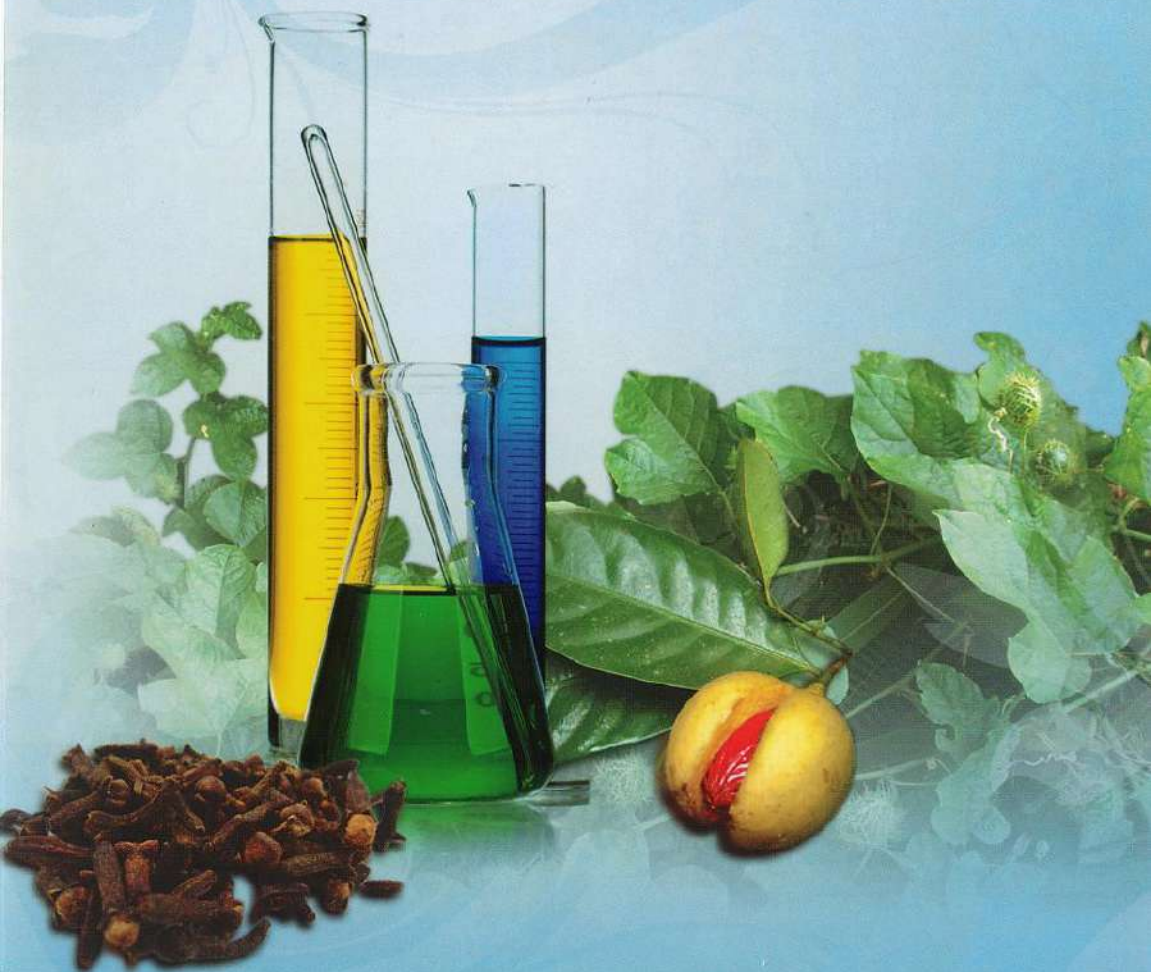


ประมวลผลงานวิจัยด้าน

พืชวิทยาศาสตร์

ของสถาบันวิจัยสมุนไพร เล่ม ๓



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข



ประมวลผลงานวิจัยด้าน

พิษวิทยา

ของสถาบันวิจัยสมุนไพร เล่ม ๓



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข

ISBN : 978-616-111-552-4

ประมวลผลงานวิจัยด้านพิษวิทยาของสถาบันวิจัยสมุนไพร เล่ม ๓

ที่ปรึกษา	นายแพทย์บุญชัย สมบูรณ์สุข นายแพทย์ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ นางนลินภัทร์ ศักดิ์ดียสุนทร	อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพร
คณะบรรณาธิการ	ทรงพล ชีวะพัฒน์ กุลชญา ไชยราช พรชัย ลินเจริญโกโคย พราว ศุภจริยาวัตร ฐตินภา นุ่มใส	
พิสูจน์อักษร	พรชัย ลินเจริญโกโคย พราว ศุภจริยาวัตร ศรายุธ ระดาพงษ์ กิตติคุณ ไชยสาร	
ถ่ายภาพ	ทรงพล ชีวะพัฒน์ ฐตินภา นุ่มใส	เฉลิมพล สุวรรณภักดี ศักดิ์วิชัย ย่อนทอง
ประสานการจัดพิมพ์	กุลชญา ไชยราช	ฐตินภา นุ่มใส
พิมพ์ครั้งที่ 1	พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๖	จำนวน ๕๐๐ เล่ม
พิมพ์ที่	โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ	
ออกแบบ	บริษัท 1241 มิราคูลิส จำกัด โทรศัพท์ ๐๒ ๙๕๘ ๙๑๒๘	
ISBN	978-616-111-552-4	
เจ้าของลิขสิทธิ์	สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี โทร. ๐๒ ๙๕๑ ๐๔๙๐	

คำนำ

สมุนไพรเป็นผลผลิตจากธรรมชาติที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้ประโยชน์มาตั้งแต่โบราณ ในปัจจุบันสมุนไพรจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ต่างประเทศกำลังหาทางลงทุนและคัดเลือกสมุนไพรไทยไปสกัดด้วยยาเพื่อรักษาโรค เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศและสิ่งแวดล้อมทำให้เกิดโรคระบาดที่ทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น จนเกิดปัญหาการดื้อยาตามมา อีกทั้งโรคบางชนิดในปัจจุบันยังไม่มียาแผนปัจจุบันที่มีสรรพคุณในการรักษาให้หายขาดได้ สมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการดูแลรักษาสุขภาพ และรัฐบาลได้มีนโยบายพัฒนาธุรกิจผลิตภัณฑ์สุขภาพและสมุนไพรไทยให้ได้คุณภาพตามมาตรฐานสากล ดังนั้นการนำสมุนไพรไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ นั้น จำเป็นต้องมีการวิจัยแบบสหสาขาวิชาเพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนการใช้ของแพทย์และผู้บริโภคอย่างมั่นใจในคุณภาพและความปลอดภัย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีการศึกษาด้านพิษวิทยาและความปลอดภัยของทั้งสมุนไพรเดี่ยวและยาตำรับ โดยมีรายงานผลการวิจัยด้านพิษวิทยาของสมุนไพรอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการหลายฉบับและเพื่อเป็นการรวบรวมผลงานดังกล่าวให้เป็นรูปเล่ม จึงได้รวบรวมนิพนธ์ต้นฉบับการศึกษาด้านพิษวิทยาของสมุนไพรที่ดำเนินการโดยสถาบันวิจัยสมุนไพรจำนวน 19 เรื่อง จัดพิมพ์เป็นหนังสือ “ประมวลผลงานวิจัยด้านพิษวิทยาของสถาบันวิจัยสมุนไพร เล่ม 3” เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้อ้างอิง

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์หวังว่า ผลงานวิจัยในหนังสือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปพิจารณา ร่วมกับข้อมูลด้านอื่น ๆ ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีคุณภาพได้มาตรฐานต่อไป



(นายแพทย์บุญชัย สมบูรณ์สุข)

อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

กันยายน ๒๕๕๕

คำขอบคุณ

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขอขอบคุณบรรณาธิการวารสารการแพทย์แผนไทย และการแพทย์ทางเลือก เวชศาสตร์ลัตวแพทย์ วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ วารสารเภสัชวิทยา Fitoterapia ไทยเภสัชสาร International Journal of Applied Research in Natural Products และ Proceedings of the 3rd Symposium on the Family Zingiberaceae ที่อนุญาตให้นำนิพนธ์ต้นฉบับ ซึ่งได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการนั้น ๆ เพื่อนำมารวบรวมและพิมพ์เผยแพร่ใหม่อีกครั้งเพื่อความสะดวกในการสืบค้นข้อมูล การทดสอบความปลอดภัยในการอ้างอิง

ขอขอบคุณ นางณัฐตรา จันทร์สุวานิชย์ ที่ให้การสนับสนุน และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ให้ ความร่วมมือเป็นอย่างดีในการจัดพิมพ์และตรวจต้นฉบับหนังสือเล่มนี้

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

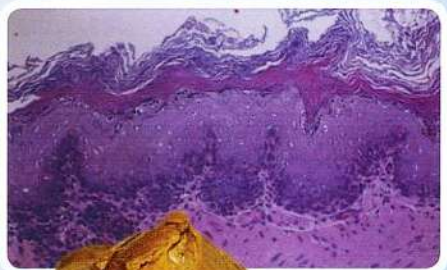
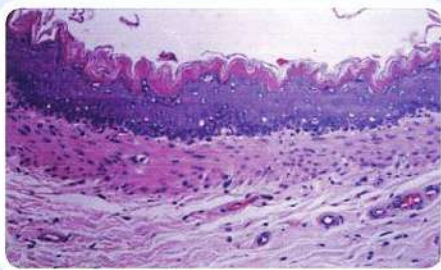
บทนำ	1
SUBCHRONIC TOXICITY OF WAN CHAK MOTLUK (<i>CURCUMA COMOSA ROXB.</i>) EXTRACT	7
RESEARCHARTICLES Chronic Toxicity of <i>Pueraria mirifica</i> in Rats	25
การศึกษาความเป็นพิษของสารลูปินิโพลินจากลำต้นชะเอมเหนือ	43
Chronic Toxicity of <i>Thunbergia laurifolia</i> Lindl. Extract	55
Acute and sub - chronic toxicity studies of a standardized extract of <i>Centella asiatica</i> ECa 233	65
Chronic Toxicity Study of <i>Garcinia mangostana</i> Linn. Pericarp Extract	77
PATHOLOGICAL STUDY ON THE CHRONIC TOXICITY OF THAI TRADITIONAL MEDICINE: YA-RID-SI-DUANG-MAHAKAL	
การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดยาหอมแนวโกฐ	97
Chronic toxicity of <i>Gynostemma pentaphyllum</i>	113



สารบัญ

การศึกษาความเป็นพิษของสมุนไพรบัวบก Toxicity study of <i>Centella asiatica</i> (L.) Urban	127
การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของผงกระชายดำ Acute and Chronic Toxicity Study of <i>Kaempferia parviflora</i> Wall ex. Bak Powder	141
รายงานการศึกษาพิษเฉียบพลันและ กิ่งเฉียบพลัน ของสารสกัดเมล็ดค้ำแสดในสัตว์ทดลอง	153
พิษเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖	165
การศึกษาพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ	181
Acute and Chronic Toxicity of <i>Moringa oleifera</i> Linn Leaves Extracts	193
Chronic Toxicity Study of <i>Kaempferia parviflora</i> Wall ex. Extract	203
Chronic toxicity study of <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poitlin rats	215
Chronic toxicity of <i>Passiflora foetida</i> L. extract	225
Acute and Subchronic Toxicity Study of <i>Ardisia elliptica</i> Thunb.Fruit Extract	237





ว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.)



บัวบก (*Centella asiatica*)



มังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.)



200 —

100 —

ปีญจชันท์ (*Gynostemma pentaphyllum*)



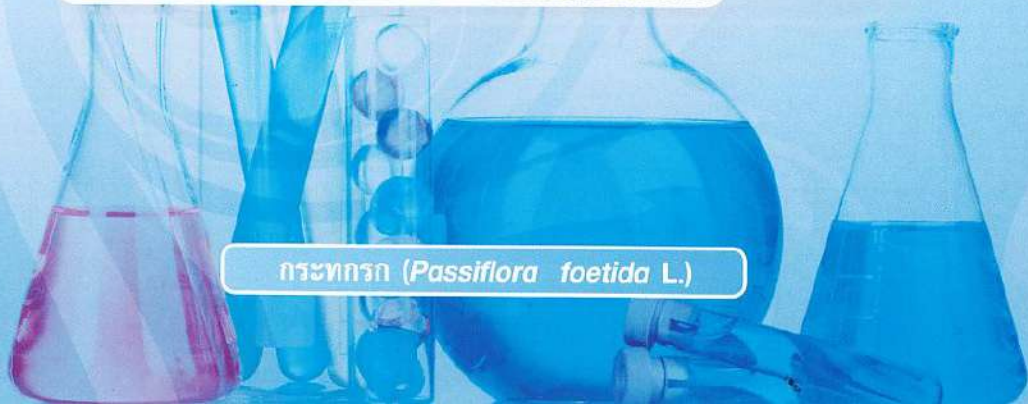
กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall)

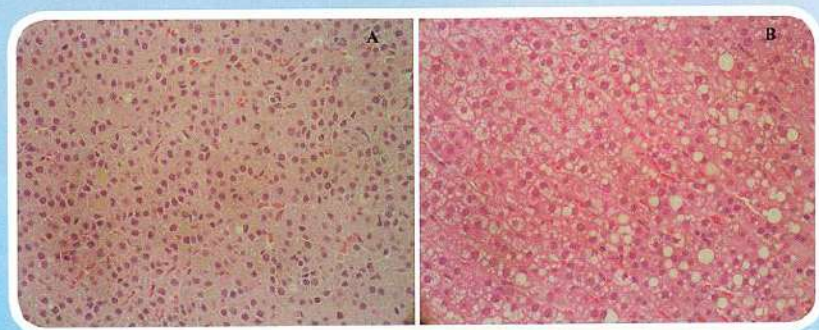
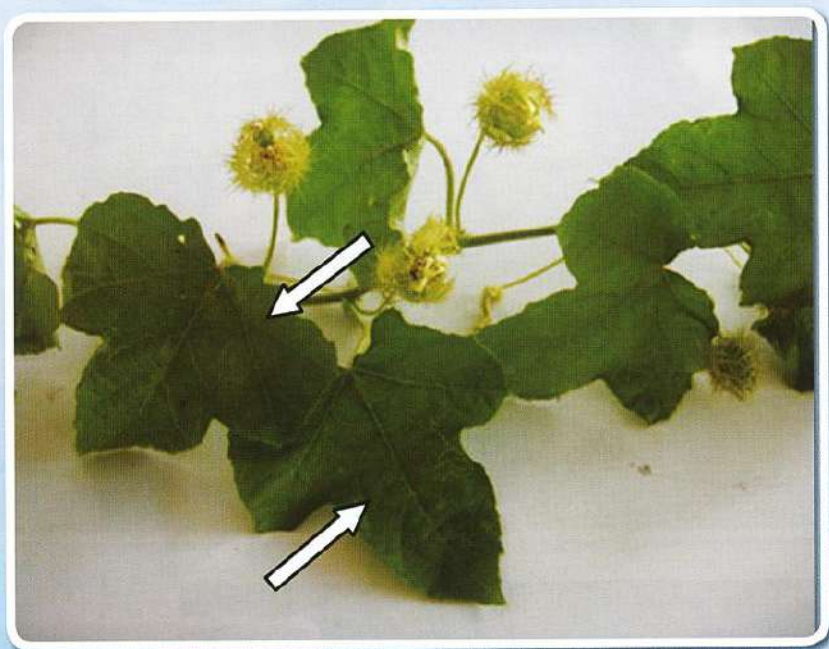


แมงลักคา (*Hyptis suaveolens* (L.)



กระพุด (*Passiflora foetida* L.)





กระพรวก (*Passiflora foetida* L.)





บทนำ

บทนำ

ทรงพล ชีวะพัฒน์
พรชัย สิ้นเจริญโกโดย

การศึกษาวิจัยทางพิษวิทยาของสมุนไพรหรือสารสกัดสมุนไพรที่ดำเนินการโดยสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์นั้น ใช้หลักเกณฑ์เช่นเดียวกับการวิจัยทดสอบพิษของยาใหม่ที่ได้จากการสังเคราะห์ (synthetic drugs) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะทราบถึงความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาสมุนไพรในระยะเวลายาวนาน หรือเพื่อตรวจหาความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นภายหลังจากการใช้ยาเป็นเวลานานต่อเนื่อง หรือพิษที่อาจเกิดขึ้นภายหลังจากการหยุดใช้ยาสมุนไพร

อาการพิษเฉียบพลัน หมายถึง การที่มนุษย์หรือสัตว์เกิดอาการพิษแสดงออกมาให้เห็นหลังจากที่ได้รับสารพิษเข้าไปครั้งเดียวหรือหลายครั้งภายในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้น การศึกษาพิษเฉียบพลันของยาหรือสมุนไพรในสัตว์ทดลองนั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อดูอาการพิษที่แสดงออกเมื่อสัตว์ทดลองได้รับสมุนไพรหรือสารที่ทดสอบจำนวน 1 ครั้งหรือมากกว่า ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง รูปแบบของยาสมุนไพรที่ให้แก่สัตว์ทดลองนั้นก็จะเตรียมให้ใกล้เคียงกับรูปแบบที่คนรับประทานมากที่สุด เช่น ถ้ารับประทานด้วยการดองเหล้าก็จะสกัดด้วยแอลกอฮอล์แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกให้หมด แต่ในบางกรณีเป็นยาตำรับที่มีส่วนผสมของสมุนไพรหลายชนิด ซึ่งไม่อาจนำมาป้อนให้แก่หนูทดลองได้ เพราะมีปริมาณมาก อาจต้องนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายก่อนแล้วจึงให้สิ่งสกัดแทนยาตำรับ สัตว์ทดลองที่นำมาใช้ทดสอบมีอย่างน้อย 2 ชนิด คือ พากสัตว์ฟันแทะ (Rodent) เช่น หนูถีบจักร (Mice) และหนูแรท (Rats) เป็นต้น ส่วนอีกชนิดหนึ่งเป็นพวก non-rodent

การทดสอบพิษเฉียบพลันในหนูนั้นจะใช้หนูถีบจักรกลุ่มละ 5 ตัวต่อเพศ โดยจัดกลุ่มให้เพียงพอที่จะหาขนาดที่ทำให้สัตว์ตายครั้งหนึ่ง โดยการให้ยาหรือสารสกัดสมุนไพรเริ่มต้นด้วยขนาดที่เป็นมิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัวที่ต่างกันตาม \log_{10} เช่น 0.1, 0.01, 0.001 ฯลฯ มิลลิกรัม/กิโลกรัมของน้ำหนักตัว โดยให้รวมขนาดที่นำเป็นค่า LD_{50} อยู่ด้วย 1 ขนาด ภายหลังจากให้ยาต้องเฝ้าสังเกตอาการพิษต่าง ๆ เป็นช่วงระยะเวลา โดยติดตามดูจนครบ 7 วัน หรือ 14 วัน จากนั้นค่าของขนาดยาและจำนวนหนูที่ตายมาคำนวณค่า LD_{50} ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีความยากง่ายต่อการทำความเข้าใจต่างกัน วิธีหนึ่งที่ค่อนข้างง่ายคือ การใช้ Probit/ log Transforms and Regression และหนูที่ตายระหว่างการทดลองหรืออยู่รอดจนครบกำหนดจะต้องถูกผ่าซากชันสูตรเพื่อหาความผิดปกติของอวัยวะภายใน ถ้าพบการเปลี่ยนแปลงที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าก็ควรที่จะมีการตรวจหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาเพิ่มเติมซึ่งจะทำให้ทราบถึงอวัยวะเป้าหมายของการเกิดพิษได้

ในการศึกษาพิษระยะยาว (Long-term toxicity test) ของยาสมุนไพรนั้น ระยะเวลาที่ให้ยาแก่สัตว์ทดลองขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการใช้ยาทางคลินิก เช่น คนรับประทานยาเป็นเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 4 สัปดาห์ ก็ต้องดำเนินการทดลองให้ยาแก่สัตว์ทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์จนถึง 3 เดือน ถ้าใช้ยานาน 1 เดือนจนถึง 6 เดือน ต้องทดลองในสัตว์นาน 3 ถึง 6 เดือน เป็นต้น ซึ่งเกณฑ์ของระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาพิษนี้ก็ยิ่งแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ

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

ขั้นตอนดำเนินการศึกษาพิษระยะยาวของสถาบันวิจัยสมุนไพร

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ศึกษาความเป็นพิษของสมุนไพรระยะยาวตามแนวทางของ WHO guideline ซึ่งเป็นวิธีการมาตรฐานของการศึกษาทางพิษวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการประเมินความปลอดภัยของสมุนไพร เพื่อเป็นข้อมูลก่อนนำไปทดลองทางคลินิกและคุ้มครองผู้บริโภค ซึ่งขั้นตอนการศึกษาพิษระยะยาวโดยสรุปมีดังนี้

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

2. การสังเกตอาการและการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ (Observations and examinations) ได้แก่

2.1 อาการทั่วไป น้ำหนักตัวและน้ำหนักอาหารที่สัตว์ทดลองกิน

2.2 การตรวจค่าทางโลหิตวิทยา ในหนูทดลองมักเก็บตัวอย่างเลือดก่อนการผ่าชันสูตร สิ่งที่ต้องตรวจวัด เช่น ฮีมาโตคริต ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง ปริมาณเกล็ดเลือด จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดและแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว เป็นต้น

2.3 การตรวจค่าเคมีในเลือด เพื่อดูค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น การทำงานของตับ และไต ในสัตว์ฟันแทะอาจทำการตรวจวิเคราะห์น้ำปัสสาวะ (Urinalysis) ร่วมด้วยโดยการตรวจปัสสาวะก่อนให้ยาและในระหว่างให้ยา สิ่งที่ต้องตรวจวัด เช่น ปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียม โปแตสเซียม ความเข้มข้นของกลูโคสในเลือด ยูเรียไนโตรเจน บิลิรูบิน โคลเลสเตอรอล อัลบูมิน และโปรตีนทั้งหมด เป็นต้น

3. การผ่าซากชันสูตรเมื่อครบกำหนดของการบริหารยา สัตว์ทดลองที่อยู่รอดจนครบกำหนดต้องนำมาผ่าซาก เพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macroscopic lesions) ซึ่งนำหนักอวัยวะภายใน และนำอวัยวะภายในมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathological study)

4. การตรวจหาอื่น ๆ เช่น การตรวจตา ตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ (อาจกระทำได้ตามความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการ) เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาพิษระยะยาวในสัตว์ทดลอง ได้แก่ พิษกึ่งเรื้อรัง (subchronic toxicity) หมายถึง การที่มนุษย์หรือสัตว์แสดงอาการให้เห็นในลักษณะต่าง ๆ หลังจากได้รับสารพิษปริมาณน้อยติดต่อกันเป็นระยะเวลาสั้น 1-3 เดือน หรือได้รับสารพิษเข้าไปไม่มากกว่าร้อยละ 10 ของช่วงชีวิตในสัตว์ทดลอง และพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity) หมายถึง การที่มนุษย์หรือสัตว์แสดงอาการให้เห็นในลักษณะต่าง ๆ หลังจากได้รับสารพิษปริมาณน้อยติดต่อกันเป็นเวลามากกว่า 3 เดือน หรืออาจได้รับสารพิษมากกว่าร้อยละ 10 ของช่วงชีวิตในสัตว์ทดลอง ส่วนใหญ่แล้วการได้รับสารพิษเข้าไปแบบเรื้อรังนั้น อาจเกิดโดยการกินหรือสูดดม เข้าไปเป็นระยะเวลานาน ๆ จนเกิดอาการพิษแสดงออกมา การเกิดพิษมักจะเกิดแบบเรื้อรังและอาจเกิดได้หลายแบบ ได้แก่ การเกิดมะเร็งที่อวัยวะภายในร่างกาย (Carcinogenicity) การก่อกลายพันธุ์หรือผ่าเหล่าของเซลล์ (Mutagenicity) การผิดปกติในอวัยวะของเด็กที่เกิดออกมาหรือการเกิดลูกวิรูป (Teratogenicity) และการผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกัน (Immunotoxicity) ซึ่งการศึกษาพิษระยะยาวในสัตว์ทดลองจะนำไปสู่การประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของ

คน (Human risk assessment) โดยทำให้ทราบถึงขนาดของยาหรือสารที่ไม่ทำให้เกิดผลอันไม่พึงปรารถนาที่พบจากการทดลอง หรือหมายถึงขนาดสูงสุดของยาที่ให้แล้วไม่ทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เรียกว่า NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect-Level)

ค่า NOAEL จะมีประโยชน์ในการใช้คำนวณ (Extrapolation) หาขนาดของยาที่เหมาะสมต่อคน ซึ่งเรียกเป็นคำรวม ๆ ว่า Human limit values (HLV)

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
- ความเป็นไปได้ในการเกิดการเสริมฤทธิ์ของสารเคมีต่าง ๆ หลายชนิดที่มีอยู่ในอาหาร

องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกายังได้กำหนดให้หารเพิ่มด้วยตัวเลข 10 (additional factor) เมื่อต้องประเมินค่าของ ADI จากข้อมูลการทดสอบพิษระยะสั้น (short-term toxicity data) นอกจากวิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีการหารค่า 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 เพราะการใช้ยานานกว่านี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะในเนื่องจากอายุที่เพิ่มขึ้น (Age-related disease) เกิดขึ้นด้วย ทำให้มีปัญหาเกี่ยวกับการแปลผลการศึกษาความผิดปกติของเซลล์อวัยวะภายในที่ตรวจพบนั้นว่าเกิดจากความเป็นพิษของตัวยาหรือเนื่องจากอายุที่เพิ่มขึ้น เช่น มะเร็งหรือเนื้องอกบางอย่างจะมีอุบัติการณ์สูงขึ้นในหนูที่อายุมาก

ดังนั้นในระยะหลังงานวิจัยพิษเรื้อรังของสมุนไพรในหนูแรทของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จึงใช้ระยะเวลาการให้ยานาน 6 เดือน ส่วนรายงานการวิจัยความเป็นพิษของสมุนไพรที่ใช้ระยะเวลาศึกษา 6 เดือนโดยกล่าวว่าเป็นการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังนั้น ตามมาตรฐาน ICH guideline อาจถือว่าเป็นการศึกษาพิษเรื้อรังได้

การดำเนินการศึกษาวิจัยที่ใช้สัตว์ทดลองของสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปัจจุบัน พิษสมุนไพรที่นำมาวิจัยต้องมีการตรวจเพื่อจัดจำแนกระบุชื่อทางวิทยาศาสตร์ตามหลักอนุกรมวิธานพืช สารสกัดที่ได้จากวัตถุดิบพืชสมุนไพรต้องมีการตรวจหาปริมาณสารสำคัญ และข้อเสนอโครงการวิจัยจะต้องได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อให้เป็นไปตามหลักสากล

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

การดูแลสัตว์ที่ทำการทดลองจะต้องคำนึงถึงด้านสิ่งแวดล้อมทางกายภาพ (Physical Environment) ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ, ความชื้น, ก๊าซ, อนุภาคอากาศ, สภาพห้อง, อาหาร และสิ่งแวดล้อมภายนอกซึ่งเชื่อมกันโดยการถ่ายเทอากาศ เพราะว่าสิ่งแวดล้อมต่างๆ สามารถทำให้เกิดการ metabolism และเกิดโรคต่างๆ ได้ ภาชนะหรือกรงที่ใช้จะต้องเหมาะสมสำหรับความต้องการสรีระพื้นฐาน และพฤติกรรม เช่น การซึบคาย, การควบคุมอุณหภูมิของร่างกาย, การเคลื่อนไหวตามปกติ และการปรับตัวทางสังคมของสัตว์ จะต้องให้สัตว์สะอาด มีการถ่ายเทของอากาศ มีความปลอดภัยไม่มีอันตราย ไม่มีสิ่งมีคมที่อาจเกิดอันตราย มีอาหารและน้ำที่สะอาดเพียงพอ สามารถสังเกตอาการต่างๆ ได้โดยไม่รบกวนสัตว์

ในสัตว์ฟันแทะ (หนู) ที่ทำการทดลองจะบุพื้นกรงซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และในการทดลองของสถาบันวิจัยได้จัดสภาพแวดล้อม พื้นกรง อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ การถ่ายเทอากาศ แสงสว่าง อาหารที่กิน น้ำเสียง การสังเกตอาการจะไม่รบกวนสัตว์ และห้องของสัตว์ทดลองแยกส่วนจากที่ทำงานของคนโดยปฏิบัติตามข้อกำหนดที่กล่าว

มาตรฐานสมุนไพรไทยและการควบคุมคุณภาพ

การนำสมุนไพรมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคทั้งแผนปัจจุบันและแผนโบราณหรือเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพนั้นจะต้องคำนึงถึงคุณภาพมาตรฐานของวัตถุดิบ เนื่องจากยาสมุนไพรบางชนิดมีราคาสูง ขาดแคลน และคุณภาพไม่ดีพอ มีการปลอมปน ขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์และไม่มีมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพสมุนไพร ทำให้ยาสมุนไพรที่ใช้ในการแพทย์ยังไม่เป็นที่ยอมรับในการบำบัดรักษาโรค การควบคุมคุณภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในการผลิตผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร เพื่อใช้เป็นการประเมินคุณค่าว่าเป็นผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรถูกต้องตามต้องการและมีคุณภาพสม่ำเสมอ ดังนั้นการสร้างมาตรฐานสมุนไพรรองรับจะทำให้ผู้บริโภคมั่นใจในการใช้ผลิตภัณฑ์สมุนไพรมากขึ้นและเป็นการยกระดับคุณภาพสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้มีมาตรฐานในระดับสากล

การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพรและผลิตภัณฑ์สมุนไพร

ในการควบคุมคุณภาพต้องเริ่มจากวัตถุดิบสมุนไพรที่จะนำมาผลิตเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ เพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีคุณภาพดี มีปริมาณสารสำคัญมากพอที่จะมีประสิทธิภาพในการรักษาโรค รวมทั้งต้องไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรก จุลินทรีย์ และสารเคมีต่าง ๆ ซึ่งอาจต้องใช้วิธีการหลายวิธีร่วมกันแล้วแต่ความเหมาะสมวิธีการทั่วไปที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่

1. การตรวจเอกลักษณ์

การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้องจะสัมพันธ์กับความปลอดภัยของยาสมุนไพร ในการตรวจเอกลักษณ์จะใช้การตรวจทางเลขนัย (macroscopical และ microscopical) ประกอบกับการตรวจสอบด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้ปฏิกิริยาสีและ/หรือวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (หรือรณรงค์เลขคิวบาง, Thin Layer Chromatography, TLC) ในการตรวจเอกลักษณ์สมุนไพรที่เป็นพืชจะให้ความสำคัญกับผลการตรวจทางเลขนัยมากกว่าผลการตรวจทางเคมี

2. การตรวจสอบหาความบริสุทธิ์

ถึงแม้ว่าสมุนไพรจะเป็นยาที่มีแหล่งกำเนิดตามธรรมชาติ และไม่ได้ผ่านกระบวนการผลิตที่สลับซับซ้อน เช่น สารเคมีที่ใช้เป็นยาก็ตาม แต่ในปัจจุบันพบว่ามีการใช้ยูนีเคมีรวมถึงยามาแมลงในการเพาะปลูกพืชสมุนไพรจำหน่ายกันมากขึ้น ดังนั้น การทดสอบที่นอกเหนือไปจากวิธีการตรวจเอกลักษณ์จะมี ดังนี้

2.1 การทดสอบสารเจือปน (impurities) หรือสารปลอมปน (adulterants) ตลอดจนสารปนเปื้อน (contaminants)

2.2 การตรวจหาปริมาณเก่า เป็นการทดสอบวิธีหนึ่งในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของยาสมุนไพรว่ามีสารเจือปนหรือมีการปลอมปนสารอื่น ๆ มาในตัวยานั้นหรือไม่

2.3 การตรวจหาปริมาณสารสกัดในตัวทำละลายที่กำหนด ใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงความปลอดภัยโดยวัดปริมาณขององค์ประกอบบางกลุ่มที่มีอยู่ในสมุนไพรโดยประมาณ

2.4 การตรวจหาหน้าที่หายไปจากการทำให้แห้งและการหาปริมาณน้ำ/ความชื้น

2.5 การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และสารพิษตกค้าง

โดยธรรมชาติจากการที่สมุนไพรมีสารอาหารสะสมอยู่มากและสามารถดูดความชื้นเข้าไปได้ จึงมักพบเชื้อจุลินทรีย์เจริญอยู่ในวัตถุดิบสมุนไพร จุลินทรีย์ที่พบอาจเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่กับพืชวัตถุดิบเองหรืออาจเกิดจากการปนเปื้อนภายหลัง อาจเกิดขึ้นในกระบวนการเก็บเกี่ยวหรือการขนส่งได้ โดยเชื้อจุลินทรีย์เหล่านั้นติดมาจากดิน มนุษย์และมูลสัตว์ ซึ่งการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในยาสมุนไพรอาจนำมาสู่การเกิดโรคได้ถ้าไม่มีมาตรฐานกำหนดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในสมุนไพรที่เป็นวัตถุดิบ

สำหรับสารพิษตกค้างซึ่งอาจมาจากโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับสิ่งแวดล้อมหรือเกิดจากสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดศัตรูพืชในระหว่างการเพาะปลูก ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ จึงมีการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนสารพิษซึ่งเป็นมาตรฐานเดียวกับที่ใช้ในประชาคมยุโรป

3. การตรวจหาปริมาณสารสำคัญ

เมื่อควบคุมคุณภาพโดยทำการตรวจเอกลักษณ์และความบริสุทธิ์แล้ว จะนำสมุนไพรนั้นมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญซึ่งจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งโดยธรรมชาติของยาสมุนไพรนั้นจะประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดในปริมาณที่ต่างกันและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารดังกล่าว อาจจะแตกต่างกันไปโดยการเสริมฤทธิ์หรือต้านฤทธิ์กันในบางโอกาส จึงเป็นการยากที่จะสรุปว่าสารใดในตัวยานั้นที่เป็นส่วนประกอบหลัก แต่ในกรณีที่มีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับสารสำคัญที่เป็นส่วนประกอบหลักนั้น จะกำหนดเป็นปริมาณขั้นต่ำของสารสำคัญที่ควรมีในวัตถุดิบนั้น

เมื่อได้วัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพจะผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร เช่น ยาลูกกลอน ยาเม็ด ยาน้ำ ยาแคปซูล ยาขี้ผึ้ง เป็นต้น ซึ่งแต่ละรูปแบบของผลิตภัณฑ์สมุนไพรจะมีรายละเอียดการควบคุมคุณภาพที่แตกต่างกันเล็กน้อย เช่น ยารับประทานรูปแบบยาน้ำที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนผสม ควรตรวจปริมาณและชนิดของแอลกอฮอล์ด้วย แต่โดยปกติแล้วรายละเอียดวิธีการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพร มีดังนี้

1. การตรวจสอบลักษณะภายนอก เป็นการตรวจสอบรูปร่าง สี กลิ่น และอื่น ๆ
2. การตรวจหาปริมาณสารสำคัญ ซึ่งจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของผลิตภัณฑ์นั้น วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญทำเช่นเดียวกับการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร
3. การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ใช้เกณฑ์มาตรฐานกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ตามกระบวนการผลิตของเภสัชตำรับไทย (Thai Pharmacopoeia)

SUBCHRONIC TOXICITY OF WAN CHAK MOTLUK (*CURCUMA COMOSA* ROXB.) EXTRACT

Songpol Chivapat¹, Angkana Hirunsaree¹, Nuchatra Junsuwanitch¹, Songpol Padungpat¹,
Anuthep Rangsripat², Somchit Niumsukul¹ and Suphan Charuchongkolwongse¹

¹ Institute of Medicinal Plants Research, Department of Medical Sciences, Thailand.

² Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Thailand.

ABSTRACT

Extract of Wan chak motluk (*Curcuma comosa* Roxb.) rhizome has been demonstrated to effectively stimulate bile secretion and reduce plasma triglyceride and cholesterol in experimental animals. The present study was undertaken to evaluate the toxicity of Wan chak motluk by intragastric administration of an ethanolic extract containing 2.05% of phloracetophenone (the choleric active substance) in six groups of Wistar rats for 90 consecutive days. The experimental groups were given the extract at doses of 100, 200, 400 and 800 mg/kg/day respectively while two control groups received distilled water and solvent vehicles respectively. The extract did not affect growth and food consumption of the rats. Decreases of hematocrit and hemoglobin in male rats receiving the highest dose of the extract were still within the normal range. Male rats treated with 800 mg/kg and female rats receiving 400 and 800 mg/kg of extract had a significant increase of alkaline phosphatase level. Increases in stomach weight and size were observed in male rats receiving the extract at a dose of 100 mg/kg or more and in females at a dose of 200 mg/kg and more. Histopathological examination of visceral organs revealed no abnormality related to the extract except hyperplasia and hyperkeratosis of the gastric epithelium, the effects of which were dose-dependent. Therefore, if the extract was putatively applied for bile secretion and plasma lipid reduction, the pathological effects on the stomach should be of concern.

INTRODUCTION

Curcuma comosa Roxb., a plant belonging to Zingiberaceae family, is locally known in Thai as Wan chak motluk (Smitinand, 2001). Thai traditional practitioners have used its rhizome for the alleviation of post partum uterine pain, enhancement of uterine involution and for reducing inflammation of the uterus after delivery. It has been employed to relief pain in scrotal sac herniation (Association of the school of Thai Traditional Medicine, 1973).

On the basis of local use, hexane extracts from the rhizome have been demonstrated to possess uterotrophic effects and estrogenic activity (Piyachaturawat, et al., 1995). Ethanolic extracts from the rhizome markedly reduced uterine contraction induced by oxytocin and some agents (Sawasdipanich, 1994). In addition to these effects, another interesting biological effect of *Curcuma comosa* rhizome is its choleric activity. Ethyl acetate extract of the rhizome prepared following a n-hexane

and ethanol extraction has been reported to stimulate bile secretion with increased biliary cholesterol secretion leading to a decrease in plasma cholesterol in normal rats (Piyachaturawat et al., 1996). The active compound isolated from the ethyl acetate extract was identified to be phloracetophenone glucoside (Suksamran et al., 1997). Phloracetophenone, the aglycone part of the glucoside, has been proven to be responsible for the choleric activity: it increases bile flow rate and biliary secretion of bile acid but decreases bile lithogenic index (Piyachaturawat et al., 1998). Recently, ethyl acetate extract has been shown to effectively reduce plasma triglycerides and cholesterol in diet-induced hypercholesterolaemic hamster (Piyachaturawat, et al., 1999).

Based on these choleric and hypolipidaemic effects, *Curcuma comosa* rhizome extract containing phloracetophenone seems to have potential for hypolipidaemic and choleric drug development. However, the dose-repeated toxicity of the crude extract of this plant has never been reported. Therefore, in this study we aimed to evaluate the subchronic toxicity of ethanolic extract of *Curcuma comosa* rhizome in Wistar rats, to obtain basic toxicological information necessary for further toxicological experiments in other species, which may result in the development of hypolipidemic and choleric drugs for human use.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Fresh rhizomes of Wan chak motluk (*Curcuma comosa*) were collected from a plantation in Nakorn Pathom Province, Thailand in November 2000. Identification of the plant was

carried out by referring to appropriate literature (Backer and van den Brink, 1963; Baker, 1894; Schumann, 1903). Voucher material (Department of Medical Sciences Herbarium No.1464) is lodged at the Department of Medical Sciences Herbarium.

Preparation of the extract

Air-dried, sliced rhizomes of *Curcuma comosa* (35 kg) were ground to a coarse powder. Pulverized rhizome (2 kg) was successively extracted with n-hexane and ethanol in a Soxhlet apparatus. The ethanolic extract was filtered and evaporated to dryness under vacuum. The *Curcuma comosa* extract (118.10 g) was obtained with 5.91% yield in the presence of 2.05% phloracetophenone.

Experimental animals

180 Wistar rats (90 male and 90 female) weighing 180-200 g each were purchased from The National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Salaya, Thailand. The animals were housed at the Laboratory Animal Center, National Institute of Health, Department of Medical Sciences at a temperature at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60% humidity and 12 hours-light-dark cycle. They were given commercially pelleted diets and the water was given freely. Prior to the experiment, they were randomly divided into six groups of 15 animals/sex.

Subchronic toxicity study

A 90-day subchronic toxicity of the *Curcuma comosa* extract was conducted on six groups of rats. Groups 1 and 2 were water and solvent control groups intragastrically receiving distilled water and 10% DMSO in corn oil (solvent of the extract) at 5 ml/kg/day respectively. Groups 3 - 6 were intragastrically administered with the extract at doses of 100,

200, 400 and 800 mg/kg/day respectively for 90 consecutive days. During the period of the experiment, body weight and food consumption were recorded weekly and the rats were closely observed for signs of abnormalities. At the end of the 90-day treatment period, the animals were fasted for 18 hours, then anaesthetised with ethyl ether and blood samples collected from post vena cava for analyzing hematological and serum clinical chemistry values. These were carried out using an automatic hematological analyser (Cell Dyn 3500 Abbot® and automatic chemistry analyser (Hitachi 912) respectively. Hematological parameters determined were % hematocrit, haemoglobin, red blood cells (RBC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), total leukocyte (WBC), % neutrophil, % eosinophil, % lymphocyte, % monocyte, % basophil, and platelet counts. Clinical chemistry values measured were alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein, albumin, globulin, total bilirubin, BUN, creatinine, glucose, uric acid, triglycerides, total cholesterol, sodium, potassium and chloride.

Necropsy was performed to examine gross pathological lesions of various internal organs. Brain, heart, lung, stomach, liver, kidney, spleen, bladder, ovary and uterus in the female rats, testis in the male, and adrenal glands were weighed and determined in % relative organ weight (g/100g body weight). As well as the above - mentioned organs, the trachea, oesophagus, pancreas, intestine, seminal vesicles, thyroid gland, lacrimal, salivary and mammary glands, were then preserved in 10% buffered

formalin solution and subsequently prepared for histopathological study.

Statistical analysis

The data were expressed as means \pm SD. The values obtained from different groups were statistically analysed by using one way ANOVA and multiple comparisons with the Scheffe test at <0.05 . Histopathological results was expressed as the incidence of lesions and statistically analysed by using Fishers Exact Test at $P < 0.05$.

RESULTS

Identification of the plant

From our identification, the plant belongs to the family Zingiberaceae and the botanical name is *Curcuma comosa* as shown in Fig. 1.

Effects of the extract on body weight and food consumption

Throughout the period of the experiment, body weight and food consumption of male and female rats receiving doses of the extract did not statistically differ from those of their solvent control groups as shown in Figs. 2 and 3. However, the solvent control and the extract-treated groups consumed significantly less food consumption than the water control groups ($p < 0.05$).

Effects of the extract on hematological values

Male rats receiving 800 mg/kg extract showed significant decreases of hematocrit, RBC and hemoglobin when compared with those of the solvent control ($p < 0.05$) group. Female rats receiving the equal dose had no significant differences of these parameters when compared with their solvent control. MCV and MCH of female rats receiving the extract at a

dose of 200 mg/kg were significantly decreased from those of their solvent control ($p < 0.05$). Female rats receiving the highest dose extract had significantly increased platelet number when compared with the solvent control group ($p < 0.05$). All haematological values are summarized in Table 1 and 2.

Effects of the extract on clinical chemistry values

ALP levels were significantly increased in male rats receiving the 800 mg/kg extract and in female rats receiving the extract at the doses of 400 and 800 mg/kg when compared with their solvent control group ($p < 0.05$). ALT level in male rats treated with the highest dose extract was significantly higher than that of their solvent control ($p < 0.05$). Total protein level in female rats receiving the highest dose extract was significantly increased from that of the solvent control ($p < 0.05$). Albumin levels in male rats receiving the highest dose extract and in female groups receiving 400 mg/kg and the highest dose extract were significantly higher than those of the solvent control groups ($p < 0.05$). Triglyceride levels were significantly decreased in male rats treated with 400 mg/kg extract and in female rats treated with 200 and 400 mg/kg extract when compared with those of their solvent control ($p < 0.05$). Clinical chemistry values are summarized in Table 3 and 4.

Effects of the extract on visceral organs

At necropsy, the enlargement of stomach with a large, yellowish-white area at the cardia was prominent with rats receiving 400 and 800mg/kg extract, while these changes did not occur in the water and solvent control groups or in the mucosa. No unusual gross lesions

was found in other organs. Male rats receiving the highest dose of extract had significantly higher brain and heart relative weights than their solvent control groups ($p < 0.05$). Stomach relative weights were statistically higher in male rats receiving each dose of the extract and in female at the doses of 200 mg/kg on ward when compared with those of their solvent controls ($p < 0.05$). Liver relative weights in both male and female rats receiving the extract at the doses of 400 and 800mg/kg were significantly increased when compared with their water and solvent controls ($p < 0.05$). Right kidney relative weights of male rats receiving 400 and 800 mg/kg and of female rats receiving 800 mg/kg extract were significantly higher than those of their solvent controls ($p < 0.05$). Male rats receiving the highest dose extract had significantly increased left adrenal glands when compared with the solvent control ($p < 0.05$). Relative organ weights were shown in Table 5 and 6.

Effects of the extract on histopathological alteration

The incidence of liver fatty degeneration in male rats receiving 200 mg/kg extract onward were significantly decreased when compared with their solvent control ($p < 0.05$). The solvent control and extract-treated groups had submucosal oedema in their stomachs and, in the females, half of the solvent control had these lesions ($p < 0.05$) while these did not occur in the water control groups. The incidence of submucosal oedema decreased significantly in the 400 and 800 mg/kg extract-treated female rats when compared with that of their solvent control group ($p < 0.05$). The incidence of mast cell and eosinophil infiltration at the stomach of male rats treated with 200 mg/kg extract was

significantly higher than that of their solvent control ($p < 0.05$). Male and female rats receiving 200 mg/kg or higher extracts had significantly higher incidence of hyperplasia and hyperkeratosis of the gastric epithelium when compared with the solvent control ($p < 0.05$). The severity of these lesion was dose-dependent as shown in Figure 4. In addition, catarrhal gastritis was observed in few rats receiving the highest dose. The organs with histopathological changes are shown in Table 7 and 8.

DISCUSSION

The present subchronic toxicity study showed that *Curcuma comosa* extract did not suppress growth and food consumption in Wistar rats. The highest dose extract may slightly affect haematopoiesis leading to the reduction of RBC, hemoglobin and hematocrit. However, these hematological values were still within the normal range (Gad, 1992). The higher values of WBC was found in female rats receiving the highest dose extract while this did not occur in male rats receiving the same dose and in this study, the control group had lower WBC numbers than the normal range. Therefore we could not conclude that this phenomenon was due to the extract effect. The significantly increased average platelet number in male and female rats receiving the highest dose extract may be related to gastritis found in a few rats of this group. The significant increase of ALP levels in male rats receiving 800 mg/kg and female rats receiving 400 mg/kg or higher extracts may be mainly attributed to the compressive effect at the hepatic bile duct caused by stomach enlargement due to hyperplasia of the epithelium, which resulted in cholestasis.

The significantly higher ALP level in the solvent control male rats when compared to the water control suggested that DMSO in the solvent vehicle may possibly enhance this alteration. This assumption was supported by the report demonstrating that DMSO, when given transhepatically in piglet, caused a mild degree of gall bladder and bile duct injury (Chen et al., 1995) and this may result in the increase of ALP. The ALT in male rats receiving the highest dose was statistically higher than the solvent control group; nevertheless it did not significantly differ from the water control. Moreover, liver tissue in this group did not show any histopathological abnormalities. Taken together, we may conclude that the extract produce no hepatotoxic effects. The significantly higher albumin levels in male rats receiving the highest dose extract and female rats receiving 400 and 800 mg/kg extracts, including total protein in the highest dose-treated female rats, did not represent any abnormalities and they were still within normal range (Gad, 1992). The reduction of triglyceride levels in male rats receiving extract at the doses of 400 mg/kg and in female at the doses of 200 and 400 mg/kg may contribute to the extract since it was found that the ethylacetate extract prepared from ethanolic extract could effectively lower plasma triglyceride and cholesterol in hypercholesterolaemic hamsters (Piyachaturawat et al., 1999). In the present study, the extract-treated rats did not show any reduction of cholesterol levels in spite of the presence of phloracetophenone in the extract; moreover male rats receiving the highest dose had the higher cholesterol levels than their control groups. This may be attributed to the differences in the chemical

constituents between ethanolic and ethylacetate extract. The ethanolic extract may contain some compounds that can suppress or antagonize the effect of phloracetophenone in reducing plasma cholesterol.

Submucosal edema may not be induced by the extract because its incidence did not increase in a dose-dependent manner. The possible cause of this change may contribute to the solvent vehicle since the lesion did not occur in both male and female water controls. Furthermore, the higher incidence in the female solvent control backed up this assumption. The significant incidence of hyperplasia and hyperkeratosis of gastric epithelium including the dose-dependent severity in rats receiving

200 mg/kg or higher extract suggested that the extract may be the major cause of these changes. With regard to other organs, the extract did not increase any serious pathological lesions in a dose-response relationship, therefore the stomach may possibly be the target organ of toxicity.

In conclusion, the present toxicity study revealed that *C. comosa* ethanolic extract containing 2.05% phloracetophenone increased the ALP levels and caused hyperplasia and hypertrophy of gastric epithelium. Hence, if the extract is used for hypolipidaemic effects, it should be formulated in enteric-coated tablets and further toxicological investigations in others animal model should be undertaken.

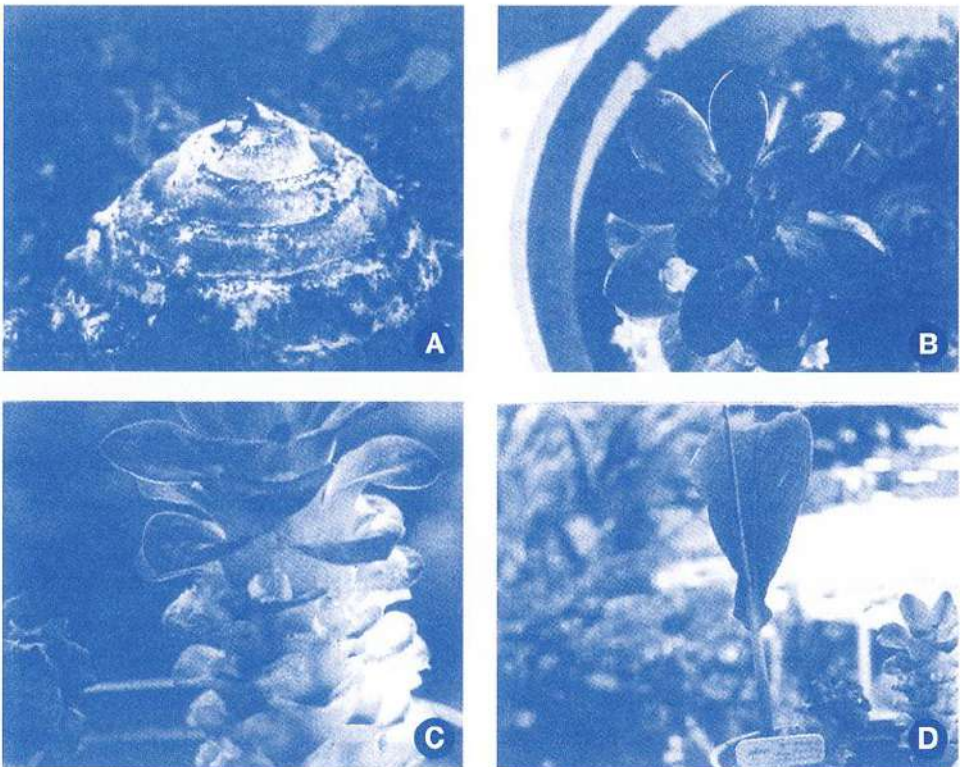


Fig.1 *Curcuma comosa* Roxb. A. Rhizome; B. Rosea coma; C. Inflorescence; D. Young leaf and inflorescence.

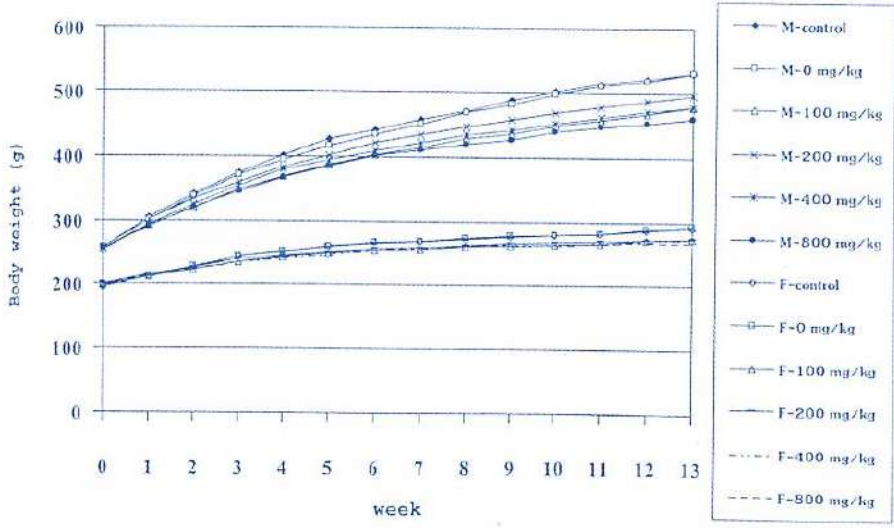


Fig.2 Average body weight of rats treated with *Curcuma comosa* extract for 90 days

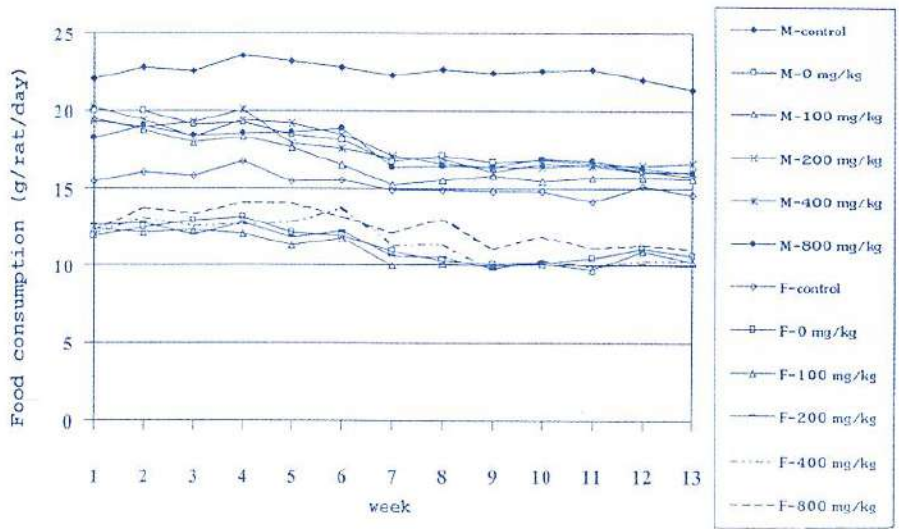


Fig. 3 Food consumption of male (M) and female (F) rats treated with *Curcuma comosa* extract for 90 days

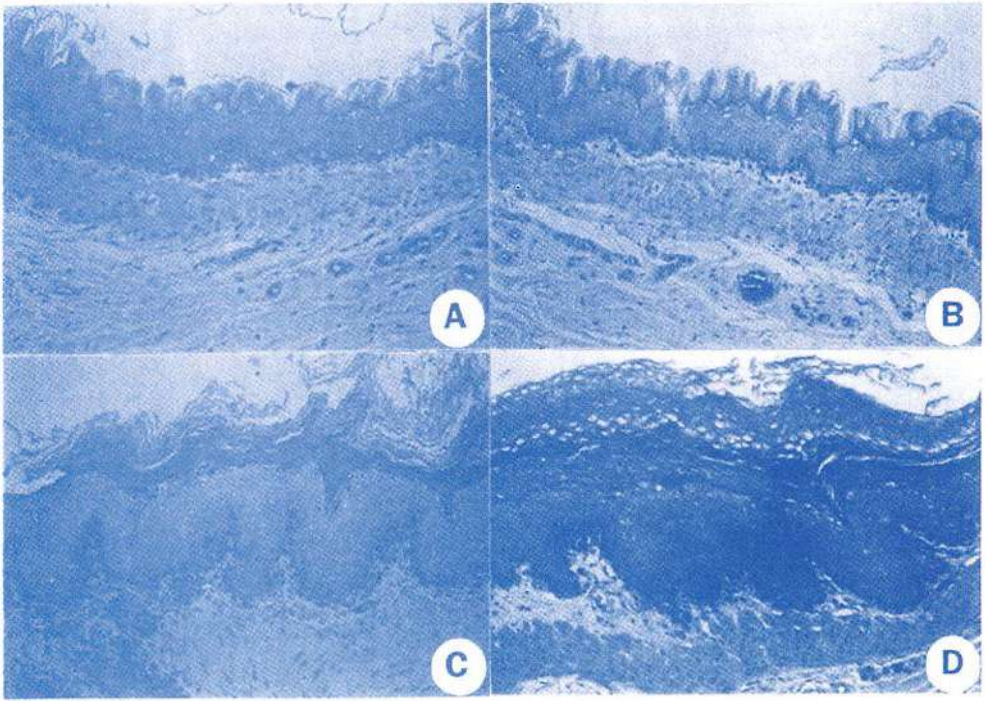


Fig 4 Histopathological effects of *Curcuma comosa* Roxb. Extract on the stomach of Wistar rats (H&Ex200).A. normal gastric epithelium in The water control group; B. normal gastric Epithelium in the solvent control group :C, D and E, illustration of hyperkeratosis and Hyperplasia of gastric epithelium in the Groups receiving 200,400 and 800 mg/kg of extract respectively.



Table 1 Haematological values of male rats treated with *Curcuma comosa* Roxb. extract for 90 days

Parameters	Water control (n=15)	Doses of the extract (mg/kg/day)				
		0 (n=15)	100 (n=15)	200 (n=15)	400 (n=14)	800 (n=13)
Hematocrit (%)	49.18 ± 1.79	49.83 ± 1.95	48.07 ± 2.06	48.27 ± 2.22	48.59 ± 2.46	46.57 ± 3.06**
RBC (K/ μ L)	9.04 ± 0.33	9.05 ± 0.32	8.86 ± 0.45	8.74 ± 0.42	8.59 ± 0.54	8.38 ± 0.75*,**
Hb (g/dl)	16.08 ± 0.41	16.16 ± 0.49	15.73 ± 0.59	15.76 ± 0.64	15.83 ± 0.78	15.14 ± 0.89*,**
MCV (m3)	54.42 ± 1.91	55.08 ± 2.07	54.33 ± 1.70	55.27 ± 1.60	56.62 ± 1.45*	55.71 ± 2.09
MCH (pg)	17.82 ± 0.60	17.86 ± 0.62	17.77 ± 0.58	18.04 ± 0.53	18.45 ± 0.61	18.13 ± 0.69
MCHC (%)	32.74 ± 0.70	32.43 ± 0.41	32.73 ± 0.55	32.68 ± 0.52	32.58 ± 0.57	32.53 ± 0.60
WBC (K/ μ L)	4.31 ± 1.01	4.08 ± 1.46	4.02 ± 1.32	3.91 ± 0.83	4.20 ± 1.00	4.19 ± 1.35
Neutrophil (%)	16.11 ± 4.55	15.89 ± 3.74	16.49 ± 4.53	18.69 ± 4.86	15.25 ± 4.01	21.88 ± 15.77
Eosinophil (%)	1.31 ± 0.36	1.05 ± 0.31	0.96 ± 0.36	0.94 ± 0.40	0.90 ± 0.38	0.96 ± 1.02
Lymphocyte (%)	72.05 ± 6.01	69.84 ± 7.32	73.62 ± 6.19	70.08 ± 7.01	73.80 ± 5.88	67.44 ± 16.61
Monocyte (%)	7.31 ± 1.94	8.37 ± 3.49	5.83 ± 2.31	6.65 ± 2.87	6.25 ± 2.63	6.24 ± 3.47
Basophil (%)	3.23 ± 1.38	4.85 ± 2.36	3.11 ± 1.04	3.65 ± 1.41	3.80 ± 1.56	3.73 ± 1.38
Platelet (K/L)	965.93 ± 107.63	1030.43 ± 135.80	1033.10 ± 64.22	1006.43 ± 116.88	1076.46 ± 96.19	1138.46 ± 107.24*

The values are expressed as mean ± SD

* Significantly different from the water control group (P<0.05)

** Significantly different from the solvent control group(P<0.05)

Table 2 Haematological values of female rats treated with *Curcuma comosa* Roxb. extract for 90 days

Parameters	Water control (n=15)	Doses of the extract (mg/kg/day)				
		0 (n=15)	100 (n=15)	200 (n=15)	400 (n=14)	800 (n=13)
Hematocrit (%)	49.59 ± 2.46	48.03 ± 3.22	47.14 ± 1.70	7.91 ± 2.56	47.99 ± 1.84	46.07 ± 2.44*
RBC (K/ μ L)	8.52 ± 0.44	8.15 ± 0.51	8.19 ± 0.37	8.41 ± 0.47	8.42 ± 0.42	8.04 ± 0.44
Hb (g/dl)	16.22 ± 0.77	15.63 ± 1 1.01	15.32 ± 0.57*	15.48 ± 0.82	15.57 ± 0.61	14.97 ± 0.63*
MCV (m3)	58.23 ± 1.58	58.93 ± 1.71	57.57 ± 1.87	57.01 ± 1.37 **	57.02 ± 1.68	57.301 ± 1.75
MCH (pg)	19.05 ± 0.58	19.17 ± 0.56	18.71 ± 0.71	18.43 ± 0.63 **	18.50 ± 0.64	18.631 ± 0.54
MCHC (%)	32.73 ± 0.42	32.53 ± 0.27	32.50 ± 0.41	32.32 ± 0.63	32.45 ± 0.41	32.51 ± 0.55
WBC (K/ μ L)	2.29 ± 0.55	2.65 ± 0.50	2.57 ± 0.63	2.59 ± 0.78	3.12 ± 0.84	3.731 ± 1.14**
Neutrophil (%)	16.83 ± 5.43	13.32 ± 3.52	14.48 ± 5.02	13.43 ± 7.00	12.29 ± 3.57	16.99 ± 7.85
Eosinophil (%)	1.22 ± 0.36	1.01 ± 0.41	1.39 1.61	1.02 ± 0.50	0.82 ± 0.27 *	0.761 ± 0.31 *
Lymphocyte (%)	70.04 ± 5.66	75.14 ± 7.25	76.70 ± 5.14 *	76.44 ± 9.46	79.73 ± 5.05 *	74.08 ± 18.82
Monocyte (%)	9.30 ± 3.79	7.62 ± 4.52	5.54 ± 2.06 *	6.31 ± 3.84	4.55 ± 1.97*	5.11 ± 2.71 *
Basophil (%)	2.61 ± 0.70	2.91 ± 1.51	1.99 ± 0.57	2.79 ± 1.30	2.61 ± 0.75	3.08 ± 1.52
Platelet (K/L)	990.20 ± 119.90	973.57 ± 82.03	913.97 ± 271.30	994.77 ± 113.77	1068.71 ± 140.31	1108.83 ± 67.27**

The values are expressed as mean ± SD

* Significantly different from the water control group (P<0.05)

** Significantly different from the solvent control group(P<0.05)

Table 3 Clinical chemistry values of male rats treated with *Curcuma comosa* Roxb extract for 90 days

Parameters	Water control (n=15)	Doses of the extract (mg/kg/day)				
		0 (n=15)	100 (n=15)	200 (n=15)	400 (n=14)	800 (n=13)
ALP (U/L)	58.13 ± 7.33	76.00 ± 14.84*	88.66 ± 20.54*	89.93 ± 19.86*	92.71 ± 18.89*	116.84 ± 42.59**,**
ALT (U/L)	31.87 ± 7.59	30.27 ± 5.52	35.47 ± 12.59	34.33 ± 5.25	34.78 ± 9.09	43.92 ± 12.96**,**
AST (U/L)	85.67 ± 9.32	75.20 ± 8.09	83.13 ± 15.10	83.86 ± 14.30	76.71 ± 5.55	82.69 ± 22.03
Total protein (g%)	6.71 ± 0.25	6.52 ± 0.28	6.33 ± 0.25*	6.48 ± 0.19	6.45 ± 0.26	6.59 ± 0.30
Albumin (g%)	4.14 ± 0.11	4.24 ± 0.14	4.27 ± 0.14	4.35 ± 0.1*	4.39 ± 0.19*	4.48 ± 0.16**,**
Globulin (g%)	2.57 ± 0.26	2.28 ± 0.18*	2.06 ± 0.19*	2.13 ± 0.18*	2.06 ± 0.17*	2.11 ± 0.25*
Bilirubin (mg/dl)	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.06 ± 0.247	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.03
BUN (mg%)	20.33 ± 2.27	15.16 ± 1.66*	15.95 ± 1.73*	16.04 ± 2.21 *	16.70 ± 2.27*	15.98 ± 2.25*
Creatinine (mg%)	0.71 ± 0.07	0.69 ± 0.07	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.05	0.68 ± 0.06	0.68 ± 0.05
Glucose (mg/dl)	160.29 ± 20.83	180.94 ± 36.51	165.02 ± 35.14	166.54 ± 27.03	195.16 ± 41.07	176.48 ± 45.17
Uric acid (mg/dl)	2.11 ± 1.10	3.20 ± 1.57	2.66 ± 1.55	2.79 ± 1.59	3.29 ± 1.64	2.91 ± 1.49
Triglyceride (mg/dl)	77.92 ± 30.98	66.78 ± 31.48	44.51 ± 6.84*	44.24 ± 13.84*	36.14 ± 15.64**,**	40.43 ± 17.96*
Cholesterol (mg/dl)	63.87 ± 14.43	63.88 ± 13.12	59.10 ± 11.85	61.55 ± 10.01	68.02 ± 8.50	89.25 ± 18.70**,**
Na ⁺ (mmol/l)	43.93 ± 1.75	144.73 ± 1.58	145.40 ± 2.44	145.73 ± 2.05	145.93 ± 1.27	145.92 ± 1.65
K ⁺ (mmol/l)	6.16 ± 1.35	6.46 ± 0.99	6.13 ± 1.64	6.31 ± 1.72	6.38 ± 1.26	6.14 ± 1.33
Cl ⁻ (mmol/l)	105.87 ± 2.09	06.00 ± 2.56	106.67 ± 1.88	107.60 ± 1.40	107.50 ± 2.14	106.92 ± 2.36

The values are expressed as mean ± SD

* Significantly different from the water control group (P<0.05)

** Significantly different from the solvent control group(P<0.05)

Table 4 Clinical chemistry values of female rats treated with *Curcuma comosa* Roxb extract for 90 days

Parameters	Water control (n=15)	Doses of the extract (mg/kg/day)				
		0 (n=15)	100 (n=15)	200 (n=15)	400 (n=14)	800 (n=13)
ALP (U/L)	29.20 ± 5.53	34.28 ± 7.34	39.13 ± 5.69	39.53 ± 19.86	50.57 ± 15.87**	54.80 ± 9.29**
ALT (U/L)	26.27 ± 4.37	27.43 ± 7.02	30.87 ± 10.07	28.53 ± 8.01	27.86 ± 9.34	27.07 ± 7.64
AST (U/L)	84.67 ± 12.52	77.79 ± 14.40	80.33 ± 10.15	78.60 ± 11.17	72.00 ± 8.12	66.60 ± 9.56*
Total protein (g%)	6.80 ± 10.33	6.60 ± 0.24	6.73 ± 0.31	6.81 ± 0.24	6.98 ± 0.36	7.22 ± 0.39**
Albumin (g%)	4.71 ± 0.29	4.66 ± 0.19	4.73 ± 0.25	4.85 ± 0.27	5.03 ± 0.24**	5.21 ± 0.31**
Globulin (g%)	2.09 ± 0.14	1.94 ± 0.16	2.00 ± 0.15	1.96 ± 0.17	1.95 ± 0.17	2.01 ± 0.17
Bilirubin (mg/dl)	0.14 ± 0.04	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.03
BUN (mg%)	23.39 ± 2.09	19.78 ± 3.32	21.49 ± 3.34	24.49 ± 6.08	24.67 ± 5.34	25.51 ± 6.80
Creatinine (mg%)	0.71 ± 0.07	0.69 ± 0.07	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.05	0.68 ± 0.06	0.68 ± 0.05
Glucose (mg/dl)	119.88 ± 26.06	128.66 ± 24.89	132.78 ± 25.37	134.39 ± 29.04	136.61 ± 24.04	134.13 ± 15.95
Uric acid (mg/dl)	1.95 ± 1.26	2.09 ± 1.18	1.56 ± 0.83	4.11 ± 8.08	1.94 ± 0.87	1.94 ± 0.67
Triglyceride (mg/dl)	42.38 ± 11.43	47.67 ± 12.90	38.31 ± 10.80	33.83 ± 5.76**	34.46 ± 7.21**	36.57 ± 10.75
Cholesterol (mg/dl)	59.66 ± 13.22	61.89 ± 14.42	52.00 ± 12.13	56.70 ± 15.05	68.02 ± 8.50	67.46 ± 17.16
Na ⁺ (mmol/l)	144.93 ± 1.67	144.64 ± 1.74	145.20 ± 2.04	145.80 ± 1.74	145.43 ± 1.40	145.27 ± 1.79
K ⁺ (mmol/l)	5.53 ± 1.95	5.51 ± 1.66	4.93 ± 1.04	4.95 ± 1.26	5.13 ± 1.43	5.25 ± 1.35
Cl ⁻ (mmol/l)	108.47 ± 1.77	108.93 ± 2.13	109.53 ± 2.39	109.33 ± 2.29	109.36 ± 1.82	109.33 ± 2.44

The values are expressed as mean ± SD

* Significantly different from the water control group (P<0.05)

** Significantly different from the solvent control group (P<0.05)

Table 5 % Relative organ weights of male rats treated with *Curcuma comosa* extract for 90 days

Parameters	Water control (n=15)	Doses of the extract (mg/kg/day)				
		0 (n=15)	100 (n=15)	200 (n=15)	400 (n=14)	800 (n=13)
Brain	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.42 ± 0.04	0.44 ± 0.04	0.46 ± 0.02***
Heart	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02**
Lung	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.35 ± 0.10	0.38 ± 0.12
Stomach	0.39 ± 0.04	0.40 ± 0.05	0.49 ± 0.05***	0.50 ± 0.09***	0.64 ± 0.08***	0.86 ± 0.08***
Liver	2.59 ± 0.15	2.65 ± 0.20	2.75 ± 0.30	2.86 ± 0.17*	3.19 ± 0.19***	3.65 ± 0.23***
Right kidney	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.02***	0.30 ± 0.02***
Left kidney	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.27 ± 0.03	0.27 ± 0.07
Bladder	0.031 ± 0.006	0.024 ± 0.005	0.028 ± 0.007	0.029 ± 0.008	0.026 ± 0.004	0.028 ± 0.009
Spleen	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02
Right adrenal	0.007 ± 0.001	0.01 ± 0.02	0.007 ± 0.002	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.006
Left adrenal	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001
Right testis	0.57 ± 0.05	0.57 ± 0.07	0.57 ± 0.07	0.64 ± 0.08	0.62 ± 0.08	0.63 ± 0.05
Left testis	0.57 ± 0.04	0.57 ± 0.06	0.59 ± 0.08	0.59 ± 0.10	0.61 ± 0.08	0.63 ± 0.05

The values are expressed as mean ± SD

* Significantly different from the water control group (P<0.05)

** Significantly different from the solvent control group (P<0.05)

Table 6 % Relative organ weights of female rats treated with *Curcuma comosa* extract for 90 days

Parameters	Water control (n=15)	Doses of the extract (mg/kg/day)				
		0 (n=15)	100 (n=15)	200 (n=15)	400 (n=14)	800 (n=13)
Brain	0.70 ± 0.07	0.66 ± 0.06	0.71 ± 0.06	0.72 ± 0.04	0.72 ± 0.07	0.72 ± 0.06
Heart	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.34 ± 0.09	0.31 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.03
Lung	0.43 ± 0.03	0.44 ± 0.09	0.42 ± 0.04	0.45 ± 0.08	0.44 ± 0.03	0.46 ± 0.05
Stomach	0.54 ± 0.07	0.58 ± 0.08	0.64 ± 0.06*	0.69 ± 0.07**,**	0.89 ± 0.14**,**	1.02 ± 0.11**,**
Liver	2.52 ± 0.23	2.60 ± 0.25	2.71 ± 0.22	2.89 ± 0.39*	3.35 ± 0.33**,**	3.92 ± 0.28**,**
Right kidney	0.28 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.03*
Left kidney	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.07	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Bladder	0.029 ± 0.004	0.027 ± 0.005	0.027 ± 0.004	0.029 ± 0.006	0.031 ± 0.005	0.032 ± 0.004
Spleen	0.25 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.21 ± 0.06
Right adrenal	0.015 ± 0.002	0.014 ± 0.003	0.013 ± 0.002	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.003	0.016 ± 0.002
Left adrenal	0.017 ± 0.002	0.014 ± 0.003	0.015 ± 0.003	0.016 ± 0.002	0.017 ± 0.002	0.018 ± 0.003**
Uterus	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.07	0.23 ± 0.06	0.29 ± 0.08	0.29 ± 0.10	0.24 ± 0.08
Right ovary	0.023 ± 0.006	0.022 ± 0.007	0.023 ± 0.004	0.026 ± 0.004	0.023 ± 0.007	0.023 ± 0.007
Left ovary	0.025 ± 0.005	0.025 ± 0.009	0.024 ± 0.005	0.024 ± 0.007	0.025 ± 0.006	0.023 ± 0.007

The values are expressed as mean ± SD

* Significantly different from the water control group (P<0.05)

** Significantly different from the solvent control group (P<0.05)

Table 7 Histopathological results of male rats treated with *Curcuma comosa* Roxb. extract for 90 days

Organs	Microscopic findings	Doses of the extract (mg/kg/day)					
		Control	0	100	200	400	800
Lung	Lymphoid proliferated peribronchioles	8/15	4/15	4/15	5/15	2/14*	2/15*
Heart	Focal myocardiosis	2/15	3/15	2/15	5/15	1/14	0/15
	Mast cell infiltration at perimyocardium	0/15	1/15	1/15	0/15	0/14	0/15
Liver	Panlobular fatty degeneration	0/15	1/15	0/15	0/15	0/14	0/15
	Centrilobular fatty degeneration	1/15	5/15	1/15	0/15*	0/14**	0/15**
Kidney	Multifocal regenerative	0/15	0/15	0/15	0/15	2/14	0/15
Stomach	Submucosal edema	0/15	3/15	6/15*	5/15*	2/14	3/15
	Mast cell and eosinophil infiltration	0/15	3/15	4/15	10/15**	2/14	0/15
	Hyperplasia of epithelium	0/15	0/15	0/15	5/15***	14/14***	15/15***
	Hyperkeratosis of epithelium	0/15	0/15	0/15	9/15***	14/14***	15/15***
Small Intestine	Submucosal lymphoid aggregation	1/15	1/15	2/15	1/15	0/15	0/15
Adrenal gland	Cortical fatty degeneration	5/15	7/15	5/15	5/15	4/14	7/14

The results are expressed as number of rats with pathological lesions/total number of rats

* significantly different when compared with the control group(P<0.05)

** significantly different when compared with the solvent control group (P<0.05)

Table 8 Histopathological results of female rats treated with *Curcuma comosa* Roxb. extract for 90 days

Organs	Microscopic findings	Doses of the extract (mg/kg/day)					
		Control	0	100	200	400	800
Lung	Lymphoid proliferated peribronchioles	4/15	3/14	1/15	4/15	1/15	2/15
Liver	Panlobular fattydegeneration	NF	NF	NF	NF	NF	NF
	Centriobular fatty degeneration	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Kidney	Tubular cast	0/15	0/14	0/15	3/15	2/15	0/15
	Submucosal edema	0/15	7/14*	4/15*	3/15	2/15**	1/15**
Stomach	Mast cell and eosinophil infiltration	0/15	3/14	3/15	1/15	0/14	0/15
	Hyperplasia of epithelium	0/15	0/14	0/15	15/15**	15/15**	15/15**
Small intestine	Hyperkeratosis of epithelium	0/15	0/14	0/15	9/15**	14/14**	15/15**
	Submucosal lymphoid aggregation	1/15	0/14	1/15	1/15	0/14	0/15
Mammary gland	Glandular hyperplasia	0/15	1/14	0/15	3/15	3/15	0/15

The results are expressed as number of rats with pathological lesions/total number of rats

* significantly different when compared with the control group(P<0.05)

** significantly different when compared with the solvent control group (P<0.05)

NF = not found

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to express gratitude to Professor Dr. Puangpen Siriruksa, Faculty of Science, Prince of Songkhla University and Associate Professor Dr. Pranom Chantaranonthai Faculty of Science, Khon Kaen University for their valuable suggestions on identifying plants. Special thanks to Dr. Pawinee Piyachaturawat, Faculty of Science, Mahidol University for supplying the rhizomes of Wan chak motluk. We also thank Dr. Apichart Suksamran for his advice on preparation of the extract and Mr. Chalernpol Suwanphakdee for his technical assistance in this work. Last but not least, special thanks to the Nursery Staff of the Botanical Section, Institute of Medicinal Plant Research for growing Wan chak motluk.

REFERENCES

- Association of the school of Thai Traditional Medicine. 1973. **Wat Prachetupon Pramuan Suppakun Ya Thai**. Part III, Umpolvitaya Printing, Bangkok.
- Backer, C.A. & van den Brink, R. C. B. 1963. **Flora of Java**. Vol.1, Groningen, NVP Noordhoff.
- Baker, J.G. 1894. *Curcuma Linn*. In: Hooker, J.D. (ed.), *Flora of British India* vol VI. L. Reeve Co Ltd., India.
- Chen, C. Y., Chang, K. K., Chow, N. E.L., Leow, T.C., Chou, T. C. & Lin, X. Z. 1995. Toxic effects of cholelitholytic solvents on gallbladder and liver. A piglet model study. **Digestive Diseases and Science** 40(2): 419-26.
- Gad, S. C. 1992. The Rat: Pathology. In: Gad, S. C. & Chengelis, C. P. (eds.), *Animal model in toxicology*, Marcel Dekker, New York, USA.
- Piyachaturawat, P., Ercharupom, S. & Suksamran, A. 1995. Uterotrophic effect of *Curcuma comosa* in rats. **International Journal of Pharmacology** 33 : 334-38.
- Piyachaturawat, P., Gansar, R. & Suksamran, A. 1996. Choleric effect of *Curcuma comosa* rhizome extracts in rats. **International Journal of Pharmacology** 34(3): 174-178.
- Piyachaturawat, P., Suwanampai, P., Komaratat, P., Chuncharunee, A. & Suksamran, A. 1998. Effect of phloracetophenone on bile flow and biliary lipids in rats. **Hepatology Research** 12: 198-206.
- Piyachaturawat, P., Charoenpiboonsin, J., Toskulkao, C. & Suksamran, A. 1999. Reduction of plasmacholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolaemic hamsters. **Journal of Ethnopharmacology** 66: 199-204.
- Sawasdiapanich, A. 1994. **Effects of ethanol extract from *Curcuma comosa* on the contraction of intact and isolated rat uterus**. MS. Thesis (Pharmacology) Chulalongkorn University.
- Schumann, K. 1903. Zingiberaceae. In: Engler, A. (ed.), *Pflanzenreich* 4: 46. Berlin, Germany.
- Smitinand, T. 2001. **Thai plant names**. Revised edition. Prachachon Co., Ltd. Bangkok.
- Suksamran, A., Eiamong, S., Piyachaturawat, P. & Byrnes, L.T. 1997. A phloracetophenone glucoside with choleric activity from *Curcuma comosa*. **Phytochemistry** 145(1): 103-105.

RESEARCHARTICLES

Chronic Toxicity of *Pueraria mirifica* in Rats

Songpol Chivapat, Pranee Chavalittumrong, Sadudee Rattanajarasroj, Somkiat Punyamung
 Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

ABSTRACT

Pueraria mirifica Airy Shaw and Suvatabandhu or White Kwao Keur has been used in folk medicine as a rejuvenating agent for the elderly. To date, toxicological data of this plant are still incomplete and therefore the six-month chronic toxicity study was undertaken. Wistar rats of each sex were orally administered *Pueraria mirifica* powder (PM) at the doses of 10, 50 and 250 mg/kg/day whereas the control group received water at 10 ml/kg/day for 6 months. The significantly decreased body weights were observed in both male and female rats receiving PM at the doses of 50 and 250 mg/kg/day. Food consumptions were suppressed in PM-treated male rats at the doses of 50 and 250 mg/kg/day and also in the highest dose- treated female rats. During the experiment, some rats receiving PM had alopecia for two weeks and then recovered. Hematology revealed that PM at the dose of 250 mg/kg/day produced significant decreases of hematocrit, RBC and hemoglobin in both sexes of rats. Triglyceride levels in the female rats treated with 250 mg/kg/day of PM were significantly increased. Cholesterol levels were significantly decreased in male rats receiving PM at the doses of 50 and 250 mg/kg/day and in female rats at the highest dose. The testicular weight of male rats receiving the highest dose of PM was significantly decreased whereas the uterine weight of female rats receiving this dose was significantly increased. Histopathological examinations of visceral organs revealed no changes related to the toxicity of *P. mirifica* except that male rats receiving the highest dose of PM had significantly higher incidence of kidney tubular cysts. Results of the study indicated that prolonged administration of 10 mg/kg/day *P. mirifica* did not cause any hematological and biochemical alterations. Nor did pathology of the internal organs indicating the toxicity at this dose.

