Original Article

ความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดใบพญาวานร

Acute Toxicity and Sub-acute Toxicity of *Pseuderanthemun palatiferum* (Nees) Radlk. Leaf Extract

พีรวิชญ์ พาดี[1]*, สมศักดิ์ นวลแก้ว[2], ชูศรี ตลับมุข[3], สุภาษร สกุลใจตรง[4]
Peerawit Padee[1]*, Somsak Nualkeaw[2], Chusri Talubmook[3], Supasorn Sakuljaitrong[4]

Received: 30 March 2009 **Accepted:** 12 May 2009

บทคัดย่อ

พญาวานรหรือฮว่านง็อกเป็นพืชสมุนไพรที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคอุจจาระร่วง โรคข้ออักเสบ โรคหัวใจ โรคไต โรคเบาหวาน เป็นต้น แต่ยังไม่มีรายงานผลการศึกษาทางด้านพิษวิทยา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบพญาวานรด้วย 80% ethanol โดยศึกษาทั้งในเซลล์ทดลองและสัตว์ทดลอง การศึกษาความเป็นพิษใน Vero cells (african green monkey kidney) ด้วยวิธี green fluorescent protein (GFP) พบว่าสารสกัดเข้มข้น 50 μg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเตรียมได้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดลอง การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูทดลองโดยการป้อนสารสกัดครั้งเดียวในขนาด 500, 1000, 1500 และ 2000 mg/kg พบว่าทุกระดับความเข้มข้นไม่ทำให้หนูทดลองตายและไม่พบอาการความเป็นพิษ หลังให้สารสกัดภายใน 24 ชั่วโมง และเมื่อสังเกตอาการต่อเป็นเวลา 14 วัน ก็ไม่พบหนูตายหรือแสดงอาการเป็นพิษใดๆ โดยหนูทดลองทุกตัวมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน การทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันโดยป้อนสารสกัดขนาด 250, 500 และ 1000 mg/kg ในหนูทดลองทุกวันเป็นเวลา 14 วัน พบว่าทุกระดับความเข้มข้นไม่ทำให้หนูทดลองตายและไม่พบอาการความเป็นพิษ การตรวจค่าเคมีโลหิตของหนูทดลอง ได้แก่ creatinine, albumin, total protein, triglycerides และ cholesterol แต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน ยกเว้นค่า BUN ของหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 และ 1000 mg/kg มีปริมาณมากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และค่า alkaline phosphatase ของหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 mg/kg มีค่าต่ำกว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของหนูทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

คำสำคัญ: พญาวานร ฮว่านง็อก พิษเฉียบพลัน พิษกึ่งเฉียบพลัน ค่าเคมีโลหิต

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2552; 5(1): 74-81

[1] นิสิตระดับปริญญาโท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
B.Sc., Graduate student, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University

[2] Ph.D. อาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
Ph.D., Instructor, Faculty of Science, Mahasarakham University

[3] Ph.D. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Environment and Resource Studies, Mahasarakham University

[4] กศ.ม. (ชีววิทยา) อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย
M.Ed., Instructor, Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University

* Corresponding author: Peerawit Padee, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Kantarawichai, Maha Sarakham 44150
Tel./Fax. +66 43 754360 E-mail: peerawit_padee@yahoo.com

