บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีทำการวิจัย

1. วัสดุ สัตว์ทดลอง และเครื่องมือ

1.1 สาร Ancistrotectorine

ได้รับจากภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 สารเคมี

absolute ethanol จากบริษัท Merck

acetycholine chloride, histamine, 5-hydroxytryptamine, barium chloride จากบริษัท Sigma ประเทศอังกฤษ

oxytocin ของบริษัท Sandoz ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ภายใต้ชื่อการค้า Syntocinon

estradiol benzoate ของบริษัท Shering ประเทศเยอรมันนี ภายใต้ชื่อการค้า Progynon

สารเคมีที่จำเป็นในการเตรียมสารละลาย Tyrode และ De Jalon ซึ่งใช้ในการทดลองผลของ ancistrotectorine ต่อเนื้อเยื่อที่แยกออกจากร่างกายสัตว์ทดลอง (NaCl, KCl, $MgSO_4.7H_2O$, $NaH_2PO_4.H_2O$, glucose, $NaHCO_3$, $CaCl_2.2H_2O$)

gas (95% O_2 + 5% CO_2) จาก TIG

1.3 สัตว์ทดลอง

กระต่าย (rabbit), หนูตะเภา (guinea-pig) จากฟาร์มผู้เลี้ยง

หนูขาว (rat) และหนูถีบจักร (mice) จากโครงการศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

1.4 เครื่องมือ

Complete isolated organ bath ของบริษัท C.P. Palmer ประเทศอังกฤษ

Isotonic transducer, pressure transducer และ recorder apparatus ของบริษัท Bioscience Model Washington 400 MD 2 C ประเทศอังกฤษ

2. วิธีทำการวิจัย

2.1 การเตรียมสารละลายของ Ancistrotectorine

ชั่ง ancistrotectorine 50 มก. ละลายใน absolute ethanol แล้วปรับปริมาตรจนครบ 5 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10 มก. ต่อ มล. ใส่ขวดปิดฝาสนิท เก็บในตู้เย็น

2.2 ศึกษาผลเบื้องต้นต่อการหดเกร็งของลำไส้กระต่ายที่แยกออกจากสัตว์ทดลองทั้งในสภาพปกติและเมื่อใช้สารต่าง ๆ (acetylcholine, barium chloride, carbachol, histamine, potassium chloride และ calcium chloride) กระตุ้นให้ลำไส้หดเกร็ง

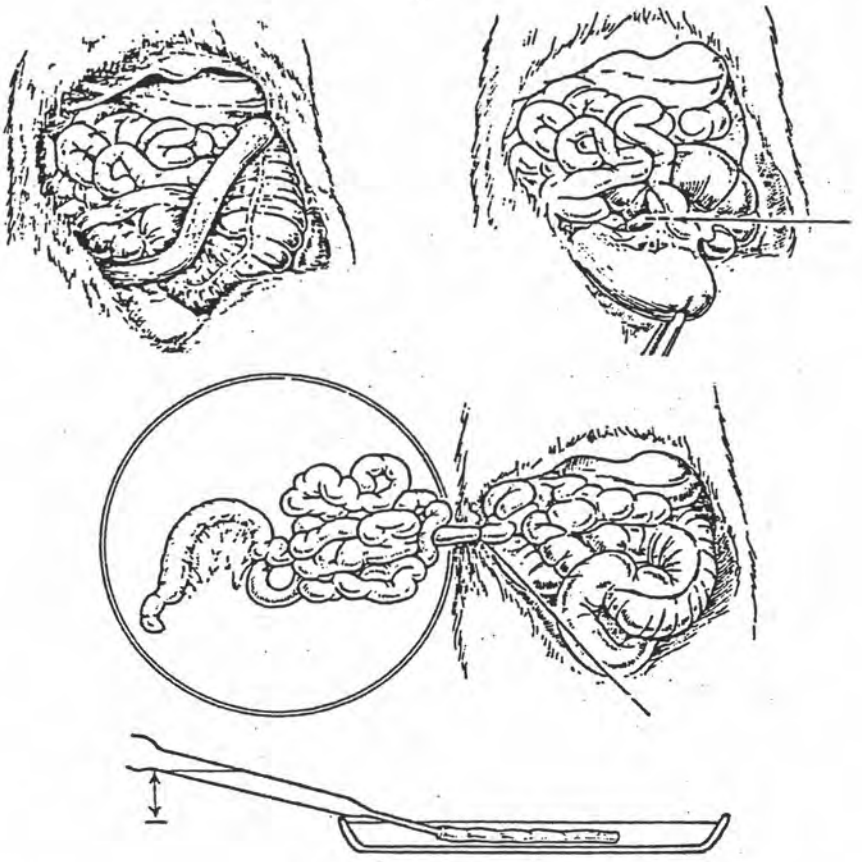
ใช้กระต่ายสีขาว มีน้ำหนักประมาณ 2-3 กก. ให้กระต่ายอดอาหารตลอดคืนก่อนทำการทดลอง ให้แต่น้ำเพียงอย่างเดียว

