

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

“การทดสอบความเป็นพิษของน้ำสกัดใบรางจืด
(*Thunbergia laurifolia* Linn.) ในหนูขาว”

*“Toxicity Tests of Rang Jert (*Thunbergia laurifolia* Linn.) Leaves
Aqueous Extract in Rats”*

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ เรืองยุทธิกการณ

นางสาววิวรรณ พิสิฐพงศ์พันธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. อำไพ ปั่นทอง

รองศาสตราจารย์ ดร. อุษณีย์ วินิจเขตคำนวน

รองศาสตราจารย์ พญ. นิรัช เลิศประเสริฐสุข

ดร. ไชยง รุจนเวท

ตุลาคม 2546

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชานิติเวชศาสตร์ ชีวเคมี เกสัชวิทยา และสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ สาขาคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่มีส่วนช่วยเหลืออำนวยความสะดวกให้งานวิจัยนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนพัฒนาคณะแพทยศาสตร์ ส่วนส่งเสริมการวิจัย ประจำปี 2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่ถูกนำมาใช้แก้พิษสารพิษหลายชนิดในรูปชาขงคัมและแคปซูล แต่ยังไม่มียางานการศึกษาความเป็นพิษของสมุนไพรรางจืดมาก่อน การวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาความเป็นพิษของรางจืดเมื่อบริโภคขนาดสูง และขนาดเท่ากับการดื่มชาในคนทุกวันต่อเนื่องกัน โดยใช้หนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley เป็นสัตว์ทดลอง พร้อมกับศึกษาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของรางจืด โดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ผลการทดลองพบว่าน้ำสกัดใบรางจืดขนาดสูง 10 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่เปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไปของหนูขาวและไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายใน และเมื่อทดสอบให้น้ำสกัดใบรางจืดขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อเนื่องกันเป็นเวลา 28 วัน พบว่าไม่มีหนูขาวตัวใดเสียชีวิตในระหว่างการทดสอบ ไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทั้งหมด ยกเว้นน้ำหนักของตับและไตของกลุ่มหนูขาวเพศผู้ ($n=12$) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($n=12$) ที่ให้น้ำแทนน้ำสกัดใบรางจืด นอกจากนี้พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด เม็ดเลือดขาวชนิด eosinophile เพิ่มขึ้น แต่น้ำตาลและระดับคาร์บอนไดออกไซด์ในเลือดลดลง ในขณะที่กลุ่มหนูขาวเพศเมีย ($n=12$) มีระดับเอนไซม์ aspartate transaminase เพิ่มขึ้น และระดับ chloride ในเลือดลดลง ในกลุ่มหนูขาวที่ได้รับน้ำสกัดใบรางจืดเป็นเวลา 28 วันและหยุดให้เพื่อสังเกตอาการต่อไปอีกเป็นเวลา 14 วัน พบว่าน้ำหนักตับและไตของหนูขาวเพศเมียกลับลดลง แต่จำนวนเม็ดเลือดขาวของหนูขาวกลุ่มเพศผู้ยังคงสูงอยู่ ส่วนระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ ในขณะที่ BUN เพิ่มขึ้นทั้งกลุ่มหนูขาวเพศผู้และเพศเมีย creatinine, direct bilirubin, aspartate transaminase, Na และ K เพิ่มขึ้น เฉพาะในกลุ่มหนูขาวเพศเมียเท่านั้น นอกจากนี้พบว่าระดับ malondialdehyde ซึ่งเป็นผลผลิตของการเกิด lipid peroxidation ในซีรัมของหนูขาวเพศผู้ลดลงอย่างชัดเจน ($P<0.001$) และรางจืดความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิตรไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนแบคทีเรีย

สรุปการศึกษาครั้งนี้ได้ว่ารางจืดไม่เป็นพิษต่อหนูขาวเมื่อได้รับในขนาดสูงครั้งเดียวและไม่ทำให้พฤติกรรมหนูขาวเปลี่ยนไป แต่หากบริโภคเป็นระยะเวลานานต่อเนื่องกันอาจมีผลต่อตับและไต อย่างไรก็ตามน้ำสกัดใบรางจืดไม่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระและไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนแบคทีเรีย

ABSTRACT

Rang Jert (*Thunbergia laurifolia* Linn.) is a Thai herbal medicinal plant used as antidote for many toxic substances in the forms of powder preparation and capsule. However, the toxicity of Rang Jert has not been reported. The objective of this study was to determine the toxicity of Rang Jert in rats at a high dose and at the dose equivalent to the quantity of daily drinking tea in human. Acute and 28 days repeated oral dose toxicity studies were performed using Sprague-Dawley rats of both sexes. Bacteria *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 were used in the study of mutagenicity. The results revealed that the aqueous extract of Rang Jert leaves at a single oral dose of 10 grams per kilogram bodyweight did not alter the general behavior and the feature of the visceral organs of rats. In addition, the extract at an oral dose of 500 milligrams per kilogram bodyweight given 28 days continually did not produce mortal effect or changes in gross morphology of the internal organs of the rats. No histological changes of visceral organs in every group of rats were found, except the mean weight of the livers and kidneys of the male tested group (n=12) were statistically significant higher than those of the control ($p<0.05$). The leukocyte and eosinophil counts were increased while glucose and carbondioxide levels were decreased. In the female tested group (n=12), the level of aspartate aminotransferase was increased and chloride level was decreased. In a separated group where the rats were treated with the extract for 28 days and kept for a further 14 days observation without treatment, the liver's and kidney's weight in the treated female group were decreased. Leukocyte count of treated male group was still elevated while glucose level was suppressed. BUN was increased in both treated female and male groups whereas creatinine, direct bilirubin, aspartate aminotransferase, sodium and potassium were increased in only treated female group. Furthermore, malondialdehyde, a by product of lipid peroxidation, decreased significantly in the treated male group ($p<0.001$). The aqueous extract of Rang Jert Leaves at the concentrations of 2.5, 5, 10 and 20 milligrams per milliliter did not cause bacterial genome mutation.

In conclusion, the aqueous extract of Rang Jert leaves in the massive single dose did not produce toxic effects and change behavioral patterns in rats. However, in the long term

consumption the aqueous extract of Rang Jert leaves might have a consequence on the liver and kidney. Moreover, Rang Jert leaves extract did not induce free radical formation and was not a bacterial mutagen.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ	๗
บทคัดย่อ	๘
Abstract	๙
สารบัญเรื่อง	๑๐
สารบัญตาราง	๑๑
สารบัญรูปภาพ	๑๒
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	๑๓
บทนำ	๑๔
วัตถุประสงค์และอุปกรณ์การวิจัย	๑๕
วิธีดำเนินการวิจัย	๑๖
ผลการวิจัย	๑๗
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	๓๓
บรรณานุกรม	๔๐
ผลงานเผยแพร่	๔๕

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	การบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของหนูขาวที่ไม่สลบ	11
2	น้ำหนักตัว (กรัม) ที่เพิ่มขึ้นใน 7 วัน ของหนูขาวในการทดสอบการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไปให้น้ำสกัดใบรางจืดในขนาด 10 g/kg	20
3	น้ำหนักตัวของหนูขาวเมื่อน้ำสกัดใบรางจืดในขนาด 500 mg/kg เป็นเวลา 28 วัน	21
4	น้ำหนักอวัยวะภายในหนูขาวเพศผู้เมื่อน้ำสกัดใบรางจืดในขนาด 500 mg/kg เป็นเวลา 28 วัน	22
5	น้ำหนักอวัยวะภายในหนูขาวเพศเมียเมื่อน้ำสกัดใบรางจืดในขนาด 500 mg/kg เป็นเวลา 28 วัน	23
6	น้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาวที่ได้รับรางจืดขนาด 500 mg/kg เป็นเวลา 28 วัน และหยุดให้เป็นเวลา 14 วัน	24
7	ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับน้ำสกัดใบรางจืดในขนาด 500 mg/kg เป็นเวลา 28 วัน	25
8	ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับน้ำสกัดใบรางจืดในขนาด 500 mg/kg เป็นเวลา 28 วัน	26
9	ค่าทางเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับน้ำสกัดใบรางจืดในขนาด 500 mg/kg เป็นเวลา 28 วัน	27
10	แสดงค่าทางเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับน้ำสกัดใบรางจืดในขนาด 500 mg/kg เป็นเวลา 28 วัน	28
11	ปริมาณของ malondialdehyde (μM) ในซีรัมของหนูขาวเพศผู้	30
12	ปริมาณของ malondialdehyde (μM) ในซีรัมของหนูขาวเพศเมีย	31
13	แสดงค่า mutant colonies ของแบคทีเรีย <i>Salmonella typhimurium</i> เมื่อทดสอบด้วยน้ำสกัดใบรางจืดในความเข้มข้นต่าง ๆ ในสภาวะที่มี (+) และไม่มี (-) การกระตุ้นด้วยเอนไซม์ S9 mix	32

สารบัญรูปภาพ

รูป

1

ลักษณะรางจืดดอกสีม่วง

หน้า

1



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ALK	alkaline phosphatase
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
BUN	blood urea nitrogen
BW	Bodyweight
Cl	Chloride
CO ₂	Carbondioxide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acids
g	Gram
Hb	Hemoglobin
Hct	Hematocrit
K	Potassium
LD ₅₀	half lethal dose
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	mean corpuscular volume
MDA	Malondialdehyde
OECD	Organization for economic co-operation and development
PMNs	Polymorphonuclear neutrophils
PUFAs	Polyunsaturated fatty acids
WBC	white blood cell count
μg	Microgram
μL	Microliter
μM	Micromolar

