บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

2.1 วัสดุ, สัตว์ทดลองและเครื่องมือ

2.1.1 สารที่ใช้ทดลอง

สารสกัดใบราตรีส่วนของ Saponin ละลายใน Normal Saline ในอัตราส่วน 10, 12.5, 20 mg./ml.

2.1.2 สัตว์ทดลอง

2.1.2.1 เต่า (Turtle)

2.1.2.2 หนูถีบจักร (Mice)

2.1.2.3 หนูตะเภา (Guinea pig)

2.1.2.4 แมว

2.1.3 เครื่องมือ

2.1.3.1 Four-channelrecordor (Devices Co., MX 4 type)

2.1.3.2 Physiological Pressure Transducers (Bell & Howell Limited)

2.1.3.3 Harvard apparatus recorder 350

2.1.3.4 Harvard apparatus isometric Force Transducer

2.1.3.5 Isolated Organ-tissue Bath (Phipps & Bird, Inc.)

2.1.3.6 Electric Kymograph

2.1.3.7 Heart Perfusion apparatus

2.1.3.8 Applied Langendorff's apparatus

2.1.3.9 P H Meter

2.1.3.10 Tally Counter

2.1.4 ยาที่ใช้ในการทดลอง

2.1.4.1 Acetylcholine10 µg./ml.

2.1.4.2 Adrenalin, 1 mg./ml. ampule

2.1.4.3 Atropine sulphate, 0.6 mg./ml. ampule

2.1.4.4 Diphenhydramine hydrochloride (Benadryl), 10 mg./ml. Vial

2.1.4.5 Histamine phosphate, 1 mg./ml. ampule

2.1.4.6 Heparin, 5000 ū/ml. Vial

2.1.4.7 Isoproterenol (Isuprel), 0.2 mg./ml. ampule

2.1.4.8 Morphine, 10 mg./ml. ampule

2.1.4.9 Propranolol (Inderal), 1 mg./ml. ampule

2.1.4.10 Sodium Pentobarbital Injection USP (Nembutal Sodium), 50 mg./ml. Vial

2.2. วิธีทำการวิจัย

2.2.1 การสกัดสารจากใบราตรี

สกัดส่วนของ saponin จากใบราตรี ตามวิธีของ Nemba และคณะ (1974) ตามแผนภูมิที่ 1 โดยนำใบราตรีสดซึ่งล้างสะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปั่นในเครื่องปั่นไฟฟ้า (Electric Blender) นำไปแช่ใน Ethyl alcohol 95% เป็นเวลา 1 สัปดาห์ กรองเอาส่วนน้ำแล้วระเหย alcohol ออกจนเกือบแห้ง เติมน้ำกลั่นคนจนละลายเข้ากันดี นำไปสกัดต่อด้วย Ether 3-5

ครั้ง เพื่อกำจัดพวกไขมันและสารเจือปนอื่น ๆ ออก ทิ้งส่วน Ether ไป ส่วนที่เหลือสกัดต่อด้วย n-Butanol ซึ่งอิ่มตัวแล้วด้วยน้ำ ทิ้งส่วนน้ำ นำส่วน n-Butanol ซึ่งเป็นส่วนของ saponin ไประเหยจะได้สารแห้งเป็นเกล็ดสีน้ำตาล ละลายใน Normal saline ในอัตราส่วน 10 mg./ml., 12.5 mg./ml. และ 20 mg./ml. กรองผ่านกระดาษกรองชนิดละเอียด นำส่วนที่กรองได้มาวัด ได้ประมาณ 5.4 - 5.6 แล้วปรับให้ได้ PH ประมาณ 7.0 เก็บสารสกัดใบราตรีไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ทดลองต่อไป

2.2.2 ศึกษาหาฤทธิ์ทั่วไป และทดลองหาขนาดที่ทำให้เกิดพิษหนูตาย 50% (Lethal-Dose 50)

ใช้หนู Mice น้ำหนัก 25-30 กรัม ไม่จำกัดเพศ ส่วนใหญ่เป็นเพศเมีย ฉีดสารสกัดใบราตรีเข้าสองทาง คือ

