(*Jatropha curcas* Linn.)

รายงานการศึกษาวิจัยโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ 2

สบู่ดำ

รายงานการศึกษาวิจัย

โครงการสมุนไพรต้านเอดส์ 2

(สบู่ดำ)

Project Herbs for AIDS 2

(*Jatropha curcas* Linn.)

ฤทธิ์ของสมุนไพรสบู่ดำในการยับยั้งเชื้อเอชไอวี
เชื้อฉวยโอกาส
และฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข
นนทบุรี
2547
ISBN 974-506-514-5

ที่ปรึกษา

นพ.สมทรง รักษ์เผ่า
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

นพ.ศิริวัฒน์ ทิพย์ธราดล นพ.สุพรรณ ศรีธรรมมา นพ.บุญชัย สมบูรณ์สุข
รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

พญ.มยุรา กุสุมภ์ ดร.พักตร์พริ้ง แสงดี
สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ศ.นพ.วิษณุ ธรรมลิขิตกุล
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

คณะกรรมการ Data & Safety Monitoring Board

นพ.บุญเจือ ธรณินทร์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

นพ.วีระสิงห์ เมืองมั่น
คณะแพทยศาสตร์รามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

นพ.สุรพล สุวรรณกูล
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

พญ.รวงผึ้ง สุทเธนทร์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

ภก.ดร.ภาคภูมิ เต็งอำนวย
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

วิจัยทางพรีคลินิก

เย็นจิตร เตชะดำรงสิน[1]
สุธน วงษ์ชีรี[2]
พนัสดา อิศรางกูร ณ อยุธยา[2]
นวลจันทร์ ฤชุศาศวัต[2]
ม.ล.ปุณฑริกา ณ พัทลุง[1]
สุธิดา ไชยราช[1]
ประถม ทองศรีรักษ์[1]
ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์[2]
วัฒนา อู่วาณิชย์[2]
เครือวัลย์ พลจันทร[2]
บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ[2]
สุทธิโชค จงตระกูลศิริ[2]
เรวดี บุตราภรณ์[2]
นงลักษณ์ สายประดิษฐ์[2]
พงษ์นุวัตร ศรีงาม[2]
ปราณี ชวลิตธำรง[1]
จารีย์ บันสิทธิ์[1]
จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์[3]
ทรงพล ชีวะพัฒน์[1]
ธีระวุธ ปิ่นทอง[1]
หรรษา ไทยศรี[2]
ละออ ชมพักตร์[2]
อัญชลี จูฑะพุทธิ[1]
โชติกา บุญ-หลง[2]
วารุณี จิรวัฒนาพงศ์[1]
อรุณ บ่างตระกูลนนท์[2]
สุขใจ ผลอำไพสถิตย์[2]
มาสเกียรติ บุญยฤทธิ์[1]
กาญจนา พฤษพันธ์[2]

วิจัยทางคลินิก

พญ.วินิตา บริราช[4]
นพ.ไพจิตร์ วราชิต[5] นพ.สมชาย แสงกิจพร[1]
พญ.ปานิตา ปทีปวณิช[6] นพ.วิสุทธิ์ สุขีไพศาลเจริญ[7]

บรรณาธิการ

สุธิดา ไชยราช
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

1. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
2. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
3. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. อดีตผู้เชี่ยวชาญพิเศษด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
5. สำนักตรวจราชการกระทรวงสาธารณสุข
6. โรงพยาบาลลำปาง อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง
7. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

คำนำ

"โครงการสมุนไพรต้านเอดส์" เป็นโครงการที่ นายแพทย์สมทรง รักษ์เผ่า อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (พ.ศ. 2546-2547) ได้ริเริ่มขึ้นตั้งแต่เมื่อปีงบประมาณ 2539 เมื่อครั้งที่ท่านดำรงตำแหน่งรองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และโรคเอดส์กำลังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่รุนแรง โรงพยาบาลต่างๆ มีผู้ป่วยเอดส์เข้ารับการรักษาเป็นจำนวนมากจนเกินจำนวนเตียงในโรงพยาบาลที่จะรับได้ และมีผู้ป่วยเอดส์และผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวนมากที่ไม่สามารถเข้าถึงยาต้านเชื้อเอชไอวีและหันมาใช้ยาจากสมุนไพรเป็นทางเลือก โดยไม่มีข้อมูลจากการวิจัยสนับสนุนความปลอดภัยหรือประสิทธิผลของสมุนไพรที่เลือกใช้ ดังนั้น นายแพทย์สมทรง รักษ์เผ่า จึงได้ริเริ่มให้กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จัดทำโครงการวิจัยแบบบูรณาการขึ้น โดยรวบรวมนักวิจัยที่มีความชำนาญในสาขาต่างๆ ของการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรเพื่อใช้เป็นยา และด้านโรคติดเชื้อต่างๆ ภายในกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้แก่ นักวิจัยจากสถาบันวิจัยสมุนไพร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข และกองวิเคราะห์ยาในขณะนั้น เพื่อทำการวิจัยและพัฒนาสมุนไพร พิสูจน์สรรพคุณ และความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรอย่างครบวงจร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อแก้ปัญหาโรคเอดส์ของประเทศ และให้ยาจากสมุนไพรที่ผ่านการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์แล้วเป็นอีกทางเลือกของผู้ป่วยเอดส์และผู้ติดเชื้อเอชไอวี ดังนั้น ในการขออนุมัติงบประมาณปี 2540 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์โดยสถาบันวิจัยสมุนไพรจึงได้เสนอขอแปรญัตติเพื่อขออนุมัติงบประมาณสำหรับ "โครงการสมุนไพรต้านเอดส์" เป็นเวลา 5 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2540-2544 และได้รับงบประมาณสนับสนุนในหมวดรายจ่ายอื่นตามคำขอ "โครงการสมุนไพรต้านเอดส์" จึงได้เริ่มต้นขึ้นอย่างเป็นทางการในปีงบประมาณ 2540

"โครงการสมุนไพรต้านเอดส์" ได้ดำเนินการต่อเนื่องมาตั้งแต่ปีงบประมาณ 2540 เรื่อยมาจนถึงปีงบประมาณ 2547 โดยได้รับการสนับสนุนเป็นอย่างดีจากอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกท่าน ได้แก่ นพ.มงคล ณ สงขลา, ดร.เรณู โกยสุโข, ศ.ดร.ภักดี โพธิศิริ, นพ.ณรงค์ศักดิ์ อังคะสุวพลา, และ นพ.สมทรง รักษ์เผ่า รวมทั้งรองอธิบดีที่รับผิดชอบสถาบันวิจัยสมุนไพร และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข และผู้อำนวยการโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ ได้แก่ นพ.ไพจิตร์ วราชิต, พญ.ดร.วินิตา บริราช, นพ.สถาพร วงษ์เจริญ, นพ.สุพรรณ ศรีธรรมา และ นพ.บุญชัย สมบูรณ์สุข

นอกจากนักวิจัยภายในกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์แล้ว โครงการนี้ยังได้ร่วมมือกับนักวิจัยจากหน่วยงานภายนอกอีกหลายท่าน อาทิเช่น รศ.ดร.จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ protease, รศ.ดร.โสภณ เริงสำราญ และ รศ.ดร.อมร เพชรสม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, Prof.Dr. Luo Shide จาก Kunming Institute of Botany, และคณะผู้ร่วมวิจัยทางคลินิกในหลายโรงพยาบาลในภาคเหนือ และจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และมหาวิทยาลัยขอนแก่น

ที่ผ่านมา คณะนักวิจัยโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ได้เก็บตัวอย่างสมุนไพร เตรียมสารสกัดและทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ เอชไอวี เชื้อโรคฉวยโอกาสต่างๆ ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันไปแล้วหลายร้อยชนิดสมุนไพรและหลายร้อยสารสกัด รวมทั้งได้มีการทดสอบพิษระยะยาวของสารสกัดในสัตว์ทดลอง ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเพื่อหาสารสำคัญและทำมาตรฐานสมุนไพร ศึกษาหาวิธีการปลูกที่เหมาะสม และทำการศึกษาวิจัยทางคลินิกในผู้ติดเชื้อเอชไอวีของสารสกัดสมุนไพรที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีศักยภาพสูงไปแล้วหลายชนิด ผลงานวิจัยที่ได้ทำไปแล้วส่วนหนึ่งได้นำมาสรุปไว้ในรายงานวิจัยฉบับนี้

แม้ว่า ผลการทดสอบสมุนไพรหลายชนิดทางคลินิกจะยังไม่พบว่าสมุนไพรมีประสิทธิผลตามที่คาดหวัง และการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวี หรือเชื้อโรคฉวยโอกาสต่างๆ ของสมุนไพรหลายชนิดจะไม่แสดงฤทธิ์ในความเข้มข้นที่มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาต่อไปได้ แต่คณะผู้วิจัยก็หวังว่าผลงานวิจัยเหล่านี้จะเป็นประโยชน์สามารถใช้เป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนายาจากสมุนไพรเพื่อผู้ป่วยเอดส์ของนักวิจัยไทยในอนาคต ช่วยลดปัญหาการทำงานวิจัยซ้ำซ้อน เพื่อประหยัดงบประมาณการวิจัยของประเทศ และเป็นแนวทางในการคัดเลือกสมุนไพรชนิดใหม่ที่จะทำการวิจัยต่อไป และสำหรับสมุนไพรหรือยาตำรับจากสมุนไพรที่พบว่ามีประสิทธิผล และความปลอดภัยจากการวิจัยทางคลินิก และสมุนไพรอื่นๆ ที่แสดงศักยภาพสูงจากการศึกษาวิจัยในหลอดทดลองหรือในสัตว์ทดลอง นักวิจัยของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กำลังทำการวิจัยต่อเนื่องเพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	iii
สารบัญ	v
สารบัญภาพ	x
สารบัญตาราง	xii
กิตติกรรมประกาศ	xiii
บทที่ 1 บทนำ	1
- ความสำคัญ	1
- วัตถุประสงค์	2
- เป้าหมายของโครงการ	2
- ระยะเวลาดำเนินการ	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
- หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	3
- ระเบียบวิธีวิจัย	3
- ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	4
- กิจกรรมหลักของโครงการ	5
บทที่ 2 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสบู่ดำ	8
- ความรู้ทั่วไป	8
- ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	9
- องค์ประกอบทางเคมี	13
- ความเป็นพิษ	14
บทที่ 3 การเตรียมสารสกัดสบู่ดำ	16
- การเตรียมวัตถุดิบ	16
- การตรียมสารสกัด (crude extract)	16
- การเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง	18
บทที่ 4 การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำในหลอดทดลอง	19
- ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Reverse Transcriptase	20
- ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Protease	22
- ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง	24
- ฤทธิ์ต้านเชื้อราฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์	27
- ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella*	30
- ฤทธิ์ต้านเชื้อ Herpes Simplex Virus	34
- ฤทธิ์ต้านเชื้อ Cytomegalovirus และ Epstein-Barr Virus	35
- ฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกัน	39

สารบัญ

หน้า

บทที่ 5 การทดสอบพิษของสารสกัดสมุ่ดำในสัตว์ทดลอง 46
- พิษเฉียบพลันของสารสกัด YTL ในหนูถีบจักร 47
- พิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัด YTL ในหนูถีบจักร 47
- พิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัด YTC ในหนูขาว 48

บทที่ 6 การเตรียมส่วนสกัดย่อย (partly purified extract) ของสารสกัดสมุ่ดำ และการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองเพิ่มเติม 52

บทที่ 7 ข้อกำหนดคุณภาพของสมุ่ดำ 58
- วัตถุดิบสมุนไพร 59
- สารสกัดสมุนไพร YTC 65

บทที่ 8 การเตรียมยา YTC แคปซูล และการควบคุมคุณภาพ 74
- การเตรียมสารสกัดสมุนไพร YTC 76
- การเตรียมยา YTC แคปซูล 76
- การควบคุมคุณภาพของยา YTC แคปซูล 77

บทที่ 9 การรักษาโรคติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) และโรคเอดส์ด้วยสารสกัดสมุนไพร YTC 82
- สรุปย่อโครงการวิจัยทางคลินิก 82
- วัตถุประสงค์ 83
- สถานที่ศึกษาวิจัยและระยะเวลาศึกษาวิจัย 83
- แผนการวิจัย 83
- ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม 86
- ใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ 88
- งบประมาณและแหล่งทุน 89
- สรุปผลการวิจัย 89
- ความเห็นของคณะกรรมการ Data & Safety Monitoring Board 92

บทที่ 10 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดและส่วนสกัดย่อยของ YTC ต่อการทำงานของระบบทางเดินอาหารในสัตว์ทดลอง 94

บทที่ 11 การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของส่วนสกัดย่อย YTC-2 ในหนูขาว 98
- วัตถุและวิธีการ 98
- ผลการทดสอบ 100
- สรุป 109

บทที่ 12 การเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified extract) ของส่วนสกัดย่อย YTC-2 และการทดสอบฤทธิ์เพิ่มเติม 111

สารบัญ

หน้า

บทที่ 13 ข้อกำหนดคุณภาพของส่วนสกัดย่อย YTC-2 115

บทที่ 14 การเตรียมยา YTC-2 แคปซูล และการควบคุมคุณภาพ 124
- การเตรียมส่วนสกัดย่อย YTC-2 124
- การควบคุมคุณภาพของยา YTC-2 แคปซูล 125

บทที่ 15 การศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัด YTC-2 ในการรักษาโรคติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) และโรคเอดส์ 127
- สรุปย่อโครงการวิจัยทางคลินิก 127
- วัตถุประสงค์ 128
- สถานที่ศึกษาวิจัยและระยะเวลาศึกษาวิจัย 128
- แผนการวิจัย 128
- ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม 132
- งบประมาณและแหล่งทุน 132
- สรุปผลการวิจัย 132
- แบบบันทึกการใช้สารสกัดสมุนไพร YTC ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์ 137
- Karnofski Performance Score (KPS) 139
- แบบบันทึกผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ 140
- ข้อมูลที่ควรทราบสำหรับผู้ที่จะเข้าร่วมโครงการ "การรักษาโรคติดเชื้อเอชไอวีและโรคเอดส์ด้วยสารสกัดสมุนไพรวายทีซี (YTC)" ในโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 141
- แบบบันทึกการใช้สารสกัดสมุนไพร YTC-2 ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ HIVและโรคเอดส์ 144
- ข้อมูลที่ควรทราบสำหรับผู้ที่จะเข้าร่วมโครงการ "การศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัดวายทีซีสอง (YTC-2) ในการรักษาโรคติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์" ในโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 146

บทที่ 16 สรุปผลการศึกษาวิจัยโครงการสมุนไพรต้านเอดส์(สมุ่ดำ) 149

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	สบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.)	9
รูปที่ 2	สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญบางชนิดที่พบในสมุนไพรสบู่ดำ	10
รูปที่ 3	แผนภูมิแสดงการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรสบู่ดำ	17
รูปที่ 4	แผนภูมิแสดงการเตรียมส่วนสกัดย่อยต่างๆ จากสารสกัดสมุนไพร YTC และฤทธิ์ในหลอดทดลอง	53
รูปที่ 5	แผนภูมิแสดงการเตรียมส่วนสกัดย่อยต่างๆ ของสารสกัดสมุนไพร YTL และฤทธิ์ในหลอดทดลอง	56
รูปที่ 6	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำ	63
รูปที่ 7	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/11 ตรวจสอบโดยวิธีที่ I	70
รูปที่ 8	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/12 ตรวจสอบโดยวิธีที่ I	70
รูปที่ 9	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/13 ตรวจสอบโดยวิธีที่ I	70
รูปที่ 10	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1 ตรวจสอบโดยวิธีที่ I	70
รูปที่ 11	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/11 ตรวจสอบโดยวิธีที่ II	71
รูปที่ 12	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/12 ตรวจสอบโดยวิธีที่ II	71
รูปที่ 13	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/13 ตรวจสอบโดยวิธีที่ II	71
รูปที่ 14	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1 ตรวจสอบโดยวิธีที่ II	71
รูปที่ 15	การเจริญเติบโตของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยา YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน	100
รูปที่ 16	การกินอาหารของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยา YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน	101
รูปที่ 17	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/3 และส่วนสกัดย่อย YTC-2	121
รูปที่ 18	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/5, YTC-2/6, YTC-2/7, YTC-2/8, YTC-2/9 และส่วนสกัดย่อย YTC-2	121
รูปที่ 19	ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/12 YTC-2/14 และส่วนสกัดย่อย YTC-2	122

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 รายละเอียดตัวอย่างสารสกัดสบู่ดำเพื่อการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในหลอดทดลอง 18
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์ส ทรานสคริปเทสของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ 22
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอสของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ 24
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ 27
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ 30
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ ซิมเพลกซ์ ของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ 35
ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกันของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำในเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูถีบจักร 42
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ 43
ตารางที่ 9 รายละเอียดตัวอย่างส่วนสกัดย่อยต่างๆ ของสารสกัดสมุนไพร YTC เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง 54
ตารางที่ 10 ผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองของส่วนสกัดย่อยต่างๆ จากสารสกัดสมุนไพร YTC 54
ตารางที่ 11 รายละเอียดตัวอย่างส่วนสกัดย่อยต่างๆ ของสารสกัดสมุนไพร YTL และ YTQ เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง 56
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองของส่วนสกัดย่อยต่างๆ จากสารสกัดสมุนไพร YTL และ YTQ 57
ตารางที่ 13 ค่า hRf และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่างๆ ในสารสกัดด้วยเอธานอล จากใบสบู่ดำแห้ง 62
ตารางที่ 14 สรุปข้อกำหนดคุณภาพของใบสบู่ดำ 65
ตารางที่ 15 รายละเอียดตัวอย่างสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1 เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง 66
ตารางที่ 16 ผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1 67
ตารางที่ 17 ค่า hRf และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่างๆ ในสารสกัดมาตรฐาน และส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ 72
ตารางที่ 18 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของใบสบู่ดำที่จะนำมาเตรียมยาเพื่อการทดลองทางคลินิก 76
ตารางที่ 19 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของยา YTC แคปซูลเพื่อการทดลองทางคลินิก 80
ตารางที่ 20 ค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ป่วยเอดส์ที่ได้รับยาสารสกัดสมุนไพร YTC 90
ตารางที่ 21 ค่าทางชีวเคมีของผู้ป่วยเอดส์ที่ได้รับยาสารสกัดสมุนไพร YTC 91
ตารางที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของ viral load เทียบกับเมื่อ 2-3 เดือน ก่อนได้รับยาสารสกัดสมุนไพร YTC 91
ตารางที่ 23 % GI Transit ของหนูที่ได้รับสารสกัดและส่วนสกัดย่อยต่างๆ ของ YTC เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 96
ตารางที่ 24 % GI Transit ของหนูที่ได้รับส่วนสกัดย่อย YTC-1 หรือ YTC-2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 96
ตารางที่ 25 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์และน้ำหนักของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน 102
ตารางที่ 26 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์และน้ำหนักของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน 102
ตารางที่ 27 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน 104
ตารางที่ 28 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน 105
ตารางที่ 29 ค่าทางชีวเคมีของซีรั่มหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน 105
ตารางที่ 30 ค่าทางชีวเคมีของซีรั่มหนูขาวเพศเมียที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน 106
ตารางที่ 31 ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับ YTC-2เป็นเวลา 28 วัน 107
ตารางที่ 32 ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะหนูขาวเพศเมียที่ได้รับ YTC-2เป็นเวลา 28 วัน 107

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 33 รายละเอียดตัวอย่างสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ ของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-2 เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง 112

ตารางที่ 34 ผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ ของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-2 113

ตารางที่ 35 ค่า hRf และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่าง ๆ ในสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/3 และส่วนสกัดย่อย YTC-2 119

ตารางที่ 36 ค่า hRf และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่าง ๆ ในสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/5 YTC-2/6, YTC-2/7, YTC-2/8, YTC-2/9 และส่วนสกัดย่อย YTC-2 120

ตารางที่ 37 ค่า hRf และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่าง ๆ ในสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/12, YTC-2/14 และส่วนสกัดย่อย YTC-2 120

ตารางที่ 38 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพยา YTC-2 แคปซูลเพื่อการทดลองทางคลินิก 126

ตารางที่ 39 แสดงลักษณะประชากรศึกษาของสารสกัด YTC-2 133

ตารางที่ 40 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำในหลอดทดลอง 155

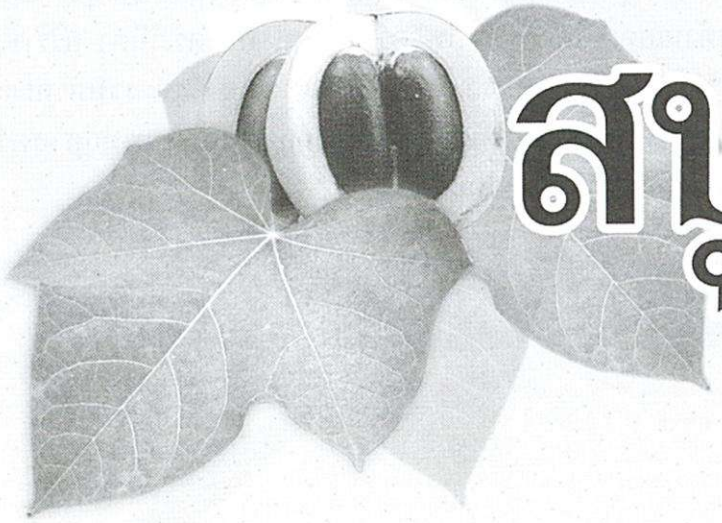
ตารางที่ 41 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำในหลอดทดลอง 156

ตารางที่ 42 สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่าง ๆจากสมุนไพรสบู่ดำ 156

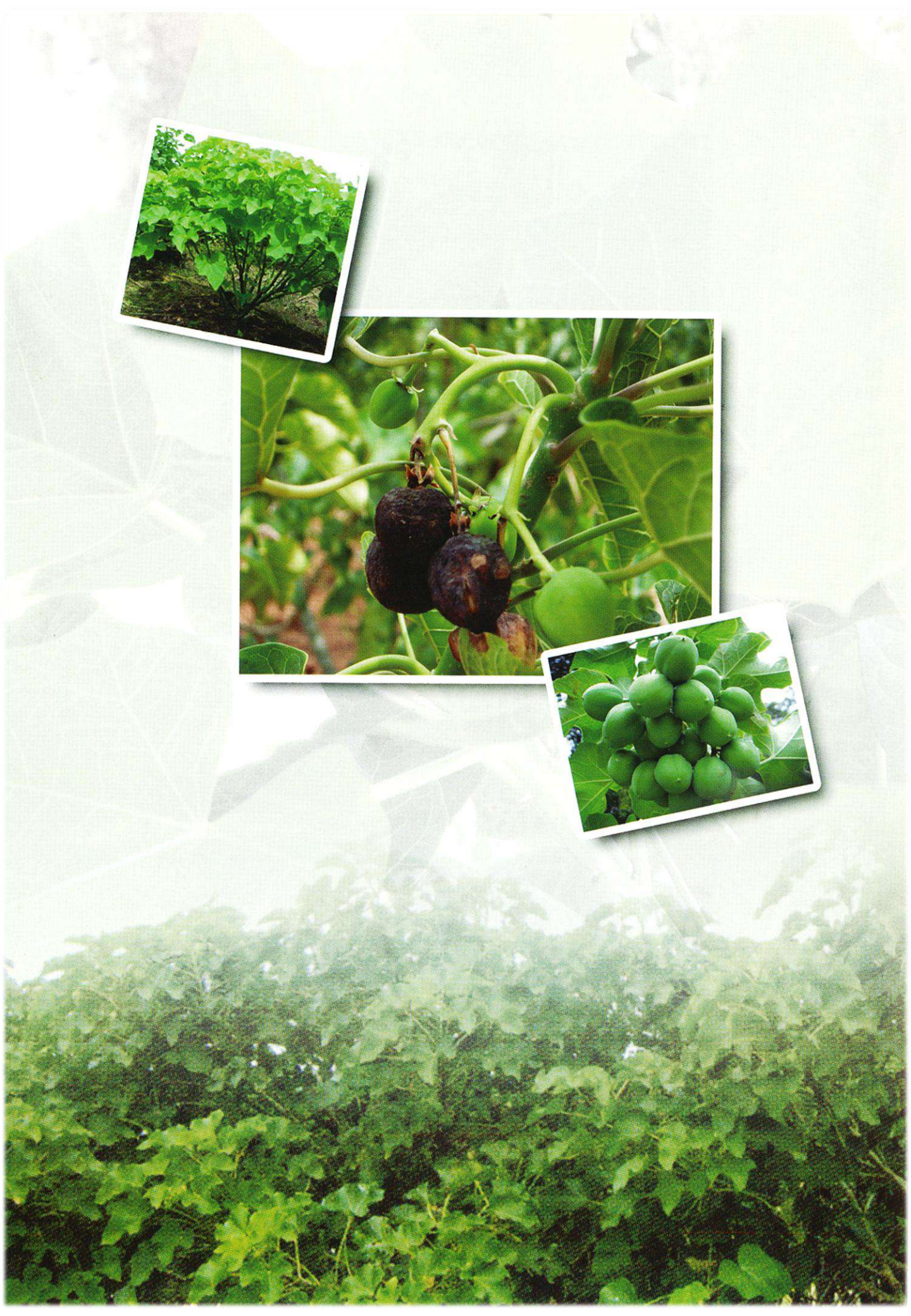
กิตติกรรมประกาศ

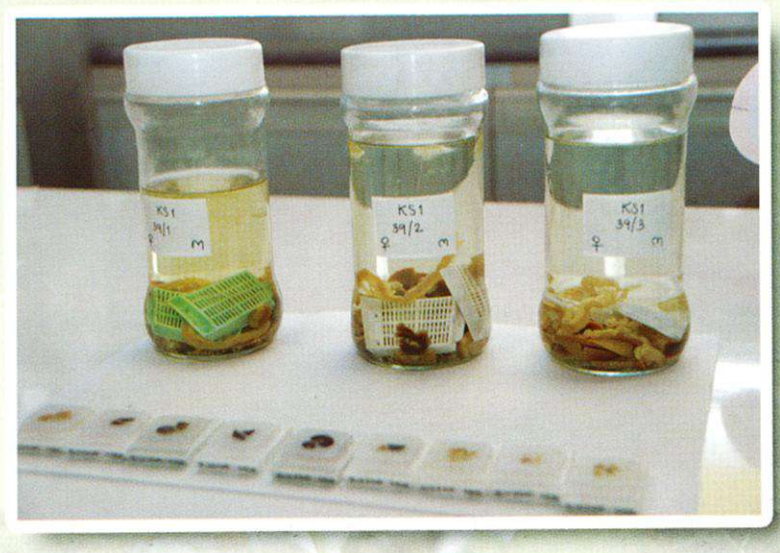
คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกท่าน ที่ได้ให้การสนับสนุนการดำเนินงานของโครงการสมุนไพรต้านเอดส์อย่างดียิ่งมาโดยตลอด นับตั้งแต่เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2540 ได้แก่ นพ.มงคล ณ สงขลา, ดร.เรณู โกยสุโข, ศ.ดร.ภักดี โพธิศิริ, นพ.ณรงค์ศักดิ์ อังคะสุวพลา และ นพ.สมทรง รักษ์เผ่า ซึ่งเป็นผู้ริเริ่มโครงการ รองอธิบดีที่รับผิดชอบสถาบันวิจัยสมุนไพรและสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข และผู้อำนวยการโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ ได้แก่ นพ.ไพจิตร์ วราชิต, พญ.ดร.วินิตา บริราช, นพ.สถาพร วงษ์เจริญ, นพ.สุพรรณ ศรีธรรมา และ นพ.บุญชัย สมบูรณ์สุข รวมทั้งคณะผู้ร่วมวิจัยทางคลินิกจากโรงพยาบาลหลายแห่งในภาคเหนือ และจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และมหาวิทยาลัยขอนแก่น

รายงานการศึกษาวิจัยโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ 2



สมุ่ดำ




KS1
39/1
♀ M
KS1
39/2
♀ M
KS1
39/3
♀ M

TC-500

TEEPOL
EDTA tube

บทที่ 1
บทนำ

สุธิดา ไชยราช

ความสำคัญ

โรคเอดส์เป็นปัญหาสาธารณสุขที่ทวีความรุนแรงมากขึ้นตามลำดับ ปัจจุบันประเทศชาติต้องใช้จ่ายเงินจำนวนมหาศาลเพื่อรักษาพยาบาลผู้ติดเชื้อและผู้ป่วยเอดส์ โดยมีเป้าหมายในการรักษาคือส่งเสริมให้ผู้ป่วยมีสุขภาพดีหรือชะลอการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวี และรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่เกิดขึ้นจากเชื้อรา แบคทีเรีย หรือไวรัสเมื่อภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอลง ซึ่งอาจทำได้โดยการใช้ยาต้านเชื้อเอชไอวี ยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพต่าง ๆ และการกระตุ้นหรือเสริมภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย

เนื่องจากยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อเอชไอวี และยาต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาส รวมทั้งยากระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เช่น interleukin-2 มีราคาแพง นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อต่าง ๆ ที่ก่อปัญหาในผู้ป่วยเอดส์เริ่มดื้อต่อยาที่ใช้รักษาแล้ว ประเทศไทยมีสมุนไพรซึ่งเป็นทรัพยากรในประเทศที่อาจมีศักยภาพในการส่งเสริมสุขภาพหรือรักษาผู้ป่วยเอดส์ และผู้ติดเชื้อเอชไอวีอยู่หลายชนิด สมควรที่จะนำมาศึกษาวิจัยหาหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มาสนับสนุนการใช้สมุนไพรนั้น ๆ เพื่อส่งเสริมการนำมาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบันและเป็นทางเลือกใหม่อีกทางหนึ่งของผู้ป่วยเอดส์และผู้ติดเชื้อเอชไอวี

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตระหนักถึงความสำคัญของปัญหาเหล่านี้ จึงได้แต่งตั้งคณะกรรมการโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ขึ้นเมื่อวันที่ 5 ตุลาคม 2538 เพื่อประสานงานในการดำเนินการวิจัยสมุนไพรหรือยาตำรับจากสมุนไพรอย่างครบวงจร โดยนักวิจัยสาขาต่าง ๆ ในกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อให้ได้มาซึ่งยาหรือผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการส่งเสริมสุขภาพ รักษา หรือฟื้นฟูสภาพของผู้ติดเชื้อเอชไอวี และผู้ป่วยเอดส์ เพื่อช่วยแก้ไขปัญหาโรคเอดส์ของประเทศ ส่งเสริมนโยบายการพึ่งตนเองด้านยา ลดการนำเข้ายาจากต่างประเทศและส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตยาภายในประเทศ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อสนับสนุนการใช้สมุนไพรที่ได้ผ่านการศึกษาและพิสูจน์สรรพคุณและความปลอดภัยด้วยวิธีการทางวิทยาศาสตร์แล้วในการรักษาโรคเอดส์ โรคติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์ และการใช้สมุนไพรเพื่อบำรุงสุขภาพหรือเสริมภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวีหรือผู้ป่วยเอดส์

เป้าหมายเมื่อสิ้นสุดโครงการ

1. วิจัยพบสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีอย่างน้อย 1 ชนิด
2. วิจัยพบสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสอย่างน้อย 3 ชนิด
3. วิจัยพบสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างน้อย 1 ชนิด

ระยะเวลาดำเนินการ

5 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2540-2544 และได้ขยายเวลาออกไปอีก 3 ปี จนถึงปีงบประมาณ 2547

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ประโยชน์ทางการแพทย์และสาธารณสุข ผู้ป่วยโรคเอดส์และผู้ติดเชื้อเอชไอวี จะได้มียาใหม่จากสมุนไพรเพื่อใช้บำรุงสุขภาพ ใช้ในการรักษาโรคเอดส์และโรคติดเชื้อฉวยโอกาส

2 ประโยชน์เชิงเศรษฐกิจและการพาณิชย์

2.1 ลดงบประมาณของรัฐในการรักษาพยาบาลผู้ป่วยโรคเอดส์

2.2 ลดการขาดดุลย์จากการนำเข้ายาจากต่างประเทศ

2.3 ช่วยเพิ่มรายได้แก่เกษตรกรผู้ปลูกสมุนไพร

2.4 ช่วยพัฒนาอุตสาหกรรมยาจากสมุนไพรอย่างเป็นระบบเพื่อการพึ่งตนเอง

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. องค์การเภสัชกรรมหรือบริษัทยาภาคเอกชนผลิตยาสำหรับผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยเอดส์

2. สถานพยาบาลต่าง ๆ ทั้งภาครัฐ (ในสังกัดกระทรวงสาธารณสุขและทบวงมหาวิทยาลัย) และสถานพยาบาลของเอกชน

3. เกษตรกรมีรายได้จากการปลูกสมุนไพรในระดับอุตสาหกรรม เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยา

4. ผู้ป่วยเอดส์และผู้ติดเชื้อเอชไอวี รวมทั้งประชาชนทั่วไป

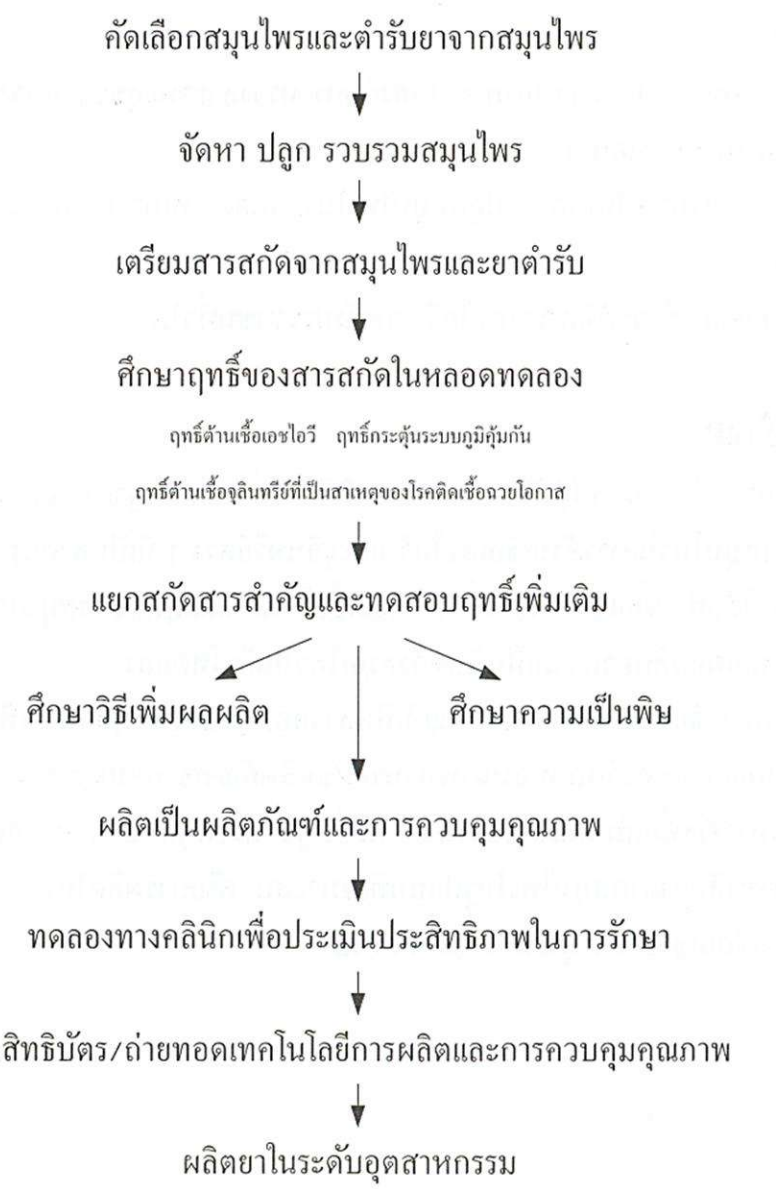
ระเบียบวิธีวิจัย

1. ศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการและทางคลินิก เพื่อหาหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ของสมุนไพรในการต้านเชื้อเอชไอวี และจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อฉวยโอกาส ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัส และฤทธิ์ของสมุนไพรในการเสริมภูมิคุ้มกัน ตลอดจนศึกษาความเป็นพิษของสมุนไพรในสัตว์ทดลอง

2. ศึกษาวิจัยทางเคมีหาสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ของสมุนไพร เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรและเภสัชผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร

3. ศึกษาวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตของสมุนไพรที่พิสูจน์สรรพคุณและความปลอดภัยแล้ว และพัฒนาวิธีการผลิตยาจากสมุนไพรในรูปแบบที่เหมาะสม เพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมสำหรับผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยโรคเอดส์ต่อไป

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยโครงการสมุนไพรต้านเอดส์



กิจกรรมหลักของโครงการ

โครงการสมุนไพรต้านเอดส์ ประกอบด้วยโครงการย่อย 18 โครงการ ดังนี้

1. โครงการคัดเลือกและจัดอันดับความสำคัญของสมุนไพร

รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสมุนไพรต่าง ๆ ที่สมควรนำมาศึกษา วางแนวทางในการคัดเลือกสมุนไพรที่จะนำมาศึกษาสรรพคุณในการรักษาโรคเอดส์ โรคติดเชื้อฉวยโอกาสต่าง ๆ รวมทั้งสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และพิจารณาคัดเลือกและจัดลำดับความสำคัญของสมุนไพรนั้น ๆ

2. โครงการคัดเลือกตำรับยาจากสมุนไพรเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเอดส์

คัดเลือกตำรับยาแผนโบราณที่ขึ้นทะเบียนกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และตำรับอื่น ๆ ที่มีศักยภาพพอที่จะศึกษาวิจัยเพื่อทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อเอชไอวี เชื้อแบคทีเรีย หรือเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์ และกำหนดคุณภาพมาตรฐานตำรับยาที่พบว่ามีฤทธิ์ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งตรวจวิเคราะห์คุณภาพตำรับยานั้นก่อนใช้ศึกษาทดลองทางคลินิก

3. โครงการสำรวจสมุนไพรและศึกษาทางพฤกษศาสตร์

ตรวจสอบชนิด และศึกษาลักษณะประจำชนิดสมุนไพร และชนิดใกล้เคียงที่สมควรนำมาศึกษาวิจัย ตลอดจนเพื่อรวบรวมและคัดเลือกพืชจากแหล่งธรรมชาติให้ได้วัตถุดิบที่มีความถูกต้องตรงตามความต้องการ และมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยสาขาต่าง ๆ

4. โครงการปลูกและขยายพันธุ์พืชสมุนไพรเป็นวัตถุดิบ

ทำการขยายพันธุ์พืชสมุนไพรที่ใช้ต้านเอดส์ โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อลดระยะเวลาในการเจริญเติบโตของสมุนไพรและให้ได้ปริมาณสารสำคัญสูง

5. โครงการสกัดและศึกษาทางเคมีของสมุนไพรต้านเอดส์

ศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรต่าง ๆ ที่คัดเลือกแล้วส่งทดสอบฤทธิ์ต่อเชื้อไวรัส เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน สารสกัดใดที่แสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจจะศึกษาวิจัยทางเคมี โดยแยกส่วนออกฤทธิ์หรือสารออกฤทธิ์ที่บริสุทธิ์ ศึกษาหาวิธีควบคุมคุณภาพ และตรวจวิเคราะห์คุณภาพของยาเตรียมที่ใช้ในการทดลองทางคลินิก

6.โครงการตรวจคัดกรองสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีด้วยวิธีการตรวจการยับยั้งเอนไซม์

ตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในหลอดทดลอง ในกลุ่มยับยั้งเอนไซม์ Reverse Transcriptase และ Protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ของเอชไอวีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสภายในเซลล์

7.โครงการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี

ค้นหาและศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรหรือส่วนผสมของสมุนไพรต่อการทำลายไวรัสเอดส์ หรือยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส โดยการทดสอบในหลอดทดลองก่อนที่จะสามารถนำมาใช้ในการรักษาหรือบรรเทาอาการของโรคเอดส์ในผู้ป่วย

8.โครงการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกันของสมุนไพรและยาตำรับจากสมุนไพร

ศึกษาสมุนไพรหรือยาตำรับจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นการตอบสนองและสร้างเสริมภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวี และผู้ป่วยเอดส์ รวมทั้งฤทธิ์สร้างเสริมภูมิคุ้มกันเชื้อฉวยโอกาสที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อเอดส์ก่อนนำไปทดสอบทางคลินิกถึงประสิทธิภาพในการรักษาต่อไป

9.โครงการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสจากเชื้อแบคทีเรียซาลโมเนลล่า

ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งและทำลายเชื้อซาลโมเนลล่าในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นแนวทางในการนำสมุนไพรมารักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสจากเชื้อซาลโมเนลล่าในผู้ป่วยเอดส์แทนยาแผนปัจจุบัน

10 โครงการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในการต้านเชื้อราฉวยโอกาส

ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรและหรือยาตำรับจากสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสจากเชื้อราในผู้ป่วยเอดส์

11. โครงการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสจากเชื้อ Herpes Simplex Virus (HSV), Varicella Zoster Virus (VZV) และ Human Herpes Virus 8 (HHV8)ในผู้ป่วยเอดส์

คัดเลือกสารสกัดที่เหมาะสมและมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสกลุ่มเฮอร์ปีส์ ชนิด HSV, VZV หรือ HHV8 มาพัฒนาเป็นยาในรูปแบบยาทา ยาฉีด หรือยารับประทานตามความเหมาะสม และทดสอบประสิทธิภาพของยาที่เตรียมขึ้นสำหรับทดลองทางคลินิกเพื่อรักษาโรคเริม โรคงูสวัด หรือโรค Kaposi's sarcoma

12. โครงการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการต้านเชื้อ Cytomegalovirus และ Epstein-Barr virus

ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ Cytomegalovirus และ Epstein-Barr virus ของสมุนไพรในเซลล์เพาะเลี้ยง

13. โครงการศึกษาพิษของสมุนไพรและยาตำรับจากสมุนไพรในสัตว์ทดลอง

ศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน พิษกึ่งเรื้อรัง หรือพิษเรื้อรังของสมุนไพรหรือยาตำรับจากสมุนไพรที่มีการศึกษาทางเภสัชวิทยาแล้วว่ามีผลต่อการรักษาโรคเอดส์ โรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่เกิดจากแบคทีเรีย ไวรัส หรือเชื้อรา หรือสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เพื่อยืนยันความปลอดภัยของสมุนไพรหรือยาตำรับก่อนนำไปทดสอบทางคลินิกถึงประสิทธิภาพในการรักษาต่อไป

14. โครงการพัฒนารูปแบบยาจากสมุนไพรต้านเอดส์

ศึกษาและพัฒนารูปแบบยาจากสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเอดส์ ให้เป็นยาที่มีรูปแบบเหมาะสมและถูกต้องตามหลัก Good Manufacturing Practice (GMP) มีขนาดและปริมาณตัวยาแน่นอน สามารถควบคุมคุณภาพมาตรฐานได้อย่างยาแผนปัจจุบัน

15. โครงการศึกษาฤทธิ์ของยาสมุนไพรทางคลินิก

ศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยเบื้องต้นของยาจากสมุนไพรในการรักษาโรคติดเชื้อเอชไอวีและโรคเอดส์

16. โครงการศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรไทยบางชนิดเพื่อยืนยันฤทธิ์ต้านไวรัสเอชไอวี

ศึกษาแยกหาสารสำคัญเฉพาะจากสารสกัดของสมุนไพรที่ได้ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีศักยภาพหรือแสดงฤทธิ์ต้านไวรัส HIV และหาสูตรโครงสร้างทางเคมีเฉพาะสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์เท่านั้น

17. โครงการเตรียม ผลิต และควบคุมคุณภาพสัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพร

เตรียมสัตว์ทดลองต้นแบบที่จำเป็นและมีคุณสมบัติเฉพาะเพื่อให้เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรที่ได้คัดเลือกแล้ว เพื่อเป็นการสนับสนุนการวิจัยก่อนที่จะนำไปใช้ในมนุษย์ต่อไป

18. โครงการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสมุนไพรต้านเอดส์

ศึกษาหาอัตราเร็วในการดูดซึมและขจัดยาออกจากร่างกายของสัตว์ทดลอง

บทที่ 2

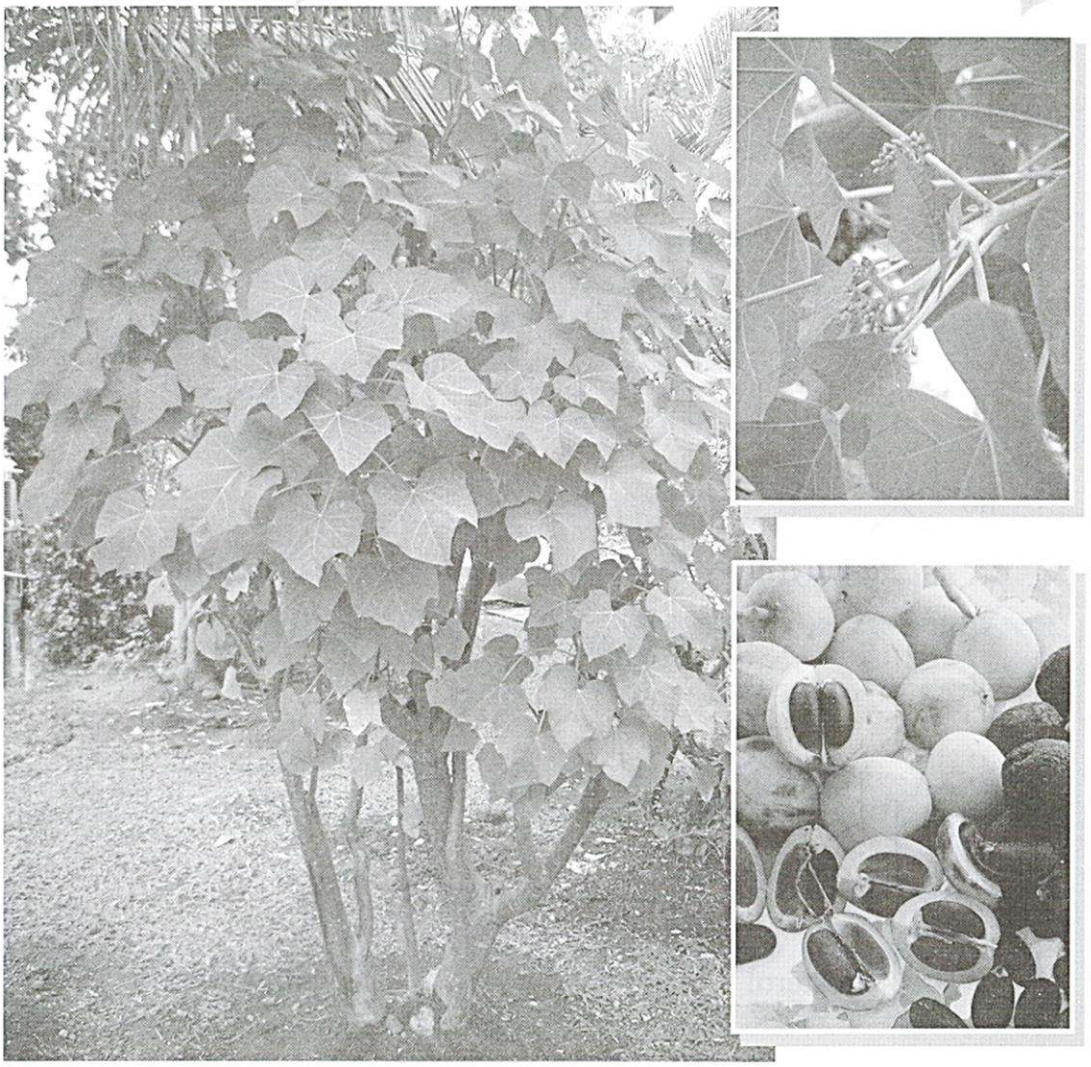
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสบู่ดำ

เย็นจิตร เตชะดำรงสิน
จารีย์ บันสิทธิ์

สบู่ดำเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่คณะผู้วิจัยใน “โครงการสมุนไพรต้านเอดส์” เห็นควรนำมาศึกษา โดยพิจารณาจากข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของสมุนไพร ประวัติการใช้ รวมทั้งเป็นสมุนไพรไทยที่อยู่ในตระกูลเดียวกับสมุนไพรต่างประเทศที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวี หรือเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสหรือมีฤทธิ์กระตุ้นหรือเสริมภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังคัดเลือกโดยอาศัยข้อมูลจากภูมิปัญญาท้องถิ่น หรือมีการทดลองใช้รักษาผู้ป่วยแล้วพบว่าทำให้ผู้ป่วยมีสุขภาพดีขึ้นหรือสามารถรักษาอาการบางอย่างของผู้ป่วยเอดส์ได้ดี

ความรู้ทั่วไป

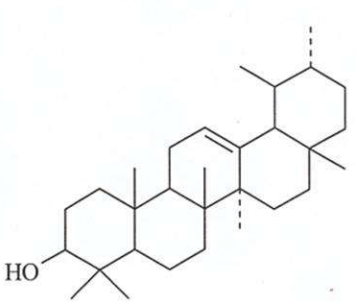
สบู่ดำเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. ชื่อสามัญคือ Physic nut, Purging nut[1-2] ส่วนชื่อในภาษาไทย เรียกต่างๆ กัน ภาคกลางเรียก สบู่ดำ สบู่หัวเทศ สลอดดำ สลอดป่า สลอดใหญ่ และ สี่หลอด ภาคเหนือเรียก พมักเยา มะเยา มะหัว มะหุ่งฮั้ว มะโห่ง และ หงทก[1] ชื่อในภาษาจีนเรียก หมาเฟิงสู้ และ มั่วฮวงชิ่ว[3] ใช้ส่วนใบ ราก ยาง น้ำมัน และเมล็ดทำยา มีรายงานการใช้สมุนไพรชนิดนี้ของแพทย์แผนโบราณในประเทศต่างๆ ดังนี้ ชาวพื้นเมืองในประเทศคาเมอรูนใช้น้ำต้มจากใบเป็นยารักษาโรคข้ออักเสบ[4] ชาวโคลัมเบียใช้รักษากามโรค[5] ชาวคอสตาริกันใช้ใบเป็นยาพอกรักษาโรคไฟลามทุ่ง ชาวกัวเตมาลาใช้ใบย่างไฟเป็นยาทาภายนอกช่วยขับน้ำนม ชาวบาร์บาเดียนใช้ยาชงจากใบแก้ผอมแห้งในเด็ก และชาวปานามาใช้เป็นยาแก้โรคดีซ่านในตำรายาไทย ใช้ใบทำเป็นยาชงกินแก้ไอ ทำเป็นยาต้มแก้ท้องเสีย ลดไข้ แก้ไอ อมบ้วนปากช่วยให้เหงือกแข็งแรง และใช้ใบตำพอกหรือคั้นเอาน้ำทารักษาแผลเรื้อรัง ฝี ลดการอักเสบ[6] เป็นต้น นอกจากนี้ น้ำต้มจากรากใช้เป็นยาแก้โรคบิด[5] ใช้บ้วนปากแก้ปวดฟันและเหงือกอักเสบ รักษาโรคผิวหนัง กลาก และโรคหิด[7-8] น้ำยางใช้เป็นยาแก้ปวดฟัน แก้แผลไฟไหม้ริดสีดวงทวารหนัก ขี้กลาก และแผลเปื่อย[5] เมล็ดใช้เป็นยารักษาอาการบวมน้ำ โรคเก๊าท์ อัมพาต และโรคผิวหนัง[9] น้ำมันจากเมล็ดใช้เป็นยาทำให้อาเจียน ยาระบาย ยาถ่าย และยาแก้โรคผิวหนัง[7]