บทนำ

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่รู้จักกันดีและใช้แพร่หลายในวงการแพทย์แผนโบราณ จากตำรายาสมุนไพร กล่าวว่ารางจืดมีรสเย็น ใช้ปรุงเป็นยาเขียว ถอนพิษไข้ แก้เบื่อเมา แก้ร้อนในกระหายน้ำ ประจำเดือนไม่ปกติ ปวดหู อักเสบ ปวดบวม และใช้รักษาผู้ป่วยที่ถูกยาพิษต่าง ๆ เป็นต้นว่า พิษจากสุรา เห็ดเมา พิษเนื่องจากอาการแพ้ หรือรับประทานสัตว์ที่มีพิษ เช่น ปลาปักเป้าทะเลบางชนิด แมงดาทะเลชนิดที่มีพิษ รวมทั้งใช้รักษาผู้ที่ได้รับสารเคมีที่มีพิษร้ายแรง เช่น สารหนู สตรีนิน และสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ ^{1,2,3}

รางจืด (รูป 1) เป็นพืชในวงศ์ thunbergiaceae^{4,5} เป็นพรรณไม้เถาชนิดหนึ่งมักพบอยู่ตามชายป่าดิบ ชอบอาศัยพันเกาะเกี่ยวกับต้นไม้ใหญ่ มีเถาที่แข็งแรงมาก ลักษณะของเถากลมเป็นข้อปล้อง มีสีเขียว ใบเป็นไม้ใบเดี่ยวออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ และขนาดของใบจะไล่กันขึ้นไปตั้งแต่ขนาดเล็กตรงโคนก้านไปหาขนาดใหญ่ตรงปลายก้านใบ ใบสีเขียวผิวเกลี้ยง ลักษณะเป็นรูปหัวใจ ตรงโคนเว้า ปลายใบเป็นติ่งแหลม กว้างประมาณ 4-5 เซนติเมตร ยาว 8-10 เซนติเมตร ออกดอกเป็นช่ออยู่ตามง่ามใบ ช่อ ๆ หนึ่งจะมีดอกอยู่ 3-4 ดอก ห้อยระย้าลงมา ลักษณะของดอกเป็นกรวยตื้น ๆ หลอดกรวยยาวประมาณ 1 เซนติเมตร



รูป 1 ลักษณะของรางจืดดอกสีม่วง (*Thunbergia laurifolia* Linn.)

ปลายดอกจะแยกเป็นแฉกอยู่ 5 แฉก หรือ 5 กลีบ ดอกเป็นสีม่วงอ่อน ๆ หรือสีคราม ดอกที่ยังอ่อนหรือยังไม่บานมีกาบห่อหุ้มอยู่ ดอกบานเต็มที่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 นิ้ว ภายในหลอดดอกเป็นสีขาวมีเกสรตัวผู้อยู่ประมาณ 4 อัน จะผลิติดอกในเดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม พอดอกกว้างโรยไปก็จะติดเป็นผล มีลักษณะเป็นฝัก ตรงปลายฝักแหลมคล้ายกับปากนก ส่วนโคนกลมยาวประมาณ 1-1.5 นิ้ว เมื่อผลแก่จะแตกออกเป็น 2 ซีก¹ มีการกระจายพันธุ์อยู่แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ขึ้นได้ในดินทุกชนิด พบทั่วไปตามชายป่าดิบ ป่าละเมาะ ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด ปักชำ และตอนกิ่ง⁶

รางจืดมีชื่อเรียกได้หลายชื่อ ได้แก่ กำลังช้างเผือก ขาเขียว เครือขาเขียว ขอบชะนาง หานามแน (เหนือ) ย้าแย (อุตรดิตถ์) น้านอง (สระบุรี) คาย รางเย็น (ยะลา) ดูเหว่า (ปัตตานี) รางเย็น ทิดพุด (นครศรีธรรมราช) จอลอติเออ ปังกะละ ชังกะ พอหน่อเตอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) แอดแอ (เพชรบูรณ์) และรางจืดเถา^{3,7}

มีต้นไม้อีกหนึ่งชนิดหนึ่งที่มีลักษณะคล้ายกับรางจืดมากและอยู่ในวงศ์ Thunbergiaceae เดียวกันคือ ช่ออินทนิล หรือสร้อยอินทนิล (*Thunbergia grandiflora* Roxb.) ดอกมีลักษณะทั่วไปคล้ายกัน ใบมีขนาดใกล้เคียงกัน แต่รางจืดมีดอกไม่มากเท่ากับสร้อยอินทนิล ใบของรางจืดจะเป็นรูปไข่และแคบกว่า ใบเกลี้ยง เส้นกลางใบมี 3 เส้น ส่วนสร้อยอินทนิลมีดอกห้อยเป็นช่อยาวมาก ใบสาก มีเส้นกลางใบ 5-7 เส้น^{2,9}

