บทที่ 2

อุบกรณ์และวิธีวิจัย

ก. อุบกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. รงทอง ร้านเจ้ากรมเบ๋อ กรุงเทพมหานคร ในเดือนตุลาคม 2533

2. สัตว์ทดลอง

2.1 กระต่ายเพศผู้ น้ำหนัก 1.5-2.0 กิโลกรัม จากศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 หนูขาว (rat) เพศผู้ น้ำหนัก 250-350 กรัม พันธุ์ Wistar จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครไชยศรี จังหวัดนครปฐม

2.3 หนูถีบจักร (mice) เพศผู้และเมีย น้ำหนัก 20-22 กรัม พันธุ์ Swiss Albino จากศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. เครื่องมือ

3.1 เครื่องมือในการแยก gambogic acid จากรงทอง

- Rotary evaporator ของบริษัท Buchi 461
- Column chromatography ขนาด 4.5x50 ซม.
- Thin - layer chromatography tank
- เครื่องกรองสูญญากาศ ของบริษัท Millipore® Waters
- TLC aluminium sheets siliga gel 60 F254

3.2 เครื่องมือในการพิสูจน์เอกลักษณ์และศึกษาสูตรโครงสร้างโมเลกุล

- การวัด Optical rotation โดยเครื่อง Perkin-Elmer 241 polarimeter
- การวัด Ultraviolet spectra โดยเครื่อง Beckman DU-7 spectrophotometer
- การวัด Infrared spectra โดยเครื่อง Midac Collegian FT-IR interferometer

- การวัด Mass spectra โดยเครื่อง Finnigan MAT -90 (direct inlet method) 70 eV
- การวัด Nuclear magnetic resonance spectra โดยเครื่อง Nicolet NMC-360 spectrometer, (360.1 MHz และ 90.8 MHz) และ general electric OMEGA-500 spectrometer (500.1 MHz และ 125.8 MHz)

3.3 เครื่องมือในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

- ชุด isolated organ bath ชนิดที่ทำเองในประเทศไทย สามารถควบคุมอุณหภูมิ 37 $\pm$ 0.5°ซ. ตลอดการทดลอง (รูปที่ 4)
- Thermoregulator ของบริษัท Heto กำหนดอุณหภูมิได้ตามต้องการ
- เครื่องมือวัดแรงหดตัว isometric transducer ของบริษัท Narco Bio-System, INC. และ pressure transducer
- บันทึกการหดตัวของลำไส้ และ vas deferens โดย physiograph MK-III ของบริษัท Narco Bio-System, INC.
- บันทึกผลการทดลองของการบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักร โดย Polygraph Recorder ของบริษัท Washington 400 MD. 2C
- ขยายการบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักร โดยใช้บันทึกใน Gilson Recorder N 2.
- ถังแก๊ส carbogen (95% O_2 และ 5% CO_2) ของบริษัท TIG

4. สารเคมี

4.1 สารเคมีในการแยกสาร gambogic acid จากรงทอง

- siliga gel (Merck 0.04-0.063 มม.)
- chloroform (redistilled)
- ethanol 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 สารเคมีในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ gambogic acid

- gambogic acid
- Atropine sulfate (Sigma), Cyproheptadine hydrochloride (Sigma); Verapamil hydrochloride (Sigma); Chlorpheniramine maleate (ATC); Barium chloride (BDH); 5-Hydroxytryptamine (sigma); Noradrenaline bitartrate (sigma); Potassium chloride (BDH); ผงถ่าน; tragacanth
- สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลายสำหรับเลี้ยงอวัยวะต่างๆที่แยกออกมาจากสัตว์ทดลอง ได้แก่ d(+) - glucose; Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$) (บริษัท Fluka) Sodium chloride (NaCl); Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (บริษัท Mallinckrodth); Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$) (บริษัท Merck) และ Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) (บริษัท Baker)

ข. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองจะรายงานในรูปค่าเฉลี่ย และแสดงค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ standard error of the means) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลการทดลองก่อนและหลังจากที่ให้สารกระตุ้น หรือสารยับยั้ง โดยใช้ student's paired t-test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยใช้ student's unpaired t-test พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

ค. <u>วิธีวิจัย</u>

1. <u>การสกัดและแยกสารบริสุทธิ์ gambogic acid จากรงทอง</u>

1.1 <u>การสกัด (Extraction)</u>

นำรงทอง มาตำให้ละเอียด สกัดด้วยตัวทำละลาย chloroform

018127

โดยนำไปใส่ใน Percolator หมักทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบาง และเครื่องกรองสูญญากาศ โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอา chloroform ออกจนหมดภายใต้สูญญากาศ จะได้สิ่งสกัดหยาบ (crude extract) ที่เป็นของเหลวสีเหลือง (รูปที่ 5)

1.2 <u>การแยกสาร (Separation)</u>

ใช้เทคนิคของรงคเลขผิวบาง (Thin layer chromatography) เพื่อหาระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่เหมาะสมในการแยกสารต่าง ๆ ในสิ่งสกัดหยาบออกจากกัน โดยระบบตัวทำลายที่ใช้มี 4 ระบบ คือ