Abstract

Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk. is a medicinal plant from the Acanthaceae family. This plant has been introduced for to treatment of many diseases including hypertension, diarrhea, arthritis, nephritis, and diabetes. However, there is no scientific data on in its toxicity. The present study aims to assess the toxicity of an 80% ethanol extract of *P. palatiferum* leaf both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, the 80% ethanol extract of *P. palatiferum* was tested in vero cells (african green monkey kidney) by a green fluorescent protein (GFP) - based assay. No cytotoxicity was detected at the dose of 50 μg/mL, which was the highest dose that could be prepared. *In vivo*, the 80% ethanol extract was administered once orally to adult Wistar rats in various doses (500, 1000, 1500 and 2000 mg/kg). The results showed that no doses of extract produced any signs or symptoms of toxicity during the first 24 hrs and no rat died with in 14 days. Moreover, the body weight of control and treatment groups were not different. A longer acute toxicity was tested on Wistar rats in various doses of 250, 500 and 1000 mg/kg by daily oral administration for 14 days. None of the dose levels showed show any signs or symptoms of toxicity and no rat died. Compared to the control group, the clinical chemistry values such as creatinine, albumin, total protein, triglycerides, and total cholesterol in each groups were not different, except BUN was significantly lower than the doses of 500 and 1000 mg/kg ($p<0.05$). The alkaline phosphatase in the dose of 250 mg/kg was significantly lower than the dose of 500 mg/kg ($p<0.05$). The gain in body weight of all treated groups were significantly higher than the control group ($p<0.05$).

Keywords: *P. palatiferum*, Acute toxicity, Sub-acute toxicity, Clinical chemistry

IJPS 2009; 5(1): 74-81

บทนำ

สมุนไพรพญาวานรหรือฮว่านง็อกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae การแพทย์พื้นบ้านของเวียดนามเชื่อว่าพืชชนิดนี้สามารถป้องกันและรักษาโรคต่างๆ ได้หลายชนิด เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคอุจจาระร่วง โรคข้ออักเสบ โรครูมาตอยด์ โรคกระเพาะอาหาร โรคบิด โรคมะเร็งลำไส้ ลำไส้อักเสบ ท้องผูก เลือดออก เป็นแผล ไข้หวัด ริดสีดวงทวาร เนื้องอก โรคตับอักเสบ โรคหัวใจ และโรคไต เป็นต้น (Dieu et al., 2005) ประเทศไทยได้มีการนำพืชชนิดนี้มาใช้ในการรักษาโรคเช่นกัน โดยมีความเชื่อว่าพืชชนิดนี้มีสรรพคุณในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคกระเพาะอาหาร อาหารไม่ย่อย ลำไส้อักเสบ โรคอุจจาระร่วง โรคตับอักเสบ โรคคอพอก โรคไตอักเสบ ตาแดง โรคความดันโลหิตสูง และโรคเบาหวาน เป็นต้น ส่วนใหญ่นิยมใช้ใบในการรับประทาน โดยรับประทานวันละ 7-9 ใบ ระยะเวลาในการรับประทานแล้วแต่ชนิดของโรค (ลำปาง, 2546)

ได้มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชชนิดนี้พบว่าประกอบด้วยสารกลุ่ม flavonoids, apigenin, triterpenoids saponin, β-sitosterol, stigmasterol, kaempferol, และ salicylic acid เป็นต้น (Hung et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก เป็นต้น รวมทั้งยังพบกรดอะมิโนจำเป็น เช่น threonine, lysine และ methionine เป็นต้น (Dieu et al., 2005) การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านเชื้อรา พบว่าใบพญาวานรมีศักยภาพสูงในการต้าน $H_2O_2^{\bullet}$ (hydrogen peroxide radical) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงของคน มีฤทธิ์สามารถต้านแบคทีเรียบางชนิดได้ เช่น *Salmonella typhi* 158, *Shigella flexineri* และ *Escherichia coli* อีกทั้งยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา ได้แก่ *Candida albicans* และ *C. stellatoides* อีกด้วย (Giang et al., 2005)

