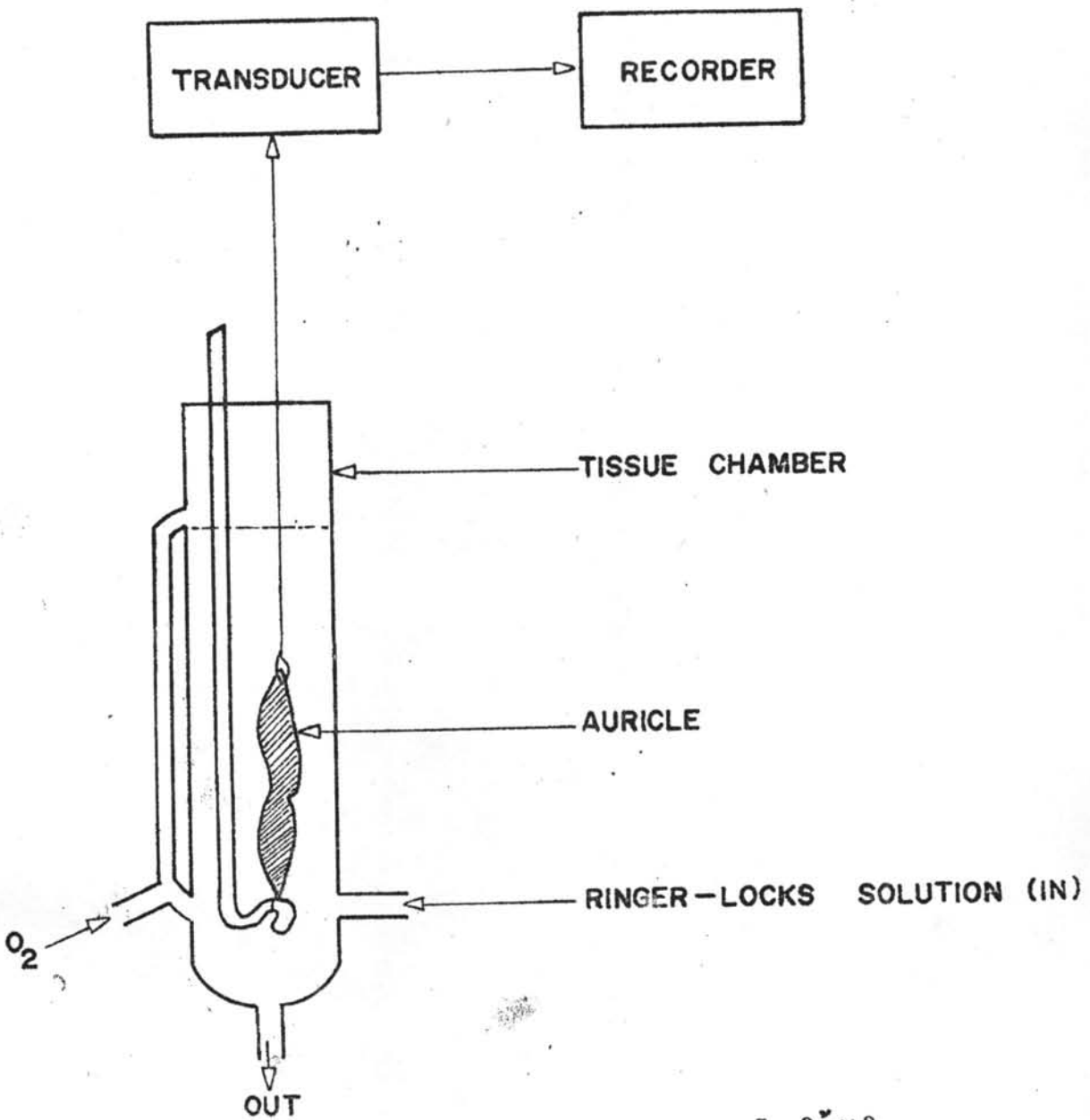
2.2.7.1 โดยใช้ Dioscorine ขนาด 0.5, 1, 2, 4, 8 µg และ 0.5, 1, 2, 4, และ 8 มิลลิกรัม

2.2.7.2 เตรียมหัวใจห้องบนทั้งสองของหนูขาว โดยทำให้หนูขาวหมดความรู้สึก ด้วยการทุบบริเวณรอยต่อระหว่างสมองและไขสันหลัง แล้วทำการผ่าตัดลงในบริเวณหน้าอกของหนูขาว เพื่อตัดเอาหัวใจออกมาจากตัว แยกส่วนที่เป็นหัวใจห้องล่าง (ventricle) ออกเหลือแต่ห้องบน (auricle) ทั้ง 2 ข้าง จากนั้นใช้ด้าย 2 เส้น ผูกกับหัวใจห้องบนทั้งซ้ายและขวา เพื่อนำไปแขวนใน chamber ของเครื่องมือ Isolated organ/tissue bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 34 องศาเซลเซียส ใน chamber จะมีสารละลาย Ringer-locke ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 1 (16) สารละลายนี้ให้ออกซิเจนผ่านตลอดเวลา ปลายข้างหนึ่งของหัวใจห้องบน จะผูกยึดติดกับขอแก้วใน chamber ส่วนอีกข้างหนึ่งใช้ด้ายโยงให้ตึงเข้ากับ Harvard Apparatus isometric transducer ซึ่งได้ต่อเข้ากับ Harvard Apparatus recorder เพื่อบันทึกการทำงานของหัวใจ ดังรูปที่ 1 (16)

ตารางที่ 1

ส่วนประกอบของ Ringer Locke Solution

สารเคมี	จำนวนกรัมต่อ 10 ลิตร
NaCl	90.0
KCl	4.2
$CaCl_2$	2.4
$NaHCO_3$	1.5
Glucose	10.0



รูปที่ 1 แสดงการทำ Isolated auricles preparation โดยใช้หัวใจห้องบนของหนูขาว