Keywords : *Pueraria mirifica*, toxicity, White Kwao Keur

พิษเรื้อรังของกวาวเครือขาวในหนูขาว

ทรงพล ชีวะพัฒน์, ปราวณี ขวลิศอ่ารง, สดุดี รัตนจรัสโรจน์, สมเกียรติ ปัญญาณ์
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

กวาวเครือขาวเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้เป็นยาบำรุงสุขภาพในผู้สูงอายุ เนื่องจากข้อมูลด้านพิษวิทยาของสมุนไพรชนิดนี้ยังไม่สมบูรณ์ คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาพิษเรื้อรังของหัวกวาวเครือขาวในหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยป้อนผงกวาวเครือขาวเขवनตะกอนในน้ำแก่หนูขาวในขนาด 10, 50, และ 250 มก./กก./วันทุกวัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ 10 มล./กก./วัน เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่าหนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 50 และ 250 มก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศผู้ที่ได้กวาวเครือขาวขนาด 50 และ 250 มก./กก./วัน และเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 250 มก./กก./วัน กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 250 มก./กก./วัน บางตัวมีอาการขนร่วงนานประมาณ 2 สัปดาห์ต่อมาจะดีขึ้นจนปกติ ผลทางโลหิตวิทยา แสดงให้เห็นว่า หนูขาวที่ได้รับกวาวเครือขนาดสูงทั้งสองเพศมีค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดแดงและปริมาณ ฮีโมโกลบินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ของหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 250 มก./กก./วันเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ กวาวเครือขาวขนาด 250 มก./กก./วัน ทำให้น้ำหนักอวัยวะของหนูเพศผู้ลดลง แต่น้ำหนักมดลูกของหนูเพศเมียเพิ่มขึ้น ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะภายในต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษของกวาวเครือขาวยกเว้นไตของหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขนาดสูงมีอัตราการเกิด tubular cyst เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจากการศึกษาพิษเรื้อรังครั้งนี้ สรุปได้ว่า เมื่อให้กวาวเครือขาวขนาด 10 มก./ กก. นานติดต่อกัน 6 เดือน ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีของซีรัม และพยาธิสภาพของอวัยวะภายในต่างๆ ที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติอันเนื่องมาจากกวาวเครือขาว

คำสำคัญ : *Pueraria mirifica*, toxicity, White Kwao Keur

INTRODUCTION

Pueraria mirifica Airy Shaw and Su-vatabandhu or White Kwao Keur¹ is a Thai indigenous woody climber belonging to the family Leguminosae.² Tuberos roots of *P. mirifica* were traditionally used by Thai people as a rejuvenating drug.³ Phytochemical studies have shown that the tuberos root contains various compounds such as miroestrol,⁴ puerarin,⁵ coumestrol, daidizin, daidzein, mirificin,⁶ mirificoumestan,⁷ genistin⁸ and kwakurin.⁹ Many

of these substances are classified as phytoestrogens. Recently, deoxymiroestrol has been isolated from roots of *P. mirifica* and shown to possess stronger estrogenic effect on MCF-7 human breast cancer cells than miroestrol.¹⁰

Several pharmacological studies of *P. mirifica* mostly concerned with its estrogenic-like activities in animals. *P. mirifica* could inhibit courtship, mating behavior and testicular development in male pigeon whereas in female it suppressed egg laying by inhibition of fol-

lular development.¹¹ Experiments conducted in female rats have shown that White Kwao Keur suppresses lactation by inhibiting mammary gland growth and milk production.¹² This herb exhibited effective postcoital antifertility in rats and increased the uterine weight as well as fluid content in the uterus of immature ovariectomized rats.¹³ In male rats, *P. mirifica* reduced reproductive behavior and caused weight reduction of testis, epididymis, prostate gland and seminal vesicles.¹⁴

Toxicity of *P. mirifica* tuberous root has been investigated in some experimental animals. In Japanese quail, this herb affected hemopoietic systems i.e. decrease hematocrit, hemoglobin and red blood cells.¹⁵ It also caused suppurative inflammation in some parts of the body.¹⁶ Hepatic lesions and degeneration of testicular leydig cells was reported in rats orally treated with 100 mg/kg of *P. mirifica* for 14 consecutive days.¹⁴ Subchronic toxicity study at the doses range between 10-1,000 mg/kg for a period of ninety days in Wistar rats showed that the highest dose affected hematological values and no estrogenic effect was observed at the lowest dose.¹⁷ Since the currently available toxicological data of this plant are still incomplete to evaluate the safety of this plant, therefore Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science conducted chronic toxicity study of *P. mirifica* tuberous root so as to provide additional toxicological information in order to ascertain the safety of using this plant.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of *Pueraria mirifica* suspensions

Tuberous roots of *P. mirifica* were collected and identified by Associate professor Yudthana Smitasiri, Mae Fah Luang University. The roots, approximately 2 kg each, were sliced and oven-dried at 50°C. The dried roots were pulverized and passed through sieve no 100. Chemical constituents of *P. mirifica* powder (PM) were assayed by the Research and Development Institute, Government Pharmaceutical Organization. The percentage amount of isoflavones : genistin, daidzin, and puerarin were 0.0113, 0.0016 and 0.0152 respectively whereas genistein was not found. Another isoflavone, daidzein, was also qualitatively found by using HPLC/photodiode array (PDA) in our institute. Bioassay of PM using an immature rat uterine weight method was also performed by Associate Professor. Yudthana. It was found that the estrogenic potency of 1 mg of dried powder of PM indicated by uterine weight increase was equal to that of about 1.5-2.0 micrograms of conjugated estrogen (Premarin®). The powders were suspended and diluted to the desired concentrations with water for chronic toxicity study

EXPERIMENTAL ANIMALS

One hundred and fifty Wistar rats (75 of each sex) weighing 150 ± 10 g were purchased from the National Laboratory Animal Center, Salaya, Mahidol University. The animals were housed in conventional hygienic laboratory animal room at the Institute of Health Science Research, Department of Medical Sciences. Temperature in the room was maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ with 60% relative humidity and 12

hours-light-dark-cycle. The animals were given commercially pelleted diets and clean tap water ad libitum.

CHRONIC TOXICITY STUDY

Seventy five rats of each sex were randomly divided into 5 groups of 15 animals per sex. Group 1 (water control) received water 10 ml/kg/day and groups 2-5 were orally administered with the suspensions of PM at the doses of 10, 50, 250 and 250 mg/kg/day respectively for six months. After the six-month period of PM administration, only group 5 (250-R), high recovery group, were further raised for two weeks without PM in order to study recovery or delay effects of PM. During the period of experiment, body weight and food consumption were measured weekly and the rats were closely observed for signs of abnormality. At the end of six-month-treatment period, the animals were fasted for 18 hours and then were dissected under ether anesthesia. Blood was collected from posterior vena cava for hematological and serum biochemical determinations.

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyzer Cell-Dyn[®] 3500. These following hematological parameters were measured: % hematocrit, hemoglobin, red blood cell (RBC), mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC), white blood cells (WBC), % neutrophil, % eosinophil, % lymphocyte, % monocyte, % basophil and platelets number. Biochemical values were assayed by using automatic chemistry analyzer Hitachi[®] 912. These following parameters were measured: alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotrans-

ferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), creatinine, total protein, albumin, total bilirubin, glucose, uric acid, triglyceride, total cholesterol, sodium, potassium and chloride ion.

Necropsy was then performed to observe gross pathological changes of various visceral organs. Brain, heart, lung, stomach, liver, kidney, spleen, bladder, testis in male rats, ovary and uterus in female rats were weighed and then calculated in term of % relative organ weight. The visceral organs were preserved in 10% buffered formalin solution and were subsequently subjected to histological preparing process for tissue slides stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological examinations.

DATA ANALYSIS

Body weight, organ weight, food consumption, hematological and biochemical values were statistically analyzed by SPSS program. One way ANOVA was performed and the data was tested for homogeneity of variance by Levene test. Bonferroni test was used in case of equal variance whereas Tamhane test was applied for unequal variance in multiple comparison. Histo pathological results were evaluated by Fisher's Exact test and statistical significance of all data was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of *P. mirifica* on body weight, food consumption and physical appearance

Average body weight of male rats treated with *P. mirifica* powder (PM) at the doses of 50 and 250 mg/kg/day were significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$) since week 2 and 3 through the end of the experi-

ment, respectively. Female rats receiving PM at the doses of 50 and 250 mg/kg/day had significantly lower average body weight than their control group ($P<0.05$) since week 3 and 4, respectively until the end of the experiment (Fig.1).

Food consumptions of male rats receiving 50 and 250 mg/kg of PM were significantly decreased when compared with that of the control group ($P<0.05$). Male rats receiving 10 mg/kg of PM had significantly lower food consumption than the control group for se

veral weeks i.e. week 2 to week 8 of the study and after that there was no difference of food consumption until the end of the study (Fig.2). Female rats receiving the highest

dose of PM had significantly lower food consumption than the control group ($P<0.05$) at each week as shown in Fig. 2. During the experiment, some animals receiving PM had alopecia areata from left or right shoulder to thoracic skin. The lesions were present for two weeks and then recovered. The number of rats showing alopecia was summarized in Table 1.

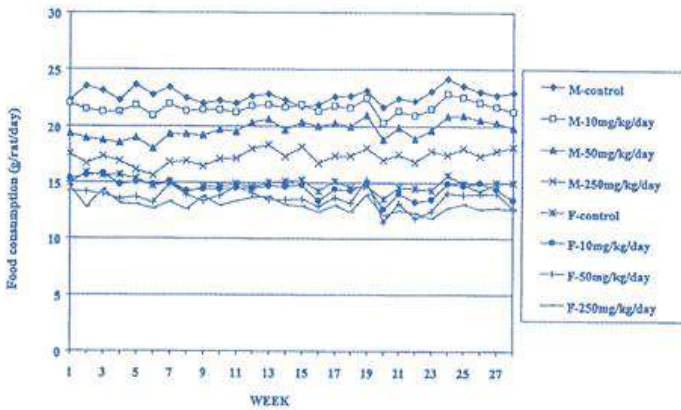


Figure 1 Average body weight of male(M) and female(F) rats treated with *P.mirifica* for 6 months

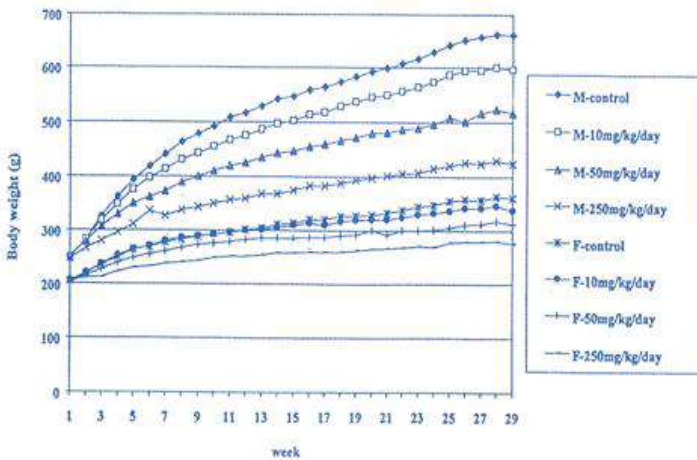


Figure 2 Food consumption of male (M) and female(F) rats treated with *P.mirifica* for 6 months

Table 1 The number of rats developed alopecia during the chronic toxicity study of *P.mirifica* (n=15/group/sex)

Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)	No. of rats with alopecia		Duration of exposure
	male	female	(day)
0	0	0	-
10	0	1(6.7%)	87
50	1(6.7%)	1(6.7%)	60-64
250	4(26.67%)	2(13.33%)	61-156
250-R	4(26.67%)	3(20%)	23-54

250-R= high dose recovery group

Effects of *P.mirifica* on hematological values

Significant decreases of hematocrit, RBC and hemoglobin were observed in male and female rats treated with 250 mg/kg/day of PM as compared with those of their corresponding control groups ($P<0.05$). Male rats receiving PM at the dose of 50 mg/kg/day and higher as well as female rats receiving PM at 250 mg/kg/day had significantly decreased eosinophil (%) when compared with the corresponding control groups ($P<0.05$). The percentage of lymphocyte in female rats receiving PM at the dose of 250 mg/kg/day was significantly higher than that of the control group ($P <0.05$). Hematological values of male and female rats were shown in Table 2 and 3

Effects of *P. mirifica* on clinical chemistry values

Male rats receiving PM at the dose of 50 and 250 mg/kg/day had significantly lower AST and cholesterol levels than the control group ($P<0.05$). Albumin level was significantly lower in the highest dose of PM- treated group than that of the control group ($P<0.05$). Bilirubin and

chloride levels of high dose recovery group were significantly increased as compared to the corresponding control group (Table 4).

Female rats receiving PM at the highest dose had significantly lower levels of AST and cholesterol than the control group ($P<0.05$) whereas triglyceride level was significantly increased ($P<0.05$). The levels of total protein were significantly increased in female rats treated with PM at the doses of 50 and 250mg/kg/day as well as in the 250-R group (Table 5).

Effects of *P. mirifica* on organ weight

At necropsy, no remarkable gross pathological lesions of the internal organs of all PM-treated and control groups were observed. Male rats treated with PM at the highest dose had significantly decreased weight of brain, lung, liver, testicles, and adrenal gland as compared to the control group ($P<0.05$). The significant increases of cardiac weight were observed in male rats receiving PM at any doses (Table 6). Female rats treated with the highest dose of PM had significantly decreased cardiac weight while uterine and adrenal weight was significantly increased ($P<0.05$) (Table 7).

Effects of *P.mirifica* on histopathology of internal organs.

It was demonstrated that the incidence of fatty degeneration in liver and adrenal gland in all groups of PM-treated male rats was significantly decreased as compared to their control group ($P<0.05$). The incidence of kidney tubular cyst was significantly increased in male rats receiving the highest dose of PM and in the high dose recovery group. Additionally, male rats treated with PM at the dose of 10 mg/kg/day onward had significantly higher incidence of tubular cast than their control group (Table 8).

Table 2 Hematology values of male rats treated with *P.mirifica* for 6 months

Parameters	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)					Normal value
	Control n=15	10 n=15	50 n=13	250 n=15	250-R n=14	
Hematocrit (%)	46.65 ± 0.52	46.78 ± 0.68	45.58 ± 0.65	42.88 ± 0.88*	46.48 ± 0.64	42.5-49.4
RBC(x10 ⁶ /μL)	9.13 ± 0.09	9.09 ± 0.12	8.85 ± 0.14	8.05 ± 0.18*	8.64 ± 0.14	7.2-9.6
Hb (g/dl)	15.72 ± 0.12	15.77 ± 0.16	15.46 ± 0.12	14.70 ± 0.18*	16.51 ± 0.15*	12-17.5
MCV (fl/red cell)	51.15 ± 0.64	51.51 ± 0.78	51.56 ± 0.52	53.25 ± 0.44	53.83 ± 0.58	57-65
MCH (pg/red cell)	17.24 ± 0.21	17.38 ± 0.18	17.58 ± 0.30	18.38 ± 0.36	19.19 ± 0.31*	14.6-21.3
MCHC (g/dl RBC)	33.76 ± 0.33	33.80 ± 0.35	34.08 ± 0.50	34.61 ± 0.79	35.64 ± 0.39*	26-38
WBC (K/μL)	5.38 ± 0.38	6.37 ± 0.37	5.25 ± 0.32	4.95 ± 0.51	4.31 ± 0.25	5-8.96
Neutrophil (%)	14.68 ± 1.54	13.78 ± 0.93	13.72 ± 1.14	14.62 ± 1.33	16.05 ± 1.17	9-34
Eosinophil (%)	1.54 ± 0.14	1.45 ± 0.10	1.00 ± 0.72*	0.98 ± 0.61*	1.59 ± 0.14	0-2.5
Lymphocyte (%)	81.29 ± 1.70	82.53 ± 1.09	83.72 ± 1.06	82.67 ± 1.37	80.24 ± 1.28	65-84.5
Monocyte (%)	1.10 ± 0.30	1.39 ± 0.35	0.94 ± 0.29	1.07 ± 0.25	1.14 ± 0.36	0-5
Basophil (%)	1.19 ± 0.19	0.78 ± 0.09	0.66 ± 0.06	0.61 ± 0.07	0.97 ± 0.10	0-1.5
Platelet (K/μL)	877.13 ± 21.06	829.00 ± 31.75	844.38 ± 23.15	844.57 ± 39.40	882.79 ± 37.02	662.0-992.0

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean± SEM

*significantly different from the control group at P<0.05

Table 3 Hematology values of female rats treated with *P.mirifica* for 6 months

Parameters	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)					Normal value
	Control n=15	10 n=15	50 n=14	250 n=15	250-R n=15	
Hematocrit (%)	45.30 ± 0.91	45.23 ± 0.76	45.95 ± 0.36	41.12 ± 0.65*	43.81 ± 0.68	42.5-49.4
RBC(x10 ⁶ /μL)	8.36 ± 0.17	8.23 ± 0.12	8.43 ± 0.10	7.58 ± 0.11*	8.02 ± 0.12	7.2-9.6
Hb (g/dl)	15.52 ± 0.27	15.33 ± 0.18	15.34 ± 0.16	14.03 ± 0.17*	15.86 ± 0.12	12-17.5
MCV (fl/red cell)	54.31 ± 0.38	54.95 ± 0.49	54.52 ± 0.48	54.21 ± 0.34	54.61 ± 0.48	57-65
MCH (pg/red cell)	18.63 ± 0.19	18.65 ± 0.17	18.20 ± 0.19	18.54 ± 0.16	19.82 ± 0.26*	14.6-21.3
MCHC (g/dl RBC)	35.32 ± 0.34	33.97 ± 0.35	33.38 ± 0.18	34.20 ± 0.31	36.31 ± 0.46*	26-38
WBC (K/μL)	2.92 ± 0.23	2.56 ± 0.28	2.69 ± 0.27	2.68 ± 0.17	2.43 ± 0.19	5-8.96
Neutrophil (%)	23.44 ± 3.10	20.77 ± 2.47	21.23 ± 2.93	21.37 ± 1.57	21.20 ± 1.92	9-34
Eosinophil (%)	1.93 ± 0.16	2.16 ± 0.16	1.52 ± 0.12	1.21 ± 0.17*	1.86 ± 0.14	0-2.5
Lymphocyte (%)	70.19 ± 3.22	73.81 ± 2.71	73.84 ± 2.92	81.02 ± 2.01*	73.23 ± 2.27	65-84.5
Monocyte (%)	3.64 ± 0.86	2.62 ± 0.74	2.75 ± 0.71	2.14 ± 0.59	2.35 ± 0.56	0-5
Basophil (%)	0.80 ± 0.10	0.64 ± 0.08	0.66 ± 0.12	0.79 ± 0.11	1.37 ± 0.16*	0-1.5
Platelet (K/μL)	847.03 ± 25.03	859.63 ± 21.93	923.42 ± 29.42	826.65 ± 33.01	871.39 ± 27.01	403.0-979.0

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean ± SEM

*significantly different from the control group at P<0.05

Table 4 Clinical chemistry values of male rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Parameters	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)					Normal value
	Control n=15	10 n=15	50 n=15	250 n=13	250-R n=15	
ALP (U/L)	63.00 ± 2.87	62.93 ± 2.66	67.93 ± 4.91	68.73 ± 4.10	72.21 ± 6.94	56.8-128.0
ALT (U/L)	38.00 ± 2.07	37.07 ± 2.50	32.57 ± 2.09	44.73 ± 4.84	38.36 ± 3.01	28.9-47.6
AST (U/L)	72.93 ± 2.89	67.60 ± 3.58	58.07 ± 2.02*	55.80 ± 3.02*	64.29 ± 1.89	45.7-80.8
BUN (mg/dl)	19.25 ± 0.49	19.98 ± 0.75	20.84 ± 0.77	19.56 ± 0.91	21.76 ± 0.94	5-29
Creatinine (mg/dl)	0.70 ± 0.03	0.63 ± 0.05	0.67 ± 0.02	0.64 ± 0.02	0.58 ± 0.01*	0.2-0.8
Total protein (g/dl)	6.77 ± 0.07	6.88 ± 0.08	6.89 ± 0.08	6.81 ± 0.08	7.09 ± 0.07*	4.7-8.15
Albumin (g/dl)	4.16 ± 0.04	4.15 ± 0.04	4.15 ± 0.06	3.83 ± 0.07*	4.26 ± 0.05	2.7-5.1
Bilirubin (mg/dl)	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.34 ± 0.01*	0.0-0.55
Glucose (mg/dl)	167.40 ± 5.54	176.62 ± 8.50	154.77 ± 11.35	189.65 ± 9.27	190.84 ± 8.06	130.0-267.0
Uric acid (mg/dl)	1.87 ± 0.21	2.29 ± 0.36	1.72 ± 0.23	2.31 ± 0.43	1.86 ± 0.27	1.2-7.5
Triglyceride (mg/dl)	162.27 ± 10.92	200.63 ± 24.33	201.15 ± 23.44	184.80 ± 38.26	195.05 ± 21.25	53.0-124.8
Cholesterol (mg/dl)	84.75 ± 4.33	96.27 ± 7.81	47.51 ± 4.48*	27.27 ± 4.36*	96.71 ± 6.28	45.0-92.0
Na ⁺ (mmol/l)	146.73 ± 0.54	146.20 ± 0.35	147.14 ± 0.36	146.67 ± 0.35	148.43 ± 0.45	143.0-156.0
K ⁺ (mmol/l)	5.77 ± 0.16	6.56 ± 0.41	5.93 ± 0.28	6.67 ± 0.25	5.49 ± 0.14	5.4-7.0
Cl ⁻ (mmol/l)	108.47 ± 0.54	108.53 ± 0.40	108.43 ± 0.40	107.60 ± 0.49	112.57 ± 0.58*	100.0-110.0

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean ± SEM

*significantly different from the control group at P<0.05

Table 5 Clinical chemistry values of female rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Parameters	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)					Normal value
	Control n=15	10 n=15	50 n=15	250 n=13	250-R n=15	
ALP (U/L)	27.53 ± 2.03	26.00 ± 2.39	25.47 ± 1.66	23.92 ± 1.03	25.29 ± 0.87	56.8-128.0
ALT (U/L)	45.13 ± 4.92	39.93 ± 2.55	35.73 ± 2.33	37.92 ± 2.81	31.14 ± 1.99*	28.9-47.6
AST (U/L)	86.67 ± 6.87	76.40 ± 4.06	82.73 ± 10.59	65.08 ± 3.41*	67.29 ± 2.29	45.7-80.8
BUN (mg/dl)	20.27 ± 0.96	21.05 ± 0.77	22.09 ± 0.60	21.90 ± 0.55	21.58 ± 1.02	5-29
Creatinine (mg/dl)	0.72 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.76 ± 0.02	0.71 ± 0.01	0.63 ± 0.01*	0.2-0.8
Total protein (g/dl)	6.98 ± 0.07	7.05 ± 0.05	7.46 ± 0.08*	7.52 ± 0.06*	7.50 ± 0.08*	4.7-8.15
Albumin (g/dl)	4.95 ± 0.05	4.89 ± 0.06	5.04 ± 0.05	4.80 ± 0.05	4.91 ± 0.06	2.7-5.1
Bilirubin (mg/dl)	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01*	0.0-0.55
Glucose (mg/dl)	149.00 ± 4.83	139.99 ± 5.28	165.56 ± 7.65*	172.25 ± 6.53*	152.81 ± 5.14	96.0-153.0
Uric acid (mg/dl)	2.03 ± 0.25	1.38 ± 0.20	2.28 ± 0.33	2.00 ± 0.29	1.76 ± 0.16	1.2-7.5
Triglyceride (mg/dl)	125.84 ± 9.17	117.01 ± 8.80	143.14 ± 15.86	221.90 ± 26.69*	153.00 ± 14.76	39.1-72.8
Cholesterol (mg/dl)	71.97 ± 4.43	69.87 ± 5.11	67.34 ± 6.49	39.02 ± 3.53*	78.17 ± 4.22	31.0-68.0
Na ⁺ (mmol/l)	147.00 ± 0.31	147.20 ± 0.37	147.60 ± 0.25	148.23 ± 0.36*	149.57 ± 0.25*	143.0-156.0
K ⁺ (mmol/l)	5.74 ± 0.32	4.93 ± 0.26	5.29 ± 0.31	5.44 ± 0.31	5.48 ± 0.16	5.4-7.0
Cl ⁻ (mmol/l)	111.27 ± 0.47	111.47 ± 0.46	111.06 ± 0.46	111.15 ± 0.36	117.57 ± 0.34*	100.0-110.0

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean ± SEM

*significantly different from the control group at P<0.05

Table 6 Organ weight of male rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Organs	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)				
	Control n=15	10 n=15	50 n=14	250 n=15	250-R n=15
Brain	2.15 ± 0.02	2.12 ± 0.02	2.12 ± 0.02	2.04 ± 0.02*	2.09 ± 0.02
Heart	1.52 ± 0.04	1.42 ± 0.03*	1.35 ± 0.03*	1.18 ± 0.04*	1.24 ± 0.03*
Lung	1.86 ± 0.04	1.84 ± 0.05	1.74 ± 0.05	1.65 ± 0.05*	1.67 ± 0.03*
Stomach	2.16 ± 0.06	2.40 ± 0.10*	2.21 ± 0.06	2.23 ± 0.07	2.15 ± 0.05
Liver	14.83 ± 0.61	15.49 ± 0.51	14.28 ± 0.44	13.15 ± 0.56*	13.33 ± 0.46
Right kidney	1.42 ± 0.06	1.43 ± 0.02	1.42 ± 0.06	1.39 ± 0.07	1.33 ± 0.05
Left kidney	1.38 ± 0.06	1.36 ± 0.02	1.34 ± 0.05	1.31 ± 0.05	1.29 ± 0.04
Spleen	1.09 ± 0.04	1.14 ± 0.05	1.04 ± 0.03	1.15 ± 0.04	1.08 ± 0.05
Left testis	3.19 ± 0.08	3.10 ± 0.06	3.02 ± 0.06	2.84 ± 0.14*	2.97 ± 0.05
Right testis	3.16 ± 0.08	3.15 ± 0.07	3.07 ± 0.04	2.90 ± 0.11*	2.98 ± 0.05
Bladder	0.15 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean ± SEM

*significantly different from the control group at P<0.05

Table 7 Organ weight of female rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Organs	Dose of <i>Pueraria mirifica</i> (mg/kg/day)				
	Control n=15	10 n=15	50 n=15	250 n=13	250-R n=15
Brain	1.96 ± 0.01	1.97 ± 0.02	1.98 ± 0.02	1.91 ± 0.02	1.93 ± 0.01
Heart	0.94 ± 0.03	0.95 ± 0.03	0.90 ± 0.02	0.86 ± 0.02*	0.91 ± 0.02
Lung	1.30 ± 0.04	1.37 ± 0.03	1.31 ± 0.02	1.22 ± 0.03	1.28 ± 0.03
Stomach	1.62 ± 0.03	1.73 ± 0.05	1.68 ± 0.06	1.72 ± 0.05	1.58 ± 0.04
Liver	7.52 ± 0.19	7.52 ± 0.29	7.46 ± 0.27	8.01 ± 0.18	7.66 ± 0.14
Right kidney	0.86 ± 0.02	0.85 ± 0.02	0.87 ± 0.02	0.83 ± 0.01	0.88 ± 0.02
Left kidney	0.82 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.81 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.82 ± 0.02
Spleen	0.70 ± 0.02	0.80 ± 0.04*	0.70 ± 0.03	0.74 ± 0.02	0.69 ± 0.02
Left ovary	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00
Right ovary	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00
Bladder	0.08 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Uterus	0.69 ± 0.04	0.69 ± 0.03	0.86 ± 0.06	1.05 ± 0.08*	0.82 ± 0.08

250-R=high dose recovery group

The values are expressed as mean ± SEM

*significantly different from the control group at P<0.05

Table 8 Histopathological results of visceral organs in Wistar rats treated with *P. mirifica* for 6 months

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>P. mirifica</i> (mg/kg/day)											
		Male (n=15/group)						Female (n=15/group)					
		0	10	50	250	250-R	0	10	50	250	250-R		
Lung	Lymphoid proliferated peribronchioles	4/15	11/15*	7/15	7/15	10/15*	8/15	9/15	0/15*	8/15	9/15	250-R	9/15
Heart	Focal myocardiolysis	1/15	1/15	1/15	1/15	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Liver	Fatty degeneration	7/15	2/15*	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
	Lymphoid aggregated	1/15	1/15	0/15	0/15	0/15	1/15	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
	Periportal areas												
Kidney	Tubular cast	0/15	9/15*	9/15*	7/15*	2/15	4/15	4/15	4/15	5/15	4/15	4/15	4/15
	Tubular cyst	2/15	1/15	4/15	10/15*	7/15*	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Intestine	GALT hyperplasia	1/15	1/15	0/15	0/15	2/15	2/15	0/15	0/15	3/15	1/15	0/15	0/15
Testis	Atrophy	0/15	1/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Uterus	Subendometrial gland hyperplasia						2/15	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Mammary gland	Glandular hyperplasia						3/15	0/15	0/15	1/15	1/15	0/15	0/15
Adrenal gland	Cortical fatty degeneration	11/15	4/15*	0/15*	0/15*	0/15*	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
	Focal hemorrhage						1/15	0/15	0/15	1/15	0/15	1/15	0/15

250-R=high-dose recovery group

The results were expressed as the number of rats with pathological findings per total number of rats treated

*significantly different from the control group at P<0.05

DISCUSSION

In this six-month chronic toxicity study, the doses of PM were changed to be 10, 50 and 250 mg/kg/day. Since our previous ninety-day subchronic toxicity study revealed that PM at the doses of 100 and 1,000 mg/kg produced some adverse effects in the animals.¹⁷ PM at the doses ranged from 50 to 250 mg/kg/day affected the body weight of the animals. The significantly lower body weight may be due to the decreasing of food intake in the PM-treated groups. It was demonstrated that an estrogen derivative, 17-beta-estradiol, can decrease food consumption and food efficiency in rats.¹⁸ Some phytoestrogens such as miroestrol was reported to produce headache and nausea,³ genistin and daidzein have been shown to decrease the synthesis of cortisol¹⁹ which has an activity on stimulating appetite. Taken together, the decrease of food consumption may be contributed by the estrogenic-like effects of PM. Alopecia found in some rats receiving PM at the given doses may also be resulted from the estrogenic-like activity of PM since there was a study demonstrating that ethynylestradiol, a synthetic estrogen, produced alopecia in the albino rats.²⁰ However, alopecia in PM-treated rats existed for about two weeks and then it recovered.

Hematologic results demonstrated that PM at the dose of 250 mg/kg significantly decreased hematocrit, RBC, and hemoglobin in both male and female rats, however these alterations were within normal range²¹ and recoverable as shown in 250-R group. The decrease of these parameters may be attributable to the estrogenic-like effect of PM since it was reported that dietary administration of

17 beta-estradiol produced anemia in rats.¹⁸ The significant changes of eosinophil(%) in PM- treated male rats at the doses of 50 and 250 mg/kg/day and in female rats receiving the highest dose of PM was within normal range²¹ i.e., 0-2.5%. In addition, the increase of lymphocyte in female rats receiving the highest dose of PM was also within normal range.²¹

The significant decreases of AST levels in PM-treated male rats at the dose of 50 and 250 mg/kg/day and in female rats receiving the highest dose were within normal range. However, this alteration did not indicate any damage of the concerning vital organs such as liver and heart. Our findings that triglyceride levels increased in a dose-dependent manner in all groups of female rats receiving PM and the significance effect was observed in the highest dose-treated group, suggest that this phenomenon may be PM related. Moreover, this findings are consistent with our previous subchronic toxicity study showing that high dose of PM (1,000 mg/kg/day) can cause the elevation of triglyceride level in female rats.¹⁷ Cholesterol levels were significantly decreased in PM- treated male rats at the doses of 50 and 250 mg/kg/day as well as in female rats receiving the highest dose of PM, suggesting the hypocholesterolemic effect of PM which was consistent with our previous study¹⁷. There was also study indicated that phyto- estrogens from soy bean, a plant in the same family as *P.mirifica* (Leguminosae) were capable in decreasing LDL and increase HDL cholesterol levels in monkey.²²

In this study we found that the body weights in the groups receiving PM at 50 and 250 mg/kg were significantly decreased and this

might result in the significant increase of relative weight of many organs. Therefore we present actual organs weight which reveal more actual alterations than relative organ weights. The decreases of some organs weights i.e., heart in PM- treated male rat at each dose and in the highest dose-treated female rats, lung in male receiving highest dose of PM were observed. However histopathology of these organs did not indicate any abnormality. The decrease of left and right testicular weight in male rats receiving the highest dose of PM and the increase of uterine weight in female rats at this dose suggest the estrogenic effects of PM as previously reported in some studies.^{13,14,17}

Histopathology results showed the alterations in some visceral organs of the male rats receiving PM. The incidence of hepatocyte fatty degeneration was significantly decreased at the doses ranging from 10 to 250mg/kg of PM. This phenomenon may be estrogenic effect of PM, since there were some investigations showing that estrogens were able to increase apolipoprotein B (apo-B) production in human hepatocytes²³ and in mice hepatocyte.²⁴ Hepatocytes assemble triglyceride into VLDL-lipoproteins particles on the backbone of apo B-100 and secrete into plasma.²⁵ This may explain why the incidence of hepatocyte fatty degeneration in the liver decreased. The significantly higher incidence of tubular cyst in the kidneys of male rats receiving PM at the dose of 250 mg/kg/day and in those of the high dose recovery group suggests that prolonged administration of PM at this dose may cause tubular cells damage. It was demonstrated that metabolites of daidzin and daidzein were excreted in urine and bile²⁶; therefore the excre-

tion of these metabolites via kidney may affect the tubular cells. The findings of crystal- like tubular cast in the kidney of PM- treated male rats suggest that there may be the disturbance of some electrolytes reabsorption or transportation of renal epithelium. Some flavones, such as genistein and daidzein activated Cl-channels, genistein and apigenin were reported to possess a stimulatory effect on sodium, potassium and chloride ion-cotransporters in a renal epithelial cell line²⁷. In addition, equol, a metabolic compound of daidzein by intestinal bacteria, is also a potent inhibitor of Na-K-Cl cotransporter.²⁸ However, the incidence of tubular cast decreased after PM discontinuation. The incidence of adrenocortical fatty degeneration of male rats receiving PM at each dose decreased in a dose-response relationship, suggesting the depletion of lipid accumulation. Previously, there was a study showed that daidzein, a phytoestrogen, can suppress cortisol synthesis in the adrenal gland²⁹. Therefore, the reduction of cortisol levels might result in the stimulation of ACTH production. Under conditions of acute or prolonged ACTH stimulation, the lipid stores in the adrenal cortical cells might be used for corticosteroid synthesis³⁰. The incidences of other histopathologic findings were not dose dependent; therefore they could not contribute to PM.

In conclusion, the chronic toxicity study of PM at the doses ranging from 10 to 250 mg/kg/day indicated that PM exerted its estrogenic-like activities in many aspects i.e., at the dose of 250 mg/kg/day affect hematology values, testicular and uterine weight. In addition, the incidence of kidney tubular cyst was significantly increased at this dose. Therefore,

prolonged use and overdose of PM dose should be avoided.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the staff of Laboratory animal center, National Institute of Health, Department of Medical Science, for animal care and facilities. We are grateful to Dr. Anudep Rangsipat, Division of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, for histopathological examination of tissue slides, and Mr. Teerawut Pinthong, head of pharmacokinetic section, Medicinal Plant Research Institute for daidzein assay.

REFERENCES

1. Smitinand T. *Thaiplant names (Botanical names-Vernacular names)*. 2nd ed. Bangkok: Funny Publishing United Partnership, 1980.
2. The Royal Institute, Editors. *Plant taxonomy*. Bangkok: Puaenpim Co., Ltd., 1995.
3. Cain JC. Miroestrol: an estrogen from the plant *Pueraria mirifica*. *Nature* 1960; 188:774-7.
4. Bounds DG and Pope GS. Light absorption and chemical properties of miroestrol, the oestrogenic substance of *Pueraria mirifica*. *J Chem Soc* 1960;17:15 -6.
5. Nilanidhi T, Kamthong B, Isarasena K and Shienghong D. Constituents of the tuberous roots of *Pueraria mirifica*. *Proc Pacific Sci Congr Pacific Sci Assoc* 9th; Bangkok, 1963 .
6. Ingham JL, Tahara S and Dziedzic SZ. A chemical investigation of *Pueraria mirifica* roots. *Z Naturforsch. Ser C* 1986; 41:403-8.
7. Ingham JL, Tahara S and Dziedzic SZ. Coumestans from the roots of *Pueraria mirifica*. *Z Naturforsch.* 43c 1988; 5-10.
8. Ingham JL, Tahara S. and Dziedzic SZ. Minorisoflavones from the roots of *Pueraria mirifica*. *Z Naturforsch SerC*. 1989; 44: 724-6.
9. Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, et al. Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med* 2000; 66: 572-5.
10. Chansakaow S, Ishikawa, T, Seki H. et al. Identification of Deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of Kwao Keur. *J. Nat. Pro* 2000; 63(2): 173-5.
11. Smitasiri Y and Sakdarat S. The means of application of *Pueraria mirifica* for pigeon (*Columba sp.*) birth control. *Suranaree J Sci Technol* 1995;2: 89-9
12. Smitasiri Y, Pangjit S, Anuntalabhochai S. Inhibition of lactation in lactating rats with *Pueraria mirifica* compared with estrogen. *J Sci Fac CMU* 1989;16:7-11.
13. Smitasiri Y, Junyatum U and Songjitsawad A. Postcoital antifertility effects of *Pueraria mirifica* in rats. *J Sci Fac CMU* 1986;13:19-28.
14. Langkalichan Y. The study of effects of *Pueraria mirifica* on reproductive organs, adrenal glands, liver, reproductive behavior and reproduction. MS Thesis (Biology) Chiang Mai University 1984.

15. Thaiyanan P, Trakulbool P, and Anantalapochai S. Effect of White Gwow on Quail II: Red blood cells and white blood cells productions. *J Med Tech CMU*1992; 25(3):107-114.
16. ChuaychooA, JunyatumU, Anuntal-abhochai S,SmitasiriS.Toxic effects of White Gwow (*Pueraria mirifica*) in Japanese quails. *J Sci Fac CMU* 1984;11: 46-55.
17. Chivapat S, Chavalittumrong P, Rattana-jarasroj S, Chuthaputti A and Punyamong S. Toxicity study of *Pueraria mirifica* Airy Shawet Suvatabandhu.*Bull Dept Med Sci*, 2000;42(3): 201-222.
18. Biegel LB, Flaws JA,Hirshfield AN, et al. 90-day feeding and one generation reproduction study in Cri:CD BR rats with 17 beta-estradiol. *Toxicol Sci* 1998; 44: 116-42.
19. Mesiano S, Katz, SL Lee JY, et al. Phytoestrogens alter adrenocortical function: genistein and daidzein suppress glu- cocorticoid and stimulate androgen production by cultured adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 : 2443-8.
20. Schardein JL. Studies of the components of an oral contraceptive agent in albino rats. I. Estrogenic component. *J Toxicol Environ Health* 1980; 6(4):6.
21. Gad SC. The Rat: In: Animal Models in Toxicology (Eds. S.C. Gad and C.P. Chengellis). New York: Marcel Dekker, 1992:81.
22. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL, Morgan TM, and Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 1996; 126: 43-50.
23. Kutteh WH, Rainy WE, and Carr BR. Regulatory effects of multifunctional cytokines and steroid hormones on apolipoprotein B production by human fetal hepatocytes. *J Soc Gynecol Investig* 1994; 1(4): 256-63.
24. Srivastava RA, Tang J, Baumann D, Schonfeld G. Hormonal and nutritional stimuli modulate apolipoprotein B mRNA editing in mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 188(1): 135-41.
25. Dominiczak MH. Apolipoproteins and Lipoproteins in Human Plasma. In Rifai N, Warnick GR, and Dominiczak MH, editors *Handbook of Lipoprotein Testing*. Washington DC:AACCPress, 1997:1-17.
26. YasudaT,Kano,Y, Saito,K. andOhsawa, K. Urinary and biliary metabolites of daidzin and daidzein in rats. *Biol Pharm Bull* 1994; 17(10): 1369-74.
27. NisatoN, ItoY, andMarunakaY. Activation of Cl-channel and Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in renal epithelial A6 cells by flavonoids: genistein, daidzein, and apigenin. *Biochem Biophys Res Commun*1999;254(2): 368-71.

28. Martinez RM, Gimenez I, Lou JM, Mayoral JA and Alda JO. Soy isoflavonoids exhibit in vitro biological activities of loop diuretics. *Am J Clin Nutr* 1998;68suppl 6: 1354-7.
29. Mesiano S, Katz SL, Lee JY, et al. Phytoestrogen alter adrenocortical function: genistein and daidzein suppress glu-corticoid and stimulate androgen production by cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2443-8.
30. Michael HR, Lynn JR and Gordon IK. *Histology: A text and atlas* .3rd ed. Maryland: Williasand Willkins, 1995.

การศึกษาความเป็นพิษของสารลูปินิโพลิน จากลำต้นชะเอมเหนือ

ทรงพล ชิวะพัฒน์*
ปราณี ขวลิตรวราง†
เอมเมัส อัครวิฑู‡
นพมาศ สุนทรเจริญนนท์‡

บทคัดย่อ

สารลูปินิโพลินเป็นสารกลุ่มฟลาโวนोनชนิดหนึ่งซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อเริม (Herpes Simplex Virus 1). การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพิษของสารลูปินิโพลินจากต้นชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib) ในการศึกษาพิษเฉียบพลัน โดยป้อนสารลูปินิโพลินทางปากแก่หนูถีบจักรในขนาด ๕ มก./กก. ซึ่งสูงกว่าขนาดที่ใช้รักษาประมาณ ๘,๓๐๐ เท่าพบว่า ไม่มีพิษเฉียบพลัน. จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันระยะเวลา ๒๘ วันในหนูแรดพันธุ์วิสตาร์ ๖ กลุ่ม: กลุ่มที่ ๑ กลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่น. กลุ่มที่ ๒ กลุ่มควบคุมด้วย tragacanth ๑% และกลุ่มที่ ๓ ถึง ๖ ได้รับสารลูปินิโพลินแขวนตะกอนใน tragacanth ๑% ทางปากในขนาดวันละ ๐.๖, ๖.๐, ๓๐ และ ๖๐ มก./กก. หรือเทียบเท่า ๑, ๑๐, ๕๐ และ ๑๐๐ เท่าของขนาดที่ใช้รักษา พบว่า สารลูปินิโพลินไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว, สุขภาพและการกินอาหารของหนูแรด. หนูเพศเมียที่ได้รับ สารลูปินิโพลินขนาดวันละ ๖๐ มก./กก. มีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นและมีนิวโทรฟิลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ แต่อยู่ในช่วงค่าปกติ. หนูเพศผู้ที่ได้รับสารลูปินิโพลินขนาดวันละ ๓๐ และ ๖๐ มก./กก. และหนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปินิโพลินขนาดวันละ ๖๐ มก./กก. มีระดับโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ แต่อยู่ในช่วงค่าปกติ. ระดับโปแตสเซียมในหนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปินิโพลินขนาดวันละ ๓๐ และ ๖๐ มก./กก. มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ. การตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาพบการเปลี่ยนแปลงที่มีอุบัติการณ์ไม่สัมพันธ์ กับขนาดของลูปินิโพลินจึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากสารลูปินิโพลิน. ดังนั้นสรุปได้ว่า สารลูปินิโพลินมีความปลอดภัยที่จะ นำมาใช้เป็นยารักษาแผลเริมที่ดี.

คำสำคัญ : ลูปินิโพลิน, ชะเอมเหนือ, ความเป็นพิษ

ภูมิหลังและเหตุผล

สารลูปินิโพลินมีชื่อทางเคมี (2S)-4',5-dihydroxy-8-(3'''-methyl-2'''-butenyl)-2'',2''-dimethylpyrano [5'',6''-g]flavanone เป็นสารกลุ่มฟลาโวนोनที่มีสูตรโครงสร้าง $C_{25}H_{36}O_5$ มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง สกัดได้ครั้งแรกจากรากของพืช *Tephrosia lupinifolia* Burch (DC) ในปริมาณร้อยละ ๐.๒๗^๑. ในส่วนรากของ *Derris laxiflora* Benth. ในปริมาณร้อยละ ๐.๒๘^๒. ส่วนรากของ *Sophora tetraptera* J. F. Mill. ในปริมาณร้อยละ ๐.๐๐๒^๓ และส่วนลำต้นของชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib) ในปริมาณร้อยละ ๐.๕๕^๔ ในการ

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารลูปินิโพลินที่แยกได้จาก ลำต้นชะเอม (*Myriopterion extensum*) โดย นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ และคณะ^๕ พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัสโรคได้ปานกลางแสดงค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ยับยั้งได้ดีที่ ๑๒.๕ ไมโครกรัม/มล. มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่เฉพาะเจาะจง ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมที่ IC₅₀ เท่ากับ ๓.๓ ไมโครกรัม/มล. มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ปานกลาง และมีฤทธิ์ต้านเชื้อเริม (Herpes Simplex Virus 1, HSV-1) ที่ดีมากโดยแสดงค่ายับยั้งเชื้อที่ IC₅₀ เท่ากับ ๐.๓ ไมโครกรัม/มล. แต่ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* หรือ dermatophytes.

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี ๑๑๐๐๐

†สำนักวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี ๑๑๐๐๐

‡ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ๑๐๔๐๐

เนื่องจากสารลูปินีโพลินมีฤทธิ์ที่ดีในการต้านไวรัสเริมและแยกได้ในปริมาณสูงจากลำต้นของชะเอมเหนือจึงได้มีการนำสารลูปินีโพลินจากชะเอมเหนือไปพัฒนาในรูปแบบครีมและเจลที่มีความเข้มข้นของสารลูปินีโพลินประมาณร้อยละ ๑-๕ เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อเริมชนิด HSV-1 ซึ่งเป็นเริมที่ทำให้เกิดแผลที่มีอาการปวดแสบปวดร้อนบริเวณริมฝีปาก พบว่าครีมที่มีลูปินีโพลินมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อเริมดี กว่ายาแผนปัจจุบัน acyclovir cream ในหลอดทดลองที่ค่า ร้อยละของสารออกฤทธิ์เท่ากัน^๖. อย่างไรก็ตามการนำสารลูปินีโพลินไปใช้เป็นยาทาแผลเริมที่บริเวณริมฝีปากหรือเยื่อช่อง ปาก ผู้ป่วยอาจกินยาเข้าร่างกายได้. ดังนั้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารลูปินีโพลินจาก ชะเอมเหนือในสัตว์ทดลองเพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ของสารลูปินีโพลินที่จะนำไปใช้ในคนต่อไป.

ระเบียบวิธีศึกษา

สมุนไพรชะเอมเหนือ

สมุนไพรชะเอมเหนือเก็บจากพื้นที่จังหวัดยโสธร และ ตระวจะชนิดพืชตามหลักอนุกรมวิธานพบว่า คือ *Derris reticulata* Craib (วงศ์สิดิถีย ฉั่วกุล ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล). ตัวอย่างพืชเก็บรักษาไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล (Voucher specimen PBM 02384).

สารลูปินีโพลิน

การเตรียมสารลูปินีโพลินโดย นพมาศ สุนทรเจริญนนท์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยสกัดลำต้นชะเอมเหนือด้วยตัวทำละลายเอทเธอร์วิธี soxhlet extraction นำ สารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกเพื่อให้เข้มข้นขึ้น จะได้ตะกอนแขวนลอยสีเหลือง กรองตะกอนที่ได้ และนำมา แยกให้บริสุทธิ์โดยการตกผลึกซ้ำด้วย acetone-n-hexane จะได้สารลูปินีโพลินที่มีลักษณะเป็นผลึกรูปแผ่นสีเหลือง ร้อยละ ๑ (โดยน้ำหนัก) สำหรับใช้ในการศึกษาพิษในสัตว์ ทดลองต่อไป.

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรพันธุ์ไอซอร์ นำหนักตัวระหว่าง ๒๐ ถึง ๒๒ กรัม จำนวน ๑๖ ตัว (เพศละ ๘ ตัว) และ หนูแรดพันธุ์วิสซาร์ จำนวน ๑๔๔ ตัว (เพศละ ๗๒ ตัว) น้ำหนักตัว ๑๓๐ ถึง ๑๕๐ กรัม ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลาฯ มหาวิทยาลัย มหิดล นำมาเลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลองระดับ conventional hygienic ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรม วิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ ๒๕+๑ องศา เซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๖๐ ได้รับแสงสว่างวันละ ๑๒ ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด และน้ำประปาไม่จำกัด ปริมาณ. ก่อนการศึกษาพิษเฉียบพลัน อดอาหารหนูถีบจักรเป็นเวลา ๒ ชั่วโมงและพักหนูแรดเป็นเวลา ๒ สัปดาห์ก่อนการทดลองพิษกึ่งเฉียบพลันเพื่อให้คุ้นเคยต่อ สภาวะแวดล้อม. โครงการศึกษาพิษของสารลูปินีโพลินจากชะเอมเหนือครั้งนี้ ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการการดูแล การเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เอกสารควบคุมโครงการ หมายเลข ๔๔-๐๐๗.

การเตรียมยาให้สัตว์ทดลอง

นำสารลูปินีโพลินมาแขวนตะกอนในสารละลาย tragacanth ๑% แล้วปรับให้ได้น้ำยาแขวนตะกอนที่มีความเข้มข้น ของสารลูปินีโพลินต่าง ๆ เพื่อใช้ในการทดสอบพิษต่อไป

การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารลูปินีโพลิน

ทำการทดสอบพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักร จำนวน ๑๖ ตัว แบ่งโดยวิธีสุ่มออกเป็น ๒ กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่มทดลองจำนวน ๑๐ ตัว (เพศละ ๕ ตัว) ได้รับสารลูปินีโพลินที่แขวนตะกอนใน tragacanth ๑% ทางปาก เป็นจำนวน ๒ ครั้ง ครั้งละ ๒.๕ ม./

กก. ห่างกัน ๖ ชั่วโมง. ส่วนกลุ่มควบคุมจำนวน ๖ ตัว (เพศละ ๓ ตัว) ได้รับสารละลาย tragacanth ๑% ทางปากในปริมาณ ๑๐ มล./กก. เป็นจำนวน ๒ ครั้งเช่นกัน. สังเกตอาการและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นอย่างใกล้ชิดใน ๕ ชั่วโมง แรกและทุกวัน พร้อมบันทึกจำนวนหนูที่ตาย. เมื่อครบกำหนด ๑๔ วันทำการุณยฆาตหนูโดยใช้เครื่องดมแก๊สคาร์บอนได-

ออกไซด์. จากนั้นผ่าซากชั้นสูตรตรวจหาความผิดปกติทาง มหาวิทยาลัยของอวัยวะภายใน

การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสารลูปีนโพลิน

แบ่งหนูแรดโดยวิธีสุ่มออกเป็น ๖ กลุ่ม กลุ่มละ ๒๔ ตัว (เพศผู้ ๑๒ ตัว และเพศเมีย ๑๒ ตัว). กลุ่มที่ ๑ เป็นกลุ่ม ควบคุมได้รับน้ำกลั่นทางปากในปริมาณวันละ ๑๐ มล./กก. กลุ่มที่ ๒ เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารละลาย tragacanth ๑% ทางปากขนาดวันละ ๑๐ มล./กก. กลุ่มที่ ๓ ถึง ๖ เป็นกลุ่ม ทดลองที่ได้รับสารลูปีนโพลินขนาดวันละ ๐.๖, ๖.๐, ๓๐ และ ๖๐ มก./กก. ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา ๒๘ วัน. ขนาดที่ 1 กำหนดให้ แก่หนูทดลองคิดเป็น ๑, ๑๐, ๕๐ และ ๑๐๐ เท่าของขนาดที่ 1 ใช้ในคน(โดยกำหนดว่าคนมีน้ำหนัก ๕๐ กก.ใช้คริมลูปีนโพลิน ๓%ปริมาณ ๑ กรัมทาเย็บช่องปากเท่ากับได้รับสารลูปีนโพลิน ปริมาณ ๓๐ มก. ดังนั้น ขนาดรักษาของสารลูปีนโพลิน (therapeutic dose, TD) 1 TD คือ ๓๐ มก./๕๐ กก. ซึ่งเท่ากับ ๐.๖ มก./กก.) ในระหว่างการทดลองสังเกตอาการ พฤติกรรมและ การเปลี่ยนแปลงต่างๆ ของหนูทุกวัน, บันทึกน้ำหนักตัว และ ปริมาณอาหารที่หนูกินสัปดาห์ละ ๓ ครั้ง (จันทร์, พุธ, ศุกร์) ถ้ามีหนูตายหรืออยู่ในภาวะใกล้ตายจะผ่าซากชั้นสูตรทันที. เมื่อหนูทดลองได้รับสารสกัดครบ ๒๘วันอดอาหารหนูเป็นเวลา ๑๖ ชั่วโมง. จากนั้นดมสลบหนูด้วยอีเทอร์ เปิดผ่าช่องท้อง เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ posterior vena cava นำไปตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Cell-Dyn® รุ่น ๓๕๐๐) เพื่อหาค่าทางโลหิตวิทยาได้แก่ ฮีมาโตคริต ฮีโม-โกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ค่าร้อยละเม็ด เลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล อีโอซิโนฟิล ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และเบโซฟิล ปริมาณเกล็ดเลือด ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ได้แก่ mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) และ mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). ส่วนซีรัมนำไปตรวจด้วย เครื่องวิเคราะห์เคมีเลือดอัตโนมัติ Hitachi® รุ่น 912 เพื่อวัด ค่าเอนไซม์อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส (ALT), แอลปาเทตอะมิโนทรานสเฟอเรส (AST), อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) โปรตีนรวม, อัลบูมิน.

บิลิวินรวม, ยูเรียไนโตรเจน, ครีอาตินีน, กลูโคส, กรดยูริก, ไตรกลีเซอไรด์, คอเลสเตอรอล, โซเดียม, โปแตสเซียม และคลอไรด์

จากนั้นผ่าซากหนูแรดเพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงทาง มหาวิทยาลัยของอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด ตับ ไต หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ม้าม ลำไส้ส่วน ต่าง ๆ ตับอ่อน อัณฑะ ต่อมลูกหมาก ถุงเก็บน้ำเชื้อ รังไข่ มดลูก ต่อมม้าม ต่อมมึนน้ำลาย ต่อมมึนตา ต่อมไทรอยด์ ต่อมหมวกไต และกระเพาะปัสสาวะ. บันทึกน้ำหนักอวัยวะที่สามารถชั่ง ได้ด้วยเครื่อง Mettler Toledo® รุ่น PB 153 เพื่อคำนวณหา น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (ก./น้ำหนักตัว ๑,๐๐๐ ก.) จากนั้น เก็บอวัยวะแช่ในน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้นร้อยละ ๑๐ แล้วนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อทางมีถุขวิทยาเพื่อตรวจหาความผิดปกติโดยพยาธิสัตว์แพทย์. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของน้ำหนักตัว, การกินอาหาร, ค่าทาง โลหิตวิทยา, ค่าสารเคมีคลินิก, และ น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ ใช้ วิธีสถิติเชิงพรรณนา. การทดสอบสมมติฐานใช้ one-way ANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Bonferoni test โดยโปรแกรม SPSS/PC version 11.5. ส่วนผลการตรวจ ทางจุลพยาธิวิทยาใช้ Fisher exact test.

ผลการศึกษา

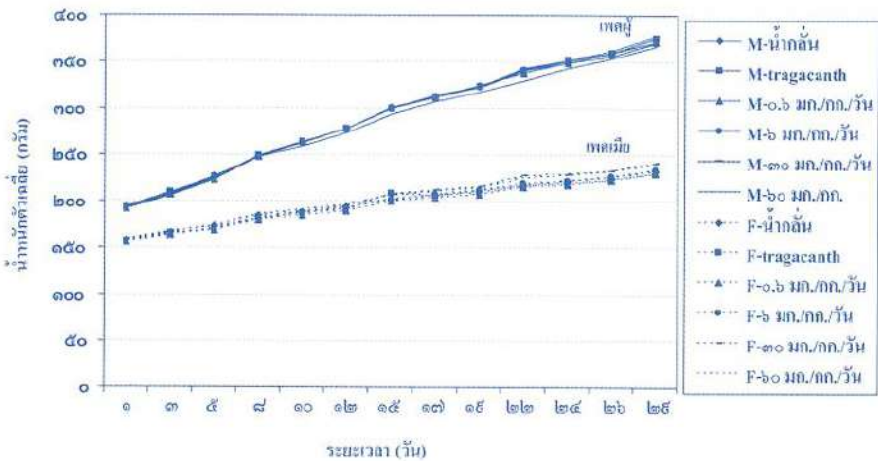
พิษเฉียบพลัน

การป้อนสารลูปีนโพลินทางปากแก่หนูถีบจักรสองครั้งใน ขนาดครั้งละ ๒.๕ ก./กก.ห่างกัน ๖ ชั่วโมง พบว่า ภายหลัง จากได้รับสารลูปีนโพลินครั้งที่ ๑ และครั้งที่ ๒ หนูถีบจักรไม่ แสดงอาการและพฤติกรรมผิดปกติ ใด ๆ เมื่อเปรียบเทียบ กับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารละลาย tragacanth ๑% เมื่อ ควบคุมกำหนด ๑๔ วัน พบว่า ไม่มีหนูตัวใดเสียชีวิตระหว่างการทดสอบ. ผลการผ่าซากชั้นสูตรตรวจอวัยวะทางพยาธิ วิทยาของหนูกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมไม่พบความผิดปกติ ใด ๆ

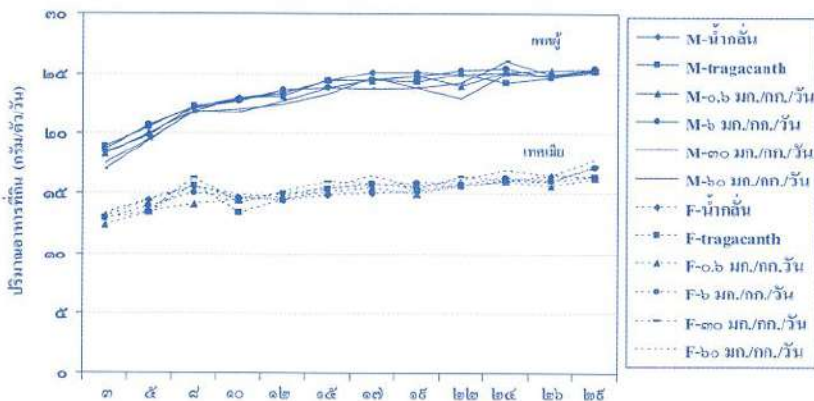
พิษกึ่งเฉียบพลัน

ผลต่อสุขภาพทั่วไป น้ำหนักตัวและน้ำหนักอาหารที่กินของหนู แรต

หนูแรตที่ได้รับสารลูปีโนโพลีลินขนาดวันละ ๐.๖, ๖.๐, ๓๐ และ ๖๐ มก./กก. เป็นเวลา ๒๘ วันมีสุขภาพ อารมณ์และ พฤติกรรมเป็นปกติไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยน้ำและกลุ่ม ควบคุมที่ได้รับ tragacanth และพบว่า มีค่าน้ำหนักตัวเฉลี่ย และการกินอาหารไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ ๑ และ รูปที่ ๒).



รูปที่ ๑ น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทั้งสองเพศ



รูปที่ ๒ ปริมาณอาหารที่กินของหนูทั้งสองเพศ

น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารลูปีโนโพลีลินขนาด ๖ และ ๖๐ มก./ กก./วัน มีค่าน้ำหนักสัมพันธ์ของม้ามสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วย น้ำอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth (ตารางที่ ๑).หนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปีโนโพลีลิน ทุกกลุ่มมีค่าน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ไม่แตกต่างจากกลุ่ม ควบคุมทั้งสองกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๒)

ตารางที่ ๑ น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (ก./นน.ตัว ๑๐๐๐ ก.) และน้ำหนักตัว (ก.) ของหนูแรดเพศผู้ที่ได้รับสารลูนิโฟลิน ๒๘ วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลองที่ได้รับสารลูนิโฟลิน (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	๐.๖	๖	๓๐	๖๐
สมอง	๕.๖๙±๐.๓๓	๕.๖๒±๐.๙๒	๕.๖๓±๐.๕๕	๕.๗๓±๐.๔๐	๕.๖๓±๐.๓๒	๕.๗๒±๐.๒๗
หัวใจ	๓.๓๑±๐.๑๘	๓.๒๗±๐.๒๒	๓.๑๕±๐.๒๒	๓.๒๕±๐.๒๔	๓.๒๘±๐.๒๙	๓.๓๐±๐.๒๘
ปอด	๔.๑๖±๐.๒๔	๓.๙๕±๐.๒๒	๓.๙๕±๐.๓๐	๔.๐๕±๐.๓๑	๓.๙๔±๐.๓๕	๔.๑๕±๐.๓๔
กระเพาะอาหาร	๔.๙๐±๐.๓๕	๔.๖๓±๐.๒๗	๔.๖๙±๐.๓๗	๔.๙๕±๐.๔๑	๔.๙๗±๐.๓๘	๔.๙๘±๐.๕๐
ตับ	๓๑.๙๖±๒.๐๓	๓๑.๑๗±๒.๖๔	๓๒.๐๕±๒.๓๖	๓๒.๓๒±๒.๘๖	๓๑.๗๓±๒.๙๘	๓๑.๑๒±๒.๖๔
ไตซ้าย	๒.๙๘±๐.๑๑	๓.๐๒±๐.๑๖	๓.๐๑±๐.๑๓	๓.๐๙±๐.๑๘	๓.๐๕±๐.๑๔	๓.๐๓±๐.๑๒
ไตขวา	๓.๑๒±๐.๑๒	๓.๐๖±๐.๒๒	๓.๒๒±๐.๑๗	๓.๒๑±๐.๑๗	๓.๑๗±๐.๑๖	๓.๑๒±๐.๒๑
ม้าม	๑.๙๖±๐.๒๑	๒.๐๓±๐.๑๖	๑.๙๙±๐.๒๑	๒.๒๕±๐.๒๐*	๒.๑๒±๐.๒๔	๒.๓๓±๐.๓๑
กระเพาะปัสสาวะ	๐.๓๕±๐.๐๗	๐.๓๕±๐.๐๖	๐.๓๕±๐.๐๖	๐.๓๕±๐.๐๔	๐.๓๕±๐.๐๖	๐.๓๕±๐.๐๖
อวัยวะชาย	๓.๐๖±๐.๖๓	๓.๑๕±๐.๑๕	๓.๑๖±๐.๑๕	๓.๒๕±๐.๑๗	๓.๑๗±๐.๑๖	๓.๒๕±๐.๑๖
อวัยวะขวา	๖.๘๕±๐.๓๑	๖.๘๘±๐.๓๘	๖.๙๐±๐.๓๖	๖.๙๕±๐.๓๗	๖.๙๕±๐.๓๙	๖.๙๖±๐.๓๖
ต่อมหมวกไตซ้าย	๐.๑๒±๐.๐๒	๐.๑๒±๐.๐๒	๐.๑๒±๐.๐๒	๐.๑๒±๐.๐๒	๐.๑๒±๐.๐๑	๐.๑๒±๐.๐๒
ต่อมหมวกไตขวา	๐.๑๑±๐.๐๒	๐.๑๑±๐.๐๒	๐.๑๑±๐.๐๒	๐.๑๑±๐.๐๒	๐.๑๑±๐.๐๒	๐.๑๒±๐.๐๒
น้ำหนักตัวเริ่มต้น	๑๙๙.๙๒±๓.๘๘	๑๙๙.๐๙±๕.๕๖	๑๙๙.๒๕±๒.๓๗	๑๙๙.๒๑±๒.๙๗	๑๙๙.๓๕±๕.๘๕	๑๙๙.๓๘±๗.๘๘
น้ำหนักตัวสิ้นสุดการทดลอง	๓๕๘.๘๓±๒๑.๕๐	๓๕๘.๕๒±๒๖.๗๐	๓๕๗.๖๔±๒๓.๐๔	๓๕๓.๕๐±๒๑.๘๓	๓๖๑.๔๐±๒๑.๑๗	๓๕๙.๕๐±๑๘.๕๕

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (๑๒ ตัว/กลุ่ม)
 *แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่ < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๒ น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (ก./นน.ตัว ๑๐๐๐ ก.) และน้ำหนักตัว (ก.) ของหนูแรดเพศเมียที่ได้รับสารลูนิโฟลิน ๒๘ วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลองที่ได้รับสารลูนิโฟลิน (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	๐.๖	๖	๓๐	๖๐
สมอง	๔.๖๑±๐.๓๖	๔.๖๒±๐.๕๕	๔.๕๓±๐.๔๐	๔.๕๘±๐.๔๘	๔.๖๕±๐.๕๗	๔.๙๔±๐.๕๓
หัวใจ	๓.๕๕±๐.๒๑	๓.๕๓±๐.๒๑	๓.๕๓±๐.๒๖	๓.๕๐±๐.๒๕	๓.๕๕±๐.๒๔	๓.๕๑±๐.๒๐
ปอด	๔.๙๕±๐.๓๓	๔.๘๓±๐.๓๘	๕.๐๐±๐.๓๕	๕.๐๐±๐.๓๕	๕.๐๖±๐.๓๑	๔.๙๑±๐.๔๕
กระเพาะอาหาร	๕.๙๑±๐.๔๔	๕.๘๐±๐.๕๙	๕.๘๙±๐.๗๒	๕.๘๕±๐.๕๒	๕.๗๐±๐.๕๗	๖.๐๙±๐.๖๐
ตับ	๓๑.๘๔±๒.๑๘	๓๑.๐๙±๑.๖๗	๓๑.๕๕±๑.๘๑	๓๑.๗๙±๒.๐๐	๓๑.๑๐±๑.๖๗	๓๑.๘๐±๒.๓๒
ไตซ้าย	๓.๓๔±๐.๒๗	๓.๒๕±๐.๒๑	๓.๒๕±๐.๒๒	๓.๑๘±๐.๑๗	๓.๒๒±๐.๒๗	๓.๑๘±๐.๒๒
ไตขวา	๓.๕๕±๐.๒๔	๓.๕๖±๐.๒๕	๓.๓๘±๐.๒๓	๓.๓๘±๐.๑๙	๓.๕๕±๐.๒๓	๓.๓๘±๐.๒๘
ม้าม	๒.๙๕±๐.๒๔	๒.๘๕±๐.๒๑	๒.๘๐±๐.๒๕	๒.๘๓±๐.๓๒	๒.๘๗±๐.๒๔	๒.๕๐±๐.๒๗
กระเพาะปัสสาวะ	๐.๓๖±๐.๐๔	๐.๓๖±๐.๐๕	๐.๓๕±๐.๐๕	๐.๓๖±๐.๐๗	๐.๓๕±๐.๐๕	๐.๓๙±๐.๐๖
รังไข่ซ้าย	๐.๓๖±๐.๐๗	๐.๓๗±๐.๐๘	๐.๓๙±๐.๐๘	๐.๓๗±๐.๑๑	๐.๓๗±๐.๐๗	๐.๔๑±๐.๑๒
รังไข่ขวา	๐.๓๓±๐.๐๖	๐.๓๗±๐.๑๓	๐.๓๖±๐.๐๘	๐.๓๖±๐.๐๘	๐.๓๖±๐.๐๗	๐.๓๓±๐.๑๐
มดลูก	๒.๘๑±๐.๖๕	๒.๘๐±๐.๗๙	๒.๒๒±๐.๘๘	๒.๔๐±๐.๗๘	๒.๒๒±๐.๖๗	๒.๐๓±๐.๓๖
ต่อมหมวกไตซ้าย	๐.๒๑±๐.๐๔	๐.๒๑±๐.๐๕	๐.๒๐±๐.๐๓	๐.๒๑±๐.๐๔	๐.๒๑±๐.๐๖	๐.๒๒±๐.๐๓
ต่อมหมวกไตขวา	๐.๑๙±๐.๐๔	๐.๒๐±๐.๐๓	๐.๒๐±๐.๐๔	๐.๑๙±๐.๐๔	๐.๑๙±๐.๐๕	๐.๒๒±๐.๐๔
น้ำหนักตัวเริ่มต้น	๑๘๔.๒๗±๗.๖๕	๑๘๖.๙๗±๖.๘๘	๑๘๖.๑๑±๕.๙๓	๑๘๖.๐๕±๖.๓๐	๑๘๕.๘๘±๗.๖๐	๑๘๗.๓๓±๖.๖๓
น้ำหนักตัวสิ้นสุดการทดลอง	๒๒๑๖.๖๗±๑๒.๗๘	๒๑๗๐.๗๙±๑๕.๕๕	๒๑๓๓.๑๒±๑๑.๓๕	๒๒๑๐.๕๒±๑๐.๐๖	๒๒๒๗.๙๐±๑๕.๖๓	๒๒๒๕.๓๙±๑๓.๐๕

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (๑๒ ตัว/กลุ่ม)

ค่าทางโลหิตวิทยา

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารลูปีนโพลินทุกกลุ่ม มีค่าทางโลหิต วิทยาไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๓). หนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปีนโพลินขนาด ๖๐ มก./ กก. /วัน มีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำ อย่างมีนัย

สำคัญ แต่มีค่าร้อยละนิวโทรฟิลต่ำกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ. หนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปีนโพลินขนาด ๖ , ๓๐ และ ๖๐ มก./กก./วัน รวมทั้งกลุ่มควบคุมที่ได้รับ traga- canth มีค่าร้อยละลิโพไซโตสูง กว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่าง มีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๔)

ตารางที่ ๓ ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูแรดเพศผู้ที่ได้รับสารลูปีนโพลิน ๒๘ วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลองที่ได้รับสารลูปีนโพลิน (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	๐.๖	๖	๓๐	๖๐
ฮีมาโตคริต (%)	๔๗.๗๗±๒.๕๘	๔๖.๒๖±๑.๖๓	๔๖.๕๖±๒.๒๒	๔๗.๒๓±๒.๐๐	๔๗.๕๘±๒.๓๔	๔๗.๑๒±๒.๔๑
ฮีโมโกลบิน (g/dl)	๑๕.๓๙±๑.๗๓	๑๔.๙๗±๑.๔๕	๑๕.๑๐±๑.๘๔	๑๕.๒๕±๑.๖๐	๑๕.๓๕±๑.๖๓	๑๕.๒๕±๑.๖๗
เม็ดเลือดแดง(x ๑๐๖cells/μl)	๘.๑๗±๑.๕๓	๗.๙๕±๑.๔๓	๗.๙๔±๑.๔๔	๘.๐๕±๑.๔๐	๘.๐๑±๑.๓๖	๘.๐๗±๑.๔๖
MCV (fl/red cell)	๕๘.๔๔±๑.๖๒	๕๘.๒๘±๒.๓๗	๕๘.๖๕±๒.๓๓	๕๘.๗๑±๑.๓๗	๕๙.๕๐±๑.๕๐	๕๘.๖๓±๑.๔๐
MCH (pg/red cell)	๑๘.๘๔±๑.๕๘	๑๘.๘๗±๑.๕๓	๑๙.๐๐±๑.๗๕	๑๘.๙๕±๑.๕๐	๑๙.๑๘±๑.๖๙	๑๘.๘๙±๑.๓๗
MCHC (g/dl RBC)	๓๒.๒๖±๑.๕๖	๓๒.๓๙±๑.๓๑	๓๒.๕๖±๑.๕๓	๓๒.๓๐±๑.๖๙	๓๒.๒๕±๑.๕๘	๓๒.๒๕±๑.๓๙
เม็ดเลือดขาว (K/ μl)	๓.๗๘±๑.๗๕	๓.๕๕±๑.๕๘	๓.๓๙±๑.๐๗	๓.๕๐±๑.๗๕	๓.๓๓±๑.๕๗	๓.๕๐±๑.๕๓
นิวโทรฟิล (%)	๑๓.๐๘±๒.๒๕	๑๒.๖๕±๒.๒๖	๑๒.๕๕±๒.๑๘	๑๖.๖๓±๒.๙๕	๑๕.๕๕±๒.๕๓	๑๘.๐๐±๒.๖๖
อีโอซิโนฟิล (%)	๑.๓๗±๑.๕๙	๑.๕๖±๑.๕๙	๑.๕๒±๑.๕๕	๑.๓๑±๑.๔๖	๑.๕๒±๑.๖๕	๑.๒๕±๑.๕๑
ลิมโฟไซท์ (%)	๘๒.๕๑±๑.๓๕	๘๐.๓๕±๑.๗๕	๗๗.๘๕±๑.๐๓	๗๙.๖๙±๑.๕๕	๗๘.๕๙±๑.๕๑	๗๘.๖๖±๒.๕๖
โมโนไซท์ (%)	๒.๐๕±๑.๕๑	๒.๐๕±๑.๕๕	๒.๐๗±๑.๕๑	๑.๕๐±๑.๕๘	๒.๓๙±๑.๑๑	๑.๖๖±๑.๖๕
แบซิฟิล (%)	๑.๑๒±๑.๕๙	๑.๐๘±๑.๕๓	๑.๑๒±๑.๕๑	๑.๕๘±๑.๒๓	๑.๓๕±๑.๖๖	๑.๓๕±๑.๒๕
เกล็ดเลือด (K/ μl)	๑๒๔๒.๓๗±๑๐๙.๙๐	๑๓๓๕.๖๕±๑๑๑.๙๓	๑๑๕๕.๗๙±๑๒๙.๕๖	๑๓๗๗.๑๗±๑๗๑.๖๗	๑๑๕๖.๙๐±๑๑๘.๕๖	๑๑๕๙.๗๒±๑๐๖.๙๘

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (๑๒ ตัว/กลุ่ม)

ตารางที่ ๔ ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูแรดเพศเมียที่ได้รับสารลูปีนโพลิน ๒๘ วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลองที่ได้รับสารลูปีนโพลิน (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	๐.๖	๖	๓๐	๖๐
ฮีมาโตคริต (%)	๔๖.๗๐±๒.๔๗	๔๕.๘๗±๑.๘๐	๔๕.๕๗±๒.๕๙	๔๗.๕๗±๒.๖๖	๔๗.๓๐±๒.๒๔	๔๗.๙๑±๒.๗๖
ฮีโมโกลบิน (g/dl)	๑๔.๙๓±๑.๘๑	๑๔.๘๘±๑.๖๕	๑๔.๙๓±๑.๐๐	๑๕.๑๓±๑.๗๕	๑๕.๒๐±๑.๗๖	๑๕.๓๓±๑.๙๗
เม็ดเลือดแดง(x ๑๐๖cells/μl)	๗.๙๕±๑.๕๕	๗.๗๒±๑.๑๘	๗.๗๘±๑.๐๐	๘.๐๖±๑.๕๐	๗.๙๗±๑.๓๔	๘.๐๓±๑.๒๙
MCV (fl/red cell)	๕๘.๕๗±๑.๙๗	๕๙.๕๕±๒.๓๗	๕๘.๖๑±๒.๑๕	๕๘.๘๙±๑.๒๓	๕๙.๓๕±๒.๖๖	๕๙.๖๕±๒.๔๕
MCH (pg/red cell)	๑๘.๗๒±๑.๓๓	๑๙.๒๙±๑.๘๕	๒๐.๖๐±๒.๕๘	๑๘.๗๗±๑.๕๑	๑๙.๐๖±๑.๐๐	๑๙.๐๖±๑.๙๙
MCHC (g/dl RBC)	๓๐.๙๗±๑.๒๖	๓๒.๔๓±๑.๖๑	๓๕.๒๒±๑.๑๒๗	๓๑.๘๖±๑.๗๙	๓๒.๑๒±๑.๕๐	๓๑.๙๕±๑.๕๑
เม็ดเลือดขาว (K/ μl)	๒.๔๓±๑.๗๖	๒.๖๖±๑.๐๘	๒.๙๕±๑.๙๑	๒.๗๓±๑.๓๓	๓.๐๒±๑.๖๓	๓.๓๑±๑.๑๓*
นิวโทรฟิล (%)	๒๑.๒๙±๕.๕๒	๑๓.๙๕±๔.๖๖	๑๖.๗๐±๕.๗๕	๑๓.๒๓±๓.๖๓	๑๖.๖๙±๒.๖๒	๑๖.๕๕±๒.๖๕*
อีโอซิโนฟิล (%)	๑.๔๐±๑.๖๙	๑.๒๙±๑.๕๗	๑.๓๔±๑.๕๑	๑.๑๒±๑.๓๗	๑.๓๑±๑.๕๖	๑.๕๕±๑.๕๕
ลิมโฟไซท์ (%)	๗๗.๕๕±๔.๗๙	๘๒.๑๙±๓.๗๙	๗๘.๗๐±๕.๕๕	๘๓.๓๐±๓.๗๖*	๘๓.๕๗±๒.๘๕*	๘๕.๐๐±๓.๕๕*
โมโนไซท์ (%)	๒.๗๑±๑.๗๖	๑.๕๕±๑.๐๗	๒.๑๒±๑.๒๕	๑.๕๐±๑.๕๖	๑.๕๘±๑.๗๕	๑.๓๗±๑.๐๘
แบซิฟิล (%)	๑.๐๕±๑.๓๙	๐.๙๕±๑.๓๕	๑.๑๒±๑.๕๐	๑.๙๖±๑.๒๗	๑.๙๖±๑.๒๖	๑.๑๒±๑.๒๒
เกล็ดเลือด (K/ μl)	๑๑๗๕.๒๕±๑๕๘.๕๑	๑๐๙๕.๘๕±๑๙๙.๗๙	๑๑๒๗.๕๐±๑๕๘.๑๓	๑๑๗๗.๗๙±๑๖๑.๕๐	๑๑๗๖.๘๕±๑๖๓.๕๐	๑๒๑๑.๑๕±๑๓๕.๕๑

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (๑๒ ตัว/กลุ่ม)

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพ < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๕ ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับสารลูปีนโพลีน ๒๘ วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลองที่ได้รับสารลูปีนโพลีน (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	๐.๖	๖	๓๐	๖๐
ALT (U/L)	๒๗.๐๘±๒๒.๒๓	๒๙.๓๘±๒๓.๘๗	๒๖.๕๐±๒๔.๘๘	๒๙.๕๘±๒๓.๗๓	๒๗.๑๗±๒๓.๕๙	๒๘.๕๒±๒๓.๘๐
AST (U/L)	๙๙.๓๙±๑๑.๙๖	๑๑๒.๒๕±๒๖.๘๓	๑๐๑.๙๗±๑๗.๙๘	๑๐๑.๕๘±๑๑.๖๓	๑๐๖.๐๘±๑๓.๘๐	๑๐๐.๐๘±๕.๗๒
ALP (U/L)	๙๘.๐๘±๖๖.๒๐	๙๘.๘๓±๑๕.๙๒	๙๙.๒๕±๖๖.๙๖	๑๐๕.๐๘±๓๕.๕๑	๑๐๘.๖๗±๑๐.๓๗	๙๕.๓๙±๑๕.๗๙
BUN (mg/dl)	๓๗.๑๖±๒๑.๑๙	๑๘.๐๗±๑.๖๐	๑๙.๑๕±๒.๑๙	๑๓.๒๕±๒.๒๐	๑๘.๑๗±๑.๙๘	๑๗.๖๕±๒.๓๘
ครีเอตินีน (mg/dl)	๐.๘๘±๐.๐๕	๐.๘๗±๐.๐๕	๐.๘๕±๐.๐๘	๐.๘๖±๐.๐๗	๐.๘๖±๐.๐๘	๐.๘๕±๐.๐๗
โปรตีนรวม (g/dl)	๖.๓๙±๐.๒๐	๖.๒๒±๐.๑๕	๖.๒๓±๐.๑๖	๖.๒๗±๐.๒๖	๖.๓๖±๐.๒๕	๖.๓๕±๐.๒๕
อัลบูมิน (mg/dl)	๕.๘๖±๐.๑๘	๕.๘๓±๐.๑๙	๕.๘๕±๐.๑๘	๕.๘๕±๐.๒๐	๕.๘๕±๐.๑๓	๕.๘๕±๐.๑๗
บิลิรูบินรวม (mg/dl)	๐.๐๘±๐.๐๒	๐.๐๘±๐.๐๓	๐.๑๗±๐.๐๓	๐.๐๙±๐.๐๒	๐.๑๐±๐.๐๓	๐.๑๐±๐.๐๒
กลูโคส (mg/dl)	๒๐๑.๒๒±๒๒.๒๘	๑๘๓.๙๓±๒๘.๗๖	๑๘๓.๗๑±๒๕.๒๗	๑๘๘.๒๒±๒๒.๒๙	๑๘๓.๕๓±๒๕.๖๕	๑๗๒.๖๕±๒๕.๖๖
กรดยูริก (mg/dl)	๒.๗๖±๐.๓๓	๑.๖๗±๐.๕๕	๑.๙๕±๐.๑๘	๑.๙๙±๐.๑๙	๒.๐๓±๐.๑๘	๑.๕๕±๐.๕๗
ไตรกลีเซอไรด์ (mg/dl)	๙๒.๓๒±๒๕.๐๘	๘๐.๕๘±๒๒.๒๖	๙๘.๒๒±๒๒.๕๕	๖๗.๘๖±๑๕.๓๙	๖๙.๗๘±๑๙.๘๘	๗๒.๙๓±๒๖.๙๐
คอเลสเตอรอล (mg/dl)	๕๖.๖๕±๗.๙๘	๕๖.๕๓±๖.๖๖	๕๐.๕๑±๕.๑๘	๕๒.๘๘±๗.๗๓	๕๖.๐๘±๙.๑๑	๕๓.๙๕±๖.๓๘
โซเดียม (mmol/l)	๑๕๘.๙๒±๐.๙๐	๑๕๘.๑๗±๑.๑๑	๑๖๑.๐๘±๑.๑๖	๑๖๑.๒๕±๑.๑๘	๑๖๑.๕๘±๑.๕๘	๑๖๑.๘๘±๑.๑๙
โปแตสเซียม (mmol/l)	๕.๕๕±๐.๖๗	๕.๖๖±๐.๑๑	๕.๙๘±๐.๓๘	๕.๘๕±๐.๑๗	๕.๕๒±๐.๑๘	๕.๗๑±๐.๑๕
คลอไรด์ (mmol/l)	๑๐๓.๖๒±๑.๕๐	๑๐๕.๕๘±๐.๑๘	๑๐๕.๗๕±๑.๓๗	๑๐๕.๗๕±๑.๕๘	๑๐๕.๕๐±๑.๒๕	๑๐๕.๐๘±๑.๕๕

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (๑๒ ตัว/กลุ่ม)
 *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่ < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๖ ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับสารลูปีนโพลีน ๒๘ วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลองที่ได้รับสารลูปีนโพลีน (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	๐.๖	๖	๓๐	๖๐
ALT (U/L)	๒๒.๖๓±๓.๕๒	๑๙.๐๐±๐.๓๑	๒๐.๕๐±๓.๕๕	๒๑.๒๗±๓.๑๖	๒๒.๕๕±๑๐.๐๗	๒๐.๐๘±๓.๕๕
AST (U/L)	๙๑.๐๐±๑๖.๘๓	๑๐๐.๕๘±๑๙.๓๙	๙๙.๒๕±๒๕.๕๕	๙๙.๐๐±๒๑.๑๐	๙๐.๒๗±๑๙.๒๖	๘๙.๓๕±๑๐.๙๑
ALP (U/L)	๕๕.๐๐±๙.๗๗	๕๖.๘๓±๑๓.๕๑	๕๓.๕๐±๑๗.๙๓	๕๕.๖๕±๑๕.๐๙	๖๐.๘๒±๒๖.๐๐	๕๕.๕๘±๑๗.๒๕
BUN (mg/dl)	๒๓.๐๗±๕.๘๐	๒๒.๒๕±๒.๖๐	๒๑.๓๗±๕.๑๑	๒๒.๖๕±๒.๕๕	๒๒.๗๙±๓.๙๒	๒๑.๘๖±๓.๐๗
ครีเอตินีน (mg/dl)	๐.๕๘±๐.๐๓	๐.๕๐±๐.๐๘	๐.๕๙±๐.๐๘	๐.๕๒±๐.๑๐	๐.๕๓±๐.๑๕	๐.๕๐±๐.๐๙
โปรตีนรวม (g/dl)	๖.๓๖±๐.๒๖	๖.๒๖±๐.๒๕	๖.๓๙±๐.๒๖	๖.๔๘±๐.๒๘	๖.๕๘±๐.๒๕	๖.๔๕±๐.๒๘
อัลบูมิน (mg/dl)	๕.๗๓±๐.๒๒	๕.๖๕±๐.๑๐	๕.๗๓±๐.๒๐	๕.๘๕±๐.๒๓	๕.๗๗±๐.๒๒	๕.๗๓±๐.๒๒
บิลิรูบินรวม (mg/dl)	๐.๑๑±๐.๐๘	๐.๑๑±๐.๐๓	๐.๑๐±๐.๐๓	๐.๑๒±๐.๐๓	๐.๑๓±๐.๐๓	๐.๑๒±๐.๐๓
กลูโคส (mg/dl)	๑๓๓.๘๖±๒๒.๘๙	๑๒๒.๘๓±๒๕.๒๕	๑๒๙.๙๖±๑๖.๕๑	๑๓๐.๓๘±๑๑.๗๒	๑๒๘.๙๐±๑๓.๗๖	๑๓๗.๘๘±๒๕.๓๑
กรดยูริก (mg/dl)	๒.๐๕±๐.๓๖	๑.๕๒±๐.๕๖	๑.๖๗±๐.๓๗	๑.๗๘±๐.๒๖	๑.๕๕±๐.๕๕	๑.๕๗±๐.๓๙
ไตรกลีเซอไรด์ (mg/dl)	๓๑.๕๗±๕.๒๐	๓๓.๒๒±๕.๓๑	๓๒.๖๕±๓.๓๙	๓๓.๕๓±๖.๙๐	๓๖.๕๕±๑๐.๓๙	๓๙.๕๕±๑๑.๓๓
คอเลสเตอรอล (mg/dl)	๕๐.๐๖±๗.๕๑	๕๕.๙๘±๘.๗๑	๕๕.๐๑±๙.๑๗	๕๕.๘๑±๙.๓๒	๕๗.๕๖±๑๐.๑๒	๕๕.๑๘±๑๕.๕๖
โซเดียม (mmol/l)	๑๕๕.๓๕±๑.๘๓	๑๕๕.๕๕±๐.๖๘	๑๕๖.๖๗±๑.๘๑	๑๕๖.๒๗±๑.๕๓	๑๕๖.๕๒±๑.๒๕	๑๕๗.๒๕±๐.๗๕*
โปแตสเซียม (mmol/l)	๕.๖๗±๐.๓๙	๕.๘๒±๐.๕๕	๕.๗๒±๐.๕๘	๕.๙๕±๐.๓๘	๕.๓๘±๐.๕๕	๕.๓๕±๐.๖๒*
คลอไรด์ (mmol/l)	๑๐๗.๓๕±๑.๑๕	๑๐๗.๙๒±๑.๕๐	๑๐๘.๑๗±๑.๗๕	๑๐๗.๕๕±๑.๖๙	๑๐๗.๗๗±๑.๒๗	๑๐๗.๕๐±๑.๐๙

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (๑๒ ตัว/กลุ่ม)
 *แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่ < ๐.๐๕)

ค่าเคมีคลินิก

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารลูปีนิโฟลินขนาด ๖๐ มก./กก./วัน มีระดับกรดยูริกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ. หนูเพศผู้ที่ได้รับสารลูปีนิโฟลินขนาด ๓๐ และ ๖๐ มก./กก. วัน มีระดับโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าระดับคอโรลของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารลูปีนิโฟลินขนาด ๖ มก./กก./วัน สูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัย สำคัญ (ตารางที่ ๕). หนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปีนิโฟลินขนาด ๖๐ มก./กก./วัน มีระดับโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่าง มีนัยสำคัญ. ระดับโปแตสเซียมของหนูเพศเมียที่ได้รับสาร ลูปีนิโฟลินขนาด ๓๐ และ ๖๐ มก./กก./วัน มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม ควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth (ตารางที่ ๖)

ตารางที่ ๗ อธิบายการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารลูปีนิโฟลิน ๒๘ วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

อวัยวะ	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลองที่ได้รับสารลูปีนิโฟลิน (มก./กก./วัน)			
		น้ำกลั่น	Tragacanth	๐.๖	๖	๓๐	๖๐
ปอด	Lymphoid proliferated bronchioles	๐/๑๒	๐/๑๒	๓/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
ตับ	Fatty degeneration (+๑)	๐/๑๒	๗/๑๒*	๒/๑๒**	๑/๑๒**	๖/๑๒*	๐/๑๒**
ลำไส้เล็ก	GALT proliferation	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๒/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
ลำไส้ใหญ่	GALT proliferation	๐/๑๒	๔/๑๒*	๐/๑๒	๒/๑๒	๑/๑๒	๐/๑๒

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของจำนวนหนูที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่<๐.๐๕)

**แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วย tragacanth อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่<๐.๐๕)

+๑= mild degree

ตารางที่ ๘ อธิบายการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปีนิโฟลิน ๒๘ วัน เทียบกับกลุ่มควบคุม

อวัยวะ	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลองที่ได้รับสารลูปีนิโฟลิน (มก./กก./วัน)			
		น้ำกลั่น	Tragacanth	๐.๖	๖	๓๐	๖๐
ปอด	Lymphoid proliferated bronchioles	๐/๑๒	๔/๑๒	๓/๑๒	๐/๑๒	๖/๑๒	๔/๑๒
ตับ	Fatty degeneration (+๑)	๐/๑๒	๘/๑๒*	๒/๑๒**	๒/๑๒**	๑๑/๑๒*	๑/๑๒**
ไต	Hydronephrosis	๐/๑๒	๑/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๑/๑๒	๐/๑๒
ลำไส้เล็ก	GALT proliferation	๐/๑๒	๑/๑๒	๑/๑๒	๑/๑๒	๒/๑๒	๒/๑๒
ลำไส้ใหญ่	GALT proliferation	๑/๑๒	๑/๑๒	๑/๑๒	๑/๑๒	๒/๑๒	๒/๑๒
ต่อมน้ำลาย	Lymphocytic adenitis	๐/๑๒	๑/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของจำนวนหนูที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่<๐.๐๕)

**แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วย tragacanth อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่<๐.๐๕)

+๑= mild degree

การตรวจอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยา

หนูเพศผู้และเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารลูปีนิโฟลินขนาด ๓๐ มก./กก./วัน และกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth มี อธิบายการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับเสื่อมแบบมีไขมันระดับอ่อนสูงกว่า กลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ. หนูเพศเมียที่ได้รับสาร ลูปีนิโฟลินขนาด ๓๐ และ ๖๐ มก./กก./วัน และกลุ่มควบคุม ที่ได้รับ tragacanth มีอธิบายการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ลิมโฟอิด ในปอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัย สำคัญ. การเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ที่พบในหนูที่ได้รับสาร ลูปีนิโฟลินมี อธิบายการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (ตารางที่ ๗ และ ๘)

วิจารณ์

ผลการทดสอบพิษเฉียบพลันของสารลูปีโนลินในหนูถีบ จักรโดยป้อนทางปากในขนาด ๒.๕ ก./กก. จำนวน ๒ ครั้ง ห่างกัน ๖ ชั่วโมง คิดเป็นขนาดสารลูปีโนลินที่ได้รับภายในหนึ่งวัน คือ ๕.๐ ก./กก. ไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลัน หรือความผิดปกติของอวัยวะทางมหัพยาศวิทยา รวมทั้งไม่มี หนูเสียชีวิต ดังนั้นขนาดของสารลูปีโนลินที่ทำให้หนูถีบ จักร ตายร้อยละ ๕๐ (LD₅₀) ควรมีค่ามากกว่า ๕.๐ ก./กก. และขนาด ที่ทดสอบพิษเฉียบพลันครั้งนี้สูงกว่าขนาดที่ใช้รักษา (๐.๖ มก./กก.) ประมาณ ๘,๓๐๐ เท่า การศึกษาถึงพิษเฉียบพลันของสารลูปีโนลินในหนูแรด พันธุ์สวิสทาร์โดยวิธีกรอกทางปาก ในขนาด ๐.๖, ๖, ๓๐ และ ๖๐ มก./กก./วัน เป็นเวลา ๒๘ วัน พบว่า สารลูปีโนลินไม่ ทำให้หนูมีอาการ สุขภาพและพฤติกรรมรบกวน น้ำหนักตัวเฉลี่ย และการกินอาหารแตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม น้ำหนักสัมพัทธ์ของม้ามมีค่าสูงขึ้นในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด ลูปีโนลินขนาด ๖ และ ๖๐ มก./กก./วัน แต่ผลการตรวจทางจุลพยาธิของม้ามก็ไม่พบความผิดปกติแต่อย่างใด. จากการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาในหนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปีโนลินขนาด ๖๐ มก./กก./วัน พบปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญนั้นยังคงอยู่ในช่วงค่าอ้างอิงของหนูเพศเมีย^๕. ส่วนการลดลงของนิวโทรฟิลอย่างมีนัยสำคัญยังอยู่ในช่วงค่า ปกติของหนูแรด^๕. การเพิ่มขึ้นของลิมโฟไซต์ในหนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปีโนลินขนาดตั้งแต่ ๖ มก./กก./วัน ขึ้นไปอยู่ในช่วงค่าปกติ^๕ อีกทั้งยังพบได้ในหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth ด้วย ดังนั้นจึงไม่น่าจะเกิดจากสารลูปีโนลิน. หนูเพศผู้ที่ได้รับสารลูปีโนลินขนาด ๖๐ มก./กก./วัน มีระดับกรด ยูริกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติของหนูแรด^๕. ระดับโซเดียมที่เพิ่มขึ้นในหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารลูปีโนลินขนาด ๓๐ และ ๖๐ มก./กก./วัน รวมทั้งในหนูเพศ เมียที่ได้รับสารลูปีโนลินขนาด ๖๐ มก./กก./วัน นั้นอยู่ใน ช่วงค่าปกติ^๕ และเป็นการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยที่ไม่มีนัยทาง พยาธิวิทยาคลินิก. ระดับคลอไรด์ของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารลูปีโนลินขนาด ๖.๐

ก./กก./วัน สูงขึ้นเพียงกลุ่มเดียวอย่างไม่ สัมพันธ์กับขนาดและอยู่ในช่วงค่าปกติ^๕ จึงไม่อาจกล่าว่าเกิดจากสารลูปีโนลิน ระดับโปแตสเซียมที่ลดลงอย่างมีนัย สำคัญในหนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปีโนลินขนาดวันละ ๓๐ และ ๖๐ มก./กก./วันมีค่าต่ำกว่าช่วงค่าปกติของหนูแรด^๕ การลดลงของโปแตสเซียมในเลือดอาจเกิดจากสาเหตุบางประการ เช่น มีการสูญเสียทางไตเพิ่มขึ้น, เมแทบอลิกอัลคาโลซิส, การสูญเสียจากอาเจียน และท้องเสีย^๕ ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้ ตรวจหาโปแตสเซียมในปัสสาวะและค่าไบคาร์บอเนต จึงขาด หลักฐานสนับสนุน. อย่างไรก็ตาม หนูทั้งสองกลุ่มดังกล่าวไม่ แสดงอาการผิดปกติใด ๆ ที่สอดคล้องกับภาวะโปแตสเซียม ต่ำ.