ปัจจุบันมีผู้สนใจที่จะนำพืชชนิดนี้ไปใช้ในการรักษาโรคต่างๆ อย่างกว้างขวางตามความเชื่อในสรรพคุณที่กล่าวอ้างข้างต้น จากการรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กับพืชชนิดนี้ พบว่ามีบางสรรพคุณที่มีงานวิจัยรองรับที่ชัดเจน เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านเชื้อรา สรรพคุณบางชนิดถึงแม้ว่ายังไม่มีการพิสูจน์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาแต่เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบทางเคมีพบว่ามีความสัมพันธ์กับสรรพคุณที่กล่าวอ้างบางชนิด เช่น สาร β-sitosterol มีฤทธิ์ลดความดันโลหิตสูง สาร kaempferol ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและลดระดับน้ำตาลในเลือด สาร phytol มีฤทธิ์ในการรักษาโรคข้ออักเสบและรูมาตอยด์ สารกลุ่ม triterpenoids saponin ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด และ salicylic acid รักษาโรคผิวหนัง เป็นต้น (พีรวิชญ์ พาดี และสมศักดิ์ นวลแก้ว, 2552) อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ชัดเจนและการศึกษาความเป็นพิษจำเป็นจะต้องมีการพิสูจน์ เพื่อให้มีการใช้สมุนไพรพญาวานรอย่างปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพิษวิทยาของสารสกัดใบสมุนไพรพญาวานร โดยมีการทดสอบทั้งในเซลล์ทดลองและสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้ข้อมูลทางพิษวิทยาเบื้องต้นก่อนที่จะนำพืชชนิดนี้ไปใช้ตามสรรพคุณที่อ้างถึง อีกทั้งยังเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องตรวจค่าเคมีโลหิต ยี่ห้อ Asus® รุ่น BT 2000, เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (micro plate reader) ยี่ห้อ Molecular Device® รุ่น Soft Max Pro, เครื่อง rotary evaporator ยี่ห้อ Heidolph® รุ่น Laborota 4000 คู่กับ Vacuum Controller ยี่ห้อ Buchi® รุ่น V-800, เครื่อง freeze dryer ยี่ห้อ Christ® รุ่น Loc-1m สารเคมีที่ใช้ทุกชนิดเป็น AR grade ได้แก่ ethanol (Merck, Germany), dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Germany), G-418 sulfate (Promega corpration, Madison, USA), ellipticine และ tween 80

การเตรียมสารสกัด

สมุนไพรพญาวานร (*P. palatiferum*) ตรวจเอกลักษณ์พันธุ์พืชโดยกองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ตัวอย่างพันธุ์พืชแห้งเก็บไว้ที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (ID.code:MSU.PH-ACA-P1) เตรียมสารสกัดจากใบอบแห้งบดละเอียด สกัดโดยวิธีการหมัก (maceration) ด้วย 80% ethanol เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปประเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator ตามด้วย freeze dryer จนได้สารสกัดที่เป็นผงแห้งปริมาณ 12.67% เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้

เซลล์ทดลอง

เซลล์ทดลองที่ใช้เป็น Vero cells (African green monkey kidney) จากห้องปฏิบัติการของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เพาะเลี้ยงเซลล์ใน Medium 199 ประกอบด้วย Earle's salts ที่มี 0.6 mM L-Glutamine 0.04 mg/mL, gentamycin 20 mM, sodium bicarbonate 0.0005% (w/v), phenol red และ 6% new-born calf serum (GIBCO) เป็นส่วนประกอบบ่มเพาะเซลล์ในตู้ควบคุมที่มีอุณหภูมิ 37°C มี CO_2 5% (Froscio et al., 2008: 9-10)

การถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ทดลอง (Transfection)

นำเซลล์มาเพาะเลี้ยงในเพลตขนาด 100 มม. ($1x10^6$ cells/plate) ทิ้งไว้ข้ามคืน ทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยใช้ calcium phosphate precipitate เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อครบ 24 ชั่วโมง และเมื่อครบ 48 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกจากเพลตโดยการย่อยด้วย trypsin แล้วนำมาใส่อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ที่มีสาร G-418 sulfate (600 μg/mL) เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่แสดงออก (GFP expression in clones) โดยใช้เครื่องฟลูออเรสเซนส์ นำเซลล์ที่เรืองแสงได้ (Vero-GFP cells) ไปใช้ในการทดลองต่อไป (Froscio et al., 2008)

