ประมวลผลงานวิจัยด้าน

พิษวิทยา

ของสถาบันวิจัยสมุนไพร เล่ม ๒

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข
ISBN 974-7549-44-1

ประมวลผลงานวิจัยด้าน

พิษวิทยา

ของสถาบันวิจัยสมุนไพร

เล่ม ๒

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข

ISBN 974-7549-44-1

ประมวลผลงานวิจัยด้านพิษวิทยาของสถาบันวิจัยสมุนไพร เล่ม 2

โดย

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ.2546

ISBN 974-7549-44-1

ที่ปรึกษา

น.พ.สมทรง รักษ์เผ่า	อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
น.พ.ศิริวัฒน์ ทิพย์ธราดล	รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
น.พ.สุพรรณ ศรีธรรมมา	รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
น.พ.บุญชัย สมบูรณ์สุข	รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
พ.ญ.มยุรา กุสุมภ์	หัวหน้าสำนักวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะบรรณาธิการ

ปราณี ชวลิตธำรง	ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพร
ทรงพล ชีวะพัฒน์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 8ว.
เอมบนัส อัตตวิชญ์	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ 8ว.

พิสูจน์อักษร ทรงพล ชีวะพัฒน์, ทรงพล ผดุงพัฒน์, รัตติพร วสุนันต์

ถ่ายภาพ ทรงพล ชีวะพัฒน์, จารีย์ บันสิทธิ์
บริษัท 1241 มิราคูลัส จำกัด

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการเภสัชเวท ห้องปฏิบัติการพฤษเคมี สถาบันวิจัยสมุนไพร
เอื้อเฟื้อวัตถุดิบสมุนไพรแห้ง

พิมพ์ครั้งที่ 1 ธันวาคม 2546 364 หน้า จำนวน 2,000 เล่ม

พิมพ์ที่ โรงพิมพ์การศาสนา

ออกแบบ บริษัท 1241 มิราคูลัส จำกัด โทรศัพท์ 0-2962-7466-7

ออกแบบรูปเล่ม ทรงพล ชีวะพัฒน์, ฐตินภา นุ่มใส

เจ้าของลิขสิทธิ์ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ประสานงานการจัดพิมพ์ สุธิดา ไชยราช, ฐตินภา นุ่มใส

คำนำ

การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรต่าง ๆ นั้น จำเป็นต้องมีการวิจัยเพื่อหาข้อมูลสนับสนุนด้วยวิธีทางวิทยาศาสตร์ ทั้งด้านสรรพคุณและความปลอดภัยของสมุนไพร และในปัจจุบัน รัฐบาลได้ให้ความสำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อสนับสนุนให้ประชาชนใช้ทดแทนการนำเข้าผลิตภัณฑ์สมุนไพรจากต่างประเทศ และหากพัฒนาให้มีคุณภาพได้มาตรฐานสากล ก็สามารถส่งออกไปยังต่างประเทศได้ ดังนั้นข้อมูลที่จำเป็นอย่างยิ่ง คือ ข้อมูลด้านพิษวิทยาของสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีความพร้อมในการดำเนินการทดสอบความปลอดภัยของสมุนไพรในสัตว์ทดลอง ทั้งสมุนไพรเดี่ยวและยาตำรับ มีรายงานผลการวิจัยด้านพิษวิทยาของสมุนไพรอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการหลายฉบับและเพื่อเป็นการรวบรวมผลงานดังกล่าวให้เป็นรูปเล่ม จึงได้นำตีพิมพ์ในหนังสือ "ประมวลผลงานวิจัยด้านพิษวิทยาของสถาบันวิจัยสมุนไพร เล่ม 1 และ เล่ม 2" เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้อ้างอิง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์หวังว่า ผลงานวิจัยในหนังสือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปพิจารณาร่วมกับข้อมูลด้านอื่น ๆ ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีคุณภาพได้มาตรฐานต่อไป

(นายแพทย์สมทรง รักษ์เผ่า)
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

คำขอบคุณ

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณบรรณาธิการวารสารไทยเภสัชสาร วารสารกรมการแพทย์ วารสารสงขลานครินทร์ สารศิริราช และวารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่อนุญาตให้นำนิพนธ์ต้นฉบับ ซึ่งได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการนั้น ๆ เพื่อนำมารวบรวมและทิมพ์เผยแพร่ใหม่อีกครั้งหนึ่ง เพื่อความสะดวกในการสืบค้นข้อมูลการทดสอบความปลอดภัยในการอ้างอิง

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเภสัชเวทที่ให้ความอนุเคราะห์สมุนไพรเพื่อถ่ายภาพประกอบรูปเล่ม ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาที่ให้ความอนุเคราะห์ถ่ายภาพในห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการจัดพิมพ์และตรวจต้นฉบับหนังสือเล่มนี้

คณะผู้จัดทำ

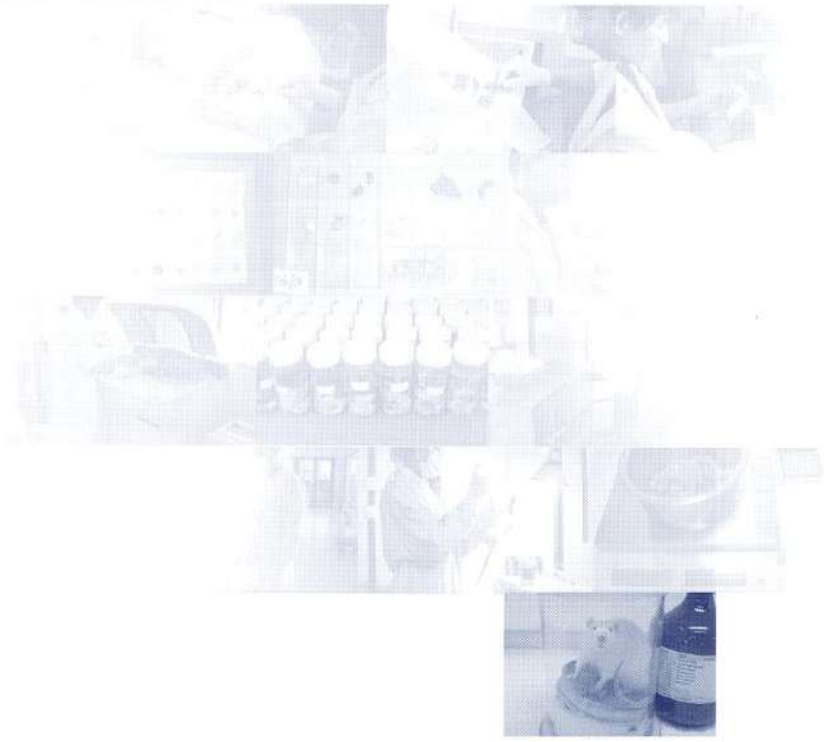
สารบัญ

บทนำ	1
พิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีผลา	7
การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีกฎุก	33
การศึกษาพิษของหมากดิบน้ำค้าง	55
การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดของบอระเพ็ด	67
ความเป็นพิษของเมล็ดเล็บมือนาง	85
การศึกษาพิษของเปลือกโมกหลวง	99
การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดดายขัด	117
Chronic toxicity study of crude extract of *Derris scandens* Benth	129
พิษกึ่งเรื้อรังของแบคทีเรียก่อโรคในแมลง แบซิลลัส สเฟียริคัส เอช-5 สายพันธุ์อยุธยา	141
การศึกษาพิษระยะยาวของเนเจอร์เพล็กในสัตว์ทดลอง	151
พิษวิทยาของกวาวเครือขาว	175
พิษเรื้อรังของแบคทีเรียก่อโรคในแมลง *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์แพร่	199

สารบัญ

พิษเรื้อรังของกวาวเครือแดง	215
Subchronic toxicity of *Cissus quadrangularis* Linn.	231
พิษเรื้อรังของยาเม็ดขี้เหล็ก	245
Chronic toxicity study of curcuminoids in rats	259
พิษเรื้อรังของสารสกัดลูกใต้ใบ	279
Subacute toxicity study of Dihydroartemisinin in Rats	*295*
Acute Toxicity Study of Medicinal Plants Used in the Primary Health Care	315
พิษเรื้อรังของผงใบขี้เหล็กในหนูขาว	323
พิษวิทยาของยาสมุนไพรภูมิพัฒน์	339
Chronic toxicity study of *Portulaca grandiflora* Hook	353
ดรรชนี (ชื่อไทย)	356
ดรรชนี (ชื่อวิทยาศาสตร์)	357

บทนำ



บทนำ

ภ.ญ.ปราณี ชวลิตธำรง
นายสัตวแพทย์ทรงพล ชีวะพัฒน์
สถาบันวิจัยสมุนไพร

การศึกษาวิจัยทางพิษวิทยาของสมุนไพรหรือสารสกัดสมุนไพรที่ดำเนินการโดยสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์นั้นใช้หลักเกณฑ์เช่นเดียวกับการวิจัยทดสอบพิษของยาใหม่ที่ได้จากการสังเคราะห์ (synthetic drugs) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะให้ทราบถึงความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ ยาสมุนไพรในระยะเวลาสั้น หรือเพื่อตรวจหาความเป็นพิษที่เกิดขึ้น กายหลังจากการใช้ยาเป็นเวลานานต่อเนื่องหรือพิษที่เกิดขึ้นภายหลังจากการหยุดใช้ยาสมุนไพร

การศึกษาพิษเฉียบพลันของยาหรือสมุนไพรในสัตว์ทดลองนั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อดูอาการเป็นพิษที่แสดงออกเมื่อสัตว์ทดลอง ได้รับสมุนไพรหรือสารที่ทดสอบจำนวน 1 ครั้งหรือมากกว่า กายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง รูปแบบของยาสมุนไพรที่ให้แก่สัตว์ทดลองนั้นก็จะเตรียมให้ใกล้เคียงกับรูปแบบที่คนรับประทานมากที่สุด เช่น ถ้ารับประทานด้วยการดองเหล้าก็จะสกัดด้วยแอลกอฮอล์แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกให้หมด แต่บางกรณีเป็นยาตำรับที่มีส่วนผสมของสมุนไพรหลายชนิด ซึ่งไม่อาจนำมาป้อนให้แก่หนูทดลองได้เพราะปริมาณมาก อาจต้องนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายก่อนแล้วจึงให้สิ่งสกัดแทนยาตำรับ สัตว์ทดลองที่นำมาใช้ทดสอบมีอย่างน้อย 2 ชนิด คือ พวกฟันแทะ (Rodent) เช่น หนูถีบจักร (Mice), หนูแรท (Rats) ส่วนอีกชนิดหนึ่งเป็นพวก non-rodent

การทดสอบพิษในหนูนั้นจะใช้กลุ่มละ 5 ตัวต่อเพศ โดยจัดให้มีจำนวนกลุ่มเพียงพอที่จะหาขนาดที่ทำให้ตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) ภายหลังจากให้ยาต้องเฝ้าสังเกตอาการพิษต่างๆ เป็นช่วงระยะเวลา โดยติดตามดูจนครบ 7 วัน หรือ 14 วัน หนูที่ตายระหว่างการทดลองหรืออยู่รอดจนครบกำหนดจะต้องถูกผ่าชากชันสูตรเพื่อหาความผิดปกติของอวัยวะภายใน ถ้าพบการเปลี่ยนแปลงที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าก็ควรที่จะมีการตรวจหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาเพิ่มเติมซึ่งจะทำให้ทราบถึงอวัยวะเป้าหมาย ของการเกิดพิษได้

ในการศึกษาพิษระยะยาว (Long-term toxicity test) ของยาสมุนไพรนั้น ระยะเวลาที่ให้ยาแก่สัตว์ทดลองขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการใช้ยาในทางคลินิก เช่น คนรับประทานยาเป็นเวลานานตั้งแต่ 1 ถึง 4 สัปดาห์ ก็ต้องดำเนินการทดลองให้ยาแก่สัตว์ทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์จนถึง 3 เดือน ถ้าใช้ยานาน 1 เดือนจนถึง 6 เดือน ต้องทดลองในสัตว์นาน 3 ถึง 6 เดือน เป็นต้น ซึ่งเกณฑ์ของระยะเวลา ที่ใช้ในการศึกษาพิษนี้ก็ยังแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ

ขั้นตอนดำเนินการศึกษาพิษระยะยาวโดยสรุปมีดังนี้

1. การกำหนดขนาดยาให้สัตว์ทดลอง ควรแบ่งให้มีกลุ่มทดลองยา 3 ระดับ คือกลุ่มที่ได้รับยาในขนาดที่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่บ่งชี้ความเป็นพิษ (no-effect dose) กลุ่มที่ได้รับยาในขนาดที่ก่อให้เกิดพิษอย่างชัดเจน และกลุ่มที่ได้รับยาอยู่ในช่วงขนาด ยา 2 ระดับดังกล่าว เพื่อดูการตอบสนองต่อยาแบบ dose-response relationship นอกจากนี้อาจต้องจัดให้มีกลุ่ม recovery เพื่อติดตามดูว่าความผิดปกติที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับยาจะกลับคืนสู่ปกติหรือไม่เมื่อหยุดให้ยาในช่วงเวลาที่กำหนดให้

วิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีการหาค่า HLV โดยใช้ค่า NOAEL หารด้วยค่า assessment factors ที่คำนวณจากวิธี probabilistic multiplication

การวิจัยพิษเรื้อรังของสมุนไพรในหนูแรทของการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรแต่เดิมนั้น ได้ใช้เวลาในการกรอกยานาน 9 เดือนขึ้นไปถึง 1 ปี ในขณะที่การศึกษาพิษกึ่งเรื้อรัง จะให้ยานาน 6 เดือน แต่ในปัจจุบันจาก ICH guidelines ได้กำหนดไว้ว่าการศึกษาพิษเรื้อรังของยาในหนูแรท ให้กรอกยาแก่หนูอย่างน้อย 6 เดือนก็เพียงพอ เพราะการใช้ยานานกว่านี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะภายในเนื่องจากอายุที่เพิ่มขึ้น(Age-related disease) เกิดขึ้นด้วย ทำให้มีปัญหากับการแปลผลการศึกษาความผิดปกติของเซลล์อวัยวะภายในที่ตรวจพบนั้นว่าเกิดจากความเป็นพิษของตัวยาหรือเนื่องจากอายุที่เพิ่มขึ้น เช่น มะเร็ง หรือ เนื้องอกบางอย่าง จะมีอุบัติการสูงขึ้นในหนูที่อายุมาก

ดังนั้นในระยะหลังงานวิจัยพิษเรื้อรังของสมุนไพรในหนูแรทของสถาบันวิจัยสมุนไพร จึงใช้เวลาในการให้ยานาน 6 เดือน ส่วนรายงานการวิจัยความเป็นพิษของสมุนไพรที่ใช้เวลาศึกษา 6 เดือน โดยกล่าวว่าเป็นการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังนั้น ตามมาตรฐาน ICH guideline อาจถือว่าเป็นการศึกษาพิษเรื้อรังได้

การดูแลสัตว์ทดลองของการทดสอบด้านพิษวิทยาของสถาบันวิจัยสมุนไพรปฏิบัติตาม Guide for the Care and Use of Laboratory Animals ของ Institute of Laboratory Animals Resources Commission on Life Sciences National Research Council

การดูแลสัตว์ที่ทำการทดลองจะต้องคำนึงถึงทางด้านสิ่งแวดล้อมกายภาพ (Physical Environment) ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ, ความชื้น, อากาศ ส่วนประกอบของอากาศ สภาพห้อง อาหาร สิ่งแวดล้อมภายนอกซึ่งเชื่อมกันโดยการถ่ายเทอากาศ เพราะว่าสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ สามารถทำให้เกิดการ metabolism และเกิดโรคต่าง ๆได้

ภาชนะหรือกรงที่ใช้จะต้องเหมาะสำหรับความต้องการสรีระพื้นฐาน และพฤติกรรมเช่น การขับถ่าย, การควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย การเคลื่อนไหวตามปกติ, การปรับตัวทางสังคมของสัตว์ จะต้องให้สัตว์สะอาด มีการถ่ายเทของอากาศ มีความปลอดภัยไม่มีอันตราย ไม่มีสิ่งมีคมที่เกิดอันตราย มีอาหารและน้ำที่สะอาดเพียงพอ สามารถสังเกตุอาการต่าง ๆได้โดยไม่รบกวนสัตว์

ในสัตว์แทะ(หนู) ที่ทำการทดลองจะปูพื้นกรงซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และในการทดลองของสถาบันวิจัยได้จัดสภาพแวดล้อม พื้นที่กรง อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ การถ่ายเทอากาศ แสงสว่าง อาหารที่กิน น้ำ เสียง และการสังเกตอาการจะไม่รบกวนสัตว์ และห้องของสัตว์ทดลองแยกส่วนจากที่ทำงานของคนโดยปฏิบัติตามข้อกำหนดที่กล่าว

หนังสือเล่มนี้ได้รวบรวมผลงานวิจัยการศึกษาพิษของพืชสมุนไพร สารสกัดและยาตำรับต่าง ๆ ที่มีสรรพคุณกล่าวอ้างไว้ในตำรายาแผนโบราณหรือที่มีรายงานการศึกษาว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ตั้งแต่ครั้งยังเป็นกองวิจัยทางแพทย์ (พ.ศ. 2495-2533) และกองวิจัยพัฒนาสมุนไพร (พ.ศ. 2533 - 2540) จนกระทั่งเป็นสถาบันวิจัยสมุนไพรตั้งแต่ปี พ.ศ.2540 เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการนำยาสมุนไพรไปใช้ในการรักษาโรคหรือบรรเทาอาการต่าง ๆ ได้อย่างปลอดภัย รวมทั้งเป็นข้อมูลทางด้านพิษวิทยาอันจะเป็นประโยชน์สำหรับการค้นคว้าวิจัย อ้างอิงและเป็นแนวทางในการพัฒนาสมุนไพรต่อไป ●

2. การสังเกตอาการและการตรวจหาการเปลี่ยนแปลง ต่างๆ (Observations and examinations) ได้แก่
2.1 อาการทั่วไป น้ำหนักตัวและน้ำหนักอาหาร ที่สัตว์ทดลองกิน
2.2 การตรวจค่าทางโลหิตวิทยา ในหนูทดลองมักเก็บตัวอย่างเลือดก่อนการผ่าชันสูตร
2.3 การตรวจค่าเคมีในเลือด เพื่อดูค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น การทำงานหน้าที่ของตับ และไต ใน rodents อาจทำการตรวจวิเคราะห์น้ำปัสสาวะ (Urinalysis) ร่วมด้วยโดยตรวจปัสสาวะก่อนให้ยาและในระหว่างให้ยา
3. การผ่าชากชันสูตรเมื่อครบกำหนดของการบริหารยา สัตว์ทดลองที่อยู่รอดจนครบกำหนดต้องนำมาผ่าชาก เพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic lesions) ชั่งน้ำหนักอวัยวะภายใน และนำอวัยวะภายในมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathological study)
4. การตรวจอื่นๆ เช่น การตรวจตา ตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (อาจกระทำได้ตามความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการ) เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม
5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาพิษระยะยาวในสัตว์ทดลอง ได้แก่พิษกึ่งเรื้อรัง (subchronic toxicity) และพิษเรื้อรัง (chronic toxicity) จะนำไปสู่การประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของคน (Human risk assessment) โดยทำให้ทราบถึงขนาดของยาหรือสารที่ไม่ทำให้เกิดผลอันไม่พึงปรารถนาที่พบจากการทดลอง หรือหมายถึงขนาดสูงสุดของยาที่ให้แล้วไม่ทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เรียกว่า NOAEL (no-observed-adverse-effect-level)

ค่า NOAEL จะมีประโยชน์ในการใช้ในการคำนวณ (Extrapolation) หาขนาดของยาที่เหมาะสมต่อคน ซึ่งเรียกเป็นคำรวมๆว่า Human limit values (HLV)

สมการที่ใช้หาค่า HLV = NOAEL/ AF_{tot}

โดยที่ $AF_{tot} = AF_1 \cdot AF_2 \ldots\ldots AF_n$

ตัวอย่างของ HLV ที่รู้จักกันดีได้แก่ Acceptable Daily Intake (ADI) และ Reference Dose (RfD) เป็นต้น

ค่า ADI ได้จากการคำนวณโดยนำค่า NOAEL ที่ได้จากสัตว์ทดลองหารด้วย safety factors หรือ assessment factors ซึ่งโดยทั่วไปมักใช้ค่าตัวเลข 100 เป็นตัวหาร (default factor) เพราะมีความไม่แน่นอน (Uncertainty) หลายประการได้แก่

- ความหลากหลายภายใน species เดียวกันเอง
- ความแตกต่างของการไวต่อยาระหว่างสัตว์และคน
- ความผันแปรของการไวต่อยาในกลุ่มประชากรคน
- จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทดสอบน้อยมากเมื่อเทียบกับขนาดของประชากรมนุษย์ที่จะได้รับยาหรือสารเคมี
- ความลำบากในการประมาณค่าที่คนได้รับ
- ความเป็นไปได้ในการเกิดการเสริมฤทธิ์ของสารเคมีต่างๆ หลายชนิดที่มีอยู่ในอาหาร

องค์การอาหารและยาของสหรัฐยังได้กำหนดให้หารเพิ่มด้วยตัวเลข 10 (additional factor) เมื่อต้องประเมินค่าของ ADI จากข้อมูลการทดสอบพิษระยะสั้น (short-term toxicity data) นอกจาก

6/3

พิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีผลา

Subacute Toxicity of Traditional Medicinal Tripala

ปราณี ชวลิตธำรง[*], *เอมมนัส อัตตวิชญ์*[*]
พัช รักษามั่น[*], *ปราณี ขันทเพ็ชร*[**]

[*]กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร

[**]กองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

ตรีผลาเป็นยาแผนโบราณมหาพิกัดซึ่งใช้ในคัมภีร์นัตถุ (ฤดูร้อน) มีส่วนประกอบของสมุนไพร 3 ชนิด คือ ลูกสมอพิเภก ลูกสมอไทย และลูกมะขามป้อม อัตราส่วนของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดจะแตกต่างกันขึ้นกับกองสมุฏฐานโรค ในกรณีแก้ปิตตะสมุฏฐาน สำหรับรักษาอาการป่วยด้วยธาตุไฟในฤดูร้อน อัตราส่วนของสมุนไพรจะเป็น 12 : 8 : 4 ตำรับแก้วาตะสมุฏฐานรักษาอาการป่วยด้วยธาตุลมในฤดูร้อนมีอัตราส่วนของสมุนไพรคือ 4 : 12 : 8 และตำรับแก้เสมหะสมุฏฐานรักษาอาการป่วยด้วยโรคธาตุน้ำในฤดูร้อนมีอัตราส่วนคือ 8 : 4 : 12

จากการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์โดยการป้อนสารสกัดด้วยน้ำในขนาด 0.36, 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน เป็นระยะเวลา 10 วัน หรือคิดเป็น 1, 8 และ 64 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน พบว่าสารสกัดยาแผนโบราณตรีผลาตำรับแก้วาตะและเสมหะสมุฏฐาน ทำให้หนูเกือบทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายและการกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ขณะที่ยาแผนโบราณตรีผลาตำรับแก้ปิตตะสมุฏฐานขนาดสูงทำให้หนูเพศผู้มีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายน้อยกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งอาจเป็นผลจากปริมาณสารแทนนินซึ่งมีอยู่มากในสมุนไพรทั้งสามชนิดที่เป็นองค์ประกอบของยาตรีผลา การตรวจค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาว พบว่าสารสกัดตำรับแก้วาตะสมุฏฐานทุกขนาดทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวในหนูเพศเมียลดลง แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้ ส่วนสารสกัดยาตรีผลาตำรับแก้ปิตตะและเสมหะสมุฏฐานไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาว ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมีพบว่าสารสกัดทุกตำรับในขนาดสูงทำให้ระดับโปรตีนรวมและ BUN ของหนูเพศผู้มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในหนูเพศเมียสารสกัดตำรับแก้ปิตตะสมุฏฐานในขนาดสูงก็มีผลลดระดับโปรตีนรวมและ BUN เช่นกัน ซึ่งผลต่อค่าโปรตีนรวมและ BUN นั้นอาจเนื่องมาจากสารแทนนินในสารสกัด นอกจากนี้สารสกัดตรีผลาตำรับแก้ปิตตะและวาตะสมุฏฐานทุกขนาด ทำให้ชีรั่มกลอบูลินในหนูเพศผู้ลดลงอย่างมีความสัมพันธ์กับขนาดที่ให้

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 33 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม-กันยายน 2539 หน้า 168-191.

ส่วนสารสกัดตำรับแก้เสมหะสมุฏฐาน ขนาด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน ก็มีผลลดระดับซีรั่มกลอบูลินในหนูเพศผู้ และสารสกัดตำรับแก้ปิดตะสมุฏฐานในขนาดเดียวกัน มีผลลดระดับซีรั่มกลอบูลินในหนูเพศเมียเช่นกัน หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดตรีผลาตำรับแก้ปิดตะและเสมหะสมุฏฐานขนาด 23.04 ก./กก./วัน มีค่าซีรั่มครีอาตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดตรีผลาตำรับแก้วาตะสมุฏฐานขนาดเดียวกันมีค่าครีอาตินินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาแสดงให้เห็นว่าตับและไตของหนูเพศเมียมีความไวต่อพิษของสารสกัดมากกว่าหนูเพศผู้ โดยหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดตำรับแก้ปิดตะสมุฏฐานในขนาด 23.04 ก./กก./วัน มีอัตราการเกิด fatty change ของตับและ nephrocalcinosis มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมและหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดตำรับแก้วาตะสมุฏฐานทุกขนาดมีอัตราการเกิด nephrocalcinosis และ hydrocalyx สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุม ส่วนหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดตำรับแก้เสมหะสมุฏฐานพบว่าอัตราการเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ของตับและไตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งพิษต่อตับหรือไตของสารสกัดตรีผลานั้นอาจเนื่องมาจากสารแทนนิน

ABSTRACT

Tripala, a preparation of Thai traditional medicine used to adjust patient's element during summer, is composed of dried fruits of three medicinal plants, namely *Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Phyllanthus emblica* at different ratios based on traditional diagnosis of patients. Pitta formula of Tripala, used to normalize the fire element in summer, consists of 12 parts of *T. bellerica*, 8 parts of *T. chebula* and 4 parts of *P. emblica*. Wata formula of Tripala, for the treatment of wind element in summer, is composed of 4 parts of *T. bellerica*, 12 parts of *T. chebula* and 8 parts of *P. emblica*. Samha formula of Tripala, for the treatment of water element in summer, contains 8 parts of *T. bellerica*, 4 parts of *T. chebula*, and 12 parts of *P. emblica*.

Subacute toxicity studies of water extracts of the three formulae of Tripala were performed in Wistar rats. The extracts were administered orally once daily for ten days at the doses of 0.36, 2.88 and 23.04 g of crude drug/kg BW/day, equivalent to 1, 8 and 64 folds of therapeutic dose, respectively. It was found that almost all of the groups of animals treated with Wata and Samha extracts had lower body weight and food consumption than those of the controls, while only male rats treated with high dose Pitta extract had lower body weight than the controls. These findings may be the result of a relatively high tannin content present in the three components of Tripala. Hematological studies showed that all groups of female rats receiving Wata extract had decreased white blood cell numbers that were not correlated with the doses of the extract, while the extracts of Pitta and Samha formulas did not appear to affect any hematological parameters of the animals.

Biochemical studies of the serum samples indicated that the high dose of the three extracts caused a significant reduction of total plasma protein and BUN levels in male rats. Similarly, female rats treated with the high dose of Pitta extract had a reduction of total protein and BUN levels. The effect of Tripala extracts on these two biochemical parameters is also likely to be due to tannin. In addition, all groups of male rats treated with Pitta and Wata extract at the doses of 2.88 and 23.04 g/kg/day also significantly decreased serum globulin levels in male rats, while similar result was observed in female rats treated with the same doses of Pitta extract. Both male and female rats receiving 23.04 g/kg/day of Pitta and Samha extracts had significantly lower serum creatinine levels than that of the controls. In contrast, the same dose of Wata extract caused a significant increase of serum creatinine levels. Histopathological examinations of liver and kidney tissue specimens indicated that the female was more susceptible to toxic effects of Tripala extracts than the male. In female rats treated with 23.04 g/kg/day of Pitta extract, the incidence of fatty change of the liver and nephro calcinosis was significantly higher than that of the control group, while all groups of female rats receiving Wata extract had a higher incidence of nephrocalcinosis and hydrocalyx than that of controls. In contrast, pathological findings of animals treated with Samha extract were not different from those of the controls. The high content of tannin may account for the observed hepatotoxic and nephrotoxic effect of Tripala extracts.

Keywords : Traditional medicine, Toxicity, Rat, *Terminalia bellerica, Terminalia chebula, Phyllanthus emblica*

บทนำ

ตรีผลาเป็นยาแผนโบราณมหาพิกัดซึ่งใช้ในคัมภีร์ฤดู (ฤดูร้อน) มีส่วนประกอบของสมุนไพร 3 ชนิด คือ ลูกสมอพิเภก ลูกสมอไทย และลูกมะขามป้อม อัตราส่วนของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด จะแตกต่างกันขึ้นกับกองสมุฏฐานโรค ในกรณีเสมหะสมุฏฐาน (รักษาอาการป่วยด้วยโรคธาตุน้ำในฤดูร้อน) มีอัตราส่วน คือ ลูกสมอพิเภก 8 ส่วน ลูกสมอไทย 4 ส่วน และลูกมะขามป้อม 12 ส่วน ตำรับแก้วาตะสมุฏฐาน (รักษาอาการป่วยด้วยธาตุลมในฤดูร้อน) มีอัตราส่วนของสมุนไพรคือ ลูกสมอพิเภก 4 ส่วน ลูกสมอไทย 12 ส่วน และลูกมะขามป้อม 8 ส่วน และตำรับแก้ปิตตะสมุฏฐาน (รักษาอาการป่วยด้วยธาตุไฟในฤดูร้อน) มีอัตราส่วนของสมุนไพรคือ ลูกสมอพิเภก 12 ส่วน ลูกสมอไทย 8 ส่วน และ ลูกมะขามป้อม 4 ส่วน[1]

สมอพิเภก มีชื่ออื่นคือ ชิบะดู่ (กะเหรี่ยง-เชียงใหม่), ลัน (เชียงราย), สมอแหน (ภาคกลาง), สะลู้ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), แหน, แหนขาว, แหนต้น (ภาคเหนือ) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia bellerica* Roxb. เป็นพืชในวงศ์ Combretaceae[2] มีสรรพคุณทางยาตามตำรา

ยาแผนโบราณคือ ผลดิบรับประทานเป็นยาระบาย ผลสุกเป็นยาสมาน รักษาโรคท้องมาน โรคริดสีดวง[3] ประเทศพม่าใช้ผลแห้งในการรักษาอาการไอ และโรคตา[4] ในอินโดจีนใช้เป็นยาฝาดสมาน และยาบำรุง ส่วนผลสดใช้เป็นยาถ่าย[5] จากการศึกษาทางเคมีพบว่าในผลของสมอพิเภกประกอบด้วย β-sitosterol, gallic acid, ellagic acid, ethyl gallate, galloyl glucose, chebulagic acid, mannitol, glucose, galactose, fructose, rhamnose[5], cardiac glycoside[6] และ bellericoside[7] จากรายงานการศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่า β-sitosterol ซึ่งเป็นสารที่พบในส่วนประกอบของยาตรีผลามีฤทธิ์ลดการดูดซึมของโคเลสเตอรอล และลดความเข้มข้นของโคเลสเตอรอลในเลือด[8] ในทางยาใช้เป็นยาลดไขมัน (hypolipidaemic agent) และใช้ในรายที่มีความผิดปกติของ prostate gland[9] gallic aicd เคยใช้เป็น astringent และ styptic ในยาสัตว์ใช้เป็น intestinal astringent[10] ellagic acid ใช้เป็น astringent และใช้ภายนอกเป็น hemostatic[9] นอกจากนี้พบว่าสารสกัดด้วยเอธานอลของสมอพิเภกช่วยเพิ่มการขับน้ำดี (increase bile flow) ในสุนัขและทำให้ความดันโลหิตลดลงจนอาจถึงตายได้ และขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) เท่ากับ 4.25 ก./กก. เมื่อให้ทางปาก แต่สารสกัดด้วยน้ำของสมอพิเภกมีผลน้อยต่อการขับน้ำดีและทำให้ความดันโลหิตลดลงเล็กน้อย และเมื่อป้อนสารสกัดในหนูถีบจักรขนาด 5 ก./กก. ไม่ทำให้เกิดอาการพิษ[11]

สมอไทยมีชื่ออื่นว่า ม่าแน่ (กะเหรี่ยง-เชียงใหม่), สมออัพยา (ภาคกลาง), หมากแน่ะ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Terminalia chebula* Retz. เป็นพืชในวงศ์ Combretaceae[2] มีสรรพคุณทางยาตามตำรายาแผนโบราณคือ ลูกรับประทานเป็นยาระบายถ่ายเสมหะแก้เสมหะเป็นพิษ แก้บิด แก้ไข้ แก้ดีพิการ ดีพลุ่ง ดีเดือด นอนสะดุ้ง หลับผวา[3] จากการศึกษาทางเคมีพบว่าผลของสมอพิเภกประกอบด้วย β-sitosterol, gallic acid, ellagic acid, ethyl gallate, galloyl glucose, chebulagic acid, mannitol, glucose, galactose, fructose, rhamnose[5], chebulenic acid, tannic acid[12], terchebin[13], brevifolin และ chebulic acid[14] จากรายงานการศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่าสารสกัดจากสมอไทยสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Samonella และ Shigella[15] และสารที่ออกฤทธิ์เป็นยาระบายของสมอไทยมีฤทธิ์คล้าย sennoside A[16] นอกจากนี้มีการศึกษาพิษของสมอไทยในหนูขาว พบว่าทำให้เกิดแผลที่ตับ ไต และยังทำให้เกิดความผิดปกติของ central vein[17]

มะขามป้อม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Phyllanthus emblica* Linn. (*Emblica officinale* Gaertn.) เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae[2] มีสรรพคุณทางยาตามตำรายาแผนโบราณ คือ ลูกตากแห้งต้มกิน แก้ไข้ แก้ไอ น้ำคั้นจากผลรับประทานแก้ท้องเสีย ขับปัสสาวะ หยอดตารักษาเยื่อตาอักเสบ[3] จากรายงานการศึกษาทางเคมีพบว่าผลมีส่วนประกอบคือ ascorbic acid[18,19] trigalloylglucose, terchebin, corilagin, ellagic acid[20], chebulagic acid, chebulinic acid, 3, 6-digalloylglucose, glucogallin, gallic acid[21] และ amino acids (glutamic acid, proline, aspartic acid, alanine, lysine, cystine)[22] จากรายงานการศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่า chebulagic acid แสดง cytotoxicity ต่อ melanoma cells[23] และยับยั้งเอนไซม์

topoisomerase I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการแบ่งตัวเซลล์[24] นอกจากนี้พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของใบมะขามป้อมโดยวิธีการของ Shibata และคณะ และ Taesotikul และ Kanjanapothi พบว่าสามารถลดความดันในหนูขาวได้[25] จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูถีบจักรเมื่อให้สารสกัดด้วยน้ำของใบมะขามป้อมในขนาด 0.1 และ 0.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 10 สัปดาห์ พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนู แต่พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักอวัยวะภายในของหัวใจ ปอด ตับ และมีการเพิ่มของระดับ SGPT ในซีรั่ม เมื่อให้สารสกัดแก่หนูถีบจักรทางปากในขนาด 20 ก./กก. ไม่เกิดอาการพิษในสัตว์ทดลอง และเมื่อฉีดสารสกัดทางช่องท้องของหนูถีบจักร พบว่าขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรเพศผู้ตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) เท่ากับ 0.415 ก./กก. ส่วนหนูถีบจักรเพศเมียมีค่าเท่ากับ 0.288 ก./กก.[26]

นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ลดโคเลสเตอรอลของสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของตรีผลาในกระต่ายที่ได้รับโคเลสเตอรอลกับสมอพิเภก, โคเลสเตอรอลกับสมอไทย, หรือโคเลสเตอรอลกับมะขามป้อม หรือโคเลสเตอรอลอย่างเดียว พบว่าระดับโคเลสเตอรอลในซีรั่มของกระต่ายที่ได้รับสมอพิเภก สมอไทย หรือมะขามป้อมร่วมกับโคเลสเตอรอลมีค่าน้อยกว่ากลุ่มที่ป้อนโคเลสเตอรอลอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ[27]

การศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณมหาพิกัดตรีผลา แก้ปิตตะสมุฏฐาน แก้วาตะสมุฏฐานและแก้เสมหะสมุฏฐานในหนูขาว เพื่อให้ทราบถึงความปลอดภัยของยานี้อันจะทำให้เกิดความมั่นใจในการใช้ยาแผนโบราณตรีผลาและทำให้ทราบข้อควรระวังในการใช้ยา

วัตถุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ (Wistar rat) เพศละ 110 ตัว เพศผู้ น้ำหนักตัว 230±20 กรัม เพศเมีย น้ำหนักตัว 200±20 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงในห้องทดลองที่มีอุณหภูมิ 25±1°C ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด และน้ำประปาที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

สมุนไพร

ซื้อจากร้านขายสมุนไพรแล้วตรวจสอบโดยฝ่ายเภสัชเวท กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร นำมาล้างให้สะอาด อบแห้งที่ 60°C บดเป็นผงหยาบเพื่อเตรียมสกัดให้สัตว์ทดลอง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัด

สำหรับการเตรียมสารสกัดของยาตรีผลาแต่ละตำรับ นำสมุนไพรที่บดหยาบแล้วทั้งสามชนิดในอัตราส่วนที่แสดงในตารางข้างล่างมาต้มสกัดด้วยน้ำ โดยวิธี reflux นำสารสกัดที่ได้ไประเหยให้เข้มข้นโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ ก่อนทำการทดลองนำสารสกัดเข้มข้นที่ได้มาทำให้เจือจางในความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้น้ำ

สมุฏฐาน	อัตราส่วนของสมุนไพร		
	สมอพิเภก	สมอไทย	มะขามป้อม
ปิตตะ	12	8	4
วาตะ	4	12	8
เสมหะ	8	4	12

ในการคำนวณขนาดของยาที่ป้อนให้แก่หนูนั้น คำนวณจากขนาดที่ใช้ในคน (therapeutic dose, TD) โดยคิดว่าคนน้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม ใช้ยาตรีผลาในรูปของยาต้ม 1 ชุดซึ่งมีตัวยาอยู่ 24 ส่วน น้ำหนักส่วนละ 1 สลึงหรือ 3.75 กรัม รับประทานติดต่อกัน 5 วัน คิดเป็นขนาดใช้ในคน (1TD) 0.36 ก./กก./วัน และกรอกให้แก่สัตว์ทดลองในขนาด 1, 8 และ 64 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน

2. การทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีผลา

แบ่งหนูขาวออกเป็นกลุ่มโดยวิธีสุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูเพศละ 10 ตัว จำนวน 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ป้อนน้ำยาสารสกัด 0.36 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัมต่อวัน (ก./กก./วัน) หรือคิดเป็น 1 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน กลุ่มที่ 2 ป้อนน้ำยาสารสกัด 2.88 ก./กก./วัน หรือคิดเป็น 8 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน กลุ่มที่ 3 ป้อนน้ำยาสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน หรือคิดเป็น 64 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุม ป้อนน้ำ 10 มล./กก. ทุกวันเป็นเวลา 10 วัน ในระหว่างการทดลอง บันทึกน้ำหนักตัว และปริมาณอาหารที่หนูขาวรับประทานทุก 2 วัน และสังเกตการเปลี่ยนแปลงต่างๆ

เมื่อครบกำหนดเวลาทำการทดสอบ 10 วันแล้ว ทำการสลบหนูขาวด้วยอีเธอร์ เจาะเลือดจากเส้นเลือด inferior vena cava เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ ค่าร้อยละฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด โดยนับจาก counting chamber และตรวจค่าทางชีวเคมี ได้แก่ ค่า serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) และค่า serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) โดยวิธีของ Henry และคณะ[28] ค่า alkaline phosphatase (ALP) โดยวิธีของ Bowers และคณะ[29] ค่า creatinine โดยวิธี Jaffe's reaction ค่า blood urea nitrogen (BUN) โดยวิธี diacetylmonoxime ค่าโคเลสเตอรอล โดยวิธี enzymatic reaction ค่าโปรตีนรวม โดยวิธี Biuret ค่าอัลบูมินโดยวิธี dye binding กับ bromcresol green ค่ากลอบูลิน โดยหักค่าของอัลบูมินออกจากค่าโปรตีนรวม[30]

นอกจากนั้นทำการผ่าชันสูตรตรวจดูพยาธิสภาพที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายใน ได้แก่ หัวใจ ไต ปอด หลอดลม ต่อมธัยรอยด์ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน ลำไส้ ม้าม กระเพาะปัสสาวะ และอัณฑะ (หรือรังไข่และมดลูก) โดยพิจารณาตำแหน่ง รูปร่าง สี ขนาดของอวัยวะต่างๆ แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ จากนั้นเก็บอวัยวะภายในต่างๆ ใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน แล้วนำตับและไต ไปเตรียมสไลด์ของเนื้อเยื่อโดยย้อมสี hematoxylin และ eosin เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์ต่อไป

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยสถิติเชิงพรรณนาทดสอบสมมติฐานโดยใช้วิธี one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan multiple range test ที่ $p < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS/PC

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีผลาแก้ปิตตะสมุฏฐาน

การเจริญเติบโตและการกินอาหาร *(ตารางที่ 1)*

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายน้อยกว่าแต่มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูที่ได้รับสารสกัด 2.88 ก./กก./วัน กินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

หนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 2.88 ก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน กินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา *(ตารางที่ 2)*

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.36 ก./กก./วัน มีค่าฮีมาโตคริตต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 2.88 ก./กก./วัน มีค่าจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมี *(ตารางที่ 3)*

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีค่าโปรตีนรวมและกลอบูลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 23.04 ก./กก./วัน มีค่าครีอาตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ค่าอัลบูมินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูที่ได้รับสารสกัด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน มีค่า BUN ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

หนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีค่าโปรตีนรวมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมเช่นเดียวกับในหนูเพศผู้ และหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน มีค่ากลอบูลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับหนูที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีค่า SGOT, BUN และโคเลสเตอรอลต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 23.04 ก./กก./วัน มีค่าครีอาตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการผ่าชากชันสูตรของหนูขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีชีวิตรอดจนสิ้นสุดการทดลอง

พบว่าไม่เกิดพยาธิสภาพที่เห็นได้ของอวัยวะภายในที่มองเห็นด้วยตาเปล่าในหนูขาวทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุม

ส่วนอวัยวะภายในเมื่อคำนวณเป็นน้ำหนักสัมพัทธ์ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม *(ตารางที่ 6)* พบว่าหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.36 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของหัวใจน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตทั้งสองข้าง กระเพาะปัสสาวะ ตับ ม้าม และปอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

หนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.36 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของปอดมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของม้ามสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา *(ตารางที่ 9)*

พบว่าหนูขาวเพศผู้กลุ่มควบคุมจำนวน 10% เกิด fatty change ที่ตับ หนูที่ได้รับสารสกัด 0.36, 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน ปรากฏการขยายตัวของ calyx ของไตเนื่องจากมี cyst ในส่วนของ cortex (hydrocalyx) ที่ไต 20%, 30% และ 20% ตามลำดับ ในหนูเพศเมีย กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน เกิด fatty change ที่ตับ 30% กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน ปรากฏ nephrocalcinosis หรือการตกตะกอนของแคลเซียม ฟอสเฟตใน renal tubule 20%, 20% และ 60% ตามลำดับ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 2.88 ก./กก./วัน ปรากฏ hydrocalyx ที่ไต 10%, 10% และ 20% ตามลำดับ

วิจารณ์

จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีผลาตำรับแก้ปัตตะสมุฏฐานสำหรับรักษาอาการป่วยด้วยธาตุไฟในฤดูร้อนในหนูขาวพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่มมีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอาหารที่กินแตกต่างจากกลุ่มควบคุมบ้าง แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้ ดังนั้นไม่น่าจะเกิดจากผลของสารสกัด ในทำนองเดียวกันการลดลงของค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว ค่าซีรั่มครีอาตินิน SGOT และโคเลสเตอรอล และการเพิ่มขึ้นของซีรั่มอัลบูมิน ก็พบในหนูที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่ม หรือในหนูเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น รวมทั้งไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงนี้จึงไม่น่าจะเกิดจากผลของสารสกัด

การตรวจซีรั่มทางชีวเคมีพบว่า หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดมีค่าโปรตีนรวมลดลงอาจเกิดจากการดูดซึมโปรตีนลดลงหรือสารสกัดซึ่งมีแทนนินอยู่มากอาจตกตะกอนโปรตีนในอาหาร ทำให้สัตว์ทดลองได้รับโปรตีนน้อยลงหรือเกิดจากการสังเคราะห์โปรตีนลดลง[30] ซึ่งการลดลงของโปรตีนรวมอาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดในขนาดสูงมี BUN และกลอบูลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายใน หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตทั้งสองข้าง กระเพาะปัสสาวะ ตับ ม้าม และปอด มากกว่ากลุ่มควบคุม อาจเนื่องจากน้ำหนักในวันสุดท้ายของหนูกลุ่มนี้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่ในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีอัตราการเกิด fatty change ที่ตับ และ nephrocalcinosis มากกว่ากลุ่มควบคุม

2. ผลการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีผลาตำรับแก้วาตะสมุฏฐาน

การเจริญเติบโตและการกินอาหาร *(ตารางที่ 1)*

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายน้อยกว่ากลุ่มควบคุม และหนูขาวที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ และหนูที่ได้รับสารสกัด 2.88 ก./กก./วัน กินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวในวันสุดท้าย และน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูที่ได้รับสารสกัด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน กินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา *(ตารางที่ 2)*

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดทุกขนาดมีค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่หนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 23.04 ก./กก./วัน มีค่าร้อยละฮีมาโตคริตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และในหนูขาวที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจซีรั่มทางชีวเคมี *(ตารางที่ 4)*

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 2.88 ก./กก./วัน มีค่า SGPT ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูขาวที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีค่าครีอาตินินสูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่มีค่าโคเลสเตอรอลและโปรตีนรวมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูที่ได้รับสารสกัด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน มีค่า BUN ต่ำกว่ากลุ่ม

ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่ได้รับสารสกัด 0.36 ก./กก./วัน มีค่าอัลบูมินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีค่าเกลือบูลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีค่า SGPT และครีอาตินินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีค่า ALP, BUN และโคเลสเตอรอลต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในหนูขาวที่ได้รับสารสกัด 2.88 ก./กก./วัน มีค่า SGPT ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และในหนูขาวที่ได้รับสารสกัด 0.36 ก./กก./วัน มีค่า ALP ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการผ่าชากชันสูตรของหนูขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีชีวิตรอดจนสิ้นสุดการทดลอง

พบว่าไม่เกิดพยาธิสภาพที่เห็นได้ของอวัยวะภายในที่มองเห็นด้วยตาเปล่าในหนูขาวทุกกลุ่มที่ได้รับยาหรือในกลุ่มควบคุม สัตว์ที่ตายไปก่อนสิ้นสุดการทดลองเกิดเนื่องจากการป้อนยาพลาดเข้าช่องทางเดินหายใจ

ส่วนอวัยวะภายในเมื่อคำนวณเป็นน้ำหนักสัมพัทธ์ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม *(ตารางที่ 7)* พบว่า ในหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.36 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของกระเพาะปัสสาวะและตับน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตข้างขวา กระเพาะอาหาร และปอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 2.88 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของหัวใจ ไตข้างขวา กระเพาะอาหาร และปอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา *(ตารางที่ 9)*

พบว่าหนูขาวเพศผู้กลุ่มควบคุมจำนวน 10% เกิด fatty change ที่ตับ หนูที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 2.88 ก./กก./วัน ปรากฏ hydrocalyx ที่ไต 20% และ 10% ตามลำดับ ในหนูเพศเมียกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36, 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน ปรากฏ nephrocalcinosis ที่ไต 20%, 50%, 55.56% และ 22.22% ตามลำดับ และ hydrocalyx ที่ไต 10%, 10%, 11.11% และ 33.33% ตามลำดับ ส่วนหนูที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 2.88 ก./กก./วัน ปรากฏ chronic pyelonephritis ที่ไต 10% และ 11.11% ตามลำดับ

วิจารณ์

หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มและหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 23.04 ก./กก./วัน มีการเจริญเติบโต และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน กินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้สารสกัดในขนาดสูงอาจมีผลทำให้หนูกินอาหารได้น้อยลงจึงทำให้น้ำหนักตัวในวันสุดท้ายน้อยกว่ากลุ่มควบคุม

การตรวจค่าทางโลหิตวิทยาพบว่า ในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่การลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ รวมทั้งไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในหนูเพศผู้เลย จึงไม่อาจสรุปได้อย่างแน่ชัดว่าการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวเกิดจากผลของสารสกัด ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่าฮีมาโตคริตของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดพบในหนูบางกลุ่มเท่านั้น จึงไม่อาจสรุปได้ว่าเกิดจากผลของสารสกัด ในทำนองเดียวกันการตรวจซีรั่มของ

หนูทางชีวเคมีพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า SGPT, ALP, ค่าโปรตีนรวมและค่าอัลบูมิน ก็เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในหนูที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่มเท่านั้นและไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ แต่พบว่าสารสกัดในขนาดสูงอาจมีผลต่อการทำงานของไตเนื่องจากทำให้ระดับครีอาตินินในซีรั่มสูงขึ้นในหนูทั้งสองเพศ

ในหนูขาวทั้งสองเพศไม่เกิดพยาธิสภาพที่เห็นได้ของอวัยวะภายในต่างๆ เมื่อดูด้วยตาเปล่า น้ำหนักสัมพัทธ์ของกระเพาะปัสสาวะและตับที่มีการเปลี่ยนแปลงในหนูบางกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ดังนั้นจึงไม่น่าจะเกิดจากผลของสารสกัด แต่สารสกัดในขนาดสูงมีผลทำให้น้ำหนักสัมพัทธ์ของไตข้างขวา กระเพาะอาหารและปอดสูงขึ้นในหนูทั้งสองเพศ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหนูกลุ่มนี้มีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของไตในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีอัตราการเกิด nephrocalcinosis และ hydrocalyx ในไตได้มากกว่ากลุ่มควบคุม

3. ผลการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีผลาตำรับแก้เสมหะสมุฏฐาน

การเจริญเติบโตและการกินอาหาร *(ตารางที่ 1)*

หนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายน้อยกว่า และกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ และในหนูขาวเพศผู้ที่ไดรับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงน้อยกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา *(ตารางที่ 2)*

หนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ผลการตรวจซีรั่มทางชีวเคมี *(ตารางที่ 5)*

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 2.88 ก./กก./วัน มีค่า SGPT ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูขาวที่ได้รับสารสกัด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน มีค่าครีอาตินิน ค่าโปรตีนรวม และค่ากลอบูลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีค่า BUN ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

หนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีค่า SGOT ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูขาวที่ได้รับสารสกัด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน มีค่าครีอาตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการผ่าชันสูตรของหนูขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีชีวิตรอดจนสิ้นสุดการทดลอง

พบว่าไม่เกิดพยาธิสภาพที่เห็นได้ของอวัยวะภายในที่มองเห็นด้วยตาเปล่าในหนูขาวทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุม สัตว์ที่ตายไปก่อนสิ้นสุดการทดลองเกิดเนื่องจากการป้อนยาพลาดเข้าช่องทางเดินหายใจ

ส่วนอวัยวะภายในเมื่อคำนวณเป็นน้ำหนักสัมพัทธ์ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม *(ตารางที่ 8)* พบว่า หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตทั้งสองข้าง ตับ กระเพาะอาหาร และปอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูขาวที่ได้รับสารสกัด 2.88 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตข้างขวา และปอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตทั้งสองข้าง ตับ และกระเพาะอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูขาวที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 2.88

ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของ กระเพาะอาหาร และปอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา *(ตารางที่ 9)*

พบว่าหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.36 ก./กก./วัน และหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน เกิด fatty change ที่ตับ 10% หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มปรากฏ hydrocalyx ที่ไต 20% ในหนูเพศเมีย กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 23.04 ก./กก./วัน ปรากฏ nephrocalcinosis ที่ไต 20%, 22.22% และ 20% ตามลำดับ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 23.04 ก./กก./วัน ปรากฏ hydrocalyx ที่ไต 10%, 11.11% และ 10% ตามลำดับ และเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 23.04 ก./กก./วัน ปรากฏ chronic pyelonephritis ที่ไต 10%

วิจารณ์

หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกขนาดมีการเจริญเติบโตและกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อาจเกิดจากสารสกัดมีสารที่มีรสฝาด เช่น แทนนินในปริมาณสูงทำให้หนูกินอาหารได้น้อยลงและการย่อยอาหารลดลง[31] การตรวจค่าทางโลหิตวิทยาพบว่า ในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มไม่มีความผิดปกติของค่าร้อยละฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือด การตรวจชีรั่มทางชีวเคมีของหนูพบว่า ในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีค่า BUN ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน มีค่าโปรตีนรวมในชีรั่มต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การลดลงของ BUN และโปรตีนรวมอาจเกิดจากการดูดซึมโปรตีนลดลง เนื่องจากแทนนินซึ่งมีมากในสมุนไพร ทั้งสามชนิดของตรีผลาไปตกตะกอนโปรตีนในอาหารทำให้ได้รับโปรตีนลดลงมีผลทำให้ค่า BUN ลดลง[31] และอาจเป็นสาเหตุให้การสังเคราะห์กลอบูลินลดลงในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน นอกจากนี้สารสกัดในขนาดสูงยังมีผลทำให้ระดับชีรั่มครีอาตินินลดลงในหนูทั้งสองเพศด้วย ส่วนการเปลี่ยนแปลงของค่า SGOT และ SGPT ในหนูที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่มเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ดังนั้นจึงไม่น่าจะเกิดจากผลของสารสกัด

ในหนูขาวทั้งสองเพศไม่เกิดพยาธิสภาพที่เห็นได้ของอวัยวะภายในต่างๆ เมื่อดูด้วยตาเปล่า หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 23.04 ก./กก./วัน มีน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของไตทั้งสองข้าง ตับ และกระเพาะอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเนื่องจากหนูกลุ่มนี้มีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายน้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของไตพบว่าในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดทุกขนาดมีโอกาสเกิด hydrocalyx ที่ไตมากกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดมีโอกาสเกิด nephrocalcinosis และ hydrocalyx ที่ไตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวและการกินอาหารของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีผลา (แก้ปิตตะ วาตะและเสมหะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.88	23.04	0.00	0.36	2.88	23.04
ปิตตะสมุฏฐาน	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=9
น้ำหนักตัว (ก.)	301.90±16.82	301.20±15.65	292.10±13.24	284.10±10.21*	239.60±6.45	228.80±4.69	222.10±9.35*	223.40±14.11
น้ำหนักเปลี่ยนแปลง (ก.)	63.50±6.47	65.90±10.00	64.70±7.12	74.20±6.16*	26.80±6.55	22.20±3.97	21.20±4.87	31.20±15.98
อาหารที่หนูขาวกิน (ก./ตัว/วัน)	20.98±0.66	21.59±1.02	19.91±1.75*	20.20±0.62	14.96±0.44	14.40±0.12	14.40±0.79	12.77±0.99*
วาตะสมุฏฐาน	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=9	n=9
น้ำหนักตัว (ก.)	301.90±16.82	310.80±12.79	290.60±10.16	283.70±12.47*	239.60±8.45	227.90±12.80*	225.00±8.09*	226.67±13.30*
น้ำหนักเปลี่ยนแปลง (ก.)	63.50±6.47	52.90±9.87*	61.40±7.15	55.00±8.51*	26.80±6.55	16.70±9.31*	17.33±4.77*	14.78±8.87*
อาหารที่หนูขาวกิน (ก./ตัว/วัน)	20.98±0.66	21.24±0.88	20.09±0.50*	20.34±0.82	14.96±0.44	14.68±0.77	12.93±1.38*	13.31±0.62*
เสมหะสมุฏฐาน	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=9	n=10	n=10
น้ำหนักตัว (ก.)	284.20±10.21	274.30±8.54*	253.80±6.71*	240.20±8.52*	229.70±12.40	214.44±5.92*	207.30±5.93*	216.80±10.53*
น้ำหนักเปลี่ยนแปลง (ก.)	68.90±6.69	64.30±6.58	64.30±5.03	53.10±7.29*	23.30±5.89	18.00±3.91	19.80±3.94	20.90±9.98
อาหารที่หนูขาวกิน (ก./ตัว/วัน)	20.42±0.52	19.63±0.29*	18.30±0.24*	16.11±0.34*	14.08±0.41	13.51±0.75*	13.22±0.39*	12.76±0.42*

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีผลา (แก้ปัดตะ วาตะและเสมหะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.88	23.04	0.00	0.36	2.88	23.04
ปิตตะสมุฏฐาน	n=9	n=10	n=9	n=10	n=10	n=9	n=9	n=9
Hematocrit (%)	45.22±1.72	43.60±1.84*	45.56±0.88	45.60±1.90	42.40±3.27	43.67±2.65	44.33±1.94	43.33±2.29
White blood cells (x 10^2 cells/mm^3)	45.89±5.11	43.60±6.50	44.89±4.94	42.60±11.08	46.90±4.09	44.11±5.09	40.67±5.07*	43.22±4.27
Platelet (x 10^3 cells/mm^3)	285.56±15.09	274.00±34.71	284.44±30.87	274.00±18.38	267.00±40.29	290.00±31.62	284.44±34.32	293.33±41.53
วาตะสมุฏฐาน	n=9	n=10	n=7	n=9	n=10	n=9	n=6	n=8
Hematocrit (%)	45.22±1.72	45.70±1.42	44.43±1.40	44.89±1.54	42.40±3.27	46.00±1.12	42.17±2.86	46.17±1.72*
White blood cells (x 10^2 cells/mm^3)	45.89±5.11	48.20±10.76	42.86±3.98	41.80±4.14	46.90±4.09	40.89±6.85*	38.67±3.67*	41.00±4.56*
Platelet (x 10^3 cells/mm^3)	285.56±15.09	299.00±15.95	278.57±21.93	287.78±55.40	267.00±40.29	298.89±17.64	281.67±49.97	276.67±38.30
เสมหะสมุฏฐาน	n=6	n=7	n=9	n=9	n=7	n=7	n=9	n=10
Hematocrit (%)	41.67±2.34	42.71±3.09	42.33±1.41	42.78±2.28	43.43±2.51	44.29±1.60	44.33±3.12	43.10±1.73
White blood cells (x 10^2 cells/mm^3)	46.50±8.64	42.14±5.08	40.67±6.10	45.56±5.77	36.71±7.63	39.00±4.97	35.44±5.08	40.30±10.44
Platelet (x 10^3 cells/mm^3)	305.00±35.07	264.29±47.91	297.78±42.65	282.22±15.63	292.86±43.48	310.00±25.82	300.00±51.72	284.00±15.06

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 3 ค่าทางชีวเคมีของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีผลา (แก้ปิตตะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.88	23.04	0.00	0.36	2.88	23.04
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
SGOT (U/l)	105.60±40.29	96.80±18.52	92.70±18.48	98.30±18.10	86.10±12.55	85.30±8.37	77.10±9.27	74.00±7.39*
SGPT (U/l)	30.20±13.88	29.00±6.25	27.60±4.58	26.80±4.89	24.40±3.92	24.30±4.72	24.60±6.20	24.80±3.77
ALP (U/l)	244.70±36.99	258.20±68.29	261.60±80.11	260.50±33.67	180.00±50.80	166.40±51.36	132.30±35.28	177.00±59.62
Creatinine (mg%)	1.27±0.18	1.07±0.12*	1.36±0.22	1.08±0.08*	1.30±0.19	1.02±0.14*	1.42±0.18	1.09±0.12*
BUN (mg%)	25.70±2.83	24.70±2.06	22.10±3.07*	21.00±2.16*	24.00±3.20	23.40±2.01	22.30±2.83	19.30±2.75*
Cholesterol (mg%)	80.50±12.09	77.00±12.78	73.70±6.11	72.80±8.55	74.40±12.85	82.90±15.90	81.30±5.36	60.00±9.88*
Total protein (g%)	6.76±0.30	6.32±0.16*	6.27±0.26*	6.03±0.19*	6.72±0.41	6.44±0.18*	6.42±0.26*	6.13±0.33*
Albumin (g%)	3.63±0.26	3.80±0.07*	3.78±0.17	3.82±0.09*	4.07±0.16	3.90±0.14	4.07±0.27	4.11±0.36
Globulin (g%)	3.13±0.29	2.52±0.18*	2.49±0.19*	2.21±0.16*	2.65±0.37	2.54±0.17	2.35±0.32*	2.02±0.24*

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4 ค่าทางชีวเคมีของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีผลา (แก้วาตะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.88	23.04	0.00	0.36	2.88	23.04
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=9	n=9	n=9
SGOT (U/l)	105.60±40.29	80.90±9.37	95.20±32.19	103.30±19.70	86.10±12.55	79.00±17.45	77.11±14.50	80.44±16.67
SGPT (U/l)	30.20±13.88	25.50±4.79	20.50±6.88*	32.70±5.87	24.40±3.92	19.89±3.30	18.67±3.46*	29.22±7.69*
ALP (U/l)	244.70±36.99	251.50±47.50	281.30±00.50	247.80±40.30	180.00±50.80	139.56±45.92*	147.11±34.10	109.22±20.55*
Creatinine (mg%)	1.27±0.18	1.36±0.20	1.16±0.16	1.50±0.31*	1.30±0.19	1.40±0.19	1.36±0.18	1.66±0.23*
BUN (mg%)	25.70±2.83	26.20±2.25	22.80±3.19*	21.30±1.70*	24.00±3.20	23.89±2.57	22.89±3.44	18.78±2.59*
Cholesterol (mg%)	80.50±12.09	75.40±9.70	73.10±10.86	54.50±7.89*	74.40±12.85	77.11±12.25	77.78±12.67	57.44±15.06*
Total protein (g%)	6.76±0.30	6.78±0.32	6.65±0.21	6.04±0.25*	6.72±0.41	6.94±0.44	6.69±0.39	6.56±0.40
Albumin (g%)	3.63±0.26	3.89±0.31*	3.84±0.13	3.65±0.15	4.07±0.16	4.12±0.36	3.93±0.16	4.12±0.24
Globulin (g%)	3.13±0.29	2.89±0.26*	2.81±0.17*	2.39±0.19*	2.65±0.37	2.82±0.28	2.76±0.32	2.44±0.17

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 5 ค่าทางชีวเคมีของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีผลา (แก้เสมหะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.88	23.04	0.00	0.36	2.88	23.04
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=9	n=10	n=10
SGOT (U/l)	86.40±11.94	84.60±16.64	85.50±7.75	86.10±16.03	74.20±8.38	75.22±8.86	75.30±8.67	66.70±4.97*
SGPT (U/l)	24.70±3.89	21.20±2.97*	19.40±3.44*	24.80±3.29	23.90±14.71	20.78±4.09	19.20±3.39	18.60±4.30
ALP (U/l)	311.20±85.65	279.80±72.54	284.30±63.63	256.30±60.72	136.70±40.50	154.78±38.33	131.30±36.59	143.20±28.72
Creatinine (mg%)	1.48±0.23	1.38±0.25	0.97±0.16*	1.16±0.20*	1.37±0.11	1.30±0.13	1.03±0.19*	1.17±0.13*
BUN (mg%)	25.10±1.20	22.60±1.78*	21.20±2.10*	21.60±1.84*	21.10±2.69	25.89±3.82	26.20±4.78	23.10±10.42
Cholesterol (mg%)	74.00±6.60	68.60±10.56	68.00±6.57	65.60±9.95	69.30±13.80	66.11±14.73	62.00±5.77	64.60±12.49
Total protein (g%)	6.25±0.27	6.18±0.13	5.66±0.15*	5.84±0.23*	6.26±0.22	6.26±0.49	6.17±0.32	6.05±0.26
Albumin (g%)	3.79±0.15	3.88±0.14	3.69±0.13	3.79±0.08	4.07±0.21	4.06±0.15	4.07±0.35	4.07±0.13
Globulin (g%)	2.46±0.23	2.30±0.15	1.97±0.13*	2.06±0.21*	2.19±0.20	2.20±0.38	2.09±0.27	1.98±0.22

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 6 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีผลา (แก้ปิตตะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.88	23.04	0.00	0.36	2.88	23.04
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
หัวใจ	3.41±0.31	3.15±0.13*	3.28±0.36	3.35±0.15	3.31±0.19	3.40±0.34	3.42±0.11	3.35±0.19
ไตข้างขวา	3.73±0.26	3.64±0.17	3.80±0.29	4.12±0.37*	3.62±0.26	3.64±0.24	3.74±0.26	3.64±0.19
ไตข้างซ้าย	3.65±0.23	3.49±0.18	3.71±0.27	3.90±0.30*	3.42±0.21	3.36±0.27	3.51±0.21	3.42±0.16
กระเพาะปัสสาวะ	0.30±0.07	0.31±0.06	0.33±0.05	0.38±0.11*	0.37±0.07	0.42±0.06	0.38±0.09	0.39±0.06
ตับ	47.38±2.26	47.49±2.71	46.84±2.37	50.84±2.84*	42.59±2.51	42.73±3.37	43.37±2.23	45.32±3.12
ม้าม	2.92±0.32	3.21±0.41	3.13±0.28	3.81±0.62*	2.91±0.45	2.92±0.29	3.03±0.65	3.50±0.36*
กระเพาะอาหาร	5.39±0.53	5.60±0.84	5.61±0.39	5.62±0.33	5.98±0.70	5.92±0.50	6.46±0.63	6.43±0.59
ปอด	4.75±0.05	5.03±0.40	5.05±0.34	5.25±0.35*	5.41±0.25	6.05±0.51*	5.77±0.49	5.34±0.40

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 7 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีผลา (แก้วาตะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.88	23.04	0.00	0.36	2.88	23.04
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=9	n=9
หัวใจ	3.41±0.31	3.27±0.17	3.39±0.21	3.45±0.23	3.31±0.19	3.48±0.22	3.45±0.26	3.63±0.28*
ไตข้างขวา	3.73±0.26	3.75±0.28	3.69±0.21	4.03±0.26*	3.62±0.26	3.53±0.33	3.66±0.18	3.96±0.44*
ไตข้างซ้าย	3.65±0.23	3.59±0.26	3.58±0.22	3.80±0.26	3.42±0.21	3.68±0.97	3.37±0.20	3.69±0.32
กระเพาะปัสสาวะ	0.30±0.07	0.23±0.05*	0.30±0.07	0.27±0.05	0.37±0.07	0.38±0.08	0.34±0.08	0.39±0.08
ตับ	47.38±2.26	44.75±2.02*	45.85±2.76	47.74±3.06	42.59±2.51	39.58±2.34*	39.74±1.75*	42.88±4.56
ม้าม	2.92±0.37	2.99±0.57	3.10±0.38	2.95±0.32	2.91±0.45	2.96±0.36	2.91±0.33	3.06±0.57
กระเพาะอาหาร	5.39±0.53	5.02±0.50	5.57±0.57	6.70±0.40*	5.98±0.70	6.19±0.74	6.09±0.59	7.59±0.66*
ปอด	4.75±0.65	4.68±0.35	5.00±0.36	5.47±0.61*	5.41±0.25	5.73±0.72	5.69±0.37	6.02±0.65*

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 8 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีผลา (แก้เสมหะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.88	23.04	0.00	0.36	2.88	23.04
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=9	n=10	n=10
หัวใจ	3.30±0.32	3.39±0.21	3.19±0.15	3.41±0.31	3.42±0.20	3.39±0.25	3.53±0.38	3.53±0.24
ไตข้างขวา	3.64±0.26	3.78±0.20	3.95±0.20*	4.16±0.26*	3.56±0.22	3.49±0.20	3.56±0.18	4.07±0.30*
ไตข้างซ้าย	3.53±0.16	3.59±0.22	3.70±0.22	3.89±0.13*	3.33±0.25	3.32±0.25	3.41±0.21	3.82±0.32*
กระเพาะปัสสาวะ	0.28±0.06	0.29±0.07	0.31±0.07	0.31±0.04	0.33±0.07	0.40±0.07	0.38±0.08	0.36±0.07
ตับ	45.50±1.64	45.55±2.76	43.69±2.29	49.68±2.26*	40.00±2.34	40.36±3.18	41.94±1.47	46.21±2.25*
ม้าม	3.34±0.33	3.05±0.32	3.26±0.40	3.37±0.29	3.14±0.37	2.91±0.41	3.11±0.48	3.16±0.40
กระเพาะอาหาร	5.76±0.42	5.62±0.58	5.92±0.45	6.61±0.49*	5.96±0.23	6.38±0.63*	6.72±0.44*	7.05±0.39*
ปอด	4.94±0.28	5.12±0.38	5.53±0.37*	5.44±0.32*	5.39±0.35	5.77±0.33*	6.33±0.44*	5.64±0.40

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ทางด้านจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีผลา (แก้ปิตตะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

		เพศผู้				เพศเมีย			
		ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
ปิตตะสมุฏฐาน									
Organ	Lesion	0.00	0.36	2.88	23.04	0.00	0.36	2.88	23.04
Liver	Fatty change	1/10							3/10
Kidney	Nephrocalcinosis					2/10		2/10	6/10
	Hydrocalyx		2/10	3/10	2/10	1/10	1/10	2/10	
	Chronic pyelonephritis								
วาตะสมุฏฐาน									
Liver	Fatty change	1/10							
Kidney	Nephrocalcinosis					2/10	5/10	5/10	2/9
	Hydrocalyx		1/10	1/10		1/10	1/10	1/10	3/9
	Chronic pyelonephritis						1/10	1/10	
เสมหะสมุฏฐาน									
Liver	Fatty change		1/10						1/10
Kidney	Nephrocalcinosis					2/10	2/10		2/10
	Hydrocalyx		2/10	2/10	2/10	1/10	1/10		1/10
	Chronic pyelonephritis								1/10

สรุป

ยาตรีผลาเป็นยาแผนโบราณมหาพิกัดซึ่งใช้ในคิมหันตฤดูหรือฤดูร้อนประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด คือ ลูกสมอพิเภก ลูกสมอไทย และลูกมะขามป้อม โดยมีอัตราส่วนของสมุนไพรทั้งสามชนิดแตกต่างกันไปตามกองสมุฏฐานโรค ซึ่ง ได้แก่ ปิตตะ วาตะ และเสมหะสมุฏฐาน จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดด้วยน้ำของยาตรีผลาทั้งสามตำรับในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ โดยการป้อนสารสกัดขนาด 0.36, 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน เป็นเวลา 10 วัน หรือคิดเป็น 1, 8 และ 64 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน พบว่า

1. สารสกัดยาตรีผลาตำรับแก้วาตะและเสมหะสมุฏฐาน ทำให้หนูเกือบทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายและการกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ขณะที่ยาตรีผลาตำรับแก้ปิตตะสมุฏฐานขนาด 23.04 ก./กก./วัน ทำให้หนูเพศผู้มีน้ำหนักตัวในวันสุดท้ายน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ผลของสารสกัดต่อน้ำหนักตัวหรือการกินอาหารของหนูนั้นอาจเนื่องมาจากสารแทนนินที่มีอยู่มากในสมุนไพรทั้งสามชนิดที่เป็นองค์ประกอบของยาตรีผลา ซึ่งสารแทนนินนี้มีผลทำให้สัตว์ทดลองกินอาหารได้น้อยลง ความสามารถในการย่อยอาหารลดลงและการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวน้อยลง[31]

2. สารสกัดยาตรีผลาตำรับแก้ปิตตะและเสมหะสมุฏฐาน ไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาว แต่สารสกัดตำรับแก้วาตะสมุฏฐานทุกขนาดทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวในหนูเพศเมียลดลงแต่เป็นการลดลงที่ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้ นอกจากนี้พบว่าหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดตำรับนี้ในขนาด 0.36 และ 23.04 ก./กก./วัน มีค่าฮีมาโตคริตมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

3. ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมี พบว่า

3.1 สารสกัดทุกตำรับในขนาดสูงทำให้ระดับโปรตีนรวมและ BUN ของหนูเพศผู้มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในหนูเพศเมียสารสกัดตำรับแก้ปิตตะสมุฏฐานในขนาดสูงก็มีผลลดระดับโปรตีนรวมและ BUN เช่นกัน ส่วนสารสกัดตำรับแก้วาตะสมุฏฐานขนาดสูงมีผลลดเฉพาะ BUN ในหนูเพศเมียซึ่งผลของสารสกัดต่อค่าโปรตีนรวมและ BUN นั้น อาจเนื่องมาจากสารแทนนินในสารสกัดซึ่งมีคุณสมบัติตกตะกอนโปรตีนได้อาจไปจับโปรตีนในอาหาร รวมทั้งอาจมีผลยับยั้งเอนไซม์ในระบบย่ออาหารทำให้การย่อยและดูดซึมโปรตีนลดลงมีผลทำให้โปรตีนรวมและ BUN ลดลง หรืออาจเกิดจากยามีผลต่อตับทำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนและ urea จากตับลดลง ทำให้ค่า BUN ลดลง

3.2 สารสกัดตรีผลาตำรับแก้ปิตตะและวาตะสมุฏฐานทุกขนาดทำให้ซีรั่มกลอบูลินในหนูเพศผู้ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยเป็นการลดลงอย่างมีความสัมพันธ์กับขนาดที่ให้และสารสกัดตรีผลาตำรับแก้เสมหะสมุฏฐานขนาด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน ก็มีผลลดระดับซีรั่มกลอบูลินในหนูเพศผู้เช่นกัน ส่วนในหนูเพศเมียพบว่าสารสกัดตำรับแก้ปิตตะสมุฏฐานเท่านั้นที่มีผลลดระดับซีรั่มกลอบูลินเมื่อให้ในขนาด 2.88 และ 23.04 ก./กก./วัน การลดลงของซีรั่มกลอบูลินอาจเนื่องมาจากสารสกัดมีผลลดการสังเคราะห์กลอบูลิน

3.3 หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดตรีผลาตำรับแก้ปิตตะและเสมหะสมุฏฐานขนาด 23.04 ก./กก./วัน มีค่าซีรั่มครีอาตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดตรีผลาตำรับแก้วาตะสมุฏฐานขนาด 23.04 ก./กก./วัน มีระดับตรีอาตินินในซีรั่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

4. ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของตับและไต แสดงให้เห็นว่าตับและไตของหนูเพศเมียมีความไวต่อพิษของสารสกัดมากกว่าหนูเพศผู้โดยหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดตำรับแก้ปัดตะสมุฏฐานในขนาด 23.04 ก./กก./วัน มีอัตราการเกิด fatty change ของตับและ nephrocalcinosis มากกว่าหนูกลุ่มควบคุม และหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดตำรับแก้วาตะสมุฏฐานทุกขนาดมีอัตราการเกิด nephrocalcinosis และ hydrocalyx สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุม ส่วนหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดตำรับแก้เสมหะสมุฏฐานพบว่าอัตราการเกิดพยาธิสภาพต่างๆ ของตับและไตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งการเกิดพิษต่อตับหรือไตของสารสกัดตรีผลาตำรับแก้ปัดตะและวาตะสมุฏฐานนั้นอาจจะเนื่องมาจากสารแทนนินซึ่งโดยปกติจะไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร แต่สารแทนนินมีฤทธิ์ทำลายเยื่อบุทางเดินอาหารได้จึงอาจถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ผ่านทางแผลของเยื่อบุทางเดินอาหารซึ่งแทนนินที่ถูกดูดซึมมีความเป็นพิษต่อตับ [31] และ metabolite ของแทนนินคือ gallic acid ก็มีความเป็นพิษต่อไต[31] ดังนั้นการใช้ตรีผลา จึงน่ามีข้อควรระวังในผู้ป่วยที่เป็นโรคแผลในทางเดินอาหาร

การใช้ยาแผนโบราณตรีผลาจะเป็นการใช้ยาเพื่อปรับธาตุในระยะที่เปลี่ยนฤดูเท่านั้นและใช้เพียงยาต้มเพียงหม้อเดียวจึงมีขนาดใช้ที่ไม่สูงและใช้ในระยะเวลา 3-4 วัน เท่านั้น ดังนั้นจึงไม่น่าจะทำให้เกิดพิษกึ่งเฉียบพลัน และในกรณีที่มีการนำยาแผนโบราณตรีผลาไปใช้เป็นส่วนประกอบของยาแผนโบราณอื่นๆ ปริมาณของยาตรีผลาก็จะน้อยลงทำให้โอกาสเกิดพิษจากยาตรีผลาน้อยลงไปด้วย อย่างไรก็ตาม ถ้ามีความจำเป็นต้องใช้ยาตรีผลานี้เป็นระยะเวลานานควรมีการตรวจดูความผิดปกติของตับและไตด้วย

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายเภสัชเวท กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร ในการจัดซื้อและตรวจสอบสมุนไพร นายแพทย์สมนึก เจษฎาภัทรกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในการตรวจสอบสไลด์เนื้อเยื่อของหนูทดลอง นางสาวอัญชลี จูฑะพุทธิ ในการตรวจสอบและแก้ไขเอกสาร ฝ่ายเภสัชวิทยา และนายดรุณ เพ็ชรพลาย ผู้อำนวยการกองวิจัยและพัฒนาสมุนไพรที่สนับสนุนและให้คำแนะนำและสถาบันการแพทย์แผนไทย ที่ให้ทุนสนับสนุน

เอกสารอ้างอิง

1. มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์ไทยเดิม. อายุรเวทวิทยาลัย (ชีวกโกมารภัจจ์). 2535. ตำราการแพทย์ไทยเดิม ฉบับที่ 1, โรงพิมพ์สามเจริญพาณิช, กรุงเทพมหานคร. หน้า 412.

2. เต็ม สมิตินันท์. 1980. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์ ชื่อพื้นเมือง). ฟันนี่พับลิชชิ่ง, กรุงเทพมหานคร. หน้า 265, 268.

3. สมาคม ร.ร. แพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ พระนคร, 2516. ประมวลสรรพคุณ ยาไทย (ภาคสาม) หน้า 172, 171, 17.

4. Perry, L.M. 1980. Medicinal Plants of East and Southeast Asia The Massachusetts Institute of Technology. p 80.

5. Row, LR. and Murty, P.S. 1970. Chemical examination of *Terminalia bellerica* Row. Indian J. Chem. 8(11) : 1047-8. Through CA 1971. (74) : 108139u.

6. Awasthi, K.L. and Nath, B. 1968. Chemical examination of *Terminalia bellerica*, I. Cardiac glycoside. J. Indian Chem. Soc.

45(10) : 913-17. Through CA 1969. (70) : 78329d.

7. Nandy, K.A., Podder, G., Sahu, P.N. and Mahato, B.S. 1989. Triterpenoids and their glucosides from *Terminalia bellerica*. Phytochemistry 28(10) : 2769-72. Through CA 1990. (112) : 73818p.

8. Reynolds, J.E.F. 1982. Martindale The Extra Pharmacopoeia 28th Ed., The Pharmaceutical Press, London. p.415.

9. Reynolds, J.E.F. 1989. Martindale The Extra Pharmacopoeia 29th Ed., The Pharmaceutical Press, London. p. 778, 779, 1203.

10. Budavari, S. 1989. The Merck index 11th Ed. Merck & Co., Inc. Rahway, New Jersey. P. 555, 680.

11. Siddiqui, H.H. 1963. *Terminalia bellerica* on bile secretion and its pharmacodynamic properties. Indian J. Pharm. 25 : 297-302. Through CA 1964. (60) : 993h.

12. Khalique, A. and Nizamuddin, M. 1972. Examination of *Terminalia chebula* (Haritaki) : Constituents of the fruits. Bangladesh Biol. Agric. Sci. 1(1) : 59-63. Through BA 1973. (56) 15833.

13. Schmidt, T.O., Schultz, J. and Wurmb, R. 1967. On natural tanning agents, XXXVI, Terchebin., Justus Liebigs. Ann. Chem. 706 : 169-179. Through BA 1968 (49) : 85923.

14. . Schmidt, T.O., Schultz, J. and Wurmb, R. 1967. On natural tanning agents, XXXVII, Hexahydroxydiphenic acid (ellagic acid), brevifolin-carboxylic acid and chebulic acid as transformation product of brevilagin (*Caesalpinia breviflia*) substances and of Terchebin (*Terminalia chebula*)., Justus Liebigs. Ann. Chem. 706 : 180-186. Through BA 1968 (49) : 85924.

15. Phadke S.A. and Kulkani, S.D. 1989. Screening *Terminalia chebula*, *Eclapta alba* and *Ocinum sanctum*. Indian J. Med. Sci., 43(50) : 113-7.

16. Gaind, K.N. and Saini, T.S. 1968 Identification of purgative principles of *Terminalia chebula* Retz. Indian J. Pharm. 30(10) : 233-234. Through BA 1970. (51) : 31923.

17. Arseculeratene, S.N., Gunatilaka, A.A. and Panabokke, R.G. 1985. Studies of medicinal plants of Sri Lanka Part 14 : Toxicity of some traditional medicinal herbs. J. Ethanopharmacol. 13(3) : 323-35.

18. Naik, K.G., Shah, C.C. and Pandya, H.G. 1951. Ascorbic acid content of some common fruits and vegetables available in Gujarat. I. Vitamin "C" content and their stability. Jour. Univ. Bombay. 19(5) Sec A : 51-58. Through BA 1953. (27) : 8979.

19. LU, R., Wu, J., Zhan, X. and Zhuang, R. 1988. Changes of vitamin C content in fruits of *Phyllanthus emblica* and its products. Shipin Kexue (Beijing) 99 : 46-50. Through CA 1988. (109) : 21879C.

20. Theresa, Y.M., Sastry, K.N.S. and Nayudamma, Y. 1968. Amla (*Phyllanthus emblica*) tannins. I. Isolation of trigalloylglucose, terchebin, corilagin and ellagic acid

from amla fruits. Leather Sci. (Madras) 15 (12) : 337-41. Through CA 1969. (71) : 10285b.

21. Srivostava, S.K. and Shri Panjan. 1967. Physiological studies on plant tannins. III. Variation of tannin compounds in the developing fruits of *Emblica officinalis*, Flora (Jena), Abt. A. 158(1) : 133-42 . Through CA 1967. (67) : 766n.

22. Barthakur, N.N. and Arnold, N.P. 1991 : Chemical analysis of the emblic (*Phyllanthus emblica* L.) and its potential as a food source. Sci. Hortic. (Amsterdam) 47 (1-2) : 99-105. Through CA 1992 (116) : 19982p.

23. Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Chang, J.J., Lee, K.H. 1992. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. J. Nat. Prod. 55(8) : 1033-43.

24. Hecht, S.M., Berry, D.E. MacKenzie, L.J., Busby, R.W. and Nasuti, C.A. 1992. A strategy for identifying novel, mechanistically unique inhibitors of topoisomerase I. J. Nat. Prod. 55(4) : 401-13.

25. วรรณดี แต้โสตถิกุล. 2528. การศึกษาฤทธิ์ ทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพรที่ใช้ลดความดันโลหิต. เชียงใหม่เภสัชสาร 4(1) : 23-30.

26. จันทนี อิทธิพานิชพงศ์ และคณะ. 2530. การศึกษาพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเฉียบพลันของใบมะขามป้อม จุฬาลงกรณ์เวชสาร 31 (5) : 367-76.

27. Thakur, B., Sinha, S., Sinha, P.K. and Sinha, S.K. 1988. The Ayurvedic medicines Hantaki, Amala and Bahira reduce cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. Int. J. Cardiol. 21(2) : 167-75.

28. Henry, R.J., Chaimori, N., Golub, O.J. and Berkman, S. 1960. Revised spectrophotometric methods for the determination of Glutamic Oxaloacetic Transaminase, Glutamic Pyruvic Transaminase and Lactic Acid Dehydrogenase. Am. J. Clin. Path. 34(4) : 381-398.

29. Bowers, G.N., Jr. and McComb, R.B. 1975. Measurement of Total Alkaline Phosphatase Activity in Human Serum. Clin. Chem. 21(3) : 1988-1995.

30. วีกูล วีรานุวัติ และ กนกนาถ ชูปัญญา 2525. เคมีคลินิก. พิมพ์ครั้งที่สอง คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร. หน้า 226, 229, 263, 441, 451.

31. Hayes, A.W. 1994. Principles and Methods of Toxicology, 3rd Ed. Raven Press, New York. p. 325.

สมอไทย

มะขามป้อม

สมอพิเภก

ขิงแห้ง

ดีปลี

พริกไทย

การศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน ของยาแผนโบราณตรีกฎก

Subacute Toxicity Study of Traditional Medicinal Trikatuk

ปราณี ชาลิตธำรง, เอมมนัส อัตถวิชญ์*
พัช รักษามั่น*, ปราณี จันทเพ็ชร**
*กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร
**กองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

ตรีกฎกเป็นยาแผนโบราณมหาพิกัดซึ่งใช้ในวสันตฤดู (ฤดูฝน) มีส่วนประกอบของสมุนไพร 3 ชนิด คือ เหง้าขิงแห้ง เมล็ดพริกไทย และผลดีปลี โดยมีอัตราส่วนของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกันตามกองสมุฏฐานโรค ในกรณีตำรับปิตตะสมุฏฐาน (ป่วยด้วยธาตุไฟในฤดูฝน) อัตราส่วนของสมุนไพรจะเป็น 12 : 8 : 4 ตำรับวาตะสมุฏฐาน (ป่วยด้วยธาตุลมในฤดูหนาว) มีอัตราส่วนของสมุนไพรคือ 4 : 12 : 8 และตำรับเสมหะสมุฏฐาน (ป่วยด้วยโรคธาตุน้ำในฤดูฝน) มีอัตราส่วนของสมุนไพร คือ 8 : 4 : 12

จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดด้วยน้ำของยาตรีกฎก ตำรับต่าง ๆ ในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ โดยป้อนสารสกัดขนาดเทียบเท่าผงยา 0.36, 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน เป็นระยะเวลา 10 วัน หรือคิดเป็น 1, 7 และ 49 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนจากผลการตรวจทางโลหิตวิทยาพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่าฮีมาโตคริต และเกล็ดเลือดในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแต่การเปลี่ยนแปลงยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ ส่วนค่าทางชีวเคมีของซีรั่มพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดตรีกฎกตำรับปิตตะสมุฏฐานและตำรับเสมหะสมุฏฐานมีระดับอัลบูมิน และโปรตีนรวมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูที่ได้รับสารสกัดตรีกฎกตำรับวาตะสมุฏฐานในขนาดสูงก็พบว่ามีระดับอัลบูมินและโปรตีนรวมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของระดับอัลบูมินในหนูที่ได้รับสารสกัดนั้นอาจเกิดจากการกระตุ้นการสังเคราะห์อัลบูมินของตับหรือเกิดจากการที่สัตว์ทดลองได้รับน้ำน้อยลง ส่วนการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของตับและไตในหนูที่ได้รับสารสกัดแต่ละตำรับไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุม

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 38 ฉบับที่ 4 ตุลาคม-ธันวาคม 2539 หน้า 273-292.

ABSTRACT

Trikatuk, a preparation of Thai traditional medicine used to adjust patient's element during rainy season, is composed of three constituents, namely *Zingiber officinale* rhizomes (ginger), *Piper nigrum* fruits (pepper) and *Piper retrofractum* fruits (long pepper). Three formulae of Trikatuk , i.e. Pitta, Wata and Semha, containing different ratios of each herbal component are used in rainy season for the treatment of illness due to fire, wind and water element, respectively. Pitta formula contains 12 parts of ginger, 8 parts of pepper and 4 parts of long pepper, while Wata fromula consists of 4 parts of ginger, 12 parts of pepper and 8 parts of long pepper and Semha formula is composed of 8 part of ginger, 4 part of pepper and 12 parts of long pepper.

Subacute toxicity studies of water extracts of the three formulae of Trikatuk were conducted in adult Wistar rats. The extracts were administered orally once daily for ten consecutive days at the doses equivalent to 0.36, 2.52 and 17.64 g. of crude drug/kg body weight/day which are equivalent to 1, 7 and 49 folds of therapeutic dose, respectively. The changes of certain hematological parameters found in some extract-treated groups were not likely to be caused by the extracts, and were within normal values . The results of biochemical studies of the serum samples indicated that the groups receiving the extracts of Pitta formula and Semha formula and Semha formula had significantly higher levels of albumin and total proteins than the control . Similarly, the group treated with high dose of Wata formula extract also had higher albumin and total protein levels. The increase of serum albumin in the animals treated with the extracts may be the result of elevated albumin synthesis in the liver. Histopathological examinations of the liver and kidney tissue specimens showed no differences in pathological findings between the extract-treated groups and the control groups.

Key words : Toxicity, Traditional medicine, Rat, *Zingiber officinale*, *Piper nigrum*, *Piper retrofractum*

บทนำ

ตรีกฎุกเป็นยาแผนโบราณมหาพิกัดซึ่งใช้ในวสันตฤดู (ฤดูฝน) มีส่วนประกอบของสมุนไพร 3 ชนิด คือ เหง้าขิงแห้ง เมล็ดพริกไทย และผลดีปลี อัตราส่วนของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด จะแตกต่างกันขึ้นกับกองสมุฏฐานโรค ในกรณีเสมหะสมุฏฐาน (ป่วยด้วยธาตุน้ำในฤดูฝน) จะมีอัตราส่วนของสมุนไพรคือ 8 : 4 : 12 สำหรับตรีกฎุกตำรับวาตะสมุฏฐาน (ป่วยด้วยธาตุลมในฤดูฝน) มีอัตราส่วนของสมุนไพรคือ 4 : 12 : 8 และตำรับปิตตะสมุฏฐาน (ป่วยด้วยธาตุไฟในฤดูฝน) จะมีอัตราส่วนของสมุนไพร คือ 12 : 8 : 4[1]

ขิงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า (*Zingiber officinale* Roscoe เป็นพืชในวงศ์ *Zingiberaceae*[2]

จากประมวลสรรพคุณยาไทย ขิงแห้งมีรสหวานเผ็ดร้อน แก้ไข้ แก้ลมพรรดึก แก้ลมพานไส้ แก้แน่น แก้เสียดแทง แก้อ้อนไม่หลับ แก้คลื่นเหียนอาเจียน ขิงสดมีรสหวานเผ็ดร้อน เหง้าเจริญอากาศธาตุ ดอกแก้โรคเกิดจากหัวใจ ใบทำให้เกิดกำเดา ต้นสะกดลมลงสู่กูชทวาร รากทำให้คอโปร่งเจริญอาหาร หัวต้มรับประทานแก้ปวดท้อง บำรุงธาตุ ขับลมในลำไส้ให้ผายลมและเรอ[3] จากการศึกษาทางพฤกษเคมีพบว่า ในเหง้ามีส่วนประกอบของ β-sesquiphellandrene[4], ar-curcumene[4], essential oil (geranyl acetate, ∝-carene, ∝-terpinene , ∝-terpinol, 1,8-cineol, neral, geranial,geraniol gingiberene)[5], 6-gingerdiol[6], gingerglycolipids A, B และ C[7], สารที่ทำให้เกิดกลิ่นฉุนคือ diaryylheptanoid, gingerols, shogaol และ zingerone[8,9,10] จากการศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่า β-sesquiphellandrene, β-bisabolene, ar-curcumene, 6-shogaol, 6-gingerol, 6-gingesulfonic acid สามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูขาวเมื่อกระตุ้นให้เกิดแผลด้วยกรดเกลือหรือเอธานอล[7,8] และ gingerol ยังมีฤทธิ์ antiplatelet ในกระต่าย[11] ส่วนสารสกัดด้วยเอธานอลซึ่งมี sesquiphellandrene หลายชนิดโดยเฉพาะ β- sesquiphellandrene มีฤทธิ์ antirhinovirus IB ในหลอดทดลอง[12] นอกจากนี้สารสกัดด้วยเอธานอลยังแสดงฤทธิ์ antioxidant โดยสามารถป้องกันปฏิกิริยา oxidation ของ linoleic acid[13] สามารถลดอาการบวมในอุ้งเท้าหนูที่ได้รับสาร carrageenan และลดไข้ในหนูที่เป็นไข้เนื่องจากได้รับยีสต์[14] สำหรับน้ำคั้นเหง้าขิงมีรายงานว่าสามารถเพิ่มแรงบีบตัวของลำไส้สุนัขได้[15] มีรายงานการศึกษาทางคลินิกของขิง พบว่าสามารถลดอาการคลื่นไส้อาเจียนในคนไข้หลังการผ่าตัด[16,17] และจากการทดสอบประสิทธิภาพของขิงผงในการลดอาการการเมารถเมาเรือ (motion sickness) ในอาสาสมัคร พบว่าขิงผงลดอาการเมารถเมาเรือได้ดีกว่า dimenhydrinate[18,19]

พริกไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper nigrum* Linn. เป็นพืชในวงศ์ Piperaceae[2] ตามสรรพคุณยาโบราณใช้เม็ดแก้ลมอัณฑพฤกษ์ และมุตฆาตลมที่ทำให้ท้องลั่นโครกคราก แก้เสมหะเฟื่อง บำรุงธาตุ ทำให้อาหารงวด[20] จากการศึกษาทางเคมีพบว่า เมล็ดพริกไทยมีส่วนประกอบของอัลคาลอยด์ คือ piperine, chavicine, piperamine[21] piperidine[22] มีน้ำมันหอมระเหยประมาณ 0.8% ซึ่งประกอบด้วย piperonol, dihydrochaveol, caryophyllene และ cryptone[21] พบว่า piperine ซึ่งเป็นสารที่พบในเมล็ดพริกไทยมีฤทธิ์กดประสาทส่วนกลาง, แก้ไข้, แก้ปวดและแก้อักเสบ[23] ซึ่ง piperine นี้ เมื่อทดสอบทางพิษวิทยา พบว่าเมื่อให้สารนี้ในหนูที่ขนาด 5-20 เท่าของขนาดที่ให้ในคน ไม่เกิดผลต่อการเจริญเติบโต อาหารที่กิน จำนวนเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวทุกชนิด ปริมาณเลือด ผลของค่าชีวเคมีของซีรั่ม เช่น โปรตีนรวม อัลบูมิน กลอบูลิน น้ำตาล และโคเลสเตอรอล และค่าเอ็นซัยม์[24] นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดพริกไทยเพิ่มเมตาบอลิซึม (basal metabolic rate) ในหนูบางตัว เพิ่มการรับอ๊อกซิเจนของเนื้อเยื่อ (tissue oxygen uptake)เพิ่มการทำงานของเอ็นซัยม์ thyroid peroxidase และระดับพลาสมา T_3 และ T_4[25]

ดีปลี มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Piper retrofractum* Vahl หรือ *Piper chaba* Hunter[2] ตามสรรพคุณยาโบราณใช้ผลดีปลีปรุงเป็นยาประจำปถวีธาตุ และแก้ธาตุพิการ ขับลมในลำไส้ แก้ท้องร่วง

ดอกรับประทานเป็นยาขับรกให้ออกง่ายภายหลังการคลอดบุตรและใช้ในเวลาโลหิตตกมาก แก้ปวดปถวีพิการ บำรุงธาตุ[20] จากการศึกษาทางเคมีพบว่าผลของดีปลีมี pipernonaline, piperundecalidine[26] และ dehydropipernonaline ซึ่งสามารถขยายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจ (coronary vasorelaxant activity)[27], piperine ซึ่งสามารถระงับอาการชักในหนูถีบจักร ลดการเคลื่อนไหวแบบ spontaneous และลดอุณหภูมิของร่างการหนู[28] น้ำมันจากผลดีปลีขนาด 0.002 % มีผลยับยั้งการเคลื่อนไหวของพยาธิไส้เดือน *Ascaris lumbricoides* ภายใน 15 นาทีโดยให้ผลต่ำกว่า tetramisole-HCL แต่ดีกว่า piperazine[29]

นักวิจัยของอินเดียพบว่าส่วนประกอบของตรีกฎุกทั้งสามชนิดมีผลต่อเภสัชจลนศาสตร์ของยาอื่นที่ให้ด้วยกันโดยเพิ่มฤทธิ์ของยา vasicine และ sparteine โดยอาจไปเพิ่มการดูดซึมที่ทางเดินอาหารหรือช่วยป้องกันการถูกเปลี่ยนแปลงในร่างกายหลังจากการถูกดูดซึมหรือโดยทั้งสองกลไก[30]

การศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของมหาพิกัดตรีกฎุกตำรับปิตตะสมุฏฐานตำรับวาตะสมุฏฐานและตำรับเสมหะสมุฏฐานในหนูขาวเพื่อให้ทราบถึงความปลอดภัยของยานี้ อันจะทำให้เกิดความมั่นใจในการใช้ยาและทำให้ทราบข้อควรระวังในการใช้ยา

วัตถุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

การทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันแต่ละสมุฏฐานให้หนูขาว (Wistar rat) 80 ตัว (เพศผู้ 40 ตัว น้ำหนักตัว 230 ± 20 กรัม, เพศเมีย 40 ตัว น้ำหนักตัว 200 ± 20 กรัม) จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงในห้องทดลองที่มีอุณหภูมิ 25 ± 1°C ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด และน้ำประปาที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

สมุนไพร

ซื้อจากร้านขายสมุนไพรแล้วตรวจสอบโดยฝ่ายเภสัชเวทกองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร นำมาล้างให้สะอาดอบแห้งที่ 50°C บดเป็นผงหยาบ เพื่อเตรียมสกัดให้สัตว์ทดลอง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดสำหรับการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลัน

นำสมุนไพรที่บดหยาบในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ของแต่ละสมุฏฐานดังแสดงในตาราง[1]มาต้มสกัดด้วยน้ำโดยวิธี reflux นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งโดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ ก่อนทำการทดลองนำสารสกัดเข้มข้นที่ได้มาทำให้เจือจางในความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้น้ำ แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูขาว ในการคำนวณขนาดของยาที่ป้อนให้แก่หนูนั้น คำนวณจากขนาดที่ใช้ในคน (therapeutic dose, TD) โดยคิดว่าคนน้ำหนักตัว 50 กิโลกรัมใช้ยาตรีกฎุกในรูปของยาต้ม 1 ชุด ซึ่งมีตัวยาอยู่ 24 ส่วน น้ำหนักส่วนละ 1 สลึง หรือ 3.75 กรัม รับประทานติดต่อกัน 5 วัน คิดเป็นขนาดใช้ในคน (1TD) 0.36 ก./กก./วัน และกรอกให้แก่สัตว์ทดลองในขนาด 1, 7 และ 49 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน

การทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีกฎุก

แบ่งหนูขาวเป็นกลุ่มโดยวิธีสุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูเพศละ 10 ตัว จำนวน 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ป้อนน้ำยาสารสกัด 0.36 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัมต่อวัน (ก./กก./วัน) กลุ่มที่ 2 ป้อนน้ำยาสารสกัด 2.52 ก./กก./วัน กลุ่มที่ 3 ป้อนน้ำยา

สารสกัด 17.64 ก./กก./วัน หรือเทียบเท่ากับ 1, 7 และ 49 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนตามลำดับ กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุม โดยป้อนน้ำ 10 มล./กก. ทุกวัน วันละครั้งเป็นเวลา 10 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลองระหว่างการทดลอง

เมื่อครบกำหนดเวลา 10 วัน ทำการสลบหนูขาวด้วยอีเธอร์ เจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือด inferior vena cava เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา

สมุฏฐาน	อัตราส่วนของสมุนไพร		
	เหง้าขิงแห้ง	เมล็ดพริกไทย	ผลดีปลี
ปิตตะ	12	8	4
วาตะ	4	12	8
เสมหะ	8	4	12

ได้แก่ ค่าร้อยละฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด โดยนับจาก counting chamber และค่าทางชีวเคมี ได้แก่ค่า serum glutamic oxaloacetic transaminase หรือ aspartate aminotransferase (AST) และค่า serum glutamic pyruvic transaminase หรือ alanine aminotransferase (ALT) โดยวิธี Henry และคณะ[31] ค่า alkaline phosphatase (ALP) โดยวิธีของ Bowers และคณะ[32] ค่าครีอาตินินโดยวิธี Jaffe's reaction ค่า blood urea nitrogen (BUN) โดยวิธี diacetylmonoxime ค่าโคเลสเตอรอล โดยวิธี enzymatic reaction ค่าโปรตีนรวม โดยวิธี biuret ค่าอัลบูมิน โดยวิธี dye binding กับ bromcersol green ค่ากลอบูลิน โดยหักค่าของอัลบูมินออกจากค่าโปรตีนรวม[33]

นอกจากนั้นทำการผ่าชากชันสูตรตรวจหาพยาธิสภาพที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายใน ได้แก่ หัวใจ ไต ปอด หลอดลม ต่อมธัยรอยด์ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ดับ ตับอ่อน ลำไส้ ม้าม กระเพาะปัสสาวะ และอัณฑะ (หรือรังไข่และมดลูก) โดยพิจารณาตำแหน่ง รูปร่าง สี ขนาดของอวัยวะต่าง ๆ นี้แล้วนำไปชั่งเพื่อคำนวณหาน้ำหนักสัมพัทธ์จากนั้นเก็บอวัยวะภายในต่าง ๆ ใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน แล้วนำอวัยวะดับและไดไปเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อโดยย้อมสี hematoxylin และ eosin เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยสถิติเชิงพรรณนา ทดสอบสมมุติฐานโดยใช้วิธี one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan multiple range test ที่ $p<0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS/PC

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของยาตรีกฎกตำรับปิตตะสมุฏฐาน

ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา *(ตารางที่ 1)*

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีค่าฮีมาโตคริตต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูที่ได้รับยา 17.64 ก./กก./วัน มีจำนวนเกล็ดเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูเพศเมียที่ได้รับยาทุกขนาด ค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมี *(ตารางที่ 2)*

หนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีค่าอัลบูมินสูงกว่าแต่มีค่ากลอบูลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยา 0.36 ก./กก./วัน มีค่าครีอาตินิน และ BUN ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูขาวที่ได้รับยา 0.36 ก./กก./วัน

และ 17.64 ก./กก./วัน หนูที่ได้รับยา 17.64 ก./กก./วัน มีค่า ALT สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ มีค่าโปรตีนรวมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยา 17.64 ก./กก./วัน มีค่า ALT และ โคเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูที่ได้รับยา 0.36 และ 17.64 ก./กก./วัน มีค่าโปรตีนรวมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและในหนูขาวที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีค่าครีอาตินินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในหนูขาวที่ได้รับยา 0.36 ก./กก./วัน มีค่า AST ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการผ่าชากชันสูตรของหนูขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีชีวิตรอดจนสิ้นสุดการทดลอง

พบว่าไม่ปรากฏความผิดปกติใด ๆ ที่มองเห็นด้วยตาเปล่าในหนูขาวทุกกลุ่มที่ได้รับยา และกลุ่มควบคุม สัตว์ที่ตายไปก่อนสิ้นสุดการทดลองเกิดเนื่องจากการป้อนยาพลาดเข้าช่องทางเดินหายใจ ส่วนอวัยวะภายในเมื่อคำนวณเป็นน้ำหนักสัมพัทธ์ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม *(ตารางที่ 5)* พบว่า ในหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยา 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตทั้งสองข้างและกระเพาะปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยา 17.64 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในหนูขาวที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของปอดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

หนูขาวเพศเมียที่ได้รับยา 17.64 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตข้างขวา ตับและกระเพาะอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา *(ตารางที่ 8)* พบว่าหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 2.52 ก./กก./วัน ปรากฏ fatty change ที่ตับ 10% และ 20% ตามลำดับ หนูขาวเพศผู้กลุ่มที่ได้รับน้ำและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36, 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน ปรากฏ hydrocalyx ที่ ไต 30%, 30%, 40% และ 40% ตามลำดับ ในหนูเพศเมียกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36, 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน ปรากฏ fatty change ที่ตับ 20%, 10%, 20% และ 22.22% ตามลำดับ และ nephrocalcinosis 80%, 60%, 70%, และ 44.44% ตามลำดับ หนูเพศเมียกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 2.52 ก./กก./วันพบ hydrocalyx 50%, 30%, และ 20% ตามลำดับ หนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 17.46 ก./กก./วัน ปรากฏ chronic pyelonephritis 11.11%

วิจารณ์

จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีกฎุกตำรับปัตตะสมุฏฐานในหนูทั้งสองเพศพบว่าผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่ม มีค่าฮีมาโตคริต และจำนวนเกล็ดเลือด แตกต่างจากกลุ่มควบคุมบ้างและยังอยู่ในช่วงค่าปกติ การตรวจชีรั่มทางชีวเคมีของหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มพบว่าค่าอัลบูมินสูงกว่าและมีค่ากลอบูลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเกิดจากการที่หนูขาวกินน้ำได้น้อยลงหรือเกิดจากการสังเคราะห์อัลบูมินเพิ่มมากขึ้นและสังเคราะห์กลอบูลินลดลง[33] หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 17.64 ก./กก./วัน มีค่า ALT สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งพบว่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแสดงว่าสารสกัดขนาดสูงอาจมีผลต่อตับและการทำงานของตับได้ส่วนค่า AST, ค่าอาตินิน,

ตารางที่ 1 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีกฎก เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.52	17.64	0.00	0.36	2.52	17.64
ตำรับปัตตะสมุฏฐาน	n=9	n=9	n=7	n=9	n=10	n=9	n=7	n=7
Hematocrit (%)	44.11±0.93	42.33±1.58	41.57±2.51*	41.78±2.22	43.70±1.70	42.67±1.00	43.00±1.41	43.86±3.02
White Blood cells (X 10^3 cell^3/mm^3)	43.67±5.66	48.11±4.94	44.86±3.53	46.22±8.39	40.80±9.31	41.89±5.11	43.86±5.79	44.71±5.38
Platelet (X 10^3 cell^3/mm^3)	302.22±19.86	310.00±18.71	301.43±22.68	327.78±33.46*	286.00±21.19	300.00±30.82	298.57±29.11	301.43±13.45
ตำรับวาตะสมุฏฐาน	n=9	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Hematocrit (%)	44.11±0.93	45.78±1.56	41.40±1.58*	44.10±3.21	43.70±1.70	45.30±1.70	44.20±1.99	45.00±1.56
White Blood cells	43.67±5.66	46.00±6.04	43.60±5.06	43.30±2.63	40.80±9.31	42.60±3.10	40.80±4.26	40.00±3.33
Platelet	302.22±19.86	275.56±12.36*	306.00±19.55	280.00±17.64*	286.00±21.19	274.00±27.97	276.00±27.97	292.00±27.81
ตำรับเสมหะสมุฏฐาน	n=9	n=9	n=10	n=10	n=10	n=10	n=9	n=10
Hematocrit (%)	44.11±0.93	43.67±2.18	44.30±1.89	45.40±1.78	43.70±1.70	41.80±2.97	43.78±2.44	44.80±2.70
White Blood cells	43.67±5.66	44.33±5.10	43.70±4.64	39.40±4.27	40.80±9.31	41.50±3.41	40.56±6.29	39.20±5.00
Platelet	302.22±19.86	311.11±22.61	288.00±14.76	294.00±35.34	286.00±21.19	304.00±22.71	290.00±21.21	303.00±53.34

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 ค่าทางชีวเคมีของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีกฎก (ตำรับปิตตะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.52	17.64	0.00	0.36	2.52	17.64
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
AST(U/l)	79.80±5.01	76.30±15.20	86.00±17.91	74.50±9.64	78.80±11.67	66.80±8.77*	77.20±11.24	74.78±11.46
ALT(U/l)	21.30±3.62	21.00±3.74	19.80±4.39	26.10±3.93*	17.80±3.79	19.30±3.95	17.50±3.72	24.22±4.27*
ALP(U/l)	324.00±99.39	279.80±63.62	292.10±68.91	338.90±107.52	138.40±45.54	156.70±28.15	149.70±48.71	126.89±24.32
Creatinine(mg%)	1.45±0.10	1.16±0.15*	1.55±0.17	1.36±0.15	1.22±0.18	1.10±0.19	1.54±0.19*	1.36±0.17
BUN (mg%)	26.00±1.63	23.60±2.01*	24.20±2.35	25.00±2.49	24.90±3.51	24.50±3.06	23.60±2.68	22.44±2.65
Cholesterol(mg%)	70.40±4.45	74.50±8.04	74.90±16.12	77.50±8.04	65.50±7.72	65.00±16.18	60.90±4.38	78.22±11.85*
Total protein(g%)	5.73±0.18	6.18±0.17*	5.75±0.29	6.00±0.18*	5.79±0.28	6.43±0.25*	5.84±0.29	6.26±0.13*
Albumin(g%)	2.69±0.12	3.72±0.16*	3.75±0.15*	3.92±0.12*	2.90±0.11	4.07±0.23*	4.04±0.21*	4.37±0.06*
Globulin(g%)	3.04±0.24	2.46±0.12*	2.00±0.24*	2.07±0.20*	2.89±0.26	2.36±0.15*	1.80±0.21*	1.89±0.12*

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 3 ค่าทางชีวเคมีของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีกฎก(ตำรับวาตะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.52	17.64	0.00	0.36	2.52	17.64
	n=10	n=9	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
AST(U/l)	79.80±5.01	91.89±16.47*	85.10±7.85	96.20±7.90*	78.80±11.67	75.20±8.11	76.80±9.00	79.60±8.42
ALT(U/l)	21.30±3.62	24.33±7.12	23.20±4.39	25.40±4.25	17.80±3.79	18.60±3.78	17.50±3.41	21.50±5.28
ALP(U/l)	324.00±99.39	307.11±83.28	370.40±118.51	387.60±92.51	138.40±45.54	141.70±32.96	162.70±27.52	163.20±34.45
Creatinine(mg%)	1.45±0.100	1.08±0.16*	1.08±0.12*	1.13±0.11*	1.22±0.18	0.98±0.07*	1.00±0.07*	1.18±0.20
BUN (mg%)	26.00±1.63	24.67±1.94	24.00±2.87*	22.60±1.58*	24.90±3.51	25.90±3.00	24.90±2.33	21.30±3.74*
Cholesterol(mg%)	70.40±4.45	69.89±7.04	79.90±8.70*	75.70±10.36	65.50±7.72	65.50±9.59	67.80±11.88	70.10±12.64
Total protein(g%)	5.73±0.18	5.85±0.19	5.84±0.39	6.00±0.21*	5.79±0.28	5.98±0.31	5.66±0.31	6.13±0.34*
Albumin(g%)	2.69±0.12	2.65±0.05	2.73±0.09	2.88±0.12*	2.90±0.11	2.96±0.13	3.04±0.19*	3.14±0.10*
Globulin(g%)	3.04±0.24	3.20±0.21	3.11±0.33	3.11±0.25	2.89±0.26	3.02±0.30	2.62±0.15*	2.99±0.31