ตำรายาสมุนไพรของชลอ อุทกภาชนิ¹ แบ่งรางจืดออกเป็น 3 ชนิด คือ

1. รางจืดชนิดเถา (*Thunbergia laurifolia* Linn.) รางจืดชนิดเถานี้เป็นรางจืดตัวผู้ ดอกสีม่วง มีสารออกฤทธิ์ที่รากและใบสูงกว่าดอกสีเหลืองและสีขาวหลายเท่า
2. รางจืดชนิดคั่น (*Milica kityana*) เป็นไม้ล้มลุกและเป็นไม้พุ่มสูงไม่เกิน 6 ฟุต ดอกสีเหลืองเหมือนดอกถั่ว และมีฝักเหมือนฝักถั่ว สารออกฤทธิ์อยู่ที่ราก สามารถใช้ถอนยาสั่งหรือยาพิษได้ แต่สรรพคุณในการรักษาโรคน้อยกว่ารางจืดชนิดเถา
3. รางจืดชนิดควั่น ลักษณะเป็นกอเหมือนต้นขมิ้น มีหัวคล้ายหัวขมิ้นแต่มีสีขาว ถ้าหักมาดมจะได้กลิ่นหอมน่ารับประทาน มีสรรพคุณในการถอนพิษยาสั่งและสารพิษต่าง ๆ ได้เช่นเดียวกัน

สรรพคุณของรางจืดชนิดเถามีระบุไว้ดังนี้

ใบสด : แก้ไข้ ถอนพิษ¹⁰ แก้โรคประจำเดือนผิดปกติ (มาเลเชีย)¹¹

ใบแห้ง : ถอนพิษจากสารเคมี เช่น สตรีนิน สารหนู และพิษจากแมลง¹²

รากและเถา : แก้อ่อนในกระหายน้ำ รักษาพิษร้อนทั้งปวง⁴

ทั้งต้น : รสจืดเย็น ปฏยาแก้มะเร็ง³

ราก : แก้วม แก้วเสบ¹³

มีรายงานการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและเภสัชวิทยาของรากจืดว่าสารเคมีที่พบในรากจืดส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม flavonoids ได้แก่ apigenin, cosmosin และ delphinidin-3,5-di-o- β -D-glucoside เป็นต้น¹⁴

วีระยุทธ¹⁵ ได้ทำการวิเคราะห์หาส่วนประกอบของใบรางจืดโดยการสกัดด้วยน้ำและ methanol ใช้วิธี chromatography พบว่าน้ำสกัดประกอบด้วย amino acids 4 ชนิดคือ methionine, glycine, serine และ unidentified amino acid อีกหนึ่งชนิด แต่หากสกัดด้วย petroleum ether ที่ 50-70°C พบว่ามี steroids 8 ชนิด และมี carotenoid อีก 1 ชนิด

การศึกษาองค์ประกอบสำคัญของใบรางจืดสด โดยการสกัดด้วย ethyl alcohol และ hexane พบว่าประกอบด้วยสารในกลุ่ม steroids อย่างน้อย 6 ชนิด^{16,17}

ศิริวรรณ¹⁸ ได้ศึกษาวิจัยพบว่าสารสกัด ether และสารสกัด petroleum ether ของใบรางจืดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย aerobacter aerogens ได้

บุญเกิด และคณะ¹⁹ ศึกษาฤทธิ์นอกกายต่อการเจริญของไวรัส hepes simplex type 1 ด้วยน้ำสกัดรางจืด ที่ระดับความเข้มข้นซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดไวรัส พบว่าน้ำสกัดใบรางจืดมีฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัสได้โดยตรง โดยมีผลยับยั้งการเพิ่มปริมาณของไวรัสในเซลล์ที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ แต่ไม่สามารถขัดขวางการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสได้

พานิและชัชวดี²⁰ ได้ศึกษาการต้านพิษเฉียบพลันของสารกำจัดแมลงชนิดออร์กาโนฟอสเฟต (โฟลิคอล E605[®]) ในหนูขาวโดยใช้น้ำสกัดใบรางจืด พบว่าน้ำสกัดใบรางจืดสดสามารถลดอัตราการตายของหนูขาวจากร้อยละ 60 $\pm$ 7 เป็นร้อยละ 25 $\pm$ 8.66 ซึ่งได้ผลดีเท่ากับการใช้ atropine ร่วมกับ 2-PAM