1. chloroform
2. chloroform : ethanol = 95:5
3. chloroform : ethanol = 97.5:2.5
4. chloroform : ethanol = 99:1

เบรียบเทียบกระสวน (pattern) ของรงคเลขผิวบาง (TLC) ในระบบตัวทำละลายต่างๆที่เหมาะสมที่สุดในการแยกสารต่างๆในสิ่งสกัดหยาบออกจากกัน

1.3 <u>การแยก gambogic acid บริสุทธิ์ ออกจากสิ่งสกัดหยาบ</u>(รูปที่ 5)

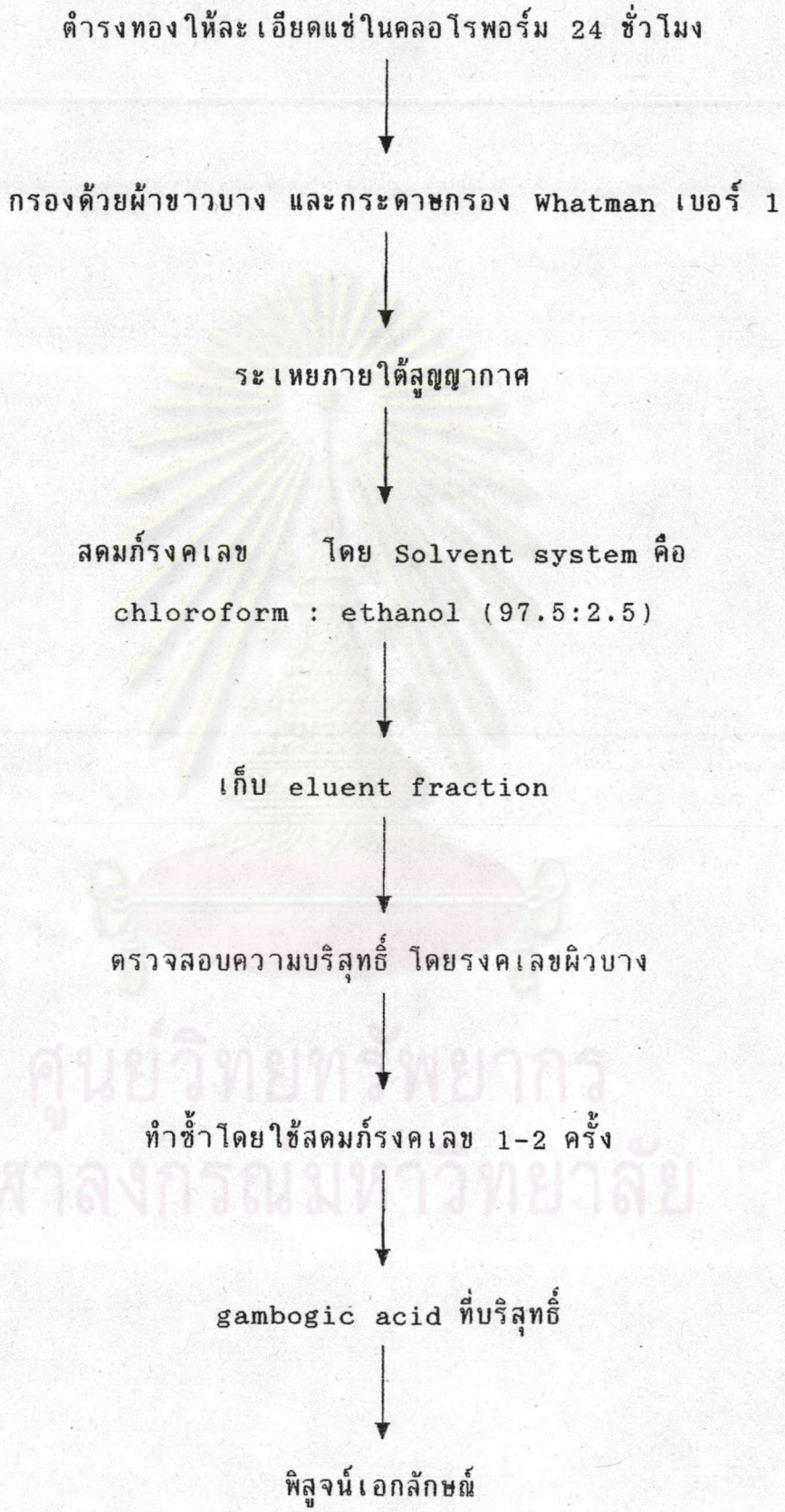
จากการศึกษารงคเลขผิวบาง (TLC) พบว่า ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสาร gambogic acid จากสิ่งสกัดหยาบ คือ chloroform : ethanol = 97.5:2.5 ซึ่งมีค่า Rf = 0.46 ดังนั้นจึงใช้ระบบตัวทำละลายนี้ในการแยกสารสกัดบริสุทธิ์ gambogic acid โดยใช้เทคนิคของสดมภ์รงคเลข (column chromatography) column ที่ใช้มีขนาด 4.5x50 ซม. เมื่อใส่ผง siliga gel ใน column ให้มีความสูงประมาณ 12 ซม. แล้วจะใช้ chloroform ผ่าน siliga gel จน siliga gel ใน column ที่เตรียมไว้อยู่ในสภาพอิ่มตัว จากนั้นนำสิ่งสกัดหยาบมาประมาณ 2 กรัม มาละลายใน chloroform ใส่ใน column ที่เตรียมไว้ แล้วตามด้วยการชะ (elute) ด้วย chloroform:ethanol (97.5:2.5) เก็บ eluent fraction ละประมาณ 20 มล. แล้วนำไปตรวจหาความบริสุทธิ์ โดยใช้รงคเลขผิวบาง (TLC) นำ fraction ที่บริสุทธิ์ และแสดงค่า Rf เท่ากัน มารวมเข้าด้วยกัน fraction ที่มีสารอื่นบนจะแยกซ้ำโดยใช้