การเสื่อมของเซลล์ตับมีอุบัติการณ์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่ได้รับสารลูปีโนลินขนาด ๓๐ มก./กก./วัน เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สัมพันธ์กับขนาด และยังพบอุบัติการณ์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูกลุ่มควบคุมด้วย tragacanth ในทำนองเดียวกันกับการเพิ่มเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ปอด ของหนูเพศเมียที่ได้รับสารลูปีโนลินขนาดวันละ ๓๐ และ ๖๐ มก./กก. มีอุบัติการณ์และระดับการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สัมพันธ์ กับขนาดอีกทั้งพบได้อย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ tragacanth ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่ตับและปอด จึงไม่น่า เกิดจากสารลูปีโนลิน ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิ วิทยาของไต ลำไส้ และต่อมน้ำลาย มีอุบัติการณ์ที่ไม่แตกต่าง จากกลุ่มควบคุมด้วยน้ำและ tragacanth จึงไม่ได้เกิดจากสารลูปีโนลิน

สรุป

การศึกษาพิษของสารลูปีโนลินจากชะเอมเหนือ พบว่า เมื่อให้สารลูปีโนลินแก่หนูถีบจักรทางปากในขนาด ๕.๐ ก./กก. (โดยแบ่งให้สองครั้ง ครั้งละ ๒.๕ ก./กก.) ไม่ทำให้เกิดพิษ เฉียบพลันและการเปลี่ยนแปลงทางมหัพยาศวิทยาของอวัยวะ. ผลการศึกษาพิษถึงเฉียบพลันในหนูแรด โดยป้อนสารลูปีโนลินทางปากขนาดวันละ ๐.๖, ๖.๐, ๓๐ และ ๖๐ มก./กก. (หรือเทียบเท่ากับ ๑, ๑๐, ๕๐ และ ๑๐๐ เท่าของขนาดที่ใช้รักษา) เป็นระยะเวลา ๒๘ วัน พบว่าสาร

ลูปีนินโฟลีนไม่มีผลต่อน้ำหนัก ตัว สุขภาพ พฤติกรรม และการกินอาหารของหนู. หนูเพศเมีย ที่ได้รับสารลูปีนินโฟลีนขนาดวันละ ๖๐ มก./กก. มีปริมาณเม็ต เลือดขาวสูงขึ้น ส่วนนิวโทรฟิลลดลงแต่อยู่ในช่วงค่าปกติ. สารลูปีนินโฟลีนที่ขนาดวันละ ๓๐ และ ๖๐ มก./กก. มีแนวโน้มทำให้ระดับโปรตีนของหนูเพศเมียลดลง แต่เนื่องจากสารลูปีนินโฟลีนใช้เป็นยาทาแผลเริ่มและขนาดที่ใช้ต่ำกว่าที่ ป้อนทางปากให้แก่หนูทดลอง ดังนั้น โอกาสที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ เป็นไปได้น้อยมาก. นอกจากนี้ สารลูปีนินโฟลีนไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของอวัยวะภายใน สรุปลงได้ว่า สารลูปีนินโฟลีนจากลำต้นชะเอมเหนือนีมีความปลอดภัยเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นยารักษาแผลเริ่ม

กิตติกรรมประกาศ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติให้ทุนอุดหนุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ ๒๕๔๙. รศ.นสพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ได้ช่วยตรวจสไลด์อวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา.

เอกสารอ้างอิง

1. Smalberger TM, Vleggaar R, Weber JC. Flavanoids from Tephrosia-VII. The constitution and absolute configuration of lupinifolin and lupinifolinol, two flavanones from *Tephrosia lupinifolia*. *Tetrahedron* 1974;30:3927-31.
2. Lin YL, Chen YL, Kuo YH. Three new flavonoids, 3'-methoxylupinifolin, laxifolin, and isolaxifolin from the roots of *Derris laxiflora* Benth. *Chem Pharm Bull* 1991;39:3132-5.
3. Shirataki Y, Matsuoka S, Komatsu M, Ohyama M, Tanaka T, Iinuma M. Four isoflavanones from roots of *Sophora tetraptera*. *Phytochemistry* 1999;50:695-701.
4. Mahidol C, Prawat H, Ruchirawat S, Likhitwitayawuid K, Lin LZ, Cordell GA. Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. *Phytochemistry* 1997; 45:825-9.
5. Soonthornchareonnon N, Ubonopas L, Kaewsawan S, Wuthi-Udomlert M. Lupinifolin, a bioactive flavanone from *Myriopieron extensum* (Wight) K. Schum. Stem. *Thai Journal of Phytopharmacy* 2004;11:19- 28.

6. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาต้านเริ่มจากสารลูปีนินโฟลีน. ใน: สุวันทา สมพงษ์, นิตยา พุทธิโกษา, สุภาพร โชคเฉลิม วงศ์, ทวีธา อาสา บำรุงไทย, อุมารินทร์ เฉิดโฉม (บรรณาธิการ). การ เผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาสมุนไพรเพื่ออุตสาหกรรม; ๒๔-๒๕ กันยายน ๒๕๔๙; ณ โรงแรมเมริเดียน แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพมหานคร : ภารกิจโครงการและประสานงานวิจัย สำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ; ๒๕๔๑ หน้า ๔๒๖-๔๓๐.
7. เยาวลักษณ์ พิมพ์นอก, อังสนา โยธินาร์กษ์, ทศวัต จรุงเกตุ. ค่าอ้างอิงทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิกในเลือดหนูแรทสายพันธุ์วิสตา วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๒๕๔๖;๔๕(๑): ๒๗-๓๖.
8. Gad SC. The rat. In: *Gad SC, Chengellis CP, editors. Animal models in toxicology.* New York : Marcel Dekker. 1992. P.81.
9. Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of veterinary clinical pathology.* Ames : Iowa State Press ; 2002.

ABSTRACT

Toxicity Study of Lupinifolin from Stem of *Derris reticulata* Craib
Songpol Chivapat*, ‡, Pranee Chavalittumrong †, Aimmanas Attawish*,
Noppamas Soonthornchareonnon#

*Medicinal Plant Research Institute, †Senior Technical Office, Department of Medical Sciences
‡Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, #Corresponding author

Lupinifolin is a flavonone compound expressing high efficacy against Herpes simplex virus 1 (HSV-1). The objective of this study was to investigate the toxicity of lupinifolin from the stem of *Derris reticulata* Craib. Oral administration of lupinifolin in mice at the dose of 5 mg/kg, which was equivalent to an 8,300-fold therapeutic dose, showed no acute toxicity. A subacute toxicity study was performed on six groups of Wistar rats for 28 days. Groups 1 and 2 were control groups given distilled water and 1 percent tragacanth, respectively. Groups 3 to 6 were administered lupinifolin orally at doses of 0.6, 6.0, 3.0 and 60mg/kg/day, which were equivalent to 1, 10, 50 and 100 times the therapeutic dose, respectively. The results revealed that lupinifolin did not affect body weight, food consumption or the animals' health. Female rats receiving lupinifolin at the dose of 60 mg/kg/day had a significant increase in WBC and a significant decrease in neutrophils when compared with the water control group, but these changes were within normal ranges. Male rats receiving lupinifolin at doses of 30 and 60 mg/kg/day and female rats receiving lupinifolin at 60mg/kg/day had a significantly higher sodium level than the water control groups ; nevertheless, the increase was within the normal range. The potassium level in female rats receiving lupinifolin at doses of 30 and 60 mg/kg/day was significantly lower than that of the water control group. Histopathological results of some visceral organs in the lupinifolin-treated groups showed no dose-dependent alterations ; therefore, lupinifolin from *D. reticulata* should be considered safe for the treatment of HSV1-infected wounds.

Key words: Lupinifolin, *Derris reticulata*, toxicity

Chronic Toxicity of *Thunbergia laurifolia* Lindl. Extract

Songpol Chivapat*[§]
 Pranee Chavalittumrong *
 Aimmanas Attawish *
 Jaree Bansiddhi *
 Songpol Padungpat *

ABSTRACT

Thunbergia laurifolia Lindl., or *rang chuet*, is a medicinal plant that is used for the treatment of poisoning with toxic substances. However, the toxicological data for this plant are not complete. Therefore, a chronic toxicity study of *rang chuet* extract (TLE) was undertaken in six groups of Wistar rats. The control group (group1) was given 10 ml/kg of distilled water per day orally. The five experimental groups (groups2-6) were orally administered TLE at doses of 20, 200, 1,000, 2,000 and 2,000 mg/kg/day for six months, respectively, which were equivalent to 1, 10, 50, and 100 times the therapeutic dose. Group 6 (2000R) was added to the study recovery group after 14 days of TLE discontinuation. The results revealed that TLE did not affect the body weight, food consumption, behavior or general health of the animals. TLE did not produce cumulative toxic signs and fatal effects. Male rats receiving TLE at the dose of 2,000 mg/kg/day and the 2000R group had a significant decrease in RBCs, including a significant difference in red cell indices, but these were within the normal range. Female rats receiving TLE at doses of 1,000 and 2,000 mg/kg/day showed significant increases in WBCs. Both sexes of the rats treated with 2,000 mg/kg of TLE had a significant increase in bilirubin levels; however, these were within the normal range. TLE did not produce any histological alterations of the visceral organs in any group of rats. However, the results suggest that hematological and clinical chemistry values should be monitored during prolonged use of TLE.

Key words: *Thunbergia laurifolia*, chronic toxicity

INTRODUCTION

Thunbergia laurifolia Lindl. is a large woody climber belonging to the Family Acanthaceae¹ including Thunbergiaceae.² Its leaves are ovate or oblonglanceolate, almost entire repand-toothed, more or less glossy. Inflorescences as a raceme are pendulous in the axil of leaves. The flowers are large, about 5-8 cm in diameter, and pale blue in color. Capsules

are 1.5 cm wide, with beaks up to 3 cm long.¹ The plants are common in tropical and mixed forest throughout the country, often cultivated as an ornamental plant or trained over walls or trellises. This plant has many local names in Thai such as *rang chuet*, *rang yen* or *nam nong*.³ The leaves and stems of *T. laurifolia* are used as a detoxifying agent in cases of poisoning and also as an antipyretic in Thai traditional

*Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Tiwanont Road, Mueang District, Nonthaburi Province, Thailand 11000.
 § Corresponding author. Tel: (662) 559-9850-9; Fax (662) 569-9866.
 E-mail address: schivapat@yahoo.com

medicine.⁴ Phytochemical constituents of *T. laurifolia* leaves are phenolic, carotenoid and chlorophyll compounds, besides caffeic acid and apigenin are found to be major constituents in *T. laurifolia* aqueous extract.⁵

The water extract of *T. laurifolia* has been demonstrated to reduce cholinergic effects and decrease mortality in rats treated with folidol, an organophosphate insecticide.⁶ Tea from the leaves of this plant has also been shown to effectively reduce insecticide residue levels in the blood circulation of agriculturists.⁷ Pramyoththin *et al.* reported that the aqueous extract of *T. laurifolia* leaves was found to possess hepatoprotective activity against ethanol induced liver injury both *in vitro* and *in vivo*.⁸ The above mentioned reports suggest that *rang chuet* has the potential to be used as an herbal detoxifying agent. However, little toxicological data, especially in laboratory animals, have been reported. A 28-day repeated dose toxicity study of the *T. laurifolia* aqueous extract at an oral dose of 500mg/kg revealed that the extract did not cause any histological changes of the organs; however, it may affect some hematological values and kidney weights.⁹ In this study, we investigated the chronic toxicity of *T. laurifolia* water extract in rats in order to obtain more toxicological information to assure the safety of this plant.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of *Thunbergia laurifolia* extract

Leaves of *Thunbergia laurifolia* Lindl. (Acanthaceae) were collected from a cultivated area in Pitsanulok Province, Thailand. A voucher specimen (Bansiddhi 45-11) was deposited

at the Botanical Laboratory, Medicinal Plant Research Institute, Nonthaburi Province. The botanical identification was determined by following the description of Backer and Bakhuizen¹ and compared with authentic specimens (Lakshnakara 1368) at the Bangkok herbarium (BK), Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Co-operatives, Bangkok, Thailand.

The leaves of *Thunbergia laurifolia* were first washed, then dried in a hot-air oven at 40°C and pulverized into coarse powder. Three hundred grams of *T. laurifolia* powder were extracted with 300 ml of distilled water by reflux method twice, each for 2 hours. The filtrate was evaporated at low pressure using a rotary evaporator to obtain dried extract at a yield of 23.283 percent (w/w). Prior to dosing in animals, the dried extract of *T. laurifolia* (TLE) was then dissolved in distilled water and adjusted to the desired concentrations for toxicity study.

Laboratory animals

Ninety male Wistar rats weighing 200-220g and an equal number of female rats weighing 170-190 g were purchased from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom Province and used in this study. The animals were housed in a hygienic conventional animal room of the laboratory animal center, Department of Medical Sciences, where the environment of the room was maintained at 25±1°C with 60 percent humidity and 12 hours of a light-dark cycle. Prior to the chronic toxicity study, the animals were acclimatized in that environment for two weeks and they were reared, on a commercially pelleted diet and clean water provided *ad lib*. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Department

of Medical Sciences.

Chronic toxicity study

Wistar rats were randomly divided into five groups of 15 animals/sex each. **Group 1** received 10 ml/kg per day of distilled water. **Groups 2 to 6** were orally administered a solution of TLE at doses of 20, 200, 1000, 2000 and 2000 mg/kg/day respectively, for six months, which were equivalent to 1, 10, 50 and 100 times the therapeutic dose (5 grains of dried, *T. laurifolia* powder/day/person). After the six-month period of TLE treatment, only **Group 6** (2000R) was reared for two more weeks without TLE administration in order to observe the recovery or delayed effects of the extract. During the period of the experiment, body weight and food consumption were recorded weekly and the rats were closely observed for general appearance, behavior and signs of abnormality. At the end of the 180-day treatment period, the animals were fasted for 16 hours before being sacrificed with diethyl ether inhalation. Laparotomy was performed and blood samples were collected from the inferior vena cava of each animal for analyzing hematological and clinical chemistry values by using the automatic hematological analyzer Cell Dyn[®]3500 and the automatic chemistry analyzer Hitachi[®]912, respectively. The hematological parameters examined were hematocrit (Hct), erythrocytes (RBCs), hemoglobin, mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC), white blood cells (WBC), neutrophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes, basophils and platelets. The clinical chemistry parameters measured were alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT), aspartate trans-

aminase (AST), total protein, albumin, bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium and chloride ion. Necropsy was then performed to determine the gross lesions of various visceral organs. Brain, heart, lung, liver, kidney, stomach, spleen, testis, uterus and adrenal glands were weighed by using a Mettler Toledo[®]PB 153 balance. The organ weights were calculated into relative organ weights (g/100g body weight). The visceral organs were then preserved in 10 percent buffered formalin and subsequently subjected to histological process for preparing tissue slides stained with hematoxylin and eosin (H&E). Tissue slides were histopathologically examined by a veterinary pathologist.

Statistical data analysis

Body weight, food intake, relative organ weight, hematological and clinical chemistry values were statistically analyzed using the SPSS program (version 11.0). One-way ANOVA was performed and the data were tested for homogeneity of variance by Levene test. Bonferroni test was used in cases of equal variance, whereas Dunnett's T3 test was applied for unequal variance in multiple comparisons. The incidence of histopathological lesions was analyzed by Fisher's exact test and the statistical significance of all data was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Effects on body weight, food consumption and physical appearance

The average body weight and food consumption of male and female rats receiving TLE at any dose were not significantly different from those of their corresponding

Table 1 Body weight (g) and percentage relative organ weight of male rats receiving *Thunbergia laurifolia* extract for 6 months

Parameters	Dose of <i>Thunbergia laurifolia</i> extract (mg/kg/day)					
	Control	20	200	1000	2000	2000R
	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15
Initial body weight	222.48 ± 14.77	221.19 ± 9.65	222.93 ± 15.33	223.29 ± 14.03	226.95 ± 16.40	223.90 ± 11.28
Final body weight	576.89 ± 73.73	562.50 ± 50.93	554.41 ± 51.48	559.43 ± 62.27	568.29 ± 67.96	553.25 ± 46.03
Brain	0.38 ± 0.05	0.39 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.03
Heart	0.25 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.03
Lung	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.03
Liver	2.23 ± 0.14	2.30 ± 0.20	2.25 ± 0.17	2.31 ± 0.17	2.41 ± 0.16	2.35 ± 0.19
Stomach	0.37 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.37 ± 0.04
Spleen	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.02*	0.17 ± 0.01
Right kidney	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01*	0.23 ± 0.02
Left kidney	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.01*	0.22 ± 0.02*
Right testis	0.52 ± 0.04	0.54 ± 0.07	0.51 ± 0.10	0.51 ± 0.12	0.49 ± 0.06	0.53 ± 0.06
Left testis	0.53 ± 0.04	0.54 ± 0.07	0.52 ± 0.09	0.50 ± 0.14	0.51 ± 0.08	0.53 ± 0.06
Right adrenal	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.001
Left adrenal	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001
Bladder	0.036 ± 0.013	0.036 ± 0.007	0.037 ± 0.011	0.031 ± 0.003	0.033 ± 0.006	0.029 ± 0.006

Note : The values are expressed as mean ± SD.

*Significantly different from the control group (p<0.05).

Table 2 Body weight (g) and percentage relative organ weight of female rats receiving *Thunbergia laurifolia* extract for 6 months

Parameters	Dose of <i>Thunbergia laurifolia</i> extract (mg/kg/day)					
	Control	20	200	1000	2000	2000R
	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15
Initial body weight	175.13 ± 8.41	175.31 ± 5.30	173.66 ± 9.83	175.51 ± 7.86	178.39 ± 11.80	172.41 ± 9.95
Final body weight	313.39 ± 26.00	327.75 ± 30.93	315.03 ± 24.96	338.5 ± 29.48	322.25 ± 35.92	311.44 ± 34.77
Brain	0.65 ± 0.05	0.63 ± 0.07	0.65 ± 0.06	0.65 ± 0.05	0.63 ± 0.07	0.64 ± 0.06
Heart	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.02
Lung	0.40 ± 0.03	0.41 ± 0.06	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.42 ± 0.05
Liver	2.32 ± 0.14	2.28 ± 0.20	2.33 ± 0.17	2.35 ± 0.17	2.49 ± 0.16	2.46 ± 0.19
Stomach	0.53 ± 0.07	0.49 ± 0.07	0.50 ± 0.05	0.51 ± 0.06	0.53 ± 0.07	0.52 ± 0.07
Spleen	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.21 ± 0.02
Right kidney	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.03*	0.27 ± 0.02
Left kidney	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.03*	0.25 ± 0.02
Right adrenal	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.003	0.013 ± 0.002	0.013 ± 0.003	0.011 ± 0.002	0.012 ± 0.003
Left adrenal	0.013 ± 0.003	0.013 ± 0.002	0.014 ± 0.003	0.014 ± 0.002	0.013 ± 0.002	0.014 ± 0.003
Bladder	0.031 ± 0.013	0.028 ± 0.007	0.032 ± 0.011	0.030 ± 0.003	0.029 ± 0.006	0.028 ± 0.006
Uterus	0.280 ± 0.127	0.232 ± 0.060	0.256 ± 0.061	0.234 ± 0.056	0.207 ± 0.044	0.237 ± 0.068

Note : The values are expressed as mean ± SD.

*Significantly different from the control group (p<0.05).

Table 3 Hematological values of male rats receiving *Thunbergia laurifolia* extract for 6 months

Parameters	Dose of <i>Thunbergia laurifolia</i> extract (mg/kg/day)					
	Control	20	200	1000	2000	2000R
	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15
Hematocrit (%)	47.25 ± 2.10	47.03 ± 1.24	46.91 ± 2.99	47.30 ± 2.58	47.42 ± 3.05	46.11 ± 1.23
RBCs($\times 10^6$ cells/mm ³)	9.01 ± 0.43	9.02 ± 0.44	8.93 ± 0.70	8.62 ± 0.40	8.35 ± 0.53*	8.25 ± 0.22*
Hemoglobin (g/dl)	15.50 ± 0.63	15.47 ± 0.42	15.34 ± 0.87	15.42 ± 0.76	15.38 ± 0.87	15.09 ± 0.41
MCV (Xm^3 /red cell)	52.50 ± 2.18	52.23 ± 2.33	52.61 ± 2.17	54.66 ± 1.91*	56.84 ± 1.69*	55.87 ± 1.39*
MCH (pg/red cell)	17.23 ± 0.80	17.20 ± 0.81	17.23 ± 0.73	17.88 ± 0.56	18.43 ± 0.57*	18.28 ± 0.54*
MCHC (g/dl RBC)	32.81 ± 0.43	32.93 ± 0.31	32.73 ± 0.47	32.61 ± 0.31	32.44 ± 0.48	32.73 ± 0.61
WBCs($\times 10^3$ cells/mm ³)	3.79 ± 0.58	2.80 ± 1.10	2.83 ± 0.87	3.10 ± 0.71	3.54 ± 1.30	3.71 ± 1.08
Neutrophils (%)	16.23 ± 6.94	24.49 ± 9.24	23.87 ± 5.82	21.56 ± 9.02	15.99 ± 5.03	20.42 ± 10.17
Eosinophils (%)	1.87 ± 0.81	1.74 ± 0.48	1.35 ± 0.38	1.58 ± 0.65	1.25 ± 0.35	1.44 ± 0.39
Lymphocytes (%)	71.52 ± 10.16	61.33 ± 11.29	60.71 ± 9.09	64.45 ± 10.56	70.83 ± 9.45	67.76 ± 12.10
Monocytes (%)	7.39 ± 2.11	8.79 ± 2.50	10.59 ± 4.20	9.14 ± 3.94	8.67 ± 4.29	7.47 ± 2.39
Basophils (%)	3.00 ± 1.48	3.65 ± 2.01	3.47 ± 1.59	3.27 ± 1.38	3.47 ± 1.39	2.90 ± 0.73
Platelets ($\text{X}10^3$ cells/mm ³)	968.93 ± 115.41	930.14 ± 180.80	956.20 ± 137.80	981.37 ± 100.96	976.83 ± 159.26	956.67 ± 65.15

Note : The values are expressed as mean ± SD.

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

control groups throughout the six-month period (data not shown). There was no abnormality in physical appearance and behavior in any group of rats receiving TLE as well as in the control

group. TLE-treated rats did not show any toxic signs and mortality throughout the experiment. Initial and final body weights of each group are expressed in Tables 1 and 2.

Table 4 Hematological values of female rats receiving *Thunbergia laurifolia* extract for 6 months

Parameters	Dose of <i>Thunbergia laurifolia</i> extract (mg/kg/day)					
	Control	20	200	1000	2000	2000R
	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15
Hematocrit (%)	45.57 ± 2.48	45.70 ± 1.44	46.31 ± 2.77	46.38 ± 2.08	46.10 ± 2.78	47.06 ± 2.10
RBCs($\times 10^6$ cells/mm ³)	7.87 ± 0.45	8.02 ± 0.36	7.97 ± 0.50	7.88 ± 0.36	7.78 ± 0.43	8.01 ± 0.49
Hemoglobin (g/dl)	15.19 ± 0.75	15.18 ± 0.42	15.31 ± 0.79	15.26 ± 0.61	15.14 ± 0.92	15.58 ± 0.60
MCV (Xm^3 /red cell)	57.89 ± 1.03	56.99 ± 1.56	58.11 ± 1.10	58.85 ± 1.55	59.24 ± 2.00	58.84 ± 1.77
MCH (pg/red cell)	19.33 ± 0.75	18.93 ± 0.53	19.23 ± 0.48	19.36 ± 0.39	19.46 ± 0.52	19.48 ± 0.64
MCHC (g/dl RBC)	33.37 ± 0.99	33.22 ± 0.41	33.09 ± 0.66	32.91 ± 0.41	32.861 ± 0.36	33.12 ± 0.42
WBCs($\times 10^3$ cells/mm ³)	1.71 ± 0.41	2.07 ± 0.45	2.33 ± 0.69	2.77 ± 0.54*	2.46 ± 0.84*	2.23 ± 0.70
Neutrophils (%)	18.76 ± 6.00	18.58 ± 5.32	16.00 ± 3.49	22.17 ± 8.95	20.57 ± 12.82	20.26 ± 9.52
Eosinophils (%)	1.33 ± 0.69	1.32 ± 0.74	1.26 ± 0.69	1.24 ± 0.70	0.971 ± 0.43	1.28 ± 0.69
Lymphocytes (%)	70.45 ± 8.27	66.93 ± 9.02	74.35 ± 5.83	69.18 ± 10.82	70.23 ± 13.01	68.16 ± 13.08
Monocytes (%)	7.10 ± 3.27	8.27 ± 5.98	6.47 ± 5.08	5.31 ± 2.99	5.95 ± 2.51	8.49 ± 4.37
Basophils (%)	2.36 ± 1.00	2.45 ± 1.34	1.93 ± 0.93	2.11 ± 1.18	2.27 ± 0.87	1.77 ± 0.84
Platelets ($\text{X}10^3$ cells/mm ³)	921.33 ± 82.02	926.07 ± 73.75	949.51 ± 146.13	916.60 ± 81.77	995.43 ± 69.71	941.07 ± 117.66

Note : The values are expressed as mean ± SD.

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

Table 5 Clinical chemistry values of male rats receiving *Thunbergia laurifolia* extract for 6 months

Parameters	Dose of <i>Thunbergia laurifolia</i> extract (mg/kg/day)					
	Control N = 15	20 N = 15	200 N = 15	1000 N = 15	2000 N = 15	2000R N = 15
ALP (U/L)	58.13 ± 8.64	57.40 ± 8.66	54.00 ± 12.76	56.47 ± 10.22	56.27 ± 7.27	53.20 ± 4.68
ALT (U/L)	33.20 ± 6.70	41.53 ± 24.65	35.27 ± 15.41	26.93 ± 9.25	24.60 ± 3.60	30.53 ± 7.94
AST (U/L)	79.73 ± 9.11	94.93 ± 34.90	85.87 ± 21.32	74.87 ± 11.78	8.60 ± 8.17	82.20 ± 10.50
Total protein (g/dl)	6.71 ± 0.29	6.85 ± 0.25	6.91 ± 0.46	6.80 ± 0.34	6.90 ± 0.36	6.89 ± 0.21
Albumin (g/dl)	4.39 ± 0.19	4.49 ± 0.12	4.45 ± 0.11	4.60 ± 0.13*	4.62 ± 0.17*	4.43 ± 0.12
Bilirubin (mg/dl)	0.06 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.10 ± 0.04*	0.7 ± 0.03
BUN (mg/dl)	18.09 ± 2.23	18.10 ± 2.65	19.59 ± 2.53	19.25 ± 1.95	19.54 ± 2.05	18.31 ± 2.20
Creatinine (mg/dl)	0.75 ± 0.08	0.73 ± 0.07	0.78 ± 0.07	0.74 ± 0.07	0.75 ± 0.06	0.73 ± 0.05
Glucose (mg/dl)	172.24 ± 29.35	165.33 ± 23.77	181.00 ± 37.13	189.43 ± 48.37	185.62 ± 37.08	172.43 ± 18.75
Uric acid (mg/dl)	1.99 ± 1.55	1.91 ± 1.19	2.37 ± 1.53	2.75 ± 1.85	3.12 ± 1.81	1.87 ± 0.89
Triglyceride (mg/dl)	131.90 ± 44.29	108.04 ± 24.87	112.43 ± 38.70	103.17 ± 22.27	99.15 ± 27.92	135.33 ± 38.04
Cholesterol (mg/dl)	71.63 ± 14.26	64.83 ± 12.52	65.06 ± 9.25	64.85 ± 10.94	71.08 ± 20.56	76.59 ± 13.98
Sodium (mmol/l)	145.87 ± 1.18	147.73 ± 1.98	147.33 ± 1.88	147.24 ± 1.83	147.07 ± 1.39	147.73 ± 1.39
Potassium (mmol/l)	5.23 ± 0.97	4.85 ± 1.05	4.95 ± 1.07	5.72 ± 1.06	6.35 ± 1.22	5.25 ± 0.80
Chloride (mmol/l)	107.93 ± 1.71	109.47 ± 1.85	109.13 ± 1.25	109.80 ± 1.96	109.27 ± 1.67	109.87 ± 1.68*

Note : The values are expressed as mean ± SD.

*Significantly different from the control group (p<0.05).

Effects on relative weight of organs

Male rats receiving TLE at the dose of 2,000 mg/kg/day showed significant increases in relative spleen and kidney weights when

compared with the control group (Table 1).

Female rats receiving TLE at the highest dose had a significant increase in relative kidney weight compared with the controls (Table 2).

Table 6 Clinical chemistry values of female rats receiving *Thunbergia laurifolia* extract for 6 months

Parameters	Dose of <i>Thunbergia laurifolia</i> extract (mg/kg/day)					
	Control N = 15	20 N = 15	200 N = 15	1000 N = 15	2000 N = 15	2000R N = 15
ALP (U/L)	23.80 ± 7.01	22.33 ± 6.50	25.27 ± 6.74	21.00 ± 5.45	20.73 ± 5.70	26.07 ± 5.92
ALT (U/L)	29.47 ± 9.74	28.40 ± 12.60	25.20 ± 8.43	25.53 ± 11.67	19.20 ± 3.40*	23.00 ± 6.33
AST (U/L)	84.20 ± 24.89	89.33 ± 35.70	81.27 ± 15.27	74.20 ± 15.13	70.07 ± 11.16	78.20 ± 11.03
Total protein (g/dl)	7.17 ± 0.26	7.15 ± 0.30	7.07 ± 0.35	7.00 ± 0.37	7.14 ± 0.43	7.13 ± 0.28
Albumin (g/dl)	5.16 ± 0.26	5.20 ± 0.20	5.13 ± 0.25	5.11 ± 0.16*	5.23 ± 0.23*	5.05 ± 0.21
Bilirubin (mg/dl)	0.10 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.15 ± 0.05*	0.12 ± 0.03
BUN (mg/dl)	24.49 ± 4.55	24.01 ± 4.12	23.92 ± 3.58	25.49 ± 4.39	25.69 ± 6.08	24.59 ± 4.72
Creatinine (mg/dl)	0.86 ± 0.08	0.89 ± 0.11	0.89 ± 0.11	0.82 ± 0.09	0.85 ± 0.16	0.89 ± 0.14
Glucose (mg/dl)	129.75 ± 11.73	123.56 ± 14.68	133.35 ± 28.73	124.26 ± 11.51	130.51 ± 20.46	131.00 ± 18.95
Uric acid (mg/dl)	1.11 ± 0.89	1.37 ± 1.18	1.46 ± 1.23	1.09 ± 1.05	1.29 ± 1.37	1.90 ± 0.91*
Triglyceride (mg/dl)	82.54 ± 32.47	88.95 ± 31.84	74.32 ± 28.39	57.45 ± 20.92	59.95 ± 23.10	73.20 ± 26.31
Cholesterol (mg/dl)	70.85 ± 12.93	66.01 ± 11.33	63.95 ± 14.15	64.17 ± 16.69	63.97 ± 9.56	67.13 ± 19.08
Sodium (mmol/l)	148.40 ± 1.12	147.13 ± 1.60	147.47 ± 1.46	147.47 ± 1.12	147.02 ± 1.03	148.53 ± 1.36*
Potassium (mmol/l)	4.26 ± 0.61	4.34 ± 1.25	4.17 ± 1.37	4.05 ± 0.93	4.13 ± 0.49	4.78 ± 1.18
Chloride (mmol/l)	110.47 ± 1.51	111.27 ± 0.96	111.53 ± 1.36	111.60 ± 1.64	110.73 ± 2.19	112.47 ± 1.25*

Note : The values are expressed as mean ± SD.

*Significantly different from the control group (p<0.05).

Table 7 Histopathological results of male rats receiving *Thunbergia laurifolia* extract for 6 months

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>Thunbergia laurifolia</i> extract (mg/kg/day)					
		Control	20	200	1000	2000	2000R
		N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15
Lung	Lymphoid proliferated peribronchioles	7/15	10/15	3/15	4/15	6/15	7/15
Heart	Focal myocardiosis	3/15	1/15	3/15	0/15	0/15	1/15
Liver	Fatty degeneration	6/15	8/15	6/15	7/15	2/15	5/15
Small intestine	Gut-associated lymphoid tissue hyperplasia	5/15	1/15	1/15	2/15	4/15	5/15
Large intestine	Gut-associated lymphoid tissue hyperplasia	1/15	4/15	1/15	2/15	1/15	2/15
Adrenal gland	Cortical fatty degeneration (mild)	0/15	2/15	8/15*	1/15	0/15	0/15

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

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

Table 8 Histopathological results of female rats receiving *Thunbergia laurifolia* extract for 6 months

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>Thunbergia laurifolia</i> extract (mg/kg/day)					
		Control	20	200	1000	2000	2000R
		N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15	N = 15
Lung	Lymphoid proliferated peribronchioles	1/15	2/15	2/15	5/15	3/15	3/15
Heart	Focal myocardiosis	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15
Small intestine	Gut-associated lymphoid tissue hyperplasia	1/15	2/15	0/15	2/15	2/15	1/15
Large intestine	Gut-associated lymphoid tissue hyperplasia	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	0/15

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

Effects on hematological parameters

The number of RBCs in the male rats receiving TLE at the dose of 2,000 mg/kg/day and in the 2000R group was significantly decreased when compared with that of their control group. Male rats receiving TLE at doses of 1,000 and 2,000 mg/kg/day and the 2000R group had significantly increased MCV values. MCH values for male rats treated with 2,000 mg/kg/ day of TLE and those of the 2000R group were significantly higher than those of their control group (Table 3). Female rats receiving TLE at doses of 1,000 and 2,000 mg/kg/day showed significant increases in WBC numbers (Table 4).

Effects on clinical chemistry parameters

Male rats receiving TLE at doses of 1,000 and 2,000 mg/kg/day had significantly higher albumin levels than their control group.

The bilirubin level of male rats receiving TLE at the dose of 2,000 mg/kg/ day was significantly higher than that of the control group (Table 5). The ALT level of the female rats receiving the highest dose of TLE was significantly lower than that of their control group, whereas the bilirubin level was significantly increased (Table 6).

Effects on histopathological alterations of visceral organs

Necropsy revealed no remarkable gross lesions in any organs of both male and female rats receiving each dose of TLE, including their corresponding control groups. The incidence and degree of histopathological alterations in some organs of the TLE-treated male and female rats did not show any dose dependency (Tables 7 and 8). There were no remarkable histopathological lesions in other organs of the TLE -treated groups and their controls.

DISCUSSION

There was no significant difference in body weight and food consumption of rats treated with TLE, suggesting that TLE does not adversely affect the general health status of such animals. Although the relative weights of spleens in male rats and those of kidneys in both sexes of rats receiving 2,000 mg/kg/day of TLE were significantly increased; there were no gross pathological and histological alterations of these organs. The increase of kidney weights in this study was consistent with the study of Wisitpongpan et al., that rats receiving rang chuet leaf extract at 500 mg/kg for 28 days had significant increases in the weight of both kidneys.⁹ Despite the statistically significant, decrease in RBCs in male rats receiving TLE at 2,000 mg/kg/day and in the 2000R group, these alterations were still within the normal range.^{10,11} Although the MCV values of male rats receiving TLE at doses of 1,000 and 2,000 mg/kg/day were significantly higher than that of the controls, and showed a tendency toward a dose-dependent response and the MCH value of the male rats receiving TLE at 2,000 mg/kg/day was significantly higher than that of the control group, these values were within the normal range.^{10,11} The increases in WBCs in female rats receiving TLE at doses of 1,000 and 2,000 mg/kg/day were consistent with the reports of Wisitpongpan et al. and Techakitroj,^{9,13} that is, they revealed a significant increase in WBCs in rats treated with *rang chuet* extract. Therefore, this phenomenon may be attributed to TLE. The increase in albumin levels in male rats receiving TLE at doses of 1,000 and 2,000 mg/kg/day and the decrease in the ALT level in female rats treated with the highest dose of

TLE were within the rats normal range.^{10,12} The significant increases in total bilirubin levels in both sexes of rats receiving TLE at the highest dose were consistent with the study of Techakitroj.¹³ In addition, Wisitpongpan et al. reported an increase in conjugated bilirubin in rats receiving rang chuet extract for 28 days.⁹ The mechanism of this change, definitely remains unknown; however, these alterations were within the normal range.¹⁰ The incidence and severity of the histopathological findings in some organs of the rats receiving TLE (Tables 7 and 8) had no correlation with the doses of TLE given; therefore, these changes may not be due to TLE.

In conclusion, the chronic toxicity study of TLE extract at doses ranging from 20 to 2,000 mg/kg/day did not affect the body weight, food consumption, behavior and general health of Wistar rats. TLE did not cause any significant gross and histological lesions in the visceral organs of Wistar the rats; The extract at doses of 1,000 and 2,000 mg/kg/day produced slight alterations of some hematological and clinical chemistry parameters of the rats; however, most were within the normal range. Therefore, this study suggests that prolonged use of high doses of *T. laurifolia* aqueous extract may affect the hematopoietic system.

ACKNOWLEDGMENTS

The author would like to thank Associate Professor Dr. Anudep Ransripipat, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for kindly performing the histopathological examination of tissue slides. They would also like to express their gratitude to the staffers of the Laboratory

Animal Center of the Department of Medical Sciences for providing their facilities for the animals concerned.

REFERENCES

1. Backer CA, Bakhuizen van den Brink RC. Acanthaceae. Flora of Java 1965;2:544-53.
2. Hutchinson J. The family of flowering plants. Oxford: The Clarendon Press; 1973. p. 609-10.
3. The Forest Herbarium Royal Forest Department, Thai Plant Names (Tem Smitinand Revised Edition 2001). Bangkok. Phachachon Press; 2001. p. 526.
4. Perry LM, Metzger J. Medicinal plants of East and Southeast Asia. Cambridge:MIT Press; 1980. p. 6.
5. Association of Thai Traditional Medicine School. Pramuan Supakun Yathai Part 3. Bangkok: Ampolpittaya Printing, 1973. p. 110. (in Thai)
6. Tejasen P, Thongtharb C. Experimental using *Thunbergia laurifolia* as antidote for insecticide poisoning. Chiang Mai Medical Bulletin 1980;19:105-14. (in Thai)
7. Dunkhoom, P. Effectiveness of Thunbergiaceae on reducing insecticide residue level in blood circulation of agriculturists. FDA Journal 2001;8:42-9.(in Thai)
8. Pramyothin P, Chirdchupunsare H, Rungsipipat A, Chaichentipyuth C. Hepatoprotective activity of *Thunbergia laurifolia* Linn extract in rats treated with ethanol: in vitro and in vivo studies. J Ethnopharmacol 2005;102:408-11.
9. Visitpongpan W, Ruamgyuthikarn V, Rujjanavej C, Pantong A, Vinijkhetkamnuan, Lertprasertsuk N. Testing of toxicity of *Thunbergia laurifolia* Linn, abstract in mice. J Med Herab 2003;10:23-36.
10. Gad SC. The rat: Pathology. In : Gad SC, Chengellis CP, editors. Animal Models in Toxicology. New York: Marcel Dekker; 1982. p.78- 81.
11. Campbell TW. Mammalian hematology: Laboratory animals and miscellaneous species. In: Troy DB, editor. Veterinary hematology and clinical chemistry. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins; 2004. p. 215.
12. Pimainog Y, Yothinarak A, Jor-rakate P. Reference ranges for hematological and clinical chemistry values in Wistar rats. Bulletin of the Department of Medical Sciences 2003;45:27-36. (in Thai)
13. Techakitroj V. The effect of rang chute (*Thunbergia laurifolia* Linn.) extract on rat splenocytes by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Thesis for Master's Degree (Pharmacology). Chulalongkorn University. 2004.

บทคัดย่อ

พิษเรื้อรังของสารสกัดรางจืด

ทรงพล ชิวะพัฒน์*, บราวณี ชาลิตธำรง*, เอมมนัส อัดตวิชัย*, จารีย์ บันลือเกียรติ*, ทรงพล ผดุงพัฒน์*

* สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ถนนพหลโยธิน ๑๑๐๐๐

รางจืดเป็นพืชสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้รักษาอาการพิษอันเกิดจากสารพิษต่าง ๆ . อย่างไรก็ตาม ข้อมูลด้านพิษวิทยา ของสมุนไพรชนิดนี้ยังไม่สมบูรณ์ จึงได้ศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดรางจืดในหนูแรพพันธุ์วีสตาร์ ๑๘๐ ตัว แบ่งออกเป็น ๖ กลุ่ม : กลุ่มที่ ๑ เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นทางปาก. กลุ่มที่ ๒ ถึง ๖ เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดรางจืดทาง ปากในขนาด ๒๐, ๒๐๐, ๑,๐๐๐, ๒,๐๐๐, และ ๒,๐๐๐ มก./กก./วัน หรือคิดเป็น ๑, ๑๐, ๕๐ และ ๑๐๐ เท่าของขนาดที่ใช้ในคน เป็นเวลา ๖ เดือน โดยกลุ่มที่ ๖ (2000R) เป็นกลุ่มศึกษาการฟื้นตัวหลังหยุดให้สารสกัดเป็นเวลา ๒ สัปดาห์. จากการ ศึกษาพบว่าสารสกัดรางจืด ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร พฤติกรรม และสุขภาพทั่วไปของหนู. สารสกัดรางจืด ไม่ทำให้เกิดอาการพิษสะสมและไม่ทำให้หนูตาย. หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรางจืดขนาด ๒,๐๐๐ มก./กก./วัน และกลุ่ม 2000R มีเม็ดเลือดแดงน้อยกว่ากลุ่มควบคุม อีกทั้งมีค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ. แต่การเปลี่ยนแปลง เหล่านี้อยู่ในช่วงค่าปกติ ขณะที่หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดรางจืดขนาด ๑,๐๐๐ และ ๒,๐๐๐ มก./กก./วัน มีเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ. หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดรางจืดในขนาด ๒,๐๐๐ มก./กก./วัน มีระดับบิลิรูบินเพิ่ม ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแต่คงอยู่ในช่วงค่าปกติ. สารสกัดรางจืดไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะภายในทั้งระดับมห พยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาแต่อย่างใด. อย่างไรก็ตาม การบริโภค รางจืดในขนาดสูงเป็นระยะเวลานานต่อเนื่องควรมี การตรวจเลือดเพื่อติดตามดูการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีที่อาจเกิดขึ้นร่วมด้วย.

คำสำคัญ : รางจืด, พิษเรื้อรัง

Acute and sub - chronic toxicity studies of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233

Songpol Chivapat¹, Pranee Chavalittumrong¹ and Mayuree H. Tantisira^{2*}

¹ Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Health, Nonthaburi, 11000, Thailand.

² Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

* Corresponding author: E-mail address: mayuree.t@chula.ac.th

ABSTRACT:

Acute toxicity study of *Centella asiatica* standardized extract ECa 233 was conducted by an oral administration of 10.0 g/kg extract into 10 male and 10 female mice. The extract at the given dose did not cause any toxic signs and death within the observation period of 14 days. Sub-chronic toxicity study of ECa 233 has been investigated in four groups of Wistar rats, each of 24 rats (12 of each sex). Control group was orally given distilled water and three experimental groups were orally administered with ECa 233 in distilled water at the doses of 10, 100, and 1,000 mg/kg/day for 90 days. All ECa 233-treated rats showed no difference with regards to body weight, food consumption and health in comparison to the control group except that female rats receiving 1,000 mg/kg/day of ECa 233 had significantly higher white blood cell counts than the control group ($p < 0.05$). However, this alteration was not associated with internal organ pathology. In addition, male rats receiving 1,000 mg/kg/day of ECa 233 had significantly higher sodium level, but still within normal range, than those of control group ($p < 0.05$). Histopathological results of internal organs did not demonstrate any incidence or degree of lesions in a dose-dependent manner with the increasing dose of ECa 233. Therefore, based on the present studies it can be concluded that ECa 233 in the dose up to 10.0 g/kg produced no acute toxicity and no significant sub-chronic toxicity was observed in rats receiving 10-1,000 mg/kg of ECa 233.

Keywords: Toxicity; ECa 233; Standardized extract of *Centella asiatica*

INTRODUCTION

Centella asiatica (Linn.) or Indian Pennywort is a perennial plant that has been used for many medicinal purposes worldwide since ancient time. In Ayurveda medicine, *C. asiatica* was described as one of neuronutrient which could prolong life and enhanced memory [1].

Pharmacological evaluation conducted in animal models has demonstrated a variety of pharmacological effects such as anti-inflammation, anti-oxidation, wound healing, anti-infective and anti-dementia [2]. In Thailand, in addition to traditional medicinal benefit such as brain and heart tonic or wound healing effect, whole plant

of *C. asiatica* is regarded as a vegetable and its juice is consumed as a beverage. Except for few reports on contact dermatitis, no serious adverse effect of *C. asiatica* has been recognized [3]. Safety of consumption of dried plant has been proved in toxicity testing in which the median lethal dose of dried powder of *C. asiatica*, given orally into mice, was found to be higher than 8 g/kg. In chronic toxicity study, Wistar rats of both sex receiving 20, 200, 600 and 1,200 mg/kg/day of *C. asiatica* for 6 months showed no sign of significant alteration of body weight, blood chemistry, clinical chemistry or histopathology in comparison to control group [4]. In contrast, hepatic damage was reported in albino rats receiving oral administration of dried *C. asiatica* at the dose of 1,000 mg/kg/day for 30 days [5]. ECa 233 is the standardized extract of *C. asiatica* defined as a white to off white titrated extract of *C. asiatica* containing not less than 80% of triterpenoids and the ratio between madecassoside and asiaticoside should be within 1.5 ± 0.5 . Preliminary study on its pharmacological activity demonstrated ameliorating effects of ECa 233 on learning and memory deficit induced by an intracerebroventricular injection of β -amyloid peptide (25-35) into rats [6]. In addition, topically applied gel containing 0.05% ECa 233 on second degree burn wound was found to significantly increase blood flow and subsequently accelerate rate of wound healing in rats [7]. However, except for the report of favorable profile of ECa 233 on rat hepatic cytochrome P450 [8], no other information of its safety is available. Therefore, we consider it interesting to conduct acute as well as sub-chronic toxicity study of ECa 233.

MATERIALS AND METHODS

Standardized extract of C. asiatica **ECa 233**

ECa 233 was kindly supplied by Associate Professor Ekarin Saifah, Ph.D. and Associate Professor Rutt Suttisri, Ph.D., Department of Pharmaceutical Botany. Quality control was made by Associate Professor Suwanna Luangcholatan and Assistant Professor Chamnan Patarapanch, Ph.D., Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand. Various concentrations of ECa 233 were freshly prepared as a suspension in distilled water and being given orally to the animals by a gavage tubing. Care was taken to assure the homogeneity of the suspension before an administration into the animals.

Experimental animals

Twenty ICR mice, ten male and ten female, weighing between 20 to 22 g were used in acute toxicity test. Forty eight male and forty eight female Wistar rats weighing between 180 to 220 g were used in sub-chronic toxicity study. They were purchased from the National Animal Center, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom, Thailand. Animals were housed in the conventional hygienic animal room of Laboratory Animal Center, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand. The room temperature was maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ with 12-hour alternate light-dark cycle and 60% relative humidity. The mice were provided with commercial pellet (C.P. Company, Thailand) and water *ad libitum*. They were fasted for two hours before performing acute toxicity test. The animals were acclimatized for at least seven days prior to the experiments. The

study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand (permission no. 49-005).

Acute toxicity study

Both male and female mice were randomly divided into two groups of ten mice each. The experimental group was orally administered with ECa 233 suspension at the dose of 10 g/kg. The animals were closely observed during the first three hours and then were observed twice daily for 14 consecutive days. At day 15, mice were euthanized using CO₂ gas chamber and then necropsy was performed for inspection of gross pathological alterations.

Sub-chronic toxicity study

Both male and female rats were randomly divided into 4 groups of 12 rats each. Group 1 was a control group being given orally with 10 ml/kg of distilled water. Group 2 to 4 were treatment groups that were orally administered with ECa 233 at the doses of 10, 100 and 1,000 mg/kg/day for 90 consecutive days. The lowest dose (10 mg/kg/day) was the effective dose in attenuation of learning and memory deficit induced by an intracerebroventricular injection of β -amyloid peptide in rodent. During the period of experiment, body weight and food consumption were measured weekly and the animals were closely observed for general appearance, behavior and signs of abnormality. At the end of treatment, the animals were fasted for 16 hours before being sacrificed with diethyl ether inhalation. Blood samples were collected from the inferior vena cava of each animal for hematology and clinical chemistry determination using automatic hematological analyzer Cell Dyn[®] 3500 and

Hitachi[®] 912, respectively. Hematological parameters examined were hematocrit (Hct), erythrocyte (RBC), hemoglobin (Hb), mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC), white blood cell (WBC), neutrophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes, basophils and platelets. Clinical chemistry parameters measured were alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransaminase (ALT), aspartate aminotransaminase (AST), Total protein, albumin, bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium and chloride ion. Necropsy was performed to determine gross pathology of various visceral organs. The organs were weighed to determine relative organ weights and then preserved in 10% phosphate buffered formalin. Histological slides of brain, heart, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intestines, spleen, bladder, salivary gland, lacrimal gland, thyroid and adrenal glands, reproductive organs (testis and seminal vesicle in male rats, ovary and uterus in female rats) were prepared and histopathologically examined by veterinary pathologist.

Statistical analysis

Body weight, food intake, relative organ weight, hematological and clinical chemistry values were analyzed using one-way analysis (ANOVA) and Bonferroni test was used for multiple comparison at a significant level of $p < 0.05$. Histopathological data were analyzed by Fisher's exact at a significant level of $p < 0.05$.

RESULTS

Acute toxicity

No sign of toxicity and no lethality were observed in either male or female mice receiving suspension of ECa 233 in distilled water in the dose of 10 g/kg within the observation period of 14 days. In addition, no gross pathological lesions were detected in any organs of the experimental animals.

Sub-chronic toxicity

Effects on body weight, food consumption and animal health

Both male and female rats receiving ECa 233 at each dose showed no significant difference in average body weight and food consumption in almost every week when compared with their sex-corresponding control groups except the female treated with the highest dose of ECa 233 had lower food consumption

than its respective control exclusively at week 7 (Figures 1 and 2). In addition, no toxic signs or abnormal behavior was found in all ECa 233-treated groups.

Effects on gross pathology and organs weight

At necropsy, no gross pathological lesions were found in control groups of both sexes. In similarity to their sex-corresponding control groups, no observable lesions of the organs were noted in male or female rats receiving ECa 233. All ECa 233-treated groups showed no significant difference in relative organ weights when compared with their sex-corresponding control groups except male rats receiving ECa 233 at 10 mg/kg/day demonstrated significantly lower relative right adrenal weight than their control group (Tables 1 and 2).

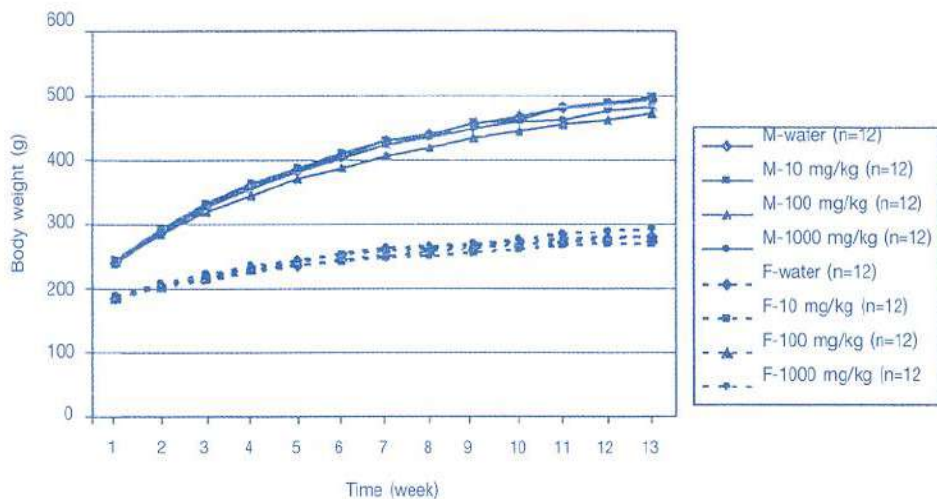


Figure 1 Body growth curves of male (M) and female (F) rats receiving ECa 233 at the doses of 10, 100 and 1000 mg/kg body weight for 3 months

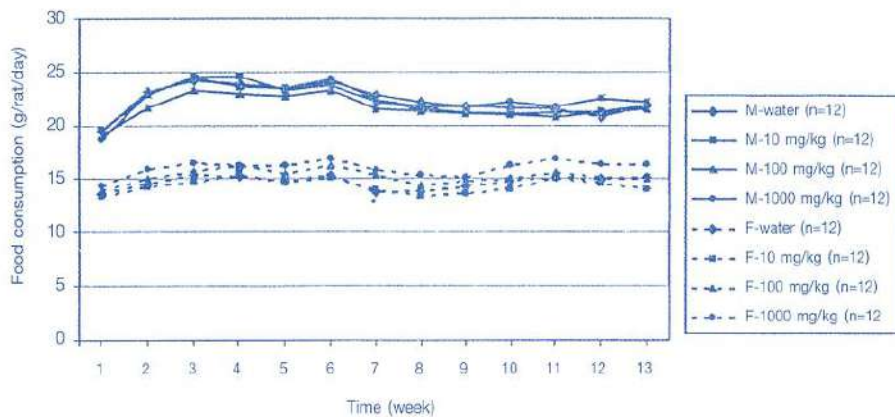


Figure 2 Food consumption of male (M) and female (F) rats receiving ECa 233 at the doses of 10, 100 and 1000 mg/kg body weight for 3 months

Table 1 Relative organ weight (g/1000 g body weight) of male rats receiving ECa 233 for 90 days

Organs	Group of rats receiving ECa 233 (mg/kg/day)			
	0 (n=12)	10 (n=12)	100 (n=12)	1000 (n=12)
Brain	4.48±0.50	4.33±0.38	4.63±0.52	4.57±0.53
Heart	2.69±0.09	2.73±0.22	2.84±0.17	2.79±0.26
Lung	3.15±0.26	3.15±0.27	3.49±0.32	3.34±0.49
Stomach	4.09±0.34	4.06±0.46	4.35±0.41	4.06±0.45
Liver	24.88±1.48	25.46±2.11	25.71±1.33	25.06±1.54
Left kidney	2.35±0.25	2.34±0.23	2.49±0.15	2.49±0.26
Right kidney	2.42±0.17	2.45±0.25	2.57±0.14	2.59±0.24
Spleen	1.73±0.20	1.70±0.17	1.89±0.23	1.69±0.19
Bladder	0.28±0.05	0.31±0.04	0.31±0.06	0.31±0.05
Left testis	6.40±0.73	6.21±0.66	7.12±0.83	6.63±0.66
Right testis	6.29±0.73	5.94±1.05	7.03±0.77	6.87±0.93
Left adrenal gland	0.09±0.02	0.08±0.01	0.09±0.02	0.10±0.02
Right adrenal gland	0.09±0.01	0.07±0.01*	0.09±0.01	0.08±0.02

Data shown were mean±SD

* Significantly different from control group (p < 0.05)

Table 2 Relative organ weight (g/1000 g body weight) of female rats receiving ECa 233 for 90 days

Organs	Group of rats receiving ECa 233 (mg/kg/day)			
	0 (n=12)	10 (n=12)	100 (n=12)	1000 (n=12)
Brain	7.29±0.43	7.49±0.44	7.21±0.36	7.00±0.49
Heart	3.33±0.39	3.38±0.26	3.29±0.28	3.27±0.32
Lung	4.51±0.31	4.62±0.37	4.44±0.54	4.51±0.72
Stomach	5.41±0.44	5.36±0.50	5.24±0.80	5.18±0.65
Liver	25.85±2.75	25.84±2.12	25.71±2.76	25.67±2.49
Left kidney	2.84±0.21	2.96±0.20	2.75±0.20	2.780±.22
Right kidney	2.89±0.16	3.07±0.22	2.88±0.13	2.91±0.20
Spleen	2.24±0.27	2.19±0.27	2.20±0.34	2.31±0.24
Bladder	0.30±0.03	0.31±0.09	0.27±0.03	0.33±0.05
Left ovary	0.35±0.11	0.35±0.13	0.32±0.10	0.31±0.12
Right ovary	0.33±0.11	0.33±0.09	0.35±0.07	0.31±0.08
Uterus	2.21±0.81	2.20±0.43	2.47±0.76	2.08±0.56
Left adrenal gland	0.17±0.02	0.18±0.02	0.18±0.03	0.17±0.04
Right adrenal gland	0.16±0.04	0.16±0.03	0.16±0.03	0.16±0.04

Data shown were mean±SD

Effects on hematological parameters

Hematological values in ECa 233-treated male groups were not significantly different from those of their control group (Table 3). Female rats receiving ECa 233 at dose of 1,000 mg/

kg/day had a significantly higher number of WBC than their control group. Eosinophils in the female groups receiving ECa 233 at 10 and 1,000 mg/kg/day were significantly lower than those of their control group (Table 4).

Table 3 Hematological values of male rats receiving ECa 233 for 90 days

Parameter	Group of rats receiving ECa 233 (mg/kg/day)			
	0 (n=12)	10 (n=12)	100 (n=12)	1000 (n=12)
Hematocrit (%)	47.36±1.87	46.79±1.91	45.81±1.37	47.03±1.10
Hemoglobin (g/dl)	15.27±0.48	15.08±0.58	14.86±0.41	15.18±0.28
RBC (x10 ⁶ cells/ μ L)	8.82±0.24	8.83±0.35	8.54±0.33	8.70±0.26
MCV (fl/red cell)	53.71±1.69	53.04±1.11	53.67±1.34	54.10±1.83
MCH (pg/red cell)	17.32±0.37	17.10±0.33	17.42±0.32	17.46±0.56
MCHC (g/dl RBC)	32.25±0.45	32.25±0.39	32.45±0.46	32.27±0.51
WBC (K/ μ L)	3.58±1.09	3.80±0.86	3.41±0.94	3.65±0.86
Neutrophil (%)	23.27±5.40	20.94±4.97	26.64±5.14	26.80±4.91
Eosinophil (%)	1.71±0.60	1.43±0.61	1.55±0.49	1.44±0.62
Lymphocyte (%)	71.17±5.76	74.28±5.24	68.38±5.59	68.24±5.87
Monocyte (%)	2.12±2.26	1.88±1.34	2.06±1.36	2.29±1.69
Basophil (%)	1.72±0.65	1.46±0.70	1.37±0.60	1.24±0.67
Platelet (K/ μ L)	931.50±102.92	957.46±84.17	901.18±68.34	915.00±64.61

Data shown were mean±SD

Table 4 Hematological values of female rats receiving ECa 233 for 90 days

Parameter	Group of rats receiving ECa 233 (mg/kg/day)			
	0 (n=12)	10 (n=12)	100 (n=12)	1000 (n=12)
Hematocrit (%)	46.01±1.66	46.15±1.80	45.56±1.23	46.63±2.42
Hemoglobin (g/dl)	14.91±0.54	14.92±0.66	14.90±0.40	15.10±0.77
RBC (x10 ⁶ cells/ μ L)	8.06±0.42	8.10±0.39	7.96±0.24	8.20±0.56
MCV (fl/red cell)	57.15±1.92	56.98±1.74	57.28±1.13	56.95±1.21
MCH (pg/red cell)	18.51±0.75	18.42±0.63	18.71±0.29	18.45±0.43
MCHC (g/dl RBC)	32.39±0.36	32.33±0.98	32.67±0.40	32.38±0.29
WBC (K/ μ L)	1.90±0.57	2.28±0.52	2.26±0.57	2.77±1.09*
Neutrophil (%)	21.85±4.91	18.80±6.26	21.35±5.37	17.26±6.54
Eosinophil (%)	2.02±0.68	1.38±0.58*	1.55±0.42	1.29±0.48*
Lymphocyte (%)	73.35±5.86	76.56±7.59	74.91±5.42	78.89±6.91
Monocyte (%)	1.76±1.73	2.05±2.26	1.38±0.74	1.55±0.94
Basophil (%)	1.03±0.54	1.22±0.59	0.81±0.33	1.03±0.34
Platelet (K/ μ L)	965.67±84.28	928.42±166.88	918.25±94.56	912.70±84.02

Data shown were mean±SD

* Significantly different from control group (p < 0.05)

Effects on clinical chemistry parameters

Clinical chemistry values of all ECa 233-treated, male and female, groups were not significantly different from those of their sex-corresponding control groups except male rats receiving the highest dose had slightly but significantly higher sodium level than their control groups (Tables 5 and 6).

Histopathology

Male rats receiving ECa 233 at 10 mg/kg/day had a significantly higher incidence of lymphoid proliferation in the lung and centrilobular fatty degeneration in the liver than their control group (Table 7). However, there was clearly no exacerbation of changes or increase of effect at higher dose of 100 and 1,000 mg/kg/day were noted. The incidences of GALT proliferation in the small intestine of female rats receiving ECa 233 at the doses of 10 and 1,000 mg/kg/day were significantly

lower than those observed in their respective control groups (Table 8).

DISCUSSION

The oral acute toxicity study revealed that ECa 233 at a single dose of 10 g/kg which was the highest dose that could be given to mice produced no acute toxic effect, lethality and gross pathological lesions. Therefore, LD₅₀ value in mice should be more than 10 g/kg suggesting a relatively high margin of safety of ECa 233 in relation to its effective dose in enhancing memory at 10 and 30 mg/kg [61]. Considering that *C. asiatica* is a common edible plant and in previous study, oral dose of dried *C. asiatica* at 8 g/kg has been shown to cause no sign of acute toxicity [4]. This finding is not surprising.

Subchronic toxicity in Wistar rats orally given with ECa 233 at doses of 10, 100 and 1,000 mg/kg/day which were equivalent to 1,

10 and 100 fold of effective dose in improving learning and memory in rodents [6] revealed that ECa 233 did not affect body weight, food consumption and animal health. The decrease of the right adrenal relative weight in male rats receiving ECa 233 at 10 mg/kg/day seems unlikely to be accounted by ECa 233 as such effect was not detected in animals receiving 100 or 1,000 mg/kg. The significant increase of WBC in female rats receiving the highest dose of ECa 233 agrees well with the finding that methanol extract of *C. asiatica* has been shown to increase total WBC count in mice [9]. Besides, the water extract of *C. asiatica* was demonstrated to significantly increase pokeweed mitogen-induced lymphocyte proliferation *in vitro* [10]. However, the increase of WBC in the highest dose-treated group could not be

classified as leucocytosis because the WBC in the control group itself was lower than rat normal range [11,12]. The decrease of eosinophil in female rats receiving 10 and 1,000 mg/kg/day was within normal range [11] and showed no dose dependency and thus might not be related to ECa 233. Dose-related increase in the level of sodium was observed, however, it was within normal range [12]. The significant increases of bronchiole associated lymphoid tissue proliferation in the lung and centrilobular fatty degeneration in the liver were observed exclusively in the male rat group receiving 10 mg/kg of ECa 233. Inconsistency and lack of dose-dependency in the finding observed do not support causal effect relationship between ECa 233 and the lesions. In contrast to liver specific toxicity of dried aerial part of *C. asiatica*

Table 5 Clinical chemistry value of male rats receiving ECa 233 for 90 days

Parameter	Group of rats receiving ECa 233 (mg/kg/day)			
	0 (n=12)	10 (n=12)	100 (n=12)	1000 (n=12)
ALT (U/L)	33.58±9.58	30.25±6.97	30.00±4.61	27.92±2.97
AST (U/L)	96.75±13.46	94.25±16.21	97.25±17.09	100.17±15.64
ALP (U/L)	62.00±7.93	61.00±8.29	60.75±8.00	62.08±7.28
BUN (mg/dl)	18.49±2.68	20.48±2.57	19.38±1.99	19.73±3.13
Creatinine (mg/dl)	0.54±0.06	0.56±0.10	0.54±0.06	0.61±0.12
Total protein (g/dl)	6.51±0.31	6.51±0.19	6.48±0.29	6.42±0.33
Albumin (g/dl)	4.41±0.14	4.42±0.17	4.49±0.13	4.49±0.13
Bilirubin (mg/dl)	0.08±0.03	0.07±0.03	0.07±0.03	0.08±0.03
Glucose (mg/dl)	184.19±24.28	181.00±29.59	177.07±20.52	176.79±25.57
Uric acid (mg/dl)	1.99±0.77	1.91±1.08	1.79±0.98	1.77±0.80
Triglyceride (mg/dl)	108.09±46.32	106.64±46.69	70.52±39.42	79.78±33.49
Cholesterol (mg/dl)	59.51±11.01	63.17±11.89	53.82±7.37	65.76±10.50
Sodium (mmol/l)	145.83±0.94	145.83±0.94	147.00±1.28	147.75±1.22*
Potassium (mmol/l)	5.07±0.82	4.88±0.99	4.87±0.86	4.20±0.54
Chloride (mmol/l)	106.83±1.19	106.42±0.90	107.50±1.73	107.83±1.27

Data shown were mean±SD

* Significantly different from control group (p < 0.05)

previously reported [8]. ECa 233 at the dose of 1,000 mg/kg showed no sign of hepatotoxic in terms of liver enzymes or histopathology. Differences in composition of the test compounds, crude powder in previous study versus standardized extract in the present study, could possibly account for the discrepancy observed. Moreover, the finding that small intestinal associated lymphoid tissue proliferation in the female rats receiving ECa 233 at the doses of 10 and 1,000 mg/kg was significantly lower than that of control might suggest its protective effect. Moreover, no other histopathological observa-

tions in the ECa 233-treated groups were found to be significantly different from those of their respective control groups. Taken all together the present study has demonstrated a good safety profile of a standardized extract of *C. asiatica* in both acute and sub-chronic toxicity testing. Based on the fact that ECa 233 is derived from edible plant with proof of benefit and safety on top of its favorable physical property with regards to consistency of active ingredients and being colorless, it is noteworthy to further develop health food or pharmaceutical products from the standardized extract of *C. asiatica*.

Table 6 Clinical chemistry values of female rats receiving ECa 233 for 90 days

Parameter	Group of rats receiving ECa 233 (mg/kg/day)			
	0 (n=12)	10 (n=12)	100 (n=12)	1000 (n=12)
ALT (U/L)	25.17±3.38	23.58±4.72	23.75±2.38	21.83±4.43
AST (U/L)	89.00±10.25	83.42±8.37	86.58±6.40	86.33±17.03
ALP (U/L)	31.00±8.25	29.58±10.41	30.42±7.66	29.00±11.34
BUN (mg/dl)	21.98±4.56	23.71±6.25	23.13±4.48	22.05±4.20
Creatinine (mg/dl)	0.62±0.13	0.61±0.14	0.66±0.10	0.61±0.14
Total protein (g/dl)	6.57±0.23	6.48±0.41	6.65±0.27	6.53±0.48
Albumin (g/dl)	4.67±0.16	4.65±0.20	4.85±0.17	4.76±0.39
Bilirubin (mg/dl)	0.09±0.04	0.11±0.03	0.11±0.04	0.11±0.03
Glucose (mg/dl)	138.39±15.43	137.44±19.12	130.47±14.65	140.17±22.19
Uric acid (mg/dl)	1.38±0.53	1.53±0.70	1.39±0.57	1.24±0.43
Triglyceride (mg/dl)	37.17±8.33	35.70±8.54	39.68±8.38	37.47±4.74
Cholesterol (mg/dl)	52.6±12.58	49.32±11.21	52.81±12.16	54.73±10.43
Sodium (mmol/l)	146.17±1.53	146.17±1.11	146.83±1.03	146.83±1.40
Potassium (mmol/l)	4.47±0.55	4.48±0.72	4.17±0.80	4.19±0.83
Chloride (mmol/l)	109.75±1.22	109.42±2.15	109.75±1.22	108.92±1.24

Data shown were mean±SD

Table 7 Histopathological results of male rats receiving ECa 233 for 90 days

Organs	Histopathological alteration	Group of rats receiving ECa 233 (mg/kg/day)			
		0	10	100	1000
Lung	Bronchiolar associated lymphoid tissue proliferation	1/12	6/12*	3/12	5/12
Heart	Focal myocardiosis	3/12	1/12	0/12	1/12
Liver	Centrilobular fatty degeneration	0/12	5/12*	3/12	1/12
	Small necrosis with mononuclear portal area	1/12	1/12	1/12	0/12
Kidney	Hydronephrosis	0/12	1/12	0/12	0/12
Small intestine	Gut associated lymphoid tissue proliferation	2/12	1/12	1/12	1/12
Large intestine	Gut associated lymphoid tissue proliferation	1/12	2/12	2/12	3/12
Adrenal gland	Cortical fatty infiltration	0/12	2/12	2/12	0/12

Data shown were number of rat with histopathological alteration/total number of rat in each group

* Significantly different from control group (p < 0.05)

Table 8 Histopathological results of female rats receiving ECa 233 for 90 days

Organs	Histopathological alteration	Group of rats receiving ECa 233 (mg/kg/day)			
		0	10	100	1000
Lung	Bronchiole associated tissue proliferation	2/12	4/12	3/12	5/12
Liver	Multifocal necrosis at portal	0/12	3/12	1/12	0/12
Kidney	Hydronephrosis	1/12	1/12	0/12	1/12
Small intestine	Gut associated lymphoid proliferation	5/12	0/12*	3/12	0/12*
Large intestine	Gut associated lymphoid proliferation	1/12	2/12	2/12	2/12

Data shown were number or rats with alteration/total number or rats in each group

* Significantly different from control group (p < 0.05)

CONCLUSION

Acute toxicity study of the standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 in mice by oral administration a single dose of 10 g/kg which was equivalent to 1,000 times of effective dose in enhancing memory effect in rodent did not produce any toxic signs, mortality and gross pathological lesions. Subchronic toxicity study of ECa 233 in Wistar rats by oral administration at the doses of 10, 100 and 1,000 mg/kg/day showed that the extract did not affect body weight, food consumption and animals health. Female rats receiving ECa 233 at 1,000 mg/kg/day had a significant increase in WBC; but could not be regarded as leucocytosis. Clinical chemistry values in ECa 233-treated rats were not significantly different from those of their corresponding sex-control groups except for a significant increase of sodium level in the male rats receiving the highest dose. However, this change was still within normal ranges. ECa 233 did not cause any significant microscopic changes of vital organs. Histopathological results revealed no causal effect relationship between ECa 233 and the lesions. Taken all together, ECa 233 is safe and should be further developed to pharmaceutical products or food supplement.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Associate Professor Anudep Rangsriripat, Ph.D., Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University for performing histopathological examination of tissue slides. Financial support from the National Research Council of Thailand and The National

Research University Project of CHE and the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund (AS0639) is truly appreciated.

REFERENCES

- [1] R. H. Singh, K. Narsimhamurthy, and G. Singh. Neuronutrient impact of Ayurvedic rasayana therapy in brain aging, *Biogerontology* 9: 369-374 (2008).
- [2] B. Brinkhaus, M. Lindner, D. Schuppan, and E.G. Hahn. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medicinal plant *Centella asiatica*. *Phytomedicine* 7: 427-448 (2000).
- [3] R. Izu, A. Aguirre, N. Gil, and J. L. Diaz-Pirez. Allergic contact dermatitis from a cream containing *Centella asiatica* extract, *Contact Dermatitis* 26: 192-193 (1992).
- [4] S. Chivapat, P. Chavalittumrong, A. Attawish, T. Boonruad, J. Bansiddhi, S. Phadungpat, S. Punyamong, and J. Mingmuang. Toxicity study of *Centella asiatica* (L) urban, *J. Thai Traditional and Alternative Medicine* 2: 3-17 (2004).
- [5] M. Oruganti, B. Kumar Roy, K. Kumar Singh, R. Prasad, and S. Kumar. Safety assessment of *Centella asiatica* in albino rats. *Phcog. J.* 2: 5-11 (2010).
- [6] A Kam-eg. B. Tantisira. and M. H. Tantisira. Preliminary study on effects of a standardized extract of *Centella asiatica*. ECa 233 on deficit of learning and memory by an intracerebroventricular injection of β -amyloid peptide in mice. *Thai J. Pharmacol.* 31: 79-82 (2009).

- [7] K. Wannarat, M. H. Tantisira, and B. Tantisira. Wound healing effects of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 on burn wound in rats. *Thai J. Pharmacol.* 31: 120-123 (2009).
- [8] K. Kulthong, M.H. Tantisira, N. Niwattisaiwong, K. Apipaiakul, S. Chevapat, and S. Lawanprasert. Effects of the standard extract of *Centella asiatica* (Eca233) on rat hepatic cytochrome P450. *Thai J. Pharmacol.* 33: 91-100 (2009).
- [9] M. G. Jayathirta, and S. H. Mishra. Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine* 11: 361-365 (2004).
- [10] K. Punturee, C.P. Wild, W. Kasinrerak, and U. Vinitketkumnuen. Immunodulatory activities of *Centella asiatica* and *Rhinocanthus nasutus* extracts. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 6: 396-400 (2005).
- [11] Y. Pimainog, A. Yothinarak, and P. Jorrakate. Reference ranges for hematological and clinical chemistry values in Wistar rats. *Bull. Dept. Med. Sci.* 45: 27-36 (2003).
- [12] S.C. Gad. The rat: pathology. In: S.C. Gad, and C.P. Chengellis (eds.). *Animal Models in Toxicology*, Marcel Dekker, New York, 1982, pp.78-81.

