

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย



๒.๑ วัสดุ สัตว์ทดลองและเครื่องมือ

๒.๑.๑ สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักร (mouse) ทั้ง ๒ เพศ (ไม่ทราบพันธุ์) น้ำหนักระหว่าง ๑๘-๒๔ กรัม หนูแต่ละตัวเมื่อนำมาทดลองแล้วจะไม่นำมาใช้ทดลองอีกต่อไป

๒.๑.๒ กลดยย

หัตถกลดยที่ใช้ทดลองได้เก็บจากต้นเดียวตลอดการวิจัย เพื่อเลี่ยงความแปรผันที่อาจเกิดจากต้นกำเนิดของตัวยยง ตัวยยงหัตถกลดยที่ใช้เก็บมาจากจังหวัดนครราชสีมา การเตรียมหัตถกลดยได้ทำโดยนำมากโปดเปลี่ยนออกฤทธิ์ให้หมด ผ่านเป็นแผ่นบางๆนำไปอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ ๘๐C ประมาณ ๒๔ ชั่วโมง แล้วเก็บกลดยที่อบแห้งแล้วไว้ใช้ทดลองต่อไป

๒.๑.๓ ยาที่ใช้ในการทดลอง

๒.๑.๓.๑ Diazepam (Valium ๑๐), ๕ มก./มล. ampules, ของบริษัท F. Hoffmann La Roche Co. Ltd. , Basle Switzerland.

๒.๑.๓.๒ Phenyltoin sodium, U.S.P. (Dilantin) ๕๐ มก./มล. ของ Parke Davis & Company, Detroit, Michigan, U.S.A.

๒.๑.๓.๓ Phenobarbital sodium, U.S.P. (Gardenal) ๒๐๐ มก./มล. ampules, ของบริษัท May and Baker, England.

๒.๑.๓.๔ Pentobarbital sodium, U.S.P. (Nembutal) ๕๐

มก./มล. ของ Abbott Laboratories, North Chicago, U.S.A.

๒.๑.๔ เครื่อง locomotor activity monitor

ใช้สำหรับวัดอัตราการเคลื่อนไหวในสัตว์ทดลอง เครื่องนี้ออกแบบและสร้างโดย พงษ์ศักดิ์ วรรณสวน และ ภาวิช ทองโรจน์ (๑๔)

๒.๒ การดำเนินการวิจัย

๒.๒.๑ การสกัดอัลคาลอยด์ไดออกสคอร์นินจากหัวกลอย

ส่วนใหญ่ของขบวนการสกัดดำเนินการโดยอาจารย์บุญยงค์ ตันติสิระ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวิช ทองโรจน์ โดยมีวิธีดังนี้ นำแผ่นกลอยที่อบแห้งแล้วมาคั้นเป็นผงแล้วนำผงที่ได้มาหมักใน ๕๕% ethanol หลายๆ ครั้งจนอัลคาลอยด์ที่มีอยู่ถูกสกัดออกมาหมด แล้วกรองเอาส่วนอัลคาลอยด์มาระเหยไต่ความเข้มข้นต่ำจนให้เหลือเป็นสารเหนียว (syrupy mass) แล้วจึงนำสารนี้มาละลายใน ๕% acetic acid กรองสารละลายที่ได้แล้วนำ filtrate มาทำให้เป็นค่างด้วย CO_2 จากนั้นจึงสกัดอัลคาลอยด์ที่มีอยู่ในสารละลายค่างนี้ด้วย chloroform หลายๆ ครั้งจนอัลคาลอยด์หมด นำส่วน chloroform ที่ได้มาระเหยภายใต้ความเข้มข้นต่ำจนได้เป็นสารเหนียว แล้วจึงละลายสารเหนียวนี้ใน acetone ที่ปราศจากน้ำแล้วเติม ๕% Hbr (ใน acetone) ที่ละลายลงไปจนทำให้สารละลาย acetone มี pH ๓-๕ เมื่อทิ้งไว้สักครู่จะมีการตกผลึกของ Dioscorine hydrobromide (DCR.Hbr) นำผลึกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีสัณฐานวิเคราะห์ (column chromatography) โดยใช้ alumina gel เป็น adsorbent และ chloroform เป็น eluent ทำการ elute ด้วย chloroform จนกระทั่ง DCR.Hbr ถูกชะลงมาหมด (โดยเหลือสารมีสีทิ้งไว้ที่ยอดของ column) แล้วนำ chloroform eluent มาระเหยภายใต้ความเข้มข้นต่ำอีกครั้งหนึ่งจนเข้มข้น แล้วเติม acetone ลงไปในสารละลายเข้มข้นนั้น หลังจากตั้งทิ้งไว้สักครู่ผลึกสีขาวของ DCR.Hbr ก็