สดมภ์รงคเลขอีก 1-2 ครั้ง เพื่อให้ได้ gambogic acid ที่บริสุทธิ์ ระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยการระเหยภายใต้สูญญากาศ ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดบริสุทธิ์ที่ได้ และเก็บไว้ในที่แห้งป้องกันแสงแดด เพื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไป

1.4 <u>การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่แยกได้</u>

โดยความช่วยเหลือของ Prof.Geofrey A. Cordell แห่ง College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago และ รศ. นิจศิริ เรืองรังษี ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพต่าง ๆ ได้แก่ Optical rotation, Ultraviolet spectrum, Infrared spectrum, Nuclear magnetic resonance spectra และ electron impact mass spectrum *m/z* (rel. int.) เพื่อสรุปสูตรโครงสร้างของสารที่สกัดได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงการแยกสาร gambogic acid จากรงทอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสารละลาย gambogic acid

ละลาย gambogic acid ด้วยเอธานอล 60% ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ และเก็บสารละลายใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็น และเตรียมใหม่ทุก 3 วัน

2. การศึกษาฤทธิ์ของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กของกระต่ายที่แยกออกจากกาย

กระต่ายเพศผู้น้ำหนัก 1.5-2.0 กิโลกรัม อดอาหารก่อนการทดลองเป็นเวลา ประมาณ 14-16 ชั่วโมง โดยให้แต่น้ำ ทำให้สลบโดยการทุบบริเวณรอยต่อระหว่างต้นคอและหัว รีบผ่าบริเวณท้องเอาลำไส้เล็กส่วน jejunum มาใส่ในภาชนะ ที่มีสารละลายไทโรด (Tyrode) และมีก๊าซ carbogen (95% O_2+5% CO_2) ผ่านตลอด ตัดไขมันและเนื้อเยื่อออกตามวิธีของ Perry W.L.M (1968) ใช้ syringe ล้างลำไส้ด้านในด้วยสารละลายไทโรด (Tyrode) แล้วตัดแบ่งลำไส้ออกเป็นท่อนๆละประมาณ 1-2 เซ็นติเมตร ใช้ด้ายผูกบลายทั้ง 2 ด้าน ให้บลายทั้งสองเบิดเพื่อให้สารละลายไทโรด (Tyrode) ผ่านได้ ผูกบลายด้านหนึ่งติดกับแท่งพลาสติก นำไปใส่ในกระเบาะแก้ว 2 ชั้น ซึ่งภายในบรรจุสารละลายไทโรด (Tyrode) 25 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ. ด้วยน้ำที่ไหลผ่านตลอด จากเครื่อง thermoregulator และภายในกระเบาะแก้วมีก๊าซ carbogen ไหลผ่านตลอด บลายอีกด้านหนึ่งของลำไส้ไปผูกกับ isometric transducer ซึ่งต่อกับ recorder ปรับลำไส้ให้มีความตึงตัว (tension) 1 กรัม incubate นาน 30 นาที เมื่อลำไส้มีการหดเกร็งสม่ำเสมอแล้ว ให้สารละลาย gambogic acid ในขนาดต่างๆ แบบ Cumulative dose คือ 1.3×10^{-5} โมลาร์, 2.6×10^{-5} โมลาร์, 3.9×10^{-5} โมลาร์ และ 5.2×10^{-5} โมลาร์

บันทึกการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่เกิดขึ้น และในการทดลองให้ ethanol 60% ซึ่งเป็นสารที่ใช้ละลาย gambogic acid ใส่ลงใน organ bath เพื่อดูผลต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายด้วย

เตรียมลำไส้เล็กของกระต่ายตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว หลังจากให้ลำไส้หดเกร็งตัวอยู่ในสารละลายไทโรด (Tyrode) ประมาณ 30 นาที จึงเริ่มการทดลองโดยให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดเกร็งตัวของลำไส้ คือ atropine 1×10^{-7} โมลาร์,

verapamil $8x10^{-7}$ โมลาร์, chlorpheniramine $1x10^{-7}$ โมลาร์ ก่อนแล้วจึงให้สารละลาย gambogic acid ในขนาดต่างๆเท่าเดิม บันทึกการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับการทดลองข้างต้น เพื่อศึกษาว่าสาร 3 ตัว คือ atropine, verapamil และ chlorpheniramine มีผลยับยั้งฤทธิ์ของสารละลาย gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กกระต่ายได้หรือไม่

