

2. วิธีการทดลอง

การวิจัยนี้ แบ่งออกเป็น 3 การศึกษาย่อย ได้แก่

1. ผลของการบริโภคกระชายดำ (กระชายดำแห้ง 1,350 มิลลิกรัม, ก่อนการทดสอบ 90 นาที) ต่อผลสมรรถนะการออกกำลังกายแบบ anaerobic และ aerobic
2. ผลของการบริโภคกระชายดำ (กระชายดำแห้ง 1,350 มิลลิกรัม/วัน, เป็นเวลา 8 สัปดาห์) ต่อสมรรถนะการออกกำลังกายและการทดสอบความทนทานของกลูโคสเทียบกับกลุ่มควบคุม
3. ผลของการบริโภคกระชายดำ (กระชายดำแห้ง 1,350 มิลลิกรัม/วัน, เป็นเวลา 8 สัปดาห์) ควบคู่ไปกับการฝึกสมรรถภาพการออกกำลังกาย (60% work max, 60 นาที/ครั้ง, 3 ครั้ง/สัปดาห์) ต่อสมรรถนะการออกกำลังกายและการทดสอบความทนทานของกลูโคสเทียบกับกลุ่มควบคุม

หมายเหตุ โครงการนี้ได้ปรับปรุงเพิ่มการศึกษาผลกระชายดำในระยะเฉียบพลัน (การศึกษาย่อย 1) เพิ่มเติมจากที่เสนอโครงการไว้ก่อนหน้านี้เพื่อให้ได้ผลการศึกษานำไปสู่การศึกษาผลของกระชายดำในระยะยาว และเพิ่มความสมบูรณ์ของเหตุผลในการเขียนบทความวิจัยผลของกระชายดำ (การศึกษาย่อย 2 และ 3) ทั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวรเพิ่มเติม

ขั้นตอนการเตรียมการศึกษา

1. การขออนุมัติการทำวิจัยในมนุษย์

เสนอรายละเอียดโครงการวิจัย คำชี้แจงข้อมูลแก่อาสาสมัคร หนังสือแสดงความยินยอม หนังสืออนุญาตจากต้นสังกัด เพื่อขออนุมัติการทำวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการพิจารณางานวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. การระดมอาสาสมัคร

หลังจากได้รับการอนุมัติให้ทำการวิจัยในมนุษย์แล้ว ผู้วิจัยทำการระดมอาสาสมัครเพศชายอายุระหว่าง 18-35 ปี โดยการติดใบประกาศ และการประชาสัมพันธ์ โดยในแต่ละการศึกษาย่อย จะแบ่งกลุ่มอาสาสมัครโดยวิธีการสุ่ม (random sampling) ล่วงหน้า ออกเป็นสองกลุ่มเท่าๆ กัน คือ 1) กลุ่มควบคุมที่รับประทานแคปซูล placebo จำนวน 15 คน และ 2) กลุ่มศึกษาที่รับประทานแคปซูลกระชายดำจำนวน 15 คน ซึ่งอาสาสมัครแต่ละคนจะไม่ทราบว่าตนรับประทานแคปซูลชนิดใด

3. การเตรียมกระชายดำและสาร placebo

งานผลิตยาสมุนไพร ศูนย์ส่งเสริมสุขภาพแผนไทย โรงพยาบาลบางกะทุ่ม อ. บางกะทุ่ม จ. พิจิตรโลก จะดำเนินการจัดเตรียมแคปซูลกระชายดำบริสุทธิ์และ แคปซูลหลอก (placebo) ให้โครงการวิจัยนี้ โดยนำกระชายดำมาล้างให้สะอาด ผานเป็นแว่นบางๆ อบให้แห้ง และนำมาบดเป็นผงละเอียด จากนั้นบรรจุผงกระชายดำนี้ในปริมาณ 450 มิลลิกรัม/แคปซูล และบรรจุขวดในปริมาณ 56 แคปซูล/ขวดสำหรับระยะเวลา 4 สัปดาห์ แคปซูลที่อาสาสมัครบริโภคจึงเป็นกระชายดำบริสุทธิ์ที่ไม่ได้เจือปนแบ่งหรือสิ่งใดในการเตรียมแคปซูลสาร placebo จะใช้ผงแป้งพ่นสีหรือแป้งข้าวเหนียวดัดละเอียด บรรจุในแคปซูลสีเดียวกันและปริมาณเดียวกัน ในการศึกษา งานผลิตยาสมุนไพร จะทำการควบคุมคุณภาพกระชายดำทั้งสามการศึกษาให้มีคุณภาพเหมือนกันด้วยการใช้กระชายดำจากแหล่งวัตถุดิบและฤดูกาลที่เก็บเกี่ยวเดียวกัน ในการศึกษา อาสาสมัครและนักวิจัยผู้ทำการทดสอบสมรรถนะการออกกำลังกายและการทดสอบความทนทานของน้ำตาลกลูโคสจะไม่ทราบว่าอาสาสมัครแต่ละคนรับประทานแคปซูลชนิดใด (double blind design) จะมีเพียงงานเภสัชกรรมของโรงพยาบาลและนักวิจัยที่ปรึกษาเท่านั้นที่ทราบว่าแคปซูลขวดใดเป็นแคปซูลกระชายดำ