Chronic Toxicity Study of *Garcinia mangostana* Linn. Pericarp Extract

Songpol Chivapat^{1*} Pranee Chavalittumrong¹ Prapal Wongsinkongman¹
Chada Phisalpong² Anudep Rungsipipat³

ABSTRACT

Ethanollic extracts from fruit pericarp of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) possess many biological and pharmacological activities. However, chronic toxicity study of ethanolic extract has never been investigated. The objective of this study was to evaluate the safety of 95% ethanolic extract from mangosteen pericarp in animal model. The oral administration of the extract was performed in 180 Wistar rats randomly allocated to six groups, each of 15/sex. Group 1 was control group receiving distilled water. Group 2 to 6 were treatment groups receiving the extract at the doses of 10, 100, 500, 1000 and 1000 mg/kg/day for six months respectively. The last group was assigned to be the satellite group for the study of reversibility of the extract effects after two-week of extract withdrawal. The results revealed that the highest dose extract produced significantly lower body weights in both male and female rats, compared to their corresponding control groups. The extract at any tested doses did not affect the animals' behavior, health status and nor did produce any abnormality of clinical manifestations and hematological values. Clinical chemistry results showed that the male rats treated with 500 mg/kg/day extract onward had significantly higher ALT than their control group. Both male and female receiving the highest dose extract had significantly higher AST, whereas their glucose levels were significantly lower when compared to their corresponding control groups. The male rats of the highest dose and satellite groups had significantly higher BUN values than their control group. The female rats receiving the extract at the dose of 500 mg/kg/day onward had significantly higher BUN and creatinine values than their control group. Histopathological results of visceral organs revealed no significant lesion related to the extract; except the satellite group of both sexes, which had significantly higher lesion of centrilobular hydropic degeneration in their livers than the corresponding control groups. Such alteration may be caused by the highest dose mangosteen pericarp extract. In conclusion, the high dose mangosteen pericarp extract affected liver and kidney. Safety of chemical constituents in the extract should be further investigated before the usage for health promotion.

Keywords: chronic toxicity, mangosteen pericarp extract, rat

¹ Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Muang District Nonthaburi Province, Thailand 11000

² Institute of Research and Development, Government Pharmaceutical Organization, Bangkok, Thailand 10400

³ Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

*Corresponding author: E-mail: songpolc@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดเปลือกมังคุด

ทรงพล ชิวะพัฒน์¹ ปราณิ ขวลิตธำรง² ประไพ วงศ์สินคงม่น³ ชญา พิศาลพงษ์⁴ อนุเทพ รังสีพิพัฒน์⁵

สารสกัดเปลือกมังคุดมีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาที่น่าสนใจหลายประการ แต่ยังไม่มียารายงานการศึกษาพิษเรื้อรัง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อให้ทราบถึงความปลอดภัยของสารสกัดเปลือกมังคุดด้วยเอทานอล โดยวิธีป้อนสารสกัดทางปากแก่หนูแรทพันธุ์วิสตาร์ จำนวน 180 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 30 ตัว (เพศละ 15 ตัว) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่น กลุ่มที่ 2 ถึง 6 เป็นกลุ่มทดลอง ที่ได้รับสารสกัดเปลือกมังคุดขนาด 10, 100, 500, 1000 และ 1000 มก./กก./วัน เป็นเวลา 6 เดือน ตามลำดับ โดยกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มศึกษาผลย้อนกลับ (satellite group) ภายหลังจากให้สารสกัดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเปลือกมังคุดขนาด 1000 มก./กก./วัน ทำให้หนูเพศผู้และเพศเมีย มีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สารสกัดทุกขนาดไม่มีผลต่อพฤติกรรม สุขภาพ รวมทั้งไม่ทำให้หนูมีอาการแสดงออกและค่าทางโลหิตวิทยาผิดปกติแต่อย่างใด การตรวจค่าทางเคมีคลินิก พบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดตั้งแต่ 500 มก./กก./วัน ขึ้นไป มีค่าเอนไซม์ ALT สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 1000 มก./กก./วัน มีเอนไซม์ AST สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่มีระดับกลูโคสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 1000 มก./กก./วัน และกลุ่ม satellite มีค่า BUN สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดตั้งแต่ 500 มก./กก./วัน ขึ้นไปมีค่า BUN และ creatinine สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน ไม่พบรอยโรคใดๆ ที่เกิดจากสารสกัดเปลือกมังคุด ยกเว้นหนูกลุ่ม satellite พบรอยโรคการเสื่อมแบบมีน้ำในเซลล์ตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเกิดจากสารสกัดเปลือกมังคุดขนาดสูงสุด การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดเปลือกมังคุดขนาดสูงมีผลต่อตับและไต หากนำไปใช้เสริมสุขภาพควรมีการศึกษาด้านความปลอดภัยขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: พิษเรื้อรัง สารสกัดเปลือกมังคุด หนูแรท

¹ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จนนทบุรี 11000

² สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม กรุงเทพฯ 10400

³ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

⁴ ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: songpoi.c@dmsc.moi.go.th

INTRODUCTION

Fruit pericarp of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) has been traditionally used for centuries in Southeast Asians as a medicinal agent for the treatment of skin infections, wounds, amoebic dysentery and also inflammation, diarrhoea, cholera and dysentery in Ayurvedic medicine. (Pedraza-Chaverri et al., 2008). Several phytochemical studies have shown that there are many xanthenes compounds in the pericarp of mangosteen fruit. For example, α -mangostin, γ -mangostin, δ -deoxygartnin, garcinone E, mangostanol (Chairungsrilerd et al., 1996), totophillin A and B (Huang et al., 2001), mangostenin (Suksamrarn et al., 2003), mangostenones C, D and E (Suksamrarn et al., 2006). Many biological and pharmacological activities of the compounds extracted from mangosteen pericarp including its crude extracts have been extensively investigated. For instance, α -mangostin, the most abundant compound in the pericarp extract, exert antiproliferative activity against human leukemia cells (Matsumoto et al., 2003) and also possess antimalarial properties (Mahabusarakam et al., 2006). Moreover, this compound was shown to possess potent chemopreventive effects in rat colon carcinogenesis (Nabandith et al., 2004). Garcinone E has potent cytotoxic effect on lung, gastric, lung cancer human cell lines (Ho et al., 2002). Suksamrarn et al. (2003) has shown that α - and β -mangostin and garcinone B exhibit strong antituberculosis activity. An ethanolic extract of the mangosteen pericarp was demonstrated to possess antibacterial (Voravuthikunchai and Kitipat, 2005), antioxidant and neuroprotective (Weecharangsan et al., 2005), anti-allergy (Nakatani et al., 2002) and anti-inflammatory

activities in experimental animals (Reanmongkol and Wattanapiromkul, 2008). In addition, it has been reported to exert the remarkable activity against SKBR3 human breast adenoma cell line (Moongkarndi et al., 2004).

Even though mangosteen pericarp has been shown to possess various health benefits, the long term toxic effect of its extract has never been reported. In this study, we investigated chronic toxicity of the mangosteen pericarp extract in experimental animal to gain additional safety information. The results will be beneficial for supporting the development and the consumption of health products from mangosteen pericarp.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and preparation of mangosteen pericarp extract (MPE): The fruits of *G. mangostana* were purchased from Chantaburi Province, Thailand. The voucher specimen (WGM0615) was deposited at the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Thailand. The dried pericarp of mangosteen fruit was coarsely pulverized into powder. The powder was macerated twice with 95% ethanol for 48 and 24 hours respectively. The extract solution from each maceration was filtered and concentrated by evaporation under reduced pressure. Both concentrated extracts were pooled together and heated at 50°C to remove the solvent. The upper part of the concentrated extract was further evaporated with rotary evaporator at 55°C under reduced pressure, and dried with vacuum oven at 50°C for 12 hours. The lower part of the concentrated extract was centrifuged with high-speed centrifuge at 9,000 rpm for ten min, then the

supernatant solution was evaporated at 55 °C under reduced pressure using rotary evaporator and then was subjected to vacuum oven at 50 °C for 12 hours. Both concentrated extracts were mixed together at 55 °C until dried. The yield of dried MPE from the dried mangosteen pericarp was about 10% (w/w). Alpha-mangostin, a major biological active compound in MPE, was found to be 24.42% according to HPLC analysis. In addition, total tannins content in MPE was assayed by the applied determination of tannins method described in Thai Herbal Pharmacopoeia Vol II (Department of Medical Sciences, 2000) and it was found to be 13.8% (w/w). The extract was kept in well-closed container, protected from light at -20 °C for further toxicological investigation.

Animals: One hundred and eighty Wistar rats (90 male and 90 female rats weighing approximately 180-200 and 170-190 g, respectively) were purchased from The National Laboratory Animal Center, Mahidol University. Animals were housed in a hygienic conventional animal room of the laboratory animal center, Department of Medical Sciences where the environment of the room was maintained at 25±1 °C with 60% humidity and 12 hour-light-dark cycle. They were raised with commercial pellet diet and clean water *ad lib*. Prior to the chronic toxicity study, the rats were acclimatized with the environment for two weeks. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Department of Medical Sciences (Approval No. 49-011).

Chronic toxicity test: Wistar rats were randomly allocated to six groups of fifteen animals of each sex. Group I was control group receiving distilled water at the volume of 10 ml/kg.

Group 2 to 6 were experimental groups orally administered with MPE at the doses of 10, 100, 500, 1000 and 1000 mg/kg/day for six months respectively. The last group (satellite group) was further raised without treatment for 14 days, in order to assess reversibility of adverse effects which may be produced by the highest dose extract. During the experimental period, body weight and food intake were recorded weekly and the animals were observed for general appearance, behavior and signs of abnormalities. At the end of the six-month treatment period, the animals were fasted overnight, anesthetized with diethyl ether inhalation. Blood samples were collected from posterior vena cava for determining hematological and serum clinical chemistry values.

Hematological analysis was performed using automatic hematological analyzer Cell Dyn[®] 3500 (Abbot Laboratories Ltd, USA). Parameters examined were red blood cells (RBC), hematocrit (Hct), hemoglobin, mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC), white blood cells (WBC), neutrophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes, basophils and platelets. Clinical chemistry values were measured by using automatic chemistry analyzer Hitachi[®] 912 (Hitachi Ltd, Japan) and parameters assayed were alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total protein, albumin, bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium and chloride ions. A complete necropsy was performed to determine gross pathological alterations of various visceral organs. Brain, heart, lung, liver, kidney, stomach, spleen, testis, uterus urinary

bladder and adrenal glands were weighed by using Mettler Toledo® PB 153 balance (Metler Toledo Int Inc, Switzerland). The organs' weights were calculated into relative organ weight (g/1000 g body weight). The visceral organs were fixed in 10% buffered formalin, and subjected to conventional histological process. Histopathological examination was performed on the above mentioned organs including the trachea, lymph nodes, esophagus, pancreas, intestine, thyroid gland, lacrimal and salivary gland, prostate gland, seminal vesicle, ovary, uterus, and mammary glands

Statistical analysis: The data were statistically evaluated by one way ANOVA. Comparison between treatment and control group were made by Bonferroni test. For histopathological results, Fisher's exact was applied. Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of MPE on body weight, food consumption and health status: Male rats receiving MPE at the doses of 1000 and 500 mg/kg/day had significantly lower average body weight than their control group since the 7th and 17th week till the end of the study respectively. Similar body weight change was observed in the female rats treated with the highest dose MPE at the 12th week onward (Fig. 1). Measurement of the weekly food intake in the male and female over the whole experimental period showed no significant difference between all the treatment groups and their corresponding control groups in almost every week. Only the male and female rats receiving the highest dose had significantly lower food intake than their corresponding control groups at week 8, 9 and 14 in the former group and at week 2 in the latter group (Fig. 2). All of the MPE-treated groups revealed healthy and no sign of abnormality, as compared to their control groups.

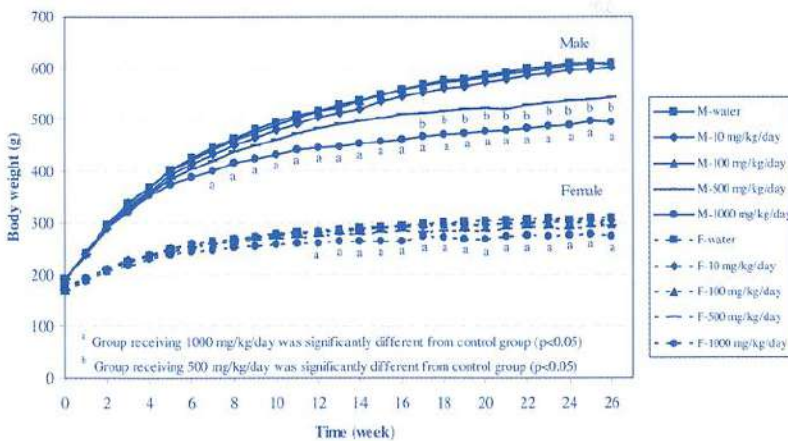


Figure 1 Growth curves of male and female rats receiving MPE for 6 months.

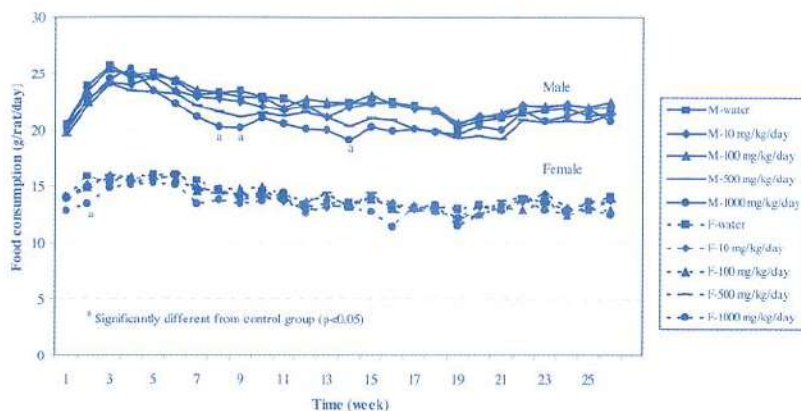


Figure 2 Food consumption of male and female rats receiving MPE for 6 months.

Table 1 Relative organ weight (g/1000 g of body weight) and body weight (g) of male rats receiving MPE for 6 months

Organs	Dose of MPE administered (mg/kg/day)					
	Control	10	100	500	1000	1000-S
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Brain	3.70±0.36	3.87±0.39	3.71±0.36	4.22±0.32*	4.65±0.36*	4.54±0.26*
Heart	2.55±0.26	2.71±0.17	2.56±0.15	2.73±0.16	2.89±0.15*	2.90±0.13*
Lung	3.01±0.38	3.25±0.35	3.14±0.32	3.50±0.38*	3.76±0.44*	3.52±0.24*
Liver	26.63±2.97	27.85±2.01	27.79±2.29	28.78±1.69	30.14±2.69*	30.24±2.98*
Stomach	3.76±0.39	4.03±0.44	3.91±0.26	4.62±0.46*	5.57±0.88*	4.75±0.49*
Spleen	1.51±0.20	1.68±0.27	1.60±0.15	1.74±0.21	1.77±0.23*	1.86±0.23*
Right kidney	2.29±0.26	2.37±0.17	2.36±0.14	2.72±0.25*	2.79±0.24*	2.86±0.23*
Left kidney	2.20±0.22	2.27±0.16	2.26±0.17	2.55±0.18*	2.71±0.24*	2.76±0.23*
Right testis	4.96±0.40	5.13±0.63	4.94±0.64	5.78±0.74*	5.86±1.18*	6.12±0.54*
Left testis	4.97±0.40	5.30±0.72	5.01±0.76	5.79±0.86	5.98±1.16*	6.18±0.54*
Right adrenal	0.06±0.01	0.06±0.02	0.06±0.01	0.07±0.01	0.08±0.01*	0.06±0.01
Left adrenal	0.07±0.02	0.07±0.01	0.07±0.02	0.07±0.02	0.08±0.01*	0.07±0.01
Bladder	0.27±0.05	0.28±0.07	0.27±0.05	0.27±0.05	0.29±0.06	0.28±0.05
Initial body weight	190.59±9.56	188.85±8.75	191.50±6.72	191.01±11.73	191.39±9.95	189.25±12.29
Final body weight	592.41±52.99	577.43±57.57	594.12±60.61	519.09±46.54*	465.91±37.80*	480.20±32.36*

The values are expressed as mean±SD, 1000-S: the satellite group
*significantly different from control group (p<0.05)

Effect of MPE on relative organ weight: In the male, relative weight of the brain, lung, stomach, both kidneys and right testis in the group receiving 500 mg/kg/day of MPE were significantly higher than those in the control group. Almost all organs in the highest dose group had significantly higher relative weight than those of their control groups except bladder. Similar

changes were observed in the satellite group except for adrenal glands and bladder (Table 1). In the female rat, relative stomach weight in the groups treated with 500 mg/kg/day MPE onward was significantly higher than that in the control group. The relative weight of the liver and both kidneys in the highest dose and satellite groups were significantly higher than

Table 2 Relative organ weight (g/1000g body weight) and body weight (g) of female rats receiving MPE for 6 months

Organs	Dose of MPE administered (mg/kg/day)					
	Control	10	100	500	1000	1000-S
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Brain	6.75±0.40	6.88±0.59	7.13±0.51	7.20±0.40	7.78±0.52*	7.25±0.45
Heart	3.21±0.40	3.27±0.26	3.26±0.25	3.29±0.22	3.47±0.26	3.36±0.24
Lung	4.23±0.44	4.21±0.67	4.59±0.49	4.55±0.42	4.58±0.31	4.55±0.40
Liver	26.89±3.09	27.28±2.68	26.74±2.80	27.46±2.13	30.31±2.24*	30.72±2.46*
Stomach	5.46±0.59	5.79±0.63	5.88±0.65	6.29±0.54*	7.70±0.97*	6.78±0.71*
Spleen	2.04±0.56	2.25±0.82	2.02±0.28	2.01±0.22	2.15±0.27	2.04±0.29
Right kidney	2.82±0.22	2.91±0.35	2.89±0.23	3.05±0.27	3.22±0.23*	3.18±0.30*
Left kidney	2.67±0.13	2.74±0.26	2.78±0.25	2.87±0.22	3.04±0.15*	3.05±0.23*
Right adrenal	0.12±0.04	0.13±0.02	0.14±0.02	0.13±0.02	0.14±0.02	0.23±0.38
Left adrenal	0.14±0.03	0.15±0.02	0.15±0.02	0.15±0.02	0.16±0.03	0.24±0.41
Bladder	0.31±0.09	0.32±0.06	0.29±0.05	0.31±0.06	0.34±0.04	0.33±0.03
Uterus	2.05±0.79	2.52±0.90	2.34±0.44	2.40±0.64	2.38±0.52	2.50±0.65
Right ovary	0.24±0.09	0.25±0.06	0.24±0.06	0.27±0.08	0.25±0.08	0.43±0.74
Left ovary	0.25±0.09	0.26±0.07	0.25±0.08	0.27±0.10	0.25±0.06	0.25±0.06
Initial body weight	173.61±8.38	174.3±67.77	169.73±8.50	169.53±6.83	169.47±5.52	171.69±11.11
Final body weight	295.19±25.60	289.49±26.22	283.63±15.18	275.68±14.74	252.75±18.20*	272.97±16.07*

The values are expressed as mean±SD, 1000-S: the satellite group
*significantly different from control group (p<0.05)

those in the control group. In addition, the highest dose group had significantly higher relative brain weight than the control group (Table 2).

Effects of MPE on hematological values: As depicted in Table 3 and 4, eosinophils in both male and female rats receiving MPE at the doses of 500 and 1000 mg/kg/day were significantly lower than those in their corresponding control groups. Neutrophils in the male rats of highest dose and satellite groups were significantly higher than those in the control group. In addition, WBC in the female rats of the satellite group was significantly higher than that in the control group.

Effects of ME on clinical chemistry values: In the male rats, the groups receiving MPE at the doses of 500 and 1000 mg/kg/day had significantly higher ALT than the control group. AST and BUN in the highest dose and satel-

lite group were significantly higher than those in the control group. Cholesterol of the group receiving MPE at the doses of 500 and 1000 mg/kg/day and of the satellite group showed significantly higher level than that of the control group. Total protein, uric acid and glucose in the highest dose group were significantly lower than those in the control group (Table 5). In the female, the highest dose group had significantly higher AST and total bilirubin than the control, whereas the glucose level was significantly lower than that in the control group. Both BUN and creatinine in the group receiving MPE at dose of 500 mg/kg/day onward and those in the satellite group were significantly higher than those in the control group (Table 6).

Effects of MPE on histopathological alterations: At autopsy, there was no remarkable macroscopic lesions in any organs of both MPE-

Table 3 Hematological values of male rats receiving MPE for 6 months

Parameters	Dose of MPE administered (mg/kg/day)					
	Control	10	100	500	1000	1000-S
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Hematocrit (%)	32.35±3.10	33.15±2.57	31.35±1.65	32.56±2.59	31.66±1.56	32.17±1.44
RBC (x10 ⁶ cells/mm ³)	9.17±0.75	9.33±0.76	8.77±0.43	9.08±0.70	8.93±0.58	8.87±0.41
Hemoglobin (g/dl)	16.49±1.05	16.78±1.18	15.93±0.42	16.58±1.31	16.18±0.98	16.34±0.58
MCV (µm ³ /red cell)	35.26±1.46	35.57±1.12	35.78±1.19	35.85±1.00	35.51±1.02	36.31±1.20
MCH(pg/red cell)	18.02±0.78	18.02±0.61	18.20±0.72	18.28±0.76	18.13±0.57	18.44±0.46
MCHC(g/dl RBC)	51.21±3.32	50.68±1.26	50.87±1.57	50.96±1.26	51.06±1.27	50.79±0.78
WBC(x10 ³ cells/mm ³)	2.47±0.65	2.80±0.58	2.52±0.68	2.64±0.73	2.59±0.48	3.08±0.73
Neutrophil (%)	27.50±4.95	28.64±6.36	29.56±6.24	30.46±9.39	38.63±9.11*	29.80±6.95*
Eosinophil (%)	2.04±0.52	1.69±0.49	1.94±0.52	1.30±0.43*	0.91±0.34*	1.40±0.46*
Lymphocyte (%)	65.2±0.866	64.86±7.27	64.10±6.05	65.53±10.22	56.73±9.98	63.37±8.05
Monocyte (%)	4.26±3.52	3.95±3.18	3.60±3.20	2.15±2.03	3.06±2.43	3.25±3.28
Basophil (%)	1.08±1.06	0.86±0.69	0.80±0.51	0.55±0.42	0.68±0.50	1.30±0.91
Platelet (x10 ³ cells/mm ³)	946.60±126.81	918.37±145.90	872.30±112.18	962.40±97.25	948.79±121.76	895.77±91.22

The values are expressed as mean±SD, 1000-S: the satellite group * significantly different from control group (p<0.05)

Table 4 Hematological values of female rats receiving MPE for 6 months

Parameters	Dose of MPE administered (mg/kg/day)					
	Control	10	100	500	1000	1000-S
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Hematocrit (%)	31.09±2.46	31.35±1.28	30.65±1.92	30.40±1.26	31.28±2.18	32.03±2.08
RBC (x10 ⁶ cells/mm ³)	8.34±0.76	8.26±0.31	8.24±0.46	7.98±0.22	8.48±0.59	8.45±0.60
Hemoglobin (g/dl)	16.04±1.17	16.16±0.68	15.90±0.99	15.71±0.49	16.24±0.91	16.42±1.06
MCV (µm ³ /red cell)	37.32±1.01	37.98±0.91	37.21±1.09	38.11±1.48	36.92±0.65	37.93±1.12
MCH(pg/red cell)	19.26±0.80	19.57±0.68	19.30±0.68	19.70±0.74	19.18±0.57	19.45±0.53
MCHC(g/dl RBC)	51.65±1.35	51.54±1.36	51.88±0.99	51.73±1.29	51.97±1.31	51.27±0.63
WBC(x10 ³ cells/mm ³)	1.13±0.31	1.22±0.52	1.21±0.38	1.43±0.56	1.53±0.49	1.74±0.37*
Neutrophil (%)	31.11±5.97	30.19±6.92	32.24±7.77	30.44±7.17	29.75±5.27	23.80±6.09
Eosinophil (%)	2.02±0.72	1.80±0.93	1.58±0.74	1.13±0.87*	1.06±0.60*	1.49±0.66*
Lymphocyte (%)	62.23±7.08	65.12±7.10	61.79±8.19	65.20±7.80	66.04±5.91	72.01±5.99
Monocyte (%)	3.85±2.94	2.33±1.62	3.71±2.34	2.59±2.28	2.46±1.90	1.85±2.17
Basophil (%)	0.79±0.64	0.55±0.27	0.67±0.35	0.65±0.50	0.88±0.30	0.84±0.66
Platelet (x10 ³ cells/mm ³)	822.68±92.86	763.73±56.44	798.37±64.25	824.29±92.97	878.73±94.02	378.93±73.24

The values are expressed as mean±SD, 1000-S: the satellite group

* significantly different from control group (p<0.05)

treated and control groups. Histopathology of visceral organs revealed that the highest dose male and female groups had significantly lower incidence of bronchiole-associated lymphoid tissue proliferation in the lung than their corresponding control groups. The satellite group of

both sexes had significantly higher incidence of centrilobular hydropic degeneration in the liver tissue than their corresponding control group. Histopathological findings of the heart, kidney and intestine in all MPE-treated groups did not differ from those in the control group (Table 7

Table 5 Biochemical values of male rats receiving MPE for 6 months

Parameters	Dose of MPE administered (mg/kg/day)					
	Control	10	100	500	1000	1000-S
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
ALP (U/L)	54.40±12.23	51.00±5.50	52.13±10.74	8.93±5.55	47.43±7.27	52.93±9.00
ALT (U/L)	44.13±16.04	47.47±21.83	36.20±7.33	79.80±21.73*	94.21±40.31*	79.47±45.68
AST (U/L)	97.13±24.80	105.13±34.59	91.73±11.06	117.27±36.84	137.00±31.65*	132.00±21.26*
Total protein (g/dl)	7.19±0.19	7.05±0.22	7.11±0.29	6.95±0.26	6.78±0.33*	7.13±0.27
Albumin (g/dl)	4.42±0.13	4.41±0.19	4.48±0.15	4.50±0.19	4.54±0.25	4.49±0.15
Total bilirubin (mg/dl)	0.08±0.03	0.08±0.03	0.09±0.03	0.11±0.03	0.11±0.03	0.10±0.03
BUN (mg/dl)	18.97±1.53	20.35±2.43	18.59±3.49	21.13±2.31	23.38±5.39*	25.07±3.99*
Creatinine (mg/dl)	0.58±0.04	0.58±0.04	0.57±0.05	0.52±0.06	0.60±0.16	0.60±0.09
Glucose (mg/dl)	263.40±57.23	250.48±57.50	271.64±70.96	208.45±39.83	156.85±46.71*	211.77±40.50
Uric acid (mg/dl)	5.09±1.32	5.24±1.21	4.95±1.65	4.39±1.11	3.35±1.13*	3.77±1.30
Triglyceride (mg/ dl)	81.78±26.27	87.83±45.58	92.42±34.23	70.83±22.72	64.21±14.35	58.70±11.23
Cholesterol (mg/dl)	84.90±13.65	75.82±12.91	79.34±16.13	70.28±13.99*	70.05±9.48*	62.92±8.89*
Sodium	145.07±2.28	145.07±2.49	145.60±2.41	146.00±2.61	146.64±3.15	144.80±1.78
Potassium	7.18±0.65	7.24±0.75	6.87±0.60	6.87±0.64	6.89±0.93	7.61±0.89
Chloride	102.87±1.36	101.93±1.44	102.53±2.07	102.33±1.95	103.64±2.37	104.40±1.99

The values are expressed as mean±SD, 1000-S: the satellite group

* significantly different from control group (p<0.05)

Table 6 Biochemical values of female rats receiving MPE for 6 months

Parameters	Dose of MPE administered (mg/kg/day)					
	Control	10	100	500	1000	1000-S
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
ALP (U/L)	22.27±7.01	24.67±5.92	23.87±3.83	24.57±4.36	24.87±5.08	24.80±4.26
ALT (U/L)	33.53±8.68	31.80±7.39	31.07±6.35	40.14±10.03	43.60±15.99	24.87±5.24
AST (U/L)	104.27±16.02	114.93±14.02	123.60±23.72	119.29±15.45	126.00±19.61*	84.93±7.58*
Total protein (g/dl)	7.15±0.34	7.17±0.23	7.13±0.28	7.12±0.30	7.16±0.36	7.33±0.34
Albumin (g/dl)	4.89±0.25	4.92±0.12	4.83±0.23	4.76±0.24	4.83±0.27	4.87±0.21
Total bilirubin (mg/dl)	0.10±0.03	0.12±0.03	0.12±0.04	0.14±0.05	0.16±0.04*	0.13±0.02
BUN (mg/dl)	21.78±2.61	24.66±4.52	23.73±5.02	28.21±4.85*	30.96±8.89*	30.07±7.27*
Creatinine (mg/dl)	0.51±0.05	0.58±0.11	0.56±0.06	0.62±0.08*	0.68±0.15*	0.64±0.06*
Glucose (mg/dl)	107.61±21.50	94.00±16.53	99.00±19.74	93.25±20.21	77.87±16.58*	100.85±20.51
Uric acid (mg/dl)	2.43±0.63	2.18±0.39	2.07±0.55	2.09±0.67	2.45±0.94	2.65±0.75
Triglyceride (mg/ dl)	41.33±6.82	42.56±6.20	38.96±7.38	35.82±7.58	38.40±9.36	44.85±7.67
Cholesterol (mg/dl)	67.55±12.94	61.86±18.23	63.46±13.82	66.15±13.45	62.35±13.01	64.13±14.15
Sodium	145.20±2.51	145.67±2.06	146.40±2.23	146.71±2.70	147.53±1.96	145.93±1.39
Potassium	6.29±0.96	6.00±0.94	5.42±1.17	5.32±1.38	5.65±1.43	7.15±1.60
Chloride	106.13±2.81	105.13±1.73	105.60±1.59	105.43±2.03	104.07±2.22	107.33±1.86

The values are expressed as mean±SD, 1000-S: the satellite group

* significantly different from control group (p<0.05)

and 8). In addition, there was no remarkable lesion in other examined organs between the MPE-treated and control group.

Table 7 Histopathological results of male and female rats receiving MPE for 6 months

Organs	Microscopic findings	Male rats						Female rats					
		Dose of MPE administered (mg/kg/day)						Dose of MPE administered (mg/kg/day)					
		Control	10	100	500	1000	1000-S	Control	10	100	500	1000	1000-S
Lung	BALT proliferation	8/15	9/15	7/15	6/15	2/15*	6/15	/15	5/15	5/15	4/15	1/15*	6/15
Heart	Myocardiosis	1/15	1/15	0/15	0/15	0/15	1/15	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL
Liver	Centrilobular hydropic degeneration	2/15	0/15	0/15	0/15	6/15	9/15*	0/15	0/15	0/15	0/15	2/15	8/15*
Kidney	Dilated tubule	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	4/15*	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL
	Hydronephrosis	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	0/15	0/15	1/15	4/15*	0/15	0/15
Small intestine	GALT proliferation in submucosa	1/15	3/15	2/15	3/15	1/15	1/15	1/15	3/15	1/15	2/15	1/15	1/15
Large intestine	GALT proliferation in submucosa	1/15	2/15	1/15	5/15	2/15	2/15	2/15	1/15	3/15	7/15	1/15	1/15

The results were expressed as the number of rats with pathological findings per total number of rats treated, 1000-S: the satellite group

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

(NRL: No remarkable lesions, BALT: bronchiole-associated lymphoid tissue, GALT: Gut-associated lymphoid tissue)

DISCUSSION

In this study, an administration of MPE at any tested doses did not cause any overt toxic signs and mortality in the rats. The measurement of body weight indicated that MPE may depress the growth of the animals and the male rats were more susceptible to this effect than the female rats. Our result was different from a previous study by Towatana et al.

(2010) saying that the oral administration of the 50% ethanolic extract in Wistar rats for three months did not affect the body weight at any time-points. This discrepancy may be caused by the difference in chemical constituents and their contents between the 95% and 50% ethanolic extract. Peaslee and Einhellig (1973) demonstrated that mice fed with diet containing tannic acid had retarded growth. In addition, the weanling rats receiving high tannin varieties of sorghum had significantly lower growth than those treated with low tannin varieties (Jambunathan and Mertz, 1973). Therefore, the result of poorer body weight in

the male group treated with 500 mg/kg MPE and that in the highest dose of both sexes might partially be due to the effects of tannins. The significantly less food intake were observed at only three time-points in the male rats of highest dose group and only one time-point in the female receiving this dose. However, measurement of the weekly food intake at any other time-points in both groups did not show any discrepancies. Thus, it could not be stated that MPE suppressed the food intake of the animals.

Almost all of the organs of the male rats of the highest dose and satellite groups as well as several organs of the male rats treated with 500 mg/kg/day MPE revealed higher relative weights. These findings may be caused by the lower body weight. As histopathological results of such organs did not show any associated abnormalities. In addition, their actual weights did not reveal any changes when compared to the control group. Similar reasons may account for the increased relative weight of some organ of the female rats of the highest dose

and satellite groups.

Hematological analysis of blood samples from the female rats revealed no significant difference in the total WBC number between the highest dose and their control group. Thus, the increase of such parameter in only the satellite female group could be due to biological variations among rats rather than the results of the extract. A decrease of eosinophils in both male and female groups receiving MPE at the doses of 500 and 1000 mg/kg/day as well as that in the satellite groups was likely due to the extract; however, this alteration was within normal range (Gad, 1992) and revealed no clinical significance. Neutrophil counts of the male rats receiving the highest dose were significantly higher and seemed to be dose-related. While Jejun et al. (2008) found that the same dose of 95% ethanolic extract of mangosteen did not cause any significant difference in hematological parameters including neutrophil in the male Sprague-Dawley rats. These discrepancies may be due to the difference in rat strains and duration of extract treatment. However, in this study, the alteration of neutrophils was slightly higher than the normal range (Gad, 1992) and the withdrawal of treatment could lead to reversibility of this effect. Clinical chemistry examination revealed the increase of ALT levels in the male rats receiving MPE at the doses of 500 and 1000 mg/kg/day and also that of AST in the male and female rats receiving highest dose, which may be caused by MPE. Pramyothin et al. (2003) demonstrated that xanthenes, the major compound isolated from mangosteen pericarp, caused the increase of both transaminases enzymes in isolated rat hepatocytes, which indicated the hepatotoxic ef-

fect. In addition, mangostin has been shown to induce the significant increase of AST and ALT in rats treated when given by intraperitoneal or oral administration (Sornprasit et al., 1987). The decrease of total protein in the male rats receiving highest dose was slightly lower than the normal range (Pimainog et al., 2003) and this change could return to normal after the extract withdrawal. Possible causes of this finding may be decreased protein synthesis caused by hepatic insufficiency and/or increased protein catabolism (Stockham and Scott, 2002). Marzo et al. (2002) reported that chicken fed with tannic acid added diet exhibited a marked increase in the activities of liver cathepsin A and D which suggested the increase in protein catabolism. Thus, the tannin in MPE, at least in part, accounts for this finding. The increase of total bilirubin in the female rats receiving the highest dose was within normal range (0.00-0.55 mg/dl) as reported by Gad (1992).

The decrease of glucose levels in the males and females receiving highest dose might contribute to the decreased gluconeogenesis in the liver, according to the hepatic insufficiency as shown by the increased hepatic enzyme activities (Stockham and Scott, 2002). The decrease of uric acid level in the male rats tended to be dose-related, however that in the highest dose group was within normal range (Gad, 1992). The decrease of cholesterol levels in the male rats receiving the extract at 500 mg/kg onward as well as the male satellite group might be due to the decreased production in the impaired hepatocytes (Stockham and Scott, 2002); nevertheless this alteration was within the reference values of the male rats (Pimainog et al., 2003). The increase of BUN and creatinine

in the female rats treated with 500 and 1000 mg/kg/day as well as the increase of BUN in the male rats of the highest dose group were higher than the reference interval of male and female Wistar rats as reported by Pimainog et al. (2003). These alterations suggested that MPE might affect the kidney function and this effect was also observed in both sexes after the extract withdrawal.

Histopathological examination of the lungs from the male and female rats of the highest dose group revealed a decreased incidence of bronchiole associated lymphoid tissue proliferation. This finding might be due to the anti-inflammatory effect of the extract. Nakatani et al. (2002) demonstrated that γ -mangostin, a xanthone compound in the mangosteen fruit hull, inhibited the syntheses of prostaglandin E2 and enzymes cyclooxygenase I and II. A significantly higher incidence of centrilobular hydropic degeneration of the liver of the male rats of the satellite group, together with the increase AST levels may be indicative of hepatotoxic effects of the extract. While the female rats of the satellite group had an increase incidence of such histological alteration without any elevations of their AST or ALT enzymes. The reasons for this finding may be explained that the magnitude of the serum enzyme activity is not a reliable indicator regarding the type or degree of tissue injury (Lassen, 2004). Our results also suggested that the withdrawal of MPE treatment could not lead to reversibility of hepatotoxic effects within two weeks. Although the males of the satellite group had the higher incidence of the kidney tubular cyst, this alteration did not show any significant difference between the male rats of the highest dose and

their control group. Furthermore, the female rats of the satellite and the highest dose group did not possess this alteration in their kidneys. Thus, this finding may not be concluded to be the results of MPE and needs to be further investigated. The increase of hydronephrosis incidence in the female rats receiving the extract at dose of 500 mg/kg/day could not be due to MPE since this was not dose dependent. Moreover, this change is considered incidental and thought to be congenital and inherited in many strains of rats (King and Russel, 2006). Other histopathological findings in the treatment groups did not show any dose dependency or any significant difference; therefore it could not be due to MPE.

In conclusion, the six-month oral administration of MPE in Wistar rats at the doses of 10, 100, 500 and 1000 mg/kg/day revealed that MPE did not produce any overt pharmacotoxic signs and abnormalities in hematological values. However, MPE at dose of 500 mg/kg/day onward affected the body weight and produced the increase in ALT, BUN and creatinine in the tested animals. The highest dose MPE caused the significant increase in AST. In addition, the finding of hepatocellular degeneration after the highest dose withdrawal may be suggestive of the persistence in liver pathology caused by the highest dose extract. Hence, this study revealed that MPE at dose 500 mg/kg onward affected liver and kidney, and it could not be suggested that MPE are safe for the long term usage. Additional assessment of the appropriate dose range including further studies on hepatotoxicity of various chemical components in MPE are suggested to be investigated, which may be useful for the safe assessment and for the

health product development from mangosteen pericarp extract.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank staffs of the Laboratory Animal Center of Department of Medical Sciences for animal facilities. We also thank Mr. Pornchai Sincharoenpokai for his technical assistance. This study was supported by grants from The Department of Medical Sciences 2008.

REFERENCES

- Chairungrilerd, N., Takeuchi, K., Ohizumi, Y., Nozoe, S. and Ohta, T. 1996. Mangosanol, a prenyl xanthone from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry*. 43(5): 1099-1102.
- Department of Medical Sciences, Public health Ministry. 2000. Thai herbal pharmacopoeia Vol II Bangkok: Prachachon Co., Ltd. 142-143.
- Gad, S.C 1992. The rat. In: *Animal Model in Toxicology*. S.C Gad and C.P. Chengelis (eds.). New York: Marcel Dekker. 78-95.
- Ho, C.K., Huang, Y.L. and Chen, C.C. 2002. Garcinone E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines. *Planta Med.* 68(11): 975-979.
- Huang, Y.L., Chen, C.C., Chen, Y.J., Huang, R.L. and Shieh, B.J. 2001. Three xanthones and a benzophenone from *Garcinia mangostana*. *J Nat Prod.* 64(7): 903-906.
- Jambunathan, R. and Mertz, E.T. 1973. Relationship between tannin levels, rat growth, and distribution of proteins in sorghum. *J Agr Food Chem.* 21(4): 692-696.
- Jejun, P., Pootkham, K., Pongpaibul, Y., Duangrat, C. and Tharavichitkul, P. 2008. Acute and repeated dose 28-day oral toxicity study of *Garcinia mangostana* Linn. Rind Extract. *CMU j Nat Sci.* 7(2): 199-208.
- King, W.W. and Russel, S.P. 2006. Metabolic, traumatic, and miscellaneous diseases. In: *The Laboratory rat*. M.A. Sucklow, S.H. Weisbroth and C.L. Franklin (eds.) Burlington: Elsevier Academic Press.
- Lassen, E.D. 2004. Laboratory evaluation of the liver. In: *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. D.B. Troy (ed.) Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins. 358.
- Mahabusarakam, W., Kuaha, K., Wilairat, P. and Taylor, W.C. 2006. Prenylated xanthones as potential antiplasmodial substances. *Planta Med.* 72(10): 912-916.
- Marzo, F., Urdaneta, E. and Santidrian, S. 2002. Liver proteolytic activity in tannic acid-fed birds. *Poultry Sci.* 81: 92-94.
- Matsumoto, K., Akao, Y., Kobayashi, E., Ohguchi, K., Ito, T., Inuma, M. and Nozawa, Y. 2003. Induction of apoptosis by xanthones from mangosteen in human leukemia cell lines. *J Nat Prod.* 66(8): 1124-1127.
- Moongkarndi, P., Kosem, N., Luanratana, O., Jongsomboonkusol, S., Pongpan, N. 2004. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia.* 75: 375-377.
- Nabandith, V., Suzui, M., Morioka, T., Kaneshiro, T., Kinjo, T., Matsumoto, K., Akao, Y., Inuma, M. and Yoshimi, N. 2004. Inhibitory effects of crude alpha-mangostin, a xanthine derivative, on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in the rat. *Asian Pac J Cancer Prev.* 5(4): 433-438.

- Nakatani, K., Atsumi, M., Arakawa, T., Oosawa, K., Shimura, S., Nakahata, N. and Ohizumi, Y. 2002. Inhibitions of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen, a Thai Medicinal Plant. *Biol Pharm Bull.* 25(9): 1137-1141.
- Peaslee, M.H. and Einhellig, F.A. 1973. Tanic acid-induced alterations in mouse growth and pituitary melanocyte-stimulating hormone activity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 25(4): 507-514.
- Pedraza-Chaverri, J., Cardenas-Rodriguez, N., Orozco-Ibarra, M. and Perez-Rojas, J.M. 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food Chem Toxicol.* 46: 3227-3239.
- Pimainog, Y., Yothinarak, A. and Jornrakate, P. 2003. Reference ranges for hematological and clinical chemistry values in Wistar rats. *Bull Dept Med Sci.* 45(1): 27-36.
- Pramyothin, P., Sapwarobol, S. and Ruangrungsi, N. 2003. Hepatotoxic effects of xanthenes extracted from rind of *Garcinia mangostana* in isolated rat hepatocytes. *Thai J Pharm Sci.* 27(3-4): 123-129.
- Reanmongkol, W. and Wattanapiromsakul, C. 2008. Evaluation of the analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities of the extracts from the pericarp of *Garcinia mangostana* Linn. In experimental animals. *Songklanakarin J Sci Technol.* 30(6): 739-745.
- Sornprasit, A., Sripiyaratnanakul, K., Chuay-Yim, P. and Tanakittithnm, P. 1987. Preliminary toxicological study of mangosteen Songklanakarin *J Sci Technol.* 9(1): 51-57.
- Stockham, S.L. and Scott, M.A. 2002. *Fundamental of Veterinary Clinical Pathology.* Ames: Iowa State Press. 610 pp.
- Suksamrarn, S., Suwannapoch, N., Phakhodee, W., Thanuhiranlert, J., Ratananukul, P., Chimnoi, N. and Suksamram, A. 2003. Antimicrobial activity of phenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull.* 51(7): 857-859.
- Suksamrarn, S., Komutiban, O., Ratananukul, P., Chimnoi, N., Lartpornmatulee, N. and Suksamram, A. 2006. Cytotoxic prenylated xanthenes from the young fruit of *Garcinia mangostana*. *Chem Pharm Bull.* 54: 301-305.
- Towatana, N.H., Reanmongkol, W., Wattanapiromsakul, C. and Bunkrongcheap, R. 2010. Acute and subchronic toxicity evaluation of the hydroethanolic extract of mangosteen pericarp. *J Med Plant Res.* 4(10): 969-974.
- Voravuthikunchai, S.P. and Kitpipit, L. 2005. Activity of medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 11: 510-512.
- Weecharangsan, W., Opanasopit, P., Sukma, M., Ngawhirunpat, T., Sotanaphun, U. and Siripong, P. 2006. Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). *Med Princ Pract.* 15: 281-287.

PATHOLOGICAL STUDY ON THE CHRONIC TOXICITY OF THAI TRADITIONAL MEDICINE: YA-RID-SI-DUANG-MAHAKAL

Achariya Sailasuta^{1,2} Suchanit Ngamkala¹ Songpol Cheewapat⁴
Pranee Chavalittamrong⁴ Tanasorn Tunsaringkarn² Anusorn Rungsiyothin²
Chanida Palanuvej² Anchalee Chuthaputti⁵ Nijisiri Ruangrungs^{2,3}

¹Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, ²Institute of Health Research,

³Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok

10330, ⁴Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, ⁵Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health, Nonthaburi, 11000

ABSTRACT

The pathological study on chronic toxicity of Thai traditional medicine: Ya-rid-si-duang-mahakal was investigated in 180 wistar rats. The rats were divided into 6 groups, 30 rats in each group (male=15 and female=15). Group 1 was a control group, treated orally with distilled water. Group 2-5 were treated orally with 10, 100, 500 and 1000 mg/day/kg body weight for 6 months continuously. Group 6 (Recovery group), they were treated orally with 1000 mg/day/kg body weight for 6 months as treatment group. After that, they were then stopped administration 2 weeks before euthanasia. The histopathological results of the treatment groups showed significant lesions in kidneys and liver when compared to control ($p<0.05$). The kidneys showed various tubular casts with mild to moderate degree tubulonephrosis and moderate degree focal nephritis as wall liver showed mild to moderate degree fatty degeneration with moderate degree focal hepatic necrosis. There were some recognizable lesions in other organs, such as, submucosal edema of stomach, laryngeal epithelial hyperplasia when the rats were given in high-dose groups. In conclusion, the chronic toxicity in 6 months administration of Ya-rid-si-duang-mahakal did not demonstrate any pathological changes in the visceral organs of the experimental rats. However, the kidney and liver function test should be monitored in the long term administration.

Keywords: pathological study, chronic toxicity, Thai traditional medicine, Ya-rid-si-duang-mahakal

INTRODUCTION

Hemorrhoid is the common health problem in human. The Thai traditional medicine: Ya-rid-si-duang-mahakal is one of alternative medicine that practically use in many hospitals for treatment¹. The study of mutagenicity of Ya-rid-si-duang-mahakal has been previously described¹. There has been neither toxicity test nor adverse effect of this Thai traditional

medicine reported yet. Therefore, this study is attempted for study on pathology on chronic toxicity of

Ya-rid-si-duang-mahakal in experimental rats. The obtained data are useful for the patient on safety and risk assessment of Ya-rid-si-duang-mahakal as a medical treatment for hemorrhoid in the primary health care.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: achariya.sa@chula.ac.th Tel. 02-218-9615-6. Fax. 0 2252-0779

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the Medicine

The Thai traditional medicine: Ya-rid-si-duang-mahakal was in powdered preparation without mercuric sulfide composition. The crude ingredients were extracted by 95% alcohol 600 ml/kg, then filtered and evaporated by rotary evaporator. The extraction residues were added by distilled water 600 ml, filtered and evaporated by lyophilizer. The preparations were then mixed, dissolved with distilled water and adjusted in various concentrations for chronic toxicity test¹.

Animals and Chronic Toxicity Study

One hundred eighty wistar rats weighing 200 ± 10 g. for male and 180 ± 10 g. for female were purchased from National Laboratory Animal Center, Mahidol University. They were housed for acclimatization in experimental room at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60% humidity and 12 hours/day artificial light. The mice were fed with sterile food and water ad lib.

Procedures for chronic toxicity were as followed. The rats were divided into 6 groups, 30 rats in each group (male=15 and female=15). Group 1 was a control group, treated orally with distilled water as placebo effect. Group 2-5 were treated orally with 10, 100, 500 and 1000 mg/day/kg body weight for 6 months continuously. For group 6 (Recovery group), the rats were treated orally with 1000 mg/day/kg body weight for 6 months as treatment group. They were stopped the medicine administration for 2 weeks before necropsy. At the end of the experimental period, the rats were euthanized by ether inhalation. During experimental period, the necropsy was then performed in the dead rats.

Upon necropsy the gross and histo-

pathological lesions were determined². The organs (brain, heart, lung, liver, kidney, larynx, spleen, intestine, pancreas, testis, prostate gland, seminal vesicle, ovary, uterine, mammary gland, salivary gland, lacrimal gland, thyroid gland, adrenal gland and bone marrow) were macroscopically examined. The tissues were then preserved in 10% buffer formalin and routinely processed for histology technic³. The tissues were embedded in paraffin block and cut into 5 microns thickness. The slides were stained by Hematoxylin & eosin (H&E stain) and observed under light microscope. In some section, the special stains such as Alcian blue pH 3, Prussian blue and Von Kossa were also employed.

Statistic analysis

The degrees of pathological severity were determined in all organs. There were mild, moderate and severe. No remarkable lesion (NRL) was used in case of no recognizable pathological change. The pathological lesion data in male and female (non-parametric) were compared between control and experimental groups. The statistical analysis used Mann Whitney Test ($p < 0.05$) by program (SPSS version 14.0)

RESULTS

No remarkable gross lesion was observed in the internal organs. The histopathological results on chronic toxicity of Thai traditional medicine: Ya-rid-si-duang-mahakal were shown (Table 1 and 2). There were mild and moderate degree, and no remarkable lesion (NRL) in liver, kidney, spleen, adrenal gland, brain, bone marrow, larynx, pancreas, stomach, intestine, heart and lung. There were

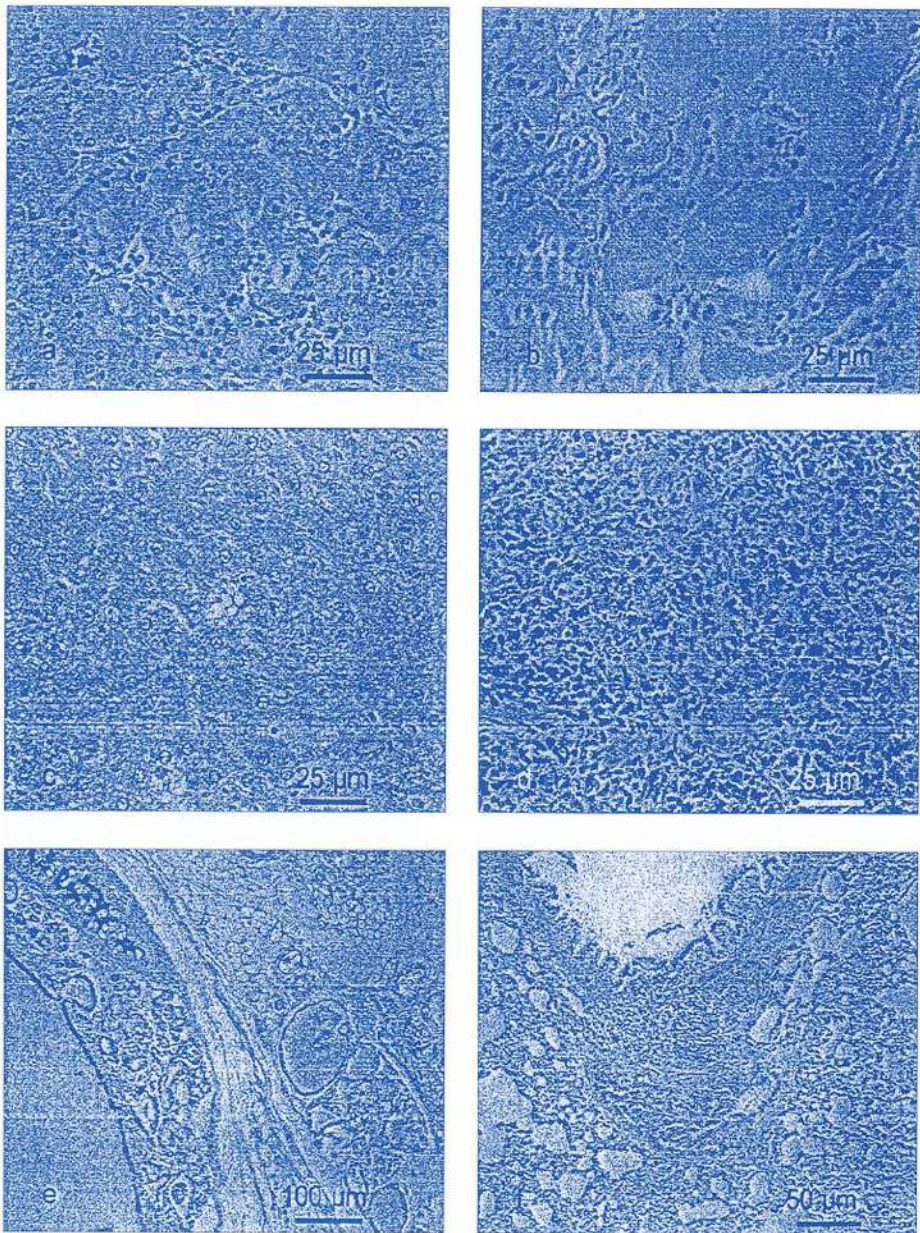


Figure 1: The histopathological picture showed swollen with hydropic degeneration of the renal tubular epithelium; mild degree tubulonephrosis (a). Evidence of hyaline casts accumulated in renal tubules; moderate degree tubulonephrosis (b). Hepatic cell degeneration showed mild degree fatty degeneration (c). Splenic hemosiderosis in moderate degree (d). Edema in the submucosal layer of the larynx (e). The hyperplasia of the bronchiolar associated lymphoid tissue at the peribronchiolar area (f) Hematoxylin-eosin

NRL in other organs, such as testis, prostate gland, seminal vesicle, ovary, uterine, mammary gland, salivary gland, lacrimal gland, and thyroid gland. Moreover, there were pulmonary congestion, focal pulmonary emphysema and mild degree bronchiolar associated lymphoid tissue (BALT) hyperplasia in all groups which showed no statistical significant ($p > 0.05$). The pathological lesions that showed statistical significant in each group ($p < 0.05$), were in kidneys and liver. There were mild to moderate degree tubulonephrosis with renal cast accumulation. The casts were protein, hyaline and calcium cast in renal tubules. Mild to moderate degree of hepatic cell degeneration and focal hepatic necrosis found in treatment groups. The others were splenic hemosiderosis, laryngeal epithelial hyperplasia, gastric submucosal edema and adrenal cortex hyperplasia (Fig. 1 a,b,c,d,e,f.). The necropsy results of the three rats that died during the experimental period; two female rats in control and 500 mg/day/kg body weight and one male rat in 1000 mg/day/kg body weight were respiratory and circulatory failure.

DISCUSSION

The pathological lesions that showed statistical significant in treatment groups when compared to control group, mainly demonstrated in kidney and liver. In addition, the lesions in stomach, larynx were well pronounced when rat received high dose of the medicine that could be due to chronic irritation⁴. For 6 months administration in various doses effected on the renal tubular epithelium. There were renal tubular degeneration with various degrees of cast accumulation which were due to nephrotoxic effect⁵. The degree was also consistently

increased when the rats were treated with high dose. Mild to moderate degree hepatic cell degeneration and focal hepatic necrosis were found in all group and high dose group that could be the hepatotoxic effect⁶⁻⁷. It has been reported that hepatic cells in rat show rapidly regeneration that could also compensate the mild degree pathological changes⁸⁻⁹. It was revealed that three rats died during the experimental period caused by circulatory failure or shock^{4,10-11}. The splenic hemosiderosis also found in all groups and showed more severity in high-dose group. It was resulted from the erythrocyte destruction or lysis of erythrocyte that occurred in normal physiology or mild toxic condition⁴⁻⁶. The adrenal cortex hyperplasia renders the hyperadrenocoticism that cause by the continuous stress⁴. Upon the results, the 6 months administration of Ya-rid-si-duang-mahakal did not demonstrate any pathological changes in visceral organs of both male and female rats in all groups. However, it is suggested that the kidney and liver function test should be monitored in the long term administration.

Table 1 The Histopathological findings in male rats (n=90)

	Doses (mg/day/kg body weight)					
	0 (n=15)	10 (n=15)	100 (n=15)	500 (n=15)	1000 (n=15)	1000-R* (n=15)
Mild degree	±	±	±	±	±	±
tubulonephrosis	20%	66.7%	13.3%	53.3%	100%	73.3%
Focal nephritis				± ^a 40%	± ^a 13.3%	± ^a 40%
Moderate degree	±	±	±	± ^a	± ^a	± ^a
tubulonephrosis	26.7%	53.3%	60%	100%	100%	100%
with casts						
Mild degree focal				± ^a	± ^a	± ^a
hepatic necrosis				73.3%	46.7%	60%

Table 1 The Histopathological findings in male rats (n=90)

	Doses (mg/day/kg body weight)					
	0 (n=15)	10 (n=15)	100 (n=15)	500 (n=15)	1000 (n=15)	1000-R* (n=15)
Moderate degree hepatic fatty degeneration				± [#]	± [#]	± [#]
				86.7%	80%	86.7%
Mild degree splenic hemosiderosis	±	±	±	±	±	±
	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Gastric submucosal edema	±	±	± [#]	± [#]	± [#]	± [#]
	40%	46.7%	26.7%	60%	33.3%	33.3%
Laryngeal epithelial hyperplasia	±	± [#]	± [#]	± [#]	± [#]	± [#]
	40%	86.7%	86.7%	93.3%	93.3%	93.3%

* 1000-R = recovery group, ± pathological lesions.

statistical significant when compared to control group (p<0.05)

Table 2 The Histopathological findings in female rats (n=90)

	Doses (mg/day/kg body weight)					
	0 (n=15)	10 (n=15)	100 (n=15)	500 (n=15)	1000 (n=15)	1000-R* (n=15)
Mild tubulonephrosis	±	±	±	±	±	±
	80%	53.3%	73.3%	40%	43.3%	73.3%
Focal nephritis				± [#]	± [#]	± [#]
				86.7%	80%	86.7%
Mild degree tubulonephrosis with casts	±	±	±	± [#]	± [#]	± [#]
	46.7%	53.3%	53.3%	100%	100%	100%
Periportal cellular infiltration				± [#]	± [#]	± [#]
				86.7%	60%	80%
Mild splenic hemosiderosis	±	±	±	±	±	±
	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Gastric submucosal edema	±	± [#]	± [#]	± [#]	± [#]	± [#]
	26.7%	40%	40%	46.7%	26.7%	100%
Laryngeal epithelial hyperplasia	±	± [#]	± [#]	± [#]	± [#]	± [#]
	33.3%	73.3%	86.7%	53.3%	86.7%	86.7%

* 1000-R = recovery group, ± pathological lesions.

statistical significant when compared to control group (p<0.05)

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the research fund of the Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health, Thailand.

REFERENCES

1. Tongyong L., Tunsaringkarn T., Palanuvej C., Rungsiyothin A., Issaravanich S., Chuthaputti A. et al. 2006. Mutagenicity and anti-mutagenicity of Thai Traditional medicine: Ya-rid-si-duang-mahakal. Thai J Health Res 20(2): 155-168.
2. Sailasuta A., Rungsipipat A., Techagnamsuwan S. 2004 The Necropsy Technic. Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University Point Graphic Co.Ltd. Bangkok.
3. Luna LG. 1964. Manual of histologic staining method of the Armed Forces, Institute of Pathology, 3rd Edition, USA Mcgraw-Hill, Inc. 12-20, 32-45, 153-154, 174-188.
4. McGavin MD. And Zachary JF. 2007. Cellular and Tissue Responses to Injury, Vascular disorders and thrombosis, Pathologic Basis of Veterinary Disease. 4th Edition, Mosby Elsevier, China, 33-38, 63-99.
5. Jones TC., Hunt RD. and King NW. 1997. Mineral Deposits and Pigments, Urinary System. Veterinary Pathology. 6th Edition, William and Wilkins Company, USA. 69-70, 1116-1128.

6. Cheville NF. 1999. Cell and Tissue Responses to sublethal Injury. Introduction to Veterinary Pathology, 2nd Edition. Iowa State University Press/ Ames USA. pp. 29-53.
7. Wander MH. And Colin GR. 1998. Fundamental of toxicologic pathology, Academic Press, Harcourt brance company, USA, pp. 166-178.
8. Meyer DJ. And Harvey JW. 1998. Veterinary Laboratory Medicine, Interpretation and Diagnosis, 2nd Edition. W.B. Saunders Comp., Tokyo. 157-186.
9. Villiers E. and Blackwood L. 2005. BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology. 2nd Edition, British Small Animal Veterinary Association, Replika Press Pvt Ltd. India, 120-121.
10. William WC. And Mcdonald MG. 1995. The Urinary system. Special veterinary pathology, Missouri, USA. Mosby Year Book Incooperation. Pp. 209-299.
11. Uehara Y., Takada S., Hirawa N., Kawabata Y., Oshima N., Numabe A., et al. 1994. Vasoconstrictors and renal protection induced by B1-selective adrenoreceptor antagonist B isoprolol. J Cardiovas Pharmacol 23: 897-906.

การศึกษาทางพยาธิวิทยาความเป็นพิษเรื้อรังของตำรับยาไทย : ยาริดสีดวงมหากาฬ

อัจฉริยา ไตละสุด¹ สุชนิทธิ งามกาลละ² ทรงพล ชิวพัฒน์³ ปราณี ชาลิตธำรง⁴
 ธนสร ตันตุงกราร์⁵ อนุสรณ์ รังสิโยธิน⁶ ชนิดา พลาญเวช⁷ อัญชลี จูฑะพุทธิ⁸ นิจศิริ เรืองรังษี⁹
 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์¹ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์²
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 ³สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
⁴กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ

การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของต้นตำรับยาไทยยาริดสีดวงมหากาฬในหนูถีบจักร พันธุ์วิสตาจำนวน 180 ตัว โดยแบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 30 ตัว ประกอบด้วยเพศผู้ 15 ตัวและเพศเมีย 15 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นทางปาก กลุ่ม 2-5 ได้รับยาทางปากในขนาด 10 100 500 และ 1000 มิลลิกรัม/วัน/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 6 เดือน กลุ่มที่ 6 ได้รับสารสกัดทางปากในขนาด 1000 มิลลิกรัม/วัน/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ติดต่อกัน 6 เดือนและหยุดยา 2 สัปดาห์ก่อนทำการชันสูตรซาก ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาพบรอยโรคที่ตับและไตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มควบคุมและกลุ่มได้รับยา โดยพบตะกอนสะสมในท่อไต ร่วมกับภาวะท่อไตเสื่อมสภาพในระดับอ่อนถึงระดับปานกลาง และการอักเสบแบบห่อหุ้มในไตระดับปานกลาง พบเซลล์ตับตายแบบห่อหุ้มและการเสื่อมสภาพของเซลล์ตับแบบมีไขมันแทรกในระดับอ่อนถึงระดับปานกลาง พบรอยโรคในอวัยวะอื่นๆ ได้แก่การบวมน้ำใต้เยื่อบุกระเพาะอาหาร และเซลล์เยื่อบุกอลองเสียงบริเวณคอหอยเพิ่มจำนวนและขยายใหญ่ในระดับอ่อนถึงปานกลาง เมื่อหนูทดลองได้รับยาขนาดสูงขึ้นด้วย จากผลการศึกษารูปได้ว่าการได้รับยาริดสีดวงมหากาฬในขนาดต่างๆติดต่อกันเป็นระยะเวลา 6 เดือนไม่พบพยาธิสภาพในอวัยวะภายในหนูทั้งสองเพศ แต่ควรมีการเฝ้าระวังโดยการตรวจการทำงานของตับและไตอย่างต่อเนื่องหากได้รับยาเป็นเวลานาน

คำสำคัญ: การศึกษาทางพยาธิวิทยา พิษเรื้อรัง ตำรับยาไทย ยาริดสีดวงมหากาฬ

*ติดต่อได้ที่ achariya.sa@chula.ac.th โทรศัพท์ 02-218-9615-6 โทรสาร 02-252-0779

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง ของสารสกัดยาหอมนวโกฐ

ปราณี ขวลิตร่าง*
ทรงพล ชีวะพัฒน์**
เอมมนัส อັตติวิชญ์**
นพมาศ สุนทรเจริญนท์ †

บทคัดย่อ

ยาหอมนวโกฐเป็นตำรับที่ใช้ในการรักษาอาการทางระบบไหลเวียนโลหิต (แก่ลม) ประกอบด้วยเครื่องยาพืชสมุนไพร ๕๔ ชนิดและพืชมอส ผู้รายงานได้ศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดยาหอมนวโกฐในหนูถีบจักรพันธุ์ไฮบริดจำนวน ๕๐ ตัวแบ่งเป็น ๕ กลุ่มๆ ละ ๑๐ ตัว โดยกลุ่มควบคุมป้อนด้วยน้ำกลั่นและกลุ่มทดลอง ๔ กลุ่ม ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐทางปากในขนาด ๒, ๔, ๘ และ ๑๖ ก./กก. ตามลำดับ พบว่า สารสกัดยาหอมนวโกฐขนาด ๒ และ ๔ กรัม ไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและไม่มีหนูตาย ส่วนขนาด ๘ และ ๑๖ ก./กก. ทำให้หนูตายร้อยละ ๑๐ และ ๗๐ ตามลำดับ จากศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดยาหอมนวโกฐเป็นระยะเวลา ๖ เดือน ในหนูแรพพันธุ์วีสตาร์ ๑๔๔ ตัว แบ่งออกเป็นกลุ่มๆ ละ ๒๔ ตัว (เพศผู้ ๑๒ และเพศเมีย ๑๒) กลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่น และกลุ่มทดลอง ๕ กลุ่ม ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐทางปากในขนาด ๑๐, ๑๐๐, ๕๐๐, ๑,๐๐๐ และ ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน หรือเทียบเท่าประมาณ ๑, ๑๐, ๕๐, ๑๐๐ และ ๑๐๐ เท่าของขนาดยาหอมนวโกฐที่ใช้ในคน โดยกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มศึกษาการฟื้นตัวภายหลังหยุดให้สารสกัดเป็นเวลา ๒ สัปดาห์ ผลการทดลอง พบว่า สารสกัดยาหอมนวโกฐไม่มีผลต่อค่าน้ำหนักตัวเฉลี่ย การกินอาหาร พฤติกรรม และสุขภาพทั่วไปของหนูแรพ หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน มีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงชันและหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาดเท่ากันมีปริมาณเกล็ดเลือดสูงชันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อหยุดให้สารสกัดพบว่า มีแนวโน้มลดลง สารสกัดยาหอมนวโกฐไม่ทำให้เกิดทางเคมีคลินิกผิดปกติแต่อย่างใด ผลการตรวจอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้สรุปได้ว่า สารสกัดตำรับยาหอมนวโกฐไม่ทำให้เกิดพิษเรื้อรังต่อหนูแรพวีสตาร์

คำสำคัญ : ยาหอมนวโกฐ, พิษเฉียบพลัน, พิษเรื้อรัง

ภูมิหลังและเหตุผล

ยาหอมนวโกฐ เป็นตำรับยาในยาสามัญประจำบ้านแผนโบราณ^๑ และจัดอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ (บัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ. ๒๕๔๙) โดยเป็นยารักษาอาการทางระบบไหลเวียนโลหิต (แก่ลม)^๒ ตำรับยาหอมนวโกฐมีส่วนประกอบเครื่องยา เป็นพืชวัตถุ ๕๔ ชนิด คือ กระวาน กฤษณา กระดอม กะลำพัก กานพลู โกฐกระดุก โกฐกั๊กรา โกฐก้านพร้าว โกฐเขมา โกฐจุฬาลำพา โกฐเขียง โกฐหุงปลา โกฐสอ

โกฐหัวบัว ขอนดอก ชิง ไคร้เหนือ จันทน์แดง จันทน์เทศ (ดอก) จันทน์เทศ (ลูก) จันทน์เทศ เจตมูลเพลิงแดง ชะลูด ชะเอมเทศ ข้าพลุ ดีปลี เทียนเกล็ดหอย เทียนขาว เทียนข้าวเปลือก เทียนดำ เทียนแดง เทียนตาตึกแดง เทียนเขาวพานี เทียนสัตตบุษย์ บอระเพ็ด บัวหลวง บุนนาค เปราะหอม ผักชีลา ผักหอม ทุกล มะขาม ป้อม มะลิ ราชดัด สน สมอภิภาก สมุลแว้ง สะค้าน สักชี สารพัดพิษ สารภี หญ้าตีนนก หญ้าแห้วหมู อบเชยญวนและธาตุวัตถุ ๑ ชนิด คือ พืชมอส

* สำนักวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี ๑๑๐๐
 ** สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี ๑๑๐๐๐
 † ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ๑๐๔๐๐

สมุนไพรต่างๆ ที่ใช้เป็นเครื่องยาในตำรับยาหอม นวโกฐมีผลต่อระบบต่างๆ ของประมวลได้ดังนี้ กลุ่มที่มีผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต ได้แก่ เกสรบัวหลวง^๑ ขอนดอก^๒ เทียนขาวเปลือก^๓ เทียนดำ^๔ เทียนแดง^๕ เทียนยาวพามี^๖ ฤทธิ์เพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ ได้แก่ บอระเพ็ด^๗ เทียนแดง^๘ ชิง^๙ ฤทธิ์ลดอัตราการเต้นของหัวใจ ได้แก่ เทียนดำ^{๑๐,๑๑} ฤทธิ์ที่ทำให้หัวใจเต้นผิดปกติมีการเต้นได้ตามปกติ ได้แก่ เกสรบัวหลวง^{๑๒} โกฐสอ^{๑๓} ฤทธิ์ทำให้ระบบการไหลเวียนโลหิตดีขึ้น ได้แก่ เห็บหมู^{๑๔,๑๕} ส่วนเครื่องยาที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร จะมีฤทธิ์ลดการบีบตัวของกระเพาะและลำไส้ ได้แก่ ข้าพลุ^{๑๖} ลูกผักชี^{๑๗} โกฐเชียง^{๑๘,๑๙} โกฐกระดุก^{๒๐,๒๑} โกฐหัวบัว^{๒๒} กานพลู^{๒๓,๒๔} เทียนแดง^{๒๕} ชิง^{๒๖,๒๗} และลูกจันทน์^{๒๘} ฤทธิ์ลดการหลั่งน้ำย่อยและกรด ได้แก่ โกฐกระดุก^{๒๙} และ ลูกจันทน์^{๓๐} ฤทธิ์เพิ่มการหลั่งเมือกในกระเพาะอาหาร ได้แก่ เปราะหอม^{๓๑} ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ได้แก่ โกฐกระดุก^{๓๒} ชะเอมเทศ^{๓๓,๓๔,๓๕,๓๖} เปราะหอม^{๓๗} ดิบลิ^{๓๘} โกฐจุฬาลำพา^{๓๙} โกฐเชียง^{๔๐} ขอนดอก^{๔๑} เทียนขาวเปลือก^{๔๒} เทียนดำ^{๔๓} เทียนคาตักแตน^{๔๔} และ เทียนสัตตบุศย์^{๔๕} ฤทธิ์ต้านการอาเจียน ได้แก่ เห็บหมู^{๔๖} กานพลู^{๔๗,๔๘} และ ชิง^{๔๙,๕๐,๕๑,๕๒,๕๓} เครื่องยาที่มีฤทธิ์ต่อระบบประสาทส่วนกลาง จะมีฤทธิ์เสริมระยะเวลาหลับของยา pentobarbital ยาวนานขึ้น ได้แก่ ดอกนูนาค^{๕๔} ฤทธิ์คลายความกังวลทำให้สงบ ได้แก่ ลูกผักชี^{๕๕} โกฐเชียง^{๕๖} จันทน์เทศ^{๕๗} กานพลู^{๕๘,๕๙} โกฐสอ^{๖๐} ลูกจันทน์^{๖๑} และพิทูล^{๖๒} ดังนั้นจะเห็นว่า ยาหอมนวโกฐเป็นตำรับยาแผนโบราณที่ประกอบด้วยเครื่องยาสมุนไพรต่างๆ ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลายต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย แต่ยังคงขาดข้อมูลด้านปลอดภัยของยาตำรับนี้ จึงได้ศึกษาความเป็นพิษทั้งระยะเฉียบพลันและระยะเรื้อรังของสารสกัดตำรับยาหอมนวโกฐในสัตว์ทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนการใช้ยาหอมนวโกฐได้อย่างมั่นใจในความปลอดภัยต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

การเตรียมสารสกัดตำรับยาหอมนวโกฐ

นำเครื่องยามาตรวจสอบชนิดและคุณภาพ โดย รศ.ดร.พจนาศ สุนทรเจริญนนท์ ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตามวิธีในเภสัชตำรับของประเทศไทย (Thai Herbal Pharmacopocia 1995) เตรียมสารสกัดตำรับยาหอมนวโกฐโดยบดหยาบเครื่องยาทั้งตำรับ หมักด้วยตัวทำละลายเอทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ทำซ้ำ ๓ ครั้ง กรองแยกสารสกัดแล้วนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ๙๕% เป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมงทำซ้ำ ๓ ครั้ง กรองแยกสารสกัดแล้วนำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดแอลกอฮอล์ นำกากเครื่องยามาต้มต่อด้วยน้ำให้เดือด ๓๐ นาที กรองแยกสารสกัดนำมาระเหยให้เข้มข้น ภายใต้สุญญากาศ แล้วรวมสารสกัดทั้งสามส่วนเข้าด้วยกันระเหยแห้ง โดยวิธีการทำแห้งแบบพ่น จะได้สารสกัดตำรับยาหอมนวโกฐซึ่งมีปริมาณสารสกัดคิดเป็น ๖.๐๒% ของน้ำหนักเครื่องยา

การเตรียมยาที่ใช้ในการทดลอง

นำสารสกัดยาหอมนวโกฐมาละลายในน้ำกลั่นเพื่อใช้ในการทดสอบพิษในสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรพันธุ์ไฮซัวร์ น้ำหนักตัวระหว่าง ๒๐ ถึง ๒๒ กรัม จำนวน ๕๐ ตัว (เพศละ ๒๕ ตัว) และหนูแรทพันธุ์ วิสตาร์ จำนวน ๑๒๐ ตัว เพศผู้ จำนวน ๖๐ ตัว น้ำหนักตัวระหว่าง ๑๓๐-๑๕๐ กรัม ชั่งจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดลเลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองระดับ conventional hygienic ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ ๒๕±๑ องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๖๐ ได้รับแสงสว่างวันละ ๑๒ ชั่วโมง ให้อาหารและน้ำไม่จำกัดปริมาณ ก่อนดำเนินการทดสอบพิษเฉียบพลันทำการอดอาหารหนูถีบจักรเป็นเวลา ๒ ชั่วโมง และพักหนูแรทก่อนการทดลองพิษเรื้อรังเพื่อให้คุ้นเคยกับสภาวะแวดล้อมเป็นเวลา ๒ สัปดาห์ โครงการศึกษาพิษของสารสกัดยาหอมนวโกฐในสัตว์ทดลองครั้งนี้ ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการการดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เอกสารควบคุม

โครงการหมายเลข ๕๑-๐๐๒

การทดสอบพิษเฉียบพลัน

แบ่งหนูถีบจักรโดยวิธีสุ่มออกเป็น ๕ กลุ่มๆ ละ ๑๐ ตัว (เพศผู้ ๕ ตัว และเพศเมีย ๕ ตัว) ดังนี้ กลุ่มทดลองได้รับน้ำกลั่นปริมาณ ๑๐ มล./กก. และกลุ่มทดลอง ๔ กลุ่ม ได้รับสารสกัดยาหอมแนวโกฐขนาด ๒, ๔, ๖ และ ๘ ก./กก. สังเกตอาการและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ อย่างใกล้ชิดใน ๕ ชั่วโมงแรกและทุกวัน จนครบ ๑๔ วัน บันทึกจำนวนหนูที่ตาย เมื่อครบกำหนดทำการุณยฆาต (Euthanasia) หนูถีบจักรด้วยเครื่องดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ผ่านปากชั้นสูตรเพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและคำนวณหาขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ ๕๐ (ค่า LD₅₀) โดยวิธี probit analysis ด้วยโปรแกรม SPSS/PC version 11.5

การทดสอบพิษเรื้อรัง

แบ่งหนูขาวโดยวิธีสุ่มออกเป็น ๖ กลุ่มๆ ละ ๒๔ ตัว (เพศผู้ ๑๒ ตัว และเพศเมีย ๑๒ ตัว) ดังนี้ กลุ่มที่ ๑ เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นทางปากในปริมาณ ๑๐ มล./กก./วัน กลุ่มที่ ๒ ถึง ๕ เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดยาหอม แนวโกฐโดยวิธีป้อนทางปากในขนาด ๑๐, ๑๐๐, ๕๐๐ และ ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา ๖ เดือน และกลุ่มที่ ๕ เป็นกลุ่มศึกษาพันตัว (1000-F) ได้รับสารสกัดยา หอมแนวโกฐขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน จนครบ ๖ เดือน จึงหยุดให้สารสกัดและเลี้ยงต่อจนครบ ๑๔ วัน ระหว่างการทดลองสังเกตอาการผิดปกติและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ (clinical and physical appearance) ทุกวัน ชั่งน้ำหนักตัวและบันทึกปริมาณอาหารที่หนูกิน สัปดาห์ละ ๑ ครั้ง ถ้ามีหนูตายหรืออยู่ในภาวะใกล้ตาย (moribund) จะทำการผ่าซากชั้นสูตรทันที เมื่อหนูทดลองได้รับสารสกัดครบ ๖ เดือน อดอาหารหนูเป็นเวลา ๑๖ ชั่วโมง จากนั้นดมสลบหนูด้วยอีเธอร์ เปิดผ่าช่องท้อง เจาะเลือดจากหลอดเลือด posterior vena cava เพื่อนำไปตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Cell-Dyn © รุ่น 3500 เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาดังต่อไปนี้ ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดง จำนวนเม็ดเลือดขาว

เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล อีโอสิโนฟิล ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ และเบสฟิล ปริมาณเกล็ดเลือด ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ได้แก่ mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) และ mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) ส่วนซีรัมนำไปตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เคมีในเลือดอัตโนมัติ Hitachi © รุ่น 912 เพื่อวัดค่าเอนไซม์อัลคาลายน์ฟอสฟาเตส (ALP) อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส (ALT) แอสปาเทอะมิโนทรานสเฟอเรส (AST) โปรตีนรวม อัลบูมิน บิลิรูบินรวม direct bilirubin ยูเรียไนโตรเจน (BUN) ครีอาตินิน กลูโคส กรดยูริก ไทรอกสิชโรโรด์ และโคเลสเตอรอล

จากนั้นผ่าซากชั้นสูตรสัตว์ทดลองเพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของอวัยวะต่างๆ ดังนี้ สมอง หัวใจ ปอด ตับ ไต หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ม้าม ลำไส้ส่วนต่างๆ ตับอ่อน อัณฑะ ต่อมลูกหมาก ถุงเก็บน้ำเชื้อ รังไข่ มดลูก ต่อมม้าม ต่อมน้ำลาย ต่อมน้ำตา ต่อมไทรอยด์ และต่อมหมวกไต บันทึกน้ำหนักอวัยวะด้วยเครื่องชั่ง Mettler Toledo © รุ่น PB153 เพื่อคำนวณหาค่าน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (น้ำหนักอวัยวะ (ก.) / น้ำหนักตัว (ก.) x ๑,๐๐๐) จากนั้นเก็บอวัยวะแช่ในน้ำยาบัพเฟอร์ฟอรมาลินความเข้มข้นร้อยละ ๑๐ แล้วนำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (histology) เพื่อตรวจหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยา

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลของน้ำหนักตัว การกินอาหาร ค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางเคมีคลินิก น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ วิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา การทดสอบสมมติฐานใช้ one-way ANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Bonferoni test โดยโปรแกรม SPSS/PC version 11.5 ส่วนผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ใช้ Fisher exact test

ผลการศึกษา

การทดสอบพิษเฉียบพลัน

หนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐขนาด ๒ และ ๔ ก./กก. มีอาการเป็นปกติไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและไม่มีหนูตัวใดเสียชีวิตระหว่างการทดสอบ ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด ๘ ก./กก. จำนวน ๑ ตัว เคลื่อนไหวช้าลง เดินลำบาก ต่อมาซึมและตาย (คิดเป็นร้อยละ ๑๐) ในวันที่ ๒ ของการทดสอบ และหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด ๑๖ ก./กก. บางตัวแสดงอาการเดินลากขาหลังภายหลังจากได้รับสารสกัด ๒๔ ชั่วโมง ต่อมาไม่เคลื่อนไหวและตายทั้งสิ้น ๗ ตัว (ร้อยละ ๗๐) ดังนั้นขนาดของสารสกัดยาหอมนวโกฐที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ ๕๐ (LD₅₀) มีค่าเท่ากับ ๑๓.๗๖ ก./กก. หรือมีค่าอยู่ระหว่าง ๑๑.๐๘-๑๗.๖๙ ก./กก. ที่ช่วงแห่งความเชื่อมั่น ๙๕ เปอร์เซ็นต์ จากการผ่าซากหนูถีบจักรทุกตัวไม่พบรอยโรคหรือความผิดปกติทางมพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

การทดสอบพิษเรื้อรัง
ผลของสารสกัดยาหอมนวโกฐต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร และสุขภาพของสัตว์ทดลอง

หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐทุกขนาด ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางมพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐขนาด ๕๐๐ มก./กก./วัน มีค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน มีค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของหัวใจ ตับ กระเพาะอาหาร ม้าม และไตซ้ายสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูกลุ่มพื้นตัว (1000-R) มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับ กระเพาะอาหาร ม้าม ไตทั้งสองข้างสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๑) หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐทุกขนาดมีน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะต่างๆ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมยกเว้นหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๒)

ผลของสารสกัดยาหอมนวโกฐต่อค่าทางโลหิตวิทยา

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน มีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและขนาด ๕๐๐ และ ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน รวมทั้งกลุ่ม 1000-R มีเปอร์เซ็นต์อีโอซิโนฟิลต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๓) หนูที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก. มีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาหอม นวโกฐขนาด ๑๐๐, ๕๐๐, และ ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน ขึ้นไป มีเปอร์เซ็นต์อีโอซิโนฟิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญและพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน มีจำนวนเกล็ดเลือดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๔)

ผลของสารสกัดยาหอมนวโกฐต่อค่าทางเคมีคลินิก

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐกลุ่ม 1000-R มีเอนไซม์ ALT สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และขนาด ๕๐๐ มก./กก./วัน มีค่าเอนไซม์ AST ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาหอม นวโกฐทุกกลุ่มมีค่าทางเคมีคลินิกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ ๖ และ ๗)