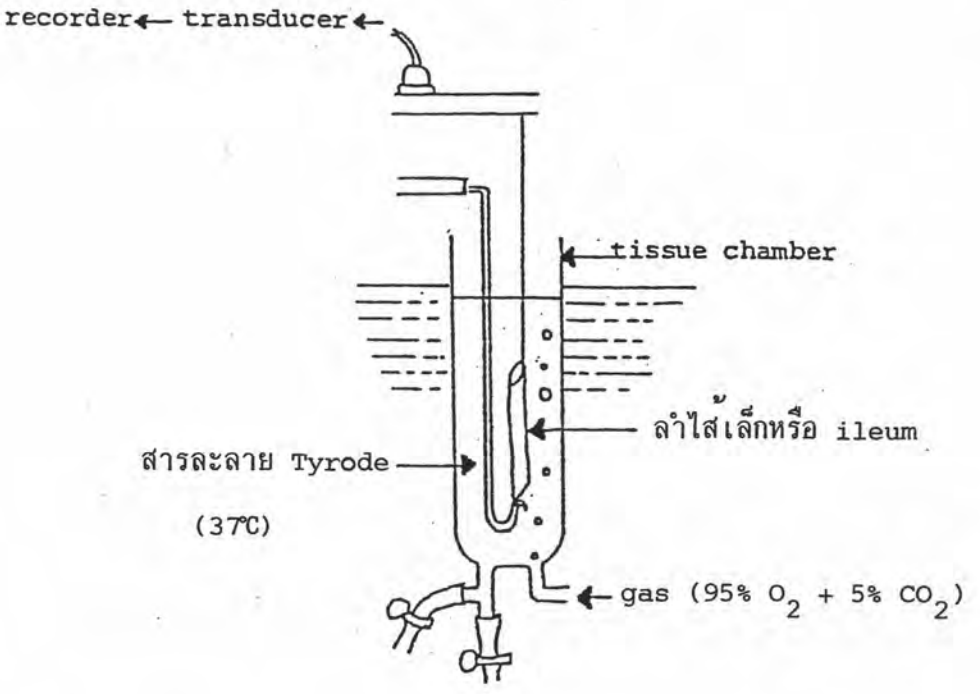
การเตรียมลำไส้กระต่ายทำโดย นำกระต่ายมาฆ่าโดยการตีที่บริเวณรอยต่อหัวและก้านคอ ตัดเอาลำไส้เล็กส่วน jejunum แล้วนำมาใส่ใน petri dish ซึ่งบรรจุสารละลาย Tyrode (ส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 1) และมี gas (95% O_2 + 5% CO_2) ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ติดกับลำไส้ทิ้งไป แล้วตัดลำไส้ให้ได้ความยาวชิ้นละ 1-2 ซม. ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้างโดยปล่อยให้ปลายเปิด ใช้ปลายด้ายด้านหนึ่งผูกติดกับขอเหล็กขนาดเล็ก จุ่มขอเหล็กลงในหลอดแก้วขนาด 25 มล. ซึ่งบรรจุสารละลาย Tyrode และมี gas (95% O_2 + 5% CO_2) ผ่านตลอดเวลา ให้ลำไส้อยู่บริเวณส่วนล่างของหลอดแก้ว หลอดแก้วนี้อยู่ใน isolated organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส ปลายด้ายด้านที่เหลือผูกติดกับ isotonic transducerซึ่งต่อเข้ากับ recorder (รูปที่ 5)(29)