4. การเตรียมวัสดุเครื่องมือและอุปกรณ์

ทำการการปรับเทียบค่ามาตรฐาน (calibration) resistant ของจักรยานที่ใช้ทดสอบสมรรถภาพ และเตรียมวัสดุอื่นๆ ที่ใช้ตามขั้นตอนการศึกษา

ขั้นตอนการศึกษา

การศึกษาย่อยที่ 1: ผลระยะเฉียบพลันของการบริโภคกระชายดำต่อผลสมรรถนะการออกกำลังกายแบบ anaerobic และ aerobic

โปรดดู ใน ภาคผนวก (บทความที่ได้จากโครงการ)

Chanchira Wasuntarawat, Sirinat Pengnet, Nutchanon Walaikavinan, Natakorn Kamkaew, Tippaporn Bualoang, Chaivat Toskulkao, and Glenn K. McConell.

No effect of acute ingestion of Thai ginseng (*Kaempferia parviflora*) on sprint and endurance exercise performance in humans. *Journal of Sports Sciences*, 2010, 28(11): 1243-1250.

การศึกษาย่อยที่ 2: ผลของการบริโภคกระชายดำต่อสมรรถนะการออกกำลังกายและการทดสอบความทนทานของกลูโคส

เมื่อได้รับการติดต่อกลับจากอาสาสมัครที่ยินดีเข้าร่วมในโครงการหลังจากได้รับทราบได้อ่านเอกสารคำชี้แจงข้อมูลแก่อาสาสมัครและเข้าใจถึงเหตุผล ลักษณะและความสำคัญของโครงการวิจัย อาสาสมัครจะมาที่ห้องปฏิบัติการ เพื่อ เซ็นหนังสือยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย (Inform consent) ตอบแบบสอบถามข้อมูลด้านสุขภาพ รับการชั่งน้ำหนักและวัดส่วนสูง คำนวณหา Body Mass Index (BMI) ให้อาสาสมัครทดลองปั่นจักรยาน จากนั้นในวันที่ทำการทดสอบ pre-tests และให้อาสาสมัครอดอาหาร 1 คืนก่อนมาทำการทดสอบ การนัดเวลาให้เลือกนัดเวลาในการทดสอบแต่ละครั้งเป็นช่วงเวลาเดียวกัน รวมทั้งชี้แจงให้อาสาสมัครงดเว้นการออกกำลังกายอย่างหนัก การดื่มชา กาแฟ เครื่องดื่มที่มีคาเฟอีน แอลกอฮอล์ บุหรี่ 24 ชั่วโมงก่อนวันทำการทดสอบ รวมถึงการบันทึกรายการอาหารและเครื่องดื่ม 1 วันก่อนวันทำ pre test ซึ่งจะควบคุมให้เหมือนกันในการทำการทดสอบครั้งต่อไป

ก่อนและหลังการบริโภคแคปซูล (pre-test, post-test) อาสาสมัครทั้งหมดจะถูกทดสอบตามลำดับ ดังนี้

- การควบคุมปริมาณน้ำตาลในกระแสเลือดโดยวิธีการทดสอบความทนทานน้ำตาลกลูโคส (Oral Glucose Tolerance Test: OGTT)
- สมรรถนะการออกกำลังกาย (exercise performance) โดยวิธี work max test

Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

เมื่ออาสาสมัครที่อดอาหารอย่างน้อย 6 ชั่วโมงมาที่ห้องปฏิบัติการ ให้อาสาสมัครปัสสาวะและเตรียม intra-venous cannulation ที่แขนข้างใดข้างหนึ่ง โดยจะสอด catheter (20 gauge) ที่ต่อกับ connecting tube เข้าที่เส้นเลือดดำบริเวณ antecubital ของแขนข้างใดข้างหนึ่ง และนำเลือดปริมาณ 2 มิลลิลิตรออกจากเส้นเลือดดำเก็บในหลอด fluoride heparin เป็นค่าตัวอย่างเลือดที่เวลา 0 นาที จากนั้นไล่เลือดบริเวณ connecting tube กลับเข้าไปในเส้นเลือดดำ โดย 0.9 % saline ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ให้อาสาสมัครดื่มน้ำตาลกลูโคส 75 กรัมที่ละลายในน้ำ 250 มิลลิลิตร และเก็บเลือดที่เวลา 30, 60, 90, 120 นาทีหลังจากการดื่มกลูโคส หลังการเก็บเลือดให้ตามด้วย 0.9 % saline ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ทุกครั้ง แขนหลอดตัวอย่างเลือดในถังน้ำแข็งเพื่อรอการวัดปริมาณกลูโคส (มก.%) ในพลาสมา โดย autoanalyzer (Roach) รวมทั้งนำไปวิเคราะห์ plasma insulin โดยใช้ insulin RIA kit (Linco research, Missouri, USA) และ วัดปริมาณ creatinine, SGPT และ SGOT ในกระแสเลือด โดย automated enzymatic colourimetric methods (Hoffmann-La Roche, France) หลังจาก เก็บตัวอย่างเลือดเวลา 120 นาที

เรียบร้อยแล้ว ดึง catheter ออกจากแขน ทำความสะอาดและปิดพลาสติกให้เรียบร้อย จากนั้นให้อาสาสมัครพักสัก 15 นาทีเพื่อทำการทดสอบ work max test ต่อไป

Work Max Test

ให้อาสาสมัครปั่นจักรยานที่ตั้งค่า power output เริ่มต้น ที่ 50 watt เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเพิ่มเพิ่ม power output โดยการเพิ่ม resistance (kg) นาทีละ 25 watt ในทุกๆ นาทีถัดไป จนกระทั่งอาสาสมัครไม่สามารถปั่นได้ครบ 1 นาทีอีก (work max) อาสาสมัครจะต้องพยายามปั่นให้ได้ power (watt) ที่สูงที่สุด และต้องรักษาระดับอัตราการปั่นให้ได้ 60 rpm ตลอดระยะเวลาการเพิ่ม resistant ที่เพิ่มอย่างต่อเนื่องและเป็นลำดับดังกล่าว บันทึก maximum work load ที่ได้ เวลาที่ใช้ในการถึง maximum work load และชี้แจงในทุกๆ work resistance ที่เพิ่มขึ้น หลังการทดสอบให้อาสาสมัครพักรับประทานอาหารและน้ำ ก่อนกลับให้อาสาสมัครรับขวดแคลเซียมที่บรรจุ 56 แคลเซียม เพื่อนำไปรับประทานวันละ 3 แคลเซียมหลังอาหารเช้า ทุกๆ วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และผู้วิจัยจะติดตามอาสาสมัครทุกสัปดาห์ตลอดระยะเวลา 4 สัปดาห์

ภายหลัง 4 สัปดาห์ ผู้วิจัยจะนัดพบและบันทึกลักษณะสุขภาพของอาสาสมัคร น้ำหนักตัว อาการข้างเคียงหรือความเปลี่ยนแปลงใดใดที่พบในช่วง 4 สัปดาห์ที่ผ่านมา พร้อมทั้งนัดวันทำการทดสอบ post tests โดยกำหนดหลังวันที่สิ้นสุดการบริโภคแคลเซียมในสัปดาห์ที่แปดไม่เกิน 2 วัน พร้อมทั้งแจ้งให้อาสาสมัครอดอาหารอย่างน้อย 6 ชั่วโมงก่อนมาทำการทดสอบและงดเว้นการออกกำลังกายอย่างหนัก การดื่มชา กาแฟ เครื่องดื่มที่มีคาเฟอีน แอลกอฮอล์ บุหรี่ 24 ชั่วโมงก่อนวันทำการทดสอบ