ผลของสารสกัดยาหอมนวโกฐต่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐขนาด ๑๐๐ มก./กก./วัน มีอุบัติการณ์ของการเพิ่มขนาดของเม็ดเลือดขาวรอบหลอดเลือดขนาดเล็กที่ปอด และการเสื่อมแบบไขมันที่ตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๗) หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐมีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอย่างไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ ๘)

ตารางที่ ๑ น้ำหนักตัว (ก.) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (ก./๑๐๐ ก.) ของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมหวลเป็นเวลา ๖ เดือน

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	ขนาดของสารสกัดยาหอมหวล (มก./กก./วัน)					
	๐	๑๐	๑๐๐	๕๐๐	๑๐๐๐	1000-R
น้ำหนักตัวเริ่มต้น	๒๒๕.๕๖±๑๑.๕๘	๒๒๕.๙๙±๑๑.๘๒	๒๒๕.๘๓±๑๓.๘๘	๒๒๕.๙๕±๙.๑๗	๒๒๖.๐๑±๑๓.๓๗	๒๒๗.๕๘±๕.๘๓
น้ำหนักตัวสิ้นสุด	๕๘๖.๗๐±๘๖.๐๘	๕๘๖.๕๕±๖๑.๙๗	๕๖๙.๘๖±๒๓.๙๕	๕๗๒.๒๒±๕๒.๒๘	๕๖๒.๓๖±๕๒.๙๙	๕๖๒.๑๘±๓๖.๒๘
สมอง	๕.๐๗±๐.๓๙	๓.๘๓±๐.๓๓	๓.๘๖±๐.๒๖	๓.๘๗±๐.๓๗	๔.๒๐±๐.๓๘	๔.๐๖±๐.๒๖
หัวใจ	๒.๕๘±๐.๒๐	๒.๕๕±๐.๒๓	๒.๖๑±๐.๒๐	๒.๗๒±๐.๖๖	๒.๘๗±๐.๒๑*	๒.๘๒±๐.๑๙
ปอด	๓.๒๒±๐.๘๗	๓.๐๘±๐.๒๗	๓.๐๙±๐.๒๗	๓.๐๕±๐.๓๕	๓.๒๗±๐.๒๙	๓.๓๒±๐.๓๘
ตับ	๒๖.๘๗±๒.๕๗	๒๗.๑๒±๑.๖๐	๒๖.๗๖±๒.๓๕	๓๐.๘๘±๑.๘๕*	๓๓.๙๖±๑.๙๕*	๓๐.๕๐±๒.๕๕*
กระเพาะอาหาร	๓.๙๑±๐.๕๓	๔.๐๑±๐.๕๑	๓.๘๗±๐.๒๕	๔.๒๒±๐.๕๒	๔.๕๓±๐.๕๐*	๔.๕๒±๐.๕๕*
ม้าม	๑.๕๖±๐.๑๖	๑.๖๓±๐.๒๕	๑.๖๕±๐.๖๐	๑.๖๖±๐.๑๗	๑.๘๘±๐.๒๖*	๑.๗๓±๐.๒๓*
โตซาวา	๒.๕๘±๐.๒๗	๒.๕๗±๐.๒๒	๒.๕๓±๐.๑๗	๒.๕๙±๐.๒๕	๒.๖๖±๐.๒๔	๒.๙๐±๐.๒๘*
โตซาย	๒.๓๐±๐.๒๖	๒.๓๐±๐.๑๘	๒.๓๖±๐.๒๒	๒.๕๖±๐.๑๖	๒.๕๙±๐.๒๓*	๒.๗๑±๐.๒๖*
อัณฑะขวา	๕.๘๐±๐.๕๐	๕.๘๓±๐.๕๒	๕.๘๗±๐.๒๒	๕.๙๐±๐.๘๘	๕.๘๖±๐.๓๐	๖.๐๓±๐.๕๕
อัณฑะซ้าย	๕.๘๘±๐.๕๔	๕.๓๐±๐.๕๔	๕.๓๕±๐.๒๙	๕.๗๗±๐.๕๓	๖.๐๕±๐.๓๖	๖.๑๒±๐.๕๓
ต่อมหมวกโตซาวา	๐.๐๖±๐.๐๑	๐.๐๖±๐.๐๑	๐.๐๖±๐.๐๑	๐.๐๖±๐.๐๑	๐.๐๖±๐.๐๑	๐.๐๖±๐.๐๒
ต่อมหมวกโตซาย	๐.๐๗±๐.๐๑	๐.๐๗±๐.๐๑	๐.๐๗±๐.๐๑	๐.๐๗±๐.๐๑	๐.๐๗±๐.๐๑	๐.๐๗±๐.๐๑
กระเพาะปัสสาวะ	๐.๒๖±๐.๐๓	๐.๒๖±๐.๐๔	๐.๒๕±๐.๐๕	๐.๒๖±๐.๒๒	๐.๒๕±๐.๐๗	๐.๒๕±๐.๐๔
จำนวนสัตว์ทดลอง (n)	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๒ น้ำหนักตัว (ก.) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (ก./๑๐๐ ก.) ของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาหอมหวลเป็นเวลา ๖ เดือน

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	ขนาดของสารสกัดยาหอมหวล (มก./กก./วัน)					
	๐	๑๐	๑๐๐	๕๐๐	๑๐๐๐	1000-R
น้ำหนักตัวเริ่มต้น	๑๘๗.๘๘±๑๓.๐๘	๑๘๖.๑๖±๑๖.๒๘	๑๘๖.๖๗±๑๐.๘๒	๑๘๕.๙๕±๑๓.๙๓	๑๘๕.๕๖±๑๑.๕๕	๑๘๘.๓๗±๗.๒๗
น้ำหนักตัวสิ้นสุด	๒๘๒.๓๑±๓๗.๒๒	๒๘๙.๒๒±๒๗.๒๐	๒๗๕.๐๘±๒๓.๘๗	๒๘๑.๑๕±๒๓.๑๑	๒๗๗.๒๑±๒๖.๘๘	๒๘๐.๑๗±๓๑.๒๘
สมอง	๖.๙๒±๐.๗๘	๖.๗๑±๐.๖๘	๗.๑๒±๐.๕๕	๗.๑๖±๐.๕๒	๗.๑๕±๐.๖๕	๗.๒๕±๐.๗๗
หัวใจ	๓.๒๙±๐.๓๖	๓.๒๒±๐.๒๕	๓.๔๐±๐.๓๐	๓.๓๐±๐.๒๗	๓.๔๙±๐.๒๘	๓.๓๕±๐.๓๗
ปอด	๔.๕๕±๐.๕๓	๔.๓๓±๐.๔๔	๔.๕๕±๐.๓๓	๔.๕๖±๐.๓๑	๔.๕๕±๐.๓๓	๔.๓๘±๐.๓๘
ตับ	๒๖.๕๓±๓.๕๒	๒๕.๘๐±๒.๑๑	๒๘.๕๙±๒.๒๕	๒๙.๖๕±๒.๑๒	๓๓.๖๘±๒.๕๖*	๒๙.๘๙±๓.๖๘
กระเพาะอาหาร	๕.๗๗±๐.๗๑	๕.๖๗±๐.๗๑	๖.๐๕±๐.๘๗	๖.๐๖±๐.๘๓	๖.๑๕±๑.๐๙	๕.๙๙±๐.๗๓
ม้าม	๒.๓๒±๐.๑๖	๒.๑๕±๐.๓๖	๒.๑๖±๐.๓๒	๒.๒๕±๐.๓๕	๒.๑๙±๐.๒๕	๒.๑๐±๐.๒๖
โตซาวา	๒.๕๘±๐.๒๐	๒.๕๘±๐.๓๑	๓.๐๗±๐.๒๖	๓.๐๙±๐.๒๖	๓.๒๕±๐.๒๘	๓.๑๖±๐.๒๙
โตซาย	๒.๓๕±๐.๒๓	๒.๓๖±๐.๒๙	๒.๙๙±๐.๒๒	๒.๙๐±๐.๒๖	๓.๐๕±๐.๒๖	๒.๙๙±๐.๒๘
ต่อมหมวกโตซาวา	๐.๑๕±๐.๐๒	๐.๑๕±๐.๐๓	๐.๑๕±๐.๐๒	๐.๑๕±๐.๐๒	๐.๑๕±๐.๐๔	๐.๑๕±๐.๐๔
ต่อมหมวกโตซาย	๐.๑๕±๐.๐๓	๐.๑๖±๐.๐๓	๐.๑๗±๐.๐๔	๐.๑๕±๐.๐๒	๐.๑๗±๐.๐๓	๐.๑๕±๐.๐๓
กระเพาะปัสสาวะ	๐.๓๐±๐.๐๔	๐.๓๑±๐.๐๗	๐.๒๙±๐.๐๔	๐.๓๓±๐.๐๙	๐.๓๑±๐.๐๖	๐.๓๑±๐.๐๖
มดลูก	๒.๕๑±๐.๗๘	๒.๙๕±๑.๑๑	๒.๗๕±๐.๙๕	๒.๓๓±๐.๗๖	๒.๒๕±๐.๕๘	๒.๖๐±๐.๗๗
รังไข่ขวา	๐.๒๕±๐.๐๗	๐.๒๕±๐.๐๖	๐.๒๕±๐.๐๖	๐.๒๕±๐.๐๖	๐.๒๒±๐.๐๖	๐.๒๕±๐.๐๗
รังไข่ซ้าย	๐.๒๙±๐.๐๘	๐.๒๘±๐.๐๗	๐.๒๘±๐.๐๗	๐.๒๓±๐.๐๗	๐.๒๕±๐.๐๗	๐.๒๗±๐.๐๘
จำนวนสัตว์ทดลอง (n)	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า p < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๓ ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมแมวโกฐเป็นเวลา ๖ เดือน

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	ขนาดของสารสกัดยาหอมแมวโกฐ (มก./กก./วัน)						
	0	๑๐	๑๐๐	๕๐๐	๕๐๐	๑๐๐๐	1000-R
ฮีมาโตคริต (%)	๕๐.๐๒±๒.๘๕	๔๙.๕๐±๒.๓๓	๔๙.๙๔±๓.๘๘	๔๙.๓๔±๓.๒๒	๔๙.๘๘±๔.๓๒	๕๐.๘๖±๓.๓๒	๕๐.๗๖±๓.๓๒
เม็ดเลือดแดง (x ๑๐๖ เซลล์/มม.๓)	๙.๒๔±๗.๕๓	๙.๒๘±๐.๔๗	๙.๓๔±๐.๖๐	๙.๑๑±๐.๓๖	๙.๒๓±๐.๖๗	๙.๒๓±๐.๖๗	๙.๓๕±๐.๕๗
ฮีโมโกลบิน (ก./ดล.)	๑๕.๕๑±๐.๘๔	๑๕.๕๕±๐.๑๑	๑๕.๕๕±๐.๑๒	๑๕.๓๕±๐.๓๘	๑๕.๖๓±๐.๒๐	๑๕.๖๓±๐.๒๐	๑๕.๗๖±๐.๙๙
MCV (fl / red cell)	๕๓.๘๕±๑.๓๙	๕๓.๓๐±๒.๐๐	๕๓.๔๗±๑.๕๐	๕๔.๐๙±๑.๗๐	๕๔.๐๙±๑.๗๐	๕๔.๐๖±๒.๔๘	๕๔.๒๖±๑.๕๙
MCH (pg / red cell)	๑๖.๗๐±๐.๕๑	๑๖.๗๕±๐.๗๖	๑๖.๖๗±๐.๔๓	๑๖.๖๗±๐.๔๓	๑๖.๖๗±๐.๔๓	๑๖.๖๗±๐.๔๓	๑๖.๖๕±๐.๓๗
MCHC (ก./ดล.เม็ดเลือดแดง)	๓๑.๐๑±๐.๓๗	๓๑.๕๒±๐.๘๖	๓๑.๖๖±๐.๕๘	๓๑.๖๖±๐.๕๘	๓๑.๖๖±๐.๕๘	๓๑.๖๖±๐.๕๘	๓๑.๖๕±๐.๓๖
เม็ดเลือดขาว (x ๑๐๓ เซลล์/มม.๓)	๒.๘๔±๐.๗๖	๒.๙๘±๐.๗๓	๒.๘๗±๐.๓๒	๒.๘๗±๐.๓๒	๒.๘๗±๐.๓๒	๒.๘๗±๐.๓๒	๒.๘๗±๐.๓๒
นิวโทรฟิล (%)	๒๘.๘๔±๑.๒๔	๒๖.๗๕±๙.๔๘	๒๕.๓๕±๔.๗๕	๒๕.๓๕±๔.๗๕	๒๕.๓๕±๔.๗๕	๒๕.๓๕±๔.๗๕	๒๕.๓๕±๔.๗๕
อีโอซิโนฟิล (%)	๑.๗๒±๐.๕๐	๑.๗๙±๐.๕๘	๑.๕๒±๐.๔๗	๑.๕๒±๐.๔๗	๑.๕๒±๐.๔๗	๑.๕๒±๐.๔๗	๑.๕๒±๐.๔๗
ลิมโฟไซท์ (%)	๖๘.๘๙±๙.๑๘	๖๗.๓๒±๘.๘๒	๗๑.๐๖±๕.๑๙	๗๑.๐๖±๕.๑๙	๗๑.๐๖±๕.๑๙	๖๖.๖๖±๕.๓๗	๖๕.๑๕±๖.๖๖
โมโนไซท์ (%)	๓.๘๐±๓.๓๓	๒.๗๕±๒.๐๖	๑.๒๒±๐.๘๑	๑.๒๒±๐.๘๑	๑.๒๒±๐.๘๑	๑.๒๒±๐.๘๑	๒.๑๑±๑.๔๐
เบโซฟิล (%)	๑.๕๕±๐.๘๗	๑.๔๐±๐.๖๖	๑.๘๒±๐.๔๙	๑.๘๒±๐.๔๙	๑.๘๒±๐.๔๙	๑.๘๒±๐.๖๓	๑.๘๒±๐.๖๓
เกล็ดเลือด (x ๑๐๓ เซลล์/มม.๓)	๙๙๖.๓๒±๒๒๓.๖๓	๑๐๐๕.๑๓±๑๓๙.๖๕	๙๓๐.๒๐±๑๕๕.๒๐	๙๓๐.๒๐±๑๕๕.๒๐	๙๓๐.๒๐±๑๕๕.๒๐	๑๑๒๘.๗๖±๓๓๐.๙๔	๑๐๗๐.๐๕±๙๐.๑๐
จำนวนเม็ดเลือดแดง (n)	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่ < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๔ ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดจากหอมวักไซเป็นเวลา ๖ เดือน

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	ขนาดของสารสกัดจากหอมวักไซ (มก./กก./วัน)					
	0	๑๐	๑๐๐	๕๐๐	๑๐๐๐	1000-R
ฮีมาโตคริต (%)	๔๖.๗๕±๓.๖๔	๔๗.๗๒±๒.๑๓	๔๘.๒๕±๒.๖๔	๔๗.๘๒±๓.๕๕	๔๕.๘๒±๒.๒๗	๔๙.๕๑±๕.๐๓
เม็ดเลือดแดง (x ๑๐ ^๖ เซลล์/ม.ม.๓)	๘.๒๐±๐.๕๖	๘.๓๑±๐.๕๗	๘.๕๕±๐.๕๕	๘.๓๓±๐.๓๗	๘.๑๕±๐.๔๘	๘.๕๕±๐.๕๒
ฮีโมโกลบิน (ก./ดล.)	๑๔.๘๖±๐.๗๘	๑๕.๐๘±๐.๖๓	๑๕.๑๘±๐.๗๖	๑๕.๑๖±๐.๙๙	๑๔.๙๐±๐.๗๐	๑๕.๕๖±๑.๒๔
MCV (fl / red cell)	๕๗.๐๒±๒.๐๗	๕๗.๕๑±๒.๑๒	๕๗.๒๔±๑.๘๒	๕๗.๓๖±๒.๗๕	๕๖.๓๓±๑.๕๑	๕๗.๙๑±๒.๓๔
MCH (pg / red cell)	๑๘.๑๖±๐.๗๘	๑๘.๕๕±๐.๕๕	๑๘.๐๐±๐.๕๕	๑๘.๕๕±๐.๗๔	๑๗.๗๑±๐.๖๕	๑๘.๒๑±๐.๙๒
MCHC (ก./ดล.เม็ดเลือดแดง)	๓๑.๘๘±๑.๔๓	๓๑.๕๕±๐.๕๗	๓๑.๔๓±๐.๕๖	๓๑.๗๓±๐.๘๗	๓๑.๕๕±๐.๖๘	๓๑.๕๖±๐.๙๖
เม็ดเลือดขาว (x ๑๐ ^๓ เซลล์/ม.ม.๓)	๑.๖๖±๐.๓๙	๒.๑๘±๐.๗๕	๑.๖๙±๐.๖๒	๒.๑๗±๑.๕๕	๒.๐๓±๐.๘๓	๑.๙๖±๐.๗๕
นิวโทรฟิล (%)	๒๗.๙๒±๘.๘๒	๒๓.๘๐±๘.๒๗	๒๘.๐๐±๘.๐๔	๒๕.๙๘±๘.๖๐	๓๓.๕๕±๗.๙๔	๒๘.๑๐±๘.๕๐
อีโอซิโนฟิล (%)	๑.๘๕±๐.๗๙	๑.๑๑±๐.๖๖	๑.๐๖±๐.๕๖*	๑.๐๗±๐.๒๐*	๐.๕๓±๐.๓๐*	๑.๑๑±๐.๗๘
ลิมโฟไซต์ (%)	๖๘.๓๒±๘.๗๖	๗๓.๒๔±๘.๖๕	๖๗.๓๗±๘.๕๐	๖๘.๓๙±๙.๗๖	๖๒.๒๑±๘.๖๑	๖๗.๐๙±๑๐.๕๔
โมโนไซต์ (%)	๑.๐๗±๐.๕๒	๑.๐๓±๐.๖๕	๒.๖๓±๒.๑๐	๓.๓๑±๒.๙๙	๒.๒๓±๑.๕๐	๒.๕๕±๒.๕๙
บาซิลฟิล (%)	๐.๘๕±๐.๔๑	๐.๙๐±๐.๔๘	๐.๙๘±๐.๕๘	๑.๕๕±๐.๙๘	๑.๕๕±๐.๕๑	๑.๑๑±๐.๕๘
เกล็ดเลือด (x ๑๐ ^๓ เซลล์/ม.ม.๓)	๘๒๕.๙๕±๘๙.๙๓	๘๓๐.๖๓±๙๐.๕๕	๘๔๓.๑๓±๘๖.๒๕	๘๕๓.๒๗±๑๐๒.๖๙	๙๙๕.๒๗±๑๔๕.๕๖*	๙๐๕.๕๒±๑๓๗.๓๐
จำนวนสัตว์ทดลอง (n)	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่ < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๕ ค่าทางเคมีคลินิกของหญิงตั้งครรภ์ที่ได้รับสารสกัดยาหอมแมวโกฐเป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ/น้ำหนักรัตว์	ขนาดของสารสกัดยาหอมแมวโกฐ (มก./กก./วัน)					
	0	๑๐	๑๐๐	๕๐๐	๑๐๐๐	1000-R
ALP (U/L)	๘๓๖.๒๕±๒๓๗.๕๑	๗๗๗.๔๒±๒๒๑.๑๒	๓๐.๙๐±๒๕.๘๒	๘๑.๑๐±๒๗.๓๕	๖๓๖.๖๕±๑๙.๓๐	๖๑.๐๐±๑๖.๔๕
ALT (U/L)	๒๒๐.๐๐±๙๖.๖๘	๑๘.๓๓±๖.๐๕	๑๕.๙๐±๖.๓๐	๑๖.๐๙±๕.๘๙	๑๗๖.๗๒±๑๑.๒๑	๓๔.๐๘±๑๕.๗๓*
AST (U/L)	๗๖.๐๘±๑๘.๕๗	๖๖.๒๕±๑๓.๒๓	๕๙.๓๐±๑๓.๒๙	๕๕.๙๐±๑๑.๓๕*	๕๙.๕๐±๑๑.๓๔	๗๔.๐๘±๑๕.๕๘
โปรตีนรวม (ก./ดล.)	๓๖.๒๒±๒.๑๒	๓๗.๕๕±๐.๔๙	๖.๖๓±๑.๐๓	๗.๕๗±๐.๙๗	๓๖.๒๕±๑.๑๖	๓๖.๖๖±๐.๖๙
อัลบูมิน (ก./ดล.)	๒๕.๕๕±๐.๕๑	๒๓.๗๐±๐.๓๕	๒.๔๙±๐.๒๐	๒.๕๒±๐.๒๙	๒๖.๐±๐.๓๖	๒๓.๓๓±๐.๒๘
บิลิรูบินรวม (มก./ดล.)	๐.๒๐±๐.๐๙	๐.๒๑±๐.๐๘	๐.๑๖±๐.๐๕	๐.๑๗±๐.๐๕	๐.๑๕±๐.๐๓	๐.๑๓±๐.๐๔
Direct Bilirubin (มก./ดล.)	๐.๐๗±๐.๐๒	๐.๐๖±๐.๐๒	๐.๐๕±๐.๐๑	๐.๐๕±๐.๐๒	๐.๐๖±๐.๐๒	๐.๐๗±๐.๐๒
BUN (มก./ดล.)	๑๖.๘๓±๓.๗๖	๑๘.๒๕±๒.๒๘	๑๗.๓๐±๕.๖๔	๑๗.๘๒±๒.๙๓	๒๐.๕๕±๖.๕๖	๒๐.๓๓±๔.๘๖
ครีเอตินีน (มก.%)	๐.๙๖±๐.๑๒	๐.๙๖±๐.๑๕	๐.๘๙±๐.๑๐	๐.๙๒±๐.๑๔	๐.๙๒±๐.๐๙	๐.๙๕±๐.๑๙
กลูโคส (มก./ดล.)	๒๔๗.๐๐±๓๔.๒๑	๓๐๓.๙๗±๕๗.๑๖	๒๓๙.๖๐±๓๕.๙๑	๒๗๗.๘๒±๗๙.๐๘	๒๘๕.๐๐±๗๘.๓๕	๒๘๕.๐๘±๙๔.๕๒
กรดยูริก (มก./ดล.)	๕.๖๕±๑.๙๓	๕.๓๐±๒.๔๘	๕.๙๙±๒.๓๖	๓.๕๘±๒.๒๓	๕.๓๙±๒.๒๕	๕.๘๓±๑.๕๑
ไตรกลีเซอไรด์ (มก./ดล.)	๑๑๐.๐๐±๒๗.๓๘	๘๙.๐๘±๓๓.๙๒	๘๖.๘๐±๒๐.๓๑	๘๙.๘๐±๒๑.๙๗	๗๔.๐๙±๒๑.๙๓	๙๕.๐๘±๕๘.๐๖
คอเลสเตอรอล (มก./ดล.)	๑๐๘.๖๓±๕๖.๑๕	๘๒.๕๓±๒๓.๓๙	๙๒.๕๐±๓๐.๓๒	๗๖.๐๐±๑๘.๑๐	๗๒๖.๖๕±๑๕.๕๖	๑๒๑.๔๒±๒๕.๐๘
จำนวนสัตว์ทดลอง (ก)	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
 * แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพี<๐.๐๕)

ตารางที่ ๖ ค่าทางเคมีคลินิกของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกลียาหอมหนูโกฐเป็นเวลา ๖ เดือน

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	ขนาดของสารสกลียาหอมหนูโกฐ (มก./กก./วัน)					
	0	๑๐	๑๐๐	๕๐๐	๑๐๐๐	1000-R
ALP (U/L)	๕๒๑.๐๖±๑๕.๓๑	๕๗๑.๕๒±๑๕.๖๒	๕๕๗.๗๓±๒๐.๕๕	๕๕๕.๒๒±๑๗.๕๕	๓๙๖.๐๕±๑๒.๕๓	๒๗๖.๕๓±๕.๗๕
ALT (U/L)	๑๓.๕๐±๕.๑๗	๑๓.๒๕±๓.๙๑	๑๕.๓๓±๕.๗๗	๑๕.๓๓±๕.๗๗	๑๒.๒๕±๕.๕๕	๑๙.๗๕±๕.๑๕
AST (U/L)	๖๖.๓๐±๑๓.๗๒	๖๙.๑๗±๑๐.๗๕	๖๕.๕๓±๑๕.๙๗	๖๕.๕๓±๑๕.๙๗	๕๗.๖๗±๑๐.๓๑	๗๕.๒๕±๖.๕๖
โปรตีนรวม (ก./ดล.)	๗.๕๐±๑.๕๑	๖.๕๓±๐.๙๕	๖.๗๕±๐.๖๙	๖.๗๕±๐.๖๙	๗.๐๖±๐.๗๐	๗.๗๕±๐.๕๕
อัลบูมิน (ก./ดล.)	๓.๒๙±๑.๐๗	๒.๙๖±๐.๕๖	๒.๕๖±๐.๕๕	๒.๕๖±๐.๕๕	๒.๙๕±๐.๙๙	๒.๗๕±๐.๓๕
บิลิรูบินรวม (มก./ดล.)	๐.๒๒±๐.๐๙	๐.๒๒±๐.๐๙	๐.๑๕±๐.๐๕	๐.๑๕±๐.๐๕	๐.๑๖±๐.๐๓	๐.๑๙±๐.๐๕
Direct Bilirubin (มก./ดล.)	๐.๑๓±๐.๐๓	๐.๐๖±๐.๐๒	๐.๐๖±๐.๐๒	๐.๐๖±๐.๐๒	๐.๐๖±๐.๐๒	๐.๐๗±๐.๐๓
BUN (มก./ดล.)	๒๐.๑๐±๕.๕๓	๒๒.๐๕±๖.๐๕	๒๐.๙๒±๖.๑๑	๒๐.๙๒±๖.๑๑	๒๓.๒๗±๕.๖๕	๒๓.๑๗±๕.๒๒
ครีเอตินีน (มก.%)	๐.๙๕±๐.๐๗	๐.๙๙±๐.๑๒	๑.๐๓±๐.๑๕	๑.๐๓±๐.๑๕	๑.๐๕±๐.๑๒	๑.๐๖±๐.๐๓
กลูโคส (มก./ดล.)	๑๕๑.๓๐±๓๗.๒๙	๑๕๕.๑๓±๒๘.๐๐	๑๕๕.๐๕±๒๘.๒๐	๑๕๕.๐๕±๒๘.๒๐	๑๕๒.๙๖±๓๕.๑๑	๑๕๓.๐๕±๒๘.๖๒
กรดยูริก (มก./ดล.)	๒.๓๕±๑.๕๗	๒.๑๒±๐.๗๙	๒.๓๗±๑.๓๗	๒.๓๗±๑.๓๗	๒.๕๕±๑.๖๖	๒.๕๓±๑.๕๗
ไตรกลีเซอไรด์ (มก./ดล.)	๖๖.๕๐±๑๖.๒๒	๖๕.๓๓±๑๐.๕๕	๖๗.๓๐±๑๗.๗๕	๖๗.๓๐±๑๗.๗๕	๖๖.๑๕±๑๓.๑๕	๖๗.๕๕±๕.๕๙
คอเลสเตอรอล (มก./ดล.)	๑๒๐.๕๐±๖๒.๑๒	๑๒๗.๑๗±๒๙.๙๒	๑๒๖.๐๐±๖๖.๑๕	๑๒๖.๐๐±๖๖.๑๕	๑๒๗.๕๕±๕๑.๕๗	๑๒๖.๕๕±๑๕.๐๓
จำนวนเม็ดเลือดแดง (ก)	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ ๗ ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมνωโกฐเป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ/การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา	ขนาดของสารสกัดยาหอมνωโกฐ (มก./กก./วัน)					
	๐	๑๐	๑๐๐	๕๐๐	๑๐๐๐	1000-R
ปอด	±	±	±#	±	±	±
Peribronchiolar associated lymphoid tissue proliferation	๑๖.๖๗%	๔๔.๖๖%	๕๘.๓๓%	๓๓.๓๓%	๓๓.๓๓%	๓๓.๓๓%
หัวใจ	±	±	NRL	NRL	NRL	±
Myocardiosis (ระดับอ่อน)	๘.๓๓%	๘.๓๓%	๐%	๐%	๐%	๘.๓๓%
ตับ	NRL	±	±#	±	±	NRL
Centrilobular fatty degeneration	๐%	๒๕.๐๐%	๓๓.๓๓%	๘.๓๓%	๑๖.๖๗%	๐%
Bile duct proliferation (ระดับอ่อน)	NRL	±	±	±	±	NRL
ลำไส้เล็ก	NRL	±	±	±	±	NRL
Lymphoid tissue hyperplasia	๐%	๘.๓๓%	๘.๓๓%	๑๖.๖๗%	๘.๓๓%	๐%
ลำไส้ใหญ่	NRL	NRL	±	±	±	NRL
Lymphoid tissue hyperplasia	๐%	๐%	๒๕.๐๐%	๘.๓๓%	๘.๓๓%	๐%
ต่อมหมวกไต	±	±	±	±	±	NRL
Cortical fatty accumulation (ระดับอ่อน)	๓๓.๓๓%	๔๑.๖๖%	๔๔.๖๖%	๑๖.๖๗%	๓๓.๓๓%	๐%
จำนวนสัตว์ทดลอง (n)	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒

ค่าในตารางแสดงในรูปร้อยละของอุบัติการณ์

± พบการเปลี่ยนแปลง

NRL : No remarkable lesion

แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่<๐.๐๕)

ตารางที่ ๘ ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาหอมνωโกฐเป็นเวลา ๖ เดือน

อวัยวะ/การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา	ขนาดของสารสกัดยาหอมνωโกฐ (มก./กก./วัน)					
	๐	๑๐	๑๐๐	๕๐๐	๑๐๐๐	1000-R
ปอด	±	±	±	±	±	±
Peribronchiolar lymphoid tissue proliferation	๑๖.๖๗%	๓๓.๓๓%	๓๓.๓๓%	๓๓.๓๓%	๑๖.๖๗%	๒๕.๐๐%
ตับ	NRL	±	±	NRL	NRL	NRL
Centrilobular hepatic fatty degeneration	๐%	๘.๓๓%	๘.๓๓%	๐%	๐%	๐%
Lymphocytic triadinitis	NRL	NRL	±	NRL	NRL	NRL
ไต	±	±	±	±	±	±
Congestion (ระดับอ่อน)	๐%	๐%	๑๖.๖๗%	๑๖.๖๗%	๘.๓๓%	๐%
Congestion (ระดับปานกลาง)	±	NRL	±	±	±	NRL
ลำไส้เล็ก	๓๓.๓๓%	๐%	๐%	๔๑.๖๖%	๘.๓๓%	๐%
Lymphoid tissue hyperplasia	±	±	±	±	±	±
ลำไส้ใหญ่	๘.๓๓%	๑๖.๖๗%	๑๖.๖๗%	๑๖.๖๗%	๑๖.๖๗%	๑๖.๖๗%
Lymphoid tissue hyperplasia	NRL	NRL	±	±	±	±
ต่อมหมวกไต	๐%	๐%	๑๖.๖๗%	๘.๓๓%	๘.๓๓%	๘.๓๓%
Congestion	NRL	NRL	NRL	±	NRL	NRL
จำนวนสัตว์ทดลอง (n)	๐%	๐%	๐%	๘.๓๓%	๐%	๐%
จำนวนสัตว์ทดลอง (n)	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒	๑๒

ค่าในตารางแสดงในรูปร้อยละของอุบัติการณ์

± พบการเปลี่ยนแปลง

NRL : No remarkable lesion

แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่<๐.๐๕)

วิจารณ์

ผลทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดยาหอมนวนิโกรีโดยป้อนทางปากแก่หนูถีบจักรในขนาด ๒, ๔, ๘ และ ๑๖ ก./กก. บ่งชี้ว่า สารสกัดยาหอมนวนิโกรีในขนาด ๒ ถึง ๔ ก./กก. ไม่เป็นอันตรายใดๆ ต่อหนูถีบจักร แต่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด ๘ ก./กก. มีอาการซึม การเคลื่อนไหวที่ผิดปกติ และตาย ๑ ตัว อาการผิดปกติและจำนวนหนูตายเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด ๑๖ ก./กก. เป็นการเปลี่ยนแปลงที่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัด ช่วยบ่งชี้ว่าสารสกัดยาหอมนวนิโกรีขนาดสูงอาจมีผลต่อระบบประสาท^{๓๓} เนื่องจากสารสกัดยาหอมนวนิโกรีที่ใช้ทดสอบครั้งนี้ได้จากการสกัดเครื่องยาด้วยตัวทำละลายได้ถึง ๓ ชนิดคือ เฮกเซน แอลกอฮอล์ ๙๕ เปอร์เซ็นต์ และ น้ำ ตามลำดับ แล้วรวมส่วนสกัดทั้งหมดเข้าด้วยกัน ทำให้ได้สารสกัดที่มีองค์ประกอบเคมีหลากหลายกว่าและปริมาณสารประกอบต่างๆ เข้มข้นกว่าการใช้ยาหอมนวนิโกรีตามแผนโบราณที่ละลายตำรับยาด้วยน้ำสุก (ในกรณีหาน้ำกระสายยาไม่ได้) จึงอาจทำให้เกิดอาการพิษได้ ขนาดของสารสกัดยาหอมนวนิโกรีที่ทำให้หนูถีบจักรแสดงอาการพิษเฉียบพลันสูงกว่าขนาดตำรับยาหอมนวนิโกรีที่คนรับประทานประมาณ ๔๐๐ ถึง ๑๖๐๐ เท่า ดังนั้นการใช้ยาหอมนวนิโกรีตามขนาดและวิธีใช้ยาที่ระบุไว้ตามหลักการแพทย์แผนไทย^{๓๔} ในระยะเวลาสั้นๆ น่าจะปลอดภัย

จากการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดยาหอมนวนิโกรี โดยป้อนสารสกัดในขนาด ๑๐, ๑๐๐, ๕๐๐ และ ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน หรือเทียบเท่าประมาณ ๑, ๑๐, ๕๐ และ ๑๐๐ เท่าของขนาดยาหอมนวนิโกรีที่ใช้ในคน พบว่า สารสกัดยาหอมนวนิโกรีไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว การกินอาหารและสุขภาพทั่วไปของสัตว์ทดลอง น้ำหนักสัมพัทธ์ของตับเพิ่มขึ้นในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวนิโกรีขนาด ๕๐๐ และหนูทั้งสองเพศที่ได้รับขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน อย่างมีนัยสำคัญเป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารสกัดในหนูทั้งสองเพศ จึงอาจเกิดจากสารสกัดยาหอมนวนิโกรี ถึงแม้ว่าค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของหัวใจ กระเพาะอาหาร ม้ามและไตซ้ายของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./

วัน และกลุ่ม 1000-R เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญก็ไม่พบความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาใดๆ ในอวัยวะดังกล่าว ดังนั้นอาจเกิดจากหนูสองกลุ่มนี้มีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มควบคุมจึงทำให้คำนวณค่าสัมพัทธ์สูงขึ้น ปริมาณเม็ดเลือดขาวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด ๕๐๐ มก./กก./วัน และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวนิโกรีขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน อาจเกิดจากสารสกัดยาหอมนวนิโกรี แต่ไม่อาจกล่าวว่ามีภาวะเม็ดเลือดขาวสูง (leukocytosis) เนื่องจากพบว่าหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกกลุ่มมีปริมาณเม็ดเลือดขาวต่ำกว่าค่าปกติที่มีรายงานไว้^{๓๕} ปริมาณเกล็ดเลือดที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวนิโกรีขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน สูงกว่าค่าปกติ^{๓๖} เพียงเล็กน้อยจึงไม่อาจจัดเป็นภาวะผิดปกติ และเมื่อหยุดให้สารสกัดเป็นเวลา ๒ สัปดาห์ พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดมีแนวโน้มลดลง การเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดอาจเกิดฤทธิ์ของสารสกัดซึ่งมีในตำรับยา Chang และคณะพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลของชิงมิฤทธิ์กระตุ้นโมโนนิวเคลียร์เซลล์ให้หลั่งไซโตไคน์ชนิด IL-1 β , IL-6 และ GM-CSF^{๓๗} การลดลงของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดโอสิโนฟิลในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวนิโกรีตั้งแต่ ๑๐๐ มก./กก./วัน และในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดตั้งแต่ ๕๐๐ มก./กก./วัน ขึ้นไปยังอยู่ในช่วงค่าปกติ^{๓๘,๓๙} และไม่มีความสัมพันธ์แต่อย่างใด สารสกัดยาหอมนวนิโกรีไม่ทำให้ค่าทางเคมีคลินิกผิดปกติ ระดับเอนไซม์ AST ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวนิโกรีขนาด ๕๐๐ มก./กก./วัน อยู่ในช่วงค่าปกติ^{๔๐} และเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดจึงไม่เกิดจากสารสกัดยาหอมนวนิโกรี อุบัติการณ์ของการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของบางอวัยวะที่พบในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวนิโกรีไม่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามขนาดของสารสกัดที่ให้จึงไม่อาจกล่าวว่าเป็นเกิดจากสารสกัด^{๔๑} ดังนั้นสารสกัดยาหอมนวนิโกรีในขนาดที่ให้แก่หนูแรทไม่ทำให้เกิดพิษเรื้อรังแต่อย่างใด

สรุป

จากการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดยาหอม นวโกฐโดยป้อนสารสกัดทางปากให้หนูถีบจักรในขนาด ๒, ๔, ๘ และ ๑๖ ก./กก. พบว่า ขนาดของสารสกัดที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ ๕๐ มีค่าเท่ากับ ๑๓.๗๖ ก./กก. สารสกัดยาหอมนวโกฐขนาด ๔ ก./กก. สูงกว่าขนาดยาหอมนวโกฐที่คนกินถึง ๔๐๐ เท่า ไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและหนูมีชีวิตรอดทุกตัวแต่หนูที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐขนาด ๘ และ ๑๖ ก./กก. มีอาการผิดปกติและตาย ร้อยละ ๑๐ และ ๓๐ ตามลำดับ ส่วนผลศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดยาหอมนวโกฐในหนูแรดพันธุ์วิธาร์เป็นระยะเวลา ๖ เดือน โดยป้อนสารสกัดทางปากในขนาด ๑๐, ๑๐๐, ๕๐๐ และ ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน หรือเทียบเท่าประมาณ ๑, ๑๐, ๕๐ และ ๑๐๐ เท่าของขนาดยาหอมนวโกฐที่คนกิน พบว่า สารสกัดยาหอมนวโกฐไม่มีผลต่อสุขภาพ ค่าน้ำหนักตัวเฉลี่ย การกินอาหาร และไม่ทำให้ค่าทางเคมีคลินิกเปลี่ยนแปลงอย่างผิดปกติ หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาหอมนวโกฐขนาด ๑,๐๐๐ มก./กก./วัน มีเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นและหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาดเท่ากันมีเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีแนวโน้มลดลงเมื่อหยุดให้สารสกัด ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบรอยโรคหรือการเปลี่ยนแปลงที่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ดังนั้นสรุปได้ว่า สารสกัดยาหอมนวโกฐไม่ทำให้เกิดพิษเรื้อรังต่อสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามหากใช้ยาหอมนวโกฐในขนาดสูงและนานติดต่อกัน ควรมีการตรวจติดตามค่าทางโลหิตวิทยา เนื่องจากสารสกัดยาหอมนวโกฐขนาดสูงมีแนวโน้มทำให้เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดของสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้น และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในคนสุขภาพดีต่อไป เพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัย

กิตติกรรมประกาศ

ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ช่วยในการตรวจผลเลือดทางจุลพยาธิวิทยา และคุณกมล บางยี่ขัน ช่วยดูแลเลี้ยงสัตว์ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

๑. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องยาสามัญประจำบ้านแผนโบราณ. ประกาศ ณ วันที่ ๒๖ มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๔๒. คัดจากราชกิจจานุเบกษา. เล่ม ๑๑๖ ตอนที่ ๖๗ ง วันที่ ๒๔ สิงหาคม ๒๕๔๒.
๒. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาจากสมุนไพร. พ.ศ. ๒๕๔๙ ตามประกาศคณะกรรมการแห่งชาติด้านยาเรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ ๒๕๔๗ (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม). กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. ๒๕๔๙.
๓. Yu J, Hu Ws. Effects of neferine on platelet aggregation in rabbits. Yao Xue Xue Bao. 1997 ; 32(1) : 1-4.
๔. Dar A, Behbahanian, Malik A, Jahan N. Hypotensive effect of the methanolic extract of *Mimusops elengi* in normotensive rats. Phytomedicine 1999;6(5):373-8.
๕. El Bardai S, Lyoussi B, Wibo M, Morel N. Pharmacological eviarence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously hypertensive rat. Clin Exp Hypertens 2001;23(4):329-43.
๖. Demir H, Kanter M, Coskun O, Uz YH, Koc A, Yildiz A. Effect of black cummin (*Nigella sativa*) on heart rate, some hematological values, and pancreatic beta-cell damage in cadmium-treated rats. Biol Trace Elem Res 2006;110(2):51-62.
๗. Khattab MM, Nagi MN. Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. Phytother Res 2007;21(5):410-4.
๘. Maghrani M, Zeggwagh NA, Michel JB, Eddouks M. Antihypertensive effect of

Lepidium sativum L. in spontaneously hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 2005;100(1-2): 193-7.

๙. Burnham TH (ed). *The Review of Natural Products*. 3rd ed. Missouri. Facts and Comparisons, 2002.

๑๐. Kongkathip N, Dhumma-upakorn P, Kongkathip B, Chawanoraset K, Sangchomkaeo P, Hatthakitpanichakul. S. Study on cardiac contractility of cycloeucaleanol and cycloeucalenone isolated from *Tinospora crispa*. *J Ethnopharmacol* 2002;83:95-9.

๑๑. Vohora SB, Khan MS. Pharmacological studies on *Lepidium sativum*, L. *Indian J Physiol Pharmacol* 1977;21(2):118-120.

๑๒. Boskabady MH, Shafei MN, Parsaee H. Effects of aqueous and macerated extracts from *Nigella sativa* on guinea pig isolated heart activity. *Pharmazie*. 2005;60(12):943-8.

๑๓. Shafei MN, Boskabady MH, Parsaee H. Effect of aqueous extract from *Nigella sativa* L. on guinea pig isolated heart. *Indian J Exo Biol* 2005;43(7):635-9.

๑๔. Eun JS, Park JA, Choi BH, Cho SK, Kim DK, Kwak YG. Effects of oxypeucedanin on hKv1.5 and action potential duration. *Biol Pharm Bull* 2005;28(4):557-60.

๑๕. Xue JK, Jiang Y, Yan YQ. Effects of the combination of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. (AM), tail of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. (TAS), *Cyperus rotundus* L. (CR), *Ligusticum chuanxiong* Hort (LC) and *Paeonia veitchii* Lynch (PV) on the hemorrheological changes in normal rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1993;18(10):621-3.

๑๖. Xue JX, Jiang Y, Yan YQ. Effects of the combination of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. (AM), *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (TAS), *Cyperus rotundus* L. (CR), *Ligusticum chuanxiong* Hort (LC) and *Paeonia veitchii* Lynch (PV) on the hemorheological changes in "blood stagnating" rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1994;19(2):108-10.

๑๗. Thaina P, Poonpanang P, Sawangjaroen K. Comparison of spasmolytic activities of *Piper longum* fruit, *Piper sarmentosum* root and *Quercus infectoria* extracts with loperamide and verapamil in rat and guinea pig intestinal tissues. The 3rd World Congress on Medicinal Plant and Aromatic Plants for Human welfare, Chiang Mai, Thailand, 3-7 Feb 2003.

๑๘. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J. *Herbal Medicine Expanded Commission E Monographs*. MA: Integrative Medicine Communications, 2000.

๑๙. Lu O, Oiu TO, Yang H. Ligustilide inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 2006;542:136-40.

๒๐. Sun SW, Wang JF. Efficacy of danggui funing pill in treating 162 cases of abdominal pain. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1992;12(9):531-2.

๒๑. Yoshikawa M, Hatakeyama S, Inoue Y, Yamahara J. Saussureamines A, B, C, D, and E, new anti-ulcer principles from Chinese saussuresae Radix. *Chem Pharm Bull* 1993;41(1):214-6.

๒๒. Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu .JY, Tan RX. *In vitro* anti-Helicobacter pylori action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *J Ethnopharmacol* 2005;93(3):329-33.

๒๓. Bergendorft O, Dekermendjian K, Nielsen M, Shan R, Ai J, Sterner O. Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors In vitro. *Phytochemistry* 1997;44(6):1121-4.
๒๔. World Health Organization. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants, vol. 1. Geneva: World Health Organization, 1999.
๒๕. Siddaraju MN, Dharmesh SM. Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase and *Helicobacter pylori* growth by phenolic antioxidants of *Zingiber officinale*. *Mol Nutr Food Res* 2007;51(3):324-32.
๒๖. Jan M, Faqir F, Hamida, MA. Comparison of effects of *Myristica fragrans* and verapamil on the volume and acidity of carbachol induced gastric secretion in fasting rabbits. *J Ayub Med C011 Abbotabad* 2005,17(2):69-71.
๒๗. Yeung HC. Handbook of Chinese Herbs (Chinese Materia Medica). California: Los Angeles County, 1996.
๒๘. <http://www.grad.cmu.ac.th/abstract/1999/med/abstract/med990009.html>. Accessed 2007 January 18.
๒๙. Kim DC, Choi SY, Kim SH, Yun BS, Yoo ID, Reddy NR, Yoon HS, Kim Kim KT. Isoliquiritigenin selectively inhibits H(2) histamine receptor signaling. *Mol Pharmacol* 2006;70(2):493-500.
๓๐. Morikawa T, Matsuda H, Yamaguchi I, Pongpiriyadacha Y, Yoshikawa M. New amides and gastroprotective constituents from the fruit of *Piper chaba*. *Planta Med* 2004;70(2):152-9.
๓๑. Karnick CR. Pharmacopoeial Standards of Herbal Plants. Vol. 1 Dethi:Sri Satguru Publications, 1994.
๓๒. Ulbricht CE, Basch EM (eds). Natural Standard Herb & Supplement Reference Evidence-based Clinical Reviews. Missouri: Elsevier Mosby,2005.
๓๓. Liu XR, Han WQ, Sun DR. Treatment of intestinal metaplasia and a typical hyperplasia of gastric mucosa with xiao wei yan powder. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1992;12(10):602-3.
๓๔. Kamath JV, Rana AC, Chowdhury AR. Pro-healing effect of *Cinnamomum zeylanicum* bark. *Phytother Res* 2003;17(8):970-2.
๓๕. Shah PJ, Gandhi MS, Shah MB, Goswami SS, Santani D. Study of *Mimusops elengi* bark in experimental gastric ulcers. *J Ethnopharmacol* 2003;89:305-11.
๓๖. Birdane FM, Cemek M, Birdane YO, Gülcin I, Büyükkouroglu ME. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol* 2007;13(4):607-11.
๓๗. El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia / reperfusion in rats. *J Ethnopharmacol* 2003;84(2-3):251-8.
๓๘. Hosseinzadeh H, Karimi GR, Ameri M. Effects of *Anethum graveolens* L. seed extracts on experimental gastric irritation models in mice. *BMC Pharmacol* 2002;2:21.
๓๙. Al Mofleh, IA, Alhaider AA, Mossa JS, Al-Sochaibani Mo, Rafatullah S. Aqueous suspension of anise "*Pimpinella anisum*" protects rats against chemically induced gastric ulcers. *World U Gastroenterol*

2007,13(7):1112-8.

๔๐. Shinde S, Phadke S, Bhagwat AW. Effect of Nagarmotha (*Cyperus rotundus* L.) on reserpine-induced emesis in pigeons. Indian J Physiol Pharmacol 1988;32(3):229-30.

๔๑. Tavlian A, Tuncer S, Erol A, Reisli R, Aysolmaz G, Otelcioglu S. Prevention of postoperative nausea and vomiting after thyroidectomy combined antiemetic treatment with dexamethasone and ginger versus dexamethasone alone. Clin Drug Investig 2006;26(4):209-314.

๔๒. Apariman S, Ratchanon S, Winyasirivej B. Effectiveness of ginger for prevention of nausea and vomiting after gynecological laparoscopy. J Med Assoc Thai 2006;89(12):2003-9.

๔๓. Gopalakrishnan C, Shankaranarayanan D, Nazimudeen SK, Visvanathan S, Kameswaran L. Antiinflammatory and CNS depressant activities of xanthenes from *Calophyllum inophyllum* and *Mesua ferrer*. Indian J Pharmacol 1980;12(3):181-91.

๔๔. Emamghoreishi M, Khasaki M, Aazam MF. *Coriandrum sativum*: evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze. J Ethnopharmacol 2005;96(31):365-70.

๔๕. Chen SW, Min L, Li WJ, Kong WX, Li JF, Zhang YJ. The effects of angelica essential oil in three murine tests of anxiety. Pharmacol Biochem Behav 2004;79:377-82.

๔๖. Hongratanaworakit T, Heuberger E, Buchbauer G. Evaluation of the effects of East Indian sandalwood oil and alpha-santalol on humans after transdermal absorption. Planta Med 2004;70(1):3-7.

๔๗. Bergendorff O, Dekermendjian K, Nielsen M, Shan R, Witt R, Ai J, Sterner O. Furano-coumarins with affinity to brain benzodis-zepine receptors *in vitro*. Phytochemistry 1997;44(6):1121-4.

๔๘. Akhondzadeh S, Fallah-Pour H, Afkham K, Jamshidi AH, Khalighi-Cigaroudi F. Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial [ISRCTN45683816]. BMC Complement Altern Med 2004;4:12.

๔๙. Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Noorbala AA, Amini H, Fallah-Pour H, Jamshidi AH, Khani M. *Crocus sativus* L. in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized and placebo controlled trial. Phytotber Res 2005;19(2):148-51.

๕๐. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Safranal, a constituent of *Crocus sativus* (safron), attenuated cerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. J Pharm Pharm Sci 2005;8(3):394-9.

๕๑. Chan PK, Hayes AW. Acute toxicity and eye irritancy. In: Hayes AW, editor. Principles and methods of Toxicology. 3 rd New York: Raven Press; 1994. p. 579-648.

๕๒. เยาวลักษณ์ พัทธานอก, อังสนา โยธินารักษ์, พศวัต จรุงฤกษ์. ค่ายังอิงทางโลहितวิทยาและเคมีคลินิกในเลือดหนูแรชสายพันธุ์ วิสตาร์ วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๒๕๔๖;๔๕(๑): ๒๗-๓๖.

๕๓. Chang CP, Chang JY, Wang FY, Chang JG. The effect of Chinese medicinal herb *Zingiberis rhizoma* extract on cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. J Ethnopharmacology 1995;48:13-19.

๕๔. Gad SC. The Rat In: Gad SC and Chengelis, editor. Animal Models in Toxicology New York : Marcel Dekker, 1992,p.81.

๕๕. Maines MD, Costa LG, Reed DJ, Sassa S, Sipes IG. Editors. Current protocol in toxicology. New York. John Wiley & Sons; Inc.; 2000.

Abstract

Chronic Toxicity of Yahom Navagoth Extract

Pranee Chavalittumrong*, Songpol Chivapat**†, Aimmanas Attawish**, Noppamas Soonthornchareonnon[#]

**Senior Technical Office, **Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Noiuhaburi Province 11000, Thailand, #Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University Bangkok 10400,*

Thailand. †Corresponding author. e-mail: Songpol.c@dmsc.mail.go.th

A Thai traditional recipe called yahom naoagoth, has been used in the treatment of circulatory disorder symptoms. The recipe comprises 54 herbal plants and Borneol camphor. Acute toxicity of yahom navagoth extract (NGE) was assessed in 50 ICR mice randomly divided into five groups of 10 mice each as follows: A control group was given distilled water orally and four experimental groups were orally administered with NGE at doses of 2, 4, 8 and 16 g/kg, respectively. NGE at doses of 2 and 4 g/kg did not cause any acute toxic signs nor lethality, whereas doses of 8 and 16 mg/kg produced 10 and 70 percent mortality, respectively. Chronic toxicity study of yahom navagoth extract was performed in 144 Wistar rats divided into six groups of 24 rats each (12 males and 12 females). The control group was given distilled water and the five experimental groups were administered yahom navagoth extract orally at doses of 10, 100, 500,1000 and 1000 mg/kg/day, respectively, for six months. The extract doses given to the animals were approximately equivalent to 1, 10, 50, 100 and 100 times larger than the human therapeutic dose. The last group was used for a recovery study after two weeks discontinuation of the highest dose. The result revealed that NGE did not affect body weight, food consumption, behavior and the general health of the animals. Male rats receiving NGE at 1000 mg/kg/day had a significant increase in total leukocytes and female rats receiving the same dose had a significant increase in platelet counts. However, these hematological values tended to decrease after withdrawal of the extract. NGE did not cause any abnormality of clinical chemistry values. The incidence of histopathological alterations in the NGE-treated groups did not show any dose dependence with the extract. In conclusion, yahom navagoth extract did not cause chronic toxicity in the Wistar rats.

Key words: yahom navagoth, acute toxicity, chronic toxicity

Chronic toxicity of *Gynostemma pentaphyllum*

A. Attawish, S. Chivapat, S. Phadungpat, J. Bansiddhi,
Y. Techadamrongsin, O. Mitrijit, B. Chaorai,
P. Chavalittumrong *

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health,
88/7 Tiwanant road, Muang, Nonthaburi 11000, Thailand

Received 20 February 2004; accepted 14 April 2004

Available online 5 June 2004

ABSTRACT

The effect of water extract of *Gynostemma pentaphyllum* was evaluated on 6-month chronic toxicity in Wistar rats. Control group received orally 10 ml kg⁻¹ day⁻¹. The extract was orally given to the five treatment groups at the doses of 6, 30, 150, 750 and 750 mg kg⁻¹ day⁻¹ for 24 weeks. The last group served as the recovery group. The results showed that the extract did not produce any significant dose-related changes. Therefore, it is concluded that the extract of *G. pentaphyllum* at the given doses did not produce any significant toxic effect in rats during 6-month period of the treatment.

©2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Gynostemma pentaphyllum* ; Chronic toxicity

1. Introduction

Gynostemma pentaphyllum is an herbal medicinal plant known in China as 'Jiao- Gu-Lan', and as 'Cha-Satun' in Thailand. It is distributed over large areas in Asia, e.g. Japan, China, Korea, India, Thailand, Malaysia and the Philippines. *G. penta- phylum* is a popular folk medicine that has been used for treatment of hepatitis, hypertension and cancer in Taiwan [1]. It is used for the treatment of hyperlipidaemiaby reducing serum triglyceride and cholesterol levels with a low incidence of side effects [2]. It could also inhibit platelet aggregation induced by ADP and other agonists [3]. Phytochemical studies show that it contains ginsenosides

[4,5] and saponins [4-7]. In addition, it also contains dammarane [4], β -sitosterol [8], protopanaxadiols and protopanaxatriols [9], rutin, ombucside [10], minerals [11], amino acids [12] and vitamins [13].

Even though *G. pentaphyllum* is said to be one of the most commonly used medicinal plants in many countries in Asia, especially in China, there has been no report of long-term toxicity study of this plant. Chronic toxicity study of this plant extract was therefore performed in rats in order to evaluate the safety of this extract prior to the evaluation of its therapeutic efficacy in humans.

* Corresponding author. Tel: $\pm 66-2589-9850$; fax: $\pm 66-2589-9866$.
E-mail address: pranee@dmisc.moph.go.th (P. Chavalittumrong).

2. Experimental

2.1. Plant material

G. pentaphyllum (Thunb.) Makino (Cucurbitaceae), aerial part was collected from Chiang-Mai Province. A voucher specimen (Bansiddhi 43-21) was deposited at the Botanical Laboratory, Medicinal Plant Research Institute. The botanical identifications were determined using description of Backer [14] and Wu [15], and compared with the authentic specimens (Kerr 6555, Lakshnakara 395) at the Bangkok Herbarium (BK), Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperative, Thailand.

2.2. Extraction

G. pentaphyllum aerial part, washed with water, cut and dried at 50 °C, was refluxed and dried to give a residue (yield:10.8%w/w). Prior to the experiments the residue was redissolved in water at the desired concentration.

2.3. Animals

Ninety male Wistar rats weighing 250 ± 10 g and 90 female rats weighing 200 ± 10 g from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakompathom Province, were used. The animals were housed in the animal facility of the Department of Medical Sciences, maintained in standard environmental conditions and were allowed to have free access to food and clean water.

2.4. Six-month toxicity study

According to the WHO guideline [16], 90 Wistar rats of each sex were randomly divided into six groups of 15 animals per sex. Group 1 (water control) received water $10 \text{ ml kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ for 24 weeks. Groups 2-5 were orally treated with water extract at doses of 6, 30, 150 and $750 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$. A further group, 6th, was

treated with $750 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and used as recovery group. Body weight and food-intake were measured weekly and the animals were observed for signs of abnormalities during the 6 months of treatment. At the end of the treatment period, the 1st - 5th groups of rats were fasted for 18 h, then anesthetized with ether and sacrificed by drawing blood samples from the posterior vena cava for hematological and biochemical examinations. The 6th group of rats, the recovery group, was withdrawn from the feeding of the extract for 14 days before being sacrificed in order to determine whether toxic effects observed in high-dose group were reversibly or permanently changed.

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyzer (Cell Dyn 3500, Abbott). The parameters of the blood samples measure were: hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb), red blood cell (RBC), mean cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), white blood cell (WBC), %neutrophil (%N), %lymphocyte (%L), %monocyte (%M), %eosinophil (%E), %basophil (%B) and platelet.

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), 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 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% phosphate buffered formalin solution. Tissue slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin. Histopathological examination was performed by a pathologist.

2.5. Statistical analysis

The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett multiple ranges test to determine significant differences between

groups at $P < 0.05$. Histopathological data were evaluated by the Fisher exact test and the significance level was set at $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Effects of *G. pentaphyllum* extract on body weight, relative food intake and relative organ weight

In both male and female animals, there was no difference in the average body weights between extract-treated groups and control group throughout the experimental period of 6 months (Fig.1). However, relative food consumption of animals receiving the extract was significantly different from the control groups for several weeks. Male rats receiving

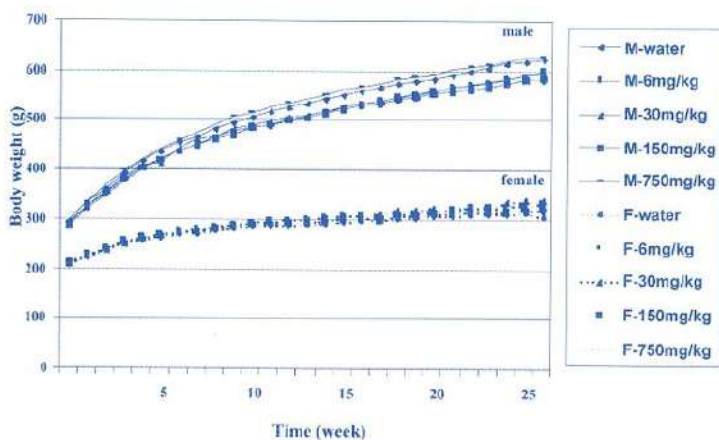


Fig. 1. Growth curves of male (M) and female (F) rats receiving *G. pentaphyllum* for 6 months.

the extract 750 mg kg⁻¹ day⁻¹ had higher relative food intake than the control group in the 4th weeks, while male rats receiving the extract 6 mg kg⁻¹ day⁻¹ had lower relative food intake than its control group during the 12th-13th weeks. Female rats receiving the extract had lower relative food intake than the control group during the 3rd-27th weeks of the study (Fig. 2). Male rats treated with the extract

at the dose of 30 mg kg⁻¹ day⁻¹ had lower relative splenic weight than that of the control group (Table 1). Female rats treated with the extract at the dose of 6 mg kg⁻¹ day⁻¹ had lower relative left ovary weight than that of the control group. While female rats treated with the extract at the doses of 6 and 150 mg kg⁻¹ day⁻¹ had lower relative bladder weight than that of the control group (Table 2).

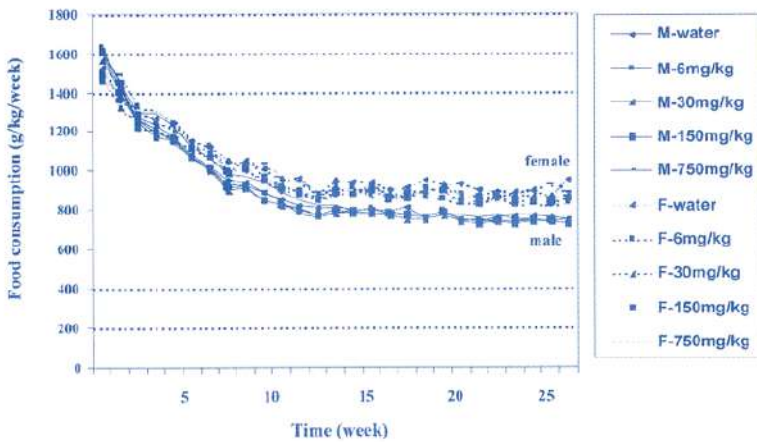


Fig. 2. Relative food consumption of male (M) and female (F) rats receiving *G. pentaphyllum* for 6 months

Table 1 Body weight (g) and relative organ weight (g/kg) of male rats receiving *G. pentaphyllum* for 6 months

Organs	Dose of <i>G. pentaphyllum</i> (mg kg-1 day-1)					
	Control n=15	6 n=15	30 n=15	150 n=15	750 n=15	750-R n=15
Initial body weight	294 ± 9	284 ± 14	289 ± 10	290 ± 18	294 ± 14	297 ± 17
Final body weight	623 ± 30	600 ± 48	593 ± 38	583 ± 56	627 ± 57	616 ± 65
Brain	3.43 ± 0.19	3.70 ± 0.37	3.67 ± 0.28	3.73 ± 0.37	3.45 ± 0.31	3.55 ± 0.39
Heart	2.42 ± 0.18	2.37 ± 0.27	2.32 ± 0.20	2.33 ± 0.20	2.32 ± 0.19	2.43 ± 0.17
Lung	2.84 ± 0.25	2.85 ± 0.31	2.94 ± 0.36	2.92 ± 0.31	2.96 ± 0.31	2.98 ± 0.26
Liver	23.47 ± 1.96	22.82 ± 1.73	22.41 ± 1.99	22.77 ± 1.27	23.74 ± 1.95	24.78 ± 2.09
Stomach	3.58 ± 0.47	3.53 ± 0.34	3.66 ± 0.45	3.63 ± 0.24	3.66 ± 0.39	3.77 ± 0.35
Spleen	1.85 ± 0.42	1.75 ± 0.23	1.60 ± 0.19*	1.71 ± 0.23	1.70 ± 0.18	1.85 ± 0.18
Right kidney	2.15 ± 0.23	2.14 ± 0.17	2.12 ± 0.21	2.13 ± 0.19	2.20 ± 0.25	2.33 ± 0.18
Left kidney	2.10 ± 0.21	2.04 ± 0.17	2.01 ± 0.22	2.09 ± 0.18	2.13 ± 0.23	2.18 ± 0.22
Right testis	5.07 ± 0.56	5.28 ± 0.66	5.23 ± 0.32	5.18 ± 0.46	5.19 ± 0.69	5.13 ± 0.53
Left testis	4.95 ± 0.51	5.25 ± 0.55	5.31 ± 0.46	5.21 ± 0.51	5.18 ± 0.59	5.16 ± 0.57
Right adrenal	0.053 ± 0.007	0.054 ± 0.006	0.049 ± 0.009	0.056 ± 0.008	0.054 ± 0.011	0.054 ± 0.008
Left adrenal	0.058 ± 0.008	0.057 ± 0.009	0.058 ± 0.010	0.061 ± 0.009	0.060 ± 0.012	0.059 ± 0.009
Bladder	0.258 ± 0.038	0.253 ± 0.029	0.283 ± 0.071	0.269 ± 0.043	0.261 ± 0.050	0.253 ± 0.037

R: recovery group.

The values are expressed as mean ± S.D.

*Significant difference from control group ($P < 0.05$).

Table 2 Body weight (g) and relative organ weight (g/kg) of female rats receiving *G. pentaphyllum* for 6 months

Organs	Dose of <i>G. pentaphyllum</i> (mg kg ⁻¹ day ⁻¹)					
	Control n=15	6 n=14	30 n=14	150 n=15	750 n=15	750-R n=14
Initial body weight	209 ± 13	211 ± 12	211 ± 20	213 ± 8	211 ± 12	207 ± 12
Final body weight	307 ± 35	333 ± 43	338 ± 33	321 ± 24	332 ± 31	316 ± 32
Brain	6.51 ± 0.51	6.16 ± 0.74	6.07 ± 0.70	6.23 ± 0.54	6.15 ± 0.69	6.39 ± 0.55
Heart	2.90 ± 0.20	2.80 ± 0.30	2.88 ± 0.41	2.79 ± 0.29	2.79 ± 0.27	2.88 ± 0.22
Lung	4.11 ± 0.24	3.79 ± 0.37	3.81 ± 0.38	3.97 ± 0.28	4.02 ± 0.43	4.07 ± 0.44
Liver	23.32 ± 2.00	21.25 ± 1.64	23.01 ± 2.99	22.95 ± 2.19	25.13 ± 2.84	24.17 ± 3.11
Stomach	5.20 ± 0.54	4.64 ± 0.60	4.86 ± 0.53	4.96 ± 0.64	5.06 ± 0.64	4.94 ± 0.69
Spleen	2.25 ± 0.25	2.21 ± 0.39	2.20 ± 0.36	2.19 ± 0.32	2.21 ± 0.32	2.23 ± 0.33
Right kidney	2.67 ± 0.23	2.55 ± 0.40	2.65 ± 0.35	2.64 ± 0.23	2.61 ± 0.22	2.67 ± 0.20
Left kidney	2.47 ± 0.19	2.38 ± 0.33	2.55 ± 0.34	2.50 ± 0.24	2.49 ± 0.35	2.58 ± 0.24
Right adrenal	0.115 ± 0.020	0.108 ± 0.024	0.108 ± 0.020	0.105 ± 0.026	0.116 ± 0.029	0.123 ± 0.018
Left adrenal	0.129 ± 0.021	0.117 ± 0.024	0.117 ± 0.021	0.114 ± 0.020	0.118 ± 0.035	0.132 ± 0.017
Right ovary	0.216 ± 0.067	0.159 ± 0.046	0.177 ± 0.061	0.199 ± 0.078	0.179 ± 0.033	0.193 ± 0.086
Left ovary	0.223 ± 0.072	0.155 ± 0.049*	0.193 ± 0.066	0.210 ± 0.076	0.203 ± 0.054	0.212 ± 0.094
Uterus	2.40 ± 0.91	1.95 ± 0.37	2.21 ± 1.01	2.33 ± 0.70	2.15 ± 0.70	2.51 ± 0.81
Bladder	0.297 ± 0.050	0.256 ± 0.051*	0.262 ± 0.034	0.255 ± 0.041*	0.261 ± 0.031	0.263 ± 0.039

R: recovery group.

The values are expressed as mean ± S.D.

*Significant difference from control group ($P < 0.05$)

3.2. Effect of *G. pentaphyllum* extract on hematological parameters

There was no difference of the number of red blood cells, white blood cell, %N, %L, %M, %E, %B, hemoglobin, including MCV and MCH between extract-treated groups and control groups of either male or female rats (Tables 3 and 4). However, the recovery group of male rat receiving the extract had significantly higher hematocrit and lower MCHC and platelet than that of the control group, while the recovery group of female rats receiving the extract had significantly lower MCHC than that of the control group. However, these changes were still within the normal range [17].

3.3. Effect of *G. pentaphyllum* extract on blood chemistry

In male and female rats, no differences in the serum levels of ALP, ALT, AST, BUN, total protein, albumin, bilirubin, creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol was found between extract-treated groups and the control groups. It was found that the levels of serum sodium and chloride of extract-treated groups were significantly higher than those of the control groups (Tables 5 and 6), however, the values were still within the normal range [17]. Serum potassium level in male recovery group was significantly higher than that of the control group, however, this change was still within normal range [17], and did not occur in any of the extract-treated groups. Hence, this change may not be due to the effect of the extract.

3.4. Effect of *G. pentaphyllum* extract on histopathology of internal organs

Histopathological examination of the liver showed incidence of fatty change in all groups

of male rats, but there was no significant difference between groups. Similarly, the incidence of focal myocarditis, hydrocalyx and testicular atrophy that found in some groups of male rats had no significant difference from that of the control group. Likewise, the incidences of nephrocalcinosis and chronic pyelonephritis were found in some groups of female rats, which had no significant difference from that of the control group (Tables 7 and 8). Taken together, the results showed that the extract of *G. pentaphyllum* did not produce any significant dose-related histopathological changes of the internal organs.

While the chronic toxicity was performed, a female rat receiving the extract 750 mg kg⁻¹ day⁻¹ died by an accidental force-feeding in the 6th week. A female rat receiving the extract 30 mg kg⁻¹ day⁻¹ had a mass in the lateral right side in the 11th week, it was separated to the other case, after that the rat was dead in the 27th week. In the same week, a female rat receiving the extract 6 mg kg⁻¹ day⁻¹ was dead. Histopathological examination of the two last female rats showed incidences of sarcoma and lymphoma, respectively. However, these changes were not found in any of the extract-treated groups. Hence, these changes may not be due to the effect of the extract. Besides, it was reported that these incidences might be caused by spontaneous neoplasms [18-20].

The result indicated that the water extract of *G. pentaphyllum* given orally at doses of 6, 30, 150 and 750 mg kg⁻¹ day⁻¹, did not produce any sign of toxicity in the rats during the 6-month administration period.

Table 3 Hematological values of male rats receiving *G. pentaphyllum* for 6 months

Organs	Dose of <i>G. pentaphyllum</i> (mg kg-1 day-1)					
	Control n=15	6 n=15	30 n=15	150 n=15	750 n=15	750-R n=15
Hematocrit (%)	48.39 ± 1.78	49.02 ± 2.10	48.51 ± 2.09	48.17 ± 1.63	47.99 ± 1.56	50.14 ± 1.48*
RBC (x106 cells/mm3)	8.97 ± 0.42	9.21 ± 0.40	9.05 ± 0.56	8.98 ± 0.35	8.92 ± 0.30	9.26 ± 0.42
Hemoglobin (g/dl)	15.89 ± 0.57	16.07 ± 0.57	15.96 ± 0.53	15.76 ± 0.53	15.59 ± 0.45	16.11 ± 0.46
MCV (µm3/red cell)	54.00 ± 1.61	53.24 ± 1.80	53.65 ± 1.94	53.62 ± 1.27	53.83 ± 1.94	54.21 ± 1.75
MCH (pg/red cell)	17.74 ± 0.60	17.47 ± 0.57	17.66 ± 0.73	17.55 ± 0.41	17.50 ± 0.62	17.40 ± 0.51
MCHC (g/dl RBC)	32.85 ± 0.40	32.80 ± 0.37	32.91 ± 0.43	32.70 ± 0.29	32.50 ± 0.48	32.13 ± 0.51*
WBC (x103 cells/mm3)	5.29 ± 1.53	5.13 ± 1.32	5.92 ± 2.99	4.95 ± 1.10	4.86 ± 0.97	4.80 ± 0.84
Neutrophil (%)	18.40 ± 6.91	16.75 ± 7.25	18.92 ± 5.59	18.70 ± 10.42	17.17 ± 4.54	17.53 ± 5.48
Eosinophil (%)	1.41 ± 0.50	1.45 ± 0.31	1.53 ± 0.50	1.65 ± 0.34	1.85 ± 0.76	1.61 ± 0.47
Lymphocyte (%)	68.31 ± 12.80	71.49 ± 8.56	69.85 ± 9.18	69.59 ± 10.40	68.91 ± 4.84	67.30 ± 7.41
Monocyte (%)	8.65 ± 7.16	7.18 ± 3.32	6.57 ± 3.22	6.39 ± 2.26	7.91 ± 2.75	9.14 ± 3.71
Basophil (%)	3.22 ± 1.20	3.12 ± 0.85	3.14 ± 1.47	3.65 ± 1.08	4.17 ± 1.94	4.42 ± 1.96
Platelet (x103 cells/mm3)	917 ± 89	968 ± 78	951 ± 105	969 ± 81	964 ± 104	1005 ± 70*

R: recovery group.

The values are expressed as mean ± S.D.

*Significant difference from control group ($P < 0.05$)

Table 4 Hematological values of female rats receiving *G. pentaphyllum* for 6 months

Organs	Dose of <i>G. pentaphyllum</i> (mg kg ⁻¹ day ⁻¹)					
	Control n=15	6 n=14	30 n=14	150 n=15	750 n=15	750-R n=14
Hematocrit (%)	47.96 ± 3.09	48.33 ± 1.69	48.83 ± 3.08	47.81 ± 2.51	49.02 ± 2.48	48.62 ± 2.28
RBC (x106 cells/mm3)	8.16 ± 0.59	8.36 ± 0.26	8.30 ± 0.67	8.16 ± 0.50	8.17 ± 0.46	8.28 ± 0.47
Hemoglobin (g/dl)	15.68 ± 0.90	15.84 ± 0.53	15.95 ± 0.87	15.59 ± 0.67	15.92 ± 0.74	15.69 ± 0.59
MCV (µm3/red cell)	58.80 ± 1.23	57.81 ± 1.40	58.92 ± 1.78	58.61 ± 1.40	60.01 ± 2.01	59.01 ± 1.89
MCH (pg/red cell)	19.22 ± 0.53	18.95 ± 0.41	19.25 ± 0.71	19.11 ± 0.48	19.49 ± 0.68	18.97 ± 0.64
MCHC (g/dl RBC)	32.71 ± 0.50	32.78 ± 0.44	32.70 ± 0.52	32.63 ± 0.57	32.49 ± 0.55	32.14 ± 0.46*
WBC (x103 cells/mm3)	2.54 ± 0.74	2.47 ± 0.77	2.60 ± 0.93	2.84 ± 0.69	2.59 ± 0.82	2.10 ± 0.57
Neutrophil (%)	20.24 ± 3.80	18.72 ± 6.09	20.92 ± 4.35	19.10 ± 5.71	20.37 ± 7.45	20.05 ± 6.64
Eosinophil (%)	1.64 ± 0.54	1.44 ± 0.61	1.50 ± 0.50	1.50 ± 0.74	1.39 ± 0.51	1.24 ± 0.34
Lymphocyte (%)	63.40 ± 7.56	67.73 ± 8.12	63.83 ± 9.21	69.42 ± 6.30	62.87 ± 7.88	66.36 ± 9.69
Monocyte (%)	10.07 ± 5.40	8.38 ± 4.68	9.22 ± 5.49	6.58 ± 2.87	10.89 ± 5.15	8.43 ± 4.24
Basophil (%)	4.64 ± 2.57	3.73 ± 1.75	4.51 ± 2.40	3.41 ± 1.45	4.48 ± 2.16	3.92 ± 1.85
Platelet (x103 cells/mm3)	908 ± 62	902 ± 104	886 ± 113	895 ± 67	924 ± 96	914 ± 100

R: recovery group.

The values are expressed as mean ± S.D.

*Significant difference from control group ($P < 0.05$)

Table 5 Biochemical values of male rats receiving *G. pentaphyllum* for 6 months

Organs	Dose of <i>G. pentaphyllum</i> (mg kg ⁻¹ day ⁻¹)					
	Control n=15	6 n=15	30 n=15	150 n=15	750 n=15	750-R n=15
ALP (U/L)	52.80 ± 6.69	50.73 ± 9.41	55.27 ± 7.30	54.40 ± 6.41	55.40 ± 9.28	53.67 ± 5.83
ALT (U/L)	35.87 ± 12.18	37.67 ± 18.75	29.07 ± 4.98	26.93 ± 5.02	34.87 ± 17.86	33.27 ± 6.55
AST (U/L)	86.13 ± 19.38	90.33 ± 15.84	78.60 ± 12.52	76.80 ± 13.21	90.13 ± 26.55	81.67 ± 10.48
Total protein (g/dl)	6.75 ± 0.26	6.72 ± 0.26	6.77 ± 0.25	6.77 ± 0.15	6.89 ± 0.19	6.90 ± 0.22
Albumin (g/dl)	4.33 ± 0.21	4.41 ± 0.14	4.39 ± 0.14	4.41 ± 0.13	4.39 ± 0.12	4.37 ± 0.10
Bilirubin (mg/dl)	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.06	0.08 ± 0.05	0.09 ± 0.05	0.09 ± 0.05	0.09 ± 0.02
BUN (mg/dl)	18.55 ± 1.74	18.53 ± 1.67	18.17 ± 2.37	18.61 ± 2.03	18.17 ± 1.87	17.85 ± 1.87
Creatinine (mg/dl)	0.73 ± 0.05	0.74 ± 0.05	0.69 ± 0.05	0.73 ± 0.05	0.71 ± 0.05	0.73 ± 0.05
Glucose (mg/dl)	190.91 ± 35.46	191.53 ± 43.70	177.84 ± 24.97	191.98 ± 42.64	200.00 ± 42.79	219.22 ± 43.65
Uric acid (mg/dl)	2.16 ± 1.48	2.69 ± 1.98	2.11 ± 1.59	2.32 ± 1.83	2.57 ± 1.84	3.44 ± 1.58
Triglyceride (mg/dl)	113.12 ± 29.11	88.50 ± 29.11	110.63 ± 34.14	97.29 ± 41.01	87.54 ± 29.40	114.59 ± 40.97
Cholesterol (mg/dl)	80.84 ± 15.00	75.45 ± 15.46	82.33 ± 16.25	77.17 ± 17.17	80.23 ± 16.65	81.13 ± 14.56
Na [±] (mmol/l)	143 ± 1	144 ± 1	145 ± 1*	145 ± 2*	146 ± 2*	143 ± 1
K [±] (mmol/l)	5.04 ± 0.76	5.43 ± 1.26	5.56 ± 1.22	5.19 ± 1.09	5.49 ± 0.96	6.83 ± 0.97*
Cl ⁻ (mmol/l)	106 ± 2	107 ± 3	108 ± 2*	108 ± 2*	108 ± 2*	107 ± 2

R: recovery group.

The values are expressed as mean ± S.D.

*Significant difference from control group ($P < 0.05$)

Table 6 Biochemical values of female rats receiving *G. pentaphyllum* for 6 months

Organs	Dose of <i>G. pentaphyllum</i> (mg kg ⁻¹ day ⁻¹)					
	Control n=15	6 n=14	30 n=14	150 n=15	750 n=15	750-R n=14
ALP (U/L)	22.80 ± 6.61	24.28 ± 6.89	28.78 ± 12.74	25.07 ± 5.35	24.67 ± 6.71	24.86 ± 3.44
ALT (U/L)	29.40 ± 9.65	28.50 ± 7.13	29.50 ± 13.77	29.33 ± 12.34	29.33 ± 12.09	28.50 ± 6.95
AST (U/L)	93.33 ± 24.69	94.36 ± 23.81	99.43 ± 47.40	88.67 ± 19.81	92.67 ± 34.15	86.71 ± 18.36
Total protein (g/dl)	7.02 ± 0.23	7.04 ± 0.54	7.02 ± 0.49	6.96 ± 0.29	7.07 ± 0.35	7.04 ± 0.37
Albumin (g/dl)	5.01 ± 0.20	5.06 ± 0.48	4.97 ± 0.48	5.00 ± 0.21	5.13 ± 0.29	5.08 ± 0.27
Bilirubin (mg/dl)	0.12 ± 0.06	0.13 ± 0.06	0.14 ± 0.07	0.11 ± 0.05	0.12 ± 0.06	0.13 ± 0.03
BUN (mg/dl)	24.51 ± 3.51	24.11 ± 4.13	22.60 ± 3.95	26.01 ± 3.56	24.55 ± 3.75	26.27 ± 3.34
Creatinine (mg/dl)	0.86 ± 0.04	0.89 ± 0.07	0.85 ± 0.11	0.89 ± 0.09	0.86 ± 0.08	0.87 ± 0.08
Glucose (mg/dl)	134.89 ± 18.52	135.35 ± 24.68	135.60 ± 22.21	131.02 ± 19.53	140.66 ± 27.83	140.51 ± 26.98
Uric acid (mg/dl)	1.85 ± 0.89	2.09 ± 1.19	2.37 ± 1.35	1.58 ± 0.67	2.69 ± 1.52	2.86 ± 1.26
Triglyceride (mg/dl)	49.09 ± 7.64	47.01 ± 12.99	60.17 ± 20.95	52.86 ± 13.09	51.52 ± 12.18	49.40 ± 11.99
Cholesterol (mg/dl)	67.73 ± 13.42	64.71 ± 16.92	72.44 ± 20.53	70.51 ± 14.09	73.78 ± 16.38	68.14 ± 21.93
Na± (mmol/l)	144 ± 2	145 ± 2	145 ± 2	146 ± 1*	146 ± 2*	146 ± 1*
K± (mmol/l)	4.85 ± 1.31	4.72 ± 1.36	5.07 ± 1.88	4.33 ± 1.23	5.51 ± 1.43	5.57 ± 1.50
Cl- (mmol/l)	111 ± 2	110 ± 2	111 ± 2	113 ± 2	111 ± 2	113 ± 3*

Fi: recovery group.

The values are expressed as mean ± S.D.

*Significant difference from control group ($P < 0.05$)

Table 7 Histopathological evaluation of male rats receiving *G. pentaphyllum* for 6 months

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>G. pentaphyllum</i> (mg kg ⁻¹ day ⁻¹)					
		Control n=15	6 n=15	30 n=15	150 n=15	750 n=15	750-R n=15
Brain		0	0	0	0	0	0
Lung		0	0	0	0	0	0
Thyroid		0	0	0	0	0	0
Heart	Focal myocarditis	1	0	0	0	0	0
Liver	Fatty change	5	5	1	3	5	3
Kidney	Hydrocalyx	0	1	0	0	0	0
Spleen		0	0	0	0	0	0
Pancreas		0	0	0	0	0	0
GI tract		0	0	0	0	0	0
Adrenal gland		0	0	0	0	0	0
Testis	Atrophy	0	0	0	1	0	0
Prostate gland	Prostatitis	1	0	0	0	0	0

R: recovery group.

The results are expressed as number of rats with pathological findings

Table 8 Histopathological evaluation of female rats receiving *G. pentaphyllum* for 6 months

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>G. pentaphyllum</i> (mg kg ⁻¹ day ⁻¹)					
		Control n=15	6 n=14	30 n=14	150 n=15	750 n=15	750-R n=14
Brain		0	0	0	0	0	0
Lung		0	0	0	0	0	0
Thyroid		0	0	0	0	0	0
Heart		0	0	0	0	0	0
Liver		0	0	0	0	0	0
Kidney	Nephrocalcinosis	3	1	2	1	2	2
	Chronic pyelonephritis	0	1	0	0	0	0
Spleen		0	0	0	0	0	0
Pancreas		0	0	0	0	0	0
GI tract		0	0	0	0	0	0
Adrenal gland		0	0	0	0	0	0
Ovary		0	0	0	0	0	0

R: recovery group.

The results are expressed as number of rats with pathological findings

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr Somnuek Jesdapatarakul, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, for histopathological examinations of tissue samples. Thanks are also due to Dr Anchalee Chuthaputti for her comment of the manuscript preparation, the staff of the Laboratory Animal Section, National Institute of Health for the animal care.