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 4 ค่าทางชีวเคมีของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีกฎก(ตำรับเสมหะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.52	17.64	0.00	0.36	2.52	17.64
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
AST(U/l)	79.80±5.01	103.80±30.30*	55.40±18.76*	87.00±8.70	78.80±11.67	81.10±9.55	44.60±17.42*	79.70±9.62
ALT(U/l)	21.30±3.62	26.30±8.14*	21.30±3.27	22.80±2.94	17.80±3.79	23.00±7.33	17.00±4.16	21.50±6.23
ALP(U/l)	324.00±99.39	312.20±97.61	406.70±130.46	260.30±74.34	138.40±45.54	158.80±32.05	141.90±22.62	144.10±36.55
Creatinine(mg%)	1.45±0.10	1.32±0.19	1.66±0.20*	1.26±0.17*	1.22±0.15	1.14±0.17	1.48±0.21*	1.23±0.08
BUN (mg%)	26.00±1.63	32.20±1.32*	29.90±1.97*	31.50±2.46*	24.90±3.51	32.00±4.85*	28.20±3.71	28.00±3.77
Cholesterol(mg%)	70.40±4.45	73.70±8.47	71.10±7.45	74.20±8.89	65.50±7.72	69.20±11.19	65.40±11.66	70.10±10.64
Total protein(g%)	5.73±0.18	6.06±0.17*	6.25±0.39*	6.10±0.34*	5.79±0.28	6.13±0.33*	6.26±0.33*	6.42±0.14*
Albumin(g%)	2.69±0.12	3.05±0.07*	3.13±0.15*	3.20±0.10*	2.90±0.11	3.08±0.15*	3.19±0.16*	3.47±0.12*
Globulin(g%)	3.04±0.24	3.01±0.17	3.12±0.35	2.90±0.32	2.89±0.26	3.05±0.27	3.07±0.24	2.94±0.14

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 5 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม)ของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีกฎก(ตำรับปิตตะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.52	17.64	0.00	0.36	2.52	17.64
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=9
หัวใจ	3.32±0.16	3.32±0.19	3.29±0.09	3.18±0.20	3.49±0.26	3.47±0.17	3.50±0.15	3.59±0.25
ไตข้างขวา	3.64±0.14	3.73±0.26	3.91±0.24*	3.90±0.28*	3.64±0.25	3.59±0.16	3.74±0.27	3.88±0.14*
ไตข้างซ้าย	3.45±0.16	3.53±0.16	3.68±0.29*	3.79±0.27*	3.47±0.22	3.48±0.07	3.57±0.11	3.56±0.11
กระเพาะปัสสาวะ	0.22±0.02	0.25±0.06	0.28±0.07*	0.30±0.03*	0.36±0.05	0.33±0.05	0.37±0.08	0.33±0.05
ตับ	45.15±1.67	44.97±1.61	43.50±3.89	49.04±2.89*	40.59±2.19	41.87±2.44	41.45±2.81	47.12±4.93*
ม้าม	3.05±0.21	3.14±0.37	3.24±0.34	3.37±0.40	3.09±0.33	3.15±0.36	3.40±0.41	3.12±0.48
กระเพาะอาหาร	5.28±0.50	5.07±0.69	5.19±0.42	5.59±0.56	5.96±0.62	5.65±0.43	5.95±0.40	6.72±0.59*
ปอด	5.33±0.63	5.13±0.24	4.90±0.31	5.03±0.38	5.94±0.59	6.51±1.25	5.91±0.35	5.71±0.74

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 6 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม)ของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีกฎุก(ตำรับวาตะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.52	17.64	0.00	0.36	2.52	17.64
	n=10	n=9	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=9
หัวใจ	3.32±0.16	3.11±0.18*	3.31±0.17	3.16±0.19	3.49±0.26	3.48±0.19	3.39±0.20	3.47±0.25
ไตข้างขวา	3.64±0.14	3.82±0.15	3.78±0.34	4.05±0.36*	3.64±0.25	3.81±0.14	3.62±0.27	3.80±0.28
ไตข้างซ้าย	3.45±0.16	3.65±0.27	3.61±0.25	3.67±0.19*	3.47±0.22	3.56±0.10	3.37±0.22	3.55±0.26
กระเพาะปัสสาวะ	0.22±0.02	0.26±0.04*	0.25±0.02	0.25±0.04	0.36±0.05	0.35±0.06	0.33±0.04	0.36±0.06
ตับ	45.15±1.67	44.55±1.84	45.72±1.50	49.28±2.77*	40.59±2.19	41.07±2.02	40.70±2.23	47.57±2.51*
ม้าม	3.05±0.21	3.01±0.31	3.40±0.21*	2.97±0.32	3.09±0.33	3.09±0.24	3.01±0.40	2.83±0.28
กระเพาะอาหาร	5.28±0.50	5.13±0.41	5.45±0.53	6.06±0.43*	5.96±0.62	6.21±0.55	5.91±0.47	7.03±0.70*
ปอด	5.33±0.63	5.11±0.44	5.11±0.41	5.19±0.45	5.94±0.59	5.74±0.37	5.80±0.55	6.07±0.61

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 7 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม)ของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีกฎก(ตำรับเสมหะสมุฏฐาน) เป็นเวลา 10 วัน

	เพศผู้				เพศเมีย			
	ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
	0.00	0.36	2.52	17.64	0.00	0.36	2.52	17.64
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
หัวใจ	3.32±0.16	3.16±0.17	3.28±0.19	3.37±0.22	3.49±0.26	3.50±0.38	3.53±0.26	3.59±0.25
ไตข้างขวา	3.64±0.14	3.62±0.27	3.81±0.23	3.73±0.30	3.64±0.25	3.36±0.14*	3.57±0.26	3.76±0.19
ไตข้างซ้าย	3.45±0.16	3.46±0.18	3.70±0.26*	3.54±0.22	3.47±0.22	3.27±0.21*	3.41±0.23	3.47±0.13
กระเพาะปัสสาวะ	0.22±0.02	0.26±0.04	0.24±0.05	0.28±0.04*	0.36±0.05	0.31±0.05	0.36±0.06	0.36±0.05
ตับ	45.15±1.67	43.95±1.32	48.08±1.78*	48.03±3.32*	40.59±2.19	42.07±3.45	41.41±2.87	47.55±2.11*
ม้าม	3.05±0.21	3.04±0.30	3.16±0.31	2.84±0.27	3.09±0.33	2.89±0.30	3.04±0.31	3.05±0.59
กระเพาะอาหาร	5.28±0.50	5.23±0.34	5.21±0.52	5.91±0.30*	5.96±0.62	6.44±0.71	6.19±0.56	6.92±0.51*
ปอด	5.33±0.63	4.66±0.29*	4.94±0.25	5.28±0.45	5.94±0.59	5.74±0.31	5.99±0.40	5.96±0.50

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวที่ป้อนยาแผนโบราณตรีกฎุกเป็นเวลา 10 วัน

		เพศผู้				เพศเมีย			
ตำรับปิตตะสมุฏฐาน		ขนาดของยา (ก./กก./วัน)				ขนาดของยา (ก./กก./วัน)			
Organ	Lesion	0.00	0.36	2.52	17.64	0.00	0.36	2.52	17.64
Liver	Fatty change		1/10(10%)	2/10(20%)		2/10(20%)	1/10(10%)	2/10(20%)	2/9(22.22%)
Kidney	Nephrocalcinosis					8/10(80%)	6/10(60%)	7/10(70%)	4/9(44.44%)
	Hydrocalyx	3/10(30%)	3/10(30%)	4/10(40%)	4/10(40%)	5/10(50%)	3/10(30%)	2/10(20%)	
	Chronic Pyelonephritis								1/9(11.11%)
ตำรับวาตะสมุฏฐาน									
Liver	Fatty change			2/10(20%)		2/10(20%)			
Kidney	Nephrocalcinosis					8/10(80%)	7/10(70%)	5/10(50%)	3/10(30%)
	Hydrocalxy	3/10(30%)	1/10(10%)	3/10(30%)	6/10(60%)	5/10(50%)	4/10(40%)	2/10(20%)	2/10(20%)
	Chronic Pyelonephritis								
ตำรับเสมหะสมุฏฐาน									
Liver	Fatty change					2/10(20%)			1/10(10%)
Kidney	Nephrocalcinosis					7/10(70%)	2/10(20%)	7/10(70%)	4/10(40%)
	Hydrocalxy	2/10(20%)	2/10(20%)	2/10(20%)	1/10(10%)		1/10(10%)		1/10(10%)
	ChronicPyelonephritis								

BUN, โคเลสเตอรอล และโปรตีนรวม ที่มีการเปลี่ยนแปลงในหนูบางกลุ่ม ที่ได้รับสารสกัด เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ได้เพิ่มขึ้นหรือลดลงตามขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นไม่น่าจะเกิดจากผลของสารสกัด ในหนูขาวทั้งสองเพศไม่พบสิ่งผิดปกติของอวัยวะภายในต่าง ๆ เมื่อดูด้วยตาเปล่า การตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาของตับและไตพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

2. ผลการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของยาตรีกฎกตำรับวาตะสมุฏฐาน

ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา *(ตารางที่ 1)*

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีค่าฮีมาโตคริตต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูที่ได้รับยา 0.36 และ 17.64 ก./กก./วัน มีจำนวนเกล็ดเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

หนูขาวเพศเมียที่ได้รับยาทุกขนาดมีค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมี *(ตารางที่ 3)*

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยาทุกขนาดมีค่าครีอาตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูที่ได้รับยา 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน มีค่า BUN ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศผู้ที่ได้รับยา 0.36 และ 17.64 ก./กก./วัน มีค่า AST สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีค่าโคเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูที่ได้รับยา 17.64 ก./กก./วัน มีค่าโปรตีนรวมและอัลบูมินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยา 17.64 ก./กก./วัน มีค่า BUN ต่ำกว่า แต่มีค่าโปรตีนรวมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูที่ได้รับยา 0.36 และ 2.52 ก./กก./วัน มีค่าครีอาตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนใหญ่หนูขาวที่ได้รับยา 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน มีค่าอัลบูมินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในหนูขาวที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีค่ากลอบูลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในหนูขาวที่ได้รับยา 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน มีค่าอัลบูมินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในหนูขาวที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีค่ากลอบูลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการผ่าชำแหละสูตรของหนูขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีชีวิตรอดจนสิ้นสุดการทดลอง

พบว่าไม่ปรากฏความผิดปกติใด ๆ ที่มองเห็นด้วยตาเปล่าในหนูขาวทุกกลุ่มที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุมส่วนอวัยวะภายในเมื่อคำนวณเป็นน้ำหนักสัมพัทธ์ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม *(ตารางที่ 6)* พบว่าในหนูเพศผู้ที่ได้รับยา 0.36 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของหัวใจ แต่ต่ำกว่ากระเพาะปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยา 17.64 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตทั้งสองข้าง ตับ และกระเพาะอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในหนูขาวที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของม้ามสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยา 17.64 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับและ กระเพาะอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา *(ตารางที่ 8)*

พบว่าหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 2.52 ก./กก./วัน ปรากฏ fatty change ที่ตับ 20% หนูขาวเพศผู้กลุ่มที่ได้รับน้ำและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36, 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน ปรากฏ

hydrocalyx ที่ไต 30%, 10%, 30% และ 60% ตามลำดับ ในหนูเพศเมียกลุ่มควบคุมปรากฏ fatty change ที่ตับ 20% หนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับน้ำและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36, 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน ปรากฏ nephrocalcinosis ที่ไต 80%, 70%, 50% และ 30% ตามลำดับ หนูเพศเมียกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36, 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน ปรากฏ hydrocalyx ที่ไต 50%, 40%, 20% และ 20% ตามลำดับ

วิจารณ์

จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีกฎุกตำรับวาตะสมุฏฐานพบว่าผลการตรวจทางโลหิตวิทยาพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่าฮีมาโตคริตและจำนวนเกล็ดเลือด ที่เกิดในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่มแต่ยังอยู่ในค่าปกติ ในทำนองเดียวกันการตรวจชีรั่มทางชีวเคมีของหนูทั้งสองเพศพบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า AST, โคเลสเตอรอล และ กลอบูลิน ในหนูบางกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นไม่น่าจะเกิดจากผลของสารสกัด นอกจากนี้พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดในขนาดสูงมีระดับชีรั่มอัลบูมินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การเพิ่มขึ้นของอัลบูมินนี้อาจเกิดจากตับมีการสร้างอัลบูมินเพิ่มขึ้น หรือจากการที่หนูกินน้ำน้อยลงจึงเป็นผลทำให้ระดับโปรตีนรวมในชีรั่มเพิ่มขึ้นด้วย ในหนูที่ได้รับสารสกัดเกือบทุกกลุ่ม ยกเว้นหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 17.64 ก./ก./วัน มีระดับครีอาตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแต่การเปลี่ยนแปลงไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นไม่น่าจะเกิดจากผลของสารสกัด ในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดเมื่อดูด้วยตาเปล่าไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในต่าง ๆ และจากการตรวจสอบทางด้านจุลพยาธิวิทยาของตับและไตไม่พบความแตกต่างของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกับกลุ่มควบคุม

3. ผลการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของยาตรีกฎุกตำรับเสมหะสมุฏฐาน

ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา *(ตารางที่ 1)*

ในหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับยาทุกขนาดมีค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมี *(ตารางที่ 4)*

หนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับยาทุกขนาดมีค่าโปรตีนรวมและค่าอัลบูมินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยาทุกขนาดมีค่า BUN สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูที่ได้รับยา 0.36 ก./กก./วัน มีค่า AST และ ALT สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่หนูที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีค่า AST ต่ำกว่า แต่ค่าครีอาตินินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูที่ได้รับยา 17.64 ก./กก./วัน มีค่าครีอตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

หนูขาวเพศเมียที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีค่า AST ต่ำกว่า แต่มีค่าครีอาตินินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่ามีนัยสำคัญ และหนูที่ได้รับยา 0.36 ก./กก./วัน มีค่า BUN สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการผ่าชากชันสูตรของหนูขาวกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีชีวิตรอดจนสิ้นสุดการทดลอง

พบว่าไม่ปรากฏความผิดปกติใด ๆ ที่มองเห็นด้วยตาเปล่าในหนูกลุ่มที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุม ส่วนอวัยวะภายในเมื่อคำนวณเป็นน้ำหนักสัมพัทธ์

ต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัม *(ตารางที่ 7)* พบว่าหนูเพศผู้ที่ได้รับยา 0.36 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของปอดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูที่ได้รับยา 17.46 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของกระเพาะปัสสาวะ ตับ และ กระเพาะอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในหนูที่ได้รับยา 2.52 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตข้างซ้ายและตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

หนูเพศเมียที่ได้รับยา 17.46 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับและกระเพาะอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูที่ได้รับยา 0.36 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตทั้งสองข้างต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา *(ตารางที่ 8)*

พบว่าหนูขาวเพศผู้กลุ่มที่ได้รับน้ำและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36, 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน ปรากฏ hydrocalyx ที่ไต 20%, 20%, 20% และ 10% ตามลำดับในหนูเพศเมียกลุ่มควบคุมปรากฏ fatty change ที่ตับ 20% หนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับน้ำและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36, 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน พบ nephrocalcinosis ที่ไต 70%, 20%, 70% และ 40% ตามลำดับ หนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.36 และ 17.64 ก./กก./วัน พบ hydoecalyx ที่ไต 10% และ 10% ตามลำดับ

วิจารณ์

จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณตรีกฎกตำรับเสมหะสมุฏฐาน พบว่า ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาแสดงว่าสารสกัดที่ให้ในหนูทุกขนาดไม่มีผลต่อค่าฮีมาโตคริต เม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือด

การตรวจซีรั่มทางชีวเคมีของหนูพบว่า หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีค่าอัลบูมินสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเกิดจากการสังเคราะห์อัลบูมินเพิ่มขึ้นหรือเกิดจากหนูกินน้ำได้น้อยลงจึงทำให้ค่าโปรตีนรวมสูงขึ้นด้วย ในหนูเพศผู้ทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมีค่า BUN สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อาจเกิดจากการสังเคราะห์เพิ่มขึ้น[33] หรือหนูกินน้ำได้น้อยลงแต่ไม่น่าจะเกิดจากการทำงานของไตผิดปกติไป เพราะการเปลี่ยนแปลงค่าครีอาตินินไม่สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ BUN ส่วนการเปลี่ยนแปลงของค่า AST และ ALT ของหนูบางกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่เพิ่มขึ้นหรือลดลงตามขนาดของสารสกัดที่ได้รับเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจึงไม่น่าจะเกิดจากผลของสารสกัด ในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดเมื่อดูด้วยตาเปล่าไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในต่างๆ และจากการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาของตับและไตไม่พบความแตกต่างของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกับกลุ่มควบคุม

สรุป

ยาตรีกฎกแผนโบราณมหาพิกัดซึ่งใช้ในวสันตฤดู (ฤดูฝน) ประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด คือเหง้าขิงแห้ง เมล็ดพริกไทย และผลดีปลี โดยมีอัตราส่วนของสมุนไพรทั้งสามแตกต่างกันไปตามกองสมุฏฐานโรคซึ่งได้แก่ ปิตตะ วาตะ และเสมหะสมุฏฐาน จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดด้วยน้ำของยาตรีกฎกทั้งสามตำรับในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์โดยการป้อนสารสกัดขนาด 0.36, 2.52 และ 17.64 ก./กก./วัน เป็นระยะเวลา 10 วัน หรือคิดเป็น 1, 7 และ 49 เท่า ของขนาดที่ใช้ในคน ผลจากการวิจัยโดยรวมสรุปได้ว่า

1. ยาทั้งสามตำรับไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบเลือดโดยไม่มีผลต่อค่าฮีมา

โตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาวหรือเกล็ดเลือด

2. ผลการตรวจทางชีวเคมีของซีรั่มพบว่า

2.1 ในหนูบางกลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับวาตะสมุฏฐานและเสมหะสมุฏฐาน การเปลี่ยนแปลงของค่า AST และ ALT เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้ นอกจากนี้สารสกัดยาตรีกฎุกทุกตำรับ ทุกขนาดก็ไม่มีผลต่อค่า ALP เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และผลการตรวจค่าทางจุลพยาธิของตับไม่พบความแตกต่างของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่ายาตรีกฎุกตำรับวาตะสมุฏฐานและเสมหะสมุฏฐานในขนาดที่ให้ไม่มีผลต่อตับของหนูขาวส่วนหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดตรีกฎุกตำรับปิตตะสมุฏฐานในขนาดสูงมีค่า ALT และน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับมากกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นสารสกัดตรีกฎุกตำรับปิตตะสมุฏฐานในขนาดสูงอาจจะมีผลต่อตับหรือการทำงานของตับ

2.2 หนูที่ได้รับสารสกัดตรีกฎุกตำรับวาตะสมุฏฐานเกือบทุกกลุ่มมีค่าครีอาตินิน และ BUN น้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่หนูที่ได้รับสารสกัดตำรับปิตตะสมุฏฐานและเสมหะสมุฏฐานมีการเปลี่ยนแปลงของค่าครีอาตินินทั้งเพิ่มขึ้น, และลดลง และไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดตำรับเสมหะสมุฏฐานมีค่า BUN สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแต่ค่า BUN ที่เพิ่มขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้และการตรวจสอบทางด้านจุลพยาธิวิทยาของไตไม่พบความแตกต่างของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุม ผลการทดลองนี้อาจสรุปได้ว่าสารสกัดตรีกฎุกในขนาดที่ให้ไม่มีผลต่อการทำงานของไตของหนูขาว

2.3 หนูที่ได้รับสารสกัดตำรับปิตตะสมุฏฐานและตำรับเสมหะสมุฏฐานเกือบทุกกลุ่มและหนูที่ได้รับสารสกัดตำรับวาตะสมุฏฐานขนาด 17.64 ก./กก./วัน มีระดับอัลบูมินและโปรตีนรวมในซีรั่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นสารสกัดตรีกฎุกอาจมีผลกระตุ้นการสังเคราะห์อัลบูมินของตับได้หรืออาจเกิดจากสัตว์ทดลองกลุ่มดังกล่าวกินน้ำน้อยลง

3. จากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของตับและไตของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดตำรับต่าง ๆ เทียบกับกลุ่มควบคุมไม่พบว่ามีความผิดปกติใดที่อาจกล่าวได้ว่าเนื่องมาจากการได้รับสารสกัด

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายเภสัชเวท กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร ในการจัดซื้อและตรวจสอบสมุนไพร นายแพทย์สมนึก เจษฎาภัทรกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในการตรวจสอบสไลด์เนื้อเยื่อของหนูทดลอง นางสาวอัญชลี จูฑะพุทธิ ฝ่ายเภสัชวิทยา ในการตรวจสอบและแก้ไขเอกสาร และนายครุณ เพ็ชรพลาย ผู้อำนวยการกองวิจัยและพัฒนาสมุนไพรที่สนับสนุนและให้คำแนะนำ

เอกสารอ้างอิง

1. มูลนิธิฟื้นฟูส่งเสริมการแพทย์ไทยเดิม. อายุรเวทวิทยาลัย (ชีวกโกมารภัจจ์). 2535. ตำราการแพทย์ไทยเดิม ฉบับที่ 1. โรงพิมพ์สามเจริญพาณิช. กรุงเทพมหานคร. หน้า 412

2. เต็ม สมิตินันท์. 2523. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์ ชื่อพื้นเมือง). ฟันนี่พับลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร. หน้า 265, 268, 355.

3. สมาคม ร.ร.แพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ พระนคร. 2510 ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคหนึ่ง).

หน้า 187-188.

4. Gopalam, A. and Ratnambal, M.J. 1989. " Essential oil of ginger." Indain. Perfum. 33(1): 63-9. Through CA 112 : 234117b, 1990.

5. Fukiko, S. *et al.* 1978 "Studies on constituents of essential oil from *Zingiber officinale* Roscoe. Part I. Constituents of essential oil from rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe." Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 52(5) : 207-11. Through CA 89 : 152563m, 1978.

6. Kikuzaki, H., Tsai, S.M. and Nakatani, N. 1992 Constituents of Zingiberaceae. 5. Gingerdiol Related Compounds from the Rhizomes of *Zingiber officinale*. Phytochemistry 31(5) : 1783-1786.

7. Yoshikawa, M., Hatakeyama, S., Taniguchi, K., Matuda, H. and Yamahara, J. 1992. 6-Gingersulfonic acid a new antiulcer principle, and Gingerglycolipid A, B and C, 3 new monoacyldigalactosylglycerols, from Zingiberis rhizoma originating in Taiwan. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 40 (8) : 2239-2241

8. Yamahara, J., Hatakeyama, S., Taniguchi, K., Kawamura, M. and Yoshikawa, M. 1992. Stomachic principles in ginger. 2. Pungent and antiulcer effects of low polar constituents isolated from ginger , the dried Rhizoma of *Zingiber officianle* Roscoe. cultivated in Tiwan the absolute stereostructure of a new diarylheptanoid. Yakugaku Zasshi 112 (9) : 645-655.

9. Zarate, R., Sukrasno and Yeoman, M.M. 1992. Application of 2 rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. J. Chromatogr. 609 (1-2): 407-413.

10. Sanders, W.J. and Seidel, J.L. 1992 New synthesis of the pungent principles of ginger zingerone and shogaol. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40(2) : 263-265.

11. Guh, J.H., Ko, F.N., Jong, T.T. and Teng, C.M. 1995. Antiplatelet effect of gingerol isolated from *Zingiber officinale*. J. Pharm. Pharmacol. 47(4): 329-32.

12. Denyer, C.V., Jackson, P., Loakes, D.M., Ellis, M.R. and Young, D.A. 1994. Isolation of antirhinoviral sesquiterpenes from ginger (*Zingiber officinale*). J. Nat. Prod. 57 (5): 658-62.

13. Zhou, Y. and Xu, R. 1992. Antioxidative effect of Chinese drugs. China Journal of Chinese Materia Medica. 17 (6) : 368-9.

14. Mascolo, N., Jain, R., Jain S.C. and Capasso, F. 1989 Ethnopharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*). J. Ethnopharmacol. 27 (1-2) : 129-40.

15. Panthong, A. and Taechasen, P. 1974. Study of the effects and the mechanism of action of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on motilily of the intact intestine in dogs. Chieng-Mai Med. Bull. 13(1) : 41-54.

16. Philips, S., Ruggier, R. and Hutchinson, S.E. 1993. *Zingiber officinale* (ginger) - an antiemetic for day case surgery. Anaesthesia

48(8) : 715 -7.

17. Bone, M.E., Wilkinson, D.J., Young, J.R., Mcneil, J. and Charlton, S. 1990 Ginger root-a new antiemetic. The effect of ginger root on post operative nausea and vomitting after major gynaecological surgery. Anaesthesia 45(8) : 669 -71.

18. Mowrey, D.B. 1982 Motion sickness, ginger, and psychophysic. The Lancet, March 20,655-657.

19. Grondved, A.; Brask, T.; Kambskard, J. and Hentzer, E. 1988 Ginger root against seasickness. A controlled trial on the open sea. Acta Otolaryngol (Stockh). 105 (1-2) : 45-9.

20. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณสำนักวัดพระเชตุพนฯ พระนคร 2510 "ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคสอง)" หน้า 63, 324.

21. Huang, K.C. 1993 The Pharmacology of Chinese Herbs. CRC Press Inc., Boca Raton. p. 139.

22. Pritzker, J. and Jungkunz, R. 1964. Senegalese pepper. Mill. Lebensm. Hyg. 36 : 308-16. Through CA 40 : 35417, 1964.

23. Lee, E.B., Shin, K.H. and Woo, W.S. 1984. Pharmacological study on piperine. Arch Pharmacol. Res. 7(2) : 127-32. Through CA 102 : 125111t, 1985.

24. Bhat, B.G. and Chandrasekhara, N. 1986. Lack of adverse influence of black pepper, its oleoresin and piperine in the weanling rat. J. Food. Saf. 7(4), 215-23 Through CA 105 : 41405r, 1986.

25. Tripathi, P., Tripathi, G.S. and Tripathi, Y.B. 1989. Thyrogenic response of *Piper nigrum*. Fitoterapia 60(6) : 539-542.

26. Tabuneng, W., Bando, H. and Amiya, T. 1983. Studies on the constituents of the crude drug Piperis Longi Fructus. On the alkaloids of fruits of *Piper longum* L. Chem. Pharm. Bull. 1 (10) : 3562-5. Through CA 100 : 99873c, 1984.

27. Shoji, N., Umeyama, A., Saito, N., Takemoto, T., Kajiwara, A. and Ohizumi, Y. 1986. Dehydro pipernonaline, and amide possessing coronary vasodilating activity, isolated from *Piper longum* L. J. Pharm. Sci. 75 (12) : 1188-99 . Through CA 106 : 149163v, 1987.

28. Shin, K.H., Yun H.S., Woo, W.S. and Lee, C.K. 1973. Pharmacologically active principle of *Piper retrofractum*. Soul Taehakkyo Saengyak Yonguso Opjukjip. 18 : 87-9. Through CA 93 : 215484s, 1980.

29. D'Cruz, J.L., Nimbkar, A.Y. and Kokate, C.K. 1980. Evaluation of fruits of *Piper longum* Linn. and leaves of *Adhatoda vasica* Nees. for antihelmintic activity. Indian Drugs. 17(4) : 99-101. Through CA 92 : 140486n, 1980.

30. Atal, C.K. Zushi, U. and Rao, P.G. 1981. Scientific evidence on the role of Ayurvedic herbals on bioavailability of drugs. J. Ethopharmacol. 4(2) : 229-32. Through CA 95 : 156487m, 1981.

31. Henry R.J., Chaimori N., Golub, O.J. and Berkman, S. 1960. Revised spectrophotometric methods for the determination of Glutamic

Oxaloacetic Transaminase, Glutamic Pyruvic Transaminase and Lactic Acid Dehydrogenase. Am. J. Clin. Path. 34(4) : 381-398.

32. Bowers, G.N. Jr and Mc Comb, R.B. 1975. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. Clin. Chem . 21(3) : 1988-1995.

33. วีกูล วีรานุวัติ และ กนกนาถ ชูปัญญา. 2525. เคมีคลินิค. พิมพ์ครั้งที่สอง คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร. หน้า 226, 229, 263, 441, 451.

34. สุรพล อิสรไกรศีล. 2536. โลหิตวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. คณะแพทย์ศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร. หน้า 38.

การศึกษาพิษของหมากดิบน้ำค้าง

Toxicity Study of *Hedyotis biflora* (Linn.) Lamk.

*เอมมนัส อัตตวิชญ์**
*ปราณี ชวลิตธำรง**
*ปราณี จันทเพ็ชร***
*กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร
**กองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

หมากดิบน้ำค้าง (*Hedyotis biflora* (Linn.) Lamk.) เป็นสมุนไพรที่เคยมีรายงานว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดกระต่ายที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วยสาร alloxan ได้ เพื่อศึกษาความปลอดภัยในการใช้หมากดิบน้ำค้างเป็นยา คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร และพิษกึ่งเรื้อรังในหนูขาว โดยให้สารสกัดด้วยน้ำของหมากดิบน้ำค้างแก่หนูถีบจักรทางปาก และคำนวณหาขนาดของสารสกัดที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) พบว่ามีค่ามากกว่า 20.0 กรัมของผงยาต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (ก./กก.) จากการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดด้วยน้ำของหมากดิบน้ำค้างในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ โดยป้อนสารสกัดขนาด 0.2, 2.0 และ 20.0 ก./กก. ติดต่อกันทุกวันนาน 4 เดือน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ พบว่าหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาด 20.0 ก./กก. ทั้งสองเพศ มีการเพิ่มของน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ผลทางโลหิตวิทยา พบว่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ของหนูเพศผู้กลุ่มทดลองทุกกลุ่มและหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 20.0 ก./กก. มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ยังอยู่ในช่วงค่าปกติ ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมีพบว่าหนูในกลุ่มทดลองเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 20.0 ก./กก. มีค่า AST, cholesterol, BUN, total protein และ globulin และในหนูกลุ่มทดลองเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 20.0 ก./กก. มีค่า AST, creatinine, total protein และ globulin ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้พบว่าน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของ สมอง ม้าม ไตทั้งสองข้าง และกระเพาะอาหาร ในหนูกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาด 20.0 ก./กก. ทั้งสองเพศ มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม ผลการตรวจอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยา ไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในที่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากพิษของสารสกัด

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 38 ฉบับที่ 4 ตุลาคม-ธันวาคม 2539 หน้า317-328.

ABSTRACT

Hedyotis biflora (Linn.) Lamk. is a medicinal plant that has been reported to possess hypoglycemic activity in alloxan-diabetic rabbits. In order to determine if this plant is safe to be used as an oral hypoglycemic agent in humans, acute and subchronic toxicity were performed in mice and rats, respectively. In acute toxicity study, LD_{50} of water extract of *Hedyotis biflora* given orally in mice was more than 20.0 gram of crude drug per kilogram of body weight (g/kg). In subchronic toxicity study, water extract of *Hedyotis biflora* was given orally to Wistar rats at the doses of 0.2, 2.0 and 20.0 g/kg/day for 4 months, while control group received distilled water orally. It was found that in both male and female rats body weight gains of the groups treated with the extract at the dose of 20.0 g/kg were significantly lower than those of the control groups. Hematological examinations showed that hematocrits of both male and female rats receiving extract at the dose of 20.0 g/kg were significantly lower than those of the control groups; however, the values were still within normal range. Serum biochemistry indicated that serum levels of AST, cholesterol, BUN, total protein and globulin in male rats treated with 20.0 g/kg extract and serum levels of AST, creatinine, total protein and globulin in female rats treated with the same dose of the extract were significantly lower than those of the control groups. Relaltive organ weights of the brian, spleen, kidneys and stomach of both male and female rats receiving extract at the dose of 20.0 g/kg were significantly higher than those of the control group ($p<0.05$). However, histopathological examinations showed no significant changes that could be due to the toxicity of the extract.

Key words : *Hedyotis biflora* (Linn.) Lamk., Toxicity.

บทนำ

หมากดิบน้ำค้าง มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Hedyotis biflora* (Linn.) Lamk. หรือมีชื่ออื่น ๆ อีก เช่น ผักขวง, สะเดาดิน (กรุงเทพ), แป๊ะฮวยเกี่ย, จูเกี่ยเช้า (จีน) เป็นพืชสมุนไพรวงศ์ Rubiaceae ลักษณะของพืชเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นอาจตั้งตรงหรือแผ่ทอดนอนกับพื้นดิน ใบเดี่ยวติดกับลำต้นแบบตรงกันข้าม ใบรูปร่างคล้ายรูปไข่หรือรูปรี ใบกว้าง 5-10 มม. ยาว 8-10 มม. ก้านใบสั้น มีหูใบรูปคล้ายสามเหลี่ยมติดอยู่ระหว่างก้านใบทั้งสอง ดอกออกเป็นช่อตามปลายยอดหรือโคนก้านใบ ช่อหนึ่งมี 3-9 ดอก ดอกเล็ก 1-2 มม. สีขาว ผลคล้ายระฆังแบน ขนาด 2-5 มม. เมล็ดรูปรีหรือกลมขนาดเล็กมาก การขยายพันธุ์ใช้เมล็ด ขึ้นได้ทั่วไป แต่ต้องมีความชื้นและปริมาณน้ำมากพอควร โดยทั่วไปมักพบเป็นวัชพืชขึ้นตามที่ต่างๆ เช่น ริมทางเดิน ริมกำแพง ข้างอาคาร และตามเรือกสวนเป็นต้น[1]

ตามตำรายาไทยหมากดิบน้ำค้างมีสรรพคุณเป็นยาแก้ท้องร่วง ท้องเดิน ยาห้ามเลือด ใส่แผล

สด[2] ใช้แก้อาการพิษของโรคผิวหนังจำพวกเริมและงูสวัด[1] และเป็นยาแก้เบาหวาน[3] มีรายงานการแยกสารที่มีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดจากหมากดิบน้ำค้าง โดยพบว่าหมากดิบน้ำค้างประกอบด้วยน้ำตาล,amino acids 13 ชนิด เช่น aspartic acids, leucine และ arginine นอกจากนี้ยังพบ peptide หรือ protein, potassium, sodium และ chloride เป็นต้น[4]

จากการศึกษาฤทธิ์ของหมากดิบน้ำค้างในการลดระดับน้ำตาลในเลือดกระต่ายที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วยสาร alloxan โดย อุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์ และคณะ[3] พบว่าน้ำยาสกัดหมากดิบน้ำค้างทั้งสดและแห้งขนาด 20.0 ก./กก. มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดกระต่ายได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มได้รับยาลดน้ำตาล chlorpropamide เนื่องจากหมากดิบน้ำค้างมีสรรพคุณในการลดระดับน้ำตาลในเลือดกระต่ายเบาหวานได้ คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาพิษของสารสกัดหมากดิบน้ำค้างในสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้ข้อมูลทางพิษวิทยาในการสนับสนุนให้ใช้หมากดิบน้ำค้างเป็นยาได้อย่างปลอดภัยต่อไป

วัตถุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักร ICR จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล น้ำหนัก 20±2 กรัม จำนวน 60 ตัว เพศละ 30 ตัว หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล น้ำหนัก 120±10 กรัม จำนวน 96 ตัว เพศละ 48 ตัว เลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 % ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด และน้ำประปาที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

สมุนไพร

หมากดิบน้ำค้างทั้งต้นจัดหาโดยฝ่ายพฤกษศาสตร์ กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร นำมาล้างน้ำให้สะอาด ผึ่ง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส บดเป็นผงหยาบ เพื่อใช้เตรียมสารสกัดให้สัตว์ทดลอง

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดหมากดิบน้ำค้างสำหรับสัตว์ทดลอง

นำหมากดิบน้ำค้างที่บดเป็นผงหยาบมาต้มสกัด (reflux) ด้วยน้ำกลั่นนาน 2 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมาระเหยเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็นความเข้มข้น 2 : 1 ใช้เป็นสารสกัดสำหรับการทดลอง

การทดสอบพิษเฉียบพลัน

ทดสอบพิษเฉียบพลันตามวิธี Weil[5] โดยทดสอบพิษของสารสกัดทางปาก ใช้หนูถีบจักร 6 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว (เพศละ 5 ตัว) ขนาดที่ให้คือ 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 และ 20.0 กรัมของสารสกัดต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (ก./กก.) สำหรับกลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่นปริมาณ 10.0 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (มล./กก.) เฝ้าดูอาการที่เปลี่ยนแปลงในระยะ 5 ชั่วโมงแรกอย่างใกล้ชิด บันทึกอาการผิดปกติและจำนวนหนูที่ตายในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และคำนวณหาขนาดยาที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50})

การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

แบ่งหนูขาวโดยวิธีสุ่มออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 24 ตัว (เพศละ 12 ตัว) ประกอบด้วย กลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่นปริมาณ 10.0 มล./กก./วัน และกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม ป้อนสารสกัดหมากดิบน้ำค้าง

แห้งเทียบเท่าผงยา 0.2, 2.0 และ 20.0 ก./กก./วัน ตามลำดับ ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 4 เดือน ขนาดของสารสกัดที่ให้หนูขาวคิดจากผลการศึกษาของ อุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์ และคณะ คือ สารสกัดด้วยน้ำของหมากดิบน้ำค้างแห้งขนาด 20.0 ก./กก. แสดงฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดกระต่ายเบาหวานได้ต่ำสุด[3] คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาโดยใช้สารสกัดด้วยน้ำของหมากดิบน้ำค้างแห้งในขนาดดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

ในระหว่างดำเนินการทดลอง บันทึกน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และสังเกตการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ดังนี้ ลักษณะของขนและผิวหนัง ตา จมูก รูทวาร สีของเยื่อเมือก (mucous membrane) อุจจาระ การหายใจ การเดิน การทรงตัว และพฤติกรรม หากมีหนูตายระหว่างการทดลองนำมาผ่าชากชันสูตร เมื่อครบกำหนด งดอาหารหนูขาวเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนทำการผ่าชาก โดยทำการดมสลบหนูด้วย อีเธอร์ เจาะเลือดจาก posterior venacava เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), จำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cells), และเกล็ดเลือด (platelets) โดยนับจาก counting chamber ค่าทางชีวเคมีคลินิก ได้แก่ ระดับบิลิรูบินรวม โดยวิธีของ Jendrassik and Grof[6] เอนไซม์ 3 ชนิดคือ alkaline phosphatase (ALP) โดยวิธีของ Bowers และคณะ[7], aspartate amino transaminase (AST) และ alanine amino transaminase (ALT)โดยวิธีของ Hennry และคณะ[8], total cholesterol โดยวิธี enzymatic reaction, BUN โดยวิธี diacetylmonoxime, creatinine โดยวิธี Jeffe's reaction, โปรตีนรวม ใช้วิธี Biuret, อัลบูมิน ใช้วิธี dye binding กับ BCG, กลอบูลิน ได้จากการหักค่าของอัลบูมินออกจากค่าของโปรตีนรวม[9]

จากนั้นทำการผ่าชากชันสูตร ตรวจหาพยาธิวิทยาที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายใน ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด หลอดลม ต่อมธัยรอยด์ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน ลำไส้ ไต ม้าม กระเพาะปัสสาวะ รังไข่ มดลูก และอัณฑะ โดยพิจารณาจากตำแหน่ง รูปร่าง ขนาด สี ลักษณะผิว ลักษณะหน้าตัดและองค์ประกอบ (texture) ของอวัยวะ ชั่งน้ำหนักอวัยวะต่าง ๆ และเก็บอวัยวะใน 10% phosphate buffer formalin นำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติเชิงพรรณา การทดสอบสมุติฐานใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan multiple range test ที่ $p<0.05$ ผลทางจุลพยาธิวิทยาเปรียบเทียบโดย chi-square test ที่ $p<0.05$ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS+PC

ผลการทดลอง

การทดสอบพิษเฉียบพลัน

พบว่าไม่ปรากฏอาการพิษใดๆ และไม่มีสัตว์ทดลองตาย เมื่อให้สารสกัดหมากดิบน้ำค้างทางปากหนูถีบจักร ในขนาด 20.0 ก./กก. ดังนั้นขนาดของสารสกัดด้วยน้ำของหมากดิบน้ำค้างที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) ควรมากกว่า 20.0 ก./กก.

การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

ผลต่อการเจริญเติบโตและการกินอาหารของหนูขาว (ภาพที่ 1, 2 และตารางที่ 1) พบว่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain) ของหนูขาวเพศผู้กลุ่มได้รับยา 2.0 และ 20.0 ก./กก.

และหนูขาว เพศเมียกลุ่มได้รับยา 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การกินอาหารของหนูขาวเพศผู้กลุ่มได้รับยา 2.0 ก./กก. และหนูขาวเพศเมียกลุ่มได้รับยา 2.0 และ 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ตลอดการทดลองไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของลักษณะขน ผิวหนัง ตา จมูก รูทวาร สีของเยื่อเมือก อุจจาระ การหายใจ การเดิน การทรงตัว และพฤติกรรมของหนูขาวทุกกลุ่ม

ผลการตรวจทางโลหิตวิทยา (ตารางที่ 2) พบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของหนูขาวเพศผู้กลุ่มทดลองทุกกลุ่มและหนูขาวเพศเมียกลุ่มได้รับยา 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังอยู่ในช่วงค่าปกติ จำนวนเม็ดเลือดขาว ในหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับยา 20.0 ก./กก. สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จำนวนเกล็ดเลือดของหนูขาวเพศผู้กลุ่มได้รับยา 0.2 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจซีรั่มทางชีวเคมี (ตารางที่ 3 และ 4) พบว่า ระดับเอนไซม์ AST ในหนูขาวเพศผู้และเพศเมียกลุ่มได้รับยา 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนระดับเอนไซม์ ALT ในหนูขาวเพศเมียกลุ่มได้รับยา 2.0 ก./กก. สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ขึ้นกับขนาดของสารสกัด ระดับ cholesterol ในหนูขาวเพศผู้กลุ่มได้รับยา 2.0 และ 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ระดับ BUN ในหนูขาวเพศผู้กลุ่มทดลองทุกกลุ่ม ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ทั้ง cholesterol และ BUN ในหนูเพศเมียไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ระดับ creatinine ในหนูขาวเพศผู้กลุ่มได้รับยา 0.2 ก./กก. สูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ในหนูขาวเพศเมียกลุ่มได้รับยา 0.2 และ 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ระดับโปรตีนรวมในหนูขาวเพศผู้และเพศเมียกลุ่มได้รับยา 0.2 และ 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ระดับ globulin ในหนูขาวเพศผู้กลุ่มได้รับยา 0.2 และ 20.0 ก./กก. และในหนูขาวเพศเมียกลุ่มได้รับยา 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่า creatinine โปรตีนรวม และกลอบูลินไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ

น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ต่อน้ำหนัก 100 กรัม (ตารางที่ 5 และ 6) พบว่า น้ำหนักสมองและกระเพาะอาหารในหนูขาวเพศผู้กลุ่มได้รับยา 2.0 และ 20.0 ก./กก. น้ำหนักม้ามและไตทั้งสองข้างในหนูขาวเพศผู้กลุ่มได้รับยา 20.0 ก./กก. สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ น้ำหนักสมอง หัวใจ ตับ ม้าม ไตทั้งสองข้าง และกระเพาะอาหาร ในหนูขาวเพศเมียกลุ่มได้รับยา 20.0 ก./กก. สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาอวัยวะภายในต่าง ๆ ของหนูขาวเช่น สมอง ปอด หลอดลม ตับอ่อน ม้าม กระเพาะอาหาร ลำไส้ และระบบสืบพันธุ์ ไม่พบความผิดปกติ นอกจากอวัยวะดังต่อไปนี้ (ตารางที่ 7) พบว่าตับมีการเปลี่ยนแปลงแบบไขมัน (fatty change) ในหนูขาวเพศผู้และเพศเมียกลุ่มควบคุม และกลุ่มได้รับยา 0.2 และ 2.0 ก./กก. กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบแบบเป็นหย่อม (focal myocarditis) พบในหนูขาวเพศผู้กลุ่มควบคุมและกลุ่มได้รับยา 0.2 และ 2.0 ก./กก. ไตพบการเปลี่ยนแปลง 2 ลักษณะคือ มีการตกตะกอนของเกลือแคลเซียมในท่อไต (nephrocalcinosis) พบในหนูขาวเพศเมียทุกกลุ่ม และกรวยไตโป่งพอง (hydronephrosis) พบในหนูขาวเพศผู้กลุ่มควบคุมและกลุ่มได้รับยา 0.2 และ 2.0 ก./กก.

วิจารณ์

จากการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดหมากดิบน้ำค้างในหนูถีบจักรพบว่าไม่ปรากฏอาการพิษใด ๆ ถึงแม้จะให้สารสกัดหมากดิบน้ำค้างแก่หนูถีบจักรทางปากขนาด 20.0 ก./กก. แสดงว่าหมากดิบน้ำค้างเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในระยะเวลาสั้น ๆ ได้อย่างปลอดภัย

จากการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดหมากดิบน้ำค้างในหนูขาวเป็นเวลานาน 4 เดือน โดยป้อนสารสกัดขนาด 0.2, 2.0 และ 20.0 ก./กก. จากผลการทดลองพบว่า การเพิ่มของน้ำหนักตัว (body weight gain) ของหนูขาวกลุ่มทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมีย ที่ขนาดยา 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อาจมีสาเหตุจากการกินอาหารต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ผลของสารสกัดหมากดิบน้ำค้างต่อค่าทางโลหิตวิทยานั้นพบว่า หนูเพศผู้กลุ่มทดลองทุกขนาดยา และในหนูเพศเมียกลุ่มทดลองที่ขนาดยา 20.0 ก./กก. มีค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นในหนูเพศเมียกลุ่มทดลองที่ขนาดยา 20.0 ก./กก. แต่เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังอยู่ในช่วงค่าปกติ[10] ดังนั้นสารสกัดจึงไม่น่ามีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาของสัตว์ทดลอง

ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมีของหนูขาวกลุ่มทดลองพบว่า ระดับเอนไซม์ AST ในหนูกลุ่มทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ขนาดยา 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ระดับเอนไซม์ AST ของหนูแต่ละกลุ่มอาจมีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของตับ[11] ระดับ cholesterol ในหนูเพศผู้กลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด 2.0 และ 20.0 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ยังอยู่ในช่วงค่าปกติ[10] ในหนูทั้งสองเพศ ระดับ creatinine กลอบูลิน และโปรตีนรวมในหนูที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่มมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่เนื่องจากเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเนื่องมาจากฤทธิ์ของสมุนไพร ส่วนค่า BUN ในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในหนูเพศเมีย จึงไม่อาจสรุปได้ว่าสารสกัดมีผลทำให้ BUN ลดลง

จากผลการทดลองพบว่า น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ต่าง ๆ ในหนูเพศผู้กลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัด 20.0 ก./กก. ได้แก่ สมอง ม้าม ไตทั้งสองข้าง และกระเพาะอาหาร ในหนูเพศเมียกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาดเดียวกัน ได้แก่ สมอง หัวใจ ตับ ม้าม ไตทั้งสองข้าง และกระเพาะอาหาร มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม อาจเนื่องจากน้ำหนักตัวของหนูขาวลดลง ทำให้ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักอวัยวะต่อน้ำหนักหนู 100 กรัม เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกันด้วย

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน พบพยาธิสภาพต่าง ๆ คือ ตับเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบไขมัน (fatty change) ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ขนาดยา 0.2 และ 2.0 ก./กก. ทั้งเพศผู้และเพศเมียอาจมีสาเหตุจากการสะสมไขมันอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ตับ ลักษณะ fatty change ที่ตรวจพบนี้เป็นเพียงหย่อมเล็ก (focal) ไม่กระจายทั่ว lobules ของตับจัดว่าเป็น mild degree ซึ่งไม่รุนแรงจนถึงขั้นทำให้เซลล์หยุดการทำงาน[12] ลักษณะกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบแบบเป็นหย่อม (focal myocarditis) พบในหนูเพศผู้ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เนื่องจากพยาธิสภาพที่พบในตับและหัวใจนี้พบได้ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง จึงไม่อาจกล่าวได้ว่ามีสาเหตุจากสารสกัด การตกตะกอนของเกลือแคลเซียมในท่อไต (nephrocalcinosis) พบได้ใน

ไตของหนูเพศเมียทุกกลุ่มมีสาเหตุที่เกี่ยวข้องกับอาหารและจัดเป็นความผิดปกติที่เกี่ยวเนื่องจากอายุ (ageelated disease) ชนิดหนึ่งที่มีอุบัติการสูงในหนูเพศเมียหลายสายพันธุ์[13] กรวยไตโป่งพอง (hydronephrosis) พบได้ทั้งในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองบางกลุ่ม ซึ่งพยาธิสภาพนี้มีโอกาสเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ ตั้งแต่ 0 ถึง 61 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริง[14] เนื่องจากความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาที่ตรวจพบในการทดลองครั้งนี้พบได้ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง จึงไม่อาจสรุปได้ว่าความผิดปกติที่เกิดขึ้นมีสาเหตุจากสารสกัดหมากดิบน้ำค้าง

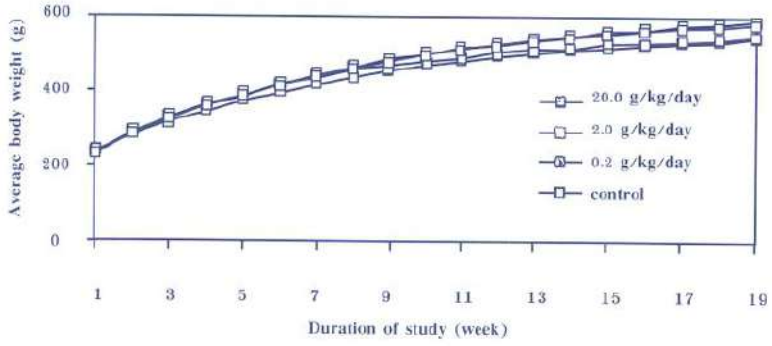
สรุป

จากการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดหมากดิบน้ำค้างในหนูถีบจักร พบว่าไม่ปรากฏอาการพิษใด ๆ ในหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดทางปากขนาด 20.0 ก./กก. และจากการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดหมากดิบน้ำค้างโดยวิธีการป้อนยาแก่หนูขาวในขนาด 0.2, 2.0 และ 20.0 ก./กก. ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 4 เดือน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาในบางกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแต่ยังอยู่ในช่วงค่าปกติ ส่วนการเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีของซีรั่มเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดสารสกัดที่ได้รับและความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาพบได้ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ดังนั้นจึงไม่อาจสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงและความผิดปกติที่เกิดขึ้นมีสาเหตุมาจากสารสกัดด้วยน้ำของหมากดิบน้ำค้าง

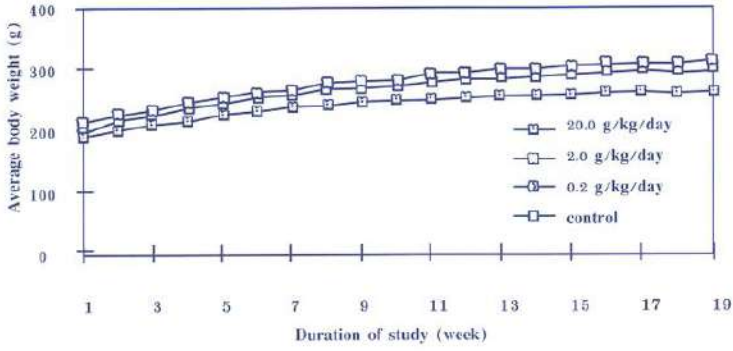
คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายดรุณ เพ็ชรพลาย ผู้อำนวยการกองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร ที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมงานวิจัยครั้งนี้ นางจารีย์ บันสิทธิ์ ฝ่ายพฤกษศาสตร์ ในการจัดหาและตรวจสอบสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย นางสาวอัญชลี จูฑะพุทธิ ที่ให้คำแนะนำและการตรวจแก้ไขการเขียน รายงานการวิจัย นายสมนึก เจษฎากัทรกุล ภาควิชา พยาธิวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบสไลด์เนื้อเยื่อสัตว์ทดลองและให้คำปรึกษาในการแปลผล นายพัช รักษามั่น ที่ช่วยป้อนสารสกัดให้สัตว์ทดลอง

ภาพที่ 1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดหมากดิบน้ำค้างนาน 4 เดือน



ภาพที่ 2 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดหมากดิบน้ำค้างนาน 4 เดือน



ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวและการกินอาหารของหนูที่ได้รับสารสกัดหมากดิบน้ำค้างนาน 4 เดือน

Dose of *H. biflora* (g/kg/day)	n/sex	Body weight gain(g)		Food consumption (g/rat/day)	
		Mean (SD)	%Difference from control	Mean (SD)	%Difference from control
0	12 M	344.2±32.8		20.6±1.0	
0.2	12 M	355.7±41.5	3.3	20.9±0.8	1.4
2.0	10 M	298.1±51.1	-13.4*	19.8±1.0	-3.9*
20.0	9 M	300.5±33.0	-12.7*	20.1±0.9	-2.4
0	12 F	112.1±26.2		13.6±0.9	
0.2	12 F	127.2±22.0	13.5	13.3±1.0	-2.2
2.0	12 F	115.4±26.6	2.9	12.7±0.8	-6.6*
20.0	10 F	81.8±20.5	-27.0*	11.3±0.7	-16.9*

M= Male, F= Female

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

ตารางที่ 2 ผลทางโลหิตวิทยาของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดหมากดิบน้ำค้างนาน 4 เดือน

Dose of *H. biflora* (g/kg/day)	n/sex	Hematocrit %	White blood cells x10^2 cells/mm^3	Platelet x10^4 cells/mm^3
0	12 M	52.0±2.3	37.8±11.9	28.1±3.3
0.2	12 M	50.2±2.2*	38.0±8.9	20.0±3.5*
2.0	10 M	49.4±1.9*	31.9±6.9	25.7±4.8
20.0	9 M	47.7±1.6*	31.9±7.0	31.1±2.5
0	11 F	49.2±2.3	18.2±2.6	28.4±2.3
0.2	10 F	49.0±2.7	21.2±6.4	27.0±4.4
2.0	10 F	49.2±1.3	21.3±4.0	25.2±5.3
20.0	9 F	46.4±1.2*	23.6±5.5*	28.9±5.6

The results are expressed as Mean ± SD

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

ตารางที่ 3 ผลทางชีวเคมีของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดหมากดิบน้ำค้างนาน 4 เดือน

Parameters		Dose of *H. biflora* (g/kg/day)			
		0 n=12	0.2 n=12	2.0 n=10	20.0 n=9
ALP	(U/I)	68.4±17.4	72.0±22.7	78.0±24.9	71.9±16.2
AST	(U/I)	68.2±15.1	58.7±7.9	64.6±14.1	35.0±10.0*
ALT	(U/I)	24.3±8.1	22.1±0.9	22.5±0.8	22.1±1.0
Bilirubin	(mg/dl)	0.18±0.19	0.14±0.10	0.20±0.17	0.22±0.10
Cholesterol	(mg/dl)	96.6±18.5	98.2±10.2	76.2±13.5*	77.7±10.4*
BUN	(mg/dl)	23.0±3.2	20.7±2.3*	17.1±1.5*	16.0±2.3*
Creatinine	(mg/dl)	1.3±0.1	1.4±0.2*	1.3±0.2	1.2±0.2
Total protein	(g/dl)	7.3±0.3	6.9±0.3*	7.3±0.2	6.3±0.4*
Albumin	(g/dl)	4.0±0.2	4.0±0.1	4.1±0.1	4.0±0.1
Globulin	(g/dl)	3.2±0.3	2.9±0.3*	3.2±0.3	2.3±0.3*

The results are expressed as Mean ± SD

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

ตารางที่ 4 ผลทางชีวเคมีของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดหมากดิบน้ำค้างนาน 4 เดือน

Parameters		Dose of *H. biflora* (g/kg/day)			
		0	0.2	2.0	20.0
		n=12	n=12	n=12	n=10
ALP	(U/I)	32.3±9.3	32.7±6.6	35.2±8.6	37.5±8.3
AST	(U/I)	67.3±12.9	64.6±17.5	69.4±14.5	44.8±7.3*
ALT	(U/I)	21.5±0.8	21.6±1.6	22.8±0.7*	22.3±0.7
Bilirubin	(mg/dl)	0.23±0.13	0.35±0.18	0.32±0.20	0.25±0.07
Cholesterol	(mg/dl)	75.7±26.8	78.1±11.3	77.7±19.7	76.2±17.4
BUN	(mg/dl)	20.4±7.0	22.4±2.5	22.3±3.1	18.6±2.6
Creatinine	(mg/dl)	1.3±0.1	1.1±0.2*	1.2±0.1	1.0±0.1*
Total protein	(g/dl)	7.4±0.4	6.9±0.4*	7.2±0.4	6.4±0.3*
Albumin	(g/dl)	4.0±1.2	4.2±0.3	4.4±0.2	4.3±0.1
Globulin	(g/dl)	2.8±0.9	2.6±0.4	2.8±0.3	2.1±0.2*

The results are expressed as Mean ± SD

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

ตารางที่ 5 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม / น้ำหนักตัว 100 กรัม) ของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดหมากดิบน้ำค้างนาน 4 เดือน

Relative organ weight (g/100 g BW)	Dose of *H. biflora* (g/kg/day)			
	0	0.2	2.0	20.0
	n=12	n=12	n=10	n=9
Brain	0.37±0.02	0.37±0.02	0.40±0.03*	0.40±0.02*
Heart	0.23±0.02	0.24±0.02	0.23±0.08	0.27±0.02
Lung	0.35±0.04	0.36±0.03	0.36±0.04	0.34±0.03
Liver	2.58±0.15	2.72±0.18	2.61±0.20	2.75±0.15
Spleen	0.17±0.03	0.18±0.02	0.18±0.03	0.21±0.03*
Rt.Kidney	0.26±0.02	0.27±0.02	0.26±0.03	0.31±0.02*
Lt.Kidney	0.24±0.02	0.25±0.02	0.26±0.03	0.29±0.02*
Stomach	0.34±0.04	0.35±0.03	0.38±0.04*	0.47±0.03*

The results are expressed as Mean ± SD

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

ตารางที่ 6 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม / น้ำหนักตัว 100 กรัม) ของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดหมากดิบน้ำค้างนาน 4 เดือน

Relative organ weight (g/100 g BW)	Dose of *H. biflora* (g/kg/day)			
	0 n=12	0.2 n=12	2.0 n=12	20.0 n=10
Brain	0.62±0.06	0.63±0.05	0.64±0.07	0.71±0.06*
Heart	0.27±0.02	0.28±0.02	0.28±0.02	0.31±0.02*
Lung	0.48±0.04	0.46±0.06	0.46±0.04	0.48±0.06
Liver	2.59±0.29	2.63±0.29	2.58±0.26	2.91±0.20*
Spleen	0.22±0.02	0.21±0.03	0.22±0.02	0.27±0.03*
Rt.Kidney	0.28±0.01	0.27±0.02	0.28±0.03	0.34±0.02*
Lt.Kidney	0.27±0.02	0.26±0.03	0.26±0.02	0.32±0.02*
Stomach	0.51±0.05	0.50±0.08	0.48±0.05	0.66±0.08*

The results are expressed as Mean ± SD

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

ตารางที่ 7 ผลทางจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดหมากดิบน้ำค้างนาน 4 เดือน

Site and Lesions	Dose of *H. biflora* (g/kg/day)							
	Male				Female			
	0	0.2	2.0	20.0	0	0.2	2.0	20.0
Liver -fatty change (mild degree)	8/12 (66.7%)	7/12 (58.3%)	5/10 (50.0%)	0/9*	1/10 (10.0%)	1/12 (8.3%)	1/12 (8.3%)	0/12
Heart -focal myocarditis	2/12 (16.7%)	1/12 (8.3%)	1/10 (10.0%)	0/9	0/10	0/10	0/12	0/12
Kidney -nephro calcinosis	0/12	0/12	0/10	0/9	6/10 (60.0%)	3/12 (25.0%)	3/12 (25.0%)	3/12 (25.0%)
-hydro nephrosis	3/12 (25.0%)	3/12 (25.0%)	1/10 (10.0%)	0/9	0/10	0/12	0/12	0/12

The results are expressed as the ratios of animals with pathological findings to the number of animals in each group and as the percentages of animals with pathological findings.

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

เอกสารอ้างอิง

1. ครุณ เพ็ชรพลาย และ จารีย์ บันสิทธิ์. 2523. การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของหมากดิบน้ำค้าง. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 22 (3) หน้า 137-143.

2. กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2537. สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม). พี เอ ลิฟวิ่ง. กรุงเทพฯ หน้า 165.

3. อุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์, โอรส ลีลากุลธนิต และ วันทนา งามวัฒน์. 2525. ฤทธิ์ของหมากดิบน้ำค้างในการลดน้ำตาลในเลือด. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 24(4) หน้า 193-203.

4. Dechatiwongse, T., Permpipat, U., Nutakul, W., Bansiddhi, J., Boonvisut, S. and Watanataweekul, C. 1983. Isolation of hypoglycemic components from *Hedyotis biflora* (L.) Lamk. Mahidol U.J. of Pharmaceutic. Sci. 10(1) : 9-14.

5. Weil, C.S. 1952. Calculation of median effective dose. Biometric. 240-263.

6. วีกูล วีรานุวัตต์, กนกนาถ ชูปัญญา. 2525. โครงการดำราศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราช พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. เคมีคลินิก. ยูนิตี้พับลิเคชั่น. กรุงเทพฯ. หน้า 169, 188, 202, 270, 429, 449.

7. Bowers, G.N., Jr. & Mc Comb, R.B. 1975, Measurement of total alkaline phosphatase activity human serum. Clin. Chem. 21(3) : 1988-1995.

8. Henry, R.J., Chaimori, N., Golub, O.J. and Berkman, S. 1960. Revised spectrophotometric, methods for the determination of glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase and lactic acid dehydrogenase. Am. J. Clin. Path. 34(4) : 381-398.

9. ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2529. หลักการวิเคราะห์ และปฏิบัติการเคมีคลินิก. หน้า 121-251.

10. Waynforth, H.B. and Flecknell, P.A. 1992. Experimental and surgical technique in the rat 2nd ed. Academic Press Inc. San Diego, USA. 342.

11. พรทิพย์ โล่ห์เลขา. 2533. คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล. เคมีคลินิกประยุกต์. ชัยเจริญ. กรุงเทพฯ. หน้า 204.

12. วิญญู มิตรานันท์. 2535. ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พยาธิวิทยากายวิภาคพื้นฐาน. โอ เอส พริ้นติ้งเฮ้าส์. กรุงเทพฯ. หน้า 40-44.

13. Khon, D.F. and Barthold, S.W. 1984 Biology and disease of rats. In : Fox, J.G., Cohen, B.J. and Loew, F.M. eds. Laboratory animal medicine. Academic Press Inc. Orlando. 118-119.

14. Burton, D.S., Maronpot, R.R. and Howard III, F.L. 1979. Frequency of hydronephrosis in Wistar rats. Laboratory Animal Science. 29(5) : 642-644.

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดของบอระเพ็ด

Toxicological Study of Crude Extract of *Tinospora crispa* Mier ex Hook F. & Thoms

Pranee Chavalittumrong, Aimmanas Attawish*,*

Anchalee Chuthaputti , Pranee Chuntapet***

*Medicinal Plant Research Institute

**Division of Clinical Pathology

Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand

บทคัดย่อ

จากการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดด้วยเอธานอลของเถาบอระเพ็ด (*Tinospora crispa* Mier ex Hook F. & Thoms) โดยให้ทางปากแก่หนูถีบจักร พบว่าเมื่อให้สารสกัดในขนาด 4 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม (ก./กก.) หรือเทียบเท่ากับลำต้นแห้ง 28.95 ก./กก. ไม่ทำให้เกิดอาการพิษใด ๆ และจากการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์โดยการป้อนสารสกัดในขนาด 0.02, 0.16 และ 1.28 ก./กก./วัน หรือ เทียบเท่าลำต้นแห้ง 0.145, 1.16 และ 9.26 ก./กก./วัน และกลุ่มควบคุม 2 กลุ่มด้วย 0.5% tragacanth และด้วยน้ำในขนาด 10 มล./กก./วัน ตามลำดับ เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าน้ำหนักของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 1.28 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมด้วย tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ทั้งนี้อาจเกิดจากหนูกลุ่มดังกล่าวกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุม การตรวจสอบทางโลหิตวิทยาไม่พบความแตกต่างที่แปรผันตามขนาดของสารสกัดที่ได้รับระหว่างหนูขาวที่ได้รับสารสกัดกับกลุ่มควบคุมในหนูทั้งสองเพศ และจากการตรวจสอบทางชีวเคมีของซีรั่มและการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา พบว่าหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดในขนาด 1.28 ก./กก. มีค่าโคเลสเตอรอล, alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), น้ำหนักสัมพัทธ์ของตับและอัตราการเกิด bile duct proliferation และ focal liver cell hyperplasia มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) พยาธิสภาพของตับที่ตรวจพบนี้อาจเป็นสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของระดับ ALP ในหนูกลุ่มดังกล่าว นอกจากนี้หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 1.28 ก./กก. และเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.16 และ 1.28 ก./กก. มีค่า

วารสารไทยเภสัชสาร ปีที่ 21 ฉบับที่ 4 ตุลาคม - ธันวาคม 2540 หน้า 199-210

ครีอาตินินสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วย tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่จากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบความแตกต่างของไตจากกลุ่มควบคุม

จากผลการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดด้วยเอธานอลของเถาบอระเพ็ดในหนูขาว พบว่าเมื่อให้สารสกัดในขนาดสูงและเป็นระยะเวลานาน อาจทำให้เกิดอาการผิดปกติของการทำงานของตับและไตได้ ดังนั้นหากมีการนำบอระเพ็ดมาใช้เป็นยาในขนาดสูงเป็นเวลานานและเกิดอาการผิดปกติของการทำงานของตับและไต ควรหยุดการใช้สมุนไพรนี้

คุณแจคำ : บอระเพ็ด, ความเป็นพิษ

ABSTRACT

Acute toxicity study of ethanolic extract of *Tinospora crispa* stem in mice showed that the extract at the highest oral dose of 4.0 g/kg of body weight (g/kg BW), which was equivalent to powdered crude drug 28.95 g/kg BW, did not produce any signs of toxicity. Six-month chronic toxicity study of the extract was performed in five groups of 16 Wistars rats of each sex. Water control group received 10 ml of water/kg BW/day while tragacanth control group received 10 ml of 0.5% tragacanth suspension/kg BW/day. The three treatment groups were given the extract at the doses of 0.02, 0.16 and 1.28 g/kg BW/day which were equivalent to dried stems 0.145, 1.16 and 9.26 g/kg BW/day, respectively. It was found that the body weight of female rat receiving 1.28 g extract/kg BW was significantly lower than that of the tragacanth control group which might be due to lower food intake in this group of animals. Hematological studies showed no significant dose-dependent difference between tragacanth control groups and all extract-treated groups in both sexes. Blood chemistry studies indicated that both male and female rats receiving 1.28 g/kg/BW of the extract had significantly higher cholesterol levels but signifiacntly lower glucose levels than those of water control and tragacnth control groups. Animals of both sexes receiving the highest dose of the extract had significantly higher alkaline phosphatase (ALP) levels, alanine aminotransferase (ALT) levels and relative liver weights than those of the water control and tragacanth control groups. Histopathological study indicated that male rats receiving the highest dose of the extract had significantly higher incidence of bile duct proliferation and focal liver cell hyperplasia than the two control groups. These two pathological findings may explain the significant increase of ALP level in this group of male rats. The results suggested that high doses of the extract may cause hepatotoxicity that could alter both function and morphology of the liver. Male rats receiving the extract also had significantly higher creatinine levels than that of the tragacanth control group. In addition, female rats given 0.16 and 1.28 g extract/kg

BW also had higher creatinine levels than that of the tragacanth control group. However, histopatological examination of the kidneys showed no significant difference between extract-treated groups and both of the control groups. The results suggested that the extract at the highest dose may also affect kidney function.

Taken together, the results of our chronic toxicity study of ethanolic extract of *Tinospora crispa* suggest that, due to the hepatotoxic and renal toxic potential of the extract observed in rats, prolonged use of high doses of *T. crispa* in humans should be avoided or if signs of liver or renal toxicities occur while using *T. crispa*-containing herbal medicine, the drug should be discontinued immediately.

KEY WORDS : *Tinospora crispa*, Toxicity

INTRODUCTION

Tinospora crispa Mier ex Hook F. & Thoms (Synonyms : *T. rumphii* Boerl, *T. tuberculata* Beaumee, 'Boraphet' in Thai) is a woody and glabous climber in the family Menispermaceae (1). Its young stems are smooth but old stems are prominently tuberculate and contain exceedingly bitter sap (2). In traditional medicine, the decoction of fresh or dried stem is used as an antipyretic in Thailand, and as a stomachic and antipyretic in Indonesia (2,3). The stem contains tinosporine, tinosporidine, picro-rectin, N-trans-feruloyl tyramine, N-cis-feroloyl trymine, tinotuberide, borapetoside A, borapetol A , ceryl alcohol, β-sitosterol, stigmasterol, phytosterol (2), syringin, borapetoside B (4), boraperol B (5), tinocrisposide (6) , while fresh leaves contain tinotufolin C, D, E, F (7).

Scientific studies on this plant indicate that it possessed several pharmacological actions (8-11). *T. crispa* stem was shown to exhibit hypoglycemic activity in experimental animals. When an aqueous extract of *T. crispa* stem was given orally to normal and alloxan-diabetic rats a hypoglycemic effect was observed in moderately diabetic rats with concomitant improvement in insulinemia (8). Acute intravenous treatment with the extract (50 mg/kg) caused an increase in plasma insulin levels in rats (8). In an *in vitro* study, water extract of the stem induced potentiation of basal and glucose-stimulated insulin secretion from both rat and human islets of Langerhans. This insulinotropic action of the extract may explain the hypoglycemic effect of *T. crispa* (9). With regard to antipyretic and anti-inflammatory actions, water extract of the stem at the doses of 100-300 mg/kg could reduce fever in Wistar rats (10), while 50% methanol extract at the dose of 10 mg/kg decreased carrageenan-induced hind paw edema in rats (11).

Currently, this plant is used in

Thailand as a bitter tonic and antipyretic ; however its toxicological data is still lacking, chronic toxicity study in the rat was therefore undertaken to determine any potential toxic effect that this plant may produce upon prolonged use so that proper warning can be issued to the public.

METHODS

Preparation of the Extract : T. crispa stems were collected and identified by the Botany Section, Division of Medicinal Plant Research and Development, then cut, dried at 50° C, ground and extracted with 95% ethanol in a soxhlet apparatus and the extract was dried under vacuum in a rotary evaporator. Prior to the experiment, the extract was diluted to the desired concentrations with 5% tragacanth suspension.

Treatment of the Animals : Twenty ICR mice (National Institute of Health Thailand) of each sex weighing 25±2 g were used in acute toxicity study. For chronic toxicity study, 80 male rats weighing 230±20 g and 80 female rats weighing 200±20 g (The National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Thailand) were used. The animals were housed in the animal facility of the NIH. The temperature in the animal room was kept at 25±1° C with 60% relative humidity. The animals were allowed to have free access to food and clean water.

Acute Toxicity Study : For oral route of administration, 4 groups of 5 male and 5 female mice were used. For extract-treated groups, the extract was administered p.o. at the doses of 1, 2 and 4 g/kg BW which were equivalent to crude drug 7.24, 14.47 and 28.94 g/kg BW, respectively, while control group received 0.5% tragacanth suspension 10 ml/kg BW. The animals were observed for mortality or any signs of abnormalities periodically during the first 24 hours and twice daily for 7 days thereafter.

Chronic Toxicity Study : Eighty Wistar rats of each sex were randomly divided into 5 groups of 16 animals per sex Group 1 (water control) received water 10 ml/kg BW/day and Group 2 (tragacanth control) received 0.5% tragacanth suspension 10 ml/kg BW/day. Groups 3-5 were given the extract at the doses of 0.02, 0.16 and 1.28 g/kg BW/day which were equivalent to dried stem 0.14, 1.16 and 9.26 g/kg BW/day or 1, 8 and 64 folds of the therapeutic dose, respectively. Body weight and food intake were measured weekly and the animals were observed for signs of abnormalities throughout the study. At the end of 180 day treatment period, the animals were fasted for 18 hours, then anesthetized with ether and sacrificed by drawing blood samples from the posterior vena cava for hematological and biochemical examinations. Hematocrits were determined while white blood cell and platelet counts were performed using counting chambers. Biochemical studies of

serum samples and the assay procedures used were alkaline phosphatase or ALP (12), aspartate aminotransferase or AST and alanine aminotransferase or ALT (13), creatinine (Jaffe's reaction), blood urea nitrogen or BUN (Diacetylmonoxime method), cholesterol (enzymatic reaction), total protein (biuret method), albumin (dye binding with bromcresol green), and globulin was determined by subtracting albumin level from total protein level.

The positions, shapes, sizes and colors of internal organs, namely, brain, heart, both kidneys and lungs, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intestine, spleen, bladder, and testis in male rats or ovary and uterus in female rats were visually observed for any signs of gross lesions. These organs were then collected, weighed to determine relative organ weights, and preserved in 10% buffered formalin solution. Tissue slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin and histopathological examinations were performed by a medical pathologist.

Statistical Analysis : The data were analyzed by oneway ANOVA followed by Duncan multiple range test, using SPSS/PC program, to determine significant differences between groups at $p<0.05$. Histopathological data were evaluated by the Fisher Exact test and the significance level was also set at $p<0.05$.

RESULTS

Acute Toxicity Study : When ethanolic extract of *Tinospora crispa* stem was given orally in mice at the doses of 1, 2 or 4 g/kg BW, it was found that the extract even at the highest dose of 4 g/kg BW, which was equivalent to powdered crude drug 28.95 g/kg BW did not produce any signs of toxicity.

Chronic Toxicity Study

Effect of the Extract on Body Weight, Food Intake, and Relative Organ Weight : At the start of the experiment, there was no difference in average body weights between groups of animals. However, after 4 weeks of treatment until the end of the experiment, the group of female animals receiving the highest dose of the extract had significantly lower body weight than those in the tragacanth and water control groups. Similarly, the body weights of the groups of male rats receiving the highest dose and the medium dose of the extract started to become significantly lower than that of the water control group, but not tragacanth control group, after 6 and 4 weeks of treatment, respectively (Figure 1). The reduction of body weights in these groups of animals may, in part, be due to significantly lower food intake as compared with water and tragacanth control groups in several weeks. In male rats, the difference in food consumption had been observed since the second week of the experiment until the

end of the study, while in female rats the significant difference in food intake was also detected in the twelfth week and many weeks thereafter; however, the difference was not observed every week as seen in male rats (Figure 2). At the end of the experiment, body weights and weight gain of female animals receiving the extract at the dose of 1.28 g/kg BW/day were significantly lower than that of the tragacanth control groups (Table 1.) Male rats treated with this dose of the extract had significantly higher relative weights of the liver and spleen, while in the female rats, relative weights of the brain, bladder, liver and stomach were significantly higher than those of the tragacanth control groups.

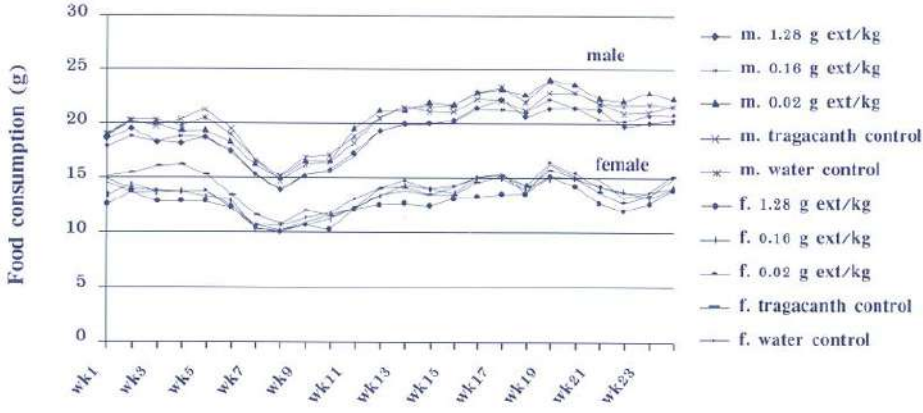


Figure 1 Food consumption of male and female rats. Water control and tragacanth control groups received 10 ml/kg BW/day of water or 0.5% tragacanth suspension, while treatment groups (m=male, f=female rats) were given 0.02, 0.16 and 1.28 g extract/kg BW/day for 180 days. Each point represents average body weight (g) at the end of each week.

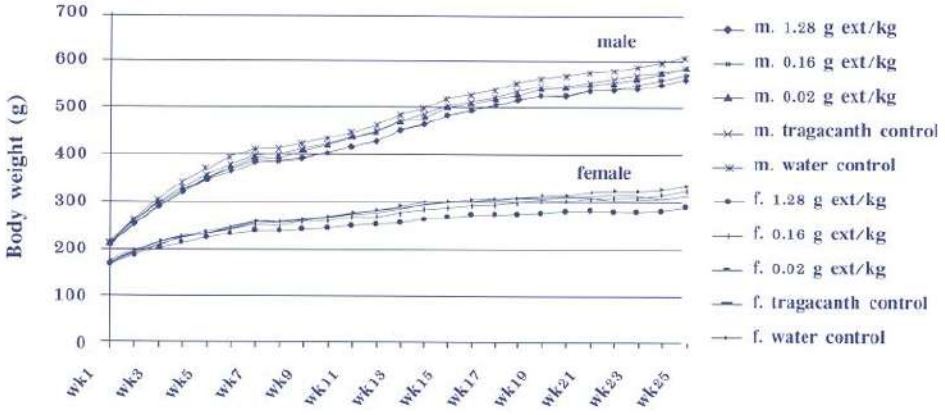


Figure 2 Growth curve of male and female rats. Water control and tragacanth control groups received 10 ml/kg BW/day of water or 0.5% tragacanth suspension, while treatment groups (m=male, f=female rats) were given 0.02, 0.16 and 1.28 g extract/kg BW/day for 180 days. Food consumption of animals housed in each cage (4rats/cage) was measured once a week. Average daily food intake/animal in each week was calculated and shown in this figure.

Table 1 % Relative organ weight (g/100 g BW) and body weight of male rats.

	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	0.02 g ext./kg/day	0.16 g ext./kg/day	1.28 g ext./kg/day
	n = 16	n = 16	n = 16	n = 15	n = 15
Initial weight (g)	149.19±10.34	147.06±8.77	146.25±8.82	145.47±11.30	150.80±12.84
Final weight (g)	590.50±53.09	571.44±57.93	563.31±41.58	548.00±61.13*	538.33±39.02*
Different wt. (g)	441.31±52.22	424.38±56.62	417.06±41.41	402.53±57.68	387.53±41.91*
Brain	0.378±0.038	0.386±0.060	0.394±0.032	0.395±0.045	0.406±0.020
Heart	0.255±0.032	0.262±0.034	0.263±0.030	0.286±0.045*	0.277±0.019
Right kidney	0.259±0.023	0.256±0.031	0.264±0.016	0.240±0.021*	0.261±0.021
Left kidney	0.245±0.023	0.244±0.026	0.249±0.014	0.232±0.021	0.247±0.017
Urinary bladder	0.030±0.006	0.036±0.017	0.034±0.012	0.033±0.008	0.033±0.011
Liver	2.556±0.212	2.605±0.259	2.617±0.128	2.695±0.250	3.579±0205*,**
Spleen	0.183±0.017	0.177±0.018	0.181±0.028	0.181±0.016	0.214±0.016*,**
Stomatch	0.390±0.044	0.410±0.031	0.392±0.034	0.411±0.038	0.403±0.043
Lung	0.362±0.029	0.380±0.045	0.359±0.045	0.372±0.043	0.383±0.034
Right testis	0.595±0.053	0.563±0.059	0.602±0.060	0.601±0.078	0.631±0.078**
Left testis	0.603±0.057	0.569±0.068	0.604±0.059	0.608±0.099	0.624±0.097

Water control and tragacanth control groups received 10 ml/kg BW/day of water or 0.5% tragacanth suspension while extract-treated groups were given 0.02, 0.16 and 1.28 g extract/kg BW/day for 180 days. At the end of the study, each organ was weighed and calculated as % relative organ weigh (g/100 g BW). Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p<0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p<0.05$)

Table 2 % Relative organ weight (g/100 g BW) and body weight of female rats.

	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	0.02 g ext./kg/day	0.16 g ext./kg/day	1.28 g ext./kg/day
	n = 16	n = 16	n = 16	n = 15	n = 15
Initial weight (g)	142.56±7.41	144.31±13.05	143.60±11.81	139.67±9.47	139.07±8.75
Final weight (g)	315.69±21.50	304.25±35.42	310.20±29.20	298.33±28.70	270.80±18.79*,**
Different wt. (g)	173.12±21.73	159.94±29.82	160.60±28.46	158.67±27.73	131.73±18.42*,**
Brain	0.636±0.043	0.663±0.063	0.657±0.063	0.675±0.056	0.758±0.060*,**
Heart	0.314±0.032	0.320±0.035	0.304±0.032	0.331±0.051	0.325±0.032
Right kidney	0.282±0.025	0.307±0.042	0.284±0.020**	0.281±0.029**	0.319±0.022*
Left kidney	0.266±0.023	0.282±0.027	0.262±0.015**	0.263±0.023**	0.305±0.018*,**
Urinary bladder	0.031±0.006	0.031±0.004	0.028±0.004	0.30±0.004	0.035±0.008*,**
Liver	2.604±0.378	2.804±0.435	2.677±0.226	2.913±0.367	4.401±0.257*,**
Spleen	0.227±0.032	0.251±0.035	0.232±0.030	0.234±0.042	0.270±0.033*
Stomatch	0.528±0.064	0.544±0.067	0.511±0.060	0.546±0.058	0.590±0.038*,**
Lung	0.461±0.044	0.498±0.049	0.476±0.048	0.492±0.057	0.513±0.041*

Water control and tragacanth control groups received 10 ml/kg BW/day of water or 0.5% tragacanth suspension while extract-treated groups were given 0.02, 0.16 and 1.28 g extract/kg BW/day for 180 days. At the end of the study, each organ was weighed and calculated as % relative organ weigh (g/100 g BW). Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p<0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p<0.05$)

Effect of the Extract on Hematological Parameters : In male rats, there was no difference in hematological parameters between control and extract-treated groups (Table 3). In female rats, the numbers of monocytes of animals receiving the extract at the doses of 0.16 and 1.28 g/kg BW/day were not different from that of the water control group but were significantly lower than that of the tragacanth control group (Table 4). However, the number of monocytes of the tragacanth control was significantly higher than that of the water control. The changes of hematocrits or eosinophil numbers found in some groups of female rats as compared to control groups were not dose-related.

Table 3 Results of hematological examinations of male rats

	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	0.02 g ext./kg/day	0.16 g ext./kg/day	1.28 g ext./kg/day
	n = 16	n = 15	n = 16	n = 14	n = 15
Hematocrit (%)	46.38±1.82	45.93±2.37	46.31±1.30	47.14±1.70	45.53±1.96
White blood cell X 10^2 cells/mm^3	6.16±1.11	6.16±1.32	6.02±1.12	5.95±1.35	5.80±1.27
Platelet X 10^3 cells/mm^3	666.38±73.19	653.27±62.17	660.06±64.55	660.93±61.02	650.73±64.54
Neutrophil (%)	64.00±9.24	59.53±8.55	58.94±8.10	60.50±9.11	61.33±7.76
Eosinophil (%)	0.50±0.63	1.27±2.05	1.56±1.97	0.93±1.14	1.00±1.13
Lymphocyte (%)	32.38±10.11	35.13±5.63	36.06±9.86	34.50±8.84	34.53±8.11
Monocyte (%)	3.12±2.22	4.07±1.98	3.44±2.56	4.07±2.09	3.13±1.68

Water control groups received 10 ml/kg BW/day while tragacanth control group received the same dose of 0.5% tragacanth suspension. The three extract-treated groups were given the extract at the doses of 0.02, 0.16 and 1.28 g/kg BW/day which were equivalent to dried stem 0.14, 1.16 and 9.26 g/kg BW/day, respectively. Blood samples were collected for hematological examination at the end of 180-day treatment period. Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p<0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p<0.05$)

Table 4 Results of hematological examinations of female rats

	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	0.02 g ext./kg/day	0.16 g ext./kg/day	1.28 g ext./kg/day
	n = 16	n = 16	n = 14	n = 12	n = 14
Hematocrit (%)	43.81±2.79	44.31±2.36	45.79±2.22*	45.83±2.08*	43.43±1.55
White blood cell X 10^2 cells/mm^3	6.49±0.74	5.89±1.04	6.39±1.10	5.94±1.36	5.84±0.69
Platelet X 10^3 cells/mm^3	652.12±75.38	668.38±68.99	639.00±73.63	629.75±41.68	627.71±59.63
Neutrophil (%)	61.31±7.50	62.00±7.21	63.14±7.97	61.42±9.59	59.21±6.52
Eosinophil (%)	0.50±0.82	1.56±1.26	1.21±1.63	0.58±1.16**	0.86±0.95
Lymphocyte (%)	35.00±7.71	30.25±6.77	31.64±9.30	35.75±10.13	37.14±8.06
Monocyte (%)	3.19±1.80	5.56±2.34*	4.00±2.48	2.25±1.71**	2.79±2.15**

Water control group received 10 ml/kg BW/day while tragacanth control group received the same dose of 0.5% tragacanth suspension. The three extract-treated groups were given the extract at the doses of 0.02, 0.16 and 1.28 g/kg BW/day which were equivalent to dried stem 0.14, 1.16 and 9.26 g/kg BW/day, respectively. Blood samples were collected for hematological examination at the end of 180-day treatment period. Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p<0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p<0.05$)

Effect of the Extract on Blood Chemistry : In both male and female rats, no difference in AST levels was found between all extract-treated groups and tragacanth control group (Table 5,6). Male rats receiving the extract 0.16 and 1.28 g/kg BW/day and female rats receiving the extract 1.28 g/kg BW/day had significantly lower ALT levels than their tragacanth controls. In addition, both male and female rats receiving 12.8 g extract/kg BW/day had significantly higher ALP levels than their tragacanth controls.

Creatinine levels of all extract-treated male rats and female rats receiving extract at the doses of 0.16 and 1.28 g/kg BW/day were significantly higher than those of tragacanth controls. However, BUN levels were not different between extract-treated groups and tragacanth control groups in both female and male rats.

Both male and female rats receiving extract 1.28 g/kg BW/day had significantly higher cholesterol levels but lower glucose levels than their tragacanth control groups. In male rats, total protein, albumin and globulin levels were not different among control and extract-treated groups while total protein level of female rats receiving extract 0.16 g/kg BW/day was significantly higher than that of tragacanth control. Sodium and potassium levels of male rats were not different between extract-treated and control groups while potassium level of female rats receiving extract at the dose of 1.28 g/kg BW/day was significantly higher than that of tragacanth control.

Table 5 Blood chemistry of male rats

	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	0.02 g ext./kg/day	0.16 g ext./kg/day	1.28 g ext./kg/day
	n = 16	n = 16	n = 15	n = 15	n = 15
AST (U/l)	54.44±9.97	60.31±11.32	61.00±10.80	54.87±7.85	59.47±11.31
ALT (U/l)	17.24±5.89	22.16±9.01*	20.22±4.71	14.56±2.69**	12.07±2.52*,**
ALP (U/l)	58.69±9.57	59.75±16.20	53.13±10.06	64.07±13.37	75.73±6.07*,**
Bilirubin (mg%)	0.40±0.27	0.59±0.39	0.35±0.18	0.49±0.34	0.37±0.28
Creatinine (mg%)	0.79±0.08	0.78±0.09	0.88±0.11*,**	0.87±0.14**	1.04±0.09*,**
BUN (mg%)	24.14±3.70	27.15±2.89*	25.06±2.94	25.23±3.90	26.91±2.62*
Cholesterol (mg%)	58.07±16.50	61.05±10.87	57.19±9.43	82.61±27.18*,**	103.63±19.85*,**
Glucose (mg%)	110.88±9.28	112.62±15.13	112.40±16.63	108.68±14.36	98.87±7.70*,**
Total protein (g%)	6.53±0.57	6.62±0.36	6.54±0.42	6.63±0.78	6.72±0.61
Albumin (g%)	4.02±0.43	3.98±0.50	4.20±0.26	3.73±0.32	3.83±0.29
Globulin (g%)	2.53±0.57	2.55±0.39	2.33±0.28	2.90±0.83	2.89±0.59
Sodium (mmol/l)	147.26±1.03	146.68±1.71	147.81±1.76	147.64±1.45	146.94±1.10
Potassium (mmol/l)	4.82±0.88	5.37±1.28	4.78±0.89	5.11±0.94	5.20±0.94

Water control group received water 10 ml/kg BW/day while tragacanth control group received the same dose of 0.5% tragacanth suspension. The three extract-treated groups were given the extract at the doses of 0.02, 0.16 and 1.28 g/kg BW/day which were equivalent to dried stem 0.14, 1.16 and 9.26 g/kg BW/day, respectively. Blood samples were collected for determinations of blood chemistry at the end of 180-day treatment period. Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p<0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p<0.05$)

Table 6 Blood chemistry of female rats

	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	0.02 g ext./kg/day	0.16 g ext./kg/day	1.28 g ext./kg/day
	n = 16	n = 15	n = 15	n = 14	n = 15
AST (U/l)	49.06±6.32	54.75±7.02	56.07±8.96*	57.53±10.76*	59.47±9.17*
ALT (U/l)	12.55±5.08	14.19±3.80	15.93±2.83*	13.31±3.42	10.95±2.38**
ALP (U/l)	26.50±7.28	29.75±9.43	26.40±8.88	21.80±4.31**	42.07±6.31*,**
Bilirubin (mg%)	0.35±0.15	0.44±0.21	0.62±0.45**	0.47±0.41	0.67±0.42**
Creatinine (mg%)	0.86±0.14	0.90±0.18	0.86±0.10	1.02±0.17*,**	1.06±0.10*,**
BUN (mg%)	25.45±3.89	26.65±4.76	25.23±4.55	23.60±3.78	26.89±3.71
Cholesterol (mg%)	59.26±20.77	79.26±17.63*	64.53±23.96	68.63±34.32	96.89±16.25*,**
Glucose (mg%)	101.38±12.86	95.19±8.62	98.73±13.28	95.60±11.84	80.80±6.97*,**
Total protein (g%)	6.67±0.33	6.81±0.57	7.07±0.57	7.52±0.75*,**	7.24±0.90*
Albumin (g%)	4.19±0.45	4.25±0.43	4.48±0.34	4.52±0.42	4.39±0.43
Globulin (g%)	2.42±0.49	2.54±0.40	2.61±0.48	3.02±1.06*	2.85±0.60
Sodium (mmol/l)	145.68±1.62	146.01±1.74	147.73±2.30*	147.16±1.34*	146.56±1.52
Potassium (mmol/l)	4.36±0.75	4.27±0.75	4.38±0.66	4.36±0.71	4.98±0.79*,**

Water control group received water 10 ml/kg BW/day while tragacanth control group received the same dose of 0.5% tragacanth suspension. The three extract-treated groups were given the extract at the doses of 0.02, 0.16 and 1.28 g/kg BW/day which were equivalent to dried stem 0.14, 1.16 and 9.26 g/kg BW/day, respectively. Blood samples were collected for determinations of blood chemistry at the end of 180-day treatment period. Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p<0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p<0.05$)

Effext of the Extract on Histopatho logy of Internal Organs : Upon gross examinations of internal organs, no abnormal signs were observed except the livers where spotted lesions were found in all male rats receiving the highest dose of the extract. These lesions became more obvious when the organs were preserved in 10% buffered formalin solution. Histopathological examinations of internal organs were performed on brain, lung, thyroid gland, parathyroid gland, trachea, esophagus, liver, heart, spleen, pancreas, kidney, stomach, intestine, bladder, including testis and prostate gland in male rats or vagina, cervix, uterus and ovary in female rats. As shown in Table 8, in female rats, there was no histopathological difference of internal organs between extract-treated groups and the two control groups. In contrast, the numbers of male rats receiving 1.28 g extract/kg BW that had bile duct proliferation and focal liver cell hyperplasia were significantly higher than those in both groups of control animals (Table 7). In addition, the number of male rats detected with fatty change of the liver was significantly higher in those receiving 0.16 g extract/kg BW than in tragacanth control group.

Table 7 Histopathological evaluations of male rats

Organ	Lesion	Groups of animals				
		Water control	Tragacanth control	0.02 g ext./kg/day	0.16 g ext./kg/day	1.28 g ext./kg/day
Lung	Organizing pneumonia	0/16	0/16	0/16	0/15	0/15
	Foreign body reaction	0/16	0/16	0/16	1/15	1/15
Liver	Bile duct proliferation	0/16	0/16	0/16	0/15	9/15*,**
	Focal liver cell hyperplasia	0/16	0/16	0/16	0/15	9/15*,**
	Fatty change	3/16	2/16	1/16	7/15**	0/15
Heart	Focal myocarditis	2/16	1/16	3/16	1/15	0/15
Thyroid	Nodular goiter	0/16	0/16	0/16	1/15	0/15
Kidney	Nephrocalcinosis	0/16	0/16	0/16	0/15	1/15
	Hydrocalyx	4/16	2/16	3/16	0/15	1/15
Testis	Atrophy	0/16	0/16	0/16	0/15	1/15
	Granuloma	0/16	1/12	0/16	0/15	0/15

Water control and tragacanth control groups received 10 ml/kg BW/day of water or 0.5% tragacanth suspension while extract-treated groups were given 0.02, 0.16 and 1.28 g extract/kg BW/day for 180 days. At the end of the study, internal organs were collected in 10% buffered formalin and prepared for histopathological examinations. Each value represents number of rats with parthological abnormalities/total number of rats examined.

* Significantly different from water control group ($p<0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p<0.05$)

Table 8 Histopathological evaluations of female rats

Organ	Lesion	Groups of animals				
		Water control	Tragacanth control	0.02 g ext./kg/day	0.16 g ext./kg/day	1.28 g ext./kg/day
Lung	Organizing pneumonia	0/16	0/16	0/15	0/15	0/15
	Foreign body reaction	0/16	0/16	0/15	0/15	0/15
Liver	Bile duct proliferation	0/16	0/16	0/15	0/15	2/15
	Focal liver cell hyperplasia	0/16	0/16	0/15	0/15	1/15
	Fatty change	0/16	0/16	2/15	1/15	1/15
Heart	Focal myocarditis	0/16	0/16	0/16	0/15	0/15
Thyroid	Nodular goiter	0/16	0/16	0/15	0/15	0/15
Kidney	Nephrocalcinosis	15/16	11/16	11/15	11/15	14/15
	Hydrocalyx	0/16	1/16	0/15	0/15	0/15

Water control and tragacanth control groups received 10 ml/kg BW/day of water or 0.5% tragacanth suspension while extract-treated groups were given 0.02, 0.16 and 1.28 g extract/kg BW/day for 180 days. At the end of the study, internal organs were collected in 10% buffered formalin and prepared for histopathological examinations. Each value represents number of rats with parthological abnormalities/total number of rats examined.

* Significantly different from water control group ($p<0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p<0.05$)

DISCUSSION

Acute toxicity study of ethanolic extract of *T. crispa* stem indicated that the extract at the doses up to 4 g/kg BW/day did not produce any signs of toxicity in mice. However, chronic toxicity study of the extract in rats showed that the extract at the highest dose of 1.28 g/kg BW/day, which is equivalent to 64 folds of the therapeutic dose, could significantly decrease the growth of the animals. This decrease in final body weight may explain, at least in part, the significantly increase of relative organ weights of several internal organs in both male and female animals receiving the highest dose of the extract.

Hematological study indicated that the extract did not affect the hematocrit or the numbers of white blood cells or platelets of male rats. In female rats, even though there were some statistically significant changes of some hematological parameters in certain groups of extract-treated animals, these changes were not dose-dependent, suggesting that they may not be the result of the extract. Hence, the extract at the doses given did not appear to affect hematological parameters in rats.

Both male and female animals treated with the highest dose of the extract had

significantly higher relative liver weights than their two control groups. Upon gross examination of internal organs, spotted lesions were found in the livers of all male rats receiving the highest dose of the extract. These lesions could be seen more easily when the organs were preserved in 10% buffered formalin solution. Histopathological examination of the livers showed a significantly higher incidence of bile duct proliferation and focal liver cell hyperplasia in this group of male animals than in the two control groups. These two pathological findings may partly explain a significant increase of ALP level in this group of male rats (14). This increase of ALP level was also observed in female rats receiving the same dose of the extract. The results suggested that high doses of the extract may induce hepatotoxicity that could alter both function and morphology of the liver.

Both male and female rats receiving the highest dose of the extract had significantly lower glucose levels than their water and tragacanth controls. This change might be the result of the hypoglycemic effect of *T. crispa* (8,9). In addition, these groups of animals also had significantly higher cholesterol levels than their controls. This increase of serum cholesterol was not likely to be derived from dietary source since these groups of animals had lower food intake than their tragacanth controls. It might be possible that the highest dose of *T. crispa* could increase hapatic synthesis of cholesterol or alter the metabolism of cholesterol, by a yet unknown mechanism, causing serum cholesterol levels in these groups of animals to rise above that of the controls.

In comparison to the corresponding tragacanth control groups, all groups of male rats receiving the extract and groups of female rats receiving 0.16 and 1.28 g extract/kg BW/day had higher creatinine levels. In addition, all groups of extract-treated female rats had significantly higher relative kidney weights than tragacanth control group. Histopathological examinations of the kidneys showed high incidence of nephrocalcinosis in female rats and hydrocalyx in male rats ; however, the incidence of the two pathological changes of extract-treated groups was not different from that of the control groups. Taken together the results suggested that the extract at high doses may also affect the kidney function.

CONCLUSION

Six-month chronic toxicity study of 95% ethanolic extract to *Tinospora crispa* stem in rats indicated that the extract at the doses of 0.02, 0.16 and 1.28 g/kg BW/day, which were equivalent to 1, 8 and 64 folds of the therapeutic dose, did not produce any significant dose-related hematological changes. However, in both male and female

animals, the extract at the highest dose caused a significant decrease of body weights and alterations of liver and kidney functions. This dose of the extract also caused morphological changes of the liver, i.e. bile duct proliferation and focal liver cell hyperplasia observed in male rats. Hence, due to the hepatotoxic and renal toxic potential of the extract, prolonged use of high doses of *Tinospora crispa* in humans should be avoided or if signs of liver or renal toxicities occur while using *T. crispa*-containing herbal medicine, the drug should be immediately discontinued.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the World Health Organization for the grant giving to this research project. We are grateful to Mrs. Jaree Bansiddhi, an expert botanist, for the supply and identification of medicinal plants, and Dr. Somnuek Jesdapatarakul for histopathological examinations of tissue samples. Thanks are also due to Mr. Daroon Pecharaply, the director of the Division of Medicinal Plant Research and Development, for his advice on this project.

REFERENCES

1. T. Smitinand. *Thai Plant Names, Botanical Names-Vernacular Names*, Funny Publishing, Bangkok, 1980, pp. 331-332.

2. ASEAN Countries. *Standard of Asean Herbal Medicine Vol. I*, Jarkata: Aksara Buana Printing, Jarkata, 1993, pp. 421-433.

3. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. *Manual for Cultivation Production and Utilization of Herbal Medicines in Primary Health Care*, The War Veterans Organization Press, Bangkok, 1990, p. 121.

4. I. Murakoshi, T. Sekine, H. Suzuki, C. Ninomiya, K. Saito, S. Okonogi and F. Ikegami. Monolignan and diterpene glycosides from the stems of *Tinospora rumphii* Boeri. *Thai. J. Pharm. Sci.* 17 : 33-37 (1993).

5. N. Fukuda, M. Yonemitsu and T. Kumura. Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. III New diterpenoids, borapetoside B and borapetl B. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 2868-72 (1985).

6. P. Pachaly and A.Z. Adnan. Tinosporoside a new bitter furanoditerpene glycoside from *Tinospora crispa* Miers. *Archiv Der Pharmazie.* 325 : 705-708 (1992).

7. N. Fukuda, M. Yonemitsu, T. Kimura, R. Isobe and T. Komori. Studies on the constituents of the leaves of *Tinospora tuberculata*. 2. Isolation and structure elucidation of 4 new furanoid diterpenes, tinofolin-C-F. *Liebig's Annalen der Chemie.* 7: 755-757 (1994).

8. H. Noor and S.J. Ashcroft. Antidiabetic effects of *Tinospora crispa* in rats. *J. Ethnopharmacol.* 27: 149-61 (1989).

9. H. Noor, P. Hammonds, R. Sutton and S.J. Ashcroft. The hypoglycemic and insulinotropic

activity of *Tinospora crispa* : studies with human and rat islets and HIT-T 15 B cells. *Diabetologia.* 32 : 354-9 (1989).

10. B. Kongsaktrakoon, R. Temsiririrkkul, W. Suvitayavat, S. Nakornchai and Y. Wongkrajang. The antipyretic effects of *Tinospora crispa* Mier ex Hook F. & Thoms. *Mahidol J. Pharm. Sci.* 21 : 1-6 (1994).

11. H. Higashino, A. Suzuki, Y. Tanaka and K. Pootakham. Inhibitory effects of Siamese *Tinospora crispa* extracts on the carrageenin-induced foot pad edema in rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 100: 339-44 (1992).

12. G.N. Bowers Jr. and R.B. McComb. Measurement of Total Alkaline Phosphatase Activity in Human Serum. *Clin. Chem.* 21 : 1988-1995 (1975).

13. R.J. Henry, N. Chaimori, O.J. Golub and S. Berkman. Revised Spectrophotometric methods for the determination of Glutamic Oxaloacetic Transaminase Glutamic Pyruvic Transaminase and Lactic Acid Dehydrogenase. *Am. J. Clin. Pathol.* 34 : 381-398, (1960).

14. G.J. Plaa and M. Charbonneau. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In A.W. Hayes (ed.) *Principles and Methods of Toxicology. 3rd ed.*, Raven Press, New York, 1994, p. 844.

บอระเพ็ด

หมากดิบน้ำค้าง

เล็บมือนาง

ความเป็นพิษของเมล็ดเล็บมือนาง

Study on Toxicity of *Quisqualis indica* Linn. Seed.

ทรงพล ชีวะพัฒน์[*], *ปราณี ชวลิตธำรง*[*]
ปราณี จันทเพ็ชร[**]
[*]สถาบันวิจัยสมุนไพร
[**]กองพยาธิวิทยาคลินิก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

เมล็ดเล็บมือนาง (*Quisqualis indica* Linn. seed) เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณระบุไว้ในตำรายาแผนโบราณว่าใช้เป็นยาถ่ายพยาธิไส้เดือนเพื่อเป็นการสนับสนุนการใช้สมุนไพรนี้อย่างมั่นใจในความปลอดภัย คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของเมล็ดเล็บมือนาง ซึ่งเตรียมโดยวิธีการสกัดด้วยน้ำ ผลการศึกษาพบว่าเมื่อให้ส่วนสกัดด้วยน้ำจากเมล็ดเล็บมือนางแก่หนูถีบจักรทางปากไม่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันและขนาดเมล็ดเล็บมือนางที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 (LD_{50}) มีค่ามากกว่า 20 ก./กก. จากการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูแรทพันธุ์วิสตาร์โดยให้ส่วนสกัดเทียบเท่าเมล็ดเล็บมือนางขนาด 0.2, 2.0, 6.0, 10.0 และ 20.0 ก./กก./วัน ทางปากติดต่อกันเป็นเวลา 60 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำพบว่า เมื่อได้รับส่วนสกัดเทียบเท่าเมล็ดเล็บมือนางขนาด 6.0, 10.0 และ 20.0 ก./กก./วัน เป็นเวลา 2 วัน สัตว์ทดลองแสดงอาการที่เกิดจากความเป็นพิษต่อระบบประสาท โดยมีอาการที่สำคัญคือ ชักกระตุกร่วมกับชักเกร็งต่อมาหยุดหายใจและตาย หนูเพศผู้ตายจากอาการพิษ คิดเป็นร้อยละ 26, 53 และ 80 ในเพศเมียร้อยละ 0, 6 และ 80.0 ตามลำดับขนาดยา และต่อมากลุ่มที่ได้รับส่วนสกัดขนาดสูงสุดคือ 20.0 ก./กก./วัน นาน 3 วันตายหมด หนูที่ได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนางครบ 60 วัน มีการเจริญเติบโตและการกินอาหารไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม การเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางชีวเคมีของซีรั่มตรวจพบได้ในหนูที่ได้รับส่วนสกัดบางกลุ่มอย่างไม่สัมพันธ์กับขนาดของส่วนสกัด จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากส่วนสกัดโดยตรง ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยา ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่สรุปได้ว่าเกิดจากความเป็นพิษของส่วนสกัดจากเมล็ดเล็บมือนาง

ABSTRACT

Quisqualis indica Linn. seed has long been used in folk medicine as an ascaricide. Toxicity studies of the seed were carried out in mice and rat in order to gain more information on using as an safety human anthelmentic. Our results revealed that mice receiving water extract equivalent to the seed at the dose of 20.0 g/kg/day orally showed no acute toxicity and

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 40 ฉบับที่ 1 มกราคม-มีนาคม 2541 หน้า 9-21.

therefore LD_{50} was more than 20.0 g/kg/day. The subacute toxicity study in Wistar rats by administration of water extract equivalent to the seed at the doses of 0.2, 2.0, 6.0, 10.0 and 20.0 g/kg/day for 60 consecutive days showed that after receiving the extract equivalent to the seed of 6.0, 10.0 and 20.0 g/kg/day for 2 days, the animals showed abnormal clinical signs; the notable ones were clonic with tonic seizures followed by respiratory arrest and death. The percentages of rats presenting toxic symptoms and death at the doses of 6.0, 10.0 and 20.0 g/kg/day in male were 26, 53 and 80 respectively, and in female were 0, 6 and 80, respectively. All rats died after receiving the highest does only for 3 consecutive days. The growth rate and feed consumption of the survived rats receiving the extract for 60 days were not different from control group. Hematological and biochemical alterations of some parameters were observed in some group of rats receiving the extract but these did not correlate with the increasing doses of the extract and hence should not be attributable to the toxicity of the *Q. indica* seed. Histopathological study of internal organs revealed no remarkable lesion accounted for the toxicity of the *Q. indica* seed.

