

บทที่ 2

อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง, สมุนไพร, เครื่องมือ, วัสดุและสารเคมี
 - 1.1 สัตว์ทดลอง กระจายเพศผู้ลูกผสมพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ จากภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย น้ำหนัก 2.7-3.5 กก. เลี้ยงในกรงกระจายทรงละตัว อยู่ในที่มีสภาวะแวดล้อมที่ดี และได้รับการดูแลรักษาความสะอาดอย่างสม่ำเสมอ อาหารสำเร็จรูปจากบริษัท เอฟ อี ซีรีค และน้ำประปา
 - 1.2 สมุนไพร รากหญ้าคาจากร้านขายยาสมุนไพรไทย (เจ้ากรมเปือ) โดยเก็บไว้เป็นกระสอบเพื่อป้องกันภาวะการแตกต่ากันของสรรพคุณรากหญ้าคา จากแหล่งสถานที่ และฤดูกาลของการเก็บ
 - 1.3 เครื่องมือ
 - เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectronic 710) ของ Bausch & Lomb
 - เครื่องเหวี่ยง (centrifuge) ของ Hettich EBA III
 - ไมโครปิเปตต์ (socorex)
 - เครื่องวัดความเป็นกรดค่า (Schott Geratte)
 - เครื่องทำความร้อน (Heater)
 - 1.4 วัสดุ
 - เข็มฉีดยา เบอร์ 21 × 1"
 - กระบอกฉีดยา ขนาด 5 มล.
 - หลอดพลาสติกสำหรับเครื่องเหวี่ยง (centrifuge tube)
 - หลอดแก้วของ pyrex ขนาด 16×150 มม.
 - กล้องยี่ดัวกระจาย
 - ไม้จางปาก
 - สายท่อนำอาหาร (Nasogastric tube)
 - 1.5 สารเคมี
 - น้ยาออร์โท-โทลูอีน ในกรคอเซติกพร้อมน้ำยาเกลือโคสมัตราฐาน 100, 200,

- 300 และ 400 มก.% (บริษัทไบโอเทคนิคัลจำกัด)
- แอลกอฮอล์ (โรงงานสุราอยุธยา กรมสรรพสามิต)
 - โซลีน (Baker chemical Co.)
 - กลีเซอรีน (บริษัทวิทยาสตรม จำกัด)
 - กรดคาร์บอริก (บริษัทวิทยาสตรม จำกัด)
 - โซเดียมฟลูออไรด์ (May + Baker TTD Dagenham England)
 - โบแตสเซียม อ็อกซาเลท (Merck)
 - คลอร์โปรพาไมด์ 250 มก. (องค์การเภสัชกรรม)
 - คี-กลูโคส (Merck)
 - 50% เคกโตส สำหรับฉีด (องค์การเภสัชกรรม)
 - อินซูลิน ยู-80 (Marca Registrada Mexico)
 - น้ำเกลือ 0.9% (general hospital products Co., Ltd.)
 - แอลล๊อกแซน โมโนไฮเดรต (sigma chemical company)
 - กรดไฮโดรคลอริก (Merck)

2. การเตรียม

2.1 การเตรียมน้ำยารากหญ้าคา

นำรากหญ้าคามาซึ่งน้ำหนักตามจำนวนที่ต้องการ ใส่ในน้ำ 12 เท่า ของจำนวนน้ำหนักของรากหญ้าคา นำไปต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เหนี่ยายาที่ได้พักไว้ กากที่เหลือใส่น้ำอีก 10 เท่า ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำน้ำยาสกัดครั้งที่ 1 และ 2 มารวมกัน ตั้งที่ไฟอ่อน ๆ ขนาดอุณหภูมิ 75°C . จนเหลือน้ำยารากหญ้าคาที่ความเข้มข้น 1:1 (รากหญ้าคา 1 กรัมได้น้ำยารากหญ้าคา 1 มล.) และที่ความเข้มข้น 2:1 (รากหญ้าคา 2 กรัมได้น้ำยารากหญ้าคา 1 มล.)