REFER ENCES

- [1] Lin CC, Huang PC, Lin JM. *Am J Chin Med* 2000;28:87.
- [2] Cour BL, Molgaard P, Yi Z. *J Ethnopharmacol* 1995;46:125.
- [3] Tan H, Liu ZL, Liu MJ. *Chung Kuo Chaung His I Chieh Ho Tsa Chih* 1993;13:278.
- [4] Yoshikawa K, Arimitsu M, Kishi K, akemoto T. *Yakugaku Zasshi* 1987;107:361.
- [5] He XG. *Zhongcaoyao* 1987;18:447.
- [6] Oshio H, Kuwabara M, Ogasawara I. *JP* 63/112523. *Appl* 86,257,993 (ChemAbstr) 1989;110:p. 101 770w.
- [7] Takemoto.T. *JP* 59/80700. *Appl* 83,170,426 (ChemAbstr) 1984;101: p. 198 181e.
- [8] Mario A, Elberti MG, Cataldo A. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1989;65:317.
- [9] Odajima T. *JP* 58/131999. *Appl.* 82,13,737 (ChemAbstr) 1983; 99: p. 200 492t.
- [10] Fang ZP, Zeng XY. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* 1989;14:676.
- [11] Park YH, Hong H, Park WK. *Han guk Yong-yang Siklyong Hakhoechi* 1987;16:105.
- [12] Kim SH, Park WK. *Han guk Yongyand Siklyong Hakhoechi* 1988;17:7.
- [13] Juchi S. *JP* 61/104772. *Appl.* 84,226,194. (ChemAbstr) 1986; 105: p. 77 831r.
- [14] Baker CA, Bakhuizen Van Den Brink RC. *Flora of Java*. Gronigen: N.V.P. Noordhoff; 1963.
- [15] Wu CY, Chen SK. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 1983;21:355.
- [16] WHO. *General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine*. Geneva: WHO, 2000. p. 29-31.
- [17] Gad SC. *The rat: pathology*. In: Gad SC, Chengellis CP, editors. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 111-113.
- [18] Poteracki J, Walsh KM. *Toxicol Sci* 1998;45:1.
- [19] Katsuta O, Doi T, Okazaki Y, Wako Y, Tsuchitani M. *Toxicol Pathol* 1999;27:463.
- [20] Baselmans AH, Kuijpers MH, van Dijk JE. *Toxicol Pathol* 1996;24:365

การศึกษาความเป็นพิษของสมุนไพรบัวบก

Toxicity study of *Centella asiatica* (L.) Urban

ทรงพล ชีวะพัฒน์*	Songpol Chivapat
จรรย์ บันสิทธิ์*	Jaree Bansiddhi
ปราณี ขวลิตรำรง*	Chavalittumrong
ทรงพล ผดุงพัฒน์*	Songpol Phadungpat
เอมมณัส อัครวิชญ์*	Aimmanas Attawish
สมเกียรติ ปัญญาเมือง*	Somkiat Punyamong
ธิดารัตน์ บุญรอด*	Thidarat Boonruad
จิราณูช มิ่งเมือง*	Jiranuch Mingmuang

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาพิษเฉียบพลันของบัวบกในหนูถีบจักร พบว่า ขนาดของผงบัวบกที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) มีค่ามากกว่า 8 ก./กก. และไม่พบความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาของ เนื้อเยื่ออวัยวะภายในที่เกิดจากบัวบก ผลการศึกษาพิษเรื้อรังในหนูแรพพันธุ์วีสตาร์ที่แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 30 ตัว (เพศละ 15 ตัว) โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมด้วยน้ำ กลุ่มที่ 2 ถึง 5 เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับผงบัวบกโดยวิธีการกรอกทางปากในขนาด 20, 200, 600 และ 1200 มก./กก./วัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน และกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มศึกษา recovery โดยได้รับบัวบก 1200 มก./กก. นาน 6 เดือนเช่นกันแล้วหยุดให้บัวบกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนเจาะเลือด พบว่า หนูที่ได้รับผงบัวบกทุกขนาด มีน้ำหนักตัว การกินอาหารและสุขภาพไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม หนูเพศผู้ที่ได้รับบัวบกขนาด 600 และ 1200 มก./กก. มีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไร ก็ตามจำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นเมื่อหยุดให้บัวบกขนาดสูงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ การตรวจค่าเคมีคลินิกของซีรัมพบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับบัวบกขนาด 600 มก./กก. ขึ้นไปมีระดับโซเดียมและคลอไรด์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และหนูเพศเมียที่ได้รับผงบัวบก 1200 มก./กก. มีระดับโซเดียมสูงกว่า กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ($p < 0.05$) แต่การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ยังคงอยู่ในช่วงปกติ ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆ ทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่บ่งชี้ จำเพาะถึงความพิษของบัวบก ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า ผงบัวบกไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อหนูแรพพันธุ์วีสตาร์

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ABSTRACT

Oral acute toxicity of *Centella asiatica* (L.) Urban powder (CA) in mice revealed that median lethal dose (LD_{50}) of CA was more than 8 g/kg body weight. Histopathological study revealed no abnormality contributed to CA. Chronic toxicity has been investigated in six groups of Wistar rats, each of 30 rats (15 of each sex). Group 1 was the water control group while group 2 to 5 received CA by oral administration at the doses of 20, 200, 600 and 1200 mg/kg/day respectively for six months. Group 6, a recovery group, received 2000 mg/kg CA and the administration was withdrawn two weeks before sacrificed. The result revealed that average body weight and food consumption in all CA-treated groups were not different from those of the control groups. Male rats receiving CA at 600 and 1200 mg/kg had significantly less white blood cell counts than the control group ($p < 0.05$); however the number of white blood cell increased after CA discontinuation for 2 weeks. Male rats receiving 600 mg/kg CA and more had significantly higher levels of sodium and chloride than control group ($p < 0.05$) and female rats treated with 1200 mg/kg CA had significantly higher sodium level ($p < 0.05$) as well. However, these alterations were trivial and within normal range. Histopathological study of various visceral organs did not show any pathognomonic lesions caused by CA. Therefore, it may be concluded that CA produces no toxicity in Wistar rats.

Keywords : *Centella asiatica* (L.) Urban, Toxicity

บทนำ

บัวบก *Centella asiatica* (L.) Urban วงศ์ Umbelliferae^(1,2) เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นสั้น มีไหลหรือส่วนของลำต้นที่แตกแขนงทอดนอนไปตามพื้นดินแล้วออกราก และใบเจริญ เต็มโตเป็นต้นใหม่ๆ ได้อย่างต่อเนื่อง ใบเดี่ยว ออกเวียนหรือสลับที่ แผ่นใบรูปไข่หรือค่อนข้างกลม กว้าง 1-7 ซม. ยาว 1-4 ซม. ขอบใบหยัก เส้นใบออกที่โคนใบ 5-7 เส้น ก้านใบยาว ช่อดอกเล็ก แบบช่อ ช่้อม ออกตามง่ามใบหรือช่อใบ ดอกเล็กมาก มีกลีบดอก 5 กลีบ สีม่วงแดง เกสรเพศผู้ 5 อัน เกสร เพศเมียมีรังไข่เป็น 2 ห้อง และก้านชูยอดเกสรค่อนข้างสั้น ผลเล็กมากและแบน กว้าง 2-4 มม. เปลือก มีสันตามยาว 7-9 เส้น⁽²⁻⁴⁾ บัวบกมีเขตการกระจายพันธุ์ทั่วไปทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั่วโลก ซึ่ง รวมถึงเอเชียตะวันออกเฉียงและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ด้วย ขึ้นได้ดีในที่ชุ่มชื้น ทั้งที่โล่งแจ้ง ที่มีแสงรำไรและในร่ม ตั้งแต่พื้นที่ราบต่ำจนถึงที่สูง 3,480 ม. เหนือระดับน้ำทะเล⁽²⁻⁵⁾

ในตำรับยาแผนโบราณของไทยได้กล่าวถึงบัวบกว่า ใบใช้รับประทานเป็นอาหารได้ ส่วนประโยชน์ทางยานั้น เป็นยาบำรุง รักษาโรคผิวหนัง โรคเส้นประสาท ขับปัสสาวะ ต้นและใบเป็นยา บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เมื่อยล้า แก้อ่อนเสีย อากาศบิด⁽⁶⁾ และยังมีสรรพคุณต้านอักเสบอีกด้วย⁽⁷⁾ คนจีนใช้บัวบกตำละเอียดละลายน้ำและน้ำตาลเป็นน้ำพุด แก้อ่อนใน แก้อ่อนเพลียได้ดี⁽⁶⁾ ส่วนในตำรา อายุรเวทของประเทศอินเดียนั้นใช้บัวบกเป็นยาบำรุงทั่วไป ยาสงบประสาทและคลายกังวล (sedative and anxiolytic)⁽⁸⁾ และบำรุงสมอง (brain tonic)⁽⁹⁾ การศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของบัวบก พบว่า มีสารสำคัญกลุ่ม triterpene saponins ได้แก่ asiaticoside ซึ่งมี sapogenin คือ Asiatic acid โดยส่วนของน้ำตาลเป็น rhamnose ต่อกับ glucose 2 โมเลกุล, asiaticoside A และ asiaticoside B มี sapogenin คือ 6-b-hydroxyasiatic acid และ teminolic acid ตามลำดับโดยส่วนของน้ำตาล เหมือนกับ asiaticoside

ทุกประการ⁽¹⁰⁾ Triterpene glycosides อื่นๆ ได้แก่ madecassoside⁽¹¹⁾, centellasaponins B,C และ D⁽¹²⁾ เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานว่ามี essential oil ในส่วน aerial part ของบัวบกมีสารกลุ่ม sesquiterpenoids อยู่ปริมาณมาก เช่น b-caryophyllene a-humulene, germacrene-D ฯลฯ⁽¹³⁾

จากรายงานการศึกษาดุษฎีทางเภสัชวิทยาต่างๆ ของสมุนไพรบัวบกนั้น พบว่า สาร Asiatic acid, madecassic acid และ asiaticoside ของบัวบกทำให้ human fibroblast มีการสังเคราะห์ collagen I เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ตามแผนโบราณที่ช่วยให้แผลหายดีขึ้น⁽¹⁴⁾ สารสกัดด้วยเฮกเซน โคลโลโรมีเทน และเอทานอลของบัวบกทั้งต้นมีฤทธิ์ลดความดันเลือดในหนูขาวที่เหนียวนานให้มีความดันเลือดสูงได้โดยกลไกการออกฤทธิ์น่าจะเกิดจากการขยายหลอดเลือด⁽¹⁵⁾ สารสกัดด้วยเอทานอล ของบัวบกขนาด 100 มก./กก. มีฤทธิ์ต้านความเครียดเทียบเท่ากับ diazepam 2.5 มก./กก.⁽¹⁶⁾ สารสกัดด้วย 50% เอทานอลของบัวบกมีฤทธิ์กดระบบประสาทส่วนกลางและยังมีฤทธิ์ต้านภาวะซึมเศร้า (antidepressant) เช่นเดียวกับ imipramine และ d-amphetamine โดยผ่านทาง D2 receptor และ cholinomimetic action ซึ่งถูก block ด้วย atropine และ chlorpromazine⁽¹⁷⁾ สารสกัดด้วย 95% แอลกอฮอล์ของรากบัวสามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะของหนูขาวที่เหนียวนำโดยวิธี restraint stress ได้อย่างมีนัยสำคัญ⁽¹⁸⁾ ฤทธิ์ที่นำสนใจอีกประการหนึ่ง คือสารสกัดด้วยเมทานอลของบัวบกสามารถยับยั้งการเกิดเนื้องอกที่กระตุนโดย Epstein bar virus ในหลอดทดลองได้ดี⁽¹⁹⁾ จากรายงานการศึกษาทางคลินิกพบว่า ซีฟิงหรือผงยาที่มีส่วนผสมของสารสกัดบัวบกช่วยเร่งการหายของแผลได้ ยาเตรียมที่ผสมบัวบกสามารถรักษาแผลเรื้อรังได้ดี สารสกัดบัวบกทำให้แผลไฟไหม้ในระดับ 2 และ 3 หายเร็วขึ้น และป้องกันการหดตัวหรือการบวมที่เกิดจากการติดเชื้อได้ อีกทั้งยังยับยั้งการสร้างแผลเป็นที่เกินกว่าระดับปกติได้⁽¹¹⁾ ในการทดลองใช้ total triterpene fraction จากบัวบกในผู้ที่มีภาวะ venous hypertension ที่มีอาการบวมของข้อเท้าและฝ่าเท้า

นั้น พบว่าสารดังกล่าวช่วยลดการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของหลอดเลือดฝอยและช่วยให้การไหลเวียนของเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็กดีขึ้นด้วย⁽²⁰⁾ ผู้ป่วยที่มีแผล ulcer ในกระเพาะอาหารและลำไส้เมื่อได้รับประทาน titrated extract ของบัวบกนั้น พบว่าร้อยละ 93 มีอาการดีขึ้นและมีการหายของแผลร้อยละ 70⁽¹⁰⁾ นอกจากนี้มีรายงานว่ามีผลให้บัวบกเป็นเวลา 12 สัปดาห์แก่เด็กที่มีปัญหาทางสมองพบว่า เด็กเหล่านี้มีความจำและรูปแบบพฤติกรรมดีขึ้น⁽⁹⁾

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่า บัวบกเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณดีเด่นหลายด้านเหมาะที่จะนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคอื่นๆ นอกเหนือไปจากการใช้รักษาแผลที่ผิวหนัง เช่น ยาลดความดันโลหิต ยารักษาแผลในกระเพาะ ยาลดความเครียด ยาลดความวิตกกังวล เป็นต้น ปัจจุบันโรงพยาบาลศูนย์เจ้าพระยาอภัยภูเบศรได้นำผงในบัวบกแห้งมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์รูปแบบแคปซูล โดยมุ่งหวังสรรพคุณบำรุงสมอง ช่วยให้เลือดไปเลี้ยงสมองได้ดีขึ้น อย่างไรก็ดีจนถึงแม้ว่าบัวบกจะถูกนำมารับประทานเป็นอาหารเป็นเวลานานแล้วก็ตาม แต่ในกระบวนการพัฒนาสมุนไพรบัวบกเพื่อใช้เป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพนั้นจำเป็นต้องอย่างยิ่งที่จะต้องผ่านการศึกษาทางพิษวิทยาในสัตว์ทดลอง เนื่องจากข้อมูลทางพิษวิทยาของสมุนไพรชนิดนี้ยังมีรายงานค่อนข้างน้อย ดังเช่นการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดบัวบกต่อหนูถีบจักร⁽²¹⁾ และ brine shrimp⁽²²⁾ ที่ไม่พบพิษ แต่มีรายงานบ่งชี้ว่า ส่วนสกัดแอลกอฮอล์จากบัวบกแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์แบบ frameshift ต่อ *Salmonella typhimurium* สายพันธุ์ TA 98 และ TA 100⁽²³⁾ ดังนั้นกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์โดยความสนับสนุนของกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกจึงได้ศึกษาพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของผงบัวบกเพื่อให้ได้ข้อมูลทางพิษวิทยาเพิ่มขึ้นอันจะเป็นประโยชน์สำหรับใช้เป็นแนวทางในการประเมินความปลอดภัย อีกทั้งยังเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคอีกทางหนึ่งด้วย

วัสดุและวิธีการ

สมุนไพรบัวบก

สำรวจและรวบรวมตัวอย่างบัวบกจากแหล่งปลูกในพื้นที่จังหวัดนครปฐม นำมาตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ตามหลักพฤกษศาสตร์กรวมวิธาน คือ *Centella asiatica*(L.) Urban(วงศ์Umbelliferae) โดยใช้เอกสารจำแนกพรรณพืช^(2,3) และเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชแห่งหมายเลข Maxwell 71-410 ซึ่งจัดเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK) อาคารสิรินธร กรมวิชาการเกษตร และได้จัดทำตัวอย่างพืชแห่งในการศึกษา หมายเลข Bansiddhi 46-1 เก็บไว้ในห้องปฏิบัติการพฤกษศาสตร์ สถาบันวิจัยสมุนไพร คัดเลือกส่วนที่ใช้ คือ ใบบัวบกสด

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรพันธุ์ ICR น้ำหนักตัวระหว่าง 18-22 ก. จำนวน 20 ตัว(เพศละ 10 ตัว) และหนูแรทพันธุ์วิสตา จำนวน 180 ตัว (เพศละ 90 ตัว) เพศผู้ น้ำหนักตัว 200-220 ก. เพศเมียน้ำหนักตัว 180-200 ก. ชื่อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาเลียมมหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อม (Hygienic conventional room) ของศูนย์สัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด และให้น้ำกรองที่สะอาดโดยไม่จำกัดปริมาณ

วิธีการศึกษา

การเตรียมสมุนไพรสำหรับการทดสอบพิษ

นำสมุนไพรบัวบกมาล้างให้สะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส บดให้เป็นผงแล้วแฉ่งผ่านตะแกรงเบอร์ 100 เพื่อให้ละเอียดสำหรับใช้ในการเตรียมน้ำยาแขวนตะกอน สำหรับการทดสอบพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังต่อไป

การตรวจคุณภาพทางเคมีและปริมาณของสารสำคัญ

นำตัวอย่างผงบัวบกแห้งที่ใช้ทดสอบพิษมาตรวจหาคุณภาพทางเคมี ได้แก่ ปริมาณของความเป็นกรด เบ้าที่ไม่ละลายในกรด ปริมาณของสารสกัดด้วยเอทานอล สารสกัดด้วยน้ำ โดยใช้วิธีที่กำหนดไว้

ใน Thai Herbal Pharmacopoeia Vol.1 และตรวจหาสารสำคัญกลุ่ม triterpenes โดยใช้ HPLC ชนิด multisolvent ของ Water รุ่น 600 E และ HPLC column ของ Phenomenex C18 Hyperclone ODS ขนาด (5µm, 250x 4.6 mm)

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

กรอกน้ำยาแขวนตะกอนผงบัวบกที่มีความเข้มข้น 1:5 ทางปากให้แก่หนูถีบจักร โดยกลุ่มทดลองจำนวน 10 ตัว (เพศละ 5 ตัว) ได้รับผงบัวบกขนาด 4 ก./น้ำหนักตัว 1 กก. กรอก 2 ครั้งเช้าและบ่ายภายใน 1 วัน คิดเป็นขนาดบัวบกที่ได้รับ 8 ก./กก. ส่วนกลุ่มควบคุมจำนวน 10 ตัวได้รับน้ำกลั่นในปริมาณ 20 มล./กก. 2 ครั้งเช่นกัน จากนั้นสังเกตอาการอย่างใกล้ชิดทุกวัน พร้อมบันทึกจำนวนหนูตาย เมื่อครบกำหนด 14 วันผ่าซากชันสูตรตรวจอวัยวะภายใน จากนั้นเก็บอวัยวะภายใน ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด ตับ ไต และระบบสืบพันธุ์แล้วนำไปเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อย้อมด้วยสี H&E เพื่อตรวจหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิสัตวแพทย์

การศึกษาพิษเรื้อรัง

แบ่งหนูโดยวิธีสุ่มออกเป็น 6 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูเพศผู้ 15 ตัว และเพศเมีย 15 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมกรอกน้ำกลั่นปริมาณ 10 มล./กก./วัน กลุ่มที่ 2 ถึง 5 เป็นกลุ่มทดลอง กรองผงบัวบกในน้ำที่ขนาด 20, 200, 600 และ 1200 มก./กก./วัน ตามลำดับ จนครบ 6 เดือน กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่ม recovery (R) ที่ได้รับผงบัวบกขนาด 1200 มก./กก./วัน จนครบ 6 เดือนเช่นกัน แล้วหยุดยาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อตรวจดูว่าการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติที่เกิดขึ้นจะกลับสู่ปกติหรือไม่ ระหว่างการทดลองสังเกตอาการเปลี่ยนแปลงของหนูทุกวัน บันทึกน้ำหนักตัวและอาหารที่กินสัปดาห์ละ 1 ครั้ง หากมีหนูตายระหว่างทดลอง จะนำมาผ่าซากชันสูตรทันที

เมื่อครบกำหนด 6 เดือนเจาะเลือดเพื่อตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยา โดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติรุ่น Cell-Dyn 3500 ของ Abbot® และแยกซีรัมเพื่อตรวจค่าพารามิเตอร์ ทางเคมีคลินิกโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi® รุ่น 912

จากนั้นผ่าซากชั้นสูตรตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในทางมหกายวิภาค (gross lesions) ซึ่งน้ำหนักอวัยวะที่สามารถชั่งได้แล้วคำนวณค่าน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์กับอวัยวะตอในน้ำยา 10% บัพเฟอร์ฟอร์มาลิน นำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ เพื่อตรวจหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยา

ข้อมูลค่าสังเกตที่ได้จากการทดลองวิเคราะห์ด้วยสถิติ one-way ANOVA โดยโปรแกรม SPSS/PC version 9.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Bonferroni test ส่วนอุบัติการณ์ของการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา ใช้ Fisher exact ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ผล

การตรวจคุณภาพและสารกลุ่ม triterpenes ของบวบ

สมุนไพรบวบที่ใช้ในการศึกษาพิษครั้งนี้มีคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ใน Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) ส่วนปริมาณสารกลุ่ม Triterpenes ซึ่งเป็นสารสำคัญในบวบนั้นยังไม่มีการกำหนดใน THP ผลการตรวจคุณภาพทางเคมีและ triterpenes แสดงไว้ในตารางที่ 1

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

ผลการศึกษาพิษเฉียบพลันของผงบวบ โดยการก่น้ำยาแขวนตะกอนของผงบวบให้แก่หนูถีบจักรในขนาด 4 ก./กก. (เป็นขนาดที่สามารถให้ได้สูงสุดใน 1 ครั้ง) โดยกรอก 2 ครั้ง ใน 1 วัน พบว่า หนูถีบจักรไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น และเมื่อครบกำหนด 14 วัน ไม่มีหนูตาย ดังนั้นขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 หรือ LD₅₀ ควรมีค่ามากกว่า 8 ก./กก. จากการผ่าซากชั้นสูตรก็ไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทางมหกายวิภาค ผลการตรวจอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยาพบการเปลี่ยนแปลงในบางอวัยวะได้ทั้งหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอย่างไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงไม่อาจกล่าวว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากสมุนไพรบวบ

การทดสอบพิษเรื้อรัง

ผลค่อน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ น้ำหนักตัว การกินอาหาร และสุขภาพทั่วไป

หนูทุกกลุ่มที่ได้รับผงบวบกมีน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ น้ำหนักตัวเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3 และ 4) ในระหว่างการทดลองพบว่า หนูทุกกลุ่มที่ได้รับบวบกมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในทุกสัปดาห์ (ไม่ได้แสดงผล) นอกจากนี้ไม่พบอาการผิดปกติใดๆ ที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนหนูที่ตายระหว่างทดลองเมื่อผ่าซากพบว่า กรอกยาพลาดเข้าสู่ปอด

ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา

หนูกลุ่มที่ได้รับผงบวบกทั้งหมดมีค่าทางโลหิตวิทยาส่วนใหญ่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมยกเว้นหนูเพศผู้ที่ได้รับผงบวบกขนาด 600 และ 1200 มก./กก. มีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5 และ 6

ผลต่อค่าทางเคมีคลินิก

หนูเพศผู้ที่ได้รับผงบวบก 600 มก./กก. ขึ้นไปรวมทั้งกลุ่ม recovery มีระดับโซเดียมและคลอไรด์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนในหนูเพศเมียนั้นพบว่า กลุ่มที่ได้รับผงบวบก 1200 มก./กก. มีระดับโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 7 และ 8)

ผลต่อการเปลี่ยนแปลงอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา

หนูเพศผู้ที่ได้รับผงบวบกขนาด 200 และ 1200 ก./กก. มีอุบัติการณ์พบหอย่อม lymphoid cell รอบหลอดเลือดเล็กทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$). หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับผงบวบก 600 และ 1200 มก./กก. มีอุบัติการณ์ของการสะสม protein cast ปริมาณเล็กน้อยที่ sinusoid ของตับอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนเพศเมียกลุ่มที่ได้รับผงบวบก 200 และ 1200 มก./กก. นั้นพบ protein cast ได้กลุ่มละ 2 ตัว หนูเพศผู้ที่ได้รับผงบวบกขนาด 200 มก./กก. ขึ้นไปมีอุบัติการณ์ของการสะสมไขมันจำนวนเล็กน้อยที่ต่อมหมวกไตส่วนนอกสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 9 และ 10)

วิจารณ์

จากการศึกษาพิษเฉียบพลันโดยกรอกผง บัวบกขนาด 8 ก./กก. ภายใน 1 วัน แก่หนูถีบจักร พบว่า สมุนไพรบัวบกไม่ทำให้เกิดอาการพิษใดๆ และสัตว์ทดลองไม่ตาย นอกจากนี้ไม่พบว่าก่อให้เกิดพยาธิสภาพของอวัยวะภายใน ดังนั้นขนาดของบัวบกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีค่า LD₅₀ มากกว่า 8 ก./กก.หรือคิดเป็น 400 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน

ผลการศึกษาพิษเรื้อรังโดยกรอกผงบัวบกทางปากแก่หนูแรทในขนาด 20, 200, 600 และ 1200 มก./กก. หรือคิดเป็น 1, 10, 30 และ 60 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน แสดงให้เห็นว่า บัวบกไม่มีผลกระทบต่อ น้ำหนักตัว การกินอาหาร และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ของหนูแรท หนูที่ได้รับบัวบกมีค่าทางโลหิตวิทยาเกือบทั้งหมดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นหนูเพศผู้ที่ได้รับบัวบกขนาด 600 และ 1200 มก./กก. มีค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในหนูเพศเมียที่ได้รับผงบัวบกขนาดเท่ากัน ซึ่งอาจเป็นการตอบสนองที่แตกต่าง เนื่องจากเพศ (gender difference) แต่เมื่อหยุดบัวบก 2 สัปดาห์พบว่า กลุ่ม recovery มีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงขึ้นและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม จากการตรวจเคมีคลินิกในเลือดหนูแรทที่ได้รับผงบัวบกพบว่า มีระดับน้ำตาลกลูโคสและโคเลสเตอรอลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ในคนมีรายงานว่า asiaticoside ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือดสูงซึ่งเป็นข้อควรระวังเมื่อใช้บัวบกร่วมกับยาลดน้ำตาลและยาลดไขมัน⁽²⁴⁾ ระดับโซเดียมและคลอไรด์ที่สูงขึ้นในเพศเมียที่ได้รับผงบัวบกขนาด 1200 มก./กก. นั้นจัดเป็นการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยและอยู่ในช่วงค่าปกติของหนูแรทวิสตา⁽²⁵⁾

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของหัวใจ ปอด กระเพาะอาหาร และลำไส้ มีอุบัติการณ์อย่างไม่มีสัมพันธ์กับขนาดของบัวบกที่ให้ จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากผงบัวบก การสะสม ของ protein cast ปริมาณเล็กน้อยใน sinusoids ที่ตับของหนูเพศผู้ที่ได้รับบัวบก 600 และ 1200 มก./กก. มีอุบัติการณ์สูง

ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อาจจะเป็นองค์ประกอบทางเคมีบางอย่างของบัวบกที่ถูกดูดซึมผ่านทางเดินอาหารทาง portal vessel มายัง sinusoids ที่ตับ ผลการตรวจค่าเคมีคลินิกที่เกี่ยวข้องกับตับช่วยบ่งชี้ว่า บัวบกไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ตับแต่อย่างใด อีกทั้งอุบัติการณ์และความรุนแรงของการเสื่อมของเซลล์ตับแบบ fatty degeneration ในหนูเพศผู้ที่ได้รับผงบัวบกก็ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมแต่อย่างใดและหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับผงบัวบกก็ไม่พบการเสื่อมของเซลล์ตับแต่อย่างใด ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า บัวบกไม่ทำให้เกิดพิษต่อตับ การสะสมของไขมันปริมาณเล็กน้อย ที่ต่อมหมวกไตส่วนนอกมีอุบัติการณ์สูงขึ้นในหนูเพศผู้ที่ได้รับผงบัวบกขนาดตั้งแต่ 200 มก./กก. ขึ้นไป อาจเกิดจากการสะสมของฮอร์โมนสเตอรอยด์เนื่องจากบัวบกมีผลทำให้เกิด cortico steroid-sparing effect ในหนูแรทภายใต้สภาวะเครียด⁽²⁶⁾ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ได้มีความรุนแรงที่เพิ่มขึ้นตามขนาดของบัวบกที่ได้รับ ส่วนในหนูเพศเมียไม่พบว่ามี การสะสมของไขมันที่ต่อมหมวกไตซึ่งอาจเนื่องจากการตอบสนองที่แตกต่างกันระหว่างเพศ (gender-difference)

สรุป

การศึกษาพิษเฉียบพลันของสมุนไพรบัวบกในหนูถีบจักรโดยกรอกผงบัวบกทางปากในขนาด 4 ก./กก.เข้าและบ่าย คิดเป็นขนาดที่ได้รับใน 1 วัน คือ 8 ก./กก. พบว่า ไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติใดๆ ไม่ทำให้หนูตาย และไม่ทำให้เกิดความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่ออวัยวะภายใน ขนาดของบัวบกที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 มีค่ามากกว่า 8 ก./กก.

ผลการศึกษาพิษเรื้อรังของบัวบกโดยกรอกผงบัวบกทางปากให้แก่หนูแรทวิสตา 6 กลุ่ม เป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมด้วยน้ำ กลุ่มที่ 2 ถึง 5 ได้รับบัวบกขนาด 20, 200, 600 และ 1200 มก./กก./วัน และกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่ม high recovery ที่ขนาด 1200 มก./กก. พบว่าสมุนไพรบัวบกไม่ผลต่อค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว ปริมาณอาหารที่กิน และสุขภาพทั่วไป หนูกลุ่มทดลองบัวบกมี

ค่าทางโลหิตวิทยาเกือบทั้งหมดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นหนูเพศผู้ที่ได้รับบัวบกขนาด 600 และ 1200 มก./กก. มีจำนวนเม็ดเลือดขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและเมื่อหยุดให้บัวบก 2 สัปดาห์ พบว่ามีจำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น หนูเพศผู้ที่ได้รับบัวบกขนาด 600 มก./กก. ขึ้นไปมีระดับโซเดียมและคลอไรด์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนเพศเมียที่ได้รับบัวบกขนาด 1200 มก./กก. มีโซเดียมสูงขึ้นเล็กน้อยเช่นกัน อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้ยังคงอยู่ในสภาวะปกติ ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน ไม่อาจกล่าวได้ว่า บัวบกทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใด ๆ อย่างไรก็ตามการรับประทานบัวบกเป็นเวลานานต่อเนื่องควรมีการตรวจเลือดทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิกพร้อมด้วยเป็นระยะเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกกระทรวงสาธารณสุข ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยความเป็นพิษของสมุนไพรบัวบกประจำปีงบประมาณ 2546 และขอขอบคุณ นางสาวรุ่งตะวัน อัศวมั่นคง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ช่วยสังเกตอาการสัตว์ทดลองและช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ รวมทั้งเจ้าหน้าที่กลุ่มสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขที่ช่วยเตรียมห้องสัตว์ทดลองและอุปกรณ์ที่จำเป็น

ตารางที่ 1 ผลการตรวจคุณภาพทางเคมีและปริมาณสารกลุ่ม Triterpenes ของผงบัวบก

ปริมาณ	% (w/w)
ความชื้น	9.3
เถ้ารวม	11.89
เถ้าที่ไม่ละลายในกรด	0.12
สารสกัดด้วยเอทานอล	16.60
สารสกัดด้วยน้ำ	29.16
Asiaticoside	0.0147
Asiatic acid	0.0110
Madecassoside	0.0792
Madecassic acid	0.0182

ตารางที่ 2 ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูถีบจักรที่ทดสอบพิษเฉียบพลันของผงบัวบก

อวัยวะ	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	หนูถีบจักร		
		กลุ่มควบคุม (n=10)	กลุ่มทดลอง (n=10)	
สมอง	NRL			
หัวใจ	NRL			
ปอด	Hemorrhage	1/10	3/10	NS
	Congestion	1/10	1/10	NS
ตับ	Hydropic degeneration	3/10	6/10	NS
ไต	Congestion	6/10	6/10	NS
ระบบสืบพันธุ์	NRL			

NRL= No remarkable lesions

NS = Not statistically significant from control group(p>0.05)

ตารางที่ 3 น้ำหนักตัว (กรัม) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (%) ของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับ ผงบัวบกเป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	กลุ่มหนูที่ได้รับผงบัวบก (มก./กก./วัน)					
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	600 n=15	1200 n=14	1200-R n=14
น้ำหนักตัวเริ่มต้น	205.26 ± 11.54	203.13 ± 11.66	203.86 ± 15.11	205.10 ± 10.00	205.34 ± 10.10	199.14 ± 6.16
น้ำหนักตัวสุดท้าย	622.39 ± 57.65	616.10 ± 48.99	611.56 ± 68.97	598.71 ± 55.28	647.65 ± 78.98	576.04 ± 63.66
สมอง	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.35 ± 0.10
หัวใจ	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.03
ปอด	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.29 ± 0.03
กระเพาะอาหาร	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.37 ± 0.03
ตับ	2.38 ± 0.16	2.42 ± 0.16	2.35 ± 0.16	2.30 ± 0.18	2.34 ± 0.23	2.44 ± 0.16
ไตซ้าย	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02
ไตขวา	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.22 ± 0.02
ม้าม	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.01
กระเพาะปัสสาวะ	0.029 ± 0.005	0.030 ± 0.004	0.031 ± 0.005	0.029 ± 0.005	0.029 ± 0.005	0.031 ± 0.007
อวัยวะชาย	0.52 ± 0.05	0.51 ± 0.08	0.53 ± 0.06	0.52 ± 0.07	0.51 ± 0.06	0.52 ± 0.09
อวัยวะขวา	0.52 ± 0.05	0.52 ± 0.05	0.53 ± 0.05	0.52 ± 0.06	0.50 ± 0.05	0.51 ± 0.09

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 4 น้ำหนักตัว (กิโลกรัม) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (%) ของหนูแรดเพศเมียที่ได้รับ ผงบัวบกเป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	กลุ่มหนูที่ได้รับผงบัวบก (มก./กก./วัน)					
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	600 n=13	1200 n=14	1200-R n=14
น้ำหนักตัวเริ่มต้น	162.74 ± 9.32	163.89 ± 6.44	160.87 ± 8.40	161.50 ± 7.17	159.52 ± 9.57	163.01 ± 10.45
น้ำหนักตัวสุดท้าย	324.44 ± 42.33	329.53 ± 22.21	311.37 ± 31.47	310.61 ± 24.44	320.87 ± 29.94	311.85 ± 19.84
สมอง	0.62 ± 0.07	0.82 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.62 ± 0.11	0.62 ± 0.10
หัวใจ	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.02
ปอด	0.38 ± 0.05	0.40 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.04
กระเพาะอาหาร	0.48 ± 0.05	0.49 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.51 ± 0.06	0.53 ± 0.13	0.48 ± 0.04
ตับ	2.26 ± 0.21	2.39 ± 0.28	2.19 ± 0.18	2.30 ± 0.20	2.40 ± 0.23	2.26 ± 0.14
ไตซ้าย	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.02
ไตขวา	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.01
ม้าม	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.02
กระเพาะปัสสาวะ	0.027 ± 0.004	0.030 ± 0.005	0.027 ± 0.004	0.027 ± 0.005	0.026 ± 0.003	0.025 ± 0.005
มดลูก	0.23 ± 0.09	0.21 ± 0.06	0.23 ± 0.07	0.21 ± 0.08	0.22 ± 0.06	0.21 ± 0.04
รังไข่ซ้าย	0.018 ± 0.006	0.016 ± 0.005	0.018 ± 0.004	0.019 ± 0.005	0.018 ± 0.005	0.018 ± 0.004
รังไข่ขวา	0.017 ± 0.006	0.017 ± 0.005	0.019 ± 0.005	0.017 ± 0.004	0.018 ± 0.007	0.017 ± 0.005

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาของหนูแรดเพศเมียที่ได้รับผงบัวบกเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	กลุ่มหนูที่ได้รับผงบัวบก (มก./กก./วัน)					
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	600 n=15	1200 n=14	1200-R n=14
Hematocrit (%)	48.00 ± 1.73	47.17 ± 4.07	43.92 ± 12.30	46.68 ± 1.45	44.28 ± 12.31	45.55 ± 12.69
Hemoglobin (g/dl)	15.65 ± 0.48	15.76 ± 0.34	14.43 ± 4.03	15.38 ± 0.39	14.47 ± 4.01	14.65 ± 4.09
RBC (x10 ⁶ /cell/μL)	9.07 ± 0.36	9.00 ± 0.25	8.23 ± 2.31	8.85 ± 0.31	8.37 ± 2.33	8.55 ± 2.41
MCV (fl/red cell)	52.95 ± 1.17	53.54 ± 1.63	49.89 ± 13.89	52.79 ± 1.62	49.37 ± 13.70	49.75 ± 13.87
MCH (pg/red cell)	17.29 ± 0.58	17.52 ± 0.44	16.38 ± 4.57	17.40 ± 0.54	16.13 ± 4.47	15.00 ± 4.47
MCHC (g/dl RBC)	32.63 ± 0.68	32.73 ± 0.34	30.66 ± 8.49	32.97 ± 0.41	30.51 ± 8.46	30.02 ± 8.32
WBC (K/μL)	5.39 ± 1.35	4.07 ± 1.18	4.05 ± 1.35	3.89 ± 1.16*	3.78 ± 1.39*	4.36 ± 1.57*
Neutrophil (%)	14.19 ± 3.70	15.95 ± 5.54	19.12 ± 8.39	19.52 ± 4.52	20.58 ± 9.81	18.87 ± 8.13
Eosinophil (%)	1.34 ± 0.13	1.53 ± 0.88	1.37 ± 0.59	1.43 ± 0.64	1.60 ± 0.81	1.56 ± 0.73
Lymphocyte (%)	77.67 ± 5.36	74.02 ± 9.69	66.40 ± 20.15	72.39 ± 5.75	63.67 ± 19.53	63.58 ± 20.65
Monocyte (%)	5.10 ± 2.34	6.50 ± 3.99	5.02 ± 2.40	4.95 ± 2.02	5.75 ± 2.69	6.31 ± 5.68
Basophil (%)	1.71 ± 0.77	2.01 ± 0.93	1.49 ± 1.26	1.60 ± 0.85	1.73 ± 1.04	2.32 ± 2.40
Platelet (K/μL)	1003.10 ± 47.72	971.37 ± 62.62	857.80 ± 252.25	955.60 ± 67.64	930.43 ± 265.89	920.73 ± 265.36

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 6 ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับผงบัวบกเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	กลุ่มหนูที่ได้รับผงบัวบก (มก./กก./วัน)					
	0 n=14#	20 n=15	200 n=15	600 n=13	1200 n=14	1200-R n=14
Hematocrit (%)	43.29 ± 12.15	46.61 ± 2.10	44.90 ± 1.94	39.96 ± 16.30	42.28 ± 11.89	43.04 ± 11.99
Hemoglobin (g/dl)	14.25 ± 3.99	15.32 ± 0.62	14.86 ± 0.57	13.19 ± 5.38	13.96 ± 3.92	14.16 ± 3.96
RBC (x10 ⁶ cells/ μ L)	7.43 ± 2.07	7.99 ± 0.48	7.94 ± 0.46	6.90 ± 2.82	7.23 ± 2.04	7.40 ± 2.07
MCV (fl/red cell)	54.34 ± 15.16	58.44 ± 2.43	56.65 ± 1.37	50.28 ± 20.52	54.64 ± 15.26	54.30 ± 15.09
MCH (pg/red cell)	17.92 ± 5.00	19.22 ± 0.79	18.76 ± 0.58	16.61 ± 6.78	18.05 ± 5.03	17.86 ± 4.97
MCHC (g/dl REC)	30.76 ± 8.53	32.89 ± 0.42	33.11 ± 0.45	28.63 ± 11.63	30.85 ± 8.54	30.70 ± 8.50
WBC (K/ μ L)	1.75 ± 1.02	2.16 ± 0.75	1.96 ± 0.77	2.10 ± 1.23	2.91 ± 2.16	1.83 ± 0.67
Neutrophil (%)	18.05 ± 10.39	18.49 ± 10.03	17.57 ± 4.94	16.20 ± 10.58	19.16 ± 16.24	15.36 ± 5.66
Eosinophil (%)	1.55 ± 0.87	1.59 ± 0.67	1.28 ± 0.45	1.21 ± 0.75	0.90 ± 0.56	1.25 ± 0.70
Lymphocyte (%)	68.63 ± 21.73	73.38 ± 12.37	76.13 ± 6.83	65.65 ± 27.90	69.27 ± 24.97	70.96 ± 20.33
Monocyte (%)	3.97 ± 2.27	5.10 ± 2.51	3.83 ± 2.19	2.73 ± 1.78	3.11 ± 1.58	4.36 ± 2.37
Basophil (%)	1.13 ± 0.88	1.45 ± 0.87	1.19 ± 0.69	0.89 ± 0.58	0.90 ± 0.59	1.40 ± 0.66
Platelet (K/ μ L)	794.23 ± 246.66	943.20 ± 89.09	968.70 ± 132.12	786.10 ± 327.97	861.17 ± 252.81	827.33 ± 260.86

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

#เจาะเลือดไม่ได้ 1 ตัว

ตารางที่ 7 ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับผงบัวบกเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	กลุ่มหนูที่ได้รับผงบัวบก (มก./กก./วัน)					
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	600 n=13	1200 n=14	1200-R n=14
AST (U/L)	80.20 ± 13.09	77.53 ± 9.2	74.40 ± 12.52	77.40 ± 11.70	78.35 ± 7.97	75.86 ± 7.66
ALT (U/L)	34.40 ± 8.34	32.67 ± 4.29	28.67 ± 5.00	33.27 ± 5.26	31.07 ± 4.57	34.50 ± 4.03
ALP (U/L)	53.60 ± 7.74	52.87 ± 10.71	52.27 ± 9.67	55.53 ± 11.66	53.93 ± 9.36	53.78 ± 8.63
Total protein (g/dl)	6.65 ± 0.20	6.61 ± 0.24	6.50 ± 0.21	6.53 ± 0.21	6.67 ± 0.25	6.81 ± 0.30
Albumin (g/dl)	4.29 ± 0.11	4.30 ± 0.10	4.34 ± 0.11	4.31 ± 0.11	4.41 ± 0.15	4.37 ± 0.16
Globulin (g/dl)	2.36 ± 0.22	2.32 ± 0.21	2.16 ± 0.18	2.21 ± 0.18	2.26 ± 0.16	2.43 ± 0.20
Bilirubin (mg/dl)	0.043 ± 0.023	0.047 ± 0.020	0.047 ± 0.025	0.045 ± 0.026	0.048 ± 0.021	0.057 ± 0.029
BUN (mg/dl)	18.64 ± 2.20	18.42 ± 2.67	17.75 ± 2.05	17.11 ± 2.21	17.68 ± 1.59	19.31 ± 2.28
Creatinine (mg/dl)	0.73 ± 0.05	0.73 ± 0.06	0.71 ± 0.06	0.69 ± 0.04	0.70 ± 0.06	0.73 ± 0.04
Glucose (mg/dl)	195.75 ± 49.63	185.54 ± 40.21	174.33 ± 34.30	172.64 ± 22.33	183.70 ± 23.07	185.54 ± 40.21
Uric acid (g/dl)	2.04 ± 1.78	1.81 ± 1.13	1.96 ± 1.46	1.49 ± 0.53	1.56 ± 0.76	1.96 ± 1.12
Triglyceride (mg/dl)	142.84 ± 31.654	143.24 ± 50.03	129.44 ± 27.25	113.78 ± 24.80	128.37 ± 22.55	130.18 ± 45.79
Cholesterol (mg/dl)	79.98 ± 11.69	74.96 ± 11.20	68.56 ± 10.04	66.58 ± 13.25	69.83 ± 13.19	72.91 ± 18.01
Sodium (mmol/l)	146.33 ± 1.54	146.87 ± 1.13	147.07 ± 1.10	147.80 ± 1.32*	148.29 ± 1.14*	148.14 ± 1.29*
Potassium (mmol/l)	5.56 ± 0.97	5.27 ± 0.85	5.31 ± 1.03	4.95 ± 0.68	4.86 ± 0.68	5.08 ± 0.77
Chloride (mmol/l)	108.93 ± 1.58	109.33 ± 0.98	110.00 ± 1.13	110.67 ± 1.50*	110.50 ± 1.02*	111.07 ± 1.33*

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 8 ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูแรพเพศเมียที่ได้รับผงบัวบกเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	กลุ่มหนูที่ได้รับผงบัวบก (มก./กก./วัน)					
	0 n=14#	20 n=15	200 n=15	600 n=13	1200 n=14	1200-R n=14
AST (U/L)	79.85 ± 13.20	71.80 ± 16.33	76.87 ± 13.62	75.38 ± 10.97	80.43 ± 18.35	78.50 ± 12.51
ALT (U/L)	29.79 ± 10.52	24.87 ± 6.47	27.07 ± 7.95	26.85 ± 5.93.48	30.21 ± 11.00	27.21 ± 7.96
ALP (U/L)	21.07 ± 4.65	19.87 ± 3.79	20.67 ± 5.73	20.38 ± 6.23	22.36 ± 5.60	20.79 ± 4.98
Total protein (g/dl)	6.60 ± 0.30	6.93 ± 0.30	6.83 ± 0.30	6.75 ± 0.25	6.87 ± 0.55	6.97 ± 0.33
Albumin (g/dl)	4.90 ± 0.22	4.92 ± 0.24	4.94 ± 0.19	4.38 ± 0.24	4.99 ± 0.64	4.99 ± 0.32
Globulin (g/dl)	1.90 ± 0.20	2.02 ± 0.15	1.89 ± 0.18	1.86 ± 0.20	1.94 ± 0.12	1.97 ± 0.08
Bilirubin (mg/dl)	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.05	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.08 ± 0.03
BUN (mg/dl)	18.48 ± 2.62	19.27 ± 2.09	20.60 ± 4.03	20.03 ± 2.11	21.59 ± 3.95	18.86 ± 2.35
Creatinine (mg/dl)	0.75 ± 0.04	0.75 ± 0.07	0.79 ± 10.09	0.77 ± 0.05	0.79 ± 0.09	0.75 ± 0.05
Glucose (mg/dl)	142.24 ± 23.46	146.22 ± 16.57	134.82 ± 13.69	135.29 ± 20.28	144.93 ± 24.22	144.23 ± 19.44
Uric acid (g/dl)	0.93 ± 0.57	1.29 ± 1.04	0.88 ± 0.39	0.75 ± 0.32	0.92 ± 0.39	0.81 ± 0.27
Triglyceride (mg/dl)	58.50 ± 29.04	64.39 ± 23.51	48.93 ± 13.00	47.57 ± 13.62	61.24 ± 25.49	75.92 ± 50.06
Cholesterol (mg/dl)	60.53 ± 14.89	70.11 ± 15.66	54.81 ± 11.56	57.65 ± 12.61	64.92 ± 13.45	60.83 ± 16.95
Sodium (mmo/l)	145.57 ± 1.65	145.73 ± 1.52	146.53 ± 1.13	146.85 ± 1.46	147.36 ± 1.50*	147.07 ± 0.73
Potassium (mmol/l)	4.74 ± 0.60	5.02 ± 1.19	4.41 ± 0.67	4.40 ± 0.50	4.36 ± 0.67	4.10 ± 0.60
Chloride (mmol/l)	111.71 ± 1.94	111.20 ± 1.52	112.13 ± 1.64	112.46 ± 1.33	111.93 ± 1.33	112.29 ± 0.83

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

#เจาะเลือดได้ 1 ตัวตามต้นฉบับ

ตารางที่ 9 ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแรพเพศเมียที่ได้รับผงบัวบก เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	ขนาดผงบัวบก (มก./กก./วัน)					
		0 n=15	20 n=15	200 n=15	600 n=15	1200 n=14	1200-R n=14
ปอด	Lymphoid proliferated peribronchioles	13/15	11/15	7/15*	11/15	7/14*	11/14
หัวใจ	Focal myocardiosis(±1)	0/15	0/15	2/15	4/15	2/14	0/14
ตับ	Hepstocyte fatty degeneration	5/15	9/15	10/15	8/15	8/14	6/14
	Protein cast deposited in sinusoids(±1)	0/15	0/15	0/15	6/15*	7/14*	0/14
กระเพาะอาหาร	Submucosal edema with PMN	0/15	0/15	1/15	0/15	0/14	0/14
	Infiltration						
ลำไส้เล็ก	Lymphoid aggregated in submucosa	1/15	2/15	2/15	1/15	1/14	5/14
ลำไส้ใหญ่		4/15	5/15	2/15	3/15	1/14	1/14
อวัยวะ	No remarkable lesion						
ต่อมหมวกไต	Cortical fatty degeneration(±1)	1/15	3/15	8/15*	5/15*	12/14*	4/14

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของ จำนวนหนูที่ตรวจพบพยาธิสภาพ / จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

±1 หมายถึง การเปลี่ยนแปลงพบเพียงเล็กน้อย (mild degree)

ตารางที่ 10 ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับผงบัวบก เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	ขนาดผงบัวบก (มก./กก./วัน)					
		0 n=15	20 n=15	200 n=15	600 n=13	1200 n=14	1200-R n=14
ปอด	Lymphoid proliferated peribronchioles	8/15	9/15	3/15	8/13	7/14	3/14
หัวใจ	Focal myocardiosis(±1)	0/15	0/15	0/15	0/13	1/14	0/14
ตับ	Hepstocyte fatty degeneration	0/15	0/15	2/15	0/13	2/14	0/14
	Protein cast deposited in sinusoids(±1)						
กระเพาะอาหาร	Submucosal edema with PMN	0/15	0/15	0/15	1/13	0/14	0/14
	Infiltration	0/15	0/15	1/15	1/13	0/14	0/14
ลำไส้เล็ก	Lymphoid aggregated in submucosa	2/15	2/15	1/15	1/13	0/14	0/14
ลำไส้ใหญ่		5/15	3/15	0/15	5/13	3/14	3/14

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของ จำนวนหนูที่ตรวจพบพยาธิสภาพ / จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

±1 หมายถึง การเปลี่ยนแปลงพบเพียงเล็กน้อย (mild degree)

เอกสารอ้างอิง

1. สีน้า ผู้พัฒนาพงศ์ ก่องกานดา ชยามฤต และ อีรวัดน์ บุญทวีคุณ (บรรณาธิการ) ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544) ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ กรมป่าไม้ บริษัทประชาชน จำกัด กรุงเทพฯ 2544. หน้า 118.
2. Hedge IC, Lamond JM. Umbelliferae. Flora of Thailand ;1992;5 (4): 442-448.
3. Buwalda P. Umbelliferae. Flora Malesiana; 1949; 4(2): 116-117.
4. Krahulik JL, Theobald WL. Umbelliferae. A Revised Handbook to the Flora of Ceylon. Vol.3. AA. Balkema, Rotterdam, 1981; p.483-485.
5. Townsend CC. Umbelliferae. Flora of Tropical East Africa. AA Balkema.1989; p.15-17.
6. สมาคมโรงเรียนแผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคสอง) ว่าด้วยพฤกษชาติ วัตถุประสงค์และสัตววัตถุ
7. Panthong A, Kanjanapothi D, Taylor WC. Ethnobotanical review of medicinal plants from Thai traditional books. Part I : Plants with anti-inflammatory, anti-asthmatic and antihypertensive properties. J of Ethnopharmacol 1986; (18): 213-228.
8. National Institute of Ayurvedic Medicine. Medicinal Plants. Available from <http://www.niam.com/corp-web/mediplnt.htm>.
9. National Institute of Ayurvedic Medicine. Centella asiatica. Available from: <http://www.niam.com/corp-web/centella.htm>.
10. Pramongkit K. Active constituents of *Centella asiatica*. (L) Urban in Thailand [Thesis]. Mahidol University; 1995.
11. WHO. Herbacentellae. In :WHO monographs on selected medicinal plants Vol 1.1999; p.77-85.

12. Matsuda H, Morikawa T, Ueda H, Yoshikawa M. Saponin constituents of Gotu Kola (2): Structures of new ursane and oleanane type triterpene oligoglycosides: centella saponins B, C, and D from *Centella asiatica* cultivated in Srilanka. Chem Pharm Bull 2001; 49: 1368-1371.
13. Wong KC and Tan GL. Essential oil of *Centella asiatica* (L.) Urb. J Essent Oil Res 1994; 6: 307-309.
14. Bonie F, Dumas M, Chaudagne C, Meybeck A. Influence of asiatic acid, madecassic acid and asiaticoside on human collagen synthesis. Planta Med 1994; 60 133-135.
15. Leaudnakrob N. Antihypertensive effect of compounds from *Centella asiatica* (L.) Urban. In experimentally induced hypertensive rats. [Thesis]. Khon Khaen University; 1999.
16. Sarma DNK, Khosa RL, Chansauria DPN, Sahai M. Antistress activity of *Tinospora cordifolia* and *Centella asiatica* extracts. Phytother Res 1996; 10: 181-183.
17. Sakina MR, Dandiya PC. A psychoneuropharmacological profile of *Centella asiatica* extract. Filotherapy 1990; 61(4): 291-296.
18. Sarma DNK, Khosa RL, Chansauria JPN, Sahai M. Antiulcer activity of *Tinospora cordifolia* Miers and *Centella asiatica* Linn. Extracts. Phytother Res 1995; 9 :589-590.
19. Murakami A, Jiuajinda S, Koshimiza K, Ohigashi H. Screening for in vitro antitumour promoting activities of edible plants from Thailand. Cancer Letters 1995; 95 : 139-149.
20. Belcaro GV, Grimaldi R, Guidi G. Improvement of capillary permeability in patients with venous hypertension after treatment with TTFCA. J of Vascular Diseases 1990; 533-540
21. มงคล โมกษะสมิต กมล สวัสดิ์มงคล ประยูทธ สาตราวาทะ การศึกษาพิษของสมุนไพรไทย. วกรรมวิทย พ 2513 ; 13(1) : 36-66.
22. Padmaja R, Arun PC, Prashanth D, Deepak M, Amit A; Anjana M. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. Fitotherapy 2002; 73 : 508-510.
23. laemworapong C. Effect of a food preservative nitrite on mutagenicity of Thai medicinal plants using the Ames test [Thesis]. Mahidol University, 1990.
24. Coldecott T. Mandukaparni, 'frog-leaved'. Available from: <http://www.wrc.net/phyto/Mandukarpami.html>, 2004.
25. Gad SC. The Rat: Pathology. In: Gad SC and Chengelis CP, ed. Animal Model in Toxicology. New York: Marcel Dekker, 1992; p.78-81,95.
26. Crouse LV, Reiley JS. *Centella asiatica* (Gota kola)- Natural Medical Protocols for Doctors. Available from : www.naturalopinion.com/nmp/nm.p4/Centell.htm, 2004.

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน และพิษเรื้อรังของผงกระชายดำ Acute and Chronic Toxicity Study of *Kaempferia Parviflora* Wall ex. Bak Powder

ทรงพล ชิวะพัฒน์¹
Songpol Chivat
ปราณี ชาวลิตธำรง¹
Pranee Chavalittumrog
ทรงพล ผดุงพัฒน์¹
Songphol Phadungpat
กัมมกาล กุมาร ปาปา²
Kammal Kumar Pama

ณัฐตรา จันทร์สุวานิชย์¹
Nuchattra Chansuvanich
เอมมนัส อัดตวิษณุ¹
Aimmanas Attawish
สมเกียรติ ปัญญามัง¹
Somkiat Punyamong

บทคัดย่อ

กระชายดำ *Kaempferia parviflora* Wall ex Bak. เป็นพืชสมุนไพรที่กำลังได้รับความนิยมจากประชาชนอย่างกว้างขวางในการบริโภคเพื่อเสริมสุขภาพ แต่ปัจจุบันยังขาดข้อมูลทางพิษวิทยาจากการศึกษาเฉียบพลันโดยกรอกผงกระชายดำทางปากแก่หนูถีบจักร พบว่า ขนาดของผงกระชายดำที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง(LD50) มีค่ามากกว่า 13.33 กรัม/กิโลกรัมและไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่ผิดปกติใดๆของอวัยวะภายใน ส่วนการศึกษาพิษเรื้อรังระยะเวลา 6 เดือน ในหนูแรพพันธุ์วีสตาร์ 6 กลุ่มๆละ 30 ตัว ประกอบด้วยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมด้วยน้ำ กลุ่ม 2 ถึง 5 เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับผงกระชายดำทางปากในขนาด 20, 200, 1000 และ 2000 มก./กก./วัน และกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มศึกษา Recovery ที่ขนาด 2000 มก./กก./วัน แล้วหยุดยา 2 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า หนูที่ได้รับกระชายดำทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อาการและสุขภาพไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม หนูที่ได้รับกระชายดำขนาด 2000 มก./กก. มีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อาจเนื่องมาจากมีน้ำหนักตัวที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม มีเม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิลต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ ในหนูเพศเมีย ที่ได้รับกระชายดำขนาด 2000 มก./กก. มีระดับโคเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หนูทั้งสองเพศที่ได้รับกระชายดำ 2000 มก./กก. มีระดับซีรั่มโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยานั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่บ่งชี้ว่าเกิดจากความ เป็นพิษของกระชายดำ

1 สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
2 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ABSTRACT

Kaempferia parviflora Wall ex Bak. (KP) is now being popular for health promotion. Up to the present time, toxicological information of this herb has been poorly know. Oral acute toxicity study revealed that LD₅₀ value of KP powder was more than 13.33 g/kg in mice and at this dose, no abnormal histopathological changes were found in various visceral organs. Chronic toxicity study has been performed in six groups of Wistar rats. Group 1 was a water control group and group 2 to 5 were orally given KP at the doses of 20, 200, 1,000 and 2,000 mg/kg/day respectively. Group 6 was a high recovery group which received 2000 mg/kg of KP and then KP was withdrawn for 2 weeks. The result revealed that all KP-treated groups has no difference of body weight and health when compared with their control group. Rats receiving 2000 mg/kg KP had some changes ; i.e., higher relative weight of liver (p<0.05) which might be due to lower body weight, less eosinophil (p<0.05), higher serum sodium levels than their control groups (p<0.05) but these were still within normal range. In addition female rats receiving the highest dose had higher cholesterol level than the control group (p<0.05). Histopathological examination of visceral organs did not show any abnormality due to KP toxicity.

บทนำ

กระชายดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* Wall ex. Bak อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae (12,3) มีการกระจายพันธุ์ในประเทศอินเดียและพม่า ในประเทศไทยพบได้ที่จังหวัดตากและกาญจนบุรี (2) ต่อมาได้มีการนำมาปลูกอย่างแพร่หลายในหลายจังหวัด ได้แก่ มหาสารคาม อุดรธานี เพชรบูรณ์ และเลย เป็นต้น สมุนไพรกระชายดำได้ถูกนำมารับประทานในรูปแบบต่างๆ เช่น ยาต้ม โดยใช้เหง้าชาวผสมน้ำผึ้ง การต้มดื่มแทนน้ำชาหรือผสมน้ำผึ้ง และยา ลูกกลอนสำหรับบำรุงกำหนด ผิวหนัง ทำให้หน้าตาแจ่มใส กระชุนกระชาย เป็นต้น (4)

จากการศึกษาทางเคมีพบว่า หัวกระชายดำ มีน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) (5) และสารกลุ่ม flavonoids หลายชนิด เช่น 5 - hydroxyl - 7 - methoxyflavonone , 5 , 7 - dimethoxyflavonone , 5 , 7-dimethoxyflavone และ 3, 5, 7-trimethoxyflavone เป็นต้น (6) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบสารกลุ่ม chalcones อีกด้วย (7) ในด้านการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารที่แยกได้จากกระชายดำ

นั้น พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลของกระชายดำ มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด aorta ลดการหดเกร็งของลำไส้ส่วน Ileum ของหนูแรทวิสตา และสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือดคนได้ด้วย (8) ส่วนสารกลุ่ม flavonoids ที่แยกได้จากกระชายดำมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* เชื้อมาลาเรียและ mycobacterium (9)

ปัจจุบันมีการแปรรูปผลิตภัณฑ์กระชายดำออกจำหน่ายในท้องตลาดเพื่อให้สะดวกในการรับประทานเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เช่น ชาชง ไวน์กระชายดำ และ แคปซูลผงกระชายดำ เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังไม่มียารายงานข้อมูลด้านความปลอดภัยของสมุนไพรกระชายดำ ดังนั้นกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์โดยความสนับสนุนของกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก จึงได้ดำเนินการศึกษาพิษของสมุนไพรกระชายดำในสัตว์ทดลองทั้งในระยะเฉียบพลันและเรื้อรัง เพื่อให้ได้ข้อมูลทางพิษวิทยาเพื่อเป็นแนวทางสนับสนุนการใช้สมุนไพรกระชายดำและช่วยคุ้มครอง ผู้บริโภคอีกทางหนึ่ง

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างกระชายดำ

สำรวจและรวบรวมวัตถุดิบสมุนไพรกระชายดำในพื้นที่จังหวัดเลย ให้เพียงพอตลอดการทดลองพิษเรื้อรัง ตรวจสอบชนิดพืชอย่างถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธานพืช พบว่า คือ *Kaempferia parviflora* พร้อมจัดทำตัวอย่างพืชแห้งเก็บรักษาไว้ในที่ปิดกั้นที่พิษกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการเตรียมสมุนไพรกระชายดำเพื่อการศึกษาพิษวิทยานั้นได้นำกระชายดำมาผึ่งให้แห้ง (air - dry) บดเป็นผง ผ่านตะแกรงเบอร์ 100 เพื่อให้ละเอียดสำหรับใช้เตรียมยาให้สัตว์ทดลอง

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

1. เตรียมผงกระชายดำแขวนตะกอนในน้ำสำหรับสัตว์ทดลองโดย นำผงกระชายดำมาแขวนตะกอนในน้ำรับให้มีความเข้มข้น 1:3 แก่หนูถีบจักร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถป้อนให้หนูทดลองได้ในปริมาณที่กำหนดตามหลักการทดสอบพิษ
2. จัดเตรียมหนูถีบจักรพันธุ์ ICR และอุปกรณ์ห้องสัตว์ทดลองที่จำเป็น
3. แบ่งหนูถีบจักรโดยวิธีสุ่มออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว (เพศละ 5 ตัว) ประกอบด้วยกลุ่มควบคุมกรอกน้ำกลั่นปริมาณ 20 มล./กก. เช้าและบ่ายใน 1 วัน ส่วนกลุ่มทดลองกรอกน้ำยาแขวนตะกอนผงกระชายดำความเข้มข้น 1:3 ในปริมาณ 20 มล./กก. เช้าและบ่ายใน 1 วัน ซึ่งเท่ากับ 13.33ก./กก.
4. สังเกตอาการเปลี่ยนแปลงทุกวันและบันทึกจำนวนหนูตายจนครบ 14 วัน
- 5.ผ่าซากชันสูตรตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า
- 6.เตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา
- 7.ตรวจสอบหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่ออวัยวะ ได้แก่ ตับ ไต หัวใจ ปอด กระเพาะอาหาร ตับอ่อน ลำไส้ มดลูก อังทะและรังไข่

การศึกษาพิษเรื้อรัง

1. สัตว์ทดลอง

หนูแรทพันธุ์วิสตาต้า จำนวน 180 ตัว (เพศละ 90 ตัว) ซึ่งจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติศานาณานำมาเลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อมให้มีอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท เจริญโภคภัณฑ์ จำกัด และน้ำประปาไม่จำกัดปริมาณ

2. การทดสอบพิษเรื้อรัง

แบ่งหนูโดยวิธีสุ่มออกเป็น 6 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูเพศผู้ 15 ตัว และ เพศเมีย 15 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมกรอกน้ำกลั่นปริมาณ 10 มล./กก./วัน กลุ่มที่ 2 ถึง 5 เป็นกลุ่มทดลอง กรอกผงกระชายดำแขวนตะกอนในน้ำที่ขนาด 20, 200, 1000 และ 2000 มก./กก./วัน ตามลำดับ หรือคิดเป็น 1, 10, 50 และ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน จนครบ 6 เดือน ส่วนกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่ม recovery (2000-R) ที่ได้รับผงกระชายดำขนาด 2000 มก./กก./วัน จนครบ 6 เดือนเช่นกัน แล้วหยุดยาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อตรวจดูว่าการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติที่เกิดขึ้นจะกลับสู่ปกติหรือไม่ ระหว่างการทดลองสังเกตอาการเปลี่ยนแปลงของหนูทุกวัน บันทึกน้ำหนักตัวและอาหารที่กินสัปดาห์ละ 1 ครั้ง หากมีหนูตายระหว่างทดลอง จะนำมาผ่าซากชันสูตรทันที

เมื่อครบกำหนด 6 เดือนจะเลือกเพื่อตรวจค่าทางโลหิตวิทยา โดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ รุ่น Cell Dyn 3500 ของ Abbot® และแยกซีรัมเพื่อตรวจค่าพารามิเตอร์ทางเคมีคลินิกโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi® รุ่น 912 จากนั้นผ่าซากชันสูตรตรวจหาวิธีการที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (gross lesions) ของอวัยวะภายใน ซึ่งน้ำหนักอวัยวะที่สามารถชั่งได้แล้วคำนวณค่าน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์เก็บอวัยวะลงในน้ำยา 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน นำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์ทางจุลพยาธิวิทยาเพื่อตรวจหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยา

ข้อมูลค่าสังเกตที่ได้จากการทดลองวิเคราะห์ด้วยสถิติ one-way ANOVA โดยโปรแกรม SPSS/PC version 9.0 ส่วนอัตราการเกิดพยาธิสภาพใช้ Fisher exact ที่ระดับ $p < 0.05$

รายละเอียดการดำเนินการวิจัย

1. เตรียมสมุนไพรรักษาตา ให้เพียงพอตลอดการทดลองและตรวจชนิดให้ถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธานพืช
2. กรอกผงกระชายดำทางปากแก่หนูแรทเป็นเวลา 6 เดือน
3. ชั่งน้ำหนักตัวและอาหารที่กินสัปดาห์ละ 1 ครั้ง
4. เจาะเลือดเพื่อตรวจทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิก
- 5.ผ่าซากชันสูตรตรวจอวัยวะภายใน
6. เตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์
7. ตรวจจลสไลด์เนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา
8. วิเคราะห์ผลการทดลอง
9. สรุปและรายงานผล

ผลการวิจัย

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

เมื่อกรอกผงกระชายดำทางปากในขนาดสูงสุดที่สามารถกรอกให้แก่หนูถีบจักรภายใน 24 ชม. คือ 13.3 ก./กก. พบว่า หนูไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ เมื่อครบกำหนด 14 วันไม่มีหนูตาย ดังนั้นขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) ควรมีความมากกว่า 13.3 ก./กก. จากการผ่าซากชันสูตรไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (gross lesions) ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับผงกระชายดำและกลุ่มควบคุมมีอุบัติการณ์ของเซลล์ตีบเสื่อม (hydropic degeneration) อย่างไม่แตกต่างกัน ส่วนอวัยวะอื่นๆ นั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใดๆ จึงกล่าวได้ว่า ผงกระชายดำในขนาดที่ให้ไม่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันต่อหนูถีบจักร

การศึกษาพิษเรื้อรัง

ผลต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักอาหารที่กิน อารมณ์สุขภาพ และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์

หนูเพศผู้ที่ได้รับกระชายดำขนาด 2000 มก./กก. มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 22 ถึง 25 ของการทดลอง แต่ในสัปดาห์สุดท้ายพบว่า หนูกลุ่มนี้มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1) และเมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว (body weight gain) พบว่า ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับกระชายดำทุกขนาดมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลองไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1 และตารางที่ 2) หนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับกระชายดำ 2000 มก./กก. กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 16 และ 22 เป็นต้นไป จนถึงสุดการทดลอง (ภาพที่ 2) อย่างไรก็ตามหนูทุกกลุ่มมีอาการ พฤติกรรม และสุขภาพทั่วไปเป็นปกติไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม หนูกลุ่มที่ได้รับกระชายดำทุกขนาดมีน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับกระชายดำขนาด 2000 มก./กก. มีน้ำหนักสัมพันธ์ของตับมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1 และ 2)

ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา

หนูกลุ่มที่ได้รับกระชายดำทุกขนาดมีค่าทางโลหิตวิทยาเกือบทั้งหมดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นหนูที่ได้รับกระชายดำขนาดสูงมีเปอร์เซ็นต์ฮีโมโกลินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและหนูเพศเมียที่ได้รับกระชายดำ 1000 มก./กก. มีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3 และ 4)

ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของเซรัม

หนูเพศเมียที่ได้รับผงกระชายดำขนาด 2000 มก./กก. มีระดับโคเลสเตอรอลสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และหนูทั้งสองเพศที่ได้รับกระชายดำขนาด 2000 มก./กก. มีระดับโซเดียม

สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5 และ 6)

ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา

หนูทั้งสองเพศที่ได้รับผงกระชายดำขนาดตั้งแต่ 200 มก./กก. ขึ้นไป มีอุบัติการณ์ของการพบหอย่อม lymphoid cell ที่แทรกอยู่รอบหลอดลมขนาดเล็กลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หนูเพศผู้ที่ได้รับกระชายดำ 20, 200 และ 2000 มก./กก. มีการรวมกลุ่มของ lymphoid cells ที่ลำไส้เล็กลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หนูเพศผู้ที่ได้รับกระชายดำขนาด 1000 มก./กก. มีอุบัติการณ์ของหอย่อมกล้ามเนื้อหัวใจเสื่อมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หนูเพศผู้ที่ได้รับกระชายดำขนาด 20, 1000 และ 2000 มก./กก. มีอุบัติการณ์ของ cortical fatty degeneration ในต่อมหมวกไตต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 7 และ 8)

วิจารณ์

การศึกษาพิษเฉียบพลันโดยกรอกผงกระชายดำให้แก่หนูถีบจักรทางปากในขนาด 13.3 ก./กก. ซึ่งเป็นขนาดสูงสุดที่สามารถให้ได้ไม่ทำให้เกิดอาการพิษใดๆ และหนูไม่ตาย จากผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูไม่พบความผิดปกติใดๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ดังนั้น ขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) ควรมีค่ามากกว่า 13.3 ก./กก. และอาจกล่าวได้ว่าไม่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันต่อหนูถีบจักร

การศึกษาพิษเรื้อรังของผงกระชายดำในหนูแรทพันธุ์วิสตาร์ เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่า หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับผงกระชายดำขนาดสูง 2000 มก./กก. หรือ 100 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมในเดือนที่ 6 (สัปดาห์ที่ 22 ถึง 25) อาจเกิดจากหนูกลุ่มนี้กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามพบว่ากระชายดำขนาดสูงนี้ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว (body weight gain) หนูที่ได้รับกระชายดำขนาดสูง 2000 มก./กก. กินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนหนึ่งอาจเกิดจาก

การได้รับผงยาปริมาณที่สูงมากในกระเพาะอาหาร หนูที่ได้รับกระชายดำขนาด 2000 มก./กก. มีน้ำหนักสัมพัทธ์ตัวสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่สัมพันธ์กับผลทางจุลพยาธิวิทยาที่พบ อาจเกิดจากหนูกลุ่มนี้มีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ทำให้คำนวณได้ค่าที่สูงขึ้น ค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดขาวในหนูเพศเมียมีแนวโน้มสูงขึ้นตามขนาดกระชายดำที่ได้รับและสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ขนาด 1000 มก./กก. นอกจากนี้จำนวนเม็ดเลือดขาวในหนูเพศผู้ที่ได้รับกระชายดำทุกกลุ่มก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแม้ว่าจะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า กระชายดำทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น หนูที่ได้รับกระชายดำขนาด 2000 มก./กก. มีอิโอสีโนฟิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญนั้นจัดเป็นการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยและคงอยู่ในช่วงค่าปกติ^(10,11) ระดับโคเลสเตอรอลที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศเมียที่ได้รับกระชายดำเนื่องจากมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามขนาดของกระชายดำที่ได้รับแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในหนูเพศผู้ซึ่งอาจเป็นการตอบสนองที่แตกต่างเนื่องจากเพศ (gender-related difference) ระดับโซเดียมที่เพิ่มขึ้นในหนูทั้งสองเพศที่ได้รับกระชายดำขนาด 2000 มก./กก. จัดว่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ⁽¹¹⁾

หนูทั้งสองเพศที่ได้รับกระชายดำขนาด 200 มก./กก. ขึ้นไปมีอุบัติการณ์การแทรกของ lymphoid cells รอบหลอดลมขนาดเล็กที่ปอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญแสดงให้เห็นว่า กระชายดำอาจมีสารบางอย่างที่แสดงฤทธิ์ต้านอักเสบได้ เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า กระชาย (*Kaempferia pandurata*) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์และสกุลเดียวกับกระชายดำมีสารบางตัวที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบได้ดี⁽¹²⁾ ในกระชายดำเองมีสารบางกลุ่ม flavonoids ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพบางอย่างได้ เช่น เชื้อรา แบคทีเรียพวก mycobacterium และมาลาเรีย⁽⁹⁾ นอกจากนี้สารสกัดจากว่านหาวนอน (*Kaempferia rotunda*) ซึ่งเป็นพืชอยู่ในสกุลเดียวกับกระชายดำก็มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella pneumoniae* และแบคทีเรียแกรมลบบางตัวได้ดี⁽¹³⁾ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่ากระชายดำอาจมี

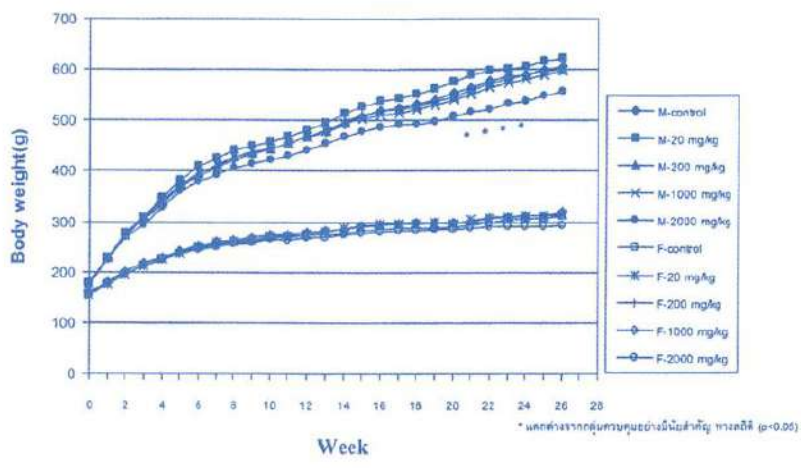
สารที่ช่วยลดภาวะอักเสบและการติดเชื้อที่ปอดได้ ในทำนองเดียวกันกับอุบัติการณ์ของการพบ lymphoid cells ในลำไส้ที่ลดลงในกลุ่มที่ได้รับกระชายดำ หยอด การเสื่อมของกล้ามเนื้อหัวใจที่พบว่าอุบัติการณ์สูงขึ้นในหนูเพศผู้ที่ได้รับกระชายดำ 1000 มก./กก. ไม่ได้มีอุบัติการณ์และความรุนแรง ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับกระชายดำขนาดสูงกว่า อีกทั้งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศเมียที่ได้รับกระชายดำขนาดเท่ากันและสูงกว่า และนอกจากนี้มียารักษาวัณโรคนี้พบได้บ่อย ในหนูที่มีอายุมาก⁽¹¹⁾ ดังนั้นจึงไม่อาจสรุปว่าเกิดจากกระชายดำ หนูเพศผู้ที่ได้รับกระชายดำขนาด 20, 1000 และ 2000 มก./กก. มีอุบัติการณ์ของการสะสมของไขมันที่ต่อมหมวกไตส่วนนอกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อาจมีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์และหลั่งฮอร์โมน corticosteroids เช่น cortisol, corticosterone เพิ่มขึ้นก็ได้ เนื่องจากฮอร์โมนนี้มีผลต่อหลายระบบของร่างกาย โดยเกี่ยวข้องกับเมตาโบลิซึม สมดุลของอิเล็กโทรไลต์ และน้ำในร่างกาย การทำงานของระบบหัวใจและหลอดเลือด ไต กล้ามเนื้อลาย ระบบประสาท ทำให้ร่างกายสามารถต้านสิ่งกระตุ้นและการเปลี่ยนแปลงต่อสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้ยังมีบทบาทต่อการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนต่างๆ (permissive effects)⁽¹⁴⁾ ซึ่งสอดคล้องกับสรรพคุณในการบำรุงร่างกายของสมุนไพรกระชายดำ ดังนั้นควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ผลทางเภสัชวิทยาของกระชายดำต่อการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมหมวกไตต่อไป การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอย่างอื่นที่พบไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างสัมพันธ์กับขนาดของกระชายดำ ดังนั้นไม่อาจกล่าวว่าเป็นผลของกระชายดำ

สรุปและข้อเสนอแนะ

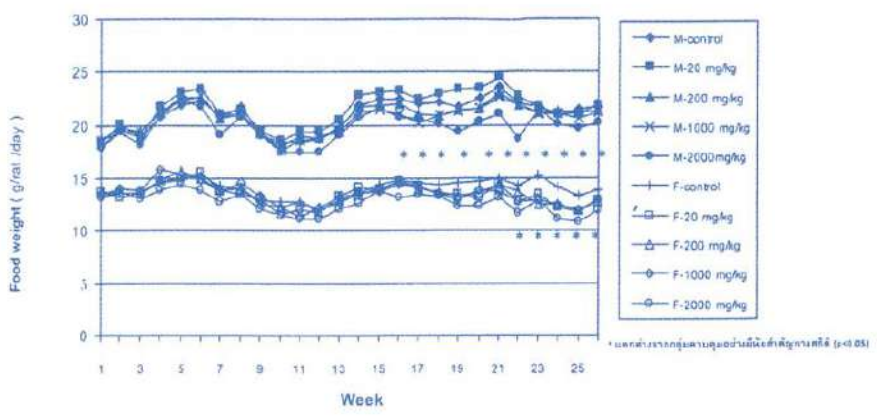
การศึกษาพิษเฉียบพลันโดยป้อนผงกระชายดำทางปากแก่หนูถีบจักรขนาดสูงสุดที่ได้ คือ 13.3 ก./กก. ไม่ก่อให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันใดๆ และหนูไม่ตาย ค่า LD₅₀ ของผงกระชายดำที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีค่ามากกว่า 13.3 ก./กก.