Keywords : *Quisqualis indica*, seed, acute and subacute toxicity

บทนำ

เล็บมือนาง (*Quisqualis indica* Linn.) เป็นพืชสมุนไพรวงศ์ Combretaceae พบขึ้นตามธรรมชาติและปลูกได้ในเขตร้อน[1] ลักษณะเป็นพืชไม้เลื้อย กิ่งอ่อน มักมีขนปกคลุม ใบเดี่ยวติดกับลำต้นแบบตรงข้าม ก้านใบยาว 1-2 ซม. มีขน ใบมีรูปรีหรือรูปไข่ กว้าง 2-9 ซม. ยาว 5-18 ซม. ดอกออกเป็นช่อใหญ่ ก้านยาวคล้ายดอกปีบ แรกออกสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีแดงจัด มีผลกลมโตเป็นเฟือง คล้ายลูกมะเฟือง สีน้ำตาลแดงเป็นมันมี 5 พู ขนาดกว้าง 0.5-1.25 ซม. ยาว 2-4 ซม. ภายในมีเมล็ดเป็นรูปกระสวย ยาวประมาณ 2.5 ซม.[2,3] ในตำรายาไทยแผนโบราณกล่าวถึงสรรพคุณของเมล็ดเล็บมือนางในการขับพยาธิไส้เดือน โดยบุบพอแตกแล้วต้มเอาน้ำดื่ม[2,4] ในตำรายาของจีนก็มีการนำสมุนไพรชนิดนี้มาใช้ในการรักษาโรคพยาธิไส้เดือนมาเป็นเวลานาน โดยเรียกชื่อยาว่า Shi Jiun Zi[5] นอกจากนี้ประเทศอื่นๆ เช่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย[6] ก็มีการใช้สมุนไพรชนิดนี้เช่นกัน

ในการศึกษาทางพฤกษเคมีพบว่า เมล็ดเล็บมือนางมีสารประกอบต่างๆ เช่น D-manitol, peragonidin glycoside, trigonelline, linoleic acid, palmitic acid และ quisqualic acid[5,7,8] เป็นต้น จากการศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่าฤทธิ์ในการขับพยาธิของสมุนไพรชนิดนี้เกิดจาก quisqualic acid[5,9] ซึ่งเป็น excitatory amino acid ที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทและยังทำให้เกิดพิษต่อระบบประสาทของสัตว์ทดลองเมื่อฉีดเข้าสู่สมองโดยตรง[10]

เนื่องจากยังไม่มีรายงานทางด้านพิษวิทยาของเมล็ดเล็บมือนางมาก่อน คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของ

เมล็ดเล็บมือนางในสัตว์ทดลอง เพื่อให้ทราบข้อมูลด้านพิษวิทยาซึ่งจะเป็นแนวทางในการนำสมุนไพรชนิดนี้มาใช้เป็นยาถ่ายพยาธิได้อย่างปลอดภัย

วัตถุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรพันธุ์ ICR น้ำหนัก 20±2 กรัม จำนวน 180 ตัว เพศละ 90 ตัว ได้รับจากฝ่ายสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และหนูพันธุ์วิสตาร์ น้ำหนัก 100±10 กรัม จำนวน 180 ตัว เพศละ 90 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60% แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูป และน้ำประปาที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

สมุนไพร

ผลเล็บมือนางแห้ง ซื้อจากร้านขายยาในเขตกรุงเทพมหานครและผ่านการตรวจสอบทางเภสัชเวทโดยฝ่ายเภสัชเวท กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำมาแกะเปลือกออก เลือกเก็บเมล็ดข้างใน จากนั้นนำเมล็ดเล็บมือนางมาบดเป็นผงหยาบเพื่อใช้ในการเตรียมส่วนสกัดด้วยน้ำต่อไป

การเตรียมส่วนสกัดด้วยน้ำจากเมล็ดเล็บมือนาง

นำเมล็ดเล็บมือนางมาต้มสกัด (reflux) ด้วยน้ำกลั่นนานครั้งละ 2 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง นำส่วนสกัดที่ได้มาระเหยให้เข้มข้น โดยใช้เครื่องระเหยแห้ง ภายใต้สุญญากาศ (under vacuum) ก่อนทำการทดลองนำส่วนสกัดเข้มข้นที่ได้มาทำให้เจือจางในความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้น้ำกลั่น เพื่อใช้ในการทดสอบพิษแก่สัตว์ทดลอง

การทดสอบพิษเฉียบพลัน

ทดสอบพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร โดยให้ส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนาง 3 วิธี คือ ป้อนทางปาก ฉีดเข้าช่องท้องและใต้ผิวหนัง แต่ละวิธีประกอบด้วยหนู 6 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว (เพศละ 5 ตัว) โดยกลุ่มทดลอง 5 กลุ่ม ได้รับส่วนสกัดเทียบเท่าเมล็ดเล็บมือนางขนาด 3.9, 5.9, 8.9, 13.3 และ 20.0 กรัม/กิโลกรัม (ก./กก.) ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม จากนั้นสังเกตอาการเปลี่ยนแปลงอย่างใกล้ชิดใน 5 ชั่วโมงแรก บันทึกจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายภายในเวลา 72 ชั่วโมง แล้วคำนวณหาขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 ตามวิธีของ Weil[11]

การทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลัน

สุ่มแบ่งหนูขาวออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 30 ตัว (เพศละ 15 ตัว) ประกอบด้วย กลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่น 10 มล./กก./วัน และกลุ่มทดลอง 5 กลุ่ม ป้อนส่วนสกัดเทียบเท่าเมล็ดเล็บมือนางขนาด 0.2, 2.0, 6.0, 10.0 และ 20.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน (ก./กก./วัน) ทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลานาน 60 วัน หรือคิดเป็น 1, 10, 30, 50 และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน ซึ่งให้ใช้เมล็ด 10 กรัม ต้มเอาน้ำดื่ม[2] โดยคิดว่าคนหนักเฉลี่ย 50 กิโลกรัม

ในระหว่างดำเนินการทดลอง เฝ้าสังเกตอาการผิดปกติและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ (Physical appearance) บันทึกน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินสัปดาห์ละครั้ง สัตว์ที่ตายในระหว่างการทดลองจะถูกผ่าชากชันสูตรเมื่อครบกำหนด 60 วัน วางยาสลบหนูด้วยอีเธอร์ เจาะเลือดจาก abdominal aorta เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ เปอร์เซนต์ฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดขาว และเกร็ดเลือด ค่าทางชีวเคมีของซีรั่ม ได้แก่ Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotrans-

ferase (ALT) โดยวิธีของ Henry และคณะ[12], Total Cholesterol โดยวิธี enzymatic reaction, BUN โดยวิธี Diacetylmonoxime, Creatinine โดยวิธี Jaffe's reaction, Total protein ใช้วิธี Biruet, Albumin ใช้วิธี Dye binding กับ BCG และ Globulin คำนวนโดยการหักค่า albumin ออกจาก total protein[13]

จากนั้นผ่าชากหนูเพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา (gross examination) ของอวัยวะสำคัญต่างๆ ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด ต่อมธัยรอยด์ กระเพาะอาหาร ตับ ไต ต่อมหมวกไต ม้าม ตับอ่อน ลำไส้ กระเพาะปัสสาวะ รังไข่ มดลูก และอัณฑะ พร้อมบันทึกน้ำหนักอวัยวะที่สามารถชั่งได้ จากนั้นเก็บอวัยวะเหล่านี้ใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน นำไปผ่านขบวนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลกาย วิภาคศาสตร์ ย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซีลินและอีโอซิน (H&E) และตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์

การวิเคราะห์ข้อมูลได้แก่ น้ำหนักตัว ปริมาณอาหารที่หนูกิน ค่าทางโลหิตวิทยาและซีรั่มชีวเคมีใช้สถิติ ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ $p<0.05$

ผล

การทดสอบพิษเฉียบพลัน

เมื่อป้อนส่วนสกัดจากเมล็ดเล็บมือนางแก่หนูถีบจักรในขนาดสูงสุดคือ 20 ก./กก. เพียงครั้งเดียว พบว่าสัตว์ทดลองทุกตัวไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ และไม่ตาย ดังนั้นขนาดของเมล็ดเล็บมือนางที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 (LD_{50}) เมื่อให้ทางปากควรมีค่ามากกว่า 20 ก./กก. และจากการฉีดส่วนสกัดเข้าทางช่องท้องและใต้ผิวหนังพบว่ามีค่า LD_{50} เท่ากับ 6.3 และ 7.3 ก./กก. ตามลำดับ

การทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลัน

1. อาการพิษจากยา

หนูที่ได้รับส่วนสกัดเทียบเท่าเมล็ดเล็บมือนางขนาด 6.0, 10.0 และ 20.0 ก./กก./วัน แสดงอาการพิษภายหลังจากได้รับยาเป็นเวลานาน 2 วัน อาการที่พบคือ มีการชักกระตุกของกล้ามเนื้อทั่วร่างกายเป็นจังหวะวิ่งสลับกับกระโดด ต่อมาชักเกร็งทั่วตัว หยุดการหายใจและตาย จำนวนหนูที่ตายจากพิษยา ในเพศผู้คิดเป็นร้อยละ 26, 53 และ 80 เพศเมียคิดเป็นร้อยละ 0, 6, และ 80 ตามลำดับ ขนาดยาดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และภายหลังจากได้รับยาเป็น 3 วัน พบว่าหนูกลุ่มทดลองยาขนาด 6.0 และ 10.0 ก./ก./วัน ที่เหลืออยู่ไม่แสดงอาการผิดปกติและอยู่รอดจนสิ้นสุดการทดลอง แต่ที่ขนาดยา 20.0 ก./กก./วัน สัตว์ทดลองที่เหลืออยู่แสดงอาการพิษและตายหมด

2. การเจริญเติบโตและการกินอาหาร

หนูแรทเพศผู้และเพศเมียกลุ่มทดลองยาขนาด 0.2, 2.0, 6.0 และ 10.0 ก./กก./วัน มีการเจริญเติบโต (ภาพที่ 1 และ 2) และการกินอาหาร (ตารางที่ 2) ตลอดการทดลองไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

3. ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา

หนูทั้งสองเพศที่ได้รับส่วนสกัดจากเมล็ดเล็บมือนางมีค่าฮีมาโตคริตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด 0.2, 6.0 และ 10.0 ก./ก./วัน มีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด 6.0 ก./กก./วัน มีจำนวนเกล็ดเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3)

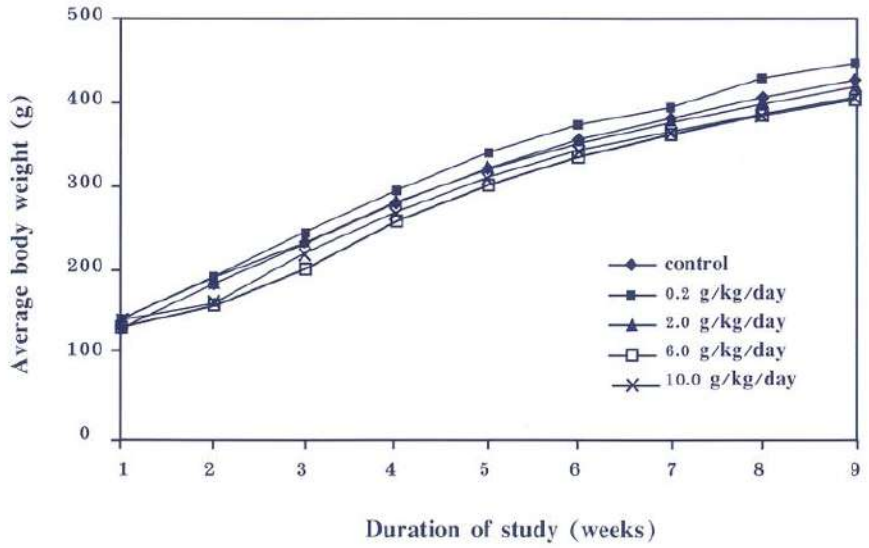
4. ผลการตรวจค่าทางชีวเคมี

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเทียบเท่าเมล็ดขนาด 2.0 ก./กก./วัน และเพศเมียที่ได้รับขนาด 0.2, 2.0

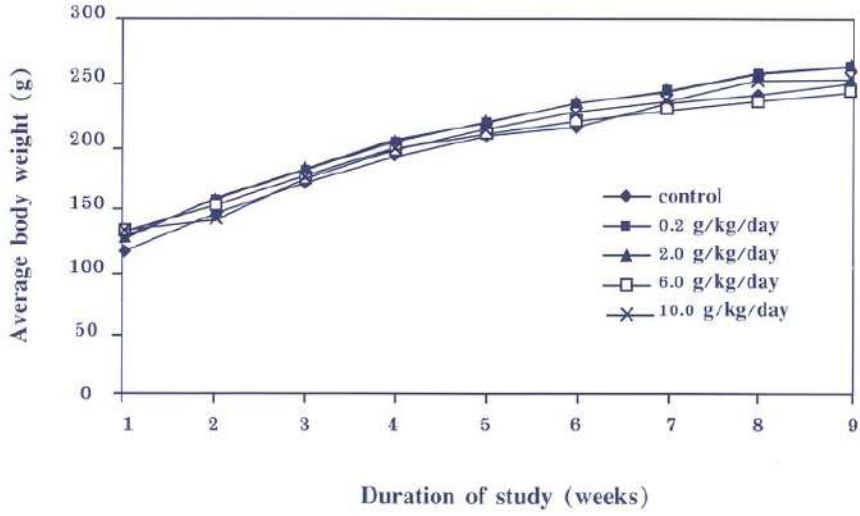
ตารางที่ 1 ร้อยละของหนูแรทที่แสดงอาการพิษและตายภายหลังจากได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนาง เป็นเวลา 2 วัน

Dose of *Q. indica* extract (g/kg/day)	%of rats showing toxic symptoms and death	
	Male	Female
6	26 (4/15)	0 (0/0)
10	53 (8/15)	6 (1/15)
20	80 (12/15)	80 (12/15)

ภาพที่ 1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนางเป็นเวลา 60 วัน



ภาพที่ 2 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูแรทเพศเมียได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนางเป็นเวลา 60 วัน



ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวและการกินอาหารของหนูแรทได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนางเป็นเวลา 60 วัน

Dose of *Q. indica* extract (g/kg/day)	n/sex	Final body weight (g)	Food consumption (g/rat/day)
Control	15/M	423.4±16.2	20.8±1.5
0.2	15/M	443.5±32.7	21.5±1.7
2.0	14/M	414.6±27.9	20.4±1.7
6.0	11/M	400.1±43.8	20.9±3.5
10.0	6/M	403.8±37.2	19.9±3.6
Control	15/F	250.1±20.1	13.9±0.3
0.2	15/F	262.2±15.9	14.4±0.3
2.0	10/F	259.1±36.5	14.5±0.5
6.0	13/F	247.1±27.9	14.1±2.6
10.0	14/F	254.3±14.6	13.4±1.3

The values are expressed as mean ± SD

ตารางที่ 3 ผลทางโลหิตวิทยาของหนูแรทที่ได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนางเป็นเวลา 60 วัน

Dose of *Q. indica* extract (g/kg/day)	n/sex	Parameters		
		Hct (%)	WBC x 10^2 cells/mm^3	Platelets x 10^3 cells/mm^3
Control	15/M	46.0±2.3	48.5±9.9	276.1±68.6
0.2	15/M	46.9±1.6	37.1±5.8*	250.8±35.5
2.0	14/M	47.0±3.4	44.5±8.8	233.6±38.3
6.0	10/M	48.1±3.3	37.1±7.9*	247.0±69.6
10.0	6/M	47.4±1.7	37.0±3.5	218.0±40.9
Control	15/F	45.6±2.2	41.4±10.7	227.9±25.8
0.2	14/F	44.5±1.9	39.3±10.6	201.4±68.7
2.0	10/F	45.8±2.0	37.7±9.0	243.1±65.5
6.0	12/F	43.4±3.2	39.2±8.3	278.3±67.3*
10.0	11/F	46.0±2.4	40.1±5.0	210.4±37.6

* Significantly different from control group, $p<0.05$

The values are expressed as mean ± SD

และ 10.0 ก./กก./วัน มีระดับเอนไซม์ AST สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูทั้งสองเพศที่ได้รับส่วนสกัดทุกขนาดมีระดับเอนไซม์ ALT ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด 0.2 และ 6.0 ก./กก./วัน มีค่า BUN สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด 0.2 และ 10.0 ก./กก./วัน และเพศเมียที่ได้รับยาขนาด 0.2, 6.0 และ 10.0 ก./กก./วัน มีระดับ albumin ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาขนาด 0.2 ก./กก./วัน มีค่า globulin สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4 และ 5)

5. ผลการผ่าชากชันสูตรทางพยาธิวิทยา

ผลจากการผ่าชากชันสูตรหนูที่ได้รับส่วนสกัดจากเมล็ดเล็บมือนางเป็นเวลา 60 วัน พบว่า ไม่ปรากฏความผิดปกติของอวัยวะภายในต่างๆ เมื่อตรวจด้วยตาเปล่า ในเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด 2.0, 6.0 และ 10.0 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตข้างขวามากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและพบว่าที่ขนาดยา 6.0 และ 10.0 ก./ก./วัน หนูมีน้ำหนักของไตซ้ายมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 6) ในหนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด 2.0 ก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและกลุ่มที่ได้รับยา 0.2 ก./กก/.วัน มีน้ำหนักไตข้างซ้ายต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้กลุ่มที่ได้รับยาขนาด 2.0, 6.0 และ 10.0 ก./กก./วัน มีน้ำหนักของกระเพาะอาหารมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 7) หนูที่ตายในระหว่างการทดลองพบว่าเกิดจากการกรอกยาพลาดเข้าสู่ปอด

ตารางที่ 4 ค่าชีรั่มชีวเคมีของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนาง เป็นเวลา 60 วัน

Parameters	Dose of *Q. indica* extract (g/kg/day)				
	0	0.2	2.0	6.0	10.0
	n=15	n=15	n=14	n=11	n=6
AST (U/L)	126.9±32.5	142.7±30.1	173.6±35.1*	131.2±37.8	139.0±27.8
ALT (U/L)	28.3±5.3	28.3±4.8	30.1±4.7	29.7±10.9	27.5±2.6
ALP (U/L)	149.6±25.8	129.6±21.6	163.4±46.4	169.0±38.5	128.2±43.2
Cholesterol (mg%)	79.6±13.5	78.6±24.3	82.5±15.6	93.0±37.1	70.7±8.7
BUN (mg%)	24.5±2.5	28.8±2.0*	24.7±2.1	27.2±4.4*	23.8±0.9
Creatinine (mg%)	1.2±0.2	1.0±0.1	1.1±0.2	1.3±0.2	1.1±0.2
Total protein (g%)	7.0±0.3	6.9±0.3	7.1±0.2	6.7±0.4	6.7±0.2
Albumin (g%)	4.0±0.2	3.5±0.1*	3.8±0.1	3.8±0.1	3.6±0.1*
Globulin (g%)	3.0±0.2	3.4±0.4*	3.3±0.2	2.9±0.3	3.1±0.3

* Significantly different from control, $p<0.05$

The values are expressed as mean ± SD

ตารางที่ 5 ค่าชีรั่มชีวเคมีของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนาง เป็นเวลา 60 วัน

Parameters	Dose of *Q. indica* extract (g/kg/day)				
	0	0.2	2.0	6.0	10.0
	n=15	n=14	n=10	n=13	n=13
AST (U/L)	89.9±26.9	145.2±27.2*	167.13±32.0*	109.8±34.0	138.5±28.3*
ALT (U/L)	22.5±6.1	30.6±5.6	28.6±5.5	24.9±9.5	36.1±8.1
ALP (U/L)	92.9±32.1	84.9±26.3	105.2±50.7	88.3±26.3	99.8±33.1
Cholesterol (mg%)	76.9±15.7	84.1±15.8	69.7±7.4	87.4±28.8	80.8±13.5
BUN (mg%)	24.9±3.1	24.7±2.3*	26.1±3.7	24.6±3.1	24.3±4.2
Creatinine (mg%)	1.1±0.2	0.9±0.1	1.2±0.2	0.9±0.1	0.9±0.1
Total protein (g%)	7.2±0.6	7.2±0.6	7.3±0.2	6.9±0.3	6.7±0.5
Albumin (g%)	4.3±0.3	3.9±0.4*	4.0±0.2	3.8±0.1*	3.8±0.2*
Globulin (g%)	2.9±0.3	3.3±0.04*	3.3±0.3	3.1±0.2	2.9±0.5

* Significantly different from control, $p<0.05$

The values are expressed as mean ± SD

6. ผลการตรวจเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา

ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยา (ตารางที่ 8) พบการเปลี่ยนแปลงดังนี้ การสะสมของไขมัน (focal fatty change) ที่เซลล์ตับ พบได้ในหนูเพศผู้ทุกกลุ่ม ส่วนเพศเมียพบในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับส่วนสกัดเทียบเท่าเมล็ดขนาด 0.2 และ 6.0 ก./กก./วัน กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ (myocarditis) พบในเพศผู้กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับขนาดยา 0.2 และ 2.0 ก./กก./วัน การสะสมของแคลเซี่ยมที่ไต (nephrocalcinosis) พบในเพศเมียกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเทียบเท่าเมล็ดเล็บมือนางขนาด 0.2 ก./กก./วัน Hydrocalyx ที่ไต พบในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาขนาด 0.2 และ 2.0 ก./กก./วัน ทั้งสองเพศ

วิจารณ์

ผลการทดสอบพิษเฉียบพลัน โดยการป้อนส่วนสกัดจากเมล็ดเล็บมือนางแก่หนูถีบจักรทางปากเพียงครั้งเดียว แสดงให้เห็นว่า ส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนางไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและมีค่า LD_{50} มากกว่า 20 ก./กก. จากการฉีดส่วนสกัดเข้าช่องท้องและใต้ผิวหนังพบว่ามีค่า LD_{50} ลดลง คือ 6.3 และ 7.3 ก./กก. ตามลำดับ ซึ่งจัดว่ามีพิษเล็กน้อย (slightly toxic) อาจเนื่องจากส่วนสกัดถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ดีกว่าจึงมีความเป็นพิษเพิ่มขึ้น

จากการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันโดยป้อนส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนางแก่หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ในขนาด 0.2, 2.0, 6.0, 10.0, และ 20.0 ก./กก./วัน

ตารางที่ 6 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 100 กรัม) ของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนาง เป็นเวลา 60 วัน

Organs	Dose of *Q. indica* extract (g/kg/day)				
	0	0.2	2.0	6.0	10.0
	n=15	n=15	n=14	n=11	n=6
Brain	0.48±0.03	0.47±0.03	0.49±0.03	0.49±0.05	0.51±0.02
Heart	0.30±0.05	0.31±0.02	0.30±0.03	0.30±0.02	0.32±0.02
Lung	0.43±0.03	0.42±0.04	0.43±0.02	0.40±0.02	0.45±0.05
Liver	3.71±0.29	3.77±0.23	3.63±0.95	4.23±0.35	3.97±0.32
Spleen	0.24±0.02	0.23±0.02	0.25±0.04	0.23±0.04	0.24±0.03
Rt. kidney	0.30±0.03	0.32±0.02	0.34±0.02*	0.38±0.05*	0.36±0.01*
Lt. kidney	0.29±0.02	0.29±0.02	0.31±0.03	0.37±0.04*	0.34±0.02*
Stomach	0.46±0.04	0.47±0.04	0.51±0.06	0.52±0.06	0.49±0.03

* Significantly different from control, $p<0.05$

The values are expressed as mean ± SD

ตารางที่ 7 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 100 กรัม) ของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนาง เป็นเวลา 60 วัน

Organs	Dose of *Q. indica* extract (g/kg/day)				
	0	0.2	2.0	6.0	10.0
	n=15	n=15	n=10	n=13	n=14
Brain	0.76±0.06	0.73±0.04	0.75±0.11	0.75±0.08	0.75±0.03
Heart	0.32±0.03	0.32±0.02	0.32±0.02	0.32±0.02	0.33±0.03
Lung	0.53±0.04	0.52±0.03	0.51±0.06	0.53±0.05	0.54±0.07
Liver	3.54±0.40	3.37±0.29	4.02±0.42*	3.65±0.42	3.77±0.32
Spleen	0.29±0.03	0.29±0.11	0.31±0.05	0.25±0.02	0.27±0.03
Rt. kidney	0.33±0.03	0.32±0.02	0.35±0.04	0.35±0.03	0.36±0.02
Lt. kidney	0.32±0.03	0.29±0.02*	0.33±0.03	0.33±0.04	0.34±0.02
Stomach	0.56±0.05	0.55±0.06	0.68±0.12*	0.67±0.09*	0.65±0.04*

* Significantly different from control, $p<0.05$

The values are expressed as mean ± SD

ทุกวัน วันละครั้ง ผลปรากฏว่า ในวันที่ 2 สัตว์ทดลองที่ได้ยาขนาด 6.0, 10.0, 20.0 ก./กก./วัน หรือคิดเป็น 30, 50 และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน สัตว์ทดลองแสดงอาการพิษและตาย จำนวนหนูที่ตายจากอาการพิษมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับขนาดยาที่ให้และหนูเพศผู้ไวต่อการเกิดพิษมากกว่าเพศเมีย ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และในวันที่ 3 ของการทดลองหนูกลุ่มที่ได้รับยาขนาดสูงสุด คือ 20.0 ก./กก./วัน หรือ คิดเป็น 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน แสดงอาการพิษและตายหมด แสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดจากเมล็ดเล็บมือนางมีการสะสมทำให้เกิดพิษถึงเฉียบพลันต่อหนูพันธุ์วิสตาร์เมื่อได้รับสารสกัดซ้ำอีก และจากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าหนูพันธุ์วิสตาร์มีความไวต่อการเกิดพิษจากส่วนสกัดมากกว่าหนูถีบจักร เพราะเมื่อให้ยาขนาดเพียง 6.0 ก./กก./วัน ซ้ำ 2 ครั้ง สัตว์ทดลองบางตัวแสดงอาการพิษและตาย แต่ทั้งนี้ยังขาดข้อมูลสนับสนุนเนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทดสอบพิษโดยการให้ยาซ้ำ 2 ครั้ง แก่หนูถีบจักร

อาการพิษต่างๆ ที่พบ ได้แก่ มีการชักกระตุกของกล้ามเนื้อ วิ่งและกระโดดอย่างรุนแรง ต่อมาชักเกร็งอย่างแรงทั่วตัว ขาเหยียด คอแหงน ตั้งฉากกับลำตัวหยุดหายใจและตาย อาการพิษที่เกิดจากการได้รับส่วนสกัดจากเมล็ดเล็บมือนางขนาด 6.0, 10.0 และ 20.0 ก./กก./วัน น่าจะเกิดจากขนาดยาดังกล่าวสูงเพียงพอที่จะทำให้สัตว์ทดลองได้รับ quisqualic acid (QA) ที่มีอยู่ในเมล็ดเล็บมือนาง[9] ซึ่งเป็น excitatory amino acid ที่มีฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ประสาทและเป็นสารที่มีศักยภาพในการทำให้เกิดการชัก (potent convulant) ในสัตว์ทดลองต่างๆ เช่น หนูถีบจักร หนูแรท แมว และไพรเมท[14,15,16] จากการศึกษาของ Mathis C.

ตารางที่ 8 ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแรทที่ได้รับส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนาง เป็นเวลา 60 วัน

Organs/lesion	Dose of *Q. indica* extract (g/kg/day)									
	Male					Female				
	0	0.2	2.0	6.0	10.0	0	0.2	2.0	6.0	10.0
Liver										
- fatty change	2/15 (13.3%)	2/15 (13.3%)	3/14 (21.4%)	2/11 (18.2%)	1/6 (16.6%)	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)	0/10	1/13	0/14
Heart										
- myocarditis	3/15 (20.0%)	3/15 (20.0%)	1/14 (7.1%)	0/11	0/6	0/15	0/15	0/10	0/13	0/14
Kidney										
- nephrocalcinosis	0/15	0/15	0/14	0/11	0/6	2/15 (13.0%)	3/15 (26.0%)	0/10	0/13	0/14
- hydrocalyx	4/15 (26.7%)	4/15 (26.7%)	3/14 (21.4%)	0/11	0/6	2/15 (13.3%)	3/15 (26.0%)	2/10	0/13	0/14

and Ungerer A. 1992[16] โดยฉีด QA เข้าสู่โพรงสมองด้านข้าง (Intracerebroventricular injection) ของหนูถีบจักร พบว่าทำให้เกิดการชักแบบต่างๆ คือ Whole body clonus, และ Clonic-tonic seizures ซึ่งมีการวิ่งและกระโดดอย่างแรง (running with explosive jump) ต่อมามีอาการเกร็งทั้งลำตัว ขาเหยียดไปทางด้านหลัง หยุดการหายใจและตายซึ่งคล้ายคลึงกับอาการพิษที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้

แม้ว่ายังไม่ปรากฏรายงานการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของสาร QA แต่อาการพิษต่อระบบประสาทที่เกิดจากการป้อนส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนางในการทดลองครั้งนี้ คล้ายคลึงกับรายงานอาการทางระบบประสาทที่เกิดจากการฉีดสาร QA เข้าสู่สมอง จึงอาจเป็นไปได้ว่า QA ในเมล็ดเล็บมือนางถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือดและผ่าน blood-brain barriers (BBB) ได้ ซึ่งคล้ายคลึงกับที่พบใน L-cysteine หรืออีกทางหนึ่งที่อาจเป็นไปได้คือ QA เข้าสู่สมองตรงบริเวณ circumventricular (CVO) ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่ค่อยมี BBB คล้ายกับที่พบในรายงานการศึกษา glutamic acid จากนั้นจึงไปออกฤทธิ์ต่อ AMPA receptors และ metabotropic receptors ที่เซลล์ประสาททำให้เกิดอาการชักขึ้นได้[17]

ผลของส่วนสกัดจากเมล็ดเล็บมือนางต่อหนูที่อยู่รอดจนสิ้นสุดการทดลองนั้นพบว่าส่วนสกัดไม่มีผลกระทบต่อการกินอาหารและการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงของค่าโลหิตวิทยาได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดขาวที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญของหนูเพศผู้กลุ่มทดลองยาบางกลุ่มและจำนวนเกร็ด

เลือดที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับยาขนาด 6.0 ก./กก./วันเพียงกลุ่มเดียว เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ได้ลดลงหรือเพิ่มขึ้นตามขนาดของส่วนสกัดที่ได้รับ ดังนั้นจึงไม่น่าจะเกิดจากพิษของส่วนสกัด

การเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีบางตัว เช่น ระดับเอนไซม์ AST ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเพศผู้กลุ่มทดลองยาขนาด 2.0 ก./กก./วัน และเพศเมียกลุ่มทดลองยาขนาด 0.2, 2.0 และ 10.0 ก./กก./วัน ค่า BUN ที่เพิ่มขึ้นเฉพาะในหนูเพศผู้กลุ่มทดลองบางกลุ่มและ albumin ที่ลดลงในหนูเพศเมียกลุ่มทดลองบางกลุ่มรวมทั้ง globulin ที่เพิ่มขึ้นเฉพาะกลุ่มทดลองยาขนาด 0.2 ก./ก./วัน นั้นเป็นการเพิ่มขึ้นหรือลดลงที่ไม่สัมพันธ์กับขนาดยาที่ได้รับดังนั้นจึงไม่น่าเกิดจากส่วนสกัด

การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตในหนูเพศผู้กลุ่มทดลองยาบางกลุ่มอาจเกิดจากน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มทดลองน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ทำให้การคำนวณน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ได้ค่าที่สูงขึ้นและเนื่องจากไม่ได้เพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มอย่างสัมพันธ์กับขนาดยาที่ได้รับรวมทั้งไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในเพศเมีย ในทำนองเดียวกันการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักกระเพาะอาหารพบในเพศเมียแต่ไม่เกิดขึ้นในเพศผู้ อีกทั้งไม่พบความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาของกระเพาะอาหาร ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ไม่น่าเกิดจากส่วนสกัด

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่ออวัยวะที่ตรวจพบครั้งนี้ คือ fatty change ที่ตับ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ การสะสมของแคลเซียมและ hydrocalyx ที่ไต พบได้ทั้งหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองบางกลุ่มอย่างไม่สัมพันธ์กับขนาดของยาที่ได้รับเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงไม่น่าเกิดจากความเป็นพิษของส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนาง

ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อสมองแบบ neruonal necrosis, loss of Purkinje cells ซึ่งเกิดจากการฉีด QA เข้าสู่สมองโดยตรง[10,14] ทั้งนี้เนื่องจากการให้กินส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนางนั้น QA บางส่วนอาจถูกกีดกั้นโดย blood brain barrier ทำให้มีระดับ QA ในสมองไม่สูงเพียงพอที่จะทำลายเซลล์ประสาทได้จึงตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคที่สมอง

สรุป

การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เมื่อให้ส่วนสกัดทางปากในขนาดเทียบเท่าเมล็ดเล็บมือนาง 20 ก./กก./วัน หรือคิดเป็น 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน เพียงครั้งเดียว ไม่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร แต่จากการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูแรทพันธุ์วิสตาร์ โดยป้อนส่วนสกัดด้วยน้ำซึ่งเทียบเท่าเมล็ดเล็บมือนางขนาด 0.2, 2.0, 6.0, 10.0 และ 20.0 ก./กก./วัน ติดต่อกันนาน 60 วัน พบว่าเมื่อได้รับส่วนสกัดเป็นเวลา 2 วัน หนูกลุ่มที่ได้รับยาขนาด 6.0, 10.0 และ 20.0 ก././วัน ซึ่งเทียบได้เท่ากับ 30, 50, และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน แสดงอาการพิษจากยา อาการที่สำคัญ คือการชักกระตุกร่วมกับชักเกร็ง (clonic with tonic seizures) ต่อมาหยุดหายใจและตาย เมื่อได้รับส่วนสกัดติดต่อกัน 3 วัน หนูกลุ่มที่ได้รับส่วนสกัดขนาดสูงสุดแสดงอาการพิษและตายหมด ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี ร่วมกับผลทางจุลพยาธิวิทยาแสดงให้เห็นว่าส่วนสกัดเมล็ดเล็บมือนางไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ ฮีมาโตคริต ปริมาณเม็ดเลือดขาวและเกร็ดเลือด รวมทั้งไม่มีผลต่อการทำงานของตับและไต แต่อย่างไรก็ตามหากนำเมล็ดเล็บมือนางมาใช้ใน

การถ่ายพยาธิไส้เดือน ควรตระหนักถึงความเป็นพิษที่อาจเกิดจาก quisqualic acid ดังนั้นไม่ควรรับประทานเกินขนาดและมากกว่า 1 ครั้งติดต่อกัน เพราะอาจเกิดพิษกึ่งเฉียบพลัน จากผลต่อระบบประสาทจนเป็นอันตรายต่อร่างกายได้

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางนฤมล มงคลชัยภักดิ์ ฝ่ายเภสัชเวท กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร ที่ช่วยจัดหาและตรวจสอบเมล็ดเล็บมือนาง นายแพทย์สมนึก เจษฎาภัทรกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ วชิรพยาบาล ที่ช่วยตรวจสอบสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา กก.กมล สวัสดีมงคล ผู้เชี่ยวชาญพิเศษด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ สาขาสมุนไพรในการตรวจและแก้ไขรายงานฉบับนี้และเจ้าหน้าที่ฝ่ายสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขแห่งชาติ ที่จัดเตรียมห้องสัตว์ทดลองและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Perry, LM. And Metzger, J. 1980. Medical plant of East and Southeast Asia : attributed properties and uses. The MIT Press. London. p. 190-191.

2. กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2537. สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม) พี เอ ลิฟวิ่ง กรุงเทพฯ หน้า 141.

3. สมาคม ร.ร.แพทย์แผนโบราณฯ สำนักวัดพระเชตุพนฯ 2510 ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาค 3) โรงพิมพ์อำพลวิทยา กรุงเทพฯ หน้า 135.

4. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณฯ สำนักวัดพระเชตุพน 2521. ตำราประมวลหลักเภสัช ร.ร. แพทย์แผนโบราณ กรุงเทพฯ หน้า 37.

5. Huang, K.C. 1993. The pharmacology of Chinese Herbs. CRC Press, Inc., London p. 323.

6. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health 1983. Manual for cultivation production and utilization of herbal medicines in Primary health care. 2nd ed. Idea square Ltd. p. 115.

7. ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 1 ธรรมกมลการพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า 206.

8. พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ สมุนไพรก้าวใหม่ 2537 ที พี พริ้นท์ กรุงเทพฯ หน้า 32-33.

9. Sheng D.F., Ren S.X. and Yi S.G. 1981. Some recent advances in the chemical studies of Chinese herbal medicine. Am. J. Bot. 1981; 68 : 300-303.

10. McDonald J.W., Silverstein F.S., Cardona D., Hudson C., Chen R., and Johnston M.V. 1990. Systemic administration of MK-801 against N-methyl-D-aspartate- and quisqualate-mediated neurotoxicity in perinatal rats.

11. Weil, C.S. 1952. Calculation of median effective dose. Biometrics. 240-263.

12. Henry, R.J., Chaimori, N., Golub, O. J. and Berkman, S. 1960. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic oxalacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase and lactic acid dehydrogenase. Am. J. Clin. Pathol. 34(4) : 381-398.

13. ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2529. หลักวิเคราะห์และปฏิบัติการเคมีคลินิค พาณิชย์การพิมพ์ กรุงเทพมหานคร. หน้า 121-251.

14. Fukuda, H., Tanaka T., Kaijima, M., Nakai, H., and Yonemasu, Y. 1985. Quiaqualic acid induced hippocampal seizures in unanesthetized cats. Neurosci Lett. 59: 53-59.

15. Meldrum, B. 1985. Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. Clin. Sci. 68 : 113-12.

16. Mathis, C. and Ungerer, A. 1992. Comparative analysis of seizures induced by intracerebroventricular administration of NMDA, kainate and quisqualate in mice. Exp. Brain Res. 88 : 277-282.

17. Olney, J.W. 1995. Glutamate receptor mediated neurotoxicity in : Chang L. W. and Slikker J.R.W. ed. Neurotoxicology approaches and methods. Academic Press New York, p. 455-461.

การศึกษาพิษของเปลือกโมกหลวง

Toxicity Study of *Holarrhena antidysenterica* Wall. Bark.

อุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์, ปราณี ชวลิตธำรง*
เอมมนัส อัตถวิชญ์*, ปราณี จันทเท็ชร**
*สถาบันวิจัยสมุนไพร
**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

โมกหลวง (*Holarrhena antidysenterica* Wall.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีรายงานการใช้รักษาโรคบิดที่เกิดจาก *Entamoeba histolytica* เพื่อความปลอดภัยในการใช้โมกหลวงเป็นยา คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดด้วยเอธานอลของเปลือกโมกหลวงผสมกับ polyvinyl pyrrolidone (PVP)ในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ทั้งสองเพศ โดยป้อนสารสกัดขนาด 0.03, 0.27 และ 0.53 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (ก./กก.) เทียบเท่าเปลือกโมกหลวงแห้ง 0.12, 1.2, และ 2.4 ก./กก. หรือคิดเป็น 1, 10 และ 20 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน ติดต่อกันทุกวันนาน 3 เดือน พบว่าน้ำหนักตัวและการกินอาหารของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.27 และ 0.53 ก./กก. น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP อย่างมีนัยสำคัญ การตรวจสอบทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีพบว่า จำนวนเม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือดและ %neutrophil ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มที่ได้รับ PVP สูงกว่า ขณะที่ %lymphocytes ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ ระดับเอนไซม์ AST และ ALT ในหนูกลุ่มทดลองทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.27 และ 0.53 ก./กก. มีค่าสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมทั้งสอง ส่วนการเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีอื่น ๆ ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดหรือเกิดในหนูเพศเดียวเท่านั้น จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเป็นผลของสารสกัด ส่วนการตรวจสอบทางด้านจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในต่าง ๆ ไม่พบความผิดปกติที่อาจกล่าวได้ว่ามีสาเหตุมาจากความเป็นพิษของสารสกัด จากผลการทดลองสรุปได้ว่าเมื่อกรอกสารสกัดด้วยเอธานอลของเปลือกโมกหลวงในขนาดสูงแก่หนูขาวติดต่อกันเป็นเวลานาน จะแสดงความเป็นพิษต่อตับได้ ดังนั้นการใช้เปลือกโมกหลวงเพื่อรักษาโรคบิดมีตัวไม่ควรใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานหรือใช้ในขนาดสูงกว่าที่กำหนด เพราะอาจเป็นอันตรายต่อตับได้

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 40 ฉบับที่ 2 เมษายน-มิถุนายน 2541 หน้า 145-157

ABSTRACT

Holarrhena antidysenterica Wall, or "Moak Luang" in Thai, is a medicinal plant possessing anti-amoebic activity against *Entamoeba histolytica* . In order to determine if this plant is safe to be used as an anti-amoebic agent in humans, subchronic toxicity study was performed in Wistar rats of both sexes. Ethanolic extract of *H. antidysenterica* complexed with polyvinyl pyrrolidone (PVP) was given orally for 3 months at the doses of 0.03, 0.27 and 0.53 g/kg BW/day, equivalent to crude drug 0.12, 1.2 and 2.4 g/kg or 1, 10 and 20 times of therapeutic dose in humans, respectively. It was found that body weight gain and food consumption of animals receiving 0.27 and 0.53 g/kg were lower than those of the water control and PVP control groups. Hematological examinations showed that white blood cell counts, platelets and %neutrophils of all extract-treated groups and PVP control groups were significantly higher, but %lymphocytes were significantly lower than those of the water control groups. Serum biochemistry indicated that groups of male and female rats receiving 0.27 and 0.53 g/kg had significantly higher AST and ALT levels than those of both control groups. Changes found in other biochemical parameters were not related the doses of the extract given or occurred in animals of either sex only. Histopatholigical examinations of internal organs showed no sign of abnormality that could be attributed to the toxic effect of the extract. It was concluded that prolonged administration of high doses of ethanolic extract of *H. antidysenterica* bark could induce hepatotoxicity in rats. Therefore, when a pharmaceutical preparation of *H. antidysenterica* bark is used as an anti-amoebic agent, prolonged use and overdoses should be avoided to prevent hepatotoxic effect of the drug.

Key words : *Holarrhena antidysenterica* (Wall.), Toxicity

บทนำ

โมกหลวง มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ ว่า *Holarrhena antidysenterica* Wall. เป็นพืชสมุนไพรวงศ์ Apocynaceae มีชื่ออื่น ๆ เช่น โมกใหญ่ (ภาคกลาง), มูกมันหลวง, มูกหลวง, โมกเขา, โมกทุ่ง (ภาคเหนือ), ยางพุด (เลย), พุทธรักษา (เพชรบุรี)[1] หรือมีชื่อภาษาอังกฤษว่า kurchi, conessi bark หรือ tellicherry bark[2]

ตามตำราแพทย์แผนโบราณของไทยและตำรายาของต่างประเทศ เปลือกต้น เปลือกราก และเมล็ดโมกหลวงมีสรรพคุณใช้รักษาโรคบิดมีตัว เนื่องจากเชื้อ *Entamoeba histolytica* ได้ จึงมีการนำเปลือกโมกหลวงมาใช้รักษาบิดมีตัวแทนการใช้ emetine แม้ว่าจะมีฤทธิ์อ่อนกว่า โดยใช้ในรูปของ liquid extract หรือ kurchi bismuth iodide ซึ่งยาทั้งสองรูปแบบนี้มีอยู่ในเภสัชตำรับของประเทศอินเดีย[2,3] สารออกฤทธิ์ในเปลือกโมกหลวงเป็นสารพวกอัลคาลอยด์ ที่สำคัญคือ conessine ซึ่งเคยมีการนำมาใช้เป็นยารักษาบิดมีตัวในรูปของเกลือ hydrobromide[4] นอกจากนั้น

เปลือกโมกหลวงยังมีอัลคาลอยด์อีกหลายชนิดเช่น kurchicine, kurchine, holarrhimine, conessimine, isoconessimine, conimine เป็นต้น[3]

ในด้านการศึกษาความเป็นพิษของเปลือกโมกหลวงนั้น ได้เคยมีรายงานว่า สารสกัดเปลือกโมกหลวงที่ป้อนให้แก่หนูขาว ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ตับ โดยเกิดการทำลาย centrilobular veins เกิดการคั่งหรือมีเลือดออกที่ centrilobular sinusoid รวมทั้งเกิด centrilobular หรือ focal hepato- cellular necrosis รวมทั้งทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ตับและไตของหนูด้วย ซึ่งผู้วิจัยได้รายงานว่าน่าจะมีสาเหตุมาจากอัลคาลอยด์กลุ่ม pyrrolizidine ที่มีในเปลือกโมกหลวง[5] นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาความเป็นพิษของอัลคาลอยด์บางชนิดที่พบในเปลือกโมกหลวงด้วย พบว่าขนาดที่ทำให้ตาย (lethal dose) ของ conessine ในหนูถีบจักรและหนูตะเภามีค่า 126 และ 115 มก./กก. โดยในขนาดสูงมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตในสัตว์ทดลองส่วน kurchicine ขนาดสูงมีฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางและขนาดที่ทำให้ตายในหนูถีบจักรและหนูตะเภาเท่ากับ 160 และ 88 มก./กก. ตามลำดับ[6]

เปลือกโมกหลวงเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาความเป็นพิษของเปลือกโมกหลวงของไทย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาพิษของสารสกัดเปลือกโมกหลวงในสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้ข้อมูลทางพิษวิทยาในการสนับสนุนให้ใช้โมกหลวงเป็นยารักษาโรคบิดมีตัวได้อย่างปลอดภัยต่อไป

วัตถุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล น้ำหนัก 120±10 กรัม จำนวน 160 ตัว เพศละ 80 ตัว เลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร สัตว์จำกัด และน้ำประปาที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

สมุนไพร

เปลือกต้นโมกหลวง จัดหาโดยกรมป่าไม้ นำมาล้างให้สะอาด ผึ่ง หั่น และอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส บดเป็นผงหยาบ เพื่อใช้เตรียมสารสกัดให้สัตว์ทดลอง

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดเปลือกโมกหลวงสำหรับสัตว์ทดลอง

นำเปลือกโมกหลวงที่บดเป็นผงหยาบมาสกัดด้วย 95% เอธานอลโดยใช้ซอกห์เลท (soxhlet) นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศ (rotary evaporator) ได้สารสกัดคิดเป็นร้อยละ 16.73 ของเปลือกโมกหลวงแห้ง และมีปริมาณ total alkaloid เท่ากับ 12 % แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปเตรียมให้อยู่ในรูปแบบที่ละลายน้ำได้โดยผสมกับ polyvinyl pyrrolidonae (PVP) ในอัตราส่วน 3:1 สำหรับใช้ทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

แบ่งหนูขาวโดยวิธีสุ่มออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 32 ตัว (เพศละ 16 ตัว) ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เป็นกลุ่มทดลอง โดยป้อนน้ำยาสารสกัดเปลือกโมกหลวงขนาด 0.03, 0.27 และ 1.33 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (ก./กก.) เทียบเท่าเปลือกโมกหลวงแห้ง 0.12, 1.2 และ 6.0 ก./กก. หรือคิดเป็น 1, 10 และ 50 เท่าของขาดที่ใช้ในคนตาม

ลำดับ[2] กลุ่มที่ 4 ป้อนสารละลาย 3.3% PVP ปริมาณ 10.0 มล./กก. ซึ่งเป็นปริมาณ PVP ที่มีอยู่ในสารสกัดขนาด 1.33 ก./กก. และกลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มควบคุมป้อนน้ำปริมาตร 10.0 มล./กก. ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 10 วัน พบว่าหนูขาวกลุ่มได้รับสารสกัด 1.33 ก./กก. มีอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร และขาหลังเป็นอัมพาตทุกตัว จึง sacrifice และทำ autopsy หนูขาวกลุ่มนี้ และทำการศึกษาต่อในหนูขาวอีกกลุ่มหนึ่งโดยลดขนาดของสารสกัดลงเป็น 0.53 ก./กก. เทียบเท่าเปลือกโมกหลวงแห้ง 2.4 ก./กก. หรือคิดเป็น 20 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน[2] โดยป้อนทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 3 เดือน

ในระหว่างดำเนินการทดลอง บันทึกน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และสังเกตุการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ได้แก่ ลักษณะของขนและผิวหนัง ตา จมูก รูทวาร สีของเยื่อเมือก (mucous membrane) อุจจาระ การหายใจ การเดิน การทรงตัวและพฤติกรรม หากมีหนูตายระหว่างการทดลองนำมาผ่าชากชันสูตร เมื่อครบกำหนด 3 เดือน งดอาหารหนูขาวเป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนทำการผ่าชากโดยทำการดมสลบหนูด้วยอีเธอร์ เจาะเลือดจาก posterior vena-cava เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), จำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cells) และเกล็ดเลือด (platelets) โดยนับจาก counting chamber ค่าทางชีวเคมีของซีรั่ม ได้แก่ ระดับของซีรั่ม โซเดียม และโปแตสเซียม โดยวิธี ion selective electrode method โดยใช้เครื่อง automated sodium/potassium analyzer รุ่น NOVA1 (NOVABIOMEDICAL, USA) ระดับบิลิรูบินรวม โดยวิธีของ Jendrassik and Grof[7] เอนไซม์ 3 ชนิดคือ alkaline phosphatase (ALP) โดยวิธีของ Bowers และคณะ[8], aspartate amino transaminase (AST) และ alanine amino transaminse (ALT) โดยวิธีของ Hennry และคณะ[9],total cholesterol โดยวิธี enzymatic reaction , BUN โดยวิธี diacetylmonoxime, creatinine โดยวิธี Jaffe's reaction, total protein โดยวิธี Biuret, albumin ใช้วิธี dye binding กับ BCG, globulin ได้จากการหักค่าของ albumin ออกจากค่าของ total protein[10]

จากนั้นทำการผ่าชากชันสูตร ตรวจหาพยาธิวิการที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายในได้แก่สมอง หัวใจ ปอด หลอดลม ต่อมธัยรอยด์ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน ลำไส้ ไต ม้าม กระเพาะปัสสาวะ รังไข่ มดลูก และอัณฑะ โดยพิจารณาจากตำแหน่ง รูปร่าง ขนาด สี ลักษณะผิว ลักษณะหน้าตัดและองค์ประกอบ (texture) ของอวัยวะ ชั่งน้ำหนักอวัยวะต่าง ๆ และเก็บอวัยวะใน 10% phosphate buffer formalin นำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติเชิงพรรณนา การทดสอบสมมติฐานใช้ one-way ANOVA และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan multiple range test ที่ $p<0.05$ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS/PC สำหรับข้อมูลทางจุลพยาธิวิทยาวิเคราะห์ข้อมูลโดย Fisher exact test ที่ $p<0.05$

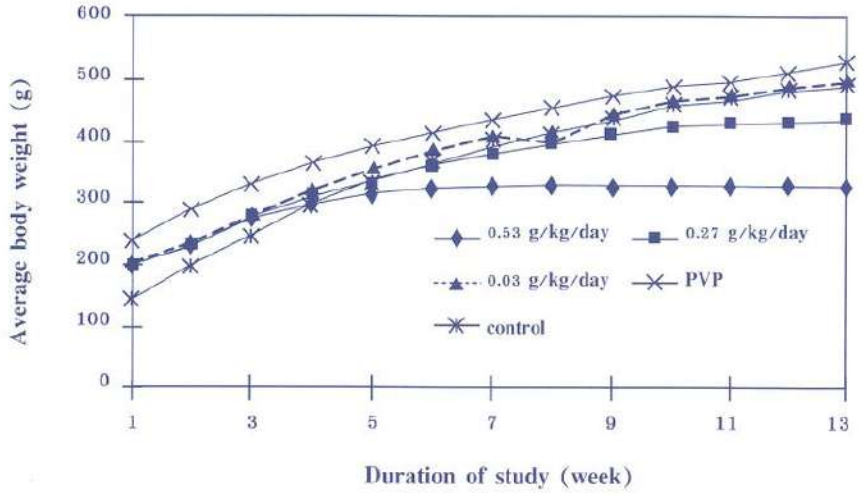
ผล

การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

ผลต่อการเจริญเติบโตและการกินอาหารของหนูขาว (ภาพที่ 1, 2 และตารางที่ 1) พบว่า

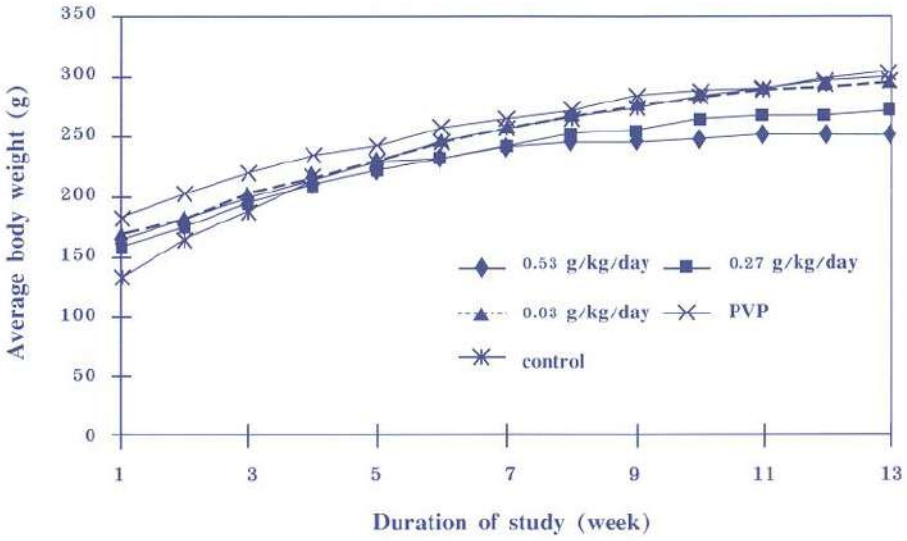
น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain) ของหนูขาวทั้งสองเพศกลุ่มทดลองทุกกลุ่มที่ได้รับ PVP ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญและหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.27 และ 0.53 ก./กก. มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP อย่างมีนัยสำคัญการกินอาหารของหนูขาวกลุ่มทดลองทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.27 และ 0.53 ก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ตลอดการทดลองพบการเปลี่ยนแปลงของหนูขาวดังนี้ ในหนูขาวทั้งสองเพศกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.53 ก./กก. มีอาการอ่อนเพลียเคลื่อนไหวช้าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับกลุ่มทดลองกลุ่มอื่น ๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติ

ผลการตรวจทางโลหิตวิทยา (ตารางที่ 2) พบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัด 0.03 ก./กก. สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ จำนวนเม็ดเลือดขาว %neutrophils และเกล็ดเลือดของหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มรวมทั้งกลุ่มที่ได้รับ PVP สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ แต่ %lymphocytes ของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มรวมทั้งกลุ่มที่ได้รับ PVP มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเปลือกโมกหลวงนาน 3 เดือน

ภาพที่ 2 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดเปลือกโมกหลวงนาน 3 เดือน



ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวและการกินอาหารของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดเปลือกโมกหลวงนาน 3 เดือน

Dose of *H. antidysenterica* (g/kg/day)	n/sex	Body weight gain (g)	Food consumption (g/rat/day)
0	16M	345.4±37.8	20.8±1.1
0(PVP)	16M	287.7±44.1[a]	20.9±1.1
0.03	16M	285.5±45.3[a]	19.9±3.4
0.27	15M	236.2±40.6[a,b]	18.4±1.5[a,b]
0.53	15M	125.7±32.0[a,b]	15.5±1.8[a,b]
0	16F	163.7±16.6	14.7±0.6
0(PVP)	16F	118.7±17.1[a]	14.5±0.9
0.03	16F	123.2±11.7[a]	13.6±2.5
0.27	15F	108.5±11.9[a,b]	1.27±1.1[a,b]
0.53	16F	84.8±15.9[a,b]	13.0±0.9[a,b]

M = เพศผู้ , F = เพศเมีย

ค่าในตารางแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ ($p<0.05$)

[b] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP ($p<0.05$)

ตารางที่ 2 ผลทางโลหิตวิทยาของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดเปลือกโมกหลวงนาน 3 เดือน

Dose of *H.antidysenterica* (g/kg/day)	n/sex	Hematocrit %	White blood cells			Platelets
			$x10^2$ cells/mm^3	%Neutrophil	%Lymphocyte	$x10^4$ cells/mm^3
0	16M	45.6±2.4	22.6±4.9	3.9±3.6	96.1±3.6	24.8±3.7
0 (PVP)	16M	46.5±2.2	31.2±3.4[a]	22.6±6.6[a]	77.2±6.6[a]	44.3±6.8[a]
0.03	16M	47.4±1.7[a]	30.3±5.5[a]	20.1±4.0[a]	79.8±3.8[a]	47.0±7.7[a]
0.27	15M	47.1±2.1	36.4±3.1[a,b]	27.0±6.7[a,b]	72.9±6.8[a,b]	45.0±4.8[a]
0.53	15M	45.0±2.1	30.5±3.4[a]	23.6±6.1[a]	76.3±6.0[a]	52.3±11.1[a,b]
1.33[#]	13M	47.6±2.2	51.8±23.5	28.5±7.4	71.5±7.4	26.6±3.5
0	16F	43.2±1.5	17.1±3.3	2.1±2.3	97.9±2.3	22.5±3.3
0 (PVP)	16F	45.1±2.0	33.0±4.3[a]	21.8±7.4[a]	78.1±7.5[a]	46.5±9.6[a]
0.03	12F	46.1±1.9[a,b]	23.9±2.2[a,b]	20.3±5.4[a]	78.9±5.3[a]	44.5±10.7[a]
0.27	14F	45.2±2.0	25.3±3.8[a,b]	25.2±4.7[a]	74.6±4.7[a]	53.7±12.0[a,b]
0.53	16F	44.4±2.6	34.3±3.1[a]	26.6±5.6[a,b]	73.3±5.6[a,b]	45.9±6.4[a]
1.33[#]	13F	47.3±2.0	48.6±15.4	23.9±8.9	76.1±8.9	27.1±2.9

M = เพศผู้ , F = เพศเมีย

ค่าในตารางแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ ($p<0.05$)

[b] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP ($p<0.05$)

[#] หนูที่ได้รับสารสกัดนาน 10 วันก่อนถูกฆ่า

เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP พบว่าหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.27 ก./กก. มีจำนวนเม็ดเลือดขาว และ % neutrophils สูงกว่า แต่ % lymphocyte ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.53 ก./กก. มีจำนวนเกล็ดเลือดสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.53 ก./กก. มี%nuetrophils สูงแต่มี %lymphocyte น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP อย่างมีนัยสำคัญ และกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.27 ก./กก. มีจำนวนเกล็ดเลือดสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ PVP

ส่วนผลการตรวจทางโลหิตวิทยาของหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัด 1.33 ก./กก./วัน นาน 10 วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำหรือ PVP นาน 3 เดือน พบว่ามีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและ PVP มาก และร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils มากกว่าแต่ร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ จำนวนเกล็ดเลือดในหนูทั้งสองเพศมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับPVP อย่างไรก็ตาม ค่าที่แตกต่างกันดังกล่าวไม่อาจทดสอบยืนยันทางสถิติได้ เนื่องจากระยะเวลาการให้ยาที่แตกต่างกัน

ผลการตรวจซีรั่มทางชีวเคมี (ตารางที่ 3 และ 4) พบว่า ในหนูขาวเพศผู้ ค่า ALP ไม่มีความแตกต่างระหว่างหนูแต่ละกลุ่ม ขณะที่หนูเพศเมียที่ได้รับ PVP มีค่า ALP น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.53 ก./กก. มีค่า ALP สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและหนูที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มที่ค่า ALP สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP อย่างมีนัยสำคัญ ส่วน AST ในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.27 และ 0.53 ก./กก. มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ในทำนองเดียวกันหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.53 ก./กก. และหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.27 ก./กก. ก็มีค่า ALT สูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม

ค่าบิลิรูบินของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.27 ก./กก. มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสอง ส่วนในหนูเพศเมียค่าบิลิรูบินในกลุ่มที่ได้รับ PVP สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ และค่าบิลิรูบินของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.03 ก./กก. มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ PVP หนูทั้งสองเพศที่ได้รับ PVP มีระดับโคเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำ และหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มรวมทั้งหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.27 ก./กก. มีค่าโคเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.03 ก./กก. มีค่า BUN ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ ขณะที่หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.03 และ 0.53 ก./กก. มีค่า BUN ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสอง หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.53 ก./กก. มีค่าครีอะตินินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสอง แต่หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มและกลุ่มที่ได้รับ PVP มีค่าครีอะตินินสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ

โปรตีนรวมของหนูเพศผู้ที่ได้รับ PVP และที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.27 และ 0.53 ก./กก. มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.03 และ 0.53 ก./กก. มีค่าโปรตีนรวมสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำ ส่วนค่าอัลบูมินในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัด 0.03 ก./กก. มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ แต่กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.27 และ 0.53 ก./กก. มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP หนูทั้งสองเพศที่ได้รับ PVP มีค่ากลอบูลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ และหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.27 และ 0.53 ก./กก. มีค่ากลอบูลินสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสอง

หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัด 0.27 ก./กก. มีระดับโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ และหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.27 ก./กก. มีระดับโปแตสเซียมต่ำกว่ากลุ่มทั้งสอง แต่ไม่มีความแตกต่างของค่าโปแตสเซียมระหว่างหนูเพศเมียแต่ละกลุ่ม

ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 4 ยังแสดงค่าทางชีวเคมีของซีรั่มของหนูที่ได้รับสารสกัด 1.33 ก./กก. นาน 10 วัน ไว้ด้วย โดยมิได้หาความแตกต่างทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เพื่อเปรียบเทียบให้เห็นถึงความเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีในหนูกลุ่มนี้ซึ่งมีอาการอ่อนเพลีย ไม่กินอาหาร และขาหลังเป็นอัมพาต จึงต้อง sacrificed หนูกลุ่มนี้หลังจากได้รับสารสกัดเพียง 10 วัน จะเห็นได้ว่าค่า AST, ALT และ บิลิรูบินมีค่าสูงกว่าค่าปกติมาก ขณะที่โคเรสเตอรอลมีค่าค่อนข้างต่ำ

ตารางที่ 3 ผลทางชีวเคมีของซีรั่มหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเปลือกโมกหลวง

Parameters	Dose of *H. antidysenterica*(g/kg/day)					
	0 n=15	0(PVP) n=15	0.03 n=15	0.27 n=16	0.53 n=15	1.33# n=13
ALP (U/l)	67.20±10.42	68.47±20.03	69.87±11.46	64.88±7.57	70.53±11.58	
AST (U/l)	80.80±7.42	75.60±12.60	60.93±16.00[a]	190.50±37.60[a,b]	186.47±34.15[a,b]	258.35±12.6
ALT (U/l)	18.00±3.38	14.53±6.92	18.53±8.24	54.69±22.98[a,b]	52.87±19.10[a,b]	115.9±25.0
Bilirubin (mg/dl)	0.096±0.023	0.095±0.057	0.088±0.028	0.122±0.016[a,b]	0.115±0.016	0.25±0.17
Cholesterol (mg/dl)	62.93±13.74	75.27±10.59[a]	75.00±14.55[a]	92.06±18.85[a,b]	84.26±15.89[a]	55.6±14.2
BUN (mg/dl)	19.33±2.44	18.47±2.20	17.13±1.92[a]	18.81±2.48	19.93±1.71	21.8±2.9
Creatinine (mg/dl)	1.20±0.19	1.25±0.24	1.29±0.24	1.36±0.15[b]	0.96±0.13[a,b]	0.8±0.6
Total protein (g/dl)	7.16±0.73	6.19±0.30[a]	7.08±0.34[b]	6.28±0.19[a]	5.98±0.14[a]	
Albumin (g/dl)	4.19±0.76	4.45±0.21	4.57±0.19[a]	3.91±0.21[b]	4.07±0.22[b]	
Globulin (g/dl)	2.79±0.60	1.75±0.20[a]	2.51±0.21[a,b]	2.37±0.24[a,b]	1.92±0.22[a]	
Sodium(mmol/l)	147.87±1.25	148.87±2.83	148.33±1.23	149.75±2.05[a]	147.47±1.06	146.0±22.7
Potassium(mmol/l)	6.87±0.73	6.95±0.72	7.30±0.61	6.11±1.00[a,b]	6.83±1.08	6.3±1.0

ค่าในตารางแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ ($p<0.05$)

[b] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP ($p<0.05$)

[#] หนูได้รับสารสกัดนาน 10 วัน ก่อนถูกฆ่า

ตารางที่ 4 ผลทางชีวเคมีของซีรั่มหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดเปลือกโมกหลวง

Parameters	Dose of *H. antidysenterica* (g/kg/day)					
	0 n=15	0(PVP) n=16	0.03 n=15	0.27 n=15	0.53 n=16	1.33[#] n=13
ALP (U/I)	36.20±5.45	27.06±8.58[a]	34.00±8.38[b]	42.27±12.40[b]	43.00±8.37[a,b]	
AST (U/I)	52.87±10.97	66.31±12.11	61.00±14.17	99.20±29.92[a,b]	164.44±43.91[a,b]	210.6±45.7
ALT (U/I)	13.60±4.75	12.75±2.65	12.13±3.50	15.13±3.62	39.31±10.61[a,b]	70.2±30.0
Bilirubin (mg/dl)	0.10±0.02	0.14±0.07[a]	0.11±0.05[b]	0.12±0.02	0.13±0.02	0.32±0.18
Cholesterol (mg/dl)	59.40±16.19	77.18±16.55[a]	70.80±16.84	74.73±14.02[a]	69.88±19.31	43.9±16.9
BUN (mg/dl)	18.60±2.87	20.31±3.52	15.60±1.88[a,b]	19.13±1.51	16.43±2.25[a,b]	22.7±11.8
Creatinine (mg/dl)	0.62±0.09	1.02±0.29[a]	0.96±0.07[a]	1.24±0.17[a]	1.23±0.09[a]	1.0±0.5
Total protein (g/dl)	6.17±0.37	6.26±0.29	6.98±0.45[a,b]	6.46±0.27	6.53±0.53[a]	
Albumin (g/dl)	4.26±0.54	4.96±0.24[a]	5.06±0.35[a]	4.10±0.18[b]	4.22±0.35[b]	
Globulin (g/dl)	1.91±0.60	1.28±0.16[a]	1.91±0.29[b]	2.36±0.14[a,b]	2.32±0.25[a,b]	
Sodium(mmol/l)	147.00±1.69	148.44±1.50[a]	146.73±1.48[b]	148.87±1.48[a]	147.25±1.57[b]	143.6±2.9
Potassium(mnol/l)	6.52±1.14	6.93±0.91	6.59±0.86	6.40±0.81	6.35±0.97	7.0±0.9

ค่าในตารางแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ ($p<0.05$)

[b] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP ($p<0.05$)

[#] หนูได้รับสารสกัดนาน 10 วัน ก่อนถูกฆ่า

ผลต่อน้ำหนักของอวัยวะภายใน ตารางที่ 5 แสดงน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม พบว่าในหนูขาวเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.27 และ 0.53 ก./กก. มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของสมอง หัวใจ ตับ ไตทั้งสองข้าง และกระเพาะอาหาร สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูขาวเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.27 และ 0.53 ก./กก. มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของสมอง ตับ ไตทั้งสองข้าง และกระเพาะอาหาร สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP อย่างมีนัยสำคัญ และหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.53 ก./กก.มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของม้ามสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ PVP อย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่หนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาดเดียวกันมีน้ำหนักสัมพัทธ์ของหัวใจและปอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 5 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 100 กรัม) ของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดเปลือกไมกหลวงนาน 3 เดือน

Relative organ weight (g/100 g BW)	Dose of *H. antidysenterica*(g/kg/day)				
	0	0 (PVP)	0.03	0.27	0.53
MALE	**n=16**	**n=16**	**n=16**	**n=16**	**n=15**
Brain	0.45±0.03	0.41±0.05	0.43±0.04	0.51±0.05[b]	0.68±0.08[b]
Heart	0.27±0.02	0.26±0.02	0.28±0.02	0.30±0.03[b]	0.36±0.04[b]
Lung	0.39±0.04	0.39±0.06	0.40±0.04	0.44±0.04	0.54±0.09
Liver	2.74±0.10	2.62±0.19	2.84±0.17	3.39±0.25[b]	4.17±0.49[b]
Spleen	0.19±0.02	0.20±0.02	0.19±0.02	0.21±0.02[a]	0.25±0.04[b]
Rt.Kidney	0.28±0.02	0.26±0.02	0.28±0.02	0.35±0.02[b]	0.44±0.07[b]
Lt.Kidney	0.24±0.01	0.24±0.02	0.26±0.02	0.32±0.02[b]	0.42±0.07[b]
Stomach	0.40±0.03	0.39±0.04	0.40±0.03	0.48±0.09[b]	0.67±0.06[b]
FEMALE	**n=16**	**n=16**	**n=15**	**n=16**	**n=16**
Brain	0.68±0.04	0.68±0.06	0.66±0.04	0.73±0.05[b]	0.84±0.07[b]
Heart	0.30±0.02	0.31±0.03	0.29±0.02	0.32±0.03	0.36±0.04[b]
Lung	0.50±0.04	0.52±0.08	0.49±0.05	0.52±0.03	0.59±0.05[b]
Liver	2.71±0.21	2.79±0.27	2.65±0.19	3.18±0.24[b]	3.91±0.31[b]
Spleen	0.24±0.02	0.25±0.02	0.23±0.02	0.24±0.03	0.25±0.03
Rt.Kidney	0.30±0.03	0.30±0.03	0.29±0.03	0.33±0.02[b]	0.36±0.03[b]
Lt.Kidney	0.28±0.02	0.29±0.03	0.27±0.02	0.31±0.01[b]	0.34±0.03[b]
Stomach	0.54±0.06	0.53±0.04	0.53±0.06	0.58±0.06[b]	0.70±0.05[b]

ค่าในตารางแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ ($p<0.05$)

[b] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP ($p<0.05$)

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน (ตารางที่ 6) ไม่พบความผิดปกติของสมอง หลอดลม ตับอ่อน ม้าม กระเพาะอาหาร ไตทั้งสองข้าง ลำไส้ และระบบสืบพันธุ์ อย่างไรก็ตามพบว่าในหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 0.27 ก./กก. ตับมีการเปลี่ยนแปลงแบบไขมัน (fatty change) สูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสอง และหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.53 ก./กก. พบว่าปอดมีรอยแผลเป็นที่อาจจะเกิดจากการติดเชื้อ (organizing pneumonia) สูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสอง นอกจากนี้ในหนูเพศผู้ยังพบ focal myocarditis ที่หัวใจและ hydronephrosis ที่ไต ส่วนในเพศเมียพบ nephrocalcinosis ที่ไต อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดความผิดปกติดังกล่าวไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ตารางที่ 6 ผลทางจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดเปลือกโมกหลวงนาน 3 เดือน

Site and lesions	Dose of *H. antidysenterica* (g/kg/day)				
	0	0 (PVP)	0.03	0.27	0.53
MALE					
Liver - fatty change (mild degree)	0/16	3/16 (18.7%)	1/16 (6.2%)	6/16[a] (37.5%)	2/15 (13.3%)
Heart - focal myocarditis	2/16 (12.5%)	4/16 (25.0%)	1/16 (6.2%)	3/16 (18.7%)	0/15
Kidneys - nephrocalcinosis	0/16	0/16	0/16	0/16	0/15
- hydronephrosis	2/16 (12.5%)	2/16 (12.5%)	4/16 (25.0%)	3/16 (18.7%)	2/15 (13.3%)
Lung - organizing pneumonia	0/16	0/16	0/16	1/16 (6.2%)	1/15 (6.7%)
FEMALE					
Liver - fatty change (mild degree)	3/16 (18.7%)	0/16	0/15	2/16 (12.5%)	2/16 (12.5%)
Heart - focal myocarditis	0/16	0/16	0/15	0/16	0/16
Kidneys - nephrocalcinosis	8/16 (50.0%)	13/16 (81.2%)	7/15 (46.7%)	6/16 (37.5%)	8/16 (50.0%)
- hydronephrosis	1/16 (6.2%)	0/16	0/15	0/16	0/16
Lung -organizing pneumonia	0/16	0/16	0/15	3/16 (18.7%)	7/16[a,b] (43.7%)

ผลการทดลองแสดงเป็นอัตราส่วนและเป็นร้อยละของสัตว์ทดลองที่มีความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาต่อจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมดในกลุ่ม

[a] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ ($p<0.05$)

[b] แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP ($p<0.05$)

วิจารณ์

จากการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเปลือกโมกหลวงขนาด 1.33 ก./กก. เทียบเท่าเปลือกโมกหลวงแห้ง 6.0 ก./กก. หรือคิดเป็น 50 เท่า ของขนาดที่ใช้ในคน พบว่าหลังจากป้อนสารสกัดขนาดดังกล่าวเพียง 10 วัน หนูขาวมีอาการอ่อนเพลีย ไม่กินอาหาร ขาหลังเป็นอัมพาตทุกตัว คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเปลือกโมกหลวงโดยลดขนาดลงเป็น 0.03, 0.27 และ 0.53 ก./กก. ตามลำดับ คิดเป็น 1, 10 และ 20 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน โดยป้อนในหนูขาวเป็นเวลาติดต่อกันนาน 3 เดือน พบว่า การเพิ่มของน้ำหนักตัว (body weight gain) ของหนูขาวทั้งสองเพศกลุ่มทดลองทุกกลุ่มน้อยกว่ากลุ่มควบคุม การลดลงของน้ำหนักตัวนี้ส่วนหนึ่งอาจสัมพันธ์กับฤทธิ์ของอัลคาลอยด์ conessine ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดในทางเดินอาหาร เช่น ptyalin, pepsin และ trypsin[11] ทำให้การดูดซึมสารอาหารลดลง

ผลของสารสกัดเปลือกโมกหลวงต่อค่าทางโลหิตวิทยานั้นพบว่า หนูขาวที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่มมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ยังอยู่ในช่วงค่าปกติและไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดอย่างไรก็ตามพบว่าหนูกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ได้รับ PVP และหนูที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีจำนวนเม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด %neutrophils สูงกว่าแต่มี %lymphocytes น้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ Atal และคณะเคยรายงานว่า สารสกัดเมล็ดโมกหลวงด้วยเอธานอลมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดกลืนกินจุลินทรีย์หรืออนุภาคแปลกปลอม (phagocytic function) เช่น neutrophils และ macrophage ในขณะเดียวกันก็ยับยั้งการทำงานของ lymphocyte ที่ทำหน้าที่สร้าง antibody (humoral component)[12] เนื่องจากเปลือกโมกหลวงและเมล็ดโมกหลวงมีสารสำคัญเป็นอัลคาลอยด์ในกลุ่มเดียวกัน[6] และนำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาบิดมีตัวได้เหมือนกัน[3] ดังนั้นผลของสารสกัดเปลือกโมกหลวงต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจึงสอดคล้องกับรายงานของ Atal และคณะ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่พบทั้งในหนูที่ได้รับ PVP และหนูที่ได้รับสารสกัดซึ่งมี PVP ปนอยู่ด้วย ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลของ PVP ต่อระบบภูมิคุมกัน เนื่องจาก PVP มีคุณสมบัติเป็น thymusindependent antigen (TI-2 antigen)[13] และเป็นสารที่ถูกกลืนกินโดย macrophage[14] จึงอาจมีผลต่อการทำงานและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ macrophage และเซลล์ชนิดอื่นในระบบภูมิคุ้มกัน เคยมีรายงานว่า PVP ในขนาดที่เหมาะสมสามารถกระตุ้น PVP-specific suppressor T cells และป้องกันการสร้าง PVP- specific memory B ได้[15]

ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมีของหนูขาวพบว่าระดับเอนไซม์ AST และ ALT ในหนูขาวกลุ่มได้รับสารสกัด 0.27, 0.53 และ 1.33 ก./กก. มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม สาเหตุอาจจะเกิดจากมีการอักเสบที่ตับหรือเซลล์ตับถูกทำลาย[16] สารที่เป็นพิษต่อตับในโมกหลวงอาจเป็นอัลคาลอยด์กลุ่ม pyrrolizidine ซึ่ง Arseculeratne และคณะ[5] เคยรายงานไว้ และในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 1.33 ก./กก. ซึ่งมีค่า AST และ ALT สูงมากนั้น นอกจากจะมีสาเหตุจากความเป็นพิษต่อตับของสารสกัดแล้ว อาจเนื่องมาจากสารสกัดมีผลทำลายเซลล์กล้ามเนื้อที่ขาทำให้เกิดอาการอัมพาตด้วย[17]

นอกจากนี้ค่าทางชีวเคมีอื่น ๆ เช่นระดับ

บิลิรูบิน, โคเลสเตอรอล, BUN, ครีอะตินิน, โปรตีนรวม, กลอบูลิน, โซเดียม และโปแตสเซียม ของหนูที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่มที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยังอยู่ในช่วงค่าปกติ[18] และไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงบางอย่างก็พบในหนูเพศเดียวเท่านั้น จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นผลเนื่องจากสารสกัด

จากผลการทดลองพบว่า น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะต่าง ๆ ในหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.27 และ 0.53 ก./กก. ได้แก่ สมอง หัวใจ ตับ ไตทั้งสองข้าง และกระเพาะอาหาร และหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาดเดียวกัน ได้แก่ สมอง ตับ ไตทั้งสองข้าง และกระเพาะอาหาร มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP น้ำหนักสัมพัทธ์ที่สูงขึ้นนี้ส่วนหนึ่งอาจเนื่องจากน้ำหนักตัวของหนูขาวกลุ่มนี้ลดลง ทำให้ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักอวัยวะต่อน้ำหนักตัวหนู 100 กรัม เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกันด้วย

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน พบพยาธิสภาพต่าง ๆ คือ ตับเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบไขมัน (fatty change) ซึ่งพบได้ในหนูทั้งสองเพศ ทั้งในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ถึงแม้ว่าอัตราการเกิด fatty change ในหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.27 ก./กก. จะมากกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ แต่เนื่องจากเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ได้ขึ้นกับขนาดของสารสกัด จึงไม่อาจสรุปได้ว่าเป็นผลมาจากสารสกัด ในทำนองเดียวกันการเกิดกล้ามเนื้อหัวใจอักเสบเป็นหย่อม (focal myocarditis), nephrocalcinosis และ hydronephrosis ที่ไตของหนูซึ่งพบได้ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด และพบมากในหนูบางเพศเท่านั้น ทำให้ไม่อาจสรุปได้ว่าเป็นความผิดปกติที่เนื่องมาจากสารสกัด และหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 0.53 ก./กก. ปอดมีอัตราการเกิดรอยแผลเป็นที่อาจเกิดจากการติดเชื้อ (organizing pneumonia) สูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสอง ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการติดเชื้อแบคทีเรียในปอด และมีการอักเสบพร้อมทั้งเกิดการตายของเนื้อเยื่อปอด จึงเกิดเป็นรอยแผลให้เห็น[19] การติดเชื้อในปอดนี้อาจมีความสัมพันธ์กับการลดลงของจำนวน lymphocytes ในหนูกลุ่มนี้

สรุป

จากการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดด้วยเอธานอลของเปลือกโมกหลวง โดยวิธีการป้อนสารสกัดแก่หนูขาวในขนาด 0.03, 0.27 และ 0.53 ก./กก. คิดเป็น 1, 10 และ 20 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 3 เดือน พบว่าสารสกัดเปลือกโมกหลวงในขนาดสูงทำให้น้ำหนักตัวและการกินอาหารของหนูขาวลดลง หนูที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มรวมทั้งหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PVP มีจำนวนเม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือดสูงและ %neutrophils สูงกว่า ขณะที่ %lymphocytes ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัด 0.27 และ 0.53 ก./กก. มีระดับเอ็นไซม์ AST และ ALT สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำและที่ได้รับ PVP ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในต่างๆ ไม่พบความผิดปกติที่อาจกล่าวได้ว่ามีสาเหตุมาจากความเป็นพิษของสารสกัด จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า สารสกัดเปลือกโมกหลวงในขนาดสูงเมื่อให้ทางปากแก่หนูขาวติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดพิษต่อตับได้ ดังนั้นการใช้เปลือกโมกหลวงในการรักษาบิดมีตัวจึงไม่ควรใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานหรือใช้ในขนาดสูงเพื่อหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายนพดล พฤกษวรรณ และเจ้าหน้าที่กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในการจัดหาสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย นางสาวอัญชลี จูฑะพุทธิ ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขการเขียนรายงานการวิจัย และนายสมนึก เจษฎาภัทรกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบสไลด์เนื้อเยื่อสัตว์ทดลองและให้คำปรึกษาในการแปลผล

เอกสารอ้างอิง

1. กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2537. สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม). หน้า 129.

2. Martindale, The Extra Pharmacopoeia 28th Ed. p. 980.

3. Satayavati, G.V., Gupta, A.K. and Tandon, N. 1987. Medicinal Plants of India : Volume 2. Cambridge Printing Works, New Delhi. p. 41-48.

4. Martindale, The Extra Pharmacopoeia 28th Ed. p. 976.

5. Arseculeratne, S.N., Gunatllaka, A.A.L. and Panabokke. R.G. 1981 Medicinal plants of Sri Lanka : Occurrence of pyrolizidine alkaloids and hepatotoxic properties in some traditional medicinal herbs. J. Ethnopharmacol 4 (2): 159-178.

6. Chopra, R.N., Nayar, S.L. and Chopra, I.C. 1956. Glossary of Indian Medicinal Plants. The Catholic Press, Ranchi. p. 134 - 135.

7. วีกูล วีรานุวัตต์, กนกนาถ ชูปัญญา. 2525. เคมีคลินิกโครงการตำราศิริราช คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 293, 429-430.

8. Bowers, G.N., Jr. & Mc Comb, R.B. 1975. Measurement of total alkaline phosphatase activity human serum. Clin. Chem. 21 (3) : 1988-1995

9. Henry, R.J., Chaimori, N., Golub, O.J. and Berkman, S. 1960. Revised spectrophotometri, methods for the determination of glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase and lactic acid dehydrogenase. Am. J. Clin. Path. 34 (4) : 381-398.

10. ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2529. หลักการวิเคราะห์และปฏิบัติการเคมีคลินิก. หน้า 121-151.

11. Chopra, R.N., Gupta, J.C., David, J.C. and Ghosh, S. 1927. Pharmacological action of conessine, the alkaloid of *Holarrhena antidysenterica*. Indian Med. Gaz. 62 : 132-140. Through Chemical Abstract 21 : 1850, 1927.

12. Atal, C.K., Sharma, M.L., Kual, A. and Khajurla, A. 1986. Immunomodulating agents of plant origin. I: Preliminary screening. J. Ethnopharm. 18: 133-141.

13. Wong, D.M. and Herscowitz. H.B. 1979. Immune activation by T-Independent antigen: lack of effect of macrophage depletion on immune response to TNP-LPS, PVP and dextran. Immunology. 37 (4): 765-775.

14. Morgan, A.G. and Steward, M.W. 1976 Macrophage clearance function and immue complex in New Zealand Black/White F1

hybrid mice. Clin. Exp. Immunol. 26(1): 133-136.

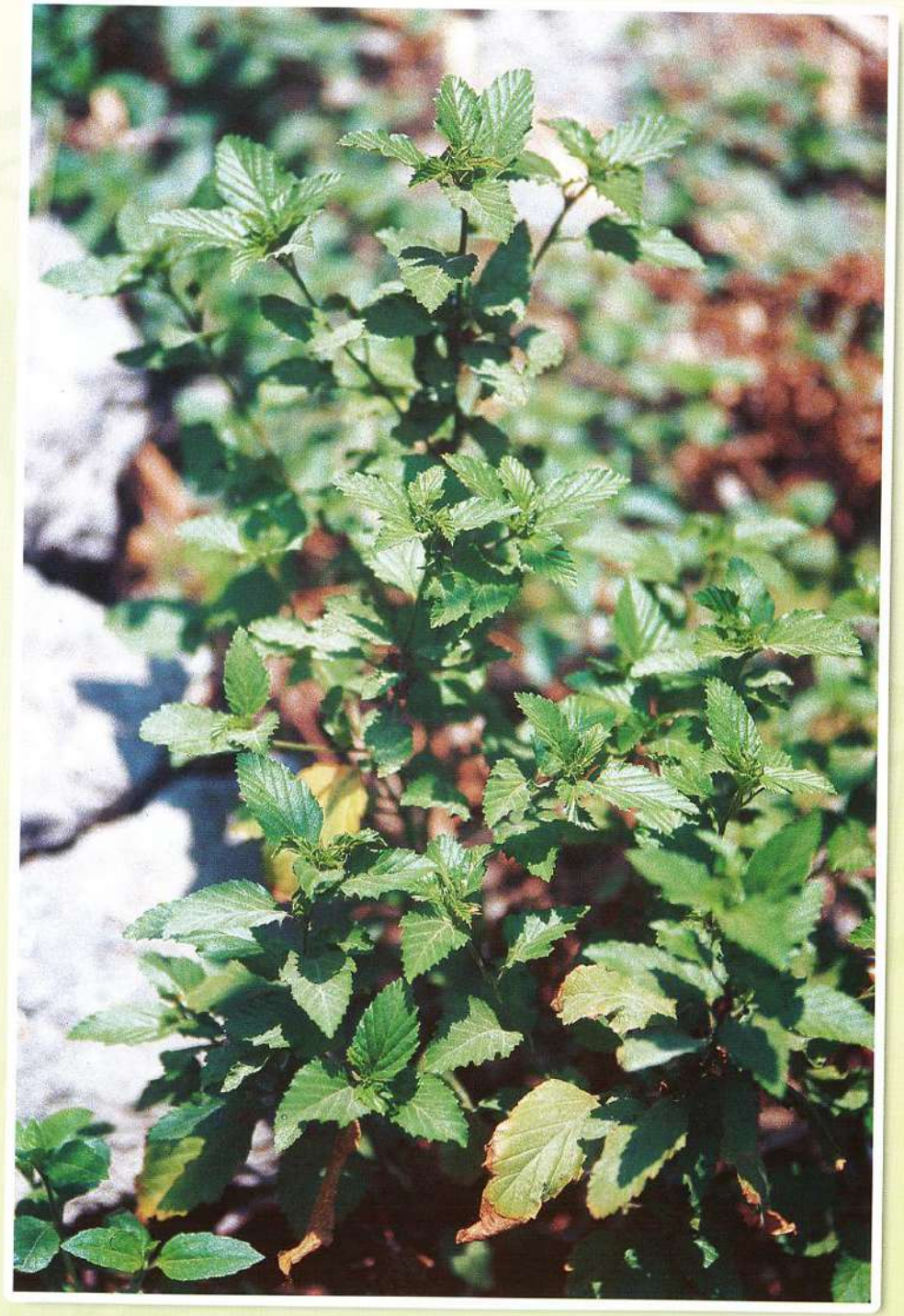
15. Van Buskirk, A.M. and Braley-Mullen, H. 1987. Suppression of IgG memory reponses by T cells activated with the type 2 antigen polyvinylpyrrolidone (PVP). Cell. Immunol. 107 (1) : 121-129.

16. Barbara, A.B. 1984 Hematology: Principles and procedures. 4th. ed. Lea & Febiger. Philadelphia. : 98-99, 102-103.

17. Suber, R.L. 1994 Clinical pathology methods for toxicology studies. in : Hayes, A.W. ed., Principles and methods of toxicology 3rd ed. Raven Press, New York. p. 760.

18. Semler, D.E., Gad, S.C. and Chengelis, C.P. 1992. The rat. in : Gad, S.C. and Chengelis, C.P. eds. Animal models in toxicology. Marcel Dekker, New York, p. 80.

19. Kumar, V., Cotran, R.S. and Robbins, S.L. 1992. Basic pathology. 5th ed. W.B. Saunders company. : 44, 58.



ดายยัด

เถาวัลย์เปรียง

การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดดายขัด

Chronic Toxicity Study of *Malvastrum coromandelianum* (L.) Garcke

เอมมนัส อัคควิชญ์, ปราณี ชวลิตธำรง*
อัญชลี ฐูฑะพุทธิ*, ขาวีย์ บันเลิทธิ์*
ปราณี จันทเพ็ชร**, สมเกียรติ ปัญญามัง*

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

ดายขัด (*Malvastrum coromandelianum* (L.) Garcke) เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งที่สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ศึกษาพบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของกระต่ายที่เป็นเบาหวานได้ จากการศึกษาพิษเรื้อรังของสมุนไพรนี้ในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ พบว่าเมื่อกรอกสารสกัดด้วยน้ำของดายขัดในขนาดเทียบเท่าผงยา 0.2, 2 และ 20 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (ก./กก.) แก่หนูติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 6 เดือน ไม่ทำให้น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นหรือค่าทางโลหิตวิทยาของหนูที่ได้รับสารสกัดแตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ 10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม/วัน อย่างมีนัยสำคัญ การกินอาหารของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ขณะที่หนูเพศเมียทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัด กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนการศึกษาค่าทางชีวเคมีของซีรั่มพบว่าหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 20 ก./กก. มีระดับโคเลสเตอรอลสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 2 และ 20 ก./กก. มีระดับโปแตสเซียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด 20 ก./กก. มีระดับอัลบูมินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวข้างต้นยังอยู่ในช่วงของค่าปกติและเกิดขึ้นในหนูเพศเดียว ค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในหลายอวัยวะของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 20 ก./กก. มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องจากน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มดังกล่าวมีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มควบคุมแม้ว่าจะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในต่าง ๆ ไม่พบความผิดปกติใดที่อาจกล่าวได้ว่ามีสาเหตุจากความเป็นพิษของสารสกัด จากผลการศึกษาพิษเรื้อรังของสมุนไพรดายขัดสรุปได้ว่าสารสกัดด้วยน้ำของดายขัดในขนาด 0.2-20 ก./กก. ไม่แสดงความเป็นพิษในหนูขาวที่ได้รับสารสกัดนี้ทางปากนาน 6 เดือน

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 40 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม-กันยายน 2541 หน้า 261-271.

ABSTRACT

Malvastrum coromandelianum (L.) Garcke or "Dai-Kat" in Thai was one of medicinal plants scientifically investigated by the Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences. We previously showed that water extract of this medicinal plant exhibited hypoglycemic effect in diabetic rabbits. This paper reported chronic toxicity study of this plant in Wistar rats. Water extract of *M. coromandelianum* at the doses equivalent to crude drug 0.2, 2 and 20 g/kg BW/day was given orally to the animals for six-month period. It was found that body weight gain and hematological parameters of all extract-treated groups were not significantly different from those of the control groups which were given 10 ml of water/kg BW/day. Food intake of all groups of female rats, but not male rats, treated with the extract was significantly lower than that of the control group. Biochemical study of serum samples showed that cholesterol level of male rats receiving the extract 20 g/kg BW was significantly lower than that of the control. In addition, potassium levels of male rats receiving that extract at the doses of 2 and 20 g/kg BW were also significantly lower than that of the control, while female rats treated with the extract 20 g/kg BW had significantly lower albumin level than their control. Even though these changes were statistically significant, they were minor changes and were within the normal limits and did not occur in the animals of the opposite sex that received the same treatment. Percent relative organ weight of some internal organs of animals of both sexes receiving the extract 20 g/kg BW were significantly lower than those of the controls. This could be because the body weights of these groups of animals were lower, though not significantly lower, than their controls. However, hisopathological study of the internal organs did not reveal any abnormalities that could be attributed to the toxicity of the extract. Taken together, the results showed that water extract of *M. coromandelianum* given orally to Wistar rats at the doses of 0.2-20 g/kg BW/day for 60 days did not produce toxicity in the animals.

Keywords : *Malvastrum coromandelianum*, **toxicity**, **chronic toxicity**

บทนำ

ดายขัด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Malvastrum coromandelianum* (L.) Garcke[1] วงศ์ Malvaceae เป็นพืชล้มลุก มีขนเดี่ยวและขนรูปดาวกระจายทั่วไป ใบเดี่ยว รูปรีหรือรูปไข่ ออกสลับหูใบเรียวเล็ก ดอกเล็ก สีเหลือง ออกเดี่ยวหรือรวมกันเป็นช่อสั้นๆ ตามง่ามใบ มีริ้วประดับเล็กๆ ใต้วงกลีบเลี้ยง ผลเล็ก ผนังแยกเป็นห้องเล็กๆ ภายในห้องมี 1 เมล็ด จากการศึกษาทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรนี้โดย อุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์และคณะ[2]

พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของดายขัดในขนาดเทียบเท่าสมุนไพรแห้ง 20 ก./กก. สามารถลดน้ำตาลในกระต่ายที่ทำให้เป็นเบาหวานโดย alloxan ได้ โดยสามารถลดน้ำตาลในเลือดได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากการให้สารสกัด สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จึงให้ความสนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรนี้ในการลดน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

เนื่องจากการศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่าสารสกัดด้วยน้ำของดายขัดมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดด้วยน้ำของดายขัดในหนูขาวที่ได้รับสารสกัดทางปากนาน 6 เดือน เพื่อหาข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ด้านความปลอดภัยของสมุนไพรดายขัดก่อนที่จะดำเนินการทดลองทางคลินิกต่อไป

วัตถุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 160 ตัว เพศเมีย 80 ตัว น้ำหนัก 180±10 กรัม เพศผู้ 80 ตัว น้ำหนัก 210±10 กรัม เลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด และน้ำประปาที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

สมุนไพร

ดายขัดทั้งต้น จัดหาและตรวจสอบชื่อชนิดตามหลักพฤกษอนุกรมวิธาน นำมาล้างให้สะอาด ผึ่งและ อบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส บดเป็นผงหยาบเพื่อใช้เตรียมสารสกัดให้สัตว์ทดลอง

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดดายขัดสำหรับสัตว์ทดลอง

นำดายขัดแห้งที่บดเป็นผงหยาบมาต้มสกัด (reflux) ด้วยน้ำกลั่นนาน 2 ชั่วโมง จำนวน 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมาระเหยเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็นความเข้มข้น 1 : 1 ใช้เป็นสารสกัดแขวนตะกอนสำหรับทดลอง

การทดสอบพิษเรื้อรัง

แบ่งหนูขาวโดยวิธีสุ่มออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 40 ตัว (เพศละ 20 ตัว) ประกอบด้วย กลุ่มควบคุมกรอกน้ำกลั่นปริมาณ 10.0 มล./กก./วัน และกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม กรอกสารสกัดดายขัดแขวนตะกอนในน้ำเทียบเท่าผงยาแห้ง 0.2, 2.0 และ 20.0 ก./กก./วัน ตามลำดับ ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 6 เดือน

ในระหว่างดำเนินการทดลอง บันทึกน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และสังเกตการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ดังนี้ ลักษณะของขนและผิวหนัง ตา จมูก รูทวาร สีของเยื่อเมือก (mucous membrane) อุจจาระ การหายใจ การเดิน การทรงตัว และพฤติกรรม หากมีหนูตายระหว่างการทดลองนำมาผ่าชากชันสูตร เมื่อครบกำหนดงดอาหารหนูขาวเป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนทำการผ่าชาก โดยทำการดมสลบหนูด้วยอีเธอร์ เจาะเลือดจาก posterior vena cava เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ ปริมาณฮีโมโกลบิน (hemaglobin), เปอร์เซนต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), จำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cells) และ เกล็ดเลือด (platelets) โดยใช้เครื่อง Automated Hematological Analyzer รุ่น Cell-Dyn 3500 (Abbott, U.S.A.)

การศึกษาทางชีวเคมีคลินิกของซีรัมเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP) ใช้วิธี enzyme kinetic ที่ 37°, hydrolysis

of pPNPP, DEA buffer, ส่วนเอนไซม์ aspartate amino transferase (AST) และ alanine amino transferase (ALT) ใช้วิธี enzyme kinetic ที่ 37°, oxidation of NADH ส่วนการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของสารอื่นๆ ในซีรัม ได้แก่ bilirubin ใช้วิธี 2, 5 dichlorophenyl diazonium salt, total cholesterol โดยวิธี enzyme colorimetric (CHOD-PAP), BUN โดยวิธี enzyme kinetic method, creatinine โดยวิธี Jaffe's reaction (end point), ระดับ glucose โดยวิธี Glucose oxidase-PAP method ของ Human, total protein ใช้วิธี Biuret, albumin ใช้วิธี dye binding กับ bromcresol green, globulin ได้จากการหักค่าของ albumin ออกจากค่าของ total protein[9], ระดับ sodium และ potassium ใช้ ion selective electrode method โดยใช้เครื่อง Automated Blood Chemistry Analyzer รุ่น MEGA (Merck, Germany)

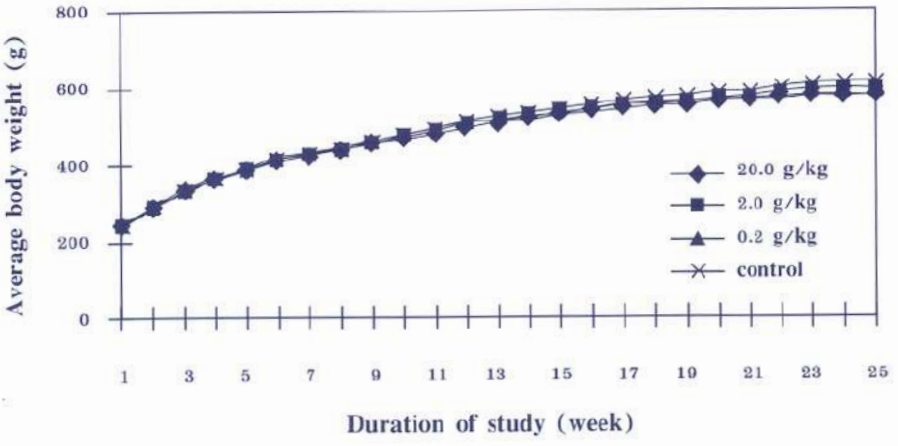
สำหรับการผ่าชากชันสูตร ได้ตรวจหาพยาธิวิการที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายใน ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด หลอดลม ต่อมธัยรอยด์ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน ลำไส้ ไต ม้าม กระเพาะปัสสาวะ รังไข่ มดลูก และอัณฑะ โดยพิจารณาจากตำแหน่ง รูปร่าง ขนาด สี ลักษณะผิว ลักษณะหน้าตัดและองค์ประกอบ (texture) ของอวัยวะ ชั่งน้ำหนักอวัยวะต่างๆ และเก็บอวัยวะใน 10% phosphate buffer formalin นำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติเชิงพรรณนา การทดสอบสมมติฐานใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan multiple range test ที่ $p<0.05$ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ผลทางจุลพยาธิวิทยาเปรียบเทียบโดย Fisher exact test ที่ $p<0.05$

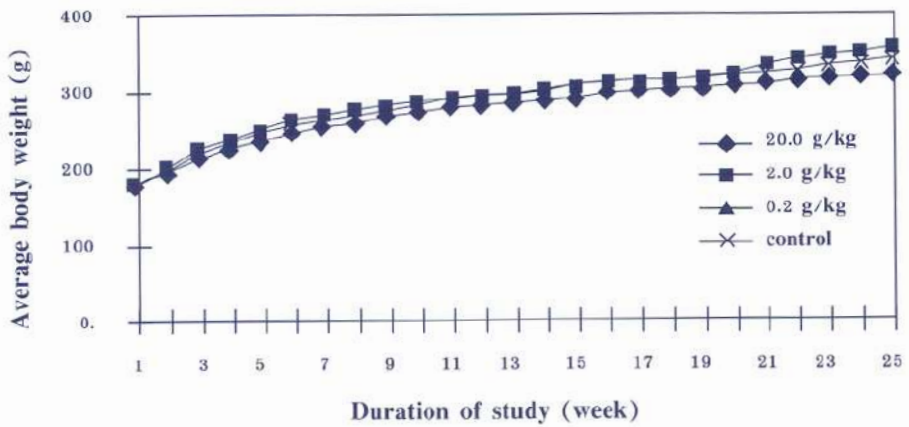
ผล

ผลต่อการเจริญเติบโตและการกินอาหาร (ภาพที่ 1, 2 และตารางที่ 1) เมื่อป้อนสารสกัดด้วยน้ำของดายขัดแก่หนูขาวในขนาดเทียบเท่าผงยา 0.2, 2 และ 20 ก./กก. เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่าการกินอาหารของหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain) ของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับยาทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ตลอดการทดลองไม่พบความผิดปกติของลักษณะขน ผิวหนัง ตา จมูก รูทวาร สีของเยื่อเมือก อุจจาระ การหายใจ การเดิน การทรงตัว และพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ภาพที่ 1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดตายขัดนาน 6 เดือน



ภาพที่ 2 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดตายขัดนาน 6 เดือน



ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและการกินอาหารของหนูที่ได้รับสารสกัดดายขัด นาน 6 เดือน

Dose of *M. coromandelianum* (g/kg/day)	No.	Body weight gain (g)		Food consumption (g/rat/day)	
		Mean±SD	%Difference from control	Mean±SD	%Difference from control
MALE					
0	20	361.5±64.4		21.8±0.9	
0.2	19	355.6±47.7	-1.6	21.6±1.3	-0.9
2.0	19	345.4±43.9	-4.4	21.5±1.1	-1.4
20.0	18	330.2±38.9	-8.6	20.3±0.6	-2.3
FEMALE					
0	20	165.6±39.3		16.0±1.2	
0.2	20	151.3±35.8	-8.6	14.4±0.5*	-10.0
2.0	19	159.5±29.1	-3.7	14.5±0.3*	-9.4
20.0	20	150.1±25.7	-9.3	13.5±0.4*	-15.6

The results are expressed as Mean ± SD

* Significantly different from control ($p<0.05$)

ผลการตรวจทางโลหิตวิทยา (ตารางที่ 2) พบว่า ปริมาณฮีโมโกลบิน, ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น, จำนวนเม็ดเลือดขาว และจำนวนเกล็ดเลือดของหนูขาว ของหนูกลุ่มที่ได้รับยาทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 2 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดดายขัดนาน 6 เดือน

Dose of *M. coromandelianum* (g/kg/day)	No.	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	White blood cells $x10^2$ (cells/mm^3)	Platelet $x10^4$ (cells/mm^3)
MALE					
0	20	16.0±0.2	49.8±0.8	37.1±2.9	93.4±5.6
0.2	19	16.7±0.3	52.3±1.2	36.6±2.3	93.4±11.0
2.0	19	16.1±0.4	50.4±1.3	37.2±2.5	93.6±8.9
20.0	18	14.8±2.4	46.1±0.7	38.1±6.6	83.5±13.4
FEMALE					
0	20	15.9±0.5	48.8±1.6	25.1±4.7	89.0±7.4
0.2	20	15.8±0.3	48.5±1.3	24.9±1.1	90.1±10.8
2.0	19	16.0±0.6	49.8±1.0	23.5±3.1	86.1±6.1
20.0	20	15.5±0.2	48.3±0.8	26.7±4.1	81.4±7.0

The results are expressed as Mean ± SD

ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมี (ตารางที่ 3 และ 4) พบว่า ระดับเอนไซม์ ALP, AST, ALT, BUN, บิลิรูบิน, ครีอาตินิน, โปรตีนรวม, และกลอบูลิน ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับยาทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยา 20 ก./กก. มีระดับโคเลสเตอรอลและโปแตสเซียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยา 20 ก./กก. มีระดับอัลบูมินและโซเดียมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูขาวเพศผู้กลุ่มที่ได้รับยา 0.2 ก./กก. มีระดับโซเดียม และโปแตสเซียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 ค่าทางชีวเคมีของชีรั่มของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดดายขัดนาน 6 เดือน

Parameters	Dose of *M. coromandelianum* (g/kg/day)			
	0 n = 20	0.2 n = 19	2.0 n = 19	20.0 n = 18
ALP (U/l)	61.7±9.4	68.2±15.6	68.2±11.9	68.9±12.1
AST (U/l)	89.7±21.6	92.7±20.0	93.7±23.9	78.3±17.5
ALT (U/l)	37.1±14.3	42.1±19.1	39.2±16.0	30.7±7.9
Bilirubin (mg/dl)	0.16±0.03	0.17±0.01	0.17±0.01	0.17±0.02
Cholesterol (mg/dl)	59.0±9.6	65.2±25.3	63.6±12.6	76.4±21.3*
BUN (mg/dl)	17.7±2.7	17.0±2.3	17.5±2.6	16.5±2.5
Creatinine (mg/dl)	0.8±0.2	0.8±0.2	0.8±0.2	0.8±0.1
Glucose (mg/dl)	159.7±27.7	156.9±28.0	153.3±23.3	163.4±25.4
Total protein (g/dl)	6.5±0.5	6.6±0.5	6.7±0.5	6.4±0.5
Albumin (g/dl)	3.3±0.2	3.3±0.2	3.4±0.2	3.3±0.2
Globulin (g/dl)	3.2±0.3	3.3±0.3	3.3±0.3	3.1±0.3
Sodium (mmol/l)	138.9±1.9	139.4±2.0	140.3±1.9*	139.7±1.9
Potassium (mmol/l)	5.5±1.0	6.0±1.6	6.3±1.0*	6.3±1.2*

The results are expressed as Mean ± SD

* Significantly different from control ($p<0.05$)

ตารางที่ 4 ค่าทางชีวเคมีของซีรั่มของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดดายขัดนาน 6 เดือน

Parameters	Dose of *M. coromandelianum* (g/kg/day)			
	0 n = 20	0.2 n = 20	2.0 n = 19	20.0 n = 20
ALP (U/l)	26.9±8.9	23.4±7.5	22.5±3.8	26.7±4.8
AST (U/l)	73.0±10.4	73.7±8.7	80.3±12.5	76.1±11.9
ALT (U/l)	25.3±3.7	26.2±13.1	28.3±15.3	27.1±8.1
Bilirubin (mg/dl)	0.22±0.02	0.22±0.03	0.21±0.06	0.21±0.03
Cholesterol (mg/dl)	58.4±9.4	58.7±9.3	63.9±29.5	63.4±14.8
BUN (mg/dl)	17.7±2.3	17.0±2.3	18.0±2.8	18.3±3.0
Creatinine (mg/dl)	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	0.8±0.1
Glucose (mg/dl)	126.5±24.4	120.8±16.0	117.0±17.2	125.8±25.7
Total protein (g/dl)	6.7±0.5	6.8±0.4	6.8±0.5	6.4±0.5
Albumin (g/dl)	3.6±0.2	3.7±0.1	3.6±0.2	3.4±0.2*
Globulin (g/dl)	3.1±0.3	3.1±0.3	3.2±0.3	3.0±0.3
Sodium (mmol/l)	137.9±1.5	138.2±1.4	138.3±1.8	136.6±1.4*
Potassium (mmol/l)	4.8±0.9	4.9±1.0	4.6±0.8	5.0±1.1

The results are expressed as Mean ± SD

* Significantly different from control ($p<0.05$)

น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม (ตารางที่ 5 และ 6) พบว่า น้ำหนักสัมพัทธ์ของสมองในหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับยามีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นหนูขาวเพศเมียกลุ่มที่ได้รับยา 0.2 ก./กก. มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนั้นน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตทั้งสองข้าง และกระเพาะอาหาร ในหนูขาวเพศผู้กลุ่มได้รับยา 20 ก./กก. มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสกัดขนาดเดียวกันมีน้ำหนักสัมพัทธ์ไตซ้าย และกระเพาะอาหารสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 5 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 100 กรัม) ของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดตายขัดนาน 6 เดือน

Relative organ weight (g/100 g BW)	Dose of *M. coromandelianum* (g/kg/day)			
	0 n = 20	0.2 n = 19	2.0 n = 19	20.0 n = 18
Brain	0.35±0.01	0.38±0.01*	0.37±0.01*	0.38±0.01*
Heart	0.26±0.04	0.26±0.02	0.25±0.02	0.25±0.03
Lung	0.34±0.04	0.36±0.07	0.36±0.06	0.37±0.06
Liver	2.40±0.38	2.48±0.30	2.38±0.27	2.44±0.26
Spleen	0.17±0.04	0.18±0.02	0.17±0.02	0.17±0.03
Rt. kidney	0.24±0.03	0.25±0.03	0.24±0.03	0.26±0.02*
Lt. kidney	0.22±0.02	0.24±0.03*	0.23±0.02	0.25±0.02*
Stomach	0.38±0.03	0.40±0.03	0.38±0.04	0.44±0.04*

The results are expressed as Mean ± SD

* Significantly different from control ($p<0.05$)

ตารางที่ 6 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 100 กรัม) ของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดตายขัดนาน 6 เดือน

Relative organ weight (g/100 g BW)	Dose of *M. coromandelianum* (g/kg/day)			
	0 n = 20	0.2 n = 20	2.0 n = 19	20.0 n = 20
Brain	0.58±0.02	0.61±0.02*	0.55±0.02*	0.61±0.03*
Heart	0.28±0.02	0.30±0.05	0.28±0.03	0.29±0.02
Lung	0.44±0.06	0.48±0.07*	0.43±0.04	0.44±0.04
Liver	2.27±0.27	2.31±0.21	2.22±0.18	2.42±0.28
Spleen	0.21±0.04	0.21±0.03	0.21±0.03	0.21±0.03
Rt. kidney	0.25±0.03	0.25±0.03	0.24±0.02	0.27±0.02
Lt. kidney	0.24±0.03	0.24±0.02	0.23±0.02	0.25±0.02*
Stomach	0.49±0.07	0.50±0.04	0.46±0.03	0.58±0.04*

The results are expressed as Mean ± SD

* Significantly different from control ($p<0.05$)

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา (ตารางที่ 7) จากการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของสมอง หัวใจ ปอด หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน ลำไส้ ไต ม้าม กระเพาะปัสสาวะ รังไข่และมดลูกในหนูเพศเมีย หรืออัณฑะในหนูเพศผู้ พบว่าตับมีการเกิด fatty change และ focal liver cell hyperplasia ในหนูขาวบางตัวทั้งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุม หัวใจของหนูขาวเพศผู้บางตัวที่ได้รับสารสกัด 2 ก./กก. เกิด focal myocarditis นอกจากนี้ตรวจพบ nephrocalcinosis ที่ไตของหนูเพศเมียบางตัวทั้งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความผิดปกตินี้ในหนูเพศผู้ ตรงกันข้ามหนูเพศผู้บางตัวทั้งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุมตรวจพบ hydrocalyx ที่ไต ซึ่งไม่พบในหนูเพศเมีย นอกจากนี้หนูเพศเมียบางตัวที่ได้รับสารสกัด 2 ก./กก. ยังตรวจพบ hydronephrosis ที่ไต ส่วนปอดตรวจพบ granuloma ในหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 2 ก./กก. และหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.2 และ 2 ก./กก. และตรวจพบ pneumonia ในหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.2 ก./กก.

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในของหนูขาวที่ได้รับสารสกัดดายชัด นาน 6 เดือน

Site and lesions	Dose of *M. coromandelianum* (g/kg/day)							
	Male				Female			
	0	0.2	2.0	20.0	0	0.2	2.0	20.0
Liver								
- fatty change	4/20	3/19	5/19	1/18	5/20	1/20	0/19*	0/20*
- FHP	2/20	0/19	0/19	0/18	0/20	0/20	0/19	0/20
Heart								
- focal myocarditis	0/20	0/19	3/19	0/18	0/20	0/20	0/19	0/20
Kidney								
- nephrocalcinosis	0/20	0/19	0/19	0/18	10/20	12/20	10/19	8/20
- hydrocalyx	5/20	1/19	3/19	1/18	0/20	0/20	0/19	0/20
- hydronephrosis	0/20	0/19	0/19	0/18	0/20	0/20	3/19	0/20
Lung								
- granuloma	0/20	0/19	1/19	0/18	0/20	1/20	5/19*	0/20
- pneumonia	0/20	0/19	0/19	0/18	0/20	2/20	0/19	0/20
Testis					-	-	-	-
- epididymo-orchitis	0/20	0/19	0/19	1/18				

FHP = focal liver cell hyperplasia

The results are expressed as the ratios of animals with pathological findings to the number of animals in each group.

* Significantly different from control ($p<0.05$)

วิจารณ์

จากการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดดายขัดในหนูขาวเป็นเวลานาน 6 เดือน โดยกรอกสารสกัดดายขัดเทียบเท่าผงยา 0.2, 2 และ 20 ก./กก. พบว่า การกินอาหารของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มกินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการเพิ่มของน้ำหนักตัว (body weight gain) ของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและการกินอาหารของหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดขนาด 20 ก./กก. จะมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มควบคุมก็ตามแต่ความแตกต่างดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ หนูขาวกลุ่มได้รับสารสกัดทั้งสองเพศมีค่าทางโลหิตวิทยาได้แก่ ฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น จำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด ไม่แตกต่างจากหนูขาวกลุ่มควบคุม

ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมีของหนูขาวกลุ่มทดลองพบว่า ระดับโคเลสเตอรอล ระดับอัลบูมิน ระดับโซเดียม และระดับโปแตสเซียมในหนูบางกลุ่มต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวข้างต้นยังอยู่ในช่วงของค่าปกติและเกิดขึ้นในหนูบางกลุ่มเท่านั้น เป็นการเปลี่ยนแปลงที่อยู่ในช่วงค่าปกติ และไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ

นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในของหนูที่ได้รับสารสกัด 20 ก./กก. ได้แก่ สมอง ไตทั้งสองข้าง และกระเพาะอาหาร ในหนูเพศผู้ และสมอง ไตข้างซ้าย และกระเพาะอาหาร ในหนูเพศเมีย มีค่ามากกว่าจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้สาเหตุส่วนหนึ่งอาจเนื่องจากน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มนี้มีค่าน้อยกว่าน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มควบคุม แม้ว่าจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญก็ตาม

จากการศึกษาทางจุลพยาธิของอวัยวะภายในของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุม พบว่าเกิด fatty change และ focal liver cell hyperplasia ในตับของหนูขาวบางกลุ่มทั้งกลุ่มที่ได้รับสารสกัดและกลุ่มควบคุม ในทำนองเดียวกับการเกิด nephrocalcinosis และ hydrocalyx ที่ไต ที่เกิดทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเช่นกัน ส่วนพยาธิสภาพที่ตรวจพบอื่นๆ เช่น focal myocarditis ของหัวใจ, hydronephrosis ของไต, granuloma และ pneumonia ในปอด และ epididymo-orchitis ของอัณฑะในหนูเพศผู้ เกิดขึ้นในหนูที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่มเท่านั้นและไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ดังนั้นจึงไม่อาจกล่าวได้ว่าพยาธิสภาพต่างๆ ของอวัยวะภายในที่ตรวจพบนี้มีสาเหตุมาจากความเป็นพิษของสารสกัด

สรุป

จากการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดด้วยน้ำของดายขัด โดยกรอกสารสกัดแก่หนูขาวในขนาดเทียบเท่าผงยาแห้ง 0.2, 2 และ 20 ก./กก. ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มกินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการเพิ่มของน้ำหนักตัวของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้สารสกัดของดายขัดยังไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาว ส่วนค่าทางชีวเคมีของชีรั่มของหนูที่ได้รับสารสกัดบางกลุ่มที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ[4] และไม่ได้เกิดขึ้นในหนูทั้งสองเพศ หรือไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของ

สารสกัดที่ได้รับ นอกจากนี้อัตราการเกิดพยาธิสภาพต่างๆ ของอวัยวะภายในที่ตรวจพบก็ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดด้วยน้ำของดายขัดในขนาดและระยะเวลาที่ให้ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในหนูขาว

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายสัตว์ทดลองสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขที่สนับสนุนในเรื่องการจัดหาสัตว์ทดลองและสถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง นายดรุณ เพ็ชรพลาย อดีตผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพรที่ให้การสนับสนุน และส่งเสริมงานวิจัยครั้งนี้ นายสมนึก เจษฎาภัทรกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ วิชรพยาบาล มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบสไลด์เนื้อเยื่อสัตว์ทดลอง และให้คำปรึกษาในการแปลผล

เอกสารอ้างอิง

1. Backer, C.A. and Bakhuizen van Den Brink, R.C. 1963. Flora of Java. Vol. 1 N.V.P. Noordhoff Groningen, The Netherlands. P. 421-426.

2. อุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์, และคณะ. 2534. ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของสมุนไพรในสัตว์ทดลอง. เอกสารประชุมวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 4. หน้า 364-365.

3. ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2529. หลักวิเคราะห์และปฏิบัติการเคมีคลินิก. หน้า 121-151.