ศึกษาฤทธิ์ลดการหดเกร็งของลำไส้เล็กของกระต่าย (antispasmodic effect) ของ ancistrotectorine ทำการทดลองดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของสารละลาย Tyrode

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
NaCl	8.0
KCl	0.2
$MgCl_2$	0.1
$CaCl_2$	0.2
NaH_2PO_4	0.05
$NaHCO_3$	1.0
Glucose	1.0
Aerating gas 95% O_2 + 5% CO_2	





รูปที่ 5 แสดงการเตรียมลำไส้เล็กของกระต่ายหรือ ileum ของหนูตะเภาที่แยกออกจากสัตว์ทดลอง

หลังจากเตรียมลำไส้ตามวิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว ปล่อยให้ลำไส้แช่อยู่ในสารละลาย Tyrode เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วจึงเริ่มการทดลองโดยบันทึกการหดเกร็งของลำไส้ในสภาพปกติ (spontaneous contraction) หลังจากนั้นใส่สารละลาย ancistrotectorine ในขนาดต่าง ๆ กันลงในลำไส้ บันทึกการหดเกร็งของลำไส้ตลอดเวลาเปรียบเทียบการหดเกร็งของลำไส้ก่อนและหลังจากได้รับสารละลาย ancistrotectorine ในการศึกษาฤทธิ์ของ ancistrotectorine ต่อ spontaneous contraction ของลำไส้กระต่ายนี้ ใช้สารละลาย ancistrotectorine ในขนาดความเข้มข้น 4×10^{-3}, 8×10^{-3} และ 12×10^{-3} มก. ต่อ มล. เปรียบเทียบฤทธิ์ของ ancistrotectorine ในขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ กันที่มีต่อลำไส้

ศึกษาผลของ Ancistrotectorine ต่อการหดเกร็งของลำไส้กระต่ายที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารชนิดต่าง ๆ

เตรียมลำไส้เล็กของกระต่ายตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว หลังจากปล่อยให้ลำไส้บิดตัวอยู่ในสารละลาย Tyrode ประมาณ 30 นาที จึงเริ่มทำการศึกษาผลของ ancistrotectorine ต่อการหดเกร็งของลำไส้กระต่ายที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารชนิดต่าง ๆ ได้แก่ acetylcholine, barium chloride, carbachol, histamine, potassium chloride และ calcium chloride โดยทำการทดลองดังต่อไปนี้

ศึกษาผลของ ancistrotectorine ต่อการหดเกร็งของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine โดยใส่สารละลาย acetylcholine ขนาดความเข้มข้น 0.01 มคก. ต่อ มล. ลงในลำไส้ บันทึกการหดเกร็งของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย acetylcholine แล้วใส่สารละลาย ancistrotectorine ในขนาดความเข้มข้น 8×10^{-3} มก. ต่อ มล. บันทึกการหดเกร็งของลำไส้อีกครั้ง เปรียบเทียบการหดเกร็งของลำไส้ก่อนและหลังจากที่ได้รับสารละลาย ancistrotectorine

การทดลองผลของ ancistrotectorine ต่อการหดเกร็งของลำไส้ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย barium chloride (ขนาดความเข้มข้น 6×10^{-2} มก. ต่อ มล.), carbachol (ขนาดความเข้มข้น 2.8×10^{-2} มก. ต่อ มล.) และ histamine (ขนาดความเข้มข้น 2×10^{-4} มก. ต่อ มล.) นั้น ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองผลของ ancistrotectorine ต่อการหดเกร็งของลำไส้ที่เกิดจากกระตุ้นด้วย acetylcholine และใน

ระยะต่อมาได้ทดสอบฤทธิ์ของ ancistrotectorine ต่อการออกฤทธิ์ของ calcium chloride และ potassium chloride อีกด้วย

2.3 ศึกษาฤทธิ์ของ Ancistrotectorine ต่อการหดเกร็งของลำไส้หนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยสารชนิดต่าง ๆ (acetylcholine, histamine, 5-hydroxytryptamine และ barium chloride)

ใช้หนูตะเภาสีขาว เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 300-400 กรัม ให้อดอาหารตลอดคืนก่อนทำการทดลอง ให้แต่น้ำเพียงอย่างเดียว