3. <u>ศึกษาฤทธิ์ของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กของหนูขาวที่แยกออกจากกาย</u>

ใช้หนูขาวเพศผู้น้ำหนัก 250-350 กรัม อดอาหาร ประมาณ 14 - 16 ชั่วโมง ก่อนการทดลองให้แต่น้ำอย่างเดียว เตรียมลำไส้เล็กหนูขาวเช่นเดียวกับลำไส้เล็กกระต่าย โดยเปิดหน้าท้องเพื่อตัดเอาส่วน ileum โดยตัดให้ห่างจาก ileocaecal junction ประมาณ 10 เซ็นติเมตร นำส่วนที่ตัดได้มาใส่ใน petridish ที่มีสารละลายไทโรด (Tyrode) อยู่พร้อมด้วยก๊าซ carbogen ผ่านตลอดเวลา ล้างลำไส้และผูกวิธีเดียวกับลำไส้เล็กกระต่าย incubate นาน 30 นาที เมื่อลำไส้มีการหดเกร็งสม่ำเสมอแล้วให้สารละลาย gambogic acid ในขนาดต่างๆ แบบ Cumulative dose คือ $6.50x10^{-6}$ โมลาร์, $9.75x10^{-6}$ โมลาร์ และ $1.30x10^{-5}$ โมลาร์

บันทึกการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่เกิดขึ้น ในการทดลองให้ ethanol 60% ซึ่งเป็นสารที่ใช้ละลาย gambogic acid ใส่ลงใน organ bath เพื่อดูผลต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวด้วย

เตรียมลำไส้เล็กของหนูขาวตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว หลังจากให้ลำไส้เล็กหดเกร็งตัวอยู่ในสารละลาย Tyrode ประมาณ 30 นาที จึงเริ่มการทดลอง โดยให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการหดเกร็งตัวของลำไส้ คือ atropine $1x10^{-7}$ โมลาร์, verapamil $8x10^{-7}$ โมลาร์, chlorpheniramine $1x10^{-7}$ โมลาร์, cyproheptadine $1x10^{-7}$ โมลาร์ แล้วจึงให้สารละลาย gambogic acid ในขนาดต่างๆเท่าเดิม บันทึกการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับการทดลองข้างต้น เพื่อศึกษาว่าสาร 4 ชนิด คือ atropine, verapamil, chlorpheniramine และ cyproheptadine มีผลยับยั้งฤทธิ์ของสารละลาย gambogic acid ต่อการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูขาวได้หรือไม่

4. <u>ศึกษาฤทธิ์ของสาร gambogic acid ต่อการบีบตัวของกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารทั้งกระเพาะของหนูถีบจักรที่แยกออกมาจากกาย</u>

ใช้หนูถีบจักรเพศผู้น้ำหนัก 20-25 กรัม อดอาหารให้แต่น้ำก่อนการทดลอง 14-16 ชั่วโมง ทำให้สลบโดยดึงหางให้กระดูกสันหลังเคลื่อน ผ่าเปิดหน้าท้องแยกเอากระเพาะอาหารทั้งกระเพาะออกมาล้างเศษอาหารภายในให้หมด โดยการฉีดสารละลายไทโรด (Tyrode) สอดสาย polyethylene ซึ่งภายในบรรจุสารละลายไทโรด (Tyrode) ใส่เข้าไปในกระเพาะอาหารทางส่วนที่ต่อกับลำไส้ผูกเชือกให้แน่น ส่วนบลายอีกด้านหนึ่งของสาย polyethylene ต่อกับ three-way stop-cock ซึ่งต่อกับ pressure tranducer สำหรับวัดแรงดันภายในกระเพาะอาหาร ฉีดสารละลายไทโรด (Tyrode) ผ่านทาง three-way เพื่อบรรจุสารละลายลงไปในกระเพาะอาหาร ไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ภายในรีบผูกบลายอีกด้านของกระเพาะส่วนที่ต่อกับหลอดอาหาร ซึ่งนำมาแช่อยู่ในกระเบาะแก้ว 2 ชั้น บรับความดันภายในกระเพาะประมาณ 25-30 mmH_2O incubate กระเพาะอาหาร 1 ชั่วโมง แล้วใส่สารละลาย gambogic acid ในขนาดต่างๆแบบ cumulative dose คือ 6.5×10^{-6} โมลาร์, 9.75×10^{-6} โมลาร์, 1.3×10^{-5} โมลาร์ และ 3.25×10^{-5} โมลาร์ และบันทึกการบีบตัวของกระเพาะอาหาร