จะสกัดกะดอง วิธีกังสำนวนนี้ได้อีกแปลงมาจากสมณนภกษที่ร่ายงานไว้โดยดัดแปลง ๓.๑๔) ๓.๑๔) ๓.๑๔)
ได้ออสคอร์รีนมาทดสอบทำโดยละลายได้ออสคอร์รีนในน้ำกลั่นให้ได้ออสคอร์รีนเข้มข้นตามที่ต้องการ

๒.๒.๒ การเตรียมน้ำสกัดกลอย

ขิงแก่นกกลอยที่อบแห้งแล้วมาจำนวนหนึ่ง แล้วเติมน้ำลงไปสี่เท่าของน้ำหนัก ขิงยา
แล้วคั้นทิ้งไว้ประมาณ ๓๐ นาที แล้วจึงกรองเอาน้ำมาใช้คั้นต่อไป น้ำสกัดนี้คือความเข้มข้นเป็น
๒๕% น้ำหนักต่อปริมาตรและเตรียมขึ้นทันทีในวันที่จะใช้ทำการทดสอบแต่ละครั้ง

๒.๒.๓ วิธินำยาเข้าสู่ร่างกาย

โดยฉีดเข้าภายในช่องท้อง (intraperitoneal injection) ทำโดยการจับ
หนูด้วยมือซ้าย โดยคิงและกำหนดน้ำหนักก่อนหลัง แล้วรวมหางไว้ด้วยนิ้วก้อย แล้วสอดเข็มเข้าช่อง
ท้อง (intraperitoneal space) ในตำแหน่งที่ประมาณว่าจะไม่ถูกอวัยวะภายในใดๆ ปริมาตร
ของยาที่ให้แต่ละครั้งไม่ต่ำกว่า ๐.๐๕ มล. และไม่เกิน ๐.๕ มล.

๒.๒.๔ การศึกษาพฤติกรรมของสัตว์ทดลองปรกติเมื่อได้รับได้ออสคอร์รีน

ทำการทดลองโดยฉีดได้ออสคอร์รีนให้แกหนูกลุ่มละ ๒ ตัว โดยมีขนาดของได้ออสคอร์รีน
ที่ให้คงกล่าวไว้ในภาคผลการทดลอง (บทที่ ๓ ข้อ ๓.๑) การสังเกตผลต่อพฤติกรรมกระทำทันที
หลังฉีดคือคืบคอดกันเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง แล้วจึงเก็บสัตว์ทดลองไว้สังเกตผลต่อไปจนครบ ๒๔ ชั่วโมง

๒.๒.๕ ศึกษาพิษและความสัมพันธ์ระหว่างขนาดกับการตายในหนูถีบจักรอัน
เนื่องมาจากได้ออสคอร์รีน (Dose-Response Characteristic)

การศึกษากฎจะเป็นพิษโดยเฉียบพลันอันเนื่องมาจากได้ออสคอร์รีนในหนูถีบจักร ทำ
โดยฉีดได้ออสคอร์รีนแต่ละขนาดต่างๆกันรวม ๔ ขนาดแกหนูกลุ่มละ ๒ ตัว กรณีของหนูที่ได้รับ
ได้ออสคอร์รีนในขนาดสูงและมีการตายเกิดขึ้น การนับจำนวนที่ตายในหนูแต่ละกลุ่มกระทำในเวลา
๒๔ ชั่วโมง แล้วนำข้อมูลจากจำนวนการตายที่ได้มาคำนวณและเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์
ระหว่างขนาดที่ให้กับผลที่ทำให้เกิดการตายอันเนื่องมาจากได้ออสคอร์รีน (๑๕) จากกราฟที่ได้จะ