การเตรียมลำไส้หนูตะเภาทำโดยฆ่าหนูตะเภาโดยใช้ท่อนเหล็กตีรอยต่อระหว่างก้านคอและหัว แล้วเปิดหน้าท้องตัดเอาลำไส้ส่วน ileum ที่อยู่เหนือ ileocaecal junction ประมาณ 10 ซม. นำมาใส่ใน petri dish ซึ่งบรรจุสารละลาย Tyrode และมี gas (95% O_2 + 5% CO_2) ผ่านตลอดเวลา แล้วทำต่อตามวิธีเดียวกับการเตรียมลำไส้กระต่าย (รูปที่ 5) (2,6,29)

หลังจากเตรียมลำไส้เรียบร้อยแล้ว ทำการทดลองต่อตามขั้นตอนต่อไปนี้

ก. ศึกษา antispasmodic effect ของ ancistrotectorine ที่มีต่อลำไส้ของหนูตะเภาเมื่อมี acetylcholine เป็นตัวกระตุ้นให้ลำไส้หดเกร็ง ทำตามขั้นตอนดังนี้

1. ทำ dose-response curve ของ acetylcholine ใช้เทคนิคการทำ cumulative dose response curve ของ Van Rossum (33) โดยเติมสารละลายของ acetylcholine ลงในลำไส้ที่เตรียมไว้ทุก ๆ 5 นาที บันทึกการหดเกร็งของลำไส้ทุกครั้งที่เติมสารละลาย acetylcholine ทำเช่นนี้จนได้การหดเกร็งสูงสุด (maximum contraction) ของลำไส้ หลังจากนั้นล้างลำไส้ด้วยสารละลาย Tyrode หลาย ๆ ครั้ง เพื่อขจัดเอา acetylcholine ออกจากลำไส้ให้หมด ปล่อยให้ลำไส้พัก 30 นาที จึงทำการทดลองในข้อ 2

2. ทำ dose-response curve ของ acetylcholine เมื่อมีสารละลาย ancistrotectorine อยู่ คือหลังจากปล่อยให้ลำไส้พัก 30 นาทีแล้ว ใส่สารละลาย ancistrotectorine (ขนาดความเข้มข้นที่ใช้ทดลองมี 3 ขนาดคือ 9.5, 17.5 และ 28.4 มคม. ต่อลิตร) ลงในหลอดแก้ว ทิ้งไว้ 10 นาทีจึงทำการทดลองต่อตามข้อ 1

หลังจากทำการทดลองในข้อ 2 เสร็จแล้ว นำลำไส้ทิ้งไป เตรียมลำไส้ชิ้นใหม่ แล้วทำการทดลองตามข้อ 1 และ 2 อีก จนได้ n ตามต้องการ

ข. ศึกษาผลของ absolute ethanol (ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณของสารละลาย ancistrotectorine ขนาดความเข้มข้น 28.4 มคม.ต่อลิตร) ซึ่งเป็นตัวทำละลายต่อการออกฤทธิ์ของ acetylcholine

1. หลังจากเตรียมลำไส้เรียบร้อยแล้ว ทำ dose-response curve ของ acetylcholine ตามวิธีในข้อ 1ก. เมื่อเสร็จการทดลองตามวิธีในข้อ 1ก และล้างลำไส้ด้วยสารละลาย Tyrode หลาย ๆ ครั้งแล้ว ปล่อยให้ลำไส้พัก 30 นาที จึงทำการทดลองในข้อ 2

2. ทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 2ก. แต่ให้ absolute ethanol (ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณของสารละลาย ancistrotectorine ขนาดความเข้มข้น 28.4 มคม. ต่อลิตร) แก่ลำไส้แทนสารละลาย ancistrotectorine

หลังจากทำการทดลองในข้อ 2 เสร็จแล้ว นำลำไส้ทิ้งไป เตรียมลำไส้ใหม่ แล้วทำการทดลองตามข้อ 1 และ 2 อีกจนได้ n ตามต้องการ