เตรียมกระเพาะอาหารของหนูถีบจักรตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว หลังจาก incubate นาน 1 ชั่วโมง จึงเริ่มการทดลองโดยให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการบีบตัวของกระเพาะอาหาร คือ atropine 1×10^{-7} โมลาร์, verapamil 8×10^{-7} โมลาร์ และ chlorpheniramine 1×10^{-7} โมลาร์ ก่อนใส่สารละลาย gambogic acid ในขนาดต่าง ๆ เท่าเดิม บันทึกการบีบตัวของกระเพาะอาหารหนูถีบจักรเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้สารละลาย gambogic acid เพียงอย่างเดียว

5. <u>ศึกษาฤทธิ์ของสาร gambogic acid ต่อการบีบตัวของลำไส้หนูถีบจักรสภาพบกติ</u> (รูบที่ 7)

การวิจัยนี้ อาศัยการเคลื่อนที่ของผงถ่านเป็นตัววัดการบีบตัวของลำไส้หนูถีบจักรที่มีสภาพบกติ วิธีการทดลองทำตามวิธีของ Macht และ Barba-Gose

(1931) การเตรียม charcoal meal เตรียมโดยใช้ tragacanth เป็นสารช่วยแขวนตะกอนผงถ่าน โดยบด tragacanth 2 กรัม กับผงถ่าน 12 กรัม ให้เข้ากันทีละน้อย ๆ พร้อมเติมน้ำ บดต่อไปพร้อมเติมน้ำครบ 130 มิลลิลิตร

การวิจัยใช้หนูถีบจักรเพศผู้และเพศเมีย น้ำหนัก 20-22 กรัม อดอาหารเป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ก่อนการทดลองโดยให้แต่น้ำ สุ่มหนูออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมให้ 1.54% สารละลาย tragacanth 0.1 บริมาตร มิลลิลิตร ทางปาก เว้นระยะเวลา 15 นาที แล้วให้ผงถ่านที่เตรียมเข้าทางปาก บริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เมื่อครบ 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัว วัดระยะทางที่ผงถ่านเคลื่อนที่ไปในลำไส้ แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของผงถ่าน

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง ให้ gambogic acid 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร) ทางปาก เว้นระยะเวลา 15 นาที แล้วให้ผงถ่านที่เตรียมเข้าทางปากบริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เมื่อครบ 30 นาที ฆ่าหนูทุกตัว วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้ คำนวณเป็นเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในกลุ่มที่ 2 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1

6. <u>ศึกษาฤทธิ์ของสาร gambogic acid ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ของหนูขาวที่แยกออกมาจากกาย</u>

ใช้หนูขาวเพศผู้น้ำหนัก ประมาณ 200-250 กรัม ทำให้สลบ โดยใช้แท่งเหล็กตีบริเวณคอและหัวผ่าบริเวณท้องเพื่อเอา vas deferens ทั้งสองข้างออกมาใส่ใน petridish ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit และมีก๊าซ Carbogen ไหลผ่านตลอด ตัดแยกเอาเนื้อเยื่อและหลอดเลือดออกให้หมด ท่ออสุจิจะมี 2 ส่วน คือ prostatic และ epididymal halves การทดลองนี้จะใช้ทั้งส่วน protatic และส่วนที่เป็นรอยต่อของ prostatic และ epididymal ขึ้นอยู่กับการตอบสนองต่อสารที่ใช้กระตุ้น ใช้ด้ายผูกปลายทั้งสองด้าน แต่ให้ปลายเปิด ปลายด้ายด้านหนึ่งผูกติดกับแท่งพลาสติก แล้วนำไปใสกระเบาะแก้วสองชั้น ซึ่งมีสารละลาย Krebs Henseleit อยู่ 25 มิลลิลิตร ซึ่งมีก๊าซไหลผ่านและควบคุมด้วยน้ำจาก water bath ให้มีอุณหภูมิ 37°ซ. ปลายอีกด้านหนึ่งของด้ายผูกกับ isometric transducer

บรับท่ออสุจิให้มีความตึงตัว 1 กรัม จากนั้น incubate ไว้ประมาณ 30-45 นาที จนการหดตัวสม่ำเสมอ โดยระหว่างนั้นเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ทุก 15 นาที จึงเริ่มทำการทดลอง

6.1 ศึกษาผลของ gambogic acid ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ที่ถูกกระตุ้นด้วย potassium chloride (KCl)

การทดลองนี้ใช้ส่วน prostatic halves ผูกต่อกับ isometric transducer หลังจาก incubate แล้วกระตุ้นด้วย potassium chloride ขนาดความเข้มข้น 80 mM. บันทึกผลประมาณ 15 นาที ล้างและ incubate ด้วยสารละลาย Krebs Henseleit ทิ้งไว้จนการหดเกร็งคงที่ แล้วใส่สารละลาย gambogic acid ความเข้มข้น 1.3×10^{-5} โมลาร์ ทิ้งไว้ 10-15 นาที จึงใส่ potassium chloride ขนาด 80 mM. แล้วเปลี่ยนความเข้มข้นของ gambogic acid เป็น 6.5×10^{-5} โมลาร์, 1.3×10^{-4} โมลาร์ และใช้ verapamil 8×10^{-7} โมลาร์, 4×10^{-6} โมลาร์ แทน gambogic acid