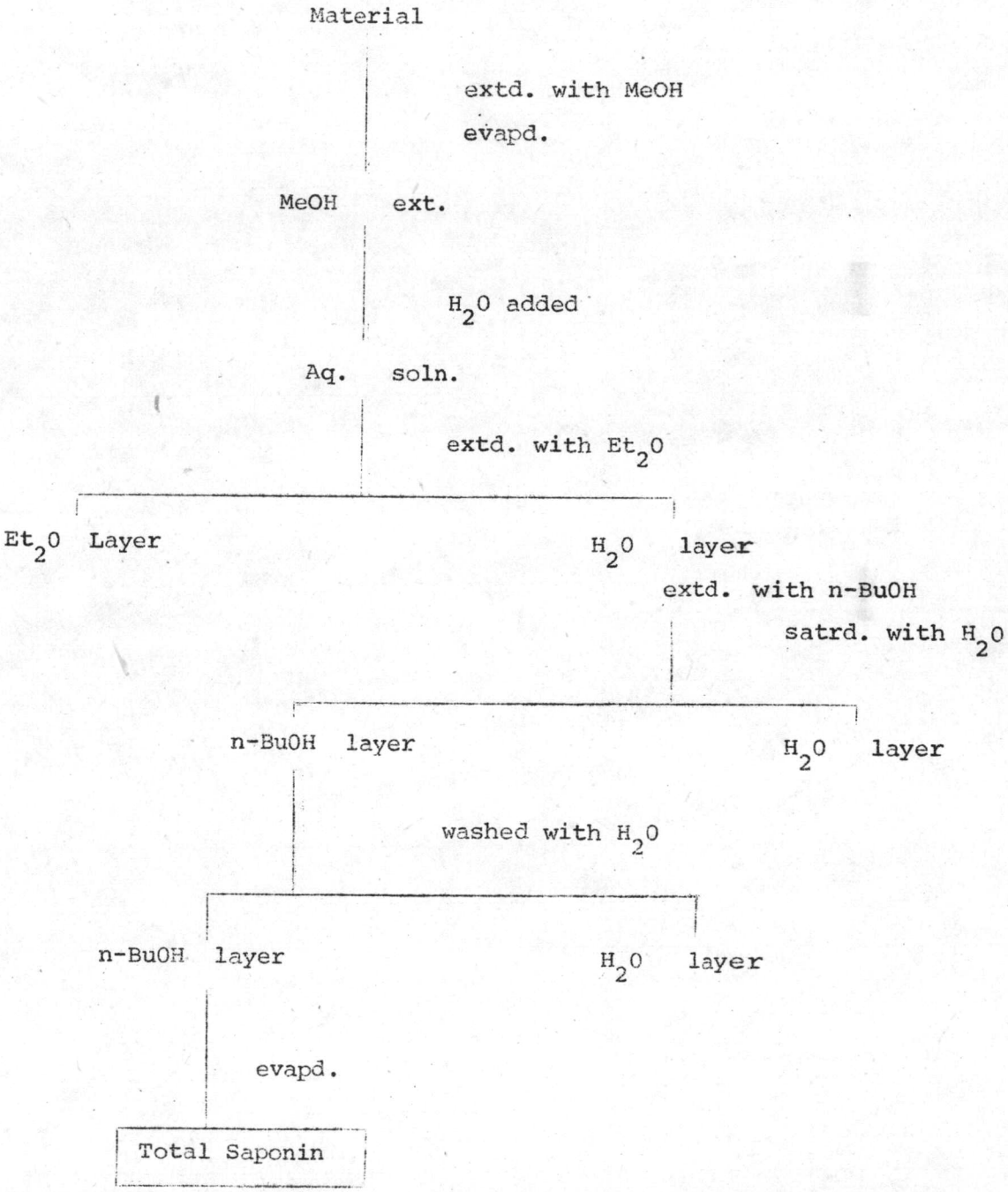
2.2.2.1 ฉีดเข้าทางเส้นโลหิตดำที่ทาง (Intravenous Injection) ใช้หนูกลุ่มละ 10 ตัว ให้สารสกัดใบราตรีขนาด 20,40,60,80 mg./Kg. เข้าในแต่ละกลุ่ม สังเกตอาการเปลี่ยนแปลงภายหลังฉีดจนถึง 72 ชั่วโมง