การประเมินผลการทดลอง ทำโดยวัดขนาดของการหดเกร็งของลำไส้เป็น มม. แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของ maximum contraction (ให้ maximum contraction เป็น 100 เปอร์เซ็นต์) นำผลที่ได้มาเขียนกราฟ ให้เปอร์เซ็นต์ของ maximum contraction อยู่บนแกนตั้ง และ log dose อยู่บนแกนนอน ทดสอบความแตกต่างของการหดเกร็งระหว่างตัวอย่างที่ได้รับ acetylcholine กับที่ได้รับสาร ancistrotectorine + acetylcholine และที่ได้รับ absolute ethanol + acetylcholine โดยใช้วิธีทางสถิติ "Student's t test" ค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาฤทธิ์ของ ancistrotectorine ต่อการหดเกร็งของลำไส้หนูตะเภาที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย histamine, 5-hydroxytryptamine และ barium chloride นั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับของ acetylcholine

009199

11808763

2.4 ศึกษาผลเบื้องต้นต่อการหดเกร็งของมดลูกหนูขาวที่แยกจากสัตว์ทดลองทั้งในสภาพปกติและเมื่อใช้ oxytocin และ 5-hydroxytryptamine กระตุ้นให้มดลูกหดเกร็ง

ใช้หนูขาวเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม ทำให้สัตว์ทดลองหมดความรู้สึกโดยใช้แท่งเหล็กตีบริเวณรอยต่อระหว่างคอและส่วนตัว แล้วเปิดหน้าท้องตัดมดลูก (uterine horn) ออกจากตัวทั้ง 2 ข้าง นำมาใส่ใน petri dish ซึ่งบรรจุสารละลาย De Jalon (ส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 2) และมี gas (95% O_2 + 5% CO_2) ผ่านตลอดเวลา ตัดแยกไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกจากกล้ามเนื้อมดลูก แล้วตัดมดลูกให้ได้ความยาวประมาณชิ้นละ 1.5-2 ซม. ใช้ด้ายผูกปลายทั้ง 2 ข้างโดยปล่อยให้ปลายเปิด ใช้ปลายด้ายด้านหนึ่งผูกติดกับขอเหล็กขนาดเล็ก จุ่มขอเหล็กลงในหลอดแก้วขนาด 25 มล. ภายในบรรจุสารละลาย De Jalon และมี gas (95% O_2 + 5% CO_2) ผ่านตลอดเวลา ให้มดลูกอยู่บริเวณส่วนล่างของหลอดแก้ว หลอดแก้วนี้อยู่ใน isolated organ bath ซึ่งควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 32 องศาเซลเซียส ปลายด้ายด้านที่เหลือผูกติดกับ isotonic transducer ซึ่งต่อเข้ากับ recorder (รูปที่ 6) (22)

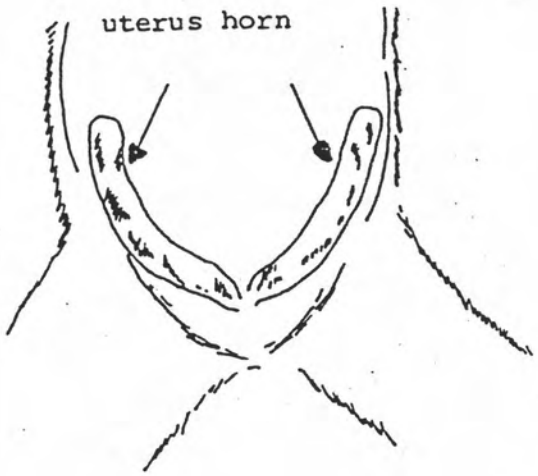
ศึกษาผลเบื้องต้นต่อการหดเกร็งของมดลูกของหนูขาวที่แยกจากสัตว์ทดลอง ทำตามขั้นตอนดังนี้