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้เป็นหนูขาวเพศผู้ (male Wistar rat) อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 50 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำหนูทดลองไปเลี้ยงในกรงที่ทำด้วย stainless steel ขนาดประมาณ 30x50x25 เซนติเมตร กรงละ 2 ตัว ปูรองพื้นด้วยขี้เลื่อยที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C ความชื้นสัมพัทธ์ 40-60% ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูป (สูตร 082 C.P. Mice Feed, S.W.T. Co.,Ltd.) และน้ำในปริมาณที่เพียงพอ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนดำเนินการทดลอง ได้รับการ

อนุมัติการวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (เลขที่ 0001/2552 ลงวันที่ 11 ธันวาคม 2551)

การศึกษาความเป็นพิษในเซลล์ทดลอง

ทดสอบตามวิธีของ Collins et al. (1998: 344-347) โดยนำเซลล์ที่เรืองแสงได้ (Vero-GFP cells) ปริมาตร 45 μl ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ 1,500 เซลล์ ใส่ลงใน 384-well tissue culture plates นำไปใส่ในตู้ควบคุมที่มีอุณหภูมิ 37°C มี CO_2 5% ทิ้งไว้ 20-24 ชั่วโมงเพื่อทำให้ได้เซลล์ชั้นเดียวเกาะเพลต เติมสารสกัดโดยใช้ 0.5%DMSO เป็นตัวทำละลายหลุมละ 5 μl ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25.00 และ 50.00 μg/mL ตามลำดับ โดยใช้ 0.5% DMSO เป็นสารควบคุม (negative control) และ ellipticine ความเข้มข้นสุดท้าย 1.39 μg/mL เป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน (positive control) ทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ นำไปบ่มเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C มี CO_2 5% เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกแล้วเติมสารละลาย 0.25% trypsin-EDTA 50 μL ต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาประมาณ 10 นาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ 200 μL นำสารแขวนตะกอนของ Vero-GFP cells ไปวัดค่าการเรืองแสงด้วย micro plate reader โดยใช้สภาวะกระตุ้นที่ 485 nm แล้ววัด GFP ที่ 535 nm ใช้ bandpass filter 20 nm นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่า % cytotoxicity

การศึกษาพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง

ใช้วิธีทดสอบแบบขนาดคงที่ (fixed-dose) ตามวิธีของ Chan and Hayes (1994) โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมี 6 ตัว กลุ่มที่ 1 ป้อนตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัดคือ 2% tween 80 กลุ่มที่ 2-5 เป็นกลุ่มทดลอง แต่ละกลุ่มป้อนสารสกัดในปริมาณที่แตกต่างกันคือ 500, 1000, 1500 และ 2000 mg/kg ตามลำดับ โดยป้อนสารสกัดตามระดับความเข้มข้นตัวละ 1 ml เพียงครั้งเดียว หลังป้อนสารสกัดสังเกตอาการความเป็นพิษ เช่น การหายใจ การขับถ่ายหรือการเคลื่อนไหว เป็นต้น และนับจำนวนหนูทดลองที่ตายภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสังเกตอาการของหนูที่รอดชีวิตต่อเป็นเวลา 14 วัน พร้อมทั้งจดบันทึกอาการความเป็นพิษหรือจำนวนหนูทดลองตาย

การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง

ใช้วิธีทดสอบแบบขนาดคงที่ (fixed-dose) ตามวิธีของ Chan and Hayes (1994) โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ใช้หนูทดลองกลุ่มละ 6 ตัว กลุ่มที่ 1 ป้อนตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัดคือ 2% tween 80 กลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มทดลอง โดยแต่ละกลุ่มป้อนสารสกัดในปริมาณที่แตกต่างกันคือ 250, 500 และ 1000 mg/kg ป้อนสารสกัดตามระดับความเข้มข้นตัวละ 1 ml วันละครั้ง เป็นเวลา 14 วัน หลังป้อนสารสกัดสังเกตอาการความเป็นพิษ เช่น การหายใจ การขับถ่ายหรือการเคลื่อนไหว เป็นต้น และชั่งน้ำหนักตัวในวันที่ 0, 4, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ หลังจากนั้นทำให้สัตว์ทดลองตายอย่างสงบด้วยวิธี cervical dislocation แล้วเจาะเลือดจากหัวใจของหนูเพื่อตรวจหาค่าเคมีโลหิต ได้แก่ blood urea nitrogen (BUN), creatinine, albumin, alkaline phosphatase (ALP), total protein, triglycerides (TG) และ total cholesterol (TC) ด้วยเครื่องตรวจค่าเคมีโลหิต