วีระวรรณ²¹ ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำสกัดใบรางจืดต่อกล้ามเนื้อเรียบ พบว่าน้ำสกัดใบรางจืดแห้งมีผลลดการทำงานของระบบไหลเวียนโลหิต ทำให้ความดันโลหิตลดลง มีผลต่อเส้นเลือดแดงของคนที่แยกจากสายสะดือของทารกแรกคลอดเป็น 2 ระยะคือ ทำให้เส้นเลือดหดตัว (vasoconstriction) และตามด้วยการคลายตัว (vasodilatation) และหากใช้น้ำสกัดใบรางจืดในขนาดสูง การคลายตัวของเส้นเลือดในระยะที่สองจะเห็นชัดเจนกว่าการใช้ความเข้มข้นขนาดต่ำ มีผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบของลำไส้เล็กของหนูขาวเกิดการคลายตัวในระยะสั้นและตามด้วยการหดตัว การเพิ่มของความตึงตัวและแรงบีบตัวของลำไส้ที่เกิดขึ้นไม่ได้เกี่ยวข้องกับ histaminic และ cholinergic receptor ผลต่อลำไส้ของหนูขาวทำให้ลำไส้คลายตัวก่อนในช่วงเวลาสั้น ๆ แล้วตามด้วยการหดตัวอย่างเด่นชัด นอกจากนี้ น้ำสกัดใบรางจืดยังกระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดลม

หนูตะเภา และกล้ามเนื้อเรียบของมดลูกหนูขาว ซึ่งผลต่อกล้ามเนื้อเรียบนี้ไม่สามารถต้านฤทธิ์ด้วย atropine และ diphenhydramine

บุษบง²² ศึกษาผลของใบรางจืดต่ออุณหภูมิของร่างกายในหนูขาว พบว่าใบรางจืดมีผลลดอุณหภูมิร่างกายของหนูขาวได้ คาดว่าน้ำสกัดใบรางจืดอาจจะออกฤทธิ์ลดอุณหภูมิของร่างกายโดยผ่านศูนย์ควบคุมอุณหภูมิในสมอง และ/หรือ ทำให้มีการขยายตัวของหลอดเลือด เพิ่มการสูญเสียความร้อนออกจากร่างกาย เป็นเหตุให้อุณหภูมิของร่างกายลดลงได้

ธีระและธำรงค์²³ ศึกษาฤทธิ์ของรากรางจืดในการแก้พิษสตริกนินซัลเฟตในหนูขาว พบว่ารากรางจืดไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสตริกนินซัลเฟตได้ การศึกษาในหลอดทดลองพบว่า รากรางจืดแห้งที่ทำเป็นผงมีคุณสมบัติดูดซับสตริกนินซัลเฟตไว้ได้

ชัชวดีและพานิ²⁴ ศึกษาเกี่ยวกับการใช้รางจืดแก้พิษสุรา พบว่าน้ำสกัดใบรางจืดมีผลต่อ motor activity ของหนูขาวทั้งก่อนและหลังการให้ ethanol 17.5% หรือสุราแม่โขง 35 ดีกรี และเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำสกัดใบรางจืดที่สกัดด้วยน้ำและน้ำชาขี้ขาว พบว่าฤทธิ์การกระแบบประสาทส่วนกลางของสุราแม่โขงจะถูกต้านฤทธิ์ได้เฉพาะกับน้ำสกัดใบรางจืดที่สกัดด้วยน้ำชาขี้ขาวเท่านั้น และการต้านฤทธิ์นี้เกิดขึ้นในระยะเวลาสั้น ๆ ประมาณ 5 นาที

Chanawirat²⁵ ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการป้องกันการทำลายตับเนื่องจากอัลกอฮอล์ในหนูถีบจักร พบว่าที่ระยะเวลา 15 ชั่วโมงหลังจากได้รับอัลกอฮอล์สารสกัดใบรางจืดมีผลลดการเกิดพิษที่ตับได้

สุพร และคณะ¹⁷ ได้สกัดสารสำคัญจากใบรางจืด และทำให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography และ thin layer chromatography พบว่า สารสกัดใบรางจืดมีสารสำคัญที่มีสูตรโครงสร้างคล้าย steroids โดยพบจำนวน 4 ชนิดเมื่อสกัดด้วย ethyl alcohol และ 2 ชนิดเมื่อสกัดด้วย hexane และศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในหนูทดลองโดยวิธี carragenin-induced paw edema พบว่า สารสกัดอัลกอฮอล์และสารสกัดเฮกเซนมีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) จึงได้พัฒนาเป็นยาทาภายนอกสำหรับด้านการอักเสบ

สุริยงค์²⁶ ศึกษาระดับน้ำตาลในเลือดเปรียบเทียบก่อนและหลังการให้สารสกัดรางจืดในหนูขาวปกติและหนูขาวที่เป็นเบาหวาน พบว่าหนูกลุ่มปกติมีปริมาณน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูกลุ่มเบาหวาน

มีการประมาณว่าสารเคมีที่มนุษย์นำมาใช้ในปัจจุบันมีจำนวนมากกว่า 80,000 ชนิด และพบว่าเพิ่มขึ้นทุกปีประมาณ 2,000 ชนิดต่อปี สารเหล่านี้มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ทั้งจากกระบวนการผลิต การขนส่ง การนำไปใช้ และการกำจัด สารเหล่านี้จะอยู่ในรูปของยา อาหาร