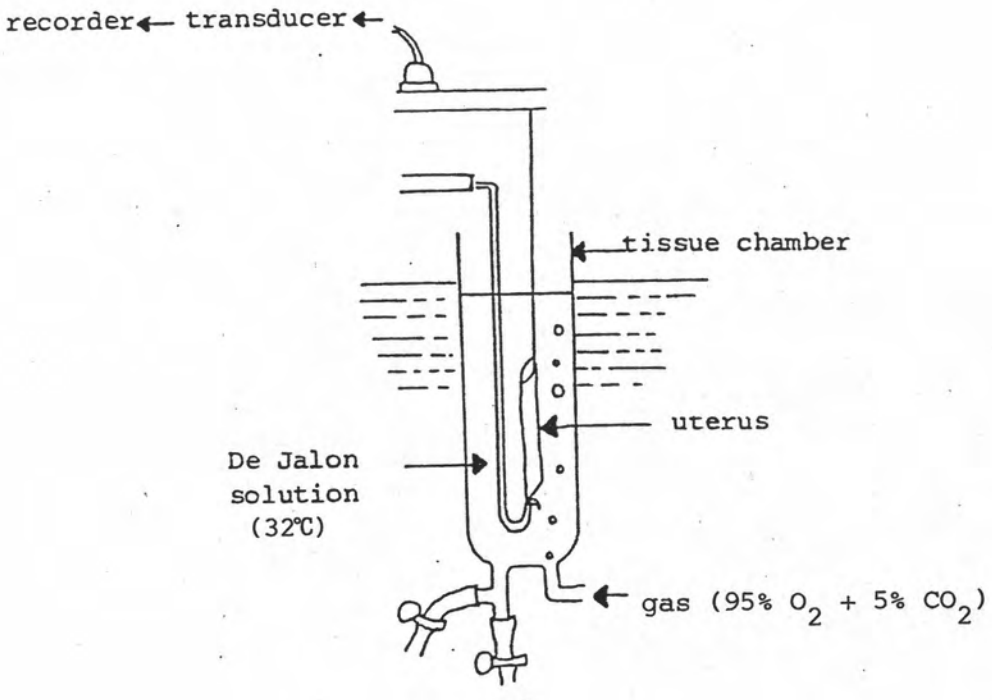
1. หลังจากเตรียมมดลูกเรียบร้อยแล้ว บันทึก spontaneous contraction ของมดลูก หลังจากนั้นให้สารละลาย ancistrotectorine ขนาดความเข้มข้น 8×10^{-3} มก. ต่อ มล. แก่มดลูก บันทึกการหดเกร็งของมดลูก เปรียบเทียบการหดเกร็งของมดลูกก่อนและหลังจากที่ได้รับสารละลาย ancistrotectorine

2. เตรียมมดลูกใหม่ ให้ oxytocin ขนาดความเข้มข้น 2×10^{-4} หน่วยมาตรฐานสากล (international unit; i.u.) ต่อ มล. เพื่อกระตุ้นให้มดลูกหดเกร็ง บันทึกการหดเกร็งของมดลูก แล้วจึงใส่ ancistrotectorine ขนาดความเข้มข้น 8×10^{-3} มก. ต่อ มล. ลงในมดลูก บันทึกการหดเกร็งของมดลูกอีกครั้งหนึ่ง เปรียบเทียบการหดเกร็งของมดลูกก่อนและหลังจากได้รับสารละลาย ancistrotectorine แล้วให้ oxytocin ขนาดความเข้มข้นเท่าเดิมแก่มดลูกอีกครั้ง บันทึกการหดเกร็งของมดลูก เปรียบเทียบการหดเกร็งนี้กับการหดเกร็งใน 2 ครั้งแรก

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของสารละลาย De Jalon

สารเคมี	ปริมาณ (กรัม/ลิตร)
NaCl	9.0
KCl	0.42
$CaCl_2$	0.06
$NaHCO_3$	0.50
Glucose	0.50
Aerating gas	95% O_2 + 5% CO_2
pH	7.8





รูปที่ 6 แสดงการเตรียมมดลูกของหนูขาวหรือหนูตะเภาที่แยกออกจากสัตว์ทดลอง

3. เตรียมมดลูกใหม่ แล้วดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2 แต่ให้ 5-hydroxytryptamine ขนาดความเข้มข้น 2×10^{-2} มคก. ต่อ มล. แทน oxytocin

2.5 ศึกษาผลเบื้องต้นต่อการหดเกร็งของมดลูกหนูตะเภาที่แยกจากสัตว์ทดลองทั้งในสภาพปกติ และเมื่อใช้ oxytocin และ 5-hydroxytryptamine กระตุ้นให้มดลูกหดเกร็ง

