

ภาคผนวก

1. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ inulin (Davidson *et al.*, 1963)

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน fructose ที่ความเข้มข้น 6.8, 4.4, และ 2.0 mg% โดยเตรียมจาก stock solution ที่ความเข้มข้น 1700, 1100 และ 500 mg% ตามลำดับ

1.2 เตรียม anthrone reagent

1.2.1 นำน้ำกลั่นปริมาตร 26 ml เติมน้ำแข็งที่ใส่ภาชนะไว้

1.2.2 เมื่อน้ำมีอุณหภูมิเย็นจัดค่อยๆ เติ H_2SO_4 ปริมาตร 100 ml โดยที่น้ำกลั่นต้องแช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา

1.2.3 ผสม anthrone น้ำหนัก 147 mg ลงในสารละลาย คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บสารละลาย anthrone ในขวดแก้วสีชาไว้ในตู้เย็นหรือแช่น้ำแข็งไว้

1.3 เจือจางตัวอย่าง urine ที่จะใช้วิเคราะห์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5000 หรือตามความเหมาะสม หลังจากผสมสารละลายดีแล้ว ดูดสารละลายปริมาตร 0.5 ml ใส่หลอดทดลอง

1.4 ตัวอย่าง plasma เตรียมโดยใช้ plasma ปริมาตร 100 μ l ผสมกับ 6% trichloroacetic acid (TCA) 3 ml ผสมให้เข้ากันแล้ว ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นโดยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 10 นาทีแล้วแยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวปริมาตร 0.5 ml ใส่หลอดทดลอง

1.5 สำหรับสารละลายมาตรฐาน fructose ใช้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.5 ml ใส่หลอดทดลอง

1.6 นำสารละลายที่ได้ในข้อ 1.3, 1.4 และ 1.5 ใส่สารละลาย anthrone ที่เตรียมไว้ปริมาตร 3 ml ผสมให้เข้ากัน

1.7 นำสารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างทั้งหมดเติมน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 38 °C เป็นเวลา 50 นาที เมื่อครบเวลานำออกมาเติมน้ำแข็งทันที

1.8 อ่านค่า transmission ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร

2. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ *para*-aminohippuric acid (PAH) (Smith *et al.*, 1945)

2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน PAH เตรียมโดยใช้ผง PAH ละลายด้วยน้ำกลั่น โดยให้ความเข้มข้น 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 และ 0.1 mg%

2.2 เตรียมสารเคมีที่จะใช้เป็น reagents ได้แก่

0.2 N HCL

0.1% sodium nitrite, NaNO₂

0.5% ammonium sulphamate, H₆N₂O₃S

0.1% N-(1-naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride (N-1-NED)

3.2% Trichloroacetic acid (TCA)

2.3 นำตัวอย่าง plasma ปริมาตร 50 μ l ใส่ในหลอดทดลอง ซึ่งแต่ละหลอดมี 3.2% TCA ปริมาตร 1100 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นดูดเอาเฉพาะของเหลวปริมาตร 1 ml มาทดลองต่อไป

2.4 นำ urine ปริมาตร 10 μ l เจือจางครั้งแรกใน 3.2% TCA ปริมาตร 1100 μ l ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 10 μ l เจือจางครั้งที่สองใน 3.2% TCA ปริมาตร 1100 μ l อีกครั้ง (ใช้กรณีที่อัตราการขับ urine เท่ากับ 10 μ l 100 g⁻¹ min⁻¹ แต่ถ้ากรณีอัตราการขับ urine สูงกว่านี้ การเจือจางครั้งที่สองจะใช้สารละลายปริมาตร 25 μ l) จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วดูดเอาสารละลายปริมาตร 100 μ l ใส่ในหลอดทดลอง

2.5 สำหรับสารละลายมาตรฐานของ plasma และ urine ใช้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมไว้ โดยใช้ปริมาตร 50 μ l ใส่ในหลอดทดลองซึ่งมี 3.2% TCA ปริมาตร 1100 μ l อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน

2.6 นำสารละลายมาตรฐาน สารตัวอย่าง plasma และสารตัวอย่าง urine ที่เตรียมไว้มาทดลองต่อไป โดยแต่ละหลอดจะใส่สารละลาย 0.2 N HCl ปริมาตร 200 μ l และ 0.1% NaNO₂ ปริมาตร 100 μ l ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที หลังจากนั้นใส่สารละลาย 0.5% ammonium sulfamate ปริมาตร 100 μ l ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที หลังจากนั้นใส่สารละลาย 0.1% N-(1-naphtyl) ปริมาตร 100 μ l ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20-60 นาที