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ข้อมูลค่าสังเกตที่ได้จากการทดลองนำไปวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย S.E.M. ร้อยละ ค่าความแปรปรวน และสถิติเชิงอนุมาน ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยสถิติ F-test (One-way ANOVA) ตรวจสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วย Scheffe's test

ผลการศึกษาวิจัย

การศึกษาความเป็นพิษในเซลล์ทดลอง

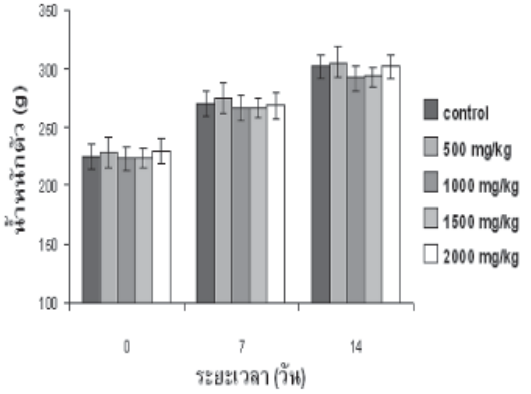
ผลการทดสอบความเป็นพิษใน Vero cells พบว่าสารสกัดใบพญาวานรทุกระดับความเข้มข้น (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25.00 และ 50.00 μg/mL) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 1

การศึกษาพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง

จากการสังเกตอาการของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ป้อนสารสกัดใบพญาวานรขนาด 500, 1000, 1500 และ 2000 mg/kg หลังป้อนสารสกัดภายในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าหนูทดลองทุกตัวรอดชีวิตทั้งหมดและไม่แสดงอาการความเป็นพิษใดๆ หลังจากการสังเกตอาการต่ออีก 14 วัน ก็ไม่พบหนูตาย

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบพญาวานรใน Vero cells

	Final concentration (μg/mL)	% Cell growth	Activity
Negative control (0.5% DMSO)	-	100.0	Non-cytotoxic
Positive control (Ellipticine)	1.39	50.0	Cytotoxic
Crude extract of *P.palatiferum*	0.78	92.3	Non-cytotoxic
	1.56	94.9	Non-cytotoxic
	3.12	95.1	Non-cytotoxic
	6.25	96.4	Non-cytotoxic
	12.50	96.4	Non-cytotoxic
	25.00	96.4	Non-cytotoxic
	50.00	100.5	Non-cytotoxic



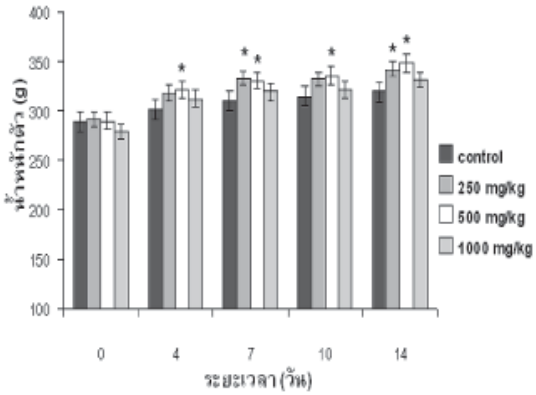
รูปที่ 1 น้ำหนักตัวของหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดครั้งเดียวและสังเกตอาการเป็นเวลา 14 วัน

และไม่พบอาการแสดงความเป็นพิษเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของหนูทดลองทั้ง 5 กลุ่ม พบว่ามีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 1