ใช้หนูตะเภาสีขาว เพศเมีย น้ำหนักประมาณ 300-350 กรัม ฉีด estradiol benzoate (progynon) ขนาด 0.1 มก. ต่อน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง 1 กก. เข้าทางกล้ามเนื้อก่อนทำการทดลอง 24 ชั่วโมง (37)

วันทำการทดลอง เตรียมมดลูกหนูตะเภาเช่นเดียวกับการเตรียมมดลูกหนูขาวในข้อ 2.4 แล้วดำเนินการทดลองต่อดังต่อไปนี้

1. ศึกษาผลของ ancistrotectorine ต่อการออกฤทธิ์ของ oxytocin โดยหลังจากเตรียมมดลูกเรียบร้อยแล้ว ให้ oxytocin ขนาดความเข้มข้น 4×10^{-4} หน่วยมาตรฐานสากล ต่อ มล. แก่มดลูก บันทึกการหดเกร็งของมดลูกที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย oxytocin แล้วล้างมดลูกด้วยสารละลาย De Jalon หลาย ๆ ครั้งเพื่อล้างเอา oxytocin ออกให้หมด ปล่อยให้มดลูกพัก 30 นาที จึงใส่ absolute ethanol ขนาด 1.2×10^{-3} มล. ต่อ มล. (มีปริมาตรเท่ากับสารละลาย ancistrotectorine) ลงในหลอดแก้ว ทิ้งไว้ 10 นาทีจึงใส่ oxytocin ขนาดความเข้มข้นเท่าเดิมลงไป บันทึกการหดเกร็งของมดลูก ล้างมดลูกอีกครั้งด้วยสารละลาย De Jalon หลาย ๆ ครั้ง เพื่อไล่ oxytocin ออกให้หมด ปล่อยให้มดลูกพัก 30 นาที แล้วใส่สารละลาย ancistrotectorine ขนาดความเข้มข้น 8×10^{-3} มก. ต่อ มล.ลงในหลอดแก้ว ทิ้งไว้ 10 นาทีจึงให้ oxytocin ขนาดความเข้มข้นเท่าเดิมและบันทึกการหดเกร็งของมดลูก เปรียบเทียบการหดเกร็งของมดลูกทั้ง 3 ครั้ง

2. ศึกษาผลของ ancistrotectorine ต่อการออกฤทธิ์ของ 5-hydroxytryptamine โดยเตรียมมดลูกใหม่ แล้วทำการทดลองตามวิธีการเดียวกับข้อ 1 แต่ใช้ 5-hydroxytryptamine ขนาดความเข้มข้น 1.3×10^{-3} มก. ต่อ มล. แทน oxytocin ในการกระตุ้นให้มดลูกหดเกร็ง

2.6 ศึกษาผลเบื้องต้นต่อการหดเกร็งของลำไส้ในกระต่ายสลบทั้งในสภาพปกติและเมื่อใช้ carbachol กระตุ้นให้ลำไส้หดเกร็ง

ใช้กระต่ายสีขาว มีน้ำหนักประมาณ 2-3 กก. ให้สัตว์ทดลองอดอาหารตลอดคืนก่อนทำการทดลอง โดยให้น้ำแต่เพียงอย่างเดียว

นำสัตว์ทดลองมาทำให้สลบโดยฉีดสารละลาย urethane (ความเข้มข้น 25% w/v) ในขนาด 7 มล. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. เข้าทางหลอดเลือดดำของสัตว์ทดลองโดยค่อย ๆ ฉีดเข้าทีละน้อย ๆ เมื่อสัตว์ทดลองสลบแล้ว เปิดหน้าท้องหาส่วนของลำไส้เล็กตัดผนังลำไส้ให้เป็นช่องเปิดเล็กน้อย แล้วสอดลูกโป่งซึ่งมีความยาวประมาณ 10 ซม. เข้าไปในลำไส้ทางช่องเปิด ภายในลูกโป่งมีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ ลูกโป่งนี้จะผูกติดกับท่อยาง ภายในท่อยางมีน้ำกลั่นอยู่ ท่อยางนี้ต่อเข้ากับ pressure transducer ซึ่งต่ออยู่กับ recorder เย็บผนังหน้าท้องให้ติดกัน (31) เมื่อเตรียมสัตว์ทดลองเรียบร้อยแล้วให้สัตว์ทดลองพัก 30 นาที ต้องคอยดูไม่ให้สัตว์ทดลองฟื้น ถ้าสัตว์ทดลองเริ่มมีอาการรู้สึกตัว ก็ฉีดสารละลาย urethane เข้าทางหลอดเลือดดำได้อีก