ในวัน post-test ผู้วิจัยบันทึกลักษณะสุขภาพของอาสาสมัคร น้ำหนักตัว อาการข้างเคียงหรือความเปลี่ยนแปลงใดใดที่พบ ในช่วง 4 สัปดาห์ที่ผ่านมา หลังจากนั้นทำการทดสอบ oral glucose tolerance test และ work max test ตามลำดับ เช่นเดียวกับวันที่ทดสอบ pre-tests

เปรียบเทียบข้อมูล (mean±SEM) ที่ได้จากการทดสอบก่อนและหลังการรับประทานกระชายดำเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ two -factor (treatment and time) repeated-measures ANOVA การเปรียบเทียบผลระหว่างช่วงเวลาทั้งสาม (pre, mid, post) ภายในกลุ่มโดยใช้ ANOVA และตามด้วย Fisher's least significance difference test หากพบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม การศึกษานี้กำหนดระดับนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

การศึกษาย่อยที่ 3: ผลของการฝึกสมรรถภาพร่างกายแบบทนทานร่วมกับการบริโภคกระชายดำต่อการเพิ่มสมรรถนะการออกกำลังกายและประสิทธิภาพการควบคุมน้ำตาลกลูโคส

ขั้นตอนการศึกษาจะเหมือนกับการศึกษาย่อยที่สองทุกด้าน แต่มีการเพิ่มการฝึกสมรรถภาพร่างกาย (training) โดยการปั่นจักรยานที่ระดับ 60% work max เป็นเวลา 60 นาที/ครั้ง จำนวน 3 ครั้ง/สัปดาห์ ที่ห้องปฏิบัติการ ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ และรับประทานแคปซูลตลอด 8 สัปดาห์นี้

นอกจากการวัด glucose, insulin แล้ว เลือด 1 มล. ที่เก็บได้ในแต่ละนาทีของการทำ work max test ตั้งแต่เริ่ม-จนถึงสิ้นสุด จะแบ่งใส่ในหลอดที่มี perchloric acid เพื่อนำไปวิเคราะห์ blood lactate โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์ lactate dehydrogenase และวัดค่าดูดกลืนแสงของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ต่อไป

หมายเหตุ ในการศึกษาย่อยที่ 2 และ 3 นี้ได้ทำเพิ่มเติมจากที่เสนอโครงการไว้ ดังนี้

1. การตรวจวัด creatinine, SGOT, SGPT เพื่อศึกษาผลการบริโภคกระชายดำเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ต่อการทำงานของตับและไต ทั้งนี้เพื่อเพิ่มการเฝ้าระวังความปลอดภัยของอาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษา ตามคำแนะนำของคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เนื่องจากขณะที่เริ่มโครงการยังไม่มีการศึกษาผลของการบริโภคกระชายดำในมนุษย์
2. การตรวจวัด insulin (การศึกษาย่อยที่ 2 และ 3) เพื่อความสมบูรณ์ของเนื้อหาสำหรับการยื่นขอตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ เนื่องจาก Insulin จะช่วยอธิบายความสอดคล้องของผลการทดสอบความทนทานของน้ำตาลกลูโคส
3. การตรวจวัด lactate threshold (การศึกษาย่อยที่ 3) เพื่อเพิ่มตัวแปรการทดสอบและโอกาสการตรวจพบ (ระดับความไว) ในการศึกษาผลของกระชายดำต่อสมรรถนะการออกกำลังกายในมนุษย์

Lactate threshold คือ ค่าความหนักของการออกกำลังกาย (watts หรือ %VO₂max) ที่ทำให้เริ่มมีการสะสม lactate ในเลือดมากกว่าระยะพัก บุคคลที่มีค่า lactate threshold มากกว่า จะสามารถออกกำลังกายได้ทนทานกว่าบุคคลที่มีค่า Lactate threshold ต่ำกว่า เนื่องจากถ้ามี lactate เร็วจะทำให้เกิดอาการเมื่อยล้าของกล้ามเนื้อเร็วขึ้น