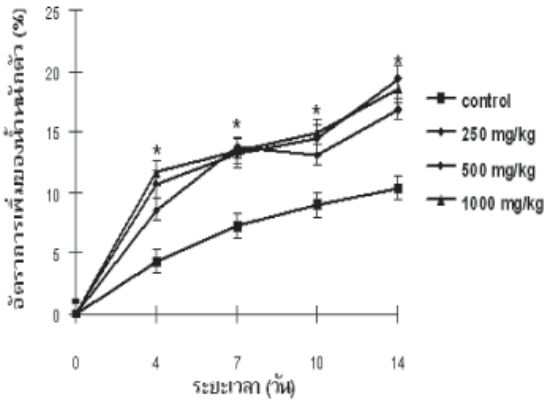
การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง

จากการสังเกตอาการของหนูทดลองทั้ง 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้สารสกัดใบพญาวานรปริมาณ 250, 500 และ 1000 mg/kg ทุกวัน เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าสารสกัดทุกระดับความเข้มข้นไม่ทำให้หนูทดลองตายและไม่แสดงอาการความเป็นพิษ เมื่อพิจารณาน้ำหนักตัวของหนูทดลองทั้ง 4 กลุ่ม พบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 mg/kg มีน้ำหนักตัวในวันที่ 7 และ 14 มากกว่าหนูทดลองกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 mg/kg มีน้ำหนักตัวในวันที่ 4, 7, 10 และ 14 วัน มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่หนูทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาด 1000 mg/kg มีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทุกวันของการทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 2 เมื่อพิจารณาอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวของหนูทดลองพบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดทุกระดับความเข้มข้นมีอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวมากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในทุกวันของการทดลอง อนึ่งเมื่อพิจารณาเฉพาะหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพบว่าหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่มมีน้ำหนักตัวและอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 3

ผลการตรวจค่าเคมีโลหิตของหนูทดลองหลังจากให้สารสกัดเป็นเวลา 14 วัน พบว่าระดับของ creatinine, albumin, total protein, triglycerides และ cholesterol ของหนูทดลองแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน ยกเว้นค่า BUN และ alkaline phosphatase โดยพบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดในขนาด 500 และ 1000 mg/kg มีระดับของ BUN มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 mg/kg มีระดับของ alkaline phosphatase ต่ำกว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 1000 mg/kg ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 2 น้ำหนักตัวของหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (* แสดงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$)



รูปที่ 3 อัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวของหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (* แสดงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลาเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$)

ตารางที่ 2 ค่าเคมีโลหิตของหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดใบสมุนไพรพญาวานรเป็นเวลา 14 วัน (n=6)

Group	Mean±S.E.M.						
	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Albumin (g/dL)	ALP (IU/L)	Total protein (g/dL)	TG (mg/dL)	TC (mg/dL)
Control	16.80±0.61	0.67±0.12	4.02±0.12	222.50±23.98	7.07±0.35	108.83±3.10	97.50±4.72
Crude 250mg/kg	19.90±1.07	0.63±0.11	3.95±0.09	180.67±23.20[a]	7.03±0.31	107.67±7.47	81.83±4.56
Crude 500mg/kg	22.40±1.31[b]	0.60±0.05	4.30±0.27	251±18.61	7.32±0.33	117±3.51	87.17±6.39
Crude 1000mg/kg	22.91±0.64[b]	0.63±0.06	4.55±0.10	225.17±18.21	8.18±0.24	118.67±9.23	94.17±3.02

[a]แสดงความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

[b]แสดงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$

BUN= Blood urea nitrogen, ALP= Alkaline phosphatase, TG = triglycerides และ TC = total cholesterol