เครื่องสำอาง สารกำจัดแมลง สารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรม และผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดในบ้านเรือน ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของประชากรที่มีโอกาสสัมผัสสารเหล่านี้²⁷

ปัจจุบันการนำพืชสมุนไพรมาใช้เพื่อรักษาโรคในมนุษย์มีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากสังคมได้ตระหนักถึงคุณค่าและประโยชน์ของสมุนไพรแทนการใช้สารเคมี แต่พืชสมุนไพรหลายชนิดยังไม่มีข้อมูลด้านความเป็นพิษ เช่นเดียวกับสมุนไพรรางจืด ถึงแม้ว่าจะมีรายงานการวิจัยในแง่ต่าง ๆ มากพอสมควรดังที่กล่าวข้างต้น แต่ยังไม่มีความเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของรางจืดเลย ได้มีบริษัทและหน่วยงานหลายแห่งทำการผลิตและจำหน่ายรางจืดในรูปแบบแคปซูล และชาผงออกวางจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไป ทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงต่อการใช้สมุนไพรรางจืด ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายได้ ดังนั้นการทดสอบความเป็นพิษของรางจืดจะเป็นประโยชน์อย่างมากเพื่อให้ทราบถึงความปลอดภัยของสมุนไพรรางจืดที่มีการนำมาบริโภคและประชาสัมพันธ์ทางเครือข่ายอินเทอร์เน็ตกันทั่วไปแล้วในขณะนี้^{7,13,28}

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไปของหนูขาว เมื่อได้รับน้ำสกัดใบรางจืดในขนาดสูง
2. ศึกษาความเป็นพิษเมื่อให้น้ำสกัดใบรางจืดในขนาดต่ำแก่หนูขาวต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลา 28 วัน (short-term repeated exposure toxicity studies) พร้อมศึกษาความผิดปกติต่าง ๆ ของอวัยวะภายใน และระดับสารเคมีและส่วนประกอบต่าง ๆ ในเลือด
3. ศึกษาความเป็นพิษระดับเซลล์ว่ามีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระหรือไม่ โดยการวัดระดับ malondialdehyde ในซีรัมของหนูขาวหลังจากได้รับน้ำสกัดใบรางจืด
4. ศึกษาความเป็นพิษต่อยีน (genotoxicity) ว่าน้ำสกัดใบรางจืดก่อให้เกิดการกลาย (mutation) ของดีเอ็นเอในแบคทีเรียหรือไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

วัสดุอุปกรณ์การวิจัย

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley ทั้งเพศผู้และเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 150-200 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาสนา มหาวิทยาลัยมหิดล นำหนูขาวเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ที่หน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อให้ปรับตัวคุ้นเคยกับสภาวะแวดล้อมเป็นเวลา 7 วัน ก่อนการทดลอง ควบคุมอุณหภูมิตลอดเวลาที่ $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ เปิดและปิดไฟทุก 12 ชั่วโมง มีผู้ดูแลคอยเปลี่ยนถาดรองปัสสาวะและอุจจาระหนูวันเว้นวัน ได้รับอาหารเม็ดมาตรฐาน (ซี.พี. 082 บริษัท เอส.คัมบลิว.ที.จำกัด) และน้ำตามต้องการ

สารเคมีและการเตรียมเพื่อวัดระดับ MDA

- Trichloroacetic acid (TCA) reagent
ละลาย TCA 100 กรัม ด้วย 0.6 M HCl 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง
- Thiobarbituric acid (TBA) 0.12 M
ชั่ง TBA (Eastman, MW 144.5) 17.298 กรัม ละลายด้วย 0.26 M 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris, MW 121.1) ในปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้องและกรองก่อนใช้
- NSS (normal saline solution)
ชั่ง NaCl 0.85 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง
- MDA standard (100 μM)
เตรียม stock MDA ความเข้มข้น 10 mM โดยใช้ standard tetramethoxypropane (TMP) (MW 164.2) 20.8 μL เติม HCl เข้มข้นลงไปประมาณ 5-8 หยด เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำลงไปให้ครบ 10 mL จะได้ stock MDA ความเข้มข้น 10 μM จากนั้นดูด stock MDA มา 10 μL เติมน้ำลงไป 990 μL จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10 μM นำมาเตรียม standard MDA ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 10, 20, 30 และ 40 μM เพื่อใช้ทำ calibration curve

สารที่ต้องเตรียมสำหรับการทำ Aims' test

- น้ำสกัดใบรางจืดในขนาดความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่าน millipore filter membrane (0.45 μ M)
- 0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.4
- S9 mix ประกอบด้วยเอนไซม์ที่อยู่ใน S9 fraction ซึ่งเตรียมจากตับของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี เพื่อกระตุ้นให้เอนไซม์มี activity เพิ่มขึ้น
- overnight culture ของแบคทีเรีย TA98 หรือ TA100 จำนวน 5 mL
- minimal glucose agar plate
- top agar ที่ปลอดเชื้ออุณหภูมิ 45°C ซึ่งต้องเติมสารละลายผสม 0.5 μ M histidine-biotin ก่อนทำการทดลอง