6.2 ศึกษาผลของ gambogic acid ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ที่ถูกกระตุ้นด้วย barium chloride ($BaCl_2$)

เตรียมท่ออสุจิโดยใช้ส่วน prostatic halves ผูกต่อกับ isometric transducer หลังจากนั้น incubate นาน 30-45 นาที จนการหดเกร็งคงที่ในสารละลาย Krebs Henseleit กระตุ้นการหดเกร็งด้วย barium chloride ขนาดความเข้มข้น 1×10^{-3} โมลาร์ บันทึกผลประมาณ 20 นาที ล้างและ incubate ด้วยสารละลาย Krebs Henseleit ทิ้งไว้จนการหดเกร็งคงที่ แล้วใส่สารละลาย gambogic acid ความเข้มข้น 1.3×10^{-5} โมลาร์ ทิ้งไว้ 10-15 นาที จึงใส่ barium chloride ขนาด 1×10^{-3} โมลาร์ แล้วเปลี่ยนความเข้มขนของ gambogic acid เป็น 2.6×10^{-5} โมลาร์, 6.5×10^{-5} โมลาร์, 1.3×10^{-4} โมลาร์ และใช้ verapamil 8×10^{-7} โมลาร์, 4×10^{-6} โมลาร์ แทน gambogic acid

6.3 ศึกษาผลของ gambogic acid ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ที่ถูกกระตุ้นด้วย noradrenaline (NA)

เตรียมท่ออสุจิโดยใช้ส่วน prostatic halves ต่อกับ epididymal halves ผูกต่อกับ isometric transducer หลังจาก incubate จนการหด

เกร็งคงที่ในสารละลาย Krebs Henseleit แล้วกระตุ้นการหดเกร็งด้วย noradrenaline ขนาดความเข้มข้น $3x10^{-5}$ โมลาร์ บันทึกผลระมาณ 15 นาที ล้างท่ออสุจิด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3-5 ครั้ง incubate จนการหดเกร็งคงที่ ใส่สารละลาย gambogic acid เข้มข้น $1.3x10^{-5}$ โมลาร์ ทิ้งไว้ 10-15 นาที จึงใส่ noradrenaline ขนาด $3x10^{-5}$ โมลาร์ และเปลี่ยนความเข้มข้นของ gambogic acid เป็น $2.6x10^{-5}$ โมลาร์, $6.5x10^{-5}$ โมลาร์, $1.3x10^{-4}$ โมลาร์ และใช้ verapamil ขนาด $8x10^{-7}$ โมลาร์, $4x10^{-6}$ โมลาร์ แทน gambogic acid

6.4 <u>ศึกษาผลของ gambogic acid ต่อการหดเกร็งของ vas deferens ที่ถูกกระตุ้นด้วย serotonin (5-HT)</u>

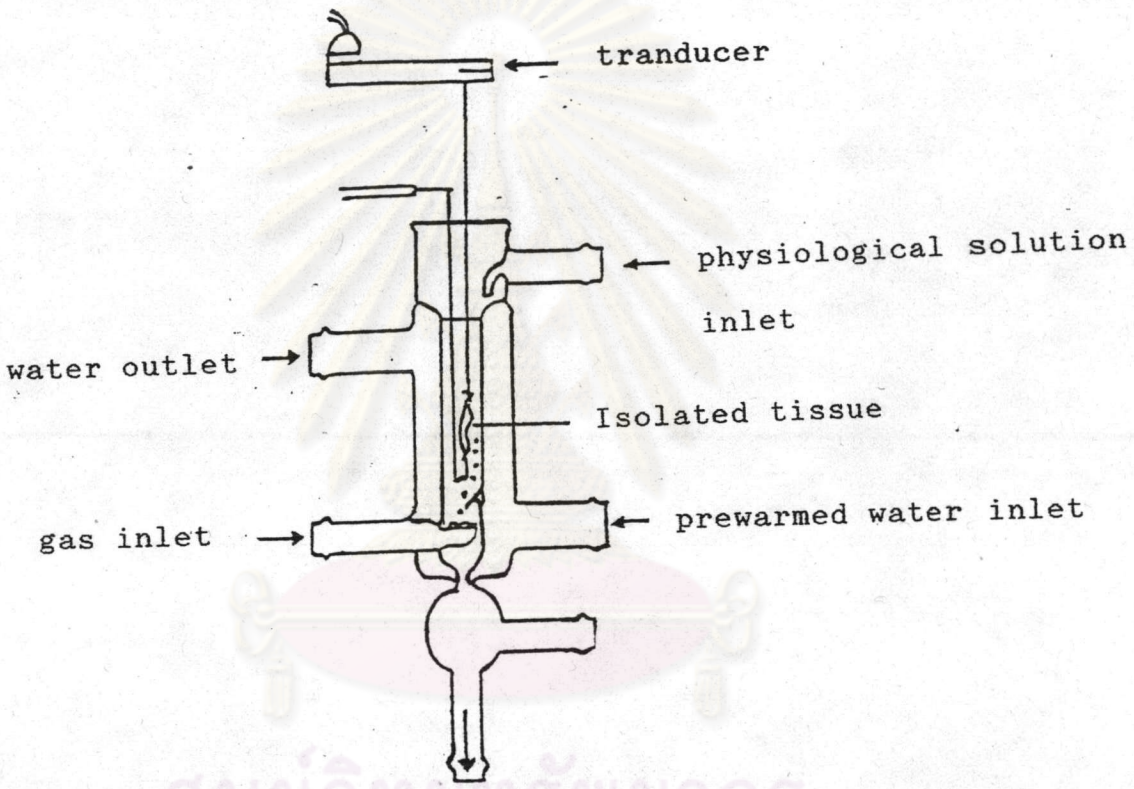
เตรียมท่ออสุจิ โดยใช้ส่วน prostatic halves ต่อกับ epididymal halves ผูกต่อกับ isometric transducer หลังจาก incubate จนการหดเกร็งคงที่ในสารละลาย Krebs Henseleit แล้วกระตุ้นด้วย serotonin ขนาดความเข้มข้น $1x10^{-4}$ โมลาร์ บันทึกผลระมาณ 15 นาที ล้างท่ออสุจิด้วยสารละลาย Krebs Henseleit 3-5 ครั้ง incubate จนการหดเกร็งคงที่ ใส่สารละลาย gambogic acid ความเข้มข้น $1.3x10^{-5}$ โมลาร์ ทิ้งไว้ 10-15 นาที จึงใส่ serotonin ขนาด $1x10^{-4}$ โมลาร์ และเปลี่ยนความเข้มข้นของ gambogic acid เป็น $1.3x10^{-4}$ โมลาร์ และใช้ verapamil ขนาด $8x10^{-7}$ โมลาร์, $4x10^{-6}$ โมลาร์ แทน gambogic acid