2.2.2.2 ฉีดเข้าทางหน้าท้อง (Intraperitoneal Injection) ใช้หนูกลุ่มละ 15 ตัว ให้สารสกัดใบราตรีขนาด 100,150,200,250,300, 350,400 mg./Kg. ในแต่ละกลุ่ม สังเกตอาการเปลี่ยนแปลงภายหลังฉีดจนถึง 72 ชั่วโมง

2.2.3 ศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีต่อความดันโลหิต (Systemic Arterial Blood Pressure, อัตราการเต้นของหัวใจ (Heart Rate) การหายใจ (Respiration) รวมทั้งผลทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ ในแมว

ใช้แมวไม่จำกัดเพศ น้ำหนัก 2.5-3.5 Kgs. ทำให้แมวหมดความรู้สึกโดยใช้ Nembutal Sodium 40 mg./Kg. ฉีดเข้าช่องท้อง (Veerasarn, 1967) ภายหลังจากแมวสลบดีแล้วจับนอนหงายยืดคอให้ตรงเพื่อให้ทางเดินหายใจสะดวก ทำการผ่าตัดลงไปบริเวณโคนขาหนีบด้านหน้า แยกเส้นเลือก Femeral artery และ Femeral Vein

แผนภูมิที่ 1 แสดงกรรมวิธีการสกัด Saponin ตามวิธีของ Namba และคณะ (1974)



ให้ชัดเจน ใช้ Polyethylene tube เส้นผ่าศูนย์กลาง .06 นิ้ว ตัดปลายด้านหนึ่งเฉียงและเรียบสอดเข้า Femeral Vein โดยปลายอีกข้างต่อเข้ากับ Three-way stopcock และ syringe บรรจุด้วย Normal saline หลังจากนั้นสอด Polyethylene tube เข้า Femeral artery ซึ่งปลายอีกข้างต่อกับ Three-way stopcock โดยทางหนึ่งต่อกับ syringe บรรจุ Heparin 100 u/ml. Normal saline และปลายอีกข้างหนึ่งต่อกับ Pressure transducer ซึ่งสัญญาณไฟฟ้าจาก Transducer นี้จะผ่านเข้าไปในเครื่องขยาย (Amplifier) และบันทึกออกมาในกระดาษ ส่วนอัตราการเต้นของหัวใจ และการหายใจใช้สัญเกตและนับด้วย Tally counter ทำการทดลองโดยฉีด Normal saline 2 ml. ทางเส้นโลหิตดำก่อนเป็น control แล้วจึงให้สารสกัดใบราตรี ความเข้มข้น 20 mg./ml. ในขนาด 2, 4 8 , 16 mg./Kg. โดยให้แต่ละขนาดเป็นเวลาอย่างน้อย 20 นาที หรือจนกว่าความดันโลหิตคงที่ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต, อัตราการเต้นของหัวใจ, การหายใจ และผลทางเภสัชวิทยาอื่น ๆ

2.2.4 ศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีต่อการหลั่ง Histamine

เตรียมแมวดังวิธีในข้อ 2.2.3 แล้วทำการทดลอง

2.2.4.1 ฉีด Histamine phosphate 5 µg./Kg. (Hoff, 1971) ทางเส้นโลหิตดำ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตที่ลดลง

2.2.4.2 ให้ Antihistamine คือ Diphenhydramine hydrochloride ในขนาด 2 mg./Kg. ทางเส้นโลหิตดำ (Naparatt, 1974) รอประมาณ 3 นาที จึงให้ Histamine phosphate 5 µg./Kg. บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต

2.2.4.3 ให้ Diphenhydramine hydrochloride 2 mg./Kg. ทางเส้นโลหิตดำ รอประมาณ 3 นาที จึงให้สารสกัดใบราตรีขนาด 2 mg./Kg. ทางเส้นโลหิตดำ บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต

2.2.5 ศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีต่อความดันโลหิต ภายหลังจากแมวได้รับ β - adrenergic blocking agent ก่อน

เตรียมแมวดังวิธีในข้อ 2.2.3 แล้วทำการทดลอง

2.2.5.1 ฉีด Isoproterenol 3 μg./Kg. ทางเส้นโลหิตดำ (Hoff, 1971) บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต

2.2.5.2 ให้ Propranolol 0.5 mg./Kg. ทางเส้นโลหิตดำ (Goth, 1972) รอประมาณ 3-5 นาที จึงให้ Isoproterenol 3 μg./Kg. ดูผลการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตนาน 2-3 นาที หรือจนกว่าความดันโลหิตจะคงที่ แล้วจึงให้สารสกัดใบราตรี 2 mg./Kg. ทางเส้นโลหิตดำ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต

2.2.6 ศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีต่อหัวใจเต่าที่แยกออก (Isolated heart)

ทำการทดลองโดยใช้เต่าขนาดโตปานกลาง ทำให้สลบด้วยการทำลายสมองส่วนต่อกับไขสันหลัง เปิดส่วนกระดองเต่าออก เลาะเยื่อหุ้มหัวใจแล้วใช้หลอดแก้วปลายเล็กสอดเข้า Superior vena cava ผูกติดกันให้แน่น ตัดแยกหัวใจออกจากตัวต่อเข้ากับเครื่องมือ Heart perfusion apparatus ที่เตรียมไว้ดังวิธีของ Hoff (1971) ผ่านสารละลาย Ringer เข้าหัวใจในอัตราเร็ว 3-5 ml. /นาที ให้ออกซิเจนผ่านผสมในสารละลาย Ringer ตลอดเวลาใช้ขอเกี่ยว Apex ของหัวใจห้องล่างและอีกขอเกี่ยวกับหัวใจห้องบน แยกกันบันทึกใน Electric Kymograph ให้หัวใจเต้นจนสม่ำเสมอ ประมาณ 15 นาที จึงให้สารสกัดใบราตรีความเข้มข้น 10 mg./ml. ในขนาด 0.05, 0.2, 0.4, 0.8 ml. คิดเป็นความเข้มข้น 0.5, 2, 4, 8 mg. ตามลำดับ ผ่านเข้าทาง Superior vena cava ให้สารสกัดใบราตรีแต่ละขนาดห่างกันอย่างน้อย 10 นาที หรือจนกว่าหัวใจจะเต้นคงที่แล้ว สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแรงบีบของหัวใจ (Amplitude of contraction) อัตราการเต้นของหัวใจ และอาการผิดปกติอื่น ๆ ที่เกิดขึ้น

2.2.7 ศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีต่อหัวใจเต่าที่แยกออกโดยผสมในสารละลาย Ringer

ทำการทดลองโดยเตรียมหัวใจเต่าดังข้อ 2.2.6 แล้วเริ่มทดลอง

2.2.7.1 ผ่านสารละลาย Ringer ชั่วเวลาหนึ่ง รอจนหัวใจเต้นคงที่

2.2.7.2 เปลี่ยน Perfusing fluid เป็นสารละลาย Ringer ซึ่งผสมสารสกัดใบราตรี 0.2 mg./ml. ผ่านเข้าหัวใจในอัตรา 3-5 ml./นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแรงบีบตัวของหัวใจและอัตราการเต้นของหัวใจ ของทั้งหัวใจห้องบนและห้องล่าง สังเกตความแตกต่าง

2.2.8 ศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีต่อหัวใจเต่าห้องล่างที่แยกออกขณะผ่าน Anticholinergic ตลอดเวลา

ทำการทดลองโดยเตรียมหัวใจเต่าดังข้อ 2.2.7 แต่บันทึกส่วนหัวใจห้องล่างอย่างเดียว ผ่านสารละลาย Ringer ในอัตรา 3-5 ml. /นาที รอจนหัวใจเต้นสม่ำเสมอจึงทำการทดลอง