ทำการทดลองต่อโดยบันทึกการหดเกร็งของลำไส้ในสภาพปกติ ถ้าลำไส้มีการหดเกร็งน้อยก็ทำการกระตุ้นให้ลำไส้บีบตัว โดยการฉีด carbachol เข้าทางช่องท้องทีละน้อยจนลำไส้มีการหดเกร็งซึ่งสามารถบันทึกได้อย่างชัดเจน ศึกษาฤทธิ์ของสารละลาย ancistrotectorine ต่อการหดเกร็งของลำไส้ โดยการฉีดสารละลายของสารนี้เข้าทางช่องท้องหรือเข้าทางหลอดเลือดดำในขนาดต่าง ๆ จนพบการเปลี่ยนแปลงชัดเจนเกิดขึ้น

2.7 ศึกษาผลของ ancistrotectorine ต่อการบีบตัวของกระเพาะอาหารและลำไส้ในหนูถีบจักร

ทำการทดลองผลของ ancistrotectorine ต่อการบีบตัวของกระเพาะอาหารและลำไส้โดยใช้หนูถีบจักรเพศผู้ น้ำหนักระหว่าง 22-23 กรัม ตามวิธีของ Macht และ Barba-Gose (26)

เตรียม charcoal meal โดยใช้ tragacanth 2 กรัม เติมน้ำกลั่นเล็กน้อย บดให้เข้ากันและเหนียวข้น แล้วเติม charcoal ลงไป บดทำให้เป็น suspension โดยค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นจนครบ 130 มล. เก็บใส่ขวด โดยต้องเขย่าทุกครั้งก่อนดูดไปใช้

เตรียมสารละลาย ancistrotectorine โดยชั่ง ancistrotectorine 50 มก. ละลายใน DMSO แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 5 มล. จะได้สารละลายความเข้มข้น 10 มก. ต่อ มล. ใส่ขวดปิดฝาให้สนิท เก็บในตู้เย็น

ให้หนูอดอาหารก่อนการทดลองประมาณ 12-15 ชั่วโมง แบ่งหนูที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกันเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 10-15 ตัว แล้วทำการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ฉีดตัวทำละลาย DMSO 0.15 มล. เข้าทางช่องท้องของสัตว์ทดลอง ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วให้ charcoal meal ที่เตรียมไว้ 0.3 มล. ทางปาก แล้วแบ่งหนูออกเป็น 2 พวก พวกแรกถูกฆ่าหลังจากให้ charcoal meal แล้ว 20 นาที พวกหลังถูกฆ่าหลังจากให้ charcoal meal แล้ว 30 นาที เมื่อฆ่าหนูแล้ว เปิดหน้าท้อง ตัดแยกกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กออกมา สังเกตลักษณะของกระเพาะอาหาร และวัดระยะทางของ charcoal ที่เคลื่อนไปตามลำไส้เล็ก คิดเฉลี่ยอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่ charcoal เคลื่อนไปต่อความยาวของลำไส้เล็ก

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดสารละลาย ancistrotectorine ขนาด 60 มก. ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. (โดยมีปริมาตร 0.15 มล. ซึ่งเท่ากับปริมาตรของ DMSO) เข้าทางช่องท้องของสัตว์ทดลอง ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที แล้วให้ charcoal meal 0.3 มล. ทางปาก แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 2 พวก พวกแรกถูกฆ่าหลังจากให้ charcoal meal แล้ว 20 นาที พวกหลังถูกฆ่าหลังจากให้ charcoal meal แล้ว 30 นาที เมื่อฆ่าหนูแล้ว เปิดหน้าท้อง นำกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กออกมา สังเกตลักษณะของกระเพาะอาหาร และวัดระยะทางที่ charcoal เคลื่อนที่ไปตามลำไส้เล็ก คิดเฉลี่ยอัตราส่วนระหว่างระยะทางที่ charcoal เคลื่อนไปต่อความยาวของลำไส้เล็ก เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1