4. ข้อมูลการศึกษาด้านพิษและความปลอดภัย สถาบันวิจัยสมุนไพร

Chronic toxicity study of crude extract of *Derris scandens* Benth

Pranee Chavalittumrong, Songphol Chivapat***
*Anchalee Chuthaputti***, Sadudee Rattanajarasroj*****
*and Somkiat Punyamong******

ABSTRACT

Derris scandens Benth, or "Thao-wan-Priang" in That, is one of the most commonly used medicinal plants in Thailand ; however, the safety of this herb upon long-term consumption has never been reported. Therefore, a six month chronic toxicity study of 50% ethanolic extract of *Derris scandens* was performed in four groups of 20 Wistar rats of each sex. Water control group received 10 ml of water/kg BW/day. The three treatment groups were given the extract at the doses of 6,60 and 600 mg/kg BW/day, which were equivalent to dried stems 0.03, 0.3 and 3 g/kg BW/day or 1,10 and 100 fold the therapeutic dose, respectively, No difference of initial or final body weights between extract-treated and control groups was detected. It was found that the extract did not produce any significant dose-related changes of hematological parameters or serum chemistry, and no histopathological lesion of any internal organ that could be due to the toxic effect of the extract was observed. The results indicated that 50% ethanolic extract of *D. scandens* at the doses given did not produce any toxicity in the rat.

Key words : *Derris scandens* , toxicity, Thao-Wan-Priang.

---

[1]M.S. (Phytochemistry), [2]M.S. (Pathobiology), [3]Ph.D. (Pharmacology), [4]M.S. (Pharmacology), [5]Cert. in Medical Science Technology, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000 Thailand

Received, 24 June 1999 Accepted, 10 August 1999

วารสารสงขลานครินทร์ ปีที่ 21 ฉบับที่ 4 ตุลาคม-ธันวาคม 2542 หน้า 425-433.

บทคัดย่อ

เถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens* Benth) เป็นสมุนไพรที่ใช้กันมากอีกชนิดหนึ่ง โดยที่ไม่มีรายงานความปลอดภัยของสมุนไพรนี้หากใช้เป็นเวลานาน ดังนั้น จึงได้ศึกษาพิษเรื้อรัง (6 เดือน)ของสารสกัดด้วย 50% เอธานอล ของเถาวัลย์เปรียงในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ 4 กลุ่ม ๆ ละ 20 ตัวต่อเพศ กลุ่มควบคุมได้รับน้ำ 10 มล./น้ำหนักตัว 1 กก./วัน ขณะที่หนูอีกสามกลุ่มได้รับสารสกัดขนาด 6, 60 และ 600 มก./น้ำหนักตัวหนู 1 กก./วัน หรือเทียบเท่ากับผงเถาวัลย์เปรียงแห้ง 0.03, 0.3 และ 3 กรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กก./วัน หรือ 1, 10 และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้กับคนต่อวัน ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดของเถาวัลย์เปรียงไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีของซีรั่ม หรือจุลพยาธิสภาพของอวัยวะภายในที่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัด และไม่พบความผิดปกติใด ๆ ที่สามารถสรุปได้ว่าเนื่องมาจากความเป็นพิษของสารสกัด

Derris scandens Benth. is a medicinal plant in the Leguminosae family commonly known in Thai as "Thao-Wan-Priang" (Muanwongyathi and Supatwanich, 1981). It is a woody vine widely distributed throughout Thailand. Its dried stem is used in Thai traditional medicine as expectorant, antitussive, diuretic, antidysentery, and for the treatment of muscle ache and pain, while the root is used as fish poison (Tiangburanatham, 1996, Anonymous, 1967). Phytochemical studies show that the stem contains eturunaagarone, waragalone, 8-γ, γ-dimethylally-wighteone, 3'-γ, γ-dimethylally-wighteone, scandinone, robustic acid, and 4,4'- DiO- methyl scandenin (Rao, *et al.*, 1994). The root is reported to contain scandenin, nallanin, chadanin (Wang, *et al.*, 1997) osajin, scandenone (warangalone), scandinone (Rao and Seshadri, 1946), chandalone, lonchocarpic acid and lonchocarpenin (Pelter and Stainton, 1996, Falshaw, *et al.*, 1969) It was recently found that warangalone, robustic acid, 8γ, γ-dimethylallywighteone, and 3'-γ, γ-dimethylallywighteone are selective and potent inhibitors of rat liver cycle AMP- dependent protein kinase catalytic subunit (cAK) with IC_{50} at 3.5, 10, 20, 24 and 33 μM, respectively. It was then suggested that the potent inhibitory action of warangalone and robustic acid on cAK may play a role in *in vivo* biological activity and insecticidal activity of *D. scandens* (Wang, *et al.*, 1997). Recently, our laboratory has reported that 50% ethanolic extract of *D. scandens* showed marked *in vitro* immunomodulating activity in mouse splenic lymphocytes (Chuthaputti and Chavalittumrong, 1998).

D. scandens is said to be one of the most commonly used medicinal plants in Thailand (Pongboonrod, 1950). Rural people

usually take infusion of roasted dried stem of *D. scandens* or alcoholic macerate of *D. scandens* stem for the relief of muscle ache after work of as tonic. In addition, Chao Praya Apaipubate General Hospital at Prachin Buri province, which is the forefront user of herbal medicines for the treatment of common diseases dispensed this dried powdered plant at the dose of 1.5-3 g for the treatment of muscle ache. However, there has been no report of toxicity study of this plant especially upon repeated dosing basis. Since, our laboratory found that 50% ethanolic extract of *D. scandens* possessed immunostimulating activity, chronic toxicity study of this extract was then performed in rats in order to evaluate the safety of this extract prior to the evaluation of its therapeutic efficacy in humans.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and preparation of plant extract

Dried stem of *D. scandens* was obtained from Chao Praya Apaipubate Hospital, Prachin Buri province. The plant was indentified by Miss Supaporn Pitiporn, the head pharmacist of the hospital. Fifty percent ethanolic extract of *D. scandens* was prepared by reflux method and the extract was dried under vacuum in a rotary evaporator. Prior to the experiment, the extract was diluted to the desired concentrations with water.

Treatment of the animals

Eighty male Wistar rats weighing 160±10 g and 80 female rats weighing 140±10 g from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom province, were used. The animals were housed in the animal facility of the Department of Medical Sciences. The temperature in the animal room was kept at weighing 25±1° C with 60% relative humidity. The animals were allowed to have free access to food and clean water.

Chronic toxicity study

Eighty Wistar rats of each sex were randomly divided into 4 groups of 20 animals per sex. Group 1 (water control) received water 10 ml/kg BW/day and Groups 2-4 were given the extract at the doses of 6,60 or 600 mg/kg BW/day which were equivalent to 0.03, 0.3 or 3 g of dried powdered plant/kg BW/day or 1, 10 or 100 fold the therapeutic dose(1.5g/50kg person/day), respectively. Body weight and food intake were measured weekly and the animals were observed for signs of abnormalities throughout the study. At the end of 180-day treatment period, the animals were fasted for 18 hours, then, anesthetized with ether and sacrificed by drawing blood samples from the inferior vena cava for hematological and biochemical examinations.

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyser (Cell dyne 3500, Abbott). Hematological parameters measured were white blood cell

(WBC), %neutrophil, %lymphocyte, %monocyte, %eosinophil, %basophil, red blood cell (RBC), hemoglobin, hematocrit (Hct), and platelet.

Biochemical analysis of serum samples was performed using an automatic chemistry analyser (Hitachi model 912). Biochemical parameters measured were aspartate aminiotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), bilirubin, creatinine, blood urea nitrogen (BUN), cholesterol, triglyceride, total protein, albumin, uric acid, glucose, sodium and potassium.

The positions, shapes, sizes and colors of internal organs, namely, brain, heart, both kidneys and lungs, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intertine, spleen, bladder, and testis in male rats or overy and uterus in female rats were visually observed for any signs of gross lesions. These organs were then collected, weighed to determine relative organ weights, and preserved in 10% buffered formalin solution. Tissue slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin and histopathological examinations were performed by a veterinary pathologist.

Statistical analysis

The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test, using SPSS/PC program, to determine significant differences between groups at $p<0.05$. Histopathological data were evaluated by the Fisher Exact test and the significance level was also set at $p<0.05$.

RESULTS

Effects of the extract on body weight, food intake, and relative organ weight

In both male and female animals, there was no difference in the average body weight between extract-treated group and control group from the start until the end of the experiment (Figure 1). It was found that food consumption of animals receiving the extract was significantly higher than that of the control groups for several weeks,i.e. in male rats during 2^{nd}-9^{th} weeks and female rats during 21^{st}-23^{rd} weeks of the study (Figure 2). However, the final body weights of male and female animals receiving the extract were not significantly different from that of the control groups (Table 1). Male rats treated with the extract at the dose of 600 mg/kg had higher relative weight of the stomach, the lung and the right and left testis than its control group, while male rats receiving the extract 60 mg/kg had higher relative weights of the liver and the right testis than the control group. In contrast, there was no difference of relative organ weights in female rats (Table 1.)

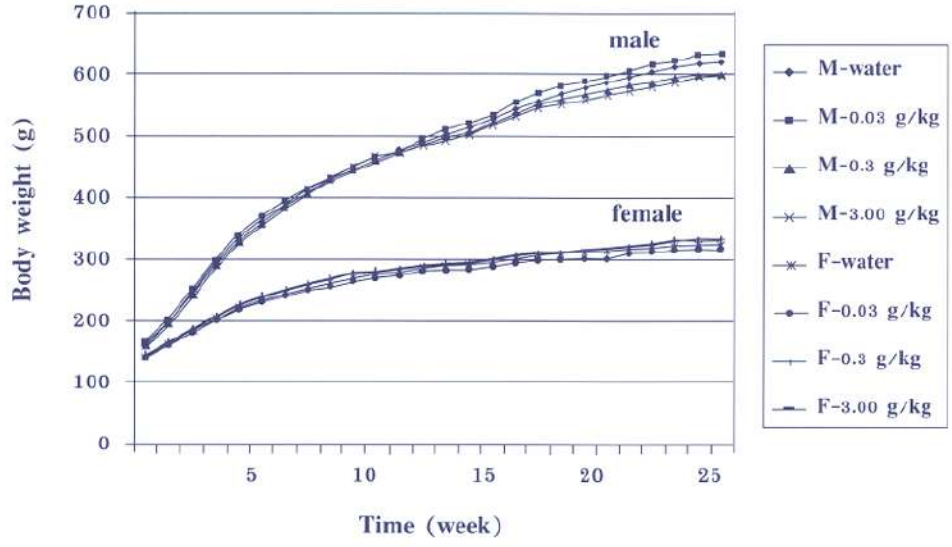


Figure 1 Growth curves of rats treated with *Derris scandens* extract for 6 months

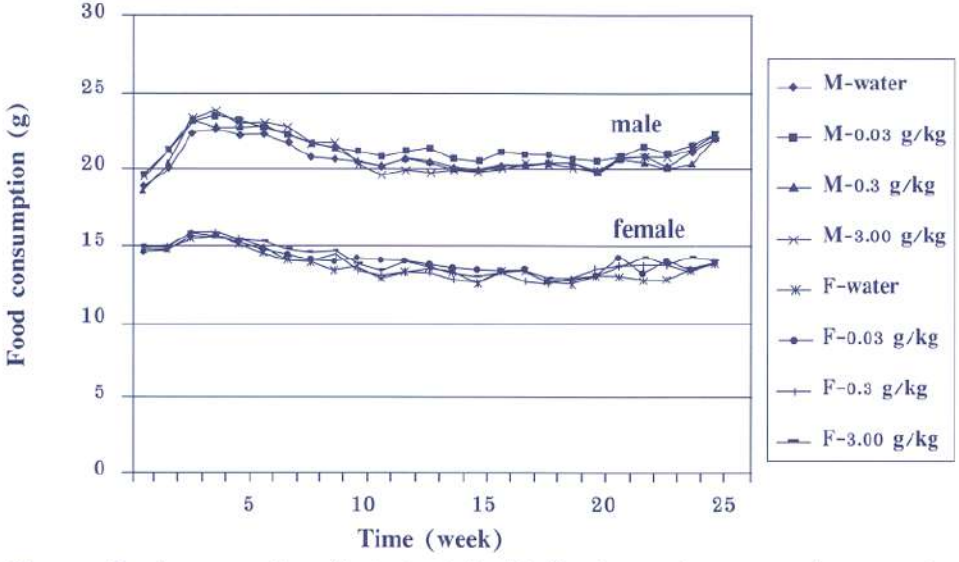


Figure 2 Food consumotion of rats treated with *Derris scandens* extract for 6 months

Effect of the extract on hematological parameters:

There was no difference of the number of white blood cells, %neutrophil, % lymphocyte, %monocyte, hemoglobin or hematocrit between extract-treated groups and control groups of both male and female rats (Table 2). The groups of male and female rats receiving the extract at the dose of 600 mg/kg had significantly lower %basophils than their

Table 1. Relative organ weight# (g/kg BW) and body weight of rats treated with *Derris scandens* extract for 6 months.

	Group of male animals				Group of female animals			
	water N=20	6 mg/kg N=20	60 mg/kg N=20	600 mg/kg N=18	water N=20	6 mg/kg N=20	60 mg/kg N=20	600 mg/kg N=19
Initial body weight(g)	158.6±23.8	168.2±20.7	159.3±13.9	162.3±18.3	142.4±12.3	139.6±9.9	146.8±11.8	145.1±9.6
Final body weight(g)	618.4±68.1	628.8±57.4	600.4±44.3	595.4±37.8	327.2±38.9	316.6±31.9	322.7±31.3	336±41.3
Brain	3.52±0.36	3.35±0.30	3.53±0.27	3.60±0.22	6.09±0.64	6.24±0.54	5.94±0.52	5.88±0.65
Heart	2.42±0.36	2.43±0.22	2.43±0.19	2.52±0.16	2.96±0.29	2.98±0.34	2.84±0.27	2.82±0.28
Right kidney	2.37±0.25	2.37±0.22	2.38±0.20	2.49±0.18	2.68±0.19	2.74±0.28	2.61±0.22	2.60±0.23
Left kidney	2.24±0.23	2.26±0.21	2.36±0.18	2.36±0.16	2.53±0.17	2.61±0.29	2.50±0.20	2.54±0.23
Urinary bladder	0.247±0.08	0.217±0.08	0.225±0.05	0.246±0.08	0.25±0.05	0.27±0.06	0.25±0.05	0.27±0.06
Liver	23.78±2.44	24.77±1.89	25.31±2.14*	25.13±1.52	24.02±3.11	24.31±2.95	23.05±2.70	25.57±3.82
Spleen	1.84±0.33	1.72±0.16	1.84±0.23	1.75±0.16	2.10±0.20	2.19±0.21	2.04±0.20	2.14±0.34
Stomach	3.41±0.35	3.29±0.83	3.63±0.45	3.78±0.31*	4.92±0.67	5.05±0.74	4.85±0.68	5.35±0.82
Lung	3.00±0.30	3.02±0.34	3.25±0.43	3.32±0.40*	4.29±0.48	4.42±0.66	4.19±0.64	4.17±0.37
Right testis	4.98±0.92	5.24±0.60	5.51±0.52*	5.51±0.54*				
Left testis	5.00±0.87	5.15±0.59	5.36±0.46	5.59±0.49*				

Relatiive organ weight =organ weight (g)/body weight(kg), Each value represents mean ± SD

*Significantly different from water control group ($p<0.05$)

Table 2. Results of hematological examinations of rats treated with *Derris scandens* extract for 6 months.

	Group of male animals				Group of female animals			
	water	6 mg/kg	60 mg/kg	600 mg/kg	water	6 mg/kg	60 mg/kg	600 mg/kg
	N=20	N=20	N=20	N=18	N=20	N=20	N=20	N=17
White blood Cells (K/uL)	5.43±1.15	4.79±1.10	5.15±1.03	4.72±0.94	3.05±0.76	3.28±0.75	3.11±0.55	3.25±0.84
Neutrophil(%)	16.65±6.50	17.01±3.48	15.66±3.43	16.21±3.68	14.07±6.52	14.92±5.80	12.71±3.82	16.83±7.11
Lymphocyte(%)	72.36±7.28	71.30±4.86	73.12±4.57	74.24±4.73	74.28±8.67	75.33±7.16	77.35±6.12	73.36±8.77
Monocyte(%)	6.52±2.31	7.50±2.40	7.22±2.23	6.30±2.10	7.54±3.06	6.34±2.12	6.98±3.15	6.94±3.10
Eosinophil(%)	1.23±0.40	1.37±0.49	1.24±0.42	1.29±0.41	1.65±0.44	1.32±0.31*	1.35±0.38*	1.18±0.26*
Basophil(%)	3.23±1.46	2.84±1.37	2.77±1.54	1.98±0.98*	2.47±0.84	2.08±0.71	1.60±0.84*	1.69±0.85*
Erythrocytes (M/uL)	9.13±0.30	9.41±0.41*	9.34±0.39	9.21±0.48	8.63±0.04	8.60±0.39	8.58±0.39	8.46±0.49
Hemoglobin (g/dL)	15.85±0.56	15.92±0.44	15.84±0.50	15.91±0.27	15.98±0.56	15.83±0.57	15.76±0.51	15.82±0.39
Hematocrit(%)	47.26±1.48	48.10±1.88	47.87±1.65	48.22±1.27	47.30±1.66	47.30±1.96	46.90±1.77	46.88±3.10
Platelet (K/ul)	934±119	1055±136*	1015±121*	1053±114*	899±96	933±91	960±92	914±86

Each value represents mean ± SD

*Significantly different from water control group ($p<0.05$)

Table 3. Blood chemistry of rats treated with *Derris scandens* extract for 6 months.

	Group of male animals				Group of female animals			
	water N=20	6 mg/kg N=20	60 mg/kg N=20	600 mg/kg N=18	water N=20	6 mg/kg N=20	60 mg/kg N=20	600 mg/kg N=19
AST(U/L)	98.53±18.96	84.65±9.11*	87.00±23.24	77.44±12.56*	100.95±35.74	81.05±6.60	77.30±13.97	87.37±61.98
ALT(U/L)	37.74±6.12	38.95±6.64	37.10±7.16	36.78±7.13	36.25±10.96	30.55±6.71	32.55±5.26	32.95±11.70
ALP(U/L)	73.63±9.16	73.50±13.84	73.60±14.61	68.61±9.03	28.25±6.08	29.05±7.88	27.90±7.10	28.95±8.70
Bilirubin (mg/dL)	0.09±0.02	0.10±0.03	0.10±0.02	0.10±0.03	0.11±0.05	0.11±0.03	0.10±0.03	0.10±0.04
Creatinine (mg/dL)	0.69±0.03	0.68±0.04	0.68±0.06	0.68±0.06	0.74±0.07	0.74±0.05	0.72±0.04	0.70±0.06*
BUN (mg/dL)	18.63±2.56	17.4±2.30	19.30±2.34	17.94±1.66	21.70±4.16	22.55±3.20	20.35±3.23	20.63±3.55
Cholesterol (mg/dL)	71.95±18.03	82.35±16.60	88.65±22.58*	78.39±12.13	77.60±22.24	72.35±17.07	76.45±19.07	77.63±29.36
Triglyceride (mg/dL)	173.32±47.06	192.45±62.99	192.65±59.24	172.56±49.68	129.15±68.97	131.15±65.52	149.35±78.58	139.42±71.79
Total protein (g/dL)	7.14±0.33	7.25±0.25	7.36±0.43	7.23±0.23	7.43±0.49	7.24±0.33	7.37±0.33	7.46±0.45
Albumin (g/dL)	3.45±0.15	3.46±0.13	3.52±0.18	3.52±0.10	3.92±0.27	3.84±0.17	3.91±0.20	3.90±0.25
Uric acid (mg/dL)	1.94±0.59	2.23±0.90	2.41±0.96	2.03±0.77	1.44±0.43	1.48±0.45	1.48±0.37	1.43±0.46
Glucose (mg/dL)	134.38±21.45	142.13±23.50	146.51±23.32	142.89±13.93	104.98±15.21	101.96±14.74	11.85±19.75	120.39±19.61*
Sodium (mmol/L)	148.00±2.38	148.55±1.73	148.15±2.03	148.56±2.26	146.65±4.78	147.10±5.08	147.15±4.37	147.58±4.26
Potassium (mmol/L)	4.58±0.58	4.53±0.57	5.54±1.11*	5.47±1.32*	4.23±0.68	4.64±1.09	4.67±0.67	4.47±0.85

Each value represents mean ± SD

*Significantly different from water control group ($p<0.05$)

Table 4. Histopathological evaluations of rats treated with *Derris scandens* extract for 6 months.

Organ	Lesion	Group of male animals				Group of female animals			
		Water N=19	6mg/kg N=20	60mg/kg N=20	600mg/kg N=18	Water N=20	6mg/kg N=20	60mg/kg N=20	600mg/kg N=19
Brain	Mild focal non-suppurative meningitis	0/20	1/20	0/20	0/18	1/20	0/20	0/20	0/19
Lung	Increased numbers of alveolar macrophages	0/20	0/20	0/20	0/18	1/20	0/20	0/20	0/19
Thyroid		0/20	0/20	0/20	0/18	0/20	0/20	0/20	0/19
Heart	Mild focal non-suppurative myocarditis	3/20	1/20	1/20	0/18	0/20	0/20	0/20	0/19
Liver	Mild fatty infiltration	4/20	0/20	3/20	1/18	0/20	0/20	2/20	0/19
Kidney	Proteinaceous casts were found in the tubules	3/20	6/20	0/20	1/18	0/20	6/20*	2/20	1/19
Spleen		0/20	0/20	0/20	0/18	0/20	0/20	0/20	0/19
Pancreas		0/20	0/20	0/20	0/18	0/20	0/20	0/20	0/19
GI tract	Increased Number of esinophilp	4/20	0/20	0/20	0/18	1/20	0/20	0/20	0/19
Testis	Testicular hypoplasia	4/20	0/20	0/20	0/18				
Ovary						0/20	0/20	0/20	0/19

Each value represents number of rats with pathological abnormalities/total number of rats examined.
*Significantly different from water control group ($p<0.05$)

controls. In male rats, the numbers of platelets in all extract-treated groups were significantly higher than that of the control; however, this change was not dose-dependent and did not occur in female rats. Meanwhile, %eosinophil of all groups of female, but not male, rats treated with the extract were significantly lower than that of the control.

Effect of the extract on blood chemistry

In male and female rats, no difference in the serum levels of ALT, ALP bilirubin, BUN, triglyceride, total protein, albumin, uric acid or sodium was found between all extract-treated groups and the control groups (Table 3). In male rats, all extract-treated groups had significantly lower AST level than their control. Male rats receiving the extract at the doses of 60 and 600 mg/kg BW has significantly higher potassium levels while those treated with 60 mg/kg extract had significantly higher cholesterol level than the control. Meanwhile, female rats receiving 600 mg extract/kg BW/day had significantly lower creatinie level but higher glucose level than its control.

Effect of the extract on histopathology of internal organs

Upon gross examinations of internal organs, no abnormal signs were observed. Histopathological results indicated that there was no lesion of thyroid gland, spleen, pancreas, and ovary in all groups of animals (Table 4). In female rats receiving the extract at the dose of 6 mg/kg, the incidence of proteinaceous casts in the tubules of the kidney was significantly higher than in the control. However, this change was not dose-dependent. Similarly, there were some lesions detected microscopically in the brain, lung, heart, liver, GI tract and testis on some groups of animals; however, none of these hispathological findings was dose-dependent.

DISCUSSION

In this chronic toxicity study, 50% ethanolic extract of *D. scandens* was given to Wistar rats at the doses of 6, 60 and 600 mg/kg for 6 months. This type of extract was chosen because it should contain most groups of chemicals present in the stem of *D.scandens* that people consume. The doses selected were about 1, 10 and 100 fold the therapeutic dose of *D. scandens*, respectively.

The extract at the doses given did not affect the body weight gain of the animals throughout the study, nor decrease food consumption of the animals even at the highest dose of 600 mg/kg. In contrast, both male and female animals treated with the extract ate more than their controls did during certain periods of the study.

Hematological study indicated that the extract did not affect the numbers of white blood cells, %neutrophil, %lymphocyte, %monocyte, hemoglobin or hematocrit of either male or female animals. In addition, his-

topathological study did not show any lesion of the spleens in any group of the animals. However, %eosinophil of all extract-treated female rats, and %basophil of animals receiving 600 mg/kg extract and female rats receiving 60 mg/kg extract were significantly lower than those of the control. Since these two types of polymorphonuclear leukocytes are supposed to be undetectable or present only a very small percentage in blood (Gad, 1992), the lower numbers of these cells in extract -treated group as compared to their controls should not be harmful to the animals. In all extract- treated male rats, the numbers of platelets were significantly higher than in the control but these changes were within normal range (Smith, 1995).

With regard to the effects of the extract on blood chemistry, it was found that all groups of male rats treated with the extract had significantly lower AST levels than their control; however, this change occurred only in male rats and not in female rats. Furthermore, no histopathological change indicative of hepatotoxic effect of the extract was observed.

The significantly higher levels of cholesterol and potassium in certain groups of male rats were not dose-dependent changes and occurred only in male rats. Hence, these changes should not be due to the effect of the extract. A significantly lower creatinine level and a higher glucose level were found only in female rats treated 600 mg/kg extract; these changes were however still with in normal limits (Gad, 1992).

Histopathological findings of some lesions in the brain, lung, heart, liver, kidney, GI tract and testis in certain groups of animals as shown in Table 4 were not dose-dependent; hence, these lesions were not suggestive of toxicity of the extract to any particular organs

CONCLUSION

Six-month chronic toxicity study of 50% ethanolic extract of *Derris scandens* in Wistar rats indicated that the extract at the doses of 6, 60 and 600 mg/kg BW/day, which were equivalent to the dried stem 0.03, 0.3 and 3.00 g/kg BW, or 1,10 and 100 fold the therapeutic dose , did not produce any significantly dose-related changes of hematological parameters, serum chemistry, or histhology of any internal organs. Therefore, it is concluded that 50% ethanolic extract of *D. scandens* at the doses given did not produce any toxic effect in rats.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Roongroje Thanawongnuwech, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for hostopathological examinations of tissue samlples. Thanks are also due to Miss

Supaporn Pittiporn, pharmacist of Chao Praya Apaipubate Hospital, Prachin Buri province, who identified and supplied dried stem of *D. scandens*, and the staff of the Animal Facility of the Department of Medical Sciences for the animal care.

REFERENCES

Anonymous, 1967. Pramuan Sapakun Ya Thai, Part 2. Society of the school of Thai Traditional Medicine, Wat Prachetupon (Wat Poh), Bangkok, pp. 137-138.

Chuthaputti, A. and Chavalittumrong, P. 1998. Immunomodulating Activity of *Derris scandens* Benth. Thai J. Pharm. Sci. 22 (4) : 137-148.

Falshaw, C.P., Harmer, R.A., Ollis, W.D., Wheeler, R.E., Lalitha, V.R., and Rao, N.V.Subba. 1969. Natural occurrence of 3-aryl-4-hydroxycoumarins. II. Phytochemical examination of *Derris scandens*. J. Chem. Soc. (3) : 374-382.

Gad, S.C. 1992. The Rat : Pathology. In Animal Models in Toxicology (Eds. S.C. Gad and C.P. Chengellis), Marcel Dekker, New York, p. 81.

Muanwongyathi, P. and Supatwanich P. 1981. Pharmacognostic study of *Derris scandens* Benth. Mahidol Univ. J. Pharm. Sci. 8 (3) :57-64.

Pelter, A. and Stainton, P. 1966. Extractives from *Derris scandens*. II. Isolation of osajin and two new isoflavones, scandenone and scandinone. J. Chem. Soc., C, Org. (7) : 701-704.

Pongboonrod, S. 1950. Mai Thed, Muang Thai, p. 299. (in Thai)

Rao, M.N., Krupadanam. G.L.D., and Srimannarayana. G. 1994. Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. Phytochemistry 37 (1) : 267-269.

Rao, N.V. Subba and Seshadri, T.R. 1946. Chemical examination of plant insecticides. II. Chemical components of *Derris scandens*. Proc. Indian. Sci. 24 A : 365-374.

Smith, J.E. 1995. Comparative hematology. In Williams Hematology 5th Edition (Eds. E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller and T.J. Kipps) McGraw Hill, New York : 77-85.

Tiangburanatham, W. 1996. Dictionary of Thai Medicinal Plants. Prachumtong Printing, Bangkok, pp. 349-350. (in Thai)

Wang, B.H., Ternai, B. and Polya, G. 1997, Specific inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by warangalone and robustic acid. Phytochemistry 44 (5) : 787-796.

พิษกึ่งเรื้อรังของแบคทีเรียก่อโรคในแมลง แบซิลลัส สเฟียริคัส เอช-5 สายพันธุ์อยุธยา

Subchronic Toxicity Study of Entomopathogenic Bacteria, *Bacillus sphaericus* H-5, Ayutthaya Strain

ปราณี ชวลิตธำรง, ทรงพล ชีวะพัฒน์**
สดุดี รัตนจรัสโรจน์, สมเกียรติ ปัญญามัง**
*เสาวนา เชวนาดิศัย***
*สถาบันวิจัยสมุนไพร
**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของแบคทีเรียแบซิลลัส สเฟียริคัส (*Bacillus sphaericus* H-5) สายพันธุ์อยุธยา ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้สำหรับควบคุมลูกน้ำยุงรำคาญในหนูขาวสายพันธุ์วิสตาร์ 4 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว ต่อเพศเป็นเวลานาน 3 เดือน โดยกรอกผงแบคทีเรีย 3 ขนาด คือ 0.0004, 0.04 และ 4 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (มก./กก.) หรือเทียบเท่า 2.13×10^4, 2.13×10^6 และ 2.13×10^8 สปอร์/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ให้แก่หนูทดลอง 3 กลุ่ม ส่วนหนูกลุ่มควบคุมได้รับน้ำขนาด 1 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาที่ตรวจพบไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของแบคทีเรียที่ให้ การเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญทางสถิติของค่าทางชีวเคมีของเลือดบางค่าก็ยังอยู่ในช่วงของค่าปกติ ส่วนผลทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียกับกลุ่มควบคุม จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *B. sphaericus* H-5 สายพันธุ์อยุธยาทั้งสามขนาดไม่ทำให้เกิดพิษในหนูขาว

ABSTRACT

Subchronic toxicity study of entomopathogenic *Bacillus sphaericus* H-5, Ayutthaya strain against *Culex quinquefasciatus* larvae was performed in four groups of 12 Wistar rats of each sex for three months. Powder preparation of the bacteria at the doses of 0.0004, 0.04 and 4 mg/kg equivalent to 2.13×10^4, 2.13×10^6 and 2.13×10^8 spores/kg/BW/day, respectively,

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 41 ฉบับที่ 3 พ.ศ. 2542 หน้า 305-313.

were given to three treatment groups, while water control group received 1 ml of water/kg/BW/day. There were no significant dose-related hematological changes, while some significant differences in blood chemistry were observed but they were still in normal range. Histopathological examinations of internal organs did not show any significant changes between bacteria-treated groups and control group. This study showed no toxic effect of *B. sphaericus* H-5 Ayutthaya strain at all three doses tested in rats.

Key words : *Bacillus sphaericus* , toxicity

INTRODUCTION

Certain species of mosquitoes in Thailand play an important role as vectors carrying communicable diseases which still remain public health problem nowadays (Division of Epideminology, weekly reported). To cut the transamision cycle, a number of control measures have been integrated in the vector control program. Since the adverse effects of insecticides as well as the contamination of insecticides to the environment are major public concern, other safe means have been selected and introduced to the vector control program. Biological control agents including predators, parasites and entomopathogenic bacteria have been studied to serve the above purpose (Chowanadisai, 1983; Yap, 1985.)

Among the insect pathogens, larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis was no doubt effective to adinine mosquito larvae (Goldberg and Margalit, 1977; Araujo-Coutinho and Lacey, 1990; Atwood et al., 1992), while culicine and anopheline larvae was completely susceptible to *Bacillus sphaericus* (Tsuchiyama, 1980; Lee, 1988; Orduz-Peralta et al, 1992).

Attempts to search for local strain of *B. sphaericus have* been mobilized by Thai investigators. Benjaphong et al (1987) reported the discovery of *B. sphaericus* from dead larvae while Chowanadisai et al (1995) were successful in isolation of effective *B. sphaericus* H-5 from mud sample from Ayutthaya province. Since entomopathogenic bacteria supposed to be used in the vector control program must not produce any harmful effect to human or the environment, the present study was therefore conducted to investigate whether the mentioned strain *B. sphaericus* would produce any toxic effect to experimental animals. The information obtained from this study will be useful and necessary for further development of bacterial larvicide from this bacterial strain.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of bacteria : *Bacillus sphaericus* H-5 Ayutthaya strain (Chowanadisai et al, 1995) was transferred into a test tube containing 2 ml of trypticase soy broth and incubated at 37°C for 3 hours. A loopful of bacterial suspension was then transferred into a flask containing 30 ml of nutrient broth (NB). The inoculum was shaken on an orbital shaker operated at 200 rpm for 18 hours. Turbidity of inoculum was determined and adjusted at 1, one ml of inocolum was later filled in a flask containing 100 ml of BCMSP and shaken on an incubator operated at 200 rpm, 32°C. After 42 hours of cultivation, the number of cells and spore-producing cells were counted by using dilution plate count method. The bacterial cells were harvested by pelleting the cells with refrigerated low speed centrifuge operated at 3,000 rpm and washed twice with sterile water. The cells were then freeze-dried in a lyophilizer, ground with tissue homogenizer and kept in vacuumed vaccine vials and stored in a refrigerator until the tine of the assay. A powder preparation of *Bacillus sphaericus* H-5 containong 5.33×10^7 spores/mg powder was prepared in adequate amount for all the experiments.

Treatment of the Animals : For subchronic toxicity study, 48 male rats weighing 230±20 g and 48 female rats weighing 200±20 g (The National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Thailand) were used. The animals were housed in the animal facility of the NIH and the animal room was kept at 25±1°C with 60% relative humidity. The animals were allowed to have food and clean water ad lib.

Subchronic Toxicity Study : Fourty-eight Wistar rats of each sex were randomly divided into 4 groups of 12 animals per sex. Group 1 (water control) received water 1 ml/kg BW/day and Groups 2-4 were given bacteria at the doses of 0.0004, 0.04 and 4 mg/kg, which equivalent to spores of *Bacillus sphaericus* 2.13×10^4, 2.13×10^6 and 2.13×10^8 spores/kg BW/day, respectively. Body weight and food intake were measured weekly and the animals were observed for signs of abnormalities throughout the study. At the end of 90-day treatment period, the animals were fasted for 18 hours, then anestheized with ether and sacrificed by drawing blood samples form the inferior vena cava for hematological and biochemical examinations. Hematological parameters, namely white blood cell (WBC), neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, baseophil, red blood cell (RBC), hemoglobin, hematocrits, mean cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), platelet, mean platelet volume (MPV), plateletcrit (PCT) and platelet distribution width (PDW) were determined by an automatic hematological analyser (Cell Dyne 3500,

Abbott). Blood chemistry of serum samples were assayed by an automatic chemistry analyser (Hitachi model 912) and the parameters measured were alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), creatinine, blood urea nitrogen (BUN), cholesterol, triglyceride, glucose, uric acid, total protein, albumin, total biririubin, sodium and potassium.

The positions, shapes, sizes, and colors of internal organs; i.e. brain, heart, both kidneys and lungs, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intestine, spleen, bladder and testis in male rats or ovary and uterus in female rats were visually observed for any signs of gross lesions. These organs were then collected, weighed to determine relative organ weights, and preserved in 10% buffered formalin solution. Tissue slides of brain, heart, both kidneys, lungs, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intestine, spleen, bladder, and testis in male rats or ovary and uterus in female rats were prepared and stained with hematoxylin and eosin and histopathological examinations were performed by a medical pathologist.

Statistical Analysis : The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test, using SPSS/PC program, to determine significant differences between groups at $p<0.05$. Histopathological data were evaluated by the Fisher Extract test and the significance level was also set at $p<0.05$.

RESULTS

Effect of The Bacteria on Body Weight, Food Intake, and Relative Organ Weight : In Female rats, there was no difference in the average of body weights between control and treatment groups during 90 days of the study, whereas body weight of male animals receiving 0.04 mg/kg of the bacteria was significantly lower than that of the control group from the 2^{nd} to the 4^{th} week of treatment (Fig. 1.)

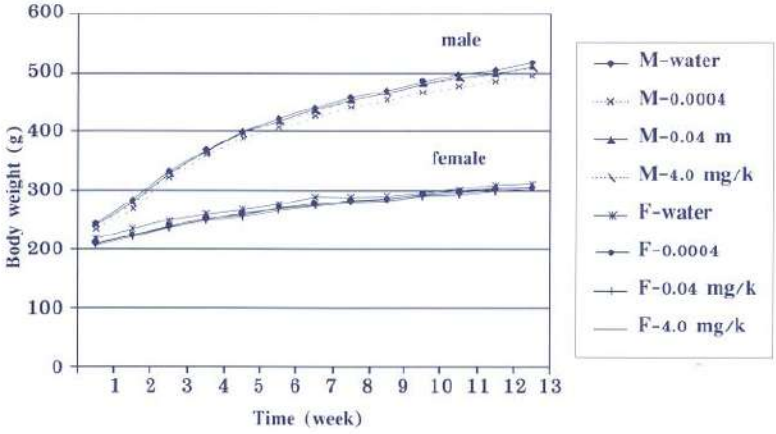


Figure 1 Growth curve of male and female rats treated with *Bacillus sphaericus* H-5, Ayutthaya strain.

In male and female rats, the difference in food comsumption had been observed since the first week of the experiment and many weeks thereafter (Fig. 2.); however, final body weights of the groups receiving

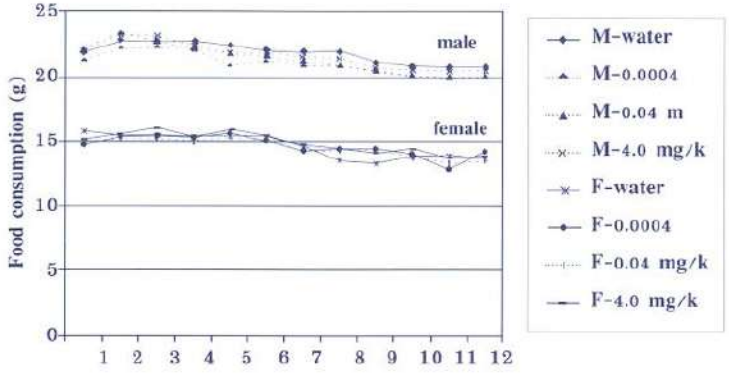


Figure 2 food consumption of male and female rats treated with *Bacillus sphaericus* H-5, Ayutthaya strain.

bacteria were not significantly different from that of the water control group, Relative organs weights of male and female rats treated with bacteria were not significantly different from those of the water control groups, except for female rats receiving 0.04 and 4 mg/kg of bacteria whose relative weights of the hearts were lower than water control group (Table 1).

Table 1 Relative organ weight# (g/kg BW)

	Group of male animals				Group of female animals			
	Control	low	medium	high	Control	low	medium	high
	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12
Brain	4.07±0.17	4.15±0.30	4.04±0.23	3.96±0.19	6.11±0.34	6.27±0.28	6.38±0.63	6.26±0.40
Heart	3.11±0.18	3.08±0.16	3.10±0.25	3.10±0.19	3.59±0.28	3.51±0.29	3.34±0.19*	3.32±0.28*
Right kidney	3.31±0.15	3.31±0.21	3.25±0.21	3.24±0.24	2.95±0.18	2.97±0.15	2.86±0.24	2.95±0.18
Left kidney	3.31±0.11	3.26±0.18	3.22±0.23	3.26±0.28	2.88±0.11	2.90±0.19	2.79±0.16	2.92±0.14
Urinary bladder	0.31±0.05	0.31±0.06	0.31±0.06	0.32±0.08	0.33±0.05	0.35±0.04	0.36±0.06	0.31±0.05
Liver	28.29±1.92	28.30±1.61	29.03±1.83	28.23±1.61	23.31±1.41	23.67±0.86	22.69±1.73	22.42±0.95
Spleen	1.82±0.21	1.72±0.12	1.70±0.16	1.73±0.16	2.22±0.21	2.20±0.29	2.16±0.19	2.04±0.15
Stomach	4.19±0.68	4.15±0.32	3.99±0.29	4.20±0.46	5.24±0.63	5.26±0.42	5.31±0.49	5.11±0.43
Lung	3.65±0.27	3.39±0.36	3.44±0.29	3.43±0.33	4.82±0.65	4.49±0.22	4.59±0.40	4.46±0.32
Right testis	6.15±0.45	6.12±0.74	6.39±0.55	5.77±1.01				
Left testis	6.01±0.46	5.95±1.07	6.24±0.40	5.73±1.05				

Relative organ weight = organ weight (g)/body weight (kg)
Each value represents mean ± SD.
*Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

Effect of The Bacteria on Hematological Parameters : There were no differences in most of hematological parameters between control and bacteria-treated groups in both sexes. However, female rats receiving 4 mg/kg of the bacteria had lower% basophil but higher MCHC than those of the water control group (Table 2).

Table 2 Hematological examination results

	Group of male animals				Group of female animals			
	Control	low	medium	high	Control	low	medium	high
	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12
White blood cells (K/ul)	6.72±1.31	5.96±1.24	5.81±1.13	5.96±1.33	4.00±0.61	3.45±0.66	3.47±0.64	3.68±0.64
Neutrophil (%)	14.84±7.53	13.11±5.69	13.25±5.30	13.87±4.76	12.86±7.08	14.07±5.47	14.29±7.82	17.84±7.59
Lymphocyte (%)	69.94±12.85	73.25±10.29	73.81±9.51	73.83±7.32	70.40±7.08	66.63±7.11	67.89±8.61	67.65±7.61
Monocyte (%)	10.25±4.75	8.83±3.36	8.57±4.88	8.62±2.99	10.84±3.86	12.69±4.24	11.60±2.88	9.87±1.37
Eosinophil (%)	1.23±0.46	1.26±0.33	1.26±0.40	1.41±0.73	1.41±0.33	1.65±0.45	1.54±0.51	1.57±0.43
Basophil (%)	3.77±2.52	3.56±2.75	3.12±2.34	2.26±1.47	4.48±1.63	4.98±1.44	4.67±1.99	3.09±0.85*
RBC ($x10^6$/uL)	9.54±0.36	9.65±0.48	9.62±0.38	9.48±0.53	8.84±0.45	8.71±0.45	8.95±0.40	8.64±0.42
Hemoglobin (g/dL)	15.39±0.48	15.49±0.40	15.41±0.47	15.09±0.53	15.15±0.68	15.09±0.53	15.47±0.64	14.96±0.55
Hematocrit (%)	50.90±2.22	51.01±1.97	50.80±1.68	50.04±2.26	50.80±2.04	49.71±2.09	51.60±2.28	48.77±2.80
MCV (fl/red cell)	53.38±1.62	53.53±1.24	52.84±1.00	52.83±1.27	57.54±1.86	57.17±1.64	57.70±1.69	56.44±1.16
MCH (pg/red cell)	16.15±0.48	16.09±0.70	16.03±0.53	15.95±0.56	17.18±0.62	17.35±0.60	17.29±0.51	17.36±0.41
MCHC (g/dl RBC)	30.28±0.96	30.05±0.78	30.35±0.65	30.20±0.95	29.85±0.50	30.38±0.96	29.96±0.77	30.80±1.05*
RDW (%CV)	16.05±1.11	15.86±0.74	16.47±0.67	16.08±0.79	14.76±0.81	15.14±0.99	14.78±0.72	15.15±1.30
Platelet (K/uL)	1049±81	1008±109	1072±89	1091±106	934±185	984±97	1011±99	946±105
MPV (fl/platelet)	9.13±0.69	9.14±0.43	9.23±0.66	9.30±0.66	9.63±0.73	9.42±0.61	9.21±0.46	9.58±1.03
Plateletcrit (%)	0.96±0.10	0.92±0.12	0.99±0.08	10.2±0.13	0.94±0.11	0.92±0.09	0.93±0.10	0.89±0.40
PDW (%CV)	18.24±0.45	18.46±0.43	18.44±0.52	18.32±0.75	18.22±0.61	18.16±0.39	18.18±0.32	18.29±0.86

Each value represents mean ± SD.
*Significantly different from water control group ($p<0.05$).

Effect of The Bacteria on Blood Chemistry : Male and female rats receiving bacteria at the concentration of 4 mg/kg had AST lower than that of water control group, while male rats receiving 0.04 mg/kg of the bacteria had ALP higher than that of water control group. Female rats receiving 4 mg/kg of the bacteria had total protein and glucose higher than that of water control group. Potassium levels of male rats receiving the bacteria at the concentrations of 0.04 and 4 mg/kg were significantly lower than that of water control. There were no differences in ALT, bolirubin, creatinine, BUN, cholesterol, triglyceride, albumin, uric acid, or sodium between all bacteria-treated groups and water control groups (Table 3).

Table 3 Blood chemistry results

	Group of male animals				Group of female animals			
	Control	low	medium	high	Control	low	medium	high
	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12	N=12
AST (U/l)	96.00±15.46	87.67±7.91	87.92±9.55	82.58±8.33*	92.75±10.20	85.92±8.26	84.42±9.08	76.50±12.20*
ALT (U/L)	53.67±8.29	52.67±9.89	53.17±9.15	53.92±4.91	39.83±5.73	36.58±4.94	35.50±5.98	36.83±7.03
ALP (U/L)	70.25±7.16	74.58±10.91	78.75±8.79*	74.33±6.64	45.58±9.68	43.17±5.03	43.17±7.87	44.42±9.60
Bilirubin (mg/dl)	0.09±0.02	0.09±0.03	0.08±0.03	0.10±0.02	0.14±0.03	0.15±0.03	0.15±0.05	0.14±0.03
Creatinine (mg/dl)	0.58±0.03	0.61±0.05	0.59±0.04	0.58±0.06	0.67±0.04	0.68±0.05	0.65±0.06	0.66±0.04
BUN (mg/dl)	21.42±2.68	23.00±3.62	21.67±2.87	22.42±1.73	19.33±1.15	19.42±1.88	20.25±2.14	19.83±2.29
Cholesterol (mg/dl)	86.08±4.94	84.83±9.05	87.83±12.83	88.25±9.64	87.58±14.69	91.08±16.41	84.08±9.18	81.08±9.64
Triglyceride (mg/dl)	87.83±23.57	83.67±27.75	96.67±33.69	85.25±21.62	73.67±17.55	72.83±18.38	80.67±21.66	77.00±24.02
Total protein (g/dl)	6.96±0.27	7.00±0.27	6.94±0.28	7.02±0.32	7.11±0.32	7.29±0.26	7.03±0.23	7.45±0.31*
Albumin (g/dl)	3.19±0.10	3.20±0.11	3.24±0.11	3.23±0.11	3.58±0.15	3.69±0.14	3.67±0.12	3.72±0.13
Uric acid (mg/dl)	1.00±0.37	1.21±0.66	0.99±0.41	1.08±0.56	1.18±0.37	1.28±0.55	1.08±0.38	1.04±0.33
Glucose (mg/dl)	136.58±19.10	136.33±18.47	142.17±14.70	146.75±22.65	114.17±14.90	127.00±20.33	109.92±15.57	131.67±13.43*
Sodium (mmol/l)	146.00±0.95	145.58±1.00	145.58±1.38	145.67±0.49	145.00±0.95	144.67±0.89	145.17±0.72	144.67±1.50
Potassium (mmol/l)	5.38±0.83	5.50±0.91	5.31±0.89*	5.29±0.52*	5.46±0.55	4.04±0.67	5.19±0.74	5.10±0.66

Each value represents mean ± SD.
*Significantly different from water control group ($p<0.05$).

Effect of The Bacteria on Histopathology of Internal Organs : No abnormal signs of internal organs were observed by gross examinations. Histopatological examinations of brain, lung, thyroid gland, parathyroid gland, trachea, esophagus, liver, heart, spleen, pancreas, kidney, stomach, intestine, bladder, including testis and prostate gland in male rats or vagina, cervix, uterus and ovary in female rats were shown in Table 4. The pathological changes observed in some tissue samples of the liver, heart, kidney and testis did not show any dose-response relationship.

Table 4 Histopathological examination results.

Organ	Lesion	Group of male animals				Group of female animals			
		water	low	medium	high	water	low	medium	high
Brain		N	N	N	N	N	N	N	N
Pancreas		N	N	N	N	N	N	N	N
Trachea		N	N	N	N	N	N	N	N
Esophagus		N	N	N	N	N	N	N	N
Stomach		N	N	N	N	N	N	N	N
Intestine		N	N	N	N	N	N	N	N
Spleen		N	N	N	N	N	N	N	N
Lung		N	N	N	N	N	N	N	N
Liver	Fatty change	0/12	0/12	0/12	0/12	3/12	2/12	0/12	0/12
Heart	Focal myocarditis	0/12	1/12	2/12	2/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Kidney	Nephrocalcinosis	0/12	1/12	0/12	0/12	3/12	5/12	3/12	5/12
	Hydrocalyx	0/12	0/12	0/12	3/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Uterus, ovary					N	N	N	N	
Testis	Atrophy	0/12	1/12	0/12	1/12				

Each value represents number of rats with pathological abnormalities/total number of rats examined.

* Significantly different from water control group ($p<0.05$)

N = Non-remarkable

DISCUSSION

There were no differences in average body weights between groups of bacteria-treated and control animals throughout the duration of study. Relative organ weights of male and female rats treated with bacteria were not significantly different from that of the water control group, except for female rats receiving 0.04 and 4 mg/kg bacteria whose relative weights of the hearts were lower than that of water control group.

Hematological study indicated that the bacteria did not affect WBC, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil, RBC, hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH, MCHC, RDW, platelet, MPV, PCT or PDW of all bacteria-treated rats. In female rats receiving 4 mg/kg of bacteria, even though MCHC was significantly higher than water control but it was still within normal range (Shayne, 1992.)

Both male and female rats receiving 4 mg/kg bacteria had significantly lower AST level than the control group. In addition, male rats receiving 0.04 mg/kg bacteria had significantly lower ALP level than that of control group but it did not show a dose-response relationship. Total protein, glucose and potassium levels of female rats receiving 4 mg/

kg bacteria were significantly higher than those of the control group but these changes were still within normal range (Shayne, 1992.)

Histopathological examination of the liver showed incidence of fatty change in some groups of female rats but was not significantly different from that of the control group. Similarly, the incidence of focal myocarditis and testicular atrophy found in some groups of male rats was not significantly different from that of the control group. Likewise, the incidence of nephrocalcinosis an hydrocalyx of the kidneys found in some groups of rats was not significantly different from that of the control group. Taken together, the results showed that Wistar rats treated orally with *B. sphaericus* H-5, Ayutthaya strain at the three concentrations tested did not show any sign of toxicity that could be due to toxic effect of the bacteria.

CONCLUSION

A powder preparation of spore-forming *Bacillus sphaericus* H-5, Ayutthaya strain was tested for subtronic toxicity in Wistar rats at the concentrations of 0.0004, 0.04 and 4 mg/kg BW. The bacteria did not produce any significant changes in hematologic parameters. Some significant differences in blood chemistry between treatment and control groups were observed but these changes were within normal range. Histopathological examinations of internal organs of bacteria-treated groups were not significantly different from those of the control group. Our study showed no toxic effects from *B. sphaericus* H-5, Ayutthaya strain in rats receiving the bacterial preparation at the highest dose of 4 mg/kg BW or lower for 90 days.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Somnuek Jesdapatarakul for histopathological examinations of tissue samples and Dr. Anchalee Chuthaputti for her assistance in manuscript preparation. Thanks are also due to the staffs of the Laboratory Animal Section, National Institute of Health for the animals care.

REFERENCES

Araujo-Coutinho CJPC, Lacey LA. Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for control of black flies in the north littoral zone of Brazil Sao Paolo State. Entomol Abst 1990; 22 : 84

Atwood DW, Robinson JV, Meisch MV, Olson JK, Johnson DR. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against larvae of the southern buffalo gnat, *Cnephia pecuarum* (Diptera : Simuliidae), and the influence of water temperature. J Am Mosq Cont Assoc 1992; 8 : 126-30.

Benjaphong N, Chowanadisai L, Boonya-

buncha S, Phanthumchinda P. A collection, isolation and efficacy test of local pathogenic bacilli against mosquito larvae. Bull Dept Med Sci 1987; 29 : 1-11.

Chowanadisai L, Chinapongpaisaln N, Phanthumachinda B. A. study on life cycle of water scorpion ; *Ranatra varipes*, the natural enemy of mosquito larvae. Bull Dept Med Sci 1983 ; 25 : 229-36. (in Thai)

Chowanadisai L, Krairiksh S and Thanasripukdikul S. Toxicity of *Bacillus sphaericus* 2362 against *Culex quinquefas- ciatus*, Mosq Borne Dis Bull 1989 ; 6 : 96-100.

Chowanadisai L, Thanasripukdikul S, Wongwanich S, et al. The isolated entomopathologic bacteria from Ayutthaya province, Thailand possessing toxicity against mosquito larvae. Bull Dept Med Sci 1995; 37 :187-95.

Goldberg LJ, Margalit L. A. bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity *against Anopeles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univittatus, Aedes aegypti and Cx. Pipiens.* Mosq News 1977; 37 : 355-58.

Lee HL. Isolation and evaluation of two isolates of *Bacillus sphaericus* for the control of mosquitoes of public health importances in Malaysia. Mosq Borne Dis Bull 1988; 5 : 39 - 47.

Orduz-Peralta S, Diaz T, Restrepo N, Et al. Isolation and characterization of four new strains of *Bacillus sphaericus* from Central Nigeria highly toxic to mosquito larvae. J Inverte pathol 1992 ; 60 : 107-8.

Shayne CG. The Rat. In : Shayne CG and Chengelis CP eds, Animal Models in Toxicology. New York : Marcel Dekker, Inc., 1992 : 80-81.

Tsuchiyama A. Pathogenicity of *Bacillus sphaericus* to larvae of *Culex pipiens*. J Appl Entomol Zool 1980; 24 : 93-7.

Yap HH. Biological control of mosquitoes, especially malaria vector, *Anopheles* species. Southeast Asian J Trop Med Pub Health 1985 ; 16 : 163-72.

การศึกษาพิษระยะยาวของเนเจอร์เพล็กในสัตว์ทดลอง

Repeated-dose Toxicity Study of Naturplex in Rats

ปราณี ชวลิตธำรง, ทรงพล ชีวะพัฒน์**
อัญชลี ลูฑะพุทธิ, สดุดี รัตนจรัสโรจน์**
สมเกียรติ ปัญญามัง, เรวดี บุตราภรณ์***

*สถาบันวิจัยสมุนไพร

**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ถนนติวานนท์ นนทบุรี 1100

บทคัดย่อ

จากการศึกษาพิษเรื้อรังของยาเนเจอร์เพล็ก ซึ่งเป็นตำรับยาสมุนไพร 5 ชนิดที่ผลิตโดยองค์การเภสัชกรรมสำหรับผู้ป่วยเอดส์ โดยกรอกยาแก่หนูขาวในขนาด 16, 160 และ 1600 มก/กก. ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 6 เดือน และกรอกยาแก่หนูขาวในขนาด 1600 มก./กก. ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 9 เดือน พบว่าหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับยาทุกกลุ่มมีน้ำหนักในวันสุดท้ายของการทดลองน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในค่าทางโลหิตวิทยา และค่าทางชีวเคมีของซีรั่มไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้อัตราการเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ของอวัยวะภายในที่ตรวจพบก็ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของยาที่ได้รับ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่ายาเนเจอร์เพล็กที่ให้ทางปากในขนาด 16, 160 และ 1600 มก./กก. ระยะเวลา 6 เดือน และยาเนเจอร์เพล็กที่ให้ทางปากในขนาด 1600 มก./กก. ระยะเวลา 9 เดือน ไม่ทำให้เกิดพิษในหนูขาว

ABSTRACT

Chronic toxicity of Naturplex, which is the extract of 5 medicinal plants manufactured by the Government Pharmaceutical Organization for AIDS patients, was conducted in Wistar rats to determine the safety of the product. The drug was given orally at the doses of 16, 160 and 1600 mg/kg BW/day for 6 month while the control group received 10 ml of water/kg BW/day. It was found the body weights, relative organ weights, hematological and serum

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 42 ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2543 หน้า 36-57.

biochemical parameters of all groups of male and female animals treated with Naturplex were not difference from those of the control. In addition, eventhough there were some hispathological lesions of internal organs detected in some groups of Naturplex-treated animals these changes were not dose-dependent or suggestive of drug toxicity. It was concluded that Naturplex given orally at the dose of 16, 160 and 1600 mg/kg BW for 6 months and Naturplex given orally at the doses of 1600 mg/kg BW for 9 months were not toxic to Wistar rats.

Key words : toxicity, Naturplex

บทนำ

เนเจอร์เพล็ก (Naturplex®) เป็นส่วนผสมของสารสกัดที่ได้จากการสกัดส่วนประกอบที่ได้จากพืช 5 ชนิดคือ กัดเค้า (*Randia siamnsis* Craib), สะแก (*Combretum quadrangulare* Kurz), พิกุล (*Mimusops elegi* Linn), พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) และตาล (*Borassus flabellifer* Linn.) เป็นยาที่องค์การที่เภสัชกรรมพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในผู้ป่วยเอดส์ สรรพคุณของสมุนไพรแต่ละชนิดประมวลได้ดังนี้

กัดเค้า (*Randia siamnsis* Craib) เป็นพืชวงศ์ Rubiaceae เป็นพรรณไม้เถาลักษณะลำต้นโต ใบจะเป็นสีเขียวสด (เที่ยงบูรณธรรม, 2539) ประโยชน์ทางยาตามสรรพคุณโบราณคือมีรสฝาดแก้เสมหะและโลหิต, แก้ไข้, ใบแก้โลหิตซ่าน, ดอกแก้โลหิตในกองกำเดา, ลูกขับโลหิตระดูสตรี, ต้นบำรุงโลหิต, รากแก้เลือดออกไรฟัน (พงษ์บุญรอด, 2493)

สะแก (*Combretum quadrangulare* Kurz) เป็นพืชวงศ์ Combretaceae เป็นพรรณไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สรรพคุณใช้ทั้งต้นเป็นยารักษาโรคตานขโมย ถ่ายพยาธิต่าง ๆ ลำต้นรักษาโรคหนองใน รักษาฝี เมล็ดใช้ขับพยาธิไส้เดือน (เที่ยงบูรณธรรม, 2539)

พิกุล (*Mimusops elegi* Linn), เป็นพืชวงศ์ Sapotacece เป็นพรรณไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ ดอกมีสรรพคุณเป็นยาบำรุงหัวใจ สารสกัดด้วยน้ำของดอกพิกุลมีฤทธิ์ขับปัสสาวะในหนูขาวได้ (ศรีนวลชัย และเดชะเสน 2517)

พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) เป็นพืชวงศ์ Saururaceae (สมิตินันท์, 2523) เป็นพรรณไม้ขนาดเล็ก ทั้งต้นมีรสเย็นและฉุนใช้เป็นยาแก้โรคบิด โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ (เที่ยงบูรณธรรม, 2539)

ตาล (*Borassus flabellifer* Linn.) เป็นพืชวงศ์ Palmae (สมิตินันท์, 2523) งวงตาลมีสรรพคุณคือมีรสหวานเย็น แก้พิษตานทราง ขับพยาธิ (พงษ์บุญรอด, 2493)

ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาพิษเรื้อรังของเนเจอร์เพล็ก ในสัตว์ทดลอง เพื่อให้ทราบความปลอดภัยในระยะยาวของผลิตภัณฑ์นี้และเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคอีกทางหนึ่ง

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 168 ตัว เพศเมีย 84 ตัว น้ำหนัก 140±15 กรัม เพศผู้ 84 ตัว น้ำหนัก 160±15 กรัม เลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60%

ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด และน้ำประปาที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

การเตรียมสารสกัดเนเจอร์เพล็กสำหรับสัตว์ทดลอง

นำผงยาเนเจอร์เพล็ก ซึ่งเตรียมจากสถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม มาทำเป็นยาแขวนตะกอนและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้สำหรับกรอกแก่สัตว์ทดลอง

การทดสอบพิษเรื้อรัง 6 เดือน

แบ่งหนูขาวโดยวิธีสุ่มออกเป็นกลุ่ม 4 กลุ่ม ๆ ละ 30 ตัว (เพศละ 15 ตัว) ประกอบด้วย กลุ่มควบคุมกรอกน้ำกลั่นปริมาณ 10.0 มล./กก./วัน ลำดับ และกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มกรอกยาเนเจอร์เพล็กแขวนตะกอนในน้ำ 16, 160 และ 1600 มก./กก./วัน ตามลำดับ ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือน กลุ่มทดลองกลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่ม "Recovery" ประกอบด้วยหนูเพศละ 12 ตัว กรอกยาเนเจอร์เพล็กแขวนตะกอนในน้ำขนาด 1600 มก./กก./วัน ทุกวันติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน 6 เดือนเช่นกัน หลังจากนั้นหยุดการให้สารสกัดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อน sacrifice เพื่อศึกษาว่าหากยาทำให้เกิดความผิดปกติแก่สัตว์ทดลอง ความผิดปกติเหล่านั้นจะหายไปหรือไม่หลังจากหยุดยา 2 สัปดาห์

การทดสอบพิษเรื้อรัง 9 เดือน

แบ่งหนูขาวโดยวิธีสุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 24 ตัว (เพศละ 12 ตัว) ประกอบด้วยกลุ่มควบคุมกรอกน้ำกลั่นปริมาณ 10.0 มล./กก./วัน และกลุ่มทดลองกรอกยาเนเจอร์เพล็กแขวนตะกอนในน้ำ 1600 มก./กก./วัน ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 9 เดือน

ในระหว่างดำเนินการทดลอง บันทึกน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และสังเกตการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ดังนี้ ลักษณะของขน ผิวหนัง ตา ขมูก รูทวาร สีของเยื่อเมือก (mucous membrane) อุจจาระ การหายใจ การเดิน การทรงตัว และพฤติกรรม หากมีหนูตายระหว่างการทดลองนำมาผ่าชากชันสูตร

ก่อนครบกำหนดทดลอง 2 สัปดาห์ เก็บปัสสาวะของหนูมาตรวจหา glucose, bilirubin, ketone, specific gravity, blood, protein, urobilinogen และ leucocytes โดยใช้ reagent strips for urinalysis (Multistix™ 10SG, Bayer Diagnostics)

เมื่อสัตว์ทดลองได้รับยาครบกำหนด งดอาหารหนูขาวเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นดมสลบหนูด้วย อีเธอร์ก่อนทำการผ่าชาก เจาะเลือดจาก posterior vana cava เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยาได้แก่จำนวนเม็ดเลือดขาว (White blood cells, WBC), %neutrophil, %lymphocyte, %monocyte, %erythrocyte, %basophil, จำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cell, RBC), ปริมาณฮีโมโกลบิน (hemoglobin), เปอร์เซ็นเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), เกล็ดเลือด (platelets), Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Red Cell Distribution Width (RDW), Mean Platelet Volume (MPV), Plateletcrit (PCT), Platelet Distribution Width (PDW), %reticulocyte และ reticulocyte โดยใช้เครื่อง Automated Hematological Analyzer รุ่น Cell-Dyn 3500 (Abbott, U.S.A.)

การศึกษาทางชีวเคมีคลินิกของซีรั่ม ทำโดยการหาระดับของเอนไซม์ alkaline phospatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST),

alanine aminotransferase (ALT), bilirubin, total cholesterol, BUN, creatinine, glucose, total protein, albumin, sodium และ potassium โดยใช้เครื่อง Automated Blood Chemistry Analyzer รุ่น Hitachi 912

สำหรับการผ่าชากชันสูตร ได้ตรวจดูพยาธิวิการที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายใน ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด หลอดลม ต่อมธัยรอยด์ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน ลำไส้ ไต ม้าม กระเพาะปัสสาวะ รังไข่ มดลูก และอัณฑะ โดยพิจารณาจากตำแหน่ง รูปร่าง ขนาด สี ลักษณะผิว ลักษณะหน้าตัดและองค์ประกอบ (texture) ของอวัยวะ ชั่งน้ำหนักอวัยวะต่าง ๆ และเก็บอวัยวะใน 10% phosphate buffer formalin นำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์

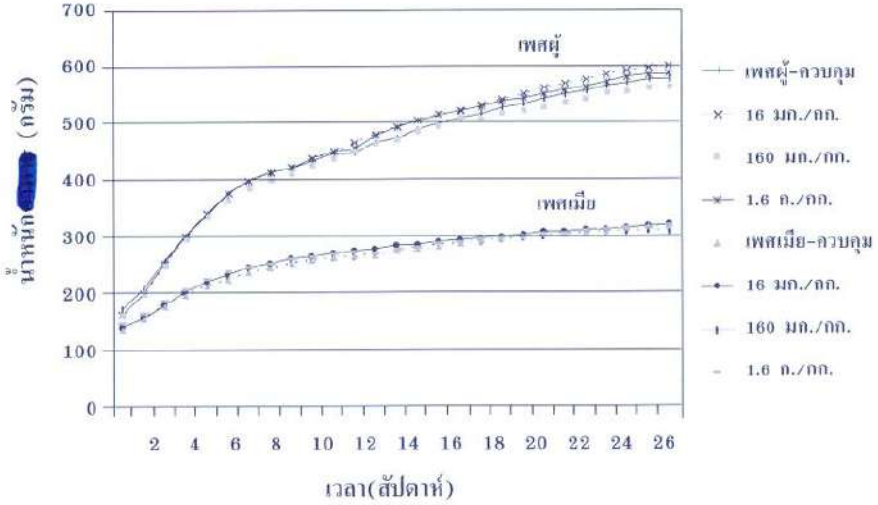
การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลในเชิงสถิติพรรณา การทดสอบสมมติฐานใช้ one- way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan Muliple Range Test ที่ $p<0.05$ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS/PC ผลทางจุลพยาธิวิทยาเปรียบเทียบผลกับกลุ่มควบคุมโดย Fisher exact test ที่ $p<0.05$

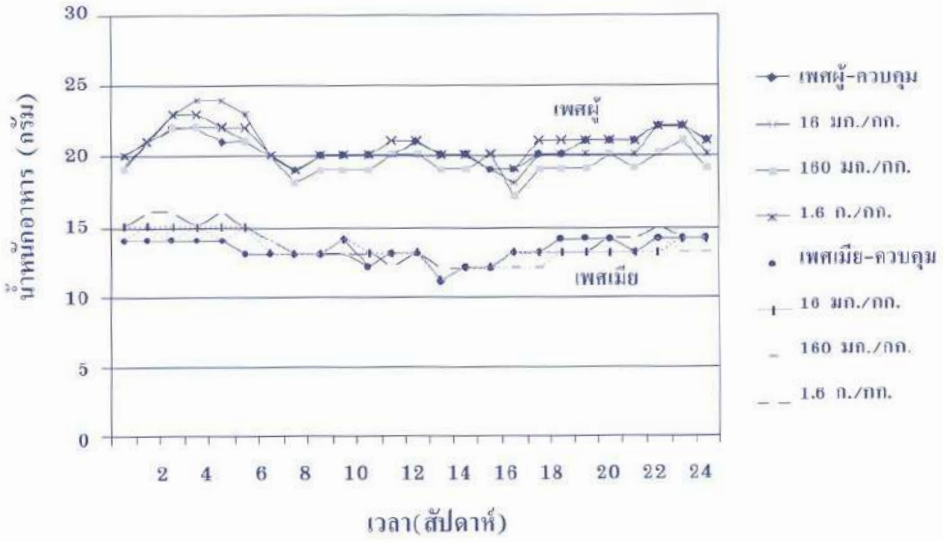
ผลการทดสอบพิษเรื้อรังนาน 6 เดือน

ผลต่อการเจริญเติบโตและการกินอาหาร

เมื่อป้อนสารสกัดแก่หนูขาวในขนาด 16, 160 และ 1600 มก./กก. เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่า แม้การกินอาหารของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาบางกลุ่มจะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมในบางสัปดาห์ แต่ไม่มีผลทำให้น้ำหนักตัวของหนูเพศผู้ที่ได้รับยาทุกกลุ่มและหนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด 16 และ 160 มก./กก. แตกต่างจากกลุ่มควบคุมตลอดการทดลอง ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด 1600 มก./กก. มีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มควบคุมใน 5 สัปดาห์แรกที่ได้รับยา แต่หลังจากนั้นน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มนี้ก็ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็กเป็นเวลา 6 เดือน



ภาพที่ 2 การกินอาหารของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับเนเจอร์เพล็กเป็นเวลา 6 เดือน

ตลอดการทดลองไม่พบความผิดปกติของลักษณะขน ผิวหนัง ตา ขมูก รูหวาร สีของเยื่อเมือก อุจจาระ การหายใจ การเดิน การทรงตัว และพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับยาทุกกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 1, 2)

ผลต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะสัตว์ทดลอง

น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะสัตว์ทดลองทั้งสองเพศที่ได้รับยา 16,160 และ 1600 มก./กก. เป็นเวลา 6 เดือนไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมยกเว้น หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด 160 มก./กก. ที่มีน้ำหนักของไตข้างซ้ายต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1, 2)

ผลการตรวจทางโลหิตวิทยา

จำนวนเม็ดเลือดขาว, %Neutrophil, %Lymphocyte, %Monocyte, %Basophil, จำนวนและเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดง, ปริมาณฮีโมโกลบิน, เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), เกล็ดเลือด, Mean Cell Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Red Cell Distribution Width (RDW), Mean Platelet Volume (MPV), Plateletcrit (PCT), Platelet Distribution Width (PDW), %Reticulocyte และ Reticulocyte ของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับยาทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นค่า RDW ของหนูกลุ่ม Recovery ทั้งสองเพศที่มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3, 4)

ตารางที่ 1 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ของหนูเพศผู้ที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 6 เดือน

	กลุ่มของสัตว์ทดลอง				
	กลุ่มควบคุม	16 มก./กก.	160 มก./กก.	1.6 ก./กก.	R-1.6 ก./กก.
	N = 15	N = 14	N = 13	N = 15	N = 10
สมอง	3.84±0.37	3.57±0.38	3.82±0.41	3.61±0.34	3.87±0.34
หัวใจ	2.45±0.22	2.37±0.20	2.34±0.20	2.42±0.26	2.43±0.20
ไตข้างขวา	2.37±0.20	2.23±0.23	2.23±0.22	2.32±0.19	2.36±0.16
ไตข้างซ้าย	2.24±0.13	2.10±0.23	2.09±0.19*	2.22±0.20	2.27±0.12
กระเพาะปัสสาวะ	0.274±0.086	0.262±0.044	0.288±0.068	0.280±0.059	0.302±0.042
ตับ	22.94±2.14	24.11±2.16	22.13±1.71	23.17±1.26	23.39±1.40
ม้าม	1.70±0.24	1.80±0.25	1.72±0.21	1.79±0.18	1.83±0.20
กระเพาะอาหาร	3.73±0.39	3.58±0.38	3.66±0.45	3.72±0.39	3.90±0.26
ปอด	3.09±0.38	2.98±0.29	3.06±0.36	3.00±0.36	3.17±0.27
อัณฑะข้างขวา	5.59±0.92	5.45±0.69	5.47±1.01	5.46±0.58	6.03±0.63
อัณฑะข้างซ้าย	5.62±1.03	5.29±0.66	5.20±0.74	5.68±0.63	5.81±0.57

น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ = น้ำหนักของอวัยวะ (กรัม) / น้ำหนักตัว (กิโลกรัม)

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

R = กลุ่ม Recovery

ตารางที่ 2 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (กรัม/ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ของหนูเพศเมียที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 6 เดือน

	กลุ่มของสัตว์ทดลอง				
	กลุ่มควบคุม	16 มก./กก.	160 มก./กก.	1.6 ก./กก.	R-1.6 ก./กก.
	N = 15	N = 15	N = 15	N = 14	N = 11
สมอง	6.00±0.83	6.14±0.87	6.31±0.60	6.24±0.67	6.14±0.64
หัวใจ	2.76±0.29	2.82±0.34	2.76±0.21	2.81±0.26	2.80±0.30
ไตข้างขวา	2.51±0.23	2.54±0.36	2.59±0.30	2.68±0.23	2.61±0.23
ไตข้างซ้าย	2.41±0.22	2.42±0.26	2.43±0.25	2.59±0.20	2.47±0.19
กระเพาะปัสสาวะ	0.277±0.078	0.281±0.044	0.277±0.084	0.270±0.060	0.290±0.043
ตับ	22.51±2.78	22.38±2.15	23.00±2.12	24.23±2.70	23.96±2.84
ม้าม	2.22±0.37	2.18±0.633	2.15±0.23	2.40±0.43	2.29±0.25
กระเพาะอาหาร	5.00±0.82	4.72±0.65	4.82±0.56	5.18±0.80	4.79±0.55
ปอด	4.13±0.52	4.02±0.53	3.98±0.45	4.30±0.60	4.07±0.45

น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ = น้ำหนักของอวัยวะ (กรัม) / น้ำหนักตัว (กิโลกรัม)
ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

R = กลุ่ม Recovery

ตารางที่ 3 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศผู้ที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 6 เดือน

	กลุ่มของสัตว์ทดลอง				
	กลุ่มควบคุม	16 มก./กก.	160 มก./กก.	1.6 ก./กก.	R-1.6 ก./กก.
	N = 15	N = 14	N = 13	N = 15	N = 10
WBC (K/uL)	39.7±0.80	4.14±1.06	3.79±1.07	3.85±1.18	3.99±0.90
%Neutrophil	17.94±4.54	17.96±5.82	19.52±5.97	17.39±4.82	17.38±4.75
%Lymphocyte	74.62±4.88	73.89±7.71	72.81±6.06	74.40±5.54	73.56±4.43
%Monocyte	3.75±2.21	4.07±2.88	3.77±2.48	4.45±2.66	4.63±2.45
%Basophil	2.42±1.51	2.83±1.46	2.64±1.21	2.42±1.25	2.88±0.79
%Eosinophil	1.28±0.56	1.26±0.62	1.26±0.68	1.35±0.89	1.53±0.35
RBC ($X10^6$/uL)	9.84±0.57	9.87±0.46	9.91±0.52	9.73±0.37	9.55±0.27
Hemoglobin(g/dL)	15.79±0.42	16.03±0.68	15.82±0.33	15.65±0.37	15.42±0.39
Hematocrit (%)	52.56±3.58	53.65±2.75	53.51±2.02	52.52±1.78	52.12±1.52
MCV (fL/red cell)	53.43±2.27	54.43±2.27	54.06±1.66	54.00±1.30	54.63±1.14
MCH (pg/red cell)	16.10±1.00	16.27±0.77	16.00±0.66	16.10±0.44	16.16±0.47
MCHC (g/dL RBC)	30.20±2.41	27.97±7.19	29.59±0.61	29.81±0.63	29.60±0.43
RDW,CV (%)	16.62±2.04	15.83±1.15	15.95±0.80	16.04±0.93	15.43±0.63*
Platelet (K/uL)	798±134	810±118	836±136	821±122	829±53
MPV (fL/red cell)	8.02±1.79	7.88±1.79	7.86±1.85*	8.21±1.91	8.83±0.51
Plateletcrit (K/uL)	0.64±0.19	0.65±0.21	0.67±0.22	0.69±0.23	0.73±0.07
PDW, CV (%)	18.36±0.59	18.46±0.51	18.46±0.75	18.59±0.54	18.51±0.73
%Reticulocyte	3.59±1.53	4.08±1.79	4.11±1.63	4.05±1.54	4.42±1.82
Reticulocyte (K/uL)	353±155	407±190	407±163	396±153	412±159

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

R = กลุ่ม Recovery

ตารางที่ 4 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศเมียที่ได้รับยาแนเจอร์เพล็ก นาน 6 เดือน

	กลุ่มของสัตว์ทดลอง				
	กลุ่มควบคุม	16 มก./กก.	160 มก./กก.	1.6 ก./กก.	R-1.6 ก./กก.
	N = 15	N = 15	N = 15	N = 14	N = 11
WBC (K/uL)	1.97±0.58	2.33±0.74	2.23±0.65	2.24±0.69	2.13±0.60
%Neutrophil	14.14±6.63	15.89±7.80	16.61±5.98	15.48±6.83	14.72±4.30
%Lymphocyte	77.17±6.92	75.27±8.60	74.83±7.76	76.19±8.23	76.20±4.55
%Monocyte	4.87±2.04	4.70±2.05	4.65±1.61	4.76±1.57	5.24±2.51
%Basophil	2.50±0.89	2.60±0.61	2.75±1.47	2.14±0.63	2.50±1.18
%Eosinophil	1.32±0.41	1.56±0.74	1.15±0.40	1.44±0.46	1.33±0.36
RBC ($X10^6$/uL)	9.02±0.43	8.99±0.53	8.84±0.43	8.65±0.46	8.80±0.37
Hemoglobin (g/dL)	15.51±0.48	15.66±0.52	15.34±0.65	15.26±0.50	15.40±0.44
Hematocrit (%)	51.90±1.91	52.01±2.19	51.46±2.23	50.79±1.96	51.40±1.32
MCV (fL/red cell)	57.59±1.73	57.94±1.95	58.23±1.90	58.75±1.76	58.45±1.61
MCH (pg/red cell)	17.24±0.90	17.46±0.62	17.37±0.71	17.66±0.74	17.50±0.59
MCHC (g/dL RBC)	29.95±1.34	30.15±0.91	29.84±0.94	30.10±1.07	29.96±0.67
RDW,CV (%)	14.28±0.96	14.29±1.05	13.74±0.58	13.80±1.02	13.44±0.85*
Platelet (K/uL)	798±93	801±75	808±68	782±77	779±51
MPV (fL/red cell)	8.92±0.99	9.14±0.90	9.13±0.71	9.13±0.93	8.97±0.57
Plateletcrit (K/uL)	0.71±0.11	0.73±0.06	0.74±0.06	0.71±0.06	0.70±0.07
PDW, CV (%)	18.45±0.66	18.42±0.51	18.49±0.55	18.59±0.47	18.53±0.52
%Reticulocyte	3.49±1.01	3.27±0.61	3.29±0.73	3.21±1.25	3.51±1.03
Reticulocyte (K/uL)	310±93	292±55	292±64	277±108	308±85

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

* ค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

R = กลุ่ม Recovery

ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมี

ในหนูทั้งสองเพศ ระดับเอนไซม์ AST, ALT, ALP, บิลิรูบิน, ครีอาตินิน, BUN, ระดับโคเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอร์ไรด์, โปรตีนรวม, อัลบูมิน, กรดยูริค, กลูโคส, โซเดียม และโปแตสเซี่ยมไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นหนูกลุ่ม Recovery เพศผู้ที่มีค่าบิลิรูบินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5, 6)

ตารางที่ 5 ค่าทางชีวเคมีของซีรั่มของหนูเพศผู้ที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 6 เดือน

	กลุ่มของสัตว์ทดลอง				
	กลุ่มควบคุม	16 มก./กก.	160 มก./กก.	1.6 ก./กก.	R-1.6 ก./กก.
	N = 15	N = 14	N = 13	N = 15	N = 10
AST (U/l)	77.93±17.73	89.36±45.51	79.38±20.23	74.87±15.76	73.30±14.16
ALT (U/l)	39.93±6.28	50.64±29.60	52.62±33.00	42.87±14.52	43.40±8.51
ALP (U/l)	71.20±11.53	77.71±13.66	65.85±8.41	71.80±10.27	69.60±8.80
Bilirubin (mg/dL)	0.09±0.03	0.08±0.03	0.08±0.03	0.07±0.03	0.04±0.02*
Creatinine (mg/dL)	0.65±0.05	0.65±0.05	0.67±0.05	0.64±0.04	0.65±0.08
BUN (mg/dL)	19.05±2.66	19.41±1.94	19.95±2.99	19.37±1.92	19.98±2.73
Cholesterol (mg/dL)	68.33±19.16	77.43±19.83	68.46±12.81	69.53±20.86	67.70±10.39
Ttriglyceride (mg/dL)	129±30	159±50	143±29	158±41	130±32
Total protein (g/dL)	6.89±0.27	7.00±0.30	6.93±0.23	7.07±0.23	6.99±0.28
Albumin (g/dL)	3.35±0.08	3.33±0.12	3.37±0.10	3.40±0.08	3.31±0.09
Uric acid (mg/dL)	0.93±0.86	0.83±0.96	1.12±0.80	0.93±0.71	1.02±0.46
Glucose(mg/dL)	149±29	157±24	150±21	149±14	163±10
Sodium (mmol/L)	146±2	147±2	147±2	146±2	146±1
Potassium (mmol/L)	5.13±0.89	4.64±0.49	5.03±1.38	5.23±1.06	5.11±0.61

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

* ค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

R = กลุ่ม Recovery

ตารางที่ 6 ค่าทางชีวเคมีซีรั่มของหนูเพศเมียที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 6 เดือน

	กลุ่มของสัตว์ทดลอง				
	กลุ่มควบคุม	16 มก./กก.	160 มก./กก.	1.6 ก./กก.	R-1.6 ก./กก.
	N = 15	N = 15	N = 15	N = 14	N = 11
AST (U/I)	80.27±40.07	67.13±13.72	73.60±16.84	67.93±14.09	70.45±12.93
ALT (U/I)	35.60±14.71	31.07±8.60	31.93±6.50	30.14±9.21	30.73±8.26
ALP (U/I)	28.00±9.06	29.93±7.36	28.20±6.44	28.29±5.85	25.18±5.06
Bilirubin (mg/dL)	0.08±0.03	0.09±0.03	0.08±0.03	0.07±0.03	0.08±0.03
Creatinine (mg/dL)	0.70±0.05	0.70±0.06	0.73±0.06	0.69±0.06	0.74±0.06
BUN (mg/dL)	19.87±2.97	20.35±3.11	20.28±2.28	21.62±3.38	21.23±2.03
Cholesterol (mg/dL)	72.07±15.39	73.73±17.94	78.53±17.51	77.29±15.32	77.18±14.98
Ttriglyceride (mg/dL)	129±43	125±41	115±28	134±74	124±32
Total protein (g/dL)	7.33±0.29	7.24±0.29	7.42±0.40	7.24±0.44	7.51±0.20
Albumin (g/dL)	3.75±0.21	3.72±0.18	3.81±0.23	3.70±0.20	3.87±0.15
Uric acid (mg/dL)	0.85±0.57	0.91±0.38	1.03±0.92	0.86±0.82	1.12±0.30
Glucose (mg/dL)	142±16	146±11	147±15	146±21	142±16
Sodium (mmol/L)	145±1	146±3	146±1	145±1	144±1
Potassium (mmol/L)	4.93±0.53	4.95±0.85	5.09±0.80	5.06±0.75	4.97±0.86

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

R = กลุ่ม Recovery

ผลการตรวจสอบของปัสสาวะ

ในหนูทั้งสองเพศตรวจไม่พบว่ามีกลูโคสหรือบิลิรูบินในปัสสาวะ นอกจากนั้น พบว่าหนูเพศผู้ที่ได้รับยา 160 มก./กก. มีความถ่วงจำเพาะของปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนหนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด 16 มก./กก. พบเลือดในปัสสาวะ ขณะที่หนูเพศผู้กลุ่มอื่นและหนูเพศเมียทุกกลุ่มตรวจไม่พบเลือดในปัสสาวะและหนูเพศเมียที่ได้รับยา 160 มก./กก. มีปริมาตรปัสสาวะสูงกว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 7, 8)

ตารางที่ 7 ผลการตรวจปัสสาวะของหนูเพศผู้ที่ได้รับยาแนเจอร์เพล็ก นาน 6 เดือน

	กลุ่มของสัตว์ทดลอง			
	กลุ่มควบคุม N = 15	16 มก./กก. N = 14	160 มก./กก. N = 13	1.6 ก./กก. N = 15
Glucose (mmol/l)	0	0	0	0
Bilirubin (mmol/l)	0	0	0	0
Ketone (mmol/l)	0.83±0.59	0.46±0.36	0.85±0.55	0.70±0.53
Sp. Gr.	1.012±0.003	1.014±0.004	1.015±0.003*	1.014±0.004
Blood (cell/ul)	0	8.93±17.97	0	0
pH	7.70±0.46	7.68±0.37	7.58±0.45	7.63±0.40
Protein (g/l)	0.53±0.34	0.55±0.35	0.41±0.26	0.39±0.25
Urobilinogen (mmol/l)	3.2	3.2	3.2	3.2
Leucocyte (cells/ul)	15.00±13.89	15.00±11.77	11.54±6.58	13.00±7.75
Volume (ml)	23.80±16.94	29.36±22.88	19.54±12.49	23.80±14.80

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

* ค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 8 ผลการตรวจปัสสาวะของหนูเพศเมียที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 6 เดือน

	กลุ่มของสัตว์ทดลอง			
	กลุ่มควบคุม N = 15	16 มก./กก. N = 15	160 มก./กก. N = 15	1.6 ก./กก. N = 14
Glucose (mmol/l)	0	0	0	0
Bilirubin (mmol/l)	0	0	0	0
Ketone (mmol/l)	0	0	0	0
Sp. Gr.	1.013±0.004	1.010±0.004	1.011±0.002	1.015±0.007
Blood (cell/ul)	0	0	0	0
pH	7.77±0.46	7.87±0.40	7.80±0.41	7.57±0.55
Protein (g/l)	0.39±0.25	0.28±0.08	0.24±0.12	0.41±0.34
Urobilinogen (mmol/l)	3.20±0	4.05±3.30	3.20±0	5.03±4.65
Leucocyte (cells/ul)	0	1.00±3.87	0	1.07±4.01
Volume (ml)	17.33±6.43	18.60±9.18	29.40±15.08*	16.43±9.06

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

* ค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

จากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของสมอง หัวใจ ปอด หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน ลำไส้ ม้าม กระเพาะ กระเพาะปัสสาวะ และรังไข่ และมดลูกในหนูเพศเมีย หรืออัณฑะในหนูเพศผู้ พบว่าไม่พบความแตกต่างของกลุ่มที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ (ตารางที่ 9, 10)

ตารางที่ 9 ผลการตรวจจุลพยาธิวิทยาของหนูเพศผู้ที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 6 เดือน

อวัยวะ	พยาธิสภาพ	กลุ่มของสัตว์ทดลอง				
		กลุ่มควบคุม	16 มก./กก.	160 มก./กก.	1.6 ก./กก.	R-1.6 ก./กก.
สมอง		N	N	N	N	N
ตับอ่อน		N	N	N	N	N
หลอดลม		N	N	N	N	N
หลอดอาหาร		N	N	N	N	N
กระเพาะอาหาร		N	N	N	N	N
ลำไส้		N	N	N	N	N
ม้าม		N	N	N	N	N
ปอด	Foreign body granuloma	0/15	0/14	1/13	0/15	0/10
ตับ	Fatty change	0/15	1/14	0/13	0/15	0/10
หัวใจ	Focal Myocarditis	0/15	1/14	0/13	0/15	0/10
ไต	Nephrocalcinosis	0/15	0/14	0/13	0/15	0/10
	Hydrocalyx	1/15	1/14	2/13	0/15	1/10
อัณฑะ	Atrophy	1/15	0/14	2/13	1/15	0/10

ค่าในตารางแสดงจำนวนหนูที่มีพยาธิสภาพ/ จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่มที่นำมาตรวจพยาธิสภาพ

R = กลุ่ม Receovery

N = Non-remarkable

ตารางที่ 10 ผลการตรวจจุลพยาธิวิทยาของหนูเพศเมียที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 6 เดือน

อวัยวะ	พยาธิสภาพ	กลุ่มของสัตว์ทดลอง				
		กลุ่มควบคุม	16 มก./กก.	160 มก./กก.	1.6 ก./กก.	R-1.6 ก./กก.
สมอง		N	N	N	N	N
ตับอ่อน		N	N	N	N	N
หลอดลม		N	N	N	N	N
หลอดอาหาร		N	N	N	N	N
กระเพาะอาหาร		N	N	N	N	N
ลำไส้		N	N	N	N	N
ม้าม		N	N	N	N	N
ปอด	Foreign body granuloma	0/15	1/15	0/15	0/14	0/11
ตับ	Fatty change	0/15	0/15	0/15	0/14	1/11
หัวใจ	Focal Myocarditis	0/15	1/15	0/15	0/14	0/11
ไต	Nephrocalcinosis	6/15	6/15	3/15	4/14	1/11
	Hydrocalyx	1/15	1/15	0/15	0/14	1/11

ค่าในตารางแสดงจำนวนหนูที่มีพยาธิสภาพ/ จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่มที่นำมาตรวจพยาธิสภาพ

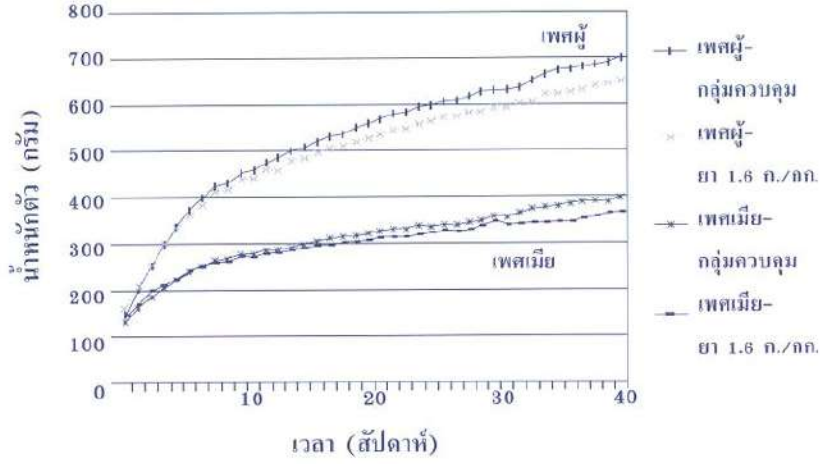
R = กลุ่ม Receovery

N = Non-remarkable

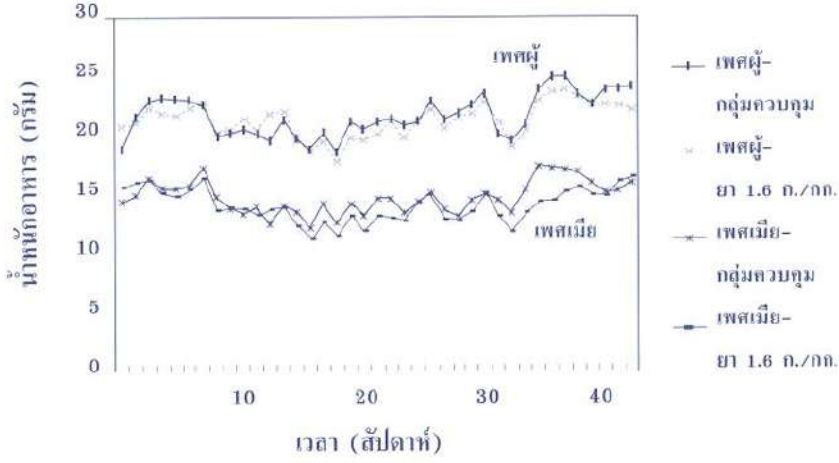
ผลการทดสอบพิษเรื้อรังนาน 9 เดือน

ผลต่อการเจริญเติบโตและการกินอาหาร

เมื่อป้อนยาแก่หนูขาวในขนาด 1600 มก./กก. เป็นเวลานาน 9 เดือน พบว่าแม้การกินอาหารของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็กจะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมในบางสัปดาห์ แต่ไม่มีผลทำให้น้ำหนักตัวของหนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับยาแตกต่างจากกลุ่มควบคุมตลอดการทดลอง ตลอดการทดลองไม่พบความผิดปกติของลักษณะขน ผิวหนัง ตา จมูก รูทวาร สีของเยื่อเมือก อุจจาระ การหายใจ การเดิน การทรงตัวและพฤติกรรมของหนูขาวที่ได้รับยาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 3, 4)



ภาพที่ 3 ผลการเจริญเติบโตของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาแจอร์เพล็กเป็นเวลานาน 9 เดือน



ภาพที่ 4 ผลการกินอาหารของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาแจอร์เพล็กเป็นเวลานาน 9 เดือน

ผลต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะสัตว์ทดลอง

น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะสัตว์ทดลองทั้งสองเพศที่ได้รับยาแนเจอร์เพล็กขนาด 1600 มก./กก. เป็นเวลานาน 9 เดือน ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 11)

ผลการตรวจทางโลหิตวิทยา

จำนวนเม็ดเลือดขาว, %Neutrophil, %Lymphocyte, %Monocyte, %Basophil, จำนวนเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดง, ปริมาณฮีโมโกลบิน, เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น

ตารางที่ 11 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์# (กรัม/ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ของหนูที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 9 เดือน

	หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด		หนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด	
	0 ก./กก.	1.6 ก./กก.	0 ก./กก.	1.6 ก./กก.
	N = 11	N = 11	N = 12	N = 10
สมอง	3.23±0.44	3.38±0.36	5.31±0.76	5.67±0.86
หัวใจ	2.27±0.27	2.43±0.30	2.71±0.25	2.68±0.24
ไตข้างขวา	2.13±0.24	2.21±0.15	2.33±0.25	2.60±0.29*
ไตข้างซ้าย	1.98±0.16	2.09±0.10	2.24±0.22	2.46±0.28
กระเพาะปัสสาวะ	0.24±0.11	0.28±0.07	0.29±0.04	0.29±0.04
ตับ	21.08±1.43	21.59±1.30	21.14±1.70	22.33±2.23
ม้าม	1.67±0.22	1.69±0.21	2.01±0.38	2.20±0.39
กระเพาะอาหาร	3.25±0.48	3.70±0.16*	4.09±0.50	4.91±0.87*
ปอด	2.66±0.36	3.02±0.29*	3.70±0.24	3.93±0.51
อัณฑะข้างขวา	4.68±0.72	5.27±0.91		
อัณฑะข้างซ้าย	4.60±0.86	5.21±0.87		

น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ = น้ำหนักของอวัยวะ (กรัม) / น้ำหนักตัว (กิโลกรัม)
ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

(hematocrit), เกล็ดเลือด, Mean Cell Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concenration (MCHC), Red Cell Distribution Width (RDW), Mean Platelet Volume (MPV), Plateletcrit (PCT), Platelet Distribution Width (PDW), %Reticulocyte และ Reticulocyte ของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับยาไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นค่า MCHC ของหนูเพศผู้มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 9 เดือน

	หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด		หนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด	
	0 ก./กก.	1.6 ก./กก.	0 ก./กก.	1.6 ก./กก.
	N = 11	N = 11	N = 12	N = 10
WBC (K/uL)	5.78±1.80	5.08±1.61	3.64±1.52	3.22±1.02
%Neutrophil	13.71±4.05	17.09±4.48	22.39±17.24	11.10±2.57
%Lymphocyte	79.51±4.86	75.89±5.06	70.28±17.56	81.60±2.71
%Monocyte	3.78±1.62	3.31±1.33	4.43±1.60	4.42±1.66
%Basophil	7.75±0.80	2.20±0.58	1.35±0.54	1.63±0.34
%Eosinophil	1.30±0.39	1.58±0.52	1.58±0.65	1.27±0.42
RBC (X10[illegible]/uL)	9.77±0.62	9.35±0.50	8.28±0.80	8.72±0.48
Hemoglobin(g/dL)	15.82±0.47	15.47±0.66	14.86±1.20	15.58±0.52
Hematocrit (%)	52.76±1.48	50.07±2.56	48.18±4.03	50.98±2.11
MCV (fL/red cell)	54.22±2.24	53.61±0.85	58.37±2.22	58.59±1.49
MCH (pg/red cell)	16.23±0.86	16.58±0.73	18.02±0.56	17.94±0.65
MCHC (g/dL RBC)	29.93±0.68	30.92±1.09*	30.92±1.24	30.58±0.47
RDW,CV (%)	16.62±1.46	16.76±1.15	14.12±1.02	13.61±0.51
Platelet (K/uL)	843±114	887±98	818±64	794±102
MPV (fL/platelet)	9.21±1.17	8.72±0.94	9.28±0.94	8.51±0.68*
Plateletcrit (%)	0.78±0.14	0.76±0.16	0.78±0.11	0.67±0.13
PDW, CV (%)	18.27±0.72	18.38±0.69	18.13±0.68	18.33±0.60
%Reticulocyte	3.08±0.77	2.64±0.30	4.02±2.87	4.51±2.11
Reticulocyte (K/uL)	274±66	245±39	314±152	386±166

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ผลการตรวจชีรั่มทางชีวเคมี

ในหนูทั้งสองเพศ ระดับเอนไซม์ AST, ALT, ALP, บิลิรูบิน, ครีอาตินิน ,BUN, ระดับโคเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอร์ไรด์, โปรตีนรวม, กรดยูริก, กลูโคส และโปรแตสเซี่ยมไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมยกเว้นค่าอัลบูมินของหนูเพศผู้ และโซเดี่ยมของหนูเพศผู้และหนูเพศเมียมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ค่าทางชีวเคมีของชีรั่มของหนูขาวที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 9 เดือน

	หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด		หนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด	
	0 ก./กก.	1.6 ก./กก.	0 ก./กก.	1.6 ก./กก.
	N = 11	N = 11	N = 12	N = 10
AST (U/I)	70.82±9.14	63.27±8.11	70.42±12.33	65.50±11.25
ALT (U/I)	36.09±7.89	36.64±7.26	31.58±7.18	32.10±5.32
ALP (U/I)	61.00±12.26	64.18±7.25	24.75±8.70	24.70±7.44
Bilirubin (mg/dL)	0.07±0.02	0.08±0.02	0.09±0.04	0.07±0.04
Creatinine (mg/dL)	0.65±0.04	0.63±0.03	0.73±0.07	0.72±0.08
BUN (mg/dL)	17.53±2.05	15.86±1.96	19.80±3.44	18.93±3.22
Cholesterol (mg/dL)	86.28±13.27	90.46±20.48	76.84±13.50	86.59±24.66
Ttriglyceride (mg/dL)	147.74±53.33	127.04±29.61	135.24±47.15	196.91±126.67
Total protein (g/dL)	6.94±0.31	6.90±0.22	7.60±0.71	7.57±0.42
Albumin (g/dL)	3.41±0.12	3.26±0.11*	3.96±0.44	3.95±0.19
Uric acid (mg/dL)	1.71±1.06	1.04±0.29	1.72±0.47	1.69±0.86
Glucose (mg/dL)	159.01±19.43	156.64±10.17	150.51±14.55	158.86±31.69
Sodium (mmol/L)	144.09±1.45	142.55±0.69*	144.08±1.68	142.60±0.84*
Potassium (mmol/L)	6.04±1.37	5.60±0.68	5.49±0.95	5.27±0.89

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ผลการตรวจสอบของปัสสาวะ

ในหนูทั้งสองเพศตรวจไม่พบว่ามีกลูโคส บิลิรูบินหรือเลือดในปัสสาวะ นอกจากนี้ค่า ketone, ความถ่วงจำเพาะ, ค่าความเป็นกรดด่าง, โปรตีน, ยูโรบิลลิโนเจน, leucocyte และปริมาตรของปัสสาวะของหนูที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็กไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ผลการตรวจปัสสาวะของหนูขาวที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 9 เดือน

	หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด		หนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด	
	0 ก./กก.	1.6 ก./กก.	0 ก./กก.	1.6 ก./กก.
	N = 11	N = 11	N = 12	N = 10
Glucose (mmol/l)	0	0	0	0
Bilirubin (mmol/l)	0	0	0	0
Ketone (mmol/l)	1.00±1.07	0.77±0.47	0	0.10±0.21
Sp. Gr.	1.016±0.007	1.014±0.003	1.012±0.003	1.001±0.002
Blood (cell/ul)	0	0	0	0
pH	7.27±0.34	7.45±0.27	7.62±0.48	7.85±0.41
Protein (g/l)				
Urobilinogen (mmol/l)	3.2	3.2	3.2	3.2
Leucocyte (cells/ul)	40.91±41.82	48.64±52.06	0	22.50±42.05
Volume (ml)	19.41±9.21	19.14±6.81	14.62±6.62	19.55±9.41

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (Mean ± SD)

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา

จากการศึกษาจุลพยาธิวิทยาของสมอง หัวใจ ปอด หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ ตับอ่อน ลำไส้ ไต ม้าม กระเพาะ กระเพาะปัสสาวะ และรังไข่ และมดลูกในหนูเพศเมีย หรืออัณฑะในหนูเพศผู้ พบว่าไม่พบความแตกต่างของกลุ่มที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ผลการตรวจจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวที่ได้รับยาเนเจอร์เพล็ก นาน 9 เดือน

อวัยวะ	พยาธิสภาพ	หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขนาด		หนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด	
		0 ก./กก.	1.6 ก./กก.	0 ก./กก.	1.6 ก./กก.
สมอง		N	N	N	N
ตับอ่อน		N	N	N	N
หลอดลม		N	N	N	N
หลอดอาหาร		N	N	N	N
กระเพาะอาหาร		N	N	N	N
ลำไส้		N	N	N	N
ม้าม		N	N	N	N
ปอด		N	N	N	N
ตับ	Fatty change	4/11	0/11	1/12	0/10
หัวใจ	Focal Myocarditis	N	N	N	N
ไต	Nephrocalcinosis	0/11	0/11	1/12	0/10
	Hydrocalyx	2/11	0/11	0/12	0/10
อัณฑะ	Atrophy	0/11	1/11		
มดลูก	Leiomyosarcoma			0/12	1/10

ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (Mean ± SD)

N = Nm-remarkable

วิจารณ์

จากการศึกษาพิษเรื้อรังของยาเนเจอร์เพล็กในหนูขาวเป็นเวลานาน 6 เดือน โดยกรอกผงยาขนาด 16, 160 และ 1600 มก/กก. พบว่าการกินอาหารและการเจริญเติบโตของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาทุกกลุ่มแตกต่างจากกลุ่มควบคุมบ้างในบางสัปดาห์แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 6 เป็นต้นไปจนเสร็จสิ้นการทดลอง หนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาทุกกลุ่มมี

น้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในของหนูที่ได้รับยาทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม หนูขาวทั้งสองเพศมีค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในของหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุม พบว่าไม่มีความแตกต่าง

จากการศึกษาพิษเรื้อรังของยาในหนูขาวเป็นเวลานาน 9 เดือน โดยการกรอกผงยาขนาด 1600 มก./กก. พบว่าการกินอาหารและการเจริญเติบโตของหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาทุกกลุ่มแตกต่างจากกลุ่มควบคุมบ้างในบางสัปดาห์แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 1 เป็นต้นไป จนเสร็จสิ้นการทดลองหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยามีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในของหนูที่ได้รับยาทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม หนูขาวทั้งสองเพศมีค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในของหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับยาและกลุ่มควบคุม พบว่าไม่มีความแตกต่าง

สรุป

จากการศึกษาพิษเรื้อรังของยาเนเจอร์เพล็กโดยกรอกยาแก่หนูขาวในขนาด 16, 160 และ 1600 มก/กกติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 6 เดือน และพิษเรื้อรังของยาโดยกรอกยาแก่หนูขาวในขนาด1600 มก./กก. ติดต่อกันเป็นเวลานาน 9 เดือนพบว่า ในหนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับยาทุกกลุ่มมีน้ำหนักในวันสุดท้ายของการทดลอง น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายใน ค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีของซีรั่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้อัตราการเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ของอวัยวะภายในที่ตรวจพบก็ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของยาที่ได้รับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายาเนเจอร์เพล็กในขนาดและระยะเวลาที่ให้ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษในหนูขาว

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายแพทย์สมนึก เจษฎาภัทรกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะสัตว์ทดลองและให้คำปรึกษาในการแปลผล เจ้าหน้าที่ฝ่ายสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขที่สนับสนุนในเรื่องการจัดหาสัตว์ทดลองและสถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากองค์การเภสัชกรรม

เอกสารอ้างอิง

1. เที่ยงบูรณธรรม ว, พจนานุกรมสมุนไพรไทย พิมพ์ครั้งที่ 4 กรุงเทพฯ สำนักพิมสุริยบรรณ 2539 : 177, 761-762, 559, 481-482

2. พงษ์บุญรอด ส, ไม้เทศเมืองไทย 2493 : 769

3. ศรีนวลชัย ป, และเตชะเสน ป, Investigation of the Diuretic Effect of Mimusops elengi (Pikhun) in Dogs and Rats เชียงใหม่เวชสาร 2517; 13:5-22

4. สมิตินันทน์ ต, ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง ฟันเนี่พับบลิชชิ่ง กรุงเทพฯ 2523 : 182.

แบซิลลัส สเฟียริคัส เอช-5 สายพันธุ์อยุธยา

แบซิลลัส ทรูริงจีซิส สายพันธุ์แพร่

กวาวเครือขาว

พิกุล

พลูคาว

พิษวิทยาของกวาวเครือขาว

Toxicity Study of *Pueraria mirifica* Airy Shawet Suvatabandhu

ทรงพล ชีวะพัฒน์, ปราณี ชวลิตธำรง
สดุดี รัตนจรัสโรจน์, อัญชลี จูฑะทุทธิ
สมเกียรติ ปัญญามัง
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาความเป็นพิษของหัวกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica* Airy Shawet Suvatabandhu) ซึ่งเตรียมในรูปของผงยาแขวนตะกอนในน้ำ ผลการศึกษาพิษเฉียบพลัน พบว่ากวาวเครือขาวไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร และขนาดของกวาวเครือขาวที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 (LD_{50}) มีค่ามากกว่า 16 กิโลกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ส่วนการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์โดยป้อนผงกวาวเครือขาวแขวนตะกอนในน้ำ ขนาด 10, 100 และ 1000 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน (มก./กก./วัน) ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 90 วัน พบว่า หนูทั้งสองเพศที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน เจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่มควบคุมและกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาบ่งชี้ว่า กวาวเครือขาวขนาด 1000 มก./กก./วัน มีผลทำให้หนูเกิดภาวะโลหิตจางโดยมี % hematocrit จำนวนเม็ดเลือดแดง และปริมาณฮีโมโกลบิน ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและมี % reticulocyte เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้กลับสู่ภาวะปกติได้ในหนูเพศผู้เมื่อหยุดให้กวาวเครือเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แต่ในหนูเพศเมียมี % hematocrit และ % reticulocyte เท่านั้นที่กลับสู่ภาวะปกติ นอกจากนี้พบว่า กวาวเครือขาวขนาด 1000 มก./กก./วัน มีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดของหนูเพศผู้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงค่าชีรั่มชีวเคมีที่เด่นชัดคือ ระดับโคเลสเตอรอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวทุกขนาด ส่วนเพศเมียลดลงในกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน ในการผ่าชันสูตรตรวจพบว่าหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักอัณฑะทั้งสองข้างต่ำกว่ากลุ่มควบคุม หนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาว 100 และ 1000 มก./กก./วัน ตรวจพบมดลูกมีลักษณะบวมเต่ง มีค่าของน้ำหนักที่แท้จริงและน้ำหนักสัมพัทธ์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิ

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 42 ฉบับที่ 3 พ.ศ. 2543 หน้า 202-223.

วิทยาพบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 1000 มก./กก./วัน มีอัตราการเกิด hyperemia ของอัณฑะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน มีอัตราการเกิด cast ที่ไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอื่น ๆ ที่ตรวจพบนั้น มีอัตราการเกิดที่ไม่สัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือที่ได้รับ จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากกวาวเครือขาว จากผลการทดลองพิษกึ่งเรื้อรังครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การให้ผงกวาวเครือขาวแก่หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ในขนาด 10 และ 100 มก./กก./วัน ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติต่อค่าโลหิตวิทยาและค่าทางชีวเคมี รวมทั้งไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพใด ๆ ของอวัยวะภายในที่บ่งชี้ถึงความเป็นพิษของกวาวเครือขาว

ABSTRACT

Toxicity studies of *Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvatabandhu root powder were investigated in mice and rats by oral administration of its suspension. Our results showed that *P. mirifica* produced no signs and symptoms of acute toxicity in mice and LD_{50} value was greater than 16 g/kg. Subchronic toxicity study in Wistar rats treated orally with *P. mirifica* suspension at the doses of 10, 100 and 1,000 mg/kg/day for 90 consecutive days revealed that the growth rate and food consumption of rats receiving *P. mirifica* at the doses of 100 and 1,000 mg/kg/day were significantly lower than those of the control groups. Hematological results in rats indicated that *P. mirifica* at the those of 1000 mg/kg/BW/day caused anemia with significant decreases of % hematocrit, the number of erythrocytes, and hemoglobin but significant increases of % reticulocyte in both sexes. Two weeks after the cessation of *P. mirifica* administration, these alterations in male rats returned to normal state whereas in female two of four parameters, %hematocrit and % reticulocyte, were found recoverable. In addition, the number of white blood cells and platelets in male rats receiving the highest dose were significantly lower than those of the control group but these changes were not observed in female rats of the same dose group. Serum biochemical examination showed that cholesterol levels in male rats receiving *P. mirifica* at each does were significantly lower than that of the control group and these changes in female were observed at the doses of 100 and 1000 mg/kg/day. At autopsy the weights of both testis from males rats receiving the highest dose were significantly lower than those of the control group. The uterus of females rats receiving *P. mirifica* at the doses of 100 and 1000 mg/kg/day looked swelling in appearance and the actual uterine weights and % relative uterine weights of these two groups were significantly higher than those of the control group. Histopathological examinations indicated that males rats receiving the highest dose of *P. mirifica* had significantly higher incidence of testicular hyperemia than the control group. Female rats receiving the highest dose of *P. mirifica* had

significantly higher incidence of kidney tubular cast than their control group. Other histopathological changes found in the present study did not correlate with the doses of *P. mirifica* and hence could bot be due to the toxicity of *P. mirifica*. Taken together, it was found that *P. mirifica* at the doses of 10 and 100 mg/kg/day given orally in Wistar rats did not cause any abnormalities of hematological or biochemical parameters nor did it cause any dose-related histopathological changes of the visceral organs

Key words : *Pueraria mirifica*, toxicity, subchronic toxicity

บทนำ

กวาวเครือขาวมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria mirifica* Airy Shaw et Suvatabandhu (สมิตินันท์, 2523) เป็นพรรณไม้ที่พบทางภาคเหนือที่จังหวัดเชียงใหม่และลำปาง ขึ้นในป่าเบญจพรรณบนพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 250-800 เมตร มีลักษณะเป็นไม้เถาเนื้อแข็ง เลื้อยพันตามไม้ใหญ่ มีใบประกอบแบบขนนก มีสามใบย่อย ช่อดอกเป็นช่อเดี่ยวและช่อแยกแขนงออกตามปลายกิ่ง ดอกรูปดอกถั่ว ออกเป็นกระจุกในระยะผลัดใบ กระจุกละ 3-5 ดอก กลีบดอก 5 กลีบ สีม่วงน้ำเงินอ่อนกลีบกลางค่อนข้างกลม ก้านสั้น เส้นผ่าศูนย์กลาง 7-8 มม. กลีบคู่ล่างติดกันเป็นรูปท้องเรือ ฝักแบนรูปขอบขนาน ผิวมีขนสั้นๆ ประปราย ภายในมีเมล็ด 3-4 เมล็ด เมล็ดค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มม. มีหัวอยู่ใต้ดินรูปร่างคล้ายหัวมันแกว (นิยมธรรม, 2538)

ตำรายาแผนโบราณได้กล่าวถึงสรรพคุณต่างๆ ของหัวกวาวเครือขาวซึ่งได้รวบรวมไว้โดย สำนักงานข้อมูลสมุนไพร (2539) และทรัพย์เจริญ (2541) ดังนี้ เป็นยาบำรุงกำลัง ทำให้อวัยวะสืบพันธุ์และมดลูกเต่งโตโดยมีโลหิตคั่งมากขึ้น ใช้แก้อ่อนเพลีย ผอมแห้ง นอนไม่หลับ เป็นยาอายุวัฒนะสำหรับผู้สูงอายุ บำรุงความกำหนัด ช่วยให้ผิวหนังเต่งตึง เสริมหน้าอก กระตุ้นเต้านมให้ขยายตัวและช่วยให้เส้นผมดกดำ ในตำรายาของหลวงอนุสารสุนทร (2474) ได้ระบุขนาดที่ใช้ของหัวกวาวเครือขาว โดยให้กินกวาวเครือผสมน้ำผึ้งขนาดเท่าเม็ดพริกไทยวันละ 1 เม็ด ยานี้ห้ามใช้ในคนหนุ่มสาวและถ้ารับประทานเกินขนาดจะทำให้มึนเมาและเป็นพิษ (สมาคมโรงเรียนแพทย์โบราณ, 2507)

จากการศึกษาทางด้านเคมีของหัวกวาวเครือขาว พบว่ามีสารประกอบอยู่หลายชนิดที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน ได้แก่ Miroestrol (Bounds and Pope, 1960), Peurarin (Inghan *et al.*, 1986) Coumestrol, Daidzin, Daidzein, Mirificin (Ingham, 1986), Genistin (Ingham, 1989) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารอีกหลายชนิดที่ยังไม่มีรายงานว่ามีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน เช่น Kwakurin, Kwakurin hydrate, Mirificoumestan เป็นต้น (สมิตะศิริ, 2541)

การศึกษาทางเภสัชวิทยาของกวาวเครือขาวนั้นส่วนมากมักเกี่ยวข้องในแง่ของการออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยมีรายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองต่างๆ พบว่า กวาวเครือมีผลยับยั้งพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสี การผสมพันธุ์และการเจริญของอัณฑะในนกพิราบเพศผู้ และสามารถยับยั้งการออกไข่โดยการยับยั้งการเจริญของฟอลลิเคิลในนกพิราบตัวเมีย (สมิตะศิริ และศักดารัตน์, 2538) ส่วนการทดลองในหนูเพศเมียที่กินกวาวเครือ

ขาวพบว่า มีผลยับยั้งการให้นมของหนูที่กำลังให้นม โดยไปยับยั้งการเจริญของต่อมน้ำนมและการสร้างน้ำนม (สมิตะศิริ, แปงจิตต์ และอนันตลาโภชัย, 2532) มีผลป้องกันการตั้งท้องเมื่อให้หนูกินในช่วงตั้งท้องวันที่ 1-10 คิดต่อกันหรือให้กินในช่วงที่มีการเคลื่อนย้ายของตัวอ่อน (ตั้งท้องวันที่ 1-3) โดยทำให้เกิดการแท้งและเมื่อให้หนูที่ตัดรังไข่ออก กิน กวาวเครือพบว่าน้ำหนักของมดลูกและปริมาณของเหลวในมดลูกเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับที่พบในหนูที่ได้รับ ethinyl estradiol (Smitasiri *et al.*, 1986) และมีรายงานว่ากวาวเครือขาวมีฤทธิ์คุมกำเนิดที่ดีในหนูขาวเมื่อให้ในขนาด 1 กรัม/ตัว/สัปดาห์ (สมิตะศิริ และแปงจิตต์, 2529) ส่วนผลของกวาวเครือขาวต่อหนูเพศผู้นั้นพบว่า สัตว์มีพฤติกรรมการสืบพันธุ์ลดลงและมีขนาดและน้ำหนักของอัณฑะ, epididymis, ต่อมลูกหมากและ seminal vesicles ลดลง รวมทั้งมีจำนวนตัวอสุจิและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิลดลงด้วย (ลางคลิจันทร์, 2527)

ในด้านการศึกษาที่บ่งชี้ถึงความเป็นพิษของกวาวเครือขาวนั้น มีรายงานว่า ส่วนสกัดด้วยน้ำของหัวกวาวเครือขาวมีพิษทำให้หนูถีบจักรที่ตัดรังไข่ออก ตายภายใน 2-3 นาที แต่ถ้าลดขนาดลงจะแสดงฤทธิ์ของเอสโตรเจนคือ ทำให้มดลูกมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (Smitasiri *et al.*, 1987) จากการศึกษาในหนูขาวพบว่าเมื่อให้กวาวเครือขาวขนาดสูง 100 มก./กก. ทำให้หนูกินอาหารลดลง และเกิดพยาธิสภาพที่เซลล์ตับ โดยมีการอักเสบ มีเลือดคั่งหลอดเลือดดำแตก และมีเลือดออกที่บริเวณ Portal traid มีการสร้างตัวอสุจิลดลงและมีการฝ่อสลายของ Leydig cells (ลางคลิจันทร์, 2527) ผลการศึกษาพิษของกวาวเครือต่อนกกระทาญี่ปุ่น พบว่า ทำให้เกิดแผลบวมเป็นหนองที่บริเวณต่าง ๆ ของร่างกาย (ช่วยชูและคณะ, 2527) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากวาวเครือขาวมีผลต่อระบบสร้างเม็ดเลือดแดงของนกกระทาพันธุ์ญี่ปุ่น โดยทำให้ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณฮีโมโกลบิน และจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างเด่นชัด (ไทยานันท์ ตระกูลบุญ และอนันตลาโภชัย, 2535)

จากข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่มีอยู่จะเห็นได้ว่ากวาวเครือขาวมีสรรพคุณซึ่งคล้ายฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน เนื่องจากมีสารไฟโตเอสโตรเจนอยู่หลายชนิด อย่างไรก็ตามการที่จะนำมาใช้เป็นยาฮอร์โมนหรืออาหารเสริมได้อย่างปลอดภัย จำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมทางด้านพิษวิทยา ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาพบเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังของกวาวเครือขาวในสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้ข้อมูลทางพิษวิทยาซึ่งจะช่วยสนับสนุนการใช้กวาวเครือขาวได้อย่างมั่นใจในความปลอดภัย

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรพันธุ์ ICR น้ำหนัก 20±2 กรัม จำนวน 20 ตัว (เพศละ 10 ตัว) ได้รับจากฝ่ายสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ น้ำหนัก 100±20 กรัม จำนวน 150 ตัว (เพศละ 75 ตัว) จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด และน้ำประปาที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

สมุนไพร

หัวกวาวเครือขาวขนาดหัวละประมาณ 2 กิโลกรัม จัดหาและตรวจสอบทางพฤกษศาสตร์โดย

รศ. ยุทธนา สมิตะศิริ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง นำมาปอกเปลือก ล้างให้สะอาด หั่นเป็นแว่นอบแห้ง บดเป็นผงแล้วผ่านตะแกรงเบอร์ 100 เพื่อให้ได้ผงละเอียด

ผลการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม isoflavones ของผงกวาวเครือขาว โดยสถาบันวิจัยและพัฒนาองค์การเภสัชกรรมพบว่ามีสารชนิดต่างๆ คิดเป็นร้อยละของผงกวาวเครือ ดังนี้ genistin 0.0164, daidzin 0.0136, puerarin 0.0486 และ genistein 0.0006 มก. ตามลำดับ

การเตรียมผงกวาวเครือขาวแขวนตะกอนในน้ำ

นำผงกวาวเครือขาวมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้นตามต้องการ เพื่อให้ได้ผงกวาวเครือขาวแขวนตะกอนในน้ำ สำหรับการทดสอบพิษในสัตว์ทดลอง

การทดสอบพิษเฉียบพลัน

แบ่งหนูถีบจักรออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว (เพศละ 5 ตัว) ประกอบด้วย กลุ่มทดลองได้รับผงกวาวเครือขาวแขวนตะกอนในน้ำที่มีความเข้มข้น 1 : 2.5 (ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถป้อนให้แก่สัตว์ทดลองได้) โดยวิธีป้อนทางปากครั้งละ 20 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กก. (มล./กก.) ให้ยา 2 ครั้ง ห่างกัน 6 ชั่วโมง คิดเป็นขนาดของผงกวาวเครือที่ได้รับ 16 กรัม/กิโลกรัม ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นปริมาตรที่เท่ากันกับน้ำยาที่ให้แก่กลุ่มทดลอง สังเกตและบันทึกอาการของสัตว์ทดลองอย่างใกล้ชิดใน 5 ชั่วโมงแรกและทุกวันจนครบ 14 วัน

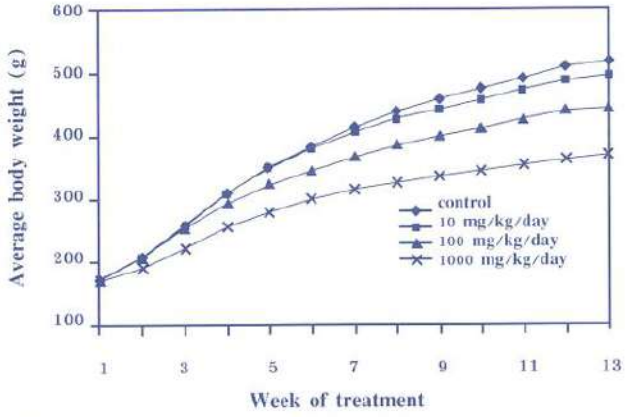
การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

แบ่งหนูขาวโดยวิธีสุ่มออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 30 ตัว (เพศละ 15 ตัว) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล./กก.วัน กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เป็นกลุ่มทดลอง ซึ่งได้รับผงกวาวเครือขาวแขวนตะกอนในน้ำ ขนาด 10, 100 และ 1000 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน (มล./กก./วัน) ตามลำดับ โดยวิธีป้อนทางปากทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน ส่วนกลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่ม recovery (1000-R) กรอกผงกวาวเครือขาวแขวนตะกอนขนาด 1000 มก./กก./วัน ทุกวันจนครบ 90 วันเช่นกัน จากนั้นหยุดให้ยาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนเจาะเลือดและผ่าชากชันสูตรเพื่อศึกษาว่าหาก ยาทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติหรือพยาธิสภาพใดๆ การเปลี่ยนแปลงหรือพยาธิสภาพเหล่านั้นจะคืนกลับสู่สภาพปกติ (recover) หรือไม่ภายหลังจากหยุดยา 2 สัปดาห์

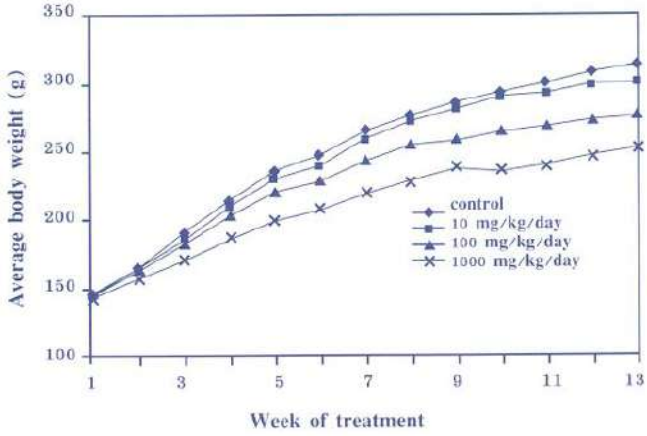
ในระหว่างดำเนินการทดลองเฝ้าสังเกตอาการผิดปกติและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ (Physical appearance) บันทึกน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เมื่อกรอกยาครบกำหนด 90 วัน อดอาหารหนูเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นดมสลบหนูด้วยอีเธอร์ เปิดผ่าช่องท้องแล้วเจาะเลือดจาก posterior vena cava เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ % hematocrit จำนวนเม็ดเลือดแดง ปริมาณ hemoglobin ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง คือ mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), และ mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) จำนวนเม็ดเลือดขาว, และ % ของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ได้แก่ neutrophil, eosinophil, lymphocyte, moncyte และ basophil จำนวนเกล็ดเลือด (platelets) และ %reticulocyte โดยเครื่อง Automatic Hematological Analyzer รุ่น Cell-Dyn 3500 ของ Abbott® นำเลือดไปปั่นแยกซีรั่มเพื่อตรวจหาทางชีวเคมีคลินิก ได้แก่ ระดับเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanie aminotransferase (ALT), total bilirubin, BUN,

creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium, และ chloride ion โดยใช้เครื่อง Automatic Blood Chemistry Analyzer รุ่น Hitachi 912

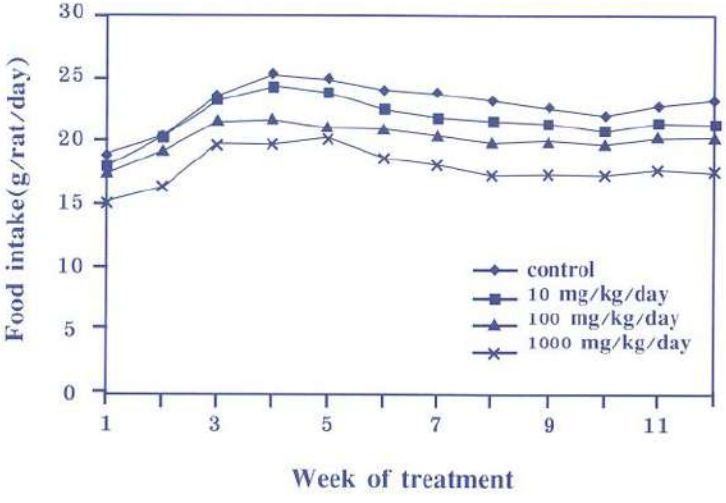
จากนั้นผ่าชากชันสูตร เพื่อตรวจหาพยาธิวิทยาที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายในต่างๆ ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ ไต ม้าม ตับอ่อน ลำไส้ กระเพาะปัสสาวะ กระดูก (femur) รังไข่ อัณฑะ มดลูก ต่อมน้ำลาย ต่อมน้ำตา ต่อมน้ำนม ต่อมไร้ท่อ ได้แก่ ต่อมธัยรอยด์ และต่อมหมวกไต บันทึกน้ำหนักอวัยวะที่สามารถชั่งได้ เพื่อนำไปคำนวณหาน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (% relative organ weight) แล้วเก็บอวัยวะต่างๆ ในบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินเข้มข้น 10% เพื่อนำไปผ่านขบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ และตรวจหาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิแพทย์



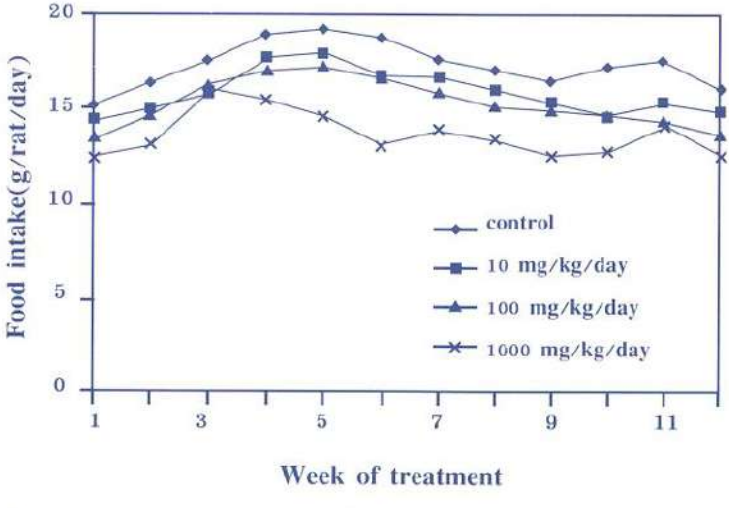
ภาพที่ 1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน



ภาพที่ 2 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน



ภาพที่ 3 การกินอาหารของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน



ภาพที่ 4 การกินอาหารของหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สถิติเชิงพรรณา การทดสอบสมมติฐานใช้ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดย Duncan's New Multiple Range Test ที่ $p<0.05$ ผลการตรวจสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา ใช้ Fisher exact test ที่ $p<0.05$

ผล

การทดสอบพิษเฉียบพลัน

เมื่อป้อนยาน้ำแขวนตะกอนของผงกวาวเครือขาวแก่หนูถีบจักรในขนาด 16 ก./กก. ซึ่งเป็นขนาดสูงสุดที่สามารถให้แก่หนูถีบจักรได้พบว่า สัตว์ทดลองไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ ตลอดเวลาที่

เฝ้าสังเกต และเมื่อครบกำหนด 14 วัน ไม่มีสัตว์ทดลองตาย ดังนั้นขนาดของผงกวาวเครือขาวที่ทำให้สัตว์ตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) ควรมีค่ามากกว่า 16 ก./กก.

การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

ผลต่อการเจริญเติบโตและการกินอาหาร

หนูขาวทั้งสองเพศ กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 จนสิ้นสุดการทดลอง ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป พบว่าหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว 100 มก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาดเท่ากันนี้มีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 เป็นต้นไป (ภาพที่ 1 และ 2) ตลอดการทดลอง หนูทั้งสองเพศกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain) และการกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1, ภาพที่ 3 และ 4)

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและการกินอาหารของหนูที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Dose of *Puerarria mirifica* (mg/kg BW/day)	n/sex	Body weight gain (g)	Food daily intake (g/rat/day)
0	15/M	338.27±30.40	22.99±1.86
10	15/M	317.27±36.74	21.79±1.73
100	14/M	264.50±37.94*	20.25±1.18*
1000	15/M	194.33±25.05*	17.96±1.51*
0	15/F	160.67±16.88	17.23±1.18
10	15/F	156.53±24.73	15.78±1.14
100	14/F	127.71±9.63*	15.24±1.24*
1000	15/F	102.40±17.32*	13.62±1.14*

The values are expressed as mean ± SD

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

ตารางที่ 2 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Parameters	Dose of *Pueraria mirifica* (mg/kg BW/day)				
	Control n=15	10 n=15	100 n=14	1000 n=15	1000-R n=15
Hematocrit (%)	52.59±5.43	52.36±3.58	52.30±2.24	49.65±2.00*	53.62±1.93
RBC (x 10^6/μL)	9.55±0.84	9.62±0.51	9.42±0.37	8.92±0.52*	9.32±0.42
Hb (g/dl)	15.97±0.56	15.72±0.70	15.58±0.56	14.73±0.60*	15.80±0.50
MCV (fl/red cell)	54.98±1.89	54.46±2.45	55.48±1.12	55.75±1.82	57.57±1.51*
MCH (pg/red cell)	16.86±1.72	16.43±1.19	16.53±0.35	16.55±0.56	16.99±0.39
MCHC (g/dl RBC)	30.76±4.09	30.18±2.08	29.83±0.64	29.68±0.48	29.52±0.73
WBC (K/μL)	6.32±1.25	6.23±1.39	5.64±0.92	4.41±1.14*	5.09±0.99*
Neutrophil (%)	11.51±2.88	13.08±6.60	14.63±8.49	15.00±5.31	14.70±5.24
Eosinophil (%)	1.24±0.37	1.09±0.40	1.08±0.45	0.95±0.29	1.18±0.28
Lymphocyte (%)	82.57±2.87	82.40±7.40	80.76±8.98	79.90±6.20	80.15±6.63
Monocyte (%)	2.73±1.78	2.13±1.68	2.19±1.32	2.71±1.86	1.92±1.18
Basophil (%)	1.95±0.82	1.29±0.45*	1.36±0.64*	1.43±0.61*	2.04±0.65
Platelet (K/μL)	928.07±98.32	892.83±102.15	866.93±91.89	857.27±78.46*	849.20±49.32*
Reticulocyte (%)	3.14±1.62	3.33±1.43	4.68±1.87*	7.92±2.60*	3.29±0.65

The values are expressed as mean ± SD

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

1000-R = Recovery group

ผลการตรวจค่าโลหิตวิทยา

หนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับกวาวเครือขาว 1000 มก./กก./วัน มีค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดแดงและปริมาณฮีโมโกลบินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขนาด 10 มก./กก./วัน มีค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง MCH และ MCHC ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขนาด 100 และขนาด 1000 มก./กก./วัน มี %reticulocyte สูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียมี %reticulocyte สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 1000 มก./กก./วัน หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน มีจำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือทุกกลุ่มมี %basophil ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่ม recovery นั้นพบว่า หนูเพศผู้ยังคงมีจำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียมีจำนวนเม็ดเลือดแดงปริมาณฮีโมโกลบินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 3 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Parameters	Dose of *Pueraria mirifica* (mg/kg BW/day)				
	Control n=15	10 n=15	100 n=14	1000 n=15	1000-R n=15
Hematocrit (%)	51.24±5.88	53.04±1.92	50.86±2.84	45.90±1.76*	50.67±1.92
RBC (x 10^6/μL)	9.12±0.62	9.24±0.29	8.83±0.56	7.94±0.38*	8.69±0.33*
Hb (g/dl)	15.96±0.70	15.64±0.43	15.26±0.78*	13.78±0.49*	14.92±0.41*
MCV (fl/red cell)	57.54±1.47	57.42±1.40	57.69±2.20	57.87±1.20	58.40±1.83
MCH (pg/red cell)	17.58±1.08	16.94±0.63*	17.31±0.66	17.38±0.43	17.20±0.64
MCHC (g/dl RBC)	30.61±2.16	29.52±1.12*	30.02±0.98	30.03±0.53	29.45±0.72*
WBC (K/μL)	3.68±1.29	4.17±0.98	3.19±0.87	3.66±0.87	3.38±0.91
Neutrophil (%)	14.11±6.20	12.64±6.72	14.99±15.31	12.44±5.35	12.05±3.73
Eosinophil (%)	1.40±0.63	1.60±1.04	1.26±0.55	1.11±0.39	1.21±0.36
Lymphocyte (%)	78.23±6.75	81.61±7.48	80.74±8.57	81.89±6.12	83.02±4.03
Monocyte (%)	4.48±2.12	2.91±2.11	4.89±3.82	3.15±2.09	2.18±1.35*
Basophil (%)	1.76±0.80	1.24±0.80	1.69±0.91	1.42±0.69	1.54±0.58
Platelet (K/μL)	889.47±113.23	855.46±59.13	907.61±69.69	904.43±89.54	848.47±67.90
Reticulocyte (%)	2.62±0.80	3.08±0.62	2.89±0.69	5.18±1.61*	2.94±0.37

The values are expressed as mean ± SD

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

1000-R = Recovery group

ผลการตรวจค่าทางชีวเคมี

หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน มีระดับ ALP สูงขึ้นจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียมีค่า ALP สูงขึ้นในกลุ่ม 10 และ 1000 มก./กก./วัน อย่างมีนัยสำคัญค่าของ ALT และ AST ในหนูเพศผู้แต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันขณะที่หนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน มีค่า ALT สูงขึ้นจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ค่าโปรตีนรวมของหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 100 และ 1000 มก./กก. ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ค่า albumin, bilirubin, creatinine และ uric acid ของหนูเพศผู้กลุ่มทดลองทุกกลุ่มต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน มีระดับ triglyceride ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่หนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขนาดเท่ากันนี้มีระดับ triglyceride สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนู

เพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือ ทุกกลุ่มและเพศเมียกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน มีค่า cholesterol ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ระดับ sodium, potassium และ chloride ของหนูเพศผู้แต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน หนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน มีระดับ sodium สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4 และ 5)

ค่าทางชีวเคมีของหนูกลุ่ม recovery ซึ่งหลังจากหยุดยาแล้ว 2 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าหนูเพศผู้มีค่าของ albumin, bilirubin, creatinine, uric acid และ cholesterol ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังเช่นที่พบในกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน

ตารางที่ 4 ค่าทางชีวเคมีคลินิกของหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Parameters	Dose of *Pueraria mirifica* (mg/kg BW/day)				
	Control n=15	10 n=15	100 n=14	1000 n=15	1000-R n=15
ALP (U/L)	69.93±12.69	70.47±10.53	79.43±15.23	85.40±12.24*	76.60±12.01
ALT (U/L)	37.00±9.89	32.40±8.17	34.14±5.46	41.07±9.57	31.27±6.15
AST (U/L)	59.93±16.48	66.40±7.71	62.79±10.26	62.73±9.38	60.33±6.96
Total protein (g%)	7.07±0.62	6.81±0.26	6.76±0.24*	6.67±0.26*	6.84±0.31
Albumin (g%)	3.65±0.57	3.30±0.10*	3.32±0.11*	3.21±0.14*	3.38±0.11*
Globulin (g%)	3.42±0.35	3.51±0.24	3.43±0.21	3.45±0.18	3.46±0.26
Bilirubin (mg/dl)	0.20±0.30	0.08±0.02*	0.06±0.03*	0.05±0.03*	0.10±0.03*
BUN (mg%)	18.91±3.11	20.08±2.24	19.36±2.13	17.95±1.90	22.64±3.90*
Creatinine (mg%)	0.71±0.24	0.61±0.05*	0.57±0.04*	0.58±0.04*	0.59±0.05*
Glucose (mg/dl)	156.69±33.10	168.27±21.32	162.13±12.83	162.25±20.23	174.53±32.96
Uric acid (mg/dl)	2.94±2.19	1.58±0.71*	1.50±0.66*	1.57±0.64*	1.82±1.00*
Triglyceride (mg/dl)	160.00±50.98	153.37±64.23	181.29±52.44	90.62±84.24*	141.72±55.06
Cholesterol (mg/dl)	104.13±63.56	59.81±9.40*	46.97±26.84*	15.91±13.39*	75.59±15.74*
Na+ (mmol/l)	144.27±3.28	144.73±2.43	145.43±2.79	145.40±2.41	142.33±2.29
K+ (mmol/l)	5.69±1.52	5.28±0.89	5.26±0.71	5.55±0.69	5.38±0.51
Cl- (mmol/l)	110.47±3.27	111.40±2.80	111.93±3.25	112.00±2.80	110.67±3.81

The values are expressed as mean ± SD

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

1000-R = Recovery group

ตารางที่ 5 ค่าทางชีวเคมีคลินิกของหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Parameters	Dose of *Pueraria mirifica* (mg/kg BW/day)				
	Control n=15	10 n=15	100 n=14	1000 n=15	1000-R n=15
ALP (U/L)	30.73±4.42	36.67±6.08*	30.79±6.47	39.00±8.59*	33.07±4.01
ALT (U/L)	32.33±4.03	30.13±5.10	36.64±4.75	38.73±9.71*	30.13±4.34
AST (U/L)	69.33±10.41	73.47±10.62	63.86±5.57	63.33±10.85	60.00±5.73*
Total protein (g%)	6.90±0.34	6.84±0.43	6.77±0.38	7.18±0.37	6.99±0.35
Albumin (g%)	3.58±0.21	3.62±0.26	3.56±0.25	3.65±0.20	3.59±0.20
Globulin (g%)	3.32±0.18	3.22±0.20	3.21±0.19	3.53±0.25*	3.40±0.18
Bilirubin (mg/dl)	0.09±0.04	0.10±0.03	0.08±0.02	0.08±0.03	0.08±0.04
BUN (mg%)	21.07±4.26	19.89±2.67	19.32±3.65	21.73±5.93	23.49±4.43
Creatinine (mg%)	0.64±0.03	0.64±0.04	0.60±0.05	0.60±0.05	0.61±0.06
Glucose (mg/dl)	149.56±22.15	143.83±25.97	151.83±27.14	156.39±16.91	144.52±20.64
Uric acid (mg/dl)	1.99±0.87	1.67±0.57	2.04±0.95	1.84±0.47	1.59±0.48
Triglyceride (mg/dl)	99.34±44.66	104.60±73.26	121.27±40.08	151.21±86.66*	129.48±55.96
Cholesterol (mg/dl)	71.82±12.19	64.96±10.04	54.78±13.24*	28.30±10.72*	79.14±13.50
Na+ (mmol/l)	142.47±1.19	142.93±1.44	142.86±1.46	144.60±2.53*	142.07±2.79
K+ (mmol/l)	5.69±1.01	5.41±0.94	5.61±0.82	5.41±0.55	5.33±0.72
Cl- (mmol/l)	110.47±3.27	111.40±2.80	111.93±3.25	112.00±2.80	110.67±3.81*

The values are expressed as mean ± SD

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

1000-R = Recovery group

ผลต่ออวัยวะภายใน

ในหนูเพศผู้พบว่า กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวทุกขนาดมีน้ำหนักของสมองต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว 100 และ 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักของตับต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักหัวใจ ปอด และ ไตและอัณฑะ ทั้งสองข้างต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 6) ส่วนหนูเพศเมียพบว่า กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักของหัวใจต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว 100 และ 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักของมดลูก มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 7) ตารางที่ 6 และ 7 ยังแสดงถึงน้ำหนักอวัยวะของกลุ่ม recovery ซึ่งปรากฏว่า เพศผู้มีน้ำหนักของสมอง หัวใจ ปอด ตับ ไต และอัณฑะทั้งสองข้างต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียมีน้ำหนัก

ของหัวใจต่ำกว่าควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และมีน้ำหนักของมดลูกไม่แตกต่าง จากกลุ่มควบคุม

เมื่อคำนวณน้ำหนักอวัยวะต่างๆ ในรูปของน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (ตารางที่ 8 และ 9) โดยเปรียบเทียบน้ำหนักอวัยวะต่อน้ำหนักตัวหนู 100 กรัม ในเพศผู้พบว่า กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของสมอง ปอด และตับมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวทั้งขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของหัวใจ กระเพาะอาหาร ไต ม้าม อัณฑะ และกระเพาะปัสสาวะมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนหนูเพศเมียนั้น กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของสมอง หัวใจ ปอด ม้าม และกระเพาะปัสสาวะมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของ ตับ ไต และมดลูกมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ตารางที่ 10 และ 11 ยังแสดงค่าน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนูกลุ่ม recovery ที่ผ่าซากภายหลังจากหยุดให้กวาวเครือขาวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งพบว่า สมอง หัวใจ ปอด กระเพาะอาหาร ตับ ไต ทั้งสองข้าง ม้าม อัณฑะทั้งสองข้าง และกระเพาะปัสสาวะของหนูเพศผู้มีน้ำหนักสัมพัทธ์มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกับที่พบในกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน ที่ผ่าซากทันทีเมื่อได้รับยาครบ 3 เดือน ส่วนหนูเพศเมียมีน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น ม้ามและกระเพาะปัสสาวะ

ตารางที่ 6 น้ำหนักอวัยวะของหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Parameters	Dose of *Pueraria mirifica* (mg/kg BW/day)				
	Control n=15	10 n=15	100 n=14	1000 n=15	1000-R n=15
Brain	2.124±0.065	2.062±0.083*	2.051±0.062*	1.996±0.060*	1.991±0.103*
Heart	1.353±0.145	1.268±0.142	1.251±0.132	1.059±0.121*	1.130±0.108*
Lung	1.716±0.164	1.628±0.171	1.643±0.143	1.447±0.155*	1.523±0.151*
Stomach	1.924±0.173	1.796±0.192	1.982±0.252	1.824±0.188	1.819±0.195
Liver	13.288±1.446	12.890±1.683	11.640±3.115*	11.405±1.312*	11.325±1.371*
Right kidney	1.302±0.126	1.286±0.102	1.279±0.132	1.115±0.111*	1.119±0.137*
Left kidney	1.237±0.108	1.220±0.076	1.212±0.090	1.058±0.117*	1.057±0.144*
Spleen	1.025±0.149	0.984±0.145	0.995±0.116	0.973±0.143	1.004±0.099
Left testis	3.172±0.295	2.972±0.242	3.131±0.244	2.786±0.263*	2.757±0.448*
Right testis	3.163±0.331	2.972±0.249	3.126±0.175	2.760±0.243*	2.680±0.367*
Bladder	0.128±0.026	0.141±0.025	0.147±0.023	0.141±0.019	0.131±0.031

The values are expressed as mean ± SD

1000-R : Recovery group

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

ตารางที่ 7 น้ำหนักอวัยวะของหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Parameters	Dose of *Pueraria mirifica* (mg/kg BW/day)				
	Control n=15	10 n=15	100 n=14	1000 n=15	1000-R n=15
Brain	1.918±0.086	1.898±0.055	1.910±0.092	1.868±0.057	1.884±0.076
Heart	0.902±0.079	0.884±0.071	0.865±0.082	0.792±0.085*	0.828±0.073*
Lung	1.291±0.083	1.207±0.082	1.224±0.111	1.137±0.111	1.166±0.113
Stomach	1.552±0.279	1.430±0.190	1.537±0.191	1.445±0.154	1.491±0.199
Liver	7.307±0.550	7.049±0.962	7.225±0.546	7.519±0.885	7.257±0.869
Right kidney	0.844±0.065	0.822±0.087	0.821±0.062	0.799±0.105	0.832±0.067
Left kidney	0.780±0.057	0.785±0.081	0.779±0.056	0.773±0.107	0.780±0.064
Spleen	0.711±0.109	0.726±0.083	0.697±0.085	0.649±0.098	0.642±0.080
Uterus	0.764±0.107	0.852±0.142	0.904±0.180*	0.898±0.187*	0.826±0.182
Bladder	0.084±0.014	0.086±0.013	0.081±0.010	0.085±0.012	0.078±0.014

The values are expressed as mean ± SD

1000-R = Recovery group

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

ตารางที่ 8 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Parameters	Dose of *Pueraria mirifica* (mg/kg BW/day)				
	Control n=15	10 n=15	100 n=14	1000 n=15	1000-R n=15
Brain	0.424±0.025	0.433±0.045	0.479±0.032	0.567±0.053*	0.531±0.060*
Heart	0.269±0.018	0.265±0.020	0.291±0.027*	0.299±0.026*	0.299±0.022*
Lung	0.343±0.036	0.340±0.026	0.382±0.023	0.409±0.042*	0.403±0.022*
Stomach	0.384±0.035	0.375±0.034	0.462±0.055*	0.514±0.031*	0.485±0.078*
Liver	2.645±0.214	2.680±0.137	2.717±0.691	3.212±0.185*	2.991±0.214*
Right kidney	0.260±0.024	0.269±0.024	0.298±0.027*	0.315±0.018*	0.296±0.028*
Left kidney	0.247±0.019	0.256±0.021	0.283±0.024*	0.298±0.013*	0.279±0.026*
Spleen	0.204±0.021	0.206±0.030	0.231±0.022*	0.274±0.026*	0.266±0.024*
Right Testis	0.633±0.057	0.623±0.057	0.733±0.090*	0.788±0.071*	0.726±0.086*
Left Testis	0.630±0.058	0.622±0.058	0.731±0.074*	0.782±0.082*	0.709±0.088*
Bladder	0.025±0.005	0.029±0.004	0.035±0.007*	0.040±0.005*	0.035±0.009*

The values are expressed as mean ± SD

1000-R = Recovery group

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

ตารางที่ 9 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Parameters	Dose of *Pueraria mirifica* (mg/kg BW/day)				
	Control n=15	10 n=15	100 n=14	1000 n=15	1000-R n=15
Brain	0.641±0.052	0.652±0.061	0.718±0.043	0.790±0.060*	0.759±0.048*
Heart	0.302±0.04	0.303±0.028	0.325±0.032	0.333±0.024*	0.334±0.31*
Lung	0.432±0.039	0.414±0.034	0.460±0.038	0.479±0.035*	0.469±0.048*
Stomach	0.521±0.114	0.491±0.074	0.579±0.082	0.609±0.057*	0.602±0.093*
Liver	2.436±0.160	2.404±0.245	2.715±0.209*	3.166±0.321*	2.913±0.263*
Right kidney	0.282±0.023	0.281±0.028	0.309±0.024*	0.336±0.039*	0.334±0.018*
Left kidney	0.260±0.017	0.268±0.022	0.293±0.023*	0.325±0.033*	0.314±0.021*
Spleen	0.237±0.033	0.249±0.036	0.262±0.029	0.272±0.029*	0.258±0.030
Uterus	0.255±0.039	0.294±0.061	0.340±0.069*	0.376±0.064*	0.332±0.071*
Bladder	0.028±0.005	0.029±0.006	0.031±0.004	0.036±0.004*	0.032±0.005

The values are expressed as mean ± SD

1000-R = Recovery group

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

ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา (ตารางที่ 10 และ 11) มีการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ดังนี้ กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบแบบเป็นหย่อม (focal myocarditis) ตรวจพบได้ในหนูเพศผู้กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองกวาวเครือขนาด 10 และ 1000 มก./กก./วัน อย่างไม่มีนัยสำคัญ การสะสมของ lymphoid cells ตรงบริเวณรอบหลอดลมขนาดเล็กที่ปอด พบได้ในหนูทั้งสองเพศทุกกลุ่ม และอัตราการเกิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเพศผู้กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 10 และ 100 มก./กก./วัน ($p<0.05$) การเสื่อมของเซลล์ตับ (hepatocyte degeneration) ในหนูเพศผู้กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองกวาวเครือมีอัตราการเกิดไม่แตกต่างกัน ส่วนเพศเมียพบเฉพาะกลุ่ม 1000 มก./กก./วัน อย่างไม่มีนัยสำคัญ Tubular cast ที่ไตบริเวณ corticomedullary junction พบได้บ้างในหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน อย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่ภายหลังหยุดยามีอัตราการเกิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 1000 มก./กก./วัน มีอัตราการเกิด tubular cast มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) focal lymphoid hyperplasia ที่ลำไส้ส่วน ileum พบได้บ้างในหนูบางกลุ่มอย่างไม่มีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงในระบบสืบพันธุ์พบว่าอัณฑะของหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน มีอัตราการเกิดภาวะ hyperemia เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และพบได้บ้างในหนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 100 มก./กก./วัน ภายในท่อ seminiferous tubule ของหนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือทุกกลุ่มยังคงมีการสร้าง spermatozoa ได้ ในหนู

ตารางที่ 10 ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Organs	Microscopic findings	Dose of *Pueraria mirifica* (mg/kg BW/day)				
		control	10	100	1000	1000-R
		n=15	n =15	n=14	n=15	n=15
Brain		NR	NR	NR	NR	NR
Heart	Focal myocarditis	1/15	2/15	0/14	1/15	0/15
Lung	Peribronchiolar lymphoid aggregation	12/15	5/15*	5/14*	10/15	11/15
Liver	Hepatocyte degeneration	3/15	5/15	3/14	2/15	0/15
Kidney	Tubular cast	0/15	0/15	0/14	2/15	5/15*
Spleen		NR	NR	NR	NR	NR
Intestine	Focal lymphoid hyperplasia	2/15	1/15	0/14	0/15	0/15
Pancreas		NR	NR	NR	NR	NR
Bladder		NR	NR	NR	NR	NR
Testis	Hyperemia (mild degree)	0/15	0/15	2/14	5/15*	2/15
Thyroid gland		NR	NR	NR	NR	NR
Adrenal gland	Fatty degeneration of cortex	4/15	3/15	2/14	0/15	0/15
Bone		NR	NR	NR	NR	NR

The results are expressed as number of rats with pathological findings/total number of rats examined.

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

NR = No remarkable lesion

เพศเมียทุกกลุ่มไม่พบความผิดปกติใดๆ ของรังไข่และต่อมน้ำนม มดลูกของหนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาดสูงสุดมี subendometrial gland hyperplasia แต่อัตราการเกิดไม่มีนัยสำคัญแต่ภายหลังหยุดยามีอัตราการเกิดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) การเกิด fatty degeneration ที่ต่อมหมวกไตชั้น cortex พบได้ในหนูเพศผู้กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 10 และ 100 มก./กก./วัน อย่างไม่แตกต่างกัน ไม่พบความผิดปกติใดๆ ที่ต่อมธัยรอยด์ ต่อมน้ำตา ต่อมน้ำลาย และกระดูกของหนูทุกกลุ่มทั้งสองเพศ

วิจารณ์

ผลการทดสอบพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักรแสดงให้เห็นว่า ผงกวาวเครือขาวไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลัน และมีค่าของ LD_{50} มากกว่า 16 ก./กก./วัน อาจจัดว่าอยู่ในกลุ่มสารที่ไม่เป็นพิษ (practically nontoxic) ดังนั้นหากรับประทานกวาวเครือขาวตามตำรายาแผนโบราณในระยะสั้นๆ น่าจะมีความปลอดภัย

จากการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังในหนูขาวเป็นเวลา 90 วัน พบว่า หนูขาวกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน มีการเจริญเติบโต

ตารางที่ 11 ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวนาน 90 วัน

Organs	Microscopic findings	Dose of *Pueraria mirifica* (mg/kg BW/day)				
		control n=15	10 n =15	100 n=14	1000 n=15	1000-R n=15
Brain		NR	NR	NR	NR	NR
Lung	Peribronchiolar lymphoid aggregation	6/15	7/15	10/14	8/15	10/15
Liver	Hepatocyte degeneration	0/15	0/15	0/14	2/15	0/15
Kidney	Tubular cast	2/15	0/15	2/14	8/15*	6/15
	Lymphoid aggregation	1/15	2/15	0/14	0/15	0/15
Spleen		NR	NR	NR	NR	NR
Intestine	Focal lymphoid hyperplasia	1/15	0/15	0/14	0/15	0/15
Pancrease		NR	NR	NR	NR	NR
Bladder		NR	NR	NR	NR	NR
Ovary		NR	NR	NR	NR	NR
Uterus	Subendometrial gland hyperplasia	0/15	0/15	0/14	2/15	5/15*
Mammary glands		NR	NR	NR	NR	NR
Thyroid glands		NR	NR	NR	NR	NR
Adrenal glands		NR	NR	NR	NR	NR
Bone		NR	NR	NR	NR	NR

The results are expressed as number of rats with pathological findings/total number of rats examined.

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

NR = No remarkable lesion

ช้ากว่ากลุ่มควบคุม น่าจะเกิดจากหนูสองกลุ่มนี้กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การที่หนูกินอาหารได้น้อยนั้น อาจเกิดจากผลของสาร phytoestrogens บางตัวที่มีอยู่ในหัวกวาวเครือขาว เช่น miroestrol, genistein และ daidzein เป็นต้น

จากการศึกษาในคนที่ได้รับ miroestrol ขนาด 1 หรือ 5 มก.ต่อวัน พบอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้อาเจียน (Cain, 1960) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารชนิดนี้มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) การให้กวาวเครือขาวขนาดสูง อาจทำให้หนูได้รับ miroestrol ในขนาดที่มีผลต่อ CNS ทำให้สัตว์เบื่ออาหาร นอกจากนี้มีการทดลองพบว่าสาร gensitein และ daidzein สามารถยับยั้งเอนไซม์ 21-hydroxylase (P450c21) ในเซลล์ต่อมหมวกไต ทำให้มีการสร้าง cortisol ลดลง (Mesiano, 1999) เนื่องจาก cortisol เป็นฮอร์โมนที่มีผลกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้รู้สึกอยากอาหาร ดังนั้นการให้กวาวเครือขาวอาจทำให้ cortisol ลดลงจึงทำให้หนูกินอาหารได้ลดลง จากรายงานการทดลองพิษกึ่งเรื้อรังของฮอร์โมน estrogen พบว่าหนูขาวที่กินอาหารผสม 17 beta estradiol มีน้ำหนักตัว การกินอาหารและ food efficiency ลดลงอย่างสัมพันธ์กับขนาดฮอร์โมนที่ให้ (Biegel *et al.*, 1998) ดังนั้นการกดการเจริญเติบโตและการกินอาหารที่ลดลงเนื่องจากกวาวเครือขาว น่าจะเป็น estrogenic-like activities ของกวาวเครือก็ได้ นอกเหนือจากฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์

ผลของกวาวเครือขาวต่อค่าทางโลหิตวิทยา พบว่า หนูทั้งสองเพศที่ได้รับกวาวเครือขาว 1000 มก./กก./วัน มีค่า hematocrit จำนวนเม็ดเลือด

แดงและปริมาณ hemoglobin ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งค่า reticulocyte ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า กวาวเครือขาวขนาดสูงมีแนวโน้มทำให้หนูเกิดภาวะโลหิตจาง ผลการทดลองครั้งนี้คล้ายคลึงกับผลของ estrogen ที่ทำให้เกิดโลหิตจางในหนูขาว (Biegel *et al.*, 1998) และสอดคล้องกับผลการทดลองในนกกระทาพันธุ์ญี่ปุ่นที่ได้รับกวาวเครือขาวซึ่งพบว่า มีการลดลงอย่างเด่นชัดของค่า hematocrit จำนวนเม็ดเลือดแดง และปริมาณ hemoglobin (ไทยานันท์, ตระกูลบุญและอนันตลาโภชัย, 2535) แต่อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาดังกล่าวกลับคืนสู่ภาวะปกติได้ในหนูเพศผู้เมื่อหยุดให้กวาวเครือขาว แต่หนูเพศเมียยังคงมีค่า hematocrit และ reticulocyte เท่านั้นที่กลับสู่ภาวะปกติ แม้ว่าจำนวนเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบินยังต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแต่มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น ค่า MCHC ที่ลดลงในเพศเมียกลุ่ม 10 มก./กก./วัน เพียงกลุ่มเดียวนั้นไม่น่าจะเกิดจากกวาวเครือขาว เพราะไม่ได้เพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างสัมพันธ์กับขนาดกวาวเครือที่ได้รับ จำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดของหนูเพศผู้กลุ่มทดลองกวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและภายหลังหยุดยา 2 สัปดาห์ยังมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเกิดจากหัวกวาวเครือมีสาร phytoestrogens บางตัวที่มีฤทธิ์ลดหรือยับยั้งการสร้างเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ ที่ไขกระดูก เช่นเดียวกับฤทธิ์ของฮอร์โมน estrogen ที่กดไขกระดูกทำให้เกิด pancytopenia (Van and Friedland 1987; Bernard *et al.*, 1983) คือ มีการสร้างเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดลดลง อย่างไรก็ตามในหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขนาดเดียวกันไม่พบว่า มีการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดอาจเนื่องจากเป็นการตอบสนองต่อยาที่แตกต่างกันอันเนื่องมาจากเพศ (gender-related differences) การลดลงของ basophil ในหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือทุกขนาด ไม่ได้ลดลงอย่างสัมพันธ์กับขนาดกวาวเครือที่ให้ อีกทั้งไม่พบว่าลดลงในเพศเมีย จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากกวาวเครือขาว

การเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีบางตัว ได้แก่ ระดับ ALP ในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับกวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน แม้ว่าสูงขึ้นจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติคือ 56.8 -128 U/L (Shayne, 1992) และเนื่องจากค่า bilirubin รวมทั้งผลทางจุลพยาธิวิทยาของตับของหนูที่ได้รับยาขนาดนี้มิได้บ่งชี้ว่า มีการอุดกั้นทางเดินน้ำดีแต่อย่างไร ดังนั้นจึงเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ได้บ่งชี้เฉพาะถึงพิษของกวาวเครือขาว ระดับเอนไซม์ ALT ที่เพิ่มขึ้นเฉพาะในเพศเมียกลุ่มทดลองกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน แม้ว่าจะมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ก็จัดว่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยไม่รุนแรงถึงขั้นบ่งชี้ว่ามี hepatic injury ซึ่งหากเกิด hepatic injury ค่าของเอนไซม์ ALT จะเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด ระดับโปรตีนรวมในเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน แม้ว่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ยังอยู่ในช่วงค่าปกติของหนูขาว ค่าของ albumin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือทุกกลุ่มและเมื่อหยุดยาแล้ว albumin ยังคงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า กวาวเครือขาวอาจรบกวนการสร้าง albumin ที่ตับได้บ้าง อย่างไรก็ตาม ค่าที่ตรวจพบนี้ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ (Shayne, 1992) ในหนูเพศเมีย ไม่พบการลดลงของระดับซีรั่มโปรตีนและ albumin จึงอาจเป็นการตอบสนองต่อยาที่แตกต่างกันในเพศต่างกัน

ระดับของกรดยูริคในเพศผู้กลุ่มทดลองกวาวเครือทุกกลุ่มแม้ว่าจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติของหนูขาว และไม่ได้บ่งชี้ถึงความผิดปกติแต่อย่างใด ระดับไขมัน triglycerides ของหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามขนาดของกวาวเครือที่ให้และมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน แสดงว่ากวาวเครือขาวน่าจะทำให้ triglycerides สูงขึ้นในหนูเพศเมีย ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของ triglycerides ในหนูเพศผู้กลุ่มทดลองกวาวเครือ มีการผันแปรและลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะกลุ่มที่ได้รับขนาด 1000 มก./กก./วัน อาจเป็นการตอบสนองต่อยาที่แตกต่างกันเนื่องจากเพศที่ต่างกัน ระดับ cholesterol ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือทุกขนาดและในเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน เป็นการลดลงที่สัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือที่ให้ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า หัวกวาวเครือขาวมีฤทธิ์ในการลดระดับ cholesterol โดยลด cholesterol ในหนูเพศผู้ ได้มากกว่าหนูเพศเมีย ฤทธิ์ลด cholesterol นี้น่าจะเกิดจากสาร phytoestrogens เนื่องจากมีรายงานการทดลองว่า phytoestrogens จากถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Leguminosae เช่นเดียวกับกวาวเครือ สามารถลดระดับ LDL cholesterol และเพิ่มระดับ HDL cholesterol ในลิงได้อย่างมีนัยสำคัญ (Anthony *et al*,. 1996) นอกจากนี้มีรายงานว่า อาหารที่มีสาร phytoestrogens ช่วยลดระดับ cholesterol ในคนและสัตว์ได้ (Knight and Eden, 1996) ระดับโซเดียมในหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว 1000 มก./กก./วัน ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เป็นการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและคงอยู่ในช่วงค่าปกติของหนูขาว (Shayne, 1992)

จากการผ่าชำแหละชันสูตรและชั่งน้ำหนักอวัยวะต่างๆ จะเห็นได้ว่า หนูเพศผู้กลุ่มทดลองกวาวเครือทุกกลุ่ม มีน้ำหนักที่แท้จริงของสมองน้อยกว่ากลุ่มควบคุมและยังคงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมภายหลังหยุดยา แต่เมื่อคำนวณเป็นน้ำหนักสัมพัทธ์ปรากฏว่า สมองมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 1000 มก./กก./วัน ซึ่งเกิดจากหนูกลุ่มนี้มีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเด่นชัด อย่างไรก็ตามผลการตรวจเนื้อเยื่อสมองทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในหนูทุกกลุ่ม ในทำนองเดียวกันกับการเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดของน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะอื่นๆ ในหนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน เป็นผลจากการที่หนูสองกลุ่มนี้มีน้ำหนักตัวที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเด่นชัด จึงจำเป็นต้องพิจารณาถึงน้ำหนักที่แท้จริงของอวัยวะร่วมด้วย ซึ่งพบว่า กวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน มีผลทำให้น้ำหนักหัวใจลดลงในหนูทั้งสองเพศ น้ำหนักของอวัยวะอื่นๆ เช่น ปอด ตับ ไตทั้งสองข้าง ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือในขนาดสูงและภายหลังหยุดยาแล้ว 2 สัปดาห์ก็ยังคงลดลง แต่ไม่พบว่าลดลงในหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขนาดเดียวกันอาจเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ขึ้นกับเพศที่ต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า กวาวเครือขาวขนาด 1000 มก./กก./วัน มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะระบบสืบพันธุ์ โดยมีผลทำให้อัณฑะของหนูเพศผู้มีน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อหยุดยาก็ยังมีน้ำหนักน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของลางคลิจันทร์ (2527) ที่พบว่า เมื่อให้กวาวเครือขาวขนาดสูงตั้งแต่ 100 มก./กก. ขึ้นไปแก่หนูขาวเพศผู้ที่โตเต็มวัยติดต่อกัน 14 วัน มีผลทำให้ขนาดและน้ำหนักของอัณฑะลดลงอย่างมี

นัยสำคัญ ซึ่งน่าจะเกิดจากกวาวเครือขาวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมน estrogen การได้รับกวาวเครือขนาดสูงอาจยับยั้งการหลั่งฮอร์โมน FSH ซึ่งจำเป็นต่อการพัฒนาของ seminiferous epithelium ทำให้อัณฑะมีขนาด และน้ำหนักลดลงได้ ในหนูเพศเมียพบว่า กวาวเครือขาวขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน มีผลทำให้มดลูกมีลักษณะบวมเต่งและมีของเหลว (fluid content) คั่ง และมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Smitasiri *et al.*, (1986) ที่พบว่า ผงกวาวเครือแห้งมีผลทำให้มดลูกของหนูที่ตัดรังไข่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นและมีปริมาณของเหลวมากขึ้น ผงกวาวเครือขาวแห้ง 1 มก. มีความแรงใกล้เคียงกับ ethinyl-estradiol ประมาณ 0.52 - 0.75 ไมโครกรัม

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่ออวัยวะต่าง ๆ ที่พบครั้งนี้คือ peribronchiolar lymphoid aggregation ที่ปอดของหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 10 และ 100 มก./กก./วัน มีอัตราการเกิดน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่ได้ลดลงอย่างสัมพันธ์กับขนาดยา และในเพศเมียทุกกลุ่มมีอัตราการเกิดที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงไม่ได้เกิดจากกวาวเครือ การเสื่อมของเซลล์ตับพบได้ในหนูเพศผู้กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างไม่แตกต่างกัน ส่วนในเพศเมียพบได้บ้างในกลุ่ม 1000 มก./กก./วัน อย่างไม่มีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงไม่อาจกล่าวว่าเกิดจากกวาวเครือ tubular cast ที่ไตของหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน มีอัตราการเกิดต่ำมากและไม่มีนัยสำคัญ ดังนั้นอัตราการเกิด cast ที่เพิ่มขึ้นเมื่อหยุดให้ยาแล้ว 2 สัปดาห์จึงไม่น่าเกิดจากกวาวเครือขาว แต่ในหนูเพศเมียนั้นจะเห็นได้ว่ากวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน ทำให้อัตราการเกิด tubular cast มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าตรวจพบ cast ได้ในท่อไตแต่ไม่พบ injury ที่เซลล์บุท่อไต จึงไม่อาจกล่าวได้ว่ากวาวเครือเป็นพิษต่อไต การเกิดภาวะ hyperemia ที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในอัณฑะของหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขนาด 1000 มก./กก./วัน แม้ว่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแต่พบว่าเป็นเพียงระดับเล็กน้อย (mild degree) ไม่รุนแรงจนถึงขั้นเป็นอันตราย subendometrial hypeplasia gland ที่มดลูกของหนูที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 1000 มก./กก./วัน มีอัตราการเกิดที่ต่ำและไม่มีนัยสำคัญ แต่เมื่อหยุดยาเป็นเวลา 2 สัปดาห์กลับมีอัตราการเกิดที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องจากกวาวเครือขาว มีฤทธิ์เป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนจึงมีผลต่อการหลั่ง gonadotropin มีการทดลองพบว่าร้อยละ 83 ของหนูที่ได้รับสาร coumestrol ซึ่งเป็น phytoestrogen ชนิดหนึ่งในหัวกวาวเครือ มีภาวะเป็นสัดที่ยาวนาน (persistent estrous state) และเมื่อให้ estrogen ชนิด estradiol ก็ไม่สามารถทำให้หนูเหล่านี้มีระดับฮอร์โมน LH เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า coumestrol มีผลทำให้เกิด neuroendocrine impairment (Whitten *et al.*, 1993) ในทำนองเดียวกันกับการได้รับกวาวเครือขาวขนาดสูงอาจมีผลยับยั้งการหลั่งฮอร์โมน FSH และ LH ในหนูส่วนมากได้ ทำให้หนูส่วนมากมีระดับ estrogen จากรังไข่ลดลงมีและอาจมี progesterone ต่ำซึ่งฮอร์โมน 2 ชนิดนี้ช่วยให้มีการเจริญของเยื่อบุและต่อมที่ผนังมดลูก ดังนั้นจึงไม่พบลักษณะ endometrial gland hyperplasia ในหนูส่วนมาก คงมีเพียงหนูส่วนน้อยเท่านั้นที่ตรวจพบได้ เมื่อหยุดให้กวาวเครือหนูบางตัวอาจมีวงจรการเป็นสัดกลับมาเป็นปกติ จึงมีอัตราการเกิดเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามยังขาดหลักฐานสนับสนุน เนื่องจากการทดลองครั้งนี้ไม่ได้วัดระดับฮอร์โมน FSH, LH, estrogen และ progesterone และเนื่องจากไม่ได้

คัดหนูที่มีวงจรการเป็นสัดใกล้เคียงกันหรือพร้อมกันมาทำการทดลอง ส่วน fatty degeneration ที่ชั้น cortex ของต่อมหมวกไตของหนูเพศผู้ตรวจพบได้ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือบางกลุ่มอย่างไม่มีนัยสำคัญจึงไม่ใช่ผลของกวาวเครือขาว

สรุป

จากผลการทดสอบพิษเฉียบพลันของหัวกวาวเครือขาวในหนูถีบจักรพบว่า ไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลัน และมีค่าของขนาดที่ทำให้สัตว์ตายร้อยละ 50 (LD_{50}) มากกว่า 16 กรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม และจากผลการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันโดยป้อนยาน้ำแขวนตะกอนของผงกวาวเครือขาวทางปากแก่หนูขาวในขนาด 10 , 100 และ 1000 มก./กก./วัน ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 90 วัน พบว่า หนูขาวที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 100 และ 1000 มก./กก./วัน มีการเจริญเติบโตช้าและกินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมกวาวเครือขาวขนาดสูงสุด คือ1000 มก./กก./วัน มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาของหนูทั้งสองเพศโดยทำให้ % hematocrit จำนวนเม็ดเลือดแดงและปริมาณฮีโมโกลบินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและมี %reticulocyte มากกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังทำให้หนูเพศผู้มีจำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงของค่าทางชีวเคมีนั้น พบว่ากวาวเครือขาวขนาด 10 , 100 และ 1000 มก./กก./วัน ทำให้ระดับโคเลสเตอรอลในหนูเพศผู้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนโคเลสเตอรอลของหนูเพศเมียนั้นลดลงในกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ 100 และ 1000 มก./กก./วัน การเปลี่ยนปลงของค่าชีวเคมีบางตัวที่พบนั้นยังคงอยู่ในช่วงของค่าปกติ ผลการชันสูตรทางพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในต่างๆ พบว่า กวาวเครือขาวขนาด 1000 มก./กก./วัน ทำให้อัตราการเกิด cast ในท่อไต ของหนูเพศเมียสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่พบว่าสูงขึ้นในเพศผู้ กวาวเครือขาวขนาด 1000 มก./กก./วัน มีผลทำให้อัณฑะของหนูเพศผู้มีน้ำหนักลดลงและมีภาวะ hyperemia เล็กน้อยในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในหนูเพศเมียนั้นกวาวเครือขาว ขนาด100 และ 1000 มก./กก./วัน มีผลทำให้มดลูก บวมเด่งและมี fluid content มาก ทำให้มดลูกมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่ตรวจในอวัยวะอื่นๆ นั้นมีอัตราการเกิดที่ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ ดังนั้นจึงไม่ได้เกิดจากกวาวเครือขาว จากการศึกษาพิษของกวาวเครือขาวในสัตว์ทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า การได้รับกวาวเครือขาวในขนาดสูงและติดต่อกันนานมีผลกระทบต่อการสร้างเม็ดเลือดของหนูขาว ดังนั้นหากรับประทานกวาวเครือขาวเพื่อเป็นยา ไม่ควรใช้ในขนาดสูงและติดต่อกันนาน เพราะอาจมีผลกระทบต่อระบบการสร้างเม็ดเลือดได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ พ.ญ.เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ ผู้อำนวยการสถาบันแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ ที่สนับสนุนเงินทุนบางส่วนในการวิจัย รองศาสตราจารย์ยุทธนา สมิตตะศิริ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ในการจัดหาหัวกวาวเครือขาว อาจารย์ น.สพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยตรวจสอบสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะสัตว์ทดลอง สพ.ญ. เรวดี บุตรากรณ์ ฝ่ายสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ในการอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องสัตว์ทดลอง และ นางสาวสุธิดา ไชยราช กลุ่มงานพัฒนาคุณภาพ

และวิชาการ สถาบันวิจัยสมุนไพร ที่อำนวยความสะดวกในด้านการสืบค้นข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

1. ช่วยชู อ, จรรยาธรรม อ, อนันตลาโภชัย ส, และ สมิตะศิริ ย. พิษของกวาวขาว (*Pueraria mirifica*) ต่อนกกระทาพันธุ์ญี่ปุ่น. วารสารคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2527; 11 : 46-55.

2. ทรัพย์เจริญ พ. ภูมิปัญญาไทย : คุณค่าของกวาวเครือ. วารสารหมออนามัย 2541 ; 8 : 41-46.

3. ไทยานันท์ ป, ตระกูลบุญ พ, อนันตลาโภชัย ส. อิทธิพลของกวาวเครือขาวต่อนกกระทา : การสร้างเม็ดเลือดแดงและขาว. วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2535; 25 : 107-114.

4. นิยมธรรม ช. กวาวเครือ. ใน : อนุกรมวิธานพืชอักษร ก. ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. กรุงเทพฯ : บริษัทเพื่อนพิมพ์ จำกัด, 2538 ; 183-184.

5. ลางคลิจันทร์ ย. การศึกษาผลของกวาวขาว (*Pueraria mirifica*) ที่มีต่ออวัยวะสืบพันธุ์ ต่อมหมวกไต ตับ พฤติกรรมการสืบพันธุ์และการสืบพันธุ์ในหนูขาวเพศเมีย วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2527.

6. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ. ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคหนึ่ง). กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อำพลวิทยา, 2507 : 109.

7. สมิตะศิริ ย. ภาพรวมงานวิจัยและพัฒนากวาวเครือขาวตั้งแต่อดีต (พ.ศ. 2524) จนถึงปัจจุบัน (พ.ศ. 2541). ในเอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการเรื่องกวาวเครือ, นนทบุรี : สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2541 : 13-27.

8. สมิตะศิริ ย, ศักดารัตน์ ส. รูปแบบของสมุนไพรกวาวเครือขาวที่เหมาะสมสำหรับใช้คุมกำเนิดนกพิราบขาว. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี 2538 ; 2 : 89-96.

9. สมิตะศิริ ย, แปงจิตต์ ส, อนันตลาโภชัย ส. การยับยั้งการให้นมในหนูที่กำลังให้นมด้วยกวาวเครือขาวเปรียบเทียบกับเอสโตรเจน. วารสารคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2532; 16 : 7-11.

10. สมิตะศิริ ย, แปงจิตต์ ส. ฤทธิ์ในการคุมกำเนิดของกวาวเครือขาวในหนูขาว. วารสารคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2529; 13 : 75-80.

11. สมิตินันท์ ต. ชื่อพันธุ์ไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์-ชื่อพื้นเมือง). กรุงเทพฯ : หจก. พันนี่พับลิชชิ่ง, 2523 : 280.

12. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (1). กรุงเทพฯ : บริษัท ประชาชน จำกัด, 2539 : 140.

13. หลวงอนุสารสุนทร. ตำรายาหัวกวาวเครือ. เชียงใหม่ : โรงพิมพ์อุปติพงศ์, 2474. อ้างถึงใน สมิตะศิริ ย, ภาพรวมงานวิจัยและพัฒนากวาวเครือตั้งแต่อดีต (พ.ศ. 2524) จนถึงปัจจุบัน (พ.ศ. 2541). เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการเรื่อง กวาวเครือ, 1 ธันวาคม 2541. นนทบุรี : สถาบันการแพทย์แผนไทย, กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2541 : 13-27.

14. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL, *et al.*, Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. J Nutr 1996; 126 : 43-50.

15. Bernard SL, Leathers CW, Brobst DF, Gorham JR. Estrogen-induced bone marrow

depresseion in ferrets. Am J Vet Res 1983 ; 44 : 657-661.

16. Biegel LB, Flaws JA, Hirshfield AN. *et al.*, 90-day feeding and one-generation reproduction study in Crl : CD BR rats with 17 beta-estradiol. Toxicol Sci 1998 ; 44 : 116-142.

17. Bounds DG, Pope GS. Light-absorption and chemical properties of miroestrol, the oestrogenic substance of *Pueraria mirifica*. J Chem Soc 1960; 17 : 15-16.

18. Cain JC. Miroestrol : An estrogenic from the plant *Pueraria mirifica*. Nature 1960; 188 : 774-777.

19. Ingham JL, Tahara S, Dziedzic SZ. A chemical investigation of *Pueraria mirifica* root. Z Naturforsch SerC 1986 ; 41 : 403-408.

20. Ingham JL, Tahara S, Dziedzic SZ. *et al.*, Puerarin 6" -O-β-apiofuranoside, a C-glycosylisoflavone O-glycoside from *Pueraria mirifica*. Phytochemistry 1986 ; 25 : 1772-1775.

21. Ingham JL, Tahara S, Dziedzic SZ. Minor isoflavones from the root of *Pueraria mirifica*. Z. Naturforsch Ser C 1989; 44 : 724-726.

22. Knight DC, Eden JA. Phytoestrogen - a short review Maturitas 1995, 22 : 167-175.

23. Mesiano S, Katz SL, Lee JY. *et al.*, Phytoestrogens alter adrenocortical function : genistein and daizein suppress glucocorticoid and stimulate androgen production by cultured adrenal cortical cells. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84 : 2443-2448.

24. Shayne CG. The Rat. In : Shayne CG and Christopher PC, ed. Animal models in toxicology.

25. New York : Marcel Dekker Inc, 1992 : 78-81.

26. Smitasiri Y, Junyatum U, Songjitsawas A. *et al.*, Postcoital antifertility effects of *Pueraria mirifica* in rats. J Sci Fac CMU 1986; 13 : 19-28.

27. Smitasiri Y, Liawuangrath S, Kittakupt P. *et al.*, Pharmacological aspects of toxic substances in tuberous roots of *Pueraria mirifica*. In : The First Princess Chulabhorn Science International Congress on Natural Products. Bangkok : Chulabhorn Foundation and Mahidol University 1987 : 123.

28. Van Kruiningen HJ, Friedland TB. Responsive estrogen-induced aplastic anemia in a dog. J AM Vet Med Assoc 1987 ; 191 : 91-92.

29. Whitten PL, Russell E, Naftolin F. A phytoestrogen diet induces the premature anoveulatory syndrome in lactationally exposed female rats. Biol Repord 1993, 49 (5) : 1117-1121.

พิษเรื้อรังของแบคทีเรียก่อโรคในแมลง *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์แพร่

Chronic Toxicity of Entomopathogenic Bacteria *Bacillus thuringiensis subsp. Israelensis* Phrae strain

ทรงพล ชีวะพัฒน์, ปราณี ชวลิตธำรง**
สดุดี รัตนจรัสโรจน์, เสาวนา เชาวนาคิศัย***
*สถาบันวิจัยสมุนไพร
**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาพิษกึ่งเรื้อรัง *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์แพร่ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ใช้สำหรับควบคุมลูกน้ำยุงลาย ในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ 5 กลุ่ม ๆ ละ 12 ตัวต่อเพศ เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยการกรอกผงแบคทีเรียทางปาก 3 ขนาด คือ 0.04, 0.4, 4.0 และ 40 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (มก./กก.) หรือเทียบเท่า 10, 100, 1,000 และ 10,000 เท่าของขนาดที่คาดว่าคนจะได้รับต่อวัน ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นขนาด 1 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาบางอย่างที่พบในหนูเพศเมีย ได้แก่ การลดลงของ %lymphocyte ในกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียขนาดสูงสุดแต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ จำนวนเกล็ดเลือดที่เพิ่มขึ้นเฉพาะหนูกลุ่มที่ได้รับแบคทีเรียขนาด 4.0 มก./กก. ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของแบคทีเรียที่ให้ ค่าทางชีวเคมีของหนูเพศผู้บางค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมก็ไม่ได้แสดงถึงความผิดปกติใดๆ ส่วนผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยานั้นไม่พบรอยโรคที่บ่งชี้เฉพาะว่าเกิดจากแบคทีเรียนี้ จากผลจากการศึกษาพิษครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์แพร่ ไม่ทำให้เกิดพิษในหนูขาว

ABSTRACT

Subchronic toxicity study of *Bacillus thuringiensis* Phrae strain (N-PR 2502) against *Aedes aegypti* larvae was investigated in five groups of 12 Wistar rats of each sex for 6 months. The powder of bacterial preparation was given orally at the doses of 0.04, 0.4, 4.0 and

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 43 ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2544 หน้า 21-31.

40 mg/kg BW/day, which were equivalent to 10, 100, 1,000, 10,000 folds of estimated daily exposure in human whereas the control group was given 1 ml/kg BW/day of water. Some hematological changes in female rats. i.e. a decrease in the %lymphocyte in the group receiving the highest dose of bacteria was still within normal range and the increase of platelets in the group treated with 40 mg/kg was not dose-dependent. Values of some biochemical parameters. in male rats exhibited statistical differences when compared with the control but they were not suggestive of any abnormalities. Histopathological examination of various organs revealed no pathognomonic lesions caused by the bacteria. The present toxicity study indicated that *B. thuringiensis* Phrae strain produced no toxicity in rats.

Key words : *Bacillus thuringiensis*, toxicity

INTRODUCTION

Microbial larvicides are among the available control agents which have gained more interest during the past few decades, to be applied in control programme of vectors borne diseases. Bacterial larvicide is particularly recognized as the promising one (Anonymous, 1981). A number of *Bacillus* sp. are found possessing larvicidal activity against many species of mosquito (Goldberg and Margalit, 1997 ; Tsuchiyama. 1980 ; Araujo - Coutinho and Lacey, 1990 ; Atwood *et al*, 1992 ; Orduz -Peralta *et al*, 1992) including local Thai stains of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (Benjaphong *et al*, 1987 ; Chowanadisai *et al*, 1995 ; Chowanadisai and U-mai, 1999.)

Bacillus thuringiensis Phrae strain (Chowanadisai and U-mai, 1999.) was proved to exhibit larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae and considered as a control agent to be studied further. Since entomopathogenic bacilli is a spore- forming bacteria producing a number of toxin proteins which are not only toxic toward insect larvae but some may show adverse effect against birds, mammals and invertebrates. Since *B. thuringiensis* Phrae strain is recognized as a candidate strain for further development of bacterial larvicide, safety test of this strain is definitely required. The present study was therefore conducted to investigate any harmful effect that *B. thuringiensis* Phrae strain might cause in rats, a commonly used mammals for toxicity study. The results will serve as a very important preliminary data for further development and safe use of the tested strain of microbial larvicide.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of bacteria

The dry from of *B. thuringiensis* Phrae

strain (Chowanadisai and U-mai, 1999.) was prepared by inoculating the bacterial culture in a test tube contaning 2 ml of Tryptic soy broth and incubating for 3 hours at 37°c. A loopful of bacterial suspension was transferred into a flask containing 100 ml of nutrient broth. The inoculum was shaken at 200 rpm on orbital shaker for 18 hours. Optical density of the inoculum was observed using spectrophotometer operated at 600 nm and adjusted until OD value reached 1. Cultivation of bacterial strain was carried out by transferring 0.5 ml of inoculum into a propagate flask containing 50 ml of solid peptone glucose salt medium, PGSM (Brownbridge and Margalit, 1986). The flasks were incubated at 37°c for 72 hours then scraped the culture with 15 ml of 0.85% sodium chloride. The bacterial cells were pelleted with refrigerated low speed centrifuge operated at 3,000 rpm for 20 minutes. The cells were washed twice with sterile water then lyophilized. The lyophilized form of bacteria was ground then kept in a vacuumed glass vial in a refrigerator until used. Laboratory bioassay to monitor the larvicidal activity was performed. Titration method (de Barjac and Target, 1979) was employed to detect the potency of bacterial powder. Standardization on the potency of the powder preparation of bacteria was at 7,000 International Toxic Unit (ITU) per milligram.

Experimental animals

One hundred and twenty Wistar rats, 60 male rats weighing 200±10g and 60 female rats weighing 150±10 g were purchased from The National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Thailand. The animals were housed in the hygeinic conventional room of Laboratory Animal Center, National Institute of Health, Department of Medical Sciences and were given commercially pelleted diets and clean tap water ad libitum. The temperature in the animal room was kept at 25±1°c. Prior to the experiment, sixty rats of each sex were randomly divided into five groups of 12 animals per sex.

Chronic toxicity study

The six-month chronic toxicity study of *Bacillus thuringiensis* Phrae strain (BT) was performed on five groups of rats. Group 1 (water control) was orally given distilled water at the volume of 1ml/kg BW/day and group 2-5 were orally treated with powder preparation of BT at the does of 0.04, 0.4, 4.0 and 40mg/kg BW/day, which were equivalent to 10, 100, 1,000 and 10,000 folds of estimated daily human exposure, respectively.

During the experiment, body weight and food consumption were measured weekly and the animals were closely observed for signs of abnormalities. At the end of 180-day treatment period, the animals were fasted for 18 hours, then were dissected under ether anesthesia and blood was collected from inferior vena cava for hematological and serum biochemical examinations. Hematological param-

eters comprising %hematocrit, hemoglobin, red blood cells (RBC), red cell indices such as mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), total leukocyte count (WBC), %neutrophil, %eosinophil, %lymphocyte, %monocyte, %basophil, platelet counts and %reticulocyte, were determined by an automatic hematological analyzer (Cell-Dyn 3500 Abbott®). Serum biochemical values were assayed by an automatic chemistry analyzer (Hitachi 912), the parameters measured were alkaline phosphatase (ALP), aspartate transaminase (ALT), alanine aminotransferase (AST), total bilirubin, total cholesterol, BUN, creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, sodium and potassium.

Necropsy was also performed to examine gross pathological lesions of various internal organs. Brain, heart, lung, stomach, liver, kidney, spleen, bladder, ovary and uterus in female, testis in male rats, rats and adrenal glands were weighed and determined in % relative organ weight (g/100 g body weight). Above mentioned organs including trachea, esophagus, pancreas, intestine, seminal vesicle, thyroid gland, lacrimal, salivary and mammary glands, were then preserved in 10% buffered formalin solution and were subsequently subjected to the histological preparing process stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination by veterinary pathologist. The data were statistically analyzed using one way ANOVA and Duncan's multiple range test at $p<0.05$. Histopathological results were analyzed by using Fisher's exact test at $p<0.05$.

RESULTS

Effect of *Bacillus thuringiensis* on Body weight, Food consumption and Relative organ weight.

In male and female rats, there was no difference of average body weight between control and BT-treated groups during 6 months of the experiment (Fig 1). Food consumption of BT-treated male rats did not statistically differ from the water control group throughout the study. In female rats, since wk 1 to wk 5 of the study, the food consumption of BT-treated groups did not differ from that of the water control group but from wk 6 to wk 9 only the group receiving 40 mg/kg/day had significantly more food consumption than the control group ; and thereafter there was no difference of food consumption between the four BT-treated groups and control group through the end of the experiment (Fig 2). At necropsy, no gross pathological lesions were observed in both treated and control groups, except one female rat receiving highest dose of BT developed a skin tumor mass at dorsal of the neck. Most of the relative organ weights of male and female rats receiving BT were not significantly different

from those of the control groups. In male rats, relative weight of lung in the group treated with 4.0 mg/kg of BT and of left kidney in the group treated with 40 mg/kg were significantly lower than those of the control group. Female rats receiving 0.4 and 40 mg/kg of BT had significantly lower relative uterine weights than the control group. (Table 1 and 2)

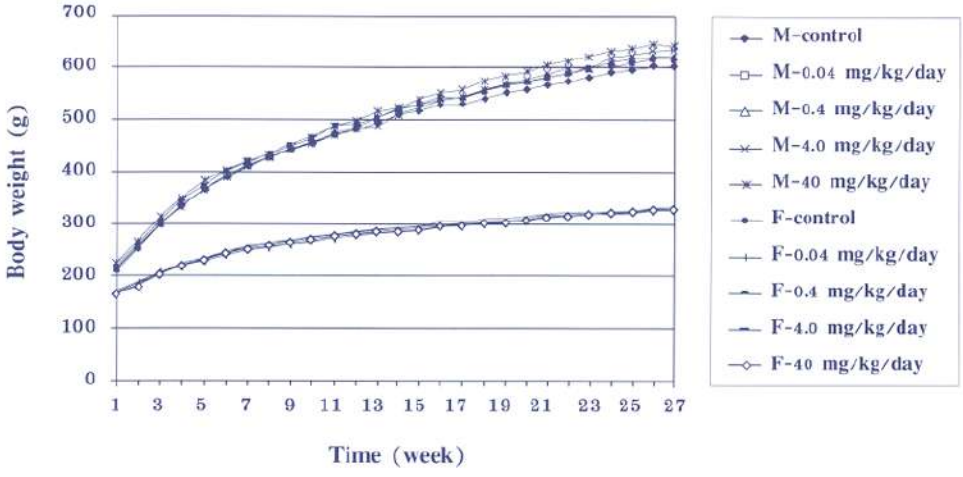


Figure 1 Growth curve of male and female rats treated with *Bacillus thuringiensis* Phrae strain for 6 months.

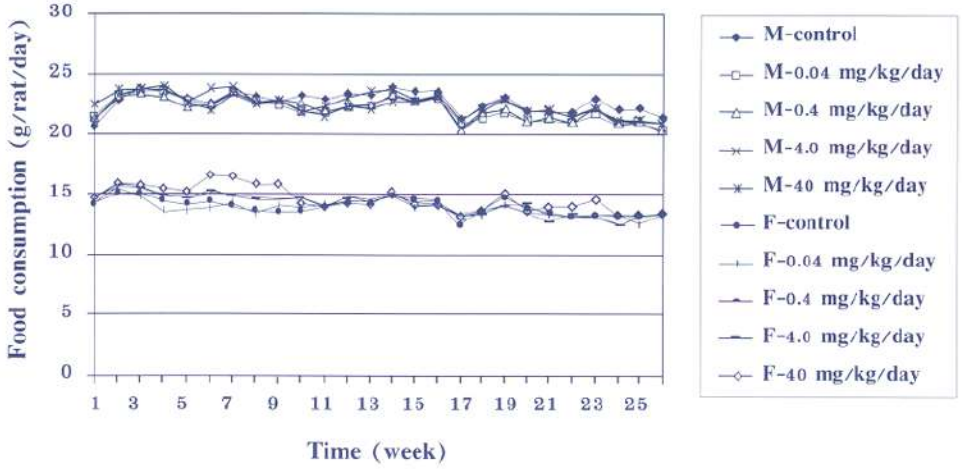


Figure 2 Food consumption of male and female rats treated with *Bacillus thuringiensis* Phrae strain for 6 months.

Table 1 % Relative organ weights of male rats receiving *B.thuringiensis* for 6 months.

Organs	Doses of *B.thuringiensis* (mg/kg/day)				
	Control	0.04	0.4	4.0	40
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Brain	0.37±0.05	0.36±0.31	0.34±0.06	0.34±0.03	0.34±0.04
Heart	0.24±0.04	0.23±0.02	0.24±0.03	0.24±0.03	0.23±0.02
Lung	0.33±0.05	0.31±0.02	0.31±0.02	0.30±0.03*	0.31±0.02
Stomach	0.37±0.05	0.35±0.04	0.37±0.04	0.34±0.03	0.35±0.04
Liver	2.40±0.27	2.31±0.11	2.37±0.17	2.29±0.20	2.34±0.17
Right kidney	0.23±0.02	0.22±0.02	0.23±0.02	0.22±0.01	0.22±0.02
Left kidney	0.22±0.02	0.21±0.02	0.22±0.02	0.21±0.01	0.20±0.02*
Bladder	0.025±0.006	0.024±0.005	0.024±0.003	0.024±0.004	0.023±0.005
Spleen	0.17±0.03	0.17±0.01	0.18±0.02	0.17±0.02	0.30±0.44
Left adrenal gland	0.007±0.002	0.007±0.001	0.007±0.001	0.006±0.001	0.007±0.001
Right adrenal gland	0.007±0.002	0.006±0.001	0.007±0.002	0.006±0.001	0.006±0.001
Left testis	0.56±0.07	0.54±0.05	0.53±0.06	0.53±0.05	0.52±0.04
Right testis	0.56±0.06	0.53±0.05	0.53±0.04	0.53±0.04	0.55±0.12

The values are expressed as mean ± SD

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

Table 2 % Relative organ weights of male rats receiving *B.thuringiensis* for 6 months.

Organs	Doses of *B.thuringiensis* (mg/kg/day)				
	Control	0.04	0.4	4.0	40
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Brain	0.61±0.06	0.61±0.06	0.61±0.05	0.58±0.09	0.61±0.06
Heart	0.29±0.04	0.28±0.04	0.28±003	0.27±0.02	0.26±0.08
Lung	0.43±0.05	0.40±0.04	0.43±0.05	0.41±0.04	0.42±0.06
Stomach	0.50±0.07	0.48±0.08	0.46±0.05	0.48±0.06	0.48±0.07
Liver	2.13±0.16	2.44±0.42	2.14±0.19	2.19±0.23	2.34±0.38
Right kidney	0.26±0.30	0.25±0.02	0.26±0.02	0.24±0.02	0.25±0.02
Left kidney	0.25±0.03	0.24±0.03	0.25±0.02	0.24±0.03	0.24±0.02
Bladder	0.027±0.005	0.026±0.003	0.025±0.003	0.026±0.005	0.025±0.005
Spleen	0.24±0.04	0.21±0.03	0.22±0.03	0.21±0.02	0.27±0.20
Left adrenal gland	0.014±0.003	0.023±0.032	0.013±0.003	0.013±0.002	0.013±0.003
Right adrenal gland	0.013±0.002	0.013±0.001	0.013±0.002	0.14±0.003	0.013±0.004
Uterus	0.34±0.11	0.25±0.06*	0.29±0.07	0.26±0.06	0.28±0.08

The values are expressed as mean ± SD

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

Table 3 **Hematological values of female rats treated with *B.thuringiensis* strain for 6 months.**

Organs	Doses of *B.thuringiensis* (mg/kg/day)				
	Control	0.04	0.4	4.0	40
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Hematocrit (%)	46.78±3.27	46.88±1.26	46.41±2.43	45.36±4.61	46.46±1.74
RBC (K/uL)	9.26±0.60	9.09±0.43	9.07±0.37	8.85±0.65	9.12±0.33
Hb (g/dl)	15.96±0.44	15.45±0.40	15.36±0.59	15.58±0.66	15.45±0.48
MCV (m3)	50.53±2.16	5.164±1.45	51.23±2.92	51.13±2.87	50.96±01.45
MCH (pg)	17.03±1.00	17.03±0.49	16.95±0.93	17.68±1.35	16.96±0.54
MCHC (%)	33.77±2.24	32.99±0.41	33.11±0.78	34.74±3.53	33.28±0.62
WBC (K/uL)	5.16±1.01	5.15±0.97	4.83±1.02	4.88±0.67	5.07±0.90
Neutrophil (%)	13.53±3.79	14.65±5.36	14.48±3.19	15.73±3.03	14.95±3.50
Eosinophil (%)	1.51±0.46	1.29±0.37	1.53±0.58	1.85±0.58	1.57±0.55
Lymphocyte (%)	80.91±3.61	78.31±6.34	78.49±4.50	77.30±5.17	79.52±4.62
Monocyte (%)	1.70±0.11	3.22±2.70	3.01±1.91	2.77±2.87	1.83±1.49
Basophil (%)	2.35±0.45	2.53±0.73	2.49±1.18	2.35±0.94	2.11±0.77
Platelet (%)	950.17±100.76	919.21±101.28	881.71±120.42	856.96±94.51	959.29±118.62
Reticulocyte (%)	3.10±0.61	3.27±0.50	2.96±0.60	3.08±0.50	3.16±0.44

The values are expressed as mean ± SD

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

Effect of *Bacillus thringiensis* on hematological values.

There was no difference in almost all hematological parameters between water control and BT-treated groups in both sexes. However, female rats receiving 40 mg/kg/day of BT had significantly lower %lymphocytes than the water control group. In addition, female rats receiving BT at the dose of 4.0 mg/kg had the significantly higher number of platelets than the control group (Table 3 and 4).

Table 4 Hematological values of female rats treated with *B. thuringiensis* for 6 months.

Parameters	Doses of *B.thuringiensis* (mg/kg/day)				
	Control	0.04	0.4	4.0	40
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Hematocrit (%)	44.94±1.56	45.06±2.13	44.37±2.11	44.78±2.49	41.85±7.76
RBC (K/ul)	8.12±0.35	8.22±0.50	8.06±0.32	8.19±0.44	7.64±1.24
Hb (g/dl)	15.23±0.53	15.00±0.52	14.96±0.61	15.00±0.41	14.23±2.53
MCV (fl/red call)	55.40±1.57	54.89±1.53	55.09±2.65	54.64±2.07	54.48±2.51
MCH (pg/red call)	18.8±0.75	18.29±0.77	18.60±0.96	18.40±1.04	18.60±1.29
MCHC (g/dl RBC)	33.98±1.33	33.32±0.69	33.81±1.59	33.74±2.46	34.25±3.01
WBC (K/uL)	2.66±0.72	3.16±2.45	2.80±0.65	3.14±0.70	4.68±6.02
Neutrophil	15.07±3.42	14.35±3.60	18.07±7.55	18.27±8.71	22.81±17.10
Eosinophil (%)	1.90±0.68	1.64±0.55	1.63±0.65	1.94±0.75	1.91±0.81
Lymphocyte (%)	78.58±4.28	79.76±4.05	76.85±8.35	76.26±8.33	66.78±19.65*
Monocyte (%)	2.87±2.74	2.63±2.49	1.74±1.32	1.86±1.52	1.95±1.20
Basophil (%)	1.58±0.85	1.62±0.50	2.01±0.98	1.67±0.61	2.51±1.79
Platelet (K/uL)	814.13±111.45	877.17±105.38	838.25±87.72	912.50±69.97*	881.92±70.99
Reticulocyte (%)	3.50±0.95	2.86±0.41	3.11±0.72	3.30±0.81	3.02±0.60

The values are expressed as mean ± SD

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

Effect of *Bacillus thringiensis* on biochemical values

Male rats receiving 40 mg/kg/day of BT had significantly lower ALT level than the water control and total protein level of male rats receiving BT at the dose of 4.0 mg/kg was significantly lower than that of the control group. Bilirubin levels of the male rats receiving BT at the dose of 0.04, 4.0 and 40 mg/kg were significantly higher than that of the control group. In female rats, there was no difference of all biochemical parameters between the BT-treated groups and the control group (Table 5 and 6)

Table 5 Biochemical values of male rats treated with *B. thuringiensis* for 6 months

Parameters	Doses of *B.thuringiensis* (mg/kg/day)				
	Control	0.04	0.4	4.0	40
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
ALP (U/L)	47.42±15.93	53.58±23.12	44.00±15.56	45.67±13.88	44.33±14.28
ALT (U/L)	36.25±6.13	33.17±9.42	38.42±7.42	33.50±5.13	30.00±4.77*
AST (U/L)	68.92±14.90	64.50±5.40	72.67±11.81	66.00±6.69	61.75±8.54
Total protein (g/dl)	6.80±0.36	6.73±0.20	6.80±0.18	6.56±0.32*	6.76±0.17
Albumin (g/dl)	3.52±0.26	3.49±0.21	3.50±0.24	3.43±0.23	3.44±0.19
Globulin (g/dl)	3.28±0.34	3.23±0.21	3.30±0.22	3.11±0.16	3.32±0.19
Bilirubin (mg/dl)	0.09±0.03	0.07±0.02*	0.09±0.02	0.05±0.02*	0.07±0.03*
BUN (mg/dl)	18.50±2.44	17.70±2.01	17.42±2.66	17.01±0.02	17.88±2.80
Creatinine(mg/dl)	0.66±0.07	0.66±0.04	0.65±0.06	0.63±0.05	0.67±0.06
Glucose (mg/dl)	177.27±37.09	166.23±21.50	161.95±37.34	156.80±27.32	162.11±22.95
Uric acid (mg/dl)	2.32±1.47	1.68±0.97	1.46±1.09	1.55±1.28	1.58±0.84
Ttriglyceride (mg/dl)	160.26±65.19	183.87±57.32	174.68±41.56	177.14±73.85	170.97±42.28
Cholesterol (mg/dl)	89.79±18.96	87.79±23.88	77.59±13.12	77.29±15.08	89.84±13.23
Na^+ (mmol/l)	144.58±2.58	145.08±2.61	145.33±2.17	146.25±2.30	146.58±2.81
K^+ (mmol/l)	5.83±9.94	5.67±0.65	5.70±0.59	5.79±0.90	5.29±0.85

The values are expressed as mean ± SD

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

Table 6 Biochemical values of female rats treated with *B. thuringiensis* for 6 months

Parameters	Doses of *B.thuringiensis* (mg/kg/day)				
	Control	0.04	0.4	4.0	40
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
ALP (U/L)	28.83±17.97	29.17±15.60	30.08±19.07	33.17±20.88	42.75±39.48
ALT (U/L)	37.50±10.87	32.92±7.99	33.75±4.63	33.50±5.58	32.92±7.14
AST (U/L)	74.50±16.33	69.83±15.01	73.58±9.95	66.58±12.81	96.92±22.03
Total protein (g/dl)	6.98±0.04	6.84±0.32	6.92±0.37	6.91±0.30	6.93±0.47
Albumin (g/dl)	3.78±0.31	3.71±0.26	3.75±0.24	3.81±0.25	3.70±0.34
Globulin (g/dl)	3.21±0.26	3.13±0.24	3.16±0.29	3.10±0.18	3.22±0.25
Bilirubin (mg/dl)	0.10±0.04	0.09±0.05	0.09±0.05	0.07±0.03	0.07±0.04
BUN (mg/dl)	20.63±4.42	20.68±0.20	18.07±2.45	19.15±2.46	19.94±2.63
Creatinine(mg/dl)	0.73±0.11	0.72±0.08	0.67±0.06	0.68±0.07	0.68±0.08
Glucose(mg/dl)	148.49±37.13	142.63±26.56	136.76±24.10	145.03±17.82	153.15±21.75
Uric acid (mg/dl)	1.95±1.35	1.65±0.54	1.48±0.66	1.43±0.43	1.73±0.71
Triglyceride (mg/dl)	137.49±53.62	128.46±44.38	137.51±63.38	176.71±61.58	167.52±56.67
Cholesterol (mg/dl)	79.82±19.14	72.28±18.42	73.60±15.10	82.04±15.12	75.00±23.62
Na+ (mmol/l)	146.00±2.45	146.00±1.65	146.58±1.83	146.42±1.38	147.42±1.83
K+ (mmol/l)	5.47±0.97	5.30±0.83	5.24±0.96	4.93±0.68	4.90±0.77

The values are expressed as mean ± SD

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

Effect of *Bacillus thringiensis* on histopathological alterations.

Histopathological results of visceral organs from BT-treated rats were summarized in Table 4. Lymphoid proliferations at peribronchioles in some rats were observed in both control and bactrial-treated groups but the incidence of lung lesions did not show and difference. One female rat of the highest dose group developed focal metastatic basal cell tumor in the lung, which spread from a skin mass lesion. The incidence of liver fatty degeneration in male rats treated with BT at the doses of 0.4, 4.0 and 40 mg/kg/day were statistically higher than that of the control ($p<0.05$) and the hepatic lesions were charac-

terized as perilobular pattern. We also found focal myocardiosis with mononuclear cells infiltration in some male group, focal renal tubular cyst in some groups of both sexes, renal tubular cast in all female groups and adrenal cortical fatty degeneration in male rats. The incidence of these lesions did not show dose-dependent manner. The incidence of interstitial edema of the testicles in male rats receiving BT at the dose of 0.04 and 40 mg/kg were statistically lower than that of the control ($p<0.05$). No remarkable lesions appeared in brain, esophagus, stomach, pancreas, spleen, large intestine, urinary bladder, thyroid gland, salivary or lacrimal gland in the control and BT-treated groups. (Table 7)

Table 7 Histopathological examination of organs from rats treated with *B. thuringiensis* for 6 months

Organs	Microscopic findings	Doses of *B. thuringiensis* (mg/kg/day)									
		Male					Female				
		Control	0.04	0.4	4.0	40	Control	0.04	0.4	4.0	40
		n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Lung	lymphoid proliferated peribronchioles	6/12	2/12	3/12	5/12	5/12	4/12	3/12	2/12	3/12	2/12
Heart	Focal myocadiosis	1/12	0/12	0/12	2/12	2/12	NF	NF	NF	NF	NF
Liver	Fatty degeneration	2/12	6/12	7/12*	8/12*	8/12*	0/12	1/12	0/12	0/12	0/12
Kidney	Focal tubular cyst	0/12	0/12	2/12	2/12	0/12	1/12	0/12	0/12	0/12	
	Tubular cast	NF	NF	NF	NF	NF	8/12	10/12	9/12	7/12	11/12
Small intestine	Lymphoid aggregated in submucosa	1/12	3/12	1/12	2/12	3/12	1/12	0/12	2/12	2/12	
Testis	Interstitial edema	2/12*	9/12	4/12	1/12*						
Ovary	Follicular cyst						1/12	0/12	0/12	1/12	0/12
Uterus	Subendometrial gland hyperplasia						2/12	1/12	2/12	0/12	0/12
Adrenal gland	Cortical fatty degeneration	4/12	6/12	3/12	3/12	5/12	NF	NF	NF	NF	NF

The data are expressed as number of rats with pathological finding/ total number of rats examined.

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

NF=not found

DISCUSSION

The chronic toxicity study of *B. thuringiensis* Phrae strain (BT) in Wistar rats revealed that BT had no effects on growth and it did not suppress food consumption. Most of the relative organ weights of the BT-treated group were not significantly different from those of the control groups. The decreases of relative lung weight in male rats receiving 4.0 mg/kg of BT and of uterine weight in female rats treated with 0.04 and 40 mg/kg of BT were not dose-dependent. Relative left kidney weight decreased in only male rats receiving 40 mg/kg of BT but it did not occur in female rats receiving the same dose of BT. Therefore , the reductions of these organs weight were not probably due to the effect of BT. Hematological examination indicated that bacteria did not affect hematological parameters. The decrease in % lymphocyte found in female rats receiving 40 mg/kg of bacteria was still within normal range (Shayne, 1992) therefore, it was not a significant change. An increase of platelets in only female rats receiving 4.0 mg/kg of bacteria did not show any dose response relationship; hence, it was not likely due to the effect of BT.

With regard to the effects of BT on blood chemistry, it appeared that BT did not affect most of the biochemical parameters. The significantly decreased ALT level occurred in male rats treated with 40 mg/kg of BT whereas it did not occur in female rats receiving the same dose of BT: therefore, it might not be the effect of BT. The decreased total protein and bilirubin levels occurred in certain groups of animals and were not a dose-dependent reduction ; hence, it could not be concluded that BT contributed to these changes.

Histopathological lesions occurring in lung, heart, kidney, small intestine, testis, ovary, uterus and adrenal gland as shown in Table 4 were not dose-related increases. Male rats receiving BT at the doses of 0.4, 4.0 and 40 mg/kg/day had statistically higher incidence of liver fatty degeneration ($p < 0.05$); however, the severity of hepatic lesions was only mild degree of focal fatty degeneration which should not be specifically indicative of hepatotoxic effects of the bacteria. In addition, the incidence did not show a clear dose-related increase and the lesion did not occur in female rats treated with the same dose of BT. No remarkable lesions were observed in other organs studied. Hence, histopathological results in this study suggested that BT did not cause harmful effects on visceral organs.

CONCLUSION

Six-month chronic toxicity study of entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis* Phrae strain was investigated by oral adminitration of bacterial powder preparation to Wistar rats at the doses of 0.04, 0.4,

4.0 and 40 mg/kg/day which were equivalent to 10, 100, 1000 and 10000 folds of estimated daily human exposure. The bacteria did not suppress growth and food consumption of the animals nor cause any significant changes of hematological or biochemical parameters. Histopathological changes found in some internal organs were not suggestive of bacterial toxicity. Our study revealed no toxic effects in rats treated with the bacterial preparation of *B. thuringiensis* Phrae strain at the doses given.

ACKNOWLEDGEMENT

This investigation received partial support from world Health Organization. We are grateful to Dr. Anuthep Rangsipipat, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Chulalongkorn University for histopathological examinations of tissue slides, Dr.Anchalee Chuthaputti for her suggestion in manuscript preparation, Mr. Somkiat Punkyamang for his technical assistance in the project and the staffs of the Animal Center of National Institute of Health for the facilities.

RERERENCES

Anonymous. Fifth Meeting on the Scientific Working Group on Biological Control of Vectors. Mimeo graphed document TDR/VEC-SWG (5)/813, 1981.

Araujo-coutinho CJPC, Lacey LA. Field evaluation of Bacillus thuringiensis var. israelensis for control of black flies in the north littoral zone of Brazil Sao Paolo State. Entomol Abst 1990; 22; 84.

Atwood Dw, Robinson JV, Meisch MV, Olson JK, Johnson Dr. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var israelensis against larvae of the southern buffalo gnat. Cnephia pecuarum (Diptera: Simuliidae), and the influence of water temperature. J Am Mosq Cont Assic 1992; 8: 126-30.

Barjac H de, Larget I. Proposals for the adoption of a standardized bioassay method for the evaluation of insecticdal formulations derived from serotype H-14 of insecticidal formulations derived from serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. Mimeographed document WHO/VBC/ 79.744, 1979.

Benjaphong N. Chowanadisai L, Booyabuncha S, Phanthumchinda P.A collection, isolation and efficacy test of local pathogenic bacilli against mosquito larvae. Bull Dept Med Sci 1987; 29: 1-11

Brownbridge M, Margalit J. New *Bacillus thuringiensis* strains isloated in Israel are highly toxic to mosquito larvae. J Inverte Pathol 1986; 48; 216-22.

Chowanadisai L, Thanasripukdikul S, Wongwanich S, *et al.* The isolated entomopathologic bacteria from

Ayutthaya province, Thailand possessing toxicity against mosquito larvae. Bull Dept Med Sci 1995; 37; 187-95.

Chowanadisai L, U-mai N. Search for Local Strains of *Bacillus thuringiensis* in Thailand for Controlling *Aedes aegypti*, Vector of Dengue Haemorrhagic Fever. Bull Dept Med Sci 1999; 41 : 245-54.

Goldberg LJ, and Margalit L. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal actiivity against *Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univittatus,* Aedes aegypti and Culex pipiehs, Mosq News 1977; 37: 355-58.

Orduz-Peralta S, Diaz T, Restrepo N, et al. Isolation and characterization of four new strains of *Bacillus thuringiensis* from Central Nigeria highly toxic to mosquito larvae. J Inverte pathol 1992; 60: 107-8.

Shayne CG. The Rat. In : Shayne CG and Christopher PC, eds. Animal models in toxicology New York: Marcel Dekker Inc, 1992 : 78-81.

Tsuchiyama A. Pathogenicity of *Bacillus sphaericus* to larvae of *Culex pipiens.* J Appl Entomol Zool 1980; 24: 93-7.

พิษเรื้อรังของกวาวเครือแดง

Chronic Toxicity of *Butea superba* Roxb.

ปราณี ชวลิตธำรง, ทรงพล ชีวะพัฒน์**
สมเกียรติ ปัญญามั่ง, สดุดี รัตนจรัสโรจน์**
*เรวดี บุตราภรณ์***
*สถาบันวิจัยสมุนไพร
**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ

กวาวเครือแดง (*Butea superba* Roxb.) เป็นสมุนไพรกวาวเครือซึ่งมีสรรพคุณเป็นยาอายุวัฒนะ นิยมใช้มากในกลุ่มชายไทยเพื่อเสริมสมรรถภาพทางเพศ แต่ไม่มีรายงานการศึกษาวิจัยถึงพิษของกวาวเครือแดง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาพิษเรื้อรังของผงกวาวเครือแดงในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์เพศผู้และเพศเมียระยะเวลา 6 เดือน โดยแบ่งหนูขาวเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่น 10 มล./กก./วัน และหนูขาวกลุ่มทดลอง 5 กลุ่ม โดยที่กลุ่มที่ 1 ถึงกลุ่มที่ 4 ได้รับผงกวาวเครือแดงที่สกัดจากส่วนรากในขนาด 10, 100, 250 และ 1000 มก./กก./วัน โดยป้อนเข้าทางปากตามลำดับ กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มสำหรับศึกษา recovery ได้รับผงกวาวเครือแดงในขนาด 1000 มก./กก./วัน ผลการศึกษาพบว่าผงกวาวเครือแดงในขนาด 10 มก./กก./วัน ไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีและพยาธิสภาพของอวัยวะภายในสัตว์ทดลอง ส่วนสัตว์ทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือแดงในขนาดตั้งแต่ 100 มก./กก./วัน ขึ้นไป พบการปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีและพยาธิสภาพของอวัยวะภายใน โดยเฉพาะหนูขาวที่ได้รับผงกวาวเครือแดงขนาดสูงสุดนั้น ผลทางชีวเคมีพบว่าระดับเอนไซม์ Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP) และ bilirubin ซึ่งแสดงถึงการทำงานของตับเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้จากการตรวจสอบทางจุลพยาธิพบว่าความผิดปกติที่ตับหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือแดงมีอัตราสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผงกวาวเครือแดงในขนาด 250 มก./กก./วัน และมากกว่าทำให้เกิดพยาธิสภาพของอวัยวะภายในของหนูขาวโดยเฉพาะที่ตับ

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 43 ฉบับที่ 3 พ.ศ. 2544 หน้า 182-186.

ABSTRACT

Butea superba Roxb. or 'Kwao-kreu dang' in Thai, is one of the traditional medicinal plants being claimed as a rejuvenating drug. Products containing *B. superba* are increasingly used among Thai men. The safety of taking *B. superba* , however, has not been scientifically reported. We, therefore, performed a six-month chronic toxicity study of *B. superba* powder in 6 groups of both sexes of Wistar rats. The control group received 10 ml of distilled water/kg BW/day. Among five experimental groups, four of them were given *B. superba* at the doses of 10, 100, 250 and 1000 mg/kg BW/day, respectively. For a recovery study, the fifth group received 1000 mg/kg BW/day. No significant changes in hematological, biochemical and histopathological parameters were observed at the dose of 10 mg/kg BW/day. Hematological and biochemical changes were demonstrated in male and female rats receiving the *B. superba* at the dose of 100 mg/kg BW/day and higher. The significant difference found in hematological parameters was, however, not dose-dependent. Significant changes in blood chemistry were shown in both sexes of animals particularly at the doses of 250 and 1000 mg/kg BW/day. The groups of rats with the highest doses of *B. superba* had significantly higher levels of Aspartate amino transferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP), bilirubin and BUN than those of control groups. In contrast, the levels of cholesterol, total protein, albumin and glucose of those highest dose group were significantly lower than the controls. Histopathological studies indicated that the rats receiving the highest dose of B. *superba* and significant high rates of liver lesions which were hepatocyte megalocytosis, lymphoid aggregated periportal area and bile duct proliferation. Our results showed that orally giving *B. superba* at the dose of 250 mg/kg BW/day and higher was toxic to internal organs, particularly the liver of the Wistar rats.

Key words : *Butea superba* , chronic toxicity, toxicity

INTRODUCTION

Butea superba Roxb., known as Kwao-kreu dang in Thai, is a plant in the Papilionaceae family (Smitinand, 1989). It is mostly found in the northern part of Thailand. *B. superba* is a climbing tree with a long tuberous root. Its sap is red when the root is cut (Pongboonrod, 1971 : Tiangburanatham, 1988). It is, therefore, identified as Kwao-kreu dang or red Kwao-kreu. Chemical constituents of *B. superba* which have been reported are 3, 7, 3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavone and 3,3'-Dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside. Both compounds were effective in inhibiting cAMP phosphodiesterase (*Roengsumran et al.*,

2000).

B. superba has been used as a natural product for physical and mental strength and for prevention of age-related health problems. In Thai traditional medicine *B. superba* is a rejuvenating herb for men, Its use is, therefore, increasing particularly among Thai men. According to traditional use, recommended amount taken for an average body weight of 50 kg is approximate to a pepper-sized seed, which is about 50 mg/day (Loung-Anusarnsoontorn, 1931). Current commercial products contain a higher amount of *B. superba* than the recommended one. Despite the fact that more people frequently consume the products, no toxicity study has been reported. We, therefore, performed a chronic toxicity study of *B. superba* to examine its effects on several organs and their functions in male and female Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of *Butea superba*

Tuber roots of B*utea superba* were collected from Saraburi Province and were identified by Associate Professor Yutthana Smittasiri, Faculty of Sciences, Mae Fah Loung University. The roots were washed, air-dried, peeled and then sliced into thin pieces. All sliced-pieces were dried in a hot air oven at 50°C. After being completely dried, they were ground and passed through a seive number 100 to get fine powder. A chromatographic finger-print by high performance liquid chromatography (HPLC) indicated the main peak of *B. superba* crude extract was at 22.23 minutes. The powder was suspended to desired concentrations with distilled water.

Treatment of the animals

A Total of 174 Wistar rats obtained from the National Laboratory Animal Center. Mahidol University, Nakornpathom, Thailand were used in the study. They consisted of 87 male rats and 87 female rats with weights 300±20 g and 200±20 g. respectively. The animals were housed in animal facility of the Department of Medical Sciences. The temperature in animal room was kept at 25±1°C with 60% relative humidity. The animals were allowed to have free access to food and clean water.

Chronic toxicity study

Eighty-seven Wistar rats of each sex were randomly divided into 6 groups. The first group was a control group with 15 rats of each sex and was orally given 10 ml of distilled water/kg BW/day. The 2^{th}- 5^{th} groups contained 15, 15, 12, 15 and 15 animals of each sex and daily received a suspension of *B. superba* at the doses of 10, 100, 250, and 1000 mg/kg BW/day, respectively for 6 months. The 6^{th} group was a recovery group which received *B. superba* suspension at the dose of 1000 mg/kg BW/day.

Body weights and food consumption were measured weekly and the animals

were observed for signs of abnormatilities throughout the study. At the end of six-months treatment, the 1st - 5th groups of rats were fasted for 18 hours, anesthetized with ether and sacrificed after drawing blood samples from the inferior vena cava for hematological and biochemical examinations. The recovery group was set up to continue feeding without giving the *B. superba* suspension for another 14 days before sacrificing.

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyser (Cell Dyn 3500, Abbott). Hematological parameters measured were white blood cell (WBC), %neutrophil, %lymphocyte, %monocyte, %eosinophil, %basophil, red blood cell (RBC), hemoglobin, hematocrit Hct), platelet, and reticulocyte.

Biochemical analysis of serum samples was performed using an automatic chemistry analyser (Hitachi model 912). Biochemical parameters measured were alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein, albumin, bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium and potassium.

The position, shapes, sizes and colors of internal organs, namely, brain, heart, both kidneys and lungs, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intestine, spleen, bladder, and testis in male rats or ovary and uterus in female rats were visually observed for any signs of gross lesions. These organs were collected, weighed to determine relative organ weights, and then preserved in 10% buffered formalin solution. Histopathological sections were prepared and stained with hematoxylin and eosin. After staining, the sections were examined by a veterinary pathologist.

Statistical Analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test, using SPSS/PC program. The Fisher's Exact test was used for analysis of Histopathological data. Significance levels were set at $p<0.05$.

RESULTS

In the present study, one male rat in the control group, one female rat in the control group, one male rat given *B. superba* at the dose of 100 mg/kg BW/day and 3 female rats in the group receiving the suspension of *B. superba* at the dose of 250 mg/kg BW/day died during the experiment. The deaths of these animals were not due to the effect of *B. superba* since histopathological examinations revealed no damage in any internal organs (data not shown). The rest of the animals, except in the groups receiving the highest doses, survived throughout the

study.

Effect of Butea superba on body weights and food intake

The body weights of the male rats receiving *B. superba* at the doses of 10, 100 and 250 mg/kg BW/day were not different from those of the water control group. The body weights of the female rats receiving *B. superba* at the doses of 10 and 100 mg/kg BW/day were significantly higher than those of the water control group from the first week to the 13th week but no significant difference was found after the 13th week. The body weights of the female rats receiving *B. superba* at the dose of 250 mg/kg BW/day were significantly lower than the control. (figure 1).

It was found that the food intake of both male and female animals treated with 10 and 100 mg/kg BW/day of B. superba was significantly lower than that of the control groups in some weeks (Figure 2,3). In male rats given 250 mg/kg BW/day of the extract, the food consumption was significantly lower in every week through-out the study as compared with the controls (Figure 2), whereas the food consumption of the female rats receiving *Butea superba* at the dose of 250 mg/kg BW/day was significantly lower than that of the control group in some weeks (Figure 3).

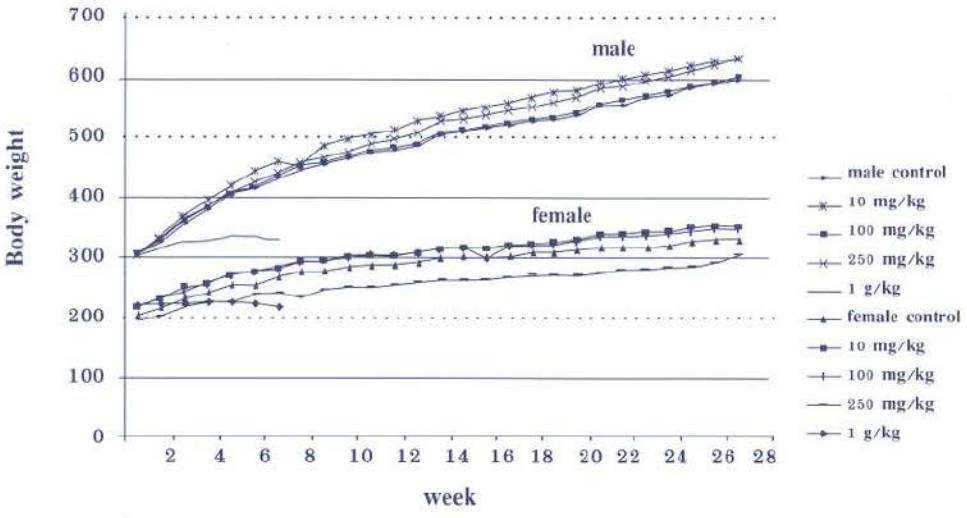


Figure 1 An average of weekly body weights (grams) of rats treated with Butea superba for 6 months.

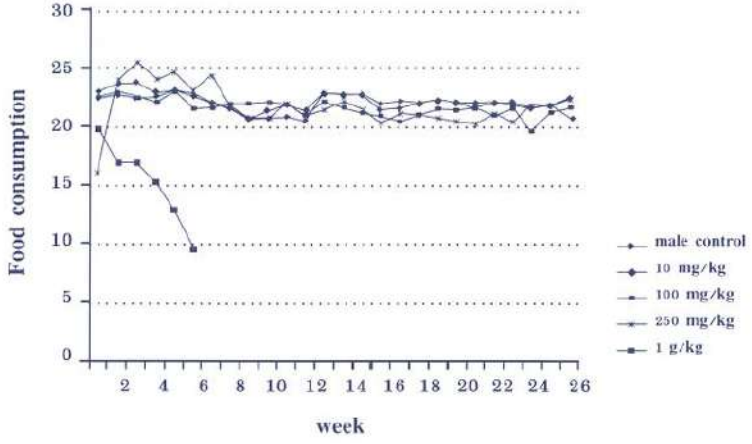


Figure 2 An average of weekly food consumption (grams) of male rats treated with *Butea superba* for 6 months.

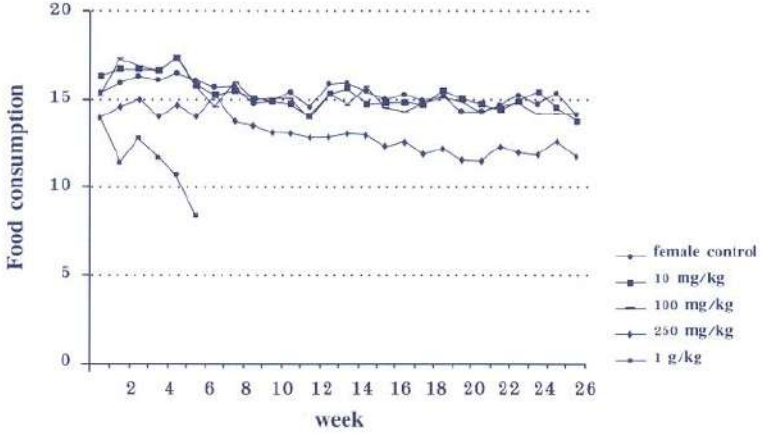


Figure 3 An average of weekly food consumption (grams) of female rats treated with *Butea superba* for 6 months.

After receiving *B. superba* at the dose of 1000 mg/kg BW/day, both male and female animals of the 5th and the 6th groups were remarkably weak. Their body weights were observed to be lower than those of the control groups (Figure 1). The animals were started to die from day 24 of the study. It was found that of the 30 animals in each sex, 6 male and 5 female rats died after receiving the suspension for 24 to 40 days. The rest of these rats were then sacrificed after days 39-43 of the experiments for further examinations.