2.2.8.1 ให้สารสกัดใบราตรีความเข้มข้น 10 mg./ml., 0.05 ml. (0.5 mg.) ผ่านเข้าหัวใจ ดูผลการเปลี่ยนแปลง รอจนหัวใจเต้นคงที่

2.2.8.2 ฉีด Acetylcholine ขนาด 0.5, 1, 2 µg. ผ่านเข้าหัวใจห่างกันทุก 5 นาที สังเกตผลการเปลี่ยนแปลง

2.2.8.3 เปลี่ยน Perfusing fluid จากสารละลาย Ringer เป็น Atropine 10^{-7} g. ในสารละลาย Ringer (Roy, 1968) ผ่านหัวใจในอัตราเท่าเดิม รอจนหัวใจเต้นสม่ำเสมอ

2.2.8.4 ฉีด Acetylcholine 0.5, 1, 2 µg. ผ่านเข้าหัวใจ ห่างกันทุก 5 นาที ดูผลการเปลี่ยนแปลง ให้ซ้ำ 2-3 ครั้ง ในขนาดต่าง ๆ เหล่านี้ จน Acetylcholine ไม่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลง

2.2.8.5 ฉีดสารสกัดใบราตรี 0.05 ml. (0.5 mg.) ผ่านเข้าหัวใจ สังเกตการเปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับเมื่อให้ครั้งแรกในข้อ 2.2.8.1 ในเรื่องของแรงบีบตัวของหัวใจและการเต้นของหัวใจ

2.2.9 ศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีต่อหัวใจหนูตะเภาที่แยกออก (Isolated heart)

ใช้หนูตะเภาไม่จำกัดเพศ น้ำหนัก 250-400 กรัม ทำให้หมดความรู้สึก โดยการตีบริเวณรอยต่อระหว่างสมองกับไขสันหลัง แล้วตัดส่วนคอให้เลือดไหลออก ทำการผ่าตัดลงไปบริเวณหน้าอกของหนูตะเภาเพื่อนำเอาหัวใจออกจากตัวอย่างรวดเร็ว โดยติด Aorta ยาว นำหัวใจใส่ขวดกระเบื้องซึ่งบรรจุสารละลาย Ringer Locke โดยมี Pure oxygen ผ่านอยู่ตลอด บีบเลือดออกจากหัวใจและตัดเลาะส่วนที่ไม่ต้องการออก นำส่วน Aorta ผูกเข้ากับปลาย glass cannular ของเครื่องมือซึ่ง Apply ตามวิธีของ Langendorff (1895) และ Gunn (1913) ผ่านสารละลาย Ringer Locke เข้าหัวใจในความดันที่สม่ำเสมอ ควบคุมอุณหภูมิของสารละลายที่ 37° C ความดันจากสารละลาย Ringer Locke จะปิด Aortic valve สารละลาย Ringer Locke จะเข้าในเส้นเลือด Coronary และออกทาง Inferior vena cava ให้ Pure oxygen ผ่านสารละลาย Ringer Locke ตลอด ใช้ขอเกี่ยว Apex ของหัวใจห้องล่าง บันทึกการเต้นของหัวใจลงใน Electric Kymograph รอจนหัวใจเต้นสม่ำเสมอจึงเริ่มทำทดลอง

2.2.9.1 ฉีดสารสกัดใบราตรีความเข้มข้น 10 mg./ml. ขนาด 0.1 mg., 0.25 mg. เข้าหัวใจ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น การให้สารสกัดใบราตรี แต่ละขนาดต้องรอจนหัวใจกลับเต้นสม่ำเสมอก่อน

2.2.9.2 ให้สารสกัดใบราตรีขนาด 0.5 mg. ผ่านเข้าหัวใจหนูตะเภาตัวใหม่ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแรงบีบตัวของหัวใจห้องล่าง

2.2.10 ศึกษาผลของ Adrenalin ต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบราตรีต่อหัวใจหนูตะเภา