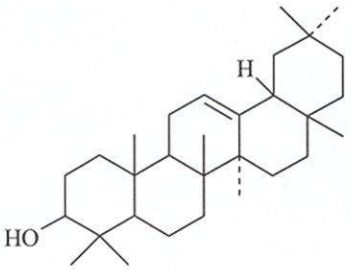
รูปที่ 1 สบู่ดำ (*Jatropha curcas* Linn.)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

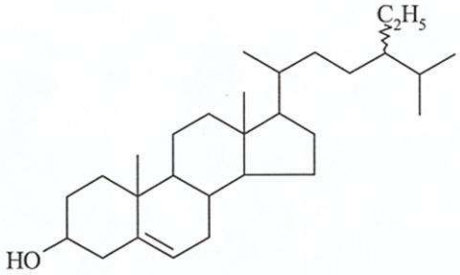
สบู่ดำมีลักษณะเป็นไม้พุ่ม มีน้ำยาง ใบเดี่ยวออกสลับ แผ่นใบรูปไข่หรือค่อนข้างกลม ปลายใบแหลม โคนใบเว้ารูปหัวใจ ขอบใบหยักเว้า 5 แฉก เส้นใบออกจากจุดโคนใบ 5-7 เส้น ดอกแยกเพศอยู่ในช่อเดียวกัน สีเหลืองอมเขียว ออกตามปลายกิ่งและง่ามใบ ดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบดอกโคนติดกันปลายแยก 5 กลีบ เกสรเพศผู้ 10 อัน ดอกเพศเมียคล้ายดอกเพศผู้แต่มีขนาดใหญ่กว่า รังไข่มี 3 พู ยอดเกสรแยกเป็นริ้ว ๆ ผลค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-3.5 เซนติเมตร ภายในมี 3 ช่อง แต่ละช่องมี 1 เมล็ด ผลแก่แห้งแล้วแตก เมล็ดแก่สีดำ



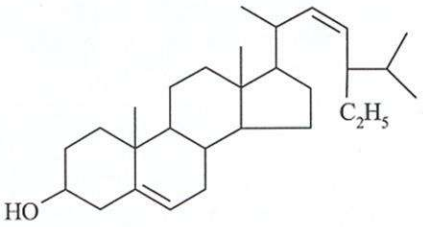
α-amyrin



β-amyrin

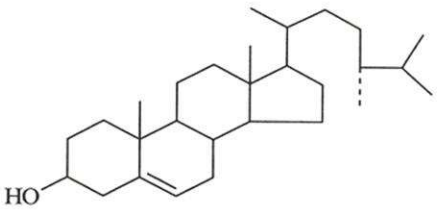


β-sitosterol

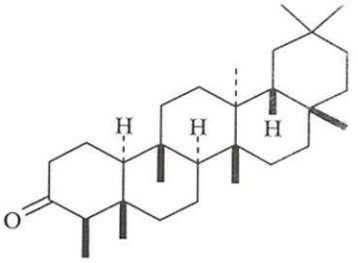


stigmasterol

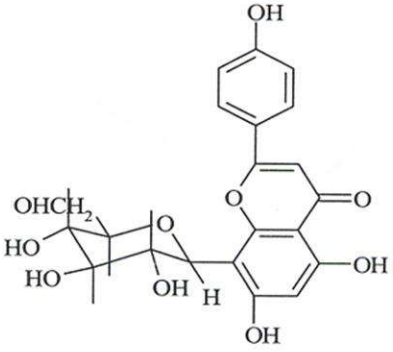
รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญบางชนิดที่พบในสมุนไพรสบู่ดำ



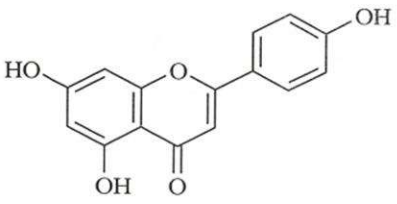
campesterol



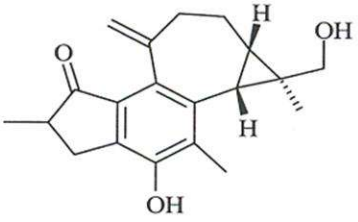
friedelin



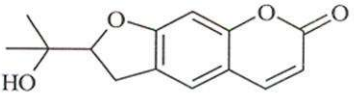
vitexin



apigenin

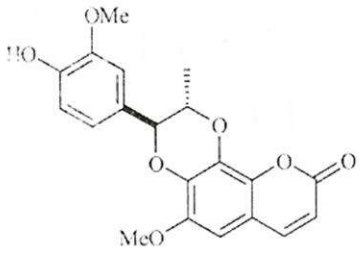


(+)-jatrophol

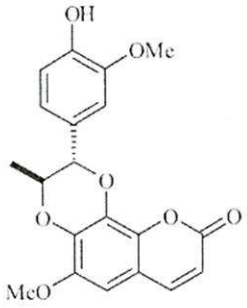


(+)-marmesin

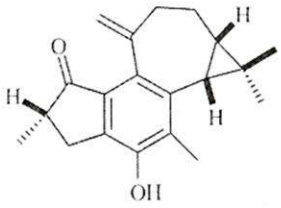
รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญบางชนิดที่พบในสมุนไพรสบู่ดำ (ต่อ)



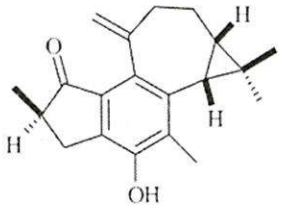
propacin



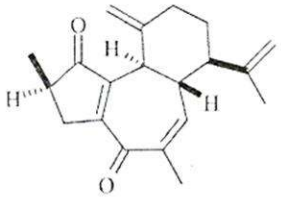
jatropin



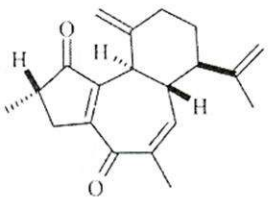
jatropholone A



jatropholone B

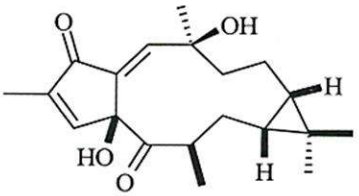


curcusone A

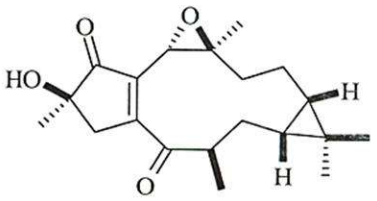


curcusone B

รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญบางชนิดที่พบในสมุนไพรสบู่ดำ (ต่อ)



curculathyrane A



curculathyrane B

รูปที่ 2 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญบางชนิดที่พบในสมุนไพรสบู่ดำ (ต่อ)

องค์ประกอบทางเคมี

สารเคมีในพืชมีหลายชนิดแตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆ ของพืช การทราบสารเคมีที่สำคัญจะช่วยให้สามารถนำสมุนไพรมาพัฒนาเป็นยาได้อย่างเหมาะสม จากรายงานการศึกษาวิจัยสมุนไพรสบู่ดำ พบว่า ใบประกอบด้วย a-amyrin, b-sitosterol, stigmasterol, campesterol, 7-keto-b-sitosterol, stigmast-5-ene-3-b,7-a-diol และ stigmast-5-ene-3-b,7-b-diol[5], isovitexin, vitexin, apigenin นอกจากนี้ยังพบ steroid sapogenins, alkaloids, triterpene alcohol, l-tricontanol, 5-hydroxypyrrolidin-2-one และ pyrimidine-2,4-dione[10] ลำต้นประกอบด้วย scopoletin methyl ether, friedelin, epifriedlinol, jatrocurin[11] เปลือกต้นประกอบด้วย b-amyrin, taraxerol และ b-sitosterol[12] รากประกอบด้วย curculathyrane A[13], B[14], jatropholone A, B, jatrophol[15], curcusones A,B,C,D[13], marmesin, propacin, jatrophin[15] เมล็ดประกอบด้วย resin และ toxalbumin คือ curcin (jatropin) และน้ำมันจากเมล็ดประกอบด้วย 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters[15]

ผลทางเภสัชวิทยา

เมล็ดมีฤทธิ์เป็นยาถ่ายอย่างแรง คล้ายผลสลอด (*Croton toglium* L.) แต่ฤทธิ์อ่อนกว่า เมื่อใช้เมล็ดที่กระเทาะเปลือกออกแล้ว 3-5 เมล็ดมาบดเป็นผงกินทำให้ถ่ายท้อง และอาเจียนได้ หรือรู้สึกแสบร้อนท้อง อาการคล้ายพิษที่เกิดจากเมล็ดละหุ่ง กากที่บีบน้ำมันออกแล้วเป็นพิษต่อเลือด จึงใช้เป็นอาหารวัวควายไม่ได้ นอกจากนี้สารบางชนิดในเมล็ดมีผลเพิ่มการเคลื่อนไหวของลำไส้เล็กของหนูขาวซึ่งการให้อะโทรปีนก็ไม่สามารถจะยับยั้งฤทธิ์นี้ได้ เมล็ดยังมีสารบางตัวที่มีฤทธิ์ในการห้ามเลือด คือจะทำให้เลือดแข็งตัวเร็ว[3]

ความเป็นพิษ

เมล็ดเป็นส่วนที่มีพิษมาก สารเป็นพิษคือ resin และ toxalbumin คือ curcin (jatropin)[18] ถ้าน้ำยาง(resin) ถูกผิวหนังจะเกิดอาการแพ้ มีรายงานว่าหลังจากรับประทานเมล็ดเข้าไปประมาณ 1 ชั่วโมงจะเกิดอาการปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเสีย ถ่ายเป็นเลือด กล้ามเนื้อชักกระตุก หายใจเร็ว ความดันต่ำ หัวใจเต้นผิดปกติ[18] และทำให้คนท้องแท้งได้[19] การรักษาเบื้องต้น ถ้ารับประทานเข้าไปให้เอาส่วนที่ไม่ถูกดูดซึมออกโดยใช้ activated charcoal ล้างท้อง หรือทำให้อาเจียน และรักษาตามอาการ[18]

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม). บริษัทประชาชน จำกัด กรุงเทพฯ. 2544.
2. James AD. Handbook of Energy Crops. Center for New Crop & Plants Products, Purdue University, U.S.A. 1983.
3. Jiangsu New Medical College. A Dictionary of Chinese Materia Medica. Vol.II. Shangwu, HongKong. 1979 (in Chinese).
4. Watt JM and Breyer-Brandwijk MG. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. 2 nd ed. E. & S. Livingstone, Ltd., Edinburgh and London. 1962.
5. Morton JF. Atlas of medicinal plants of middle America. Bahamas to Yucatan. C.C. Thomas, Springfield, IL. 1981.
6. ลีนา ผู้พัฒนพงศ์. สมุนไพรไทย ตอนที่ 5. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ชุติมาการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 2530.
7. Perry LM. Medicinal plants of east and southeast Asia. MIT Press, Cambridge. 1980.
8. Duke JA and Ayensu ES. Medicinal plant of China. Reference Publications, Inc. Algonac, MI. 1985.
9. Watt JM and Breyer-Brandwijk MG. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. 2nd ed. E & S Livingstone, Ltd., Edinburgh and London. 1962.

10. Staubmann R, Schubert-Zsilavecz, Hiermann A and Kartnig T. Acomplex of 5-hydroxy-pyrrolidin-2-one and pyrimidine-2,4-dione isolated from *Jatropha curcas.* Phytochemistry.1999; 50: 337-338.
11. Talapatra SK, Mandal K and Talapatra B. Jatrocurcin, a New Tetracyclic Triterpene from *Jatropha curcas.* Journal of the Indian Chemical Society. 1993; 70(6): 543-548.
12. Mitra CR, Bhatnagar SC and Sinha MK. Chemical examination of *Jatropha curcas.* Indian J. Chem. 1970; 8(11): 1047.
13. Temcharoen P, Glinsukon T. and Naengchomnong W. Antibacterial Activity of Curcusones and Curculathyranes from *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). Thai J. Toxicology 1992; 8: 31-34.
14. Picha P, Naengchamnong W, Kano E, Hayashi S, Ohtsubo T, Matsumoto H, Shioura H and Ondee S. NRCT-JSPS Core University System, Pharmaceutical Sciences and Chemistry of Natural Products & Polymer Sciences. The Third Joint-Seminar. Current Advances in Natural Products Research. November 27-29, Bangkok, Thailand. 1996.
15. Oluwole FS and Bolarinwa AF. *Jatropha curcas* Extract Causes Anaemia in Rat. Phytotherapy Research. 1997; 11:538-539.
16. Francois MT and Droit S. Pyrolysis of oil of Barbados nuts, *Jatropha curcas* L. Bull.Soc.Chim. 1933; 53: 728-741.
17. Koley SN, Bhattacharyya D and Saha A. Oils from *Jatropha curcas.* Ind. Chim. Belge. 1969; 34 (4): 301-2.
18. กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือพืชพิษ 1. บริษัทเท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล จำกัด กรุงเทพฯ. 2536. หน้า 69.
19. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi. The Wealth of India. Sree Saraswaty Press, Ltd., Calcutta. 1969.

บทที่ 3

การเตรียมสารสกัดสบู่ดำ

เย็นจิตร เตชะดำรงสิน
จารีย์ บันสิทธิ์

การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร

แม้ว่าการสกัดพืชสดจะให้ปริมาณสารสำคัญสูงกว่าการสกัดพืชแห้งก็ตาม แต่วิธีนี้ไม่สะดวกและไม่เหมาะกับอุตสาหกรรม จึงนิยมนำพืชสดมาทำให้แห้งก่อน การทำแห้งจะช่วยป้องกันการเกิดเชื้อราและช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญบางชนิด โดยทั่วไปพืชสดจะมีน้ำอยู่ประมาณร้อยละ 70-80 การทำให้พืชแห้งจะใช้เวลาแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของพืชและส่วนที่ใช้ การทำแห้งโดยให้คงคุณภาพควรทำทันทีหลังจากเก็บพืชมา และทำให้แห้งโดยเร็วและใช้อุณหภูมิต่ำ เพราะการใช้อุณหภูมิสูงอาจทำให้สารสำคัญสลายตัวได้

แยกเตรียมโดยนำใบหรือลำต้นของสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) สดมาหั่นให้มีขนาดเล็กลงตามความเหมาะสม นำไปล้างให้สะอาด ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ อบให้แห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดเป็นผง บรรจุในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิดมิดชิด ปิดฉลาก เก็บในที่สะอาด มีอากาศถ่ายเทได้ดี และไม่ชื้น

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

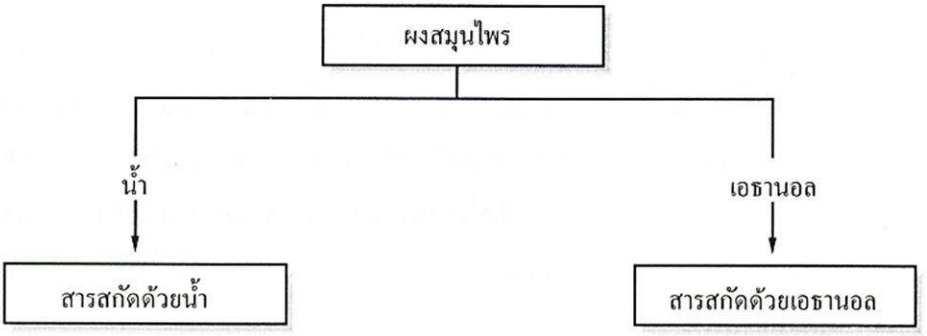
การสกัดเป็นการดึงหรือชะส่วนที่ละลายออกจากส่วนที่ไม่ละลาย(ส่วนที่เหลือ) ซึ่งอาจเป็นของแข็งหรือของเหลวก็ได้ ด้วยการใช้ตัวทำละลาย (solvent) ที่เป็นของเหลวที่เหมาะสม ความสามารถของการสกัดจะขึ้นกับอัตราการซึมผ่าน(rate of diffusion) ของส่วนที่ละลายผ่านชั้นสัมผัสของของเหลวที่ทำหน้าที่เป็นตัวทำละลาย กับสารตั้งต้นที่จะสกัด เนื่องจากสารประกอบในพืชมีมากมายหลายชนิดและมีคุณสมบัติแตกต่างกันมาก การเลือกตัวทำละลายที่สมบูรณ์สามารถสกัดสารทุกกลุ่มที่ต้องการออกมาจึงทำได้ยาก โดยทั่วไปการสกัดสมุนไพรจะอิงการใช้ของแพทย์แผนโบราณ เช่น ต้มเอาน้ำดื่ม ดองเหล้า เป็นต้น ดังนั้นตัวทำละลายที่นิยมใช้คือเอธานอล (ethanol) หรือส่วนผสมของเอธานอลกับน้ำหรือน้ำ

1. สารสกัดด้วยน้ำ (water extract)

ต้มสกัดผงสมุนไพรด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:3 โดยวิธี reflux นานครั้งละ 1 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้งกรองสารสกัดที่ได้บีบกาก รวมสารสกัดที่กรองได้ (filtrate) เข้าด้วยกัน ทำสารสกัดให้เข้มข้นโดยนำไประเหยเพื่อลดปริมาตรภายใต้แรงดันสุญญากาศโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งโดยวิธีแช่แข็งสารละลาย จากนั้นทำให้น้ำระเหิดไปโดยใช้เครื่อง lyophilizer จะได้สารสกัดแห้ง รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3

2. สารสกัดด้วยเอธานอล (ethanol extract)

นำผงสมุนไพรบรรจุลงใน extraction thimble แล้วใส่ใน soxhlet extraction apparatus ใช้เอธานอล (ethanol) เป็นตัวทำละลาย ให้ความร้อนโดยใช้ heating mantle สกัดจนกระทั่งสีของตัวทำละลายใน extractive ซีด กรองสารสกัดที่ได้นำไประเหยให้แห้งภายใต้แรงดันสุญญากาศโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียส รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แผนภูมิแสดงการเตรียมสารสกัดจากสมุนไพรสบู่ดำ

การเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง

สารสกัดด้วยน้ำที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง สามารถส่งทดสอบฤทธิ์ได้เลยหากเป็นสารสกัดด้วยน้ำที่ชื้นง่าย และสารสกัดที่ไม่ละลายน้ำ ต้องนำมาเตรียมให้อยู่ในรูป complex ของ polyvinylpyrrolidone 40,000 (PVP-40) ก่อนส่งทดสอบฤทธิ์เพื่อให้สามารถละลายในตัวกลางที่เป็นน้ำได้ดี โดยต้องระบุสัดส่วนของสารสกัด และ PVP-40 ไว้ด้วย เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของตัวยาในตัวอย่างที่นำไปทดสอบฤทธิ์ การเตรียม extract complex ทำได้ดังนี้

1. แยกชั่งสารสกัดสมุนไพรและผง PVP-40 ในสัดส่วนที่เหมาะสม
2. ละลายสารสกัดสมุนไพรในเมธานอล หรือตัวทำละลายอื่นที่เหมาะสมจนสารละลายที่ได้มีลักษณะใส (อาจต้องใช้ความร้อนช่วยในการละลาย)
3. ละลายผง PVP-40 ในเมธานอล หรือตัวทำละลายอื่นที่เหมาะสมและเข้ากัน ได้กับสารละลายของสารสกัดสมุนไพร
4. ค่อย ๆ เทสารละลายของสารสกัดสมุนไพรลงในสารละลายของ PVP-40 ทีละน้อย คนตลอดเวลาเพื่อให้สารละลายทั้งสองเข้ากัน
5. นำสารละลายที่ได้ไประเหยให้แห้งภายใต้แรงดันสุญญากาศโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียส จะได้ extract complex ตามต้องการ
6. นำ extract complex ที่ได้มาบดให้เป็นผงละเอียด บรรจุในขวดปิดสนิท ปิดฉลาก
7. นำผง extract complex ที่ได้ไปทดสอบการละลายน้ำ หากยังละลายได้ไม่ดีอาจจะต้องปรับสัดส่วนของสารสกัดสมุนไพรและผง PVP-40 ให้เหมาะสมกับคุณสมบัติของสารสกัด

ตารางที่ 1 ผลการเตรียมตัวอย่างสารสกัดสบู่ดำเพื่อการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นในหลอดทดลอง

ลำดับที่	ชนิดสารสกัด	รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารสกัด:PVP-40	ปริมาณตัวยาในตัวอย่าง (%)
1	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นแห้ง	YTA	1:2	33.33
2	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นแห้ง	YTB	1:2	33.33
3	สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง	YTC	1:2	33.33
4	สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง	YTD	1:1	50
5	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด	YTK	-	100
6	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง	YTL	-	100
7	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นและ ใบแห้ง	YTP	1:2	33.33
8	สารสกัดด้วยน้ำจากใบสด	YTQ	-	100

บทที่ 4

การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำในหลอดทดลอง

วัฒนา อู่วาณิชย์ สุธน วงษ์ชีรี เกรือวัลย์ พลจันทร
โชติกา บุญ-หลง อัญชลี จูฑะพุทธิ บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ
เย็นจิตร เตชะดำรงสิน จารีย์ บันสิทธ์ พนัสดา อิศรางกูร ณ อยุธยา
จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์ อรุณ บ่างตระกูลนนท์ นวลจันทร์ ฤชุศาศวัต
สุขใจ ผลอำไพสถิตย์ สุทธิโชค จงตระกูลศิริ หรรษา ไทยศรี
นงลักษณ์ สายประดิษฐ์ ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ ละออ ชมพักตร์
พงษ์นุวัตร ศรีงาม กาญจนา พฤษพันธ์

การทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรต่างๆ ได้ดำเนินการทดสอบเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี

1.1 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์ส ทรานสคริปเทส (Reverse Transcriptase)

1.2 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส (Protease)

1.3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี(Anti-human Immunodeficiency Virus)

2. ฤทธิ์ต้านเชื้อฉุลินทรีย์ที่ก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาส

2.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อราฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์

2.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella*

2.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อ Herpes Simplex Virus

2.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อ Cytomegalovirus และ Epstein-Barr Virus

3. ฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกัน

3.1 การศึกษาในสัตว์ทดลอง

3.2 การศึกษาโดยใช้ลิมโฟซัยท์จากคนปกติ

1. <u>การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส (Reverse Transcriptase Inhibition Assay)</u> เป็นการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในหลอดทดลอง ในกลุ่มสารยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ของเอชไอวีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสภายในเซลล์

หลักการ

เอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทสจะเร่งปฏิกิริยา reverse transcription เป็นขั้นตอนเปลี่ยน RNAให้เป็น c-DNA ในปฏิกิริยาจะใช้ Dig-dUTP และ Biotin-dUTP ผสมกับ dNTPs ทำให้เกิดผลิตผลที่ติดฉลาก Dig และ Biotin ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณได้จากการจับกับ Streptavidin-microplate และ anti Dig-peroxidase เกิดคอมเปล็กบนพื้นผิว ปริมาณ c-DNA ที่สังเคราะห์จะตรวจวัดได้โดยการทำให้เกิดสี เมื่อเติมสับสเตรตและวัดการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เอนไซม์ต้นแบบ : HIV-1 Reverse transcriptase (recombinant)

2. ส่วนประกอบของปฏิกิริยา

2.1 Poly A oligo dT_{15} template

2.2 Nucleotide Mixture: dig-dUTP, Biotin-dUTP และ dNTPs

2.3 Tris buffer pH 7.8

2.4 Reaction mixture ผสม 2.1-2.3 ได้สารละลายปริมาตร 1 ml.ประกอบด้วย 46 mM Tris, 266 mM KCl, 27.5 mM $MgCl_2$, 9.2 mM DTT, 10 µM nucleotide mixture, 750 mA_{260} template/primer

2.5 Conjugate: anti-Dig peroxidase

2.6 Substrate: TMB

2.7 Stop solution: 0.5 M H_2SO_4

2.8 สารยับยั้งเอนไซม์เปรียบเทียบ : Doxorubicin และ Dideoxy thymidinetriphosphate(ddTTP)

2.9 สารสกัดสมุนไพรที่อยู่ในรูปละลายน้ำได้และกำจัดแทนนินออกแล้ว

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 Shaking incubator, microplate type

3.2 Automate microplate washer

3.3 ELISA reader

วิธีการทดลอง

1. ขั้นตอนปฏิกิริยาเอนไซม์

1.1 หาสภาวะเหมาะสมของปริมาณเอนไซม์ที่วัดการดูดกลืนแสงได้ประมาณ 1.5-1.0 OD 450/620 โดยการเจือจางเอนไซม์ให้ได้ประมาณ 1.0-2.5 นาโนกรัม/ปฏิกิริยา

1.2 ขั้นตอนการตรวจวัดปฏิกิริยาทำในเพลทหลุม ที่เคลือบด้วย streptavidine ดังนี้ ผสมสารละลายเอนไซม์ สารละลายตัวตั้งปฏิกิริยาและสารละลายทดสอบชนิดละ 20 µl. ทำปฏิกิริยาที่ 37° C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลท ด้วย PBS-T 5 ครั้ง เติม Anti Dig-peroxidase ชนิด 200 mU/ml. หลุมละ 100 µl. ทำปฏิกิริยาที่ 37° C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลท 5 ครั้ง จากนั้นเติมสับเสตรท TMB หลุมละ 100 µl. ทำปฏิกิริยาเกิดสีนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยสารละลาย 0.5 M H_2SO_4 หลุมละ 100 µl. แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยใช้แสงความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรอ้างอิง ทุกครั้งที่วิเคราะห์ ต้องมีปฏิกิริยาควบคุม ดังนี้คือ Reagent blank, Enzyme control และสารยับยั้งเปรียบเทียบ

2. ขั้นตอนการวิเคราะห์ผลการยับยั้งเอนไซม์โดยใช้สารสกัดสมุนไพร

เตรียมสารละลายสมุนไพรสกัดที่ความเข้มข้น 250 µg/ml. ผสมกับปฏิกิริยาก่อนเติมเอนไซม์ผลการยับยั้งที่ได้มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 ของปฏิกิริยาที่ไม่มีสารยับยั้ง ผลยับยั้งเบื้องต้นต้องวิเคราะห์ความเข้มข้น สารที่ยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (Inhibition Concentration IC_{50}) โดยเจือจางสารสกัดสมุนไพรจนถึง 50 µg/ml. แล้วทำปฏิกิริยาใหม่

ผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซมรีเวอร์ส ทรานสคริปเทส ของสารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเอธานอลจากสมุนไพรสบู่ดำ จำนวน 7 ชนิด พบว่า เฉพาะสารสกัดด้วยน้ำจากใบสด (YTQ) ลำต้นและใบสด (YTK) และลำต้นและใบแห้ง (YTL) รวม 3 ชนิด แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซมรีเวอร์ส ทรานสคริปเทส ดังนี้ สารสกัด YTK มีฤทธิ์แรงสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 95 ที่ความเข้มข้น 250 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 50 มคก./มล. สารสกัด YTQ และ YTL มีฤทธิ์ปานกลางสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ร้อยละ 84.7 และ 84.9 ที่ความเข้มข้น 250 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 219 และ 212 มคก./มล. ตามลำดับ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซมรีเวอร์ส ทรานสคริปเทสของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ

ลำดับที่	ชนิดสารสกัด	รหัสตัวอย่าง	ยับยั้งเอนไซม์ RT (%)	
			250 มคก./มล.	IC_{50} มคก./มล.
1	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นแห้ง	YTA	NA	ND
2	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นแห้ง	YTB	32.4	ND
3	สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง	YTC	NA	ND
4	สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง	YTD	41.6	ND
5	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด	YTK	95.0	50
6	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง	YTL	84.9	212
7	สารสกัดด้วยน้ำจากใบสด	YTQ	84.7	219

หมายเหตุ NA = ไม่แสดงฤทธิ์
ND = ไม่ได้ทดลอง

2. <u>การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส (Protease Inhibition Assay)</u> เป็นการตรวจคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในหลอดทดลองในกลุ่มสารยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ของเอชไอวี ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสภายในเซลล์

หลักการ

เอนไซม์โปรทีเอสเร่งปฏิกิริยา proteolysis เป็นการย่อยสลายโปรตีนเป็นเปปไทด์ หรือกรดอะมิโน วัดปริมาณผลผลิตที่ได้โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 310 นาโนเมตร

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เอนไซม์: recombinant HIV protease (Sigma-Aldrich) เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10^{-9} เท่าด้วย [50 mM sodium acetate (pH 5.0), 1 mM EDTA 2 Na และ 2 mM 2-mercaptoethanol] : glycerol ในอัตราส่วน 75:25 (v/v)
2. สารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ : 0.1 mM His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-Phe[NO_2]-Glu-Ala-Ile- Ser-NH_2(Sigma-Aldrich): ละลายใน 50 mM sodium acetate (pH 5.0)
3. สารเปรียบเทียบ (positive control): 0.1 mM Pepstatin A ที่ละลายในน้ำกลั่น
4. บัฟเฟอร์ : 2X AEND buffer เตรียมจาก 160 mM sodium acetate, 2 mM EDTA, 2 mM DTT และ 1.6 M sodium chloride ปรับให้ได้ pH 4.7

วิธีทดลอง

1. ปริมาตรส่วนผสมของปฏิกิริยา 400 µl ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ 200 µl, น้ำกลั่น 70 µl, สารละลายของสารตั้งต้น 80 µl, สารสกัดสบู่ดำ หรือ Pepstatin A 40 µl (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 µl/ml)
2. นำส่วนผสมทั้งหมดมาบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
3. เติมสารละลายของเอนไซม์ 10 µl
4. นำส่วนผสมจากขั้นตอนสุดท้าย ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 310 nm ทุก 1 นาที เป็นเวลา 40 นาที
5. ในการทดลองจะมีชุดควบคุม 2 ชุด คือ negative control และ positive control
   5.1 negative control ใช้น้ำกลั่น หรือตัวทำละลายของตัวอย่างใส่แทนสารสกัดสบู่ดำ
   5.2 positive control ใช้ 0.1 mM Pepstatin A แทนสารสกัดสบู่ดำ

   คำนวณค่า inhibitory activity ของสารสกัดสบู่ดำ จากสูตร

   $\%\ \text{inhibition} = (AUC_{\text{negative control}} - AUC_{\text{sample}}) \times 100 / AUC_{\text{negative control}}$

   Area under curve (AUC) = ($\text{Time}^2/2 \times \text{slope}$)

ผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอสของสารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง และจากลำต้นและใบสดของสมุนไพรสบู่ดำ พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด (YTK) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส ได้ร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 200 มคก./มล. แต่สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง (YTD) ไม่มีฤทธิ์ดังกล่าว รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอสของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ

ลำดับที่	ชนิดของสารสกัด	รหัสตัวอย่าง	ยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส (%) ที่ความเข้มข้น 200 มคก./มล.
1	สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง	YTD	NA
2	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด	YTK	50

หมายเหตุ NA = ไม่แสดงฤทธิ์

3. <u>การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี (Anti-Human Immunodeficiency Virus)</u> เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสเอดส์และความเป็นพิษต่อเซลล์เลี้ยงในหลอดทดลอง

หลักการ

ทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสและความเป็นพิษโดยใช้เซลล์เม็ดโลหิตขาวชนิด T-cell ที่เลี้ยงไว้ในขวดทดลองและทดสอบถึงกลไกการต้านไวรัสของสารสกัดสมุนไพร ปริมาณไวรัสที่ลดลงไปเนื่องจากฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรเปรียบเทียบกับการไม่ได้ใช้สารสกัดสมุนไพรถูกตรวจวัดปริมาณไวรัสโดยวิธี immunofluorescence assay(IFA) หรือ HIV-1 P24 antigen ELISA detection

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เซลล์

1.1 MT4 cells เป็น HTLV-1- carrying adult T-cell leukemia cell line[1] ใช้ในการทดสอบไวรัสเอชไอวี

1.2 MOLT-4 cells เป็น acute lymphocytic leukemia-derived HTLV-I negative T-cell line[2] ใช้ในการเตรียมไวรัส

เซลล์ทั้งหมดได้รับจาก Dr. Kazuyoshi Ikuta, Hokkaido University และเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์ (RPMI-1640 medium) ที่มี 10%fetal bovine serum (FBS)

2. ไวรัสเอชไอวี

HTLV-IIIB เตรียมโดยการเพิ่มจำนวนไวรัสใน continuous HTLV-III producer MOLT-4 cells[3] จำนวนเซลล์ $4x10^6$ cells/ml ในน้ำเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 7 วัน แล้วเก็บ cell free culture fluid แยกไว้เป็น 1 ml/vial ในตู้แช่แข็ง -80° C การตรวจวัดปริมาณของไวรัส HIV จะใช้วิธี HIV infectivity assay[3] มีค่าเป็น TCID 50/ml (50% Tissue culture infective dose)

วิธีทดลอง

1. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์เลี้ยงในขวดทดลอง

นำวิธีการของ Johnson VA[4] มาปรับปรุงแก้ไข โดยเจือจางสารสกัดสบู่ดำให้ได้ความเข้มข้นของสารต่างกันในน้ำเลี้ยงเซลล์ แบบ two-fold dilution เริ่มตั้งแต่ 4 มก./มล. จนถึง 0.1 มก./มล. หรือน้อยกว่า จากนั้นผสมน้ำยาสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 1 มล. กับเซลล์เลี้ยง MT-4 ($5x10^5$ เซลล์/มล.) 1 มล. ในถาด 24 หลุม (24 well cell culture cluster; Costar, Corning Incorporated, NY, USA) แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37° C , 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 5 วัน นำเซลล์ในน้ำยาสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มานับจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยวิธี Trypan blue dye exclusion test เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุมที่ใช้เซลล์ผสมกับน้ำยาเลี้ยงเซลล์เท่านั้นแต่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร แล้วคำนวณร้อยละของเซลล์ที่ลดไป (% cell reduction) เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม ความเข้มข้นของสารสกัดที่มีค่าร้อยละของเซลล์ที่ลดน้อยกว่า 10% คือความเข้มข้นของสารสกัดที่จะต้องใช้ในการทดสอบฤทธิ์ยังยั้งไวรัสเอชไอวีต่อไป

$$\% \text{ cell reduction} = \frac{\text{No. of viable cells in control - No. of viable cells in test well x 100}}{\text{No. of viable cells in control}}$$

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเอชไอวี

เป็นวิธีที่ได้ปรับปรุงแก้ไขจากวิธีของ Yarchoan R. et al[6] และ Ohki K. et al[7] โดยเจือจางสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นที่ไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้น้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี FBS ผสมกับไวรัสเอชไอวีที่มีค่า HIV infectivity titer > $1x\ 10^4$ TCID50/ml ซึ่งนำมาเจือจาง 10 เท่า (10-fold dilution) ด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มี 20% FBS โดยผสมสารสกัด 100 ไมโครลิตรกับไวรัสแต่ละความเจือจางของไวรัส 100 ไมโครลิตร ที่เติมไว้ในถาด

96 หลุม (96 well/Flat bottom; IWAKI, Asahi Technoglass, CHIBA, Japan) ความเจือจางของไวรัสละ 4 หลุม ขณะเดียวกันผสมเซลล์เลี้ยง MT-4 ($1x10^5$ เซลล์/มล.) กับน้ำยาสารสกัดสมุนไพรในหลอดทดสอบด้วย แล้วนำถาด 96 หลุม และหลอดทดสอบไปอบที่อุณหภูมิ 37° C, 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเซลล์ 50 ไมโครลิตรที่ผสมกับสารสกัดสมุนไพรลงไปทุกหลุม นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37° C, 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 5 วัน แล้วนำเซลล์ในแต่ละหลุมมาทดสอบหา HIV antigen ด้วยวิธี IFA คำนวณหาปริมาณของไวรัส มีค่าเป็น TCID 50/ml โดยวิธีของ Reed & Muench[4] เปรียบเทียบกับปริมาณไวรัสที่ผสมกับเซลล์แต่ไม่มีสารสกัดสมุนไพร(virus control) และคำนวณปริมาณไวรัสที่ลดลงจาก virus control (%reduction of HIV infectivity) สารสกัดสมุนไพรที่สามารถยังยั้งไวรัสได้ค่ามากกว่า 80% HIV Reduction ถือว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสเอชไอวีได้ ในการทำทุกครั้งได้ทดสอบสารสกัดจาก AZT เพื่อเปรียบเทียบ

$$\% \text{ reduction of HIV infectivity} = \frac{\text{TCID50/ml of virus control} - \text{TCID50/ml of sample}}{\text{TCID50/ml of virus control}} \times 100$$

ผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีของสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดด้วยเอธานอลจากสมุนไพรสบู่ดำจำนวน 7 ชนิด พบว่า สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง (YTC) และจากลำต้นและใบแห้ง (YTP) สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด (YTK) และจากลำต้นและใบแห้ง (YTL) รวม 4 ชนิด แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี ดังนี้ YTC มีฤทธิ์แรง สามารถยับยั้งเชื้อเอชไอวีได้ร้อยละ 90 ที่ความเข้มข้น 8.3 มคก./มล. รองลงมาคือ YTP สามารถยับยั้งเชื้อเอชไอวีได้ร้อยละ 90 ที่ความเข้มข้น 33.3 มคก./มล. ส่วน YTK และ YTL สามารถยับยั้งเชื้อเอชไอวีได้ร้อยละ 80 และ 85 ที่ความเข้มข้น 4,000 และ 250 มคก./มล. ตามลำดับ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีของสารสกัดต่าง ๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ

ลำดับที่	ชนิดของสารสกัด	รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้น (มคก./มล.)	ยับยั้งเชื้อเอชไอวี (%)
1	AZT	-	5.0	97-99
2	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นแห้ง	YTA	26.7	68
3	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นแห้ง	YTB	26.7	NA
4	สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง	YTC	8.3	90
5	สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง	YTD	40.0	34
6	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด	YTK	4,000	80
7	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง	YTL	250	85
8	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นและใบแห้ง	YTP	33.3	90

หมายเหตุ สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้องยับยั้งไวรัสที่ใช้ทดสอบได้ $\geq$ 80 %
NA = ไม่แสดงฤทธิ์

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราฉวยโอกาสจากผู้ป่วยเอดส์ เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งและทำลายเชื้อราที่ก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์

หลักการ

ฤทธิ์ยับยั้งและทำลายเชื้อราฉวยโอกาส 4 ชนิดในผู้ป่วยเอดส์ ได้แก่ *Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Penicillium marneffei* และ *Histoplasma capsulatum* ทั้งสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยและสายพันธุ์ของต่างประเทศ จะถูกทดสอบโดยการนำเชื้อราฉวยโอกาสจากผู้ป่วยเอดส์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งเติมสารสกัดสมุนไพร สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทำลายเชื้อราฉวยโอกาสในความเข้มข้นต่ำไม่เป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง และเป็นสมุนไพรที่หาง่ายสามารถเพาะปลูกได้ จะได้รับการคัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาแล้วทำการทดลองในอาสาสมัคร และผู้ป่วยเอดส์ที่มีโรคเชื้อราฉวยโอกาสแทรกซ้อน สำหรับการทดลองในผู้ป่วยเอดส์จะต้องเก็บวัตถุตัวอย่างของผู้ป่วยเพื่อตรวจหาเชื้อราฉวยโอกาสในห้องปฏิบัติการก่อนที่ผู้ป่วยจะได้รับยาสมุนไพร โดยวิธีเพาะเชื้อจากวัตถุตัวอย่างของผู้ป่วยมาตรวจหาเชื้อราฉวยโอกาสเป็นระยะ ๆ ว่ายาสมุนไพรสามารถทำลายเชื้อราในผู้ป่วยหรือไม่

อุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety Cabinet) ของบริษัท Yamato ประเทศญี่ปุ่น
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ของบริษัท Tomy Seiko Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
3. เครื่องปั่น (Automatic Lab-Mixer) D-10N ของบริษัท Ikeda Scientific Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น
4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ของบริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น

แหล่งที่มาของเชื้อรา

1. *Candida albicans*
   - 1.1 CDC B.385 Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA
   - 1.2 ATCC 90028 Chiba University
   - 1.3 Lab Number 36-364-43 โรงพยาบาลบำราศนราดูร (HIV+)
   - 1.4 Lab Number 40-154-33 โรงพยาบาลบำราศนราดูร (HIV+)
   - 1.5 Lab Number 40-173-19 โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า
   - 1.6 Lab Number 41-262-18 โรงพยาบาลบำราศนราดูร (HIV+)
2. *Cryptococcus neoformans*
   - 2.1 CDC 551 Meiji College of Pharmacy, Tokyo, Japan
   - 2.2 CN 45 Lab Number 40-2247-35 โรงพยาบาลบำราศนราดูร (HIV+)
   - 2.3 CN 52 Lab Number 40-120-41 โรงพยาบาลบำราศนราดูร (HIV+)
   - 2.4 CN 68 Lab Number 41-412-24 โรงพยาบาลบำราศนราดูร (HIV+)
   - 2.5 CN 69 Lab Number 41-407-19 โรงพยาบาลบำราศนราดูร (HIV+)
   - 2.6 CN 70 Lab Number 41-277-13 โรงพยาบาลบำราศนราดูร (HIV+)
3. *Penicillium marneffei*
   - 3.1 CBS 107.89 Centraalbureau voor Schimmel Cultures, Baarn, The Netherlands
   - 3.2 ATCC 201704 โรงพยาบาลลำปาง (HIV+)
   - 3.3 ATCC 201704 โรงพยาบาลลำปาง (HIV+)
   - 3.4 PM 59 = Lab Number 40-217-20 โรงพยาบาลแม่สอด (HIV+)
   - 3.5 PM 65 = Lab Number 40-160-40 โรงพยาบาลบำราศนราดูร (HIV+)

3.6 PM 66 = Lab Number 41-175-1 โรงพยาบาลบำราศนราดูร (HIV+)

4. *Histoplasma capsulatum*

4.1 CBS 213.53 Centraalbureau voor Schimmel Cultures, Baarn, The Netherlands

4.2 CBS 633.91 Centraalbureau voor Schimmel Cultures, Baarn, The Netherlands

วิธีทดลอง [8-12]

1. เตรียมเพาะเชื้อที่ใช้ทดสอบ
เพาะเชื้อรา เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาพที่พร้อมต่อการนำมาใช้ทดสอบ
2. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสบู่ดำในห้องทดลอง
2.1 ปั่น กรองสารสกัดสบู่ดำ แล้วเจือจางสารสกัดสบู่ดำที่ความเข้มข้น 20, 10, 5, 2.50, 1.25, 0.625 มก./มล.
2.2 บ่มเชื้อรา *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* พร้อมกับสารสกัดสบู่ดำ ที่อุณหภูมิ 270 ซ. เป็นเวลา 48 ชม. หรือบ่มเชื้อรา *Penicillium marneffei* และ *Histoplasma capsulatum* พร้อมกับสารสกัดสมุนไพรที่อุณหภูมิ 270 ซ. เป็นเวลา 96 ชม.
2.3 ตรวจดูการเจริญของเชื้อราด้วยตาเปล่า และกล้องจุลทรรศน์ หากพบการเจริญของเชื้อในทุกสารสกัดเจือจางค่าต่าง ๆ ก็จะยุติการวิจัยสารสกัดชนิดนั้นๆ
2.4 หากไม่พบการเจริญของเชื้อ เพาะเชื้อจากอาหารเหลวซึ่งมีสารสกัดสบู่ดำผสมอยู่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานพลาสติก แล้วบ่ม ตรวจดูการเจริญของเชื้อ
2.5 ทดสอบฤทธิ์ของสารสัดสบู่ดำในการต้านเชื้อราฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์ โดยการเก็บตัวอย่างต่าง ๆ เช่น เจาะเลือด เจาะน้ำไขสันหลังผู้ป่วย เพื่อตรวจหาเชื้อราฉวยโอกาส โดยวิธีเพาะเชื้อจากวัตถุตัวอย่างของผู้ป่วยก่อนได้รับยาสารสกัดสบู่ดำ และเป็นระยะ ๆ เมื่อได้รับยาสมุนไพร

ผลการทดสอบ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเอธานอลจากสมุนไพรสบู่ดำ จำนวน 6 ชนิด พบว่า สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง (YTC) แสดงฤทธิ์แรงที่สุด คือสามารถยับยั้งและทำลายเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ได้ที่ความเข้มข้น 1.67 มก./มล. และสามารถยับยั้งเชื้อรา *Histoplasma capsulatum* ได้ที่ความเข้มข้น 6.67 มก./มล. ส่วนสารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นแห้ง (YTA) แสดงฤทธิ์ยับยั้งและทำลายเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ได้ที่ความเข้มข้น 6.67 มก./มล. และสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นแห้ง (YTB) แสดงฤทธิ์ยับยั้งและทำลายเชื้อราดังกล่าวได้ที่ความเข้มข้น 3.33 และ 6.67 มก./มล. ตามลำดับ แต่ไม่พบสารสกัดใดแสดงฤทธิ์ยับยั้งและทำลายเชื้อรา *Candida albicans และ Penicillium marneffei* รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัดต่าง ๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ

ลำดับที่	ชนิดของสารสกัด	*Candida albicans* (มก./มล.)		*Cryptococcus neoformans* (มก./มล.)		*Histoplasma capsulatum* (มก./มล.)		*Penicillium marneffei* (มก./มล.)	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
1	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นแห้ง (YTA)	NA	NA	6.67	6.67	NA	NA	NA	NA
2	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นแห้ง (YTB)	NA	NA	3.33	6.67	NA	NA	NA	NA
3	สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง (YTC)	NA	NA	1.67	1.67	6.67	NA	NA	NA
4	สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง (YTD)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด (YTK)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง (YTL)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

หมายเหตุ NA = ไม่แสดงฤทธิ์
MIC = ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา (Minimum Inhibition Concentration)
MFC = ความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อรา (Minimum Fungicidal Concentration)

5. <u>การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียซาลโมเนลล่า</u> เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งและทำลายเชื้อซาลโมเนลล่าในห้องปฏิบัติการ

หลักการ

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสบู่ดำในการยับยั้งและทำลายเชื้อซาลโมเนลล่า ที่แยกได้จากอุจจาระของผู้ป่วยเอดส์และผู้ป่วยทั่วไปที่มีอาการอุจจาระร่วง และเชื้อซาลโมเนลล่าสายพันธุ์มาตรฐานที่ได้รับมาจาก WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella.* Institute Pasteur, Paris,France ในการทดสอบเบื้องต้นจะคัดเลือกเชื้อซาลโมเนลล่าที่พบได้บ่อย 25 สายพันธุ์ จาก 313 สายพันธุ์ เป็นตัวแทนของเชื้อทั้งหมดมาทดสอบกับสารสกัดสบู่ดำ และ ควบคุมการทดลองด้วยเชื้อมาตรฐาน 2 ชนิดคือ *E.coil* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 หากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดสบู่ดำมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อซาลโมเนลล่าที่เป็นตัวแทนได้ จึงนำเชื้อซาลโมเนลล่าสายพันธุ์อื่น ๆที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดมาทดสอบต่อ แต่หากพบว่าสารสกัดสบู่ดำไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อซาลโมเนลล่าจะหยุดการทดสอบ

อุปกรณ์และสารเคมี

(1) Incubator (MEMMERT,Germany)
(2) Autoclave (YAMATO,Japan)
(3) Hot air oven (MEMMERT,Germany)
(4) pH meter (THERMO ORION,USA)
(5) Mastascan & Replicator (MAST,England)
(6) ตู้เก็บเวชภัณฑ์อุณหภูมิต่ำ (SANYO,Thailand)
(7) *Salmonella* antiserum 1 ชุด (S&A REAGENTS, Thailand)
(8) อาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar, Muller Hinton broth (MAST,England)

วิธีทดลอง

1. ตรวจสอบความบริสุทธิ์, คุณสมบัติทางชีวเคมี และซีโรโลยีของเชื้อซาลโมเนลล่าที่คัดเลือกไว้จำนวน 313 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยเอดส์ ผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วง และสายพันธุ์มาตรฐาน
2. ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสบู่ดำต่อเชื้อซาลโมเนลล่าในห้องปฏิบัติการโดยเลือกเชื้อซาลโมเนลล่าที่พบได้บ่อย 25 สายพันธุ์ มาทดสอบในเบื้องต้น โดยมีการควบคุมการทดลองด้วยเชื้อมาตรฐาน 2 ชนิดคือ *E.coil* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 หากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดสมุนไพรมีฤทธิ์ใน

การทำลายเชื้อซาลโมเนลล่าได้ จึงนำเชื้อซาลโมเนลล่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่คัดเลือกไว้มาทดสอบต่อแต่หากพบว่าสารสกัดสบู่ดำไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อซาลโมเนลล่า จะหยุดการทดสอบทำการทดสอบด้วย 2 วิธี คือ

2.1 Tube dilution method[13-15]

2.1.1 เตรียมหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ 12 หลอด เติม Muller Hinton broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดที่ 2-12 โดยหลอดที่ 12 เป็นหลอดควบคุม

2.1.2 เจือจางสารสกัดสบู่ดำที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (two-fold dilution) โดยเติมสารสกัดสบู่ดำลงในหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมสารสกัดสบู่ดำ และ Muller Hinton broth ในหลอดที่ 2 ให้เข้ากันแล้วดูดสารละลายจากหลอดที่ 2 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ 3 ผสมให้เข้ากันแล้วดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่ 4 ทำเช่นนี้จนถึงหลอดที่ 11 จึงดูดทิ้งไป 1 มิลลิลิตร

2.1.3 เติมเชื้อซาลโมเนลล่าที่เตรียมให้มีปริมาณเท่ากับ 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ใส่ลงในทุกหลอด ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.1.4 นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.5 ตรวจดูเหลอดที่ไม่มีเชื้อขึ้น บันทึกผลการทดลอง เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดใน การยับยั้งเชื้อซาลโมเนลล่า (Minimum Inhibition Concentration, MIC)

2.1.6 นำสารละลายในหลอดที่ไม่มีเชื้อขึ้นไปเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.7 ตรวจดูอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเชื้อขึ้น บันทึกผลการทดลอง เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อซาลโมเนลล่า (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

2.2 Agar dilution method[13-15]

2.2.1 เจือจางสารสกัดสบู่ดำที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (two-fold diliution) ด้วย Muller Hinton broth จำนวน 12 dilutions