Effect of *Butea superba* on relative organ weights

No significant difference in the relative weights (g/kg BW) of the brain, the heart, the kidneys (left and right), the liver, the spleen, the stomach, and the lung of both male and female rats given *B. superba* at the doses of 10, 100 mg/kg BW/day was shown (Table1, 2) . The relative weight of the testis (left and right) of the male rats treated with *B. superba* at these doses was not different from their controls. It was found that the relative weight of the urinary bladder of the male group treated with the dose of 10 mg/kg BW/day was significantly lower than its control group (Table 1).

In male rats receiving *B. superba* 250 mg/kg BW/day, the relative weight of the liver was significantly lower but that of the spleen was significantly higher as compared with the control group (Table 1). The female group treated with the same dose had significantly higher weights of the brain, the spleen, the lung and the right kidney relative to the controls (Table 2).

Both male and female rats given *B. superba* at the dose of 1000 mg/kg BW/day, (Table 1, 2) showed significantly higher weights in every organ relative to the control groups.

Table 1 Relative organ weights (g/kg BW) of male rats treated with *Butea superba* for 6 months.

Organs	Group of male rats				
	Control N=14	10 mg/kg BW/day N=15	100 mg/kg BW/day N=14	250 mg/kg BW/day N=12	1000 mg/kg BW/day N=24
Brain	3.64±0.32	3.45±0.28	3.64±0.34	3.58±0.29	5.96±0.56*
Heart	2.42±0.23	2.44±0.42	2.36±0.26	2.35±0.26	3.12±0.32*
Right kidney	2.31±0.24	2.20±0.21	2.34±0.31	2.37±0.16	3.57±0.33*
Left kidney	2.24±0.23	2.11±0.19	2.23±0.29	2.29±0.16	3.41±0.03*
Urinary bladder	0.294±0.074	0.236±0.045*	0.271±0.068	0.239±0.067	0.376±0.05*
Liver	22.99±2.06	23.26±1.96	21.91±2.43	21.04±2.90*	24.76±6.59*
Spleen	1.69±0.17	1.70±0.21	1.75±0.18	1.99±0.38*	3.33±0.64*
Stomach	3.58±0.39	3.41±0.24	3.48±0.41	3.81±0.52	5.65±0.67*
Lung	3.15±0.45	2.91±0.41	3.08±0.23	3.20±0.40	4.48±0.44*
Right testis	5.47±0.54	5.24±0.59	5.45±1.01	5.34±0.36	7.13±1.23*
Left testis	5.43±0.62	5.28±0.54	5.29±1.12	5.37±0.54	7.19±1.14*

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different form the water control group ($p<0.05$)

Table 2 **Relative organ weights (g/kg BW) of female rats treated with *Butea superba* for 6 months.**

Organs	Group of female rats				
	Control N=14	10 mg/kg BW/day N=15	100 mg/kg BW/day N=15	250 mg/kg BW/day N=9	1000 mg/kg BW/day N=25
Brain	6.15±0.65	5.81±0.58	5.83±0.54	6.83±1.00*	8.60±0.89*
Heart	2.85±0.34	2.84±0.22	2.80±0.40	2.90±0.22	3.28±0.41*
Right kidney	2.63±0.30	2.61±0.28	2.66±0.28	2.93±0.36*	3.49±0.82*
Left kidney	2.56±0.35	2.44±0.22	2.48±0.23	2.68±0.30	3.46±0.39*
Urinary bladder	0.28±0.04	0.28±0.07	0.26±0.05	0.27±0.05	0.32±0.09*
Liver	23.08±2.91	22.57±2.80	22.19±2.47	23.91±1.81	30.46±3.98*
Spleen	2.37±0.38	2.31±0.30	2.29±0.32	2.85±0.81*	3.47±0.59*
Stomach	4.88±0.84	4.70±0.57	4.97±0.72	5.47±1.10	6.82±1.15*
Lung	4.11±0.35	4.05±0.52	3.95±0.41	4.74±0.44*	5.49±0.43*

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different form the water control group ($p<0.05$)

Effect of *Butea superba* on hematological parameters

Significant differences in the number of white blood cells, %neutrophil, %lymphocyte, %monocyte, %eosinophil, %basophil, the number of red blood cells, hematocrit, hemoglobin, platelets, and the number of reticulocytes were not seen in either sex of the rats receiving 10 mg/kg BW/day of *B. superba* (Table 3,4).

The female rats given *B. superba* at the dose of 100 mg/kg BW/day had no significant changes in any hematological parameters tested (Table 4) whereas the male rats receiving the suspension at the same dose had significant decreases in the number of RBC and the percentages of basophil (Table 3).

At the dose of 250 mg/kg BW/day, the female group showed significant decreases in the number of RBC, and hematocrit and significant increases in the number of WBC, and the percentages of monocyte were shown as compared with the corresponding control group (Table 4). The male rats given *B. superba* at the dose of 250 mg/kg BW/day had significant increase in % eosinophil, while significant differences in the numbers of RBC and the percentages of basophil was shown compared to the controls (Table 3).

The numbers of white blood cells,

reticulocyte and %monocyte of the female rats receiving *B. superba* at the dose of 1000 mg/kg BW/day were significantly higher than the control group but the %basophil and platelet of this group of rats were significantly lower than the control group (Table 4). The male rats receiving the highest dose of the *B. superba* suspension (Table 3) exhibited significantly increased in the number of white blood cells, %neutrophil, %monocyte and reticulocyte but %basophil, %lymphocyte, the number of red blood cells and platelet were significantly lower than those of the control group.

Table 3 Hematological examinations of male rats treated with *Butea superba* for 6 months.

Parameters	Group of male rats				
	Control N=14	10 mg/kg BW/day N=15	100 mg/kg BW/day N=14	250 mg/kg BW/day N=12	1000 mg/kg BW/day N=24
white blood cell (K/(μl)	5.04±0.99	5.45±1.13	4.75±0.66	5.29±0.91	11.73±5.57*
neutrophil (%)	15.42±4.01	15.13±3.67	16.30±3.31	15.20±5.21	24.74±14.41*
lymphocyte (%)	77.89±5.16	77.99±5.45	76.30±4.29	76.10±8.48	57.70±19.87*
monocyte (%)	2.88±2.22	3.61±2.87	4.13±2.34	5.17±4.02	14.29±9.22*
eosinophil (%)	1.55±0.59	1.45±0.56	1.63±0.50	2.15±1.02*	1.87±0.79
basophil (%)	2.25±0.56	1.83±0.80	1.65±0.42*	1.40±0.66*	1.42±0.87*
red blood cells (x10^6 K/(μl)	9.31±0.53	9.18±0.44	8.85±0.52*	8.90±0.49*	8.40±1.39*
hemoglobin (g/dl)	15.66±0.71	15.53±0.40	15.50±0.61	16.07±0.63	14.70±2.21
hematocrit (%)	47.23±2.71	46.15±1.73	45.86±2.38	45.68±2.72	44.14±7.27
platelet (K/(μl)	908±50	876±79	858±106	945±118	468±129*
reticulocyte	230±30	220±46	232±46	266±114	399±189*

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different form the water control group ($p<0.05$)

Table 4 Hematological examinations of female rats treated with *Butea superba* for 6 months.

Parameters	Group of Female rats				
	Control N=14	10 mg/kg BW/day N=15	100 mg/kg BW/day N=15	250 mg/kg BW/day N=9	1000 mg/kg BW/day N=24#
white blood cell (K/μl)	2.53±0.55	2.81±0.63	2.71±0.44	4.60±3.62*	5.13±1.86*
neutrophil (%)	17.24±5.32	15.33±6.31	17.90±7.34	21.63±7.28	19.48±17.39
lymphocyte (%)	75.79±4.78	78.85±8.59	73.51±8.28	69.23±9.71	72.38±18.14
monocyte (%)	3.84±2.80	2.83±2.28	5.06±3.41	6.37±3.94*	5.96±5.44*
eosinophil (%)	1.84±0.65	1.75±0.74	2.00±0.59	1.47±0.57	1.53±1.08
basophil (%)	1.29±0.95	1.24±0.55	1.54±0.67	1.33±0.76	0.65±0.59*
red blood cells ($x10^6$ K/μl)	8.07±0.31	8.10±0.20	8.24±0.45	7.53±1.35*	8.42±0.70
hemoglobin (g/dl)	15.00±0.40	14.97±0.40	15.20±0.59	14.52±1.91	15.03±0.90
hematocrit (%)	44.33±2.24	44.59±1.99	45.34±1.98	41.34±5.93*	44.92±3.4
platelet (K/μl)	834±113	819±85	833±108	762±184	653±143*
reticulocyte	260±69	240±36	280±112	338±222*	325±202*

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different form the water control group ($p<0.05$)

blood was unable to draw from one rat

Effect of *Butea superba* on blood chemistry

It was demonstrated that ALT of the female rats receiving *B. superba* at the dose of 10 mg/kg BW/day was significantly lower than that of the control group. All other parameters did not change in both sexes of animals treated with 10mg/kg BW/day of the *B. superba* suspension (Table 5, 6).

There was no difference in all biochemistry parameters tested in the female group receiving *B. superba* at the dose of 100 mg/kg BW/day (Table 6). The levels of AST and ALT of the male rats given at the same dose were significantly higher than the control group as shown in Table 5.

In both male and female rats receiving the suspension of *B. superba* at the dose of 250 mg/kg BW/day (Table 5, 6), the levels of ALP and bilirubin were higher than those of the control groups. Moreover, the male group showed significantly higher levels of AST, ALT and uric acid than those of the control group. The levels of total protein of

each sex were significantly decreased. The level of glucose in the female group was significantly higher but that of the male group was significantly lower than the control groups. For the female group, significant decreases in the levels of creatinine, cholesterol, triglyceride, total protein and albumin were demonstrated as compared with the control group.

The levels of AST, ALT, ALP, bilirubin and BUN were significantly increased in both male and female rats receiving *B. superba* at the dose of 1000 mg/kg BW/day (Table 5,6), whereas the levels of cholesterol, total protein, albumin and glucose were significantly decreased as compared with the controls.

Table 5 Blood chemistry of male rats treated with *Butea superba* for 6 months.

Parameters	Group of male rats				
	Control N=14	10 mg/kg BW/day N=15	100 mg/kg BW/day N=14	250 mg/kg BW/day N=12	1000 mg/kg BW/day N=24
AST (U/l)	66.86±9.38	68.07±7.06	75.71±10.03*	93.67±11.69*	379.21±223.70*
ALT (U/l)	38.71±8.38	44.33±8.93	51.21±6.08*	61.67±16.07*	182.17±72.60*
ALP (U/l)	57.21±9.50	59.80±11.07	57.64±6.64	74.25±12.54*	280.38±74.63*
bilirubin (mg/dl)	0.09±0.03	0.07±0.05	0.11±0.03	0.16±0.04*	2.20±1.41*
creatinine (mg/dl)	0.66±0.04	0.64±0.05	0.64±0.05	0.63±0.03	0.65±0.17
BUN (mg/dl)	19.04±2.95	18.50±2.67	18.49±1.67	17.67±1.42	27.12±22.62*
cholesterol (mg/dl)	85.51±13.52	86.94±19.37	73.20±14.64	78.56±61.32	72.51±35.39*
triglyceride (mg/dl)	153.62±55.26	200.65±68.76	153.67±39.60	174.95±116.95	161.92±75.29
total protein (g/dl)	6.64±0.28	6.65±0.17	6.44±0.37	6.33±0.15*	4.14±1.11*
albumin (g/dl)	3.27±0.16	3.29±0.12	3.29±0.20	3.24±0.15	1.87±0.71*
uric acid (mg/dl)	1.60±0.86	1.77±0.82	1.54±0.68	2.23±0.67*	2.11±1.03
glucose (mg/dl)	174.35±21.65	178.48±17.80	162.26±12.23	148.03±16.01*	87.04±33.22*
sodium (mmol/l)	143.29±1.27	143.73±0.80	143.21±1.25	142.42±0.90	141.00±6.37
patassium (mmol/l)	5.81±1.02	5.29±0.58	5.65±0.87	6.16±0.54	6.36±1.44

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different form the water control group ($p<0.05$)

Table 6 Blood chemistry of female rats treated with *Butea superba* for 6 months.

Parameters	Group of Female rats				
	Control N=14	10 mg/kg BW/day N=15	100 mg/kg BW/day N=15	250 mg/kg BW/day N=9	1000 mg/kg BW/day N=24#
AST (U/l)	78.79±20.85	68.67±10.88	67.40±6.81	87.33±12.07	174.44±47.45*
ALT (U/l)	42.64±17.64	30.47±5.19*	33.87±6.42	43.00±14.66	106.80±46.01*
ALP (U/l)	25.36±5.76	24.73±7.52	25.73±6.70	42.22±19.55*	158.16±87.71*
bilirubin (mg/dl)	0.07±0.06	0.08±0.03	0.11±0.04	0.18±0.03*	0.68±0.92*
Creatinine (mg/dl)	0.70±0.06	0.74±0.08	0.71±0.07	0.61±0.09*	0.64±0.06
BUN (mg/dl	20.83±3.22	19.56±2.80	18.45±3.07	21.14±2.19	24.25±5.33*
Cholesterol (mg/dl)	77.70±8.92	71.27±16.67	76.48±15.77	64.68±15.89*	48.73±22.72*
Triglyceride (mg/dl)	128.99±63.05	114.38±41.69	157.23±73.46	78.57±47.50*	117.41±39.65
total protein (g/dl)	6.60±0.19	6.79±0.36	6.78±0.35	5.84±1.01*	5.48±0.81*
albumin (g/dl)	3.63±0.22	3.68±0.23	3.66±0.23	3.14±0.68*	2.85±0.51*
uric acid (mg/dl)	1.59±0.83	1.32±0.67	1.82±1.40	1.66±0.04	1.97±0.65
glucose (mg/dl)	141.52±16.86	146.54±12.70	155.49±28.57	155.66±14.64*	116.36±20.62*
sodium (mmol/l)	143.64±1.50	144.20±1.42	144.40±1.35	143.78±1.48	146.76±2.52
Patassium (mmol/l)	5.36±0.95	5.12±0.58	5.14±1.15	5.51±0.48	5.73±0.64

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different form the water control group ($p<0.05$)

blood was unable to draw from one rat

Effect of *Butea superba* on histopathology of internal organs

Changes in the internal organs of both male and female rats receiving the suspension of *B. superba* at the doses of 10, 100 and 250 mg/kg BW/day were not observed by the gross examinations. In contrast, signs of abnormalities were illustrated in the highest dose groups. Five females rats receiving *B. superba* at the dose of 1000 mg/kg BW/day died after 24-40 days of oral administration. Furthermore, the rest were in moribund stages and were sacrified after 39-43 days of the treatment. The gross examinations among the 25 females rats revealed that one had approximately 8 ml of interstitial fluid in the lung, one had focal hemorrhage in the stomach, one had a smaller-sized liver, one had a sign of splenomegaly, one had mesenteric edema, and one exhibited thinning of the uterine horn. Additionally, the liver was pallid in four female rats and three rats had about 0.5-2.0 ml of interstitial fluid in the abdomen.

Six male rats receiving *Butea superba* at the dose of 1000 mg/kg BW/day also died after 24-40 days of oral administration. Like the female group, the rest were sacrified after 39-43 days of treatment. Among the 24 male animals, the gross examinations showed that two exhibited splenomegaly, five had a smaller-sized liver, five showed interstitial edema of the pancreas, five had focal hemorrhage in the stomach, and thirteen had approximately 0.5-2.0 ml of interstitial fluid in

the abdomen. Congestion in the testis was observed in 5 rats and atrophy in the seminal ducts was seen in another 5 rats. It was noticed that the kidney and the liver were pallid in 3 and 10 male rats, respectively.

Histopathological examinations revealed that at the dose of 10 mg/kg BW/day, 6 of 15 female rats demonstrated subendometrial gland hyperplasia of the uterus, and glandular hyperplasia of the cervix was noticed in 6 female rats. Evidence of dilated lumen of the seminal vesicles was seen in 6 of 15 male rats (Table 7,8)

The numbers of female rats receiving *B. superba* at the dose of 100 mg/kg BW/day, with the indications of subendometrial gland hyperplasia of the uterus, glandular hyperplasia of the cervix and hepatocyte megalocytosis of the liver, were significantly increased as compared with its control groups (Table 8). In male rats receiving *B. superba*, at the dose of 100 mg/kg BW/day, a significant increase in the numbers showing interstitial edema of the testis and dilated lumen of the seminal vesicle was found as compared to its control group (Table 7)

Table 7 Histopathological evaluations of male rats treated with *Butea superba* for 6 months.

Organs	Lesions	Group of male rats				
		Control N=14	10 mg/kg BW/day N=15	100 mg/kg BW/day N=14	250 mg/kg BW/day N=12	1000 mg/kg BW/day N=24
Heart	Focal myocardiosis	1/14	2/15	4/14	0/12	0/24
Lung	Lymphoid proliferated peribronchioles	3/14	1/15	5/14	4/12	3/24
Liver	Fatty degeneration	7/14	4/15	3/14	5/12	1/24*
	Hepatocyte megalocytosis	0/14	0/15	0/14	12/12*	24/24*
	Lymphoid aggregated-periportal area	0/14	0/15	0/14	0/12	8/24*
	Bile duct proliferation	0/14	0/15	0/14	0/12	4/24*
	Peliosis hepatitis	0/14	0/15	0/14	2/12	0/24
Kidney	Multifocal tubular cyst	0/14	1/15	0/14	1/12	0/24
	Tubular cast	0/14	0/14	0/14	0/14	0/24
	Tubulonephrosis	0/14	0/15	0/14	1/12	2/24
Testis	Interstitial edema	0/14	0/15	7/14*	6/12*	1/24
	Seminiferous tubule-degeneration	0/14	0/15	1/14	1/12	2/24
	Congestion	0/14	0/15	0/14	0/12	1/24
Seminal-vesicle	Epithelial hyperplasia	0/14	0/15	0/14	1/12	9/24*
	Dilated lumen	0/14	6/15*	6/14*	10/12*	1/24
Adrenal-gland	Cortical fatty degeneration	13/14	4/15	7/14	5/12*	0/24*

Each value represents number of rats with pathological abnormalities/total number of rats examined.
*Significantly different from water control group ($p<0.05$)

Table 8 Histopathological evaluations of female rats treated with *Butea superba* for 6 months.

Organs	Lesions	Group of male rats				
		Control N=14	10 mg/kg BW/day N=15	100 mg/kg BW/day N=15	250 mg/kg BW/day N=9	1000 mg/kg BW/day N=25
Heart	Focal myocardiosis	0/14	0/15	0/15	0/9	0/25
Lung	Lymphoid proliferated peribronchioles	1/14	4/15	4/15	0/9	7/25*
Liver	Fatty degeneration	1/14	0/15	1/15	2/9	3/25
	Hepatocyte megalocytosis	0/14	0/15	7/15*	9/9*	23/25*
	Lymphoid aggregated periportal area	0/14	1/15	1/15	0/9	13/25*
Kidney	Multifocal tubular cyst	0/14	0/15	1/15	0/9	0/25
	Tubular cast	10/14	5/15	6/15	3/9	3/25*
	Tubulonephrosis	0/14	0/15	0/15	0/9	0/25
Uterus	Subendometrial gland hyperplasia	1/14	6/15*	9/15*	3/9	1/25
Cervix	Glandular hyperplasia	0/14	6/15*	6/15*	0/9	2/25
Adrenal gland	Cortical fatty degeneration	0/14	0/15	0/15	0/9	0/25

Each value represents number of rats with pathological abnormalities/total number of rats examined.
*Significantly different from water control group ($p<0.05$)

Remarkable histopathological changes, especially in the liver, were noticed with statistical difference at the higher doses of the treatment. Hepatocyte megalocytosis (Figure 4) was found in all animals treated at the dose of 250 mg/kg BW/day, in all male rats given the *B. superba* at the dose of 1000 mg/kg BW/day and in 23 of the 25 female rats at this dose. Moreover, there was significant increase in the numbers of male and female rats treated with the highest dose showing lymphoid aggregated periportal area of the liver. The number of the male group receiving the highest dose of the *B. superba* suspension with the finding of bile duct proliferation of the liver (Figure 5) was significantly higher than that of the female and the control groups. In addition, significantly high numbers of the male rats given *B. superba* at the dose of 250 mg/kg BW/day with interstitial edema in the testis were observed.

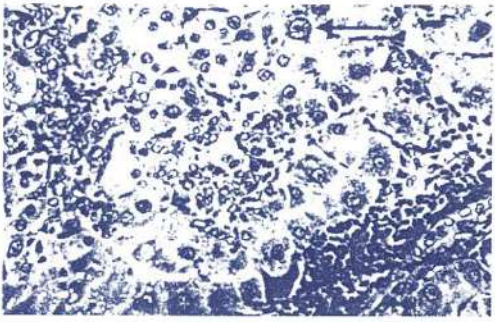


Figure 4 Histopathological examination of the liver section from the Wistar rat receiving the *B. superba* suspension at the dose of 250 mg/kg BW/day (H&E staining x 100). An arrow indicated hepatocyte megalocytosis found in the liver.

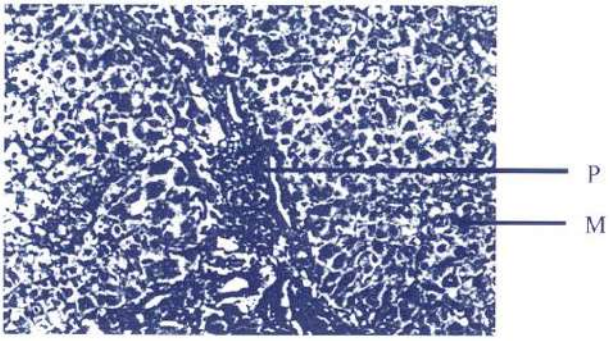


Figure 5 Bile duct proliferation (P) and megalocytosis (M) in the liver of the Wistar rat receiving *B. superba* suspension at the dose of 1000 mg/kg BW/day were illustrated as indicated by arrows (H&E staining x 100).

DISCUSSION

We have examined the chronic toxicity of *B. superba* given orally to the Wistar rats at the doses of 10, 100, 250 and 1000 mg/kg BW/day for 6 months. The findings of significant change of some hematological parameters in groups of animals treated with the suspension of *B. superba* at the dose of 100 mg/kg *B. superba* and higher were demonstrated. These changes were neither dose-dependent nor out of normal ranges (Gad *et al.*, 1992 : Beutler *et al.*, 1995).

The biochemical and histopathological studies were done to examine the effect of *B. superba* on major internal organs and their functions. The most relevant finding was the alteration of the liver and its function especially at the dose of 250 mg/kg BW/day and

higher. Evidence of hepatotoxic effects of *B. superba* was a dose-related increase in AST, ALT, ALP and bilirubin with a decrease in synthetic function as shown by the reduction in the levels of albumin and total protein, The histopathological examination of the liver indicated abnormalities of hepatocytes, portal vein thrombosis and bile duct proliferation.

CONCLUSION

Chronic oral administration of *B. superba* at the doses of 10, 100, 250 and 1000 mg/kg BW daily for 6 months indicated that *B. superba* exhibited toxic effects to the liver and some other internal organs especially at the dose of 250 mg/kg and higher. It is, therefore, suggested that the powder of *B. superba* should be thoroughly considered prior to its consumption at very high doses and for a long-term usage.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Assistant Professor Dr. Anuthep Rungseepipat of the Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for histopathological examinations of tissue samples. We also thank Associate Professor Yuttana Smittasiri of the Faculty of Science, Mae Fah Luang University, for identification and providing *B. superba* and Associate Professor Dr. Krongtong Yoovathaworn of the Department of Pharmacology, Faculty of Sciences, Mahidol University, for her valuable suggestions. We appreciated Dr. Ian Pull for reading the manuscript.

REFERENCES

Beutler E, Lichtman MA, Coller BS and Kipps TJ. Hematology 5th ed. New York: McGraw-Hill, Inc. 1995 : 1668.

Gad SC and Chengelis CP. Animal Models in Toxicology. New York: Marcel Dekker, Inc. 1992 : 164.

Loung-Anusarnsoontorn. Ya-hao-Kwao-Kreu-Dang. Chieng Mai: Upatipong Press. 1931 : 1-17.

Pongboonrod S. Mai thed moueng Thai. Bangkok : Kasaembannakij Press, 1971 : 82-85.

Roengsumran S, Petsom A, Ngamrojanavanich N, et al. Flavonoid and flavonoid glycoside from *Butea superba* Roxb. and their cAMP phosphodiesterase inhibitory activity. J Sci Res Chula Univ 2000; 25 : 69-176.

Smitinand T. Thai plant names. Bangkok : Funny Publishing, 1989, 57.

Tiangburanatham V. Dictionary of Thai medicinal plants. Bangkok : Odian Store Press, 1988 : 44-45.

Subchronic toxicity of *Cissus quadrangularis* Linn.

Aimmanas Attawish, Pranee Chavalittumrong
Songpol Chivapat, Anchalee Chuthaputti
Sadudee Rattanajarasroj, Somkiat Punyamong
Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand

ABSTRACT

Cissus quadrangularis Linn (*C. quadrangularis*), or "Phet-Cha-Sung-Khaat" in Thai, is one of the most commonly used medicinal plants in Thailand for the treatment of hemorrhoid; however, the safety of this herb upon long-term consumption has never been reported. Toxicity study was conducted to evaluate the three-month subchronic toxicity of *C. quadrangularis* powder in five groups of 12 Wistar rats of each sex. Water control group received orally 10 ml of water/kg BW/day. The dried-stems powder was given orally to the four treatment groups at the doses of 0.03, 0.3, 3.0 and 3.0 g/kg BW/day, which were equivalent to 1, 10, 100 and 100 fold of the therapeutic dose in human, respectively, the last group was the recovery group, No difference of initial or final body weights between *C. quadrangularis* treated and control groups was detected. It was found that *C. quadrangularis* did not produce any significant dose-related changes of hematological parameters or serum clinical chemistry, and no histopathological lesion of any internal organ that could be due to the toxic effect of *C. quadrangularis* was observed. The results indicated that *C. quadrangularis* at the doses given did not produce any toxicity in the rats during the administration period of 3 months.

Key words : *Cissus quadrangularis* Linn., subchronic toxicity

วารสารสงขลานครินทร์ ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 มกราคม-มีนาคม 2545 หน้า 39-51. (Songklanakarin J. Sci. Technol. 2002, 24(1) : 39 -51)

[1]M.S. (Nutritional Toxicology), [2]M.S. (Phytochemistry), [3]M.S. (Pathobiology), [4]Ph.D. (Pharmacology), [5]M.S. (Pharmacology), [6]Cert. in Medical Science Technology, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000 Thailand.

Corresponding e-mail : aimmanas@dmsc.moph.go.th

Received, 9 October 2000 Accepted, 26 September 2001

toxicity testing (30 days) in Wistar rats, it was found that *C. quadrangularis* caused low levels of serum creatinine, albumin and WBC. These occurrences disappeared within 14 days when the rats were allowed to recover (Limpanussorn, *et al.*, 2000). In addition, the Chao-Praya-Apaipubate General Hospital in Prachinburi province, the leading hospital in utilizing herbal medicines for the treatment of common diseases, is dispensing the dried stem powder in the dose of 1.5-3.0 g for the treatment of hemorrhoid. However, no report for long-term toxicity test has been made. Thus in order to evaluate the safety of this plant, the present study, using an OECD guideline (1998), was conducted to investigate the subchronic toxicity of *C. quadrangularis* when administered orally for three months in rats.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and preparation

The plant was collected from the botanical garden of Chao-Praya-Apaipubate Hospital in Prachinburi province, and was verified by Miss Supaporn Pitiporn, the head pharmacist of the hospital. A voucher specimen (BKF 092329) was deposited at the Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.

The plant was washed with tap water, cut, dried in a hot air oven at 50°C, ground and sieved with sieve No. 100, then the powder stored in a brown bottle with cap at room temperature. The powder was suspended to the desired concentrations with distilled water. Phytochemical determination showed the quercetin constituent equivalent to 0.1216 microgram percent.

Treatment of the animals

Sixty male Wistar rats weighing 210± 10 g and 60 female rats weighing 170±10 g from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakornpathom province, were used. The animals were housed in the animal facility of the Department of Medical Sciences. The temperature in the animal room was kept at 25±1°C with 60% relative humidity. The animals were allowed to have free access to food and clean water.

Three months toxicity study

According to the OECD guideline (1998), sixty Wistar rats of each sex were

randomly divided into 5 groups of 12 animals per sex. Group 1 (water control) received water 10 milliliter/kilogram of body weight/day (ml/kg BW/day). Groups 2 - 5 were given the suspensions which were equivalent to 0.03, 0.3, 3.0 and 3.0 grams of dried powdered plant/kilogram of body weight/day (g/kg BW/day) which were equivalent to 1, 10, 100 and 100 folds therapeutic dose (1.5 g/50-kg person/day), respectively. The last group was the recovery group. Body weight and food - intake were measured weekly and the animals were observed for signs of abnormalities for 3 months. At the end of the treatment period, the 1st - 4th groups of rats were fasted for 18 hours, then anesthetized with ether and sacrificed by drawing blood samples from the posterior vena cava for hematological and biochemical examinations. The 5th group of rats was withdrawn from of the feeding of the plant for another14 days before being sacrificed.

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyzer (Cell Dyn 3500, Abbott). The parameters of the blood samples measured were: hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb), red blood cell (RBC), mean cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), white blood cell (WBC), %neutrophil (%N), %lymphocyte (%L), %monocyte (%M), %esoinophil (%E), %basophil (%B), platelet, mean platelet volume (MPV),plateletcrit (PCT), platelet distribution width (PDW) and reticulocyte.

Biochemical analysis of serum samples was performed using an automatic chemistry analyzer (Hitachi model 912). Biochemical parameters measured were alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), p-amylase, total protein, albumin, bilirubin, creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium and chloride.

The positions, shapes, sizes and colors of internal organs, namely, brain, heart, both kidneys and lungs, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intestine, spleen, bladder, salivary gland, adrenal gland and testis in male rats ovary and uterus in female rats were visually observed for any signs of gross lesions. These organs were then collected, weighed to determine relative organ weights, and preserved in 10% phosphate buffered formalin solution. Tissue slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin and histopathological examinations were performed by a veterinary pathologist.

Statistical Analysis

The data were analyzed by one - way ANOVA followed by Duncan multiple range test, using SPSS/PC program, to determine significant differences between groups at

$p<0.05$. Histopathological data were evaluated by the Fisher extact test and the significance level was set at $p<0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of the *C.quadrangularis* on body weight, food intake and relative organ weight.

In both male and female animals, there was no difference in the average body weights between *C. quadrangularis*-treated groups and control groups throughout the experimental period of 3 month (Figure 1). It was found that food consumption of animals receiving the *C. quadrangularis* was significantly different from the control groups for several weeks. Male rats receiving *C. quadrangularis* 3.0 g/kg/day had lower food intake than the male control group during 4^{th} - 12^{th} weeks and female rats receiving *C. quadrangularis* 0.03 g/kg/day had higher food intake than the female control group during 1^{st} -13^{th} weeks of the study (Figure 2). In male rats, there was no difference in the relative organ weight between *C. quadrangularis*-treated group and control group (Table 1). Female rats treated with *C. quadrangularis* at the dose of 0.03 g/kg/day had lower relative organ weights of the brain and heart than the control group (Table 2).

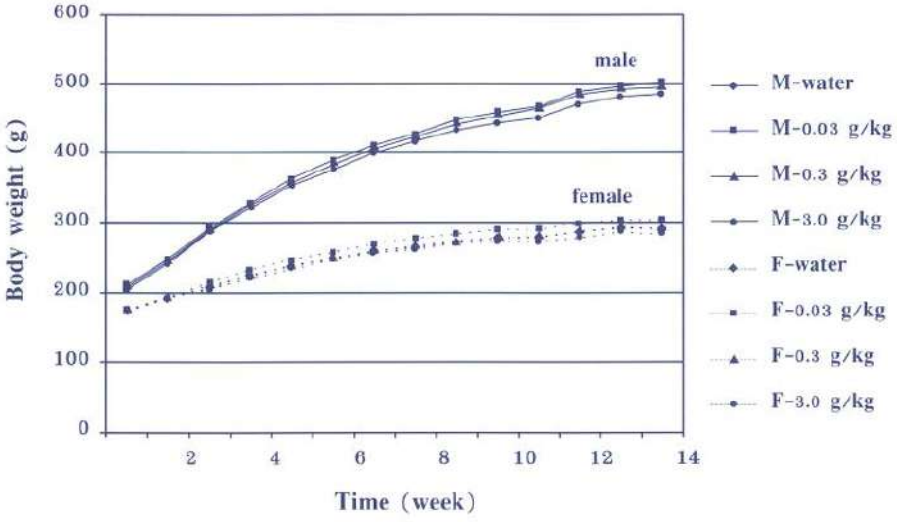
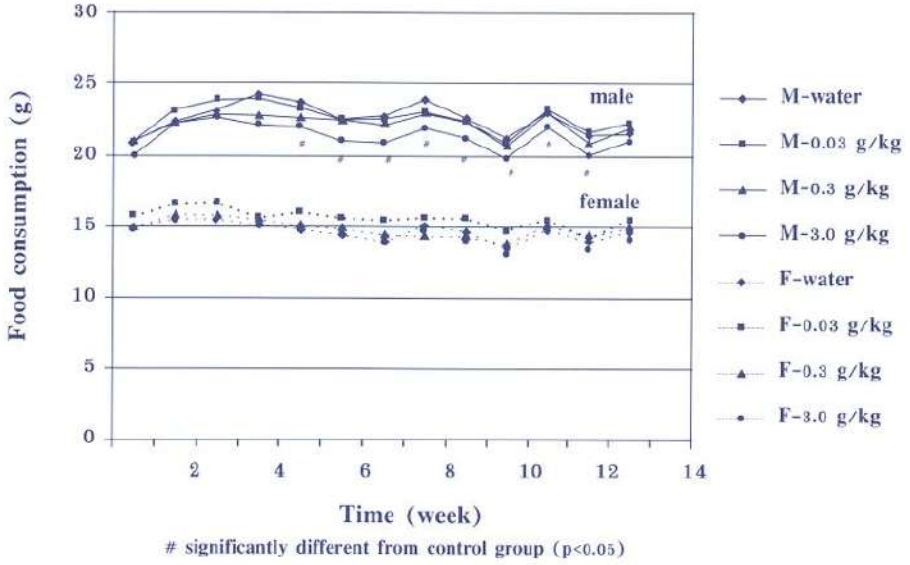


Figure 1. Growth curves of male and female rats receiving *C. quadrangularis* for 3 months.



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

Figure 2. **Food consumption of male and female rats receiving *C. quadrangularis* for 3 months.**

Table 1. **Body weight (g) and relative organ weight (g/kg) of male rats receiving *C. quadrangularis* for 3 months.**

Organs	Dose of *C. quadrangularis* (g/kg/day)				
	control	0.03	0.3	3.0	3.0-R
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Initial body weight	205±12	211±10	208±10	208±9	202±7
Final body weight	493±37	502±47	498±29	485±37	482±34
Brain	4.28±0.32	4.21±0.36	4.27±0.30	4.26±0.18	4.25±0.36
Heart	2.62±0.18	2.55±0.25	2.69±0.20	2.55±0.18	2.60±0.30
Lung	3.57±0.38	3.51±0.32	3.38±0.29	3.52±0.32	3.29±0.28
Liver	25.54±1.19	25.56±1.09	25.55±2.48	25.75±1.78	25.18±1.70
Stomach	3.72±0.32	3.73±0.35	3.77±0.39	3.88±0.37	3.65±0.20
Spleen	1.87±0.20	1.88±0.18	1.88±0.18	1.89±0.14	1.88±0.26
Right Kidney	2.58±0.18	2.55±0.14	2.64±0.17	2.61±0.18	2.59±0.19
Left Kidney	2.51±0.18	2.47±0.16	2.52±0.15	2.50±0.17	2.48±0.16
Right Testis	6.61±0.42	6.52±0.57	6.36±0.41	6.78±0.69	6.45±0.70
Left Testis	6.53±0.41	6.46±0.45	6.26±0.34	6.59±0.86	6.30±0.65
Right Adrenal	0.079±0.012	0.077±0.013	0.080±0.015	0.076±0.014	0.077±0.013
Left Adrenal	0.083±0.014	0.082±0.018	0.084±0.016	0.081±0.013	0.082±0.024
Bladder	0.255±0.042	0.274±0.035	0.240±0.042	0.262±0.037	0.238±0.054

R: Recovery group

The values are expressed as mean ± SD.

Table 2. Body weight (g) and relative organ weight (g/kg) of female rats receiving *C. quadrangularis* for 3 months.

Organs	Dose of *C. quadrangularis* (g/kg/day)				
	control	0.03	0.3	3.0	3.0-R
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Initial body weight	176±9	175±10	176±7	171±6	172±9
Final body weight	292±20	306±26	294±18	284±22	291±23
Brain	6.82±0.45	6.34±0.51*	6.71±0.44	6.91±0.54	6.75±0.62
Heart	3.06±0.27	2.81±0.22*	3.08±0.27	2.87±0.25	3.09±0.39
Lung	4.46±0.42	4.54±0.22	4.28±0.30	4.57±0.47	4.23±0.42
Liver	23.84±2.98	24.57±1.82	24.19±1.95	24.57±1.71	24.23±3.32
Stomach	4.98±0.76	4.89±0.60	4.94±0.32	5.14±0.50	5.11±0.59
Spleen	2.37±0.27	2.20±0.22	2.43±0.24	2.41±0.33	2.49±0.31
Right Kidney	2.84±0.24	2.78±0.20	2.79±0.27	2.78±0.25	2.86±0.32
Left Kidney	2.71±0.23	2.59±0.21	2.69±0.27	2.66±0.23	2.66±0.25
Right Adrenal	0.148±0.037	0.146±0.028	0.160±0.032	0.144±0.019	0.138±0.024
Left Adrenal	0.163±0.042	0.148±0.033	0.165±0.027	0.149±0.026	0.153±0.024
Uterus	3.00±0.75	2.80±1.06	3.03±0.56	2.50±0.31	2.96±0.75
Bladder	0.272±0.058	0.295±0.060	0.274±0.064	0.280±0.059	0.246±0.029

* significantly different from control group ($p<0.05$)
R: Recovery group
The values are expressed as mean ± SD.

Effect of *C. quadrangularis* on hematological parameters

There was no difference of hematocrit, the number of red blood cells, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC, the number of white blood cell, %N, %L, platelet, PCT, PDW, MPV or the number of reticulocyte between *C. quadrangularis*-treated groups and control groups of either male of female rats (Table 3 and 4). However the groups or male rats receiving *C. quadrangularis* had significantly lower %B than that of the control. Male rats receiving *C. quadrangularis* at the dose of 3.0 g/kg/day had significantly lower %M than that of the control. Male rat receiving *C. quadrangularis* at the dose of 3.0 g/kg/day had significantly lower percent of reticulocyte than that of the control but these values were within normal range (Gad, 1992). Female rats receiving *C. quadrangularis* at the dose of 3.0 g/kg/day had significantly higher %E than that of the control but these values were within normal range (Gad, 1992). In recovery groups, it was found that *C. quadrangularis* caused high %N and low %B in male, but caused high %E and low MCHC in female, however these values were within normal range (Gad, 1992).

Table 3. Hematological values of male rats receiving *C. quadrangularis* for 3 months.

Parameters	Dose of *C. quadrangularis* (g/kg/day)				
	control	0.03	0.3	3.0	3.0-R
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Hematocrit (%)	45.70±3.04	45.64±2.22	46.30±1.36	44.95±3.33	44.99±2.37
RBC ($X10^6$ cells/mm^3)	9.11±0.71	8.90±0.34	9.11±0.34	8.84±0.39	8.78±0.45
Hemoglobin (g/dl)	15.68±0.55	15.62±0.59	15.62±0.40	15.48±0.48	15.45±0.52
MCV (fl/red cell)	50.18±1.81	51.25±1.76	50.85±1.55	50.79±2.40	51.25±1.03
MCH (pg/red cell)	17.30±1.22	17.55±0.54	17.15±0.39	17.57±0.62	17.63±0.69
MCHC (g/dl RBC)	34.52±2.51	34.28±1.13	33.75±0.56	34.72±2.29	34.43±1.53
WBC ($X10^3$cells/mm^3)	5.62±1.38	5.70±1.28	5.90±1.26	5.86±0.91	5.18±0.79
Neutrophil (%)	11.72±2.89	11.17±3.01	13.58±4.3	13.34±3.83	79.07±6.66*
Eosinophil (%)	1.60±0.73	1.37±0.63	1.78±0.66	2.07±0.64	1.74±0.67
Lymphocyte (%)	81.77±5.55	84.25±4.36	81.07±5.23	82.17±3.65	15.53±6.35*
Monocyte (%)	3.09±2.42	1.94±1.49	2.39±1.27	1.33±1.43*	2.44±1.26
Basophil (%)	1.83±1.19	1.27±0.30*	1.17±0.27*	1.10±0.44*	1.21±0.39*
Platelet ($X10^3$cells/mm^3)	949±140	866±67	909±100	913±93	865±77
PCT (%)	0.86±0.20	0.79±0.16	0.86±0.11	0.76±0.17	0.86±0.11
PDW (%CV)	17.57±2.61	17.51±2.79	18.29±0.41	16.80±3.62	18.56±0.66
MPV (fl/platelet)	9.06±1.47	9.04±1.54	9.42±0.51	8.53±1.94	9.93±1.15
Reticulocyte ($X10^3$cells/mm^3)	235±43	234±41	205±29	204±33	245±30
Reticulocyte (%)	2.61±0.39	2.62±0.46	2.26±0.33*	2.34±0.36	2.81±0.25

*significantly different from control group ($p<0.05$)
R: Recovery group
The values are expressed as mean ± SD.

Effect of the *C. quadrangularis* on blood chemistry

In male and female rats, no difference in the serum levels of ALP, ALT, AST, BUN, p-amylase, total protein, albumin, bilirubin, creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cho-

Table 4. Hematological values of female rats receiving *C. quadrangularis* for 3 months.

Parameters	Dose of *C. quadrangularis* (g/kg/day)				
	control	0.03	0.3	3.0	3.0-R
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Hematocrit (%)	44.52±2.35	44.12±1.77	45.02±1.65	44.30±1.98	45.54±2.28
RBC ($X10^6$ cells/mm^3)	8.02±0.41	7.88±0.30	8.13±0.30	8.08±0.42	8.13±0.22
Hemoglobin (g/dl)	15.01±0.51	14.78±0.71	15.16±0.51	14.86±0.42	14.98±0.76
MCV (fl^3/red cell)	55.54±1.93	56.03±2.07	55.46±2.96	54.91±1.39	56.02±1.97
MCH (pg/red cell)	18.75±0.73	18.76±0.91	18.70±1.05	18.48±0.63	18.44±0.76
MCHC (g/dl RBC)	33.77±0.89	33.51±0.79	33.70±0.52	33.66±0.82	32.91±0.50*
WBC ($X10^3$cells/mm^3)	2.66±0.65	2.79±0.53	2.89±0.87	2.71±0.57	2.40±0.47
Neutrophil (%)	10.99±4.00	14.77±5.22	12.20±4.59	14.61±6.02	14.85±3.65
Eosinophil (%)	1.60±0.31	1.53±0.47	1.88±0.85	2.27±1.10*	1.53±0.44
Lymphocyte (%)	84.53±4.12	80.12±6.83	83.27±5.86	79.62±6.79	79.22±5.37
Monocyte (%)	1.93±0.89	2.77±2.07	1.78±1.80	2.58±1.61	3.10±2.16
Basophil (%)	0.96±0.43	0.82±0.31	0.86±0.41	0.94±0.36	1.30±0.48*
Platelet ($X10^3$cells/mm^3)	868±54	872±88	919±103	873±61	883±75
PCT (%)	0.79±0.05	0.80±0.08	0.85±0.08	0.80±0.07	0.83±0.06
PDW (%CV)	18.01±0.46	18.20±0.22	18.15±0.43	18.07±0.31	18.00±0.21
MPV (fl/platelet)	9.18±0.59	9.20±0.49	9.25±0.60	9.11±0.43	9.43±0.38
Reticulocyte ($X10^3$cells/mm^3)	261±65	275±59	264±75	240±45	298±70
Reticulocyte (%)	3.29±0.79	3.46±0.72	3.24±0.88	2.98±0.53	3.66±0.83

*significantly different from control group ($p<0.05$)
R: Recovery group
The values are expressed as mean ± SD.

lesterol, sodium, potassium and chloride was found between *C. quadrangularis*-treated groups and the control groups. It was found that *C. quadrangularis* caused high level of serum bilirubin, but caused low level of serum uric acid in male rats which were al-

Table 5. Biochemical values of male rats receiving *C. quadrangularis* for 3 months.

Parameters	Dose of *C. quadrangularis* (g/kg/day)				
	control	0.03	0.3	3.0	3.0-R
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
ALP (U/L)	64.00±11.39	64.08±8.94	65.92±8.73	60.17±8.17	66.50±8.02
ALT (U/L)	32.83±8.32	31.67±5.42	34.75±7.42	38.50±6.29	38.67±14.64
AST (U/L)	71.42±11.44	68.33±4.72	65.08±8.34	65.92±10.09	66.25±10.70
p-amylase (U/L)	1989±266	1960±185	2154±288	2070±205	1958±216
Total protein (g/dl)	6.57±0.76	6.50±0.32	6.66±0.31	6.49±0.42	6.72±0.22
Albumin (g/dl)	3.33±0.40	3.35±0.23	3.38±0.23	3.32±0.24	3.23±0.08
Bilirubin (mg/dl)	0.07±0.03	0.07±0.02	0.07±0.02	0.06±0.03	0.11±0.03*
BUN (mg/dl)	18.32±2.55	17.18±2.29	19.49±3.41	18.60±2.97	19.38±3.19
Creatinine (mg/dl)	0.64±0.07	0.64±0.04	0.65±0.05	0.62±0.06	0.62±0.04
Glucose (mg/dl)	170.48±25.77	169.16±18.26	175.09±23.06	170.54±18.18	157.54±11.48
Uric acid (mg/dl)	2.12±1.05	1.64±0.58	1.94±0.62	1.80±0.71	1.42±0.43*
Triglyceride (mg/dl)	127.54±46.73	125.72±38.37	144.11±33.39	145.38±48.91	131.76±12.78
Cholesterol (mg/dl)	72.39±24.92	62.24±8.62	70.04±10.98	67.13±15.03	59.36±12.78
Na+(mmol/l)	148±3	144±8	146±5	145±6	140±1*
K+ (mmol/l)	5.72±1.12	5.22±0.53	5.30±0.55	5.32±0.51	5.88±0.62
Cl-(mmol/l)	108±4	106±5	106±2	107±3	110±2

*significantly different from control group ($p<0.05$)
R: Recovery group
The values are expressed as mean ± SD.

lowed to recover (Table 5 and 6), however the values were within normal range (Gad, 1992). The significantly change of serum sodium in recovery groups was less than that of the control group, however the lowered serum sodium had no clinical effect. This change did not occur in any of the treated groups. Hence, this change may not be due to the effect of *C. quadrangularis* .

Effect of the *C. quadrangularis* on histopathology of internal organs

Upon gross examination of internal organs no abnormal signs were observed. Histopathological results indicated that there was no lesion of salivary gland, spleen, pancreas or intestine in any group of animals (Tables 7 and 8). The incidence of peribronchiolar lymphoid aggregation in all treated groups was

Table 6. Biochemical values of female rats receiving *C. quadrangularis* for 3 months.

Parameters	Dose of *C. quadrangularis* (g/kg/day)				
	control	0.03	0.3	3.0	3.0-R
	n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
ALP (U/L)	28.42±3.87	28.17±5.37	29.17±5.49	27.25±4.35	27.92±6.57
ALT (U/L)	26.50±5.18	28.75±6.18	26.42±5.68	29.08±5.87	27.83±5.69
AST (U/L)	64.08±8.35	67.00±9.12	63.08±6.96	64.17±10.61	61.58±6.23
p-amylase (U/L)	1150±242	1168±180	1126±200	1081±183	1054±284
Total protein (g/dl)	6.92±0.40	6.91±0.36	6.72±0.42	6.61±0.58	6.98±0.25
Albumin (g/dl)	3.71±0.17	3.69±0.26	3.65±0.26	3.61±0.42	3.54±0.14
Bilirubin (mg/dl)	0.10±0.04	0.10±0.06	0.10±0.04	0.09±0.07	0.09±0.03
BUN (mg/dl)	19.48±1.88	19.74±2.17	19.56±3.04	20.19±3.55	19.43±3.70
Creatinine (mg/dl)	0.71±0.05	0.72±0.04	0.67±0.06	0.70±0.09	0.69±0.04
Glucose (mg/dl)	145.16±14.78	147.90±16.33	128.92±21.28	132.21±28.77	132.82±17.49
Uric acid (mg/dl)	1.62±0.50	1.37±0.50	1.37±0.50	1.48±0.57	1.42±0.61
Triglyceride (mg/dl)	79.05±32.62	73.85±23.84	79.58±38.35	86.26±26.42	84.15±32.48
Cholesterol (mg/dl)	71.71±22.00	73.85±17.98	68.07±12.91	67.99±12.77	67.10±14.15
Na+(mmol/l)	150±3	148±4	146±6	146±10	141±1*
K+ (mmol/l)	5.00±0.66	4.79±0.60	4.88±1.01	4.61±0.90	4.99±0.68
Cl-(mmol/l)	114±4	112±4	111±2	110±8	113±2

*significantly different from control group ($p<0.05$)
R: Recovery group
The values are expressed as mean ± SD.

significantly lower than the control group, and this incidence was increased in the recovery group. Hence, this change should be due to the effect of *C. quadrangularis*. Park and his colleague (2001) reported that β-sitosterol from the ethanol extract of cactus (*Opuntiaficus indica*) showed anti-inflammatory action in adjuvant-induced chronic inflammation model in mice. Because of β-sitosterol the same constituent in *C. quadrangularis*, this plant may have anti-inflammatory action too. In male rats receiving *C. quadrangularis* at the dose of 0.03 g/kg/day, the incidence of hepatocyte degeneration of the liver was not significantly different from that of the control. Cortex fatty degeneration of adrenal gland was noted in half of the male control group. However the inci-

Table 7. Histopathological values of male rats receiving *C. quadrangularis* for 3 months.

Organs	Microscopic Findings	Dose of *C. quadrangularis* (g/kg/day)				
		control	0.03	0.3	3.0	3.0-R
		n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Lung	Peribronchiolar lymphoid aggregation	7/12	0/12*	0/12*	2/12*	3/12
Heart	Focal myocarditis	1/12	0/12	0/12	0/12	1/12
Liver	Hepatocyte degeneration	1/12	1/12	0/12	0/12	0/12
Kidney		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Spleen		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Pancreas		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
GI tract		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Testis		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Adrenal gland	Cortex fatty degeneration	6/12	0/12*	0/12*	1/12*	6/12
Salivary gland		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12

*significantly different from control group ($p<0.05$)
R: Recovery group
The results are expressed as number of rats with pathological findings/ total number of rats examined.

dence of fatty degeneration of the adrenal gland in all groups of male rats receiving *C. quadrangularis* was significantly lower than that of control, and there was no difference of the incidence between recovery and control group. This incidence seemed to be sex-related (Gad, 1992). Therefore, *C. quadrangularis* may reduce fat accumulation in the adrenal cortex. Fraser (1994) reported that β-sitosterol inhibited the absorption of both endogenous and exogenous cholesterol and in moderate doses lowered serum cholesterol. As in female rats receiving *C. quadrangularis*, though there were some lesions detected microscopically in the liver and kidneys in some groups of animals, but this change was not significantly different from control group. We found that only the congestion of adrenal gland in recovery group was significantly higher than that of control; however, this lesion might be caused by the stress from anesthetic process as well (Koplewitz, *et al.*, 1998; Pugachev, 1977; Bassett and Cairncross, 1975).

CONCLUSION

Three-month subchronic toxicity study of *C. quadrangularis* Linn. in Wistar rats indicated that the dried stem powder at the doses of 0.03, 0.3 and 3.0 g/kg BW/day, which were equivalent to 1, 10 and 100 fold of the

Table 8. Histopathological values of female rats receiving *C. quadrangularis* for 3 months.

Organs	Microscopic Findings	Dose of *C. quadrangularis* (g/kg/day)				
		control	0.03	0.3	3.0	3.0-R
		n=12	n=12	n=12	n=12	n=12
Lung	Peribronchiolar lymphoid proliferation	3/12	0/12*	0/12*	1/12*	2/12
Heart	Focal myocarditis	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Liver	Lymphoid aggregated periportal area	0/12	1/12	1/12	0/12	1/12 (focal necrosis)
Kidney	Tubular cast cyst	7/12	9/12	4/12	6/12	7/12
	Lymphoid aggregation	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Spleen		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Pancreas		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
GI tract		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Ovary		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
Uterus						
Cervix						
Adrenal gland	Congestion	0/12	0/12	0/12	0/12	6/12*
Salivary gland		0/12	0/12	0/12	0/12	0/12

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

R: Recovery group

The results are expressed as number of rats with pathological findings/ total number of rats examined.

therapeutic dose did not produce any significant dose-related changes of hematological parameters, serum biochemistry or histopathology of any internal organs. Therefore, it is concluded that *C. quadrangularis* at the given doses did not produce any significant toxic effect in rats during the period of treatment for 3 months.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. Anuthep Rangsripipat, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for histopathological examinations of tissue samples. Thanks are also due to Miss Supaporn Pittipron , the head pharmacist of Chao-Praya-Apaipubate Hospital, Prachin Buri province, who identified and supplied dried stems of *C. quadrangularis*, and the staff of the Animal Facility of the Department of Medical Sciences for the animal care.

REFERENCES

Banjob, M., Pecharaply, D., Chaiyaraj, S. and Sawangwong, C. 2000a. Medicinal plants in North Eastern, Part 2. Institute of Medicinal Plant Research, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thanasinjaroen Printing, Bangkok, Thailand. p. 55. (in Thai)

Banjob, M., Pecharaply, D., Chaiyaraj, S. and Sawangwong, C. 2000b. Medicinal plants in North Eastern, Part 3. Institute of Medicinal Plant Research, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health S.R. Printing Massproducts Co. Ltd., Bangkok, Thailand. p. 68. (in Thai)

Bassett, J.R. and Cairncross, K.D. 1975. Morphological changes induced in rats following prolonged exposure to stress. Pharmacol. Biochem. Behav. 3 (3) : 411-20.

Bhutani, K.K., Kapoor, R. and Atal, C.K. 1984. Two unsymmetric tetracyclic triterpenoids from *Cissus quadrangularis*. Phytochemistry. 23 (2) : 407-10.

Chopra, S.S., Patel, M.R. and Awadhiya, R.P. 1976. Studies on *Cissus quadrangularis* in experimental fracture repair : a histopathological study. Indian J. Med. Res. 64 : 1365-75.

Chopra, S.S., Patel, M.R., Gupta, L.P. and Datta, I.C. 1975. Studies on *Cissus quadrangularis* in experimental fracture repair : effect on chemical parameters in blood. Indian J. Med. Res. 63 : 824-8.

Fraser, GE. 1994. Diet and coronary heart disease : beyond dietary fats and low-density-lipoprotein cholesterol. Amer. J. Clin. Nutri. 59: 1117-23.

Gad, S.C. 1992. The Rat: Pathology. In: Gad, S.C., Chengellis, C.P. (Eds.), Animal Model in Toxicology, Marcel Dekker, New York, USA. pp.81,111-3.

Koplewitz, B.Z., Daneman, A., Cutz, E. and Hellmann, J. 1998. Neonatal adrenal congestion: a sonographic-pathologic correlation. Pediatr. Radiol. 28 (12) : 958-62.

Lhieochaiphunt, S. and Sangdee P. 1985. An acute toxicity testing of *Cissus quadrangularis* ; Vitidaceae. Research Report. Faculty of Pharmacy, Chieng Mai University. pp. 15. (in Thai)

Limpanussorn, J., Poongchompu. S., Thisayakorn, K. *et al* 2000 Toxicity study of *Cissus quadrangularis* L. In : Guideline for Medicinal Plant Development of Thailand. Thailand Institute of Scientific and Technological Research. p. 47. (in Thai)

Madan, M.G. and Ram, K.V. 1990. Unsymmetric tetracyclic triterpenoid from *Cissus quadrangularis*. Phytochemistry. 29 (1) : 336-7.

OECD. 1998. OECD Principles of Good Laboratory Practice, Section 2. OECD, Paris, France.

Park, E., Kahng, J., Lee, S.H., Shin, K. 2001. An anti-inflammatory principle from cactus. Fitoterapia. 72 (3) : 288-90.

Pongboonrod, S. 1950. Mai Thed Muang Thai. Kaseambunnakit Printing, Bangkok, Thailand. pp. 428-9. (in Thai).

Pugachev, M.K. 1977. Problem of thickening of the adrenal cortex in acute thermal stress. Arkh. Anat. Gistol. Embriol. 72 (3) : 73-7.

Quisumbing, E. 1951. Medicinal plants of the Philippines. Tech. Bull. 16 : 1-10.

Saburi, A.A., Rene, N., Marie-Therese, M., *et al.* 1999. Stilbene derivatives from *Cissus quadrangularis*. J. Nat Prod. 62 : 1694-5.

Segsunviriya C. and Choomprabutra, S. 1989. A clinical study of *Cissus quadrangularis* Linn. in hemorrhoid patients. Seminar of Research and Development of Medicinal Plant. Division of Medical Research, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. pp. 54-5 (in Thai)

Sen, S.P. 1964. Active constituents (oxo steroids) of *Cissus quadrangularis*. Indian J. Pharmacy. 26 (9) : 247-8.

Tiangburanatham, W. 1996. Dictionary of Thai Medicinal Plants. Prachumtong Printing, Bangkok, Thailand. pp. 572-3. (in Thai).

Pluemjai, T. and Saifah, E. 1986. Constituents of *Cissus quadrangularis* Linn. Th. J. Pharm. Sci. 11(4) : 205-11.

Udupa, K.N. and Prasad, G. 1964. Biomechanical and 45-CA studies on the effect of *Cissus quadrangularis* in fracture repair. Indian J. Med. Res. 52 (5) : 480-7.

Udupa, K.N., Prasad, G. and Sen, S.P. 1965. The effect of phytogenic anabolic steroid in the acceleration of fracture repair. Life Sci. 4 (3) : 317-27.

Wuthithammawej, W. 1994. Thai Traditional Medicine. O.S. Printing House, Bangkok, Thailand. p. 337. (in Thai)

พิษเรื้อรังของยาเม็ดขี้เหล็ก

Chronic Toxicity of *Cassia siamea* Tablet

*Songpol Chivapat, DVM. M.Sc. (Pathobiology)**

*Pranee Chavalittumrong, M.Sc. (Phytochemistry)**

*Boonme Sunyasootcharee, DVM. M.Sc. (Vet Pathology)***

*Sadudee Rattanajarasroj, M.Sc. (Pharmacology)**

*Somkiat Punyamong, Cert.In Medical Technology**

*Institute of Medicinal Plant Research, Department of Medical Science,

**Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

Bull Dept Med Serv 2001; 26 : 485-497.

ABSTRACT

Cassia siamea tablet was manufactured for the treatment of insomnia. It was subsequently reported that there were 11 patients using this herbal medicine had drug-induced hepatitis. To protect the consumer and to evaluate the toxicity of this tablet, chronic toxicity study of *Cassia siamea* tablets containing 1.19% anhydrobarakol was conducted in 5 groups of Wistar rat of each sex for 6 months. The control group was given distilled water and experimental groups were intragastrically administered with the *Cassia siamea* tablet powder at the doses of 20, 200 and 2,000 mg/kg/day which were equivalent to 1, 10 and 100 folds of therapeutic doses respectively. Another 2,000 mg/kg drug-treated group was determined to be high recovery group, in order to examine recovery of drug-induced abnormality after drug discontinuation for 2 weeks. Our result showed that livers from rats receiving 2,000 mg/kg of *Cassia siamea* powder had fatty liver in gross appearance and significantly increased relative weight. Histopathological study indicated that the tablet caused degeneration and necrosis of hepatocytes in all *Cassia siamea* -treated groups and the severity of the lesion was in a dose-dependent manner.

Key word : Cassia siamea tablet, Toxicity.

วารสารกรมการแพทย์ ปีที่ 26 ฉบับที่ 11 พฤศจิกายน 2544 หน้า 485-497.

บทคัดย่อ

ยาเม็ดขี้เหล็กถูกผลิตขึ้นเพื่อใช้รักษาอาการนอนไม่หลับ ต่อมามีรายงานพบผู้ป่วย 11 ราย ที่มีภาวะตับอักเสบที่เกิดจากการใช้ยานี้ เพื่อเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคและประเมินความเป็นพิษของยาดังกล่าว คณะผู้รายงานจึงศึกษาพิษเรื้อรังของยาเม็ดขี้เหล็กที่มีสารสำคัญ anhydrobarakol ร้อยละ1.19 โดยวิธีป้อนเข้าสู่กระเพาะอาหารแก่หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ 5 กลุ่มๆ ละ15 ตัวต่อเพศ เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่น กลุ่มทดลองได้รับผงยาขี้เหล็กในขนาด 20, 200, 2,000 มก./กก./วัน ซึ่งเทียบเท่ากับ 1, 10 และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน ตามลำดับและกลุ่ม high recovery ซึ่งได้รับยา 2,000 มก./กก. จนครบ 6 เดือน แล้วหยุดยาเป็นเวลา 2 สัปดาห์เพื่อดูการกลับสู่ภาวะปกติ พบว่าตับของหนูที่ได้รับยาเม็ดขี้เหล็กขนาด 2,000 มก./กก. มีขนาดใหญ่ บวมโต มีสีเหลืองทั่วตับ (fatty liver) และมีน้ำหนักสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญผลการตรวจเนื้อเยื่อตับทางจุลพยาธิวิทยาในหนูที่ได้รับยาขี้เหล็กทุกกลุ่มบ่งชี้ว่ายาขี้เหล็กทำให้มีการเสื่อมและการตายของเซลล์ตับ (degeneration and necrosis of hepatocytes) และความรุนแรงของพยาธิสภาพเพิ่มขึ้นตามขนาดยาที่ได้รับ

บทนำ

ขี้เหล็กมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cassia siamea* Lam. อยู่ในวงศ์ Leguminosae เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ใบประกอบแบบขนนก ดอกออก เป็นช่อสีเหลือง มีฝักยาว พืชชนิดนี้พบได้ทั่วไปในประเทศไทย[1] ในตำรายาแผนโบราณได้กล่าวถึงสรรพคุณของขี้เหล็กว่าใบอ่อนและดอกตูม เป็นยาระบายอ่อนๆ ใบใช้รับประทานขับระดูขาว แก้นิ่ว ขับปัสสาวะ ดอกลดความดันโลหิต แก้อาการนอนไม่หลับ แก้หืด แก่นรับประทานเป็นยาแก้กามโรค หนองใน[2,3] การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบขี้เหล็กพบว่า มีสารกลุ่ม chromones กลุ่ม anthraquinones และสารอื่นๆ อีกหลายชนิด เช่น β-sitosterol, cassiamin A, chrysophanol, p-coumaric acid, thalicitin[4] เป็นต้น ตัวอย่างสารในกลุ่ม chromones ได้แก่ barakol, 5-acetonyl-7-hydroxy-2-methylchromone[5] และ 2-methyl-5-acetonyl-7-hydroxychromone[4] จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร barakol ที่แยกได้จากใบขี้เหล็กในหนูขาว โดยการฉีดเข้าช่องท้องในขนาด 25 และ 100 มก./กก. พบว่า มีผลทำให้หนูนอนหลับได้เร็วกว่าหนูกลุ่มควบคุม โดยที่ขนาด 25 มก./กก. ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง energy ratio ของคลื่นสมอง[6] Thongsaard และคณะ[7] รายงานว่า เมื่อฉีดสาร barakol ให้แก่หนูขาวทางช่องท้อง พบว่า สารนี้มีฤทธิ์ลดความวิตกกังวล (anxiolytic) คล้ายคลึงกับผลของ diazepam แต่ต่างกันที่ barakol ทำให้หนูมีพฤติกรรม exploratory และ locomoter เพิ่มขึ้น โดยอาจมีกลไกการออกฤทธิ์เป็น dopamine agoinst ยับยั้งการหลั่ง dopamine ที่สมองส่วน striatum[8] นอกจากฤทธิ์ดังกล่าวข้างต้นแล้วยังพบว่าสาร barakol จากใบขี้เหล็กมีฤทธิ์ลดความดันเลือดทั้ง systolic และ diastolic ในหนูขาวและแมวเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจในแมว และมีฤทธิ์ลดการหดเกร็งของหลอดเลือดแดงทรวงอกที่เหนี่ยวนำด้วย phenylephrine ของหนูขาวที่แยกออกมาอีกด้วย[9] การที่ใบขี้เหล็กมีสาร barakol เป็นสารสำคัญในการทำให้เกิด sedative และ anxiolytic effects นั้น ทำให้มีการนำใบขี้เหล็กมาพัฒนาเป็นยาช่วยให้นอนหลับโดยมี

การควบคุมคุณภาพของสารสำคัญในรูปของ anhydrobarakol ผลการทดลองทางคลินิกพบว่ายาเม็ดสกัดจากใบขี้เหล็กทำให้คนปกติง่วงหลับได้ และช่วยให้ผู้ที่มีปัญหานอนไม่หลับง่วงหลับได้ดีขึ้น[10] วีระสิงห์ เมืองมั่น และคณะ[11] ได้ทดลองใช้ยาขี้เหล็กในผู้ป่วยหลังการผ่าตัด ซึ่งพบว่าช่วยให้นอนหลับได้ดีขึ้น และไม่พบผลข้างเคียงที่ก่อให้เกิดอันตรายใดๆ

ยาสมุนไพรขี้เหล็กได้ถูกวางจำหน่ายในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2540 โดยประชาชนสามารถหาซื้อได้ตามร้านขายยาที่มีอยู่ทั่วไป ต่อมาในปี พ.ศ. 2543 ปรากฏว่า มีรายงานการพบผู้ป่วยที่มีภาวะดับอักเสบซึ่งเกิดจากการรับประทานยาเม็ดขี้เหล็ก จำนวน 11 รายโดยผู้ป่วยทุกรายไม่มีประวัติโรคตับเรื้อรังมาก่อน[12] กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในฐานะหน่วยงานของรัฐซึ่งทำหน้าที่ศึกษาวิจัยเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค จึงเห็นความจำเป็นที่จะต้องศึกษาพิษเรื้อรังของยาเม็ดขี้เหล็กในสัตว์ทดลอง เพื่อเป็นการพิสูจน์ยืนยันความเป็นพิษของยาสมุนไพรนี้ และให้ทราบข้อมูลด้านพิษวิทยาเพิ่มเติมอันจะเป็นประโยชน์ต่อประชาชนผู้บริโภค อีกทั้งยังอาจมีส่วนช่วยผลักดันให้มีการวิจัยและพัฒนาปรับปรุงยาเม็ดขี้เหล็กให้มีความปลอดภัยสูงต่อผู้บริโภคต่อไป

วัตถุและวิธีการ

ยาเม็ดขี้เหล็ก (*Cassia siamea* tablet)

ยาเม็ดขี้เหล็ก Lot No. TCS-087 ได้รับจากบริษัทผลิตภัณฑ์สมุนไพรไทย จำกัด ซึ่งเป็นผู้ผลิตภายใต้เทคโนโลยีการผลิตที่ได้รับถ่ายทอดจากองค์การเภสัชกรรม ใน 1 เม็ดประกอบด้วย ใบอ่อนขี้เหล็ก 400 มิลลิกรัม ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatographic densitometry โดย นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่ามีสารสำคัญ คือ Anhydrobarakol อยู่ร้อยละ 1.19

การเตรียมยาที่ใช้ในการทดลอง

นำยาเม็ดขี้เหล็กมาบดให้เป็นผงละเอียด แล้วแขวนตะกอนในน้ำ ปรับให้มีความเข้มข้นตามต้องการ เพื่อใช้ในการทดสอบพิษเรื้อรังแก่หนูขาว

สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์วิสตาร์ น้ำหนักตัวระหว่าง 150 ±10 กรัม จำนวน 150 ตัว (เพศละ 75 ตัว) ที่ได้รับจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล เลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60 ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูป ของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ และน้ำประปาที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

การทดสอบพิษเรื้อรัง

แบ่งหนูขาวโดยวิธีสุ่มออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 30 ตัว (เพศละ 15 ตัว) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นทางปากในปริมาณ 10 มล./กก./วัน กลุ่มที่ 2 ถึง 4 เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับยาขี้เหล็กโดยวิธีการป้อนยาทางปากในขนาด 20, 200 และ 2,000 มก./กก./วัน ตามลำดับ จนครบ 6 เดือน ซึ่งคิดเป็น 1, 10 และ 100 เท่า ของขนาดที่ใช้ในคน (โดยคิดว่าคนหนัก 50 กิโลกรัม ใน 1 วัน รับประทานผงยาขี้เหล็กเฉลี่ย 1,000 มิลลิกรัม) ส่วนกลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่ม high recovery ซึ่งได้รับผงยาขนาด 2,000 มก./กก./วัน จนครบ 6 เดือนเช่นกัน จากนั้นหยุดให้ยาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วจึงผ่าชันสูตร เพื่อติดตามดูว่าภายหลังหยุดยาแล้วความผิดปกติหรือพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจะกลับสู่ภาวะปกติหรือไม่

ในระหว่างการทดลองเฝ้าสังเกตอาการผิดปกติและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ (clinical and

physical observation) บันทึกน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เมื่อครบกำหนด 6 เดือน อดอาหารหนูเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นดมสลบหนูด้วยอีเธอร์ เปิดผ่าช่องท้อง เจาะเลือดจากหลอดเลือด posterior vena cava เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยาโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ รุ่น Cell-Dyn 3500 ของ Abbot® ปั่นแยกซีรัมเพื่อนำไปตรวจหาค่าทางเคมีคลินิก ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi รุ่น 912 ของ Roche®

จากนั้นผ่าชากชันสูตรเพื่อตรวจหาวิการที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายในต่างๆ ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ตับ ไต ม้าม ตับอ่อน ลำไส้ กระเพาะปัสสาวะ รังไข่ อัณฑะ มดลูก ต่อมน้ำลาย ต่อมน้ำตา ต่อมน้ำนม ต่อมไทรอยด์และต่อมหมวกไต บันทึกน้ำหนักอวัยวะที่สามารถชั่งได้แล้วคำนวณเป็นน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (% relative organ weight) เก็บอวัยวะแช่ในบัฟเฟอร์มาลินความเข้มข้นร้อยละ 10 นำไปเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์เพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา

การตรวจเนื้อเยื่อตับทางจุลพยาธิวิทยา

ความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงหรือรอยโรค (microscopic lesions) ของเนื้อเยื่อตับในการศึกษาครั้งนี้ แบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ (grade) ดังนี้

ระดับ 1 คือ ตับมีการเสื่อมและการตายเล็กน้อย (ร้อยละ < 25)

ระดับ 2 คือ ตับมีการเสื่อมและการตายปานกลาง (ร้อยละ 25-50)

ระดับ 3 คือ ตับมีการเสื่อมและการตายรุนแรงเป็นบริเวณกว้าง (ร้อยละ > 50)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลของน้ำหนักตัว การกินอาหาร ค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางเคมีคลินิก น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ ใช้สถิติเชิงพรรณา การทดสอบสมมติฐานใช้ one-way ANOVA และ Scheffe's test โดยโปรแกรม SPSS/PC version 9.0 ผลการตรวจเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยาใช้ Fisher exact test ที่ $p<0.05$

ผล

ผลต่อน้ำหนักตัวและการกินอาหาร

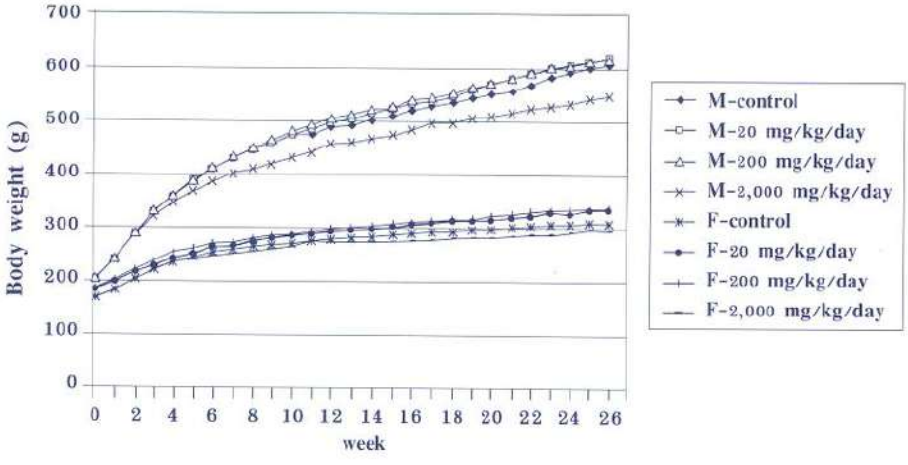
หนูขาวทั้ง 2 เพศที่ได้รับยาขี้เหล็กทุกกลุ่ม มีน้ำหนักตัวและการกินอาหารไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูเพศผู้ที่ได้รับยาขี้เหล็กขนาด 2,000 มก./กก. มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่ก็ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 1 และ 2)

ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา

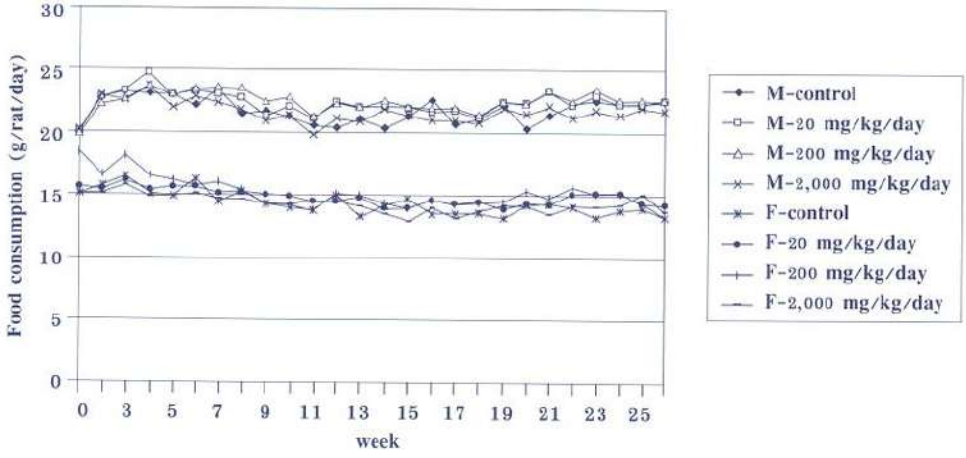
หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขี้เหล็กขนาด 2,000 มก./กก. และกลุ่ม high recovery มีค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังมีนิวโตรฟิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) หนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด 2,000 มก./กก. และกลุ่ม high recovery มีจำนวนเม็ดเลือดแดงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาแสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2

ผลต่อค่าทางเคมีคลินิก

หนูเพศผู้ที่ได้รับยาขี้เหล็กขนาด 2,000 มก./กก. มีระดับเอนไซม์ ALP และกอเลสเทอรอลต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่มีค่าของกลอบูลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หนูกลุ่มที่ได้รับยาขี้เหล็กขนาด 200 และ 2,000 มก./กก. มีค่าของ Globulin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หนูทั้ง 2 เพศที่ได้รับยาขนาด 2,000 มก./กก. มีระดับ



รูปที่ 1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับยาขี้เหล็กเป็นเวลา 6 เดือน



รูปที่ 2 การกินอาหารของหนูขาวเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับยาขี้เหล็กเป็นเวลา 6 เดือน

ตารางที่ 1 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยาขี้เหล็กเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	ขนาดของขี้เหล็ก (มก./กก./วัน)				
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	2,000 n=15	2,000-R n=15
Hematocrit (%)	48.59±2.66	47.26±1.74	48.29±2.78	45.50±1.92*	44.55±2.84*
Hemoglobin (g/dl)	15.93±0.66	15.66±0.46	15.82±0.68	14.84±0.60*	14.68±0.51*
RBC ($x10^6$ cells/μL)	9.42±0.39	8.98±0.32	9.26±0.32	8.72±0.33	8.65±0.61
MCV (fl/red cell)	51.55±1.67	52.66±1.76	52.12±1.84	52.20±2.34	51.53±2.32
MCH (pg/red cell)	16.91±0.45	17.48±0.78	17.10±0.52	17.01±0.76	17.08±1.28
MCHC (g/dl RBC)	32.82±0.63	33.22±1.13	32.80±0.92	32.63±1.03	33.26±2.69
WBC (K/μL)	6.13±1.84	5.77±1.85	5.45±1.77	6.09±0.94	5.95±1.53
Neutrophil (%)	14.26±3.97	17.32±5.17	16.48±7.05	20.79±7.15*	20.35±5.92*
Eosinophil (%)	1.72±0.79	1.58±0.53	1.74±0.58	1.23±0.41	1.31±0.38
Lymphocyte (%)	75.49±7.53	73.69±7.22	72.49±11.97	67.55±8.16	70.99±8.97
Monocyte (%)	6.46±3.96	5.99±3.26	7.74±5.35	8.76±3.89	6.19±2.42
Basophil (%)	2.08±1.44	1.42±1.41	1.54±1.30	1.66±0.63	1.15±0.82
Platelet (K/μL)	986.97±79.81	953.53±119.49	906.99±168.74	1905.60±101.97	1060.90±85.01

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2,000-R = high recovery group

ตารางที่ 2 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยาขี้เหล็กเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	ขนาดของยาขี้เหล็ก (มก./กก./วัน)				
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	2,000 n=15	2,000-R n=15
Hematocrit (%)	48.71±3.62	47.12±1.60	47.00±2.02	46.66±3.49	46.71±2.24
Hemoglobin (g/dl)	15.79±0.92	15.40±0.53	15.38±0.43	15.33±0.85	15.10±0.57
RBC ($x10^4$ cells/μL)	8.64±0.63	8.28±0.32	8.26±0.38	7.97±0.48*	8.07±0.36*
MCV (fl/red cell)	56.38±1.50	56.90±1.54	56.93±1.34	58.51±1.89	57.84±1.15
MCH (pg/red cell)	18.32±0.64	18.61±0.52	18.65±0.54	19.26±0.70	18.72±0.51
MCHC (g/dl RBC)	32.49±0.95	32.70±0.66	32.77±0.83	32.96±1.19	32.38±0.67
WBC (K/μL)	3.07±1.31	2.70±0.82	2.96±0.73	3.09±0.40	2.95±0.75
Neutrophil (%)	15.43±8.35	15.93±5.23	15.23±6.70	17.88±7.17	15.54±5.16
Eosinophil (%)	1.73±0.65	2.26±1.17	1.93±0.93	1.49±0.52	1.76±0.63
Lymphocyte (%)	75.50±8.57	78.37±5.61	76.92±7.37	73.26±10.21	80.58±4.55
Monocyte (%)	5.77±2.50	6.03±2.54	4.45±2.01	5.59±3.25	4.98±1.47
Basophil (%)	1.56±0.97	1.48±1.11	1.75±0.95	1.75±0.95	1.55±0.53
Platelet (K/μL)	913.60±129.78	881.60±68.06	861.66±86.20	939.57±103.66	1010.90±54.62

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2,000-R = high recovery group

ตารางที่ 3 ผลการตรวจทางเคมีคลินิกของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยาขี้เหล็กเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	ขนาดของยาขี้เหล็ก (มก./กก./วัน)				
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	2,000 n=15	2,000-R n=15
ALT (U/L)	43.67±10.60	36.33±6.19	44.53±16.15	46.60±32.03	41.53±15.29
AST (U/L)	72.80±13.99	73.73±9.85	75.53±11.41	68.00±19.79	64.93±15.24
ALP (U/L)	69.87±14.73	65.73±9.06	58.47±7.39	45.47±7.47*	59.33±10.81*
BUN (mg%)	21.13±2.77	19.91±2.45	19.76±2.84	21.15±2.84	18.91±2.77
Creatinine (mg%)	0.66±0.05	0.69±0.06	0.65±0.04	0.68±0.05	0.61±0.04
Total protein (g%)	6.89±0.12	6.92±0.29	6.92±0.27	7.43±0.42	6.80±0.25
Albumin (g%)	4.24±0.13	4.23±0.19	4.27±0.19	4.41±0.22	4.27±0.15
Globulin (g%)	2.65±0.14	2.69±0.32	2.65±0.21	3.03±0.35*	2.53±0.24
Bilirbubin (mg/dl)	0.05±0.02	0.08±0.07	0.22±0.07*	1.84±0.17*	0.10±0.04
Glucose (mg/dl)	175.91±18.41	171.18±26.07	165.50±23.52	142.53±20.99	163.34±19.36
Uric acid (%) (mg%)	1.80±1.14	1.71±1.30	1.36±0.97	1.56±1.45	2.00±0.89
Triglyceride (mg/dl)	119.38±40.51	119.84±37.39	112.27±43.19	27.88±9.90*	110.08±27.41
Cholesterol (mg/dl)	75.55±12.10	69.76±17.26	81.61±27.48	50.04±11.69*	66.53±15.81
Sodium (mmol/l)	147.13±1.30	148.20±1.37	148.07±1.28	148.27±1.28	144.87±1.35*
Potassium (mmol/l)	5.09±0.75	4.71±0.54	4.69±0.48	5.03±0.79	5.39±0.81
Chloride (mmol/l)	107.33±1.49	108.60±1.45	108.87±1.24	108.80±1.61	105.93±1.16

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2,000-R = high recovery group

กลูโคสและไขมันไตรกลีเซอไรด์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 3 และ 4

ผลต่ออวัยวะภายใน

จากการผ่าชันสูตรตรวจหาพยาธิสภาพที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง พบว่า ตับของหนูกลุ่มที่ได้รับยาขี้เหล็กขนาด 2,000 มก./กก. มีขนาดใหญ่ บวมโตและมีสีเหลืองทั่วตับ (fatty liver) อย่างชัดเจน ไม่พบพยาธิสภาพที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าในอวัยวะอื่นๆ หนูที่ได้รับยาขี้เหล็กขนาด 2,000 มก./กก. มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับ ไตทั้ง 2 ข้าง และม้ามมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5 และ 6)

ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา

อวัยวะที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (ตารางที่ 7 และ 8) พบว่าตับของหนูที่ได้รับยาขี้เหล็กทุกขนาดมีอัตราการเกิดการเสื่อมและการตายของเซลล์ตับ (hepatocellular degeneration and necrosis) สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ลักษณะการเสื่อมของเซลล์ตับเป็นแบบ fatty degeneration โดยพบ fat globules ขนาดต่าง ๆ สะสมอยู่ภายในเซลล์ และพบว่าการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของตับมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นตามขนาดของยาขี้เหล็กที่ได้รับ (รูปที่ 3) ในหนูกลุ่ม high recovery นั้นเมื่อหยุดยาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก็ยังคงตรวจพบความเสียหาย

ตารางที่ 4 ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูเพศเมียที่ได้รับยาขี้เหล็กเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	ขนาดของยาขี้เหล็ก (มก./กก./วัน)				
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	2,000 n=15	2,000-R n=15
ALT (U/L)	27.47±5.64	29.73±7.12	30.86±6.09	31.00±6.66	28.87±4.59
AST (U/L)	65.27±6.10	71.73±12.52	73.42±11.05	60.80±8.90	59.07±5.70
ALP (U/L)	24.20±5.33	24.33±5.11	23.07±5.68	25.47±8.43	23.13±4.78
BUN (mg%)	24.61±5.80	21.45±4.44	21.32±3.89	24.94±3.27	24.20±4.20
Creatinine (mg%)	0.81±0.06	0.76±0.07	0.76±0.04	0.73±0.04*	0.72±0.05*
Total protein (g%)	7.01±0.27	7.16±0.26	7.26±0.36	7.07±0.39	6.85±0.28
Albumin (g%)	4.79±0.02	4.81±0.20	4.93±0.29	4.76±0.24	4.69±0.21
Globulin (g%)	2.22±0.15	2.35±0.15	2.33±0.19	2.32±0.21	2.16±0.22
Bilirbubin (mg/dl)	0.08±0.03	0.09±0.05	0.18±0.03*	1.32±0.19*	0.16±0.03*
Glucose (mg/dl)	151.31±20.53	139.85±18.81	137.09±16.04	121.38±9.87*	118.88±7.15*
Uric acid (%)(mg%)	1.48±0.58	1.27±0.52	1.07±0.38	1.17±0.42	1.37±0.47
Triglyceride (mg/dl)	84.11±26.76	103.56±50.21	92.25±34.63	34.45±12.80*	91.32±35.15
Cholesterol (mg/dl)	71.64±7.87	72.02±17.56	75.79±19.86	69.56±18.13	69.38±17.03
Sodium (mmol/l)	146.73±1.87	147.67±1.49	148.14±1.61	147.27±2.05	142.73±1.49
Potassium (mmol/l)	4.65±0.66	4.67±0.55	4.58±0.49	4.73±0.82	5.06±0.71
Chloride (mmol/l)	107.80±1.89	108.80±1.97	109.28±2.61	108.40±2.75	106.20±0.86

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2,000-R = high recovery group

ที่ตับได้ (ตารางที่ 9) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เป็นลักษณะของโรคตับแข็งในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับยาขี้เหล็กทุกขนาด

วิจารณ์

การศึกษาพิษเรื้อรังของยาเม็ดขี้เหล็กในหนูขาวเป็นเวลา 6 เดือนครั้งนี้พบว่า ยาขี้เหล็กไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการกินอาหารของหนูขาว การเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาที่พบในหนูทั้ง 2 เพศบ่งชี้ว่า ยาขี้เหล็กขนาด 2,000 มก./กก. หรือคิดเป็น 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน อาจมีผลกดการสร้างเม็ดเลือดแดงได้บ้าง และเมื่อหยุดยาก็ยังคงมีผลอยู่ อย่างไรก็ตามค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และเม็ดเลือดแดงของหนูกลุ่มนี้ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติที่รายงานโดย Shayne[13] ร้อยละของนิวโตรฟิลที่เพิ่มขึ้นในหนูเพศผู้ที่ได้รับยา 2,000 มก./กก. อาจเนื่องจากเป็นการตอบสนองต่อการเกิดเนื้อตายที่ตับของหนูกลุ่มนี้ซึ่งมีความรุนแรงมากกว่ากลุ่มอื่นๆ แต่ก็ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ[13] การเปลี่ยนแปลงของระดับของเอนไซม์ ALT และ AST ของหนูกลุ่มทดลองขี้เหล็กทุกขนาดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมรวมถึงการลดลงของ ALP ในหนูเพศ ผู้ที่ได้รับยาขนาด 2,000 มก./กก. ทั้งๆ ที่ตรวจพบความเสียหายที่ตับนั้น อาจเนื่องจากว่าการวัดระดับเอนไซม์เมื่อสิ้นสุดการทดลองเพียงครั้งเดียวไม่ตรงกับสภาวะขณะที่เซลล์ตับจำนวนมากกำลังถูก

ตารางที่ 5 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนูเพศผู้ที่ได้รับยาขี้เหล็กนาน 6 เดือน

อวัยวะ	ขนาดของยาขี้เหล็ก (มก./กก./วัน)				
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	2,000 n=15	2,000-R n=15
สมอง	0.36±0.03	0.35±0.03	0.36±0.04	0.40±0.04	0.39±0.03
หัวใจ	0.24±0.02	0.24±0.02	0.25±0.02	0.26±0.02	0.26±0.02
ปอด	0.30±0.04	0.30±0.03	0.30±0.04	0.34±0.04*	0.33±0.04
กระเพาะอาหาร	0.38±0.06	0.37±0.05	0.37±0.05	0.40±0.04	0.40±0.04
ตับ	2.46±0.28	2.34±0.21	2.41±0.19	3.31±0.53*	2.88±0.23*
ไตซ้าย	0.23±0.02	0.21±0.02	0.23±0.03	0.27±0.02*	0.26±0.02*
ไตขวา	0.23±0.02	0.22±0.02	0.24±0.03	0.28±0.02*	0.27±0.02*
ม้าม	0.17±0.03	0.17±0.02	0.17±0.02	0.21±0.03*	0.21±0.02*
กระเพาะปัสสาวะ	0.024±0.004	0.026±0.006	0.026±0.004	0.026±0.005	0.026±0.005
อัณฑะซ้าย	0.53±0.11	0.53±0.09	0.55±0.09	0.55±0.11	0.58±0.09
อัณฑะขวา	0.57±0.13	0.55±0.07	0.55±0.08	0.55±0.10	0.62±0.09

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2,000-R = high recovery group

ตารางที่ 6 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนูเพศเมียที่ได้รับยาขี้เหล็กนาน 6 เดือน

อวัยวะ	ขนาดของยาขี้เหล็ก (มก./กก./วัน)				
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	2,000 n=15	2,000-R n=15
สมอง	0.64±0.05	0.61±0.07	0.60±0.06	0.69±0.08	0.69±0.05
หัวใจ	0.29±0.03	0.29±0.02	0.29±0.02	0.32±0.03	0.31±0.02
ปอด	0.41±0.05	0.41±0.04	0.40±0.05	0.45±0.06	0.45±0.04
กระเพาะอาหาร	0.51±0.06	0.48±0.04	0.47±0.07	0.56±0.06	0.54±0.07
ตับ	2.26±0.21	2.22±0.15	2.26±0.15	2.95±0.39*	2.51±0.27
ไตซ้าย	0.24±0.02	0.24±0.02	0.24±0.03	0.30±0.03*	0.28±0.02
ไตขวา	0.25±0.04	0.26±0.03	0.25±0.03	0.32±0.04*	0.29±0.02
ม้าม	0.22±0.03	0.22±0.02	0.23±0.04	0.27±0.05*	0.26±0.03
กระเพาะปัสสาวะ	0.028±0.006	0.028±0.004	0.025±0.004	0.33±0.006	0.32±0.004
รังไข่ซ้าย	0.026±0.007	0.024±0.005	0.0023±0.010	0.028±0.007	0.032±0.005
รังไข่ขวา	0.024±0.005	0.021±0.005	0.023±0.006	0.025±0.006	0.028±0.005

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2,000-R = high recovery group

ตารางที่ 7 ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยาขี้เหล็กเป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	พยาธิสภาพที่พบ	ขนาดของยาขี้เหล็ก (มก./กก./วัน)				
		0	20	200	2,000	2,000-R
		n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
ปอด	Lymphoid proliferated peribronchioles (+1)	8/15	6/15	2/15*	4/15	5/15
หัวใจ	Focal myocardiosis	3/15	4/15	0/15	1/15	0/15
ตับ	Degeneration and Necrosis	0/15	15/15*	15/15*	15/15*	15/15*
ไต	Tubular cyst	0/15	3/15	2/15	2/15	3/15
	Regenerative tubules	0/15	1/15	0/15	1/15	2/15
ตับอ่อน	Lymphocytic pancreatitis	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15
ลำไส้เล็ก	Lymphoid aggregated in submucosal layer	0/15	3/15	2/15	1/15	1/15
อัณฑะ	Atrophy	0/15	0/15	0/15	2/15	1/15
ต่อมหมวกไต	Cortical fatty degeneration	5/15	9/15	9/15	8/15	6/15

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของ จำนวนหนูที่ตรวจพบพยาธิสภาพ/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2,000-R = high recovery group

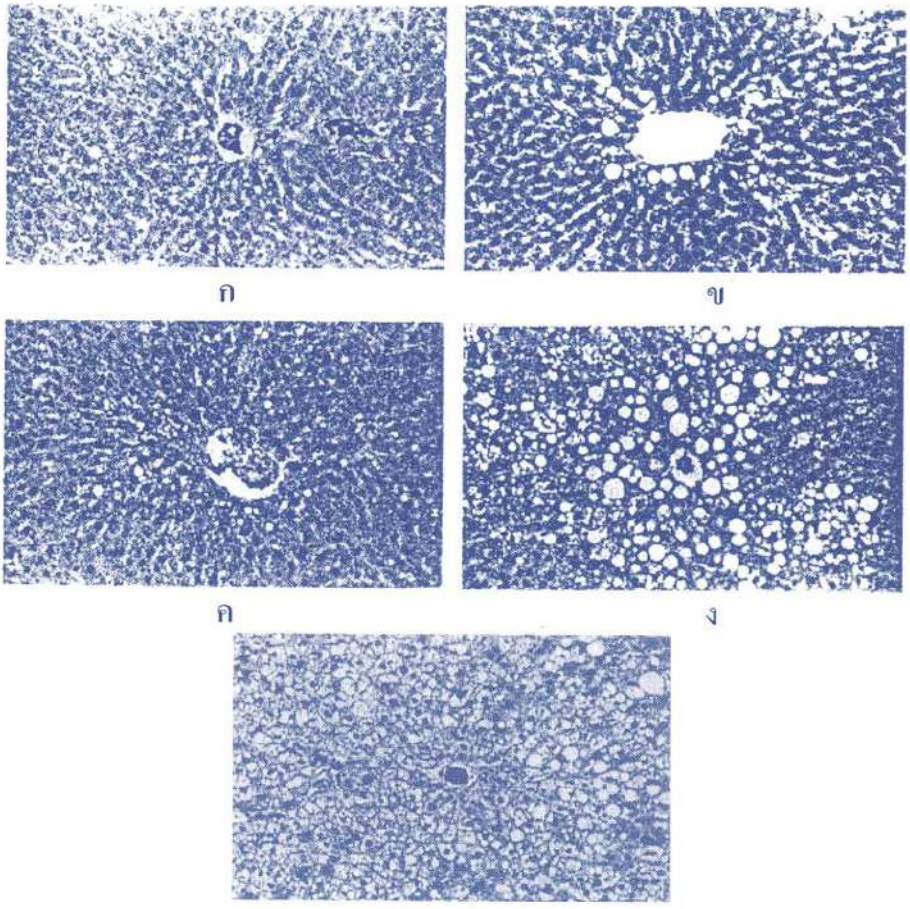
ตารางที่ 8 ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยาขี้เหล็กเป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	พยาธิสภาพที่พบ	ขนาดของยาขี้เหล็ก (มก./กก./วัน)				
		0	20	200	2,000	2,000-R
		n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
ปอด	Lymphoid proliferated peribronchioles (+1)	6/15	8/15	1/14*	1/15*	0/15
ตับ	Degeneration and Necrosis	0/15	12/15*	14/14*	15/15*	15/15*
ไต	Tubular cyst	0/15	1/15	1/14	0/15	1/15
	Regenerative tubule	0/15	1/15	0/14	1/15	2/15
ตับอ่อน	Focal regeneration	0/15	1/15	0/14	0/15	0/15
ลำไส้เล็ก	Lymphoid aggregated in submucosal layer	0/15	1/15	2/14	1/15	3/15
ลำไส้ใหญ่		0/15	1/15	0/14	1/15	0/15
ต่อมหมวกไต	Cortical fatty degeneration	0/15	1/15	0/14	0/15	0/15

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของ จำนวนหนูที่ตรวจพบพยาธิสภาพ/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2,000-R = high recovery group



รูปที่ 3 ผลการตรวจเนื้อเยื่อดับทางจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวที่ได้รับยาขี้เหล็กเป็นระยะเวลา 6 เดือน (H&E x 500)

ก. กลุ่มควบคุมมีลักษณะเซลล์ปกติ

ข. กลุ่มที่ได้รับยาเม็ดขี้เหล็กขนาด 20 มก./กก./วัน มีการเปลี่ยนแปลงระดับที่ 1 (mild fatty change)

ค. กลุ่มที่ได้รับยาเม็ดขี้เหล็กขนาด 200 มก./กก./วัน มีการเปลี่ยนแปลงระดับที่ 1 (mild fatty change)

ง. กลุ่มที่ได้รับยาเม็ดขี้เหล็กขนาด 2,000 มก./กก./วัน มีการเปลี่ยนแปลงระดับที่ 2 (moderate fatty change)

จ. กลุ่มที่ได้รับยาเม็ดขี้เหล็กขนาด 2,000 มก./กก./วัน มีการเปลี่ยนแปลงระดับที่ 3 (severe fatty change)

ทำลายอย่างเฉียบพลัน กลุ่มที่ตับถูกทำลายไม่มาก นักเซลล์ตับสามารถสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทน (regeneration) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญนั้น อาจเกิดจากหนูกลุ่มนี้มีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มควบคุมจึงส่งผลให้การคำนวณได้ค่าสูงขึ้น อย่างไรก็ตามไม่พบความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะดังกล่าวที่บ่งชี้ว่าเกิดจากยาขี้เหล็ก ผลการตรวจเนื้อเยื่อตับบ่งชี้ว่า ยาขี้เหล็กทุกขนาดมีพิษต่อตับของหนูขาวโดยทำให้เกิดการเสื่อมแบบไขมัน (fatty degeneration) และการตายของเซลล์ตับ พยาธิสภาพนี้มีความรุนแรงเพิ่มขึ้นอย่างสัมพันธ์กับขนาดยาและเมื่อหยุดยาก็คงตรวจพบรอยโรคได้แต่ไม่พบว่ายาขี้เหล็กทำให้เกิดสภาวะตับแข็ง (cirrhosis) ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะอื่นๆ นั้นมีอัตราการเกิดและความรุนแรงอย่างไม่สัมพันธ์กับขนาดยาที่เพิ่มขึ้นจึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากยาเม็ดขี้เหล็ก

สรุป

การศึกษาพิษเรื้อรังของยาเม็ดขี้เหล็กในหนูขาวโดยป้อนยาทางปากในขนาด 20, 200 และ 2,000 มก./กก./วัน หรือเทียบเท่า 1 10 และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน แสดงให้เห็นว่า ยาเม็ดขี้เหล็กตั้งแต่ 20 มก./กก. ขึ้นไปทำให้เกิดการเสื่อมและการตายของเซลล์ตับ พยาธิสภาพนี้มีความรุนแรงเพิ่มขึ้นตามขนาดยาที่ให้ นอกจากนี้ยาขนาดสูงยังอาจมีผลต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงของหนู รายงานการศึกษาพิษเรื้อรังในสัตว์ทดลองครั้งนี้ช่วยพิสูจน์ยืนยันว่า ยาเม็ดขี้เหล็กมีพิษต่อตับ ซึ่งก่อนหน้านี้ได้มีรายงานผู้ป่วยที่มีภาวะตับอักเสบจากการใช้ยาเม็ดขี้เหล็กในประเทศไทยถึง 11ราย ความเป็นพิษของยาขี้เหล็กต่อตับนั้น ยังไม่อาจสรุปให้ชัดเจนว่า เกิดจากสารสำคัญบาราคอลหรือสารชนิดอื่นๆ ที่มีอยู่ในใบขี้เหล็ก ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา และสัตวแพทย์หญิงเรวดี บุตราภรณ์ กลุ่มงานสัตว์ทดลอง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการสัตว์ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. วิทยาศาสตร์, กรม. สถาบันวิจัยสมุนไพร. สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม). พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : ห้างหุ้นส่วนจำกัด รุ่งเรืองสาสน์การพิมพ์ ; 2541.

2. วัดพระเชตุพนฯ, สำนักสมาคมแพทย์แผนโบราณ. ประมวลสรรพคุณยาไทยภาค 1 ว่าด้วยพฤกษชาติ วัตถุชาติ และสัตววัตถุนานาชนิด. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์อำพลวิทยา; 2507.

3. เสงี่ยม พงษ์บุญรอด ไม้เทศเมืองไทย. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ประเสริฐศิริ; 2493.

4. Wagner H, Mohammed SE, Seligmann O, Mohanchari V. Chemical constituents of *Cassia siamea* Lam. I. Planta Med 1978; 33 : 258-61.

5. Bycroft BW, Hassaniali-Walji A, Johnson AW, King TJ. The structure and synthesis of barakol: a novel dioxaphenaline derivative from *Cassia siamea*. J Chem Soc 1686-9.

6. Bulyalert D. Effect of barakol on the cen-

tral nervous system: quantitative analysis of EEG in the rat. Chiangmai Med Bull 1993; 32: 191-6.

7. Thongsaard W, Deachapunya C, Pongsakorn S, Boyd ED, Bennett GW, Marsden CA, Barakol : a potential anxiolytic extracted from *Cassia siamea*. Pharmacol Biochem Behav 1996; 53 : 753-58.

8. Thongsaard W, Pongsakorn S, Sudsuang R, Bennett GW, Kendal DA, Marsden CA. Barakol, a natural anxiolytic inhibits striatal dopamine release but not uptake in vitro. Eur J Pharmacol 1997; 319:157-64.

9. Suwan G, Sudsuang R, Dhummaupakorn P, Werawong C. Hypotensive effects of barakol extracted from leaves of *Cassia siamea* Lam. In rats and cats. Thai J Physiol Sci 1992; 5 : 53-65.

10. ประกอบ ผู้วิบูลย์สุข, พิมลวรรณ ทัพยุทะ พิจารณ์, ธริส หิญชีระนันทน์. การศึกษาฤทธิ์ที่ทำให้ง่วงหลับในคนของยาสมุนไพรแปรรูปสกัดจากใบขี้เหล็ก. วารสารสมาคมจิตแพทย์แห่งประเทศไทย 2543; 45 : 251-9.

11. Muangman V, Charoenbon S, Chanthepthewan W, Phisalpong C. A clinical trial on a herbal medicine, Khi-lek (*Cassia siamea*) syrup and tablets for insomnia. Thai J Phytopharm 2000; 7:18-27.

12. Hongsirinirachorn M, Threeprasertsuk S, Chutaputti A. Hepatitis associated with barakol: cases report. Thai J Gastroenterol 2001 ; 2 : 17-21.

13. Shayne CG. The Rat. In: Shayne CG, Christopher PC, editors. Animals models in toxicology. 10th ed. New York: Marcel Dekker Inc; 1992. P. 78-81.

14. วีกูล วีรานุวัตติ์, กนกนาถ ชูปัญญา. เคมีคลินิก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: กรุงเทพเวชสาร; 2525. หน้า 202-41.

15. วัฒนา เลี้ยววัฒนา. การตรวจสมรรถภาพของตับ. ใน : ภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. บรรณาธิการ. พยาธิวิทยาคลินิก. พิมพ์ครั้งที่ 2, กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์เรือนแก้ว; 2537. หน้า 215-9.

Chronic toxicity study of curcuminoids in rats

Pranee Chavalittumrong , Songpol Chivapat
Sadudee Rattanajarasroj , Somkiat Panyamong
Anchalee Chuthaputti , Chada Phisalaphong

ABSTRACT

A six-month chronic toxicity study of curcuminoids extracted from the powdered dried rhizome of *Curcuma longa* L. was performed in six groups of 15 Wistar rats of each sex. Water control group received 5 ml of water/kg BW/day, while tragacanth control group received 5 ml of 0.5% tragacanth suspension/kg BW/day orally. Three treatment groups were given the suspension of curcuminoids powder at the doses of 10,50 and 250 mg/kg BW/day, which were 1, 5 and 25 times of the proposed therapeutic dose. The fourth treatment group, or the recovery group, also received 250 mg/kg BW/day of curcuminoids for six months, but two weeks of no curcuminoids treatment elapsed before the time of sacrifice. It was found that the growth rate of male rats receiving curcuminoids 50 mg/kg BW/day was significantly higher than that of the tragacanth control group. Curcuminoids did not produce any significant dose-related changes of hematological parameters. In the group of male animals receiving 250 mg/kg BW/day of curcuminoids, actual and relative liver weights and the level of alkaline phosphatase (ALP) were sinificantly higher than those of the two controls, but the ALP level was still within a normal range. There appeared to be a higher incidence of mild degree of liver fatty degeneration and adrenocortical fatty degeneration in this group of animals; however, the incidence was not significantly different from that of the two controls. The results indicated that long-term administration of curcuminoids at therapeutic dose (10 mg/kg BW/day) did not produce any toxicity in rats. However, at higher doses, it may affect the function and morphology of the liver in a reversible manner.

Key words : curcuminoids. toxicity

วารสารสงขลานครินทร์ ปีที่ 24 ฉบับที่ 4 ตุลาคม-ธันวาคม 2545 หน้า 633-647.

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยได้ศึกษาพิษเรื้อรังนาน 6 เดือนของเคอร์คิวมินอยด์ในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ 6 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัวต่อเพศหนูกลุ่มควบคุมกลุ่มแรกได้รับน้ำ 5 มล./น้ำหนักตัว 1 กก./วัน (มล./กก./วัน) ทางปาก ส่วนกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 2ได้รับทรากาค้าน 5 มล./กก./วัน หนูกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มแรกที่ได้รับน้ำแขวนตะกอนของเคอร์คิวมินอยด์ในทรากาค้าน ในขนาด 10, 50 และ 250 มก./น้ำหนักตัว 1 กก./วัน (มก./กก./วัน) หรือเทียบเท่า 1, 5 และ 25 เท่าของขนาดใช้ในคนต่อวัน ส่วนหนูกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ใช้ศึกษาว่าอาการพิษที่เกิดจากเคอร์คิวมินอยด์สามารถหายเป็นปกติได้หรือไม่หากไม่ได้รับสารนั้นแล้ว หนูกลุ่มนี้ได้รับ เคอร์คิวมินอยด์ 250 มก./กก./วัน เช่นกัน แต่หลังจากได้รับสารครบ 6 เดือน ได้ให้หยุดให้สารเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนทำการผ่าชาก พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของหนูเพศผู้ที่ได้รับเคอร์คิวมินอยด์ 50 มก./กก./วัน สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับทรากาค้านอย่างมีนัยสำคัญ เคอร์คิวมินอยด์ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาใดๆ ที่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารที่ให้ ในหนูเพศผู้ที่ได้รับเคอร์คิวมินอยด์ 250 มก./กก./วัน พบว่าน้ำหนักจริงและน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับ และระดับของอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส สูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม แต่ระดับของอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสยังอยู่ในช่วงค่าปกติ แม้ว่าหนูกลุ่มนี้ดูเหมือนจะมีอุบัติการณ์ของไขมันสะสมในตับและชั้นคอร์เท็กซ์ของต่อมหมวกไตสูง แต่อุบัติการณ์ดังกล่าวก็ไม่ได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าการใช้เคอร์คิวมินอยด์ ในขนาดที่ใช้ในคน (10 มก./กก./วัน) ติดต่อกันเป็นเวลานาน ไม่ทำให้เกิดพิษในหนูขาว อย่างไรก็ตาม เคอร์คิวมินอยด์ในขนาดสูงอาจมีผลต่อการทำงานและโครงสร้างของตับได้ แต่เป็นการเปลี่ยนแปลงที่กลับเป็นปกติใหม่ได้เมื่อหยุดให้เคอร์คิวมินอยด์

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

Turmeric is the dried rhizome of *Curcuma longa* L. of the family Zingiberaceae. It has long been used as a food-coloring agent and spice all over the world, especially in Asia. Based on the clinical study conducted in Thailand, turmeric is recommended by WHO and Thailand's Essential Drug List as an herbal medicine for the treatment of dyspepsia (Thamlikitkul, *et al.*, 1989, World Health Organization, 1999, National Drug Committee, 2000).

Chemically, turmeric contains curcuminoids, volatile oil, starch and resin. Curcuminoids refer to a group of compounds present in turmeric, which are chemically related to its principal; constituent, curcumin (diferuloylmethane). Three main curcuminoids that can be isolated from turmeric are curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin. These curcuminoids are responsible for yellow color of the herb (Department of Medical Sciences, 1998).

There are many reports on pharmacological and clinical studies of curcuminoids

and the dose of curcuminoids used in those clinical studies varied from 500 mg to 1.2 g per day (Majeed, *et al.*, Soni and Kuttan, 1992). Recently it has been discovered that curcuminoids are potent antioxidant and possess chemopreventive activity (Selvam, *et al.*, 1995, Grinberg, 1996, Ramsewak, *et al.*, 2000, Huang , *et al* ., 1994, Limtrakul, *et al* ., 1997, Limtrakul et al ., 2001). However, there appears to be only a few published articles on the toxicity of turmeric but none on the toxicity of curcuminoids (Bhavani, *et al.*, 1980, Sittisomwong, *et al.*, 1990, Qureshi, *et al.*, 1992). The present study was therefore conducted to determine toxicity of curcuminoids extract in rats in order to obtain scientific evidence about the safety of this group of compounds upon long-term consumption. The result of this study can be used to promote the safe use of curcuminoids in Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of curcuminoids

Dried rhizomes of *Curcuma longa* L. were collected from local market and ground into powder. The turmeric powder was extracted with ethanol and then evaporated at low pressure to obtain ethanolic extract in the from of semisolid residue containing oil and curcuminoids. The oil part was then removed to give curcuminoids extract. The curcuminoids contents of the extract used in the experiment were 58 - 67% and the ratio of curcumin : desmethoxycurcumin : bisdesmethoxycurcumin was 1 : 0.4-0.5 : 0.2-0.3. The curcuminoid extract was suspended to the desired concentrations with 0.5% tragacanth suspension.

Treatment of the animals

Ninety male Wistar rats weighing 290-320 g and 90 female rats weighing 200-230 g from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom province, were used. The animals were housed in the animal facility of the Department of Medical Sciences. The temperature in the animal room was kept at 25±1°C with 60% relative humidity. The animals were allowed to have free access to food and clean water.

Six-months toxicity study

Ninety Wistar rats of each sex were randomly divided into 6 groups of 15 animals per sex. Group 1 (water control) received water 5 ml/kg BW/day orally and Group 2 (tragacanth control) received 0.5% tragacanth suspension 5 ml/kg BW/day. Group 3-6 were given the curcuminoids suspended in 0.5% tragacanth suspension at the doses of 10, 50, 250 or 250 mg/kg BW/day, respectively. Body weight and food intake was measured weekly and the animals were observed for signs of abnormalities throughout the study. At the end of 6 month treatment period, the 1^{st} - 5^{th} groups of rats were fasted for 18 hours, then anesthetized with ether and sacrificed by drawing blood samples from the inferior vena

cava for hematological and biochemical examinations. The 6th group of rats, the recovery group, was allowed to have free access to food and water without curcuminoids administration for another 14 days before being sacrificed.

Hematological analysis was performed using performed using an automatic hematological analyzer (Cell dyn● 3500, Abbott). Hematological parameters measured were white blood cell (WBC), %neutrophil, %lymphocyte, %monocyte, %basophil, %eosinophil, red blood cell (RBC), hemoglobin, hematocrit (Hct), platelet, plateletcrit (PCT),%reticulocyte, and reticulocyte.

Biochemical analysis of serum samples was performed using an automatic chemistry analyzer (Hitachi model 912). Biochemical parameters measured were aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) , p-amylase, bilirubin, creatinine, blood urea nitrogen (BUN), cholesterol, triglyceride, total protein, albumin, uric acid, glucose, sodium, potassium and chloride.

The positions, shapes, sizes and colors of internal organs, namely, brain, heart, both kidneys and lungs, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intestine, spleen, bladder, and testis in male rats or ovary and uterus in female rats were visually observed for any signs of gross lesions. These organs were then collected, weighed to determine actual and relative organ weights, and preserved in 10% buffered formalin solution. Tissue slides were later prepared and stained with hematoxylin and eosin, and histopathological were examinations were performed by a veterinary pathologist.

Statistical analysis

Data were statistically analyzed using SPSS/PC program and statistically significant difference was set at $p<0.05$. Food consumption, body weight, hematology, serum biochemistry and organ weight (absolute and relative) data analyzed by one - way ANOVA followed by Bonferoni's test or Tamhane's test. Histopathological results were evaluated by test Fisher exact test at $p<0.05$.

RESULTS

Effects of the curcuminoids on body weight and food intake

The body weights of male rats receiving 50 mg/kg/day of curcuminoids were significantly higher than those of the tragacanth control group from the first week until the end of the study (Figure 1). The body weights of male rats receiving curcuminoids 10 mg/kg/day were significantly higher than those of the tragacanth control during the 3rd- 5th weeks.