2.2.10.1 ศึกษาผลของ Adrenalin ต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบราตรีขนาด 0.1 mg. ต่อหัวใจหนูตะเภา โดยเตรียมหัวใจหนูตะเภาดังข้อ 2.2.9

2.2.10.1.1 ฉีด Adrenalin 0.2 μg. ผ่านหัวใจ สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น รอจนหัวใจเต้นสม่ำเสมอ

2.2.10.1.2 ฉีดสารสกัดใบราตรีขนาด 0.1 mg. ผ่านหัวใจ ดูผลการเปลี่ยนแปลงระยะหนึ่งจึงให้ Adrenalin 0.2 µg. ผ่านหัวใจบันทึกสิ่งที่เกิดขึ้น

2.2.10.2 ศึกษาผลของ Adrenalin ต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบราตรี 0.25 mg. ต่อหัวใจหนูตะเภา ดำเนินวิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.2.10.1

2.2.11 ศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีต่อกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนของเต่าที่แยกออกใน organ - tissue bath

ทำการทดลองโดยเตรียมหัวใจห้องบนทั้งสองข้างของเต่าตามวิธีของ Perry (1970) โดยทำให้เต่าหมดความรู้สึกด้วยการทำลายส่วนต่อสมองกับไขสันหลัง เปิดกระดองเต่าออก แล้วเลาะเยื่อหุ้มหัวใจออก ใช้ด้ายผูกสองข้างของหัวใจห้องบนแต่ละข้างแล้วตัดหัวใจออกจากตัวแช่ในสารละลาย Ringer ซึ่งมีออกซิเจนผ่านตลอด แยกส่วนที่เป็นหัวใจล่างออกเหลือแต่หัวใจห้องบนกับ Sinus venosus นำไปแขวนใน chamber ของเครื่องมือ Isolated Organ - tissue bath โดยไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิ ใน chamber มีสารละลาย Ringer ซึ่งมีออกซิเจนผ่านตลอด chamber บรรจุน้ำได้ 50 ml. ปลายข้างหนึ่งของหัวใจห้องบนผูกติดกับขอแก้วใน chamber ส่วนปลายอีกข้างผูกเข้ากับ Harvard apparatus isometric Force Transducer จากนั้นต่อเข้ากับ Harvard apparatus recorder เพื่อบันทึกการทำงานของหัวใจ รอจนหัวใจเต้นคงที่จึงเริ่มทดลอง โดยหยดสารสกัดใบราตรีความเข้มข้น 12.5 mg./ml. ขนาด 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 และ 1.0 ml. ลงใน chamber ซึ่งมีสารละลาย Ringer บรรจุอยู่ 50 ml. คิดเป็นความเข้มข้นของสารสกัดใบราตรี 2.5×10^{-2}, 5×10^{-2}, 10×10^{-2}, 12.5×10^{-2}, 25×10^{-2} mg./ml. ของสารละลาย Ringer เมื่อให้แต่ละขนาดของสารสกัดใบราตรี ดูการเปลี่ยนแปลงนาน 10-15 นาที จึงเปลี่ยนสารละลาย Ringer เก่าออก รอให้หัวใจเต้นสม่ำเสมอในสารละลายใหม่จึงให้สารสกัดในขนาดต่อไป สังเกตการเปลี่ยนแปลงของอัตราการเต้นของหัวใจ การบีบตัวของหัวใจ และอาการผิดปกติอื่น ๆ

2.2.12 ศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีต่อกล้ามเนื้อหัวใจห้องบนของหนูตะเภาที่แยกออกใน Organ - tissue bath