2.2 การให้น้ำยาแก่สัตว์ทดลอง

นำกระต่ายที่อดอาหารแลเป็นเวลา 18 ชั่วโมง มาใส่ในกล่องยัดคั่วกระต่าย เพื่อป้องกันมิให้กระต่ายตื่น ใช้ไม้จางปากกระต่ายไว้ แล้วสอดสายท่อนำอาหารผ่านไม้จางปากที่เจาะรูไว้ ผ่านจากปากลงสู่กระเพาะอาหารของกระต่าย ทำการทดสอบว่าสายท่อนำอาหารผ่านลงสู่กระเพาะอาหารแล้ว โดยใช้ปลายของสายท่อนำอาหาร ที่อยู่ภายนอกงุ่มลงไปในน้ำ ถ้าเกิดฟอง

ขณะที่กระต่ายหายใจ แสดงว่าสายท่อนำอาหารผ่านลงสู่ปอด ต้องดึงสายท่อนำอาหารออกแล้ว สอดใหม่ ถ้าไม่มีฟองและกระต่ายหายใจได้คล่อง แสดงว่าสายท่อนำอาหารผ่านลงสู่กระเพาะอาหารแล้ว จากนั้นให้น้ำยาผ่านทางสายท่อนำอาหาร ตามปริมาณที่ต้องการ

2.3 การเตรียมสัตว์ทดลองให้เป็นเบาหวาน

1. งดอาหารก่อนการทดลองเป็นเวลา 18 ชม.
2. เจาะเลือดจำนวน 1 มล. จากหลอดเลือดดำริมใบหูด้านนอกเพื่อนำไปวัดค่าระดับน้ำตาลในเลือดก่อนที่จะได้รับยา โดยวิธีออร์โท-โทลูอิดีน (วิบูล วิรานุวัตต์ และกนกนาถ ชูปัญญา, 2524)
3. ฉีดน้ำยา 5% แอลกอฮอล์แซน โมโนไฮเดรตในน้ำเกลือ พี เอช 4.5 ขนาด 80-100 มก./กก. เข้าเส้นเลือดดำริมใบหูด้านนอก ใช้เวลาฉีดโดยเฉลี่ย 15 นาที/ตัว
4. การให้น้ำตาลหลังจากฉีดแอลกอฮอล์แซน
 - ให้น้ำยา คี-กลูโคส 50% จำนวน 50 มล. โดยให้หลังจากฉีดแอลกอฮอล์แซนแล้วภายใน 1-3 ชม. ทางสายท่อนำอาหาร
 - ภายหลังฉีดแอลกอฮอล์แซน 6-10 ชม. ถ้ากระต่ายมีอาการซึมอ่อนเพลีย ให้ฉีด 50% กลูโคส 10 มล. ทางหลอดเลือดดำ
5. การตรวจระดับน้ำตาลในเลือด เจาะเลือดตรวจหาระดับน้ำตาลในวันที่ 3 และวันที่ 5 หลังจากฉีดแอลกอฮอล์แซน และต่อไปอีกสัปดาห์ละ 2 ครั้ง จนกว่าระดับน้ำตาลในเลือดจะสูงถึง โดยที่ระดับน้ำตาลในเลือดต้องสูงเกิน 150 มก.% จึงจะถือว่าเป็นเบาหวานแล้วจึงนำมาใช้ในการทดลอง (มาลินี พงษ์มารุทัย และขวัญฤดี เคชาติวงศ์ ณ ออยุธยา, 2524)
6. ถ้ายังไม่เกิดเบาหวานหลังจากการฉีดแอลกอฮอล์แซนครั้งแรกให้ฉีดยาซ้ำด้วยขนาดเดิมอีกเป็นครั้งที่ 2 โดยแต่ละครั้งห่างกันประมาณ 5-7 วัน

3. การเก็บพลาสมาและการวัดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลอง

3.1 การเก็บพลาสมาของสัตว์ทดลอง

1. เจาะเลือดจำนวน 1 มล. จากหลอดเลือดดำริมใบหูด้านนอก และหลอดเลือดค้ำกลางหูของกระต่ายที่อดอาหารเป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยใช้ไซเคียมฟลูออไรด์ : โบแตสซีเอ็มอีอกซาเลท (1:3) เป็นตัวป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยการใช้ฟลูออไรด์ มีจุดมุ่งหมาย 2 อย่างคือ เพื่อยับยั้งการแข็งตัว