In female rats, the body weights of the group receiving curcuminoids 50 mg/kg/day were significantly higher than those of the water control during the 5th until the 8th weeks.

The body weights of the group receiving curcuminoids 250 mg/kg/day were significantly higher than those of the water control between the 1st and 16th weeks. The body weights of tragacanth group were significantly higher than those of the water control group during the 1st-8th weeks (Figure 1).

The food intakes of both male and female rats receiving curcuminoids were significantly higher than those of the tragacanth controls on some weeks during the study (Figure 2).

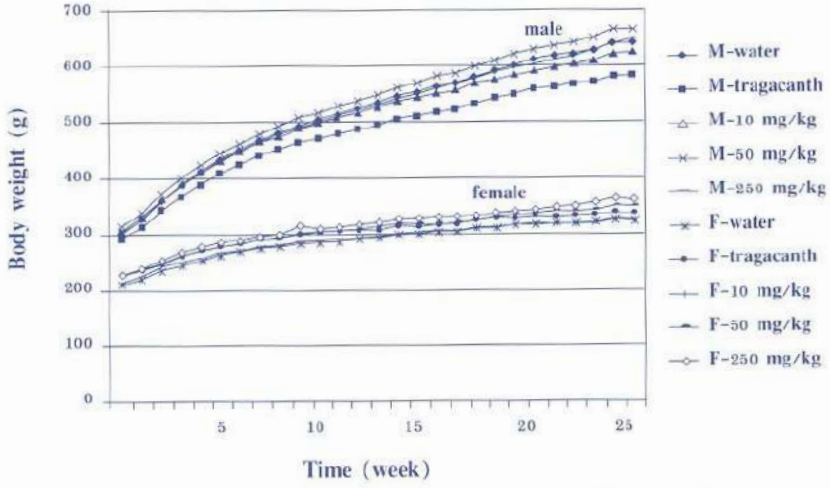


Figure 1. Growth curves of male and female rats receiving curcuminoids for 6 months.

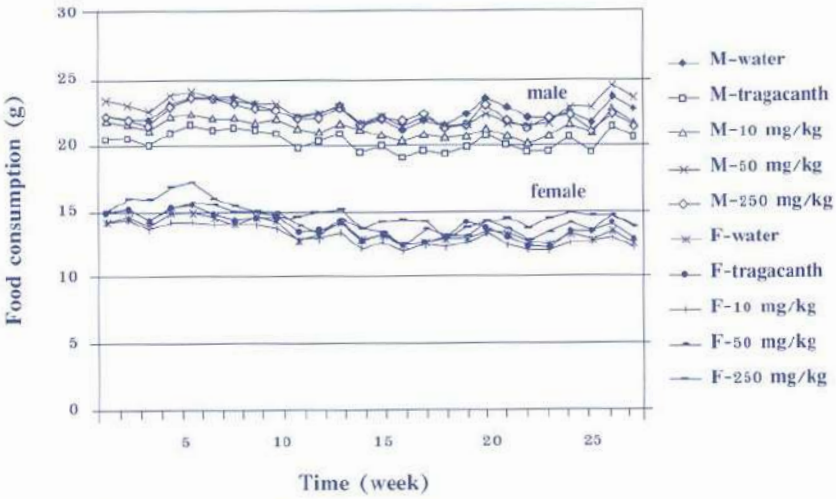


Figure 2. Food consumption of male and female rats receiving curcuminoids for 6 months

Effect of curcuminoids on actual organ weight and relative organ weight.

Male rats treated with curcuminoids at the dose of 250 mg/kg/day had a higher actual weight and relative weight of the liver than the water and tragacanth control groups, and had a higher actual weight of the left kidneys than the tragacanth control group. Male rats treated with curcuminoids at the dose of 50 mg/kg/day had a higher weight of the liver but a lower relative weight of the brain than the tragacanth control group. (Table 1 and Table 3).

Female rats treated with curcuminoids at the dose of 250 mg/kg had a higher actual weight of the liver than the water and tragacanth control groups. Female rats treated with curcuminoids at the dose of 50 mg/kg had a higher actual weight of the brain than the water control group. (Table 2).

Effect of curcuminoids on hematological parameters

Table 5 and 6 showed that was no difference of the number of white blood cell, %neutrophil , %lymphocyte , %monocyte , %basophil, %esoinophil , the number of red blood cell, hematocrit, platelet, PCT, or the number of reticulocytes between curcuminoids-treated groups and those of the water and tragacanth control group of both male and female rats. The group of male rats receiving curcuminoids at the dose of 250 mg/kg/day had significantly lower hemoglobin level than the water control group. In the recovery group of male rats, the number of reticulocytes was significantly lower than that of the water control group, while %hematocrit was significantly lower than those of the two control groups.

Effect of the curcuminoids on blood chemistry

In male and female rats, no difference in the serum levels of AST, ALT, P-amylase bilirubin, ceratinine, BUN, triglyceride, total protein, uric acid, glucose, sodium, potassium , or chloride was found between all curcuminoids-treated groups and the water and tragacanth control groups. The group of male rats receiving curcuminoids at the dose of 250 mg/kg/day had significantly higher ALP than the tragacanth control group and had significantly higher albumin than the water and tragacanth control groups. The group of female rats receiving curcuminoids at the dose of 250 mg/kg/day had significantly higher cholesterol than the tragacanth control (Table 7-8).

Effect of curcuminoids on histopathology of internal organs

Upon gross examination of internal organs no abnormal signs were observed. Histopathological results indicated that some lesion were found in some groups or all groups of animals in the lung, heart, liver, kidney, spleen, intestine, thyroid gland, and testis (in male rats), or uterus and mammary gland (in

Table 1. **Actual organ weight and body weight of male rats given curcuminoids orally for 6 months.**

Male	Group of animals					
	water	tragacanth	10 mg/kg/day	50 mg/kg/day	250 mg/kg/day	250-R mg/kg/day
	N=15	N=15	N=15	N=14	N=15	N=15
Initial body weight	306±18	292±17	309±12	315±5**	300±15	301±24
Final body weight	635±63	576±48	618±53	657±44**	640±76	670±68**
Weight gain	329±51	285±35	309±51	342±42	340±67	368±59**
Brain	2.08±0.075	2.10±0.063	2.11±0.067	2.11±0.070	2.14±0.120	2.14±0.043
Heart	1.50±0.16	1.47±0.14	1.45±0.13	1.54±0.094	1.54±0.24	1.58±0.17
Right Kidney	1.37±0.11	1.31±0.10	1.31±0.11	1.40±0.12	1.60±0.60	1.49±0.17
Left Kidney	1.33±0.11	1.24±0.13	1.24±0.15	1.34±0.11	1.39±0.12**	1.42±0.18**
Urinary bladder	0.143±0.032	0.143±0.021	0.153±0.022	0.160±0.030	0.145±0.034	0.148±0.031
Liver	14.66±1.97	13.10±1.30	14.17±1.20	15.39±1.55**	17.05±2.03*,**	15.77±2.08**
Spleen	1.10±0.13	1.04±0.15	1.14±0.15	1.12±0.14	1.15±0.17	1.11±0.16
Stomach	2.19±0.20	2.04±0.22	2.18±0.20	2.23±0.17	2.23±0.21	2.29±0.25**
Lung	1.87±0.28	1.70±0.18	1.87±0.22	1.72±0.14	1.83±0.13	1.92±0.18**
Right Adrenal	0.035±0.066	0.033±0.054	0.030±0.051	0.036±0.055	0.034±0.068	0.034±0.055
Left Adrenal	0.040±0.071	0.037±0.047	0.035±0.055	0.039±0.061	0.039±0.067	0.038±0.054
Right Testis	3.16±0.55	3.10±0.37	3.24±0.26	3.23±0.25	3.23±0.44	3.21±0.23
Left Testis	3.09±0.38	3.15±0.42	3.24±0.31	3.54±1.08	3.22±0.41	3.20±0.25

Each value represents mean ± SD.

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

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

female rats) (Table 9-10). Meanwhile, no lesion was found in the brain pancreas, esophagus, and salivary gland in all groups of animals. The lesions found in all or some groups of both male and female animals were lymphoid proliferated peribronchioles, fatty degeneration of the liver, tubular cyst of the kidney, lymphoid hyperplasia of the spleen, and lymphoid aggregation in the submucosal layer of the intestine. However, the incidence of those changes in the controls and curcuminoids - treated groups was not significantly different (Table 9-10).

Other histopathological findings in some groups of male rats treated with curcuminoids were focal myocardiosis, tes-

Table 2. **Actual organ weight and body weight of female rats given curcuminoids orally for 6 months.**

Female	Group of animals					
	water	tragacanth	10 mg/kg/day	50 mg/kg/day	250 mg/kg/day	250-R mg/kg/day
	N=15	N=15	N=15	N=15	N=15	N=15
Initial body weight	209±9	225±8*	214±14	221±11	227±17*	211±14
Final body weight	318±29	330±24	318±31	345±31	356±37	364±55*
Weight gain	110±25	105±19	104±24	124±27	130±31	143±47*,**
Brain	1.91±0.066	1.94±0.099	1.94±0.088	1.99±0.066*	1.96±0.055	1.93±0.071
Heart	0.91±0.090	0.95±0.099	0.91±0.049	0.97±0.059	1.00±0.095	0.98±0.117
Right Kidney	0.82±0.082	0.81±0.043	0.80±0.106	0.87±0.217	0.89±0.112	0.81±0.241
Left Kidney	0.78±0.072	0.78±0.058	0.76±0.092	0.76±0.119	0.85±0.087	0.80±0.092
Urinary bladder	0.078±0.011	0.086±0.012	0.082±0.095	0.086±0.011	0.085±0.012	0.080±0.096
Liver	6.94±0.74	6.98±0.55	6.78±0.73	7.44±0.65	8.47±1.55*,**	7.80±1.55
Spleen	0.65±0.052	0.74±0.14	0.68±0.12	0.69±0.10	0.74±0.10	0.77±0.19
Stomach	1.57±0.17	1.59±0.18	1.57±0.23	1.59±0.20	1.59±0.17	1.63±0.20
Lung	1.33±0.11	1.33±0.13	1.28±0.11	1.32±0.11	1.34±0.11	1.33±0.098
Right Adrenal	0.039±0.064	0.038±0.081	0.039±0.049	0.038±0.055	0.041±0.079	0.040±0.068
Left Adrenal	0.043±0.058	0.040±0.080	0.039±0.055	0.043±0.044	0.042±0.089	0.041±0.065
Right ovary	0.065±0.014	0.062±0.017	0.062±0.013	0.060±0.014	0.062±0.016	0.084±0.0116
Left ovary	0.063±0.017	0.064±0.097	0.068±0.019	0.067±0.014	0.068±0.019	0.058±0.011
Uterus	0.63±0.26	0.80±0.30	0.67±0.14	0.71±0.23	0.81±0.17	0.72±0.23

Each value represents mean ± S.D.

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

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

ticular atrophy, follicular hyperplasia of the thyroid gland. The incidence of those abnormalities was, however, neither dose-related nor significantly different from that of the controls (Table 9). Adrenocortical fatty degeneration were found in all groups of male rats with the highest incidence (10/15) in the group treated with curcuminoids 250 mg/kg, yet the incidence was not significantly different from controls (Table 9). An isolated case of renal cell carcinoma was detected in one male rat receiving curcuminoids 250 mg/kg.

In female rats, tubular cast was found in the kidneys of all groups of animals and

Table 3. Organ weight relative to body weight@ (g/kg BW) of male rats given curcuminoids orally for 6 months.

Male	Group of animals					
	water	tragacanth	10 mg/kg/day	50 mg/kg/day	250 mg/kg/day	250-R mg/kg/day
	N=15	N=15	N=15	N=14	N=15	N=15
Final body weight	635±63	576±48	618±53	657±44**	640±76	670±68**
Brain	3.36±0.27	3.72±0.30*	3.51±0.32	3.28±0.21**	3.49±0.52	3.24±0.33**
Heart	2.42±0.24	2.60±0.24	2.40±0.19	2.39±0.17	2.49±0.29	2.38±0.18
Right Kidney	2.20±0.18	2.33±0.23	2.16±0.15	2.18±0.24	2.56±0.81	2.25±0.18
Left Kidney	2.14±0.16	2.20±0.24	2.05±0.19	2.08±0.22	2.26±0.21	2.13±0.18
Urinary bladder	0.23±0.054	0.26±0.032	0.25±0.048	0.26±0.050	0.24±0.049	0.22±0.048
Liver	23.45±1.67	23.14±1.79	23.38±1.30	23.82±1.86	27.54±3.14*,**	23.66±1.76
Spleen	1.76±0.17	1.83±0.24	1.88±0.20	1.74±0.23	1.86±0.26	1.68±0.21
Stomach	3.53±0.32	3.60±0.26	3.60±0.33	3.46±0.33	3.61±0.44	3.46±0.34
Lung	3.00±0.31	3.01±0.25	3.09±0.41	2.67±0.23	2.97±0.39	2.90±0.32
Right Adrenal	0.059±0.092	0.059±0.098	0.054±0.085	0.056±0.098	0.058±0.016	0.052±0.010
Left Adrenal	0.064±0.091	0.067±0.013	0.059±0.010	0.062±0.011	0.066±0.020	0.056±0.071
Right testis	5.08±0.87	5.48±0.56	5.38±0.66	5.04±0.59	5.26±0.97	4.86±0.52
Left testis	5.00±0.74	5.56±0.67	5.37±0.68	5.53±1.90	5.23±0.88	4.84±0.48

@ Organ weight relative to body weight is expressed as (g organ weight/g body weight)x1000

Each value represents mean ± S.D.

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

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

glandular hyperplasia of the mammary glands was found in some groups of animals, but the incidence was not dose-related or significantly different between groups (Table 10). Glandular hyperplasia of the uterus and cervix was found in only one animals treated with 50 mg/kg curcuminoids, while congestion of the adrenal gland was found in only one animal in the water control group.

DISCUSSION

Even though it was found that the body weights of some groups of curcuminoids-treated rats were significantly higher than those of the controls on some weeks during the experimental period, this may in part be due to the initial body weights which were significantly higher than those of the controls from

Table 4. **Organ weight relative to body weight@ (g/kg BW) of female rats given curcuminoids orally for 6 months.**

Female	Group of animals					
	water	tragacanth	10 mg/kg/day	50 mg/kg/day	250 mg/kg/day	250-R mg/kg/day
	N=15	N=15	N=15	N=15	N=15	N=15
Final body weight	318±29	330±24	318±31	345±31	356±37	364±55*
Brain	6.14±0.53	6.03±0.51	6.25±0.45	5.94±0.55	5.65±0.53	5.48±0.79*
Heart	2.94±0.28	2.96±0.32	2.92±0.16	2.87±0.20	2.88±0.23	2.75±0.34
Right Kidney	2.62±0.31	2.53±0.25	2.59±0.28	2.60±0.74	2.55±0.34	2.27±0.89
Left Kidney	2.50±0.29	2.44±0.27	2.45±0.22	2.26±0.35	2.45±0.26	2.25±0.30
Urinary bladder	0.25±0.032	0.27±0.040	0.27±0.028	0.26±0.034	0.24±0.047	0.23±0.041**
Liver	22.35±3.10	21.61±1.30	21.85±2.25	22.09±2.16	24.23±3.54	21.73±2.04
Spleen	2.11±0.29	2.30±0.44	2.18±0.31	2.05±0.35	2.13±0.27	2.14±0.44
Stomach	5.07±0.80	4.94±0.59	5.06±0.85	4.73±0.67	4.57±0.60	4.60±0.77
Lung	4.27±0.49	4.12±0.52	4.12±0.33	3.94±0.50	3.87±0.45	3.76±0.52
Right adrenal	0.13±0.019	0.12±0.029	0.13±0.020	0.12±0.017	0.12±0.020	0.11±0.016
Left adrenal	0.14±0.028	0.12±0.026	0.13±0.020	0.13±0.016	0.12±0.023	0.12±0.024
Right ovary	0.21±0.048	0.19±0.057	0.20±0.039	0.18±0.043	0.18±0.052	0.25±0.37
Left ovary	0.20±0.052	0.20±0.032	0.22±0.054	0.20±0.033	0.20±0.051	0.17±0.041
Uterus	2.01±0.81	2.50±0.92	2.19±0.55	2.13±0.70	2.35±0.58	2.04±0.73

@ Organ weight relative to body weight is expressed as (g organ weight/g body weight)x1000

Each value repreasents mean ± SD.

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

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

the beginning of the study. There was no difference of the hematological parameters between curcuminoids - treated groups and those of the control groups, except for male rats treated with high dose of curcuminoids that had significantly lower hemoglobin level than the water control group, but the higher hemoglobin level was still within the normal rage (Gad, 1992)

Biochemical examinations of the serum showed that male rats receiving high dose of curcuminoids had a significantly higher ALP level than the tragacanth control, and a significantly higher albumin level than the two control groups (Table 7). However, both the ALP and albumin levels of this group of ani-

Table 5. Hematological examination results of male rats given curcuminoids orally for 6 months.

Male	Group of animals					
	water	tragacanth	10 mg/kg/day	50 mg/kg/day	250 mg/kg/day	250-R mg/kg/day
	N=15	N=15	N=15	N=14	N=15	N=15
WBC (K/uL)	6.73±2.14	5.33±1.27	5.76±1.32	5.92±1.27	5.20±1.51	6.37±1.26
%Neutrophil	17.88±5.76	17.46±5.66	18.70±4.89	18.56±5.34	15.75±4.36	16.78±3.85
%Lymphocyte	78.69±5.19	79.32±6.18	77.98±5.21	77.96±5.47	80.28±5.72	79.80±4.14
%Monocyte	1.32±1.43	1.22±1.66	1.04±1.27	1.06±1.07	1.78±1.91	0.99±0.89
%Basophil	0.64±0.24	0.55±0.26	0.56±0.29	0.64±0.47	0.66±0.27	0.70±0.31
%Eosinophil	1.48±0.29	1.44±0.49	1.71±0.65	1.79±0.53	1.52±0.33	1.73±0.73
RBC($x10^6$/uL)	9.01±0.39	8.79±0.32	8.77±0.39	8.90±0.39	8.74±0.45	8.43±0.74*
Hemoglobin (g/dL)	16.22±0.57	15.78±0.46	15.73±0.43	15.76±0.41	15.56±0.48*	15.87±0.55
%Hematocrit	46.65±2.11	45.58±1.90	44.47±2.69	45.55±1.29	44.65±1.99	42.69±4.38*,**
Platelet (K/uL)	929.67±111.73	869.10±115.16	908.23±58.07	905.07±73.06	900.43±103.50	906.80±126.08
PCT(%)	0.92±0.14	0.84±0.15	0.89±0.13	0.86±0.081	0.86±0.099	0.92±0.17
% Reticulocyte	18.48±6.51	13.19±6.06	14.38±2.57	13.82±5.14	14.93±5.58	13.73±5.07
Reticulocyte (K/uL)	1676.53±579.59	1158.93±569.99	1260.00±270.40	1223.21±457.83	1312.86±510.37	1133.07±429.57*

Each value repreasents mean ± SD.

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

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

mals were still within the normal range (Gad 1992). In addition these changes appeared to be reversible since the levels of both ALP and albumin in the recovery group were not different from those of the two controls. Female rats receiving high dose of curcuminoids had significantly higher cholesterol level than the tragacanth control; however, it appeared to be a reversible change because cholesterol level of the recovery group was not different from that of the tragacanth control (Table 8).

Histopathological examinations of the internal organs of male rats receiving high does of curcuminoids showed an apparently dose-related incidence of mild degree of fatty degeneration in the liver and adrenocortical fatty degeneration that than of the two controls. The incidence of both histopatho-

Table 6. Hematological examination results of female rats given curcuminoids orally for 6 months.

Female	Group of animals					
	water	tragacanth	10 Mg/kg/day	50 mg/kg/day	250 mg/kg/day	250-R mg/kg/day
	N=15	N=15	N=15	N=15	N=15	N=15
WBC (K/uL)	3.16±1.51	2.83±1.18	2.40±0.67	2.65±1.13	2.69±0.92	2.36±0.96
%Neutrophil	19.91±8.37	21.36±11.16	22.06±6.65	23.19±4.60	21.33±5.71	21.93±6.80
%Lymphocyte	75.56±9.62	75.49±11.12	73.54±7.70	72.31±5.55	73.40±6.31	73.22±8.05
%Monocyte	2.05±1.84	0.90±0.44	1.47±1.42	1.54±1.68	2.26±2.48	2.09±2.19
%Basophil	0.51±0.54	0.48±0.31	0.55±0.49	0.50±0.24	0.73±0.49	0.57±0.32
%Eosinophil	3.10±4.28	1.77±0.61	2.37±0.92	2.46±1.11	2.29±0.62	2.19±0.84
RBC($x10^6$/uL)	8.00±0.48	7.77±0.56	7.86±0.50	7.82±0.49	7.75±0.40	7.63±0.49
Hemoglobin (g/dL)	15.54±0.49	15.18±0.75	15.31±0.55	15.31±0.74	15.20±0.46	15.10±0.46
%Hematocrit	44.38±2.59	43.16±1.75	43.74±2.62	43.79±2.26	43.24±1.93	42.40±2.10
Platelet (K/uL)	855.07±100.51	803.20±84.62	848.00±98.19	843.37±100.51	814.03±87.63	812.30±99.91
PCT(%)	0.84±0.12	0.76±0.073	0.80±0.11	0.81±0.11	0.76±0.069	0.78±0.09
% Reticulocyte	16.72±6.57	17.49±5.13	15.47±5.70	12.81±5.85	15.81±4.72	16.59±5.36
Reticulocyte (K/uL)	1340.07±535.38	1343.80±337.44	1234.50±493.81	983.73±423.91	1223.07±400.15	1268.14±444.68

Each value represents mean ± S.D.

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

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

logical findings in the recovery group, however, appeared to be lower than that of the high dose group and not significantly different from that of the controls suggesting that these observed pathological changes were reversible. Since there were no change of serum triglyceride or glucose levels in curcuminoids - treated male rats, the fatty degeneration of the two organs was not likely due to an increase of serum triglyceride or glucose levels. The reason for the fatty change in the two organs was not known.

Therefore, if curcuminoids will be taken at a high dose for a long period of time, patients should be advised to observe themselves for any possible sign of liver toxicity, i.e. juandice or yellowing of the skin or the eye, brown urine, nausea, vomiting, abdomi-

Table 7. Blood chemistry results of male rats given curcuminoids orally for 6 months.

Male	Group of animals					
	water	tragacanth	10 mg/kg/day	50 mg/kg/day	250 mg/kg/day	250-R mg/kg/day
	N=15	N=15	N=15	N=14	N=15	N=15
AST (U/L)	70.47±8.55	68.67±6.91	71.93±10.09	73.86±14.42	67.07±6.58	71.13±15.09
ALT (U/L)	39.60±9.17	36.20±4.89	35.60±6.95	39.07±10.48	35.73±7.98	42.13±16.01
ALP (U/L)	67.47±9.16	62.73±9.74	69.07±16.37	74.21±12.74	79.40±13.39**	68.13±12.67
P-amylase (U/L)	1960.87± 260.43	1833.73± 139.52	1884.60± 205.10	2099.36± 207.49	1992.73± 311.97	2063.60± 271.07
Bilirubin (mg/dL)	0.066±0.039	0.073±0.037	0.070±0.028	0.080±0.025	0.069±0.042	0.052±0.036
Creatinine (mg/dL)	0.67±0.062	0.68±0.045	0.65±0.061	0.65±0.041	0.65±0.063	0.67±0.041
BUN (mg/dL)	18.64±1.55	19.19±3.16	18.28±2.38	17.64±2.05	17.80±2.04	17.63±1.83
Cholesterol (mg/dL)	89.31±19.55	85.75±16.37	91.71±18.77	81.68±15.80	104.47±22.79	118.40±24.20*,**
Triglyceride (mg/dL)	183.42±72.53	139.42±33.75	155.20±30.13	149.90±38.95	152.12±54.28	253.94±88.26**
Total protein (g/dL)	6.95±0.31	6.83±0.19	6.91±0.29	6.94±0.23	6.94±0.29	7.15±0.31**
Albumin (g/dL)	4.27±0.14	4.23±0.09	4.25±0.14	4.36±0.13	4.44±0.19*,**	4.24±0.17
Uric acid (mg/dL)	2.71±1.34	1.51±0.59	1.90±1.03	1.84±0.87	2.01±0.89	1.87±0.87
Glucose (mg/dL)	185.57±30.78	154.04±17.72*	165.93±21.81	169.66±22.36	171.07±28.88	172.28±19.04
Sodium (mmol/L)	146.47±2.26	146.80±1.82	147.33±1.84	147.86±1.66	148.20±1.90	147.13±1.25
Potassium (mmol/L)	6.54±1.37	5.69±0.81	5.65±0.37	5.44±0.48	5.65±0.43	5.93±0.75
Chloride (mmol/L)	109.80±2.43	111.27±1.87	111.40±1.55	111.57±1.83	111.87±2.26	112.73±2.31*

Each value represents mean ± SD.

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

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

Table 8. Blood chemistry results of female rats given curcuminoids orally for 6 months.

FeMale	Group of animals					
	water	tragacanth	10 mg/kg/day	50 mg/kg/day	250 mg/kg/day	250-R mg/kg/day
	N=15	N=15	N=15	N=15	N=15	N=15
AST (U/L)	86.87±29.15	93.07±24.86	102.80±41.78	97.40±36.66	73.80±12.39	74.07±11.75
ALT (U/L)	43.60±17.44	40.93±19.58	47.33±17.77	47.00±18.35	36.80±11.10	35.40±9.83
ALP (U/L)	22.67±4.12	23.27±7.27	20.73±3.20	23.60±6.43	23.60±4.61	22.67±4.29
P-amylase	1217.53±299.96	1143.27±170.25	1146.67±178.65	1082.53±212.42	1230.60±167.27	1298.60±238.92
Bilirubin (mg/dL)	0.097±0.037	0.096±0.051	0.099±0.040	0.080±0.052	0.112±0.059	0.074±0.035
Creatinine (mg/dL)	0.75±0.079	0.76±0.084	0.76±0.070	0.77±0.090	0.75±0.065	0.74±0.061
BUN (mg/dL)	21.45±3.45	21.95±3.72	22.34±2.70	21.50±2.60	19.99±3.22	19.05±3.13
Cholesterol (mg/dL)	71.59±14.39	65.02±10.76	74.24±9.83	79.05±16.66	83.46±18.86**	72.53±16.38
Triglyceride (mg/dL)	109.93±30.98	112.82±40.87	122.29±39.66	127.74±39.82	134.81±41.25	143.35±71.07
Total protein (g/dL)	7.27±0.49	7.28±0.36	7.31±0.27	7.40±0.36	7.56±0.29	7.33±0.44
Albumin (g/dL)	5.00±0.31	5.00±0.35	5.09±0.21	5.12±0.25	5.28±0.22	5.05±0.27
Uric acid (mg/dL)	1.77±0.86	1.43±0.91	1.94±1.21	1.47±0.68	1.58±0.82	1.48±0.55
Glucose (mg/dL)	141.07±22.46	133.45±19.19	144.32±33.92	139.75±23.68	143.33±15.77	153.70±23.05
Sodium (mmol/L)	147.13±1.60	147.67±1.78	147.67±1.68	148.07±1.44	148.20±1.57	148.47±0.92
Potassium (mmol/L)	5.42±0.94	4.69±0.96	5.15±1.06	4.88±0.95	5.05±0.95	4.63±0.67
Chloride (mmol/L)	113.20±1.66	113.07±1.58	113.40±1.40	113.33±1.84	113.73±1.94	116.93±1.87*,**

Each value repreasents mean ± SD.

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

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

Table 9. Histopathological results of visceral organs in male rats given curcuminoids orally for 6 months.

Organs	Microscopic findings	Group of animals					
		water	tragacanth	10 mg/kg/day	50 mg/kg/day	250 mg/kg/day	250-R mg/kg/day
Lung	Lymphoid proliferated peribronchioles	4/14	6/14	8/15	4/14	3/15	8/15
Heart	Focal myocardiosis	3/14	1/14	1/15	1/14	0/15	0/15
Liver	Fatty degeneration	4/14	3/14	2/15	5/14	8/15	4/15
Kidney	Tubular cyst	2/14	2/14	0/15	2/14	0/15	2/15
	Renal cell carcinoma	0/14	0/14	0/15	0/14	1/15	0/15
Spleen	Lymphoid hyperplasia	0/14	0/14	0/15	1/14	0/15	0/15
Intestine	Lymphoid aggregated submucosal layer	2/14	2/14	4/15	2/14	0/15	2/15
Testis	Atrophy	1/14	2/14	0/15	0/15	1/15	0/15
Adrenal gland	Cortical fatty degeneration	5/14	5/14	2/15	5/14	10/15	6/15
Thyroid gland	Follicular hyperplasia	0/14	0/14	0/15	2/14	0/15	0/15

The results were expressed as the number of rats with pathological findings per total number of rats treated.

Table 10. Histopathological results of visceral organs in female rats given curcuminoids orally for 6 months.

Organs	Microscopic findings	Group of animals					
		water	tragacanth	10 mg/kg/day	50 mg/kg/day	250 mg/kg/day	250-R mg/kg/day
Lung	Lymphoid proliferated peribronchioles	4/15	5/14	6/14	2/15	2/15	6/15
Heart	Myocardial calcification	1/15	0/14	0/14	0/15	0/15	0/15
Liver	Fatty degeneration	0/15	0/14	0/15	0/14	2/15	0/15
Kidney	Tubular cast	5/15	3/14	4/14	7/15	6/15	5/15
	Tubular cyst	0/15	0/14	0/14	1/15	0/15	0/15
Spleen	Lymphoid hyperplasia	0/14	0/14	0/15	1/14	0/15	0/15
Intestine	Lymphoid aggregated Submucosal layer	2/15	2/14	1/14	0/15	0/15	3/15
Uteus and cervix	Glandular hyperplasia	0/15	0/14	0/14	1/15	0/15	3/15
Mammary gland	Glandular hyperplasia	0/15	2/14	2/14	0/15	0/15	3/15
Adrenal gland	Congestion	1/15	0/14	0/14	0/15	0/15	0/15

The results were expressed as the number of rats with pathological findings per total number of rats treated.

nal pain, light-colored stool, unusual tiredness, and loss of appetite. In additiion, liver function test should also be performed periodically.

CONCLUSION

Six-month chronic toxicity study of curcuminoids in Wistar rats indicated that curcuminoids at the doses of 10 and 50 mg/kg/day did not produce any significant dose-related changes of organ weights, hematological parameters, serum biochemistry or pathology of the internal organs. Both male and female rats receiving curcuminoids 250 mg/kg/day had higher actual weights of the liver than those of the two control groups. Fatty degeneration of the liver occurred in a dose-dependent manner in male rats, while it was observed in 2 out of 15 female rats receiving the highest dose of curcuminoids. In addition, a dose - related adrenocortical fatty degeneration was also observed in curcuminoids - treated male rats but not in female rats. However, the incidence of these pathological changes was not significantly different between curcuminoids-treated animals and the two controls, and was lower in the recovery group suggesting a reversible nature of these changes. Taken together, the results suggested that long term administration of curcuminoids at a high dose might affect the liver of the rat morphologically and functionally in a reversible manner.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Asst. Prof. Dr. Anuthep Rungseepipat of the Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, for histopathological examinations of tissue samples. We also thank Dr. Reywadee Butraporn and the staffs of the Animal Facility of the Department of Medical Sciences for the animal care.

REFERENCES

Bhavani Shankar, T.N., Shantha, NV., Ramesh, H.P., Murthy, I.A.S., and Murthy, V.S. 1980. Toxicity studies on turneric (*Curcuma longa*) : Acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. Indian J. Exp. Biol. 18:73-75.

Department of Medical Sciences, 1998. Khamin Chan. **In** Thai Herbal Pharmacopoeia. Volume 1., Bangkok. P. 38-44.

Gad, S.C. 1992. The Rat : Pathology. **In** Animal Models in Toxicology (Eds. S.C. Gad and C.P. Chengellis), Marcel Dekker, New York. P. 81.

Grinberg, L.N., Shalev, O., Tonnesen H.H., and Rachmilewitz., E.A. 1996. Studies on curcumin and curcuminoids: XXVI. Antioxidant effects of curcumin on the red blood cell membrane. Int. J. Pharmaceutics 132:251-257.

Haung, M.T., Lou, Y.R., Ma, W., Newmark,

H.L., Reuhl, K.R., and Conney, A.H. 1994. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach,duodenal, and colon carcinogenesis in mice Cancer Res. 54: 5841-5847.

Limtrakul, P., Lipigorngoson, S., Namwong, O., Apisariyakul, A., and Dunn, F.W. 1997 Inhibitory effects of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice Cancer Lett. 116: 197 - 203.

Limtrakul, P., Anuchapreeda, S., Lipigorngoson, S., and Dunn, F.W .2001. Inhibition of carcinogeninduced c-Ha-ras and c-fos proto - oncogenes expression by dietary curcumin. BMC Cancer 1:1.

Majeed, M., Badmaev, V., and Murray, F. 1995. Turmeric and the healing curcuminoids. Keats Publishing, New Canaan, Connecticut . p. 26-27.

National Drug Committee. 2000. Khamin Chan. **In** National List of Essential Drug A.D. 1999. (List of Herbal Medicine Products). Association of Thailand Agricultural Co-op Printing, Bangkok. P. 16-23.

Qureshi, S., Shah, A.H., and Ageel, A.M. 1992. Toxicity Studies on *Alpinia galanga* and *curcuma longa*. Planta. Med. 58: 124-127.

Ramsewak, R.S., De Witt, D.L. and Nair, M.G. 2000. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammtory activities of curcumins of curcumin I-III from *Curcuma longa*. Phytomedicine 7: 303-308.

Selvam, R., Subramanian, M., Gayathri, R., and Angayakanni, N. 1995. The anti-oxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). J. Ethnopharmacol. 47: 59-67.

Sittisomwong, N., Leelasagaluk, V., Chivapat, S., Wangmad, A., Ragsaman, P. and Chuntarachaya, C. 1990. Acute and subchronic toxicity of turmeric. Bull. Dept. Med. Sci. 32 (3) : 101-111.

Soni, K.B. and Kuttan, R. 1992. Effect of oral curcumin adminstration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. Indian J. Physiol Pharmacol 36(4): 273-275.

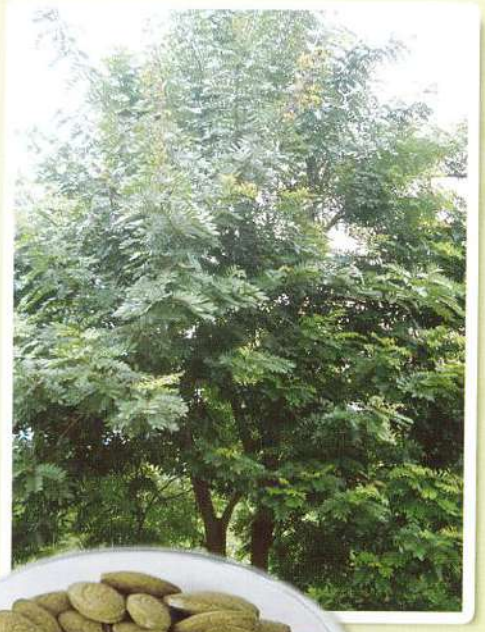
Smith, J.E. 1995. Comparative hematology. **In** Williams Hematology 5th Edition. (Eds. E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller and T.J. Kipps) McGraw-Hill, New York, p.77-85.

Thamlikitkul, V., Bunyapraphatsara, N., Dechatiwongse T., Theerapong, S., Chantrakul, C., Thanaveerasuwan, T., Nimitnon, S., Boonroj, P., Punkrut W., Gingsungneon, V., *et al.* 1989. Randomized double blind study of *Curcuma domestica* Val. for dyspepsia. J. Med. Assoc. Thai. 72: 613-620.

World Health Organization. 1999. Rhizoma Curcumae Longae. **In** WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. I. Malta. p. 115-124.

กวาวเครือแดง

เพชรสังฆาต



ขี้เหล็ก

มะระขี้นก

ชุมเห็ดเทศ

เจตมูลเพลิงแดง

ฟ้าทะลายโจร

ลูกใต้ใบ

ขมิ้นชัน

พิษเรื้อรังของสารสกัดลูกใต้ใบ

Chronic toxicity of *Phyllanthus urinaria* L. extract

Pranee Chavalittumrong, Songphol Chivapat**

Jaree Bansiddhi , Somkiat Punyamong* , Theerawat Pinthong* ,*

*Pranee Chuntapet** , Somlak Poungshompoo****

* Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand

** National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand

*** Faculty of Veterinary Science , Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดด้วย 95% เอธานอลของลูกใต้ใบ (*Phyllanthus urinaria* L.) ในหนูขาวสายพันธุ์วิสตาร์ 5 กลุ่ม ต่อเพศเป็นเวลา 6 เดือน หนูที่ได้รับสารสกัด 3 กลุ่ม กรอกสารสกัดขนาด 5, 50 หรือ 500 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน หรือเทียบเท่าผงยา 0.025, 0.25 และ 2.5 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ตามลำดับ หนูกลุ่มควบคุมด้วยน้ำได้รับน้ำ 10 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน (มล./กก./วัน) ส่วนหนูกลุ่มควบคุมด้วย tragacanthได้รับน้ำยาแขวนตะกอน 0.5% tragacanth 10 มล./กก./วัน ผลการศึกษาพบว่าไม่มีความแตกต่างของการเจริญเติบโตระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกับหนูกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังไม่พบความเป็นพิษของสารสกัดต่อระบบเลือด หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มและหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาดสูงสุดมีระดับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างทางจุลพยาธิวิทยาของตับระหว่างหนูที่ได้รับสารสกัดกับหนูกลุ่มควบคุม ส่วนผลของสารสกัดต่อไตนั้น แม้ว่าจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับยูเรียไนโตรเจนหรือครีอาตินินที่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดในหนูทั้งสองเพศ แต่ในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดพบว่าอัตราการเกิดการอักเสบและมีเลือดคั่ง (congestive glomerulotubular nephritis) สูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วย tragacanth ส่วนไตของหนูเพศเมียพบภาวะแคลเซียมสะสมที่ไต (nephrocalcinosis) แต่อัตราการเกิดไม่แตกต่างกันระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าสารสกัดด้วย 95% เอธานอลของลูกใต้ใบในขนาดที่ป้อนให้แก่หนูขาวในการทดลองนี้เป็นเวลา 6 เดือนอาจมีผลต่อการทำงานของตับและในหนูเพศผู้สารสกัดอาจมีผลต่อจุลพยาธิวิทยาของไต

ABSTRACT

A chronic toxicity study of the alcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* L. was performed in both sexes of Wistar rats that were divided into 5 groups. Three experimental groups were given the extract daily for 6 months at the concentrations of 5, 50 and 500 mg/kg BW/day which were equivalent to dried stems of 0.025, 0.25 and 2.5 g/kg BW/day, respectively. Two control groups, i.e., water and tragacanth control groups, received 10 ml of water/kg BW/day and 10 ml of 0.5% tragacanth suspension/kg BW/day, respectively. There was no effect on the growth and hematological parameters found in all of the experimental groups. Both male and female rats given the highest dose had elevated levels of aspartate aminotransferase (AST) but histopathological findings of the livers were not different between the tested and the two control groups. It was found that the incidence of congestive glomerulotubular nephritis and tubular hyalin cast in the experimental groups of male rats was higher than the tragacanth controls but no dose-dependent changes in blood urea nitrogen (BUN) or creatinine were seen. Histopathological examination of the female kidneys did not show differences in the incidence of nephrocalcinosis nor did demonstrate dose-related increase in BUN and creatinine. Our study suggested that the *P. urinaria* alcoholic extract at the dose given could possibly induce mild effect of liver function and lesions in the kidney of male rats after oral administration to the rats for upto 6 months.

INTRODUCTION

Phyllanthus urinaria L. is a small herb in the family of Euphorbiaceae[1]. It is widely distributed throughout Thailand and is known as Luk Tai Bai[2] in Thai. Chemical compounds isolated from *P. urinaria* were methyl brevifolincarboxylate, trimethyl ester dehydrochebulic acid, n-octadecane, beta-sitosterol, ellagic acid, daucosterol, kaempferol, quercetin, gallic acid, rutin[3], gallic acid ethyl ester[4], corilagin[5] and 7'-hydroxy-3',4',5, 9, 9'-pentamethoxy-3,4-methylenedioxy lignan[6].

P. urinaria was reported to possess several pharmacological activities. An aqueous extract that was intraperitoneally given to rats exhibited anti-inflammatory and analgesic activities. Hydroalcoholic extract of *P. urinaria* caused graded contraction in guinea pig trachea[7] and urinary bladder[8]. It was found that 50% methanol extract decreased blood glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats by facilitation of glucose metabolism and/or inhibition of glucose absorption in the gut[9]. An alcoholic extract of *P. urinaria* demonstrated antihepatotoxic activity in vitro and in vivo[10].

Several studies demonstrated antiviral activities of *P. urinaria*. The plant extract was found to inhibit Epstein Barr virus DNA polymerase[11], inhibit duck hepatitis B endogenous DNA polymerase[12], and decrease extracellular hepatitis B s-antigen (HBs Ag) excretion by inhibition intracellular (HBs Ag) formation[13]. Moreover, Hepatitis B e-antigen was undetectable in chronic hepatitis B infected patients receiving *P. urinaria* extract and seroconversion of Hepatitis B e-antibody were found[14]. Additionally, the water extract was shown to have retroviral reverse transcriptase inhibitory activity to Moloney Murine Leukemia Virus[15].

Recent study indicated that 7'-hydroxy-3',4',5, 9, 9'-pentamethoxy-3,4-methylenedioxy lignan, a novel molecule identified from *P. urinaria*, was capable of inhibiting telomerase activity and also could affect apoptosis by bcl2 inhibition and activation of caspase 3 and caspase 8[6].

It has become apparent that an increasing number of people prefer to take natural medicines, including *P. urinaria*, despite the fact that no safety assessment upon prolonged used is reported. Therefore, our study was to conduct chronic (6-month) toxicity of the alcoholic extract of *P. urinaria* in rats and to evaluate its safety for consumer protection.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

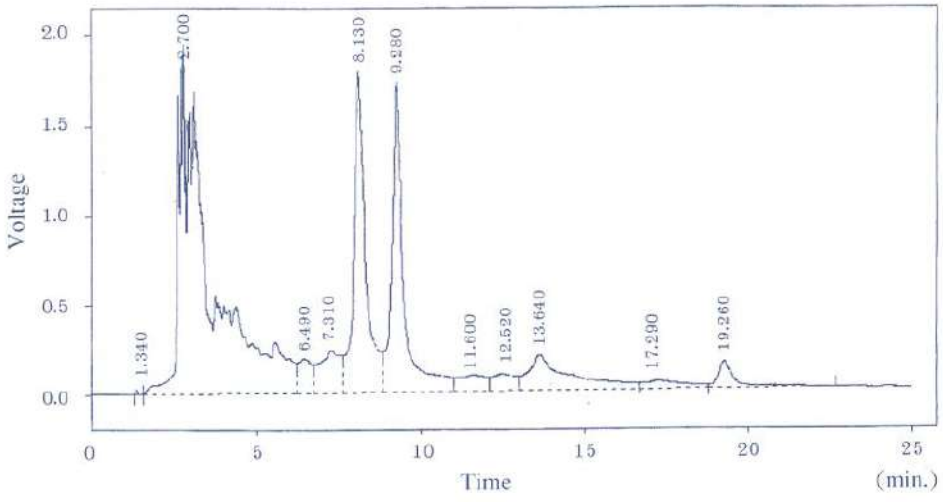
Aerial parts of *P. urinaria* were collected from the central part of Thailand and were identified by comparison with a voucher specimen at the Forest Herbarium of the Royal Forest Department, Ministry of Agriculture and Cooperative, Thailand.

Preparation of the Extract

The aerial parts were cut into small pieces, dried at 50°C, ground and extracted with 95% ethanol in a soxhlet apparatus. The ethanol extract was dried under vacuum in a rotary evaporator. An HPLC fingerprint of the extract showed a peak at 9.28 minutes (Fig. 1), corresponding to corilagin, a compound isolated from *P. Urinaria*. The extract was diluted to desired concentrations with 0.5% tragacanth suspension before giving to animals.

Treatment of the Animals

Ninety-seven male and ninety-eight female Wistar rats with weights ranging from 210 to 250 g and 180 to 220 g, respectively were purchased from The National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Thailand. The animals were then housed in an animal facility of the Department of Medical Sciences. The animals were allowed to have free access to food and clean water under standard conditions of 12-hour dark, 12-hour light period, with 60% relative humidity and at temperature of 25 ± 1°C.



Column	:	Hichrom5 C18 250 x 4.6 mm.
Mobile phase	:	Acetronitrile/Water/Isopropanal : 15/83.5/1.5
Flow Rate	:	0.8 ml/min
Detection	:	UV 220 nm.
Temperature	:	Room Temp.

Figure 1. An HPLC fingerprint of *P. urinaria* extract. Details of the method used were shown. Corilagin was used as a marker.

Chronic Toxicity Study

The rats of each sex were randomly divided into 5 groups per sex. Group 1 (water control) received water 10 ml/kg BW/day. Group 2 (tragacanth control) received 0.5% tragacanth suspension 10 ml/kg BW/day. Groups 3-5 were given the extract at doses of 0.005, 0.05 or 0.5 g/kg BW/day which were equivalent to 0.025,0.25 and 2.5 g/kg BW/day of dried plants, respectively. Body weights and food intake were weekly measured and the animals were observed for signs of abnormalities throughout the study. After 180 days, the animals were fasted for 18 hours, then anesthetized with ether and sacrificed by drawing blood from the inferior vena cava. The blood samples were measured for hematological and biochemical changes.

Analysis for hematological changes

was tested for Hematocrit, white blood cell, differential count and platelet. Biochemical studies of serum samples and the assay procedures used were alkaline phosphatase or ALP[16], aspartate aminotransferase or AST and alanine aminotransferase or ALT[17], creatinine (Jaffe's reaction), blood urea nitrogen or BUN (Diacetylmonoxime method), cholesterol (enzymatic reaction), total protein (biuret method), albumin (dye binding with bromcresol green), globulin was determined by subtracting albumin level from total protein level, total biririubin (2,5 dichlorophenyldiazonium salt), sodium and potassium (ion selective electrode).

The positions, shapes, sizes and colors of internal organs, namely, brain, heart, both kidneys and lungs, stomach, liver, spleen, urinary bladder, and testis in male rats were visually observed for any signs of gross lesions. These organs were weighed to determine relative organ weights. The heart, the lung, the kidney and the liver were then preserved in 10% buffered formalin solution. Tissue slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin and histopathological examinations were performed by a Veterinary pathologist.

Statistical Analysis

The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test for determination of significant differences between groups at $p < 0.05$. Histopathological data were statistically tested by the Fisher's Exact test with significant level at $p < 0.05$.

RESULTS

Effect on Body Weight, Food Intake, and Relative Organ Weight

There was no significant difference in body weights between the water controls and the tragacanth controls of both male and female rats on day 0 and day 180 of the study (Table 1, 2). It was, however, found that final body weights of the male rats receiving the extract at the dose of 50 mg/kg BW/day was significantly higher than its tragacanth controls from the 7th week to the end of the study (Fig. 2). The female rats given 500 mg/kg BW/day of the extract had significant lower body weights relative to the water control groups in some weeks (Fig. 2). However, no significant differences in the final body weights of all female groups receiving *P. urinaria* extract were shown (Table 2).

Differences in food consumption were observed in both male and female rats from the first week of the experiments and several weeks thereafter (Fig. 3).

At the dose of 50 mg/kg BW/day, the male rats had lower relative weights of the brain and the heart as compared with the tragacanth control group. The relative weights of the liver, the spleen, the stomach and the lung of the male group given the extract at

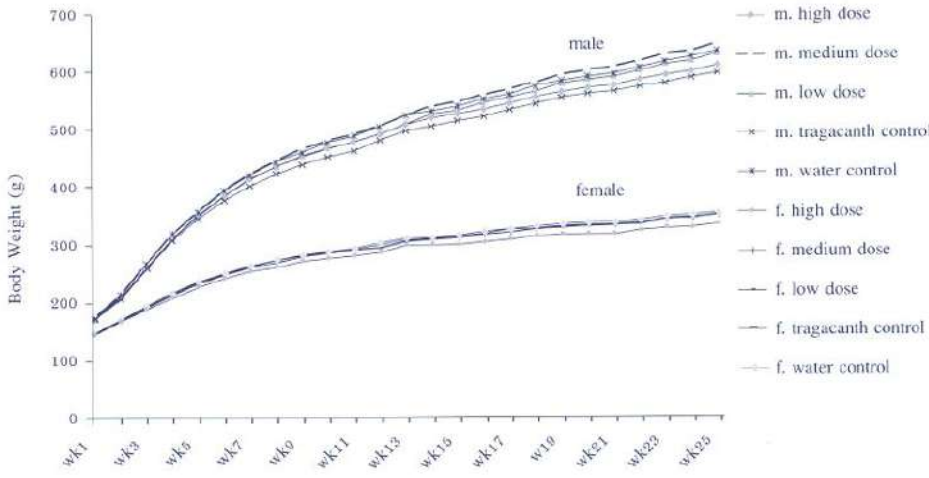


Figure 2. Growth curve of male and female rats orally given *P.urinaria*

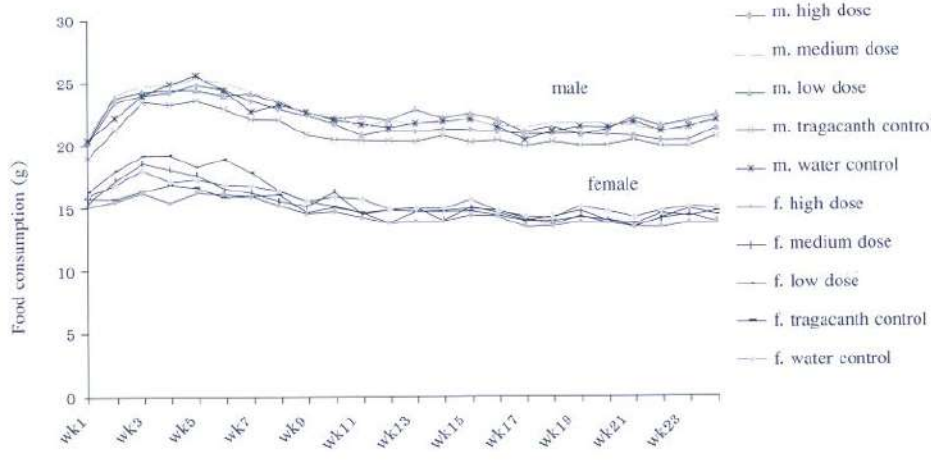


Figure 3. Food consumption of male and female rats orally given *P.urinaria*

Table 1. Body weight and relative organ weight# (g/kg BW) of male rats orally given *P. urinaria*

Parameter	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	5 mg/kg/day	50 mg/kg/day	500 mg/kg/day
	n = 20	n = 18	n = 19	n = 20	n = 20
Starting weight (g)	174±9	172±15	172±18	171±16	172±11
Final weight (g)	625±64	591±46	624±58	641±64**	600±47
Brain	3.52±0.36	3.65±0.28	3.57±0.36	3.34±0.35**	3.61±0.24
Heart	2.45±0.24	2.60±0.36	2.58±0.26	2.40±0.19**	2.60±0.22
Right kidney	2.39±0.17	2.45±0.28	2.41±0.23	2.33±0.17	2.46±0.23
Left kidney	2.35±0.22	2.33±0.29	2.34±0.18	2.24±0.14	2.40±0.19
Urinary bladder	0.27±0.08	0.30±0.10	0.30±0.11	0.28±0.07	0.34±0.10*
Liver	24.81±1.95	24.17±2.75	25.14±2.18	25.62±1.76	25.76±1.92**
Spleen	1.71±0.21	1.74±0.22	1.73±0.20	1.79±0.16	1.90±0.29*,**
Stomach	3.72±0.32	3.56±0.28	3.63±0.46	3.65±0.42	3.89±0.38**
Lung	3.21±0.36	3.29±0.50	3.58±0.39	3.24±0.62	4.05±0.98*,**
Right testis	5.20±0.46	5.24±1.15	5.32±0.56	4.96±0.91	5.52±0.89
Left testis	5.27±0.53	5.33±0.86	5.24±0.62	4.86±1.30	5.35±1.03

Relative organ weight = organ weight (g)/body weight (kg)

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p < 0.05$)

the dose of 500 mg/kg BW/day were higher than its corresponding tragacanth controls and those of the urinary bladder, the spleen and the lung were higher than its water controls (Table 1). In female rats receiving the extract at the dose of 5 mg/kg BW/day, the relative weight of the heart was significantly low as compared with its tragacanth controls. At the dose of 50 mg/kg BW/day, the females had lower relative weight of the spleen relative to the water controls. The relative weight of the stomach of the female group given 500 mg/kg BW/day of the extract was higher than its tragacanth controls (Table 2).

Effect on Hematological Parameters

Significant differences in the number of white blood cells, % neutrophil, % lymphocyte, % monocyte, % eosinophil, % basophil, hematocrit and platelets were not seen in either sex of the rats receiving 5 and 50 mg/kg BW/day of *P. urinaria* relative to both control groups (Table 3, 4).

The male rats given *P. urinaria* at the

Table 2 Body weight and relative organ weight# (g/kg BW) of female rats orally given *P. urinaria*

Parameter	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	5 mg/kg/day	50 mg/kg/day	500 mg/kg/day
	n = 20	n = 20	n = 20	n = 19	n = 20
Starting weight (g)	148±7	149±11	146±10	148±10	146±9
Final weight (g)	342±34	339±25	342±39	335±25	320±37
Brain	5.98±0.67	5.95±0.48	5.97±0.65	6.02±0.55	6.37±0.71
Heart	2.99±0.31	3.05±0.36	2.84±0.34**	3.01±0.21	3.14±0.34
Right kidney	2.83±0.32	2.67±0.27	2.73±0.20	2.74±0.28	2.79±0.22
Left kidney	2.72±0.32	2.57±0.24	2.63±0.22	2.61±0.25	2.70±0.20
Urinary bladder	0.28±0.05	0.28±0.07	0.27±0.05	0.29±0.06	0.29±0.07
Liver	25.45±3.90	24.11±3.18	23.49±2.39	23.53±2.77	23.90±5.45
Spleen	2.36±0.45	2.23±0.34	2.23±0.35	2.13±0.28*	2.30±0.20
Stomach	5.25±0.84	4.90±0.69	4.99±0.65	4.92±0.71	5.42±0.60**
Lung	4.56±0.63	4.54±1.05	4.79±0.79	4.42±0.42	4.75±0.60

Relative organ weight = organ weight (g)/body weight (kg)

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p < 0.05$)

dose of 500 mg/kg BW/day had significant increases in % basophils and hematocrit as compared with the tragacanth controls and the water controls, respectively (Table 3). The percentage of eosinophil of the female rats receiving the extract at the dose of 500 mg/kg BW/day was significantly higher than that of the water control group (Table 4).

Effect on Blood Chemistry

There was no difference in all biochemistry parameters tested between the two control groups of male and female rats (Table 5, 6). It was demonstrated that the ALP level of the male rats given 5 mg/kg BW/day of *P. urinaria* extract was different from its water control group. At the dose of 50 mg/kg BW/day, the level of AST of the male rats receiving the extract was significantly higher than the water controls and the level of bilirubin was significantly higher than the two control groups. In addition, significant decrease in the level of serum sodium was shown compared to the tragacanth group. The level of AST in male rats receiving 500 mg/kg BW/day was different from the two control groups (Table 5).

In female rats given the extract at the dose of 5 mg/kg BW/day, the levels of AST

Table 3 Hematological results of male rats orally given *P. urinaria*

Parameter	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	5 mg/kg/day	50 mg/kg/day	500 mg/kg/day
	n = 20	n = 18	n = 19	n = 20	n = 20
White blood cells (K/uL)	4.26±1.42	4.28±1.55	4.33±1.05	4.64±1.23	4.96±1.74
Neutrophil (%)	20.87±12.47	19.26±7.51	15.65±5.71	17.59±8.15	24.48±17.12
Lymphocyte (%)	67.32±14.47	70.68±9.12	73.25±9.07	70.47±9.16	63.46±18.28
Monocyte (%)	6.53±3.54	5.48±2.19	6.31±3.57	6.32±2.84	6.17±2.47
Eosinophil (%)	1.85±1.33	1.56±0.78	1.52±0.69	1.56±0.95	1.42±0.74
Basophil (%)	3.44±1.68	3.02±1.48	3.29±1.95	4.07±2.03	4.47±1.81**
Hematocrit (%)	47.80±3.30	48.77±2.08	49.62±1.95	50.02±1.55	50.12±5.52*
Platelet(K/uL)	1039.23±132.24	1067.76±187.39	1035.04±125.15	982.02±172.68	999.28±164.43

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p < 0.05$)

Table 4 Hematological results of female rats orally given *P. urinaria*

Parameter	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	5 mg/kg/day	50 mg/kg/day	500 mg/kg/day
	n = 19	n = 20	n = 20	n = 19	n = 20
White blood cells (K/uL)	2.51±1.24	2.04±1.01	2.40±1.26	2.32±0.88	2.24±0.91
Neutrophil (%)	22.97±12.41	22.19±12.14	20.52±11.87	18.16±7.90	22.09±13.42
Lymphocyte (%)	65.42±15.49	62.75±14.91	64.89±13.99	69.79±10.72	62.29±15.70
Monocyte (%)	6.08±2.44	8.39±2.88	8.13±4.22	6.72±2.91	7.96±5.19
Eosinophil (%)	1.97±1.05	2.26±1.45	2.30±1.35	1.70±0.56	3.59±4.16*
Basophil (%)	3.57±2.01	4.41±2.16	4.17±2.37	3.62±1.65	4.08±2.07
Hematocrit (%)	47.28±3.32	47.80±2.22	48.43±2.04	48.37±2.17	48.72±1.67
Platelet(K/uL)	975.34±184.16	986.77±147.65	910.78±146.77	905.73±120.11	914.83±119.04

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p < 0.05$)

Table 5 Results of blood chemistry of male rats orally given *P. urinaria*

Parameter	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	5 mg/kg/day	50 mg/kg/day	500 mg/kg/day
	n = 20	n = 18	n = 19	n = 20	n = 20
AST (U/l)	70.95±12.46	75.94±10.96	80.53±10.36	84.80±12.96*	92.80±27.25*,**
ALT (U/l)	31.60±6.17	29.39±6.71	33.84±8.32*	30.95±5.59	27.85±4.39
ALP (U/l)	157.50±26.56	154.67±29.77	154.37±24.00	170.40±33.66	158.25±32.27
Bilirubin (mg%)	0.19±0.02	0.19±0.02	0.19±0.01	0.20±0.02	0.20±0.02
Creatinine (mg%)	0.54±0.05	0.55±0.06	0.56±0.06	0.56±0.04	0.57±0.05
BUN (mg%)	17.80±2.24	18.56±3.40	18.00±2.60	18.80±2.48	18.30±2.74
Cholesterol (mg%)	90.20±19.47	81.28±14.67	86.58±19.64	86.55±14.87	87.80±22.15
Total protein (g%)	7.18±0.73	7.24±0.84	7.13±0.80	7.36±0.75	7.31±0.69
Albumin (g%)	3.44±0.12	3.48±0.16	3.47±0.14	3.46±0.14	3.48±0.21
Globulin (g%)	3.75±0.74	3.77±0.79	3.66±0.79	3.84±0.68	3.83±0.79
Sodium (mmol/l)	145.84±2.19	146.78±2.60	147.06±3.51	144.80±2.21**	145.55±2.61
Potassium (mmol/l)	5.73±0.98	5.90±0.89	5.62±1.17	5.36±0.99	5.42±1.10

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p < 0.05$)

and ALT were significantly higher than the water controls, while that of the AST showed significantly higher than the tragacanth control. At the dose of 50 mg/kg BW/day, the female rats showed significant increases in the levels of AST, ALP, creatinine while significant decrease in the level of serum potassium was found. The female rats receiving the extract at the dose of 500 mg/kg BW/day showed significant differences in the levels of AST and creatinine relative to its controls (Table 6).

Effect on Histopathology of Internal Organs

Upon gross examinations of internal organs, no abnormal signs were observed except in the kidneys where lesions were found in all experimental and control groups. Significant difference in histopathological findings of the heart (nonpurulent myocarditis), the lung (arterial wall calcification and thickening, interstitial pneumonia) and the liver (hepatocytes degeneration, bile duct proliferation) was not found in a dose-dependent manner in all tested groups. All of the male groups receiving the *P. urinaria* extract showed higher incidence of congestive glomerulotubular nephritis of the kidneys as compared with the tragacanth controls. In addition, there was significant

Table 6 Results of blood chemistry of female rats orally given *P. urinaria*

Parameter	Groups of animals				
	Water control	Tragacanth control	5 mg/kg/day	50 mg/kg/day	500 mg/kg/day
	n = 20	n = 20	n = 20	n = 19	n = 19
AST (U/l)	66.50±11.49	70.55±9.96	79.25±15.00*,**	85.95±15.87*,**	83.16±13.44*,**
ALT (U/l)	24.65±4.51	27.05±5.64	29.05±6.86*	27.95±4.70	26.26±5.92
ALP (U/l)	56.85±14.43	63.00±19.16	69.40±20.55	78.79±22.67*,**	69.53±20.03
Bilirubin (mg%)	0.24±0.02	0.23±0.02	0.22±0.03	0.23±0.02	0.23±0.03
Creatinine (mg%)	0.53±0.07	0.57±0.07	0.53±0.05	0.62±0.10*	0.59±0.06*
BUN (mg%)	21.15±4.11	20.95±3.59	19.85±2.64	20.89±4.58	21.10±4.02
Cholesterol (mg%)	72.35±18.29	72.00±16.14	68.20±18.97	72.47±18.00	75.25±15.81
Total protein (g%)	7.53±0.80	7.51±0.88	7.34±0.74	7.77±1.10	7.67±0.81
Albumin (g%)	3.81±0.29	3.83±0.23	3.77±0.20	3.96±0.34	3.91±0.26
Globulin (g%)	3.72±0.78	3.68±0.82	3.55±0.71	3.82±0.92	3.76±0.76
Sodium (mmol/l)	143.47±2.15	145.10±2.34	142.65±13.64	146.67±4.91	147.20±4.19
Potassium (mmol/l)	5.29±1.09	5.58±1.03	5.36±1.13	4.46±0.73*,**	4.93±1.11

Each value represents mean ± SD.

* Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p < 0.05$)

difference in the incidence of tubular hyalin cast of the kidneys of the male groups given the extract at the doses of 50 and 500 mg/kg BW/day relative to the tragacanth controls (Table 7). In female rats, nephrocalcinosis of the kidney was demonstrated in all groups.

DISCUSSION

We assessed the safety of *P. urinaria* alcoholic extract after orally given to the Wistar rats of both sexes at the doses of 5, 50 and 500 mg/kg BW/day for 6 months. Owing to the fact that the extract was diluted with 0.5% tragacanth suspension, the effects of tragacanth in both male and female rats were firstly compared. Significant differences in the body weights, the relative organ weights, hematological and biochemical parameters were not demonstrated between the tragacanth and the water control groups. The only significant finding was seen in histopathological examination of the female kidneys but it may be due to nonneoplastic lesions, which are naturally occurred, in aged rats[18]. Therefore, it may indicate that 0.5% tragacanth suspension did not have any crucial effects on the internal organs and their functions.

The rats receiving the extract showed

Table 7 Histopathological lesions of rats given *P. urinaria* extract

Organs	Microscopic findings	Doses of P. urinaria extract (mg/kg/day)									
		Male					Female				
		Water control	Tragacanth control	5	50	500	Water control	Tragacanth control	5	50	500
Heart	Nonpurulent myocarditis	3/20	7/18	6/19	7/20	4/20	1/20	0/20	0/20	0/19	0/20
	Arterial wall calcification	2/20	2/18	3/19	3/20	3/20	2/20	0/20	0/20	1/19	0/20
Lung	Arterial wall thickening	0/20	2/18	5/19*	4/20	0/20	0/20	1/20	0/20	0/19	0/20
	Interstitial pneumonia	3/20	5/18	0/19**	6/20	2/20	1/20	2/20	1/20	0/19	0/20
Kidney	Congestive glomerulotubular nephritis	3/20	1/18	6/19**	7/20**	8/20**	5/20	0/20*	2/20	0/19*	2/20
	Tubular hyalin cast	1/20	1/18	5/19	7/20**	7/20**	3/20	0/20	0/20	0/19	1/20
	Nephrocalcinosis	0/20	0/18	0/19	0/20	0/20	15/20	17/20	16/20	13/19	13/20
Liver	Hepatocytes degeneration	0/20	1/18	2/19	2/20	4/20	0/20	0/20	0/20	0/19	0/20
	Bile duct proliferation	1/20	2/18	1/19	1/20	3/20	0/20	1/20	4/20	1/19	0/20

Each value represents number of rats with pathological abnormalities/total number of rats examined.

* Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

** Significantly different from tragacanth control group ($p < 0.05$)

significant changes in the body weights, the food intake and the relative organ weights during the experimental period but those alterations were not dose-dependent. It may suggest that the alcoholic extract did not affect regular growth of both male and female rats.

The findings of significant changes in % eosinophil, % basophil and hematocrit were only demonstrated without dose-related evidence in groups of animals given the highest dose, i.e., 500 mg/kg BW/day of *P. urinaria* extract. The alteration might not result from administration of the extract.

Significantly elevated levels of the parameters indicating liver's function were shown in both male and female groups but those changes were not related to the concentrations of the extract given to the animals. Additionally, histopathology study of the livers did not illustrate hepatotoxic effect of the extract. Histopathological examinations of the kidneys, however, revealed significant changes in glomerulotubular nephritis and tubular hyaline cast in male groups. It has been noted that nonneoplastic lesions are commonly seen in aged rats[18]. The lesions include chronic progressive nephropathy and nephrocalcinosis which occur more frequently in aging male and female rats, respectively. Therefore, histopathological changes in the kidneys of animals in the study remain to be examined whether it might be due to the effect of the extract or naturally occurring phenomenon.

In conclusion, oral administration of *P. urinaria* to male and female Wistar rats at the concentrations of 5, 50 and 500 mg/kg BW/day daily for 6 months did not demonstrate detrimental effects on critical organs and their functions. Similar to modern medicine, periodical monitoring of liver and kidney functions is suggested for long-term users of *P. urinaria*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the staffs of the Animal Facility, Department of Medical Sciences for taking care of the animals throughout the study.

REFERENCES

1. Airy Shaw HK. 1971. The Euphorbiaceae of Siam. Kew Bulletin, 191-363.
2. Smitinand T. 1980. Thai Plant Names, Botanical Names-Vernacular Names. Funny Publishing, Bangkok.
3. Yao QQ, Zuo CX. 1993. Chemical studies on the constituents of Phyllanthus urinaria L. Yao Hsueh Hsueh Pao. 28: 829-835
4. Santos AR, De Campos RO, Miguel OG, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Calixto JB. 1999. The involvement of K+ channels and Gi/o protein in the antinociceptive action of the gallic acid ethyl ester. Eur J

Pharmacol 379: 7-17

5. Jikai L, Yue H, Henkel T, Weber K. 2002. One step purification of corilagin and ellagic acid from *Phyllanthus urinaria* using high-speed countercurrent chromatography. Phytochem Anal 13: 1-3.
6. Giridharan P, Somasundaram ST, Perumal K, Vishwakarma RA, Karthikeyan NP, Velmurugan R, Balakrishnan A. 2002. Novel substituted methylenedioxy lignan suppresses proliferation of cancer cells by inhibiting telemerase and activation of c-myc and caspases leading to apoptosis. Br J Cancer 87: 98-105.
7. Paulino N, Cechinel Filho V, Pizzolatti MG, Yunes RA, Calixto JB. 1996. Mechanisms involved in the contractile responses induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* on the guinea pig isolated trachea: evidence for participation of tachykinins and influx of extracellular Ca2+ sensitive to ruthenium red. Gen Pharmacol 27: 795-802.
8. Dias MA, Campos AH, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB. 1995. Analysis of the Mechanisms underlying the contractile response induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* in the guinea-pig urinary bladder in-vitro. J Pharmacy & Pharmacol. 47: 846-851.
9. Higashino H, Suzuki A, Tanaka Y, Pootakham K. 1992. Hypoglycemic effects of Siamese Momordica charantia and Phyllanthus urinaria extracts in streptozotocin-induced diabetic rats (the 1st report). Nippon Yakurigaku Zasshi 100: 415-421 (in Japanese).
10. Prakash A. Satyan KS. Wahi SP. Singh RP. 1995. Comparative Hepatoprotective activity of three Phyllanthus species, P. urinaria, P. niruri and P. simplex, on carbontetrachloride induced liver injury in rat. Phytotherapy Research 9: 594-596
11. Liu KC, Lin MT, Lee SS, Chiou JF, Ren S, Lien EJ. 1999. Antiviral tannins from two Phyllanthus species. Planta Med 65: 43-46.
12. Mi Z, Chen H, Zhang X, Shao, X Li Z, Wu, X. 1995. Duck hepatitis B virus model for screening of antiviral agents from medicinal herbs. Chin Med J 108: 660-664.
13. Zhong Y, Zuo C, Li F, Ding X, Yao Q, Wu K, Zhang Q, Wang Z, Zhou LW, Lan J, Wang X. 1998. Chemical constituents of *Phyllanthus urinaria* L. and its antiviral activity against hepatitis B virus. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 23: 363-364, 384 (in Chinese).
14. Wang M, Cheng H, Li Y, Meng L, Zhao G, Mai K. 1995. Herbs of the genus Phyllanthus in the treatment of chronic hepatitis B: observations with three preparations from different geographic sites. J Lab Clin Med 126: 350-354.
15. Suthienkul O, Miyazaki O, Chulasiri M, Kositanont U, Oishi K. 1993. Retroviral

reverse transcriptase inhibitory activity in Thai herbs and species: screening with Moloney murine leukemia viral enzyme. Southeast Asian J Trop Med Public Health 24: 751-755.

16. Bowers Jr GN, McComb RB. 1975. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. Clin Chem 21: 1988-1995.

17. Henry RJ, Chaimori N, Golub OJ, Berkman S. 1960. Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic oxaloacetic transaminase glutamic-pyruvic transaminase and lactic acid dehydrogenase. Am J Clin Pathol 34: 381-398.

18. Gad SC. 1992. The rat: pathology. In: Gad SC, Chengellis, CP. (Eds.), Animal Models in Toxicology. Marcel Dekker, New York.

Subacute toxicity study of Dihydroartemisinin in *Rats*

Anchalee Chuthaputti , Pranee Chavalittumrong

Songphol Chivapat , Sadudee Rattanajarasroj , Somkiat Punyamong

* Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand

ABSTRACT

Subacute toxicity of dihydroartemisinin (DHA), a qinghaosu-derivative antimalarial, was studied in Wistar rats. DHA suspension in 0.5% tragacanth was given orally to five DHA-treated groups once daily at the doses of 3, 30, 120, 200 and 300 mg/kg for 28 days, while two control groups received either water or 0.5% tragacanth. It was found that repeated doses of DHA 300 mg/kg was lethal to all animals, while DHA 200 mg/kg was lethal to most animals especially the females. In contrast, DHA at the doses of 3 and 30 mg/kg did not appear to cause any clinically significant changes of hematological or serum biochemical parameters, or histopathological abnormalities. Similar changes were observed in various aspects in male rats receiving DHA 200 mg/kg and female rats receiving DHA 120 mg/kg. When compared with the tragacanth controls, they had significantly lower final body weights but higher actual stomach weight, and higher weights of several internal organs relative to body weight. Hematological examinations showed that they had higher numbers of reticulocytes, white blood cells and platelets, but the size and hemoglobin content of RBC were lower. Serum biochemistry showed that their ALT levels were statistically higher than those of the tragacanth controls but still within normal limits, while serum triglyceride levels were drastically lower suggesting that DHA might affect endogenous triglyceride synthesis. DHA at the doses used in this study did not appear to induce histopathological changes of internal organs that could lead to death since the incidence of histopathological findings was not different between DHA-treated groups and control groups. Lethal doses of DHA appeared to affect the function of various systems of the body.

วารสารสงขลานครินทร์ ปีที่ 24 ฉบับที่ 4 ตุลาคม-ธันวาคม 2545 หน้า 633-647.

INTRODUCTION

Artemisinin or qinghaosu is an active principle of *Artemisia annua*, a native medicinal plant of China with known antimalarial activity. Several derivatives of qinghaosu have been developed and are now very beneficial for the treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria commonly found in Thailand. Dihydroartemisinin (DHA) is an artemisinin derivative and is also the major active metabolite of various artemisinin derivatives, e.g. arteether, artemether, artesunate, and artelinic acid. Artemether and artesunate, but not DHA itself have been widely used in many endemic areas without serious adverse effects. Since artemether and artesunate are prodrugs to DHA, the safety and efficacy of both derivatives should belong to DHA.

For several aretemisinin derivatives which yield DHA as active metabolite, toxicity studies in experimental animals showed that parenteral administration of high doses of arteether, artemether and artesunate exhibited different degrees of neurotoxic effect [1-3]. However, therapeutic doses of those antimalarial agents do not appear to cause neurotoxicity in humans. So far there has been no report of neurotoxic effect of DHA given orally in experimental animals yet.

The fact that artemether and artesunate are synthesized from artemisinin through DHA makes the derivatives more costly than DHA itself. Accordingly, DHA is of interest for a new antimalarial drug development program. However, there is little evidence regarding preclinical toxicity studies of DHA available. This project is aimed at determining subacute toxicity of DHA, semi-synthesized in Thailand from imported starting material in rodents in order to establish the safety of this compound which will be used as an antimalarial in humans. This report summarized the results of short-term or subacute (28-day) toxicity study of DHA in Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals : Dihydroartemisinin was obtained from the laboratory of T2 researchers responsible for chemical synthesis of the compound. Gum tragacanth, which was used as the suspending agent, was from Sigma Chemicals, USA. DHA was prepared as a suspension in 0.5% tragacanth.

Animals : Wistar rats of both sexes were used in subacute toxicity study of DHA. Eighty six male rats weighing 230 ± 20 g and 86 female rats weighing 200 ± 20 g were obtained from The National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya District, Nakornpathom Province. The animals were housed in the animal facility of the National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi. The temperature in the animal room was kept at 25 ± 1°C with 60% relative humidity. The animals were allowed

to have food and clean water ad lib and were acclimatized in the animal facility for at least one week before DHA administration.

Subacute toxicity study : Eighty six Wistar rats of each sex were randomly divided into 7 groups of 12-13 animals per sex. Group 1 (water control) received water 10 ml/kg BW/day and Group 2 (tragacanth control) received 0.5% tragacanth suspension 10 ml/kg BW/day. Groups 3-7 were given DHA suspension for 28 days at the doses of 3, 30, 120, 200 or 300 g/kg BW/day. Body weight and food intake were measured weekly and the animals were observed for signs of abnormalities throughout the study. DHA-treated animals in a moribund shape were sacrificed prior to the end of the experiment. At the end of 28-day treatment period, the animals were fasted for 18 hours, then anesthetized with ether and sacrificed by drawing blood samples from the inferior vena cava for hematological and biochemical examinations.

Hematological examination : Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyser (Cell dyne 3500, Abbott). The parameters measured were white blood cell (WBC), %neutrophil, %lymphocyte, %monocyte, %basophil, %eosinophil, red blood cell (RBC), hemoglobin, hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), platelet, mean platelet volume (MPV), plateletcrit (PCT), and platelet distribution width (PDW). %reticulocyte, and reticulocyte.

Serum biochemical examination : Biochemical analysis of serum samples was performed using an automatic chemistry analyzer (Hitachi model 912). Biochemical parameters measured were aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), biririubin, creatinine, blood urea nitrogen (BUN), cholesterol, triglyceride, total protein, albumin, glucose, uric acid, sodium, potassium, bicarbonate, and chloride.

Histopathological examination : The positions, shapes, sizes and colors of internal organs, namely, brain, heart, both kidneys and lungs, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intestine, spleen, bladder, and testis in male rats or ovary or uterus in female rats were visually observed for any signs of gross lesions. These organs were then collected, weighed to determine relative organ weights, and preserved in 10% buffered formalin solution. Tissue slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin and histopathological examinations were performed by a veterinary pathologist.

Statistical Analysis : The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan multiple range test, using SPSS/PC program, to determine significant differences between groups at $p < 0.05$. Histopathological

data were evaluated by the Fisher Exact test and the significance level was also set at $p < 0.05$.

RESULTS

General observations. It was found that female (2/12) and male (3/12) rats in 300-mg/kg groups began to die after receiving DHA for 2 and 3 days, respectively. After 3 days of dosing, 9 female and 3 male rats receiving this dose of DHA died and the rest of female and male rats died within 7 and 9 days of DHA dosing, respectively. The toxic signs of high doses of DHA observed in these animals prior to their death were prostration, chromodacryorrhea, facial edema, discharge of blood from the nose, weight loss and severe diarrhea. Upon autopsy, pronounced gastric and intestinal distension due to gas was observed. It was found that DHA even at the dose of 200 mg/kg was still rather toxic and some of the animals in a moribund shape had to be sacrificed. Finally, only one female rat and six male rats survived until the end of experiment. Since data of female rat in 200-mg/kg group were from only one animal, they might not be a good representative of what happened in this group of animals. Therefore, these data were shown but not included for statistical evaluation.

Effect of DHA on body weight, weight gain, food intake and organ weight. Initial and final body weights of male rats treated with DHA 120 and 200 mg/kg were significantly lower than their tragacanth control (Figure 1 and Table 1). Final body weights of these two groups were much lower than those of other groups, this may partly be due to lower food intake (Figure 3). Hence, body weight gains of these groups of male rats were significantly lower than those of the water and tragacanth controls (Table 1). Similarly, both initial and final body weights of female rats receiving DHA 120 mg/kg was significantly different from those of water and tragacanth controls (Table 2). Weight gain of this group of animals was however not significantly different from controls (Figure 2 and Table 2) since they ate more than tragacanth control on the 3rd and 4th weeks (Figure 4).

The only similar changes in male and female rats treated with DHA 120 mg/kg concerning the actual organ weight (Table 1 & 2) and organ weight relative to brain weight (Table 3 & 4) were the stomach weights which were significantly higher than their two controls. In contrast, while actual weight (Table 1 & 2) and organ weights relative to brain weight (Table 3 & 4) of right and left kidneys, urinary bladder and liver of female rats receiving DHA 120 mg/kg were significantly higher than those of tragacanth control, those weights of male rats treated with DHA 120 and 200 mg/kg were not different from tragacanth control. Moreover, in the groups of

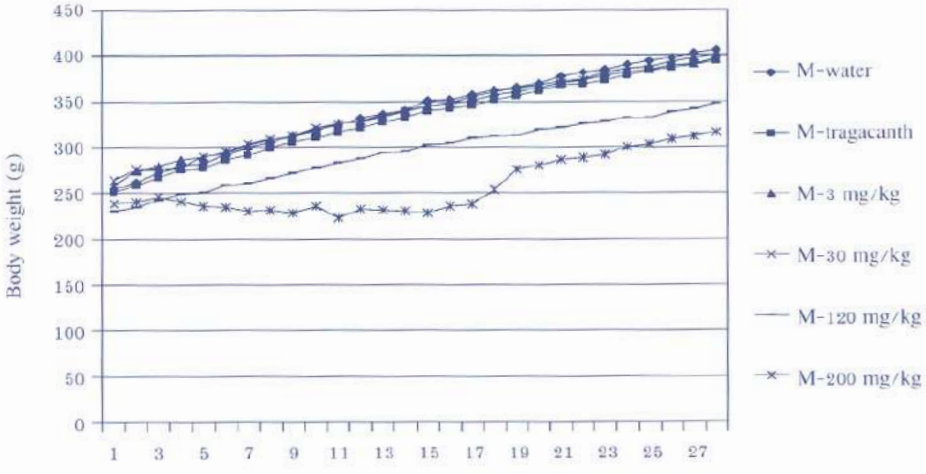


Figure 1 Growth curves of male rats given DHA orally for 28 days

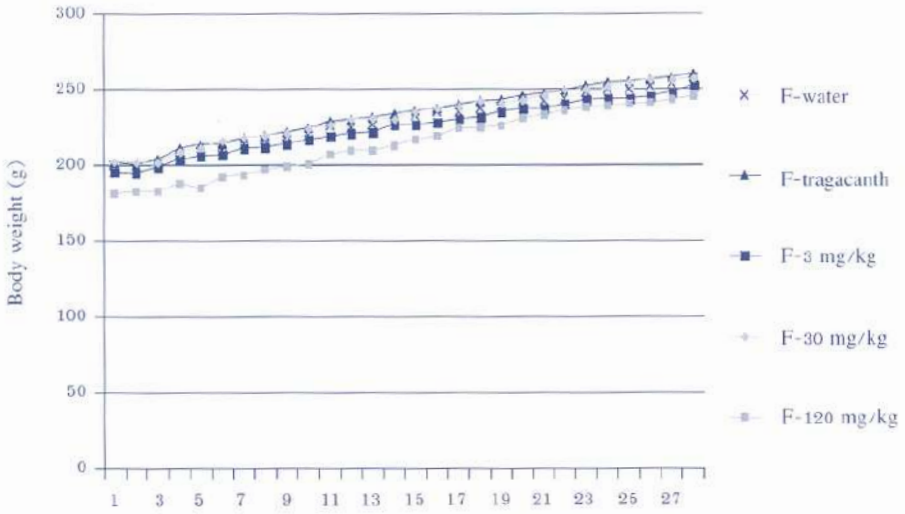


Figure 2 Growth curves of female rats given DHA orally for 28 days

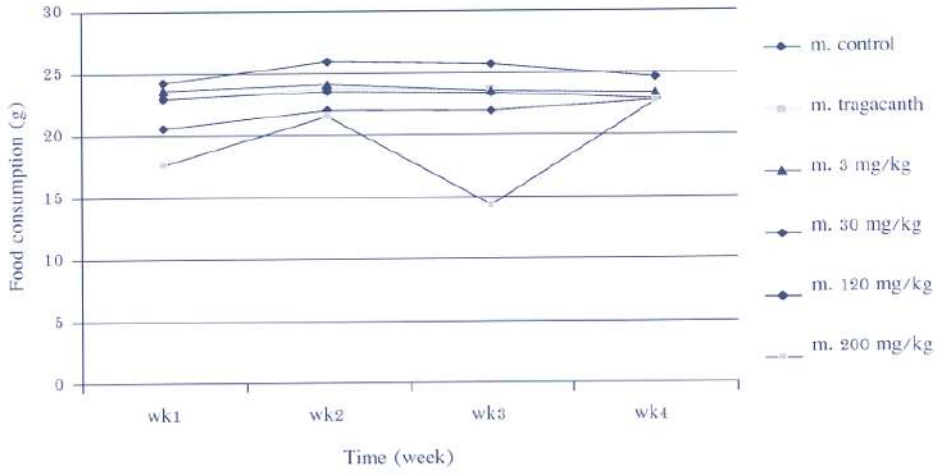


Figure 3 Food consumption of male rats given DHA orally for 28 days

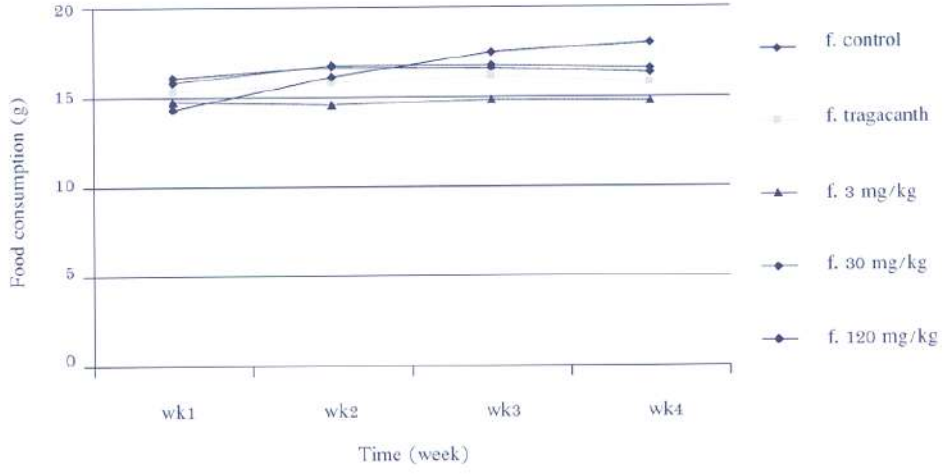


Figure 4 Food consumption of female rats given DHA orally for 28 days

Table 1 Actual organ weight and body weight (g) of male rats given DHA orally for 28 days.

MALE	Group of animals					
	water N=12	tragacanth N=12	3mg/kg N=13	30mg/kg N=13	120mg/kg N=12	200mg/kg N=6
Initial body weight	256±12	251±12	259±15	264±11	230±7*,**	239 + 8*,** (n=12)
Final body weight	406±20	394±21	401±25	396±24	346±10*,**	316±31*,** (n=6)
Weight gain	150±18	143±16	142±21	132±21*	116±12*,**	75±30*,**
Brain	1.97±0.08	1.96±0.09	2.00±0.04	1.99±0.07	1.93±0.05	1.89±0.08*,**
Heart	1.15±0.12	1.10±0.13	1.12±0.13	1.12±0.13	0.99±0.07*,**	0.99±0.08*,**
Right kidney	1.18±0.09	1.12±0.12	1.18±0.11	1.25±0.13**	1.13±0.09	1.18±0.11
Left kidney	1.13±0.10	1.14±0.15	1.13±0.11	1.21±0.13	1.04±0.06	1.13±0.08
Urinary bladder	0.109±0.022	0.131±0.036	0.135±0.028	0.131±0.027	0.135±0.032	0.140±0.034*
Liver	12.13±0.94	11.30±0.86	11.93±1.24	12.14±1.31	10.98±0.76*	11.46±0.62
Spleen	0.95±0.10	0.93±0.10	0.93±0.15	0.94±0.08	0.79±0.09*,**	0.84±0.05*
Stomach	1.69±0.18	1.58±0.10	1.70±0.20	1.77±0.12**	1.90±0.22*,**	1.91±0.13*,**
Lung	1.59±0.10	1.58±0.20	1.57±0.12	1.57±0.09	1.45±0.10*,**	1.49±0.13
Right testis	2.68±0.19	2.54±0.13	2.56±0.28	2.75±0.18**	2.50±0.12*	2.41±0.19*
Left testis	2.72±0.25	2.63±0.25	2.67±0.18	2.74±0.22	2.47±0.12*	2.51±0.23*

Each value represents mean ± SD.

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

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

Table 2 Actual organ weight and body weight (g) of female rats given DHA orally for 28 days.

MALE	Group of animals					
	water N=12	tragacanth N=11	3mg/kg N=10	30mg/kg N=10	120mg/kg N=11	200mg/kg N=1
Initial body weight	200±10	202±17	196±13	203±18	182±9*,**	176
Final body weight	258±12	260±15	252±13	257±12	245±12*,**	213
Weight gain	58.50±11.80	57.58±17.60	56.00±14.34	53.38±11.81	63.08±7.63	37
Brain	1.87±0.08	1.85±0.08	1.85±0.09	1.88±0.08	1.83±0.07	1.72
Heart	0.77±0.08	0.77±0.07	0.74±0.06	0.79±0.05	0.78±0.07	0.72
Right kidney	0.79±0.06	0.75±0.05	0.76±0.06	0.86±0.07*,**	0.93±0.05*,**	0.80
Left kidney	0.77±0.07	0.71±0.06*	0.72±0.06	0.82±0.05*,**	0.88±0.05*,**	0.69
Urinary bladder	0.080±0.021	0.075±0.010	0.074±0.009	0.080±0.013	0.099±0.013*,**	0.11
Liver	6.84±0.49	6.73±0.69	6.88±0.64	7.24±0.52	8.67±0.63*,**	9.65
Spleen	0.65±0.09	0.63±0.07	0.68±0.09	0.75±0.08*,**	0.75±0.10*,**	0.73
Stomach	1.31±0.10	1.27±0.11	1.23±0.06	1.46±0.15*,**	1.58±0.15*,**	1.46
Lung	1.24±0.16	1.18±0.06	1.20±0.09	1.23±0.11	1.25±0.10	1.12

Each value represents mean ± SD.

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

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

Table 3 Organ weight relative to brain weight# of male rats given DHA orally for 28 days.

MALE	Group of animals					
	water N=12	tragacanth N=12	3mg/kg N=13	30mg/kg N=13	120mg/kg N=12	200mg/kg N=6
Heart	58.33±5.68	56.21±6.59	56.00±6.69	54.98±5.94	51.46±3.61*	52.50±4.44
Right kidney	59.91±4.88	57.43±5.61	58.81±5.32	62.94±6.04**	58.51±3.56	62.60±4.77
Left kidney	57.54±5.13	58.25±7.81	56.75±5.40	60.94±6.36	54.23±2.50	60.03±4.07
Urinary bladder	5.547±1.215	6.728±1.966	6.758±1.427	6.561±1.443	7.010±1.719*	7.457±1.957
Liver	615.78±51.64	577.88±42.42	597.16±63.33	608.97±64.83	569.88±31.58	608.03±30.55
Spleen	48.26±5.14	47.60±4.81	46.48±7.49	47.21±4.59	41.11±4.44*,**	44.94±4.71
Stomach	85.61±7.90	80.87±4.60	85.01±9.86	88.82±6.67**	98.53±11.40*,**	101.48±9.46
Lung	80.96±6.04	80.42±8.80	78.38±6.25	78.86±4.98	75.37±4.19	78.78±6.18
Right testis	135.84±8.58	130.17±8.12	128.12±14.97	137.89±8.54	129.87±7.34	127.84±6.36
Left testis	137.81±11.66	134.49±14.07	133.84±9.78	137.30±10.47	128.29±6.98	133.25±12.42

Organ weight relative to brain weight is expressed as
(g organ weight / g brain weight) x 100
Each value represents mean ± SD.

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

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

Table 4 Organ weight relative to brain weight# of female rats given DHA orally for 28 days

FEMALE	Group of animals					
	water N=12	tragacanth N=11	3mg/kg N=13	30mg/kg N=13	120mg/kg N=12	200mg/kg N=1
Heart	41.26±4.05	41.50±3.73	40.33±4.09	42.05±2.98	42.41±3.22	41.90
Right kidney	42.39±2.82	40.86±3.49	41.06±3.88	45.01±4.56**	50.70±2.47*,**	46.39
Left kidney	40.95±2.87	38.44±2.95	38.88±3.82	43.59±3.88**	47.89±2.28*,**	40.38
Urinary bladder	4.281±1.159	4.062±0.672	4.105±0.608	4.321±0.726	5.327±0.735*,**	6.59
Liver	365.84±27.59	364.28±38.74	363.91±37.83	384.60±32.23	471.27±37.32*,**	562.59
Spleen	34.58±4.39	33.97±3.62	36.84±6.04	38.97±3.51*,**	40.22±5.38*,**	42.77
Stomach	70.01±6.99	68.44±6.59	69.68±7.46	76.11±8.14*,**	86.21±6.61*,**	84.84
Lung	66.19±7.19	63.87±2.59	63.39±6.37	65.79±6.30	68.19±4.47	65.09

Organ weight relative to brain weight is expressed as
(g organ weight / g brain weight) x 100
Each value represents mean ± SD.

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

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

Table 5 Organ weight relative to body weight[@] (g/kg BW) of male rats given DHA orally for 28 days.

MALE	Group of animals					
	water N=12	tragacanth N=12	3mg/kg N=13	30mg/kg N=13	120mg/kg N=12	200mg/kg N=6
Final body weight	406±20	394±21	401 + 25	396 + 24	346 + 10*,**	316 + 31*,** (n=6)
Brain	5.09±0.24	5.22±0.28	5.23±0.31	5.28±0.34	5.96±0.19*,**	6.32±0.42*,**
Heart	2.96±0.19	2.92±0.31	2.92±0.34	2.90±0.29	3.06±0.16	3.32±0.40*,**
Right kidney	3.04±0.24	2.99±0.24	3.07±0.22	3.31±0.21*,**	3.49±0.26*,**	3.95±0.26*,**
Left kidney	2.92±0.21	3.02±0.29	2.96±0.21	3.20±0.22*,**	3.23±0.12*,**	3.79±0.31*,**
Urinary bladder	0.282±0.064	0.349±0.098	0.355±0.085	0.346±0.074	0.418±0.103*	0.470±0.124*,**
Liver	31.25±1.96	30.06±1.57	31.10±2.41	32.00±2.08**	33.93±1.73*,**	38.43±2.90*,**
Spleen	2.45±0.19	2.48±0.25	2.42±0.37	2.48±0.17	2.45±0.27	2.85±0.46*,**
Stomach	4.35±0.44	4.21±0.25	4.43±0.45	4.69±0.40**	5.87±0.65*,**	6.45±0.98*,**
Lung	4.11±0.27	4.19±0.43	4.09±0.33	4.15±0.17	4.49±0.25*,**	4.99±0.62*,**
Right testis	6.91±0.60	6.79±0.50	6.69±0.75	7.27±0.38**	7.73±0.36*,**	8.07±0.39*,**
Left testis	7.01±0.70	7.01±0.79	7.00±0.65	7.23±0.43	7.64±0.37*,**	8.42±0.90*,**

@ Organ weight relative to body weight is expressed as
(g organ weight / g body weight) x 1000
Each value represents mean ± SD.

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

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

Table 6 Organ weight relative to body weight[@] (g/kg BW) of female rats given DHA orally for 28 days.

FEMALE	Group of animals					
	water N=12	tragacanth N=11	3mg/kg N=13	30mg/kg N=13	120mg/kg N=12	200mg/kg N=1
Final body weight	258±12	260±15	252±13	257±12	245±12*,**	213
Brain	7.66±0.46	7.44±0.52	7.90±0.57**	7.58±0.42	8.03±0.22**	8.37
Heart	3.16±0.31	3.09±0.27	3.18±0.29	3.18±0.22	3.41±0.27*,**	3.61
Right kidney	3.24±0.22	3.04±0.16	2.23±0.28	3.40±0.35**	4.07±0.18*,**	3.88
Left kidney	3.13±0.25	2.86±0.21	3.06±0.27	3.30±0.30**	3.84±0.15*,**	3.38
Urinary bladder	0.325±0.080	0.302±0.046	0.323±0.047	0.328±0.059	0.428±0.057*,**	0.55
Liver	27.96±1.72	27.12±2.51	28.66±2.95	29.08±2.18	37.81±2.55*,**	47.09
Spleen	2.65±0.41	2.53±0.27	2.90±0.45**	2.95±0.30**	3.23±0.45*,**	3.58
Stomach	5.35±0.48	5.09±0.23	5.50±0.71	5.75±0.50**	6.92±0.55*,**	7.10
Lung	5.09±0.82	4.77±0.29	4.98±0.38	4.97±0.39	5.48±0.35**	5.45

@ Organ weight relative to body weight is expressed as
(g organ weight / g body weight) x 1000
Each value represents mean ± SD.

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

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

Table 7 Hematological examination results of male rats given DHA orally for 28 days.

MALE	Group of animals					
	water N=12	tragacanth N=12	3mg/kg N=13	30mg/kg N=13	120mg/kg N=12	200mg/kg N=6
WBC (K/uL)	7.55±1.83	6.83±1.09	7.24±1.24	7.76±1.34	6.94±1.82	9.82±2.00*,**
%Neutrophil	9.62±2.59	12.80±6.64	8.52±2.15**	10.80±3.17	11.75±4.47	9.84±3.79
%Lymphocyte	84.34±3.32	80.30±6.31*	86.16±3.11**	83.10±3.79	83.17±4.55	86.07±4.84**
%Monocyte	3.53±1.57	4.47±3.00	3.27±1.66	3.78±2.26	3.12±1.02	2.19±0.99**
%Basophil	1.57±0.39	1.56±0.36	1.44±0.52	1.64±0.63	1.54±0.49	1.44±0.28
%Eosinophil	0.93±0.41	0.57±0.51	0.58±0.16*,**	0.70±0.26	0.44±0.14*,**	0.44±0.19*,**
RBC(X10e6/uL)	9.01±0.47	9.07±0.35	9.20±0.42	9.02±0.85	9.29±0.37	9.44±0.63
Hemoglobin (g/dL)	15.91±0.53	16.02±0.46	15.79±0.51	15.84±0.45	15.56±0.47**	15.32±0.65*,**
%Hematocrit	52.54±2.11	52.02±2.71	52.83±1.88	51.49±4.89	51.46±1.34	51.35±3.41
MCV (fL/red cell)	58.39±2.33	57.36±2.50	57.48±1.80	57.15±1.56	55.44±1.50*,**	54.47±2.31*,**
MCH (pg/red cell)	17.68±0.68	17.74±1.03	17.19±0.59	17.78±2.30	16.77±0.62	16.28±0.83*,**
MCHC (g/dL RBC)	30.28±0.60	31.01±2.44	29.91±0.48	30.75±4.35	30.23±0.62	29.92±0.87
RDW	14.10±1.03	14.39±1.53	13.73±0.82	14.40±1.09	16.38±1.43*,**	18.88± 1.97*,**
Platelet (K/uL)	868±98	870±64	897±66	936±75	916±90	1018±130*,**
MPV (fL/platelet)	8.35±0.37	8.89±1.09	8.44±0.39	8.22±0.56**	8.47±0.42	8.32±0.62
PCT (%)	0.73±0.10	0.77±0.11	0.76±0.07	0.77±0.07	0.78±0.08	0.85±0.14*
PDW	18.42±0.44	18.49±0.61	18.41±0.60	18.20±0.44	18.11±0.42	18.53±0.33
%Reticulocyte	4.77±2.31	4.12±0.94	4.61±1.26	5.19±1.63	3.32±0.43	8.79±7.79*,**
Reticulocyte(K/uL)	428±208	376±82	427±138	461±142	303±44	815±706*,**

Each value represents mean ± SD.

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

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

animals treated with DHA 120 mg/kg, actual spleen weight and spleen weight relative to brain weight of male rats were significantly lower, but those of female rats were significantly higher than their two controls. In addition, while actual lung weight of this group of male rats were higher than those of the two controls, actual lung weight of female rats was not different from controls (Table 1 & 2).

As shown in Table 5 and 6, both male and female rats receiving DHA at the dose of 120 mg/kg and male rats receiving DHA 200 mg/kg had significantly higher organ weights relative to body weight of all or most internal organs as compared to their two controls. Meanwhile, in both male and female animals treated with DHA 30 mg/kg, weight of right and left kidneys and stomach relative to body weight were significantly higher than those of tragacanth controls. In addition, in these groups of animals, livers and right testis weights relative to body weight of male rats and spleen weight relative to body weight of female rats were also significantly higher than

Table 8 Hematological examination results of female rats given DHA orally for 28 days.

FEMALE	Group of animals					
	water N=12	tragacanth N=11	3mg/kg N=13	30mg/kg N=13	120mg/kg N=12	200mg/kg N=1
WBC (K/uL)	4.01±0.76	3.74±0.65	4.49±1.54	4.18±0.98	5.04±1.64**	7.10
%Neutrophil	10.26±3.83	10.77±4.77	8.57±3.04	8.50±1.44	10.54±4.38	4.43
%Lymphocyte	81.95±3.79	81.10±5.91	85.71±2.83*,**	85.26±2.49**	84.13±4.79	92.95
%Monocyte	4.83±2.39	5.48±3.53	3.72±1.09	4.01±1.75	3.36±2.00**	1.18
%Basophil	1.70±1.20	1.74±0.78	1.27±0.47	1.36±0.42	1.40±0.72	0.96
%Eosinophil	1.27±0.51	0.91±0.43*	0.72±0.25*	0.88±0.35*	0.57±0.23*,**	0.48
RBC(X106/uL)	8.83±0.30	8.85±0.57	8.67±0.34	8.82±0.39	8.31±0.42*,**	8.91
Hemoglobin (g/dL)	15.42±0.55	15.27±0.75	15.13±0.32	14.96±0.48	13.52±0.60*,**	14.45
%Hematocrit	50.91±1.94	50.70±2.96	49.68±1.44	49.27±2.28	46.09±2.40*,**	49.50
MCV (fL/red cell)	57.68±1.56	57.34±1.49	57.39±2.28	55.88±1.56	55.48±1.04*,**	56.50
MCH (pg/red cell)	17.48±0.57	17.29±0.72	17.48±0.65	17.00±0.72	16.30±0.41*,**	16.20
MCHC (g/dL RBC)	30.31±0.68	30.16±0.77	30.48±0.82	30.46±1.18	29.38±0.52*,**	29.20
RDW	13.42±1.02	13.63±0.60	14.04±1.14	14.80±1.51*,**	16.60±0.97*,**	14.95
Platelet(K/uL)	906±87	892±108	942±95	934±75	1060±107*,**	1059
MPV (fL/platelet)	8.28±0.48	8.43±0.45	8.13±0.42	8.35±0.92	8.43±0.47	9.31
PCT (%)	0.75±0.09	0.75±0.10	0.77±0.09	0.78±0.11	0.90±0.11*,**	0.99
PDW	18.56±0.54	18.48±0.62	18.28±0.45	18.34±0.61	18.07±0.42*	19.25
%Reticulocyte	3.05±0.49	2.99±0.98	3.14±0.74	3.41±0.66	4.14±1.16*,**	6.43
Reticulocyte(K/uL)	268±44	261±92	271±70	300±60	342±91*,**	567

Each value represents mean ± SD.

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

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

those of their tragacanth controls.

Effect of DHA on hematological parameters. In male rats receiving DHA 200 mg/kg, it was noticed that there was a large increase of the number of reticulocytes and %reticulocyte as compared to the control groups (Table 7). In addition, WBC, %lymphocyte, RDW, platelet were also significantly higher, while %monocyte, %eosinophil, hemoglobin, MCV, MCH were significantly lower than those of tragacanth control. In animals receiving DHA at the dose of 120 mg/kg, it was found that both male and female rats had significantly lower %eosinophil, hemoglobin and MCV but significantly higher RDW (Table 7 & 8). In addition, female rats also had significantly lower %monocyte, RBC, %Hct, MCH, MCHC, PDW but significantly higher WBC, RDW, platelet, PCT, %reticulocyte , and reticulocyte than their tragacanth control. For the groups of animals treated with 30 mg/kg, female rats had higher %lymphocyte and RDW than tragacanth control but lower %eosinophil than water con-

Table 9 Blood chemistry results of male rats given DHA orally for 28 days.

MALE	Group of animals					
	water N=12	tragacanth N=12	3mg/kg N=13	30mg/kg N=13	120mg/kg N=12	200mg/kg N=6
AST (U/L)	70.50±8.52	79.42±11.98	74.69±14.74	74.62±9.04	85.33±8.03*	76.50±7.09
ALT (U/L)	39.17±7.94	39.83±9.16	41.08±6.91	43.54±6.78	47.50±8.80*,**	44.33±9.63
ALP (U/L)	113.75±20.23	117.17±26.69	110.00±24.58	101.69±14.06	96.83±12.66**	102.17±18.63
Bilirubin(mg/dL)	0.11±0.02	0.10±0.03	0.11±0.02	0.10±0.02	0.09±0.03	0.10±0.02
Creatinine (mg/dL)	0.61±0.03	0.61±0.06	0.60±0.06	0.60±0.05	0.56±0.04*,**	0.52±0.04*,**
BUN (mg/dL)	20.24±2.90	21.17±5.36	21.97±4.73	20.85±3.09	18.81±2.16	18.55±2.00
Cholesterol (mg/dL)	61.09±12.37	61.17±4.70	59.66±8.69	62.41±13.29	64.53±13.12	58.57±8.86
Triglyceride(mg/dL)	134±25	133±27	136±39	101±37*,**	43±20*,**	27±9*,**
Total protein (g/dL)	6.79±0.19	6.80±0.48	6.79±0.31	6.85±0.44	6.52±0.30	6.33±0.21*,**
Albumin (g/dL)	3.44±0.12	3.44±0.16	3.47±0.19	3.50±0.17	3.40±0.16	3.31±0.09
Uric acid (mg/dL)	1.66±0.55	1.90±0.82	1.59±0.63	1.82±0.53	1.44±0.34	1.95±0.61
Glucose (mg/dL)	168±18	177±23	173±22	169±22	154±15**	167±16
Sodium (mmol/L)	144±1	145±1*	145±1	145±1	145±1	148±2*,**
Potassium (mmol/L)	5.56±1.14	5.24±0.68	5.49±0.65	5.61±0.63	5.63±0.41	6.03±1.22
Bicarbonate (mmol/L)	21.32±2.83	21.51±2.98	21.17±2.73	21.58±2.44	21.15±0.94	19.60±0.60
Chloride (mmol/L)	105±4	106±4	107±5	106±4	102±2*,**	104±1

Each value represents mean ± SD.

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

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

trol, while male rats had lower MPV than tragacanth control. Male and female rats receiving 3 mg/kg DHA had significantly lower %eosinophil than their water controls but higher %lymphocytes than their tragacanth control, while male rats also had lower %neutrophil than its tragacanth control.

Effect of DHA on blood chemistry : In male rats receiving DHA 200 mg/kg, it was found that triglyceride, creatinine and total protein levels were significantly lower than those of the tragacanth control (Table 9). The changes of blood chemistry were mostly observed in both male and female rats treated with 120 mg/kg DHA (Table 9 & 10). Serum creatinine, triglyceride and chloride levels in these groups of animals were significantly lower while serum ALT was significantly higher than those of their tragacanth controls. In addition, as compared to tragacanth controls, this group of male rats had significantly lower ALP and glucose levels, while female rats had significantly higher bilirubin, BUN and cholesterol levels but lower total protein and bicarbonate levels. Moreover, significantly lower ALT level was also observed in female rats treated with 30 mg/kg DHA. The lowered plasma triglyceride

Table 10 Blood chemistry results of female rats given DHA orally for 28 days.

FEMALE	Group of animals					
	water N=12	tragacanth N=11	3mg/kg N=13	30mg/kg N=13	120mg/kg N=12	200mg/kg N=1
AST (U/L)	77.50±8.94	74.36±13.70	66.00±7.60	74.23±8.55	78.67±5.16	77
ALT (U/L)	34.58±7.29	29.91±5.43	34.31±5.92	40.08±7.60**	47.33±9.09*,**	43
ALP (U/L)	54.08±12.38	55.91±9.97	56.62±12.74**	56.77±9.71	64.67±9.65	57
Bilirubin(mg/dL)	0.08±0.04	0.09±0.02	0.09±0.03	0.08±0.04	0.12±0.03*,**	0.13
Creatinine (mg/dL)	0.64±0.05	0.66±0.05	0.65±0.04	0.60±0.05**	0.61±0.05**	0.55
BUN (mg/dL)	22.47±4.35	22.02±2.52	22.70±4.50	21.82±3.84	29.24±4.40*,**	23.40
Cholesterol (mg/dL)	71.75±17.43	62.72±9.86	71.86±10.35	73.26±16.22	76.55±13.10**	73.55
Triglyceride(mg/dL)	84.83±39.85	98.62±45.81	73.82±20.45	74.36±22.49	33.92±10.44*,**	23.43
Total protein (g/dL)	6.91±0.31	6.83±0.33	6.85±0.21	6.75±0.32	6.57±0.22*,**	5.90
Albumin (g/dL)	3.60±0.18	3.56±0.20	3.60±0.13	3.57±0.19	3.45±0.10	3.09
Uric acid (mg/dL)	1.40±0.47	1.66±0.54	1.49±0.38	1.45±0.36	1.64±0.40	1.50
Glucose (mg/dL)	136±15	141±21	139±12	131±12	132±16	160
Sodium (mmol/L)	145±1	145±1	145±1	145±1	146±1	147
Potassium (mmol/L)	5.32±0.81	5.23±1.24	5.28±0.84	5.10±0.75	5.90±0.72	6
Bicarbonate (mmol/L)	20.97±1.81	20.58±0.90	20.71±1.10	20.88±1.55	18.34±1.11*,**	19.70
Chloride (mmol/L)	108±4	109±3	108±4	109±4	105±1*,**	105

Each value represents mean ± SD.

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

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

levels in DHA-treated groups appeared to be a dose-dependent change.

Effect of DHA on histopathological changes of internal organs : Histopathological changes of internal organs and the incidence in male and female rats treated with DHA for 28 days were shown in Table 11 & 12, respectively. Some pathological alterations were observed in the heart, lung, liver, kidney, intestine and urinary bladder. However, the incidence of histopathology observed in DHA-treated groups was not different from that of the two control groups. It should be noted that since only one or two female rats treated with DHA 200 or 300 mg/kg survived until the end of the study, the incidence of histopathological changes in these groups of animals was not included for statistical analysis. Non-remarkable histopathological finding was observed in the thyroid gland, parathyroid gland, adrenal gland, brain, trachea, esophagus, spleen, pancreas, stomach, testis, epididymis, prostate, salivary gland, lacrimal gland, lymph nodes, or thymus.

DISCUSSION

Repeated administration of DHA at the dose of 300 mg/kg was obviously lethal to

Table 11 Histopathologial findings of male rats receiving DHA for 28 days

Organs	Microscopic findings	Dose of DHA (mg/kg BW/day)						
		Water	Tragacanth	3	30	120	200	300
		n = 12	n = 12	n = 13	n = 13	n = 12	n = 6	n = 5
Heart	Focal myocarditis	0/12	0/12	0/13	0/13	0/12	0/6	0/5
	Non-supperative myocarditis	0/12	0/12	1/13	0/13	0/12	0/6	0/5
Lung	Chronic interstitial pneumonia	2/12	3/12	3/13	2/13	2/12	1/6	0/5
	Arterial wall thickening	0/12	1/12	1/13	1/13	0/12	0/6	0/5
Liver	Hepatocyte degeneration	0/12	0/12	2/13	3/13	0/12	0/6	2/5
	Bile duct proliferation	0/12	0/12	2/13	2/13	0/12	0/6	2/5
Kidney	Congestive glomerulo-tubular nephrosis	1/12	0/12	2/13	3/13	3/12	2/6	0/5
Intestine	Catarrhal enteritis	1/12	1/12	1/13	0/13	0/12	0/6	0/5
Bladder	Proteinaceous mass	3/12	3/12	3/13	3/13	0/12	0/6	1/5

Table 12 Histopathologial findings of female rats receiving DHA for 28 days

Organs	Microscopic findings	Dose of DHA (mg/kg BW/day)						
		Water	Tragacanth	3	30	120	200	300
		n = 12	n = 12	n = 13	n = 13	n = 12	n = 1	n = 2
Lung	Chronic interstitial pneumonia	4/12	3/12	2/13	5/13	3/12	1/1	2/2
	Arterial wall thickening	1/12	1/12	1/13	0/13	0/12	0/1	1/2
Liver	Hepatocyte degeneration	0/12	2/12	2/13	2/13	2/12	1/1	0/2
	Bile duct proliferation	0/12	2/12	2/13	1/13	1/12	1/1	0/2
Kidney	Mild nephrocalcinosis	2/12	3/12	3/13	4/13	4/12	1/1	1/2
Intestine	Catarrhal enteritis	1/12	1/12	0/13	0/13	2/12	0/1	1/2
Bladder	Proteinaceous mass	0/12	0/12	1/13	0/13	0/12	0/1	0/2
	Epithelial necrosis	0/12	0/12	0/13	0/13	1/12	0/1	0/2

both male and female rats. Even though there was no histopathological damage of internal organs in this group of animals that could explain the cause of death (Table 11 & 12), the toxic signs detected in dying animals suggested that high dose of DHA may affect functions of various systems of the body, e.g. central nervous system, autonomic nervous system, cardiovascular system, and possibly GI tract as well. Similarly, DHA at the dose of 200 mg/kg was still lethal to some animals, hence only six males and one female survived until the end of the experiment. The results suggested that female rats were apparently more sensitive to the toxic effects of DHA than male rats since more female rats died at a shorter duration after receiving high doses of DHA.