เนื่องจากการหดเกร็งของ vas deferens จะมีลักษณะเป็นแบบ phasic ตามด้วย tonic contraction หรือ phasic ตามด้วย rhythmic contraction ดังรูปที่ 8 อนึ่งการวัดค่าของ rhythmic contraction นั้นจะแตกต่างกันไป การศึกษานี้วัด rhythmic contraction ที่เกิดขึ้น โดยคิดจำนวนครั้งเฉลี่ยรวมภายใน 5 นาที ภายหลังให้ยา เพื่อเป็นการเปรียบเทียบกับการเกิด rhythmic contraction ก่อนให้ยา อย่างไรก็ตาม การพิจารณาผลการทดลองจะพิจารณาค่าของ phasic contraction เป็นสำคัญ

ตารางที่ 1 ตารางแสดงส่วนประกอบของสารชนิดต่างๆใน Physiological Solution ที่ใช้ในการทดลอง (กรัม/ลิตร)

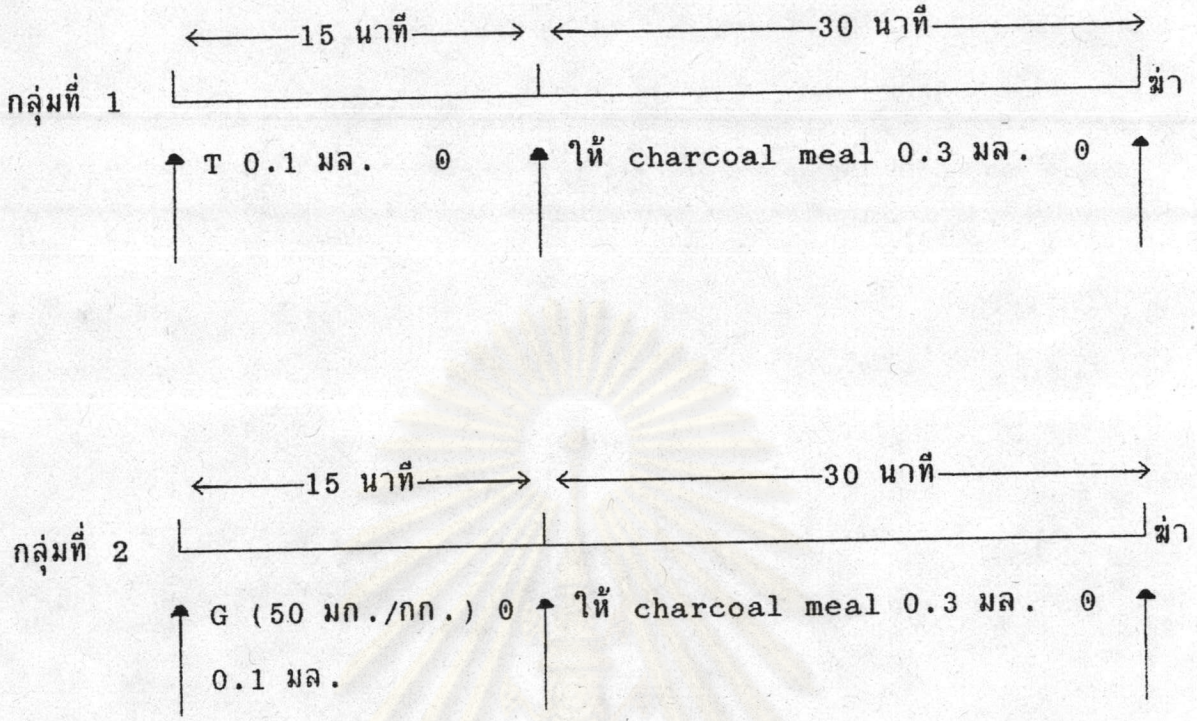
Physiological Solution	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	$NaHCO_3$	NaH_2PO_4	$MgSO_4$	KH_2PO_4	Glucose
Tyrode	8.0	0.2	0.2	0.1	1.0	0.05	-	-	1.0
Krebs Henseleit	6.92	0.35	0.28	-	2.09	-	0.14	0.16	2.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการทดลองกับอวัยวะที่แยกออกจากกายสัตว์ทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