2.2.2 ดูดสารละลายสารสกัดสบู่ดำที่เจือจางหลอดละ 2 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแต่ละจานเท Muller Hinton agar ลงไป 18 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยทำ duplicate ทำเช่นเดียวกันจนครบทุก dilution ทิ้งไว้ให้ agar แข็งตัว

2.2.3 นำเชื้อซาลโมเนลล่าซึ่งทำให้ค่าความเข้มข้นเท่ากับ 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดโดยใช้เครื่อง Replicator ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดสบู่ดำด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ และ บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ผสมสารสกัดสบู่ดำซึ่งเป็นตัวควบคุมการทดสอบ (โดยสามารถทดสอบเชื้อ *Salmonella* และเชื้อมาตรฐาน *E.coil* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 รวม 27 สายพันธุ์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละความเข้มข้น)

2.2.4 นำไปอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.5 ตรวจดูการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของสารสกัดสบู่ดำต่าง ๆกัน เปรียบเทียบกับจานควบคุมซึ่งเชื้อควรเจริญได้อย่างดี บันทึกผลการทดลองที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อเจริญเป็นค่า MIC ของสารสกัดสมุนไพรในการทำลายเชื้อซาลโมเนลล่า

ผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อซาลโมเนลล่าของสารสกัดสบู่ดำด้วยเอธานอลจากใบแห้ง (YTC) และสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด (YTK) และจากลำต้นและใบแห้ง (YTL) ของสมุนไพรสบู่ดำ จำนวน 3 ชนิด พบว่าไม่มีสารสกัดใดที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อซาลโมเนลล่าที่ความเข้มข้นของสารสกัด 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

หมายเหตุ

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อซาลโมเนลล่าด้วยวิธี Agar dilution method และ Tube dilution method พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการทดลองเหมือนกันคือไม่สามารถยับยั้งเชื้อซาลโมเนลล่าได้ ดังนั้นในวิธี Tube dilution method จึงไม่มีผลของค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อซาลโมเนลล่า (Minimum Bactericidal Concentration ,MBC)

6. <u>การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Herpes Simplex Virus</u> เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อ Herpes Simplex Virus (HSV) ที่ทำให้เกิดโรคเริม ในหลอดทดลอง

หลักการ

โรคติดเชื้อเริม (Herpes Simplex Virus) เป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาสกลุ่มหนึ่งที่เกิดขึ้นมากในกลุ่มคนที่เป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง การพัฒนาสารสกัดสมุนไพรมาเป็นยารักษาผู้ป่วยโรคเริมจะเป็นการลดค่าใช้จ่ายยาที่มีราคาแพงจากต่างประเทศได้ อย่างไรก็ตามก่อนการนำมาใช้กับผู้ป่วยต้องผ่านการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อเริมในห้องปฏิบัติการ (*In vitro* study) เสียก่อน โดยศึกษาดูฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ (Inactivation Activity) และฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ (Antiviral Activity) โดยวิธี Plaque reduction assay

อุปกรณ์และสารเคมี

1. Laminar air flow (Biosafety cabinet class II Nuair, Nu 440-400E สหรัฐอเมริกา)
2. Carbon dioxide incubator (Forma, สหรัฐอเมริกา)
3. Water bath (Yamato, Thermo-Mate BE 200, ประเทศญี่ปุ่น)
4. Baby hamster kidney cell line (BHK) สายพันธุ์ BHK 21, ประเทศญี่ปุ่น
5. Inverted microscope (Nikon, Diaphot, ประเทศญี่ปุ่น)

วิธีทดลอง

ใช้วิธี Plaque Reduction Assay ซึ่งแบ่งการทดสอบเป็น 2 วิธี คือ

1. Antiviral activity-assay เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสบู่ดำในการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ BHK โดยละลายสารสกัดสบู่ดำในสารละลายมีเดียที่ใช้เลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1:300, 1:600, 1:1,200, 1: 2,400 ...(น้ำหนัก/ปริมาตร) จากนั้นนำสารละลายที่มีสารสกัดสบู่ดำเจือจางค่าต่างๆ ไปเลี้ยงเซลล์ที่ infect ด้วยเชื้อ HSV ก่อนหน้านี้ 1 ชั่วโมง หากสารละลายที่มีสารสกัดสบู่ดำโดยทำให้ไวรัสเกิด Plaque forming ได้น้อยลงจากเซลล์ติดเชื้อควบคุมก็ถือว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-2
2. Inactivation activity-assay เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการทำลายไวรัส HSV โดยตรงของสารสกัดสบู่ดำ วิธีทำคล้ายกับวิธีแรก แต่ต่างตรงที่ว่าการทดสอบฤทธิ์วิธีนี้จะผสมเชื้อ HSV กับสารสกัดสบู่ดำที่ความเข้มข้นต่างๆ กันก่อน 30 นาที แล้วจึง

นำไป infect เซลล์ BHK ดังนั้น หากสารสกัดใดทำให้ไวรัส infect น้อยลง คือเกิด Plaque forming ได้น้อยลง ก็ถือว่าสารนั้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อ HSV-2

ผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ ซิมเพลกซ์ของสารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเอธานอลจากสมุนไพรสบู่ดำ จำนวน 6 ชนิด พบว่า สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง (YTC) และสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด (YTK) รวม 2 ชนิด แสดงฤทธิ์ทำลายไวรัส (virucidal activity) สูงที่ค่าเจือจางไม่ต่ำกว่า 1:57,600 และ 1:19,200 ตามลำดับ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ ซิมเพลกซ์ ของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ

ลำดับที่	ชนิดสารสกัด	รหัสตัวอย่าง	ค่าเจือจางที่แสดงฤทธิ์ทำลายไวรัส (น้ำหนักต่อปริมาตร)
1	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นแห้ง	YTA	NA
2	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นแห้ง	YTB	NA
3	สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง	YTC	1: 57,600
4	สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง	YTD	NA
5	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด	YTK	1:19,200
6	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง	YTL	NA

หมายเหตุ NA = ไม่แสดงฤทธิ์

7. <u>การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Cytomegalovirus (CMV) และ Epstein-Barr virus (EBV)</u> เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรในการต้านเชื้อ CMV และ EBV ในเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี CPE screening test และ Terminal probe analysis

หลักการ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ CMV: ฤทธิ์ต้านไวรัสและความเป็นพิษของสมุนไพรจะถูกทดสอบโดยใส่ในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Human embryonic lung cell (HEL) ใน 24-well plate เปรียบเทียบการเกิด cytopathic effect (CPE) ใน HEL ที่ใส่ยามาตรฐาน โดยสังเกตลักษณะการเกิด CPE ด้วยกล้อง inverted microscopy

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ EBV: ฤทธิ์ต้านไวรัสและความเป็นพิษของสมุนไพรจะถูกทดสอบโดยใช้ Akata cell ซึ่งเป็น lymphoid cell ชนิด EBV-producer cell line โดยที่บนผิวเซลล์จะมี surface IgG ดังนั้นเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยสาร anti-IgG ก็จะทำให้

เซลล์มีการแบ่งตัว (viral replication) ซึ่งในการแบ่งตัวของ EBV จะใช้ episome ที่เป็น circular DNA เป็นต้นแบบและสร้างสาย DNA สายตรง (linear DNA) เส้นยาวออกมา โดยสายนี้จะถูกตัดโดย viral enzyme ในบริเวณของ terminal repeats ก็จะได้ DNA สายตรงหลายสายที่มีจำนวน terminal repeats ไม่เท่ากัน อย่างน้อยต่างกัน 500 base pairs (เนื่องจากที่ปลายทั้งสองข้างของ EBV DNA จะมีกลุ่มของ DNA ที่ซ้ำกันจำนวน 4-5 หรือ 12 กลุ่มแต่ละกลุ่มมี DNA ที่เหมือนกันประมาณ 500 base pairs)

เมื่อ treat Akata cell ด้วยยามาตรฐาน จะลดจำนวนของ viral DNA ได้ และเปรียบเทียบกับเมื่อ treat ด้วยสารละลายสมุนไพร ถ้าสารสมุนไพรไม่มีฤทธิ์ต้านไวรัสก็จะมี viral DNA ให้เห็นเป็น DNA band เรียงกันเป็นขั้นบันได ในขณะที่ถ้าสารนั้นมีฤทธิ์จะไม่เห็น DNA band เลย เนื่องจากแต่ละสายจะมีจำนวน DNA ไม่เท่ากัน ดังนั้น เมื่อนำ DNA ไป run electrophoresis ก็จะได้ band เรียงกันตามขนาดยาวสั้นของ DNA โดยวิธี Southern blot และ hybridization ด้วย probe ที่มี DNA sequence ใกล้ๆกับบริเวณของ terminal repeat เรียกว่า Xhol 1.9 fragment ที่ label ด้วยสารกัมมันตรังสี

อุปกรณ์

1. CO_2 incubator
2. Inverted microscope
3. Refrigerated centrifuge
4. Liquid nitrogen tank
5. Host cell: Human embryonic lung fibroblast (HEL), Akata cell
6. Virus: Towne strain CMV
7. Electrophoresis tank
8. Dark room for film development
9. Vacuum oven

วิธีทดลอง

การหาฤทธิ์ต้านไวรัส CMV ประกอบด้วยการทดสอบ 2 วิธีคือ

1. Assay for antiviral activity with post-drug treatment โดยวิธี cytopathic-effectscreening (CPE screening) ซึ่งดัดแปลงจากวิธี plaque reduction assay ทำการ infect เซลล์เพาะเลี้ยงด้วยไวรัสเป็นเวลา 2 ชม.จากนั้นจึงใส่สารสกัดสมุนไพรลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยง

วิธีการ infect ไวรัสปริมาณ 2000 pfu ลงใน 24-well plate ซึ่งมีเซลล์เพาะเลี้ยง หลังบ่มเพาะนาน 2 ชม. นำสารสกัดสมุนไพรมาละลายเพื่อทำให้มีความเข้มข้น 0.001,0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml และยามาตรฐาน (Ganciclovir) ความเข้มข้น 10 μM จากนั้นใส่สารสกัดและยามาตรฐานปริมาณ 1 ml ดังกล่าวลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ infect ไวรัส แล้วเพื่อดูฤทธิ์ต้านเชื้อ และใส่สารสกัดลงในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ได้ infect ไวรัสเพื่อดูความเป็นพิษของสารสกัดที่มีต่อเซลล์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงด้วยกล้อง inverted microscope เป็นเวลา 9 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทุก 3-5 วัน

2. Assay for antiviral activity with drug-pre treatment โดยวิธี cytopathic effect screening (CPE screening) เป็นการใส่สารสกัดสมุนไพรลงในเซลล์เพาะเลี้ยงและบ่มไว้ 1 คืนก่อน จากนั้นจึง infect ด้วยไวรัส 2 ชม. แล้วใส่สารสกัดสมุนไพรลงไปอีกครั้ง

วิธีการนำสารสกัดสมุนไพรมาละลายเพื่อทำให้มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml และยามาตรฐาน (Ganciclovir) ความเข้มข้น 10 μM จากนั้นใส่สารสกัดและยามาตรฐานปริมาณ 1 ml ดังกล่าวลงในเซลล์เพาะเลี้ยง incubate 37°C 1 คืน เทสารสกัดทิ้ง จากนั้น infect เซลล์เพาะเลี้ยงด้วยไวรัสปริมาณ 2,000 pfu และ incubate 37°C นาน 2 ชม.เทสารละลายไวรัสออกไปเติมสารสกัดดังกล่าวใหม่ อีกครั้งและ incubate 37°C ต่อไปสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ด้วยกล้องฯ เป็นเวลา 9 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3-5 วัน ขณะเดียวกันดูความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่ได้ infect ด้วยไวรัส

วิธี *Dot blot hybridization* ในกรณีที่การอ่านผล CPE ไม่ชัดเจนว่า สารสกัดอาจมีผลยับยั้งเชื้อได้ หรือไม่จะทำการทดสอบด้วยวิธี dot blot hybridization ดังนี้

- เท medium ออกจาก 24 - well plate ที่เพาะเลี้ยง HEL cell
- เติมสารละลายเพื่อ denature DNA และเติม neutralization solution ปรับความเข้มข้นของ DNA solution
- ใส่ DNA solution ลงใน membraneผ่านเครื่อง minifold
- dry membrane ใน oven
- ทำการ hybridization ใช้ probe ที่ติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสี
- ล้าง membrane และทำให้แห้ง นำไป expose กับ film, develop film และดูผล

วิธีการทดลอง การศึกษาหาฤทธิ์ต้านไวรัส EBV โดยวิธี terminal probe analysis

A. Cytotoxicity

1. ดูความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงและหาขนาดความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสม (Infectiious Dose, ID_{50})
2. นับ Akata cell ใน flask และปรับให้ได้ 8 x 10^5 cell/ml
3. dispense ลงใน 24 - well plate
4. ใส่สารสกัดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละ well ดังนี้ 0.001,0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml
5. นับ cell ตาย และ cell ที่มีชีวิต (รอด) ของแต่ละ ความเข้มข้นข้างต้น
6. หาจำนวน cell ตายสะสม และจำนวน cell รอดสะสม
7. คำนวนหา ID_{50} ของสารสกัด

B. Tissue culture & inducing cell

1. เตรียม Akata cell 1 flask ให้ได้ 5-6 x10^5 cell / ml จำนวน 50 ml และแบ่ง cell ลงใน petri dish ๆละ10 ml จำนวน 2 petri dish เพื่อเป็น uninduced control
2. กระตุ้น cell ใน flask โดยเติม anti-IgG ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 mg/ ml
3. แบ่ง cell ที่กระตุ้นแล้วลงใน petri dish ๆละ 10 ml จากนั้น เติมยามาตรฐาน และสารสกัดความเข้มข้นต่าง ๆลงไป
4. นำไป incubate ที่ 37° C เป็นเวลา 72 hr หลังจากนั้นให้นับ cell
5. นำ cell ไปปั่นล้างเพื่อทำ DNA analysis

C. Genomic DNA preparation

1. ผสม cell pellet ใน 300 µl DNA digest buffer
2. เติม proteinase K ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 mg/ml บ่มเพาะ ที่ 48° C ค้างคืน
3. เติม 10 µl RNAseA บ่มเพาะต่อที่ 37° C เป็นเวลา 2 hr
4. ทำ Phenol extraction เพื่อแยก DNA
5. ละลาย DNA pellet ด้วยน้ำกลั่น

D. Southern blotting

1. ทำการ ย่อย DNA ด้วย BamHI enzyme
2. นำตัวอย่าง DNA ไป run electrophoresis บน 0.7 % agarose ใช้ Raji DNA เป็น control สำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณ DNA ของตัวอย่าง
3. Denature, neutralize DNA ใน แผ่น gel และ transfer DNA ไปยัง nitrocellulose membrane
4. ล้าง membrane ทำให้แห้งโดยอบใน vacuum oven ที่ 80° C
5. wet membrane และ seal ใน hybridization bag
6. ทำการ hybridization ค้างคืนโดยใช้ riboprobe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี
7. ล้าง membrane ทำให้แห้ง นำไป expose film 24 hr และdevelop film เพื่อดูผล

8. <u>การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกัน</u> เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรที่มีผลต่อการเสริมสร้างหรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ

หลักการ

การติดเชื้อเอชไอวีนำไปสู่ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทั้งนี้เพราะเชื้อสามารถทำลายและ/หรือยับยั้งการทำงานของเซลล์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของร่างกายต่อสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำลาย $CD4^+$ T cells ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของเชื้อไวรัสนี้ $CD4^+$ T cells มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบการสร้าง Antibody และการตอบสนองแบบเซลล์ (Humoral และ Cellular Immune Responses) โดยช่วย B cells สร้าง Antibody และหลั่ง cytokines บางชนิดเมื่อถูกกระตุ้น ช่วยการตอบสนองแบบเซลล์ ดังนั้นผลจากการทำลาย $CD4^+$ T cells ทำให้ร่างกายมีความสามารถในการตอบสนองต่อเชื้อเอชไอวีรวมทั้งเชื้อฉวยโอกาสต่างๆ ลดลง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เซลล์ K-562
2. เซลล์ YAC-2
3. สัตว์ทดลองหนู Balb/c ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา นครปฐม
4. เลือดคนปกติจากศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย
5. RPMI 1640, fetal bovine serum, penicillin, streptomycin, glutamine,

HEPES(GIBCO, Grand Island, NY, USA)

6. Ficoll-Hypaque mixture(Isoprep, Robbins Scientific Corporation, Sunnyvale, CA, USA)
7. Phytohaemagglutinin (PHA) (Murex Diagnostics Limited, Dartford, UK)
8. ^{3}H-thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK)
9. ^{5}1Cr

วิธีทดลอง

1. การศึกษาในหนูถีบจักร Balb/c Mice

   การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของลิมโฟซัยท์โดย

   1.1 ป้อนสารสกัดสมุนไพรโดยกรอกทางปากในความเข้มข้นที่กำหนดแก่สัตว์ทดลองจนครบ 7 วัน

   1.2 เตรียมลิมโฟซัยท์จากม้ามและนำมากระตุ้นด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสภาวะที่มีและไม่มี Phytohaemagglutinin (PHA) เป็นเวลา 3 วัน วัดการแบ่งตัวของลิมโฟซัยด์ โดยวัด ^{3}H-thymidine up แล้วคำนวณค่า Stimulation Index

2. การศึกษาโดยใช้ลิมโฟซัยท์จากคนปกติ

   การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของลิมโฟซัยท์ โดยเตรียมลิมโฟซัยด์จากเลือดคนปกติ โดยใช้ Ficoll-Hypaque Density Gradient และนำมากระตุ้นด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 3 วัน วัดการแบ่งตัวของลิมโฟซัยท์จาก ^{3}H-thymidine uptake และคำนวณค่า Stimulation Index

ผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกันของสารสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดด้วยเอธานอลจากสมุนไพรสบู่ดำ จำนวน 7 ชนิด ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูถีบจักร พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง (YTL) ที่ความเข้มข้น 1:102,400 - 1:1,600 สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแบ่งตัวได้ และยังเสริมฤทธิ์ของสาร Phytohaemagglutinin (PHA) ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัวด้วย สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง (YTC) และจากลำต้นและใบแห้ง (YTP) ที่ความเข้มข้น 1:819,200 - 1:12,800 ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแบ่งตัว แต่สามารถเสริมฤทธิ์ของสาร PHA ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัว รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 7

สำหรับการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกันของสารสกัดดังกล่าว ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนพบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง (YTL) ไม่แสดงฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน แต่สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง (YTC) และจากลำต้นและใบแห้ง (YTP) ที่ความเข้มข้น 15 - 120 มคก./มล. แสดงฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนได้

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกันของสารสกัดต่างๆ จากสมุนไพรสบู่ดำในเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูถีบจักร

ชนิดสารสกัด	รหัสตัวอย่าง	Lymphocyte proliferation	PHA response
สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นแห้ง	YTA	1:819,200-1:409,600 (NA) 1:204,800-1:51,200 (ST +) 1:25,600-1:12,800 (NA) 1:6,400-1:1,600 (SP)	1:819,200-1:204,800 (NA) 1:102,400-1:12,800 (ST ++) 1:6,400-1:1,600 (SP)
สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นแห้ง	YTB	1:819,200-1:12,800 (ST +)	1:819,200-1:409,600 (NA) 1:204,800-1:12,800 (ST +)
สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง	YTC	1:819,200-1:12,800 (NA)	1:819,200-1:12,800 (ST +++)
สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง	YTD	1:409,600-1:51,200 (NA) 1:25,600-1:6,400 (SP)	1:409,600-1:12,800 (NA) 1:6,400 (ST +)
สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด	YTK	1:102,400-1:6,400 (NA) 1:3,200-1:1,600 (SP)	1:102,400-1:3,200 (NA) 1:1,600 (ST +)
สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง	YTL	1:102,400 (ST +++)	1:102,400-1:1,600 (ST ++)
สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นและใบแห้ง	YTP	1:819,200-1:12,800 (NA)	1:819,200-1:25,600 (ST +++)

หมายเหตุ
NA = ไม่แสดงฤทธิ์
ST = แสดงฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาว
SP = แสดงฤทธิ์กดการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาว
\+ = แสดงฤทธิ์อ่อน
++ = แสดงฤทธิ์ปานกลาง
+++ = แสดงฤทธิ์แรง

สรุปผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดสบู่ดำ

จากผลการทดลองทางห้องปฏิบัติการ พบว่า สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำแห้ง (YTC) แสดงฤทธิ์แรงในการยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลองร้อยละ 90 ที่ความเข้มข้น 8.3 มคก./มล. แสดงฤทธิ์ทำลายเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ สูง ที่ค่าเจือจางไม่ต่ำกว่า 1:57,000 สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* ได้ที่ความเข้มข้น 1.67 มก./มล. และสามารถยับยั้งเชื้อรา *Histoplasma capsulatum* ได้ที่ความเข้มข้น 6.67 มก./มล. รวมทั้งสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนได้ที่ความเข้มข้น 15-120 มคก./มล. แต่ที่ความเข้มข้น 1:819,200 - 1:12,800 ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาว

ของหนูถีบจักรแบ่งตัว แต่สามารถเสริมฤทธิ์ของสาร PHA ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัว รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 8

สำหรับสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสบู่ดำสด (YTK) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลองร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้น 4 มก./มล. แสดงฤทธิ์แรงในการยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส ร้อยละ 95 ที่ความเข้มข้น 250 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 50 มคก./มล. และแสดงฤทธิ์ทำลายไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์สูงที่ค่าเจือจางไม่ต่ำกว่า 1:19,200 ส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง (YTL) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง ร้อยละ 85 ที่ความเข้มข้น 250 มคก./มล. และแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส ร้อยละ 84.9 ที่ความเข้มข้น 250 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 212 มคก./มล. รวมทั้งสารสกัดดังกล่าวที่ความเข้มข้น 1:102,400 - 1:1,600 สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูถีบจักรแบ่งตัวได้ และยังเสริมฤทธิ์ของสาร PHA ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัว รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นทางห้องปฏิบัติการของสารสกัดต่าง ๆ จากสมุนไพรสบู่ดำ

ลำดับที่	ฤทธิ์ที่ทดสอบ	ชนิดของสารสกัด							
		YTA	YTB	YTC	YTD	YTK	YTL	YTP	YTQ
1	ยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์ส ทรานสคริปเทส	NA	NA	NA	NA	+++	++	ND	++
2	ยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส	ND	ND	ND	NA	+	ND	ND	ND
3	ยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง	NA	NA	+++	NA	+	++	+++	ND
4	ต้านเชื้อราฉวยโอกาส	+	++	+++	NA	NA	NA	ND	ND
5	ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella*	ND	ND	NA	ND	NA	NA	ND	ND
6	ต้านเชื้อ Herpes Simplex Virus	NA	NA	+++	NA	++	NA	ND	ND
7	ต้านเชื้อ Cytomegalovirus และ Epstein-Barr Virus	ND	NA	ND	ND	NA	NA	ND	ND
8	กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกันในเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูถีบจักร	++	+	+++	NA	NA	+++	+++	ND
9	กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกันในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน	NA	ND	+++	ND	NA	NA	+++	ND

หมายเหตุ NA = ไม่แสดงฤทธิ์
ND = ไม่ได้ดำเนินการทดลอง
+++ = แสดงฤทธิ์แรง
++ = แสดงฤทธิ์ปานกลาง
+ = แสดงฤทธิ์อ่อน

เอกสารอ้างอิง

1. Miyoshi I, Taguchi H, Kubonishi I, et al. Type C virus-producing cell lines derived from adult T cell leukemia. Gann Monogr 1982; 28:219-228.
2. Minowada J, Ohnuma T, Moore GE. Rosette forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. J Natl Cancer 1972; 49:891-895.
3. Ikuta K, Imai H, Ueda S, et al. Amphification of human immuno deficiency virus production from a virus-producing cell line in culture at high cell density Jpn J Cancer Res (Gann)1987; 78:643-647.
4. Johnson VA. Evalution of candidate anti-HIV agents in vitro. In Techniques in HIV Research. Stockton Press. U.S.A., ISBN#0-935859-76-4, pp.225-237.
5. Klaus GGB. Viability tests. In Lymphocytes a practical approach. IRL Press. UK., ISBN 1-85221-019-2, p. 23.
6. Yarchoan R, Mitsuya H, Broder S. Clinical and basic advances in the antiretroviral therapy of human immunodeficiency virus infection. Am J Med 1989; 87:191-200.
7. Ohki K, Kimura T, Ohmura K, Morikawa Y, Jones IM, Azuma I, et al. Monoclonal antibodies to a CD4 peptide derivative which includes the region corresponding to an immunoglobulin CDR3: Evidence of the involvement of pre-CDR3-related region in HIV-1 and host cell interaction. Molecular Immunology. 1992; 29:1391-1400.
8. การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์ทางห้องปฏิบัติการ กองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
9. พักตร์วิมล ประเสริฐ และคณะวารสารโรคเอดส์ 2536; 5:181-187.
10. Louria DB, Lavenhar M, Kaminski T and Eng RHK. J. Med. Vet. Mycol 1989; 27:253-256.
11. งานวิจัยสมุนไพรในประเทศไทย รวบรวมโดยฝ่ายเภสัชจลนศาสตร์ กองวิจัยทางแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2530.

12. รัตนา สินธุภัค และคณะวารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2535 ; 1:9-20.
13. Mahabusarakum W, Wiriyachitra P and Phongpichit S. 1986. Antimicrobial activities of chemical constituents from *Garcinia mangostana* Linn. J. Sci. soc. Thailand. 12: 239-242.
14. Edwin H lennette, Albert B, William J, Hausler JR and Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C. 1985. p.978-987.
15. Ericsson HM, Sherris JC. Antibiotic sentivity testing. Report of an International Collaborative Study. Acta pathol Microbial Science. Sect B, 1971: Suppl 217.
16. Monica M, Marialuisa Z, Giovanna G and Michele LP. Rapid quantitative assay of cytomegalovirus infectivity. J Virol Methods 1988; 20:333-340.
17. Wentworth BB and French L. Plaque assay of cytomegalovirus strain of human origin Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1970; 135:253-258.
18. Turk SR, Shipman JR, Nassiri R, et al. Pyrrolo [2,3-d] pyrimidine nucleosides as inhibitors of human cytomegalovirus replication. Antimicrols Agents Chemother. 1987; 31:544-50.

บทที่ 5
การทดสอบพิษของสารสกัดสบู่ดำในสัตว์ทดลอง

ปราณี ชวลิตธำรง ทรงพล ชีวะพัฒน์
จารีย์ บันสิทธิ์ เรวดี บุตราภรณ์
เย็นจิตร เตชะดำรงสิน

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่างๆ ของสารสกัดสบู่ดำทางห้องปฏิบัติการ พบว่า สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำแห้ง (YTC) แสดงฤทธิ์ต่างๆ แรงที่สุด ดังนี้ สามารถยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลองได้ดีมาก สามารถทำลายเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์สูง สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* และยับยั้งเชื้อรา *Histoplasma capsulatum* รวมทั้งสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน และเสริมฤทธิ์ของสาร phytohaemagglutinin (PHA) ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัวด้วย

สำหรับสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสบู่ดำแห้ง (YTL) แสดงฤทธิ์แรงรองลงมา คือกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูถีบจักรแบ่งตัวได้ดีมาก และยังเสริมฤทธิ์ของสาร PHA ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัวด้วย นอกจากนี้ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง และยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส (RT) ได้แรงปานกลาง ส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด (YTK) แม้จะแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส ได้ดีมาก และแสดงฤทธิ์ในการทำลายเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ได้แรงปานกลางก็ตาม แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส และยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลองค่อนข้างอ่อน ดังนั้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้ดำเนินการทดสอบพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัด YTL ในหนูถีบจักร และทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัด YTC ในหนูขาว ดังนี้

1. การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัด YTL ในหนูถีบจักร

วิธีการ

ทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัด YTL ในหนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR จำนวน 5 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว) แบ่งเป็น กลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม (ได้รับน้ำ) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 4 กลุ่ม

ผลการทดลอง

สารสกัด YTL เมื่อกรอกให้ทางปากแก่หนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR ในขนาดเทียบเท่าผงยา 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง และไม่มีสัตว์ทดลองตาย ดังนั้นขนาดของสารสกัด YTL ที่ทำให้หนูถีบจักรตายครึ่งหนึ่ง เมื่อให้สารสกัดทางปากจึงมีค่ามากกว่า 40 กรัม/กิโลกรัม แต่เมื่อให้สารสกัด YTL ในขนาดเดียวกัน โดยการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่า สารสกัด YTL ในขนาด 40 กรัม/กิโลกรัม ทำให้เกิดอาการชักในสัตว์ทดลอง และขนาดของสารสกัด YTL ที่ทำให้หนูถีบจักรตายครึ่งหนึ่งเมื่อให้ทางช่องท้องมีค่ามากกว่า 7.93 กรัม/กิโลกรัม

2. การทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัด YTL ในหนูถีบจักร

วิธีการ

ทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัด YTL ในหนูถีบจักรสายพันธุ์ Balb/c จำนวน 4 กลุ่ม ๆ ละ 20 ตัว (เพศละ 10 ตัว) แบ่งเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม (ได้รับน้ำ) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 3 กลุ่ม

ผลการทดสอบ

เมื่อกรอกสารสกัด YTL ทางปากแก่หนูถีบจักรสายพันธุ์ Balb/c ในขนาดเทียบเท่าผงยา 0.06, 0.6 และ 6.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน คิดเป็น 1, 10 และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนเป็นเวลา 28 วัน พบว่า สารสกัดทุกขนาดไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต หรือการกินอาหารของหนู นอกจากนี้ค่าทางชีวเคมีของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ได้แก่ aspartic aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN) หรือ creatinine ก็ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

3. การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัด YTC ในหนูขาว

วิธีการ

ทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัด YTC ในหนูขาวจำนวน 5 กลุ่มๆ ละ 30 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 15 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ 10 มล./กก. กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth suspension 10 มล./กก. ส่วนกลุ่มที่ 3-5 ซึ่งเป็นกลุ่มทดลองได้รับยาแขวนตะกอนของสารสกัด YTC ใน tragacanth ในขนาดต่างๆ กัน ดังนี้ กลุ่มที่ 3 ขนาด 5 มก./กก. กลุ่มที่ 4 ขนาด 50 มก./กก. และกลุ่มที่ 5 ขนาด 500 มก./กก. (คิดเป็น 1, 10 และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนตามลำดับ) ติดต่อกันทุกวัน นาน 90 วัน

ผลการทดลอง

1. ผลต่อการเจริญเติบโต การกินอาหาร และน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์

สารสกัด YTC ในขนาด 5 และ 50 มก./กก. ไม่ทำให้การเจริญเติบโตและการกินอาหารของหนูแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ขณะที่สารสกัดในขนาด 500 มก./กก. ทำให้การเจริญเติบโตและการกินอาหารของหนูทั้งสองเพศ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ หนูกลุ่มนี้มีสุขภาพทรุดโทรม ขนหยาบแข็ง ซึมและเยื่อเมือกซีด น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในเทียบกับน้ำหนักตัวในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก. จึงมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากน้ำหนักตัวที่น้อยกว่านั่นเอง

2. ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา

หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ นอกจากนี้หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มยังมีค่า hematocrit และจำนวนเม็ดเลือดแดงน้อยกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงนี้มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่หนูได้รับ โดยหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาดสูงสุดมีเยื่อเมือกซีด ซึ่งแสดงสภาวะ anemia และสอดคล้องกับค่าทางโลหิตวิทยาที่ตรวจพบ นอกจากนี้หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก. ยังมีจำนวน platelet ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมมาก รวมทั้งมีร้อยละของ lymphocyte ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ขณะที่ร้อยละของ neutrophil สูงกว่ากลุ่มควบคุมมาก จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัด YTC มีฤทธิ์

ข้างเคียงในการลดจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์เม็ดเลือดแดงได้โดยมีความสัมพันธ์กับขนาดที่ให้ อย่างไรก็ตาม ในขนาด 5 มก./กก. ซึ่งเป็นขนาดที่ใช้ในคน การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังอยู่ในช่วงค่าปกติ

3. ผลต่อค่าทางชีวเคมีของเลือด

พบว่าค่าทางชีวเคมีทุกค่าของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 5 มก./กก. ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับหนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 50 มก./กก. หนูเพศผู้มีค่า creatinine ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียมีค่า ALT (SGPT) สูงกว่า แต่มีค่า uric acid และ potassium ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ แต่การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ไม่ได้เกิดในหนูทั้งสองเพศและไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้ จึงไม่อาจสรุปได้ว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารสกัด

สำหรับหนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก. ซึ่งมีสุขภาพทรุดโทรม มีค่าทางชีวเคมีหลายค่าในหนูทั้งสองเพศที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth ได้แก่ total protein, albumin, globulin, creatinine, triglyceride, uric acid และ sodium ซึ่งมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ cholesterol มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

4. ผลต่อจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน

จากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของตับ ไต หัวใจ และปอดของหนู ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่บ่งชี้ว่าสารสกัด YTC มีพิษต่อเซลล์ตับ แต่พบว่ามีการสร้างเม็ดเลือดนอกไขกระดูก (extramedullary hematopoesis) ที่ตับของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 50 และ 500 มก./กก. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งเกิดจากภาวะ anemia ที่พบในหนูเหล่านี้

ส่วนการเปลี่ยนแปลงในทางเสื่อมของไตชนิด congestive glomerulotubular nephrosis นั้นเป็นแบบ mild degree สามารถตรวจพบได้ทั้งในหนูกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดโดยในหนูเพศเมียที่ได้รับ tragacanth พบพยาธิสภาพนี้ถึง 78.6 % และเฉพาะหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 50 มก./กก. เท่านั้นที่อัตราส่วนของหนูที่มีพยาธิสภาพนี้มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ จึงไม่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้ ขณะที่หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 50 และ 500 มก./กก. มีจำนวน

หนูที่มีพยาธิสภาพนี้มากกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำแต่ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับtragacanth อย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับพยาธิสภาพที่ปอดพบว่าในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 50 และ 500 มก./กก. มีจำนวนหนูที่มีการอักเสบเรื้อรังชนิด chronic interstitial pneumonia มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงนี้อาจเนื่องมาจากการลดลงของเม็ดเลือดขาว และพยาธิสภาพดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้หนูเหล่านี้มีหัวใจห้องล่างโต (ventricular hypertrophy) นอกจากนี้ตรวจพบกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบในหนูเพศผู้บางกลุ่มอย่างไม่มีนัยสำคัญและตรวจไม่พบในหนูเพศเมีย ในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก. ยังตรวจพบ megakaryocytes ที่ปอดมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับการลดลงอย่างมากของ platelet ในหนูกลุ่มนี้ และในหนูเพศผู้ทุกกลุ่มและหนูเพศเมียบางกลุ่มพบการสะสมของแคลเซียมที่ผนังหลอดเลือดแดงที่ปอดแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผลการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัด YTC ในหนูขาว

จากผลการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัด YTC ในหนูขาวที่กล่าวมาข้างต้น สรุปได้ว่า สารสกัด YTC ในขนาด 5 มก./กก. ซึ่งเทียบเท่าขนาดที่จะทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีในคน ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของการเจริญเติบโต การกินอาหาร น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายใน ค่าทางชีวเคมีของเลือดหรือจุลพยาธิวิทยาของตับไต หัวใจ ปอด แต่อาจทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงบ้าง อย่างไรก็ตามจำนวนเม็ดเลือดขาวยังจัดว่าอยู่ในช่วงของค่าปกติ ส่วนจำนวนเม็ดเลือดแดงพบว่ามีการลดลงเฉพาะในหนูเพศเมียเท่านั้น แต่ก็ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติเช่นเดียวกัน

ส่วนหนูที่ได้รับสารสกัดในขนาด 50 มก./กก. ซึ่งสูงกว่าขนาดที่จะใช้ในคน 10 เท่านั้น ค่าทางชีวเคมีต่างๆ ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดที่แสดง dose response relationship ที่จะบ่งชี้ว่าเกิดจากความเป็นพิษของสารสกัด และสัตว์ทดลองก็ยังมีการเจริญเติบโต การกินอาหารและน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในที่ปกติ แม้ว่าหนูสองเพศจะมีจำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ก็ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ อย่างไรก็ตามสารสกัดในขนาดนี้อาจมีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังจะเห็นได้จากค่าทางโลหิตวิทยาในหนูเพศเมีย และ extramedullary hematopoesis ที่ตรวจพบที่ตับของหนูทั้งสองเพศ สำหรับผลทางจุลพยาธิวิทยา ไม่พบว่าสารสกัดในขนาดนี้ทำให้เกิด

ความผิดปกติของตับ ส่วนผลต่อไตนั้นแม้ว่าจะพบ congestive glomerulotubular nephrosis แบบ mild degree ในหนูทุกตัว แต่พยาธิสภาพนี้ก็ตรวจพบในหนูกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มในสัดส่วนที่สูงด้วยเช่นกัน ประกอบกับค่า BUN และ creatinine ของหนูที่ได้รับสารสกัด 50 มก./กก. ก็ไม่ได้เปลี่ยนแปลงในทางที่จะชี้ว่าเกิดความเป็นพิษต่อไต จึงไม่อาจสรุปได้ว่าสารสกัดในขนาดนี้เป็นพิษต่อไต อย่างไรก็ตามพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัด 50 มก./กก. เกิด chronic interstitial pneumonia มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และพยาธิสภาพนี้อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิด ventricular hypertrophy ในหนูกลุ่มนี้

ส่วนสารสกัด YTC ในขนาด 500 มก./กก. ซึ่งสูงกว่าขนาดใช้ในคนถึง 100 เท่านั้น พบว่าทำให้เกิดพิษในหนูขาวอย่างชัดเจน ทำให้หนูมีสุขภาพทรุดโทรม ไม่กินอาหารและไม่เจริญเติบโต มีภาวะ anemia และ extramedullary hematopoesis ที่ตับ มีการลดลงของเม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด และ lymphocyte และขณะที่ร้อยละของ neutrophil สูงขึ้น 3-4 เท่า ค่าทางชีวเคมีแตกต่างจากกลุ่มควบคุมหลายค่า ส่วนผลทางจุลพยาธิวิทยาพบ chronic interstitial pneumonia และ ventricular hypertrophy มีอัตราส่วนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการที่จำนวนหนูแต่ละเพศเมื่อสิ้นสุดการทดลองเหลือเพียง 9-10 ตัว จากจำนวนเริ่มต้น 15 ตัวนั้น หนูที่ตายไม่ได้มีสาเหตุมาจากความเป็นพิษของสารสกัด เพราะเมื่อผ่าซากดูพบมีสารสกัดอยู่ในปอด ซึ่งคงเกิดจากการสำลักสารสกัดบางส่วนเข้าไปในปอดขณะกรอก เนื่องจากหนูกลุ่มนี้ดิ้นรนและขัดขืนไม่ยอมให้จับตัวเพื่อกรอกสารสกัดอย่างสงบเช่นเดียวกับหนูกลุ่มอื่น

จากผลการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัด YTC ในหนูขาว จะเห็นได้ว่า สารสกัดนี้ในขนาด 5 มก./กก. เทียบเท่ากับที่จะศึกษาในผู้ป่วยเอดส์ในขนาด 250 มิลลิกรัมต่อวัน โดยแบ่งให้ครั้งละ 125 มก. วันละ 2 ครั้ง ไม่ทำให้เกิดพิษที่ร้ายแรงใดๆ แก่หนูขาว มีความปลอดภัยค่อนข้างสูงมาก โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับยา zidovudine หรือ AZT ที่ใช้กันมากในปัจจุบัน ซึ่งในขนาดที่ใช้รักษามีโอกาสทำให้เกิด granulocytopenia ได้ประมาณ 42 % และ anemia ได้ถึง 29 % ในผู้ป่วยที่มี CD4 น้อยกว่า 200 cells/mm^3 หรือ 4-10 % และ 4 % ในผู้ป่วยที่มี CD4 มากกว่า 200 cells/mm^3 ตามลำดับ

แม้ว่าผลการทดสอบความเป็นพิษของ YTC ชี้ว่า สารสกัดนี้ในขนาดที่จะใช้ในการทดลองทางคลินิกมีความปลอดภัยสูงในหนูขาว คณะผู้วิจัยก็จะตรวจสอบความปลอดภัยของสารสกัด YTC ในผู้ป่วยเอดส์อย่างระมัดระวัง โดยมีการตรวจสุขภาพ วัด CBC, blood chemistry, chest X-rays และ HIV viral load เป็นระยะๆ ตลอดการทดลอง

บทที่ 6

การเตรียมส่วนสกัดย่อยของสารสกัดสบู่ดำ และการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองเพิ่มเติม

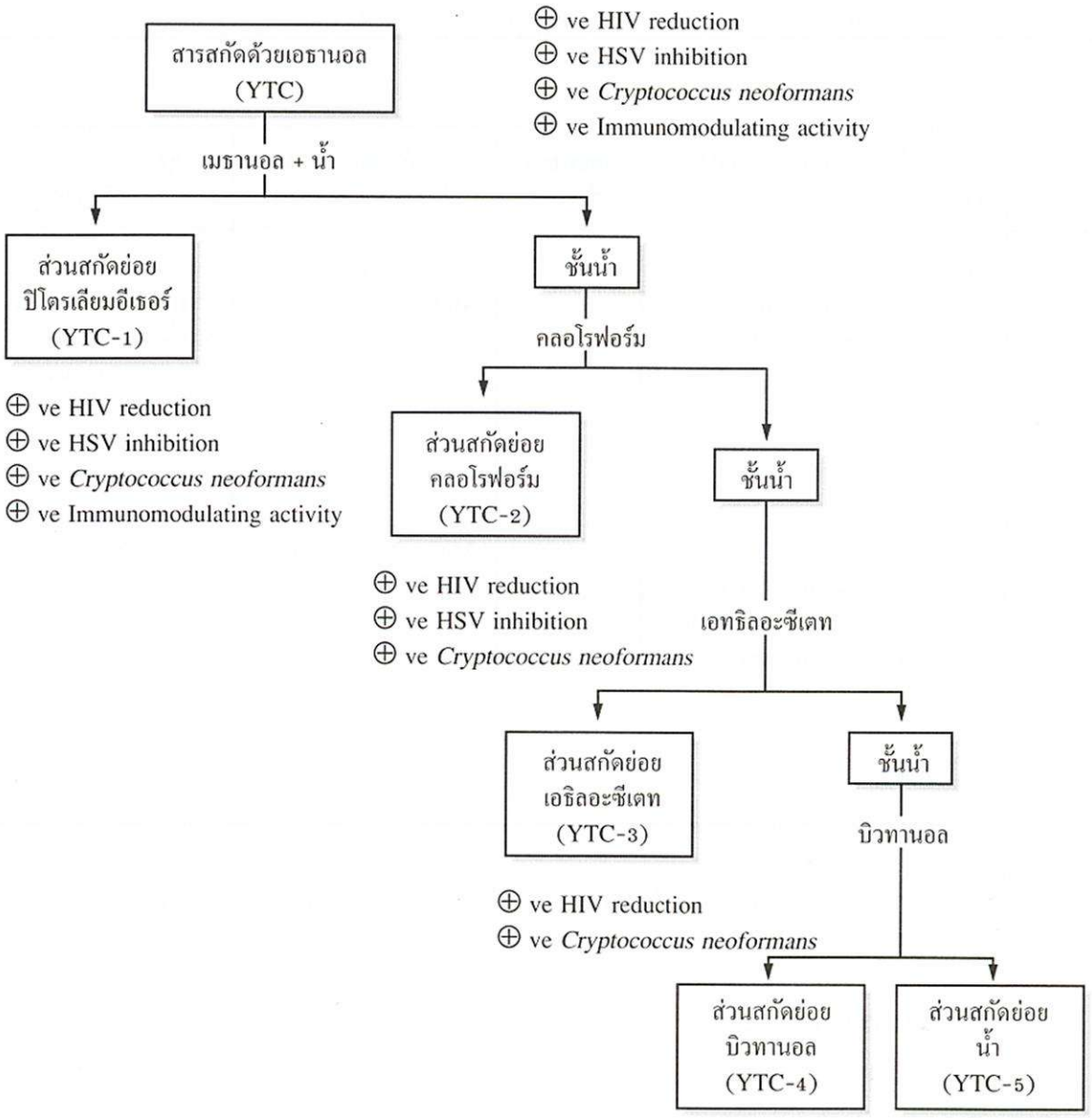
เย็นจิตร เตชะดำรงสิน วัฒนา อู่วาณิชย์
เครือวัลย์ พลจันทร์ โชติกา บุญ-หลง
สุธน วงษ์ชีรี พนัสดา อิศรางกูร ณ อยุธยา
อัญชลี จูฑะพุทธิ บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ
นวลจันทร์ ฤชุศาศวัต จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์
จารีย์ บันสิทธิ์ สุทธิโชค จงตระกูลศิริ

จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดสบู่ดำชนิดต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ พบว่า สารสกัดสมุนไพร YTC มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HIV, Herpes Simplex Virus และ *Cryptococcus neoformans* นอกจากนี้ยังสามารถเสริมฤทธิ์ของสาร Phytohaemagglutinin (PHA) ในการกระตุ้นให้ T cells ของหนูถีบจักรแบ่งตัว รวมทั้งสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนด้วย และจากผลการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพร YTC ในหนูขาว สรุปได้ว่า สารสกัดนี้ในขนาด 5 มก./กก. เทียบเท่ากับที่จะศึกษาในผู้ป่วยเอดส์ในขนาด 250 มิลลิกรัมต่อวัน โดยแบ่งให้ครั้งละ 125 มก. วันละ 2 ครั้ง ไม่ทำให้เกิดพิษที่ร้ายแรงใด ๆ แก่หนูขาว สารสกัดดังกล่าวมีความปลอดภัยค่อนข้างสูงมาก โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับยา zidovudine หรือ AZT ที่ใช้กันมากในปัจจุบัน

การเตรียมส่วนสกัดย่อยของสารสกัดสมุนไพร

นำสารสกัดสมุนไพร YTC มาสกัดต่ออย่างเป็นขั้นตอนโดยวิธี partition กับตัวทำละลายตามลำดับ polarity เริ่มจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วไปถึงตัวทำละลายที่มีขั้ว จะได้ 5 ส่วนสกัดย่อย (partly purified extract) ได้แก่ ส่วนสกัดย่อยปิโตรเลียมอีเธอร์ (YTC-1) ส่วนสกัดย่อยคลอโรฟอร์ม (YTC-2) ส่วนสกัดย่อยเอธิลอะซีเตท (YTC-3) ส่วนสกัดย่อยบิวทานอล (YTC-4) และส่วนสกัดย่อยน้ำ (YTC-5) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต่าง ๆ ในหลอดทดลองเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบว่าสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร YTC อยู่ในส่วนสกัดย่อยใด เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดสมุนไพร จากผลการทดสอบ พบว่า เฉพาะส่วนสกัดย่อย YTC-1 เท่านั้นที่มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเชื้อ HIV, Herpes Simplex Virus และ *Cryptococcus neoformans* รวมทั้งมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่ง

ตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนด้วย สำหรับส่วนสกัดย่อย YTC-2 แม้ว่าจะมีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเชื้อ HIV และสามารถทำลายเชื้อ Herpes Simplex Virus สูง รวมทั้งสามารถยับยั้งและทำลายเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* แต่ไม่แสดงฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกัน และส่วนสกัดย่อย YTC-3 มีฤทธิ์อ่อนมากในการยับยั้งเชื้อ HIV ในขณะที่ส่วนสกัดย่อย YTC-4 และ YTC-5 ไม่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 4 และตารางที่ 9 และ 10



รูปที่ 4 แผนภูมิแสดงการเตรียมส่วนสกัดย่อยต่างๆ จากสารสกัดสมุนไพร YTC และฤทธิ์ในหลอดทดลอง

ตารางที่ 9 รายละเอียดตัวอย่างส่วนสกัดย่อยต่างๆ ของสารสกัดสมุนไพร YTC เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง

ลำดับที่	ชนิดของส่วนสกัดย่อย	รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารสกัด : PVP-40	ปริมาณตัวยาในตัวอย่าง (%)
1	สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบ	YTC	-	100
2	ส่วนสกัดย่อยปิโตรเลียมอีเธอร์	YTC-1	1 : 2	33.33
3	ส่วนสกัดย่อยคลอโรฟอร์ม	YTC-2	1 : 2	33.33
4	ส่วนสกัดย่อยเอธิลอะซีเตท	YTC-3	1 : 2	33.33
5	ส่วนสกัดย่อยบิวทานอล	YTC-4	1 : 2	33.33
6	ส่วนสกัดย่อยน้ำ	YTC-5	1 : 2	33.33

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองของส่วนสกัดย่อยต่างๆ จากสารสกัดสมุนไพร YTC

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV	ฤทธิ์ทำลายเชื้อHSV	ฤทธิ์ทำลายและฆ่าเชื้อรา *Cr.Neoformans*	ฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกัน
1	YTC	90 % ที่ความเข้มข้น 8.3 มคก./มล. ค่า IC_{50} เท่ากับ 1.18 มคก./มล.	1 : 57,000	MIC = 1.67 มก./มล. MFC = 1.67 มก./มล.	กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ความเข้มข้น 15-120 มคก./มล.
2	YTC-1	90 % ที่ความเข้มข้น 3.3 มคก./มล. ค่า IC^{50} เท่ากับ 7.05 มคก./มล.	1 : 115,000	MIC = 1.67 มก./มล. MFC = NA	กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนที่ความเข้มข้น 15-120 มคก./มล.
3	YTC-2	85 % ที่ความเข้มข้น 3.3 มคก./มล. ค่า IC_{50} เท่ากับ 5.84 มคก./มล.	1 : 115,000	MIC = 3.33 มก./มล. MFC = 6.67 มก./มล.	NA
4	YTC-3	90 % ที่ความเข้มข้น 33.3 มคก./มล. ค่า IC_{50} เท่ากับ 13.16 มคก./มล.	NA	MIC = 3.33 มก./มล. MFC > 6.67 มก./มล.	NA
5	YTC-4	NA	NA	NA	NA
6	YTC-5	NA	NA	NA	NA

หมายเหตุ NA = ไม่แสดงฤทธิ์
MIC = ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา (Minimum Inhibition Concentration)
MFC = ความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อรา (Minimum Fungicidal Concentration)