ผลการศึกษาพิษเรื้อรังโดยป้อนผงกระชายดำทางปากให้แก่หนูแรชวีสตาร์ขนาด 20, 200, 1000 และ 2000 มก./กก./วัน เป็นเวลา 6 เดือน แสดงให้เห็นว่า กระชายดำไม่ทำให้เกิดอาการพิษเรื้อรัง และไม่มีผลต่อสุขภาพและการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูหนูที่ได้รับกระชายดำมีค่าทางโลหิตวิทยาเกือบทั้งหมดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นหนูเพศเมียที่ได้รับกระชายดำขนาด 1000 มก./กก. มีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และหนูที่ได้รับกระชายดำขนาด 2000 มก./กก. มีเปอร์เซ็นต์อีโอสิโนฟิลต่ำกว่ากลุ่มควบคุมแต่คงอยู่ในช่วงค่าปกติ หนูที่ได้รับกระชายดำที่ขนาดสูง 2000 มก./กก. มีระดับโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบพยาธิสภาพใดๆ ที่สัมพันธ์กัน ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูที่ได้รับกระชายดำแสดงให้เห็นว่าสมุนไพรรกระชายดำไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพหรือความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ ที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติ

จากผลการทดลองดังกล่าวมีข้อเสนอแนะว่า การรับประทานสมุนไพรรกระชายดำเป็นเวลานานต่อเนื่อง ควรที่จะมีการตรวจเลือดเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือดขาว ระดับโคเลสเตอรอลและโซเดียมร่วมด้วย นอกจากนี้การศึกษาด้านมาตรฐานและควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบกระชายดำและผลิตภัณฑ์กระชายดำที่มีจำหน่ายในท้องตลาดเป็นสิ่งจำเป็นที่จะช่วยให้ประชาชนได้บริโภคสมุนไพรรกระชายดำได้อย่างมั่นใจในคุณภาพ ประสิทธิภาพและความปลอดภัย อีกทางหนึ่ง



ภาพที่ 1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับผงกระชายดำเป็นเวลา 6 เดือน



ภาพที่ 2 การกินอาหารของหนูเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับผงกระชายดำเป็นเวลา 6 เดือน

ตารางที่ 1 น้ำหนักตัว (กรัม) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (%) ของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับผงกระชายดำเป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	กลุ่มหนูที่ได้รับผงกระชายดำ (มก./กก./วัน)					
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	1000 n=15	2000 n=15	2000-R n=15
น้ำหนักตัวที่เริ่มต้น	178.87±5.97	178.33±8.74	177.43±9.40	177.63±9.44	173.50±8.58	176.45±6.91
น้ำหนักตัวสุดท้าย	606.55±45.14	444.93±46.46	601.37±35.93	98.39±59.60	557.37±36.60	558.39±61.68
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น	427.68±42.30	623.26±48.26	423.93±38.8	420.75±56.10	383.87±32.82	381.94±59.49
สมอง	0.36±0.02	0.36±0.02	0.36±0.03	0.37±0.03	0.38±0.02	0.38±0.04
หัวใจ	0.24±0.02	0.24±0.02	0.34±0.01	0.35±0.05	0.26±0.04	0.26±0.02
ปอด	0.27±0.02	0.33±0.03	0.27±0.02	0.28±0.02	0.29±0.02	0.28±0.02
กระเพาะอาหาร	0.34±0.04	0.29±0.04	0.24±0.02	0.25±0.02	0.36±0.03	0.36±0.03
ตับ	2.30±0.23	2.27±0.17	2.18±0.14	2.38±0.19	2.55±0.19*	2.28±0.17
ไตซ้าย	0.20±0.01	0.21±0.01	0.20±0.02	0.21±0.01	0.22±0.02	0.20±0.01
ไตขวา	0.21±0.02	0.22±0.02	0.21±0.02	0.22±0.02	0.23±0.02	0.21±0.02
ม้าม	0.16±0.01	0.16±0.02	0.15±0.02	0.17±0.02	0.17±0.02	0.17±0.02
กระเพาะปัสสาวะ	0.029±0.05	0.031±0.007	0.032±0.010	0.031±0.006	0.033±0.005	0.029±0.005
อวัยวะชาย	0.51±0.05	0.48±0.09	0.52±0.04	0.52±0.05	0.55±0.04	0.54±0.06
อวัยวะขวา	0.51±0.04	0.48±0.09	0.52±0.05	0.53±0.06	0.55±0.05	0.53±0.08
ต่อมหมวกไตซ้าย	0.0055±0.0007	0.0054±0.0009	0.0050±0.0008	0.0057±0.0009	0.0051±0.0008	0.0054±0.0005
ต่อมหมวกไตขวา	0.0047±0.0005	0.0049±0.0007	0.0046±0.0001	0.0051±0.0005	0.0052±0.0005	0.0049±0.0004

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน * แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 2 น้ำหนักตัว (กรัม) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (%) ของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับผงกระชายดำเป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ/น้ำหนักตัว	กลุ่มหนูที่ได้รับผงกระชายดำ (มก./กก./วัน)					
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	1000 n=15	2000 n=15	2000-R n=15
น้ำหนักตัวที่เริ่มต้น	155.50±10.63	154.17±85.37	154.77±9.45	157.67±6.77	153.76±8.73	153.84±7.89
น้ำหนักตัวสุดท้าย	311.43±27.18	313.73±205.60	319.437±26.04	319.30±34.49	294.57±22.63	301.61±28.44
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น	155.93±27.41	159.55±20.72	164.66±27.39	161.73±35.53	140.81±25.12	147.77±27.97
สมอง	0.66±0.06	0.55±0.04	0.64±0.04	0.62±0.07	0.69±0.06	0.66±0.06
หัวใจ	0.29±0.03	0.29±0.02	0.30±0.03	0.29±0.04	0.31±0.02	0.29±0.07
ปอด	0.41±0.05	0.41±0.09	0.37±0.03	0.39±0.04	0.41±0.03	0.40±0.05
กระเพาะอาหาร	0.46±0.04	0.47±0.04	0.47±0.04	0.49±0.07	0.57±0.07	0.52±0.06
ตับ	2.27±0.17	2.30±0.16	2.27±0.21	2.43±0.33	2.64±0.22*	2.38±0.27
ไตซ้าย	0.23±0.02	0.24±0.06	0.24±0.02	0.25±0.03	0.25±0.01	0.24±0.02
ไตขวา	0.25±0.03	0.24±0.02	0.25±0.02	0.25±0.03	0.26±0.02	0.25±0.03
ม้าม	0.21±0.03	0.22±0.03	0.19±0.03	0.21±0.03	0.22±0.04	0.20±0.03
กระเพาะปัสสาวะ	0.029±0.049	0.026±0.055	0.031±0.067	0.026±0.045	0.032±0.006	0.031±0.039
มดลูก	0.24±0.08	0.24±0.06	0.22±0.05	0.21±0.06	0.24±0.08	0.23±0.06
รังไข่ขวา	0.018±0.005	0.018±0.005	0.018±0.064	0.017±0.005	0.017±0.007	0.017±0.005
รังไข่ซ้าย	0.017±0.006	0.017±0.005	0.019±0.005	0.017±0.004	0.018±0.007	0.017±0.005
ต่อมหมวกไตซ้าย	0.013±0.0029	0.012±0.0028	0.011±0.0022	0.012±0.0021	0.0012±0.0016	0.012±0.0014
ต่อมหมวกไตขวา	0.012±0.0025	0.012±0.0025	0.011±0.0019	0.011±0.0020	0.011±0.0016	0.011±0.0016

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน * แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาของหนูแร่งเพศผู้ที่ได้รับผงกระยาชดำเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	กลุ่มหนูที่ได้รับผงกระยาชดำ (มก./กก./วัน)					
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	1000 n=15	2000 n=15	2000-R n=15
Hematocrite (%)	49.94±2.71	48.07±2.66	48.73±1.44	48.51±1.86	48.50±2.73	48.04±2.33
Hemoglobin (g/dl)	15.95±0.86	15.54±0.81	15.77±0.48	15.62±0.57	15.65±0.77	15.77±0.70
RBC (x10 ⁶ cells/ μ l)	9.27±0.35	9.03±0.43	9.18±0.28	9.15±0.36	9.10±0.41	8.87±0.39
MCV (fl/red cell)	53.85±1.96	53.29±2.12	53.08±1.14	53.04±1.82	53.30±1.87	54.16±1.87
MCH (pg/red cell)	17.21±0.77	17.22±0.63	17.19±0.41	17.09±0.62	17.22±0.69	17.77±0.70
MCHC (g/dl RBC)	31.95±0.81	32.32±0.50	32.38±0.36	32.31±0.33	32.29±0.59	32.82±0.43*
WBC (K/ μ L)	3.59±0.96	3.38±0.56	3.49±0.66	4.22±1.25	4.51±0.77	4.38±1.51
Neutrophil (%)	20.72±6.70	23.41±6.65	21.12±3.46	20.48±4.91	25.22±9.65	23.91±14.88
Eosinophil (%)	1.81±0.85	1.56±0.45	1.55±0.52	1.30±0.52	1.06±0.40*	1.63±0.79
Lymphocyte (%)	68.04±7.61	66.87±7.38	67.70±4.84	69.21±7.23	65.55±8.89	65.08±13.49
Monocyte (%)	7.61±4.03	6.86±2.69	7.35±3.93	7.13±2.19	6.39±2.44	6.63±1.67
Basophil (%)	1.84±1.40	1.31±0.48	2.29±1.08	1.89±1.69	1.77±0.75	2.75±1.14
Platelet (K/ μ L)	955.50±137.63	963.53±145.45	956.73±114.61.25	973.30±91.18	924.30±83.41	88.97±97.98

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจค่าทางโลหิตวิทยาของหนูแร่งเพศเมียที่ได้รับผงกระยาชดำเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	กลุ่มหนูที่ได้รับผงกระยาชดำ (มก./กก./วัน)					
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	1000 n=15	2000 n=15	2000-R n=15
Hematocrite (%)	47.75±2.72	46.85±2.57	45.48±1.70	46.93±3.27	47.83±2.99	46.71±2.20
Hemoglobin (g/dl)	15.57±0.79	15.26±0.73	15.26±0.56	15.30±1.03	15.49±0.86	15.35±0.60
RBC (x10 ⁶ cells/ μ l)	8.15±0.38	8.09±0.33	7.91±0.25	8.12±0.52	7.93±1.10	7.94±0.29
MCV (fl/red cell)	58.50±2.23	57.09±2.22	58.75±1.92	57.79±1.82	58.56±2.25	58.86±1.67
MCH (pg/red cell)	19.11±0.78	18.87±0.76	19.26±0.56	18.84±0.71	18.97±0.87	19.34±0.48
MCHC (g/dl RBC)	32.53±0.65	32.58±0.54	32.83±0.41	32.60±0.48	32.40±0.52	32.88±0.60
WBC (K/ μ L)	2.15±0.61	2.35±0.68	2.79±1.01	3.66±1.49*	3.06±0.98	2.18±0.68
Neutrophil (%)	14.77±4.98	17.98±11.45	17.86±8.17	16.77±8.33	14.76±3.66	22.30±9.33
Eosinophil (%)	1.55±0.49	1.36±0.89	1.26±0.59	1.13±0.43	0.94±0.45*	1.47±0.52
Lymphocyte (%)	77.98±5.54	75.01±12.69	75.05±9.32	76.50±6.66	78.85±4.29	68.78±9.54
Monocyte (%)	4.59±2.07	4.46±1.92	4.56±2.09	4.32±1.55	4.15±1.72	5.48±1.41
Basophil (%)	1.12±0.53	1.20±0.46	1.26±0.47	1.28±0.51	1.30±0.61	1.96±0.63*
Platelet (K/ μ L)	903.03±112.76	875.4±91.77	912.83±113.32	122.65	939.23±114.06	902.20±75.24

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับผงกระชายดำเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	กลุ่มหนูที่ได้รับผงกระชายดำ (มก./กก./วัน)					
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	1000 n=15	2000 n=15	2000-R n=15
AST (U/L)	99.60±18.29	103.67±13.87	104.40±22.47	98.40±14.08	93.07±10.87	85.07±13.29
ALT (U/L)	39.73±8.03	38.13±8.00	40.40±7.65	35.73±6.76	35.93±9.10	36.60±7.54
ALP (U/L)	56.80±10.07	54.73±8.26	54.67±8.26	50.93±8.15	49.93±8.67	52.40±8.12
Total protein (g%)	6.63±0.23	6.76±0.25	6.73±0.17	6.79±0.26	6.67±0.29	6.57±0.30
Albumin (g%)	4.48±0.15	4.42±0.16	4.45±0.11	4.47±0.14	4.50±0.22	4.39±0.17
Globulin (g%)	2.15±0.16	2.34±0.20	2.28±0.11	2.31±0.20	2.17±0.19	2.18±0.21
Bilirubin (g%)	0.064±0.030	0.077±0.030	0.059±0.026	0.061±0.020	0.076±0.029	0.116±0.029*
BUN (mg%)	18.79±2.20	18.51±2.23	18.31±1.11	19.98±3.80	20.03±2.52	20.03±2.52
Creatinine (mg%)	0.77±0.065	0.77±0.073	0.74±0.059	0.74±0.075	0.73±0.058	0.74±0.044
Glucose (mg/dl)	162.55±30.03	145.80±19.49	168.80±32.44	165.33±20.32	174.20±28.17	160.53±28.40
Uric acid (g%)	2.55±1.43	1.93±1.03	2.50±1.01	2.47±1.28	2.51±1.40	1.19±0.49*
Triglyceride (mg/dl)	112.43±28.08	107.30±36.61	99.23±32.42	100.38±31.98	86.12±28.57	107.86±23.97
Cholesterol (mg/dl)	74.73±14.66	75.77±16.75	65.76±11.16	78.39±15.19	72.82±11.10	65.56±15.32
Sodium (mmol/l)	148.80±1.42	149.27±1.28	150.07±1.58	149.73±1.39	150.87±1.19*	149.93±1.33
Potassium (mmol/l)	6.04±1.44	5.44±1.67	5.55±1.34	5.72±1.30	5.47±1.42	5.01±0.93
Chloride (mmol/l)	109.80±1.37	111.07±1.28	110.67±1.40	111.27±1.39	110.53±1.96	0.012±0.0014

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 6 ผลการตรวจค่าทางเคมีคลินิกของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับผงกระชายดำเป็นเวลา 6 เดือน

พารามิเตอร์	กลุ่มหนูที่ได้รับผงกระชายดำ (มก./กก./วัน)					
	0 n=15	20 n=15	200 n=15	1000 n=15	2000 n=15	2000-R n=15
AST (U/L)	89.20±14.45	85.67±19.25	81.93±12.74	85.67±25.09	84.80±20.55	70.47±9.66
ALT (U/L)	25.07±5.80	27.80±12.84	29.27±8.22	27.67±9.85	26.40±8.55	26.00±6.38
ALP (U/L)	26.53±6.28	21.67±4.84	23.13±4.47	23.73±9.31	23.00±5.33	20.40±6.14
Total protein (g%)	6.84±0.23	6.94±0.24	6.89±0.31	6.97±0.47	7.08±0.32	6.89±0.31
Albumin (g%)	4.92±0.22	4.98±0.16	5.02±0.22	5.03±0.34	5.07±0.21	4.96±0.22
Globulin (g%)	1.91±0.26	1.96±0.12	1.87±0.19	1.94±0.27	2.01±0.24	1.93±0.16
Bilirubin (g%)	0.097±0.037	0.093±0.030	0.090±0.044	0.091±0.025	0.096±0.037	0.131±0.026*
BUN (mg%)	22.91±3.33	22.89±4.33	22.57±4.50	21.86±4.80	25.03±6.51	20.54±3.01
Creatinine (mg%)	0.86±0.09	0.86±0.13	0.81±0.12	0.75±0.09	0.81±0.11	0.79±0.10
Glucose (mg/dl)	128.56±24.34	131.47±14.87	130.45±15.76	133.60±18.29	132.16±20.44	135.71±17.73
Uric acid (g%)	1.45±0.64	1.06±0.23	1.05±0.37	1.01±0.65	1.10±0.58	0.72±0.23*
Triglyceride (mg/dl)	47.53±11.55	53.99±26.07	50.59±17.39	64.31±56.72	56.40±25.25	55.64±15.04
Cholesterol (mg/dl)	48.83±13.92	51.85±13.88	53.84±12.36	68.60±19.61	78.30±22.36*	65.48±23.92
Sodium (mmol/l)	148.40±1.30	149.20±1.61	149.33±1.18	149.73±0.96	150.73±1.10*	149.33±1.18
Potassium (mmol/l)	5.22±1.17	4.34±0.45	4.49±0.99	4.43±0.91	4.17±0.63	4.37±0.41
Chloride (mmol/l)	112.20±1.01	112.93±1.33	112.87±1.41	112.47±1.73	120.60±2.03	112.33±1.23

ค่าในตารางแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางที่ 7 ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแรพเพศผู้ที่ได้รับกระชายดำเป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	ขนาดของผงกระชายดำ (มก./กก./วัน)					
		0 n=15	20 n=15	200 n=15	1000 n=15	2000 n=15	2000-R n=15
ปอด	Lymphoid proliferated peribronchioles	14/15	12/15	8/15*	8/15*	7/15*	7/15*
หัวใจ	Focal myocardiosis (+1)	1/15	3/15	4/15	6/15*	4/15	2/15
	Hepatocyte degeneration	10/15	12/15	11/15	12/15	5/15	7/15
ตับ	Protein cast deposited in sinusoids (+1)	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	1/15
	Submucosal edema with PMN infiltration	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15
กระเพาะอาหาร	Focal nodular hyperplasia	0/15	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15
	Lymphoid aggergated in submucosa	8/15	0/15*	0/15*	3/15	0/15*	2/15*
ลำไส้เล็ก	Atrophy	2/15	4/15	5/15	1/15	1/15	1/15
	Hemorrhagic supperative epididymitis	0/15	2/15	0/15	0/15	0/15	1/15
ลำไส้ใหญ่	Atrophy	0/15	2/15	0/15	0/15	0/15	1/15
	Hemorrhagic supperative epididymitis	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15
ต่อมหมวกไต	Cortical fatty degeneration	12/15	6/15*	11/15	5/15*	3/15*	1/15*

ตัวเลขในตารางแสดงรูปของจำนวนหนูที่ตรวจพบพยาธิสภาพ/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

+1 หมายถึง การเปลี่ยนแปลงพบเพียงเล็กน้อย (mild degree)

ตารางที่ 8 ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแรพเพศเมียที่ได้รับกระชายดำเป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	ขนาดของผงกระชายดำ (มก./กก./วัน)					
		0 n=15	20 n=15	200 n=15	1000 n=15	2000 n=15	2000-R n=15
ปอด	Lymphoid proliferated peribronchioles	13/15	8/15	2/15*	2/15*	3/15*	2/15*
หัวใจ	Focal myocardiosis (+1)	1/15	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15
	Hepatocyte degeneration	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15
ตับ	Protein cast deposited in sinusoids (+1)	0/15	0/15	0/15	1/15	0/15	2/15
	Chronic pyelitis	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15
ไต	Tubular dilataion	0/15	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15
	Pelvic epithelial proliferation	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	0/15
ม้าม	Congestion	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15
	Lymphoid aggergated in submucosa	4/15	4/15	0/15	0/15	2/15	0/15
ลำไส้เล็ก	Lymphoid aggergated in submucosa	4/15	4/15	0/15	0/15	2/15	0/15
ลำไส้ใหญ่		1/15	0/15	3/15	1/15	1/15	1/15

ตัวเลขในตารางแสดงรูปของจำนวนหนูที่ตรวจพบพยาธิสภาพ/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

+1 หมายถึง การเปลี่ยนแปลงพบเพียงเล็กน้อย (mild degree)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข ที่สนับสนุนทุนโครงการวิจัยพิษของกระชายดำ ประจำปีงบประมาณ 2546 และขอขอบคุณ นางสาวรุ่งตะวัน อัศวมนันคง ที่ช่วยรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เจ้าหน้าที่กลุ่มสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ที่ช่วยเตรียมอุปกรณ์ และห้องสัตว์

เอกสารอ้างอิง

- Schumann K. Das Pflanzenreich in : Engelmann V, ed. J. Crammer. Weinheim: BergstraBe , 1900.
- Sirirugsa P. Taxonomy of genus *Kaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand. Thai. For. Bull. 1992 ; 19 : 1-15.
- ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ฉบับปรับปรุงแก้ไข) พิมพ์ครั้งที่ 2 : บริษัทประชาชน จำกัด , 2554 : หน้า 303.
- กองบรรณาธิการวารสารสมุนไพรเพื่อสุขภาพ กระชายดำ ไวอะกร้า และยาอายุวัฒนะของ ไทยวารสารสมุนไพรเพื่อสุขภาพ 2554 ; 17 : 67-75.
- Boonruad T. Quality evaluation of crude drugs and volatile oil of *Krachaidamrhizome*. Bull Dept Med Sci 2003 ; 45 : 1-16.
- Jaipetch T, Reutrakul V, Tuntiwahwuttikul P, Santisuk T. Flavonoids in the black rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. Phytochem 1983 ; 22 : 625-626.
- Herunsalee A, Pancharoen O, Tuntiwahwuttikul P. Further studies of flavonoids of The black rhizomes *Boesenbergia pandurata*. J. Sci Soc Thailand 1987; 13 :119-122.
- Wattanapitayakul S , Nawinprasert A , Herunsalee A et al. Vasodilatio , anti-spasmodic and antiplatelet actions of *Kaempferia parviflora*. The Sixth JSPS - NECT Joint Seminar. Recent Advances in Natural Medicine Research. December 2 - 4 , 2003 Bangkok . Thailand. (Poster presentation).
- Yenjai C , Prasanphen K , Daoodee S , Wongpanich V , Kittakoop P. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. Filoterapia 2002; 75: 89-92.
- พินายนอก ย , โยธินารักษ์ อ , จรเกตุ พ. คำอ้างอิงทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิกในเลือดหนูแรชสายพันธุ์ Wistar ว กรมวิทย์ พ 2546 ; 45 : 27-36.
- Gad SC. The Rat : Pathology in : Gad SC and Chengelis CP , ed. Animal Model in Toxicology. New York : Marcel Dekker , 1992 : 78-95.
- Yun JM , Kwon H Hwang JK. In vitro anti - inflammatory activity of panduratin A isolated from *Kaempferia parviflora* in Raw264.7 cells. Planta Med 2003 ; 69 : 1102-8.
- Thomas E , Shanmugam J , Rafi MM. Antibacterial activity of plants belongong to Zingiberaceae family. Biomedicine 1996 ; 16 : 15-20.
- วณิชเกียรติ พงศ์. ยาสเตอรอยด์ ใน : สังวรินทะ และคณะบรรณาธิการ เกษัชวิทยา พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ : บริษัท Text and Journal Publication จำกัด , 2538 : 630-637.

รายงานการศึกษาพืชเทียบพันธุและ กิ่งเทียบพันธุ ของสารสกัดเมล็ดค้ำแสดง ในสัตว์ทดลอง

ทรงพล ชีวะพัฒน์
เอมมนัส อัดตวิษณุ
สมเกียรติ ปัญญาเม้ง
มาลี บรรจบ
ทรงพล ผดุงพัฒน์
สลิ ปันยารชุน
รัตน์ อินทสว

บทนำ

ค้ำแสดง (*Bixa orellana* Linn.) เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ ใบเดี่ยวรูปร่างคล้ายใบโพธิ์ ดอกสีชมพูออกเป็นช่อที่ยอด ผลมีสีแดง คล้ายลูกเงาะภายในกลวง มีเมล็ดสีแดง สีจากเมล็ดใช้แต่งสีอาหารให้มีสีแดงส้ม เช่น แต่งสี ขนม ไอศกรีม เนย น้ำมัน และใช้ย้อมผ้าฝ้ายให้มีสีแดงส้มได้ด้วย⁽¹⁾ สารสีที่มีอยู่ในเมล็ดค้ำแสดง ถูกเรียกว่า แอนเนตโต (Annatto) ซึ่ง มีการใช้ตั้งแต่ยุคโบราณในอเมริกาใต้และในยุโรปกว่าหนึ่งร้อยปี⁽²⁾ ปัจจุบัน ประเทศอังกฤษ ฝรั่งเศส เยอรมัน มีการใช้สีแอนเนตโตอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ขนมอบ เนยแข็ง มาการิน ผลิตภัณฑ์จากไข่ เจลาติน พุดดิ้ง ซอสหวาน เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์นม และของขบเคี้ยวต่างๆ เป็นต้น⁽³⁾

การสกัดแอนเนตโตจากเมล็ดค้ำแสดงนั้นสามารถทำได้โดยใช้ตัวทำละลายหรือน้ำมันพืชก็ได้ สารสกัดแอนเนตโตแบ่งออกเป็น 6 ชนิด คือ Annatto B, C, D, E, F, และ G ตามการใช้ตัวทำละลายและปริมาณของสารสี (pigment) สองชนิดคือ bixin และ norbixin ตัวอย่าง เช่น Annatto B มาจากการสกัดเมล็ดค้ำแสดงด้วยตัวทำละลาย โดยมีสารสีร้อยละ 92 โดยประกอบด้วย bixin และ norbixin 97% และ 1.7% ตามลำดับ Annatto D สกัดโดยใช้ไขมันพืช ประกอบด้วยสารสี 10.8% โดยเป็น bixin 94% เป็นต้น⁽³⁾

เนื่องจากต้นค้ำแสดงพบได้ตามป่าดิบแล้งมีมากทางภาคเหนือ⁽⁴⁾ และปลูกได้ทุกภาคทั่วไป⁽⁵⁾ ทำให้สามารถหาวัตถุดิบในการสกัดได้ง่าย ดังนั้นกลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ สถาบันวิจัยสมุนไพร จึงได้เตรียมสารสกัดเมล็ดค้ำแสดงโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้เป็น feed additive แต่งสีในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งจะช่วยลดการนำเข้าสี annatto จากต่างประเทศได้ อย่างไรก็ตามจำเป็นที่จะต้องศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสีที่เตรียมจากเมล็ดค้ำแสดง ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาพืชเทียบพันธุและกิ่งเทียบพันธุของสารสกัดเมล็ดค้ำแสดงเพื่อให้ได้ข้อมูลทางพิษวิทยาเบื้องต้นก่อนนำไปแต่งสีอาหารและผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ ต่อไป

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดคำแสดที่เตรียมขึ้นโดยกลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร พบว่า เมื่อให้สารสกัดเมล็ดคำแสดแก่หนูถีบจักรทางปากขนาดสูงสุดคือ 16.0 ก./กก. ไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและหนูไม่ตาย จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันระยะเวลา 28 วัน ในหนูแรทวิสตา จำนวน 150 ตัวแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 15 ตัวต่อเพศ ประกอบด้วยกลุ่มควบคุมบ้วนน้ำกลั่น และกลุ่มทดลองได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดทางปากในขนาด 0.24, 2.4, 12.0, และ 60.0 มก./กก./วัน แสดงให้เห็นว่า สารสกัดไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ ค่าทางเคมีคลินิกและไม่ทำให้เกิดอาการพิษสะสม ส่วนการเพิ่มขึ้นของนิวโทรฟิลในหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 12.0 และ 60.0 มก./กก./วัน ยังอยู่ในช่วงค่าปกติและจัดเป็น minor change ผลการผ่าซากชันสูตรไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา (gross pathological lesions) ของอวัยวะภายใน จากการตรวจชิ้นเนื้ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาแสดงให้เห็นว่า หนูที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดไม่มีความผิดปกติของอวัยวะภายในต่างๆ ยกเว้นหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาดสูงสุดมีอุบัติการณ์ของเซลล์ตับเสื่อมแบบไขมันสูงขึ้นแต่การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นระดับ mild fatty change เท่านั้น ดังนั้นการใช้สารสกัดเมล็ดคำแสดที่เตรียมขึ้นเป็นสารแต่งสีไม่ควรใช้ปริมาณสูงหรือเข้มข้นมากเกินไปและควรพิจารณาถึงปริมาณสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดได้แก่ bixin และ norbixin ด้วยเพื่อปรับขนาดให้เหมาะสมกับอาหารแต่ละประเภทตั้งรายงานการใช้สารสกัดแอนเนตโตของประเทศอื่นๆ ด้วย

ABSTRACT

Toxicity study of *Bixa orellana* Linn. extract, produced by Medicinal Plant Research Institute was investigated. The maximum dose of 16.0 g/kg extract was orally administered to mice and it was shown that the extract cause no acute toxic signs and no death. Oral subacute toxicity study in five group of Wistar rats consisting of water control and four extract-treated groups at the doses of 0.24, 2.4, 12.0 and 60.0 mg/kg/day revealed that the extract did not cause any toxic sign and there was no alteration on body weight, food consumption, relative organ weight and blood chemistry values. The increases of neutrophil in male rats receiving the extract at the dose 12.0 and 60.0 mg/kg/day were minor change and still within normal range. Necropsy results showed no gross pathological changes of visceral organs. Histopathology revealed no abnormalities in any organs except male rats receiving the highest dose of extract had higher incidence of mild fatty change. Therefore, application of the extract for coloring agent at high concentration or overdose should be avoided and the amount of active ingredients (bixin and norbixin) in the extract should be taken into account for appropriate concentration in each food stuff as reported in other countries.

Key word : *Bixin orellana*, Toxicity

วัสดุและวิธีการ

สารสกัดเมล็ดค้ำแสด

สารสกัดเมล็ดค้ำแสดที่มีปริมาณสารสีสำคัญ bixin ร้อยละ 14.17 เตรียมโดยกลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรพันธุ์ ICR จำนวน 20 ตัว (เพศละ 10 ตัว) น้ำหนักตัว 18-22 กรัม หนูแรทวิสตาจำนวน 150 ตัว (เพศละ 75 ตัว) เพศผู้ น้ำหนัก 200-220 กรัม และเพศเมีย 180-200 กรัม ซึ่จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาสนา มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อม (hygienic conventional room) ของศูนย์สัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยมีอุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60 ให้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด และน้ำกรองที่สะอาดโดยไม่จำกัดปริมาณ (ad libitum)

วิธีการศึกษา

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

กลุ่มแบ่งหนูถีบจักรออกเป็นสองกลุ่มๆ ละ 10 ตัว เพศละ 5 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มทดลองได้รับน้ำยาแขวนตะกอนของสารสกัดเมล็ดค้ำแสดขนาด 8 ก./กก. ทางปาก ซึ่งเป็นขนาดสูงสุดที่สามารถเตรียมและให้ได้โดยป้อน 2 ครั้ง ห่างกัน 6 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นทางปากในปริมาณ 20 มล./กก. 2 ครั้งเช่นกัน จากนั้นสังเกตอาการอย่างใกล้ชิด พร้อมบันทึกจำนวนหนตายทุกวัน จนครบ 14 วัน จากนั้นดมสลับหนูด้วยอีเธอร์แล้วผ่าซากชันสูตรตรวจหาความผิดปกติทางพยาธิวิทยา (gross pathology) ของอวัยวะภายในต่างๆ

การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

กลุ่มแบ่งหนูแรทออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัวและเพศเมีย) ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำกลั่นโดยวิธีป้อนทางปากปริมาณ 10 มล./กก./วัน เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 ถึง 5 เป็นกลุ่มทดลองที่ได้

รับน้ำยาแขวนตะกอนของสารสกัดเมล็ดค้ำแสดทางปากในขนาด 0.24, 2.4 , 12 และ 60 มก./กก./วัน ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 28 วัน ระหว่างการทดลองสังเกตพฤติกรรม อาการผิดปกติของหนูทุกวัน บันทึกน้ำหนักตัวและน้ำหนักอาหารที่กิน ทุกสองสัปดาห์ เมื่อครบกำหนด 28 วัน อดอาหารหนูเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นดมสลับหนูด้วยอีเธอร์ เปิดผ่าช่องท้องเจาะเลือดจาก posterior vena cava เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยาโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cell-Dyn 3500[®] ปั่นแยกซีรัมเพื่อนำไปตรวจหาค่าเคมีคลินิกโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi[®] รุ่น 912 จากนั้นผ่าซากชันสูตรตรวจอวัยวะภายในต่างๆ เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ส่วนต่างๆ ตับ ไต ม้าม ตับอ่อน ต่อม น้ำลาย ต่อมหน้าตา ต่อมอัทรอยด์ ต่อมหมวกไต อวัยวะระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ อัณฑะ ต่อมลูกหมาก seminal vesicle รังไข่ ท่อนำไข่และมดลูก ซึ่งน้ำหนักอวัยวะที่ชั่งได้ด้วยเครื่องชั่งละเอียดชนิดนิยม 3 ตำแหน่ง Mettler Toledo[®] รุ่น PB 153 แล้วคำนวณเป็นค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะ (กรัม/น้ำหนักตัว 1000 กรัม) เก็บอวัยวะต่างๆ ในน้ำยาบัพเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10% แล้วนำชิ้นเนื้ออวัยวะไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อที่มีความหนา 4 ไมครอน ย้อมด้วยสี H&E เพื่อตรวจหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิสัตวแพทย์

การวิเคราะห์ข้อมูลน้ำหนักตัว น้ำหนักอาหารที่กิน น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ ค่าทางโลหิตวิทยา และค่าเคมีคลินิก ใช้ one-way ANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วย Dunnett's test ส่วนผลการตรวจสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาใช้ Fisher exact test ที่ $p < 0.05$

ผลการทดลอง

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

จากการป้อนสารสกัดเมล็ดค้ำแสดทางปากแก่หนูถีบจักรในขนาด 8 กรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (ก./กก.) 2 ครั้งห่างกัน 6 ชั่วโมง พบว่า ภายหลังได้สาร

สัปดาห์ที่ 1 และ 2 หนูทุกตัวมีอาการและพฤติกรรมต่าง ๆ เป็นปกติไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม และเมื่อครบกำหนด 14 วัน ไม่มีหนูตาย ผลการผ่าซากชิ้นสุตรไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทางมหัพยาวิทยา ดังนั้นขนาดที่ทำให้หนูตายร้อยละ 50 ควรมีค่ามากกว่า 16.0 ก./กก.

การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

ผลต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ สุขภาพทั่วไปและการเปลี่ยนแปลงทางมหัพยาวิทยา

หนูที่ได้รับสารสกัดเมล็ดค้ำแสดทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัว น้ำหนักอาหารที่กิน และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 1 และ 2 , ตารางที่ 1 และ 2) นอกจากนี้ไม่พบอาการผิดปกติหรือพฤติกรรมใดๆ ที่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม จากการผ่าซากชิ้นสุตรไม่พบความผิดปกติทางมหัพยาวิทยาของอวัยวะต่างๆ

ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดค้ำแสดขนาด 12 มก./กก. มีค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดแดง และปริมาณฮีโมโกลบิน ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปรอร์เซ็นต์ของนิวโทรฟิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดค้ำแสดขนาด 12 และ 60 มก./กก. ในขณะที่ลิมโฟซัยท์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 60 มก./กก. (ตารางที่ 3) ในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกขนาดนั้นมีค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4)

ผลต่อค่าทางเคมีคลินิก

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดค้ำแสดขนาด 0.24 ก./กก./วัน มีค่าเอนไซม์ ALT ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.24 และ 12.0 ก./กก. มีระดับกลูโคสต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้พบวาระดับกรดยูริกลดลงในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.24, 2.4 และ 12.0 ก./กก./วัน (ตารางที่ 5) ในเพศเมียพบว่า ค่าทางเคมีคลินิกทุกพารามิเตอร์ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 6)

ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดค้ำแสดขนาด 60 มก./กก./วัน มีอุบัติการณ์ของการเกิด mild fatty degeneration (5/10) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอื่นๆ ที่พบในบางอวัยวะมีอุบัติการณ์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 7 และ 8)

วิจารณ์

การศึกษาพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักรโดยกรอกสารสกัดเมล็ดค้ำแสดขนาด 8.0 ก./กก. เป็นเวลา 2 ครั้ง ห่างกัน 6 ชั่วโมง ไม่ทำให้เกิดอาการพิษใดๆ และไม่มีหนูตาย ดังนั้นขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) ควรมีค่ามากกว่า 16.0 ก./กก. และอาจจัดว่าสารสกัดเมล็ดค้ำแสดอยู่ในกลุ่มที่ไม่เป็นพิษ (practically non toxic) เมื่อใช้ Hodge and Sterner Scale ⁽⁶⁾

ส่วนการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูเพศผู้เป็นเวลา 28 วัน โดยป้อนสารสกัดเมล็ดค้ำแสดขนาด 0.24, 2.4, 12 และ 60 มก./กก./วัน พบว่า สารสกัดเมล็ดค้ำแสดไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ย น้ำหนักอาหารที่กิน และไม่ก่อให้เกิดอาการแสดงออกที่ผิดปกติใดๆ น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ของตับที่ลดลงในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 2.4 ก./กก./วัน เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากสารสกัดเมล็ดค้ำแสด ค่าของฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดแดง และฮีโมโกลบินที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 12.0 ก./กก./วัน จัดว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยโดยจำนวนเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบินยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ ⁽⁷⁾ และการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่เป็น dose-response relationship การเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 12.0 และ 60.0 มก./กก. รวมทั้งเปอร์เซ็นต์ของลิมโฟซัยท์ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 60 มก./กก./วัน ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติเช่นเดียวกันจัดว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เล็กน้อยไม่มีความสำคัญ และไม่สัมพันธ์กับพยาธิสภาพของ

บางอวัยวะที่พบ ระดับกลูโคสที่ลดลงในหนูเพศผู้บางกลุ่มไม่อาจกล่าวว่าเป็นผลจากสารสกัดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงไม่สัมพันธ์กับขนาดที่ให้ ส่วนการครุยริกที่ลดลงในหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.24, 2.4 และ 12.0 มก./กก. นั้นยังอยู่ในช่วงค่าปกติ⁽⁷⁾ และไม่ลดลงอย่างสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดเมลิธคาล์ส

จากผลการตรวจชิ้นเนื้อของอวัยวะต่างๆทางจุลพยาธิวิทยา แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเมลิธคาล์สไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะภายในของหนูแรท ยกเว้นหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 60 มก./กก./วัน มีอุบัติการณ์พบเซลล์ตับเสื่อมแบบไขมันสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เป็นการเปลี่ยนแปลงเพียง ระดับ mild fatty change เท่านั้น ส่วนในหนูเพศเมียนั้น มีอุบัติการณ์ของการเปลี่ยนแปลงที่ตับไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งอาจเป็นการตอบสนองที่แตกต่างระหว่างเพศ (gender difference) การเปลี่ยนแปลงที่พบได้ในอวัยวะอื่นนั้น ไม่อาจกล่าวได้ว่า เกิดจากสารสกัดเมลิธคาล์ส เนื่องจากเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดและไม่มีควมจำเพาะใดๆ ที่บ่งชี้ว่าเกิดจากพิษของสารสกัดเมลิธคาล์ส

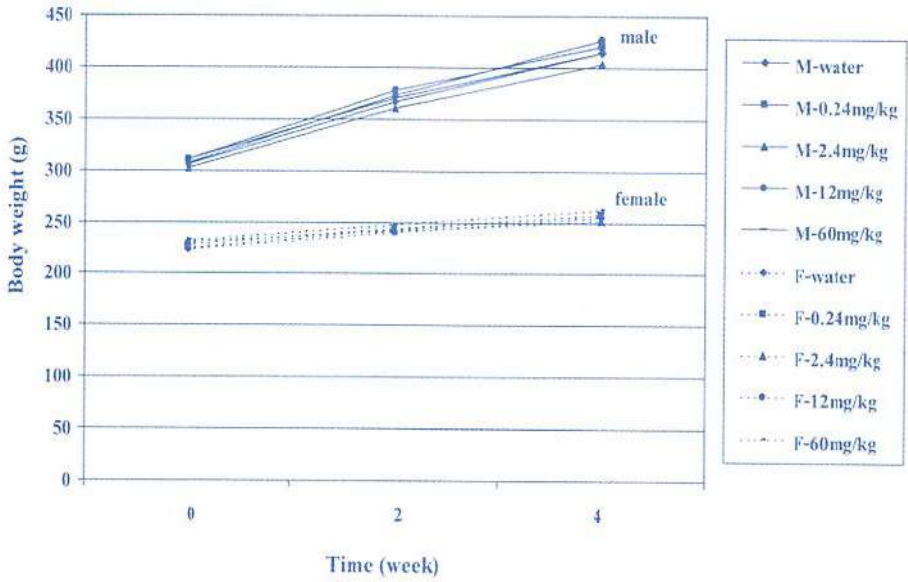
สรุป

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเมลิธคาล์สที่เตรียมโดยกลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สถาบันวิจัยสมุนไพร สรุปได้ว่า เมื่อให้สารสกัดเมลิธคาล์สทางปากแก่หนูถีบจักรในขนาด 16.0 ก./กก. โดยแบ่งให้ 2 ครั้งๆ ละ 8 ก./กก. พบว่า ไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันใดๆ และจัดอยู่ในกลุ่มสารที่ไม่มีพิษ ส่วนการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันระยะเวลา 28 วัน โดยป้อนให้หนูวิสตาร์ในขนาด 0.24, 2.4, 12.0, 60.0 มก./กก./วัน แสดงให้เห็นว่า สารสกัดแอนแนตโตที่เตรียมขึ้นนี้ ไม่มีผลกระทบต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ ไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติหรือพฤติกรรมของหนูเปลี่ยนไป นอกจากนี้ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิก ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาบ่งชี้ว่า

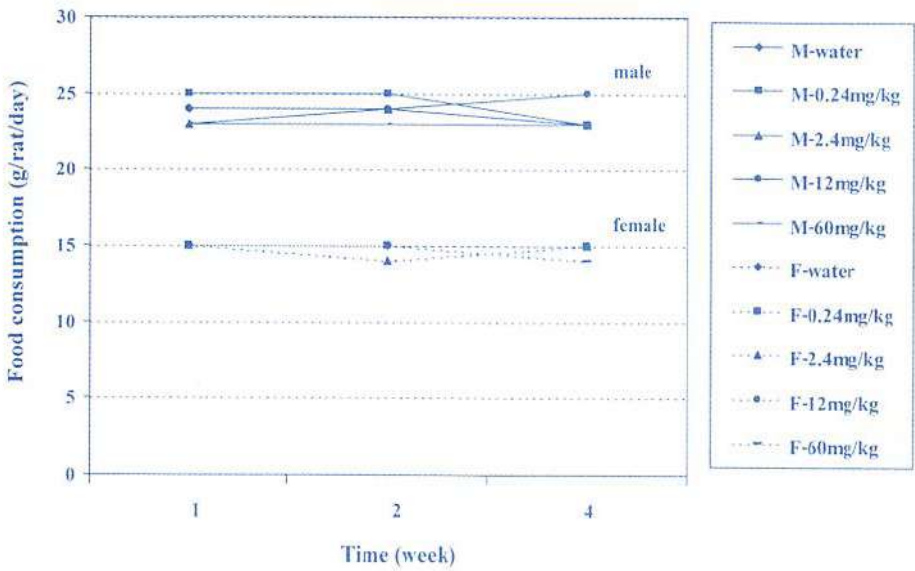
สารสกัดเมลิธคาล์สไม่มีผลทำให้เกิดความผิดปกติใดๆ ต่ออวัยวะภายในของหนูแรท ยกเว้นเมื่อให้ขนาดสูง 60.0 มก./กก./วัน แก่หนูเพศผู้หรือเท่ากับหนูได้รับ bixin 8.5 มก./กก./วัน ซึ่งสูงกว่า ADI ของสารสกัดแอนแนตโตในรูปแบบ bixin ถึง 131 เท่า พบว่า จำนวนของหนูที่มีเซลล์ตับเสื่อมแบบไขมันเพิ่มขึ้น (5/15) แต่การเปลี่ยนแปลงนี้อยู่ในระดับเล็กน้อย (mild fatty change) และไม่มีผลต่อค่า liver enzymes เนื่องจากค่า ADI ของสารสกัด annatto ที่ WHO กำหนดไว้ในรูปของสาร bixin คือ 0-0.065 มก./กก./วัน (8) ดังนั้นหากใช้สารสกัดเมลิธคาล์สเป็น feed additive ควรใช้ในปริมาณที่พอเหมาะไม่สูงมากเกินไปและควรมีการตรวจ chemical contents อื่นๆ ที่สำคัญ เช่น norbixin เพื่อปรับใช้ในขนาดที่เหมาะสมสำหรับผสมอาหารแต่ละประเภทต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- 1) วันดี กฤษณพันธ์ 2538. สมุนไพรสารพัด ประโยชน์ ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 186-7.
- 2) Evans WC Annatto: a natural choice. Biologist 2000;47 (4): 181-4.
- 3) Kroes R. and Verger P. Annatto Extracts. Available from [http:// www. whqlibdoc. who.int /publications /2004/924a66052x.pdf](http://www.whqlibdoc.who.int/publications/2004/924a66052x.pdf).
- 4) วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย โอ เอส พรีนติ้ง เฮ้าส์ กรุงเทพมหานคร 2540 : 153.
- 5) โครงการพัฒนาเทคนิคยาสมุนไพร การใช้สมุนไพรบริษัทสารมวลชน จำกัด กรุงเทพฯ 2524 : 47-48.
- 6) Canadian center for occupational health and safety. What is and LD50 and LC50 .2005. Available from [http:// www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html](http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html) 2005.
- 7) Gad SC. The RAT: Pathology. In: Gad SC and Chengelis CP, ed. Animal Model in Toxicology. New York: Marcel Dekker 1992; 78-81, 95.
- 8) WHO 1982. Evaluation of certain food additives and contaminants. Technical Report Series 683 p.42.



ภาพที่ 1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดค้ำแสด เป็นเวลา 28 วัน



ภาพที่ 2 การกินอาหารของหนูแรทเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดค้ำแสด เป็นเวลา 28 วัน

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว (กรัม) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 1000 กรัม) ของหนูแรพเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสด เป็นเวลา 28 วัน

Organs	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg/day)				
	Control	0.24	2.4	12	60
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Initial body weight	256±12	261±12	256±11	257±10	259±10
Final body weight	393±33	407±27	381±33	400±29	397±25
Brain	5.02±0.31	4.91±0.26	5.11±0.37	4.99±0.41	4.96±0.33
Heart	2.88±0.18	2.87±0.18	2.85±0.20	2.89±0.19	2.98±0.21
Lung	3.81±0.37	3.62±0.27	3.78±0.35	3.72±0.36	3.77±0.29
Liver	30.78±2.56	29.03±1.68	28.84±2.01*	29.31±2.07	29.53±2.15
Stomach	4.46±0.53	4.14±0.41	4.44±0.40	4.19±0.37	4.18±0.32
Spleen	2.00±0.30	2.00±0.24	1.82±0.16	2.04±0.19	1.99±0.36
Right Kidney	2.92±0.19	2.81±0.16	2.86±0.23	2.81±0.20	2.85±0.21
Left Kidney	2.80±0.19	2.67±0.11	2.78±0.28	2.69±0.20	2.71±0.15
Right Testis	7.40±1.03	7.16±0.97	7.55±0.94	7.44±0.91	7.34±1.01
Left Testis	7.33±0.91	7.19±0.89	7.55±1.07	7.18±0.73	7.27±0.61
Right Adrenal	0.080±0.012	0.086±0.013	0.084±0.018	0.084±0.012	0.085±0.012
Left Adrenal	0.088±0.013	0.096±0.011	0.097±0.016	0.095±0.012	0.091±0.011
Bladder	0.279±0.041	0.351±0.081	0.338±0.092	0.327±0.054	0.428±0.050

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)
 ค่าในตารางแสดงในรูป mean±SD.

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว (กรัม) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 1000 กรัม) ของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับสาร สกัดเมล็ดค้ำแสด เป็นเวลา 28 วัน

Organs	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg/day)				
	Control	0.24	2.4	12	60
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Initial body weight	212±8	211±10	216±8	212±8	214±8
Final body weight	243±15	243±12	241±11	245±13	249±16
Brain	7.55±0.46	7.47±0.38	7.66±0.54	7.55±0.39	7.28±0.42
Heart	3.21±0.19	3.23±0.26	3.17±0.19	3.09±0.20	2.95±0.76
Lung	4.66±0.27	4.78±0.28	4.70±0.38	4.66±0.34	4.67±0.41
Liver	28.23±2.06	28.00±2.62	27.47±2.38	27.18±2.77	27.08±2.50
Stomach	5.27±0.55	5.48±1.01	5.40±0.55	5.12±0.70	5.12±0.55
Spleen	2.33±0.25	2.41±0.43	2.25±0.26	2.30±0.32	2.30±0.21
Right Kidney	3.04±0.21	3.05±0.19	3.04±0.24	2.99±0.20	2.93±0.28
Left Kidney	2.89±0.19	2.89±0.19	2.89±0.22	2.86±0.20	2.81±0.24
Right Adrenal	0.153±0.026	0.160±0.024	0.148±0.019	0.154±0.017	0.152±0.028
Left Adrenal	0.172±0.03	0.183±0.033	0.161±0.024	0.171±0.021	0.162±0.021
Right Ovary	0.289±0.009	0.325±0.011	0.305±0.011	0.227±0.066	0.257±0.076
Left Ovary	0.299±0.011	0.348±0.012	0.329±0.014	0.268±0.013	0.250±0.064
Uterus	2.11±0.50	2.42±0.57	2.17±0.82	2.34±0.65	1.99±0.42
Bladder	0.315±0.099	0.293±0.034	0.289±0.059	0.288±0.051	0.296±0.040

ค่าในตารางแสดงในรูป mean±SD.

ตารางที่ 3 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดตำลึง เป็นเวลา 28 วัน

Organs	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg/day)				
	Control	0.24	2.4	12	60
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Hematocrit (%)	52.17±2.63	50.47±3.68	50.01±2.67	48.98±2.60*	49.71±3.75
RBC (x10 ⁶ cells/mm ³)	9.24±0.50	8.83±0.42	8.87±6.39	8.69±0.52*	8.90±0.63
Hemoglobin (g/dl)	16.95±0.67	16.33±0.58	16.32±0.67	16.13±0.69*	16.30±0.99
MCV (μm ³ /red cell)	56.46±1.18	56.16±1.72	56.39±1.59	56.36±1.08	55.85±1.26
MCH (pg/red cell)	18.35±0.42	18.51±0.56	18.41±0.46	18.58±0.49	18.34±0.46
MCHC (g/dl RBC)	31.93±2.30	32.97±0.49*	32.65±0.45	32.95±0.53	32.84±0.62
WBC (x10 ³ cells/mm ³)	5.15±1.28	4.81±1.29	4.38±1.03	4.57±0.73	4.74±1.02
Neutrophil (%)	13.58±2.19	15.58±3.81	15.42±3.60	18.67±5.23*	20.43±7.94*
Eosinophil (%)	1.01±0.37	0.98±0.29	0.96±0.42	0.89±0.32	1.13±0.45
Lymphocyte (%)	75.61±5.09	76.16±6.62	77.14±5.60	72.57±7.68	68.63±9.54*
Monocyte (%)	6.37±3.81	4.44±3.85	4.40±2.42	5.61±2.84	6.83±4.38
Basophil (%)	3.42±1.56	2.93±1.70	2.08±0.99	2.26±0.94	2.97±2.59
Platelet (x10 ³ cells/mm ³)	1102±98	1078±128	1072± 96	1039±110	1099±120

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงในรูป mean±SD.

ตารางที่ 4 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับสารสกัดเมล็ดตำลึง เป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg/day)				
	Control	0.24	2.4	12	60
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Hematocrit (%)	48.24±2.90	47.42±2.75	47.95±2.48	46.76±2.61	48.99±3.54
RBC (x10 ⁶ cells/mm ³)	8.29±0.53	8.20±0.49	8.46±0.61	8.17±0.43	8.57±0.66
Hemoglobin (g/dl)	15.65±0.81	15.47±0.79	15.60±0.77	15.47±0.44	16.02±1.05
MCV (μm ³ /red cell)	58.19±1.65	57.83±1.44	56.77±1.44	57.18±1.74	57.18±1.54
MCH (pg/red cell)	18.89±0.60	18.89±0.60	18.48±0.58	18.97±0.92	18.71±0.49
MCHC (g/dl RBC)	32.46±0.54	32.64±0.63	32.55±0.37	33.23±1.96	32.73±0.49
WBC (x10 ³ cells/mm ³)	2.84±0.66	3.00±0.83	3.04±0.96	3.06±0.71	3.23±1.19
Neutrophil (%)	15.80±3.02	18.32±5.01	18.57±4.29	18.17±7.77	17.14±4.21
Eosinophil (%)	1.02±0.45	1.11±0.45	1.06±0.34	1.21±0.46	0.92±0.42
Lymphocyte (%)	77.59±5.71	74.60±5.92	74.41±5.43	74.64±7.32	75.91±54.4
Monocyte (%)	4.25±3.47	4.48±2.16	4.56±2.92	4.46±2.25	4.64±2.18
Basophil (%)	1.32±0.75	1.47±0.53	1.40±0.83	1.52±0.82	1.39±0.67
Platelet (x10 ³ cells/mm ³)	1049±110	1042±130	1079±109	1082±95	1103±84

ค่าในตารางแสดงในรูป mean±SD.

ตารางที่ 5 ค่าเคมีคลินิกของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดเมล็ดค้ำแสด เป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg/day)				
	Control	0.24	2.4	12	60
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
ALP (U/L)	81.53±17.65	75.93±8.57	78.00±9.06	81.20±10.54	73.67±9.38
ALT (U/L)	31.13±7.06	24.80±3.30*	29.67±6.64	29.93±4.49	27.73±4.48
AST (U/L)	93.47±8.90	91.80±8.86	96.33±12.13	96.27±9.28	95.73±8.48
Total protein (g/dl)	6.81±0.18	6.65±0.15	6.67±0.20	6.66±0.18	6.74±0.18
Albumin (g/dl)	4.66±0.14	4.55±0.12	4.62±0.12	4.60±0.11	4.62±0.09
Bilirubin (mg/dl)	0.09±0.03	0.07±0.03	0.07±0.02	0.08±0.02	0.06±0.03
BUN (mg/dl)	17.37±1.69	18.35±2.48	18.15±2.07	17.68±1.80	18.39±1.95
Creatinine (mg/dl)	0.56±0.04	0.53±0.05	0.53±0.08	0.51±0.05	0.55±0.07
Glucose (mg/dl)	227.23±31.75	194.99±25.21*	211.97±45.88	189.64±34.02*	193.03±30.36*
Uric acid (mg/dl)	4.45±1.48	2.28±1.15*	2.61±1.66*	2.17±1.64*	2.81±1.61*
Triglyceride (mg/dl)	99.81±21.60	120.35±21.36	100.59±30.36	105.15±23.96	113.12±37.21
Cholesterol (mg/dl)	51.57±9.96	60.59±10.83	54.73±10.45	59.24±9.17	59.58±14.50

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงในรูป mean±SD.

ตารางที่ 6 ค่าเคมีคลินิกของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดเมล็ดค้ำแสด เป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg/day)				
	Control	0.24	2.4	12	60
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
ALP (U/L)	36.87±5.55	38.93±5.31	38.33±8.85	37.27±3.99	36.80±6.76
ALT (U/L)	19.87±2.72	24.00±14.89	21.93±7.25	19.73±4.79	19.80±3.36
AST (U/L)	80.47±7.87	87.67±18.60	82.73±15.32	84.40±7.22	81.07±3.69
Total protein (g/dl)	6.77±0.27	6.87±0.25	6.87±0.23	6.91±0.24	6.93±0.17
Albumin (g/dl)	4.80±0.18	4.84±0.18	4.89±0.17	4.91±0.16	4.98±0.16*
Bilirubin (mg/dl)	0.09±0.03	0.08±0.04	0.10±0.03	0.09±0.04	0.09±0.03
BUN (mg/dl)	21.93±3.94	22.75±3.47	22.09±3.61	21.44±4.47	21.50±4.13
Creatinine (mg/dl)	0.59±0.08	0.62±0.08	0.60±0.09	0.56±0.07	0.62±0.07
Glucose (mg/dl)	163.98±36.85	153.07±20.82	166.81±38.20	145.98±15.42	147.15±20.39
Uric acid (mg/dl)	2.20±1.15	1.97±0.97	2.39±1.47	1.95±0.84	2.83±1.20
Triglyceride (mg/dl)	44.05±7.81	40.21±5.74	44.47±8.77	39.63±5.95	40.91±6.15
Cholesterol (mg/dl)	50.64±14.56	53.32±11.58	53.58±9.98	54.11±8.93	49.44±11.04

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงในรูป mean±SD.

ตารางที่ 7 ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแร่งเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดค้ำแสด เป็นเวลา 28 วัน

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg/day)				
		Control	0.24	2.4	12	60
		n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Lung	Lymphoid proliferated bronchiole	7/15	9/15	5/15	10/15	13/15
Heart	Myocardiosis	0/15	1/15	0/15	1/15	1/15
Liver	Hepatocyte Fatty degeneration	0/15	0/15	3/15	2/15	5/15*
Pancreas	Acinar hyperplasia	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15
Small intestine	GALT proliferation	2/15	2/15	0/15	3/15	1/15
Large intestine	GALT proliferation	3/15	2/15	5/15	4/15	4/15
Adrenal gland	Cortex fatty degeneration	0/15	0/15	0/15	3/15	0/15

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)
 ผลการตรวจแสดงในรูปของ จำนวนหนูที่พบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูที่ตรวจ
 GALT = Gut associated lymphoid tissue

ตารางที่ 8 ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแร่งเพศเมียที่ได้รับสารสกัดเมล็ดค้ำแสด เป็นเวลา 28 วัน

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg/day)				
		Control	0.24	2.4	12	60
		n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Lung	Lymphoid proliferated bronchiole	3/15	6/15	5/15	11/15	10/15
Liver	Hepatocyte Fatty degeneration	0/15	0/15	1/15	0/15	2/15
Kidney	Congestion (mild)	0/15	0/15	7/15*	1/15	0/15
Spleen	NRL					
Pancreas	Acinar hyperplasia	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15
Small intestine	GALT proliferation	1/15	1/15	2/15	4/15	1/15
Large intestine	GALT proliferation	3/15	2/15	3/15	1/15	3/15

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)
 ผลการตรวจแสดงในรูปของ จำนวนหนูที่พบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูที่ตรวจ
 GALT = Gut associated lymphoid tissue

พิษเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖

ทางพล ชีวะพัฒน์*
 เอมมนัส อัดตวิษณ์*
 ปราณีย์ ชาลิตอำรุง**
 วนิตา จันทระเทพเวทย์*

บทคัดย่อ

สารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นส่วนผสมจากสารสกัดพืช ๘ ชนิด ได้แก่ พุทธรักษา, ปีกไก่ดำ, พญาขอ, มะไฟ เตียนห้า, เหงือกปลาหมอ, เทงทวย, ข้าวเย็นเหนือและข้าวเย็นใต้, ผลิดโดยองค์การเภสัชกรรม เพื่อใช้ทดลองรักษามะเร็ง เต้านม. คณะผู้รายงานได้ศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ โดยกรอกเข้าปากหนูแรดพันธุ์วีสตาร์ ๑๖๘ ตัว ที่แบ่งเป็น ๗ กลุ่ม กลุ่มละ ๒๔ ตัว (เพศผู้ ๑๒ ตัว, เพศเมีย ๑๒ ตัว). กลุ่มที่ ๑ เป็นกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่น. กลุ่มที่ ๒ ถึง ๔ ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ วันละ ๐.๒๔, ๑.๒ และ ๓.๖ ก./กก. เป็นเวลา ๖ เดือน. กลุ่มที่ ๕ เป็นกลุ่มฟื้นตัวได้รับสารสกัดวันละ ๓.๖ ก./กก. ๖ เดือน. จากนั้นหยุดให้สารสกัด ๒ สัปดาห์ก่อนผ่าซาก. กลุ่มที่ ๖ เป็นกลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่น และกลุ่มที่ ๗ ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ ทางปากในขนาดวันละ ๓.๖ ก./กก. ๙ เดือน. จากการ ศึกษาพบว่า สารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวและสุขภาพของหนูแรด. หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด ขนาดวันละ ๑.๒ และ ๓.๖ ก./กก. ๖ เดือน และขนาดวันละ ๓.๖ ก./กก. ๙ เดือน มีค่าฮีมาโตคริต, ฮีโมโกลบิน และจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ค่า $P < 0.05$) และหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรเป็นเวลา ๙ เดือน มีจำนวนเกล็ดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ค่า $P < 0.05$) แต่ค่าที่เปลี่ยนแปลงเหล่านี้ยังอยู่ในเกณฑ์ปกติ. หนูเพศผู้ที่ได้รับสาร สกัดเป็นเวลา ๙ เดือนมีค่าเอนไซม์ แอสพาเทอะมิโนทรานสเฟอเรส (เอเอสที) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ค่า $P < 0.05$) แต่มีระดับโปรแตสเซียมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ค่า $P < 0.05$). การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของ อวัยวะหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร ทั้งระยะเวลา ๖ เดือนและ ๙ เดือน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากสารสกัดแต่อย่างใด. การทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ ไม่ทำให้เกิดพิษเรื้อรังต่อหนูแรด.

คำสำคัญ : สารสกัดสมุนไพร, มะเร็งเต้านม, จีพีโอ ๑๙๘๖, พิษเรื้อรัง

ภูมิหลังและเหตุผล

สารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นส่วนผสมของสาร สกัดที่ได้จากพืช ๘ ชนิด คือ พุทธรักษา (*Canna indica* L.), ปีกไก่ดำ (*Polygala triflora* L.), พญาขอ (*Clinacanthus nutans* Lindau), มะไฟนา (*Ammania baccifera* L.) เหงือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus* Vahl), เทงทวย (*Mallotus philippensis* Muell.Arg.) ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth), และข้าวเย็นใต้ (*Pygmaeopremma herbacea* (Roxb.) Mold.). ยาสมุนไพรตำรับนี้พัฒนาโดยสถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การ

เภสัชกรรม เพื่อใช้รักษามะเร็งเต้านม สมุนไพรแต่ละชนิดมีสรรพคุณประมวลได้ดังนี้

พุทธรักษา (*Canna indica* L.) เป็นพืชวงศ์ Cannaceae^๑ ลักษณะเป็นไม้ล้มลุกเนื้ออ่อน ประโยชน์ทาง ยาใช้เป็นยาแก้ไอ, บำบัดวัณโรค, บำรุงปอด, ระงับอาเจียน เป็นโลหิตและเป็นยาสมาน^๒. ปีกไก่ดำ (*Polygala triflora* L.) วงศ์ Polygalaceae เป็นพืชล้มลุก ใช้ทั้งต้นต้มน้ำดื่มขับปัสสาวะ ใช้เป็นยาเดี่ยวหรือผสมลำต้นมักกระเทียมโรงต้มแก้ดื่มบำรุงโลหิต, บำรุงกำลังทางเพศ. จากตำน้ำดื่มบำรุงน้ำนม. สารสกัดนี้มาจากทั้งต้นมีฤทธิ์ด้านการเจริญของเนื้อ

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
 **สำนักวิชาการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
 *สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม

งอกในหนูและเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง^๓ พญาขอ (*Clinacanthus nutans* Lindau) เป็นพืชวงศ์ Acanthaceae เป็นไม้เลื้อย ลำต้นสีเขียว ไม่มีหนาม ใบสดใช้รักษาโรคผิวหนังจากเริมและงูสวัด, แก้พิษแมลงสัตว์กัดต่อย^๔. นอกจากนี้สารสกัดพญาขอมีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ได้^๕. มะไฟนา (*Ammania baccifera* L.) เป็นพืชล้มลุกในวงศ์ Lythraceae^๖ ขึ้นตามที่ชื้นแฉะ ต้นสูง ๓๐-๕๐ ซม. ลำต้นมีสีอมแดง ยังไม่พบการใช้ในตำรายาไทย แต่มีรายงานศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลของต้นมะไฟนามีฤทธิ์ระงับปวดในหนูถีบจักร^๗. เหยือกปลาหมอ (*Acanthus ebracteatus* Vahl.) อยู่ในวงศ์ Acanthaceae^๘ มีสรรพคุณตามแผนโบราณดังนี้ ใบตำพอกรักษาปวดบวม แผลอักเสบ. แพทย์ไทยใช้ทั้งห้าเป็นยาแก้ไข้หัว พิษฝี ลูกใช้เป็นยาขับโลหิตอย่างแรง^๙ และมีรายงานว่าสารสกัดด้วยน้ำของเหยือกปลาหมอสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งตับในหนูทดลองได้^{๑๐}. เหยือกหยาย (*Mallotus philippensis* Muell.Arg.) วงศ์ Euphorbiaceae^{๑๑} เป็นไม้ยืนต้นขนาดย่อมถึงขนาดกลาง กิ่งมีสีน้ำตาลปนเขียว, ขับพยาธิ, แก้ไข้, โรคตับและเมื่ออาหาว^{๑๒}. ข้าวเย็นเหนือ (*Smilax corbularia* Kunth.) เป็นพืชวงศ์ Smilacaceae^{๑๓} และข้าวเย็นใต้ (*Pygmaepremma herbaceae* (Roxb.) Mold.) เป็นพืชวงศ์ Verbenaceae^{๑๔} หัวข้าวเย็นใช้แก้เส้นพิการ, น้ำเหลืองเสีย, กามโรคระยะเข้าข้อมีเม็ดขึ้นคัน. ยาไทยโบราณทุกขนานมักมีส่วนผสมของหัวข้าวเย็น^{๑๕}.

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร GPO1986 พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด proliferation ของ endothelium cell ของ HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) และ GB (glioblastoma multiform cells) ที่เลี้ยงโดย conditional medium หรือ ซีรัมจากผู้ป่วย glioblastoma^{๑๖}. การศึกษาดังนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ ในสัตว์ทดลองเพื่อให้ทราบถึงข้อมูลความปลอดภัยของยาจากสมุนไพรตัวรับนี้ ก่อนที่จะนำไปสู่การทดลองทางคลินิกในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมต่อไปและเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคอีกทางหนึ่ง.

ระเบียบวิธีศึกษา

สารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖

สารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ รุ่น เอ็มซีอี ๐๒/๔๙ พลิตโดยสถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาล, มีปริมาณความชื้นร้อยละ ๕.๐๓, ปริมาณสารสกัดในน้ำและในแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ ๕๖.๘๑ และ ๑.๖๖ ตามลำดับ.

การเตรียมสมุนไพรสำหรับการทดสอบพิษ

นำสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ มาแขวนตะกอนในน้ำกลั่น ปรับให้มีความเข้มข้น ๓ ระดับ คือ ๐.๐๒๔, ๐.๑๒ และ ๐.๓๖ ก./มล.

สัตว์ทดลอง

หนูแรดพันธุ์วิสตาร์อายุ ๖ สัปดาห์ จำนวน ๑๖๘ ตัว (เพศละ ๘๔ ตัว) เพศผู้มีน้ำหนักตัว ๑๘๐ ถึง ๒๐๐ กรัม และเพศเมียน้ำหนักตัว ๑๕๐ ถึง ๑๗๐ กรัม ชั่งจากลำนำสัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา นำมาเลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลอง ระดับสุขศาสตร์ทั่วไป ที่ควบคุมสภาวะแวดล้อมให้มีอุณหภูมิ ๒๕±๑ องศาเซลเซียส, ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ ๖๐ และได้รับแสงสว่างวันละ ๑๒ ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำไม่จำกัดปริมาณเลี้ยงไว้ ๒ สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลอง เพื่อให้เกิดความคุ้นเคยต่อสภาวะแวดล้อม. โครงการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตามเอกสารควบคุมโครงการหมายเลข ๕๐-๐๐๔

การศึกษาพิษเรื้อรัง

แบ่งหนูโดยวิธีสุ่มออกเป็น ๗ กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนูเพศผู้ ๑๒ ตัว และเพศเมีย ๑๒ ตัว. กลุ่มที่ ๑ เป็นกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นทางปาก ปริมาตรวันละ ๑๐ มล./กก. กลุ่มที่ ๒ ถึง ๔ เป็นกลุ่มทดลองได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ ทางปาก ในขนาดวันละ ๐.๒๔, ๐.๑๒ และ ๓.๖ ก./กก. ตามลำดับเป็นเวลา ๖ เดือน หรือคิดเป็น ๑, ๕ และ ๑๕ เท่าของขนาดที่ใช้ในคน คือ ๑๒ กรัม/คน/วัน โดยคิดน้ำหนักตัว ๕๐ กก. กลุ่มที่ ๕ เป็นกลุ่มฟื้นตัว (๓.๖ อาร์) ได้รับสารสกัดสมุนไพรทางปากในขนาดวันละ ๓.๖

ก./กก. จนครบกำหนด ๖ เดือนเช่นกัน แล้วเลี้ยงหนูต่อไปอีกเป็นเวลา ๒ สัปดาห์ก่อนทำการผ่าซากชิ้นสุตรเพื่อใช้ศึกษา ดูว่าการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติที่พบยังคงอยู่ หรือคืนสู่สภาพปกติ. กลุ่มที่ ๖ เป็นกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นทางปากปริมาตรวันละ ๑๐ มล./กก. และกลุ่มที่ ๗ เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรขนาดวันละ ๓.๖ ก./กก. เป็นเวลา ๙ เดือน.

ในช่วงการทดลองเฝ้าสังเกตอาการผิดปกติและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ทุกวัน. บันทึกน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่หนูกินสัปดาห์ละ ๑ ครั้ง. เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดครบกำหนด อดอาหารหนูเป็นเวลา ๑๖ ชั่วโมง. จากนั้นดมสลบหนูด้วยอีเทอร์เปิดผ่าช่องท้อง เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำใหญ่หลอดเลือดหลัง นำไปตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Cell-Dyn[®] รุ่น ๓๕๐๐ เพื่อหาค่าตัวแปรเสริมทางโลหิตวิทยาคือ ฮีมาโตคริต, ฮีโมโกลบิน, จำนวนเม็ดเลือดแดง, ค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง (mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) และ mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)), จำนวนรวมและค่าร้อยละเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล, อีโอซิโนฟิล, ลิมโฟไซต์, โมโนไซต์, เบโซฟิล และจำนวนเกล็ดเลือด. ส่วนซีรัมนำไปตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เคมีในเลือดอัตโนมัติ Hitachi[®] รุ่น 912 เพื่อวัดค่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (ALP), อะลานีนอะมีโนทรานสเฟอเรส (ALT) แอสพาเทอะมิโนทรานสเฟอเรส (AST), ยูเรียไนโตรเจน (BUN), ครีอาตินิน, โปรตีนรวม, อัลบูมิน, บิลิรูบินรวม, กลูโคส, กรดยูริก, ไตรกลีเซอไรด์, คอเลสเตอรอล, โซเดียม, โปแตสเซียม และคลอไรด์

จากนั้นทำการผ่าซากสัตว์ทดลองเพื่อตรวจทางมหัพยาศวิทยาของสมอง, หัวใจ, ปอด, ตับ, ไต, หลอดลม, หลอดอาหาร, กระเพาะอาหาร, ม้าม, ลำไส้, ตับอ่อน, อัณฑะ, ต่อมลูกหมาก, ฤงเก็บน้ำเชื้อ, รังไข่, มดลูก, ต่อมม้าม, ต่อมมึนลาย, ต่อมมึนตา, ต่อมธัยรอยด์, ต่อมหมวกไตและกระเพาะปัสสาวะ. บันทึกน้ำหนักอวัยวะด้วยเครื่องชั่ง Metter Toledo[®] รุ่น PB

153 คำนวณหาน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์โดยคิดเป็นน้ำหนักอวัยวะต่อน้ำหนักตัวหนู ๑,๐๐๐ กรัม. เก็บอวัยวะต่าง ๆ ลงในน้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินเข้มข้นร้อยละ ๑๐ แล้วนำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อวิทยาย้อมด้วยสีฮีมาโตกโซลินและอีโอซินเพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา.

การวิเคราะห์ข้อมูล

น้ำหนักตัว, ปริมาณอาหารที่กิน, ค่าทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิก, น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ ใช้สถิติเชิงพรรณนา ในการทดลองพิษเรื้อรัง ๖ เดือน ใช้ one-way ANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้การทดสอบ Bonferroni ที่ระดับนัยสำคัญ ค่าที่ < ๐.๐๕ และการทดลองพิษเรื้อรัง ๙ เดือน ใช้การทดสอบ Student's t โดยโปรแกรม SPSS version ๑๑.๕. ส่วนปฏิบัติการของการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาใช้ Fisher exact ที่ (ค่าที่ < ๐.๐๕).

ผลการศึกษา

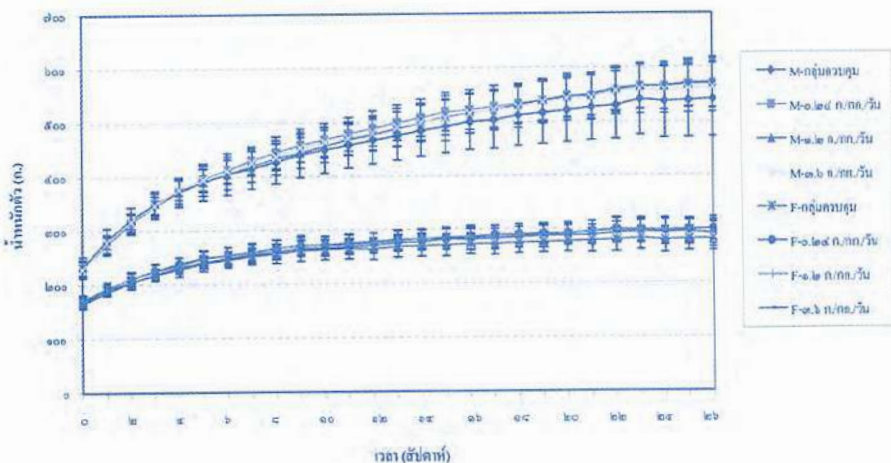
พิษเรื้อรัง ๖ เดือน

ผลต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ย การกินอาหารและสุขภาพของหนูทดลอง

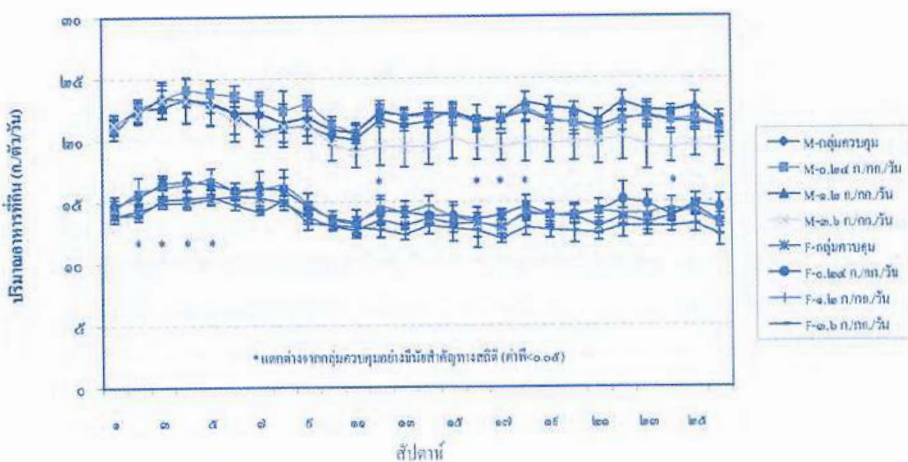
หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ วันละ ๓.๖ ก./กก. กินอาหารได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ ๑๒, ๑๖ ถึง ๑๘ และสัปดาห์ที่ ๒๔. ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดวันละ ๐.๒๔ และ ๑.๒ ก./กก. กินอาหารได้มากกว่ากลุ่มควบคุมเฉพาะช่วงแรกของการทดลอง (สัปดาห์ที่ ๒ ถึง ๕) เท่านั้น. อย่างไรก็ตามพบว่าหนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมตลอดการทดลอง (รูปที่ ๑ และ ๒)

ผลต่อน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์

หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ ทุกกลุ่มเป็นเวลา ๖ เดือน มีค่าน้ำหนักสัมพันธ์ของอวัยวะต่างๆ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นหนูเพศเมียกลุ่มพื้นตัว (๓.๖-อาร์) มีน้ำหนักสัมพันธ์ของต่อมหมวกไตซ้ายสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๑ และ ๒)



รูปที่ ๑ จำนวนไข่อ่อน (น.) ของหนุเทศผู้ (M) และเพชเมย (F) ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรรังจิโอะ ๑๔๘๖ เป็นเวลา ๖ เดือน



รูปที่ ๒ ปริมาณอาหารที่กิน (น./ตัว/วัน) ของหนุเทศผู้ (M) และเพชเมย (F) ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรรังจิโอะ ๑๔๘๖ เป็นเวลา ๖ เดือน

ผลทางโลหิตวิทยา

หนุเทศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรรังจิโอะ ๑๔๘๖ วันละ ๐.๒๔ น./กก./วัน มีค่าฮีโมโกลบินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ. หนุเทศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรรังจิโอะ วันละ ๑.๒ และ ๓.๖ น./กก. มีค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดง

ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ. หนุกลุ่มพื้นตัว (๓.๖-อาร์) มีค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๓). หนุเทศเมยที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรรังจิโอะ ๑๔๘๖ วันละ ๐.๒๔ น./กก. มีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๔)

ผลต่อค่าเคมีเวชกรรม

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด จีพีโอ ๑๙๘๖ ทุกขนาด มีค่าเคมีคลินิกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม. หนูกลุ่มฟื้นตัวมีระดับโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ(ตารางที่ ๕). หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด วันละ ๐.๒๔ ก./กก. มีค่าเอนไซม์เอแอลที สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และกลุ่มฟื้นตัวมีระดับโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๖).

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา

จากการผ่าซากชันสูตรไม่พบความผิดปกติ

ของอวัยวะระดับมหพยาธิวิทยาในหนูที่ได้รับสารสกัด จีพีโอ ๑๙๘๖ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม. การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด วันละ ๐.๒๔ ก./กก. มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ลิมโฟซัยต์ที่ชั้นใต้เยื่อของลำไส้เล็ก (GALT Proliferation) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ. ส่วนการเปลี่ยนแปลงอื่นๆที่พบนั้นมีอุบัติการณ์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

และไม่พบพยาธิสภาพใด ๆ ที่อวัยวะที่ทำการตรวจทั้งของหนูกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม. ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาแสดงไว้ในตารางที่ ๗ และ ๘.