เครื่องมือ

1. เครื่องผสม (vortex mixer, VM-300)
2. Spectrophotometer (Beckman, DU 605)
3. เครื่องชั่งสาร (Oertling, NA-164)
4. Aspirator (EYELA, A-35)
5. เครื่องปั่น (centrifuge, H-103N series, KOKUSAN)
6. ตู้อบ (incubator, B5050, Heraeus)
7. Autoclave (SS-245, Tomy Seiko)
8. Water shaker bath (Grant, OLS 200)
9. Dispenser (Dispet TM)
10. กล้องจุลทรรศน์ (stereomicroscope, VMZ-4SA-2W, Olympus)
11. Automatic pipette ขนาด 2-20 μ L
12. Automatic pipette ขนาด 10-100 μ L
13. Automatic pipette ขนาด 20-200 μ L
14. Automatic pipette ขนาด 100-1,000 μ L
15. Feeding tube และ syringe ขนาด 1 μ L
16. กรงพลาสติกใช้ในการสังเกตอาการ
17. เครื่องชั่งน้ำหนักหนูขาว ชั่งได้สูงสุด 500 กรัม

18. เครื่องมือผ่าตัด เช่น tissue forceps, scissors, artery clamp, probe เกี่ยวเส้นเลือด และกรรไกร
ตัดเส้นเลือด เป็นต้น
19. Lyophilizer (CHRIST[®], Germany)

สารเคมี

1. Pentobarbital sodium
2. 2-Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma)
3. Trichloroacetic acid (TCA) (ACS, Merck)
4. Bacto agar (Difco)
5. D-Glucose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma)
6. D-Biotin (Sigma)
7. Histidine (Sigma)
8. β -Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma)
9. β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (Sigma)
10. D⁺-glucose anhydrous (Fluka)
11. Dipotassium hydrogenphosphate (Merck)
12. Citric acid monohydrate (Merck)
13. Disodium hydrogen phosphate (Merck)
14. Sodium dihydrogenphosphate (Merck)
15. Magnesium sulfate anhydrous (Merck)

Oxoid nutrient broth No. 2 (Oxoid Ltd.)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดใบรางจืด

เก็บใบรางจืดจากบริเวณทางเข้าอุทยานแห่งชาติออบขาน ต.น้ำแพร่ อ.หางดง จ.เชียงใหม่ โดยเลือกเฉพาะใบที่ไม่แก่หรืออ่อนเกินไป นำมาล้างสิ่งสกปรกออกและเช็ดให้แห้ง ตากใบรางจืดในที่ร่มจนใบแห้งประมาณ 7 วัน นำใบแห้งมาป่นให้ละเอียด เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง นำผงใบรางจืดแห้งที่ได้ชั่งน้ำหนักและสกัดด้วยน้ำร้อนที่ต้มจนเดือดในอัตราส่วน 1:10 (W/V) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองเอาเฉพาะส่วนน้ำด้วยผ้ากอซ 3 ชั้น และกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 นำส่วนที่กรองได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer นำผงสารสกัดใบรางจืดที่ได้ชั่งน้ำหนักและเก็บใส่ขวดสีชา ปิดฝาพ่น parafilm เก็บขวดใน dessicator ที่อุณหภูมิ 4°C ก่อนนำไปใช้

การศึกษาความเป็นพิษ (Toxicity studies)

ทำการทดสอบนาร์รองโดยให้น้ำสกัดใบรางจืดแก่หนูขาวขนาด 2 และ 5 g/kg ใช้หนูขาว 2 ตัว (เพศผู้ 1 เพศเมีย 1) ต่อหนึ่งขนาด และกลุ่มควบคุม 2 ตัว (เพศผู้ 1 เพศเมีย 1) ให้น้ำในปริมาณที่เท่ากัน สังเกตอาการหลังจากให้น้ำสกัดใบรางจืดในเวลา 5, 15, 30 นาที และ 1, 2 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสังเกตอาการทุกวันเป็นเวลา 7 วัน พบว่าหนูขาวไม่มีพฤติกรรมที่ผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุม และไม่พบการเสียชีวิตของสัตว์ทดลองตัวใดเลย ดังนั้นในการทดสอบความเป็นพิษศึกษาการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไปจึงให้น้ำสกัดใบรางจืดแก่หนูขาวในขนาดสูงเพิ่มขึ้นเป็น 10 g/kg

การทดสอบการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไปของหนูขาว (Changes in general behavior of conscious rats)

เตรียมน้ำสกัดใบรางจืดโดยนำผง lyophilized รางจืดที่เก็บไว้ที่ 4°C ในตู้เย็นมาละลายด้วยน้ำกลั่น ใส่ขวดปิดฝาให้สนิท ก่อนนำไปทดสอบหนูขาว ด้วยขนาด 10 g/kg