ของเลือด โดยการตกตะกอนกับแคลเซียม และยับยั้งการสลาย ของน้ำตาลในเม็ดเลือดแดง และพบว่าโซเดียมฟลูออไรด์ เป็นสารกันเลือดแข็งที่เหมาะสมที่สุดในการทดสอบหาระดับน้ำตาลในเลือด แต่การใช้ โซเดียมฟลูออไรด์อย่างเดียวยังต้องใช้จำนวนมากโดยใช้ 6-10 มก. ต่อเลือด 1 มล. ซึ่งจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและเกิดการเคลื่อนที่ของน้ำในเม็ดเลือดแดงออกมาได้ จึงมักนิยมใช้ควบคู่กับโปแตสเซียม ออกซาเลท (อัมพวัน ปวโร, 1984)

2. นำเลือดที่เจาะได้แล้วไปทำการแยกพลาสมาออกมาโดยนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ 3,000 rpm นาน 5 นาที แล้วใช้ไมโครปิเปตต์ดูดเอาพลาสมา .05 มล. ใส่ในหลอดแก้วทดลองที่ติดหมายเลขของตัวสัตว์ และชั่ว โมงที่เจาะไว้แล้ว

3.2 การวัดระดับน้ำตาลในเลือด

หลักการ กลูโคสในพลาสมาจะทำปฏิกิริยากับน้ำยาออร์โท-โทลูอิดีนในกรคอเซตึกขณะร้อนจะเกิดสีน้ำเงินปนเขียว มีความเข้มของ ระดับสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของกลูโคส ช่วงคลื่นแสงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการดูดกลืนแสงของสีน้ำเงินปนเขียว คือที่คลื่นแสง 625 นาโนเมตร (อัมพวัน ปวโร และวารุณี เกียรติศิริกุล, 2527)

การวิเคราะห์และอ่านค่า

1. เติมน้ำยาออร์โท-โทลูอิดีนลงในหลอดแก้วทดลองที่ใส่พลาสมาไว้หลอดละ 3 มล.
2. เขย่าผสมกันดีมน้ำเดือด 100°C เป็นเวลา 10 นาที
3. ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็นอีก 4 นาที
4. นำไปเข้าเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่คลื่นแสง 625 นาโนเมตร
5. อ่านค่าระดับน้ำตาลในเลือดที่ได้ในแต่ละหลอด โดยปรับค่ากับน้ำยากลูโคสมาตรฐานก่อนอ่านค่าทุกครั้ง
6. สีที่เกิดขึ้นจะคงอยู่ได้นานประมาณ 30-45 นาที

4. วิธีดำเนินการวิจัย

1. การทดลองกระทำในภาวะปกติ

- 1.1 ทดลองฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของน้ำยารากหญ้าคาในกระต่ายภาวะปกติ

40 ตัว โดยมี

กลุ่มควบคุมด้วยน้ำกลั่น จำนวน 8 ตัว

กลุ่มที่รับยาลดน้ำตาลในเลือดคลอร์โปรพาไมด์ 50 มก./กก. จำนวน 8 ตัว

กลุ่มที่ได้รับนํ้ายารากหญ้าคา ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ ตามปริมาณนํ้ายารากหญ้าคาที่ได้รับ

- กลุ่มที่ได้รับนํ้ายารากหญ้าคา 5 ก./กก. จำนวน 8 ตัว ใช้นํ้ายารากหญ้าคาความเข้มข้น 1:1 แล้วเติมนํ้ากลั่นจนครบ 50 มล.
- กลุ่มที่ได้รับนํ้ายารากหญ้าคา 10 ก./กก. จำนวน 8 ตัว ใช้นํ้ายารากหญ้าคาความเข้มข้น 1:1 แล้วเติมนํ้ากลั่นจนครบ 50 มล.
- กลุ่มที่ได้รับนํ้ายารากหญ้าคา 15 ก./กก. จำนวน 8 ตัว ใช้นํ้ายารากหญ้าคาความเข้มข้น 2:1 แล้วเติมนํ้ากลั่นจนครบ 50 มล.