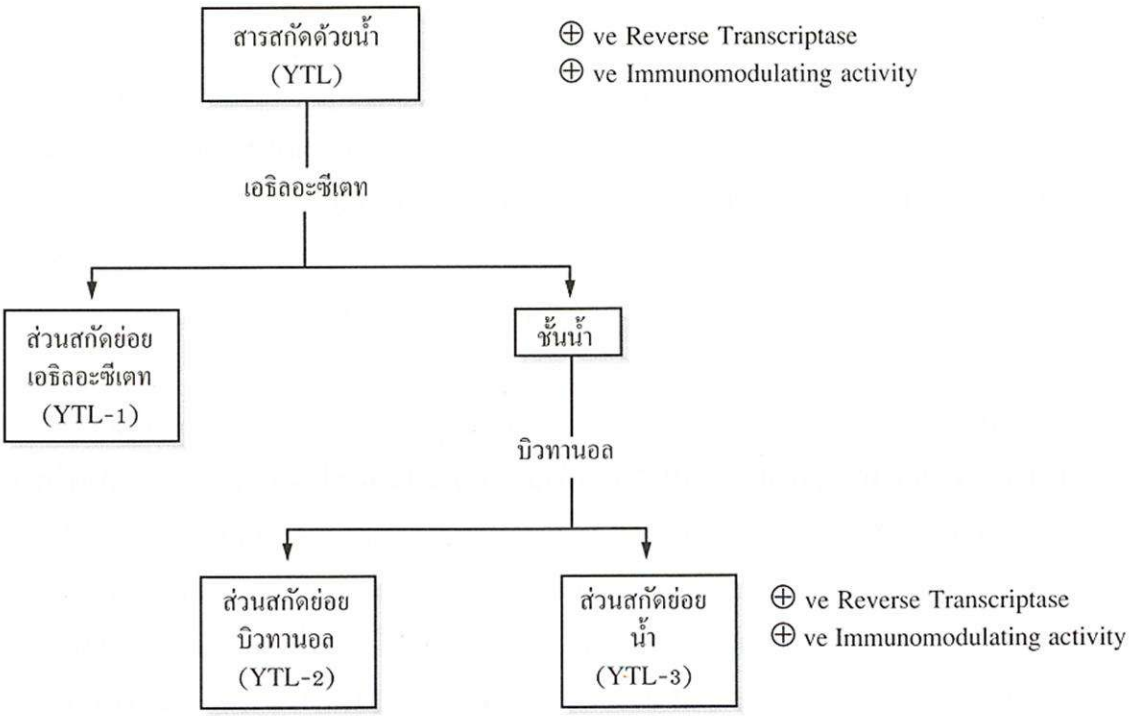
สำหรับสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสบู่ดำแห้ง (YTL) แสดงฤทธิ์แรงรองลงมา คือสามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวในหนูถีบจักรแบ่งตัวได้ดีมากและยังเสริมฤทธิ์ของสาร Phytohaemagglutinin (PHA) ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัวด้วย นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Reverse Transcriptase

ได้แรงปานกลางด้วย และจากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพร YTL ในสัตว์ทดลอง สรุปได้ว่า ขนาดของสารสกัด YTL ที่ทำให้หนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR ตายครึ่งหนึ่ง เมื่อให้สารสกัดทางปากมีค่ามากกว่า 40 กรัม/กิโลกรัม แต่เมื่อให้สารสกัดดังกล่าวในขนาดเดียวกัน โดยการฉีดเข้าช่องท้อง พบว่า ขนาดของสารสกัด YTL ที่ทำให้หนูถีบจักรตายครึ่งหนึ่ง เมื่อให้ทางช่องท้องมีค่ามากกว่า 7.93 กรัม/กิโลกรัม และจากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัด YTL ในหนูถีบจักร พบว่า เมื่อกรอกสารสกัด YTL ทางปากแก่หนูถีบจักรสายพันธุ์ Balb/c ในขนาด 6.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน คิดเป็น 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนเป็นเวลา 28 วัน พบว่าสารสกัดดังกล่าวไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต หรือการกินอาหารของหนู นอกจากนี้ค่าทางชีวเคมีของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัด YTL ได้แก่ Aspartic aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN) หรือ creatinine ก็ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

เมื่อนำสารสกัดสมุนไพร YTL มาสกัดต่ออย่างเป็นขั้นตอนโดยวิธี partition กับตัวทำละลายตามลำดับ polarity เริ่มจากตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยไปถึงตัวทำละลายที่มีขั้วมาก จะได้ 3 ส่วนสกัดย่อย (partly purified extract) ได้แก่ ส่วนสกัดย่อยเอธิลอะซีเตท (YTL-1) ส่วนสกัดย่อยบิวทานอล (YTL-2) และส่วนสกัดย่อยน้ำ (YTL-3) แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ในหลอดทดลองเพิ่มเติม เพื่อให้ทราบว่าสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร YTL อยู่ในส่วนสกัดย่อยใด เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดสมุนไพร จากผลการทดสอบ พบว่า ส่วนสกัดย่อย YTL-3 มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเอนไซม์ Reverse Transcriptase มากกว่าสารสกัดสมุนไพร YTL นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดย่อย YTL-3 ที่ความเข้มข้น 1:102,400 สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูถีบจักรแบ่งตัวได้ และที่ความเข้มข้น 1:204,800 ยังเสริมฤทธิ์ของสาร PHA ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัว รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 5 และตารางที่ 11 และ 12

จากผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรในหลอดทดลอง (บทที่ 4) พบว่า นอกจากสารสกัดสมุนไพร YTL ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Reverse Transcriptase แล้ว ยังพบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด (YTK) และสารสกัดด้วยน้ำจากใบสด (YTQ) มีฤทธิ์ดังกล่าวด้วย แต่เนื่องจากสารสกัดสมุนไพร YTK ที่เตรียมได้มีปริมาณไม่เพียงพอที่จะดำเนินการแยกต่อไป จึงดำเนินการแยกเฉพาะสารสกัดสมุนไพร YTQ โดยใช้วิธีเดียวกับการแยกสารสกัดสมุนไพร YTL จากผลการทดสอบฤทธิ์พบว่า ส่วนสกัดย่อย YTQ-3 มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเอนไซม์ Reverse Transcriptase มากกว่าสารสกัดสมุนไพร YTQ เช่น

เดียวกับสารสกัดสมุนไพร YTL ผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่า สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Reverse Transcriptase ในสมุนไพรสบู่ดำเป็นสารที่ polar มาก และพบทั้งในสมุนไพรสดและสมุนไพรแห้ง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 11 และ 12



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงการเตรียมส่วนสกัดย่อยต่างๆ จากสารสกัดสมุนไพร YTL และฤทธิ์ในหลอดทดลอง

ตารางที่ 11 รายละเอียดตัวอย่างส่วนสกัดย่อยต่างๆ ของสารสกัดสมุนไพร YTL และ YTQ เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง

ลำดับที่	ชนิดของส่วนสกัดย่อย	รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารสกัด : PVP-40	ปริมาณตัวยาในตัวอย่าง (%)
1	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง	YTL	-	100
2	ส่วนสกัดย่อยเอธิลอะซีเตท	YTL-1	-	100
3	ส่วนสกัดย่อยบิวทานอล	YTL-2	-	100
4	ส่วนสกัดย่อยน้ำ	YTL-3	-	100
5	สารสกัดด้วยน้ำจากใบสด	YTQ	-	100
6	ส่วนสกัดย่อยเอธิลอะซีเตท	YTQ-1	-	100
7	ส่วนสกัดย่อยบิวทานอล	YTQ-2	-	100
8	ส่วนสกัดย่อยน้ำ	YTQ-3	-	100

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองของส่วนสกัดย่อยต่างๆ จากสารสกัดสมุนไพร YTL และ YTQ

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV	ยับยั้งเอนไซม์ RT		ฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกัน	
			250 มคก./มล.	IC_{50} มคก./มล.	Lymphocyte proliferation	PHA response
1	YTL	85 % ที่ความเข้มข้น 250 มคก./มล.	84.9	212	1:102,400 (ST+++)	1:102,400 ถึง 1:1,600 (ST++)
2	YTL-1	ND	58.3	ND	NA	1:6,400 (ST+)
3	YTL-2	ND	30.4	ND	NA	NA
4	YTL-3	ND	89.9	71.2	1:12,800 (ST++)	1:204,800 (ST+++)
5	YTQ	ND	84.7	219	ND	ND
6	YTQ-1	ND	23.3	ND	ND	ND
7	YTQ-2	ND	18.6	ND	ND	ND
8	YTQ-3	ND	92.9	106	ND	ND

หมายเหตุ
NA = ไม่แสดงฤทธิ์
ND = ไม่ได้ดำเนินการ
ST = แสดงฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาว
\+ = แสดงฤทธิ์อ่อน
++ = แสดงฤทธิ์ปานกลาง
+++ = แสดงฤทธิ์แรง

บทที่ 7
ข้อกำหนดคุณภาพของสบู่ดำ

เย็นจิตร เตชะดำรงสิน วัฒนา อู่วาณิชย์
เครือวัลย์ พลจันทร โชติกา บุญ-หลง
อัญชลี จูฑะพุทธิ พนัสดา อิศรางกูร ณ อยุธยา
วารุณี จิรวัฒนาพงศ์ สุทธิโชค จงตระกูลศิริ
จารีย์ บันสิทธิ์ ประถม ทองศรีรักษ์

กระบวนการควบคุมคุณภาพยาจากสมุนไพรเป็นปัจจัยที่สำคัญยิ่งต่อการเตรียมยา เพื่อให้ได้ยาจากสมุนไพรที่มีคุณภาพดี มีประสิทธิภาพแน่นอนในการรักษา และมีความปลอดภัยในการใช้ สำหรับการศึกษาวิจัยทางคลินิก เนื่องจากประสิทธิผลของยามีความสัมพันธ์โดยตรงกับคุณภาพของยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาจากสมุนไพร องค์ประกอบที่ทำให้สมุนไพรมีคุณภาพแตกต่างกันมีดังนี้

1. ความแตกต่างของสารประกอบทางเคมีของพืช (chemical variation) ซึ่งอาจจะเกิดจากพันธุ์ ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว ฯลฯ
2. การเสื่อมสภาพของสมุนไพร (deterioration) เช่น การเน่าเสีย ก็จะทำให้คุณภาพของสมุนไพรต่ำลงด้วย
3. การใช้สมุนไพรชนิดอื่นมาปนปลอม (adulteration) หรือการทดแทนทั้งหมด (substitution)

ในทางการแพทย์แผนโบราณ มักจะตรวจคุณภาพโดยการดูลักษณะภายนอก ดมกลิ่น ชิมรส หรือโดยวิธีการอื่นๆ ตามประสบการณ์ของภูมิปัญญาพื้นบ้าน ส่วนการควบคุมคุณภาพของสมุนไพรในทางวิทยาศาสตร์ จะทำโดยการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานสมุนไพร หากสมุนไพรชนิดใดมีข้อกำหนด (monograph) ในเภสัชตำรับ ของประเทศต่างๆ หรือในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) ก็สามารถดำเนินการตามที่กำหนดไว้ได้ แต่หากสมุนไพรชนิดใดยังไม่มีการจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานไว้ จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาวิจัยเพื่อจัดทำข้อกำหนดคุณภาพ (quality specification) ของสมุนไพรชนิดนั้นๆ ไว้ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร

กระบวนการควบคุมคุณภาพของยาจากสมุนไพรมี 2 ขั้นตอน ดังนี้

1. การควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบ เช่น สมุนไพร สารสกัดสมุนไพร ฯลฯ
2. การควบคุมคุณภาพของยาเตรียม เช่น ยาเม็ด ยาแคปซูล ฯลฯ

ในที่นี้จะกล่าวถึงรายละเอียดเฉพาะการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบเท่านั้น สำหรับการควบคุมคุณภาพของยาเตรียมนั้นจะกล่าวถึงในบทถัดไป

การควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรสบู่ดำ

วัตถุดิบสมุนไพรจะมีคุณภาพดีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับกระบวนการในการผลิตสมุนไพร ซึ่งเกี่ยวข้องกับบุคลากรหลายสาขาอาชีพ ได้แก่ นักวิชาการเกษตร เกษตรกร ผู้เก็บสมุนไพรจากแหล่งธรรมชาติ และผู้ค้าวัตถุดิบ การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพรประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลัก คือ การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว กรรมวิธีหลังการเก็บเกี่ยว และ การบรรจุและเก็บรักษา ทุกขั้นตอนล้วนมีความสำคัญต่อคุณภาพของสมุนไพร

จากผลการศึกษาวิจัยทางพรีคลินิกของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำ (YTC) มีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาเพื่อการศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อไป ดังนั้น จึงจำเป็นต้องจัดทำข้อกำหนดคุณภาพของใบสบู่ดำขึ้น เพื่อใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบมาตรฐานของวัตถุดิบสมุนไพรก่อนการเตรียมสารสกัดสมุนไพรเพื่อการผลิตยา และเนื่องจากสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต่างๆ ในสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวยังไม่ทราบจึงไม่สามารถกำหนดปริมาณของสารสำคัญได้ จำเป็นต้องตรวจสอบฤทธิ์ต่างๆ ในหลอดทดลองควบคู่ไปกับการหาปริมาณส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ (active fraction) และการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของใบสบู่ดำ สำหรับข้อกำหนดอื่นๆ ได้ดำเนินการตามมาตรฐานสากล ดังนี้

วัตถุดิบสมุนไพร

สมุนไพรที่นำมาศึกษา จัดหาโดยนักพฤกษศาสตร์และนักวิชาการเกษตร ทั้งจากแหล่งปลูกและแหล่งธรรมชาติ รวม 12 ตัวอย่าง และได้ตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องตามหลักพฤกษอนุกรมวิธาน คือ *Jatropha curcas* Linn. วงศ์ Euphorbiaceae

บทนิยาม

สมุนไพรสบู่ดำ หมายถึงใบที่ทำให้แห้งของพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linn. วงศ์ Euphorbiaceae

องค์ประกอบทางเคมี

ใบสบู่ดำประกอบด้วย α-amyrin, β-sitosterol, stigmasterol, campesterol, 7-keto-β-sitosterol, stigmast-5-ene-3-β,7-α-diol, stigmast-5-ene-3-β,7-β-diol, isovitexin, vitexin, apigenin, steroid sapogenins, alkaloids, triterpene alcohol, l-tricontanol, 5-hydroxypyrrolidin-2-one และ pyrimidine-2,4-dione.

เอกลักษณ์ทางเคมี

1. การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้น

ต้มผงสมุนไพร 2 กรัม ด้วยเอธานอล 20 มิลลิลิตร บนเครื่องอังไอน้ำ (water-bath) กรอง ระเหยสารละลายที่กรองได้จนเกือบแห้ง เติมสารละลาย 50 % เมธานอล จำนวน 10 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว แล้วนำไปสกัดต่อโดยวิธี partition กับคลอโรฟอร์มจำนวน 10 มิลลิลิตร นำน้ำยาชั้นคลอโรฟอร์มมาทดสอบ ดังนี้

1.1 ตรวจหาสารประเภทสเตียรอยด์ (steroids) โดยทำปฏิกิริยากับ Blue Tetrazolium Reagent[1] หยด Blue Tetrazolium Reagent ซึ่งเป็นสารละลายผสมของน้ำยา A (0.5 % Tetrazolium Blue ในเมธานอล) และน้ำยา B (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 24 กรัม ใน 50% เมธานอล) ในอัตราส่วน 1:2 จำนวน 2-3 หยดลงในน้ำยาตัวอย่างที่เตรียมไว้จำนวน 1 มิลลิลิตร น้ำยาจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง

1.2 ตรวจหาสารประเภทไตรเทอร์ปีน (triterpenes) โดยทำปฏิกิริยากับ Vanillin Sulfuric Acid Reagent[1] หยด Vanillin Sulfuric Acid Reagent (ละลาย Vanillin 3 กรัม ใน absolute ethanol 100 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริค 0.5 มิลลิลิตร เตรียมทันทีก่อนใช้) 2-3 หยดลงในน้ำยาตัวอย่างที่เตรียมไว้ ต้มบนเครื่องอังไอน้ำสักครู่ น้ำยาจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง

2. การตรวจสอบโดยวิธี โครมาโตแกรมชนิดผิวบาง

2.1 น้ำยาตัวอย่าง

ต้มผงสมุนไพร 1 กรัม ด้วยเอธานอล 10 มิลลิลิตร บนเครื่องอังไอน้ำ กรองระเหยสารละลายที่กรองได้จนเกือบแห้ง โดยใช้เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ ส่วนที่เหลือจากการระเหย (residue) นำมาละลายด้วยเอธานอล จำนวน 1 มิลลิลิตร

2.2 น้ำยาส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ (active fraction)

ต้มผงสมุนไพร 2 กรัม ด้วยเอธานอล 20 มิลลิลิตร บนเครื่องอังไอน้ำ กรองระเหยสารละลายที่กรองได้จนเกือบแห้ง เติมสารละลาย 50 % เมธานอล จำนวน 10 มิลลิลิตร คนให้ทั่ว แล้วนำไปสกัดต่อโดยวิธี partition กับปิโตรเลียมอีเธอร์ 2 ครั้งๆ ละ 10 มิลลิลิตร รวมสารละลายชั้นปิโตรเลียมอีเธอร์ แล้วนำไประเหยจนแห้งโดยใช้เครื่องระเหยระบบสุญญากาศ ส่วนที่เหลือจากการระเหยนำมาละลายด้วยเอธานอล 2 มิลลิลิตร

2.3 น้ำยามาตรฐาน

แยกละลายสารมาตรฐาน β-sitosterol และ stigmasterol ชนิดละ 1 มิลลิกรัม ในเอธานอล 1 มิลลิลิตร

2.4 อุปกรณ์และน้ำยาแยก

2.4.1 แผ่นกระจกฉาบสารดูดซับ (Adsorbent) : Silica gel GF_{254} (Merck) 10 x 20 ซม.

2.4.2 น้ำยาแยก (Developing solvent) : ผสม Hexane : Ethyl acetate อัตราส่วน 15:5

2.4.3 ถังทำโครมาโตกราฟฟี (Chromatographic tank) : ใส่น้ำยาแยกลงในถังให้มีความสูงจากก้นถังประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที ก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

2.5 วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) นำน้ำยาตัวอย่าง น้ำยาส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ และน้ำยามาตรฐานชนิดละ 5 ไมโครลิตร มาแต้มบนแผ่นกระจกฉาบสารดูดซับในแนวระดับเดียวกันโดยให้ห่างจากขอบล่างของกระจกประมาณ 2 เซนติเมตร และให้มีระยะระหว่างหยดน้ำยาแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร นำไปตั้งบนถังทำโครมาโตกราฟฟีที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไป

ตามผิวฉาบสูง 10 เซนติเมตร นำแผ่นกระจกออกจากถัง ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจสอบโดย (1) ดูด้วยตาเปล่า (2) พ่นด้วยน้ำยา Anisaldehyde Sulfuric Acid Reagent (ละลาย anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตรในสารละลายผสมของ glacial acetic acid 10 มิลลิลิตร และ เมธานอล 85 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้นจำนวน 5 มิลลิลิตร) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นสีชัดเจน (ประมาณ 5 นาที)

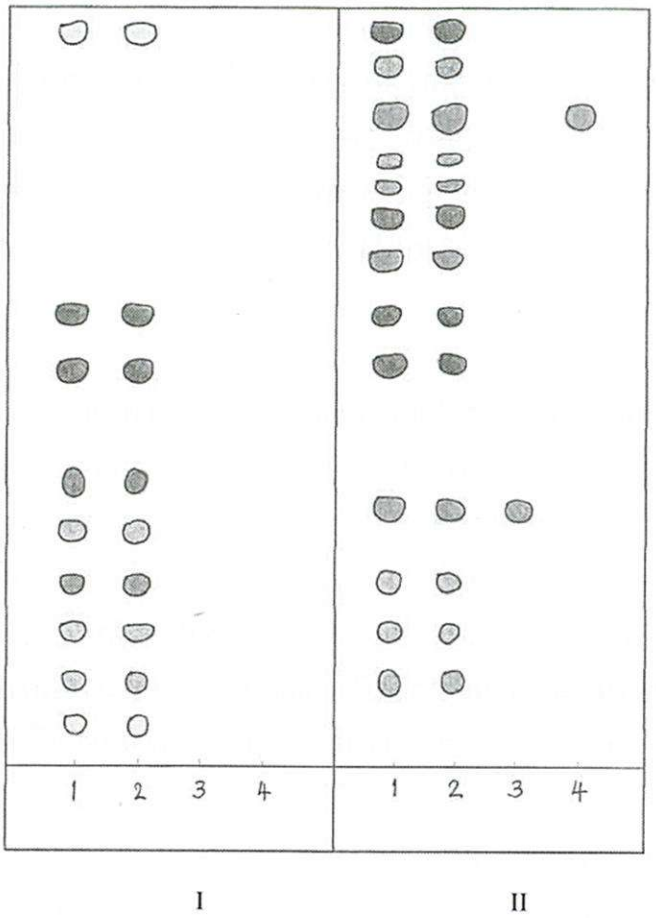
2.6 ผลการตรวจสอบ

จากการตรวจสอบโดยวิธีดังกล่าวข้างต้น ได้โครมาโตแกรมชนิดผิวบางซึ่งจะเห็นตำแหน่งและสีของ β-sitosterol, stigmasterol และ ส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ตรงกับน้ำยาตัวอย่าง รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 13 และรูปที่ 6

ตารางที่ 13 ค่า hRf และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่าง ๆ ในสารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำแห้ง

ตำแหน่ง	ค่า hRf	การตรวจสอบ	
		ดูด้วยตาเปล่า	Anisaldehyde Sulfuric Acid
1	5-6	เหลืองสด	-
2	11-12	เขียวขี้ม้าอ่อน	เขียวตองอ่อน
3	17-18	เขียวตองอ่อน	เขียวตองอ่อน
4	23-25	เขียวขี้ม้าอ่อน	เขียวตองอ่อน
5	29-31	เขียวตองอ่อน	-
6 (β-sitosterol)	32-34	-	ม่วง
7	35-38	เขียวเข้ม	-
8	50-53	เขียวเข้ม	เขียวเข้ม
9	58-60	เขียวเข้ม	เขียวเข้ม
10	64-67	-	ม่วง
11	70-72	-	ม่วงแดง
12	75-77	-	ม่วงน้ำเงิน
13	78-80	-	ม่วงน้ำเงิน
14 (stigmasterol)	82-86	-	ม่วง
15	90-93	-	ม่วงน้ำเงิน
16	96-98	เหลืองสด	ม่วงแดง

หมายเหตุ ค่า Retardation factor หรือ Relative front (Rf) ซึ่งคำนวณได้จาก
Rf = ระยะที่สารเคลื่อนที่/ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่
แต่เนื่องจากค่าที่ได้เป็นทศนิยม จึงใช้ hRf = 100 Rf



รูปที่ 6 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำ

I = ตรวจสอบโดยดูด้วยตาเปล่า

II = ตรวจสอบโดยพ่นด้วยน้ำยา Anisaldehyde Sulfuric Acid Reagent แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นสีชัดเจน (ประมาณ 5 นาที)

1 = น้ำยาตัวอย่าง

2 = น้ำยาส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์

3 = น้ำยามาตรฐาน β-sitosterol hRf เฉลี่ย 33

4 = น้ำยามาตรฐาน stigmasterol hRf เฉลี่ย 84

ข้อกำหนดคุณภาพ

1. **ปริมาณสิ่งแปลกปลอม**[2-4]: ต้องไม่เกินร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก

สุ่มตัวอย่างตามวิธีที่กำหนดไว้ในตำรายาของประเทศไทย[5] จำนวน 100 กรัม นำมาเกลี่ยในภาชนะแบนราบ คัดแยกสิ่งแปลกปลอมด้วยตาเปล่าหรือด้วยแว่นขยาย ชั่งน้ำหนักสิ่งแปลกปลอม คำนวณหาน้ำหนักร้อยละของสิ่งแปลกปลอมในตัวอย่าง

2. **ปริมาณความชื้น**[6]: ต้องไม่เกินร้อยละ 9.0 โดยน้ำหนัก
นำผงสมุนไพร 5 กรัม ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (น้ำหนักที่ชั่งอย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง) บรรจุในขวดชั่ง (weighing bottle) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน เกลี่ยผงสมุนไพรให้เรียบ นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณค่าร้อยละของน้ำหนักที่หายไปจากผงสมุนไพรที่ใช้ (น้ำหนักที่หายไปคือปริมาณความชื้นของสมุนไพร)

3. **ปริมาณเถ้ารวม**[6]: ต้องไม่เกินร้อยละ 13.0 โดยน้ำหนัก
เผาผงสมุนไพร 2-4 กรัม ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนในถ้วยกระเบื้อง (crucible) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนในเตาเผา (muffled furnace) โดยค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิไม่เกิน 450 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาว (ปราศจากคาร์บอน) ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก หากเถ้ายังมีสีดำ ทิ้งถ้วยกระเบื้องไว้ให้เย็น เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร นำไปทำให้แห้งบนอ่างอังไอน้ำ และเตาไฟฟ้า (hot plate) แล้วนำไปเผาจนได้น้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนัก คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้ารวมจากน้ำหนักของผงสมุนไพรที่ใช้

4. **ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด**[6]: ต้องไม่เกินร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก
เผาผงสมุนไพร 2-4 กรัม ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนในถ้วยกระเบื้อง (crucible) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนในเตาเผา (muffled furnace) ที่อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาว (ปราศจากคาร์บอน) นำเถ้าทั้งหมดมาต้มกับกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 2 โมลาร์ 25 มิลลิลิตร นาน 5 นาที กรองด้วยกระดาษกรองชนิดที่ปราศจากเถ้า ล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน จนน้ำล้างตะกอนเป็นกลาง นำเถ้าที่กรองได้และกระดาษกรองใส่ลงในถ้วยกระเบื้องใบเดิม ทำให้แห้งบนเตาไฟฟ้า นำไปเผาที่อุณหภูมิ 500 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาค่าร้อยละของปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรดจากสมุนไพรที่ใช้

5. **ปริมาณสารสกัดด้วยเอธานอล**[6] : ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 9.0 โดยน้ำหนัก
หมักผงสมุนไพร 5 กรัม ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ด้วยเอธานอล 100 มิลลิลิตรในขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทนาน 24 ชั่วโมง โดย 6 ชั่วโมงแรกให้เขย่าขวดบ่อยๆ ตั้งทิ้งไว้อีก 18 ชั่วโมง กรองอย่างรวดเร็ว นำสารละลายที่กรองได้ 20 มิลลิลิตร ใส่ใน

ถ้วยปากกว้างที่ทราบน้ำหนักแน่นอนปล่อยให้ระเหยแห้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณค่าร้อยละของปริมาณสารที่ได้จากผงสมุนไพรที่ใช้

6. **ปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์:** เนื่องจากยังไม่ทราบสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ จึงใช้ตรวจสอบฤทธิ์ต่าง ๆ ในหลอดทดลองแทน คือ ต้องแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HIV, Herpes Simplex Virus, *Cryptococcus neoformans* และสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนได้

ตารางที่ 14 สรุปข้อกำหนดคุณภาพของใบสบู่ดำ

ลำดับที่	รายการ	ข้อกำหนด	
		ไม่เกินร้อยละ	ไม่น้อยกว่าร้อยละ
1	ปริมาณสิ่งแปลกปลอม	2.0	
2	ปริมาณความชื้น	9.0	
3	ปริมาณเถ้ารวม	13.0	
4	ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด	1.0	
5	ปริมาณสารสกัดด้วยเอธานอล		9.0
6	ปริมาณสิ่งสกัดด้วยน้ำ		14.0
7	ปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์		แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV, HSV และเชื้อรา รวมทั้งสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนได้

การควบคุมคุณภาพของสารสกัดสมุนไพร YTC

สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำ (YTC) แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HIV เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาส และฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกันในหลอดทดลองได้ดีมาก (ตารางที่ 8) และเมื่อดำเนินการแยกสารสกัด YTC ออกเป็น 5 ส่วนสกัดย่อย (partly purified extract) พบว่า ส่วนสกัดย่อยปิโตรเลียมอีเธอร์ (YTC-1) แสดงฤทธิ์ทุกอย่างเหมือนกับสารสกัด YTC แต่มีฤทธิ์แรงมากขึ้น (ตารางที่ 10) ดังนั้น ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัด YTC ในเบื้องต้นนั้น นอกจากทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดดังกล่าวในหลอดทดลองแล้ว ยังจำเป็นต้องนำส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1 มาแยกต่อให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธี column chromatography ออกเป็นสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified extract)

ชนิดต่างๆ แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ในหลอดทดลองเพิ่มเติม เพื่อให้ทราบว่า สารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจของส่วนสกัดย่อย YTC-1 อยู่ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดใด เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ต่อไป

เมื่อนำส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1 มาแยกโดยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และใช้เฮกเซน เอธิลอะซีเตทและเมธานอลเป็น mobile phase จะได้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ 13 ชนิด ได้แก่ YTC-1/1, YTC-1/2, YTC-1/3, YTC-1/4.....จนถึง YTC-1/13 รายละเอียดตัวอย่าง และผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16

ตารางที่ 15 รายละเอียดตัวอย่างสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1 เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารสกัด : PVP-40	ปริมาณตัวยาในตัวอย่าง (%)
1	YTC-1	-	100
2	YTC-1/1	1:4	20
3	YTC-1/2	1:9	10
4	YTC-1/3	1:4	20
5	YTC-1/4	1:9	10
6	YTC-1/5	1:9	10
7	YTC-1/6	1:9	10
8	YTC-1/7	1:4	20
9	YTC-1/8	1:2	33.33
10	YTC-1/9	1:4	20
11	YTC-1/10	1:4	20
12	YTC-1/11	1:4	20
13	YTC-1/12	1:2	33.33
14	YTC-1/13	1:2	33.33

ตารางที่ 16 ผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ ของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV	ฤทธิ์ทำลายเชื้อ HSV	ฤทธิ์ทำลายและฆ่าเชื้อรา *Cr. Neoformans*	ฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกัน
1	YTC	90% ที่ความเข้มข้น 8.3 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.18 มคก./มล.	1 : 57,000	MIC = 1.67 มก./มล. MFC = 1.67 มก./มล.	กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน ที่ความเข้มข้น 15 ถึง 120 มคก./มล.
2	YTC-1	90% ที่ความเข้มข้น 3.3 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.05 มคก./มล.	1 : 115,000	MIC = 1.67 มก./มล. MFC = NA	กระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน ที่ความเข้มข้น 15 ถึง 120 มคก./มล.
3	YTC-1/1	NA	NA	NA	ND
4	YTC-1/2	NA	NA	NA	ND
5	YTC-1/3	NA	NA	NA	ND
6	YTC-1/4	NA	NA	NA	ND
7	YTC-1/5	NA	NA	NA	ND
8	YTC-1/6	NA	NA	NA	ND
9	YTC-1/7	NA	NA	NA	ND
10	YTC-1/8	NA	NA	NA	ND
11	YTC-1/9	NA	NA	NA	ND
12	YTC-1/10	NA	NA	NA	ND
13	YTC-1/11	95% ที่ความเข้มข้น 50 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.9 มคก./มล.	NA	MIC = 2.0 มก./มล. MFC = 2.0 มก./มล.	ND
14	YTC-1/12	95% ที่ความเข้มข้น 10 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.39 มคก./มล.	1 : 1,843,200	MIC = 3.33 มก./มล. MFC = 6.67 มก./มล.	ND
15	YTC-1/13	85% ที่ความเข้มข้น 41.6 มคก./มล. โดยมีค่าIC_{50} เท่ากับ 20.1 มคก./มล.	1 : 230,400	NA	ND

หมายเหตุ NA = ไม่แสดงฤทธิ์
ND = ไม่ได้ดำเนินการทดลอง เนื่องจากปริมาณสารที่แยกได้ไม่เพียงพอ
MIC = ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา (Minimum Inhibition Concentration)
MFC = ความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อรา (Minimum Fungicidal Concentration)

จากตารางที่ 16 จะเห็นได้ว่า สารสำคัญชนิดต่าง ๆ ที่แสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจในส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ (active fraction) จะอยู่ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified extract) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ YTC-1/11, YTC-1/12 และ YTC-1/13 และสารออกฤทธิ์จะมีหลายชนิด ไม่ใช่สารชนิดเดียว ดังนั้น เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมในการควบคุมคุณภาพของสารสกัด YTC จึงต้องใช้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวมาเป็นสารสกัดมาตรฐานในการจัดทำ TLC fingerprint ของสารสกัด YTC ควบคู่ไปกับการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดดังกล่าวในหลอดทดลองด้วย

TLC fingerprint ของสารสกัด YTC

1. น้ำยาตัวอย่าง

ละลายส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ (YTC-1) 0.2 กรัมในเอธานอล 1 มิลลิลิตร

2. น้ำยาสารสกัดมาตรฐาน

แยกละลายสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/11, YTC-1/12 และ YTC-1/13 จำนวน 20, 100 และ 40 มิลลิกรัมใน เอธานอล 1 มิลลิลิตร

3. อุปกรณ์และน้ำยาแยก

3.1 แผ่นกระจกฉาบสารดูดซับ (Adsorbent) : Silica gel GF_{254} (Merck) 10 x 10 เซนติเมตร

3.2 น้ำยาแยก (Developing solvent) :

1 st Dimension : Hexane-Ethyl acetate 7:3

2 nd Dimension : Chloroform-Isopropanol 17:3

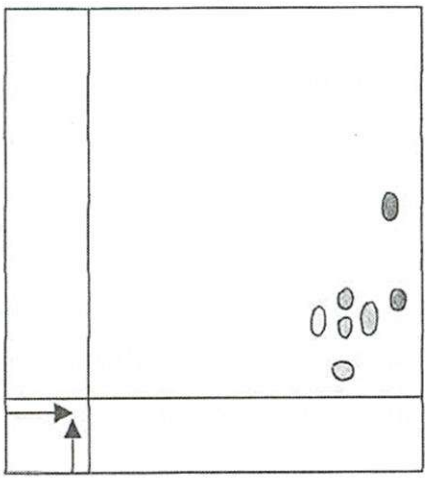
3.3 ถังทำโครมาโตกราฟฟี (Chromatographic tank) : แยกใส่น้ำยาแยกแต่ละชนิดลงในถังให้มีความสูงจากก้นถังประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาทีก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

4. วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) นำน้ำยาตัวอย่าง และน้ำยาสารสกัดมาตรฐานแต่ละชนิด ๆ ละ 1 ไมโครลิตร มาแยกแต้มบนแผ่นกระจกฉาบสารดูดซับในตำแหน่งที่กำหนดไว้คนละแผ่น นำไปแยกตั้งบนถังทำโครมาโตกราฟฟีที่มีน้ำยาแยกชนิดที่ 1 (1^{st} Dimension) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวฉาบสูง 5 เซนติเมตร นำแผ่นกระจกออกจากถัง ทิ้งไว้ให้แห้ง หมุนแผ่นกระจกเป็นมุมฉากตามลูกศรที่กำหนดไว้ แล้วนำไปแยกตั้งบนถังทำโครมาโตกราฟฟีที่มีน้ำยาแยกชนิดที่ 2 (2^{nd} Dimension) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวฉาบสูง 5 เซนติเมตร นำแผ่นกระจกออกจากถัง ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจสอบโดย (1) ดูด้วยตาเปล่า (2) พ่นด้วยน้ำยา Anisaldehyde Sulfuric Acid Reagent แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นสีชัดเจน (ประมาณ 5 นาที)

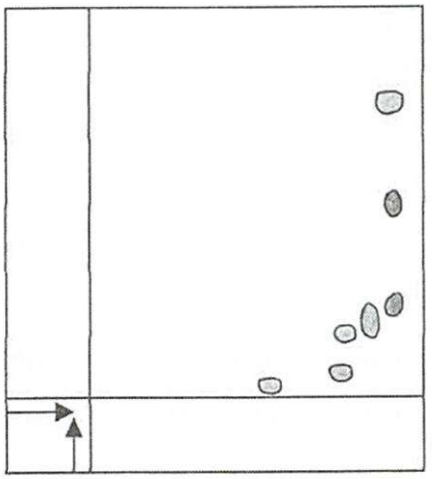
5. ผลการตรวจสอบ

จากการตรวจสอบโดยวิธีดังกล่าวข้างต้น ได้โครมาโตแกรมผิวบางซึ่งจะเห็นตำแหน่งและสีของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ YTC-1/11, YTC-1/12 และ YTC-1/13 ตรงกับส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1 รายละเอียดดังแสดงในรูปที่ 7-14 และตารางที่ 17



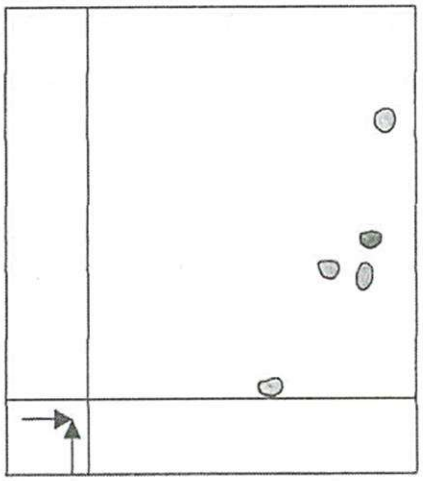
I

รูปที่ 7 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง ของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/11



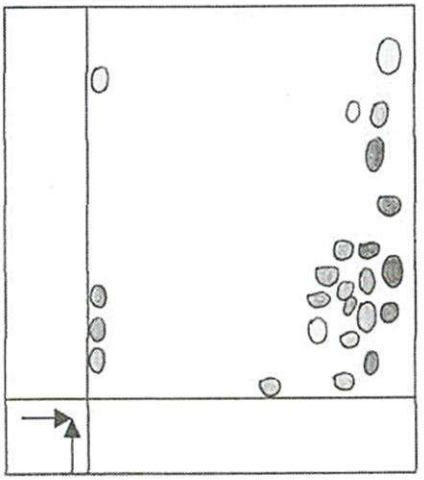
I

รูปที่ 8 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง ของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/12



I

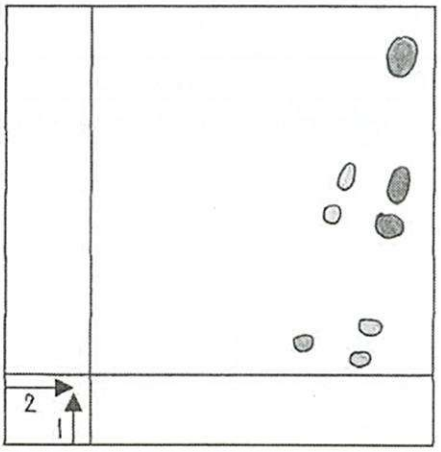
รูปที่ 9 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง ของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/13



I

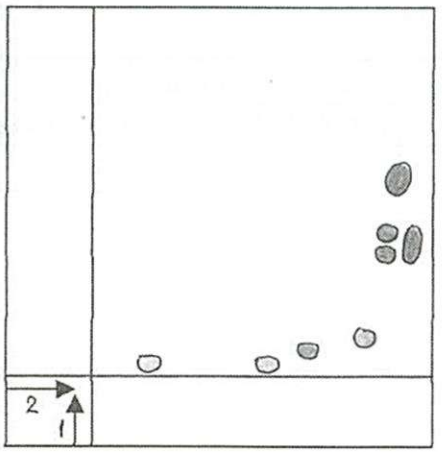
รูปที่ 10 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง ของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1

หมายเหตุ 1 st Dimension= Hexane-Ethyl acetate 7:3
2 nd Dimension = Chloroform-Isopropanol 17:3
I = ตรวจสอบโดยดูด้วยตาเปล่า



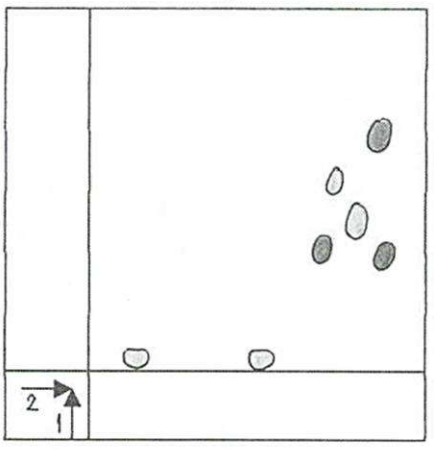
II

รูปที่ 11 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง ของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/11



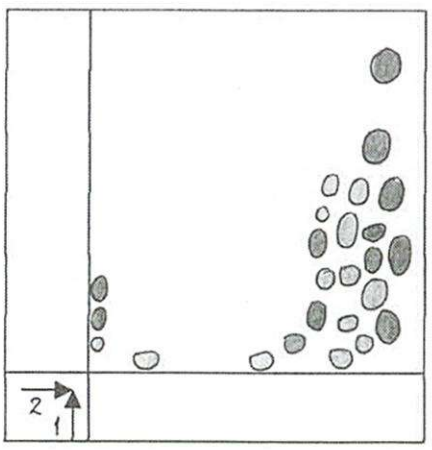
II

รูปที่ 12 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง ของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/12



II

รูปที่ 13 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง ของสารสกัดมาตรฐาน YTC-1/13



II

รูปที่ 14 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบาง ของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-1

หมายเหตุ 1 st Dimension = Hexane-Ethyl acetate 7:3
2 nd Dimension = Chloroform-Isopropanol 17:3
II = ตรวจสอบโดยพ่นด้วยน้ำยา Anisaldehyde Sulfuric Acid Reagent แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นสีชัดเจน (ประมาณ 5 นาที)

ตารางที่ 17 ค่า hRf และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่างๆ ในสารสกัดมาตรฐานและส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์

ตำแหน่ง	ค่า hRf		การตรวจสอบ	
	1 st Dimension	2 nd Dimension	ดูด้วยตาเปล่า	Anisaldehyde Sulfuric Acid
1	2-3	56-59	เขียวอ่อน	ม่วงอ่อน
2	2-3	14-16	-	ม่วง
3	4-5	39-42	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน
4	6-8	80-86	เขียวอ่อน	เขียวสด
5	8-12	2-4	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน
6	8-14	62-64	-	ฟ้าอมน้ำเงิน
7	12-14	83-87	เขียวอ่อน	เขียวสด
8	14-15	2-3	เขียวอมฟ้า	เขียวสด
9	14-16	76-80	เขียวอ่อน	เขียวอ่อน
10	16-18	67-70	เหลือง	ม่วงน้ำเงิน
11	20-24	94-96	เขียวสด	-
12	22-27	2-3	เขียวอ่อน	เขียวแก่
13	22-25	77-80	เขียวอมฟ้า	เขียวอ่อน
14	26-30	70-72	เขียวอมฟ้า	เขียวอ่อน
15	26-30	76-79	เขียวอมฟ้า	เขียวอ่อน
16	26-31	83-87	เขียวอมฟ้า	เขียวแก่
17	28-32	90-92	เขียวแก่	เขียวแก่
18	35-39	66-70	เขียวอมฟ้า	ม่วงแดง
19	36-40	90-92	เขียวอมฟ้า	เขียวแก่
20	38-41	80-85	เขียวแก่	ม่วงอ่อน
21	41-45	70-75	-	ม่วงอ่อน
22	45-48	91-95	เขียวแก่	เขียวแก่
23	47-50	81-85	-	ม่วงอ่อน
24	50-55	74-78	-	ม่วงอ่อน
25	60-63	85-87	-	ม่วงแดง
26	64-68	90-92	เขียวแก่	-
27	74-78	90-92	เขียวแก่	-
28	76-78	82-85	เหลือง	-
29	84-87	3-5	เหลือง	-
30	86-88	90-92	-	ม่วงน้ำเงิน
31	88-90	90-93	เหลือง	-

หมายเหตุ ค่า Retardation factor หรือ Relative front (Rf) ซึ่งคำนวณได้จาก
Rf = ระยะที่สารเคลื่อนที่/ระยะทางที่ solvent เคลื่อนที่
แต่เนื่องจากค่าที่ได้เป็นทศนิยม จึงใช้ hRf = 100 Rf

เอกสารอ้างอิง

1. Jork H, Funk W, Fisher W and Wimmer H. Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods, Volume 1 a. VCH, Germany. 1990.
2. Lou ZC. General Control Methods for Vegetable Drugs. WHO/Pharm/80.502. World Health Organization, Geneva. 1980.
3. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. WHO/Pharm/92.559/rev.1. World Health Organization, Geneva. 1992.
4. British Pharmacopoeia, Volume 2. The Stationary Office of the British Pharmacopoeia Commission, London. 1998.
5. Thai Pharmacopoeia, Vol.1.Pt.1. The War Veterans Organization Press, Bangkok. 1987.
6. Thai Herbal Pharmacopoeia, Vol.1. Prachachon Co., Ltd., Bangkok. 1995.