อภิปรายผลและสรุป

การทดสอบความเป็นพิษของสมุนไพรพญาวานรทั้งสองวิธีคือ การทดสอบในเซลล์ทดลองและการทดสอบในสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดใบสมุนไพรพญาวานรไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันทั้งต่อเซลล์ทดลองและในสัตว์ทดลอง โดยความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเตรียมได้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทดลองคือ 50 μg/mL ในขณะที่การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองสามารถให้ได้ปริมาณสูงสุดถึง 2000 mg/kg ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่สามารถเตรียมได้เช่นเดียวกัน โดยไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษใดๆเมื่อป้อนให้สัตว์ทดลองและสัตว์ทดลองรอดชีวิตทั้งหมด จัดเป็นสารสกัดที่ไม่น่าจะก่อพิษเฉียบพลันที่สำคัญเมื่อรับประทาน โดยแปลผลตามเกณฑ์การทดสอบความเป็นพิษแบบ fixed-dose (วงศ์วิวัฒน์ และคณะ, 2546)

ผลการตรวจค่าเคมีโลหิตของหนูทดลองพบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ให้สารสกัดขนาด 500 และ 1000 mg/kg มีค่า BUN สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งค่า BUN ที่สูงขึ้นอาจเกิดจากการรับประทานสารสกัดที่มีโปรตีนหรือกรดอะมิโนในปริมาณมาก ซึ่งมีความเป็นไปได้เนื่องจากใบพญาวานรมีรายงานการพบองค์ประกอบของโปรตีนปริมาณ 30.8% ของใบแห้ง และกรดอะมิโนจำเป็นหลายชนิด (Dieu et al., 2005) หรืออาจเกิดจากการทำงานของไตผิดปกติ ซึ่งกรณีนี้จะต้องพิจารณาร่วมกับค่า creatinine ด้วย เพราะทั้งสองค่าจะบ่งบอกถึงการทำงานของไตในการ

ขับสารพิษออกจากร่างกาย โดยพบว่าหนูทดลองทุกกลุ่มมีค่า creatinine ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการทำงานของไตยังคงทำงานเป็นปกติ เมื่อพิจารณาค่าเคมีโลหิตที่แสดงถึงการทำงานของตับ ได้แก่ albumin, alkaline phosphatase, total protein, triglycerides และ cholesterol ในหนูที่ได้รับสารสกัดทุกความเข้มข้นก็มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าการทำงานของตับยังคงปกติเช่นกัน (สุธาทิพย์, 2544) อย่างไรก็ตามการรับประทานสารสกัดหรือใบของพืชชนิดนี้ในปริมาณสูงควรจะต้องพิจารณาเป็นพิเศษ

จากการทดสอบเบื้องต้นในการเตรียมสารสกัดในการทดลองครั้งนี้จะได้สารสกัดหยาบเท่ากับ 1.7% ของใบสด ซึ่งโดยทั่วไปคนมักจะใช้ใบสดในการรับประทานวันละ 7-9 ใบ (ลำปาง, 2546) แต่การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในครั้งนี้ใช้สารสกัดที่มีปริมาณสูงถึง 2000 mg/kg ซึ่งมากกว่าปริมาณที่คนรับประทานถึง 25 เท่า และการทดลองใช้สารสกัดอย่างต่อเนื่องในขนาดสูงถึง 1000 mg/kg เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ก็ไม่พบอาการผิดปกติใดๆ เช่นเดียวกัน ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความปลอดภัยของพืชชนิดนี้ แม้ว่าไม่ได้ทดสอบความเป็นพิษโดยตรงแต่ก็มีการติดตามความปลอดภัยในการใช้ร่วมด้วย เช่น การศึกษาการลดอัตราการเกิดโรคอุจจาระร่วง โดยนำผงแห้งบดละเอียดขนาดความเข้มข้น 1 g/kg วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน ป้อนในลูกหมู ผลการทดสอบพบว่าไม่มีอาการข้างเคียงเกิดขึ้นในหมูเช่นเดียวกัน (Dieu and Hoa, 2003) การทดสอบฤทธิ์ต้านอุจจาระร่วงและการเพิ่มน้ำหนักตัวในหมู โดยให้ผงแห้งบดละเอียดของสมุนไพรพญาวานรขนาด 200 mg/kg ทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน ในหมูที่ป่วยด้วยโรคอุจจาระร่วง พบว่านอกจากจะให้ผลดีในการรักษาโรคอุจจาระร่วงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *E. coli* และไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงจากการรักษาแล้วยังทำให้หมูมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Dieu et al., 2006) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้โดยหนูที่ได้รับสารสกัดมีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวและมีน้ำหนักตัวมากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมของสมุนไพรพญาวานรเกี่ยวกับความปลอดภัยในการใช้ในระยะสั้นเท่านั้น และทำให้มั่นใจได้ว่าน่าจะมีความปลอดภัยแม้ว่าจะใช้ในปริมาณสูงก็ตาม อนึ่งการใช้ในระยะเวลานานจำเป็นต้องมีการศึกษาทางด้านความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังหรือความเป็นพิษเรื้อรังเพิ่มเติม รวมถึงศักยภาพในการรักษาโรคต่างๆตามสรรพคุณที่กล่าวอ้างก็จำเป็นต้องได้รับการพิสูจน์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเช่นเดียวกัน