2.7 อ่านค่า transmission ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร

3. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ lithium

3.1 เตรียม lithium diluent ประกอบด้วย KCl 4.7 mmol/l, Triton-X 0.1 g/l ผสมในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้เข้ากัน

3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน lithium chloride ละลายใน lithium diluent ให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.018, 0.036, 0.072, 0.108, 0.144 และ 1.018 mmol/l นำสารละลายมาตรฐานปริมาตร 100 μ l ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml

3.3 นำตัวอย่าง plasma ปริมาตร 100 μ l ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml

3.4 นำตัวอย่าง urine ปริมาตร 100 μ l ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นผสมด้วย lithium diluent จนได้ปริมาตร 2 ml

3.5 วิเคราะห์หาปริมาณ lithium ด้วยเครื่อง inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP-AES) ที่ช่วงคลื่น 670.8 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 แสดงค่าความแรงการบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนของหนูแร้ที่แยกออก จากตัวที่ได้รับ ethanol (n = 6), cerberin (n = 6), 17 β -neriifolin (n = 6) หรือ digoxin (n = 7) ขนาดต่างๆ

Substances and drugs	Force of contraction (cm)				Heart rate (beat min ⁻¹)			
	control	0-1 min	1-10 min	10-20 min	control	0-1 min	1-10 min	10-20 min
Ethanol (%)								
0.012	1.0±0.11	1.0±0.10	1.0±0.10	1.0±0.10	284±4	282±3	283±3	285±3
0.025	1.1±0.31	1.1±0.28	1.1±0.28	1.1±0.31	280±7	276±6	275±8	278±6
0.062	1.2±0.04	1.2±0.06	1.2±0.04	1.2±0.04	282±10	282±10	278±10	280±8
0.125	1.3±0.11	1.3±0.12	1.2±0.12	1.3±0.11	280±7	280±7	281±7	279±6
0.188	1.3±0.07	1.3±0.07	1.3±0.07	1.3±0.09	275±3	273±3	278±4	278±4
Cerberin ($\mu\text{g ml}^{-1}$)								
0.25	1.1±1.02	1.1±0.80	1.1±1.05	1.1±2.10	274±1	273±1	273±1	271±2
2.5	1.2±1.35	1.2±1.05	1.2±2.39	1.3±4.59	268±3	267±1	268±1	268±2
6.25	1.1±1.04	1.1±0.83	1.2±1.38**	1.2±4.2*	273±2	265±2*	267±1*	267±6
12.5	1.1±2.11	1.2±3.07	1.3±5.57**	1.5±1.60**	273±3	263±3*	263±3*	264±2*
18.75	1.4±3.07	1.5±4.46	1.9±1.64*	2.1±2.60*	274±3	267±4	267±5	304±7
17 β -neriifolin ($\mu\text{g ml}^{-1}$)								
0.25								
2.5	1.0±2.20	1.0±3.30	1.0±5.60	1.1±6.50	266±2	265±1	264±1	264±2
6.25	1.3±1.05	1.4±1.80	1.5±4.40*	1.5±5.40*	263±1	263±1	261±1	261±1
12.5	1.4±3.40	1.4±4.50	1.6±6.10**	1.8±8.20*	267±2	262±2*	265±2	266±4
18.75	1.4±2.50	1.5±3.30	2.2±2.00*	2.7±2.00**	264±4	263±1	288±9	301±9
	1.3±1.00	1.4±1.05	2.1±2.40*	3.1±4.00*	262±3	263±2	318±7*	389±6***
Digoxin ($\mu\text{g ml}^{-1}$)								
0.25	0.9±2.00	0.9±2.60	0.9±2.40	1.0±2.90*	290±1	288±1	287±3	286±4
2.5	1.0±1.00	1.0±1.70	1.2±2.80*	1.2±2.30*	289±2	279±3*	287±2	289±3
6.25	1.3±1.40	1.4±1.70**	1.6±9.3*	1.6±10.0*	282±2	265±2*	287±3	294±4
12.5	0.9±2.50	1.4±3.60**	1.8±4.00***	1.8±6.00***	289±1	253±5**	306±4	327±3
18.75	1.0±3.00	1.1±4.8	1.3±8.7**	?	284±1	229±4**	315±6	?

ค่าที่แสดงคือ mean±S.E.M.

*, **, *** แสดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05, P<0.01 และ P<0.001 ตามลำดับ

? หัวใจหยุดเต้น