ป้อนน้ำสกัดใบรางจืดในขนาดสูงครั้งเดียวคือ 10 g/kg แก่หนูขาวจำนวน 10 ตัว (เพศผู้ 5 เพศเมีย 5) เป็นกลุ่มทดสอบ ส่วนกลุ่มควบคุม เป็นหนูขาวจำนวน 10 ตัว (เพศผู้ 5 เพศเมีย 5) ให้น้ำในปริมาณที่เท่ากัน แล้วสังเกตอาการที่เปลี่ยนแปลงของหนูขาวในช่วงเวลาดังนี้ 5, 15, 30 นาที

และ 1, 2 และ 24 ชั่วโมง ดูว่าหนูขาวมีพฤติกรรมที่ผิดปกติไปหรือมีการตายเกิดขึ้นหรือไม่ หลังจากนั้นสังเกตอาการและชั่งน้ำหนักตัววันละ 1 ครั้งทุกวันเป็นเวลา 7 วัน หนูขาวที่ยังมีชีวิตอยู่ครบ 7 วัน ถูกนำมาทำให้สลบด้วยการฉีด pentobarbital ทางช่องท้อง ในขนาด 50 mg/kg และผ่าซาก เพื่อสังเกตความผิดปกติด้วยตาเปล่าของอวัยวะภายในทั้งหมด การสังเกตอาการที่เปลี่ยนแปลงจะอาศัยตาม standard working sheet ที่ดัดแปลงมาจาก standardized work sheet สำหรับการทำการ Hippocratic screening test²⁹ รายละเอียดแสดงไว้ในตาราง 1

การทดสอบความเป็นพิษเมื่อนำสารสกัดใบรางจืดต่อเนื่องกันในหนูขาว (Short term repeated exposure toxicity test)

คำนวณขนาดน้ำสกัดใบรางจืดที่จะให้กับหนูขาวจากขนาดที่ผู้บริโภคมักรับจริง ๆ ใน 1 วัน โดยใช้ผงใบรางจืดแห้งหนักประมาณ 1 กรัมต่อหนึ่งชอง คือประมาณ 3 กรัม/น้ำหนักตัว 60 กิโลกรัม ต่อวัน หรือ 50 mg/kg/day ผงสกัดใบรางจืดแห้งมี yield ประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักใบรางจืดเริ่มต้น ดังนั้นใบรางจืด 50 มิลลิกรัมเมื่อนำมาสกัดแล้วได้ yield เท่ากับ 5 มิลลิกรัม ใช้ค่าความไม่แน่นอนที่อาจเกิดขึ้น (uncertainty factor) ในการกำหนดค่าความปลอดภัย (safety factor)³⁰ จากความแตกต่างระหว่างคนกับสัตว์ (interspecies difference) คือ 10 และความแตกต่างระหว่าง species เดียวกัน (interindividual difference) อีก 10 มาคำนวณขนาดของน้ำสกัดใบรางจืดที่ให้กับหนูขาวคือ $5 \times 10 \times 10$ เท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

นำผง lyophilized รางจืดมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วเก็บในขวดปิดฝาให้สนิทก่อนนำไปป้อนหนูขาวในขนาด 500 mg/kg

ตาราง 1: รายละเอียดของหนูขาวที่ต้องบันทึกเพื่อศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม

Date	Qualitative and Semi-quantitative Screening and Toxicity Report of:																								
Vehicle of sample:	Test animal:										Fasted ?														
Concentration:	Sex:					Mark:										Color mark:									
Group:	No.										Weight (G):														
Route of exposure:	Time:										Evaluated by:														
Body weight (gm) day1-7																									
Time: (min) post dosag											Time: (min) post dosag														
PARAMETER	RESPONSE										PARAMETER										RESPONSE				
CNS											EARS, ORAL, MUCC														
Motor Activity											Blanching														
Ataxia											Hyperemia														
Loss. Righting Reflex											Cyanosis														
Analgesia											GENERAL														
Resp. Rate											Salivation														
Resp. Depth											Tail Erection														
Paralysis: legs											Pilomotor Erection														
Screen grip: H.L. loss											Micturation														
Screen grip: F.L. loss											Diarrhea														
Fine Body Tremors											Circling Motions														
Coarse Body Tremors											Tail Lashing														
Fasciculation											Abdominal Gripping														
Clonic Convulsions																									
Tonic Convulsions											Head Tap: Aggressive														
Mixed Type Convulsio											Head Tap: Passive														
EYES											Head Tap: Fearful														
Enophthalmos											Body Touch: Aggressive														
Exophthalmos											Body Touch: Passive														
Palpebral Ptosis											Body Touch: Fearful														
Lacrimation											Status Positions														
Bloody Tears											Excess Curiosity														
DEATH AND AUTOPSY NOTES																									