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2552 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สนับสนุนวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการวิจัยจาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคุณวินัย สมประสงค์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นอย่างสูงที่ให้ความกรุณาในการตรวจเอกลักษณ์พันธุ์พืชสำหรับการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

พีรวิชญ์ พาดี และ สมศักดิ์ นวลแก้ว. ข้อเท็จจริงเกี่ยวกับสมุนไพรพญาวานรหรือฮว่านง็อก. *วารสารวิชาการสาธารณสุข* 2552; 18(1): หน้า 131-138.

ลำปาง ปาชิโร. สมุนไพรมาแรงฮว่านง็อก. *วารสารเทคโนโลยีชาวบ้าน* 2546; 15(309): หน้า 32.

วงศ์วิวัฒน์ ทัศนียกุล, สุดา วรรณประสาท, สุพัตรา ปรศุพัฒนา. *สาระพิษวิทยา: จากพื้นฐานสู่ข้างเตียงผู้ป่วย.* ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2546. หน้า 23-37.

สุธาทิพย์ พิชญไพบูลย์. *การแปลผลตรวจห้องปฏิบัติการสำหรับเภสัชกร.* กรุงเทพฯ: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล; 2544. หน้า 57-58.

Chan PK and Hayes AW. Acute toxicity and eye irritation. In Hayes AW editor. *Principles and methods of toxicology.* New York: Raven Press; 1994. p.579-647.

Collins LA, Torrero MN, Franzblau SG. Green fluorescent protein reporter micro plate assay for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis. Anti Agen Chem* 1998; 42: p.344-347.

Dieu HK and Hoa TV. *Efficacy of Pseuderanthemum palatiferum powder against diarrhea of piglet.* Cantho: Cantho University; 2003. p.1-6.

Dieu HK, Loc CB, Yamasaki S, et al. 2005. The ethnobotanical and botanical study on *Pseuderanthemum palatiferum* as a new medicinal plant in the Mekong Delta of Vietnam. *Japa Agri Res Qua* 2005; 39(3): p.191-196.

Dieu HK, Loc CB, Yamasaki S, et al. The effects of *Pseuderanthemum palatiferum*, a new medicinal plant, on growth performances and diarrhea of piglets. *Japa Agri Res Qua* 2006; 40(1): p.85-91.

Froscio S, Cannon E, Humpage A. *Research report No 66: Optimisation of cylindrospermopsin toxicity assay.* Adelaide: Australian Water Quality Centre; 2008. p.9-10.

Giang PM, Bao HV, Son PT. Study on anti-oxydative activities and preliminary investigation on antibacterial, antifungal of extracted fraction rich in flavonoides from leaves of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. *TC khoa hoc va cong nghe* 2005; 9: p.9-12.

Hung NV, Tuan LA, Chien NQ. Study on chemical constituents of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. *TC khoa hoc va cong nghe* 2004; 42: p.75-79.