ทำให้ทราบค่า LD_{๕๐} ของ ไคออสคอริน ในหนูถีบจักร

๒.๒.๖ ศึกษายาลของ ไคออสคอริน ต่อพฤติกรรม การเคลื่อนไหว

ทำการทดลองโดยใช้หนูกลุ่มละ ๓ ตัว โดยมี ๔ กลุ่มได้รับไคออสคอรินแต่ละขนาด ดังนี้ LD_{๑๐} (๑๐.๐ มก./กก.) LD_{๕๐} (๒๑.๕ มก./กก.) LD_{๑๐๐} (๒๗.๐ มก./กก.) และ LD_{๒๐๐} (๓๑.๖ มก./กก.) และอีกกลุ่มหนึ่งโดยให้ได้รับน้ำเกลือ (Normal saline solution) ๐.๕ มล. เข้าช่องท้อง แล้วบันทึกการเคลื่อนไหวในหนูแต่ละตัวเป็นระยะๆ ละ ๕ นาทีจนครบ ๑ ชั่วโมง โดยใช้เครื่องมือ locomotor activity monitor ซึ่งจะแสดงผลเป็นตัวเลขแสดงอัตราการเคลื่อนไหวในคาบเวลาที่กำหนด แล้วนำข้อมูลที่ได้นมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เกิดจากหนูซึ่งได้รับน้ำเกลือ ซึ่งใช้เป็นกลุ่ม control

๒.๒.๗ ศึกษาฤทธิ์ระหว่างกันของ ไคออสคอริน กับ ยากลกดประสาทส่วนกลาง (cns. depressant) และ ยาแก้ชักบางชนิด (anticonvulsant)

โดยใช้ยาต่างๆ ในตารางที่ ๑ ซึ่งยาเหล่านี้ได้ให้ในขนาดคงที่โดยฉีดเข้าช่องท้องก่อน แล้วจึงให้ไคออสคอรินในภายหลัง เมื่อถึงเวลาตามที่แสดงไว้ในตารางที่ ๑ การศึกษาทำในหนูถีบจักรกลุ่มละ ๖ ตัว ยาแต่ละชนิดจะใช้ในหนู ๒-๔ กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มได้รับไคออสคอรินขนาดต่างๆกัน หลังจากให้ไคออสคอรินแล้ว จึงสังเกตุผลและนับจำนวนการตายในหนูแต่ละกลุ่ม แล้วนำข้อมูลจำนวนการตายที่ได้นมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลที่ทำให้ตายกับขนาดของ ไคออสคอรินที่ให้นในหนูกลุ่มต่างๆที่ได้รับยาชนิดต่างๆกัน แล้วเปรียบเทียบผลทั้งหมดบนกราฟกับผลที่ได้จากข้อ ๒.๒.๕

ตารางที่ ๑. ยากประสาทส่วนกลางและยาแก้ชักที่ให้

Drugs	Dose, mg/kg	Time injected (min. before Dioscorine)
Diazepam	๑๐	(๒๐) ๕
Pentobarbital sod. (nembutal)	๒๐	๓๐ (๒๑, ๒๒)
Phenobarbital sod.	๓๕	๓๐ (๒๒)
Phenyltoin sod. (dilantin)	๒๕	๓๐

๒.๒.๘ ศึกษาปฏิกิริยารวมระหว่างไดออกสคอร์นและบาบิทูเรท (Barbiturates)
โดยระยะเวลาการสลบ

การทดลองได้กระทำในหนูกลุ่มละ ๖ ตัว โดยหนูกลุ่มหนึ่งได้ใช้เป็นกลุ่ม control ซึ่งได้บันทึกระยะเวลาการสลบหลังจากได้รับ pentobarbital sodium (๕๐ มก./กก.) โดยการฉีดเข้าหน้าท้อง ในหนูกลุ่มอื่นอีก ๕ กลุ่มเมื่อให้ pentobarbital sodium (๕๐ มก./กก.) ดังกลุ่ม control แล้วหลังจากนั้นเป็นเวลา ๕ นาทีได้ให้ไดออกสคอร์นในขนาด LD_๑, LD_{๑๐}, LD_{๓๐} และ LD_{๕๐} ทางช่องท้อง แล้วจึงบันทึกระยะเวลาการสลบของหนูกลุ่มเหล่านี้เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control

๒.๒.๙ ศึกษาพฤติกรรมของสัตว์ทดลองปกติเมื่อได้รับน้ำสกัดกอลอย

ฉีดน้ำสกัดกอลอยให้แก่หนูกลุ่มละ ๖ ตัว โดยมีขนาดของน้ำสกัดกอลอยที่ให้ดังกล่าวในภาคผลการทดลอง การสังเกตพฤติกรรมกระทำทันทีหลังฉีดติดต่อกันเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง แล้วจึงเก็บสัตว์ทดลองไว้สังเกตต่อไปจนครบ ๒๔ ชั่วโมง

๒.๒.๑๐ การประเมินผลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาตัดสินความมีนัยสำคัญทางสถิติโดยใช้ Student's

t test