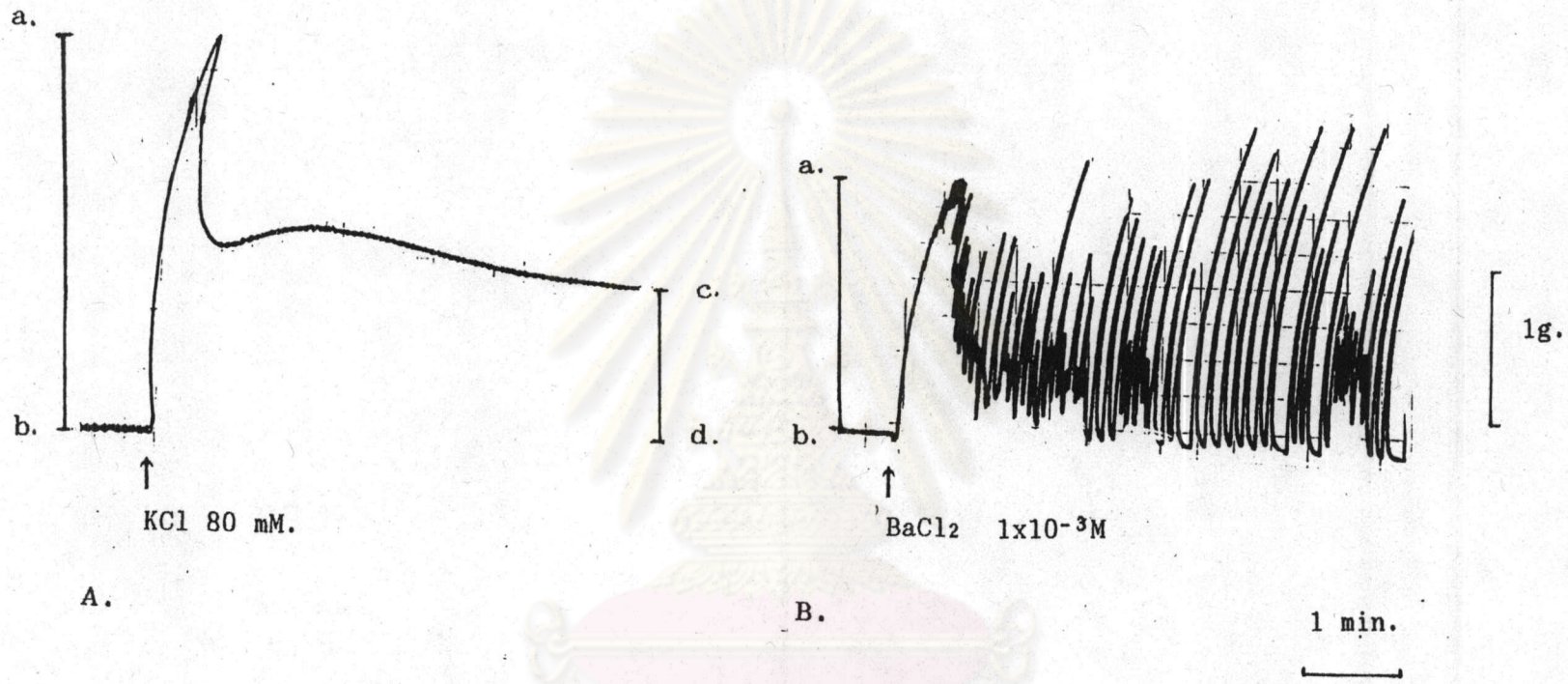
หมายเหตุ T = สารละลาย Tragacanth

G = gambogic acid

0 = ให้ทางปาก

รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการให้ยาในการศึกษาฤทธิ์ของ gambogic acid ต่อการหดตัวของลำไส้ในหนูถีบจักรปกติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 แสดงตัวอย่างวิธีการวัดค่าแรงหดเกร็งของ vas deferens ซึ่งบันทึกโดย isometric transducer; ค่า amplitude ของ phasic contraction ที่เกิดจาก KCl (รูป A) $BaCl_2$ (รูป B) วัดระยะทางระหว่าง a กับ b คือ phasic phase และระยะ c-d คือค่า tonic phase ซึ่งพบชัดเจนในรูป A การวัดความถี่ของ rhythmic contraction จะคิดค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งของการหดตัวในเวลา 5 นาที