บทที่ 8
การเตรียมยา YTC แคปซูลและการควบคุมคุณภาพ

ปราณี ชวลิตธำรง เย็นจิตร เตชะดำรงสิน
จารีย์ บันสิทธิ์ อัญชลี จูฑะพุทธิ วัฒนา อู่วาณิชย์
โชติกา บุญ-หลง พนัสดา อิศรางกูร ณ อยุธยา
เครือวัลย์ พลจันทร สุทธิโชค จงตระกูลศิริ

ยาแคปซูล (Capsules) หมายถึง ยาเตรียมรูปแบบของแข็งที่ประกอบด้วยตัวยาสำคัญตั้งแต่หนึ่งชนิดขึ้นไป ผสมเข้ากันอย่างสม่ำเสมอกับสารปรุงแต่งต่างๆ ในสูตรตำรับตามความเหมาะสม บรรจุอยู่ในเปลือกแคปซูลชนิดแข็งหรืออ่อน ที่นิยมทำจากเจลาติน สามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิร่างกาย และมีให้เลือกใช้หลายขนาดตามปริมาตรบรรจุที่ต้องการ[1]

ข้อดีของยาแคปซูล[1] มีดังนี้

1. กลืนได้ง่าย เนื่องจากเปลือกแคปซูลมีความลื่น
2. เหมาะสำหรับบรรจุยาที่มีกลิ่นรสไม่พึงประสงค์
3. เป็นรูปแบบยาที่มีความสวยงาม สามารถสร้างเอกลักษณ์ให้ผลิตภัณฑ์ได้เป็นอย่างดี
4. ยาแคปซูลชนิดแข็งสามารถเตรียมได้ง่าย รวมทั้งสามารถปรับขนาดรับประทานให้เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยแต่ละรายได้
5. พกพาสะดวก มีความคงตัวดี ฯลฯ

ข้อจำกัดของยาแคปซูล[1] คือ ไม่เหมาะที่จะใช้บรรจุสารที่มีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. ละลายน้ำได้ดีมาก
2. สามารถดูดความชื้นจากเปลือกแคปซูล
3. มีความหนาแน่นต่ำ
4. ทำปฏิกิริยากับเจลาตินในเปลือกแคปซูลทำให้การละลายของเปลือกแคปซูลเปลี่ยนแปลงไป

ส่วนประกอบของเปลือกแคปซูล[1] มีดังนี้

1. เจลาติน หรือสารทดแทนเจลาติน
2. สารต่อไปนี้ในปริมาณเล็กน้อย
   - สารแต่งสี
   - สารทึบแสง เช่น ทิเทเนียมไดออกไซด์
   - สารป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์
   - สารช่วยทำให้แข็ง เช่น ซูโครส

3. น้ำร้อยละ 13-16

การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในเปลือกแคปซูลหากปริมาณความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 10 เปลือกแคปซูลแห้ง เปราะแตกง่าย แต่หากปริมาณความชื้นสูงกว่าร้อยละ 16 เปลือกแคปซูลเหนียวติดกัน เสียรูปร่าง

คุณสมบัติทั่วไปของเจลาติน[1] มีดังนี้

1. ไม่ละลายในน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส
2. ละลายได้ในน้ำร้อน และของเหลวในทางเดินอาหารที่อุณหภูมิปกติของร่างกาย
3. มีความคงตัวทางเคมีดีในสภาพแห้ง แต่จะสลายตัวด้วยเชื้อจุลินทรีย์เมื่อปริมาณความชื้นสูงขึ้น
4. ความแข็งแรง ความยืดหยุ่นและความใสของเปลือกแคปซูลที่ผลิตได้ ขึ้นกับแหล่งที่มาของเจลาติน

ส่วนประกอบทั่วไปของสูตรตำรับ[1] มีดังนี้

1. ตัวยาสำคัญ
2. สารเจือจาง (สารเพิ่มปริมาณ)
3. สารช่วยการไหล
4. สารปรุงแต่งอื่นๆ
   - สารยึดเกาะ
   - สารช่วยการแตกตัว
   - สารลดแรงตึงผิว
   - สารดูดซับ

แนวทางการกำหนดสูตรตำรับ[1] มีดังนี้

1. ตัวยาสำคัญต้องไม่ทำปฏิกิริยากับเปลือกแคปซูล
2. เลือกขนาดของเปลือกแคปซูลให้เหมาะสม
3. การทำเป็นแกรนูลจะช่วยลดความฟูของผงยา และแก้ปัญหาการแยกชั้นของตัวยาออกจากส่วนผสมได้
4. ในกรณีที่ไม่ได้ทำเป็นแกรนูล สารเจือจางจะต้องมีคุณสมบัติการไหลที่ดี มีความหนาแน่นใกล้เคียงกับตัวยา มีการกระจายขนาดอนุภาคในช่วงแคบ
5. ถ้าใช้เครื่องบรรจุแคปซูลที่มีหลักการทำงานเป็น Dosator สารเจือจางที่ใช้จะต้องมีคุณสมบัติในการยึดเกาะกันได้เมื่อได้รับแรงอัด
6. การกำหนดปริมาณของสารเจือจาง การทดลองบรรจุจริงด้วยเครื่องบรรจุที่จะใช้ และปรับปริมาณให้เหมาะสม

การเตรียมสารสกัดสมุนไพร YTC

วัตถุดิบสมุนไพรที่จะเข้าสู่กระบวนการเตรียมสารสกัดสมุนไพร ได้รับการจัดหาโดยนักพฤกษศาสตร์ มีการตรวจสอบมาตรฐานวัตถุดิบตามข้อกำหนดคุณภาพของใบสบู่ดำ (บทที่ 7) รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของใบสบู่ดำที่จะนำมาเตรียมยาเพื่อการทดลองทางคลินิก

ลำดับที่	รายการวิเคราะห์	เกณฑ์กำหนด	ผลวิเคราะห์
1	เอกลักษณ์ทางเคมี	- ทำปฏิกิริยากับ Blue Tetrazolium Reagent ให้สีม่วงแดง - ทำปฏิกิริยากับ Vanillin Sulfuric Acid Reagent ให้สีม่วงแดง - ตรวจสอบโดยวิธี TLC พบสารสำคัญเหมือนส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์	ให้ผลการตรวจสอบทุกอย่างตามเกณฑ์ที่กำหนด
2	ปริมาณสิ่งแปลกปลอม (%)	≤ 2.0	0
3	ปริมาณความชื้น (%)	≤ 9.0	6.24
4	ปริมาณเถ้ารวม (%)	≤ 13.0	8.51
5	ปริมาณเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (%)	≤ 1.0	0.26
6	ปริมาณสารสกัดด้วยเอธานอล (%)	≥ 9.0	15.38
7	ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (%)	≤ 14.0	19.27
8	การทดสอบประสิทธิภาพของยาเพื่อยืนยันฤทธิ์ในหลอดทดลอง	แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV, HSV และเชื้อรา รวมทั้งสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนได้	แสดงฤทธิ์ต่างๆ ตามเกณฑ์ที่กำหนด

เมื่อได้ใบสบู่ดำที่มีคุณภาพได้มาตรฐานตามต้องการแล้ว นำวัตถุดิบดังกล่าวมาบดเป็นผงหยาบ บรรจุลงใน extraction thimble แล้วใส่ใน soxhlet extraction apparatus ใช้เอธานอลเป็นตัวทำละลาย ให้ความร้อนโดยใช้ heating mantle สกัดจนกระทั่งสีของสมุนไพรซีด กรองสารสกัดที่ได้ นำไประเหยแห้งภายใต้แรงดันสุญญากาศโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปดูดด้วยสุญญากาศเพื่อเอาตัวทำละลายออกให้หมด จะได้สารสกัดสมุนไพร YTC ตามต้องการ ในการเตรียมยาเพื่อการทดลองทางคลินิกนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเตรียมยาครั้งเดียว เพื่อให้ผู้ป่วยทุกคนได้รับยาชนิดเดียวกันจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ดังนั้น จึงควรคำนวณปริมาณสารสกัด YTC ที่ต้องการใช้ในการเตรียมยาแคปซูลก่อน แล้วดำเนินการสกัดจนกระทั่งได้ปริมาณสารสกัดตามต้องการ นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน แบ่งสารสกัดส่วนหนึ่งนำไปเตรียมตัวอย่าง

เพื่อการทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัดในหลอดทดลอง และการศึกษาคุณภาพทางเคมี (บทที่ 7) สารสกัดที่เหลือทั้งหมดเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด แล้วเก็บในตู้เย็นเตรียมพร้อมเพื่อการเตรียมยาแคปซูล YTC ต่อไป

ส่วนประกอบของยา YTC แคปซูล

ใน 1 แคปซูล ประกอบด้วยสารสกัดสมุนไพร YTC 125 มิลลิกรัม

การควบคุมคุณภาพของยา YTC แคปซูล

การผลิตยาแคปซูลมักพบปัญหาทั้งในขั้นตอนการเตรียมส่วนประกอบในแคปซูลและในขั้นตอนการบรรจุยาใส่แคปซูล ปัญหาที่มักเกิดขึ้นกับการผลิตยาแคปซูลชนิดแข็ง[2] มีดังนี้

1. **น้ำหนักแคปซูลไม่สม่ำเสมอ** มักเกิดกับเครื่องที่บรรจุแคปซูลด้วยมือ อาจเกิดจากสาเหตุดังต่อไปนี้
   - การเกลี่ยผงยาลงในแคปซูลไม่สม่ำเสมอ
   - ปริมาณผงยาที่บรรจุในแคปซูลไม่พอเหมาะกับขนาดของแคปซูล
   - สูตรตำรับไม่เหมาะสม มีความชื้นหรือขาดสารช่วยไหล ทำให้ผงยาไหลลงในแคปซูลไม่สม่ำเสมอ
   - ขนาดแกรนูลไม่พอเหมาะกับขนาดของแคปซูล
2. **แคปซูลฉีก** ส่วนมากเกิดจากส่วนฝาครอบส่วนตัวของแคปซูลไม่หมด ทำให้ส่วนตัวของแคปซูลฉีกแซงส่วนฝาขึ้นมา สาเหตุที่ทำให้เกิด ได้แก่
   - ตั้งเครื่องไม่พอดี
   - ปริมาณของผงยาในแคปซูลมากเกินไป
   - ขนาดแกรนูลใหญ่เกินไปไม่เหมาะกับขนาดของแคปซูล
   - สูตรตำรับชื้นทำให้ผงยามีโอกาสเกาะติดอยู่บนขอบของส่วนตัวแคปซูล ส่วนฝาจึงครอบส่วนตัวไม่สะดวก
3. **แคปซูลปลายบุบ** อาจเกิดได้จากสาเหตุดังนี้
   - ปริมาณของผงยาในแคปซูลมากเกินไป ทำให้ต้องใช้แรงมากขึ้นในการครอบส่วนฝาและส่วนตัวของแคปซูลให้พอดี
   - เกิดจากการตั้งเครื่องไม่พอดี

ยา YTC แคปซูล เป็นผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร ซึ่งเตรียมจากสารสกัดสมุนไพร YTC โดยมีการควบคุมการผลิตทุกขั้นตอน ตั้งแต่วัตถุดิบสมุนไพรที่นำมาใช้ การเตรียมและการควบคุมคุณภาพของสารสกัดสมุนไพร YTC และกรรมวิธีการผลิตยา YTC แคปซูล สำหรับ

การควบคุมคุณภาพของยา YTC แคปซูล นั้น ดำเนินการตามมาตรฐานสากล และมาตรฐานตามตำรายาที่รัฐมนตรีกระทรวงสาธารณสุขประกาศ[1] ดังนี้

1. **การตรวจลักษณะภายนอก** เป็นการตรวจสอบรูปร่าง กลิ่น สี และ อื่นๆ ของผลิตภัณฑ์ยา เพื่อให้ได้มาตรฐานตามที่กำหนด
2. **การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี และปริมาณตัวยาสำคัญ** ของตัวยาสมุนไพรบางตัวที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ กรณีที่ไม่ทราบสารสำคัญจะใช้วิธีตรวจวิเคราะห์สารประกอบที่แสดงลักษณะเฉพาะของสมุนไพรเพื่อป้องกันการปนปลอมยา และเพื่อช่วยการควบคุมคุณภาพของยา
3. **การผันแปรของน้ำหนักยา** (Weight variation) จะตรวจในรูปแบบของยาลูกกลอน ยาเม็ด และยาแคปซูล เกณฑ์ทั่วไปสำหรับยาแผนโบราณกำหนดให้น้ำหนักเฉลี่ยใน 10 หรือ 20 เม็ด แตกต่างจากน้ำหนักเม็ดยาได้ไม่เกินร้อยละ 15
4. **การตรวจสอบการแตกกระจายตัว** (Disintegration time) การแตกกระจายตัวของยาเม็ดจะเร็วหรือช้า ขึ้นกับคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพของผงยา ความแข็ง และความหนาแน่นของยาในเม็ดยา และส่วนประกอบของตำรับยา กำหนดให้กระจายตัวหมดภายใน 30 นาที
5. **การตรวจการปนเปื้อนโลหะหนัก** การปนเปื้อนโลหะหนัก อาจมาจากโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม และจากสารพิษตกค้างซึ่งมีโลหะหนักเป็นองค์ประกอบ ปัจจุบันยังไม่มีตำรายาที่รัฐมนตรีกระทรวงสาธารณสุขประกาศฉบับใด กำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนโลหะหนัก อย่างไรก็ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยได้แนะนำไว้ดังนี้
   - สารหนู ไม่เกิน 4 ส่วนในล้านส่วน
   - แคดเมียม ไม่เกิน 0.3 ส่วนในล้านส่วน
   - ตะกั่ว ไม่เกิน 10 ส่วนในล้านส่วน
6. **การตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์** ตามตำรายาของประเทศไทย (Thai Pharmacopoeia) ได้กำหนดค่ามาตรฐานไว้ ดังนี้

   6.1 ยาสมุนไพรสำหรับรับประทานที่ไม่ต้องผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อนรับประทาน เช่น ยาผง ยาลูกกลอน ยาเม็ด ยาแคปซูล ตัวอย่างยาสมุนไพร 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร กำหนดให้มี
   - แบคทีเรียที่ชอบอากาศ (Aerobic bacteria) ได้ไม่เกิน 5.0×10^5
   - แบคทีเรียที่ชอบอาศัยในลำไส้ (Enterobacteria) ได้ไม่เกิน 5.0×10^3

- ยีสต์และรา ได้ไม่เกิน 5.0×10^3
- แบคทีเรียชนิด อี-โคไล (*E. coli*) ได้ไม่เกิน 5.0×10
- แบคทีเรียชนิดสแตฟฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ต้องไม่มี

และตัวอย่าง 10 กรัม หรือ 10 มิลลิลิตร ต้องปราศจากเชื้อแบคทีเรียชนิดซาลโมเนลลา (*Salmonella spp.*) และ คลอสตริเดียม (*Clostridium spp.*)

6.2 ยาสมุนไพรสำหรับรับประทานที่ต้องผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อนรับประทาน เช่น ชงในน้ำเดือด รวมทั้งยาสมุนไพรที่ใช้ภายนอก ตัวอย่างยาสมุนไพร 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร กำหนดให้มี

- แบคทีเรียที่ชอบอากาศ (Aerobic bacteria) ได้ไม่เกิน 5.0×10^7
- แบคทีเรียที่ชอบอาศัยในลำไส้ (Enterobacteria) ได้ไม่เกิน 5.0×10^4
- ยีสต์และรา ได้ไม่เกิน 5.0×10^4
- แบคทีเรียชนิด อี-โคไล *(E. coli)* ได้ไม่เกิน 5.0×10^2

และตัวอย่าง 10 กรัม หรือ 10 มิลลิลิตร ต้องปราศจากเชื้อแบคทีเรียชนิดซาลโมเนลลา (*Salmonella spp.*) และ คลอสตริเดียม (*Clostridium spp.*)

6.3 ยาเตรียมจากสมุนไพรสำหรับรับประทาน ตัวอย่างยาเตรียมจากสมุนไพร 1 กรัม หรือ 1 มิลลิลิตร กำหนดให้มี

- แบคทีเรียที่ชอบอากาศ (Aerobic bacteria) ได้ไม่เกิน 5.0×10^4
- แบคทีเรียที่ชอบอาศัยในลำไส้ (Enterobacteria) ได้ไม่เกิน 5.0×10^2
- ยีสต์และรา ได้ไม่เกิน 5.0×10^2
- แบคทีเรียชนิด อี-โคไล (*E. coli*) ต้องไม่มี
- แบคทีเรียชนิดซูโดโมแนส แอรูจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) ต้องไม่มี
- แบคทีเรียชนิดสแตฟฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) ต้องไม่มี

และตัวอย่าง 10 กรัม หรือ 10 มิลลิลิตร ต้องปราศจากเชื้อแบคทีเรียชนิดซาลโมเนลลา (*Salmonella spp.*)

7. การตรวจปริมาณสิ่งสกัดในตัวทำละลายต่าง ๆ เป็นการตรวจปริมาณสารที่ละลายได้ในตัวทำละลายต่าง ๆ เพื่อควบคุมคุณภาพของยาให้สม่ำเสมอ

รายละเอียดผลการวิเคราะห์คุณภาพของยา YTC แคปซูล ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของยา YTC แคปซูลเพื่อการทดลองทางคลินิก

ลำดับที่	รายการวิเคราะห์	เกณฑ์กำหนด	ผลวิเคราะห์
1	การตรวจลักษณะภายนอก	แคปซูลเบอร์ 0 สีเหลือง-เทา ฉลากยาแจ้งว่า YTC extract 125 มก./ แคปซูล ขนาดบรรจุแคปซูลละ 550 มก.	แคปซูลเบอร์ 0 สีเหลือง-เทา ภายในบรรจุผงละเอียด สีเขียวปนเทา น้ำหนักเฉลี่ยแคปซูลละ 560.8 มก. มี YTC extract เฉลี่ยแคปซูลละ 127.5 มก.
2	การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี	ให้ TLC fingerprint เหมือนของสารสกัด YTC	ให้ TLC fingerprint เหมือนของสารสกัด YTC
3	การทดสอบประสิทธิภาพของยาในหลอดทดลอง เพื่อยืนยันฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV	สามารถยับยั้งเชื้อ HIV ได้ $\geq$ 80 % ที่ความเข้มข้นของตัวยา $\leq$ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	ยับยั้งเชื้อ HIV ได้ 85 % ที่ความเข้มข้นของตัวยา 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
4	การผันแปรของน้ำหนักยา (%)	$\pm$ 15	$\pm$ 5.25
5	การแตกกระจายตัว (นาที)	$\leq$ 30	12
6	การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ *	(1) ในยาเตรียมจากสมุนไพร 1 กรัม กำหนดให้มี -แบคทีเรียที่ชอบอากาศ $\leq 5.0 \times 10^4$ -แบคทีเรียที่ชอบอาศัยในลำไส้ $\leq 5.0 \times 10^2$ -ยีสต์และรา $\leq 5.0 \times 10^2$ -ต้องไม่พบแบคทีเรียชนิดอี-โคไลชนิดซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และ ชนิดสแตฟฟิโลคอคคัส ออเรียส (2) ในยาเตรียมจากสมุนไพร 10 กรัม ต้องปราศจากเชื้อแบคทีเรียชนิดซาลโมเนลลา	เข้ามาตรฐานตามเกณฑ์ที่กำหนด
7	ปริมาณสารสกัดด้วยเอธานอล (%)	$\geq$ 22.0	23.82

หมายเหตุ * เนื่องจากยา YTC แคปซูลเป็นยาเตรียมจากสารสกัดสมุนไพร การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จึงใช้เกณฑ์กำหนดของยาเตรียมจากสมุนไพรสำหรับรับประทาน (ข้อ 6.3)

การศึกษาความคงสภาพ (Stability Test) ของตัวยา

จากการศึกษาความคงสภาพของตัวยาทั้งในรูปสารสกัดสมุนไพร YTC และในรูปผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร YTC แคปซูล โดยการทดสอบยืนยันฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง และการตรวจสอบ TLC fingerprint พบว่า สารสกัดสมุนไพร YTC ที่เก็บไว้ในตู้เย็น และยา YTC แคปซูลที่เก็บในขวดสีชามีฝาปิดมิดชิดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 เดือน ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ HIV ในหลอดทดลองได้เหมือนเดิม รวมทั้งมีองค์ประกอบทางเคมีไม่เปลี่ยนแปลง จึงสามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า สารสกัดสมุนไพร YTC และยา YTC แคปซูลมีอายุการเก็บได้ไม่น้อยกว่า 1 ปี 6 เดือน

เอกสารอ้างอิง

1. การอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง เทคนิคการผลิตยาจากสมุนไพรในรูปแบบยาเม็ดและยาแคปซูล สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข และคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2545.
2. มาลี บรรจบ และ ดรุณ เพ็ชรพลาย การผลิตยาจากสมุนไพร กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2539.

บทที่ ๙

การรักษาโรคติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus และโรคเอดส์ด้วยสารสกัดสมุนไพร YTC

พ.ญ.วินิตา บริราช น.พ.ไพจิตร์ วราชิต
น.พ.สมชาย แสงกิจพร พ.ญ.ปานิตา ปทีปวณิช

สรุปย่อโครงการวิจัยทางคลินิก

จากผลการทดลองทางห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า สารสกัดสมุนไพร YTC มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HIV, Herpes Simplex Virus, Varicella Zoster Virus, *Cryptococcus neoformans* รวมทั้งสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนได้ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพรดังกล่าวในหนูขาว พบว่า สารสกัดนี้ในขนาด 5 มก./กก. เทียบเท่ากับที่จะศึกษาในผู้ป่วยเอดส์ในขนาด 250 มิลลิกรัมต่อวัน โดยแบ่งให้ครั้งละ 125 มก. วันละ 2 ครั้ง ไม่ทำให้เกิดพิษที่ร้ายแรงใดๆ แก่หนูขาว มีความปลอดภัยค่อนข้างสูงมาก โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับยา zidovudine หรือ AZT ที่ใช้กันมากในปัจจุบัน ซึ่งในขนาดที่ใช้รักษามีโอกาสทำให้เกิด granulocytopenia ได้ประมาณ 42 % และ anemia ได้ถึง 29 % ในผู้ป่วยที่มี CD4 น้อยกว่า 200 cells/mm^3 หรือ 4-10 % และ 4 % ในผู้ป่วยที่มี CD4 มากกว่า 200 cells/mm^3 ตามลำดับ

แม้ว่าผลการทดสอบความเป็นพิษของ YTC ชี้ว่า สารสกัดนี้ในขนาดที่จะใช้ในการทดลองทางคลินิกมีความปลอดภัยสูงในหนูขาว คณะผู้วิจัยก็จะตรวจสอบความปลอดภัยของสารสกัด YTC ในผู้ป่วยเอดส์อย่างระมัดระวัง โดยมีการตรวจสุขภาพ วัด CBC, blood chemistry, chest X-rays และ HIV viral load เป็นระยะๆ ตลอดการทดลอง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้ดำเนินการเตรียมสารสกัด YTC ในรูปแคปซูล เพื่อทดสอบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ทางคลินิก โดยศึกษาผู้ป่วยที่มารับการรักษา ณ โรงพยาบาลศูนย์ลำปาง จำนวน 30 คน รูปแบบการวิจัยเป็น Phase I/II Clinical Trial และกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยและเกณฑ์การเลิกจากการศึกษาผู้ป่วยอย่างชัดเจน การศึกษาใช้ระยะเวลาทั้งสิ้น 8 เดือน โดยใน 2 เดือนแรกเป็นขั้นการเตรียมการและเตรียมระบบ

การส่งต่อสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ส่วนระยะ 6 เดือนต่อมา เป็นการศึกษาวิจัยทางคลินิก ซึ่งประกอบด้วยการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ พร้อมกับการประเมินผลการรักษาทุกเดือน เพื่อศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพร YTC หลังจากนั้นจะได้วิเคราะห์ผลการรักษาและสรุปผลนำเสนอต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิผล (efficacy) และความปลอดภัยเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพร YTC ในการรักษาโรคติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์

สถานที่ศึกษาวิจัยและระยะเวลาศึกษาวิจัย

สถานที่ศึกษา โรงพยาบาลศูนย์ลำปาง อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง

ระยะเวลาศึกษา ประมาณ 8 เดือน (มีนาคม 2541 ถึง ตุลาคม 2541)

แผนการวิจัย

1. รูปแบบการวิจัย : Phase I / II Clinical Trial

2. เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้ารับการศึกษา (Inclusion Criteria)
   - เพศชาย
   - อายุ 20 - 50 ปี
   - ตรวจเลือดพบ anti - HIV antibody
   - มีปริมาณของ HIV RNA concentrations (HIV viral load) ในพลาสมามากกว่า 20,000 copies/mL.
   - มี Karnofski Performance Score (KPS) 70 คะแนน หรือมากกว่า (ดูในภาคผนวก)
   - ยินยอมเข้ารับการศึกษาทดลองโดยสมัครใจ

   ผู้ป่วยที่เข้าโครงการจะมีทะเบียนประวัติแยกต่างหากและเก็บไว้เป็นความลับ

3. เกณฑ์การไม่รับผู้ป่วยเข้าสู่การศึกษา (Exclusion Criteria)
   - แพ้ยาในกลุ่ม sulfonamide
   - กำลังได้รับการรักษาหรือคาดว่าจะได้รับการรักษาด้วยยาต้าน HIV ในระยะเวลา 6 เดือน เช่น zidovudine, ddI , ddC, protease inhibitor เป็นต้น

- คาดว่าจะมีชีวิตอยู่ไม่เกิน 6 เดือน
- ไม่สามารถรับประทานยาเม็ดได้
- ไม่สามารถมารับการติดต่อรักษาสม่ำเสมอได้ภายใน 6 เดือน
- มีอาการ และอาการแสดงที่ชัดเจนของการติดเชื้อวัณโรค หรือ การติดเชื้อ *Cryptococcus* และจำเป็นต้องได้รับการรักษาวัณโรค และ/หรือ การติดเชื้อ *Cryptococcus*

4. จำนวนประชากรที่ศึกษา

จากสมมติฐานของการวิจัยที่ว่าปริมาณของ HIV viral load ในพลาสมาของผู้ป่วยก่อนได้รับการ รักษาด้วยสารสกัดสมุนไพร YTC มีปริมาณเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard deviation) เป็น 25,000 ± 5,000 copies/ml และถ้าสารสกัดสมุนไพร YTC มีประสิทธิผลก็ควรลดปริมาณ HIV viral load ลงได้เหลือประมาณ 15,000 ± 5,000 copies/ml โดยยอมให้มีความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 ร้อยละ 5 และความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 ร้อยละ 20 ดังนั้นจำนวนประชากรที่ต้องการในการศึกษานี้ประมาณ 30 คน

5. เกณฑ์การให้เลิกจากการศึกษา (Discontinuation Criteria)
- มีอาการ อาการแสดงที่รุนแรงโดยอาการ และ อาการแสดงดังกล่าวน่าจะเป็นพิษหรือผลข้างเคียงจากสารสกัดสมุนไพร YTC
- ผู้ป่วยไม่สมัครใจที่จะรับการศึกษาต่อไป

6. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

6.1 ผู้ป่วยที่มีเกณฑ์ดังกล่าวข้างต้นครบถ้วนจะได้รับการซักประวัติการตรวจร่างกาย ถ่ายภาพรังสีทรวงอก (Chest X-Ray, CXR) ตรวจปัสสาวะ (Urinalysis, UA) และเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ ปริมาณ 20 มล. เพื่อตรวจหา HIV viral load, CD4,Complete Blood Count (CBC), fasting blood sugar (FBS), BUN, creatinine,electrolytes, SGOT, SGPT, bilirubin, albumin, globulin, alkaline phosphatase,amylase

6.2 ผู้ป่วยจะได้รับการรักษา ดังนี้

- ยา co-trimoxazole ขนาด 480 มก. รับประทานวันละครั้ง
- สารสกัดสมุนไพร YTC ครั้งละ 1 แคปซูล (แคปซูลละ125 มิลลิกรัม) วันละ 2 ครั้ง หลังอาหาร ติดต่อกันนาน 6 เดือน
- ยาอื่น ๆ ตามแต่ปัญหาและความจำเป็นของผู้ป่วยแต่ละราย

6.3 ผู้ป่วยจะได้รับคำแนะนำให้หลีกเลี่ยงการใช้ยาอื่น ๆ นอกเหนือจากที่ได้รับจากผู้วิจัย และจะได้รับคำแนะนำให้กินยาที่ได้รับจากผู้วิจัยอย่างสม่ำเสมอ และกลับมารับการติดตามผลการรักษาตามนัดทุกครั้ง และกลับมาพบผู้วิจัยทุกครั้งที่มีปัญหา หรือความผิดปกติใด ๆ

6.4 ผู้ป่วยจะได้รับการติดตามผลการรักษาทุก 1 เดือน จนครบ 6 เดือน การติดตามผลการรักษาแต่ละครั้ง ผู้ป่วยจะได้รับการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และตรวจทางห้องปฏิบัติการ รวมทั้งได้ pre- และ post-treatment counseling ด้วย

ขั้นเตรียมการ 2 เดือนแรก

ซักประวัติ ตรวจร่างกาย และตรวจ HIV viral load 2 ครั้ง ห่างกัน 4 สัปดาห์ และ CD4 ก่อนเริ่มการรักษา

เดือนที่	การปฏิบัติ
1	ซักประวัติ ตรวจร่างกาย CBC, UA, FBS, BUN, Creatinine, electrolytes, SGOT, SGPT Bilirubin, alkaline phosphatase, albumin, globulin, amylase, CXR, HIV viral load
2	เหมือนเดือนที่ 1 ยกเว้น CXR
3	เหมือนเดือนที่ 1 และตรวจ CD4 ด้วย
4	เหมือนเดือนที่ 1 ยกเว้น CXR
5	เหมือนเดือนที่ 1 ยกเว้น CXR
6	เหมือนเดือนที่ 1 และตรวจ CD4 ด้วย

รวมทั้งจะมีการตรวจสอบจำนวนสารสกัดสมุนไพร YTC ที่ผู้ป่วยได้รับทุกครั้งที่ผู้ป่วยมารับการติดตามผล

ระหว่างการศึกษาเพื่อประเมินผลการรักษาในระยะเวลา 3 เดือน ถ้าผู้ป่วยมีปัญหาใดๆ สามารถกลับมาหาแพทย์และผู้วิจัยได้ตลอดเวลา ในการตรวจผู้ป่วยแต่ละครั้งจะดำเนินการเหมือนการติดตามผู้ป่วยตามนัด และตรวจรักษาเพิ่มเติมตามปัญหาของผู้ป่วย

6.5 การวิเคราะห์ข้อมูลผลการรักษา

6.5.1 Primary outcome โดยเปรียบเทียบปริมาณของ HIV viral load ระหว่างก่อนการรักษา และภายหลังการรักษาในเดือนที่ 1 ถึง 6 โดยใช้สถิติ ANOVA (Analysis of Variance)

6.5.2 Secondary outcome

- KPS ก่อนและหลังการรักษา
- อุบัติการของ Opportunistic infections
- จำนวนเซลล์ CD4 ก่อนและหลังการรักษา
- พิษและผลข้างเคียงจากการรักษาโดยประเมินจากการสอบถาม การตรวจร่างกาย และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ
- ความพึงพอใจของผู้ป่วยต่อการรักษาโดยการสอบถาม

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV หรือโรคเอดส์ส่วนใหญ่ในประเทศไทยในปัจจุบันมิได้รับการรักษาด้วยยาต้าน HIV แม้ว่าจะมีผลงานวิจัยที่แสดงว่าการใช้ยาต้าน HIV หลาย ๆ ขนาน (ยากลุ่มที่ต้าน reverse transcriptase 2 ขนานร่วมกับ protease inhibitor 1 ขนาน) จะทำให้ปริมาณของเชื้อ HIV ในเลือดลดลงได้มาก ลดโอกาสเกิดการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infections) และผู้ป่วยอาจมีชีวิตยืนยาวขึ้น ตามคำแนะนำมาตรฐานการรักษาของผู้เชี่ยวชาญโรคเอดส์[1] ก็ตาม แต่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV หรือโรคเอดส์ส่วนใหญ่ในประเทศไทยก็มิได้รับการรักษาตามมาตรฐานที่ได้แนะนำไว้ เนื่องจากผู้ป่วยไม่สามารถรับภาระค่าใช้จ่ายได้ และรัฐบาลก็ไม่สามารถรับภาระส่วนนี้ได้ เช่นกัน (ค่ายาประมาณเดือนละ 20,000 บาท) การวิจัยนี้มุ่งศึกษากลุ่มผู้ป่วยที่จะไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้าน HIV โดยจะไม่นำผู้ป่วยที่ได้รับหรือจะได้รับยาต้าน HIV มาศึกษา ดังนั้นผู้ป่วยที่นำมาศึกษาอาจจะได้ประโยชน์จากสารสกัดสมุนไพร YTC ถ้าสารสกัดดังกล่าวมีประสิทธิผลในการรักษาโรค แต่ผู้ป่วยก็จะต้องเจ็บปวดจากการเจาะเลือดอย่างน้อย 7 ครั้ง เสียเวลาในการกลับมารับการ

ตรวจรักษาและติดตามผลการรักษา และอาจจะเสี่ยงต่อพิษและผลข้างเคียงจากสารสกัดสมุนไพรได้ อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้ทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดดังกล่าวแล้วและนำมาศึกษาเมื่อผลการศึกษาพบว่ามีความปลอดภัย

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้จะได้รับการอธิบายถึงวัตถุประสงค์ วิธีการศึกษา ผลดี-ผลเสียที่อาจจะเกิดขึ้น และแนวทางการแก้ไขและความรับผิดชอบของผู้วิจัยจนผู้ป่วยเข้าใจและหมดข้อสงสัย และยินยอมเข้าร่วมในการศึกษาโดยสมัครใจโดยเซ็นชื่อลงในใบยินยอมดังต่อไปนี้

ใบยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัย
เรื่อง
การศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัดสมุนไพร YTC ในการรักษาโรคติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์

การวิจัยเรื่อง การศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัดสมุนไพร YTC ในการรักษาโรคติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์

วันให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัยอันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียดและมีความเข้าใจดีแล้ว

ผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบังซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะเลิกการเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ และเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้โดยสมัครใจและการบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคที่ข้าพเจ้าจะได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ จะมีการเจาะเลือดเป็นจำนวน 20 ซีซี ทุก 1 เดือน เป็นจำนวน 7 ครั้ง

ผู้วิจัยได้อธิบายให้ข้าพเจ้าทราบและเข้าใจแล้วว่า การเจาะเลือดเพียงเล็กน้อย โดยทั่วไปจะไม่เกิดอันตรายใด ๆ แก่ข้าพเจ้าเลย นอกจากอาจมีรอยช้ำบริเวณเจาะเลือดเล็กน้อย ซึ่งหายได้เองภายใน 7 วัน

ผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษาพยาบาลอย่างดีที่สุด โดยไม่คิดมูลค่า โดย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข 88/7 ซอยบำราศนราดูร ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000 โทรศัพท์ 02-589-9850-8 โทรสาร 02-5915449

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม
( )
ลงนาม.....พยาน
( )
ลงนาม.....พยาน
( )

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้แก่ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดี และข้าพเจ้าจึงลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม.....ผู้ยินยอม
( )
ลงนาม.....พยาน
( )
ลงนาม.....พยาน
( )

งบประมาณและแหล่งทุน

โครงการวิจัยนี้ได้รับงบประมาณหมวดค่าตอบแทน ใช้สอย และวัสดุ 1,726,000 บาท (หนึ่งล้านเจ็ดแสนสองหมื่นหกพันบาทถ้วน) จากเงินงบประมาณหมวดรายจ่ายอื่น (โครงการเร่งรัดวิจัยสมุนไพรต้านเอดส์) ของงานวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาประสิทธิผล (efficacy) และความปลอดภัยเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพร YTC ในการรักษาโรคติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) และโรคเอดส์ ณ โรงพยาบาลลำปาง จังหวัดลำปาง สรุปโดยสังเขปได้ ดังนี้

1. มีผู้ป่วยที่ได้รับยา YTC ทั้งสิ้น 21 ราย เป็นผู้ป่วยที่มี CD4 < 200 cells/mm^3 ตาม inclusion criteria ใหม่ที่เสนอโดยคณะกรรมการศึกษาวิจัยในคน เมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2541 จำนวน 20 ราย ส่วนอีก 1 ราย มี CD4 ประมาณ 500 cells/mm^3 เป็นญาติของเจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาลลำปาง ซึ่งอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ

2. อาการที่เกิดขึ้นระหว่างการใช้ยา YTC สามารถสรุปได้ ดังนี้

- ถ่ายเหลว	14 ราย
- น้ำหนักลดลง	11 ราย
- ผิวคล้ำขึ้น	2 ราย
- ผื่นคัน	1 ราย
- ระบบประสาทผิดปกติ (กะระยะไม่ถูก, พูดไม่ค่อยออก, อ่อนแรงซีกซ้ายแต่ไม่มาก,CT brain-negative)	1 ราย
- ซีด	2 ราย
- ตาเหลือง เกิด ascites	1 ราย
- ถึงแก่กรรมระหว่างใช้ยาและหลังหยุดยา	4 ราย

3. มีผู้ป่วยที่ได้รับยาไม่ครบ 3 เดือน จำนวน 12 ราย โดยมีสาเหตุต่างๆ กัน ดังนี้

- แพทย์ให้หยุดยา		5 ราย
เนื่องจาก	ascites	1 ราย
	Cryptococcal meningitis	2 ราย
	lung lesions	1 ราย
	พูดไม่ค่อยออก อ่อนแรงซีกซ้าย	1 ราย
- ไม่มาตามนัด		3 ราย
- หยุดยาเอง		3 ราย
เนื่องจาก	ท้องเสีย	1 ราย
	ซีด	2 ราย
- ถึงแก่กรรม		1 ราย

4. ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาของผู้ป่วยที่ยังรับประทานยา YTC อยู่ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับค่าที่ได้ก่อนได้รับยา (คำนวณค่านัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี two-tailed paired t-test, $p < 0.05$) แสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ค่าทางโลหิตวิทยาของผู้ป่วยเอดส์ที่ได้รับยาสารสกัดสมุนไพร YTC

Hematological Parameters	Time after treatment (months)				
	-3 or -2	0	1	2	3
Hemoglobin (g %)	12.47 ± 2.00	12.54 ± 2.28	11.82 ± 2.05 **	11.79 ± 2.04 **	12.48 ± 2.32
Hematocrit (%)	31.30 ± 5.66	38.25 ± 6.45	34.21 ± 5.84 **	34.99 ± 5.72 **	38.03 ± 6.68
WBC (cells/mm^3)	5,882 ± 1,816	5,150 ± 1,602	5,239 ± 1,573	4,553 ± 1,413	5,150 ± 1,620
Platelet (cells/mm^3)	223,118 ± 65,293	201,278 ± 58,318	221,778 ± 88,922	187,733 ± 71,759	159,875 ± 42,547
Neutrophil (%)	52.12 ± 11.96	55.82 ± 11.82	53.47 ± 12.69	61.29 ± 14.29	60.43 ± 10.98
Lymphocyte (%)	29.59 ± 12.91	27.59 ± 9.93	28.47 ± 10.44	25.93 ± 11.41	29.71 ± 8.62
Eosinophil (%)	15.71 ± 10.29	12.47 ± 9.20	11.94 ± 10.10	9.29 ± 11.58	7.00 ± 4.43

** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับเมื่อก่อนได้รับยา 2-3 เดือน

5. ผลการตรวจทางชีวเคมีของเลือดของผู้ป่วยที่ยังรับประทานยา YTC อยู่ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับค่าที่ได้ก่อนรับยา (คำนวณค่านัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี two-tailed paired t-test, $p < 0.05$) แสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ค่าทางชีวเคมีของผู้ป่วยเอดส์ที่ได้รับยาสารสกัดสมุนไพร YTC

Biochemical Parameters	Time after treatment (months)				
	-3 or -2	0	1	2	3
FBS (mg/dL)	96.66 ± 21.94	76.18 ± 7.29 **	81.18 ± 5.83 *	88.00 ± 18.93	90.18 ± 8.53 *
Amylase (U/L)	70.76 ± 35.68	72.24 ± 25.01	72.71 ± 30.34	83.83 ± 25.00	97.86 ± 55.54 *
BUN (mg/dL)	10.41 ± 2.53	9.88 ± 2.87	9.18 ± 3.38	13.17 ± 5.31	10.57 ± 1.62
Creatinine (mg/dL)	1.05 ± 0.23	1.15 ± 0.23	1.16 ± 0.28	1.16 ± 0.15	1.26 ± 0.15

** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับเมื่อก่อนได้รับยา 2-3 เดือน
FBS มีค่าต่ำกว่าค่าเมื่อก่อนได้รับยา 2-3 เดือน แต่ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ

สำหรับ liver function test ของผู้ป่วยส่วนมากมีค่าปกติ ผู้ป่วย 1 รายมีค่า alkaline phosphatase สูง(447 U/L) 2 เดือนก่อนได้รับยา แต่ได้ลดลงมาเป็นปกติก่อนได้รับยา (291 U/L) หลังรับประทานยาได้ 1 เดือนครึ่งมีอาการตาเหลือง และ ascites จึงให้หยุดยาและรับเข้ารักษาในโรงพยาบาล หลังออกจากโรงพยาบาลแล้ว 1 เดือน ผู้ป่วยได้เสียชีวิตที่บ้าน (เมื่อเริ่มได้รับยาผู้ป่วยมี viral load 130,000 copies/ml, CD4 1% หลังได้รับยาหนึ่งเดือน viral load เพิ่มเป็น 300,000 copies/ml, CD4 0%)

6. ค่าเฉลี่ยของ viral load ของผู้ป่วย 2-3 เดือนก่อนได้รับยา และที่ 0,1,2 และ 3 เดือนหลังได้รับยาเปลี่ยนแปลงของ viral load ของผู้ป่วยที่ได้รับสารสกัด YTC เทียบกับเมื่อ 2-3 เดือนก่อนได้รับยา สรุปไว้ในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 การเปลี่ยนแปลงของ viral load เทียบกับเมื่อ 2-3 เดือน ก่อนได้รับยาสารสกัดสมุนไพร YTC

	Time after treatment (months)			
	0	1	2	3
> + 0.5 log	2 (9.5 %)	2 (9.5 %)	3 (20 %)	2 (22.2 %)
< - 0.5 log	8 (38.1 %)	2 (9.5 %)	1 (6.7 %)	1 (11.1 %)
Unchanged	11 (52.4 %)	17 (81.0 %)	11 (73.3 %)	6 (66.7 %)
No. of patients	21	21	15	9

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าค่าเฉลี่ยของ viral load หลังได้รับยามีแนวโน้มสูงขึ้น แต่การเพิ่มหรือลดของ viral load ในผู้ป่วยส่วนมากยังอยู่ในช่วง 0.5 log อนึ่งผู้วิจัยเสนอว่าในการวิจัยครั้งหน้า จะหาค่า viral load อย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อจะหาค่า baseline viral load ที่ค่อนข้างแน่นอนก่อนที่จะให้ยาแก่ผู้ป่วย เนื่องจากโดยทั่วไปค่า viral load ของผู้ป่วยเอดส์มีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงได้บ้างในช่วงเวลาต่างๆ

ความเห็นของคณะกรรมการ Data & Safety Monitoring Board

1. ขนาดของยา YTC ที่ให้แก่ผู้ป่วยน่าจะมีขนาดสูงเกินไป จึงทำให้เกิดอาการท้องเดินขึ้นในผู้ป่วยหลายรายและผู้ป่วยบางรายมีอาการซีด ดังนั้น หากจะทำการศึกษาในขั้นต่อไปควรลดขนาดของยาลง หรือทำให้สารสกัด YTC ซึ่งยังเป็นสารสกัดหยาบอยู่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยการแยกสกัดเอาสารที่ก่อให้เกิดฤทธิ์ข้างเคียงออกจากสารออกฤทธิ์ เพื่อช่วยลดฤทธิ์ข้างเคียงของยา นอกจากนี้ ควรให้ผู้ป่วยมีการควบคุมความสะอาดของอาหารที่บริโภคอย่างเคร่งครัด

2. อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัด YTC ทำให้เกิดการระคายเคืองหรืออักเสบต่อเยื่อบุของระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัด YTC มีผลต่อเซลล์อื่นๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวด้วยซึ่งหากมีฤทธิ์ดังกล่าวจริงอาจมีผลเพิ่ม cellular transcription protein ใน T cells ซึ่งจะทำให้เกิดการกระตุ้น promoter ของ HIV replication ได้ และอาจเป็นสาเหตุให้ viral load ของผู้ป่วยไม่ลดลง ดังนั้นจึงควรทดสอบ cytotoxicity ของสารสกัด YTC ต่อเซลล์หลายๆ ชนิดรวมทั้ง lymphocytes ด้วย

3. ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด YTC ว่า หากไม่ใช่สารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase เป็นไปได้หรือไม่ว่าอาจออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ protease ให้ติดต่อคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งมีอาจารย์ใหม่เพิ่งกลับจากต่างประเทศเคยทดสอบฤทธิ์ของ protease inhibitor

4. ผู้ป่วยเอดส์ในการทดลองนี้มี Karnofski performance score มากกว่า 70, viral load จัดว่าไม่สูงมาก แต่มี CD4 น้อยกว่า 200 อาจจะจัดเป็นผู้ป่วยจำพวก rapid progressor ซึ่งการใช้ยาขนานเดียว (monotherapy) ในการรักษานั้น โอกาสที่จะรักษาไม่ได้ผลนั้นสูงมาก จึงขอเสนอให้ทดลองศึกษาในรูปแบบ combination therapy โดยอาจจะใช้เสริมกับยาจำพวก nucleoside เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้แทน protease inhibitor ที่มีราคาแพง

เอกสารอ้างอิง

1. Carpenter CCJ et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Updated recommendations of the International AIDS society - USA Panel. JAMA 1997; 277: 1962-9.

บทที่ 10

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดและส่วนสกัดย่อยของ YTC ต่อการทำงานของระบบทางเดินอาหารในสัตว์ทดลอง

อัญชลี จูฑะพุทธิ ม.ล.ปุณฑริกา ณ พัทลุง
เย็นจิตร เตชะดำรงสิน ประถม ทองศรีรักษ์

จากการที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้ศึกษาพบว่าสารสกัดสมุนไพร YTC มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV-1 ในหลอดทดลอง และในขนาดที่จะใช้ในการทดลองทางคลินิกไม่ทำให้เกิดอาการพิษในสัตว์ทดลอง ดังนั้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้นำยาจากสารสกัดสมุนไพร YTC ไปศึกษาวิจัยทางคลินิกในผู้ป่วยเอดส์ ณ โรงพยาบาลลำปาง จังหวัดลำปาง ผลการศึกษาพบว่าทำให้เกิดอาการท้องเสียในผู้ป่วยหลายราย จนทำให้ผู้ป่วยบางรายต้องหยุดใช้ยาเนื่องจากอาการข้างเคียงดังกล่าว ดังนั้น สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงได้ทำการศึกษาวิจัยสารสกัด YTC เพิ่มเติม เพื่อแยกเอาส่วนสกัดย่อยที่ทำให้เกิดอาการข้างเคียงออกไป เหลือแต่ส่วนสกัดย่อยที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 เพื่อจะได้นำมาศึกษาวิจัยด้านพิษวิทยาและประสิทธิผลทางคลินิกต่อไป

จากการศึกษาทางเคมี เพื่อหาสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ของสารสกัด YTC เพื่อประโยชน์ในการใช้ควบคุมคุณภาพของยาที่จะผลิตจากสารสกัดสมุนไพรนี้นั้นได้เคยมีการแยกสารสกัด YTC ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบออกเป็น 5 ส่วนสกัดย่อย ได้แก่ YTC-1, YTC-2, YTC-3, YTC-4 และ YTC-5 แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง (in vitro anti-HIV activity) พบว่า เฉพาะสารสกัด YTC-1 และ YTC-2 เท่านั้นที่มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเชื้อเอชไอวี สำหรับส่วนสกัดย่อย YTC-3 มีฤทธิ์อ่อนมาก และส่วนสกัดย่อย YTC-4 และ YTC-5 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง ดังนั้น สถาบันวิจัยสมุนไพรจึงได้ดำเนินการทดสอบฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบทางเดินอาหารในสัตว์ทดลองของสารสกัด YTC และส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ เอชไอวี (YTC-1 + YTC-2) และส่วนสกัดย่อยที่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวี (YTC-3 + YTC-4 + YTC-5) ก่อน เพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของระบบทางเดินอาหารในสัตว์ทดลองอยู่ในส่วนสกัดย่อยชนิดใด

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมยาแขวนตะกอนจากสารสกัดสบู่ดำ

เตรียมสารสกัดสมุนไพรในรูปของยาแขวนตะกอนใน 1% Tragacanth ในน้ำ ให้มีความเข้มข้นของเนื้อสารตามที่ต้องการ โดยนำค่า%yield ของส่วนสกัดย่อยต่างๆ มาคำนวณหาปริมาณของส่วนสกัดย่อยที่จะต้องใช้เตรียมยาแขวนตะกอน เพื่อให้มีปริมาณเทียบเท่ากับปริมาณที่มีอยู่ในสารสกัด YTC 50 มก./กก./10 มล. สำหรับกรอกให้แก่สัตว์ทดลองในปริมาตร 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (มล./กก.)

2. ผงถ่านแขวนตะกอน (Charcoal suspension)

นำยาเม็ด Ultracarbon® มาบดให้ละเอียด ชั่งและเตรียมให้เป็นผงถ่านแขวนตะกอน 9% ใน 3.7% Tragacanth

3. สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรเพศเมีย น้ำหนักตัว 20-30 กรัม ก่อนการทดลองอดอาหารหนู 18 ชั่วโมง แต่ไม่อดน้ำ

4. วิธีทดลอง

วิธีการทดสอบดัดแปลงจากวิธีการของ Turner[1] โดยการกรอกสารสกัดที่จะทดสอบฤทธิ์ในปริมาตร 10 มล./กก. และกรอก 1% Tragacanth ในหนูกลุ่มควบคุม อีก 30 นาทีต่อมา กรอกผงถ่านแขวนตะกอนปริมาตร 0.3 มล./ตัว หลังจากนั้น 1 ชั่วโมง sacrifice หนูโดย cervical dislocation ผ่าท้องหนู แล้ววัดระยะทางที่ผงถ่านเคลื่อนที่ไปในลำไส้เล็ก และความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็ก นำมาคำนวณหา %GI transit ของหนูแต่ละตัว ดังนี้

$$\% \text{ GI Transit} = \frac{\text{ระยะทางที่ผงถ่านเคลื่อนไปในลำไส้เล็ก (ซม.)} \times 100}{\text{ความยาวทั้งหมดของลำไส้เล็ก (ซม.)}}$$

นำค่าเฉลี่ยของ % GI Transit ของหนูแต่ละกลุ่มมาเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม โดยใช้ Students' t-test

ผลการทดลอง

ตารางที่ 23 แสดง % GI Transit ของหนูที่ได้รับสารสกัดต่าง ๆ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า สารสกัด YTC ในขนาด 50 มก./กก. มีผลทำให้ % GI transit เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และส่วนสกัดย่อย YTC-1 + YTC-2 ในขนาดเทียบเท่ากับสารสกัด YTC 50 มก./กก. มีผลเพิ่ม % GI transit อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ส่วนสกัดย่อย YTC-3 + YTC-4 + YTC-5 ในขนาดเทียบเท่ากับสารสกัด YTC 50 มก./กก. ไม่มีผลเพิ่ม % GI transit ดังนั้น องค์ประกอบทางเคมีที่มีผลเพิ่ม GI motility จึงอยู่ในส่วนสกัดย่อยรวมที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีได้แรงในหลอดทดลอง นั่นคือ ส่วนสกัดย่อย YTC-1 + YTC-2 มีทั้งสารที่ออกฤทธิ์และสารที่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงอยู่ด้วยกัน

ตารางที่ 23 % GI Transit ของหนูที่ได้รับสารสกัดและส่วนสกัดย่อยต่าง ๆ ของ YTC เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Extract	% GI Transit (Mean ? SD)		P-value
	Control	Test	
YTC	66.8 ± 9.0 n=41	75.6 ± 14.4 n=36	0.002
YTC-1 + YTC-2	60.5 ± 10.2 n=30	77.9 ± 15.6 n=31	< 0.0001
YTC-3 + YTC-4 + YTC-5	62.8 ± 11.0 n=33	63.9 ± 9.4 n=32	0.68

เพื่อศึกษาว่าองค์ประกอบทางเคมีที่กระตุ้น GI motility อยู่ในส่วนสกัดย่อย YTC-1 หรือ YTC-2 จึงได้ทดลองให้ส่วนสกัดย่อยทั้งสองชนิดแก่หนูถีบจักร ในขนาดเทียบเท่ากับสารสกัด YTC 50 มก./กก. พบว่าเฉพาะส่วนสกัดย่อย YTC-1 เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์กระตุ้น GI motility ขณะที่ส่วนสกัด YTC-2 ไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 % GI Transit ของหนูที่ได้รับส่วนสกัดย่อย YTC-1 หรือ YTC-2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Extract	% GI Transit (Mean ? SD)		P-value
	Control	Test	
YTC-1	61.1 ± 11.3 n=44	77.0 ± 13.3 n=32	< 0.0001
YTC-2	1.1 ± 11.3 n=44	64.2 ± 11.7 n=30	0.26

สรุปผลการทดลอง

องค์ประกอบทางเคมีที่มีผลเร่ง GI motility ของสารสกัด YTC อยู่ในส่วนสกัดย่อย YTC-1 ดังนั้น เพื่อลดปัญหาจากฤทธิ์ข้างเคียงของส่วนสกัดย่อย YTC-1 ซึ่งมีผลเพิ่ม GI motility และอาจทำให้เกิดฤทธิ์ข้างเคียงในผู้ป่วยเอดส์ จึงได้แยกสกัดเฉพาะส่วนสกัดย่อย YTC-2 มาศึกษาต่อ ทั้งในด้านความเป็นพิษในสัตว์ทดลองและการทดลองทางคลินิก เพื่อศึกษาประสิทธิผลและฤทธิ์ข้างเคียงของยาจากส่วนสกัดย่อย YTC-2 ในผู้ป่วยเอดส์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Turner, R.A. Screening Methods in Pharmacology. Academic Press, New York, 1965, pp.235-7 And p.142.

บทที่ 11
การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของส่วนสกัดย่อย YTC-2 ในหนูขาว

ปราณี ชวลิตธำรง ทรงพล ชีวะพัฒน์
อัญชลี จูฑะพุทธิ สดุดี รัตนจรัสโรจน์
สมเกียรติ ปัญญามัง เรวดี บุตราภรณ์
จารีย์ บันสิทธิ์ เย็นจิตร เตชะดำรงสิน

YTC เป็นสารสกัดชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลองได้ดีมาก อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปทดสอบทางคลินิกในผู้ป่วยโรคเอดส์ที่โรงพยาบาลลำปาง พบว่า ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ คือ ทำให้ผู้ป่วยบางรายมีอาการท้องเดิน ดังนั้นฝ่ายพฤกษเคมี สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้แยกสกัดสารที่ทำให้เกิดอาการดังกล่าวออกไป ได้เป็นสารสกัด YTC-2 ซึ่งยังคงมีฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลองได้ดีอยู่ แต่ไม่มีผลเร่งการบีบตัวของทางเดินอาหารในสัตว์ทดลอง และได้ดำเนินการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัด YTC-2 ในหนูขาวเพื่อศึกษาความปลอดภัยของสารสกัด YTC-2 ก่อนที่จะนำไปทดลองทางคลินิกต่อไป

สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 120 ตัว เพศเมีย 60 ตัว น้ำหนัก 200 $\pm$15 กรัม เพศผู้ 60 ตัว น้ำหนัก 280 $\pm$ 20 กรัม เลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิ 25 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพันธ์ 60 % ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด และน้ำประปาที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

วิธีการทดลอง

นำสารสกัด YTC-2 มาทำเป็นยาแขวนตะกอนใน 1%tragacanth ในน้ำและปรับปริมาตรให้มีความเข้มข้นต่างๆ เพื่อใช้เป็นยาสำหรับกรอกแก่สัตว์ทดลอง ดำเนินการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันโดยการแบ่งหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ จำนวน 120 ตัว (เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 60 ตัว) โดยวิธีสุ่มออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 24 ตัว (เพศละ 12 ตัว) ประกอบด้วยกลุ่มควบคุม 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่กรอกน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล./กก./วัน กลุ่ม

ควบคุมที่กรอกน้ำยาแขวนตะกอน 1% tragacanth ปริมาตร 10 มล./กก./วัน และกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม กรอก YTC-2 ที่แขวนตะกอนใน 1%tragacanth 2, 20 และ 200 มก./กก./วัน ตามลำดับ ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 28 วัน

ในระหว่างดำเนินการทดลอง บันทึกน้ำหนักตัวทุกวันและปริมาณอาหารที่หนูกิน สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และสังเกตการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ดังนี้ ลักษณะของขนและผิวหนัง ตา จมูก รูทวาร สีของเยื่อเมือก (mucous membrane) อุจจาระ การหายใจ การเดิน การทรงตัว และพฤติกรรม หากมีหนูตายระหว่างการทดลองนำมาผ่าซากชันสูตร

เมื่อสัตว์ทดลองได้รับยาครบกำหนด งดอาหารหนูขาวเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้น ดมสลบหนูด้วยอีเธอร์ก่อนทำการผ่าซาก เจาะเลือดจาก posterior venacava เพื่อนำไป ตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cells, WBC), %neutrophil, %lymphocyte, %monocyte, %erythrocyte, %basophil, จำนวน เม็ดเลือดแดง (red blood cells, RBC), ปริมาณฮีโมโกลบิน (hemoglobin), เปอร์เซนต์ เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), เกล็ดเลือด (platelets), mean corpuscular volume (MCV), meancorpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red celldistribution width (RDW), mean platelet volume (MPV), plateletcrit (PCT), platelet distribution width (PDW), %reticulocyte และ reticulocyte count โดยใช้เครื่อง Automated Hematological Analyzer รุ่น Cell-Dyn 3500 (Abbott, U.S.A.)