004387

ทำการทดลองโดยเตรียมหัวใจห้องบนทั้งสองข้างตามวิธีของ Perry (1970) โดยทำให้หนูตะเภาหมดความรู้สึกด้วยการตีบริเวณรอยต่อระหว่างสมองกับไขสันหลัง ตัดส่วนคอให้เลือดไหลออก ทำการผ่าลงไปบริเวณหน้าอกของหนูตะเภาเพื่อนำเอาหัวใจออกจากตัว แยกส่วนที่เป็นหัวใจห้องล่างออกเหลือแต่หัวใจห้องบน ทั้งหมดนี้หัวใจต้องแช่ในสารละลาย Ringer Locke ซึ่งมีออกซิเจนผ่านตลอด ใช้ด้ายผูกสองข้างของหัวใจ นำไปแขวนใน chamber ของเครื่อง Isolated Organ - tissue bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 30-32° C ใน chamber บรรจุสารละลาย Ringer Locke 50 ml. มีออกซิเจนผ่านตลอด ปลายข้างหนึ่งของหัวใจผูกติดกับขอแก้วใน chamber ส่วนปลายอีกข้างผูกเข้ากับ Harvard apparatus isometric Force Transducer จากนี้ต่อเข้ากับ Harvard apparatus recorder เพื่อบันทึกการทำงานของหัวใจ ปล่อยให้หัวใจเต้นสม่ำเสมอ จึงเริ่มทำการทดลองโดยหยดสารสกัดใบราตรีความเข้มข้น 10 mg./ml. ขนาด 0.05, 0.2, 0.4, 0.8 ml. ลงใน chamber ซึ่งมีสารละลาย Ringer Locke บรรจุอยู่ 50 ml. คิดเป็นความเข้มข้นของสารสกัดใบราตรี 1×10^{-2}, 4×10^{-2}, 8×10^{-2}, 16×10^{-2} mg./ml. ของสารละลาย Ringer Locke ให้แต่ละขนาดของสารสกัดแล้ว สังเกตการเปลี่ยนแปลง จนคงที่จึงให้ขนาดต่อไปโดยไม่ต้องล้างออก เป็นการดูผลของ Accumulative doses สังเกตการเปลี่ยนแปลงของการบีบตัวของหัวใจ, อัตราการเต้นของหัวใจและอาการผิดปกติอื่น ๆ ที่เกิดขึ้น

2.2.13 ศึกษาผลของสารสกัดใบราตรีต่อการบีบตัวของลำไส้เล็กในตัว (Intestinal - Motility in Vivo) ของหนูถีบจักร

ทำการทดลองตามวิธีของ Macht (1931) ใช้หนูถีบจักรไม่จำกัดเพศ, น้ำหนัก 20-25 กรัม งดอาหารโดยให้น้ำอย่างเดียวอย่างน้อย 8 ชั่วโมง ก่อนการทดลอง แบ่งหนูเป็นกลุ่ม ๆ โดยจัดหนูที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกันอยู่กลุ่มเดียวกัน ทำ control ด้วย Normal saline 0.2 ml. และ Morphine 20 mg./Kg. อีกกลุ่มหนึ่ง ให้สกัดใบราตรีในขนาด 40, 80, 160 mg./Kg. ในแต่ละกลุ่มฉีดเข้าทางหน้าท้องทิ้งไว้

I 17166597

นาน 20 นาที เวลาฉีดต้องทำอย่างรวดเร็ว เวลาในการฉีดทั้งกลุ่มไม่ควรเกิน 5 นาที เมื่อครบ 20 นาที แล้วให้ charcoal ซึ่งผสมด้วย Purified animal charcoal 12 gm., tragacanth 2 gm. และน้ำ 130 ml. ให้ charcoal ผสม 0.2 ml. ต่อน้ำหนักหนู 20 gm. ให้ทางปาก โดยให้อย่างรวดเร็ว ภายหลัง 10 นาที แล้ว ฆ่าหนูโดยการหักคอส่วนรอยต่อของสมองกับไขสันหลัง และผ่าหน้าท้องหนูแยกส่วนกระเพาะอาหารกับลำไส้ออก ตัดส่วน Intestine ตั้งแต่ Pylorus ถึง Caecum ยืดออก วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของ Standard charcoal คิดเป็นเปอร์เซนต์ของที่ผ่านกับลำไส้ทั้งหมด เปรียบเทียบกับ control ที่ให้ Normal saline, Morphine.