โดยทุกกลุ่มจะได้รับปริมาณนํ้ายาครั้งละ 50 มล. ในการทดลองแต่ละครั้งทางสายท่อนํ้าอาหาร และกลุ่มที่ได้รับนํ้ายารากหญ้าคาจะได้รับการทดลองเป็นขั้นตอนดังนี้ คือ

- ให้นํ้ายารากหญ้าคาครั้งเดียวต่อวัน
- ให้นํ้ายารากหญ้าคาสองครั้งโดยห่างกัน 2 ชั่วโมง ต่อวัน
- ให้นํ้ายารากหญ้าคาติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน, 7 วัน และ 10 วัน โดยให้วันละครั้ง การทดลองในแต่ละครั้งจะเว้นช่วงระยะห่างกันเป็นเวลาอย่างน้อย 4 วัน และจะเจาะเลือดหาระดับนํ้าตาลในเลือดก่อนให้นํ้ายารากหญ้าคาทุกครั้ง

- เปรียบเทียบผลของการลดระดับนํ้าตาลในเลือดของกระต่ายภาวะปกติที่ได้รับนํ้ายารากหญ้าคา กับกระต่ายภาวะปกติที่ได้รับนํ้ากลั่น และที่ได้รับยาลดระดับนํ้าตาลในเลือดคลอร์โปรพาไมด์ 50 มก./กก.

2. การทดลองกระต่ายในภาวะเบาหวาน

2.1 เตรียมกระต่ายให้เป็นเบาหวานโดยให้แอลลือกแซนขนาด 80-100 มก./กก. (ถวัลย์ จรคล และคนอื่น ๆ , 2515)

- 2.2 นำกระต่ายที่เป็นเบาหวานแล้วจำนวน 30 ตัว มาทดลอง โดยมีกลุ่มควบคุมด้วยนํ้ากลั่น จำนวน 6 ตัว
- กลุ่มที่ได้รับยาลดนํ้าตาลในเลือด คลอร์โปรพาไมด์ 250 มก./กก.

จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ได้รับนํ้ายารากหญ้าคา ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ ตามปริมาณนํ้ายารากหญ้าคาที่ได้รับ

- กลุ่มที่ได้รับน้ำยารากหญ้าคา 5 ก./กก. จำนวน 6 ตัว ใช้น้ำยารากหญ้าคา ความเข้มข้น 1:1 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 50 มล.
- กลุ่มที่ได้รับน้ำยารากหญ้าคา 10 ก./กก. จำนวน 6 ตัว ใช้น้ำยารากหญ้าคา ความเข้มข้น 1:1 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 50 มล.
- กลุ่มที่ได้รับน้ำยารากหญ้าคา 15 ก./กก. จำนวน 6 ตัว ใช้น้ำยารากหญ้าคา ความเข้มข้น 2:1 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 50 มล.

โดยทุกกลุ่มจะได้รับปริมาณน้ำยาครั้งละ 50 มล. ในการทดลองแต่ละครั้งทางสาย ท่อนำอาหาร และกลุ่มที่ได้รับน้ำยารากหญ้าคาจะได้รับการทดลองเป็นขั้นตอนดังนี้ คือ

- ให้น้ำยารากหญ้าคาครั้งเดียวต่อวัน
- ให้น้ำยารากหญ้าคาติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน, 7 วัน และ 10 วัน โดยให้วันละครั้ง การทดลองในแต่ละครั้งจะเว้นช่วงระยะห่างกันเป็นเวลาอย่างน้อย 4 วัน และจะเจาะ เลือดหาระดับน้ำตาลในเลือดก่อนให้น้ำยารากหญ้าคาทุกครั้ง

เปรียบเทียบผลของการลดระดับน้ำตาลในเลือดที่ได้ดังกล่าวกับกระดาษภาวะเบาหวาน ที่ได้รับน้ำกลั่นและ ฆ่าลดระดับน้ำตาลในเลือด คลอร์โปรปาไมด์ 250 มก./กก.

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่าระดับน้ำตาลในเลือดที่วัดได้ของ แต่ละกลุ่ม มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm S.E.$)

เปรียบเทียบความแตกต่าง ระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาคลอร์โปรปาไมด์ โดยใช้ Student's unpaired t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง ชั่วโมงหลังจากได้รับยาแล้วในกลุ่มเดียวกัน โดยใช้ student's paired t-test ซึ่งจะพิจารณา ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%