การศึกษาทางชีวเคมีคลินิกของซีรั่ม ทำโดยการหาระดับของเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransaminase (ALT), aspartate aminotransminase (AST), pancreatic α-amylase (P-amylase), โปรตีนรวม, อัลบูมิน, บิลิรูบิน, BUN, ครีอะตินิน, กลูโคส, กรดยูริค, ไตร-กลีเซอไรด์, โคเลสเตอรอล, โซเดียม, โปแตสเซียม และ คลอไรด์ โดยใช้เครื่อง Automated Blood Chemistry Analyzer รุ่น Hitachi 912

สำหรับการผ่าซากชันสูตร ได้ตรวจดูพยาธิสภาพที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายใน ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด หลอดลม ต่อมไทรอยด์ หลอดอาหาร กระเพาะ อาหาร ตับ ตับอ่อน ลำไส้ ไต ม้าม กระเพาะปัสสาวะ รังไข่ มดลูก และ อัณฑะ โดย พิจารณาจากตำแหน่ง รูปร่าง ขนาด สี ลักษณะผิว ลักษณะหน้าตัดและองค์ประกอบ

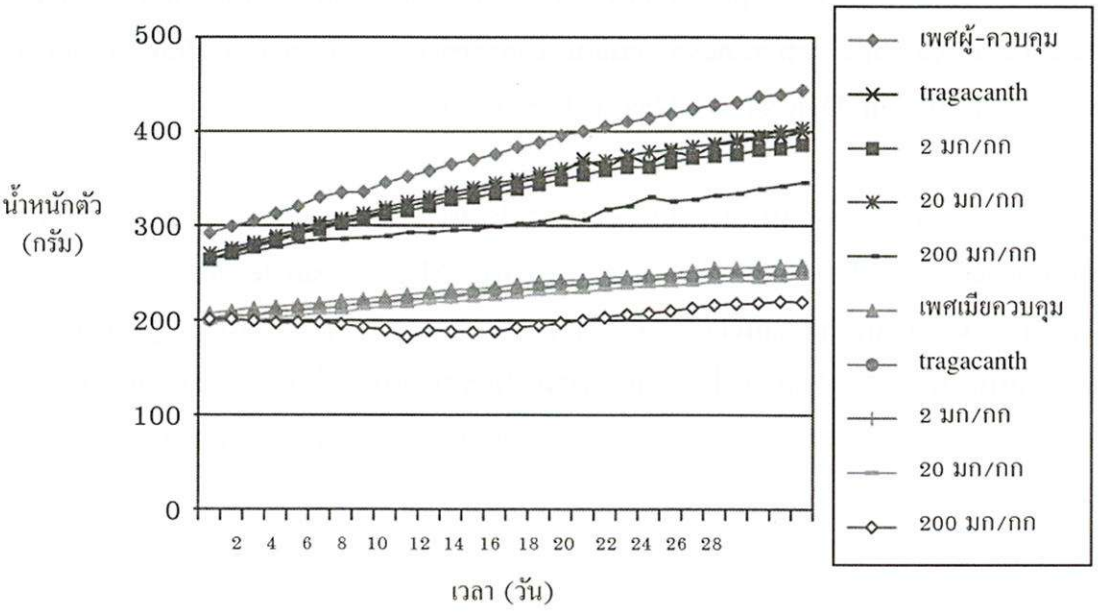
(texture) ของอวัยวะ ชั่งน้ำหนักอวัยวะต่างๆและเก็บอวัยวะใน 10% phosphate buffer formalin นำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทาง จุลกายวิภาคศาสตร์ เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติเชิงพรรณนา การทดสอบสมมติฐานใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan multiple range test ที่ $P<0.05$ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS/PC ผลทางจุลพยาธิวิทยาเปรียบเทียบผลกับกลุ่มควบคุมโดย Fisher exact test ที่ $P<0.05$

ผลการทดสอบ

1. ผลต่อการเจริญเติบโตและการกินอาหาร

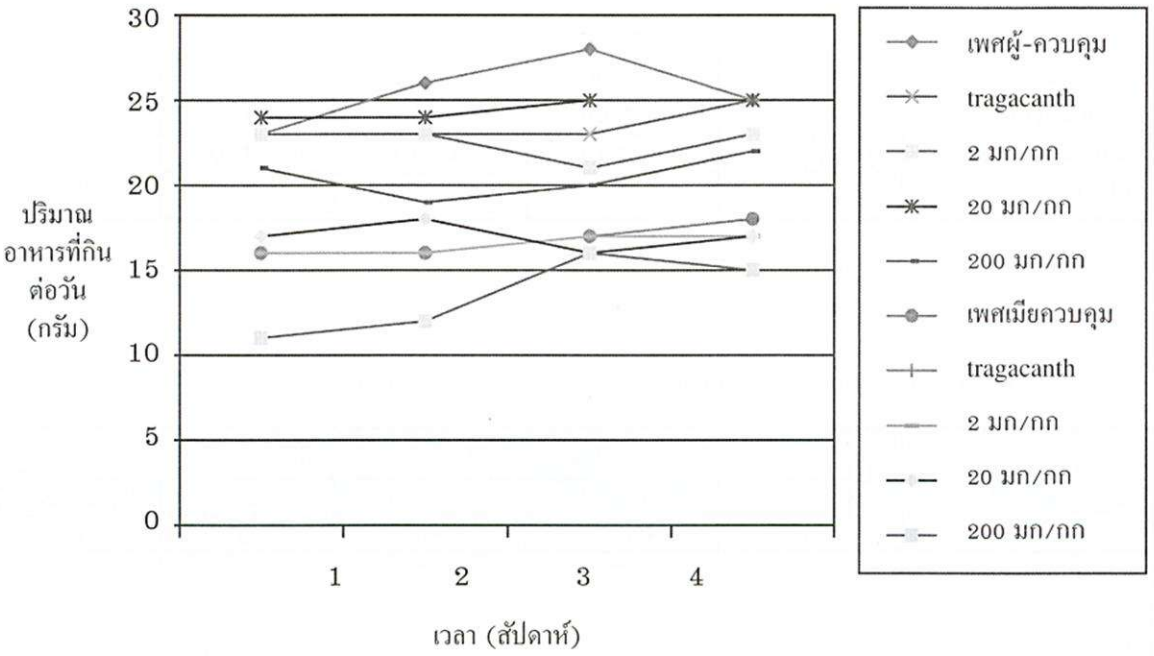
เมื่อป้อนสารสกัดแก่หนูขาวในขนาด 2, 20 และ 200 มก./กก. เป็นเวลานาน 28 วัน พบว่า ในหนูเพศผู้ น้ำหนักเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth และหนูที่ได้รับ YTC-2 ทุกกลุ่มมีค่า ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่เริ่มต้นจนจบการทดลอง แต่หนูเพศผู้ที่ ได้รับสารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน มีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่วันที่ 6 จนสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 การเจริญเติบโตของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยา YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน

ในหนูเพศผู้ การกินอาหารของกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศผู้ที่ได้รับ สารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน จะกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth ตั้งแต่สัปดาห์แรกจนสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 16

น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 20 และ 200 มก./กก./วัน จะน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำตั้งแต่วันแรกจนสิ้นสุดการทดลอง แต่น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 200 มก./กก./วัน น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth ตั้งแต่วันที่ 4 จนสิ้นสุดการทดลอง โดยที่การกินอาหารของหนูเพศเมียกลุ่มนี้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้ tragacanth ตั้งแต่สัปดาห์แรกจนสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 การกินอาหารของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยา YTC-2 เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2. ผลต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะสัตว์ทดลอง

น้ำหนักสัมพัทธ์ของ สมอง หัวใจ ปอด กระเพาะอาหาร ตับ ไตทั้งสองข้าง และกระเพาะปัสสาวะของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดในขนาด 200 มก./กก./วัน สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของ สมอง ปอด ตับ และไตทั้งสองข้าง สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 25 และ 26

ตารางที่ 25 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์และน้ำหนักของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน

Organs	Dose of YTC-2 (mg/kg/day)				
	Control	Tragacanth	2	20	200
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Initial weight (g)	292 ± 13	264 ± 12 *	264 ± 11 *	270 ± 9 *	265 ± 11 *
Final weight (g)	444 ± 20	399 ± 34 *	386 ± 36 *	404 ± 23 *	346 ± 22 *,**
Brain	4.90 ± 0.26	5.12 ± 0.36	5.29 ± 0.44 *	5.02 ± 0.25	5.98 ± 0.35 *,**
Heart	2.75 ± 0.19	2.86 ± 0.20	2.85 ± 0.17	2.89 ± 0.24	3.08 ± 0.23 *,**
Lung	4.10 ± 0.68	4.03 ± 0.31	4.10 ± 0.31	4.13 ± 0.29	4.73 ± 0.47 *,**
Stomach	4.20 ± 0.28	4.26 ± 0.31	4.21 ± 0.36	4.34 ± 0.40	4.55 ± 0.35 *,**
Liver	30.51 ± 2.39	30.62 ± 2.19	30.08 ± 1.83	31.12 ± 1.75	32.67 ± 2.39 *,**
Right Kidney	3.13 ± 0.31	3.12 ± 0.15	3.16 ± 0.18	3.06 ± 0.19	3.59 ± 0.24 *,**
Left Kidney	2.98 ± 0.24	2.94 ± 0.21	3.05 ± 0.27	2.93 ± 0.17	3.49 ± 0.25 *,**
Spleen	2.19 ± 0.26	2.29 ± 0.22	2.22 ± 0.16	2.30 ± 0.29	2.41 ± 0.25 *
Right Testis	6.64 ± 0.61	7.30 ± 0.97 *	7.89 ± 0.77 *	7.40 ± 0.55 *	7.82 ± 0.69 *
Left Testis	6.52 ± 0.69	7.21 ± 0.93 *	7.77 ± 0.61 *	7.07 ± 1.03	7.84 ± 0.61 *
Right adrenal grand	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02
Left adrenal grand	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.03
Bladder	0.25 ± 0.04	0.28 ± 0.07	0.31 ± 0.06 *	0.27 ± 0.04	0.33 ± 0.06 *,**

The values are expressed as mean ± SD.

* significantly different from control group ($p<0.05$).

ตารางที่ 26 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์และน้ำหนักของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน

Organs	Dose of YTC-2 (mg/kg/day)				
	Control	Tragacanth	2	20	200
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Initial weight (g)	207 ± 8	200 ± 10	202 ± 9	197 ± 8 *	201 ± 7
Final weight (g)	258 ± 13	251 ± 15	250 ± 16	245 ± 13	219 ± 16
Brain	7.64 ± 0.33	7.66 ± 0.62	7.59 ± 0.55	7.80 ± 0.46	8.47 ± 0.73 *,**
Heart	3.26 ± 0.26	3.33 ± 0.15	3.27 ± 0.28	3.13 ± 0.29	3.48 ± 0.19 *
Lung	5.11 ± 0.47	5.32 ± 0.40	5.27 ± 0.41	5.05 ± 0.47	6.33 ± 0.49 *,**
Stomach	5.43 ± 0.68	5.46 ± 0.68	5.30 ± 0.67	5.62 ± 0.47	5.66 ± 0.52
Liver	28.34 ± 2.39	27.77 ± 1.73	27.08 ± 2.52	28.62 ± 1.78	30.19 ± 2.15 *,**
Right Kidney	3.25 ± 0.24	3.25 ± 0.17	3.24 ± 0.20	3.23 ± 0.23	3.53 ± 0.19 *,**
Left Kidney	3.16 ± 0.20	3.04 ± 0.18	3.06 ± 0.17	3.06 ± 0.22	3.44 ± 0.21 *,**
Spleen	2.88 ± 0.34	2.87 ± 0.34	2.74 ± 0.37	2.80 ± 0.24	2.87 ± 0.41
Uterus	2.94 ± 1.16	3.43 ± 0.84	3.26 ± 0.80	3.22 ± 0.98	2.82 ± 1.12
Right adrenal gland	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.21 ± 0.05	0.23 ± 0.04
Left adrenal gland	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.05	0.23 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.23 ± 0.04
Bladder	0.33 ± 0.06	0.33 ± 0.06	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.07	0.35 ± 0.09

The values are expressed as mean ± SD.

* significantly different from control group ($p<0.05$).

3. ผลการตรวจทางโลหิตวิทยา

หนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับยา 200 มก./กก./วัน มีค่า mean cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), mean platelet volume (MPV), plateletcrit (PCT), platelet distribution width (PDW), เกล็ดเลือด, และ reticulocyte count ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), จำนวนเม็ดเลือดแดง, ปริมาณฮีโมโกลบิน, จำนวนเม็ดเลือดขาว, และ %lymphocyte มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน มีค่า % neutrophil และ % monocyte สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด ขนาดเดียวกัน มีค่า % eosinophil, % monocyte, % basophil และ % reticulocyte สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 27 และ 28

4. ผลการตรวจซีรั่มทางชีวเคมี

ในหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัด ระดับเอนไซม์ ALP, AST, บิลิรูบิน, BUN, โคเลสเตอรอล, โซเดียม, โปแตสเซียมและคลอไรด์ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 200 มก./กก./วัน มีค่า ALT, P-amylase, โปรตีนรวม และอัลบูมิน สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแต่ ไตรกลีเซอไรด์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 29

ส่วนหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 200 มก./กก./วัน มีค่า ALT, P-amylase และกลูโคส แต่ค่าครีอาตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำและ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 20 มก./กก./วัน มีค่าโปรตีนรวม, กลูโคสและกรดยูริค สูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำและ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ และมีค่าอัลบูมินและไตรกลีเซอไรด์สูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 30

ตารางที่ 27 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of YTC-2 (mg/kg/day)				
	control	tragacanth	2	20	200
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Hematocrit (%)	46.36 ± 2.27	46.60 ± 2.68	46.33 ± 1.67	45.09 ± 2.52	43.23 ± 1.56 *,**
RBC (x10^{6}cells/mm^3)	8.55 ± 0.44	8.60 ± 0.47	8.55 ± 0.37	8.50 ± 0.42	7.92 ± 0.43 *,**
Hemoglobin (g/dl)	15.59 ± 0.49	15.81 ± 0.57	15.61 ± 0.53	15.50 ± 0.50	14.45 ± 0.55 *,**
MCV (μm^3/red cell)	54.28 ± 1.26	54.20 ± 1.69	54.24 ± 1.56	53.03 ± 2.00	54.64 ± 1.50
MCH (pg/red cell)	18.28 ± 0.55	18.42 ± 0.88	18.27 ± 0.61	18.30 ± 0.76	18.28 ± 0.51
MCHC (g/dl RBC)	33.70 ± 1.04	34.03 ± 1.43	33.70 ± 0.80	34.57 ± 2.14	33.45 ± 0.52
WBC (x10^3 cells/mm^3)	5.93 ± 1.20	5.50 ± 0.94	5.12 ± 1.36	5.14 ± 1.38	3.77 ± 0.76 *,**
Neutrophil (%)	13.71 ± 4.53	10.59 ± 3.71	12.62 ± 3.91	12.08 ± 4.67	18.69 ± 8.57 *,**
Eosinophil (%)	1.21 ± 0.41	1.25 ± 0.40	1.00 ± 0.44	1.27 ± 0.53	1.46 ± 0.62
Lymphocyte (%)	81.75 ± 5.58	82.68 ± 4.60	82.78 ± 4.39	82.62 ± 6.71	72.77 ± 8.26 *,**
Monocyte (%)	1.82 ± 1.48	3.46 ± 2.37	2.06 ± 1.67	2.57 ± 2.35	5.53 ± 3.52 *,**
Basophil (%)	1.52 ± 0.47	2.02 ± 0.83	1.56 ± 0.54	1.45 ± 0.36 **	1.56 ± 0.79
Platelet (x10^3 cells/mm^3)	922 ± 130	908 ± 71	917 ± 65	950 ± 62	924 ± 70
PCT (%)	0.90 ± 0.11	0.86 ± 0.15	0.85 ± 0.06	0.87 ± 0.08	0.86 ± 0.08
PDW (%CV)	18.25 ± 0.33	18.21 ± 0.97	18.23 ± 0.41	18.10 ± 0.37	18.04 ± 0.41
MPV (fl/platelet)	9.74 ± 0.48	9.48 ± 1.63	9.33 ± 0.53	9.21 ± 0.55	9.29 ± 0.59
Reticulocyte (%)	2.27 ± 0.36	2.37 ± 0.42	2.20 ± 0.39	2.26 ± 0.37	2.65 ± 0.69
Reticulocyt (k/uL)	192 ± 35	204 ± 39	187 ± 36	195 ± 35	208 ± 49
RDW (%CV)	14.20 ± 0.70	14.51 ± 0.77	14.06 ± 0.83	14.96 ± 1.60	13.86 ± 0.68

The values are expressed as mean ± SD.

* significantly different from control group ($p<0.05$)

ตารางที่ 28 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of YTC-2 (mg/kg/day)				
	control	Tragacanth	2	20	200
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Hematocrit (%)	45.03 ± 1.51	44.74 ± 1.21	43.82 ± 1.08	45.55 ± 1.65	41.87 ± 2.03 *,**
RBC (x 10^6 cells/mm^3)	8.12 ± 0.29	8.15 ± 0.37	7.88 ± 0.25	8.29 ± 0.28	7.56 ± 0.41 *,**
Hemoglobin (g/dl)	14.91 ± 0.44	14.90 ± 0.49	14.62 ± 0.38	15.17 ± 0.71	13.98 ± 0.69 *,**
MCV (μm^3/red cell)	55.48 ± 1.20	54.97 ± 1.85	55.63 ± 1.60	54.98 ± 1.31	55.37 ± 1.12
MCH (pg/red cell)	18.40 ± 0.59	18.32 ± 0.72	18.57 ± 0.74	18.32 ± 0.69	18.50 ± 0.51
MCHC (g/dl RBC)	33.15 ± 0.79	33.32 ± 0.57	33.38 ± 0.78	33.30 ± 0.66	33.42 ± 0.61
WBC (x10^3 cells/mm^3)	4.05 ± 1.28	3.82 ± 1.45	3.12 ± 0.53 *	3.50 ± 0.66	2.85 ± 0.58 *,**
Neutrophil (%)	15.56 ± 7.25	15.46 ± 5.25	16.47 ± 8.43	13.64 ± 6.18	20.41 ± 5.58
Eosinophil (%)	1.52 ± 0.65	1.28 ± 0.53	1.19 ± 0.40	1.55 ± 0.42	1.84 ± 0.59 **
Lymphocyte (%)	79.55 ± 7.93	80.28 ± 5.18	78.04 ± 10.00	80.72 ± 7.77	71.78 ± 8.22 *,**
Monocyte (%)	2.26 ± 2.14	2.02 ± 1.75	3.07 ± 2.42	2.89 ± 2.42	4.46 ± 3.39 **
Basophil (%)	1.10 ± 0.44	0.96 ± 0.29	1.23 ± 0.49	1.20 ± 0.65	1.50 ± 0.53 **
Platelet (x10^3 cells/mm^3)	910 ± 93	950 ± 101	861 ± 99 **	966 ± 111	920 ± 77
PCT (%)	0.83 ± 0.07	0.86 ± 0.09	0.79 ± 0.06	0.88 ± 0.08	0.83 ± 0.08
PDW (%CV)	18.14 ± 0.74	18.07 ± 0.41	18.21 ± 0.53	18.18 ± 0.43	18.10 ± 0.54
MPV (fl/platelet)	9.18 ± 0.85	9.02 ± 0.67	9.22 ± 0.48	9.13 ± 0.39	9.08 ± 0.47
Reticulocyte (%)	4.02 ± 1.15	3.50 ± 0.75	3.58 ± 0.86	3.39 ± 0.97	4.30 ± 0.66 **
Reticulocyte (k/uL)	329 ± 99	290 ± 59	283 ± 69	283 ± 79	323 ± 55
RDW (%CV)	13.52 ± 0.63	13.75 ± 0.80	13.51 ± 0.86	13.61 ± 0.81	13.75 ± 0.81

The values are expressed as mean ± SD.

* significantly different from control group ($p<0.05$).

ตารางที่ 29 ค่าทางชีวเคมีของซีรั่มหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of YTC-2 (mg/kg/day)				
	Control	Tragacanth	2	20	200
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
ALP (U/L)	107 ± 20	106 ± 14	114 ± 16	118 ± 13	112 ± 19
ALT (U/L)	39.58 ± 7.12	40.25 ± 8.59	43.08 ± 12.98	41.25 ± 12.61	53.92 ± 16.33 *,**
AST (U/L)	79.33 ± 5.94	79.25 ± 6.17	82.17 ± 12.90	80.00 ± 13.20	73.00 ± 10.91
P-amylase (U/L)	2034 ± 321	1884 ± 263	2002 ± 304	2006 ± 391	2221 ± 454 **
Total protein (g/dl)	6.32 ± 0.25	6.36 ± 0.26	6.41 ± 0.24	6.48 ± 0.28	6.58 ± 0.21 *,**
Albumin (g/dl)	3.36 ± 0.12	3.43 ± 0.12	3.45 ± 0.10	3.48 ± 0.19	3.49 ± 0.12 *
Bilirubin (mg/dl)	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.02
BUN (mg/dl)	21.31 ± 2.08	20.92 ± 2.59	19.55 ± 2.37	20.98 ± 2.68	19.55 ± 2.14
Creatinine (mg/dl)	0.60 ± 0.03	0.61 ± 0.04	0.58 ± 0.05	0.62 ± 0.04 *	0.58 ± 0.06
Glucose (mg/dl)	175 ± 22	165 ± 25	159 ± 17	161 ± 22	178 ± 23
Uric acid (mg/dl)	1.94 ± 0.59	2.12 ± 0.85	1.71 ± 0.51	1.81 ± 0.51	2.27 ± 1.04
Triglyceride(mg/dl)	129 ± 45	115 ± 28	120 ± 29	138 ± 32	88 ± 27 *,**

Parameters	Dose of YTC-2 (mg/kg/day)				
	Control	Tragacanth	2	20	200
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Cholesterol (mg/dl)	57.56 ± 8.79	61.60 ± 12.44	58.29 ± 4.54	56.68 ± 12.82	60.28 ± 12.24
Na^+(mmol/l)	143 ± 2	143 ± 3	145 ± 3	145 ± 2	14.3 ± 4
K^+(mmol/l)	5.62 ± 0.88	5.67 ± 0.91	5.48 ± 0.72	5.20 ± 0.42	5.45 ± 0.75
Cl^-(mmol/l	115 ± 10	114 ± 11	114 ± 12	116 ± 11	117 ± 13

The values are expressed as mean ± SD.

* significantly different from control group ($p<0.05$).

ตารางที่ 30 ค่าทางชีวเคมีของซีรั่มหนูขาวเพศเมียที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of YTC-2 (mg/kg/day)				
	control	Tragacanth	2	20	200
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
ALP(U/L)	57.58 ± 8.96	54.75 ± 10.49	53.67 ± 9.89	52.08 ± 11.77	53.58 ± 13.77
ALT(U/L)	35.33 ± 6.98	31.67 ± 7.69	34.25 ± 7.92	41.92 ± 11.10	59.08 ± 21.92 *,**
AST(U/L)	73.92 ± 10.08	72.50 ± 12.09	78.17 ± 17.91	72.67 ± 12.88	69.00 ± 18.46
P-amylase(U/L)	914 ± 177	987 ± 227	925 ± 142	1021 ± 218	1297 ± 259 *,**
Total protein (g/dl)	6.18 ± 0.24	6.32 ± 0.29	6.26 ± 0.31	6.55 ± 0.20 *,**	6.23 ± 0.24
Albumin (g/dl)	3.47 ± 0.14	3.55 ± 0.22	3.54 ± 0.18	3.63 ± 0.17 *	3.45 ± 0.13
Bilirubin (mg/dl)	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.09 ± 0.02
BUN (mg/dl)	21.95 ± 2.84	21.80 ± 3.60	20.38 ± 4.33	23.25 ± 3.57	21.78 ± 3.93
Creatinine (mg/dl)	0.60 ± 0.04	0.62 ± 0.07	0.61 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.56 ± 0.04 *,**
Glucose (mg/dl)	121.18 ± 21.65	119.36 ± 11.38	124.24 ± 17.51	141.90 ± 27.92 *,**	141.03 ± 11.75 *,**
Uric acid (mg/dl)	1.28 ± 0.30	1.24 ± 0.30	1.18 ± 0.18	1.77 ± 0.65 *,**	1.40 ± 0.42
Triglyceride (mg/dl)	56.19 ± 23.46	69.27 ± 28.44	65.98 ± 23.81	90.30 ± 34.41 *	63.19 ± 14.71
Cholesterol (mg/dl)	63.33 ± 19.81	70.06 ± 14.01	63.97 ± 13.86	68.54 ± 13.70	72.74 ± 15.80
Na^+ (mmol/l)	144 ± 4	145 ± 2	146 ± 7	145 ± 3	145 ± 8
K^+ (mmol/l)	4.79 ± 0.47	4.85 ± 0.43	5.07 ± 0.39	5.14 ± 1.08	5.05 ± 0.50
Cl^-(mmol/l	118 ± 13	120 ± 11	117 ± 18	119 ± 12	116 ± 19

The values are expressed as mean ± SD.

* significantly different from control group ($p<0.05$).

5. ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

จากการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของ ตับ ไต ม้าม ตับอ่อน ต่อมน้ำลาย ต่อมไทรอยด์ และต่อมหมวกไต พบความผิดปกติในหนูบางกลุ่ม ได้แก่ ตับพบ lymphoid aggregation ในบริเวณ periportal area ในหนูเพศผู้ 2 ใน 12 ตัวที่ได้รับสารสกัด 200 มก./กก./วัน และพบ fatty degeneration ของ adrenal cortex ในหนูเพศผู้กลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มและ

กลุ่มที่ได้สารสกัด 200 มก./กก./วัน ส่วนในหนูเพศเมียพบ tubular cast ในไตในหนูทุกกลุ่ม อัตราการเกิดความผิดปกติดังกล่าวในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 31 ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน

Organs	Microscopic findings	Dose of YTC-2 (mg/kg/day)				
		Control	tragacanth	2	20	200
		n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Liver	Lymphoid aggregated periportal area	NR	NR	NR	NR	2/12
Kidney		NR	NR	NR	NR	NR
Spleen		NR	NR	NR	NR	NR
Pancreas		NR	NR	NR	NR	NR
Salivary gland		NR	NR	NR	NR	NR
Thyroid gland		NR	NR	NR	NR	NR
Adrenal gland	Fatty degeneration of cortex	3/12	1/12	0/12	0/12	3/12

The results are expressed as number of rats with pathological findings / total number of rats examined.
NR = Non-remarkable
*significantly different from control group ($p<0.05$).

ตารางที่ 32 ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะหนูขาวเพศเมียที่ได้รับ YTC-2 เป็นเวลา 28 วัน

Organs	Microscopic findings	Dose of YTC-2 (mg/kg/day)				
		Control	tragacanth	2	20	200
		n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Liver		NR	NR	NR	NR	NR
Kidney	Tubular cast	9/12	8/12	9/12	9/12	7/12
Spleen		NR	NR	NR	NR	NR
Pancreas		NR	NR	NR	NR	NR
Salivary gland		NR	NR	NR	NR	NR
Thyroid gland		NR	NR	NR	NR	NR
Adrenal gland		NR	NR	NR	NR	NR

The results are expressed as number of rats with pathological findings / total number of rats examined.
NR = Non-remarkable
* significantly different from control group ($p<0.05$)

จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัด YTC-2 ในหนูขาวเป็นเวลานาน 28 วัน โดยกรอกสารสกัดขนาด 2, 20 และ 200 มก./กก. พบว่า การกินอาหารและการเจริญเติบโตของหนูเพศผู้และหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 200 มก./กก./วัน ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ ทำให้น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มนี้เมื่อสิ้นสุดการทดลองต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ การที่น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในบางอวัยวะของหนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน มีค่าน้อยกว่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในของหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ น่าจะเนื่องมาจากน้ำหนักตัวในหนูกลุ่มนี้ที่น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ tragacanth จึงทำให้น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์มีค่าสูงกว่า

สารสกัด YTC-2 ในขนาดสูงมีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ดังจะเห็นได้ว่าหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน มีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและ ที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญและต่ำกว่าค่าปกติ ($5\text{-}8.96 \times 10^3$ cells/mm^3) นอกจากนี้ หนูกลุ่มนี้ยังมีค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), จำนวนเม็ดเลือดแดง, ฮีโมโกลบิน, และ%lymphocyte ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ แต่มี %neutrophil สูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำและ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ค่าทางโลหิตวิทยาดังกล่าวยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ[1]

ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน มีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญและต่ำกว่าค่าปกติ ส่วนจำนวนเม็ดเลือดแดง, hematocrit,hemoglobin, %lymphocyte แม้ว่าจะมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญแต่ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ สำหรับ % eosinophil, % monocyte, % basophil และ % reticulocyte มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วย tragacanth แต่ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ[1]

ในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน พบว่ามีค่า ALT และ P-amylase สูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 200 มก./กก./วัน ยังมีค่าโปรตีนรวมสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มเล็กน้อย แต่ค่าไตรกลีเซอไรด์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมแต่ยังอยู่ในช่วงปกติ[2] ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 200 มก./กก./วัน มีค่ากลูโคสสูงกว่าแต่ครีอาตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ค่าดังกล่าวยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ[1] สำหรับค่าโปรตีนรวม กลูโคส และกรดยูริคในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 20 มก./กก./วัน ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญนั้น

เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ[1] และไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่หนูได้รับ รวมทั้งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่พบในหนูเพศเมียเท่านั้น จึงไม่อาจสรุปได้ว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เนื่องมาจากสารสกัด YTC-2

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในของหนูทั้งสองเพศ ได้แก่ ตับ ไต ม้าม ตับอ่อน ต่อมน้ำลาย ต่อมไทรอยด์และต่อมหมวกไต พบว่าอัตราการเกิดความผิดปกติที่พบในบางอวัยวะไม่มีความแตกต่างระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผลการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของ YTC-2 ในหนูขาว

จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของ YTC-2 โดยกรอกสารสกัด YTC-2 ที่เตรียมเป็นยาแขวนตะกอนใน 1% tragacanth แก่หนูขาวในขนาด 2, 20 และ 200 มก./กก./วัน ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 28 วัน ผลการศึกษาในหนูที่ได้รับสารสกัดแต่ละขนาด อาจสรุปได้ดังนี้

ในหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน มีการเจริญเติบโตและการกินอาหารต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญและมีอวัยวะสัมพัทธ์ของสมอง ปอด ตับและไตทั้งสองข้างสูงกว่ากลุ่มควบคุม สำหรับค่าทางโลหิตวิทยาพบว่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), จำนวนเม็ดเลือดแดง, ฮีโมโกลบิน, %lymphocyte และจำนวนเม็ดเลือดขาว มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำและ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าดังกล่าวยกเว้นจำนวนเม็ดเลือดขาวยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ และหนูทั้งสองเพศมีค่าทางชีวเคมีของซีรั่ม ALT และ P-amylase สูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ อัตราการเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ของอวัยวะภายในอื่น ๆ ที่ตรวจพบก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุม

หนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 20 มก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวและการกินอาหารต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำเป็นบางวันแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth และมีน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth ค่าทางโลหิตวิทยาไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งสอง ส่วนค่าทางชีวเคมีของซีรั่ม แม้ว่าค่าโปรตีนรวม กลูโคส และกรดยูริคในหนูเพศเมียจะสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth แต่เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ และไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัด อัตราการเกิด tubular cast ในไตของหนูเพศเมียไม่แตกต่างจากกลุ่ม

ควบคุม หนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับยา 2 มก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวและการกินอาหารต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำเป็นบางวันแต่ไม่แตกต่างจากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth และมีอวัยวะสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth ค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางชีวเคมีของซีรั่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งสอง อัตราการเกิด tubular cast ในไตของหนูเพศเมียไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

จากผลการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันข้างต้นจึงอาจสรุปได้ว่า สารสกัด YTC-2 ที่ให้แก่หนูขาวในขนาด 2 และ 20 มก./กก./วัน เป็นเวลา 28 วัน ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ในขณะที่ สารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน ทำให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง โดยทำให้หนูเจริญเติบโตช้ากว่าและกินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงต่ำกว่าค่าปกติ และทำให้เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), จำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และ %lymphocyte มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ และ สารสกัด YTC-2 ขนาด 200 มก./กก./วัน อาจมีผลต่อการทำงานของตับและตับอ่อน เพราะทำให้ระดับของ ALT และ P-amylase ในซีรั่มเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ไม่พบพยาธิสภาพของอวัยวะทั้งสองที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

1. Semler, D.E., Gad S.C., Chengelis C.P. The Rat. In: Animal Models in Toxicology. Gad S.C. and Chengelis C.P., Eds. Marcel Dekker, Inc., New York 1992, pp. 80-81.
2. Levine, B.S. Animal Clinical Pathology. In: CRC Handbook of Toxicology. Derelanko, M.J. and Hollinger, M.A., Eds. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1995, pp. 522-531.

บทที่ 12
การเตรียมสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ของส่วนสกัดย่อย YTC-2 และการทดสอบฤทธิ์เพิ่มเติม

เย็นจิตร เตชะดำรงสิน วารุณี จิรวัฒนาพงศ์
จารีย์ บันสิทธิ์ อัญชลี จูฑะพุทธิ เครือวัลย์ พลจันทร
วัฒนา อู่วาณิชย์ พนัสดา อิศรางกูร ณ อยุธยา
โชติกา บุญ-หลง สุทธิโชค จงตระกูลศิริ

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้เคยดำเนินการนำยาเตรียมจากสารสกัดสมุนไพร YTC ไปศึกษาวิจัยทางคลินิกเพื่อศึกษาประสิทธิผลของยาจากสารสกัดสมุนไพร YTC ในระยะที่ I/II ในผู้ป่วยเอดส์ที่มี CD4 น้อยกว่า 200 cells/mm^3 จำนวน 30 ราย ณ โรงพยาบาลลำปาง จังหวัดลำปาง แล้วพบว่า ยาดังกล่าวทำให้เกิดอาการข้างเคียง คือทำให้เกิดอาการท้องเสียในผู้ป่วยหลายรายจนทำให้ผู้ป่วยบางรายต้องหยุดใช้ยา ดังนั้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อแยกเอาส่วนสกัดย่อยซึ่งยังแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ในหลอดทดลองได้ดีอยู่ แต่ไม่มีผลเร่งการบีบตัวของทางเดินอาหารในสัตว์ทดลอง คือ ส่วนสกัดย่อย YTC-2 และได้ดำเนินการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของส่วนสกัดย่อยดังกล่าวในหนูขาว ผลการศึกษาสรุปได้ว่า ส่วนสกัดย่อย YTC-2 ที่ให้ทางปาก ในขนาด 2 และ 20 มก./กก./วัน หรือคิดเป็นประมาณ 1 และ 10 เท่าของขนาดที่จะนำไปทดลองทางคลินิก เป็นเวลา 28 วัน ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในหนูขาวทั้งสองเพศ แต่ส่วนสกัดย่อยดังกล่าวในขนาด 200 มก./กก./วัน หรือคิดเป็นประมาณ 100 เท่าของขนาดที่จะทดลองใช้ทางคลินิก ทำให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง โดยทำให้หนูเจริญเติบโตช้ากว่า และกินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม %hematocrit, จำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และ %lymphocyte มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ ขณะที่จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงต่ำกว่าช่วงของค่าปกติ และทำให้ระดับเอนไซม์ ALT และ P-amylase ในซีรั่มเพิ่มขึ้นอย่างไรก็ตาม ไม่พบพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อนำส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-2 มาดำเนินการแยกโดยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase และใช้คลอโรฟอร์ม เอธิลอะซีเตท และเมธานอล เป็น mobile phase จะได้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ YTC-2/1, YTC-2/2, YTC-2/3, YTC-2/4 จนถึง YTC-2/15 รายละเอียดตัวอย่าง และผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 33 และ 34

ตารางที่ 33 รายละเอียดตัวอย่างสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-2 เพื่อการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลอง

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ สารสกัด : PVP-40	ปริมาณตัวยาในตัวอย่าง (%)
1	YTC-2	-	100
2	YTC-2/1	1:9	10
3	YTC-2/2	1:9	10
4	YTC-2/3	1:9	10
5	YTC-2/4	1:9	10
6	YTC-2/5	1:7	12.5
7	YTC-2/6	1:7	12.5
8	YTC-2/7	1:9	10
9	YTC-2 /8	1:4	20
10	YTC-2/9	1:4	20
11	YTC-2/10	1:6	14.29
12	YTC-2/11	1:8	11.11
13	YTC-2/12	1:4	20
14	YTC-2/13	1:3	25
15	YTC-2/14	1:2	33.33
16	YTC-2/15	1:2	33.33

ตารางที่ 34 ผลการทดสอบฤทธิ์ในหลอดทดลองของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ ของส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-2

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV	ฤทธิ์ทำลายเชื้อ HSV	ฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา *Cr. neoformans*
1	YTC	90 % ที่ความเข้มข้น 8.3 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} = 1.18 มคก./มล.	1:57,000	MFC = 1.67 มก./มล.
2	YTC-2	85 % ที่ความเข้มข้น 3.3 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} = 5.84 มคก./มล.	1:115,000	MFC = 6.67 มก./มล.
3	YTC-2/1	NA	NA	NA
4	YTC-2/2	NA	NA	MFC = 2.0 มก./มล.
5	YTC-2/3	84 % ที่ความเข้มข้น 50 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} = 51.89 มคก./มล.	NA	MFC = 2.0 มก./มล.
6	YTC-2/4	NA	1:384,000	MFC = 2.0 มก./มล.
7	YTC-2/5	85 % ที่ความเข้มข้น 3.8 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} = 9.2 มคก./มล.	NA	NA
8	YTC-2/6	90 % ที่ความเข้มข้น 31.3 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} = 19.49 มคก./มล.	NA	MFC = 1.25 มก./มล.
9	YTC-2/7	90 % ที่ความเข้มข้น 6.0 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} = 9.33 มคก./มล.	NA	MFC = 0.5 มก./มล.
10	YTC-2/8	84 % ที่ความเข้มข้น 6.0 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} = 6.99 มคก./มล.	1:192,000	MFC = 0.5 มก./มล.
11	YTC-2/9	90 % ที่ความเข้มข้น 12.0 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} = 8.83 มคก./มล.	1:96,000	MFC = 1.0 มก./มล.
12	YTC-2/10	NA	1:134,400	NA
13	YTC-2/11	NA	1:172,800	NA
14	YTC-2/12	84 % ที่ความเข้มข้น 50.0 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} = 52.28 มคก./มล.	NA	MFC = 4.0 มก./มล.
15	YTC-2/13	NA	NA	NA
16	YTC-2/14	90 % ที่ความเข้มข้น 41.7 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} = 15.1 มคก./มล.	NA	MFC = 6.67 มก./มล.
17	YTC-2/15	NA	NA	NA

หมายเหตุ NA = ไม่แสดงฤทธิ์
MFC = ความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อรา (Minimum Fungicidal Concentration)

จากตารางที่ 34 จะเห็นได้ว่า สารสำคัญชนิดต่างๆ ที่แสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจในส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์ YTC-2 (active fraction) จะกระจายอยู่ในสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified extract) หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง ฤทธิ์ทำลายเชื้อ Herpes Simplex Virus และฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* และยังพบว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง และฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* จะไปในทิศทางเดียวกัน นอกจากนี้ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จำนวนหลายชนิดแสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา และฤทธิ์ทำลายเชื้อ Herpes Simplex ได้แรงมากกว่า YTC-2 (active fraction) อีกด้วย

บทที่ 13

ข้อกำหนดคุณภาพของส่วนสกัดย่อย YTC-2

เย็นจิตร เตชะดำรงสิน จารีย์ บันสิทธิ์
วารุณี จิรวัฒนาพงศ์ วัฒนา อู่วาณิชย์
เครือวัลย์ พลจันทร โชติกา บุญ-หลง

จากการทดลองทางคลินิกในระยะ I/II ในผู้ป่วยเอดส์ พบว่า ยาเตรียมจากสารสกัดสมุนไพร YTC ทำให้เกิดอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ คือ อาการท้องเสียในผู้ป่วยเอดส์ ดังนั้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมและพบว่า ส่วนสกัดย่อย YTC-2 เป็นส่วนสกัดที่น่าจะนำมาใช้ในการต้านเชื้อ HIV โดยมีแนวโน้มว่าจะไม่เกิดฤทธิ์ข้างเคียงที่ทำให้เกิดอาการท้องเสีย (ตารางที่ 23 และ 24) จากแผนภูมิแสดงการเตรียมส่วนสกัดย่อยต่างๆ จากสารสกัดสมุนไพร YTC (รูปที่ 4) และผลการทดสอบฤทธิ์ต่างๆ ในหลอดทดลอง (ตารางที่ 10) พบว่า ฤทธิ์ต่างๆ ที่พบในสารสกัดสมุนไพร YTC นั้น จะเหมือนกับฤทธิ์ที่พบในส่วนสกัดย่อย YTC-1 และ YTC-2 รวมกัน แต่ฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยทั้งสองจะแรงมากกว่าสารสกัดสมุนไพร YTC ทั้งนี้เนื่องมาจาก YTC เป็นสารสกัดหยาบ มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน (complex composition) ซึ่งประกอบด้วยสารออกฤทธิ์หลายตัว และสารร่วมอื่นๆ ที่ไม่แสดงฤทธิ์แต่อาจมีผลต่อฤทธิ์ของยาโดยตรง และหรืออาจมีผลเสริมฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ก็ได้

เมื่อแบ่งส่วนสกัดย่อยที่เตรียมจากสารสกัดสมุนไพร YTC ตัวอย่างเดียวกันออกเป็น 2 กลุ่ม โดยแบ่งกลุ่มตามฤทธิ์ที่พบในหลอดทดลอง คือ กลุ่ม YTC-1 + YTC-2 ซึ่งแสดงฤทธิ์ที่ต้องการ และกลุ่ม YTC-3 + YTC-4 + YTC-5 ซึ่งไม่แสดงฤทธิ์ที่ต้องการ และนำส่วนสกัดย่อยทั้ง 2 กลุ่ม มาศึกษา % GI Transit ในหนูถีบจักร พบว่า ส่วนสกัดย่อยกลุ่ม YTC-1 + YTC-2 (28.3 มก./กก.) ซึ่งเทียบเท่ากับสารสกัด YTC ในขนาด 50 มก./กก. ในหนูถีบจักรมีผลเพิ่ม % GI Transit อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ส่วนสกัดย่อย YTC-3 + YTC-4 + YTC-5 (21.7 มก./กก.) ซึ่งเทียบเท่ากับสารสกัด YTC ในขนาด 50 มก./กก. ไม่มีผลในการเพิ่ม % GI Transit และเมื่อทดลองต่อไปในส่วนสกัดย่อย YTC-1 และ YTC-2 จะพบฤทธิ์ในการเพิ่ม GI Movement เฉพาะในส่วนสกัดย่อย YTC-1 แต่ไม่พบในส่วนสกัดย่อย YTC-2 (ตารางที่ 24)

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อย YTC-1 และ YTC-2 จะพบว่า ส่วนสกัดย่อยทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ HIV และทำลายเชื้อ Herpes Simplex Virus ได้ใกล้เคียงกัน แต่ฤทธิ์ทำลายและฆ่าเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* แตกต่างกัน สำหรับฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกันนั้นจะพบเฉพาะในส่วนสกัดย่อย YTC-1 เท่านั้น (ตารางที่ 10) นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มของสารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดย่อย YTC-1 นั้นมีคุณสมบัติของความมีขั้วใกล้เคียงกัน คือ เฉพาะสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ (semi-purified extract) YTC-1/11, YTC-1/12 และ YTC-1/13 เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ที่ต้องการ ในขณะที่สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดอื่นๆ ไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าว ซึ่งจะเห็นความแตกต่างกันค่อนข้างชัดเจน (ตารางที่ 16) ดังนั้น การจัดทำข้อกำหนดคุณภาพทางเคมีของส่วนสกัดย่อย YTC-1 นั้นจะทำได้ไม่ยากมากนัก สำหรับกลุ่มของสารออกฤทธิ์ในส่วนสกัดย่อย YTC-2 นั้น มีคุณสมบัติของความมีขั้วแตกต่างกันค่อนข้างมาก จากตารางที่ 34 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV มีจำนวน 8 ชนิด สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (1) YTC-2/3 (2) YTC-2/5 + YTC-2/6 + YTC-2/7 + YTC-2/8 + YTC-2/9 (3) YTC-2/12 (4) YTC-2/14 ส่วนสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่แสดงฤทธิ์ทำลายเชื้อ Herpes Simplex Virus มีจำนวน 5 ชนิด แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (1) YTC-2/4 (2) YTC-2/8 + YTC-2/9 + YTC-2/10 + YTC-2/11 สำหรับสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ที่แสดงฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* มีจำนวน 9 ชนิด แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (1) YTC-2/2 + YTC-2/3 + YTC-2/4 (2) YTC-2/6 + YTC-2/7 + YTC-2/8 + YTC-2/9 (3) YTC-2/12 (4) YTC-2/14 จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า มีสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์เพียง 3 ชนิด ได้แก่ YTC-2/1, YTC-2/13 และ YTC-2/15 เท่านั้นที่ไม่แสดงฤทธิ์ใดๆ เลย หรืออาจพูดได้ว่าสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์เกือบทุกชนิดมีความสำคัญต่อคุณภาพของส่วนสกัดย่อย YTC-2 ทั้งสิ้น ดังนั้นการจัดทำข้อกำหนดคุณภาพทางเคมีของส่วนสกัดย่อย YTC-2 นั้นจึงทำได้ยากมาก ไม่สามารถเลือกใช้สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นสารสกัดมาตรฐานหรือเป็น marker ในการเปรียบเทียบได้ เนื่องจากสารออกฤทธิ์มีจำนวนหลายชนิดเพื่อป้องกันการปนปลอมของยา การควบคุมคุณภาพในเบื้องต้นนั้นจะต้องหา TLC fingerprint ของส่วนสกัดย่อย YTC-2 โดยใช้วิธีตรวจสอบหลายวิธีให้สามารถครอบคลุมสารประกอบชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในส่วนสกัดย่อยดังกล่าว อย่างไรก็ตามเพื่อความแม่นยำและให้ได้ข้อกำหนดคุณภาพของส่วนสกัดย่อย YTC-2 ที่ดีและเหมาะสม จำเป็นต้องยึดผลการทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดย่อยดังกล่าวในหลอดทดลองเป็นหลัก และใช้การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีเป็นส่วนเสริม

ข้อกำหนดคุณภาพของส่วนสกัดย่อย YTC-2

1. การทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดย่อย YTC-2 ในหลอดทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของส่วนสกัดย่อย YTC-2 เพื่อยืนยันฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง โดยกำหนดเกณฑ์มาตรฐานไว้ว่า ต้องสามารถยับยั้งไวรัสที่ใช้ทดสอบได้มากกว่า 80%ที่ความเข้มข้นของตัวยาไม่เกิน 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของส่วนสกัดย่อย YTC-2 ด้วยปฏิกริยาสีได้ผลดังนี้

2.1 ตรวจหาสารประเภทสเตียรอยด์ (steroids) โดยทำปฏิกิริยากับ Blue Tetrazolium Reagent[1]

หยด Blue Tetrazolium Reagent ซึ่งเป็นสารละลายผสมของน้ำยา A (0.5% Tetrazolium Blue ในเมธานอล) และน้ำยา B (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 24 กรัม ใน 50% เมธานอล) ในอัตราส่วน 1:2 จำนวน 2-3 หยดลงในสารละลาย YTC-2 ในเอธานอลความเข้มข้น 20 มก./มล. จำนวน 1 มิลลิลิตร สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง

2.2 ตรวจหาสารประเภทไตรเทอร์ปีน (triterpenoids) โดยทำปฏิกิริยากับ Vanillin Sulfuric Acid Reagent[1]

หยด Vanillin Sulfuric Acid Reagent (ละลาย Vanillin 3 กรัมใน absolute ethanol 100 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริคจำนวน 0.5 มิลลิลิตร เตรียมทันทีก่อนใช้) จำนวน 2-3 หยดลงในสารละลาย YTC-2 ในเอธานอลความเข้มข้น 20 มก./มล. จำนวน 1 มิลลิลิตร ต้มบนเครื่องอังไอน้ำสักครู่ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วง

3. การตรวจสอบโดยวิธี Thin-layer chromatography

3.1 น้ำยาตัวอย่าง

ละลายส่วนสกัดย่อย YTC-2 หนัก 0.2 กรัมในเอธานอล 1 มิลลิลิตร

3.2 น้ำยาสารสกัดมาตรฐาน

แยกละลายสารสกัดมาตรฐานดังนี้

- YTC-2/3 และ YTC-2/14 จำนวน 10 มิลลิกรัมในเอธานอล 1 มิลลิลิตร
- YTC-2/8, YTC-2/9 และ YTC-2/12 จำนวน 20 มิลลิกรัมในเอธานอล 1 มิลลิลิตร
- YTC-2/5, YTC-2/6 และ YTC-2/7 จำนวน 30 มิลลิกรัมในเอธานอล 1 มิลลิลิตร

3.3 อุปกรณ์และน้ำยาแยก

3.3.1 แผ่นกระจกฉาบสารดูดซับ (Adsorbent) : Silica gel GF_{254} (Merck) 5 x 10 และ 10 x 10 เซนติเมตร

3.3.2 น้ำยาแยก (Developing solvent)

(1) Chloroform-Ethyl acetate- Acetic acid 80:20:1

(2) Chloroform-Ethyl acetate- Acetic acid 30:20:1

(3) Chloroform-Ethyl acetate- Acetic acid 25:25:1

3.3.3 ถังทำโครมาโตกราฟฟี (Chromatographic tank) แยกใส่น้ำยาแยกแต่ละชนิดลงในถังให้มีความสูงจากก้นถังประมาณ 1 เซนติเมตร ทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาทีก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

3.4 วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) นำน้ำยาตัวอย่าง และน้ำยาสารสกัดมาตรฐานแต่ละชนิดๆ ละ 5 ไมโครลิตร มาแยกแต้มบนแผ่นกระจกฉาบสารดูดซับในแนวระดับเดียวกัน โดยให้ห่างจากขอบล่างของกระจกประมาณ 2 เซนติเมตร และให้มีระยะห่างระหว่างหยดน้ำยาแต่ละชนิดไม่น้อยกว่า 1 เซนติเมตร ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งบนถังทำโครมาโตกราฟฟีที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้น้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวฉาบสูง 8 เซนติเมตร นำแผ่นกระจกออกจากถังทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจสอบโดย

(1) พ่นด้วยน้ำยา Vanillin Phosphoric Acid Reagent (ละลาย Vanillin 1 กรัมในสารละลาย 50% phosphoric acid จำนวน 100 มิลลิลิตร) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นสีชัดเจน (ประมาณ 10 นาที)

(2) พ่นด้วยน้ำยา Vanillin Sulfuric Acid Reagent (ละลาย Vanillin 3 กรัมใน absolute ethanol 100 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริคจำนวน 0.5 มิลลิลิตร เตรียมทันทีก่อนใช้) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นสีชัดเจน (ประมาณ 10 นาที)

(3) พ่นด้วยน้ำยา Blue Tetrazolium A (0.5% Tetrazolium Blue ในเมธานอล) ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วพ่นทับด้วยน้ำยา Blue Tetrazolium B (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 24 กรัม ในสารละลาย 50 % เมธานอล) ที่มากเกินพอ (excess) จนเห็นสีชัดเจน

3.5 ผลการตรวจสอบ

จากการตรวจสอบโดยวิธีดังกล่าวข้างต้น ได้โครมาโตแกรมผิวบางซึ่งจะเห็นตำแหน่งและสีของสารสกัดมาตรฐานชนิดต่างๆ ตรงกับส่วนสกัดย่อย YTC-2 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 35 - 37 และรูปที่ 17 - 19

ตารางที่ 35 ค่า hRf และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่างๆ ในสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/3 และ ส่วนสกัดย่อย YTC-2

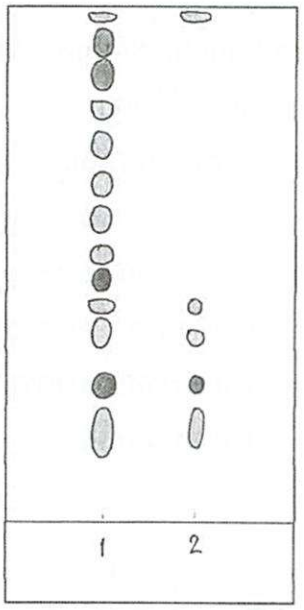
ตำแหน่ง		ค่า hRf	สีที่เกิดขึ้นเมื่อตรวจสอบโดย Vanillin Phosphoric Acid
ส่วนสกัดย่อย YTC-2	สารสกัดมาตรฐาน YTC-2/3		
1	1	15-17	เนื้ออมชมพูเข้ม
2	2	25-28	น้ำตาลเข้ม
3	3	35-36	เนื้ออมชมพูอ่อน
4	4	40-43	ม่วง
5	-	44-45	น้ำตาลไหม้
6	-	50-51	น้ำตาลเหลือง
7	-	58-60	เนื้ออมชมพูเข้ม
8	-	64-67	ม่วงอ่อน
9	-	71-75	ม่วงอ่อน
10	-	78-80	ม่วงอ่อน
11	-	85-89	ม่วงน้ำเงิน
12	-	91-93	ม่วงน้ำเงิน
13	13	94-97	ม่วงน้ำเงิน

ตารางที่ 36 ค่า hRf และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่างๆ ในสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/5,YTC-2/6, YTC-2/7, YTC-2/8, YTC-2/9 และส่วนสกัดย่อย YTC-2

ส่วนสกัดย่อย YTC-2	สารสกัดมาตรฐาน					hRf	สีที่เกิดขึ้นเมื่อตรวจสอบโดย Vanillin Sulfuric Acid
	YTC-2/5	YTC-2/6	YTC-2/7	YTC-2/8	YTC-2/9		
1	-	-	-	-	1	5-7	ม่วงแดง
2	-	2	2	-	-	12-13	เหลือง
3	-	-	3	3	3	20-24	ม่วงน้ำเงิน
4	4	4	4	4	4	27-30	เหลืองอมส้ม
5	5	5	5	5	5	35-36	ม่วงน้ำเงิน
6	-	-	-	-	6	53-55	แดงอมส้ม
7	-	7	7	7	7	62-65	ม่วงน้ำเงิน
8	8	8	8	-	-	67-70	ม่วงน้ำเงิน
9	-	-	-	-	-	74-76	ม่วงน้ำเงิน
10	-	-	10	-	-	80-82	ส้ม
11	-	-	-	-	11	84-86	ม่วง
12	-	-	-	-	12	89-90	ฟ้าอ่อน

ตารางที่ 37 ค่า hRf และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่างๆ ในสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/12, YTC-2/14 และส่วนสกัดย่อย YTC-2

ส่วนสกัดย่อย YTC-2	สารสกัดมาตรฐาน		hRf	สีที่เกิดขึ้นเมื่อตรวจสอบโดย	
	YTC-2/12	YTC-2/14		Blue Tetrazolium Reagent	Vanillin Phosphoric Acid
1	-	1	5-7	-	ม่วงแดง
2	-	2	9-12	-	เหลืองอมน้ำตาล
3	-	3	15-17	-	ม่วงอ่อน
4	-	4	20-24	-	เหลืองอมน้ำตาล
5	-	5	27-28	-	ม่วง
6	-	6	45-47	-	เนื้ออมชมพูเข้ม
7	-	-	54-56	-	ม่วงน้ำเงิน
8	-	-	66-67	-	ม่วงน้ำเงิน
9	9	-	68-70	ม่วงแดง	-
10	-	-	75-76	ม่วง	เนื้ออมชมพูเข้ม
11	11	-	81-84	ม่วง	-
12	-	-	88-89	-	ม่วง
13	13	-	91-93	ม่วงอ่อน	-



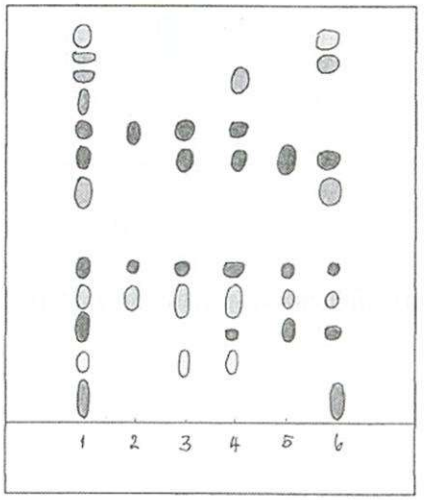
รูปที่ 17 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/3 และส่วนสกัดย่อย YTC-2

น้ำยาแยก Chloroform-Ethyl acetate-Acetic acid 80:20:1

ตรวจสอบโดยพ่นด้วยน้ำยา Vanillin Phosphoric Acid Reagent นำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นสีชัดเจน

1 = น้ำยาส่วนสกัดย่อย YTC-2

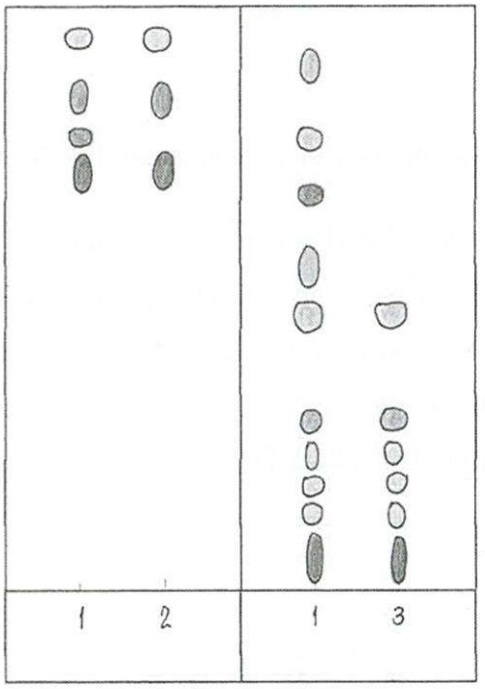
2 = น้ำยาสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/3



รูปที่ 18 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/5, YTC-2/6,YTC-2/7, YTC-2/8, YTC-2/9 และส่วนสกัดย่อย YTC-2

น้ำยาแยก Chloroform-Ethyl acetate-Acetic acid 30:20:1
ตรวจสอบโดยพ่นด้วยน้ำยา Vanillin Sulfuric Acid Reagent นำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นสีชัดเจน

1 = น้ำยาส่วนสกัดย่อย YTC-2
2 = น้ำยาสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/5
3 = น้ำยาสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/6
4 = น้ำยาสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/7
5 = น้ำยาสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/8
6 = น้ำยาสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/9



รูปที่ 19 ลักษณะทางโครมาโตแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/12,YTC-2/14 และส่วนสกัดย่อย YTC-2

น้ำยาแยก Chloroform-Ethyl acetate-Acetic acid 25:25:1

I = ตรวจสอบโดยพ่นด้วยน้ำยา Blue Tetrazolium A ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วพ่นทับด้วยน้ำยา Blue Tetrazolium B ที่มากเกินพอ (excess)

II = ตรวจสอบโดยพ่นด้วยน้ำยา Vanillin Phosphoric Acid Reagent นำไปอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเห็นสีชัดเจน

1 = น้ำยาส่วนสกัดย่อย YTC-2

2 = น้ำยาสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/12

3 = น้ำยาสารสกัดมาตรฐาน YTC-2/14

เอกสารอ้างอิง

1. Jork H, Funk W, Fisher W and Wimmer H. Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods, Volume 1a. VCH, Germany. 1990.

บทที่ 14
การเตรียมยา YTC-2 แคปซูลและการควบคุมคุณภาพ

ปราณี ชวลิตธำรง เย็นจิตร เตชะดำรงสิน
ธีระวุธ ปิ่นทอง วัฒนา อู่วาณิชย์ จารีย์ บันสิทธิ์
อัญชลี จูฑะพุทธิ มาสเกียรติ บุญยฤทธิ์

YTC-2 เป็นส่วนสกัดย่อยคลอโรฟอร์มซึ่งเตรียมจากสารสกัดสมุนไพร YTC (รูปที่ 4) จัดเป็นสารสกัดชนิดพิเศษ (special extract) แตกต่างจากสารสกัดทั่วไป (normalextract) ตรงที่ได้มีการกำจัดสารร่วมที่ไม่ต้องการออกไปแล้ว และมีความเข้มข้นของกลุ่มสารออกฤทธิ์บางชนิดระดับหนึ่ง คลอโรฟอร์มจัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง สามารถสกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้วไปจนถึงองค์ประกอบที่มีขั้วปานกลาง โดยอาศัยหลักการตัวทำละลายจะละลายสารที่มีคุณสมบัติเหมือนกันได้ดี (like dissolve like) ดังนั้นส่วนสกัดย่อย YTC-2 จึงมีองค์ประกอบที่ไม่มีขั้วไปจนถึงองค์ประกอบที่มีขั้วปานกลาง ข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้ทำให้ทราบคุณลักษณะและคุณสมบัติของสารสำคัญในสารสกัดชนิดพิเศษ YTC-2 ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการกำหนดสูตรตำรับที่เหมาะสม และการควบคุมคุณภาพของยา YTC-2 แคปซูล

การเตรียมส่วนสกัดย่อย YTC-2

นำใบสบู่ดำแห้งที่มีคุณภาพได้มาตรฐานตามเกณฑ์กำหนด (ตารางที่ 18) มาบดเป็นผงหยาบ บรรจุลงใน extraction thimble แล้วใส่ใน soxhlet extraction apparatus ใช้เอธานอลเป็นตัวทำละลาย ให้ความร้อนโดยใช้ heating mantle สกัดจนกระทั่งสีของสมุนไพรซีด กรองสารสกัดที่ได้ นำไประเหยแห้งภายใต้แรงดันสุญญากาศโดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดสมุนไพร YTC แห้ง เติมสารละลาย 50 % เมธานอลปริมาตรพอเหมาะ เขย่า จะได้ suspension แล้วนำไปสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ โดยใช้กรวยแยก (separatory funnel) ทิ้งสารละลายชั้นปิโตรเลียมอีเธอร์ ชั้นน้ำนำมาสกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์ม เก็บสารละลายชั้นคลอโรฟอร์มมาระเหยแห้งภายใต้แรงดันสุญญากาศ โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ประมาณ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปดูดด้วยสุญญากาศเพื่อ

เอาตัวทำละลายออกให้หมด จะได้ส่วนสกัดย่อย YTC-2 ตามต้องการ ในการเตรียมยาเพื่อการทดลองทางคลินิกนั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเตรียมยาครั้งเดียว เพื่อให้ผู้ป่วยทุกคนได้รับยาชนิดเดียวกันจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ดังนั้น จึงควรคำนวณปริมาณส่วนสกัดย่อย YTC-2 ที่ต้องการใช้ในการเตรียมยาแคปซูลก่อน แล้วดำเนินการสกัดจนกระทั่งได้ปริมาณส่วนสกัดย่อยดังกล่าวตามต้องการ นำส่วนสกัดย่อย YTC-2 ที่ได้ทั้งหมดมารวมกัน แบ่งส่วนหนึ่งนำไปเตรียมตัวอย่างเพื่อการทดสอบยืนยันประสิทธิภาพของ YTC-2 ในหลอดทดลองและการศึกษาคุณภาพทางเคมี (บทที่ 13) YTC-2 ที่เหลือทั้งหมดเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด แล้วเก็บในตู้เย็นเตรียมพร้อมเพื่อการเตรียมยาแคปซูล YTC-2 ต่อไป

ส่วนประกอบของยาแคปซูล

ใน 1 แคปซูล ประกอบด้วยส่วนสกัดย่อย YTC-2 หนัก 35 มิลลิกรัม

การควบคุมคุณภาพของยา YTC-2 แคปซูล

ยา YTC-2 แคปซูล เป็นผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร ซึ่งเตรียมจากสารสกัดชนิดพิเศษ โดยได้มีการควบคุมการผลิตทุกขั้นตอน ตั้งแต่วัตถุดิบสมุนไพรที่นำมาใช้ การเตรียมและการควบคุมคุณภาพของส่วนสกัดย่อย YTC-2 (บทที่ 13) และกรรมวิธีการผลิตยา YTC-2 แคปซูล สำหรับการควบคุมคุณภาพของยา YTC-2 แคปซูลนั้น ได้ดำเนินการตามมาตรฐานสากล และมาตรฐานตามตำรายาที่รัฐมนตรีกระทรวงสาธารณสุขประกาศ เช่นเดียวกับการควบคุมคุณภาพของยา YTC แคปซูล (บทที่ 8) รายละเอียดผลการวิเคราะห์คุณภาพของยา YTC-2 แคปซูล ดังแสดงในตารางที่ 38

ตารางที่ 38 ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของยา YTC-2 แคปซูลเพื่อการทดลองทางคลินิก

ลำดับที่	รายการวิเคราะห์	เกณฑ์กำหนด	ผลวิเคราะห์
1	การตรวจลักษณะภายนอก	แคปซูลเบอร์ 2 สีเขียวเข้ม มีฉลากยาแจ้งว่า ยาจากสารสกัด YTC-2 (35 มก./แคปซูล) ขนาดบรรจุแคปซูลละ 350 มก.	แคปซูลเบอร์ 2 สีเขียวเข้ม ภายในบรรจุผงละเอียดสีเขียวปนเทา น้ำหนักเฉลี่ยแคปซูลละ 353.9 มก. มี YTC-2 เฉลี่ยแคปซูลละ 35.4 มก.
2	การตรวจเอกลักษณ์ทางเคมี	ให้ TLC fingerprint เหมือนของส่วนสกัด ย่อย YTC - 2	ให้ TLC fingerprint เหมือนของส่วนสกัดย่อย YTC -2
3	การทดสอบประสิทธิภาพของยาในหลอดทดลอง เพื่อยืนยันฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV	สามารถยับยั้งเชื้อ HIV ได้ $\geq$ 80 % ที่ความเข้มข้นของตัวยา $\leq$ 5 มคก./มล.	ยับยั้งเชื้อ HIV ได้ 85 % ที่ความเข้มข้นของตัวยา 1.2 มคก./มล. โดยมีค่า IC_{50} < 0.0017 มก./มล.
4	การผันแปรของน้ำหนักยา (%)	$\pm$ 15	$\pm$ 5.82
5	การแตกกระจายตัว (นาที)	$\leq$ 30	15
6	การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ *	(1) ในยาเตรียมจากสมุนไพร 1 กรัม กำหนดให้มี - แบคทีเรียที่ชอบอากาศ $\leq 5.0 \times 10^4$ - แบคทีเรียที่ชอบอาศัยในลำไส้ $\leq 5.0 \times 10^2$ - ยีสต์และรา $\leq 5.0 \times 10^2$ - ต้องไม่พบแบคทีเรียชนิดอี-โคไลชนิดซูโดโมแนส แอรูจิโนซา และ ชนิดสแตฟฟิโลคอคคัส ออเรียส (2) ในยาเตรียมจากสมุนไพร 10 กรัม ต้องปราศจากเชื้อแบคทีเรียชนิดซาลโมเนลลา	เข้ามาตรฐานตามเกณฑ์ที่กำหนด
7	ปริมาณสารสกัดด้วยเอธานอล(%)	$\geq$ 8.5	10.00

หมายเหตุ * เนื่องจากยา YTC แคปซูลเป็นยาเตรียมจากสารสกัดสมุนไพร การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ จึงใช้เกณฑ์กำหนดของยาเตรียมจากสมุนไพรสำหรับรับประทาน (ข้อ 6.3)

การศึกษาความคงสภาพ (Stability Test) ของตัวยา

จากการศึกษาความคงสภาพของตัวยาทั้งในรูปสารสกัดสมุนไพร YTC-2 และในรูปผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพร YTC-2 แคปซูล โดยการทดสอบยืนยันฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง และการตรวจสอบ TLC fingerprint พบว่า ส่วนสกัดย่อย YTC-2 ที่เก็บไว้ในตู้เย็น และยา YTC-2 แคปซูลที่เก็บในขวดสีชามีฝาปิดมิดชิดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 เดือน ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ HIV ในหลอดทดลองได้เหมือนเดิม รวมทั้งมีองค์ประกอบทางเคมีไม่เปลี่ยนแปลง จึงสามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า ส่วนสกัดย่อย YTC-2 และยา YTC-2 แคปซูลมีอายุการเก็บได้ไม่น้อยกว่า 2 ปี 6 เดือน

บทที่ 15

การศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัด YTC-2 ในการรักษาโรคติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์

น.พ.ไพจิตร์ วราชิต
น.พ.สมชาย แสงกิจพร
น.พ.วิสุทธิ์ สุขีไพศาลเจริญ

สรุปย่อโครงการวิจัยทางคลินิก

จากผลการทดลองทางห้องปฏิบัติการของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่าสารสกัดสมุนไพร YTC มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ HIV, Herpes Simplex Virus และ Varicella Zoster Virus รวมทั้งสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนได้ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้เคยดำเนินการทดลองทางคลินิกเพื่อศึกษาประสิทธิผลของยาจากสารสกัดสมุนไพร YTC ในระยะที่ I/II ในผู้ป่วยเอดส์ที่มี CD4 น้อยกว่า 200 cells/mm^3 จำนวน 30 รายที่โรงพยาบาลลำปางเมื่อปีงบประมาณ 2541 พบว่ายาจากสมุนไพร YTC มีฤทธิ์ข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ คือ ทำให้ผู้ป่วยหลายรายมีอาการท้องเดิน และบางรายต้องหยุดใช้ยาเนื่องจากฤทธิ์ข้างเคียงดังกล่าว

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้นำสารสกัดสมุนไพร YTC มาแยกออกเป็น 5 ส่วนสกัดย่อย แล้วทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV-1 ในหลอดทดลองและฤทธิ์กระตุ้น GI motility ในหนูถีบจักร พบว่า สารสกัด YTC-2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV-1 แต่ไม่เพิ่ม GI motility ดังนั้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้ทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดสมุนไพร YTC-2 ในหนูขาว เพื่อให้ทราบข้อมูลด้านความปลอดภัยของยา YTC-2 ในสัตว์ทดลองก่อนที่จะขออนุมัติดำเนินการวิจัยทางคลินิกเพื่อประเมินประสิทธิผลของยา YTC-2 ต่อไป

ผลการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัด YTC-2 ในหนูขาวพบว่าสารสกัด YTC-2 ที่ให้ทางปากในขนาด 2 และ 20 มก./กก./วัน หรือคิดเป็นประมาณ 1 และ 10 เท่าของขนาดที่จะนำมาทดลองใช้ทางคลินิก เป็นเวลา 28 วัน ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในหนูขาวทั้งสองเพศ แต่สารสกัดในขนาด 200 มก./กก./วัน หรือคิดเป็นประมาณ 100 เท่าของขนาดที่จะทดลองใช้ทางคลินิก ทำให้เกิดพิษในสัตว์ทดลอง โดยทำให้หนูเจริญเติบโตช้ากว่าและกินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม % hematocrit, จำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และ % lymphocyte มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ ขณะ

ที่จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงต่ำกว่าช่วงของค่าปกติ และทำให้ระดับเอนไซม์ ALT และ P-amylase ในซีรั่มเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ไม่พบพยาธิสภาพของตับและตับอ่อนในหนูกลุ่มนี้

โครงการนี้จะศึกษาประสิทธิผลของสารสกัด YTC-2 ในขนาด 35-50 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง นาน 3 เดือนในผู้ป่วยเอดส์ที่มี CD4 มากกว่า 200 cells/mm^3 จำนวน 30 ราย โดยมี รูปแบบการวิจัยเป็นแบบ Phase I / II Clinical Trial และกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยและเกณฑ์การเลิกจากการศึกษาผู้ป่วยอย่างชัดเจน การศึกษาใช้ระยะเวลาทั้งสิ้น 7 เดือน โดยในสองเดือนแรกเป็นขั้นการเตรียมการและเตรียมระบบการส่งต่อสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ และการตรวจคัดกรองผู้ป่วยตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย ส่วนระยะ 5 เดือนต่อมาเป็นการศึกษาวิจัยทางคลินิก ซึ่งประกอบด้วยการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการทุก 2 สัปดาห์เป็นเวลา 3 เดือนเพื่อประเมินผลการรักษาและความปลอดภัยของสารสกัด YTC-2 ในระหว่างได้รับยา และหลังหยุดยาแล้ว เดือนละครั้งอีก 2 เดือน หลังจากนั้นจะได้วิเคราะห์ผลการรักษา และสรุปเพื่อนำเสนอต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาประสิทธิผล (efficacy) และความปลอดภัยเบื้องต้นของสารสกัด YTC-2 ในการรักษาโรค ติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์

สถานที่ศึกษาวิจัยและระยะเวลาศึกษาวิจัย

สถานที่ศึกษา โรงพยาบาลคณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ระยะเวลาศึกษา ประมาณ 7 เดือน

แผนการวิจัย

1. รูปแบบการวิจัย : Phase I / II Clinical Trial

2. เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้ารับการศึกษา (Inclusion Criteria)
   - เพศชายหรือเพศหญิง
   - อายุ 20 - 50 ปี
   - ตรวจเลือดพบ anti - HIV antibody
   - มีปริมาณของ HIV RNA concentrations (HIV viral load) ในพลาสมามากกว่า 20,000 copies/ml.
   - มีค่า CD4 มากกว่า 200-700 cells/mm^3

- มี Karnofski Performance Score (KPS) 70 คะแนน หรือมากกว่า (ดูในภาคผนวก)
- ยินยอมเข้ารับการศึกษาทดลองโดยสมัครใจ

ผู้ป่วยที่เข้าโครงการจะมีทะเบียนประวัติแยกต่างหากและเก็บไว้เป็นความลับ

3. เกณฑ์การไม่รับผู้ป่วยเข้าสู่การศึกษา (Exclusion Criteria)
   - หญิงตั้งครรภ์หรืออยู่ระหว่างการให้นมบุตร
   - แพ้ยาในกลุ่ม sulfonamide
   - กำลังได้รับการรักษาหรือคาดว่าจะได้รับการรักษาด้วยยาต้าน HIV ในระยะเวลา 6 เดือน เช่น zidovudine, ddl , ddC, protease inhibitor เป็นต้น
   - คาดว่าจะมีชีวิตอยู่ไม่เกิน 6 เดือน
   - ไม่สามารถรับประทานยาเม็ดได้
   - ไม่สามารถมารับการติดต่อรักษาสม่ำเสมอได้ภายใน 6 เดือน
   - มีอาการ และอาการแสดงที่ชัดเจนของการติดเชื้อวัณโรค หรือ การติดเชื้อ *Cryptococcus* และจำเป็นต้องได้รับการรักษาวัณโรค และ/หรือ การติดเชื้อ *Cryptococcus*

4. จำนวนประชากรที่ศึกษา

   จากสมมติฐานของการวิจัยที่ว่าปริมาณของ HIV viral load ในพลาสมาของผู้ป่วยก่อนได้รับการรักษาด้วยสารสกัด YTC-2 มีปริมาณเฉลี่ย $\pm$ ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard deviation) เป็น 25,000 $\pm$ 5,000 copies/ml และถ้าสารสกัด YTC-2 มีประสิทธิผลก็ควรลดปริมาณ HIV viral load ลงได้เหลือประมาณ 15,000 $\pm$ 5,000 copies/ml โดยยอมให้มีความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 ร้อยละ 5 และความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 ร้อยละ 20 ดังนั้นจำนวนประชากรที่ต้องการในการศึกษานี้ประมาณ 30 คน

5. เกณฑ์การให้เลิกจากการศึกษา (Discontinuation Criteria)
   - มีอาการ อาการแสดงที่รุนแรงโดยอาการ และ อาการแสดงดังกล่าวน่าจะเป็นพิษหรือผลข้างเคียงจากสารสกัด YTC-2
   - ผู้ป่วยไม่สมัครใจที่จะรับการศึกษาต่อไป

6. ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

6.1 ผู้ป่วยที่มีเกณฑ์ดังกล่าวข้างต้นครบถ้วนจะได้รับการซักประวัติ การตรวจร่างกาย ถ่ายภาพรังสีทรวงอก (Chest X-Ray, CXR) ตรวจปัสสาวะ (Urinalysis, UA) และเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ ปริมาณ 20 มล. เพื่อตรวจหา HIV viral load, CD4, Complete Blood Count (CBC), fasting blood sugar (FBS), BUN, creatinine, electrolytes, SGOT, SGPT, bilirubin, albumin, globulin, alkaline phosphatase, amylase และ urine pregnancy test ในผู้ป่วยเพศหญิง

6.2 ผู้ป่วยจะได้รับการรักษา ดังนี้

- ยา co-trimoxazole ขนาด 480 มก. รับประทานวันละครั้ง
- สารสกัด YTC-2 ครั้งละ 1 แคปซูล (แคปซูลละ35-50 มิลลิกรัม) วันละ 3 ครั้ง หลังอาหารเช้า กลางวัน และเย็น ติดต่อกันนาน 3 เดือน
- ยาอื่น ๆ ตามแต่ปัญหาและความจำเป็นของผู้ป่วยแต่ละราย

6.3 ผู้ป่วยหญิงจะได้รับคำแนะนำให้ป้องกันการตั้งครรภ์ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น ฉีดยา ฝังยาคุมกำเนิด เป็นต้น ในระหว่างที่เข้าร่วมโครงการนี้เป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือน

6.4 ผู้ป่วยจะได้รับคำแนะนำให้หลีกเลี่ยงการใช้ยาอื่น ๆ นอกเหนือจากที่ได้รับจากผู้วิจัยและจะได้รับคำแนะนำให้กินยาที่ได้รับจากผู้วิจัยอย่างสม่ำเสมอ และกลับมารับการติดตามผลการรักษาตามนัดทุกครั้ง และกลับมาพบผู้วิจัยทุกครั้งที่มีปัญหา หรือความผิดปกติใด ๆ

6.5 ผู้ป่วยจะได้รับการติดตามผลการรักษาทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 3 เดือน การติดตามผลการรักษาแต่ละครั้ง ผู้ป่วยจะได้รับการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และตรวจทางห้องปฏิบัติการ รวมทั้งได้ pre-และ post-treatment counseling ด้วย

สัปดาห์ที่	การปฏิบัติ
2	ซักประวัติ ตรวจร่างกาย CBC, UA, FBS, BUN, Creatinine, electrolytes, SGOT, SGPT, Bilirubin, alkaline phosphatase, albumin, globulin, amylase, HIV viral load
4	เหมือนสัปดาห์ที่ 2 + CD4
6	เหมือนสัปดาห์ที่ 2
8	เหมือนสัปดาห์ที่ 2 + CD4
10	เหมือนสัปดาห์ที่ 2
12	เหมือนสัปดาห์ที่ 2 + CD4 + CXR
16	เหมือนสัปดาห์ที่ 2
20	เหมือนสัปดาห์ที่ 2 + CD4

รวมทั้งจะมีการตรวจสอบจำนวนสารสกัด YTC-2 ที่ผู้ป่วยได้รับทุกครั้งที่ผู้ป่วยมารับการติดตามผลสำหรับผู้ป่วยหญิงจะได้รับการตรวจ urine pregnancy test ทุกเดือน

6.6 ระหว่างการศึกษาเพื่อประเมินผลการรักษาในระยะเวลา 3 เดือน ถ้าผู้ป่วยมีปัญหาใดๆ สามารถกลับมาหาแพทย์และผู้วิจัยได้ตลอดเวลา ในการตรวจผู้ป่วยแต่ละครั้งจะดำเนินการเหมือนการติดตามผู้ป่วยตามนัด และตรวจรักษาเพิ่มเติมตามปัญหาของผู้ป่วย

6.7 การวิเคราะห์ข้อมูลผลการรักษา

6.7.1 Primary outcome โดยเปรียบเทียบปริมาณของ HIV viral load ระหว่างก่อนการรักษา และภายหลังการรักษาในสัปดาห์ที่ 2 ถึง 12 โดยใช้สถิติ ANOVA (Analysis of Variance)

6.7.2 Secondary outcome

- KPS ก่อนและหลังการรักษา
- อุบัติการของ Opportunistic infections
- จำนวนเซลล์ CD4 ก่อนและหลังการรักษา
- พิษและผลข้างเคียงจากการรักษาโดยประเมินจากการสอบถาม การตรวจร่างกาย และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ
- ความพึงพอใจของผู้ป่วยต่อการรักษาโดยการสอบถาม

ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV หรือโรคเอดส์ส่วนใหญ่ในประเทศไทยในปัจจุบันมิได้รับการรักษาด้วยยาต้าน HIV แม้ว่าจะมีผลงานวิจัยที่แสดงว่าการใช้ยาต้าน HIV หลาย ๆ ขนาน (ยากลุ่มที่ต้าน reverse transcriptase 2 ขนานร่วมกับ protease inhibitor 1 ขนาน) จะทำให้ปริมาณของเชื้อ HIV ในเลือดลดลงได้มาก ลดโอกาสเกิดการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infections) และผู้ป่วยอาจมีชีวิตยืนยาวขึ้น ตามคำแนะนำมาตรฐานการรักษาของผู้เชี่ยวชาญโรคเอดส์(1) ก็ตาม แต่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV หรือโรคเอดส์ส่วนใหญ่ในประเทศไทยก็มิได้รับการรักษาตามมาตรฐานที่ได้แนะนำไว้ เนื่องจากผู้ป่วยไม่สามารถรับภาระค่าใช้จ่ายได้ และรัฐบาลก็ไม่สามารถรับภาระส่วนนี้ได้เช่นกัน (ค่ายาประมาณเดือนละ 20,000 บาท) การวิจัยนี้มุ่งศึกษากลุ่มผู้ป่วยที่จะไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้าน HIV โดยจะไม่นำผู้ป่วยที่ได้รับหรือจะได้รับยาต้าน HIV มาศึกษา ดังนั้นผู้ป่วยที่นำมาศึกษาอาจจะได้ประโยชน์จากสารสกัด YTC-2 ถ้าสารสกัดดังกล่าวมีประสิทธิผลในการรักษาโรค แต่ผู้ป่วยก็จะต้องเจ็บปวดจากการเจาะเลือดอย่างน้อย 9 ครั้ง เสียเวลาในการกลับมารับการตรวจรักษาและติดตามผลการรักษา และอาจจะเสี่ยงต่อพิษและผลข้างเคียงจากสารสกัดสมุนไพรได้ อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้ทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดดังกล่าวแล้ว และนำมาศึกษาเมื่อผลการศึกษาพบว่ามีความปลอดภัย

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้จะได้รับการอธิบายถึงวัตถุประสงค์ วิธีการศึกษา ผลดี-ผลเสียที่อาจจะเกิดขึ้น และแนวทางการแก้ไขและความรับผิดชอบของผู้วิจัยจนผู้ป่วยเข้าใจและหมดข้อสงสัย และยินยอมเข้าร่วมในการศึกษาโดยสมัครใจโดยเซ็นชื่อลงในใบยินยอมดังต่อไปนี้

งบประมาณและแหล่งทุน

โครงการวิจัยนี้ได้รับงบประมาณหมวดค่าตอบแทน ใช้สอย และวัสดุ 1,800,000 บาท (หนึ่งล้านแปดแสนบาทถ้วน) จากเงินงบประมาณหมวดรายจ่ายอื่น (โครงการเร่งรัดวิจัยสมุนไพรต้านเอดส์) ของงานวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาประสิทธิผล (efficacy) และความปลอดภัยเบื้องต้นของสารสกัด YTC-2 ในการรักษาโรคติดเชื้อ Human Immunodefiency Virus (HIV) และโรคเอดส์ ณ โรงพยาบาลคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น สรุปโดยสังเขปได้ ดังนี้

Demographic data

อาสาสมัครทั้งหมด 31 คน มาติดตามผลการรักษาไม่ครบ 12 สัปดาห์ จำนวน 2 คน ทำให้มีประชากรศึกษาทั้งหมด 29 คน มีชาย 9 คน และหญิง 20 คน คิดเป็นสัดส่วน 20 : 9 = 2.22 : 1 ทั้งหมดมีอายุระหว่าง 20-41 ปี อายุเฉลี่ย (mean) = 28.9 ปี ช่วงกึ่งกลางหรือมัธยฐาน (median) = 29 และอายุที่พบมากที่สุด (mode) = 30 ปี ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 5.43 ปี และค่า variance = 29.45 อาชีพของประชากรศึกษาคือ ทำนา (9), รับจ้าง (9), ค้าขาย (5), แม่บ้าน (2), นักเรียน (2), ช่างเสริมสวย และรับราชการ (อย่างละ 1) ในประเด็นนี้ อาชีพทำนาและรับจ้างมีมากที่สุดคือ อย่างละ 9 ราย (29%) ซึ่งแสดงถึงโรคระบาดในหมู่ประชากรมีการศึกษาต่ำ ทำให้ไม่มีการป้องกัน อาสาสมัครทั้งหมดมาจากจังหวัดใกล้เคียงในภาคอีสาน คือ ขอนแก่น (9), อุบลราชธานี (4), กาฬสินธุ์ (3), นครราชสีมา, ชัยภูมิ, ร้อยเอ็ด และหนองบัวลำภู (2), และสระแก้ว,นครศรีธรรมราช และมหาสารคาม (อย่างละ 1 ราย) มีสภาพสมรสคือ สมรส (15), ม่าย (9) และโสด (5) มีระดับการศึกษาดังนี้ ประถมศึกษา (15, 48%), ป.6 ม.6 (7, 23%), ปวส. ปวช. (4, 13%) และอื่นๆ (3, 9.7%) และมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ (risk factors) คือ heterosexual (25, 81%), homosexual (1, 3.2%) และอื่นๆ (2, 6.4%) รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 39

ตารางที่ 39 แสดงลักษณะประชากรศึกษาของสารสกัด YTC-2

ประชากรศึกษาทั้งหมด	29
อัตราส่วน ชาย : หญิง	20 : 9 = 2.22 : 1
ช่วงอายุประชากรศึกษา (range)	20-41
อายุเฉลี่ย (mean)	28.9
อายุกึ่งกลาง (มัธยฐาน)(median)	29
อายุที่พบบ่อย (mode)	30
ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)	5.43
Variance	29.45
Heterosexual	25 (81 %)
Homosexual	1 (3.2 %)
อื่นๆ	2 (6.4 %)

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. Primary outcomes : วัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณไวรัสในเลือดเปรียบเทียบก่อนและหลังการรักษา และภายหลังการรักษาในสัปดาห์ที่ 2 ถึง 12 โดยใช้สถิติ ANOVA (analysis of variance)
2. Secondary outcomes โดยดูเปรียบเทียบ
   - KSP ก่อนและหลังการรักษา
   - อุบัติการของ Opportunistic infections
   - จำนวนเซลล์ CD4 ก่อนและหลังรักษา
   - พิษและผลข้างเคียงจากการรักษาโดยประเมินจากการสอบถาม และการตรวจร่างกาย และผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ
   - ความพึงพอใจของผู้ป่วยต่อการรักษาโดยการสอบถาม

Primary outcome measurement

ปริมาณไวรัสในเลือดเปรียบเทียบก่อนและหลังการรักษา

1. การวัดปริมาณไวรัสทุก 2 สัปดาห์หาความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการรักษา พบว่า ในภาพรวม ไม่พบความแตกต่างเป็นนัยยะสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.089) ในสัปดาห์ที่ 2 และ 6 ไม่พบความแตกต่างเป็นนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ดี ในสัปดาห์ที่ 4, 8, 10 และ 12 ระดับปริมาณไวรัสในเลือดหลังการรักษาด้วยยา YTC-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. เนื่องจากพบว่าการกระจายของค่า viral load ไม่เป็นแบบปกติ (normal distribution) จึงต้องใช้การทดสอบแบบ Wilcoxon Sign Tests เปรียบเทียบค่า viral load ก่อน และหลังการรักษา ผลที่ได้คือ ค่า viral load เพิ่มขึ้น ดังนี้
   - ก่อนให้การรักษา ค่ามัธยฐาน = 76,161.1 (percentile 25 และ 75 = 14,966.75 และ 69,189.25 ตามลำดับ)
   - กรณีคิดพื้นที่ทั้งหมด ค่ามัธยฐาน = 76,161.1 (percentile 25 และ 75 = 32,903.82 และ 143,864.89 ตามลำดับ) ค่า p-value = 0.001

- กรณีไม่คิดพื้นที่สัปดาห์ที่ 2 ค่ามัธยฐาน = 58,746.45 (percentile 25 และ75=30,001.95 และ 137,612.64 ตามลำดับ) ค่า p-value = 0.004

3. เนื่องจากการวัดระดับปริมาณไวรัสมีความแปรปรวนมาก อย่างไรก็ตามจะไม่เกิน 3 เท่า หรือ 0.5 log10 และการใช้ยาต้านไวรัสพบว่า ไวรัสสามารถดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นในกรณีที่ใช้ยาต้านไวรัสแล้วระดับปริมาณไวรัสลดลงมากกว่า 3 เท่า ภายใน 4 สัปดาห์ถือว่ายานั้นสามารถใช้ต้านไวรัสได้ โดยหลักการนี้ จึงแจงนับเอาโดยตรง พบว่า มีจำนวนผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา YTC-2 เพียงรายเดียว เท่านั้นคือ 1/28 ราย (ผู้ป่วยร่วมโครงการทั้งหมดมี 31 ราย ไม่มาติดตามผล 2 ราย และมี 1 รายต้องตัดออกเนื่องจากมีจำนวนไวรัสในเลือดครั้งแรกน้อยกว่า 5,000 copies/ml ซึ่งการวัดอาจคลาดเคลื่อนได้)

ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ยา YTC-2 ไม่ให้ผลการรักษาโดยพบว่า หลังได้ยา YTC-2 แล้ว ปริมาณไวรัสในเลือดหลังการรักษามีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเทียบกับก่อนการรักษาอย่างเป็น นัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ดี การทดลองนี้ไม่มีกลุ่มควบคุม ดังนั้น ยา YTC-2 อาจสามารถ กดการสร้างไวรัสได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม (ทั้งสองกลุ่มมีปริมาณไวรัสในเลือดเพิ่มขึ้น แต่กลุ่มได้ ยา YTC-2 มีระดับปริมาณไวรัสเพิ่มขึ้นน้อยกว่า)

Secondary outcomes

ค่า Karnofsky Performance Score

พบว่าไม่แตกต่างกันระหว่างก่อนและหลังการรักษา (100 คะแนนเต็ม)

อุบัติการเกิด opportunistic infections :

- มี herpes zoster 2 ราย ณ สัปดาห์ที่ 12 และ 16
- มี oral thrush 2 ราย ณ สัปดาห์ที่ 10 และ 12

จำนวนเซลล์ CD4 ก่อนและหลังการรักษา

1. การคำนวณหาค่าความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการรักษาด้วยวิธี ANOVA พบว่า จำนวนเซลล์ CD4 T-lymphocytes หลังการรักษาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p-value = 0.025 (25 ราย) และหลังการรักษาในสัปดาห์ที่ 12 คือ สัปดาห์ที่ 20 พบว่า จำนวนเซลล์ CD4 T-lymphocytes กลับเพิ่มขึ้น ทำให้ไม่พบความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังการรักษา

2. สำหรับจำนวนเซลล์ CD4 พบว่ามีการกระจายเป็นแบบปกติ จึงใช้ pair t-test เปรียบเทียบค่าก่อนและหลังการรักษา พบว่าหลังการรักษามีค่า CD4 ลดลงดังนี้
   - กรณีที่คิดจากพื้นที่ทั้งหมด ค่า CD4 ลดลงเฉลี่ย 34.42 เซลล์ (SD 77.47, 95% CI = 4.38, 64.46) p-value = 0.026
   - กรณีไม่คิดพื้นที่สัปดาห์ที่ 2 ค่า CD4 ลดลงเฉลี่ย 37.47 เซลล์ (SD 77.30, 95% CI = 7.50, 67.45) p-value = 0.016

การที่จำนวนเซลล์ CD4 T-lymphocytes ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 12 สัปดาห์ แสดงว่า ยา YTC-2 อาจมีผลต่อการกดภูมิต้านทานอย่างมากและเมื่อเลิกใช้ยาจำนวนเซลล์ CD4 T-lymphocytes กลับเพิ่มจำนวนขึ้น แสดงว่า ยา YTC-2 มีผลต่อการกดภูมิต้านทานด้วยถึงแม้จะเป็นแบบผันกลับได้ (reversible) ก็ตามจึงไม่น่าจะเป็นยาที่นำไปทดลองต่อไป

พิษและผลข้างเคียงจากการรักษาโดยประเมินจากการสอบถาม และการตรวจร่างกายและผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ไม่พบพิษและผลข้างเคียงไม่พึงประสงค์อย่างชัดเจนทางคลินิก แต่ความผิดปกติในค่า biochemical parameters แต่ละตัว ยังอยู่ระหว่างการวิเคราะห์ คาดว่าใช้เวลาอีก 1 สัปดาห์จึงจะแล้วเสร็จ

ความพึงพอใจของผู้ป่วยต่อการรักษาโดยการสอบถามผู้ป่วยทั้งหมดมีความพึงพอใจต่อการรักษา

เอกสารอ้างอิง

1. Carpenter CCJ et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Updated Recommendations of the International AIDS society-USA Panel. JAMA 1997; 277:1962-9.

แบบบันทึก
การใช้สารสกัดสมุนไพร YTC ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์

1. สถานพยาบาล

1.1 ร.พ..... 1.2 ร.พ..... 1.3 ร.พ.....

2. ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

2.1 รหัสผู้ป่วย.....
2.2 อายุ.....ปี
2.3 ภูมิลำเนา.....
2.4 อาชีพ.....
2.5 สถานภาพสมรส.....
2.5.1 โสด 2.5.2 สมรส 2.5.3 ม่าย
2.6 การศึกษาระดับสูงสุด
2.6.1 ประถม 6 หรือน้อยกว่า 2.6.2 ประถม 6 - ม.6
2.6.3 ปวส. ปวช. 2.6.4 อื่น ๆ (ระบุ).....

3. ข้อมูลเกี่ยวกับการติดเชื้อ HIV

3.1 ปัจจัยเสี่ยง
3.1.1 heterosexual 3.1.2 homosexual
3.1.3 intravenous drug user 3.1.3 อื่น ๆ (ระบุ).....
3.2 อาการ/อาการแสดงของการติดเชื้อ HIV
3.2.1 ไม่มี
3.2.2 มี
3.2.2.1 ไข้เรื้อรังนานกว่า 1 เดือน
3.2.2.2 น้ำหนักตัวลดลงมากกว่าร้อยละ 10 ภายในเวลา 3 เดือน
3.2.2.3 ท้องเดินเรื้อรังนานกว่า 1 เดือน
3.2.2.4 ต่อมน้ำเหลืองโต ขนาดโตกว่า 1 ซม. มากกว่า 2 แห่ง ที่ไม่ใช่บริเวณขาหนีบนานกว่า 1 เดือน
3.2.2.5 การติดเชื้อราในช่องปาก
3.2.2.6 การติดเชื้อราฉวยโอกาส (ระบุ)

ชนิดของการติดเชื้อ	เวลา (เดือน, พ.ศ.)
.....	.....
.....	.....

3.2.2.7 อื่น ๆ (ระบุ).....

3.3 Karnofski Performance Score (KPS).....

3.4 การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV และจำนวน CD4 เซลล์

3.4.1 anti-HIV antibody positive เมื่อ.....

3.4.2 HIV viral load.....copies/มล. เมื่อ.....

3.4.3 จำนวน CD4 เซลล.....ลบ.มม. เมื่อ.....

3.5 การรักษาที่เคยได้รับ

3.5.1 ยังไม่มีเคยได้รับการรักษาใด ๆ

3.5.2 เคยได้รับการรักษามาแล้ว

3.5.2.1 AZT เมื่อ.....

3.5.2.2 ยาต้านวัณโรค (ระบุ).....เมื่อ.....

3.5.2.3 ยาต้านเชื้อรา (ระบุ).....เมื่อ.....

3.5.2.4 อื่น ๆ (ระบุ).....

.....

4. การรักษา

ผู้ป่วยเริ่มได้รับสารสกัด YTC เมื่อวันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

Karnofski Performance Score (KPS)

คะแนน	คำจำกัดความ
100	ปกติ ไม่มีอาการหรืออาการแสดงว่าป่วย
90	ดำรงชีวิตเป็นปกติ มีอาการหรืออาการแสดงว่าป่วยเล็กน้อย
80	ยังดำรงชีวิตอย่างปกติ มีอาการแสดงว่าป่วย
70	ช่วยตัวเองได้ แต่ทำงานไม่ไหว ทำได้น้อยลงชัดเจน
60	ต้องมีคนช่วยดูแลเป็นบางโอกาส แต่ยังช่วยตัวเองได้
50	ต้องมีคนช่วยดูแลเป็นประจำ และต้องพบแพทย์บ่อยครั้ง (มากกว่าเดือนละครั้ง)
40	ไร้ความสามารถ ต้องดูแลเป็นพิเศษ
30	อาการหนัก สมควรพักรักษาตัวในโรงพยาบาล
20	อาการหนักมาก ต้องอยู่ในโรงพยาบาล ต้องมีการรักษาประคับประคองช่วยชีวิต
10	ไม่รู้สึกตัว ใกล้วาระสุดท้าย
0	เสียชีวิต

รหัสผู้ป่วย.....

แบบบันทึกผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

	ผลการตรวจ (วัน/เดือน/ปี)									
	Screen .../.../...	Day 0 .../.../...	Wk 2 .../.../...	Wk 4 .../.../...	Wk 6 .../.../...	Wk 8 .../.../...	Wk 10 .../.../...	Wk 12 .../.../...	Wk 16 .../.../...	Wk 20 .../.../...
CBC:										
Hct										
WBC										
PMN/L										
Platelets										
U/A:										
Protein										
Sugar										
Blood chem.										
SGOT										
SGPT										
ALP										
Amylase										
Bilirubin										
Albumin										
FBS										
BUN										
Creatinine										
Na^+/k^+										
HCO_3^-/Cl^-										
Chest X-ray										
HIV viral load										
CD4										
Others										

ข้อมูลที่ควรทราบสำหรับผู้ที่จะเข้าร่วมโครงการ "การรักษาโรคติดเชื้อเอชไอวีและโรคเอดส์ด้วยสารสกัดสมุนไพรวายทีซี (YTC) ในโครงการสมุนไพรต้านเอดส์" กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

1. ความรู้เกี่ยวกับโรคเอดส์

โรคเอดส์เป็นกลุ่มอาการของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (Human immuno-deficiency virus, HIV) เชื้อนี้เข้าไปทำลายเม็ดเลือดขาว ซึ่งเป็นแหล่งสร้างภูมิคุ้มกันโรค จึงทำให้ร่างกายติดเชื้อโรคต่างๆ ได้ง่าย เช่น วัณโรค ปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ อาการมักจะรุนแรงและเสียชีวิตได้

อาการ มี 3 ระยะ ได้แก่

1. **ระยะไม่มีอาการ** ผู้ติดเชื้อเอชไอวี จะมีสุขภาพทั่วไปเหมือนคนปกติ อาจจะอยู่ในสภาพนี้ได้นานถึง 5-10 ปี หรือมากกว่านั้น

2. **ระยะเริ่มมีอาการ** ผู้ติดเชื้อจะเริ่มมีอาการอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่าง เช่น ต่อมน้ำเหลืองโต เชื้อราในช่องปาก ไข้เรื้อรัง ท้องเสียเรื้อรัง น้ำหนักลดลงมากโดยไม่มีสาเหตุอื่น

3. **ระยะเอดส์เต็มขั้น** เป็นระยะที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกทำลายลงมาก ทำให้ติดโรคฉวยโอกาสได้ง่าย เช่น วัณโรค ปอดบวม เชื้อราในช่องปาก เริมและงูสวัด เป็นต้น

การติดต่อ ที่สำคัญมี 3 ทาง ได้แก่ ทางเพศสัมพันธ์ ทางเลือด ซึ่งส่วนใหญ่ติดจากการใช้ยาเสพย์ติดชนิดฉีดเข้าเส้น การมีเพศสัมพันธ์กับผู้ติดเชื้อ และการถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก

การป้องกัน สามารถป้องกันโรคเอดส์ได้โดย

1. รักเดียวใจเดียว มีคู่ครองคนเดียว
2. มีเพศสัมพันธ์ที่ปลอดภัย โดยการใช้ถุงยางอนามัยป้องกัน
3. ไม่ใช้ยาเสพย์ติดทุกชนิด
4. ลด ละ เลิก การดื่มสุราหรือของมึนเมา เพราะเป็นเหตุนำไปสู่การมีพฤติกรรมเสี่ยงได้
5. การตรวจเลือดก่อนแต่งงาน และก่อนตั้งครรภ์ เพื่อป้องกันการติดเชื้อเอดส์ในเด็ก

การรักษา ขณะนี้ยังไม่มียารักษาโรคเอดส์ให้หายขาดได้ ยาที่ใช้ในปัจจุบันเป็นยาที่ช่วยลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีในร่างกาย แต่ยังไม่มียาชนิดใดที่สามารถทำลายเชื้อเอชไอวีให้หมดไปจากร่างกายได้ ยาชนิดแรกที่ใช้เป็นรักษาโรคเอดส์และยังถือว่าเป็นยามาตรฐานในปัจจุบันคือ ยาเอแซดที (Azidovudine, AZT) ซึ่งใช้ได้ผลดีในระยะแรกแต่ต่อมามักพบปัญหาเชื้อดื้อยา นอกจากนี้ยังมียาชนิดอื่น ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันอีก ได้แก่ยาดีดีไอ (ddI) ดีดีซี (ddC) ดีโฟที (d4T) ทรีทีซี (3TC) ยาเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์ส ทรานสคริพเตส ซึ่งจำเป็นต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวี ค่ายากลุ่มนี้แต่ละชนิดต่อเดือนจะอยู่ระหว่าง 3,500 - 6,000 บาท แต่การรักษาผู้ป่วยเอดส์ในปัจจุบันพบว่าควรจะใช้ยาร่วมกันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เพื่อช่วยชะลอและลดการดื้อยาของเชื้อเอชไอวี ซึ่งทำให้ค่ายาต่อเดือนสูงขึ้นอีก

นอกจากนี้ ยังมียากลุ่มใหม่อีกหนึ่งกลุ่มที่มีประสิทธิผลดีในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส เรียกว่ายายับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส (Protease inhibitors) มักใช้ร่วมกับยาประเภทแรกเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิผลในการรักษาและลดการดื้อยาของเชื้อ ตัวอย่างเช่น ซาควินาเวียร์ (saquinavir, SQV) และ อินดินาเวียร์ (indinavir, IDV) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยากลุ่มนี้มีราคาแพงมาก (เม็ดละประมาณ 55 และ 85 บาท ตามลำดับ) เมื่อใช้ร่วมกับยาอีก 2 ชนิดในกลุ่มแรกจะทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงถึงประมาณ 23,000 ถึง 25,000 บาทต่อเดือน

2. ความรู้เกี่ยวกับโครงการ การรักษาโรคติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์ ด้วยสารสกัดสมุนไพรวายทีซี (YTC)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขได้ระดมนักวิจัยสาขาต่างๆ ดำเนินการศึกษาวิจัยสมุนไพรอย่างครบวงจร ในโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในการรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีหรือผู้ป่วยเอดส์ เพื่อช่วยลดหรือทดแทนยาแผนปัจจุบันที่มีราคาแพง และเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคเอดส์ ซึ่งจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่า สารสกัดสมุนไพรวายทีซี มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี และเชื้อไวรัสที่ก่อโรคงูสวัดและโรคเริม ตลอดจนมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาวของคนด้วย และยังพบว่าสารสกัดสมุนไพรวายทีซีในขนาดที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่ก่อให้เกิดพิษในสัตว์ทดลอง จึงได้ผลิตสารสกัดดังกล่าวในรูปยาแคปซูล เพื่อนำมาศึกษาถึงประสิทธิผลและความปลอดภัยเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรวายทีซีในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่การศึกษาประสิทธิผลของยาดังกล่าวในระยะต่อไป

3. ข้อควรทราบและข้อควรปฏิบัติ สำหรับผู้ที่จะเข้าร่วมโครงการ

3.1 ข้อมูลทั่วไป ผู้ที่จะเข้าร่วมโครงการควรมีคุณสมบัติ ดังนี้

- เพศชายหรือเพศหญิงที่ไม่อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
- อายุ 20-50 ปี
- มีผลการตรวจเลือดหาภูมิต้านทานต่อเชื้อเอดส์ เป็นผลบวก
- ผ่านการตรวจร่างกายจากแพทย์ในโครงการวิจัย
- เข้าร่วมโครงการโดยสมัครใจ และสามารถมารับการรักษาสม่ำเสมอภายใน 6 เดือน
- ไม่ได้รับยารักษาโรคเอดส์ใดๆ มาก่อน หรือ ได้รับยาอื่นมาแล้ว และหยุดยาไม่ต่ำกว่า 6 เดือน
- ผู้ที่มีโอกาสได้รับยารักษาโรคเอดส์ เช่น เอแซดทีควรตัดสินใจด้วยตนเองถึงข้อดี-ข้อเสียของการเข้าร่วมโครงการ เพราะโครงการนี้ศึกษาประสิทธิผลของสารสกัดสมุนไพรวายทีซี เพียงอย่างเดียว ซึ่งไม่มีการให้ผู้ป่วยรับประทานยาต้านไวรัสเอดส์ชนิดอื่น เช่น เอแซดที ดีดีไอ เป็นต้น ตลอดระยะเวลา 6 เดือนที่ร่วมอยู่ในโครงการวิจัย

3.2 ขั้นตอนการศึกษาวิจัย

- ผู้เข้าร่วมโครงการ จะได้รับการซักประวัติ ตรวจร่างกาย ถ่ายภาพรังสีทรวงอกตรวจปัสสาวะ และเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เพื่อตรวจหาปริมาณไวรัสเอดส์ ปริมาณเม็ดเลือดขาว และตรวจทางชีวเคมี
- ผู้เข้าร่วมโครงการ จะได้รับการรักษา ดังนี้
  - ยาโคไตรม็อกซาโซล ขนาด 480 มิลลิกรัม รับประทานวันละครั้ง ติดต่อกันนาน 6 เดือน เพื่อป้องกันโรคปอดบวมจากเชื้อนิวโมซีสทิส คารินิไอ (Pneumocystis carinii pneumonia, PCP)
  - สารสกัดสมุนไพรวายทีซี ขนาด 1 แคปซูล (แคปซูลละ 125 มิลลิกรัม) รับประทาน วันละ 2 ครั้ง หลังอาหาร ติดต่อกันนาน 6 เดือน
  - ยาอื่นๆ ตามแต่ปัญหาและความจำเป็นของแต่ละราย โดยจะไม่มีการรับประทานยาต้านไวรัสชนิดอื่น เช่น เอแซดที หรือดีดีไอ เป็นต้น ตลอดระยะเวลา 6 เดือนที่ร่วมในโครงการวิจัย
- ผู้เข้าร่วมโครงการจะได้รับการติดตามผลการรักษาทุก 1 เดือน จนครบ 6 เดือน การติดตามผลการรักษาแต่ละครั้งจะได้รับการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และ การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

3.3 ข้อควรปฏิบัติ สำหรับผู้เข้าร่วมโครงการ

- ควรมารับการรักษาอย่างสม่ำเสมอ ภายในระยะเวลาที่กำหนด
- ควรรับประทานยาให้ครบทุกครั้งตามแพทย์สั่ง
- ไม่ควรใช้ยาอื่น นอกเหนือจากยาที่ให้ หากมีความจำเป็นใดๆ ควรปรึกษาแพทย์ผู้วิจัย

3.4 ความเสี่ยงในการเข้าร่วมในโครงการศึกษาวิจัย

ก. ความเสี่ยงจากการรับประทานสารสกัดสมุนไพรวายทีซี โดยที่สารสกัดดังกล่าวสกัดจากสมุนไพรที่มีการใช้กันอยู่แล้วในประเทศไทย และจากการศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลองทั้งระยะสั้นและระยะปานกลาง ไม่พบผลแทรกซ้อนที่เป็นอันตรายจากสารสกัดดังกล่าว แต่หากเกิดอันตรายใดๆ ขึ้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จะเป็นผู้รับผิดชอบในการรักษาพยาบาล

ข. ความเสี่ยงจากการเจาะเลือดตรวจ จะมีการเจาะเลือดผู้ร่วมโครงการเพื่อตรวจสอบ 7 ครั้ง ครั้งละ 20 ซีซี อันตรายจากการเจาะเลือดหากจะเกิดขึ้นก็มีได้น้อยมาก เช่น เลือดออกใต้ผิวหนัง หรือติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น แต่ผู้วิจัยจะพยายามไม่ให้เกิดอันตราย โดยใช้เข็มที่ปราศจากเชื้อ และใช้ผู้ชำนาญในการเจาะเลือด สำหรับปริมาณครั้งละ 20 ซีซี รวม 7 ครั้ง เป็นปริมาณที่น้อยมาก ไม่มีอันตรายใดๆ ต่อผู้ป่วย

3.5 การสมัครใจเข้าร่วมและการถอนตัวจากโครงการ

ผู้ป่วยมีสิทธิโดยสมบูรณ์ที่จะสมัครใจเข้าร่วมหรือไม่เข้าร่วมโครงการ และมีสิทธิที่จะถอนตัวจากโครงการเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผลการถอนตัว

3.6 การตอบแทนอาสาสมัคร

ผู้เข้าร่วมโครงการ จะได้รับค่าตอบแทนครั้งละ 200 บาท เพื่อเป็นค่าพาหนะในการเดินทางมาติดตามผลการรักษา

ระหว่างการศึกษา เพื่อประเมินผลการรักษาในระยะเวลา 6 เดือน
ถ้ามีปัญหาใดๆ จากการใช้ยาจากสารสกัดวายทีซี ผู้ป่วยสามารถกลับมาพบแพทย์ได้ตลอดเวลา
หรือติดต่อแพทย์ได้ที่ **พ.ญ. ปานิตา ปทีปวณิช โรงพยาบาลลำปาง อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง**
โทรศัพท์ (054)-223-623-31 ต่อ 2222 หรือ 1216

โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษา

แบบบันทึก
การใช้สารสกัดสมุนไพร YTC ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์

1. สถานพยาบาล

1.1 ร.พ..... 1.2 ร.พ..... 1.3 ร.พ.....

2. ข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

2.1 รหัสผู้ป่วย.....
2.2 อายุ.....ปี
2.3 ภูมิลำเนา.....
2.4 อาชีพ.....
2.5 สถานภาพสมรส.....
2.5.1 โสด 2.5.2 สมรส 2.5.3 ม่าย
2.6 การศึกษาระดับสูงสุด
2.6.1 ประถม 6 หรือน้อยกว่า 2.6.2 ประถม 6 - ม.6
2.6.3 ปวส. ปวช. 2.6.4 อื่น ๆ (ระบุ).....

3. ข้อมูลเกี่ยวกับการติดเชื้อ HIV

3.1 ปัจจัยเสี่ยง
3.1.1 heterosexual 3.1.2 homosexual
3.1.3 intravenous drug user 3.1.3 อื่น ๆ (ระบุ).....
3.2 อาการ/อาการแสดงของการติดเชื้อ HIV
3.2.1 ไม่มี
3.2.2 มี
3.2.2.1 ไข้เรื้อรังนานกว่า 1 เดือน
3.2.2.2 น้ำหนักตัวลดลงมากกว่าร้อยละ 10 ภายในเวลา 3 เดือน
3.2.2.3 ท้องเดินเรื้อรังนานกว่า 1 เดือน
3.2.2.4 ต่อมน้ำเหลืองโต ขนาดโตกว่า 1 ซม. มากกว่า 2 แห่ง ที่ไม่ใช่บริเวณขาหนีบนานกว่า 1 เดือน
3.2.2.5 การติดเชื้อราในช่องปาก
3.2.2.6 การติดเชื้อราฉวยโอกาส (ระบุ)

ชนิดของการติดเชื้อ	เวลา (เดือน, พ.ศ.)
.....	.....
.....	.....

3.2.2.7 อื่น ๆ (ระบุ).....

3.3 Karnofski Performance Score (KPS).....

3.4 การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV และจำนวน CD4 เซลล์

3.4.1 anti-HIV antibody positive เมื่อ.....

3.4.2 HIV viral load.....copies/มล. เมื่อ.....

3.4.3 จำนวน CD4 เซลล.....//ลบ.มม. เมื่อ.....

3.5 การรักษาที่เคยได้รับ

3.5.1 ยังไม่มีเคยได้รับการรักษาใด ๆ

3.5.2 เคยได้รับการรักษามาแล้ว

3.5.2.1 AZT เมื่อ.....

3.5.2.2 ยาต้านวัณโรค (ระบุ).....เมื่อ.....

3.5.2.3 ยาต้านเชื้อรา (ระบุ).....เมื่อ.....

3.5.2.4 อื่น ๆ (ระบุ).....

.....

4. การรักษา

ผู้ป่วยเริ่มได้รับสารสกัด YTC -2 เมื่อวันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้อมูลที่ควรทราบสำหรับผู้ที่จะเข้าร่วมโครงการ "การศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัดวายทีซีสอง (YTC-2) ในการรักษาโรคติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์" ในโครงการสมุนไพรต้านเอดส์กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

1. ความรู้เกี่ยวกับโรคเอดส์

โรคเอดส์เป็นกลุ่มอาการของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (Human immuno-deficiency virus, HIV) เชื้อนี้เข้าไปทำลายเม็ดเลือดขาว ซึ่งเป็นแหล่งสร้างภูมิคุ้มกันโรค จึงทำให้ร่างกายติดเชื้อโรคต่างๆ ได้ง่าย เช่น วัณโรค ปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ อาการมักจะรุนแรงและเสียชีวิตได้

อาการ มี 3 ระยะ ได้แก่

1. **ระยะไม่มีอาการ** ผู้ติดเชื้อเอชไอวี จะมีสุขภาพทั่วไปเหมือนคนปกติ อาจจะอยู่ในสภาพนี้ได้นานถึง 5-10 ปี หรือมากกว่านั้น

2. **ระยะเริ่มมีอาการ** ผู้ติดเชื้อจะเริ่มมีอาการอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่าง เช่น ต่อมน้ำเหลืองโต เชื้อราในช่องปาก ไข้เรื้อรัง ท้องเสียเรื้อรัง น้ำหนักลดลงมากโดยไม่มีสาเหตุอื่น

3. **ระยะเอดส์เต็มขั้น** เป็นระยะที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกทำลายลงมาก ทำให้ติดโรคฉวยโอกาสได้ง่าย เช่น วัณโรค ปอดบวม เชื้อราในช่องปาก เริมและงูสวัด เป็นต้น

การติดต่อ ที่สำคัญมี 3 ทาง ได้แก่ ทางเพศสัมพันธ์ ทางเลือด ซึ่งส่วนใหญ่ติดจากการใช้ยาเสพย์ติดชนิดฉีดเข้าเส้น การมีเพศสัมพันธ์กับผู้ติดเชื้อ และการถ่ายทอดจากแม่สู่ลูก

การป้องกัน สามารถป้องกันโรคเอดส์ได้โดย

1. รักเดียวใจเดียว มีคู่ครองคนเดียว
2. มีเพศสัมพันธ์ที่ปลอดภัย โดยการใช้ถุงยางอนามัยป้องกัน
3. ไม่ใช้ยาเสพย์ติดทุกชนิด
4. ลด ละ เลิก การดื่มสุราหรือของมึนเมา เพราะเป็นเหตุนำไปสู่การมีพฤติกรรมเสี่ยงได้
5. การตรวจเลือดก่อนแต่งงาน และก่อนตั้งครรภ์ เพื่อป้องกันการติดเชื้อเอดส์ในเด็ก

การรักษา ขณะนี้ยังไม่มียารักษาโรคเอดส์ให้หายขาดได้ ยาที่ใช้ในปัจจุบันเป็นยาที่ช่วยลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีในร่างกาย แต่ยังไม่มียาชนิดใดที่สามารถทำลายเชื้อเอชไอวีให้หมดไปจากร่างกายได้ ยาชนิดแรกที่ใช้เป็นรักษาโรคเอดส์และยังถือว่าเป็นยามาตรฐานในปัจจุบันคือ ยาเอแซดที (Azidovudine, AZT) ซึ่งใช้ได้ผลดีในระยะแรกแต่ต่อมามักพบปัญหาเชื้อดื้อยา นอกจากนี้ยังมียาชนิดอื่น ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันอีก ได้แก่ยาดีดีไอ (ddI) ดีดีซี (ddC) ดีโฟที (d4T) ทรีทีซี (3TC) ยาเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซมรีเวอร์ส ทรานสคริพเตส ซึ่งจำเป็นต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวี ค่ายากลุ่มนี้แต่ละชนิดต่อเดือนจะอยู่ระหว่าง 3,500 - 6,000 บาท แต่การรักษาผู้ป่วยเอดส์ในปัจจุบันพบว่าควรจะใช้ยาร่วมกันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป เพื่อช่วยชะลอและลดการดื้อยาของเชื้อเอชไอวี ซึ่งทำให้ค่ายาต่อเดือนสูงขึ้นอีก

นอกจากนี้ ยังมียากลุ่มใหม่อีกหนึ่งกลุ่มที่มีประสิทธิผลดีในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส เรียกว่ายายับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส (Protease inhibitors) มักใช้ร่วมกับยาประเภทแรกเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิผลในการรักษาและลดการดื้อยาของเชื้อ ตัวอย่างเช่น ซาควินาเวียร์ (saquinavir, SQV) และ อินดินาเวียร์ (indinavir, IDV) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยากลุ่มนี้มีราคาแพงมาก (เม็ดละประมาณ 55 และ 85 บาท ตามลำดับ) เมื่อใช้ร่วมกับยาอีก 2 ชนิดในกลุ่มแรกจะทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาสูงถึงประมาณ 23,000 ถึง 25,000 บาทต่อเดือน

2. ความรู้เกี่ยวกับโครงการ การรักษาโรคติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์ ด้วยสารสกัดวายทีซีสอง (YTC-2)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขได้ระดมนักวิจัยสาขาต่างๆ ดำเนินการศึกษาวิจัยสมุนไพรอย่างครบวงจร ในโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรในการรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีหรือผู้ป่วยเอดส์ เพื่อช่วยลดหรือทดแทนยาแผนปัจจุบันที่มีราคาแพง และเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคเอดส์ ซึ่งจากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า

- สารสกัดวายทีซีสองมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง
- สารสกัดสมุนไพรวายทีซีสอง ในขนาดที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่ก่อให้เกิดพิษในสัตว์ทดลอง

ดังนั้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงได้ผลิตสารสกัดวายทีซีสองในรูปแคปซูล เพื่อนำมาศึกษาถึงประสิทธิผลและความปลอดภัยเบื้องต้นของสารสกัดวายทีซีสองในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะนำไปสู่การศึกษาประสิทธิผลของยาดังกล่าวในระยะต่อไป

3. ข้อควรทราบและข้อควรปฏิบัติ สำหรับผู้ที่จะเข้าร่วมโครงการ

3.1 ข้อมูลทั่วไป ผู้ที่จะเข้าร่วมโครงการควรมีคุณสมบัติ ดังนี้

- เพศชายหรือเพศหญิงที่ไม่อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
- อายุ 20-50 ปี
- มีผลการตรวจเลือดหาภูมิต้านทานต่อเชื้อเอดส์ เป็นผลบวก
- ผ่านการตรวจร่างกายจากแพทย์ในโครงการวิจัย
- เข้าร่วมโครงการโดยสมัครใจ และสามารถมารับการรักษาสม่ำเสมอภายใน 6 เดือน
- ไม่ได้รับยารักษาโรคเอดส์ใดๆ มาก่อน หรือ ได้รับยาอื่นมาแล้ว และหยุดยาไม่ต่ำกว่า 6 เดือน
- ผู้ที่มีโอกาสได้รับยารักษาโรคเอดส์ เช่น เอแซดทีควรตัดสินใจด้วยตนเองถึงข้อดี-ข้อเสียของการเข้าร่วมโครงการ เพราะโครงการนี้ศึกษาประสิทธิผลของสารสกัดวายทีซีสองเพียงอย่างเดียว ซึ่งไม่มีการให้ผู้ป่วยรับประทานยาต้านไวรัสเอดส์ชนิดอื่น เช่น เอแซดที ดีดีไอ เป็นต้น ตลอดระยะเวลา 6 เดือนที่ร่วมอยู่ในโครง

3.2 ขั้นตอนการศึกษาวิจัย

- ผู้เข้าร่วมโครงการ จะได้รับการซักประวัติ ตรวจร่างกาย ถ่ายภาพรังสีทรวงอกตรวจปัสสาวะ และเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เพื่อตรวจหาปริมาณไวรัสเอดส์ ปริมาณเม็ดเลือดขาว และตรวจทางชีวเคมี
- ผู้เข้าร่วมโครงการ จะได้รับการรักษา ดังนี้
  - ยาโคไตรม็อกซาโซล ขนาด 480 มิลลิกรัม รับประทานวันละครั้ง ติดต่อกันนาน 6 เดือน เพื่อป้องกันโรคปอดบวมจากเชื้อนิวโมซีสทิส คารินิไอ (Pneumocystis carinii pneumonia, PCP)
  - สารสกัดวายทีซีสอง ขนาด 1 แคปซูล (แคปซูลละ 35-50 มิลลิกรัม) รับประทาน วันละ 3 ครั้ง หลังอาหาร ติดต่อกันนาน 3 เดือน
  - ยาอื่นๆ ตามแต่ปัญหาและความจำเป็นของแต่ละราย โดยจะไม่มีการรับประทานยาต้านไวรัสชนิดอื่น เช่น เอแซดที หรือดีดีไอ เป็นต้น ตลอดระยะเวลา 6 เดือนที่ร่วมในโครงการวิจัย
  - ผู้ป่วยหญิงจะได้รับคำแนะนำให้ป้องกันการตั้งครรภ์ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่นฉีดหรือฝังยาคุมกำเนิด เป็นต้น ในระหว่างที่เข้าร่วมโครงการนี้เป็นเวลาอย่างน้อย 6 เดือน
- ผู้เข้าร่วมโครงการจะได้รับการติดตามผลการรักษาทุก 2 สัปดาห์ จนครบ 3 เดือนและหลังหยุดยาแล้วอีกเดือนละครั้ง นาน 2 เดือน การติดตามผลการรักษาแต่ละครั้งจะได้รับการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และ การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

3.3 ข้อควรปฏิบัติ สำหรับผู้เข้าร่วมโครงการ

- ควรมารับการรักษาอย่างสม่ำเสมอ ภายในระยะเวลาที่กำหนด
- ควรรับประทานยาให้ครบทุกครั้งตามแพทย์สั่ง
- ไม่ควรใช้ยาอื่น นอกเหนือจากยาที่ให้ หากมีความจำเป็นใดๆ ควรปรึกษาแพทย์ผู้วิจัย

3.4 ความเสี่ยงในการเข้าร่วมในโครงการศึกษาวิจัย

ก. ความเสี่ยงจากการรับประทานสารสกัดวายทีซีสอง จากการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูขาวเป็นเวลา 28 วัน พบว่าสารสกัดวายทีซีสองในขนาดที่สูงกว่าที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประมาณ 100 เท่า มีผลลดจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว และอาจมีผลต่อตับและตับอ่อนในหนูขาว อย่างไรก็ตาม ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่า สารสกัดวายทีซีสองในขนาดที่ใช้ในการศึกษานี้จะมีผลดังกล่าวในคนหรือไม่ ดังนั้น ผู้ป่วยจะได้รับการเจาะเลือด เพื่อตรวจดูการเม็ดโลหิต และการทำงานของตับและตับอ่อนเป็นระยะทุกสองสัปดาห์ตลอดระยะเวลาการศึกษา หากผลการตรวจบ่งชี้ว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้น จะให้ผู้ป่วยหยุดยาทันที แต่หากเกิดอันตรายใด ๆ ขึ้น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จะเป็นผู้รับผิดชอบในการรักษาพยาบาล

ข. ความเสี่ยงจากการเจาะเลือดตรวจ จะมีการเจาะเลือดผู้ร่วมโครงการเพื่อตรวจสอบ 9 ครั้ง ครั้งละ 20 ซีซี อันตรายจากการเจาะเลือดหากจะเกิดขึ้นก็มีได้น้อยมาก เช่น เลือดออกใต้ผิวหนัง หรือติดเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น แต่ผู้วิจัยจะพยายามไม่ให้เกิดอันตราย โดยใช้เข็มที่ปราศจากเชื้อ และใช้ผู้ชำนาญในการเจาะเลือด

3.5 การสมัครใจเข้าร่วมและการถอนตัวจากโครงการ

ผู้ป่วยมีสิทธิโดยสมบูรณ์ที่จะสมัครใจเข้าร่วมหรือไม่เข้าร่วมโครงการ และมีสิทธิที่จะถอนตัวจากโครงการเมื่อใดก็ได้โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผลการถอนตัว

3.6 การตอบแทนอาสาสมัคร

ผู้เข้าร่วมโครงการ จะได้รับค่าตอบแทนครั้งละ 200 บาท เพื่อเป็นค่าพาหนะในการเดินทางมาติดตามผลการรักษา

ระหว่างการศึกษา เพื่อประเมินผลการรักษาในระยะเวลา 5 เดือน
ถ้ามีปัญหาใดๆ จากการใช้ยาจากสารสกัดวายทีซี ผู้ป่วยสามารถกลับมาพบแพทย์ได้ตลอดเวลา
หรือติดต่อแพทย์ได้ที่

โรงพยาบาลคณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
น.พ. วิสุทธิ์ สุขีไพศาลเจริญ โทรศัพท์ (034)-2348-360-9

โรงพยาบาลลำปาง อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง
พ.ญ. ปานิตา ปทีปวณิช โทรศัพท์ (054)-223-623-31 ต่อ 2222 หรือ 1216

โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จะเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายในการรักษา

บทที่ 16

สรุปผลการศึกษาวิจัยโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ (สบู่ดำ)

สุธิดา ไชยราช

ในการศึกษาวิจัยสมุนไพรโครงการสมุนไพรต้านเอดส์ ได้มีการคัดเลือกสมุนไพรที่มีศักยภาพโดยการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการวิจัยสมุนไพรทั้งในประเทศและต่างประเทศ เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการศึกษาวิจัยสมุนไพรชนิดนั้น ๆ และดำเนินการวางแผนการทดลองเพื่อศึกษาสรรพคุณสมุนไพรที่คัดเลือกในการรักษาโรคเอดส์ โรคติดเชื้อฉวยโอกาสต่าง ๆ รวมทั้งสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน สบู่ดำเป็นสมุนไพรที่คัดเลือกจากสมุนไพรหลายชนิดที่นำมาศึกษาทบทวนวรรณกรรม และเป็นสมุนไพรที่อยู่ในตระกูลเดียวกับสมุนไพรที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวี ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อฉวยโอกาส หรือมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิต้านทาน

การดำเนินการศึกษาโดยการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำในหลอดทดลอง ได้ดำเนินการทดสอบเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี

1.1 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์ส ทรานสคริบเทส(Reverse Trancriptase)

1.2 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส (Protease)

1.3 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี (Anti-human Immunodeficiency Virus)

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี โดยวิธีการต่าง ๆ ตามที่ได้แสดงในตารางที่ 40 พบว่า สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้งของสมุนไพรสบู่ดำ (YTC) มีฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง ร้อยละ 90 ที่ความเข้มข้น 8.3 มคก./มล. รายละเอียดตาม ตารางที่ 40 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำในหลอดทดลอง (หน้า 155)

2. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาส

2.1 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฉวยโอกาสในผู้ป่วยเอดส์

2.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย Salmonella

2.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อ Herpes Simplex Virus

2.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อ Cytomegalovirus และ Epstein-Barr Virus

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาส โดยวิธีการต่าง ๆ ตามที่ได้แสดงในตารางที่ 41 พบว่า สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้งของสมุนไพรสบู่ดำ (YTC)

มีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส Herpes simplex สูงที่ค่าเจือจางไม่ต่ำกว่า 1 : 57000 และมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อฉวยโอกาส *Cryptococcus neoformans* ที่ความเข้มข้น 1.67 มก./มล. และ *Histoplasma capsulatum* ที่ความเข้มข้น 6.67 มก./มล. สำหรับฤทธิ์อื่น ๆ ไม่ได้ผล รายละเอียดตาม ตารางที่ 41 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำในหลอดทดลอง (หน้า 156)

3. ฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกัน

3.1 การศึกษาในสัตว์ทดลอง

3.2 การศึกษาโดยใช้ลิมโฟซัยท์จากคนปกติ

ผลการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกันของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำด้วยน้ำ และสารสกัดเอธานอลจากสมุนไพรสบู่ดำ จำนวน 7 ชนิด ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูถีบจักร พบว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิ ได้แก่ สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง (YTL) ที่ความเข้มข้น 1 : 102400 -1 : 1600 สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแบ่งตัวได้ นอกจากนี้ยังเสริมฤทธิ์สาร Phytohaemagglutinin (PHA) ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัวด้วย สำหรับสารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง (YTC) สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนได้ที่ความเข้มข้น 15-120 มคก./มล. และที่ความเข้มข้น 1: 819200 - 1: 12800 ไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูถีบจักรแบ่งตัว แต่สามารถเสริมฤทธิ์สาร Phytohaemagglutinin (PHA) ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัว

สรุปว่าจากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นต่าง ๆ ของสารสกัดสบู่ดำทางห้องปฏิบัติการ พบว่าสารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำแห้ง (YTC) แสดงฤทธิ์ต่าง ๆ ได้แรงที่สุด ดังนี้ ยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลองได้ดีมาก ทำลายเชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์สูง ยับยั้งและฆ่าเชื้อรา *Cryptococcus neoformans* และ *Histoplasma capsulatum* รวมทั้งสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลเม็ดเลือดขาวของคน และเสริมฤทธิ์ของสาร Phytohaemagglutinin (PHA) ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัวด้วย รายละเอียดตาม ตารางที่ 42 สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่าง ๆจากสมุนไพรสบู่ดำ (หน้า 156)

สารสกัดที่มีฤทธิ์แรงรองลงมา ได้แก่ สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสบู่ดำแห้ง (YTL) แสดงฤทธิ์กระตุ้นเซลเม็ดเลือดขาวของหนูถีบจักรให้แบ่งตัวได้ดีมากและเสริมฤทธิ์ของสาร Phytohaemagglutinin (PHA) ในการกระตุ้นให้ T cells แบ่งตัวด้วย นอกจากนี้ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส (RT) ได้แรงปานกลาง อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีสารสกัดอื่นอีกที่แสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจและฤทธิ์ในการต้านเชื้อเอชไอวีค่อนข้างอ่อน ดังนั้น จึงทำการคัดเลือกสารสกัดที่จะนำมาทดสอบความเป็นพิษทั้งการทดสอบพิษเฉียบพลันและพิษ

กึ่งเฉียบพลันของสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสบู่ดำแห้ง (YTL) และทำการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำแห้ง (YTC)

ในการดำเนินการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสบู่ดำแห้ง (YTL) ในหนูถีบจักรสายพันธุ์ ICR พบว่าในขนาด 5, 10, 20 และ 40 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ขนาดของสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสบู่ดำแห้ง (YTL) ที่ทำให้หนูถีบจักรตายครึ่งหนึ่ง เมื่อให้สารสกัดทางปากมีค่ามากกว่า 40 กรัม/กิโลกรัม แต่เมื่อฉีดเข้าทางช่องท้อง พบว่า สารสกัด YTL ขนาด 40 กรัม/กิโลกรัม ทำให้เกิดอาการชักในสัตว์ทดลอง และขนาดของสารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสบู่ดำแห้ง (YTL) ที่ทำให้หนูถีบจักรตายครึ่งหนึ่ง เมื่อให้สารสกัดทางช่องท้องมีค่ามากกว่า 7.93 กรัม/กิโลกรัม

ในการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดน้ำจากลำต้นและใบสบู่ดำแห้ง (YTL) ในหนูถีบจักรสายพันธุ์ Balb/c ขนาดเทียบเท่าผงยา 0.06, 0.6, และ 6 กรัม/กิโลกรัม/วัน คิดเป็น 1, 10 และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนเป็นเวลา 28 วัน พบว่าสารสกัดทุกขนาดไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต หรือการกินอาหารของหนู ค่าทางชีวเคมีของหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ได้แก่ aspartic aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN) หรือ creatinine ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ผลการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำแห้ง (YTC) ในหนูขาว สรุปได้ว่า สารสกัด YTC ในขนาด 5 มก./กก. ซึ่งเทียบเท่าขนาดที่จะทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีในคน ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของการเจริญเติบโต การกินอาหาร น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายใน ค่าทางชีวเคมีของเลือดหรือจุลพยาธิของตับ ไต หัวใจ ปอด แม้ว่ามีจำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงไปบ้าง แต่ยังจัดอยู่ในช่วงของค่าปกติ ส่วนจำนวนเม็ดเลือดแดงพบว่าลดลงเฉพาะในหนูเพศเมียเท่านั้น แต่ก็อยู่ในค่าปกติเช่นกัน

ส่วนหนูขาวที่ได้รับสารสกัด YTC ในขนาด 50 มก./กก. ซึ่งเป็นขนาดที่สูงกว่าที่จะใช้ในคน 10 เท่านั้น ค่าทางชีวเคมีต่าง ๆ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ที่แสดง dose response relationship ซึ่งจะบ่งว่าเกิดจากความเป็นพิษของสารสกัด สัตว์ทดลองยังคงมีอัตราการเจริญเติบโต การกินอาหาร และน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในที่เป็นปกติ หนูทั้งสองเพศมีจำนวนเม็ดเลือดขางลดลง แต่อยู่ในเกณฑ์ปกติ สารสกัดในขนาดนี้อาจทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สังเกตจากค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศเมีย และ extramedullary hematopoesis ที่ตรวจพบที่ตับของหนูทั้งสองเพศ สำหรับผลทางจุลพยาธิวิทยา ไม่พบว่าสารสกัดขนาดนี้จะทำให้เกิดการผิดปกติของตับ ส่วนผลต่อ

ไตนั้น แม้ว่าจะพบ congestive glomerulotubular nephrosis แบบ mild degree ในหนูทุกตัว แต่พยาธิสภาพดังกล่าวก็ตรวจพบในหนูกลุ่มควบคุมด้วยเช่นกัน และค่า BUN และ creatinine ของหนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 50 มก./กก. ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในการบ่งชี้ว่าจะทำให้เกิดการเป็นพิษต่อไต อย่างไรก็ตามแม้ว่าสารสกัดขนาด 50 มก./กก. จะทำให้หนูที่ได้รับสารสกัดนี้เกิด Chronic interstitial pneumonia มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และพยาธิสภาพนี้อาจสัมพันธ์กับการเกิด ventricular hypertrophy ในหนูกลุ่มนี้

ส่วนสารสกัด YTC ขนาด 500 มก./กก. ซึ่งสูงกว่าขนาดใช้ในคนถึง 100 เท่านั้น พบว่าทำให้เกิดพิษในหนูขาวอย่างชัดเจน ทำให้หนูมีสุขภาพทรุดโทรม ไม่กินอาหารและไม่เจริญเติบโต มีภาวะ anemia และ extramedullary hematopoesis ที่ตับ มีการลดลงของเม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด และ lymphocyte และขณะที่ร้อยละของ neutrophil สูงขึ้น 3-4 เท่า ค่าทางชีวเคมีแตกต่างจากกลุ่มควบคุมหลายค่า ส่วนผลทางจุลพยาธิวิทยาพบ chronic interstitial pneumonia และ ventricular hypertrophy มีอัตราส่วนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการที่จำนวนหนูแต่ละเพศเมื่อสิ้นสุดการทดลองเหลือเพียง 9-10 ตัว จากจำนวนเริ่มต้น 15 ตัวนั้น หนูที่ตายไม่ได้มีสาเหตุมาจากความเป็นพิษของสารสกัด เพราะเมื่อผ่าซากดูพบมีสารสกัดอยู่ในปอด คาดว่าอาจเกิดจากการสำลัก ทำให้สารสกัดบางส่วนเข้าไปในปอดขณะกรอก เนื่องจากหนูกลุ่มนี้ดิ้นรนและขัดขืนไม่ยอมให้จับตัวเพื่อกรอกสารสกัดอย่างสงบเช่นเดียวกับหนูกลุ่มอื่น

จากผลการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัด YTC ในหนูขาว จะเห็นได้ว่า สารสกัดนี้ในขนาด 5 มก./กก. เทียบเท่ากับที่จะศึกษาในผู้ป่วยเอดส์ในขนาด 250 มิลลิกรัมต่อวัน โดยแบ่งให้ครั้งละ 125 มก. วันละ 2 ครั้ง ไม่ทำให้เกิดพิษที่ร้ายแรงใดๆ แก่หนูขาว มีความปลอดภัยค่อนข้างสูงมาก โดยเฉพาะเมื่อเทียบกับยา zidovudine หรือ AZT ที่ใช้กันมากในปัจจุบัน ซึ่งในขนาดที่ใช้รักษามีโอกาสทำให้เกิด granulocytopenia ได้ประมาณ 42 % และ anemia ได้ถึง 29 % ในผู้ป่วยที่มี CD4 น้อยกว่า 200 cells/mm^3 หรือ 4-10 % และ 4 % ในผู้ป่วยที่มี CD4 มากกว่า 200 cells/mm^3 ตามลำดับ

แม้ว่าผลการทดสอบความเป็นพิษของ YTC ชี้ว่า สารสกัดนี้ในขนาดที่จะใช้ในการทดลองทางคลินิกมีความปลอดภัยสูงในหนูขาว คณะผู้วิจัยก็จะตรวจสอบความปลอดภัยของสารสกัด YTC ในผู้ป่วยเอดส์อย่างระมัดระวัง โดยมีการตรวจสุขภาพ วัด CBC, blood chemistry, chest X-rays และ HIV viral load เป็นระยะๆ ตลอดการทดลอง

จากผลการวิจัยทางพรีคลินิก พบว่า สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบสบู่ดำ (YTC) มีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาเพื่อการศึกษาวิจัยทางคลินิกต่อไป ดังนั้น จึงได้จัดทำข้อ

กำหนดคุณภาพของสบู่ดำเพื่อเป็นแนวทางในการตรวจสอบมาตรฐานของวัตถุดิบสมุนไพรก่อนการเตรียมสารสกัดสมุนไพรเพื่อใช้ในการผลิตยา ในขั้นตอนเตรียมยาในการทดลองทางคลินิก ได้เตรียมสารสกัด YTC ในรูปแคปซูล เพื่อทดสอบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV ทางคลินิก โดยศึกษาในผู้ป่วยที่มารับการรักษา ณ โรงพยาบาลศูนย์ลำปาง จำนวน 30 คน รูปแบบการวิจัยเป็น Phase I/II Clinical Trial และกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยและเกณฑ์การเลิกจากการศึกษาผู้ป่วยอย่างชัดเจน การศึกษาใช้ระยะเวลาทั้งสิ้น 8 เดือน โดยใน 2 เดือนแรกเป็นขั้นการเตรียมการและเตรียมระบบการส่งต่อสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ ส่วนระยะ 6 เดือนต่อมา เป็นการศึกษาวิจัยทางคลินิก ซึ่งประกอบด้วยการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ พร้อมกับการประเมินผลการรักษาทุกเดือน เพื่อศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพร YTC ผู้ป่วยที่เข้าโครงการจะมีทะเบียนประวัติแยกต่างหากเป็นสัดส่วนและเก็บเป็นความลับ

จากการศึกษาประสิทธิผล (efficacy) และความปลอดภัยเบื้องต้นของสารสกัดสมุนไพร YTC ในการรักษาโรคติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) และโรคเอดส์ ณ โรงพยาบาลลำปาง จังหวัดลำปาง สรุปว่า มีผู้ป่วยที่ได้รับยา YTC ทั้งสิ้น 21 ราย เป็นผู้ป่วยที่มี CD4 $<$ 200 cells/mm^3 ตาม inclusion criteria ใหม่ที่เสนอโดยคณะกรรมการศึกษาวิจัยในคน เมื่อวันที่ 11 สิงหาคม 2541 จำนวน 20 ราย ส่วนอีก 1 รายมี CD4 ประมาณ 500 cells/mm^3 เป็นญาติของเจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาลลำปาง ซึ่งอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ อาการที่เกิดขึ้นระหว่างการใช้ยา YTC ส่วนใหญ่มีอาการ ถ่ายเหลว น้ำหนักลดลง มีผู้ป่วยที่ได้รับยาไม่ครบ 3 เดือน มีสาเหตุต่างๆ กัน ดังนี้ ป่วยด้วยโรคติดเชื้ออื่น แพทย์ให้หยุดยา ไม่มาตามนัด หยุดยาเอง และถึงแก่กรรม

คณะกรรมการศึกษาวิจัยในคนมีความเห็นว่า ขนาดของยา YTC ที่ให้แก่ผู้ป่วยน่าจะมีขนาดสูงเกินไป จึงทำให้เกิดอาการท้องเดินขึ้นในผู้ป่วยหลายราย และผู้ป่วยบางรายมีอาการซีด ดังนั้น หากจะทำการศึกษาในขั้นต่อไปควรลดขนาดของยาลง หรือทำให้สารสกัด YTC ซึ่งยังเป็นสารสกัดหยาบอยู่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยการแยกสกัดเอาสารที่ก่อให้เกิดฤทธิ์ข้างเคียงออกจากสารออกฤทธิ์ เพื่อช่วยลดฤทธิ์ข้างเคียงของยา นอกจากนี้ ควรให้ผู้ป่วยมีการควบคุมความสะอาดของอาหารที่บริโภคอย่างเคร่งครัด

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาวิจัยสารสกัด YTC เพิ่มเติม เพื่อแยกเอาส่วนสกัดย่อยที่ทำให้เกิดอาการข้างเคียงออกไป เหลือแต่ส่วนสกัดย่อยที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV-1 เพื่อจะได้นำมาศึกษาวิจัยด้านพิษวิทยาและประสิทธิผลทางคลินิกต่อไป

จากการศึกษาทางเคมี เพื่อหาสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ของสารสกัด YTC เพื่อประโยชน์ในการใช้ควบคุมคุณภาพของยาที่จะผลิตจากสารสกัดสมุนไพรนี้นั้น ได้เคยมีการแยกสารสกัด YTC ซึ่งเป็นสารสกัดหยาบออกเป็น 5 ส่วนสกัดย่อย ได้แก่ YTC-1, YTC-2, YTC-3, YTC-4 และ YTC-5 แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง (*in vitro* anti-HIV activity) พบว่า เฉพาะสารสกัด YTC-1 และ YTC-2 เท่านั้นที่มีฤทธิ์แรงในการยับยั้งเชื้อเอชไอวี สำหรับส่วนสกัดย่อย YTC-3 มีฤทธิ์อ่อนมาก และส่วนสกัดย่อย YTC-4 และ YTC-5 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง ดังนั้น จึงได้ดำเนินการทดสอบฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบทางเดินอาหารในสัตว์ทดลองของสารสกัด YTC และส่วนสกัดย่อยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ เอชไอวี (YTC-1 + YTC-2) และส่วนสกัดย่อยที่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวี (YTC-3 + YTC-4 + YTC-5) ก่อน เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของระบบทางเดินอาหารในสัตว์ทดลอง พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่มีผลเร่ง GI motility ของสารสกัด YTC อยู่ในส่วนสกัดย่อย YTC-1 ดังนั้น เพื่อลดปัญหาจากฤทธิ์ข้างเคียงของส่วนสกัดย่อย YTC-1 ซึ่งมีผลเพิ่ม GI motility และอาจทำให้เกิดฤทธิ์ข้างเคียงในผู้ป่วยเอดส์ จึงได้แยกสกัดเฉพาะส่วนสกัดย่อย YTC-2 มาศึกษาต่อ ทั้งในด้านความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง

จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดย่อย YTC-2 โดยกรอกสารสกัด YTC-2 ที่เตรียมเป็นยาแขวนตะกอนใน 1% tragacanth แก่หนูขาวในขนาด 2, 20 และ 200 มก./กก./วัน ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 28 วัน สรุปได้ว่า สารสกัด YTC-2 ที่ให้แก่ หนูขาวในขนาด 2 และ 20 มก./กก./วัน เป็นเวลา 28 วัน ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ในขณะที่ สารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน ทำให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง โดยทำให้หนูเจริญเติบโตช้ากว่าและกินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงต่ำกว่าค่าปกติ และทำให้เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), จำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และ %lymphocyte มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ และ สารสกัด YTC-2 ขนาด 200 มก./กก./วัน อาจมีผลต่อการทำงานของตับและตับอ่อน เพราะทำให้ระดับของ ALT และ P-amylase ในซีรั่มเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ไม่พบพยาธิสภาพของอวัยวะทั้งสองที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

จากนั้นได้ดำเนินการศึกษาเพื่อควบคุมคุณภาพและเตรียมยาแคปซูลสารสกัด YTC-2 เพื่อใช้ในการศึกษาประสิทธิผลและความปลอดภัยของสารสกัด YTC-2 ในการรักษาโรคติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์ในขนาด 35-50 มิลลิกรัม วันละ 3 ครั้ง นาน 3 เดือน ในผู้ป่วยเอดส์ที่มี CD4 มากกว่า 200 cells/mm^3 จำนวน 30 ราย โดยมี รูปแบบการวิจัย

เป็นแบบ Phase I / II Clinical Trial และกำหนดเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยและเกณฑ์การเลิกจากการศึกษาผู้ป่วยอย่างชัดเจน การศึกษาใช้ระยะเวลาทั้งสิ้น 7 เดือน โดยในสองเดือนแรกเป็นขั้นการเตรียมการและเตรียมระบบการส่งต่อสิ่งส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ และการตรวจคัดกรองผู้ป่วยตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วย ส่วนระยะ 5 เดือนต่อมาเป็นการศึกษาวิจัยทางคลินิก ซึ่งประกอบด้วยการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการทุก 2 สัปดาห์เป็นเวลา 3 เดือนเพื่อประเมินผลการรักษาและความปลอดภัยของสารสกัด YTC-2 ในระหว่างได้รับยา และหลังหยุดยาแล้ว เดือนละครั้งอีก 2 เดือน ผลการศึกษาพบว่า ยา YTC-2 ไม่ให้ผลการรักษา ทั้งนี้ หลังจากผู้ป่วยได้ยา YTC-2 แล้ว ปริมาณไวรัสในเลือดหลังการรักษามีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเทียบกับก่อนการรักษาอย่างเป็นนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ดี การทดลองนี้ไม่มีกลุ่มควบคุม ดังนั้น ยา YTC-2 อาจสามารถกดการสร้างไวรัสได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม เนื่องจากทั้งสองกลุ่มมีปริมาณไวรัสในเลือดเพิ่มขึ้น แต่กลุ่มได้ยา YTC-2 มีระดับปริมาณไวรัสเพิ่มขึ้นน้อยกว่า การที่จำนวนเซลล์ CD4 T-lymphocytes ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 12 สัปดาห์ แสดงว่า ยา YTC-2 อาจมีผลต่อการกดภูมิต้านทานอย่างมากและเมื่อเลิกใช้ยาจำนวนเซลล์ CD4 T-lymphocytes กลับเพิ่มจำนวนขึ้น แสดงว่า ยา YTC-2 มีผลต่อการกดภูมิต้านทานด้วยถึงแม้จะเป็นแบบผันกลับได้(reversible) ก็ตาม จึงไม่น่าจะเป็นยาที่นำไปทดลองต่อไป

อย่างไรก็ตามแม้ว่าการทดลองทางคลินิกของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำจะยุติลง เนื่องจากผลข้างเคียงของยาสมุนไพร แต่ก็ยังมีสารสกัดสมุนไพรอื่น ๆ ที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคเอดส์ ต้านเชื้อจุลินทรีย์ฉวยโอกาส หรือกระตุ้นภูมิต้านทาน ซึ่งคณะผู้วิจัยก็จะดำเนินการคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรที่มีศักยภาพเพื่อพัฒนาเป็นยาสำหรับผู้ป่วยโรคเอดส์ในโอกาสต่อไป

ตารางที่ 40 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเอชไอวีของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำในหลอดทดลอง

ลำดับ	ชนิดสารสกัด	รหัสตัวอย่าง	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ RT(%)		ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส(%)	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อเอชไอวี(%)
			250 มคก./มล.	IC_{50} มคก./มล.	200 มคก./มล.	ความเข้มข้น(มคก./มล.)/ยับยั้งเชื้อเอชไอวี(%)
1	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นแห้ง	YTA	NA	ND		26.7 มคก./มล./ 68
2	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นแห้ง	YTB	32.4	ND		NA
3	สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง	YTC	NA	ND		8.3 มคก./มล. / 90
4	สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง	YTD	41.6	ND	NA	40.0 มคก./มล. / 34
5	สารสกัดด้วยน้ำลำต้นและใบสด	YTK	95.0	50	50	4,000 มคก./มล. / 80
6	สารสกัดด้วยน้ำลำต้นและใบแห้ง	YTL	84.9	212		250 มคก./มล. / 85
7	สารสกัดด้วยน้ำจากใบสด	YTQ	84.7	219	33.3 มคก./มล./ 90	
8	AZT	-				5.0 มคก./มล. / 94-99

ตารางที่ 41 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคติดเชื้อฉวยโอกาสของสารสกัดสมุนไพรสบู่ดำในหลอดทดลอง

ลำดับ	ชนิดสารสกัด	รหัสตัวอย่าง	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา								ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส
			Candida Albicans(มก./มล.)		Cryptococcus Neoformans(มก./มล.)		Histoplasma capsulatum(มก./มล.)		Penicillium marneffei(มก./มล.)		Herpes simplex ค่าเจือจางที่ทำลายไวรัส (นน./ปริมาตร)
			MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	
1	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นแห้ง	YTA	NA	NA	6.67	6.67	NA	NA	NA	NA	NA
2	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นแห้ง	YTB	NA	NA	3.33	6.67	NA	NA	NA	NA	NA
3	สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง	YTC	NA	NA	1.67	1.67	6.67	NA	NA	NA	1: 57,600
4	สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง	YTD	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด	YTK	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1: 19,200
6	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง	YTL	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	สารสกัดด้วยน้ำจากใบสด	YTQ	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 42 สรุปผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่าง ๆจากสมุนไพรสบู่ดำ

ลำดับที่	ชนิดสารสกัด	รหัสตัวอย่าง	ฤทธิ์ที่ทดสอบ								
			ยับยั้งเอนไซม์RT	ยับยั้งเอนไซม์PT	ยับยั้ง HIV	ต้านเชื้อรา ฉวยโอกาส	ต้านเชื้อ *Salmonella*	ต้านเชื้อ HSV	ต้านเชื้อCMV และ EBV	กระตุ้นและเสริมภูมิคุ้มกันในเซลล์เม็ดเลือดขาว หนูถีบจักร	คน
1	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นแห้ง	YTA	NA	ND	NA	+	ND	NA	ND	++	NA
2	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นแห้ง	YTB	NA	ND	NA	++	ND	NA	NA	+	ND
3	สารสกัดด้วยเอธานอลจากใบแห้ง	YTC	NA	ND	+++	+++	NA	+++	ND	+++	+++
4	สารสกัดด้วยน้ำจากใบแห้ง	YTD	NA	NA	NA	NA	ND	NA	ND	NA	ND
5	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบสด	YTK	+++	+	+	NA	NA	++	NA	NA	NA
6	สารสกัดด้วยน้ำจากลำต้นและใบแห้ง	YTL	++	ND	++	NA	NA	NA	NA	+++	NA
7	สารสกัดด้วยเอธานอลจากลำต้นและใบแห้ง	YTP	ND	ND	+++	ND	ND	ND	ND	+++	+++
8	สารสกัดด้วยน้ำจากใบสด	YTQ	++	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
88/7 ถนนติวานนท์ ต.ตลาดขวัญ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000
โทรศัพท์ : 0-2589-9850-8 โทรสาร : 0-2589-9866
www.dmsc.moph.go.th