Body weight gain, food intakes and final body weights of male rats treated with DHA 200 and 120 mg/kg were significantly lower than their tragacanth control. The lower final body weights of these two groups of male rats may, at least in part, explain why weights of all or most of their internal organs relative to body weight were significantly higher than the tragacanth controls (Table 5). Similarly, weights of most of the internal organs relative to body weight of female rats receiving DHA 120 mg/kg were significantly higher than those of the tragacanth control (Table 6). Moreover, in the groups of animals treated with DHA 30 mg/kg, the significant dose-dependent increases of certain organ weights relative to body weight, i.e. right and left kidneys and stomach in both male and female animals, liver and right testis in male animals, and spleen in female rats, was also likely be due to the apparent dose-dependent decrease of the final body weights.

In contrast to the body weight, the brain weight did not easily or drastically vary by animal's health. Even though actual brain weight of male rats treated with DHA 200 mg/kg was significantly lower than the two control groups, it was only a minor difference. Hence, the significant differences of actual organ weights and organ weights relative to brain weight of DHA-treated groups as compared to the tragacanth controls were comparable, especially in female rats (Table 1-4). The only dose-related change that occurred in both male and female rats receiving DHA 30 and 120 mg/kg was the significantly higher actual stomach weight and stomach weight relative to brain weight when compared to their tragacanth controls. However, no histopathological alteration of the stomach was detected in these groups of animals.

Hematological results showed that male rats in 200-mg/kg group and female rats in 120-mg/kg group had a large increase of reticulocytes or young, immature erythrocytes, suggesting that there was an increased rate of young RBC production in these groups of animals. This finding was in contrast to the

previously reported toxic effects of qinghaosu given intramuscularly in rhesus monkeys or dogs where main toxic effect was manifested on the hemopoietic system, especially the erythroid series, causing a significant reduction of reticulocytes(4). Interestingly, even though there was a large increase of reticulocytes in male rats receiving DHA 200 mg/kg and in female rats receiving DHA 120 mg/kg, the number of RBC in these groups of animals did not increase but was unchanged or decreased instead. Moreover, other hematological parameters of these of groups of animals showed that the average volume of RBC (MCV), hemoglobin concentration and average hemoglobin per erythrocyte (MCH) were lower, while the variability of the size of RBC (RDW) was higher than their tragacanth controls. Even though these values were still within normal limits[5], it is possible that high doses of DHA might affect RBC maturation and the production of hemoglobin.

%Monocyte and %eosinophil in male rats treated with DHA 200 mg/kg and in females receiving DHA 120 mg/kg were significantly lower than their tragacanth controls but were still within normal ranges[5]. In contrast, there was a significant increase of white blood cells in these groups of animals, while a significant increase of %lymphocyte was found in certain groups of DHA-treated animals of both sexes. However, since this change was not dose-dependent, the apparent increase of %lymphocyte may not be due to the effect of DHA and may not account for an increase of WBC observed in animals receiving high doses of DHA.

High doses of DHA also appeared to increase the number of platelets in rats. It was found that female rats receiving DHA 120 mg/kg and male rats treated with DHA 200 mg/kg had significantly higher platelet numbers than tragacanth controls. In addition, these female rats also had higher plateletcrit (PCT) than its tragacanth control.

With regard to the changes of serum chemistry, certain groups of DHA-treated animals had significantly higher ALT levels but lower ALP levels, while significantly higher bilirubin level occurred only in the group of female rats treated with 120 mg/kg; however, these changes were still within normal ranges[5,6]. Since these changes were observed in either male or female animals only, and were not dose-dependent, it could not be concluded that the changes of these hepatic-related parameters were the result of DHA administration. In addition, DHA at the doses given in this study did not appear to cause damage to hepatic tissues since the incidence of histopathological changes observed in the livers, i.e. hapatocyte degeneration and arterial wall thickening, was not different between DHA-treated groups and control groups.

Creatinine levels of male rats in 120- and 200-mg/kg groups and female rats in 30-

and 120-mg/kg groups were significantly lower than those of the tragacanth controls; however, these values were still within the normal range[5]. A significantly higher BUN level was observed only in the group of female rats treated with DHA 120 mg/kg, while BUN levels in male rats appeared to be decreased as the dose of DHA increased, though not statistically significant. Hence, the effect of DHA on BUN levels was still inconclusive, and the observed changes of creatinine and BUN levels did not suggest that DHA at the doses used in this study affect renal function.

Histopathological examination of the urinary system showed congestive glomerulotubular nephrosis and proteinaceous mass in the bladders of some groups of male rats, while in female rats mild nephrocalcinosis was observed in all groups, and proteinaceous mass and epithelial necrosis of the bladders were found in some DHA-treated groups. However, the incidence of these pathological findings was not different between DHA-treated groups and control groups suggesting that administration of DHA to Wistar rats for 28 days at the doses used in this study did not induce pathological damage to the urinary system.

High doses of DHA greatly reduced serum triglyceride levels in both male and female rats. This reduction of serum triglyceride was likely due to the effect of DHA on the endogenous synthesis of triglycerides by the liver rather than a decrease of food intake, since DHA-treated female rats ate more, not less, than the tragacanth control on the 3rd and 4th weeks of the study. In contrast, no change of serum cholesterol was observed in DHA-treated male rats, while a significant increase of serum cholesterol was observed in female rats treated with DHA 120 mg/kg; however, this change was still within the normal limit[6].

In DHA-treated male rats, there was no change of serum total protein, albumin, uric acid, sodium, potassium, or bicarbonate levels, and the decreases of glucose and chloride levels in 120-mg/kg group were not dose-dependent. In female rats, the significantly lower total protein, bicarbonate and chloride levels found in 120 mg/kg group were within normal limit[5]. Hence, it was concluded that DHA did not affect these serum biochemical parameters.

Other histopathological findings that were observed in both male and female rats were chronic interstitial pneumonia, arterial wall thickening in the lungs and catarrhal enteritis. However, the incidence was not different between DHA-treated groups and control groups. Hence, it was concluded that these histopathological changes were not due to DHA.

CONCLUSION

Short-term or subacute (28-day) toxicity study of DHA was performed in Wistar rats. DHA suspension in 0.5% tragacanth was given orally at the doses of 3, 30, 120, 200 and 300 mg/kg. All animals receiving DHA 300 mg/kg died while almost all females and some males receiving DHA 200 mg/kg died. In contrast, DHA at the doses of 3 and 30 mg/kg did not appear to cause subacute toxicity. Similar hematological and biochemical changes were observed in male rats treated with DHA 200 mg/kg and in female rats receiving DHA 120 mg/kg. High doses of DHA did not seem to cause suppression of hemopoietic system since the numbers of WBC, reticulocytes and platelets were higher than tragacanth controls. Even though certain parameters, i.e. %monocyte, % eosinophil, hemoglobin, MCV were lower than tragacanth controls, they were still within normal ranges. Significant change of serum biochemistry caused by high doses of DHA was a drastic reduction of serum triglyceride, which might be due to the effect of DHA on endogenous synthesis of triglycerides. The incidence of all histopathological findings in DHA-treated groups was not different from that of the control groups. Hence, DHA administration at the doses and duration used in this study did not cause any physical damage to the internal organs that could explain the cause of death of the animals receiving high doses of DHA. Taken together, the results showed that oral administration of DHA 3 or 30 mg/kg for 28 days in Wistar rats did not produce toxicity. Meanwhile DHA at the doses of 120 mg/kg or higher could affect certain hematological and biochemical parameters. Toxic symptoms of rats receiving lethal doses of DHA suggested that the death of DHA-treated animals was due to the alteration of the function of various systems of the body, e.g. CNS, ANS, CVS and digestive systems, rather than due to specific toxicity to a particular organ.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Somluk Peungchompu, D.V.M., MS. for histopathological examination of animal tissues and for her technical advice. Thanks are also due to the staffs of the animal facility of the Department of Medical Sciences for the animal care.

REFERENCES

1. Kamchonwongpaisan S, McKeever P, Hossler P, et al (1997) Artemisinin neurotoxicity: neuropathology in rats and mechanistic studies in vitro. Am J Trop Med Hyg 56(1): 7-12.
2. Nontprasert A, Nosten-Bertrand M, Pukrittayakamee S, et al. (1998) Assessment of the neurotoxicity of parenteral artemisinin derivatives in mice. Am J Trop Med Hyg 59(4): 519-522.
3. Dayan AD (1998) Neurotoxicity and

artemisinin compounds. Do the observations in animals justify limitation of clinical use? Med Trop (Mars) 58: 32-37.

4. China Cooperative Research Group on Qinghaosu and Its Derivatives as Antimalarials. (1982) J Trad Chinese Med 2(1): 31-38.
5. Semler DE, Gad SC and Chengelis CP (1992) The Rat. In: Animal Model in Toxicology. Gad SC and Chengelis CP, Eds. Marcel Dekker, New York, p. 80-81.
6. Levine BS (1995) Animal Clinical Pathology. In: CRC Handbook of Toxicology. Derelanko, M.J. and Hollinger, M.A., Eds. CRC Press, Boca Raton, p. 523.

Acute Toxicity Study of Medicinal Plants Used in the Primary Health Care

Pranee Chavalittumrong , Aimmanas Attawish

Jaree Bansiddhi , Angkana Herunsalee , Pranee Chuntapet

Department of Medical Sciences Nonthaburi, Thailand

With the financial support from The World Health Organization 1995

บทคัดย่อ

จากการศึกษาพิษเฉียบพลันของสมุนไพรบางชนิดที่แนะนำให้ใช้ในการสาธารณสุขมูลฐานได้แก่ เปลือกมะนาว, ถั่วพู, เปลือกว่านหางจระเข้, เหง้าสับปะรดสด, เหง้าสับปะรดแห้ง, สีเสียดเหนือ, คำแสด, ใบเตย, แก่นฝาง และดอกอัญชันสด ในหนูถีบจักร พบว่าเมื่อให้สมุนไพรทางปาก ขนาดของสารสกัดด้วย 50% เอธานอลของสมุนไพรข้างต้นที่ทำให้หนูตายร้อยละ 50 (LD_{50}) มีค่ามากกว่า 40, 140, 80, 36.8, 20, 80, 80, 100, 50 และ 80 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (ก./กก.) ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดขนาดดังกล่าวเป็นขนาดสูงสุดที่กรอกได้สำหรับสมุนไพรแต่ละชนิดโดยไม่เกิดอาการพิษในสัตว์ทดลอง จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดด้วย 50% เอธานอลของสมุนไพรดังกล่าวจัดอยู่ในสารจำพวกไม่เป็นพิษ (practically non-toxic) ส่วนน้ำคั้นที่ทำให้แห้งโดยใช้ความเย็น (lyophilization) ของ น้ำมะนาว, ถั่วพู, วุ้นจากว่านหางจระเข้, คำแสด, ใบเตย และดอกอัญชัน เมื่อให้ทางปากในขนาดสูงสุดที่สามารถให้ได้สำหรับสมุนไพรแต่ละชนิด คือ 70 มล./กก., 3.2, 20, 30, 60 และ 1.24 ก./กก. ตามลำดับ พบว่าไม่ทำให้เกิดอาการพิษในหนูถีบจักร และสารสกัดด้วยน้ำของเหง้าสับปะรดสด, เหง้าสับปะรดแห้ง, สีเสียดเหนือ และแก่นฝาง เมื่อให้ทางปากในขนาดสูงสุดที่สามารถให้ได้ คือ 30, 13.2 และ 60 ก./กก. ตามลำดับ ก็ไม่ทำให้เกิดอาการพิษในหนูถีบจักรเช่นกัน

ABSTRACT

Acute toxicity studies of some medicinal plants recommended for use in the primary health care; namely, lime rind, winged bean, leaf peel of Aloe vera, fresh and dried rhizome of pineapple, catechu wood, anatto seed, pandan leaf, sappan wood, and blue pea flower, were performed in mice. When 50% ethanolic extracts of those medicinal plants were given orally to both male and female mice, it was found that the doses that caused death to 50% of the animals or LD_{50} were more than 40,140, 80, 36.80, 20, 80, 80, 100, 50 and 80 g/kg of body weight (g/kg), respectively. Since these doses of the plant extracts were the highest dose of each plant that could be given orally to the animals, it was concluded that 50% ethanolic extract of these plants were practically non-toxic. In addition, when lyophilized powder of the juice of lime, winged bean, Aloe vera mucilage, anatto seed, pandan leaf, or blue pea flower were dissolved in water and given in mice at the highest possible oral doses of 70 ml/kg, 3.2, 20, 30, 60, and 1.24 g/kg, respectively, no toxic signs were observed. Furthermore, water extracts of fresh and dried rhizome of pineapple, catechu wood and sappan wood at the highest oral doses of 30, 13.2, and 60 g/kg, respectively, also produced no toxicities in mice.

INTRODUCTION

Under the Fifth National Economic and Social Plan (1982-1986), sixty six medicinal plants were selected to be used in the primary health care. However, toxicity data for certain selected plants are still lacking. Therefore, the Toxicity and Safety Test Section, Division of Medicinal Plant Research and Development conducted acute toxicity study on twenty extracts of nine medicinal plants; namely, lime, winged bean, aloe, pineapple, catechu tree, anatto tree, pandan, sappan wood and blue pea. Details of each plant are summarized as follows.

Lime (*Citrus aurantifolia* (Chrisim) Swing.) or 'Ma-Now' in Thai is a small treee/shrub in the Family Rutaceae, According to the Thai traditional medicine, the decoction of fruit rind is used to treat flatulence and dyspepsia and lime juice mixed with some salt is used as an expectorant and cough suppressant. Studies on chemical constituents of the fruit show that it contains n-methylanthranilic acid, l-alanine, γ-amino butyric acid, l-arginine, asparagine, l-aspartic acid, l-glutamic acid, l-glutamine, histidine, l-proline, l-serine, quinic acid, palmitic acid, stearic acid, myristic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, palmitoleic acid, flavonoids, polyphenol, 1,2-dibromoethane, terpenoids, β-phellandrene, terpinene, β- citral, camphene, α-citral, citronellol, p-

cymene, geraniol, geranyl acetate, d-limonene, linalol, myrcene, nerol, ocimene, sabinene, terpineols, linalyl acetate, β-pinene, α-pinene, sesquiterpenoids, carotene, farnesol, vitamin C, riboflavin, thiamine, vitamin A, and essential oil.[1]

Winged bean (*Psophocarpus letragonotobus* (L.) DC., Family Leguminosae) or 'Tour-Poo' in Thai is a type of edible legume traditionally used as health tonic. Young pod is an ingredient in several Thai dishes. Boiled seeds are eaten as such or are sun-dried and ground to powder, 4-6 g of powdered seed are mixed with water and taken three times daily before meal. The seed is composed of carbohydrates (22.96-49.5%), proteins (30-40%), fat (10-20%) and ash (3.52-8.21%).[2]

Aloe (*Aloe barbadensis* Mill., Family Liliaceae) or 'Wan-Haang-Jarakay' in Thai is one of the most well-known and commonly used herbs worldwide. Its leaves contain a lot of chemicals; e.g., anthraquinone glycosides (aloe-emodin, aloesin, aloin, anthranol, 1,8-dihydroxyanthraquinone, chrysophanic acid, barbaloin, β-barbaloin), p-coumaric acid, amino acids (alanine, phenylalanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cystine, glutamine, glutamic acid, glycine, histidine, leucine, l-leucine, isoleucine, lysine, proline, hydroxyproline, serine, threonine, tyrosine, valine, l-valine), alkaloids, carbohydrates, polysaccharide, monosaccharide, enzymes, proteins, lupeol, triterpenoids, steroids, campesterol, cholesterol, β-sitosterol, β-carotene, mucilage, calcium oxalate, citric acid, isocitric acid, malonic acid, fumaric acid, malic acid, tartaric acid, succinic acid, maleic acid, pyruvic acid, etc. The mucilage of the leaf is scientifically proved to be effective for the tratment of burns, chronic wounds and gastric ulcers due to its wound-healing property. In addition, the mucilage also possesses antibacterial activity.[3]

Pineapple (*Ananas comosus* Merr., Family Bromeliaceae) or 'Sub-Pa-Rod' in Thai. Fresh or dried underground stem of pineapple is used as diuretic. Chemical studies indicated that the underground stem contains proteins and the stem contains bromelain, quinic acid-1,4-di-p-coumarate, p-coumaric acid, 3,4-dihydroxycinnamic acid, elements, enzymes (peroxidase, acid phosphatase, amylase, catalase, proteinase, tyrosinase, pectinesterase, and gelatin-digesting enzymes).[4]

Catechu tree (*Acacia catechu* (Linn.) Willd., Family Leguminosae) or 'Se-Sead-Ner'. Wood extract traditionally used as an antidiarrheal is prepared by boiling small pieces of catechu wood and heating until dried black mass is obtained. Catechu wood contains catechin, dicatechin, 3',4',7'-tri-o- methyl catechin, and 3',4',5,5',7-penta-o-methyl gallocatechin.[5]

Anatto tree (*Bixa oreliana* Linn., Family Bixaceae) or 'Kum-Sad' in Thai. Its seeds

contain water-soluble orange red substances, mainly bixin, that are useful as food coloring agent. Other substances in the seed are norbixin, orellin, fat, resin and some bitter principles.[6]

Pandan (*Pandanus amaryllifolius* Roxb., Family Pandanaceae) or 'Touy' in Thai. Leave juice is used as both flavoring and coloring (green) agent in various Thai dishes and desserts. The principle substance in the leaf is pandamarine. In addition, pandamarilactone-1, pandamarilactone-32, and pandamarilactone-31 are also found in the leaf.[7]

Sappan wood (*Caesalpinia sappan* Linn., Family Leguminosae) or 'Faang' in Thai contains brazilin, sappanin, phellandrene and ocimene. When the wood is immersed in water, it gives red color that is useful for coloring food.[8]

Blue pea, or butterfly pea (*Clitoria ternated* Linn., Family Leguminosae) or 'Un-Chan' in Thai. The juice from flowers is used to color food blue.[9]

MATERIALS AND METHODS

Materials

Animals

Acute toxicity studies of plant extracts were conducted in male and female Swiss albino mice (weighing 20 ± 5 g) obtained from The National Laboratory Animal Centre, Mahidol Universty. The animals were raised in the animal facility that was kept at 25 ± 1°C with 60 % relative humidity. The animals were allowed to have free access to food (Charoen Pokapan Animal Feed Co., Ltd.) and tap water.

Medicinal Plants

All medicinal plants were collected and identified by the staffs of the Botany Section, Division of Medicinal Plant Research and Development. The plants were cleaned, dried at 50°C and ground to powder for extraction.

Methods

Preparation of plant extracts for acute toxicity studies

1. **50% Ethanolic extract.** Powdered crude drugs were extracted by reflux with 50% ethanol and evaporated under vaccuum. Prior to the toxicity study, the concentrated 50% ethanolic extracts were diluted with water to the desired concentrations.

2. **Water extract.** Powdered crude drugs were extracted by reflux with water and evaporated under vaccuum. Prior to the toxicity study, the concentrated water extracts were diluted with water to the desired concentrations.

3. **Lyophilized powder of plant juice.** Plant juice was prepared by mixing fresh plants with water in an electric blender. The water in the juice was then evaporated by lyophilization. Prior to the toxicity study, the lyophilized powder was diluted to the desired concentrations with water.

Acute toxicity study

Mice were randomly divide into 5 groups. Each group consisted of 5 animals of each sex. The first group serving as control group was given water orally at 10 ml/kg of body weight. Groups 2-5 received different doses of plant extracts orally. The animals were observed for mortality or any signs of abnormalities periodically during the first 24 hours and twice daily for 7 days thereafter.

REFERENCES

1. Bunyapraphatsara, Nuntavan. Kow-Pai - Kub-Samunprai, Vol 2, p 160-161. Tummakamol Printing ISBN 974-586-049-2
2. Fatth, Quazi Abdul and Asghari Bano. Dacca Univ. Stud. Part B. 28(1) : 71-74. 1980. Varietal variation of protein, oil, carbohydrate and ash content in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seed. Through BA 70(12): 80047, 1980.
3. Bunyapraphatsara, Nuntavan. Kow-Pai - Kub-Samunprai, Vol 1, p 213-214. Tummakamol Printing
4. Bunyapraphatsara, Nuntavan. Kow-Pai - Kub-Samunprai, Vol 3, p 165-166. Tummakamol Printing ISBN 974-586-220-7
5. Bunyapraphatsara, Nuntavan. Kow-Pai - Kub-Samunprai, Vol 1, p 226. Tummakamol Printing
6. Ruengrungsi, Nijsiri; Tuntiwatan, Payorm. Phuech-Samunprai, Chulalongkorn University Printing, Bangkok, 2532, p 93-94.
7. Nomato-MG, Ganson-MJ, Truscott-NJW, Carver-JA. Phytochemistry. "Structural Characterization of Piperidine Alkaloids from Pandarus-Amaryllifolius by Inverse-Detected 2D-NMR"1993, 34(4) p 1159-63.
8. Colour Atlas of Chinese Traditional Drugs Vol 1. Edited by National Institue for the control of Pharmaceutical and Biological Products. 1981, p 126.
9. Smitinand, Tem. Thai Plant Names. Botanical Names-Vernacular Names 1980 p 88.

RESULTS

Thai names	Botanical name	Part use	Extraction	Highest dose given (g./Kg. body weight)	Side effect
1. มะนาว 'Ma-Now'	*Citrus aurantifolia* (Christm) Swing.	fruit peel	50% ethanol	40.00	
		juice	lyophilization	70.00 มล./กก.	
2. ถั่วพู 'Tour-Poo'	*Psophocarpus letragontobus* (L.) DC	young fruit	50% ethanol	140.00	
			lyophilization	3.20	
3. ว่านหางจระเข้ 'Wan-Haang-Larakay'	*Aloe barbadensis* Mill.	mucilage	lyophilization	20.0	
		leave peel	50% ethanol	80.00	
4. สับปะรด 'Sub-Pa Rod'	*Ananas comosus* Merr.	fresh rhizome	50% ethanol	36.80	
			water extract	30.0	
		dried rhizome	50% ethanol	20.00	
			water extract	13.20	
5. สีเสียดเหนือ 'Se-Sad-Ner'	*Acacia catechu* (Linn.) Willd		50% ethanol	80.00	
			water extract	60.00	
6. คำแสด 'Kum-Sad'	*Bixa orellana* Linn..	seed	50% ethanol	80.00	
			lyophilization	30.00	

Thai names	Botanical name	Part use	Extraction	Highest dose given (g./Kg. body weight)	Side effect
7. เตย 'Touy'	*Pandanus amaryllifolius* Roxb	leaves	50% ethanol	100.00	
			lyophilization	60.0	
8. ฝาง 'Faang'	*Caesalpinia sappan* Linn	แก่น	50% ethanol	50.0	
			water extract	50.0	
9. อัญชัน 'Un-Chan'	*Clitoria ternatea* Linn	flower	50% ethanol	80.00	
			lyophilization	1.24	

พิษเรื้อรังของผงใบขี้เหล็กในหนูขาว

Chronic Toxicity of *Cassia siamea* Lam. Leaves in Rats

Pranee Chavalittumrong , Songpol Chivapat**

Sadudee Rattanajarasroj , Boonme Sunyasootcharee***

*Noppamas Soonthornchareonnon*** , Somkiat Panyamong**

*Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences,

Tiwanond Road, Nonthaburi 11000, Thailand.

**Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

***Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

บทคัดย่อ

ขี้เหล็กเป็นพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Leguminosae ตำรายาแผนโบราณใช้ใบขี้เหล็กเป็นยาช่วยให้นอนหลับ เพื่อความปลอดภัยในการใช้สมุนไพรนี้ ได้ศึกษาความเป็นพิษของใบขี้เหล็กซึ่งมีสาร barakol อยู่ 0.17% ในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ 5 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัวต่อเพศ เป็นเวลา 6 เดือน หนูกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ขณะที่หนูกลุ่มทดลอง 3 ใน 4 กลุ่ม ได้รับผงใบขี้เหล็กขนาด 20, 200 และ 2,000 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน (มก./กก./วัน) หนูกลุ่มทดลองกลุ่มที่ 4 (กลุ่ม recovery) ได้รับผงใบขี้เหล็กขนาด 2,000 มก./กก./วัน เป็นเวลา 6 เดือน แล้วหยุดให้ใบขี้เหล็ก 14 วัน ก่อนฆ่าหนู เพื่อศึกษาว่าความเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดจากใบขี้เหล็กสามารถกลับสู่ภาวะปกติได้หรือไม่หลังหยุดยา ผลการศึกษาพบว่าระดับของบิลิรูบินของหนูที่ได้รับใบขี้เหล็กขนาด 200 และ 2,000 มก./กก./วัน มีระดับบิลิรูบินในซีรัมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อุบัติการณ์ของการเกิดความผิดปกติของตับ ได้แก่ การเสื่อมและการตายของเซลล์ตับพบได้ในหนูที่ได้รับขี้เหล็กทุกขนาดและความรุนแรงของความผิดปกติเพิ่มมากขึ้นตามขนาดของใบขี้เหล็กที่ได้รับทั้งในหนูเพศผู้และเพศเมีย นอกจากนี้ ความรุนแรงของความเป็นพิษต่อตับของขี้เหล็กก็เพิ่มขึ้นตามขนาดที่ได้รับด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหนูเพศผู้ ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าหนูเพศผู้มีความไวต่อความเป็นพิษของขี้เหล็กมากกว่าหนูเพศเมีย และการเปลี่ยนแปลงของตับในหนูกลุ่ม recovery แสดงให้เห็นว่าความผิดปกติของตับที่เกิดจากพิษของใบขี้เหล็กลดลงมีแนวโน้มสู่ภาวะปกติได้เมื่อหยุดยาเพียง 14 วัน ผลการศึกษาทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าใบขี้เหล็กทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับของหนูได้โดยมีความสัมพันธ์กับขนาดที่ให้แม้ในขนาดที่ใช้เป็นยาในคน ดังนั้น หากจะมีการใช้ใบขี้เหล็กเป็นยาช่วยให้นอนหลับติดต่อกันเป็นเวลานานจะต้องมีการตรวจการทำงานของตับเป็นระยะและควรหยุดใช้ทันทีที่มีอาการตับอักเสบจากยาเกิดขึ้น

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 45 ฉบับที่ 3 พ.ศ. 2546 หน้า 101-114.

ABSTRACT

The leaf of *Cassia siamea* Lam. or *Senna siamea* (Lam.) Irwin & Barneby, a plant in the Leguminosae family known in Thai as Khilek, is traditionally used as sleep-aid. We performed a six-month toxicity study of *C. siamea* powdered leaves containing 0.17% barakol in five groups of 15 Wistar rats of each sex. The control group received 5 ml of distilled water/kg BW/day orally, while three of the four experimental groups were given *C. siamea* powdered leaves at the doses of 20, 200 and 2,000 mg/kg BW/day, which were equivalent to 1, 10 and 100 folds of therapeutic dose, respectively. For the recovery study, the fourth treatment group received the powdered leaves at the dose of 2,000 mg/kg BW/day for 6 months and was later kept without *C. siamea* administration for 14 more days before being sacrificed. The levels of bilirubin of the animals receiving the powdered leaf at the doses of 200 and 2,000 mg/kg BW/day were significantly higher than those of their controls. A dose-dependent increase of the incidence of hepatic lesion, namely degeneration and necrosis, were found at every dose level in both male and female animals. In addition, the higher the doses of *C. siamea* leaf were taken, the more severe the degree of hepatic damage was observed, especially in male rats. Hence, it appeared that male rats were more susceptible to the hepatotoxic effect of *C. siamea* than female rats. Reduction of the hepatic damage of the recovery group suggested that the hepatotoxic effect of *C. siamea* was reversible when the drug was stopped for only 14 days. Taken together the results showed that upon long-term consumption the leaf of *C. siamea* could produce dose-dependent hepatotoxic effect in rats even at the therapeutic dose. Hence, if *C. siamea* leaf is going to be used as a sleep aid for a long period of time, liver function test should be performed periodically and the drug should be stopped immediately if the signs of drug-induced hepatitis occur.

Key words : *Cassia siamea, Senna siamea,* Toxicity

INTRODUCTION

Cassia siamea Lam. or *Senna siamea* (Lam.) Irwin & Barneby, known in Thai as Khilek, is a medicinal plant in the Family Leguminosae[1]. The boiled young leaf and flower are used to make Khilek curry, a common Thai dish, and are also useful as a mild laxative and sleep-aid according to Thai traditional medicine[2]. The traditionally claimed sedative effect of *Cassia siamea* has received attention from Thai and foreign researchers since 1949 when a crystalline alkaloid isolated from the leaves was reported to show CNS depressant activity in rats[3].

In 1969 a chromone compound called barakol was first isolated from the leaves[4] and it was later found that the yield of barakol from young leaves of Thai *C. siamea* was about 0.1%[5]. By reducing the particle size of the powdered leaves, the proportion of the solvent and powdered leaf, as well as the duration of extract, as high as 0.8% barakol could be obtained[6]. Pharmacological studies showed that barakol possessed sedative[7] and anxiolytic[8, 9] activities, which may account for the sedative effect of *C. siamea*. However, there was also a conflicting report indicating that barakol showed no anxiolytic activity in the tests of rat anxiety[10]. Clinical studies proved that herbal medicine made from *C. siamea* leaves extract did possess hypnotic effect that is useful for persons with insomnia problem[11, 12].

C. siamea was therefore developed into an over-the-counter sleep-aid and first launched into the market in 1997. Since then there was a case report of drug-induced hepatitis in a number of patients with no known history of hepatitis[13]. As a result, the Thai FDA has then temporarily stopped the production of sleep-aid products from *C. siamea* leaves pending more data on its safety from toxicity study in animals. As a mean of consumer protection, the Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health therefore conducted chronic toxicity of *C. siamea* leaves in rats to determine its general toxicity and potential hepatotoxicity upon long-term consumption.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Cassia siamea leaves

The leaves of *C. siamea* were collected and identified by Miss Supaporn Pitiporn, head pharmacist at Chaophraya Abhaibhubejhr Hospital, Prajeenburi Province. Identification was done by comparison with a voucher specimen (BKF 28182) that was deposited at the Forest Herbarium, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand. The leaves were then dried and ground into powder. Phytochemical analysis showed that the leaves powder contained 0.17% of anhydrobarakol (equivalent to 0.18% barakol). For a six month chronic toxicity study, the powdered leaves was suspended in water and adjusted to obtain required final concentrations prior to the oral administration to the animals.

Animals

Seventy-five male (290-320g) and seventy-five female (200-230g) Wistar rats were obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakornpathom Province. The animals were housed in the animal facility of the Department of Medical Sciences. The temperature in the animal room was kept at 25 ± 1°C with 60% relative humidity. The animals were allowed to have free access to food and clean

water. The animals were divided into 5 groups of 15 animals/group/sex.

Group 1 = Control group orally received water 10 ml/kg BW/day by gavage.

Group 2 - 4 = Experimental groups received *C. siamea* leaf powder suspension with water at the doses of 20, 200 and 2,000 mg/kg/day, respectively.

Group 5 = Recovery group received the leaf powder at 2,000 mg/kg for 6 months followed by 14 days without *C. siamea* administration before being sacrificed.

Chronic toxicity study

During a 6-month treatment period, body weights and food intakes were recorded weekly. The animals were observed for any signs of abnormalities throughout the study. At the end of the treatment period, the animals in groups 1-4 were fasted for 18 hours, then anesthetized with ether and sacrificed by drawing blood from the inferior vena cava, while the animals in the recovery groups were sacrificed 14 days after the cessation of *C. siamea* administration. Blood samples were then determined for hematological and biochemical changes.

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyzer (Cell dyn 3500, Abbott). Hematological parameters measured were white blood cell (WBC), %neutrophil, %lymphocyte, %monocyte, %basophil, %eosinophil, red blood cell (RBC), hemoglobin, hematocrit (Hct), mean cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red cell distribution width (RDW), platelet, mean platelet volume (MPV), plateletcrit (PCT), and platelet distribution width (PDW).

Biochemical analysis of serum samples was performed using an automatic chemistry analyzer (Hitachi model 912). Biochemical parameters measured were aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), p-amylase, bilirubin, creatinine, blood urea nitrogen (BUN), cholesterol, triglyceride, total protein, albumin, uric acid, glucose, sodium, potassium, and chloride.

The positions, shapes, sizes and colors of internal organs, namely, brain, heart, both kidneys and lungs, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intestine, spleen, bladder, and testis in male rats or ovary and uterus in female rats were visually observed for any signs of gross lesions. These organs were then collected, weighed to determine actual and relative organ weights, and preserved in 10% buffered formalin solution. Tissue slides were later prepared and stained with hematoxylin and eosin, and histopathological examinations were performed by a veterinary pathologist.

Statistical analysis

The incidence of histopathological changes was tested for statistical significance

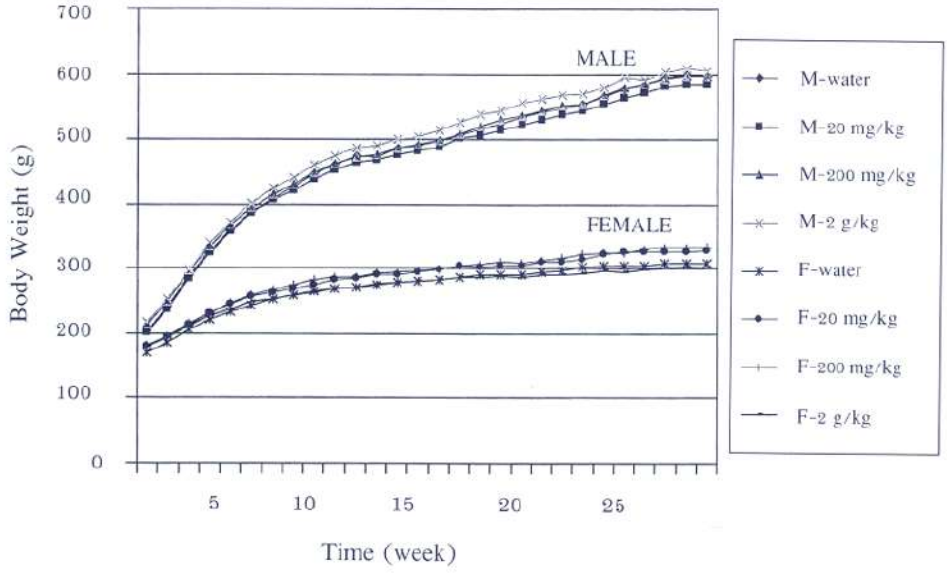


Figure 1 Growth curves of male and female rats receiving *Cassia siamea* for 6 months.

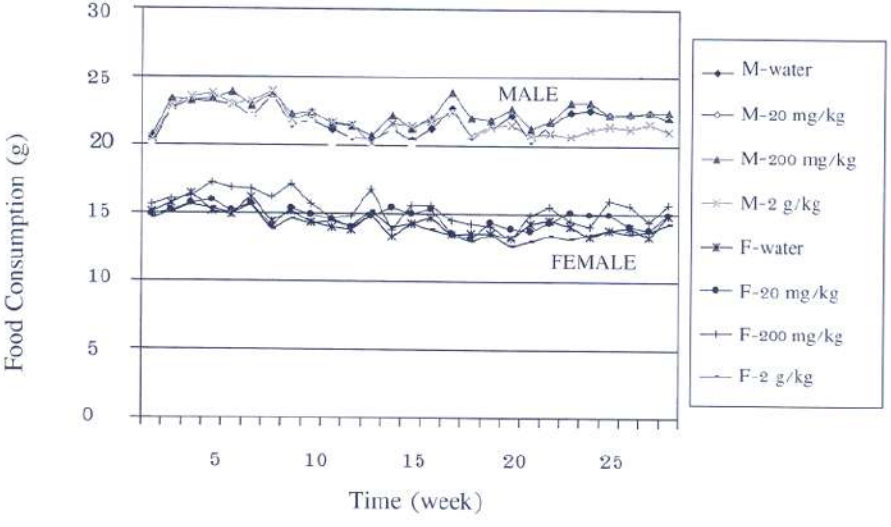


Figure 2 Food consumption of male and female rats receiving *Cassia siamea* for 6 months.

Table 1 Organ weight relative to body weight* (g/kg BW) of male rats given *C. siamea* leaf orally for 6 months.

MALE	Dose of *C. siamea* (mg/kg/day)				
	0 (n=15)	20 (n=15)	200 (n=15)	2000 (n=15)	2000-R (n=15)
Brain	3.63 ± 0.33	3.75±0.43	3.68±0.30	3.47±0.35	3.78±0.21
Heart	2.40 ± 0.24	2.33±0.20	2.50±0.28	2.44±0.26	2.50±0.17
Right kidney	2.34 ± 0.21	2.23±0.19	2.38±0.27	2.43±0.32	2.48±0.22
Left kidney	2.26 ± 0.20	2.12±0.18	2.28±0.25	2.34±0.36	2.36±0.18
Urinary bladder	0.237 ± 0.046	0.242±0.029	0.270±0.045	0.256±0.046	0.226±0.038
Liver	24.60 ± 2.85	23.14±1.41	24.27±3.07	27.44±3.28	27.42±2.32
Spleen	1.70 ± 0.25	1.71±0.24	1.68±0.188	1.81±0.23	1.88±0.24
Stomach	3.82 ± 0.62	3.71±0.39	3.75±0.51	3.49±0.44	3.91±0.42
Lung	2.99 ± 0.38	2.97±0.30	3.09±0.34	2.93±0.30	3.20±0.32
Right adrenal	0.058 ± 0.014	0.053±0.008	0.052±0.010	0.064±0.016	0.054±0.011
Left adrenal	0.060 ± 0.015	0.058±0.007	0.059±0.010	0.068±0.018	0.056±0.011
Right testis	5.71 ± 1.28	5.57±0.75	5.20±1.04	5.14±0.78	5.71±0.60
Left testis	5.34 ± 1.09	5.53±0.77	5.39±0.63	5.16±0.83	5.58±0.71

*Organ weight relative to body weight is expressed as (g organ weight/g body weight) x 1000

2000-R = Recovery group

Each value represents mean ± SD

by Fisher exact test, while significant changes of all other parameters were determined by one-way ANOVA followed by Scheffe's test.

RESULTS

Effects of *C. siamea* leaf on body weight and food intake

The body weights of rats receiving *C. siamea* were not significantly different from those of the control groups, except for the body weight of male rats receiving *C. siamea* 2,000 mg/kg/day was significantly higher than that of the control group on the first and second weeks (Figure 1).

The food intakes of male rats receiving *C. siamea* were not significantly different from that of the control group, while the food intakes of female rats receiving *C. siamea* were significantly different from the control group in some weeks during the study (Figure 2).

Table 2 **Organ weight relative to body weight* (g/kg BW) of female rats given *C. siamea* leaf orally for 6 months.**

FEMALE	Dose of *C. siamea* (mg/kg/day)				
	0 (n=15)	20 (n=15)	200 (n=15)	2000 (n=15)	2000-R (n=15)
Brain	6.39 ± 0.49	6.15±0.39	5.97±0.58	6.65±0.75	5.87±0.55
Heart	2.93 ± 0.32	2.85±0.22	2.81±0.22	3.13±0.22	2.92±0.29
Right kidney	2.55 ± 0.41	2.51±0.21	2.53±0.23	2.97±0.43**	2.69±0.31
Left kidney	2.37 ± 0.18	2.40±0.21	2.37±0.19	2.75±0.27**	2.52±0.29
Urinary bladder	0.288 ± 0.057	0.256±0.039	0.257±0.059	0.291±0.057	0.253±0.050
Liver	22.60 ± 2.09	21.39±5.23	22.35±2.45	26.38±3.39**	24.52±2.55
Spleen	2.22 ± 0.34	2.15±0.36	2.18±0.36	2.32±0.44	2.22±0.38
Stomach	5.06 ± 0.63	4.96±0.57	4.65±0.65	5.27±0.67	4.90±0.78
Lung	4.07 ± 0.55	4.06±0.32	3.91±0.55	4.30±0.42	3.91±0.53
Right adrenal	0.116 ± 0.023	0.119±0.028	0.116±0.024	0.116±0.027	0.115±0.023
Left adrenal	0.123 ± 0.020	0.121±0.033	0.126±0.019	0.127±0.026	0.113±0.018
Right ovary	0.234 ± 0.053	0.220±0.067	0.230±0.070	0.238±0.072	0.216±0.038
Left ovary	0.260 ± 0.072	0.232±0.076	0.250±0.093	0.245±0.068	0.226±0.038
Uterus	2.20 ± 1.16	2.21±0.65	1.93±0.77	2.13±1.12	1.84±0.45

*Organ weight relative to body weight is expressed as (g organ weight/g body weight) x 1000

2000-R = Recovery group

Each value represents mean ± SD

**Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

Effect of *C. siamea* leaf on relative organ weight

Relative weights of both right and left kidneys and liver of female rats in the high dose group were significantly higher than that of the control group. For male rats receiving the same dose of *C. siamea*, though relative liver weight appeared to be higher than the control group, the difference was not statistically significant. (Table 1 & 2).

Effect of *C. siamea* leaf on hematological para-meters

Male rats treated with *C. siamea* 200 and 2,000 mg/kg had significantly lower RBC number than the control group and male rats treated with *C. siamea* 2,000 mg/kg also had

Table 3 Hematological examination results of male rats given C. siamea leaf orally for 6 months.

MALE	Dose of *C. siamea* (mg/kg/day)				
	0 (n=15)	20 (n=15)	200 (n=15)	2000 (n=15)	2000-R (n=15)
WBC (K/uL)	6.13±1.85	6.13±1.23	5.75±0.90	6.85±2.64	5.38±0.81
%Neutrophil	14.27±3.97	14.61±4.50	16.26±4.58	19.27±14.55	15.49±3.91
%Lymphocyte	75.49±7.54	76.12±6.39	74.64±6.86	68.38±15.91	71.60±6.95
%Monocyte	6.46±3.96	6.53±3.49	5.98±2.37	8.66±4.59	9.69±6.22
%Basophil	2.08±1.44	1.51±0.86	1.36±0.99	2.07±1.03	1.80±1.94
%Eosinophil	1.72±0.79	1.24±0.40	1.75±0.62	1.61±0.60	1.40±0.35
RBC ($X10^6$/uL)	9.42±0.39	9.09±0.59	8.92±0.35*	8.70±0.37*	9.16±0.49
Hemoglobin (g/dL)	15.93±0.66	15.76±0.42	15.43±0.54	14.97±0.61*	15.44±0.49
%Hematocrit	48.59±2.67	46.79±4.10	45.85±3.02	45.70±1.78	47.49±3.12
MCV (fL/red cell)	51.55±1.67	51.44±2.33	51.34±2.14	52.55±1.29	51.84±2.24
MCH (pg/red cell)	16.91±0.45	17.48±1.14	17.33±0.57	17.23±0.61	16.81±0.79
MCHC (g/dL RBC)	32.82±0.63	34.12±3.30	33.87±1.82	32.79±0.74	32.50±1.94
RDW	16.52±0.71	18.29±3.74	17.28±1.90	16.33±0.79	16.68±1.37
Platelet (K/uL)	986.97±79.81	972.20±118.10	973.50±91.02	962.40±122.93	1032.23±87.55
MPV (fL/platelet)	9.53±0.73	9.79±0.73	9.53±0.58	9.80±0.86	10.51±1.28*
PCT (%)	0.94±0.11	0.95±0.15	0.92±0.10	0.94±0.13	1.09±0.19*
PDW	18.30±0.60	18.53±0.67	18.14±0.55	18.44±0.67	18.86±0.83

Each value represents mean ± SD

*Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

2000-R = Recovery group

significantly lower hemoglobin level than the control group. These changes were however not observed in the recovery group. In female rats, no significant change of hematological parameters was observed (Table 3 & 4).

Effect of *C. siamea* leaf on blood chemistry

Both male and female rats treated with *C. siamea* 200 and 2,000 mg/kg had significantly higher levels of bilirubin than the water control group. While bilirubin level in the recovery group of male rats was not different from the control group, the level of bilirubin

Table 4 Hematological examination results of female rats given *C. siamea* leaf orally for 6 months.

FEMALE	Dose of *C. siamea* (mg/kg/day)				
	0 (n=15)	20 (n=15)	200 (n=15)	2000 (n=15)	2000-R (n=15)
WBC (K/uL)	3.07±1.32	2.91±0.64	3.20±0.86	2.72±0.78	3.75±0.94
%Neutrophil	15.43±8.36	12.05±4.43	15.33±6.12	17.02±6.91	11.24±3.42
%Lymphocyte	75.50±8.57	78.37±5.61	76.92±7.37	76.92±7.37	73.26±10.21
%Monocyte	5.77±2.50	5.90±2.39	4.90±1.96	6.57±3.11	5.43±1.13
%Basophil	1.56±0.97	1.70±1.48	1.15±0.69	1.34±0.78	1.18±0.40
%Eosinophil	1.73±0.65	1.97±0.65	1.70±0.62	1.81±1.07	1.57±0.55
RBC ($X10^6$/uL)	8.64±0.63	8.31±0.47	8.16±0.53	8.26±0.41	8.27±0.40
Hemoglobin (g/dL)	15.79±0.92	15.44±0.59	15.49±0.47	15.38±0.72	15.10±0.71
%Hematocrit	48.71±3.62	46.77±2.60	45.98±2.78	47.79±2.62	47.49±2.57
MCV (fL/red cell)	56.38±1.50	56.31±1.44	56.32±1.41	57.88±2.32	57.40±1.11
MCH (pg/red cell)	18.32±0.64	18.63±0.70	19.11±1.31	18.64±0.56	18.26±0.43
MCHC (g/dL RBC)	32.49±0.95	33.10±1.30	34.02±2.77	32.22±0.79	31.83±0.75
RDW	13.84±0.67	14.24±1.07	18.84±1.44	13.85±0.81	13.67±0.38
Platelet (K/uL)	913.60±129.78	898.73±101.75	865.50±105.66	910.46±56.09	988.03±136.12
MPV (fL/platelet)	9.33±0.56	10.03±1.62	10.23±1.89	9.36±0.85	9.95±0.57
PCT (%)	0.85±0.12	0.89±0.13	0.88±0.15	0.85±0.09	0.98±0.12
PDW	18.33±0.51	18.75±0.94	18.58±1.04	18.21±0.45	18.44±0.57

Each value represents mean ± SD

*Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

2000-R = Recovery group

of female recovery group was significantly higher than its own control. Only male rats treated with *C. siamea* 2,000 mg/kg also had lower serum cholesterol and triglyceride levels than the water control group but these changes were not observed in the recovery group. Female rats receiving *C. siamea* 2,000 mg/kg had higher p-amylase but lower creatinine levels than the control group (Table 5 & 6).

Effect of *C. siamea* leaf on histopathology

The incidence of hepatocellular degeneration and necrosis in all *C. siamea*-treated groups of both male and female rats was significantly higher than those of their control groups. Other histopathological changes,

Table 5 Blood chemistry of male rats given *C. siamea* leaf orally for 6 months.

MALE	Dose of *C. siamea* (mg/kg/day)				
	0 (n=15)	20 (n=15)	200 (n=15)	2000 (n=15)	2000-R (n=15)
AST (U/L)	72.80 ± 13.99	70.87±9.10	70.53±11.84	63.33±12.88	68.07±12.31
ALT (U/L)	43.67 ± 10.60	41.73±10.02	38.73±7.83	37.07±18.92	42.87±8.87
ALP (U/L)	69.87 ± 14.73	65.40±12.02	63.33±8.97	61.67±21.61	59.87±10.13
p-amylase (U/L)	2041.47 ± 155.61	2054.73±182.39	2016.53±211.65	1840.13±426.77	2051.47±241.36
Bilirubin (mg/dL)	0.06 ± 0.03	0.08±0.03	0.13±0.05*	1.02±0.21*	0.09±0.04
Creatinine (mg/dL)	0.66 ± 0.05	0.66±0.04	0.65±0.04	0.66±0.05	0.67±0.05
BUN (mg/dL)	21.13 ± 2.77	20.11±3.03	20.01±1.89	20.15±3.86	19.89±2.84
Cholesterol (mg/dL)	75.55 ± 12.10	74.28±18.68	73.00±15.26	54.98±13.64*	73.78±18.11
Triglyceride (mg/dL)	119.38 ± 40.51	137.44±48.95	124.63±36.72	54.51±28.04*	121.73±47.05
Total protein (g/dL)	6.89 ± 0.12	6.83±0.22	6.87±0.35	6.94±0.40	6.83±0.22
Albumin (g/dL)	4.25 ± 0.13	4.28±0.15	4.18±0.12	4.14±0.44	4.33±0.10
Uric acid (mg/dL)	1.80 ± 1.14	1.79±1.41	1.55±1.09	1.55±0.89	2.58±1.72
Glucose (mg/dL)	175.91 ± 18.41	177.57±33.51	176.73±25.45	154.85±27.63	177.26±33.86
Sodium (mmol/L)	147.13 ± 1.30	147.47±1.19	147.87±1.19	147.67±1.54	144.40±1.30*
Potassium (mmol/L)	5.09 ± 0.75	4.82±0.60	4.88±0.57	5.09±1.07	5.39±0.91
Chloride (mmol/L)	107.33 ± 1.50	108.47±0.99	108.40±1.68	108.67±2.09	104.73±1.67*

Each value represents mean ± SD

*Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

2000-R = Recovery group

namely focal myocarditis, tubular dilation and mild focal mineralization of the kidney and hypoplasia of spermatogenesis were not different between *C. siamea*-treated groups and the control groups (Table 7 & 8).

The degree of histopathological changes of the liver in each group of animals shown in Table 9 indicated that there was a dose-dependent increase in liver damage in both male and female animals. Even at the dose of 20 mg/kg, a mild degree of hepatocellular degeneration and necrosis was observed in all male rats and 4/15 female rats. At the dose of 200 mg/kg, all rats of both sexes had a moderate degree of hepatocellular degeneration and necrosis. The incidence of liver damage of male rats receiving *C. siamea* 200 mg/kg was much higher than that of the female, and the

Table 6 Blood chemistry of female rats given *C. siamea* leaf orally for 6 months.

FEMALE	Dose of *C. siamea* (mg/kg/day)				
	0 (n=15)	20 (n=15)	200 (n=15)	2000 (n=15)	2000-R (n=15)
AST (U/L)	65.27 ± 6.10	68.80±11.19	63.53±6.50	57.87±10.85	61.60±13.60
ALT (U/L)	27.47 ± 5.64	32.33±8.80	26.00±3.51	27.33±6.21	29.87±5.94
ALP (U/L)	24.20 ± 5.33	22.73±4.28	22.93±3.39	20.07±6.20	22.53±6.07
p-amylase (U/L)	1176.67 ± 171.83	1249.87±224.17	1267.93±128.49	1396.93±191.90*	1328.87±181.98
Bilirubin (mg/dL)	0.08 ± 0.04	0.08±0.04	0.14±0.03*	0.68±0.08*	0.14±0.03*
Creatinine (mg/dL)	0.81 ± 0.06	0.76±0.03	0.73±0.05*	0.75±0.07*	0.71±0.05*
BUN (mg/dL)	24.61 ± 5.80	22.49±3.03	19.86±2.49	24.29±3.05	21.31±3.44
Cholesterol (mg/dL)	71.64 ± 7.87	77.06±20.21	72.33±17.71	78.20±19.80	75.64±17.26
Triglyceride (mg/dL)	84.11 ± 26.76	114.48±51.76	97.01±37.64	84.47±44.59	164.13±83.24*
Total protein (g/dL)	7.01 ± 0.27	6.80±1.68	7.18±0.24	7.33±0.39	6.85±0.25
Albumin (g/dL)	4.79 ± 0.20	4.85±0.25	4.78±0.20	4.94±0.32	4.73±0.23
Uric acid (mg/dL)	1.48 ± 0.58	1.40±1.05	1.15±0.39	1.11±0.44	1.77±0.35
Glucose (mg/dL)	151.31 ± 20.53	147.69±29.89	143.20±18.85	133.06±9.64	143.71±15.11
Sodium (mmol/L)	146.73 ± 1.87	146.87±2.10	147.07±1.87	146.93±1.87	140.33±1.59*
Potassium (mmol/L)	4.65 ± 0.66	4.77±0.66	4.53±0.40	4.61±0.61	5.88±0.64*
Chloride (mmol/L)	107.80 ± 1.90	108.47±2.56	108.20±2.18	109.00±1.93	104.27±1.53*

Each value represents mean ± SD

*Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

2000-R = Recovery group

degree of liver damage in the animals treated with 2,000 mg/kg of *C. siamea* was more severe in male than in female rats. The degree of liver damage in the recovery group of both male and female rats were much lower than those of the groups treated with *C. siamea* 2,000 mg/kg (Table 9).

DISCUSSION

The results of our chronic toxicity study of *C. siamea* leaves in rats were similar in many aspects to our previous report on the chronic toxicity of *Cassia siamea* tablet[14]. The relative liver weight of female rats treated with *C. siamea* 2,000 mg/kg was significantly higher than the control group, while the relative liver weight of male rats receiving the

Table 7 Histopathological changes of male rats given *C. siamea* leaf orally for 6 months.

Organs	Histopathological changes	Dose of *C. siamea* (mg/kg/day)				
		0 (n=15)	20 (n=15)	200 (n=15)	2000 (n=15)	2000-R (n=15)
Heart	Focal myocarditis	3/15	0/15	2/15	2/15	2/15
Liver	Degeneration and necrosis	0/15	15/15*	15/15*	15/15*	15/15*
Kidney	Tubular dilation	0/15	0/15	2/15	2/15	0/15
Testis	Hypoplasia of spermatogenesis	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15

The figures show the number of animals with histopathological change/total number of animals per group

*Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

2000-R = Recovery group

Table 8 Histopathological changes of female rats given *C. siamea* leaf orally for 6 months.

Organs	Histopathological changes	Dose of *C. siamea* (mg/kg/day)				
		0 (n=15)	20 (n=15)	200 (n=15)	2000 (n=15)	2000-R (n=15)
Heart	Focal myocarditis	0/15	1/15	0/15	0/15	1/15
Liver	Degeneration and necrosis	0/15	4/15	15/15*	15/15*	4/15
Kidney	Mild focal mineralization	6/15	0/15	1/15	0/15	2/15
	Focal tubular dilation	0/15	0/15	2/15	0/15	0/15

The figures show the number of animals with histopathological change/total number of animals per group

*Significantly different from water control group ($p < 0.05$)

2000-R = Recovery group

same treatment appeared to be higher but not statistically significant. Even though the relative kidney weights of female rats in the high dose group was also significantly higher than those of the control group but no histopathological change of the kidney was observed in this group of animals.

A decrease in the number of RBC and the amount of hemoglobin was observed in male rats in the high dose group but not in female rats, however, these changes were still in the normal ranges[15].

Table 9 Degree of liver damage in rats given *C. siamea* leaf orally for 6 months.

Sex	Dose of *C. siamea* (mg/kg/day)	Histopathological changes		
		Level 1	Level 2	Level 3
MALE	0	-	-	-
	20	100%	-	-
	200	100%	-	-
	2000	33.3%	40.0%	26.7%
	2000-R	86.7%	-	13.3%
FEMALE	0	-	-	-
	20	26.7%	-	-
	200	100%	-	-
	2000	100%	-	-
	2000-R	-*	-	-

2000-R = Recovery group

\- = No histopathological change of such level was detected

Level 1 = Mild degree of hepatocellular degeneration and necrosis (< 25%)

Level 2 = Moderate degree of hepatocellular degeneration and necrosis (25 - 50%)

Level 3 = Severe hepatocellular degeneration and necrosis (> 50%)

*4/15 (26.7%) showed individual cell degeneration and necrosis of only a few cells in each visual field. The degree of damage is considered lower than level 1

Similar to our previous finding[14], even though there was a clear evidence of hepatocellular damage in all of the *C. siamea*-treated groups, no increase in AST or ALT levels was observed. This discrepancy could be because the blood samples were obtained at the end of the study, while the massive destruction of the hepatocytes which could lead to a significant increase in AST and ALT levels was likely to occur at the early stage of *C. siamea* administration. This explanation was confirmed by another experiment conducted in our laboratory where blood chemistry was performed periodically throughout the period of *C. siamea* administration.

In contrast, a significant dose-dependent increase in bilirubin level was observed in both male and female rats. In male rats receiving the high dose of *C. siamea*, serum cholesterol and triglyceride levels were sig-

nificantly lower than those of the control group. However, these changes appeared to be reversible when *C. siamea* administration was stopped because cholesterol and triglyceride levels in the recovery group of male rats was not different from the control group. Since the liver plays an important role on the synthesis of cholesterol and fatty acids, the reduction of cholesterol and triglycerides in the serum may be due to a large degree of liver damage in the high dose group of male rats. When the histopathological change of the liver was improved after the cessation of *C. siamea*, serum levels of cholesterol and triglyceride could then become normal again.

Histopathological findings clearly showed a dose-dependent hepatotoxic effect of *C. siamea* leaves in the rat and could be observed even at the dose of 20 mg/kg In addition, the results indicated that the degree of hepatocellular degeneration and necrosis was more severe in male rats than in female rats. Therefore, it appeared that male Wistar rats are more susceptible to the hepatotoxicity of *C. siamea* leaves than female rats. The degrees of the liver damage in the recovery groups in both male and female rats were much lower than those of the high dose groups. Hence, *C. siamea*-induced hepatocellular damage appeared to be reversible when *C. siamea* administration is withdrawn.

It remains to be further studied to identify the toxic compound in the leaves whether it is barakol or anhydrobarakol, which are the active constituents, or other substances. If barakol is responsible for the toxicity of *C. siamea* leaves, it may partly explain why the overall toxicity of *C. siamea* leaves in this study appeared to be less than that induced by *C. siamea* tablet reported earlier[14] since barakol concentration in our *C. siamea* leaves was about 10 folds lower.

CONCLUSION

Our chronic toxicity study of *C. siamea* in rats indicates that *C. siamea* leaves do possess dose-dependent hepatotoxic effect and hepatocellular degeneration and necrosis can occur even at the dose of 20 mg/kg The results show that male rats appear to be more susceptible to the toxic effect of *C. siamea* than female rats. Hence, in the future if the single-herb products of *C. siamea* leaves will continue to be produced and used as a sleep-aid again, perhaps at a lower dose, liver function test should be performed periodically if it is to be used for a long period of time. The consumer should also be advised to stop taking the drug immediately if the signs of drug-induced hepatitis, namely jaundice (yellowing of the skin or whites of the eyes) and dark yellow or brown urine, occur. In addition, concomitant administration with other hepatotoxic drugs should be avoided.

Further studies should be performed to identify which compound is responsible for

the hepatotoxic effect of *C. siamea* leaves. If such compound differs from the active principle, it can lead to the production of a safer drug from purified leaves extract.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Anchalee Chuthaputti for her comment on the manuscript and her time and effort on the manuscript preparation. Thanks are also due to Dr. Raywadee Butraporn, DVM and her staffs for the service of the animal facilities and the animal husbandry.

REFERENCES

1. Smitinand T. Thai Plant Names. Bangkok : The Forest Herbarium, Royal Forest Department, 2001 : 478 p.
2. Bunyapraphatsara N, Chokechaichareonporn O, eds. Samunprai Mai-Peurn-Baan. 1st ed. Bangkok Prachachon Printing, 1996 : p. 532 - 7.
3. Arunlakshana O. Pharmacological study of the leaves of *Cassia siamea*. Siriraj Hosp Gazette 1949; 1 : 434 - 44.
4. Hassanali-Walji A, King TJ, Wallwork SC. Barakol, a novel dioxaphenalene derivative from *Cassia siamea*. J Chem Soc Chem Commun 1969; 12 : 678.
5. Chaichantipyuth, C. A phytochemical study of the leaves of *Cassia siamea* Lamk. and Cassia spectabilis Dc. Master of Sciences (Pharmacy) Thesis, Chulalongkorn University, Bangkok, 1978 : 155 p.
6. Tangsrisamruang P. The preliminary extraction of barakol from *Cassia siamea* and concentration by pervaporation. Master of Engineering in Chemical Engineering Thesis, Chulalongkorn University, Bangkok, 1997 : 108 p.
7. Bulyalert D. Effects of barakol on the central nervous system : quantitative analysis of EEG in the rat. Chiang Mai Med Bull 1993 ; 32 : 191 - 6.
8. Thongsaard W, Deachapunya C, Pongsakorn S, *et al.* Barakol : a potential anxiolytic extracted from *Cassia siamea*. Pharmacol Biochem Behav 1996; 53 : 753 - 8.
9. Thongsaard W, Pongsakorn S, Sudsuang R, *et al.* Barakol, a natural anxiolytic inhibits striatal dopamine release but not uptake in vitro. Eur J Pharmacol 1997; 319 : 157 - 64.
10. Fiorino DF, Treit D, Menard J, *et al.* Is barakol anxiolytic? Behav Pharmacol 1998; 9 : 375 - 8.
11. Pooviboonsuk P, Tappayuthpijarn P, Hincheeranund T. Hypnotic effect of modified herbal extract from *Cassia siamea* in human subjects. J Psychiatr Assoc Thailand 2000; 45 : 251 - 9.
12. Muangman V, Charoenbon S, Chanthepthewan W, *et al.* A clinical trial on a herbal medicine, Khi-lek (*Cassia*

siamea) syrup and tablets for insomnia. Thai J Phytochem 2000; 7 : 18 - 27.

13. Hongsirinirachorn M, Threeprasertsuk, S, Chutaputti A. Hepatitis associated with barakol : cases report. Thai J Gastroenterol 2001; 2 : 17 - 21.

14. Chivapat S, Chavalittumrong P, Sunyasootcharee B, *et al.* Chronic toxicity of *Cassia siamea* tablet. Bull Dept Med Services 2001; 26 : 485 - 97.

15. Semler DE, Gad SC, Chengelis CP. The Rat. In : Gad SC, Chengelis CP, eds. Animal Model in Toxicology. New York : Marcel Dekker, 1992 : 80 - 1.

พิษวิทยาของยาสมุนไพรภูมิพัฒน์

Toxicity Study of a Herbal Preparation : Poompat

ทรงพล ชีวะพัฒน์ , ปราณี ชวลิตธำรง**
เอมมนัส อัศตวิชญ์ , ทรงพล ผดุงพัฒน์**
สมเกียรติ ปัญญามัง , เรวดี บุตรากรณ์***

**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ

ภูมิพัฒน์เป็นยาเตรียมจากสมุนไพร 35 ชนิด ผลิตโดยสถาบันการแพทย์แผนไทย เพื่อทดลองใช้ในผู้ป่วยกลุ่มที่ติดเชื้อเอดส์ โดยมุ่งหวังสรรพคุณบำรุงร่างกายและเพิ่มภูมิคุ้มกัน แต่ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาทางพิษวิทยา ผู้วิจัยได้ศึกษาความเป็นพิษของยาภูมิพัฒน์ทั้งระยะเฉียบพลันและเรื้อรังโดยการป้อนผงยาภูมิพัฒน์ทางปาก ผลการศึกษาพบว่า เมื่อให้ยาภูมิพัฒน์แก่หนูถีบจักรพันธุ์ไอซีอาร์ในขนาด 13.3 ก/กก หรือคิดเป็น 332 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน ไม่ทำให้เกิด พิษเฉียบพลัน จากการศึกษาพิษเรื้อรังในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์โดยให้ยาภูมิพัฒน์ขนาด 0.04, 0.4, 1.2, และ 2.4 ก/กก/วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก หรือเทียบเท่ากับ 60 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน มีน้ำหนักตัวและการกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่พบอาการผิดปกติอื่น ๆ หนูที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ทุกขนาดมีค่าทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมยกเว้นหนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาด 2.4 ก/กก มีระดับโปแตสเซียมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่บ่งชี้ว่าเกิดจากยาภูมิพัฒน์

คำสำคัญ : ยาภูมิพัฒน์, พิษเฉียบพลันและเรื้อรัง, ยาสมุนไพร

วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 45 ฉบับที่ 3 พ.ศ. 2546 หน้า 143-155.

ABSTRACT

Poompat is a herbal preparation, consisting of 35 medicinal plants, manufactured by The Institute of Thai Traditional Medicine. It is proposed to be a health promotion and immune enhancer agent in HIV-infected patients; however toxicity study of this preparation has not yet been reported. Therefore we investigated acute and chronic toxicity studies of Poompat powder by oral administration. Our result demonstrated that administration of the preparation in ICR mice at the dose of 13.3 g/kg, equivalent to 332 fold of human therapeutic dose, did not produce acute toxicity. The chronic toxicity study in Wistar rats receiving Poompat at the doses of 0.04, 0.4, 0.2 and 2.4 g/kg revealed that male rats receiving the highest dose equivalent to 60 fold of therapeutic dose had significantly less body weight and food consumption than their control group. However, this group did not show any abnormal symptoms. Hematological and clinical chemistry values in rats receiving Poompat at the given doses did not differ from those of their control groups except female rats receiving the highest dose had significantly lower levels of potassium than their control group. Histopathological examination of visceral organs tissues showed no abnormalities related to Poompat.

Keywords : Poompat, acute and chronic toxicity, herbal preparation

บทนำ

ยาภูมิพัฒน์เป็นยาเตรียมจากสมุนไพรที่ผลิตโดยสถาบันการแพทย์แผนไทย เพื่อทดลองใช้ในผู้ป่วยกลุ่มติดเชื้อเอดส์ ขนาดรับประทานครั้งละ 2 แคปซูล แคปซูลละ 500 มก วันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น ก่อนอาหาร โดยมุ่งหวังสรรพคุณในการเป็นยาบำรุงร่างกาย ทำให้เจริญอาหาร เพิ่มภูมิคุ้มกันและทำให้ภูมิคุ้มกันดีขึ้น ส่วนผสมของยาภูมิพัฒน์ประกอบด้วยสมุนไพร 35 ชนิด ดังนี้ กฤษณา พิกุล บุนนาค สารภี มะลิ บัวหลวง โกฐพุงปลา โกฐสอ ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ข่า ข้าวเย็นใต้ ข้าวเย็นเหนือ แก่นขี้เหล็กเลือด คัดเค้า จันทน์ขาว จันทน์แดง เจตมูลเพลิงขาว เจตมูลเพลิงแดง ชุมเห็ดเทศ ตีปลี ตะโกนา ทิ้งถ่อน เทียนดำ พริกไทยล่อน ไพล ฟ้าทะลายโจร มะระขี้นก มะแว้งเครือ รากพุงดอ ลูกใต้ใบ สะค้าน เห็ดหลินจือ เหงือกปลาหมอ นอกจากนี้ ยังมีกำมะถันเหลืองผสมด้วย จะเห็นได้ว่า ส่วนผสมของยานี้ประกอบด้วยสมุนไพรบางชนิดที่มีสรรพคุณเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในตำรายาแผนโบราณ เช่น ขมิ้นชัน ช่วยบรรเทาอาการอาหารไม่ย่อย แน่น จุกเสียด ฟ้าทะลายโจรแก้ไข้ เจ็บคอ แก้ท้องเสีย ชุมเห็ดเทศ ช่วยบรรเทาอาการท้องผูก ตีปลีแก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้ไอ และขับเสมหะ เหงือกระชายแก้อาการท้องอืด ปวดท้อง แก้บิดมูกเลือด ขมิ้นอ้อย แก้อาการท้องเดิน[1] มะแว้งเครือช่วยละลายเสมหะ

และลดไข้[2] เป็นต้น นอกจากสรรพคุณของสมุนไพรต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีหลักฐานบางประการเกี่ยวกับสมุนไพรบางชนิดที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและต่อเชื้อไวรัสเอชไอวี เช่น เห็ดหลินจือ *(Ganoderma lucidum)* มีสารโปลีแซกคาไรด์ 3 ชนิด คือ PL-1 ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูถีบจัก PL-3, PL-4 ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ T- และ B-lymphocytes[3] มะระขี้นก *(Momordica charantia)* ในผลสุกและเมล็ดมีโปรตีน MRK29 มีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 reverse transcriptase สามารถลดการแสดงออกของโปรตีน p24 ของเซลล์ที่ติดเชื้อ HIV และยังอาจมีบทบาทต่อการควบคุมเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเนื่องจากเพิ่มฤทธิ์ของ Tumor Necrosis Factor (TNF) ได้ถึง 3 เท่า[4] ฟ้าทะลายโจรมีสาร dehydroandrographolide acid monoester ที่สามารถยับยั้งเชื้อ HIV ในเซลล์เพาะเลี้ยง H-9 และในเซลล์โมโนนิวเคลียร์ของคนได้[5] และมีรายงานว่า สารสกัดด้วยเอทานอลของฟ้าทะลายโจรและสาร andrographolide มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะต่อแอนติเจน[6] จากข้อมูลเหล่านี้ทำให้คาดว่ายาภูมิพัฒน์มีสรรพคุณที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อเอดส์ได้ดี

อย่างไรก็ตาม การนำยาภูมิพัฒน์มาใช้ทดลองกับผู้ป่วยเอดส์นั้น จำเป็นอย่างยิ่งต้องคำนึงถึงความเป็นพิษหรืออาการข้างเคียงซึ่งอาจเกิดขึ้นไม่ว่าจะเป็นการใช้ระยะสั้นหรือระยะยาว ดังนั้นกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ซึ่งมีหน้าที่หลักในการวิจัยเพื่อคุ้มครองผู้บริโภค จึงได้ศึกษาพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของยาภูมิพัฒน์ในสัตว์ทดลองเพื่อให้ทราบถึงข้อมูลด้านพิษวิทยาซึ่งจะเป็นแนวทางในการนำยาสมุนไพรนี้มาดำเนินการทดลองทางคลินิกได้อย่างปลอดภัยต่อไป

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรพันธุ์ไอซีอาร์ (ICR) น้ำหนักตัว 20 - 22 กรัม จำนวน 20 ตัว (เพศละ 10 ตัว) และหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ (Wistar) จำนวน 150 ตัว เพศผู้น้ำหนักตัว 200 ± 10 กรัม เพศเมียน้ำหนักตัว 180 ± 10 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปของบริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด และน้ำกรองที่สะอาดไม่จำกัดปริมาณ

การเตรียมยาภูมิพัฒน์สำหรับสัตว์ทดลอง

ผงยาภูมิพัฒน์ได้รับจากสถาบันแพทย์แผนไทย มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองน้ำตาล นำมาบดให้ละเอียดแล้วแร่งผ่านตะแกรง sieve No. 100 แล้วนำผงยามาแขวนตะกอนในน้ำกลั่น (freshly prepared) ปรับให้มีความเข้มข้น 1 : 3 (กรัม : มิลลิลิตร) ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถกรอกให้หนูถีบจักรที่ทดสอบพิษเฉียบพลัน ส่วนการศึกษาพิษเรื้อรังซึ่งทดสอบในหนูขาว ได้เตรียมผงยาภูมิพัฒน์แขวนตะกอนในน้ำให้มีความเข้มข้น 4 ระดับต่างกัน คือ 6 : 25 (stock solution), 3 : 25, 1 : 25 และ 1 : 250 (กรัม : มิลลิลิตร) ตามลำดับ

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

แบ่งหนูถีบจักรโดยวิธีสุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม ในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนู 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว) กลุ่มทดลองได้รับผงยาภูมิพัฒน์แขวนตะกอนในน้ำที่มีความเข้มข้น 1 : 3 ที่ขนาด 20 มล/กก โดยป้อนทางปาก 2 ครั้ง ภายใน 1 วัน คิดเป็นขนาดยาที่ได้รับทั้งสิ้น 13.3 กรัม/น้ำหนักตัว 1

กิโลกรัม (ก/กก) ปริมาตรของยาน้ำแขวนตะกอนที่ให้แก่หนูถีบจักรครั้งนี้เป็นไปตามหลักการทดสอบพิษเฉียบพลันใน rodent[7] ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากันกับกลุ่มทดลอง สังเกตอาการพิษ (Pharmacotoxic signs) ต่อระบบต่าง ๆ ภายหลังได้รับยาอย่างใกล้ชิด 5 ชั่วโมงแรก ได้แก่ การหายใจ การเคลื่อนไหว การชัก อาการผิดปกติที่ตา ขน อาการทางระบบอาหาร เป็นต้น จากนั้นเฝ้าสังเกตอาการของหนูทุกวันพร้อมบันทึกจำนวนหนูที่ตาย เมื่อครบกำหนด 14 วัน ดมสลบหนูด้วยอีเทอร์แล้วผ่าชากชันสูตรเพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางมหพยาธิวิทยา (gross lesions) ของอวัยวะภายในต่าง ๆ ที่มองเห็นด้วยตาเปล่า หากพบความผิดปกติจะนำไปตรวจทางจุลพยาธิวิทยาต่อไป

การศึกษาพิษเรื้อรัง

แบ่งหนูขาวโดยวิธีสุ่มออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว และเพศเมีย 15 ตัว) ดังนี้กลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นทางปากในปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ส่วนกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม ได้รับผงยาภูมิพัฒน์แขวนตะกอนในน้ำที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ในขนาด 0.04, 0.4, 1.2 และ 2.4 กรัม/กิโลกรัม/วัน (ก/กก/วัน) ตามลำดับ โดยป้อนทางปากเป็นเวลานาน 6 เดือน หรือคิดเป็น 1, 10, 30 และ 60 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน (ซึ่งสถาบันการแพทย์แผนไทยกำหนดให้ผู้ป่วยรับประทานยาภูมิพัฒน์ครั้งละ 2 แคปซูล แคปซูลละ 500 มก วันละ 2 ครั้ง ในที่นี้คิดว่าคนมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 50 กก ดังนั้น ขนาดที่ใช้ในคนคือ 0.04 ก/กก/วัน) ในระหว่างดำเนินการทดลองบันทึกน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินทุกสัปดาห์เฝ้าสังเกตอาการพิษและการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของร่างกาย (Physical appearance) ทุกวัน ได้แก่ ขน ผิวหนัง ตา เยื่อเมือก รูทวาร อุจจาระ การหายใจ การเดิน การทรงตัว และพฤติกรรมของหนูทดลอง ถ้ามีหนูตายระหว่างทดลองจะนำมาผ่าชากชันสูตร เมื่อหนูได้รับยาครบกำหนด 6 เดือน จะอดอาหารหนู เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้ระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดคงที่ จากนั้นดมสลบด้วยอีเทอร์ เปิดผ่าช่องท้อง เจาะเลือดจาก abdominal aorta นำไปตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Cell Dyn® รุ่น 3500 เพื่อหาค่าทางโลหิตวิทยา ดังต่อไปนี้ เปอร์เซ็นต์ hematocrit, ปริมาณฮีโมโกลบิน จำนวนเม็ดเลือดแดง จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil, eosinophil, lymphocyte, monocyte, และ basophil จำนวนเกล็ดเลือด ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ได้แก่ mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) และ mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ส่วนซีรัมที่แยกได้นั้นนำไปตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เคมีในเลือดอัตโนมัติ Hitachi® รุ่น 912 เพื่อ วัดค่าเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein, albumin, ค่า globulin จะคำนวณจากค่าโปรตีนรวมลบด้วยอัลบูมิน, bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium และ chloride ion

จากนั้นผ่าชากชันสูตรสัตว์ทดลองเพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางมหพยาธิวิทยา (groos lesions) ของอวัยวะต่างๆ ที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ดังนี้ สมอง หัวใจ ปอด ตับ ไต หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ม้าม ลำไส้ ตับอ่อน อัณฑะ ต่อมลูกหมาก seminal vesicles รังไข่ มดลูก

ต่อมน้ำนม ต่อมน้ำลาย ต่อมน้ำตา ต่อมธัยรอยด์ และต่อมหมวกไต บันทึกน้ำหนักอวัยวะที่สามารถชั่งได้ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่งของ Mettler Toledo® รุ่น PB153 เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (% relative organ weight) จากนั้นเก็บอวัยวะในน้ำยา 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลินแล้วนำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา[8] เพื่อตรวจหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาโดยนักพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ (Veterinary pathologist)

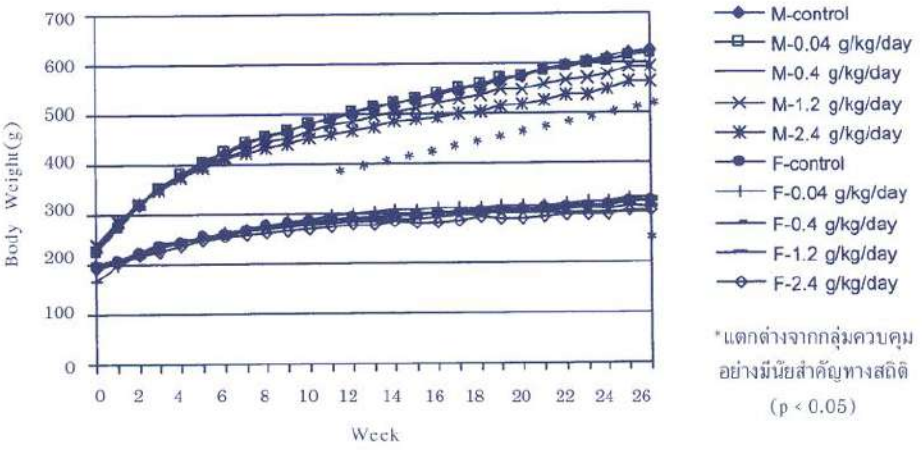
การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลน้ำหนักตัว การกินอาหาร ค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางเคมีคลินิก น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ วิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา การทดสอบสมมติฐานใช้ one-way ANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Dunnette's test ด้วยโปรแกรม SPSS version 9.0 ส่วนอุบัติการณ์ของการเปลี่ยนแปลง ทางจุลพยาธิวิทยา ใช้ Fisher exact ที่ $p < 0.05$[9]

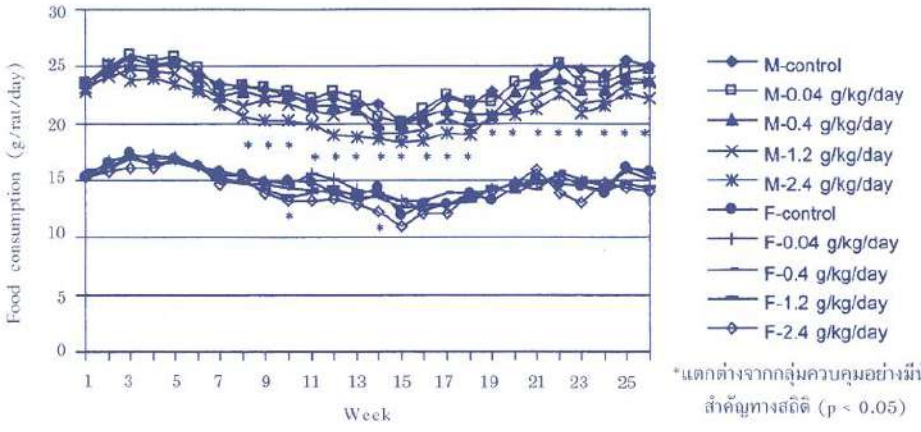
ผล

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

หนูถีบจักรกลุ่มทดลองที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 13.3 ก/กก ไม่แสดงอาการพิษเฉียบพลันใดๆ ตลอดช่วงเวลาที่เฝ้าสังเกต เมื่อครบกำหนด 14 วัน พบว่า ไม่มีสัตว์ทดลองตาย ผลการผ่าชากชันสูตรตรวจอวัยวะภายในไม่พบความผิดปกติใดๆ ที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับยาภูมิพัฒน์เป็นเวลา 6 เดือน



ภาพที่ 2 การกินอาหารของหนูขาวเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับยาภูมิพัฒน์เป็นเวลา 6 เดือน

การศึกษาพิษเรื้อรัง

ผลของยาภูมิพัฒน์ต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร และสุขภาพของหนูขาว

หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 12 ไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ส่วนหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับยาเท่ากันมีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมจนกระทั่งสัปดาห์สุดท้ายพบว่า หนูกลุ่มนี้เริ่มมีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 1) ผลของยาภูมิพัฒน์ต่อการกินอาหารนั้นพบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 ไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับยาขนาดเท่ากันนั้น กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะสัปดาห์ที่ 10 และ 14 ของการทดลองเท่านั้น (ภาพที่ 2) ตลอดระยะเวลาของการทดลองไม่พบอาการหรือการเปลี่ยนแปลงใด ๆที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติของหนูกลุ่มที่ได้รับยาภูมิพัฒน์และกลุ่มควบคุม แต่อย่างใด

ผลของยาภูมิพัฒน์ต่อค่าทางโลหิตวิทยา

หนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ทุกกลุ่มเป็นเวลา 6 เดือน มีค่าทางโลหิตวิทยาไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นหนูเพศเมียที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก มีเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดอีโอสิโนฟิลต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1 และ 2)

ผลของยาภูมิพัฒน์ต่อค่าทางเคมีคลินิก

หนูกลุ่มที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ทุกกลุ่มมีค่าทางเคมีคลินิกส่วนใหญ่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างไรก็ตามพบว่า หนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก มีระดับโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่มีระดับโปแตสเซียมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 1 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยาภูมิพัฒน์เป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	ขนาดของยาภูมิพัฒน์ (ก/กก/วัน)				
	0 (n=15)	0.04 (n=15)	0.4 (n=15)	1.2 (n=14*)	2.4 (n=14*)
Hematocrit (%)	47.84±1.91	47.62±1.66	48.10±1.82	48.65±2.23	47.70±1.24
Hemoglobin (g/dl)	15.78±0.49	15.66±0.47	15.79±0.44	15.94±0.50	15.74±0.34
RBC ($x10^6$cells/μL)	9.07±0.36	9.16±0.45	9.04±0.50	9.20±0.19	8.93±0.49
MCV(fl/red cell)	52.75±1.47	52.03±1.84	53.26±1.98	52.87±2.27	53.48±2.34
MCH (pg/red cell)	17.40±0.53	17.13±0.56	17.50±0.69	17.33±0.54	17.64±0.91
MCHC (g/dl RBC)	33.00±0.54	32.90±0.33	32.86±0.52	32.80±0.68	32.99±0.53
WBC (K/μL)	4.00±1.04	3.57±0.73	3.21±0.77	3.66±1.16	3.50±0.86
Neutrophil (%)	19.63±6.48	21.52±6.48	22.66±5.09	20.37±5.60	24.81±5.41
Eosinophil (%)	1.55±0.50	1.41±0.58	1.59±0.38	1.23±0.36	1.42±0.40
Lymphocyte (%)	68.52±7.52	67.81±7.52	66.25±6.92	68.40±7.59	64.47±6.56
Monocyte (%)	6.46±1.67	6.27±2.12	6.40±2.13	6.83±2.47	6.26±2.43
Basophil (%)	3.83±1.08	2.98±1.09	3.09±0.85	3.13±1.38	3.04±1.25
Platelet (K/μL)	963.87±85.64	983.90±106.25	987.90±105.09	995.53±103.81	968.61±117.17

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน *ตายระหว่างการทดลอง 1 ตัว เนื่องจากสำลักยาเข้าสู่ปอด

ตารางที่ 2 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยาภูมิพัฒน์เป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	ขนาดของยาภูมิพัฒน์ (ก/กก/วัน)				
	0 (n=15)	0.04 (n=15)	0.4 (n=15)	1.2 (n=15)	2.4 (n=15)
Hematocrit (%)	46.75±1.80	46.03±1.98	46.52±2.11	46.64±1.89	47.67±2.64
Hemoglobin (g/dl)	15.41±0.51	15.14±0.59	15.35±0.76	15.27±0.71	15.64±0.68
RBC ($x10^6$cells/μL)	8.13±0.37	7.80±0.40	8.04±0.50	7.94±0.34	8.16±0.36
MCV(fl/red cell)	57.54±1.72	57.60±1.71	57.97±2.53	58.75±1.80	58.44±2.72
MCH (pg/red cell)	18.95±0.57	18.96±0.55	19.13±0.92	19.25±0.66	19.21±0.75
MCHC (g/dl RBC)	32.95±0.66	32.94±0.54	33.00±0.53	32.74±0.34	32.92±1.38
WBC (K/μL)	2.21±0.69	2.43±0.69	2.47±0.69	2.57±0.81	2.73±0.83
Neutrophil (%)	22.31±8.81	16.82±5.79	16.50±6.54	18.63±7.38	17.97±6.76
Eosinophil (%)	1.47±0.49	1.47±0.53	1.63±0.68	1.41±0.66	0.95±0.32*
Lymphocyte (%)	66.10±8.93	74.54±6.59	73.38±7.74	70.56±8.39	72.64±6.79
Monocyte (%)	7.78±2.41	4.70±1.58	6.02±2.55	6.58±1.88	6.10±1.81
Basophil (%)	2.33±0.94	2.47±0.84	2.47±0.86	2.82±0.77	2.34±0.68
Platelet (K/μL)	927.60±90.18	938.17±84.15	963.30±135.80	938.37±88.50	951.23±80.81

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยาภูมิพัฒน์เป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	ขนาดของยาภูมิพัฒน์ (ก/กก/วัน)				
	0 (n = 15)	0.04 (n = 15)	0.4 (n = 15)	1.2 (n = 14*)	2.4 (n = 14*)
ALP (U/L)	64.00 ± 7.47	65.00±11.85	61.53±7.70	67.43±8.86	61.71±8.77
ALT (U/L)	29.40 ± 9.79	30.27±3.89	30.13±6.30	31.14±5.46	30.36±3.71
AST (U/L)	82.00 ± 11.27	82.66±8.11	79.53±10.50	81.28±11.38	77.78±10.86
Total protein (g/dl)	6.88 ± 0.19	6.92±0.21	6.89±0.25	6.95±0.29	6.78±0.20
Albumin (g/dl)	4.48 ± 0.15	4.47±0.12	4.49±0.17	4.60±0.12	4.49±0.17
Globulin (g/dl)	2.40 ± 0.24	2.45±0.23	2.40±0.24	2.37±0.26	2.28±0.17
Bilirbubin (mg/dl)	0.06 ± 0.03	0.09±0.06	0.09±0.04	0.08±0.05	0.10±0.05
BUN (mg/dl)	17.63 ± 2.40	17.22±2.38	17.02±2.58	17.27±2.04	18.41±1.88
Creatinine (mg/dl)	0.77 ± 0.05	0.74±0.07	0.72±0.06	0.73±0.06	0.74±0.62
Glucose (mg/dl)	169.32 ± 21.32	179.22±16.72	175.25±30.76	195.71±65.39	158.71±25.11
Uric acid (mg/dl)	1.49 ± 0.61	1.35±0.68	1.51±1.34	2.33±1.99	1.30±1.24
Triglyceride (mg/dl)	107.23 ± 36.08	108.07±29.87	109.99±30.32	87.19±26.36**	84.61±32.56
Cholesterol (mg/dl)	69.42 ± 17.48	74.90±13.41	70.95±23.82	64.49±12.76**	65.31±16.05
Sodium (mmol/l)	146.93 ± 1.09	147.60±1.35	148.60±0.98	149.07±1.27	149.36±1.21**
Potassium (mmol/l)	4.57 ± 0.69	4.41±0.54	4.58±0.90	4.67±1.15	4.18±0.71**
Chloride (mmol/l)	106.40 ± 1.40	106.26±0.88	107.53±1.41	107.57±2.21	108.14±1.03**

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน *ตายระหว่างการทดลอง 1 ตัว เนื่องจากสำลักยาเข้าสู่ปอด
**แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยาภูมิพัฒน์เป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	ขนาดของยาภูมิพัฒน์ (ก/กก/วัน)				
	0 (n = 15)	0.04 (n = 15)	0.4 (n = 15)	1.2 (n = 15)	2.4 (n = 15)
ALT (U/L)	30.80 ± 11.85	32.53±10.67	39.33±37.77	37.40±25.16	33.13±14.10
AST (U/L)	99.93 ± 51.19	82.60±16.91	96.00±42.09	98.47±62.48	86.13±23.33
ALP (U/L)	28.33 ± 6.46	26.13±6.50	25.60±7.05	26.13±8.31	26.67±5.94
BUN (mg/dl)	24.22 ± 3.74	22.31±3.63	22.56±4.07	25.06±4.76	27.09±5.12
Creatinine (mg/dl)	0.84 ± 0.11	0.77±0.06	0.80±0.07	0.85±0.10	0.87±0.14
Total protein (g/dl)	6.93 ± 0.19	6.90±0.34	6.96±0.31	7.07±0.24	7.05±0.31
Albumin (g/dl)	4.91 ± 0.15	4.91±0.22	4.99±0.19	5.07±0.28	5.00±0.22
Globulin (g/dl)	2.03 ± 0.24	1.99±0.23	1.97±0.22	2.00±1.71	2.06±0.19
Bilirbubin (mg/dl)	0.11 ± 0.04	0.10±0.05	0.12±0.06	0.14±0.05	0.13±0.06
Glucose (mg/dl)	130.44 ± 16.89	145.64±21.64	138.27±12.69	150.39±18.22	139.39±26.66
Uric acid (mg/dl)	1.33 ± 0.52	0.97±0.45	1.09±0.39	1.36±0.88	1.50±0.79
Triglyceride (mg/dl)	56.19 ± 15.69	58.08±23.20	55.82±10.18	54.99±11.62	54.13±8.94
Cholesterol (mg/dl)	69.89 ± 20.94	73.37±22.83	69.36±19.32	84.54±17.51	81.92±26.18
Sodium (mmol/l)	146.07 ± 1.16	146.60±1.12	147.60±1.29	147.53±1.46	147.93±1.09*
Potassium (mmol/l)	4.51 ± 0.95	3.97±0.47	3.90±0.46	3.81±0.46	3.71±1.14*
Chloride (mmol/l)	107.73 ± 0.96	108.80±1.36	108.67±1.76	108.07±1.49	107.27±1.44

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 5 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยาภูมิพัฒน์เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	ขนาดของยาภูมิพัฒน์ (ก/กก/วัน)				
	0 (n = 15)	0.04 (n = 15)	0.4 (n = 15)	1.2 (n = 14*)	2.4 (n = 14*)
สมอง	0.36 ± 0.03	0.36±0.04	0.36±0.03	0.38±0.04	0.39±0.03
หัวใจ	0.24 ± 0.03	0.23±0.02	0.24±0.02	0.24±0.02	0.26±0.02
ปอด	0.28 ± 0.03	0.28±0.03	0.29±0.03	0.29±0.02	0.30±0.02
กระเพาะอาหาร	0.36 ± 0.02	0.37±0.04	0.36±0.04	0.37±0.05	0.39±0.03**
ตับ	2.45 ± 0.18	2.48±0.32	2.45±0.25	2.67±0.29	2.71±0.22**
ไตซ้าย	0.22 ± 0.02	0.21±0.02	0.22±0.02	0.23±0.02	0.24±0.02**
ไตขวา	0.23 ± 0.02	0.23±0.02	0.23±0.02	0.24±0.03	0.24±0.02
ม้าม	0.16 ± 0.02	0.16±0.01	0.17±0.02	0.18±0.02	0.18±0.02**
กระเพาะปัสสาวะ	0.027 ± 0.006	0.027±0.004	0.026±0.005	0.028±0.005	0.028±0.004
อัณฑะซ้าย	0.52 ± 0.09	0.52±0.07	0.52±0.04	0.56±0.11	0.57±0.07
อัณฑะขวา	0.52 ± 0.10	0.52±0.07	0.52±0.05	0.56±0.07	0.55±0.07

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน *ตายระหว่างการทดลอง 1 ตัว เนื่องจากสำลักยาเข้าสู่ปอด
**แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6 น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยาภูมิพัฒน์เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	ขนาดของยาภูมิพัฒน์ (ก/กก/วัน)				
	0 (n = 15)	0.04 (n = 15)	0.4 (n = 15)	1.2 (n = 15)	2.4 (n = 15)
สมอง	0.62 ± 0.06	0.60±0.06	0.63±0.06	0.6±0.04	0.67±0.05*
หัวใจ	0.29 ± 0.02	0.28±0.03	0.29±0.02	0.30±0.03	0.29±0.02
ปอด	0.39 ± 0.04	0.39±0.04	0.40±0.04	0.42±0.03	0.43±0.02
กระเพาะอาหาร	0.50 ± 0.05	0.48±0.06	0.49±0.08	0.53±0.06	0.53±0.05
ตับ	2.41 ± 0.29	2.38±0.29	2.45±0.19	2.66±0.35	2.79±0.36*
ไตซ้าย	0.25 ± 0.02	0.26±0.02	0.25±0.03	0.26±0.02	0.27±0.03
ไตขวา	0.26 ± 0.02	0.27±0.02	0.26±0.03	0.28±0.02	0.28±0.03
ม้าม	0.21 ± 0.04	0.21±0.02	0.22±0.04	0.23±0.03	0.22±0.03
กระเพาะปัสสาวะ	0.027 ± 0.003	0.026±0.004	0.027±0.004	0.029±0.003	0.029±0.004
รังไข่ซ้าย	0.020 ± 0.004	0.020±0.063	0.020±0.043	0.020±0.055	0.019±0.041
รังไข่ขวา	0.018 ± 0.043	0.018±0.047	0.019±0.037	0.021±0.059	0.018±0.037

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 7 ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยาภูมิพัฒน์เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	พยาธิสภาพที่พบ	ขนาดของยาภูมิพัฒน์ (ก/กก/วัน)				
		0 (n = 15)	0.04 (n = 15)	0.4 (n = 15)	1.2 (n = 14*)	2.4 (n = 14*)
ปอด	Lymphoid proliferated peribronchioles (+1)	8/15	6/15	6/15	7/14	4/14
หัวใจ	Focal myocardiosis	2/15	2/15	0/15	0/14	1/14
ตับ	Periportal fatty degeneration	3/15	3/15	3/15	2/14	1/14
	Bile duct hyperplasia	1/15	0/15	0/15	0/14	0/14
	Submucosal fibrosis of bile duct	0/15	1/15	0/15	0/14	0/14
ไต	Focal tubular dilatation	1/15	2/15	0/15	0/14	0/14
ต้บอ่อน	Focal nodular hyperplasia	1/15	0/15	0/15	0/14	0/14
ลำไส้เล็ก	Lymphoid aggregated in submucosa (+1)	1/15	2/15	0/15	2/14	2/14
ต่อมหมวกไต	Cortical fatty degeneration	3/15	5/15	1/15	3/14	2/14
	Focal cortical calcification	0/15	1/15	0/15	0/14	0/14

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของจำนวนหนูที่ตรวจพบพยาธิสภาพ/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

(+1) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงมีเพียงเล็กน้อย

*ตายระหว่างการทดลอง 1 ตัว เนื่องจากสำลักยาเข้าสู่ปอด

($p < 0.05$) เฉพาะหนูเพศผู้เท่านั้นที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก มีค่าของคลอไรด์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3 และ 4)

ผลของยาภูมิพัฒน์ต่ออวัยวะต่าง ๆ

ผลการผ่าซากชันสูตรตรวจอวัยวะภายในของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับยาภูมิพัฒน์นั้น ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางมหพยาธิวิทยา เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม หนูขาวทั้งสองเพศที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับยาขนาด 2.4 ก/กก มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของกระเพาะอาหาร ไตซ้ายและม้าม เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หนูเพศเมียที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของสมองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5 และ 6) การตรวจอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยา พบการเปลี่ยนแปลงในบางอวัยวะ ได้แก่ cortical fatty degeneration ที่ต่อมหมวกไตของหนูเพศผู้ การรวมกลุ่มของ lymphoid cell ที่ลำไส้ เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มีอัตราการเกิดและความรุนแรง อย่างไม่สัมพันธ์กับขนาดของยาที่ให้ (ตารางที่ 7 และ 8)

วิจารณ์

ผลการศึกษาพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักรพันธุ์ไอซีอาร์ แสดงให้เห็นว่า ยาภูมิพัฒน์ที่ขนาด 13.3 ก/กก หรือเทียบเท่ากับ 332 เท่าของขนาดที่ใช้ใน

ตารางที่ 8 ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยาภูมิพัฒน์เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	พยาธิสภาพที่พบ	ขนาดของยาภูมิพัฒน์ (ก/กก/วัน)				
		0 (n = 15)	0.04 (n = 15)	0.4 (n = 15)	1.2 (n = 15)	2.4 (n = 15)
ปอด	Lymphoid proliferated bronchioles (+1)	5/15	3/15	3/15	6/15	0/15
หัวใจ	Focal myocardiosis	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15
ตับ	No remarkable lesions					
ไต	Chronic pyelitis	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15
ตับอ่อน	Focal nodular hyperplasia	1/15	0/15	1/15	0/15	0/15
ลำไส้เล็ก	Lymphoid aggregated in submucosa (+1)	1/15	0/15	0/15	0/15	1/15
ลำไส้ใหญ่	Lymphoid aggregated in submucosal layer (+1)	0/15	2/15	0/15	1/15	0/15
ต่อมหมวกไต	Cortical fatty degeneration	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของจำนวนหนูที่ตรวจพบพยาธิสภาพ/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม
(+1) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงมีเพียงเล็กน้อย

คน ไม่ก่อให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและสัตว์ทดลองไม่ตาย ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าขนาดของยาภูมิพัฒน์ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) มีค่ามากกว่า 13.3 ก/กก

จากการศึกษาพิษเรื้อรังในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่า หนูขาวเพศผู้กลุ่มที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก หรือเทียบเท่ากับ 60 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนเป็นระยะเวลา 3 เดือนขึ้นไป มีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญซึ่งสอดคล้องกับการกินอาหารที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญของหนูกลุ่มนี้ ในขณะที่หนูเพศเมียที่ได้รับยาเท่ากันไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้จนกระทั่งสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองจึงเริ่มมีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องจากหนูเพศผู้กลุ่มนี้ได้รับผงยาสมุนไพรปริมาณสูงมากในกระเพาะอาหารส่งผลให้กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มอื่น ๆ หรือผงยาปริมาณมากอาจไปขัดขวางหรือรบกวนการดูดซึมอาหารภายในลำไส้ ดังนั้น การให้ยาภูมิพัฒน์ขนาดสูงเป็นเวลานานอาจมีผลกระทบต่อการเพิ่มของน้ำหนักตัวและกดการกินอาหารของหนูขาวได้ โดยหนูเพศผู้จะไวต่อการตอบสนองนี้มากกว่าหนูเพศเมีย อย่างไรก็ตาม จากการสังเกตอาการและตรวจสภาพร่างกายทั่วไปของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ พบว่า มีอาการทางระบบต่าง ๆ พฤติกรรมและสุขภาพทั่วไปเป็นปกติไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม จึงกล่าวได้ว่าการได้รับยาภูมิพัฒน์ติดต่อกัน 6 เดือน ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติต่อร่างกายของสัตว์ทดลอง

ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาของหนูกลุ่มที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ทุกกลุ่มบ่งชี้ว่า ยาภูมิพัฒน์ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติใด ๆ แม้ว่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวนิวโตฟิลจะลดลงในหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก แต่ก็ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ[9] ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของซีรัม พบว่า ระดับของโซเดียมสูงขึ้นในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ 2.4 ก/กก และระดับคลอไรด์สูงขึ้นในหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับยาภูมิพัฒน์2.4 ก/กก อย่างมีนัยสำคัญนั้น อาจเกิดจากหนูกลุ่มนี้ได้รับเกลือโซเดียมคลอไรด์จากยาในปริมาณที่สูงกว่าหนูกลุ่มอื่น ทั้งนี้ เนื่องจากยาภูมิพัฒน์มีส่วนผสมของสมุนไพรเหงือกปลาหมอ ซึ่งพืชชนิดนี้มักพบตามป่าชายเลนหรือบริเวณปากน้ำที่น้ำทะเลขึ้นถึง[1] อย่างไรก็ตาม จัดเป็นการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติของหนูขาว[9] ระดับโปแตสเซียมที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูกลุ่มที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก อาจเกิดจากไตมีการขับโปแตสเซียมเพิ่มขึ้นทำให้เสียโปแตสเซียมกับปัสสาวะมาก เนื่องจากส่วนผสมของยาภูมิพัฒน์มีสมุนไพรบางชนิดที่มีสรรพคุณช่วยขับปัสสาวะ ได้แก่ แก่นขี้เหล็กเลือด[10] ตะไคนา พริกไทยล่อน[11] มะแว้งเครือ[12] และเหง้ากระชาย[1] เป็นต้น แต่ก็ยังขาดหลักฐานสนับสนุนเนื่องจากการทดลองครั้งนี้ไม่ได้วัดปริมาณปัสสาวะและปริมาณของโปแตสเซียมในปัสสาวะ โปแตสเซียมเป็นอิเลคโตรไลท์ที่มีมากในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปแตสเซียมในซีรัมไม่ได้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปแตสเซียมทั้งหมดในร่างกาย ในคนถือว่าภาวะโปแตสเซียมต่ำในเลือดเมื่อระดับซีรัมโปแตสเซียมต่ำกว่า 3.5 mmol/l และผู้ที่มีโปแตสเซียมต่ำจะพบอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง รวมทั้งกล้ามเนื้อที่เกี่ยวกับการหายใจทำให้หายใจลำบาก สำไส้เป็นอัมพาต[13] จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบอาการดังกล่าวปรากฏในหนูกลุ่ม ที่ได้รับภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก และไม่พบพยาธิ-สภาพของไตที่สัมพันธ์กับภาวะโปแตสเซียมต่ำ จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าหนูกลุ่มนี้มีภาวะโปแตสเซียมต่ำ

น้ำหนักสัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้นของกระเพาะอาหาร ตับ ไต ม้าม ของหนูเพศผู้และสมองของหนูเพศเมียที่ได้รับยาภูมิพัฒน์ขนาด 2.4 ก/กก ไม่อาจกล่าวได้ว่าเป็นผลจากยาภูมิพัฒน์ เนื่องจากไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใด ๆ ทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่ออวัยวะดังกล่าว ดังนั้น อาจเพราะหนูกลุ่มนี้มีน้ำหนักตัวที่สัปดาห์สุดท้ายน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จึงทำให้ผลการคำนวณค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ได้ค่าที่สูงขึ้น ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยา ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่บ่งชี้จำเพาะว่าเกิดจากยาภูมิพัฒน์ เนื่องจากมีอัตราการเกิดและความรุนแรงที่ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของยาแบบ dose-dependent พยาธิสภาพบางอย่างที่พบได้ในบางอวัยวะนั้น เช่น การพบหย่อม lymphoid cells ที่ปอดในหนูทุกกลุ่มอย่างไม่แตกต่าง ทั้งอัตราการเกิดและความรุนแรง อาจเกิดจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนบางอย่างที่หนูสูดหายใจเข้าไป ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่ายาภูมิพัฒน์ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่ผิดปกติใดๆ

สรุป

การศึกษาพิษเฉียบพลันของยาภูมิพัฒน์ในหนูถีบจักรพันธุ์ไอซีอาร์ โดยป้อนยาในขนาดสูงสุดที่สามารถให้ได้คือ 13.3 ก/กก หรือเทียบเท่ากับ 332 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน ไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันจากผลการศึกษาพิษเรื้อรังในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ โดยป้อนยาขนาด 0.04, 0.4, 1.2 และ 2.4

ก/กก/วัน หรือเทียบเท่ากับ 1, 10, 30 และ 60 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน แสดงให้เห็นว่า ยาภูมิ-พัฒน์ไม่ทำให้เกิดอาการพิษสะสม ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติ ยกเว้นหนูที่ได้รับยาขนาดสูงพบการลดลงของระดับซีรัมโปแตสเซียมแต่ไม่พบอาการที่สัมพันธ์กับภาวะโปแตสเซียม ต่ำแต่อย่างใด นอกจากนี้ไม่พบว่ายาภูมิพัฒน์ทำให้เกิดพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะภายในต่าง ๆ แต่อย่างไรก็ตาม หากรับประทานยานี้ในขนาดสูงและเป็นเวลานาน ติดต่อกันควรมีการตรวจร่างกายและตรวจวัดระดับโซเดียมและโปแตสเซียมในเลือดเป็นระยะ ๆ เพื่อป้องกันอาการผิดปกติอันอาจเกิดจากการเสียดุลย์อิเลคโตรไลท์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ พญ.เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ ผู้อำนวยการสถาบันแพทย์แผนไทย ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยและยาภูมิพัฒน์สำหรับการศึกษาครั้งนี้ นางสาวอรทิตา ไมตรีจิตต์ นางสาวอัมพร ลออเงิน ที่ช่วยสังเกตอาการและดูแลสัตว์ทดลอง และนายสัตวแพทย์ ดร.อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ ในการตรวจสอบสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา

เอกสารอ้างอิง

1. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สมุนไพรพื้นบ้าน (ฉบับรวม) กรุงเทพฯ : รุ่งเรืองสาส์น การพิมพ์, 2541: 2, 28, 54.
2. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคสาม) ว่าด้วยพฤกษชาติ วัตถุธาตุ และสัตววัตถุนานาชาติ. กรุงเทพฯ : พิชัย-การพิมพ์, 2516 : หน้า 51-2.
3. Bao XF, Wang XS, Dong Q, *et al.* Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum.* Phytochem 2002; 59(2) : 175-81.
4. Jiratchariyakul W, Wiwat C, Vongsakul M, *et al.* HIV inhibitor from Thai bitter gourd. Planta Med 2001; 67(4) : 350-3.
5. Chang RS, Ding L, Chen GQ, *et al.* Dehydroandrographolide succinic acid monoester as an inhibitor against immunodeficiency virus. Proc Soc Exp Biol Med 1991; 197(1) : 59-66.
6. Puri A, Saxena R, Saxena RP, *et al.* Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata* J Nat Prod 1993; 56(7) : 995-9.
7. Chan PK and Hayes AW. Acute toxicity and eye irritancy. In : Hayes AW editor. Pinciples and methods of Toxicology 3rd ed. New York : Raven press, 1994 : p. 585-93.
8. นพนิตย์ ว. เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ห้างขายยาตรานกยูง แม่เลื่อน, 2524.
9. Gad SC. Statistical approaches to the design of toxicology studies. In : Maines MD *et al.* ed. Current protocols in Toxicology. New York : John Wiley&Sons, Inc, 1999 : unit 1.2.
10. Gad SC. The Rat : Pathology. In : Gad SC and Chengelis CP, ed. Animal Model in Toxicology. New York : Marcel Dekker, 1992 : p. 78-81.

11. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคหนึ่ง) ว่าด้วยพฤกษชาติ วัตถุธาตุ และสัตว์วัตถุนานาชาติ. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อำพลพิทยา, 2507 : หน้า 171.
12. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคสอง) ว่าด้วยพฤกษชาติ วัตถุธาตุ และสัตว์วัตถุนานาชาติ. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อำพลพิทยา, 2510 : หน้า 72-3, 325.
13. วีรานุวัฒน์ ว. ชูปัญญา ก. เคมีคลินิก. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร, 2525 : หน้า 286-92.

Chronic toxicity study of *Portulaca grandiflora* Hook

Pranee Chavalittumrong, Songphol Chivapat**

Aimmanas Attawish , Jaree Bansiddhi**

Songphol Phadungpat , Banchong Chaorai* , Raywadee Butraporn***

* Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand

** National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, Thailand

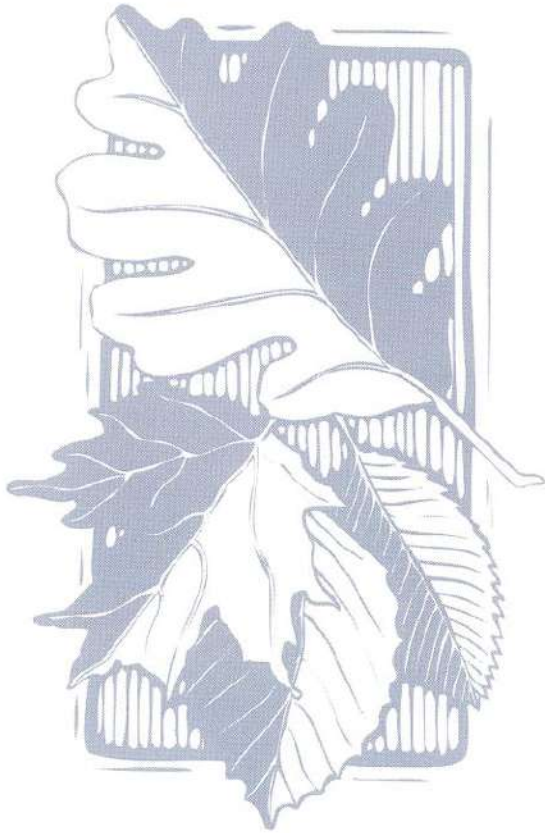
ABSTRACT

We investigated the toxic effects of *Portulaca grandiflora* aqueous extract given to male and female Wistar rats for 6 months. The rats were divided into five groups of each sex that were control groups, three experimental groups and recovery groups. The control groups received 5 ml of distilled water/kg per day. The experimental groups were orally given the water extract of *Portulaca grandiflora* at doses of 10, 100 and 1000 mg/kg per day. The recovery groups received 1000 mg/kg per day for 6 months and were continued husbandry without giving the extract for further 14 days. Changes in the body weights, actual and relative organ weights were not significantly demonstrated in all groups throughout the study. No significant alteration in hematological, biochemical and histopathological parameters was observed in all female groups given the extract. It was found that any significant changes in hematological and biochemical parameters in the male rats at the doses of 100 and 1000 mg/kg per day were not dose-related. In addition, no histopathological lesions were observed in the male animals. Our results suggested that the water extract of *Portulaca grandiflora* at the doses given in the study did not induce any detrimental effects in the rats.

Keywords : *Portulaca grandiflora* ; Toxicity

Journal of Ethnopharmacology 90(2004) 375-380.

ดรรชนี



INDEX

ดรรชนีชื่อไทย

กวาวเครือขาว *(Pueraria mirifica Airy Shaw et* Suvatabandhu) 175
กวาวเครือแดง *(Butea superba* Roxb.) 215
ขิง *(Zingiber officinale* Roscoe) 33
ขี้เหล็ก *(Cassia siamea* Lam.) 245
ดายขัด *(Malvastrum coromandelianum (L.)* Garcke) 117
ดีปลี *(Piper retrofractum* Vahl) 33
เถาวัลย์เปรียง *(Derris scandens* Benth) 129
บอระเพ็ด *(Tinospora crispa Mier ex Hook F. &* Thoms) 67
พริกไทย *(Piper nigrum* L.) 33
เพชรสังฆาต *(Cissus quadrangularis* Linn.) 231
มะขามป้อม *(Phyllanthus emblica* L.) 7
โมกหลวง *(Holarrhena antidysenterica Wall.)* 99
เล็บมือนาง *(Quisqualis indica* Linn.) 85
สมอไทย *(Terminalia chebula* Retz.) 7
สมอพิเภก *(Terminalia bellirica* Gaertn.) 7
หมากดิบน้ำค้าง *(Hedyotis biflora (Linn.)* Lamk.) 55

ดรรชนีชื่อวิทยาศาสตร์

Butea superba Roxb. (กวาวเครือแดง) 215
Cassia siamea Lam. (ขี้เหล็ก) 245
Cissus quadrangularis Linn. (เพชรสังฆาต) 231
Derris scandens Benth (เถาวัลย์เปรียง) 129
Hedyotis biflora (Linn.) Lamk. (หมากดิบน้ำค้าง) 55
Holarrhena antidysenterica Wall. (โมกหลวง) 99
Malvastrum coromandelianum (L.) Garcke (ดายขัด) 117
Phyllanthus emblica L. (มะขามป้อม) 7
Piper nigrum L. (พริกไทย) 33
Piper retrofractum Vahl (ดีปลี) 33
Pueraria mirifica Airy Shaw et Suvatabandhu (กวาวเครือขาว) 175
Quisqualis indica Linn. (เล็บมือนาง) 85
Terminalia bellirica Gaertn. (สมอพิเภก) 7
Terminalia chebula Retz. (สมอไทย) 7
Tinospora crispa Mier ex Hook F. & Thoms (บอระเพ็ด) 67
Zingiber officinale Roscoe (ขิง) 33

บันทึก

www.dmsc.moph.go.th