ตารางที่ ๑ น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (ก./๑๐๐๐ก.) ของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๖ เดือน

อวัยวะ	กลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร (ก./กก./วัน)				
	๐	๐.๒๔	๑.๒	๓.๖	๓.๖-อาร์
	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว
สมอง	๔.๒๕ ± ๐.๖๖	๓.๘๔ ± ๐.๓๕	๓.๙๑ ± ๐.๓๗	๓.๘๙ ± ๐.๓๒	๔.๐๐ ± ๐.๒๕
หัวใจ	๒.๙๑ ± ๐.๓๔	๒.๗๐ ± ๐.๑๙	๒.๘๐ ± ๐.๒๐	๒.๘๖ ± ๐.๑๓	๒.๗๓ ± ๐.๒๐
ปอด	๓.๘๕ ± ๐.๖๙	๓.๕๓ ± ๐.๕๗	๓.๕๕ ± ๐.๒๙	๓.๕๒ ± ๐.๒๗	๓.๓๕ ± ๐.๔๑
ตับ	๒๗.๙๕ ± ๓.๐๗	๒๕.๕๕ ± ๒.๔๓	๒๕.๘๗ ± ๒.๗๘	๒๖.๕๑ ± ๒.๘๗	๒๖.๑๐ ± ๒.๔๑
กระเพาะอาหาร	๔.๐๒ ± ๐.๔๑	๓.๙๐ ± ๐.๕๕	๓.๙๒ ± ๐.๒๔	๔.๐๔ ± ๐.๔๑	๔.๐๘ ± ๐.๔๙
ม้าม	๑.๖๑ ± ๐.๒๑	๑.๕๗ ± ๐.๒๒	๑.๖๕ ± ๐.๓๕	๑.๖๐ ± ๐.๓๒	๑.๕๖ ± ๐.๑๗
โตซาวา	๒.๖๒ ± ๐.๓๗	๒.๓๘ ± ๐.๒๒	๒.๔๓ ± ๐.๒๕	๒.๕๕ ± ๐.๔๐	๒.๔๑ ± ๐.๑๘
โตซาย	๒.๕๕ ± ๐.๓๘	๒.๒๗ ± ๐.๒๐	๒.๓๑ ± ๐.๒๔	๒.๓๗ ± ๐.๒๘	๒.๓๓ ± ๐.๑๗
รังไข่ขวา	๕.๖๓ ± ๐.๕๕	๕.๓๒ ± ๐.๖๐	๕.๐๖ ± ๐.๙๐	๕.๓๓ ± ๐.๕๑	๕.๔๕ ± ๐.๕๑
รังไข่ซ้าย	๕.๗๕ ± ๐.๕๕	๕.๒๒ ± ๐.๗๘	๕.๔๒ ± ๐.๕๖	๕.๒๖ ± ๐.๕๖	๕.๔๑ ± ๐.๓๔
ต่อมหมวกโตซาวา	๐.๐๗ ± ๐.๐๑	๐.๐๖ ± ๐.๐๑	๐.๐๗ ± ๐.๐๑	๐.๐๖ ± ๐.๐๑	๐.๐๗ ± ๐.๐๔
ต่อมหมวกโตซาย	๐.๐๗ ± ๐.๐๑	๐.๐๗ ± ๐.๐๑	๐.๐๗ ± ๐.๐๒	๐.๐๗ ± ๐.๐๑	๐.๐๙ ± ๐.๐๔
กระเพาะปัสสาวะ	๐.๓๔ ± ๐.๐๔	๐.๓๒ ± ๐.๐๗	๐.๒๙ ± ๐.๐๕	๐.๓๐ ± ๐.๐๔	๐.๖๕ ± ๐.๗๕

ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ ๒ น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (ก./๑๐๐กก.) ของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๖ เดือน

อวัยวะ	กลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรร (ก./กก./วัน)				
	๐	๐.๒๕	๑.๒	๓.๖	๓.๖-อาร์
	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว
สมอง	๗.๑๘ ± ๐.๕๓	๖.๙๓ ± ๐.๕๑	๖.๙๑ ± ๐.๕๑	๖.๙๗ ± ๐.๓๗	๗.๑๙ ± ๐.๕๔
หัวใจ	๓.๖๗ ± ๐.๑๙	๓.๕๐ ± ๐.๑๙	๓.๕๔ ± ๐.๒๑	๓.๕๑ ± ๐.๒๕	๓.๕๙ ± ๐.๓๑
ปอด	๕.๙๕ ± ๐.๖๓	๕.๗๕ ± ๐.๕๐	๕.๗๑ ± ๐.๒๕	๕.๕๗ ± ๐.๓๖	๕.๖๐ ± ๐.๓๒
ตับ	๒๗.๕๕ ± ๒.๘๐	๒๘.๐๒ ± ๓.๐๕	๒๖.๓๗ ± ๒.๘๙	๒๖.๙๑ ± ๒.๐๒	๒๙.๕๖ ± ๔.๑๘
กระเพาะอาหาร	๕.๘๓ ± ๒.๘๐	๒๘.๐๒ ± ๓.๐๕	๒๖.๓๗ ± ๒.๘๙	๒๖.๙๑ ± ๒.๐๒	๒๙.๕๖ ± ๔.๑๘
ม้าม	๒.๑๓ ± ๐.๓๐	๒.๐๐ ± ๐.๒๑	๒.๐๖ ± ๐.๓๓	๑.๙๐ ± ๐.๑๙	๒.๑๕ ± ๐.๒๗
ไตขวา	๒.๙๖ ± ๐.๒๒	๓.๐๑ ± ๐.๒๕	๓.๐๗ ± ๐.๑๕	๒.๙๕ ± ๐.๒๓	๓.๐๘ ± ๐.๓๒
ไตซ้าย	๒.๘๘ ± ๐.๒๓	๒.๙๗ ± ๐.๒๙	๒.๙๑ ± ๐.๑๙	๒.๘๗ ± ๐.๑๗	๒.๘๘ ± ๐.๓๐
ต่อมหมวกไตขวา	๐.๑๓ ± ๐.๐๒	๐.๑๓ ± ๐.๐๒	๐.๑๓ ± ๐.๐๒	๐.๑๓ ± ๐.๐๒	๐.๑๖ ± ๐.๐๔
ต่อมหมวกไตซ้าย	๐.๑๕ ± ๐.๐๒	๐.๑๕ ± ๐.๐๓	๐.๑๕ ± ๐.๐๓	๐.๑๕ ± ๐.๐๓	๐.๑๙ ± ๐.๐๕
กระเพาะปัสสาวะ	๐.๓๕ ± ๐.๐๔	๐.๓๒ ± ๐.๐๗	๐.๓๕ ± ๐.๐๖	๐.๓๐ ± ๐.๐๔	๐.๓๐ ± ๐.๐๖
มดลูก	๒.๙๐ ± ๐.๙๒	๒.๖๒ ± ๑.๘๘	๒.๐๙ ± ๐.๕๑	๒.๕๗ ± ๑.๒๒	๒.๕๕ ± ๐.๗๙
รังไข่ขวา	๐.๓๐ ± ๐.๐๔	๐.๒๘ ± ๐.๐๕	๐.๒๘ ± ๐.๐๕	๐.๒๕ ± ๐.๐๓	๐.๓๕ ± ๐.๐๗
รังไข่ซ้าย	๐.๒๖ ± ๐.๐๕	๐.๒๖ ± ๐.๐๖	๐.๒๘ ± ๐.๐๕	๐.๒๖ ± ๐.๐๖	๐.๓๒ ± ๐.๐๗

ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ค่าพี < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๓ ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๖ เดือน

ตัวแปรเสริม	กลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรร (ก./กก./วัน)					ค่าปกติ
	๐	๐.๒๕	๑.๒	๓.๖	๓.๖-อาร์	
	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	
ฮีมาโทคริต (%)	๕๕.๓๒ ± ๓.๙๕	๕๕.๘๗ ± ๒.๑๙	๕๕.๙๕ ± ๒.๕๕	๕๕.๘๘ ± ๒.๐๓	๕๙.๕๓ ± ๓.๒๒	๔๕.๕-๕๓.๕
ฮีโมโกลบิน (ก./ดล.)	๑๗.๑๓ ± ๑.๑๓	๑๖.๐๘ ± ๐.๖๓	๑๕.๙๗ ± ๐.๗๒	๑๕.๙๐ ± ๐.๖๕	๑๖.๑๘ ± ๐.๘๑	๑๒.๐-๑๗.๕
เม็ดเลือดแดง (x ๑๐๖ เซลล์/มม ^๓)	๙.๕๖ ± ๐.๖๖	๙.๐๕ ± ๐.๕๒	๘.๘๙ ± ๐.๓๙	๘.๘๔ ± ๐.๕๒	๙.๐๒ ± ๐.๖๐	๓.๒๐-๙.๖
MCV (fl/red cell)	๕๖.๓๒ ± ๓.๕๕	๕๕.๑๒ ± ๐.๙๐	๕๕.๐๘ ± ๒.๐๘	๕๕.๓๐ ± ๑.๕๗	๕๕.๙๕ ± ๑.๙๒	๕๓-๖๕
MCH (pg/red cell)	๑๘.๑๓ ± ๑.๑๓	๑๗.๘๐ ± ๐.๕๗	๑๗.๙๖ ± ๐.๓๖	๑๗.๙๙ ± ๐.๕๕	๑๗.๙๖ ± ๐.๗๐	๑๕.๖-๒๑.๓
MCHC (ก./ดล. เม็ดเลือดแดง)	๓๒๑.๑๘ ± ๐.๕๗	๓๒๓.๓๐ ± ๐.๔๘	๓๒๒.๖๒ ± ๐.๕๐	๓๒๓.๕๓ ± ๐.๖๐	๓๒๓.๗๐ ± ๐.๗๒	๒๖-๓๘
เม็ดเลือดขาว (x ๑๐๓ เซลล์/มม ^๓)	๓.๒๒ ± ๐.๙๒	๓.๕๐ ± ๐.๗๓	๓.๖๕ ± ๐.๓๕	๒.๙๙ ± ๐.๕๙	๓.๐๖ ± ๐.๔๔	๕-๘.๙๖
นิวโทรฟิล (%)	๒๒.๐๖ ± ๓.๗๕	๒๓.๓๑ ± ๔.๙๕	๒๔.๖๗ ± ๓.๐๖	๒๗.๘๓ ± ๙.๙๙	๒๑.๓๘ ± ๕.๗๓	๙-๓๕
อีโอซิโนฟิล (%)	๑.๕๕ ± ๐.๕๐	๑.๘๓ ± ๐.๖๓	๑.๕๗ ± ๐.๕๐	๑.๕๕ ± ๐.๕๒	๑.๖๐ ± ๐.๓๕	๐-๒.๕
ลิมโฟไซต์ (%)	๗๒.๕๘ ± ๓.๗๘	๖๙.๕๒ ± ๙.๘๑	๖๗.๖๐ ± ๙.๗๘	๖๕.๙๐ ± ๙.๓๑	๗๓.๐๘ ± ๖.๑๕	๖๕-๘๕.๕
โมโนไซต์ (%)	๒.๕๙ ± ๒.๒๒	๓.๙๐ ± ๓.๐๖	๓.๙๐ ± ๓.๓๐	๒.๙๘ ± ๒.๕๑	๒.๕๐ ± ๒.๒๘	๐-๕
เบโซฟิล (%)	๑.๒๘ ± ๐.๙๐	๑.๕๓ ± ๐.๙๖	๒.๐๘ ± ๑.๘๘	๑.๘๓ ± ๑.๒๒	๑.๕๕ ± ๑.๑๖	๐-๑.๕
เกล็ดเลือด (x ๑๐๓ เซลล์/มม ^๓)	๙๖๓.๑๒ ± ๑๓๖.๒๘	๙๖๓.๖๒ ± ๑๓๖.๘๗	๙๖๓.๒๙ ± ๙๕.๖๖	๙๕๓.๓๓ ± ๑๓๖.๙๙	๙๖๐.๒๖ ± ๑๓๖.๙๙	๖๖๖-๙๙๒

ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ค่าพี < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๔ ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีทีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๖ เดือน

ตัวแปรเสริม	กลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร (ก./กก./วัน)					ค่าปกติ
	๐	๐.๒๕	๑.๒	๓.๖	๓.๖-ฮาร์รี่	
	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	
ฮีมาโทคริต (%)	๔๔.๕๕ ± ๒.๓๒	๕๐.๗๖ ± ๒.๔๔	๔๘.๗๗ ± ๓.๒๑	๔๙.๓๙ ± ๒.๐๑	๔๙.๐๕ ± ๓.๑๘	๔๕.๓-๕๕.๒
ฮีโมโกลิน (ก./ดล.)	๑๖.๐๕ ± ๐.๘๔	๑๖.๕๙ ± ๐.๙๑	๑๖.๐๕ ± ๑.๐๗	๑๖.๐๕ ± ๐.๘๑	๑๖.๖๖ ± ๑.๑๙	๑๒-๑๗.๕
เม็ดเลือดแดง (x ๑๐๖เซลล์/มม ^๓)	๕.๒๖ ± ๐.๕๖	๕.๖๓ ± ๐.๖๖	๕.๓๕ ± ๐.๕๒	๕.๕๕ ± ๐.๓๕	๕.๕๑ ± ๐.๖๒	๗.๒-๙.๖
MCV (fl/red cell)	๕๕.๘๕ ± ๑.๑๑	๕๕.๘๙ ± ๑.๑๕	๕๕.๘๙ ± ๑.๕๖	๕๕.๘๘ ± ๑.๑๓	๕๕.๓๓ ± ๑.๙๓	๕๗-๖๕
MCH (pg/red cell)	๑๙.๕๓ ± ๐.๔๕	๑๙.๒๐ ± ๑.๑๐	๑๙.๒๕ ± ๐.๕๗	๑๙.๐๕ ± ๐.๕๔	๑๙.๒๓ ± ๐.๕๑	๑๕.๖-๒๑.๓
MCHC (ก./ดล. เม็ดเลือดแดง)	๓๓.๐๓ ± ๐.๕๑	๓๓.๕๙ ± ๐.๗๒	๓๒.๙๖ ± ๐.๕๘	๓๒.๕๗ ± ๐.๕๒	๓๒.๙๘ ± ๐.๕๗	๒๖-๓๕
เม็ดเลือดขาว (x ๑๐๓เซลล์/มม ^๓)	๑.๕๒ ± ๐.๓๑	๑.๖๖ ± ๐.๒๙	๑.๖๒ ± ๐.๕๒	๑.๗๑ ± ๐.๕๖	๑.๗๕ ± ๐.๖๙	๕-๘.๖
นิวโทรฟิล (%)	๒๕.๕๘ ± ๖.๕๓	๒๘.๐๙ ± ๕.๕๒	๒๘.๗๓ ± ๕.๗๒	๒๘.๓๐ ± ๕.๒๗	๒๘.๑๗ ± ๕.๑๙	๙-๓๔
อีโอซิโนฟิล (%)	๑.๑๕ ± ๐.๑๕	๑.๒๗ ± ๐.๕๕	๑.๓๖ ± ๐.๕๙	๑.๐๘ ± ๐.๕๙	๑.๒๒ ± ๐.๕๓	๐-๒.๕
ลิมโฟไซต์ (%)	๖๗.๐๘ ± ๖.๘๖	๗๐.๘๗ ± ๕.๕๙	๗๐.๓๓ ± ๖.๓๓	๗๒.๒๖ ± ๕.๕๐	๗๐.๘๕ ± ๕.๙๖	๖๕-๘๕.๕
โมโนไซต์ (%)	๔.๐๕ ± ๒.๗๖	๒.๗๕ ± ๑.๙๑	๒.๒๗ ± ๒.๒๖	๒.๑๑ ± ๑.๖๖	๒.๒๒ ± ๑.๖๕	๐-๕
เบโซฟิล (%)	๑.๓๗ ± ๑.๐๐	๑.๐๕ ± ๐.๖๖	๑.๓๑ ± ๐.๖๖	๑.๑๕ ± ๐.๗๙	๑.๒๐ ± ๐.๖๐	๐-๕.๕
เกล็ดเลือด (x ๑๐๓เซลล์/มม ^๓)	๙๐๕.๐๕ ± ๕๗.๐๕	๙๒๑.๐๕ ± ๕๗.๗๒	๘๗๑.๐๕ ± ๖๗.๐๗	๘๖๖.๓๓ ± ๖๗.๙๐	๘๙๑.๒๕ ± ๖๗.๐๕	๕๐๓.๐-๙๗๙.๐

ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ค่าพี < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๕ ค่าทางเคมีคลินิกของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีทีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๖ เดือน

ตัวแปรเสริม	กลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร (ก./กก./วัน)					ค่าปกติ
	๐	๐.๒๕	๑.๒	๓.๖	๓.๖-ฮาร์รี่	
	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	
ALP (U/L)	๔๖.๙๓ ± ๖.๗๒	๕๔.๕๐ ± ๙.๒๘	๕๐.๕๒ ± ๖.๘๖	๕๒.๓๓ ± ๕.๘๐	๕๕.๕๕ ± ๖.๘๖	๔๖.๘-๑๒๘.๐
ALT (U/L)	๔๙.๐๐ ± ๓๑.๔๘	๓๗.๕๒ ± ๑๓.๕๕	๓๖.๕๕ ± ๑๐.๓๓	๓๕.๖๗ ± ๑๑.๖๒	๔๙.๓๓ ± ๒๓.๒๒	๒๘.๙-๕๗.๖
AST (U/L)	๙๕.๒๕ ± ๒๐.๓๐	๘๘.๕๒ ± ๑๙.๘๐	๘๙.๗๕ ± ๘.๒๘	๙๕.๕๕ ± ๒๑.๗๘	๙๖.๑๗ ± ๓๓.๖๐	๑๐๓.๐-๒๐๓.๐
BUN (มก./ดล.)	๒๒.๗๓ ± ๒.๑๓	๒๐.๘๓ ± ๒.๕๕	๑๙.๖๙ ± ๒.๓๖	๑๙.๘๖ ± ๓.๙๐	๒๑.๘๘ ± ๓.๒๕	๕-๒๙
ครีเอตินีน (มก./ดล.)	๐.๖๕ ± ๐.๐๗	๐.๖๖ ± ๐.๐๘	๐.๖๕ ± ๐.๐๖	๐.๖๓ ± ๐.๐๙	๐.๖๓ ± ๐.๐๘	๐.๒-๐.๘
โปรตีนรวม (ก./ดล.)	๖.๕๕ ± ๐.๓๙	๖.๙๕ ± ๐.๓๓	๖.๘๐ ± ๐.๓๑	๖.๘๐ ± ๐.๒๑	๖.๙๙ ± ๐.๒๓	๕.๗-๘.๕
อัลบูมิน (มก./ดล.)	๔.๕๐ ± ๐.๑๗	๔.๕๓ ± ๐.๒๑	๔.๕๕ ± ๐.๑๕	๔.๕๕ ± ๐.๒๙	๔.๕๘ ± ๐.๑๖	๒.๗-๕.๑
บิลิรูบิน (มก./ดล.)	๐.๑๒ ± ๐.๐๓	๐.๑๕ ± ๐.๐๓	๐.๑๐ ± ๐.๐๔	๐.๑๐ ± ๐.๐๓	๐.๑๕ ± ๐.๐๓	๐.๐-๐.๕๕
กลูโคส (มก./ดล.)	๒๒๘.๒๐ ± ๖๕.๐๙	๒๕๘.๖๗ ± ๗๔.๐๒	๒๔๙.๐๑ ± ๓๘.๖๐	๒๕๗.๗๒ ± ๖๗.๕๕	๒๕๘.๕ ± ๓๘.๕๒	๑๓๐.๐-๒๖๗.๐
กรดยูริก (มก./ดล.)	๕.๓๘ ± ๑.๓๓	๕.๕๒ ± ๒.๐๓	๕.๓๓ ± ๑.๖๕	๕.๘๘ ± ๑.๕๑	๕.๕๕ ± ๑.๕๖	๑.๒-๗.๕
ไตรกลีเซอไรด์ (มก./ดล.)	๖๙.๖๐ ± ๒๕.๘๙	๘๐.๗๐ ± ๔๐.๘๐	๖๙.๕๕ ± ๒๒.๕๐	๗๑.๕๕ ± ๒๗.๕๐	๘๖.๘๘ ± ๓๖.๗๒	๕๓.๐-๑๒๕.๘
คอเลสเตอรอล (มก./ดล.)	๗๗.๐๒ ± ๑๑.๕๗	๘๕.๕๓ ± ๒๐.๓๙	๗๒.๐๐ ± ๑๐.๙๐	๘๐.๐๓ ± ๑๑.๖๖	๘๐.๘๐ ± ๑๘.๖๗	๕๕.๐-๙๒.๐
Na ⁺ (mmol/l)	๑๕๓.๕๖ ± ๑.๑๑	๑๕๓.๒๕ ± ๑.๗๗	๑๕๔.๕๕ ± ๑.๗๓	๑๕๔.๗๕ ± ๒.๐๘	๑๕๓.๐๐ ± ๒.๐๙	๑๕๓.๐-๑๕๖.๐
K ⁺ (mmol/l)	๓.๕๓ ± ๑.๖๘	๖.๕๓ ± ๑.๕๔	๖.๕๓ ± ๑.๑๖	๖.๕๕ ± ๑.๖๑	๖.๗๒ ± ๑.๗๗	๕.๕-๗.๐
Cl ⁻ (mmol/l)	๑๐๔.๗๕ ± ๒.๐๑	๑๐๕.๕๕ ± ๕.๕๓	๑๐๕.๗๕ ± ๒.๒๘	๑๐๕.๗๕ ± ๑.๗๗	๑๐๗.๐๐ ± ๑.๒๘	๑๐๐.๐-๑๑๐.๐

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพี < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๖ ค่าทางเคมีคลินิกของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๖ เดือน

ตัวแปรเสริม	กลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร (ก./กก./วัน)					
	๐	๐.๒๕	๑.๒	๓.๖	๓.๖-อาร์	ค่าปกติ
	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	
ALP (U/L)	๒๒๒.๐๐ ± ๕.๖๕	๒๐.๙๒ ± ๓.๒๙	๒๑.๘๓ ± ๕.๒๕	๒๑.๐๐ ± ๕.๗๕	๒๓.๙๒ ± ๓.๖๑	๕๖.๕-๑๒๘.๐
ALT (U/L)	๒๙.๐๐ ± ๕.๕๓	๕๒.๘๓ ± ๑๓.๑๖*	๓๕.๐๕ ± ๑๓.๐๕	๓๑.๖๕ ± ๑๑.๗๖	๓๕.๐๕ ± ๕.๕๓	๒๘.๙-๕๗.๖
AST (U/L)	๘๕.๕๒ ± ๙.๖๑	๑๐๘.๕๐ ± ๒๒.๙๕	๙๘.๙๒ ± ๓๖.๑๓	๙๘.๐๙ ± ๑๖.๐๕	๙๘.๓๓ ± ๑๖.๐๒	๘๗.๐-๒๑๗.๐
BUN (มก./ดล.)	๒๕.๘๐ ± ๗.๐๕	๒๕.๖๒ ± ๒.๙๒	๒๓.๙๙ ± ๕.๕๖	๒๕.๙๐ ± ๕.๕๕	๒๓.๗๒ ± ๕.๖๖	๕-๒๙
ครีเอตินีน (มก./ดล.)	๐.๖๙ ± ๐.๑๒	๐.๖๕ ± ๐.๐๗	๐.๖๕ ± ๐.๑๑	๐.๗๑ ± ๐.๑๕	๐.๖๗ ± ๐.๐๘	๐.๒-๐.๘
โปรตีนรวม (ก./ดล.)	๖.๘๙ ± ๐.๓๐	๖.๘๕ ± ๐.๓๗	๖.๗๙ ± ๐.๓๓	๖.๗๗ ± ๐.๒๒	๓.๒๕ ± ๐.๕๗	๕.๗-๘.๕
อัลบูมิน (มก./ดล.)	๕.๗๕ ± ๐.๑๗	๕.๗๙ ± ๐.๒๕	๕.๘๐ ± ๐.๒๕	๕.๕๒ ± ๐.๑๖	๕.๐๐ ± ๐.๓๕	๒.๗-๕.๑
บิลิรูบิน (มก./ดล.)	๐.๑๖ ± ๐.๐๕	๐.๑๕ ± ๐.๐๖	๐.๑๗ ± ๐.๐๕	๐.๑๕ ± ๐.๐๓	๐.๑๖ ± ๐.๐๓	๐.๐-๐.๕๕
กลูโคส (มก./ดล.)	๑๖๖.๖๘ ± ๒๙.๙๕	๑๘๖.๖๘ ± ๓๖.๑๕	๑๖๖.๗๖ ± ๑๕.๓๓	๑๖๖.๖๐ ± ๒๑.๖๖	๑๕๕.๑๗ ± ๓๖.๗๓	๗๖.๐-๑๕๓.๐
กรดยูริก (มก./ดล.)	๓.๑๓ ± ๐.๘๘	๓.๓๓ ± ๑.๐๘	๒.๕๐ ± ๑.๑๕	๒.๘๓ ± ๐.๖๐	๓.๖๖ ± ๑.๒๐	๑.๒-๓.๕
ไตรกลีเซอไรด์ (มก./ดล.)	๓๘.๕๒ ± ๖.๖๖	๕๒.๖๙ ± ๗.๖๑	๓๕.๕๓ ± ๖.๖๕	๓๙.๒๕ ± ๖.๑๓	๕๓.๘๙ ± ๑๑.๐๘	๓๙.๑-๗๒.๕
คอเลสเตอรอล (มก./ดล.)	๗๑.๗๗ ± ๒๐.๕๕	๗๒.๒๗ ± ๑๕.๓๗	๖๙.๑๕ ± ๑๕.๘๕	๗๕.๙๙ ± ๑๓.๒๒	๖๘.๕๓ ± ๑๕.๕๕	๓๑.๐-๖๕.๐
Na [±] (mmol/l)	๑๕๓.๐๐ ± ๒๐.๙๕	๑๕๓.๐๐ ± ๑๕.๕๕	๑๕๓.๕๐ ± ๑๑.๑๗	๑๕๓.๒๕ ± ๑๕.๗๗	๑๕๓.๓๓ ± ๑๕.๕๐*	๑๕๓.๐-๑๕๖.๐
K [±] (mmol/l)	๖.๕๗ ± ๑.๓๖	๗.๓๓ ± ๑.๖๙	๕.๘๕ ± ๑.๒๖	๖.๗๗ ± ๑.๗๙	๗.๕๑ ± ๑.๕๕	๕.๕-๗.๐
Cl ⁻ (mmol/l)	๑๐๗.๙๒ ± ๑๑.๗๓	๑๐๗.๕๕ ± ๒๑.๒๕	๑๐๘.๓๓ ± ๒๑.๖๖	๑๐๘.๐๕ ± ๑๕.๕๕	๑๐๗.๖๗ ± ๑๕.๕๕	๑๐๐.๐-๑๑๐.๐

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่ <๐.๐๕)

ตารางที่ ๗ ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๖ เดือน

ตัวแปรเสริม	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	กลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร (ก./กก./วัน)				
		๐	๐.๒๕	๑.๒	๓.๖	๓.๖-อาร์
ปอด	BALT proliferation	๖/๑๒	๖/๑๒	๑๐/๑๒	๗/๑๒	๖/๑๒
หัวใจ	Myocardiosis	๐/๑๒	๐/๑๒	๓/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
ตับ	Bile ductile proliferation	๐/๑๒	๐/๑๒	๑/๑๒	๑/๑๒	๐/๑๒
	Centriobular fatty degeneration	๓/๑๒	๐/๑๒	๓/๑๒	๓/๑๒	๒/๑๒
ไต	Tubular cast	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
ลำไส้เล็ก	GALT proliferation	๑/๑๒	๖/๑๒*	๕/๑๒	๑/๑๒	๑/๑๒
ลำไส้ใหญ่	GALT proliferation	๐/๑๒	๐/๑๒	๒/๑๒	๑/๑๒	๑/๑๒
ต่อมหมวกไต	Cortical fatty infiltration	๕/๑๒	๘/๑๒	๘/๑๒	๘/๑๒	๘/๑๒
	Cortical congestion	๐/๑๒	๐/๑๒	๑/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
	Cortical hyperplasia	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของจำนวนหนูที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าที่ <๐.๐๕)

BALT : Bronchiole-associated lymphoid tissue GALT : Gut-associated lymphoid tissue

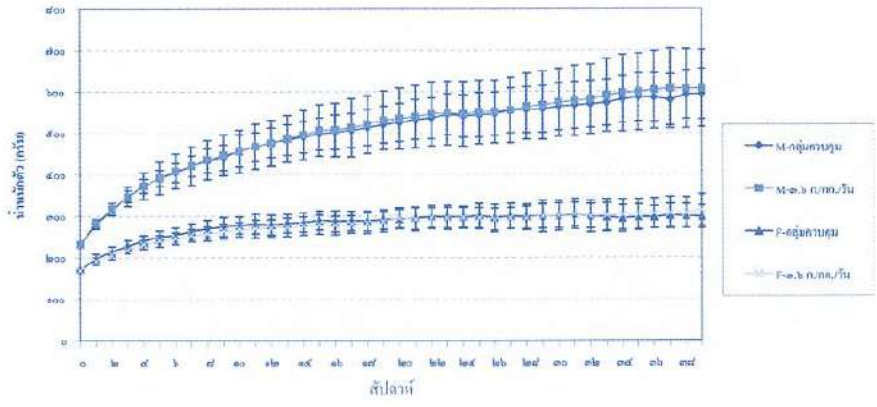
ตารางที่ ๘ ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๖ เดือน

ตัวแปรเสริม	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	กลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร (ก./กก./วัน)				
		๐	๐.๒๔	๑.๒	๓.๖	๓.๖-๒๖ ไร่
ปอด	BALT proliferation	๒/๑๒	๕/๑๒	๓/๑๒	๖/๑๒	๑/๑๒*
หัวใจ	Myocardiosis	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
ตับ	Bile ductile proliferation	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
	Centriobular fatty degeneration	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
ไต	Tubular cast	๑/๑๒	๑/๑๒	๑/๑๒	๑/๑๒	๐/๑๒
ลำไส้เล็ก	GALT proliferation	๒/๑๒	๑/๑๒*	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
ลำไส้ใหญ่	GALT proliferation	๔/๑๒	๒/๑๒	๑/๑๒	๒/๑๒	๐/๑๒
ต่อมหมวกไต	Cortical fatty infiltration	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
	Cortical congestion	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒
	Cortical hyperplasia	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๒

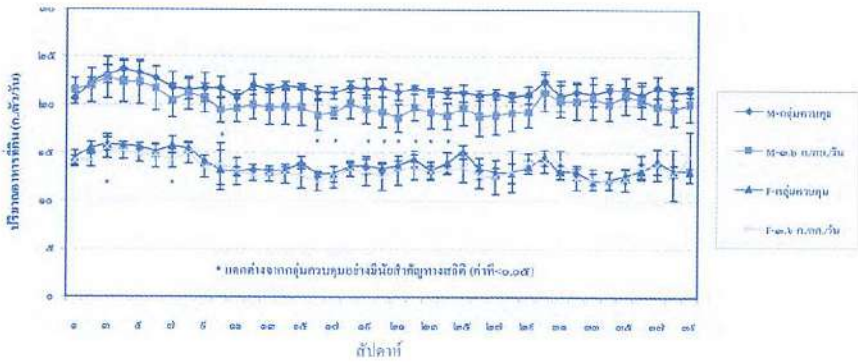
ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของจำนวนหนูที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพี < ๐.๐๕)

BALT : Bronchiole-associated lymphoid tissue GALT : Gut-associated lymphoid tissue



รูปที่ ๓ จำนวนเม็ดเลือดขาว (น.) ของหนูเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรจีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๙ เดือน



รูปที่ ๔ ปริมาณอาหารที่กิน (ก./ตัว/วัน) ของหนูเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรจีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๔ เดือน

พิษเรื้อรัง ๔ เดือน

ผลต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ย การกินอาหารและสุขภาพของหนูทดลอง

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ วันละ ๓.๖ ก./กก. นาน ๔ เดือน กินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในสัปดาห์ที่ ๑๐, ๑๖, ๑๗ และ ๑๙ ถึง ๒๔ และหนูเพศเมียกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะสัปดาห์ที่ ๓ และ ๗. อย่างไรก็ตามพบว่า หนูที่ได้รับสารสกัดมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด (รูปที่ ๓ และ ๔) ตลอดการทดลอง ๔ เดือนพบว่า หนูที่ได้รับสารสกัด ขนาดวันละ ๓.๖ ก./กก. มีสุขภาพและอาการแสดงออกเป็นปกติไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม.

ผลต่อน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ วันละ ๓.๖ ก./กก. มีน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ต่างๆ ไม่แตกต่างจาก กลุ่มควบคุม. หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด วันละ ๓.๖ ก./กก. มีน้ำหนักสัมพันธ์ของ

ไตซ้ายสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมแต่น้ำหนักสัมพันธ์ของมดลูกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๙)

ผลทางโลหิตวิทยา

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ วันละ ๓.๖ ก./กก. มีค่าฮีมาโตคริต, ฮีโมโกลบิน และจำนวนเม็ดเลือดแดงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ. หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด วันละ ๓.๖ ก./กก. มีจำนวนเกล็ดเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๑๐)

ตารางที่ ๙ นำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (ก./๑๐๐ก.) ของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๙ เดือน

อวัยวะ	หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด (ก./กก./วัน)		หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด (ก./กก./วัน)	
	๐	๓.๖	๐	๓.๖
	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว	๑๑ ตัว
สมอง	๓.๘๕ ± ๐.๓๘	๓.๗๑ ± ๐.๖๓	๖.๙๓ ± ๐.๖๖	๖.๙๒ ± ๑.๒๙
หัวใจ	๒.๕๗ ± ๐.๒๕	๒.๖๓ ± ๐.๓๕	๓.๒๘ ± ๐.๒๒	๓.๓๙ ± ๐.๓๒
ปอด	๓.๑๕ ± ๐.๒๕	๓.๒๑ ± ๐.๖๘	๔.๓๓ ± ๐.๘๙	๔.๔๕ ± ๐.๖๒
ตับ	๒๕.๓๑ ± ๒.๘๗	๒๕.๗๙ ± ๒.๖๙	๒๖.๑๗ ± ๔.๕๕	๒๗.๒๙ ± ๓.๑๙
กระเพาะอาหาร	๔.๒๖ ± ๐.๔๗	๔.๑๒ ± ๐.๔๕	๕.๙๔ ± ๐.๘๑	๖.๐๔ ± ๐.๗๒
ม้าม	๑.๖๘ ± ๐.๓๗	๑.๕๗ ± ๐.๑๘	๒.๑๓ ± ๐.๒๕	๑.๙๔ ± ๐.๒๗
โตขวาง	๒.๘๖ ± ๐.๓๓	๒.๘๘ ± ๐.๕๐	๒.๘๗ ± ๐.๒๖	๓.๐๘ ± ๐.๒๘
โตซ้าย	๒.๒๕ ± ๐.๒๒	๒.๓๕ ± ๐.๓๕	๒.๗๑ ± ๐.๑๙	๒.๘๙ ± ๐.๒๓*
อัมตะขวา	๔.๙๗ ± ๑.๑๐	๔.๙๕ ± ๐.๙๗	-	-
อัมตะซ้าย	๔.๙๕ ± ๐.๙๗	๔.๙๙ ± ๐.๗๖	-	-
ต่อมหมวกไตขวา	๐.๐๕ ± ๐.๐๑	๐.๐๖ ± ๐.๐๑	๐.๑๒ ± ๐.๐๒	๐.๑๒ ± ๐.๐๓
ต่อมหมวกไตซ้าย	๐.๐๖ ± ๐.๐๑	๐.๐๖ ± ๐.๐๑	๐.๑๓ ± ๐.๐๒	๐.๑๓ ± ๐.๐๓
กระเพาะปัสสาวะ	๐.๓๒ ± ๐.๐๖	๐.๓๑ ± ๐.๐๖	๐.๓๓ ± ๐.๐๔	๐.๓๑ ± ๐.๐๓
มดลูก	-	-	๓.๑๘ ± ๑.๑๑	๒.๑๒ ± ๐.๘๑*
รังไข่ขวา	-	-	๐.๒๕ ± ๐.๐๕	๐.๒๖ ± ๐.๐๕
รังไข่ซ้าย	-	-	๐.๒๗ ± ๐.๐๖	๐.๒๕ ± ๐.๐๕

ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพี < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๑๐ ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๙ เดือน

ตัวแปรเสริม	หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด (ก./กก./วัน)			หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด (ก./กก./วัน)		
	๐	๓.๖	ค่าปกติ	๐	๓.๖	ค่าปกติ
	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว		๑๒ ตัว	๑๑ ตัว	
ฮีมาโทคริต (%)	๔๙.๑๑ ± ๓.๒๖	๕๕.๘๘ ± ๑.๙๖*	๔๔.๕-๕๒.๕	๔๕.๘๓ ± ๒.๐๘	๕๖.๖๑ ± ๕.๑๘	๔๘.๓-๕๕.๒
ฮีโมโกลิน (ก./ดล.)	๑๖.๐๒ ± ๐.๙๑	๑๕.๒๕ ± ๐.๘๖*	๑๒.๐-๑๗.๕	๑๕.๐๔ ± ๐.๖๗	๑๕.๓๕ ± ๑.๑๘	๑๒.๐-๑๗.๕
เม็ดเลือดแดง (x ๑๐๖ เซลล์/มม ^๓)	๕.๘๓ ± ๐.๔๐	๕.๓๐ ± ๐.๕๒*	๗.๒-๙.๖	๗.๘๐ ± ๐.๓๐	๗.๙๒ ± ๐.๗๔	๗.๒-๙.๖
MCV (fl/red cell)	๕๕.๕๐ ± ๒.๐๔	๕๕.๓๓ ± ๐.๙๘	๕๗-๖๕	๕๕.๒๖ ± ๑.๕๕	๕๕.๘๗ ± ๑.๓๐	๕๗.๐-๖๕.๐
MCH (pg/red cell)	๑๘.๑๕ ± ๐.๖๒	๑๘.๘๘ ± ๐.๘๗	๑๘.๖-๒๑.๓	๑๙.๒๘ ± ๐.๗๒	๑๙.๕๒ ± ๐.๖๘	๑๘.๖-๒๑.๓
MCHC (ก./ดล. เม็ดเลือดแดง)	๓๒.๗๒ ± ๐.๗๒	๓๓.๓๓ ± ๑.๓๓	๒๖.๐-๓๕.๐	๓๓.๑๒ ± ๑.๖๑	๓๒.๙๖ ± ๑.๕๙	๒๖.๐-๓๕.๐
เม็ดเลือดขาว (x ๑๐๓ เซลล์/มม ^๓)	๓.๒๗ ± ๐.๕๕	๓.๘๕ ± ๐.๖๕	๕.๐-๘.๖๖	๑.๘๙ ± ๐.๕๕	๒.๐๐ ± ๐.๕๘	๕.๐-๘.๖๖
นิวโทรฟิล (%)	๒๘.๔๔ ± ๕.๕๘	๒๗.๕๕ ± ๔.๔๗	๙.๐-๓๕.๐	๒๘.๐๘ ± ๓.๒๗	๓๐.๗๗ ± ๙.๘๘	๙.๐-๓๕.๐
อีโอซิโนฟิล (%)	๑.๙๗ ± ๐.๗๙	๑.๘๘ ± ๐.๕๐	๐-๒.๕	๒.๑๑ ± ๑.๕๓	๑.๕๒ ± ๐.๗๕	๐-๒.๕
ลิมโฟไซท์ (%)	๗๑.๑๙ ± ๖.๙๘	๖๘.๒๘ ± ๙.๑๖	๖๕.๐-๘๕.๕	๖๗.๕๑ ± ๗.๗๒	๖๕.๒๐ ± ๙.๐๘	๖๕.๐-๘๕.๕
โมโนไซท์ (%)	๑.๑๕ ± ๑.๖๙	๑.๗๑ ± ๒.๒๒	๐-๕.๐	๑.๑๓ ± ๐.๙๙	๑.๙๔ ± ๑.๘๘	๐-๕.๐
เบโรฟิล (%)	๑.๓๑ ± ๐.๖๓	๑.๑๗ ± ๐.๕๘	๐-๑.๕	๑.๒๖ ± ๐.๕๖	๑.๘๖ ± ๐.๕๙	๐-๑.๕
เกล็ดเลือด (x ๑๐๓ เซลล์/มม ^๓)	๔๘๘.๕๕ ± ๕๘๒.๕	๕๗๗.๐๐ ± ๕๙๔.๘๕	๒๒๒.๐ ± ๙๗๓.๐	๕๘๕.๒๘ ± ๓๗๖.๖	๕๖๘.๑๕ ± ๙๔.๕๕	๕๐๓.๐-๙๗๓.๐

ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพี < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๑๑ ค่าทางเคมีคลินิกของหนูแรดได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๙ เดือน

ตัวแปรเสริม	หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด (ก./กก./วัน)			หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด (ก./กก./วัน)		
	๐	๓.๖	ต่ำปกติ	๐	๓.๖	ต่ำปกติ
	๑๒ ตัว	๑๒ ตัว		๑๒ ตัว	๑๑ ตัว	
ALP (U/L)	๘๗.๐๐ ± ๙.๘๘	๕๑.๕๐ ± ๓.๗๘	๕๖.๘-๑๒๘.๑	๒๑.๓๓ ± ๓.๑๘	๒๒.๐๐ ± ๕.๕๑	๕๖.๘-๑๒๘.๑
ALT (U/L)	๕๑.๐๗ ± ๙.๙๙	๕๕.๑๓ ± ๒๑.๙๕	๒๘.๙-๘๗.๖	๓๖.๘๒ ± ๙.๖๘	๕๖.๒๗ ± ๓๖.๘๒	๒๘.๙-๘๗.๖
AST (U/L)	๘๗.๕๘ ± ๑๖.๘๗	๑๐๑.๕๒ ± ๒๖.๓๙	๑๑๓.๐-๒๖๑.๐	๙๑.๕๐ ± ๑๙.๙๓	๑๑๒.๕๕ ± ๖๓.๓๐	๘๗.๕-๑๒๑.๐
BUN (มก./ดล.)	๑๙.๗๕ ± ๒.๖๖	๑๗.๙๙ ± ๓.๒๘	๕.๐-๒๙.๐	๒๘.๗๘ ± ๙.๐๓	๒๘.๘๓ ± ๙.๕๑	๕.๐-๒๙.๐
ครีเอตินีน (มก./ดล.)	๑.๕๕ ± ๐.๐๗	๑.๕๒ ± ๐.๐๘	๑.๒-๑.๘	๑.๖๑ ± ๐.๑๑	๑.๖๙ ± ๐.๑๖	๑.๒-๑.๘
โปรตีนรวม (ก./ดล.)	๖.๙๙ ± ๑.๒๐	๖.๙๒ ± ๑.๑๙	๕.๗-๘.๑	๖.๙๙ ± ๑.๒๑	๗.๐๓ ± ๑.๓๒	๕.๗-๘.๑
อัลบูมิน (มก./ดล.)	๕.๕๕ ± ๑.๑๗	๕.๕๕ ± ๑.๑๓	๒.๗-๕.๑	๕.๕๖ ± ๑.๑๘	๕.๕๕ ± ๑.๓๒	๒.๗-๕.๑
บิลิรูบิน (มก./ดล.)	๑.๐๙ ± ๐.๐๓	๑.๑๒ ± ๐.๐๕	๑.๐-๑.๕	๑.๑๒ ± ๐.๐๓	๑.๑๕ ± ๐.๐๕	๑.๐-๑.๕
กลูโคส (มก./ดล.)	๒๑๘.๓๐ ± ๕๗.๕๘	๒๑๓.๘๓ ± ๓๕.๘๐	๑๓๑.๐-๒๖๗.๐	๑๕๕.๘๗ ± ๓๕.๗๗	๑๕๗.๙๕ ± ๒๒.๘๗	๑๖๖.๐-๕๕๓.๐
กรดลูริก (มก./ดล.)	๓.๘๘ ± ๒.๖๖	๒.๐๒ ± ๑.๑๒	๑.๒๖-๓.๕	๑.๕๐ ± ๐.๙๑	๑.๕๓ ± ๑.๑๕	๑.๒-๓.๕
ไตรกลีเซอไรด์ (มก./ดล.)	๑๐๒.๗๕ ± ๓๑.๕๗	๙๖.๑๑ ± ๓๘.๑๘	๕๖.๐-๑๒๕.๘	๕๑.๙๗ ± ๘.๒๖	๕๖.๑๘ ± ๑๒.๘๕	๓๙.๐-๗๒.๘
คอเลสเตอรอล (มก./ดล.)	๕๕.๕๕ ± ๑๘.๗๘	๕๓.๘๒ ± ๒๕.๓๑	๕๕.๐-๑๒๖.๐	๖๕.๙๗ ± ๒๙.๖๘	๗๐.๓๕ ± ๒๕.๑๗	๓๑.๐-๖๕.๐
Na ⁺ (mmol/l)	๑๔๘.๗๕ ± ๘.๖๕	๑๔๙.๖๗ ± ๘.๒๓	๑๕๓.๐-๑๕๖.๐	๑๕๕.๐๓ ± ๕.๖๖	๑๕๖.๒๗ ± ๓.๙๘	๑๕๓.๐-๑๕๖.๐
K ⁺ (mmol/l)	๖.๑๐ ± ๑.๑๖	๕.๘๓ ± ๑.๑๘	๕.๕-๗.๐	๕.๒๓ ± ๑.๖๖	๕.๕๕ ± ๑.๖๒	๕.๕-๗.๐
Cl ⁻ (mmol/l)	๑๐๕.๑๗ ± ๒.๓๗	๑๐๕.๕๐ ± ๓.๑๙	๑๐๐.๐-๑๐๐.๐	๑๐๗.๓๓ ± ๒.๕๖	๑๐๕.๖๘ ± ๑.๙๖	๑๐๐.๐-๑๐๐.๐

ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพ < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๑๒ ผลการตรวจจลวิทยาทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแรดที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๙ เดือน

อวัยวะ	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด (ก./กก./วัน)		หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด (ก./กก./วัน)	
		๐	๓.๖	๐	๓.๖#
		ปอด	BALT proliferation	๘/๑๒	๘/๑๒
หัวใจ	Myocardiosis	๓/๑๒	๓/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๑
ตับ	Centrilobular fatty degeneration	๘/๑๒	๕/๑๒	๐/๑๒	๑/๑๑
ไต	Dilated tubules	๖/๑๒	๓/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๑
ลำไส้เล็ก	GALT proliferation	๑/๑๒	๑/๑๒	๓/๑๒	๒/๑๑
ลำไส้ใหญ่	GALT proliferation	๓/๑๒	๑/๑๒	๐/๑๒	๑/๑๑
ต่อมหมวกไต	Cortical fatty infiltration	๕/๑๒	๕/๑๒	๐/๑๒	๐/๑๑

หนูตาย ๑ ตัวเนื่องจากลำไส้ทะลุเข้าสู่ปอด

ตัวเลขแสดงจำนวนหนูที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

*แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพ < ๐.๐๕)

BALT : Bronchiole-associated lymphoid tissue

GALT : Gut-associated lymphoid tissue

ค่าเคมีเวชกรรม

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ วันละ ๓.๖ ก./กก. มีระดับเอนไซม์ เอเอสที สูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีระดับโปรแตสเซียมต่ำกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ. ส่วนหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรวันละ ๓.๖ ก./กก. นั้นมีค่าทางเคมีคลินิกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๑๑)

การเปลี่ยนแปลงของอวัยวะทางพยาธิวิทยา

จากการผ่าซากชันสูตรหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรจีพีโอ ๑๙๘๖ วันละ ๓.๖ ก./กก. และกลุ่มหนูควบคุม ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของอวัยวะต่างๆ ทางมหพยาธิวิทยา. ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบพยาธิสภาพใดๆ ที่อวัยวะที่ทำการตรวจของหนูทุกกลุ่ม. การเปลี่ยนแปลงของอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาที่พบในหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรจีพีโอ ๑๙๘๖ ขนาดวันละ ๓.๖ ก./กก. ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ ๑๒)

วิจารณ์

การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ ในหนูแรตพันธุ์วีสตาร์ เป็นเวลา ๖ เดือน โดยป้อนสารสกัดทางปากวันละ ๐.๒๔, ๑.๒ และ ๓.๖ ก./กก. หรือคิดเป็น ๑, ๕ และ ๑๕ เท่าของขนาดที่ใช้ในคน และพิษเรื้อรังโดยป้อนสารสกัดวันละ ๓.๖ ก./กก. เป็นเวลา ๙ เดือน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของหนูแรต ถึงแม้ว่ามีการกินอาหารลดลงในบางสัปดาห์ก็ตาม. สารสกัดสมุนไพร ไม่ทำให้น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะส่วนใหญ่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม. ค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของต่อมหมวกไตที่สูงขึ้นในหนูเพศเมียกลุ่ม ๓.๖-อาร์ อาจเกิดจากหนูจำนวน ๑ ตัวมีภาวะงอกเจริญเกินของเปลือกต่อมหมวกไต. หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร วันละ ๓.๖ ก./กก./วัน เป็นเวลา ๙ เดือนมีน้ำหนักสัมพัทธ์ของไตชายเพิ่มขึ้นและน้ำหนักสัมพัทธ์ของมดลูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาใดๆของอวัยวะดังกล่าว. ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และจำนวนเม็ด

เลือดแดงของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร เป็นเวลา ๖ เดือนมีแนวโน้มลดลงตามขนาดสารสกัดที่เพิ่มขึ้น และพบว่าหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา ๙ เดือนมีค่าตัวแปรเสริมดังกล่าวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกันดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าเกิดจากสารสกัดสมุนไพร. แต่อย่างไรก็ตามเมื่อหยุดให้สารสกัดพบว่ามีแนวโน้มสูงขึ้นและการเปลี่ยนแปลงนี้ยังคงอยู่ในช่วงค่าอ้างอิงทางโลหิตวิทยาของหนูแรตสายพันธุ์วีสตาร์^{๒๖}. หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร วันละ ๐.๒๔ ก./กก. มีจำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็นการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มเดียวและไม่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัด จึงไม่น่าจะเกิดจากสารสกัดสมุนไพร จำนวนเม็ดเลือดที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัด เป็นเวลา ๙ เดือนยังคงอยู่ในช่วงค่าอ้างอิง^{๒๖}. การเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ เอเอสที อย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร วันละ ๐.๒๔ ก./กก. อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงแต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าอ้างอิง^{๒๖}. ระดับโซเดียมที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูกลุ่มพื้นตัว (๓.๖-อาร์) เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยังคงอยู่ในช่วงค่าอ้างอิงของหนูแรต^{๒๖,๒๗}. หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร วันละ ๓.๖ ก./กก. เป็นเวลา ๙ เดือนมีระดับโปรแตสเซียมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมแต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ^{๒๖} และไม่พบอาการผิดปกติใดๆ. การเพิ่มขึ้นของโซม เอเอสที อย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร เป็นเวลา ๙ เดือนแสดงให้เห็นว่า เมื่อได้รับสารสกัดเป็นเวลานานอาจมีผลต่อตับได้. การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่พบในหนูที่ได้รับสารสกัด เป็นระยะเวลา ๖ เดือนไม่ได้มีอุบัติการณ์เพิ่มขึ้นตามขนาดสารสกัดที่ได้รับ และหนูที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา ๙ เดือน มีอุบัติการณ์การเปลี่ยนแปลงอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน. ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า สารสกัดสมุนไพร จีพีโอ ๑๙๘๖ ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะภายใน.

สรุป

การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพรรุจีฟ โอิ ๑๙๘๖ เป็นระยะเวลา ๖ เดือนโดยป้อนสารสกัดให้หนูแรดพันธุ์วีสตาร์ทางปากวันละ ๐.๒๕, ๑.๒, ๓.๖ ก./กก. หรือคิดเป็น ๑, ๕ และ ๑๕ เท่าของขนาดที่ใช้ในคน และพิษเรื้อรังระยะเวลา ๙ เดือนโดยให้สารสกัดสมุนไพรรุจีฟทางปากวันละ ๓.๖ ก./กก. พบว่าสารสกัดสมุนไพรรุจีฟ ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว, สุขภาพทั่วไปและไม่ได้ทำให้เกิดผลดลองมีอาการผิดปกติใดๆ. ค่าทางโลหิตวิทยาบางตัวที่ลดลงในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด ทั้งระยะเวลา ๖ และ ๙ เดือนนั้นคงอยู่ในช่วงค่าอ้างอิงของหนูแรด. การทดลองระยะเวลา ๖ เดือนนั้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของค่าเคมีคลินิก แต่หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรุจีฟ โอิ ๑๙๘๖ เป็นเวลา ๙ เดือนมีค่าเอนไซม์ เอเอสที สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและมีระดับโปรตีนแอลบูมินต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ. ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูที่ได้รับสารสกัด ระยะเวลา ๖ และ ๙ เดือนนั้น ไม่พบความผิดปกติที่เกิดจากสารสกัด จึงสรุปว่า สารสกัดสมุนไพรรุจีฟ โอิ ๑๙๘๖ ในขนาดที่ใช้ทดลองไม่ทำให้เกิดพิษเรื้อรังต่อหนูแรด. อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในสัตว์ทดลองครั้งนี้มีข้อบ่งชี้ว่าการใช้สารสกัดสมุนไพรรุจีฟเป็นเวลานานอาจมีผลต่อบุคคล.

กิตติกรรมประกาศ

องค์การเภสัชกรรมให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย "พิษเรื้อรังของสารสกัดสมุนไพรรุจีฟ โอิ ๑๙๘๖". รศ.นสพ.ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ช่วยตรวจสอบสไลด์อวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา และคุณเที่ยงทอง นรากร องค์การเภสัชกรรมช่วยในการประสานงาน

เอกสารอ้างอิง

1. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ฉบับปรับปรุงแก้ไข) พิมพ์ครั้งที่ ๒. กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด:

- ๒๕๕๔ หน้า ๓๐, ๕๘, ๑๐๓, ๕๘๖.
2. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคสอง) ว่าด้วยพฤกษชาติวัตถุธาตุและสัตว์วัตถุานาชาติ. กรุงเทพฯ: พิษัยการพิมพ์; ๒๕๑๖:๒๓๑, ๓๕๔
3. มุลนิธิมหาวิทยาลัยมหิดล สารานุกรมสมุนไพรรุจีฟ เล่มที่ ๕ กายาอีสาน, กรุงเทพฯ: บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน) ๒๕๔๓ หน้า ๑๙๐.
4. สถาบันวิจัยสมุนไพรรุจีฟ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ฉบับรวม) กรุงเทพฯ: รุ่งเรืองสาส์นการพิมพ์; ๒๕๔๑ หน้า ๒, ๘๕.
5. บุชรารวรรณ ศรีวรรณ, ปราณีย์ ชาลิตอารัง, ลอช ชนพัทธ์. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพญาญอต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ในหลอดทดลอง. ไทยเภสัชสาร ๒๕๓๙; ๒๐:๒๖๑-๗.
6. Acrid weed, Tooth cup. Available from www.ku.ac.th /AgrInfo /th..... aqplant/aqpt114.html 2008
7. Tiwaweach D, Siripong P, Kupradinun P,Thamavit W, Shirai T;Hagwan A. Inhibition of diethylnitrosamine (DEN)-induces hepaticby pre and post treatment with Acanthus ebracteatus Vahl. in rats. Thai Cancer J 1993;19:7-13.
8. สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนฯ ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคหนึ่ง) ว่าด้วยพฤกษชาติ วัตถุธาตุและสัตว์วัตถุานาชาติ. กรุงเทพฯ: พิษัยการพิมพ์; ๒๕๑๖ หน้า ๒๒๖
9. ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ, วณิดา จันทร์เทพเทวัญ. การตรวจพิสูจน์และการทำข้อกำหนดของข้าวเย็นเหนือข้าวเย็นใต้. ไทยเภสัชสาร ๒๕๒๖; ๑๗:๗๙-๙๐.
10. เสี่ยม พงษ์บุญรอด. ไม้เทศเมืองไทย. กรุงเทพฯ: กองเภสัชกรรม กรมวิทยาศาสตร์; ๒๕๓๓ หน้า ๑๒๐-๒.
11. Akarasereenont P, Wongkajornsilp A, Chotewuttakorn S, Thawan A, Haubprasert S, Kraissintu K. The effect of herbal extracts (GPO 1988) on proliferation of vascular endothelium.Thai J Pharmacol 1999;21:205-12.
12. เขียวลักษณ์ พิมพ์นอก, อังสนา โยธินาร์ก, พศวัต จรเกตุ. ค่าอ้างอิงทางโลหิตวิทยาและเคมีคลินิกในเลือดหนูแรดสายพันธุ์วีสตาร์. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๒๕๔๖;๔๕:๒๓๗-๒๖.
13. Gad SC. The Rat: In: Eds S, Gad C, Chengelis CP. Animal Models in Toxicology. New York: Marcel Dekker; 1992. p. 81.

Abstract

Chronic Toxicity of GPO 1986 Herbal Extract

Songpol Chivapat*, Aimmanas Attawish*, Pranee Chavalittumrong**, VanidaChantarateptawan#

*Medicinal Plant Research Institute, **Senior Technical Office, Department of Medical Sciences,

Nonthaburi Province, Thailand, #Research and Development Institute, Government Pharmaceutical Organization

GPO 1986 is a mixture of eight herbal extracts from *Canna indica* L., *Polyagala chinensis* L., *Clinacanthus nutans* Linddu, *Ammannia baccifera* L., *Acanthus ebracteatus* Vahl, *Mallotus Philippensis* Muell. Arg., *Smilax corbuldria* Kunth, and *Pygmaeopremma herbacea* (Roxb.) Mold. This recipe is used by the Government Pharmaceutical Organization in a clinical trial on mammary cancer. Chronic toxicity of GPO1986 was conducted in 168 Wistar rats randomly divided into 7 groups of 24 rats each (12 males and 12 females). Group 1 was a control group receiving distilled water and group 2 to 4 were orally administered with GPO 1986 at doses of 0.24, 1.2, 3.6.g/kg/day, respectively, for 6 months. Group 5 was their recovery group receiving GPO 1986 at the dose of 3.6 g/kg/day for 6 months; after that, the animals were further raised without GPO 1986 for 2 weeks before autopsy. Group 6 was the control group receiving distilled water. Group 7 was orally administered GPO 1986 at the dose of 3.6 g/kg/day for 9 months. The results showed that GPO 1986 did not affect body weights and animal health. Male rats receiving GPO 1986 at doses of 1.2 and 3.6 g/kg/day for 6 months and male rats receiving GPO 1986 for 9 months showed significant decreases of hematocrit, hemoglobin and red blood cells. Female rats receiving GPO 1986 for mouths had a significant reduction in platelet counts ($p < 0.05$). However, these hematological changes were within the rat reference values. Male rats receiving GPO 1986 for nine months had asignificant increase in AST level ($p < 0.05$) Whereas the potassium level was significantly decreased ($p < 0.05$). Histopathological results of visceral organs in the six-month and the nine month treatment groups did not show any alterations caused by GPO 1986. In conclusion, GPO 1986 did not produce chronic toxicity in Wistar rats.

Keywords: herbal extract, toxicity, GPO 1986, mammary cancer

การศึกษาพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ

ทรงพล ชีวะพัฒน์*
พรชัย สันเจริญโกโดย*
ปราณี ชาลธำรงค์*

บทคัดย่อ

ยาเบญจทิพย์โอสถเป็นตำรับยาที่มีฤทธิ์ลดความดันโลหิต ประกอบด้วยเครื่องยาสมุนไพร 10 ชนิด ผู้รายงานได้ศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถโดยป้อนสารสกัดทางปากแก่หนูถีบจักรกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มในขนาด 2.5, 5.0 และ 10.0 ก./กก. พบว่า สารสกัดไม่ทำให้หนูแสดงอาการผิดปกติใดๆ หนูทุกตัวมีชีวิตรอดและไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทางมหพยาธิวิทยา ขนาดของสารสกัดที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 มีค่ามากกว่า 10.0 ก./กก. ซึ่งสูงกว่าขนาดที่ใช้ในคน ประมาณ 1,000 เท่า ในการศึกษาพิษเรื้อรังระยะเวลา 6 เดือน โดยป้อนสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถทางปากแก่หนูแรตพันธุ์สตาร์จำนวน 144 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 24 ตัว (เพศผู้ 12 และ เพศเมีย 12 ตัว) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นกลุ่มควบคุมด้วยน้ำและ 1% tragacanth กลุ่มที่ 3 ถึง 6 เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถขนาด 10, 100, 500 และ 500 มก./กก./วัน ตามลำดับโดยกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มศึกษาภาวะฟื้นตัว (500-R) ภายหลังจากให้สารสกัดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต การกินอาหาร สุขภาพ พฤติกรรมของหนูแรต และไม่ทำให้ค่าทางโลหิตของหนูกลุ่มทดลองแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ผลการวิเคราะห์ค่าชีวคินิตต่างๆ ของหนูกลุ่มทดลอง พบว่า ระดับโปรตีนรวมในซีรัมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในหนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก. ซึ่งยังคงอยู่ในช่วงค่าอ้างอิงของหนูปกติ ส่วนค่าพารามิเตอร์อื่นๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลการตรวจอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 100 มก./กก./วัน มีอุบัติการณ์ของเซลล์ตับเสื่อมแบบมีไขมันสูงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้หนูกลุ่มดังกล่าวและกลุ่ม 500-R ยังมีอุบัติการณ์ของการคั่งเลือดที่ไตสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่พบความผิดปกติของไกลเมอรูลัสและท่อไตแต่อย่างใด การเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ที่พบได้ในบางอวัยวะนั้นไม่สัมพันธ์กับขนาดที่ได้รับจึงคาดว่ามิได้เกิดจากสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ สรุปได้ว่า สารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังที่รุนแรงต่อสัตว์ทดลอง

คำสำคัญ : ยาเบญจทิพย์โอสถ, พิษเฉียบพลัน, พิษเรื้อรัง

ภูมิหลังและเหตุผล

ยาเบญจทิพย์โอสถ เป็นตำรับยาหอมที่กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกเห็นควรสนับสนุนและส่งเสริมให้มีการใช้ในด้านการดูแลสุขภาพของผู้ป่วยโรคความดันโลหิต เนื่องจากมีผลการศึกษาทางเภสัชวิทยาว่า ยาตำรับนี้มีฤทธิ์ลดความดันโลหิตได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับตำรับยาหอม

ชนิดอื่น 1 ตำรับยาเบญจทิพย์โอสถประกอบด้วยเครื่องยาสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ กฤษณา กานพลู ลูกกระวาน จันทน์เทศ ชะเอม และเกสรทั้ง 5 ได้แก่ มะลิ สารภี บัวหลวง พิกุล และ บุนนาค โดยสมุนไพรแต่ละชนิดมีสรรพคุณตามตำราแผนโบราณพอประมวลได้ดังนี้ กฤษณา บำรุงโลหิต ใช้ปรุงเป็นยาบำรุงและรักษาโรคหัวใจ กานพลูแก้เสมหะเหนียว แก้

* สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, + สำนักวิชาการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

หืด แก้วพิษโลหิต แก้วท้องขึ้น ลูกกระวานใช้ขับเสมหะ ขับโลหิต ขับลม บำรุงธาตุและกระจายเลือด จันทน์เทศ แก้วท้องร่วง แก้วร้อนใน แก้วปดมดลูก ขับลมและบำรุงโลหิต ชะเอม แก้วโรคในคอ ช่วยย่อยอาหาร แก้วเลือดออกตามไรฟัน บำรุงธาตุ ขับเสมหะ มะลิบำรุงหัวใจ ขับพิษร้อน บำรุงครรภ์ แก้วไข สารภีใช้แก้ไข้ บัวหลวงแก้ไขรากลด แก้วไขมีพิษร้อน พิษลูกแก้ม บำรุงโลหิต บุนนาคใช้แก้ไข^๒

จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรต่างๆ ที่ใช้เป็นเครื่องยาในตำรับยาเบญจทิพย์โอสถ พบว่า มีผลต่อระบบต่างๆ พอประมวลได้ดังนี้ ฤทธิ์ลดการบีบตัวของกระเพาะอาหารและลำไส้ ได้แก่ กระวาน^๓ และ กานพลู^๔ ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ได้แก่ กานพลู^{๕,๖} ฤทธิ์ลดความดันโลหิต ได้แก่ พิษุ^๗ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ได้แก่ กฤษณา^๘, ชะเอม^๙ และสารภี^{๑๐} ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ได้แก่ กฤษณา^{๑๑} ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ได้แก่ ชะเอมซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก, เชื้อวัณโรค และเชื้อไวรัสเริม^{๑๒} สมุนไพรที่มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางจะมีฤทธิ์เสริมระยะเวลาหลับของยา pentobarbital ให้ยาวนานขึ้น ได้แก่ ดอกบุนนาค^{๑๓} ฤทธิ์บรรเทาอาการปวด ได้แก่ ดอกบุนนาค^{๑๔} และจันทน์เทศ^{๑๕} ฤทธิ์สงบประสาท ได้แก่ จันทน์เทศ^{๑๖} ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ยาเบญจทิพย์โอสถเป็นตำรับยาที่ประกอบด้วยเครื่องยาสมุนไพรต่างๆ ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลายต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย แต่ยังคงขาดข้อมูลด้านความปลอดภัยของยาดำรับนี้ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ร่วมกับกรมพัฒนาการแพทย์แผนไทย จึงได้ศึกษาความเป็นพิษทั้งระยะเฉียบพลันและเรื้อรังของสารสกัดตำรับยาเบญจทิพย์โอสถในสัตว์ทดลอง เพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนการใช้ยาเบญจทิพย์โอสถได้อย่างมั่นใจในความปลอดภัยต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

สารสกัดยาดำรับเบญจทิพย์โอสถ

สารสกัดของตำรับยาเบญจทิพย์โอสถเตรียมโดย รศ.ดร. อรุณพร อีฐรัตน์และคณะ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ มีวิธีการ

เตรียมโดยสรุป ดังนี้ บดสมุนไพรแต่ละชนิดที่เป็นส่วนประกอบของตำรับยาให้เป็นผงละเอียด ซึ่งผงสมุนไพรตามสัดส่วนได้แก่ กฤษณา กานพลู ลูกกระวาน จันทน์เทศ และชะเอม ร้อยละ 10.42, 10.42, 16.67, 20.83 และ 20.83 ตามลำดับ ส่วนเกสรทั้งห้า ได้แก่ มะลิสารภี บัวหลวง พิษุ บุนนาค อย่างละ 1 ส่วนรวมกันได้ร้อยละ 20.83 นำส่วนผสมทั้งหมดมาคลุกเคล้าให้เข้ากันในขวดโหลที่มีฝาปิดและหมักด้วย 95% เอทานอลพอท่วม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำส่วนของเหลวที่ได้มากรองแล้วระเหยที่อุณหภูมิ 50 มิลลิบาร์ เพื่อระเหยแอลกอฮอล์ออกให้หมด ทำการหมักและกรองจนครบ 3 ครั้ง รวมสารสกัดที่ได้จากการระเหยทั้งหมด พบว่า ผลผลิตที่ได้ (% yield) คิดเป็นร้อยละ 11.2

การเตรียมยาให้สัตว์ทดลอง

นำสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถมาแขวนตะกอนใน 1% tragacanth ปรับให้มีความเข้มข้นต่างๆ ตามต้องการ เพื่อให้ทดสอบพิษในสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรพันธุ์ไอซีอาร์ น้ำหนักระหว่าง 20 ถึง 25 กรัม จำนวน 50 ตัว (เพศละ 25 ตัว) และหนูแรดพันธุ์วิสตาจำนวน 144 ตัว เพศผู้จำนวน 72 ตัว น้ำหนักระหว่าง 140 ถึง 160 กรัม เพศเมียจำนวน 72 ตัว น้ำหนักระหว่าง 130 ถึง 150 กรัม ซื้อมาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล เลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองระดับ strict conventional hygienic ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60 ได้รับแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์จำกัด และให้น้ำประปาที่ไม่จำกัดปริมาณ ก่อนดำเนินการทดสอบพิษเฉียบพลันทำการอดอาหารหนูถีบจักรเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และพักหนูแรดก่อนการทดลองพิษเรื้อรังเพื่อให้คุ้นเคยกับสภาวะแวดล้อมเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โครงการศึกษาพิษของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถในสัตว์ทดลองครั้งนี้ ได้รับอนุญาตจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เอกสารควบคุมโครงการหมายเลข 53-002

การทดสอบพิษเฉียบพลัน

แบ่งกลุ่มหนูกับจักรโดยวิธีสุ่มออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว) ดังนี้ กลุ่มทดลอง 3 กลุ่มได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์ โอลสดทางปากเพียงครั้งเดียวในขนาด 2.5, 5.0 และ 10.0 ก./กก. ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมสองกลุ่มได้รับน้ำกลั่นและสารละลาย 1% tragacanth ทางปากในปริมาณ 20 มล./กก. สังเกตอาการและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ อย่างใกล้ชิดใน 5 ชั่วโมงแรกและต่อไปทุกวันจนครบ 14 วัน พร้อมบันทึกจำนวนหนูตายเพื่อคำนวณหาขนาดที่ทำให้ตายร้อยละ 50 (LD₅₀) เมื่อครบกำหนด 14 วัน ทำการุณยฆาต (Euthanasia) หนูกับจักรโดยใช้เครื่องดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ผ่านสูตตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในทางพยาธิวิทยา

การทดสอบพิษเรื้อรัง

แบ่งหนูแรตโดยวิธีสุ่มออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 24 ตัว (เพศผู้ 12 ตัว และเพศเมีย 12 ตัว) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นและสารละลาย 1% tragacanth ทางปากในปริมาณ 10 มล./กก./วัน ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 ถึง 5 เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดตำรับยาเบญจทิพย์โอลสดทางปากในขนาด 10, 100 และ 500 มก./กก./วัน ตามลำดับ ติดต่อกันทุกวัน เป็นระยะเวลา 6 เดือน และกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มศึกษาภาวะฟื้นตัว (500-R) ได้รับสารสกัดตำรับยาเบญจทิพย์โอลสดขนาด 500 มก./กก./วัน จนครบ 6 เดือนจึงหยุดให้สารสกัดและเลี้ยงต่อไปจนครบ 14 วัน ในระหว่างการทดลองสังเกตอาการผิดปกติและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ (physical appearance) ทุกวัน ชั่งน้ำหนักตัวและบันทึกปริมาณอาหารที่หนูกิน สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ถ้ามีหนูตายหรืออยู่ในสภาวะใกล้ตาย (moribund) จะทำการผ่าซากชิ้นสุตรทันที เมื่อครบกำหนด 6 เดือนอดอาหารหนูเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นดมสลบหนูด้วยไคเอทิลอีเทอร์ เปิดผ่าช่องท้อง เจาะเลือดจากหลอดเลือด posterior vena cava เพื่อนำไปตรวจด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์เซลล์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Cell-Dyn[®] รุ่น 3500 เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาดังต่อไปนี้ ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดง ค่าดัชนีเม็ดเลือด

แดง ได้แก่ mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) และ mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) จำนวนเม็ดเลือดขาว ร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล อีโอซิโนฟิล ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ เบโซฟิล และปริมาณเกล็ดเลือด ส่วนซีรัมนำไปตรวจด้วยเครื่องวิเคราะห์เคมีในเลือดอัตโนมัติ Cobas Integra[®] รุ่น 400 plus เพื่อวัดค่าเอนไซม์อะลานีนแอมิโนทรานสเฟอเรส (ALT) แอสพาเทตแอมิโนทรานสเฟอเรส (AST) และแอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) ยูเรียไนโตรเจน (BUN) ครีเอตินีน โปรตีนรวม อัลบูมิน บิลิรูบินรวม กลูโคส กรดยูริก ไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอล โซเดียม โพแทสเซียม และคลอไรด์

จากนั้นผ่าซากชิ้นสุตรสัตว์ทดลองเพื่อตรวจหาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของอวัยวะต่างๆ ดังนี้ สมอง หัวใจ ปอด ตับ ไต หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ม้าม ลำไส้ส่วนต่างๆ ตับอ่อน อวัยวะต่อมลูกหมาก ถุงเก็บน้ำเชื้อ รังไข่ มดลูก ต่อมน้ำนม ต่อมน้ำลาย ต่อมน้ำตา ต่อมไทรอยด์ และต่อมหมวกไต บันทึกน้ำหนักอวัยวะที่สามารถชั่งได้ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง Mettler Toledo[®] รุ่น PB153 เพื่อคำนวณหาน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (ก./น้ำหนักตัว 1,000 ก.) จากนั้นเก็บอวัยวะแช่น้ำยาบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้นร้อยละ 10 แล้วนำไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลของน้ำหนักตัว การกินอาหาร ค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางเคมีคลินิก น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ วิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา การทดสอบสมมติฐานใช้ one-way ANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Bonferoni test โดยโปรแกรม SPSS/PC version 15 ส่วนผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาใช้ Fisher exact test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

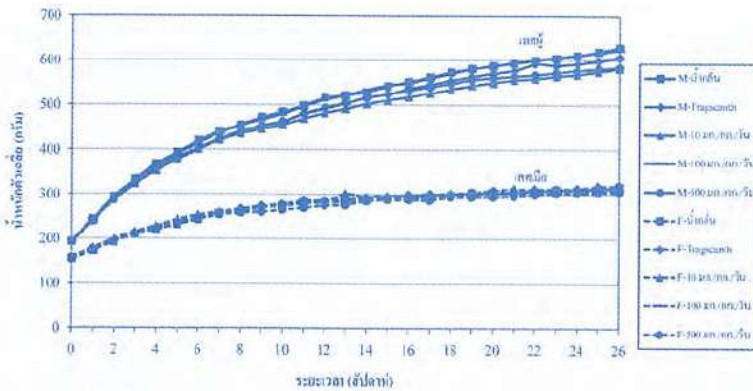
ผล การทดสอบพิษเฉียบพลัน

หนูถีบจักรกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถขนาด 2.5, 5.0 และ 10 ก./กก. ไม่แสดงอาการหรือพฤติกรรมที่ผิดปกติใดๆ ภายหลังจากได้รับสารสกัด และหนูทุกตัวมีชีวิตรอดจนครบกำหนดผลการผ่าซากชันสูตรไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทางมหพยาธิวิทยาในหนูกลุ่มทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมทั้งสอง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ขนาดของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) มีค่ามากกว่า 10 ก./กก.

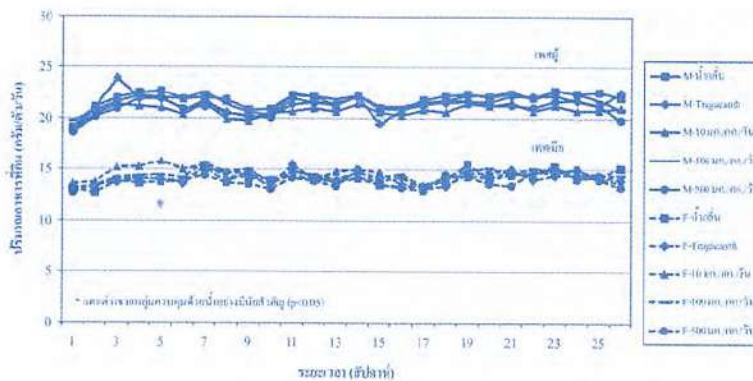
การทดสอบพิษเรื้อรัง

ผลของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถต่อน้ำหนักตัว การกินอาหารและสุขภาพของสัตว์ทดลอง

หนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถขนาด 10, 100, 500 มก./กก./วันและกลุ่ม 500-R มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1) หนูทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถกินอาหารได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้น สัปดาห์ที่ 5 หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 10 มก./กก./วัน กินอาหารได้มากกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 2) ตลอดระยะเวลาการทดลองไม่พบอาการหรือพฤติกรรมที่ผิดปกติของหนูกลุ่มทดลองทุกกลุ่มแต่อย่างใด



รูปที่ 1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถเป็นเวลา 6 เดือน



รูปที่ 2 ปริมาณอาหารที่กินของหนูเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถเป็นเวลา 6 เดือน

ผลของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถต่อน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์

ในหนูเพศผู้พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถขนาด 500 มก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพันธ์ของตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ และมีน้ำหนักสัมพันธ์ของไตและต่อมหมวกไตข้างซ้ายสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่ม 500-R มีน้ำหนักสัมพันธ์ของไตซ้ายสูงชันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) หนูเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมพันธ์ของตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญและกลุ่ม 500-R มีน้ำหนักสัมพันธ์ของตับสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

ผลของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถต่อค่าทางโลหิตวิทยา

หนูเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกขนาดมีค่าทางโลหิตวิทยาทั้งหมดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยน้ำและ tragacanth ยกเว้นหนูเพศผู้กลุ่ม 500-R มีค่า MCHC ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่าง

มีนัยสำคัญ (ตารางที่ 3 และ 4)

ผลของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถต่อค่าทางเคมีคลินิก

หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถทุกขนาดมีค่าทางเคมีคลินิกเกือบทั้งหมดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยน้ำและ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถขนาด 500 มก./กก./วัน มีระดับโปรตีนรวมซีรั่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5 และ 6)

ผลของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถต่อการเปลี่ยนแปลงอวัยวะทางพยาธิวิทยา

จากการผ่าซากชันสูตรไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะใดๆ ทางมพยาธิวิทยาในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถและกลุ่มควบคุม ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถขนาด 10 มก./กก./วัน มีอุบัติการณ์ของการเพิ่มจำนวนหย่อมลิมโฟยด์เซลล์บริเวณรอบหลอดเลือดขนาดเล็กในปอดต่ำกว่ากลุ่ม

ตารางที่ 1 น้ำหนักตัว (ก.) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (ก./1,000 ก.) ของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง - ขนาดสารสกัด (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	10	100	500	500-R
สมอง	3.62±0.32	3.69±0.32	3.81±0.19	3.62±0.41	3.80±0.38	3.93±0.33
หัวใจ	2.54±0.16	2.59±0.26	2.59±0.17	2.58±0.12	2.78±0.42	2.62±0.21
ปอด	2.89±0.33	3.22±0.51	3.26±0.24	3.05±0.40	3.24±0.40	3.17±0.22
ตับ	23.58±2.19	23.25±1.50	24.71±1.20	26.23±2.11	27.68±3.21*#	25.81±2.14
กระเพาะอาหาร	3.69±0.47	3.78±0.33	4.02±0.47	3.79±0.36	4.15±0.34	4.22±0.56
ม้าม	1.53±0.17	1.46±0.13	1.63±0.24	1.61±0.16	1.63±0.20	1.61±0.24
ไตขวา	2.25±0.23	2.22±0.16	2.35±0.19	2.29±0.27	2.48±0.36	2.47±0.18
ไตซ้าย	2.10±0.22	2.06±0.13	2.17±0.12	2.14±0.17	2.39±0.33*	2.39±0.27*
อวัยวะขา	4.78±0.70	5.39±0.63	5.13±0.56	4.62±0.84	5.01±0.96	5.09±0.78
อวัยวะซ้าย	4.87±0.85	5.29±0.55	5.24±0.46	4.72±0.85	5.38±1.30	5.26±0.79
ต่อมหมวกไตขวา	0.09±0.02	0.07±0.01	0.07±0.01	0.07±0.02	0.07±0.01	0.06±0.01
ต่อมหมวกไตซ้าย	0.065±0.012	0.077±0.016	0.073±0.010	0.075±0.017	0.082±0.012*	0.078±0.010
กระเพาะปัสสาวะ	0.30±0.06	0.29±0.06	0.31±0.05	0.29±0.06	0.32±0.07	0.28±0.05
น้ำหนักเริ่มต้น	192.70±7.97	192.12±13.13	193.54±13.79	193.56±12.89	192.08±17.59	193.70±11.80
น้ำหนักสิ้นสุด	605.67±52.13	587.36±60.48	562.03±35.39	604.97±63.88	566.34±59.05	558.63±42.92

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยน้ำ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 2 น้ำหนักตัว (ก) และน้ำหนักอวัยวะสะสมพิษ (ก/1000ก) ของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง - ขนาดสารสกัด (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	10	100	500	500-R
สมอง	6.38±0.68	6.37±0.46	6.48±0.52	6.86±0.70	6.84±0.54	6.57±0.65
หัวใจ	3.20±0.30	3.14±0.18	3.23±0.35	3.32±0.39	3.29±0.20	3.42±0.33
ปอด	4.22±0.55	4.17±0.24	4.15±0.34	4.52±0.45	4.43±0.43	4.39±0.33
ตับ	23.41±5.03	24.26±1.69	25.44±3.69	26.11±2.83	30.09±1.79*#	28.24±2.98*
กระเพาะอาหาร	5.19±0.74	5.03±0.36	5.74±0.75	5.50±0.51	5.96±0.55	5.90±0.91
ม้าม	2.07±0.22	2.05±0.18	2.13±0.36	2.12±0.21	2.17±0.30	2.16±0.37
ไตขวา	2.77±0.33	2.74±0.21	2.75±0.26	2.89±0.25	3.00±0.31	3.03±0.28
ไตซ้าย	2.64±0.24	2.65±0.19	2.61±0.27	2.76±0.18	2.78±0.23	2.88±0.30
ต่อมหมวกไตขวา	0.15±0.03	0.14±0.02	0.14±0.03	0.16±0.03	0.14±0.02	0.15±0.03
ต่อมหมวกไตซ้าย	0.16±0.03	0.15±0.02	0.16±0.03	0.16±0.02	0.15±0.02	0.15±0.04
กระเพาะปัสสาวะ	0.32±0.06	0.29±0.05	0.28±0.07	0.33±0.05	0.33±0.04	0.31±0.06
มดลูก	2.12±0.69	2.12±0.34	2.40±0.61	2.13±0.62	2.76±0.85	2.41±0.70
รังไข่ขวา	0.26±0.07	0.27±0.05	0.24±0.07	0.28±0.05	0.26±0.08	0.28±0.07
รังไข่ซ้าย	0.27±0.07	0.28±0.04	0.24±0.11	0.26±0.06	0.28±0.07	0.29±0.07
น้ำหนักกึ่งเริ่มต้น	156.26±5.87	156.98±9.27	157.77±9.53	157.72±6.87	154.00±8.14	161.69±8.87
น้ำหนักสิ้นสุด	304.03±23.91	307.03±18.86	301.09±26.56	295.77±18.69	290.48±1.29	309.43±40.37

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยนัยสำคัญ (p<0.05)

แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วย tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 3 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง - ขนาดสารสกัด (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	10	100	500	500-R
ฮีมาโตคริต (%)	30.01±1.10	30.33±1.33	30.42±1.34	30.15±1.33	29.64±1.01	30.72±1.83
ฮีโมโกลบิน (ก./ดล.)	15.79±0.53	15.94±0.75	15.96±0.66	15.78±0.72	15.55±0.45	15.93±0.93
เม็ดเลือดแดง (x10 ⁶ เซลล์/มม ³)	9.08±0.35	9.15±0.43	9.08±0.58	9.14±0.41	8.88±0.32	9.24±0.48
MCV (fL/red cell)	33.08±0.64	33.15±0.39	33.56±0.97	33.00±1.09	33.40±0.62	33.25±1.02
MCH (pg/red cell)	17.40±0.40	17.43±0.29	17.64±0.56	17.27±0.66	17.51±0.30	17.24±0.48
MCHC (ก./ดล. เม็ดเลือดแดง)	52.59±0.67	52.56±0.42	52.52±0.40	52.37±0.42	52.44±0.51	51.87±0.66*#
เม็ดเลือดขาว (x10 ³ เซลล์/มม ³)	3.17±0.71	3.16±0.72	3.19±0.73	3.25±0.75	3.20±0.97	2.95±0.44
นิวโทรฟิล (%)	34.41±6.91	32.65±5.73	37.02±9.68	35.29±11.37	37.48±8.90	29.97±7.54
อีโอซิโนฟิล (%)	1.85±0.50	2.35±0.92	1.60±0.63	1.52±0.66	1.45±0.55	1.61±0.39
ลิมโฟไซต์ (%)	59.43±7.66	62.69±5.78	59.72±9.21	60.19±11.61	59.23±8.10	65.71±8.61
โมโนไซต์ (%)	3.03±3.82	1.51±1.17	1.25±0.80	2.03±2.41	1.14±0.89	2.00±2.75
เบโซฟิล (%)	1.28±1.28	0.81±0.51	0.42±0.21	0.96±0.46	0.70±0.34	0.71±0.77
เกล็ดเลือด (x10 ³ เซลล์/มม ³)	878.17±65.32	865.91±40.15	863.64±85.69	912.71±85.34	893.25±132.39	881.13±87.29

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยนัยสำคัญ (p<0.05)

แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วย tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 4 ค่าทางโลหิตวิทยาของหญิงตั้งครรภ์ที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง - ขนาดสารสกัด (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	10	100	500	500-R
ฮีมาโตคริต (%)	29.93±0.99	29.23±1.05	29.52±1.54	29.18±1.40	30.37±1.12	29.38±1.29
ฮีโมโกลบิน (ก./ดล.)	15.89±0.62	15.63±0.56	15.70±0.77	15.45±0.72	16.03±0.64	15.61±0.65
เม็ดเลือดแดง (x10 ⁶ เซลล์/มม ³)	8.46±0.25	8.24±0.35	8.40±0.48	8.27±0.55	8.58±0.48	8.28±0.47
MCV (fl/red cell)	35.38±0.50	35.46±0.74	35.16±0.49	35.33±1.06	35.46±0.89	35.53±1.07
MCH (pg/red cell)	18.78±0.35	18.95±0.46	18.70±0.31	18.73±0.49	18.70±0.48	18.88±0.70
MCHC (ก./ดล. เม็ดเลือดแดง)	53.10±0.71	53.47±0.72	53.16±0.42	53.00±0.53	52.76±0.60	53.15±0.74
เม็ดเลือดขาว (x10 ³ เซลล์/มม ³)	1.57±0.42	1.68±0.39	1.52±0.36	1.73±0.47	1.80±0.46	1.59±0.47
นิวโทรฟิล (%)	30.08±5.51	31.45±8.41	29.29±8.25	29.74±7.99	28.40±5.71	31.36±8.41
อีโอสิโนฟิล (%)	2.31±0.77	1.97±1.08	1.74±0.65	1.74±0.69	1.40±0.46	1.83±0.88
ลิมโฟไซต์ (%)	64.19±6.70	64.87±9.05	67.04±7.88	66.50±8.90	68.10±6.03	63.09±9.22
โมโนไซต์ (%)	2.52±3.10	0.91±0.57	1.11±0.80	1.11±1.62	1.25±0.98	2.48±2.88
เบโซฟิล (%)	0.92±0.65	0.80±0.44	0.81±0.35	0.91±0.44	0.77±0.33	1.24±1.19
เกล็ดเลือด (x10 ³ เซลล์/มม ³)	846.50±57.34	867.00±66.59	867.79±64.00	865.54±85.03	917.67±96.45	877.08±95.01

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 5 ค่าทางเคมีคลินิกของหญิงตั้งครรภ์ที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง - ขนาดสารสกัด (มก./กก./วัน)			
	น้ำกลั่น	tragacanth	10	100	500	500-R
ALT (U/L)	37.58±15.22	37.45±12.81	31.00±7.33	31.75±5.08	35.50±5.57	34.17±6.42
AST (U/L)	67.33±20.98	78.55±6.88	80.73±10.06	78.58±13.20	85.17±20.89	76.08±8.88
ALP (U/L)	48.17±6.24	42.73±4.56	44.91±7.38	45.50±5.63	45.67±10.08	41.83±5.22
BUN (มก./ดล.)	18.36±1.35	17.91±2.89	18.02±3.13	18.90±2.63	17.74±2.23	16.93±1.81
ครีเอตินิน (มก./ดล.)	0.56±0.07	0.53±0.08	0.54±0.08	0.57±0.07	0.53±0.07	0.49±0.04
อัลบูมิน (ก./ดล.)	4.55±0.15	4.52±0.23	4.52±0.14	4.53±0.15	4.48±0.33	4.44±0.14
บิลิรูบิน (มก./ดล.)	0.07±0.02	0.08±0.03	0.07±0.02	0.06±0.02	0.06±0.03	0.07±0.02
โปรตีนรวม (ก./ดล.)	6.73±0.31	6.61±0.25	6.54±0.20	6.65±0.24	6.50±0.53	6.38±0.17
กลูโคส (มก./ดล.)	250.48±32.00	238.89±24.85	240.66±42.71	252.78±145.78	220.69±45.07	217.01±27.80
การดยูริก (มก./ดล.)	5.43±1.02	5.03±1.12	5.78±1.34	6.15±1.63	5.58±1.41	4.59±1.06
ไตรกลีเซอไรด์ (มก./ดล.)	92.34±27.93	81.50±30.14	69.43±15.44	87.86±23.38	82.31±20.57	88.11±28.52
คอเลสเตอรอล (มก./ดล.)	73.52±7.44	70.47±13.50	65.98±10.37	74.48±24.62	68.61±20.96	77.24±14.75
Na ⁺ (mmol/l)	144.50±1.17	144.27±1.74	144.73±1.49	145.42±1.44	144.50±1.62	144.33±1.23
K ⁺ (mmol/l)	7.57±0.63	7.66±0.56	7.37±0.55	7.34±0.57	7.38±0.77	7.40±0.58
Cl ⁻ (mmol/l)	104.67±0.98	105.27±1.19	105.55±1.51	105.50±1.51	104.92±1.56	104.42±1.16

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 6 ค่าทางเคมีคลินิกของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง - ขนาดสารสกัด (มก./กก./วัน)			
	น้ำกั้น	tragacanth	10	100	500	500-R
ALT (U/L)	27.25±7.69	26.33±7.75	27.42±10.92	24.50±7.28	23.50±3.45	25.33±7.20
AST (U/L)	81.83±12.03	83.17±14.12	84.92±17.72	83.33±8.32	69.25±4.97	74.00±7.35
ALP (U/L)	19.83±3.35	19.67±4.46	19.75±5.01	19.58±5.16	19.25±7.70	19.00±3.67
BUN (มก./ดล.)	21.29±4.22	21.09±3.84	20.81±2.78	21.51±3.46	21.08±3.05	20.85±3.56
ครีเอตินิน (มก./ดล.)	0.53±0.15	0.50±0.09	0.51±0.06	0.51±0.12	0.50±0.07	0.49±0.08
โปรตีนรวม (ก./ดล.)	6.33±0.25	6.62±0.40	6.58±0.35	6.43±0.36	6.74±0.28*	6.52±0.25
อัลบูมิน (ก./ดล.)	4.82±0.19	5.03±0.30	4.96±0.34	4.80±0.29	5.05±0.26	4.88±0.17
บิลิรูบิน (มก./ดล.)	0.09±0.03	0.10±0.04	0.09±0.02	0.09±0.02	0.07±0.02	0.09±0.02
กลูโคส (มก./ดล.)	122.42±19.84	114.73±19.98	109.79±11.49	115.27±24.95	119.90±12.82	137.38±28.06
กรดยูริก (มก./ดล.)	2.28±0.69	2.18±0.63	2.51±0.96	2.15±1.04	2.22±0.67	2.32±0.61
ไตรกลีเซอไรด์ (มก./ดล.)	38.70±8.68	48.62±19.38	42.58±6.05	36.24±6.47	32.96±5.16	53.31±36.86
คอเลสเตอรอล (มก./ดล.)	58.98±11.03	66.15±18.72	65.94±16.06	61.26±23.29	72.95±12.98	78.78±21.05
Na+ (mmol/l)	142.42±1.00	143.00±1.28	144.00±1.65	143.58±1.73	143.83±1.80	142.83±0.94
K+ (mmol/l)	7.01±1.28	6.60±1.09	6.85±1.75	6.04±1.35	6.43±1.20	6.48±1.01
Cl- (mmol/l)	107.25±1.42	108.08±1.62	108.17±1.40	107.00±1.86	106.58±1.31	106.00±1.41

ค่าในตารางแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยนัยสำคัญ (p<0.05)

ควบคุมด้วยน้ำและ tragacanth อย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถขนาด 100 มก./กก./วัน มีอุบัติการณ์ของเซลล์ตับเสื่อมแบบมีไขมันสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีอุบัติการณ์ของการสะสมไขมันที่ต่อมหมวกไตชั้นนอกต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก./วัน และกลุ่ม 500-R มีอุบัติการณ์การคั่งของเลือดในหลอดเลือดดำที่บริเวณรอยต่อของเนื้อไตส่วนนอกและส่วนในสูงกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 100 มก./กก./วัน มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ป้อน tragacanth อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอื่นๆ ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ มีอุบัติการณ์ที่ไม่ได้เพิ่มหรือลดลงตามขนาดของสารสกัดที่ได้รับ (ตารางที่ 7 และ 8)

วิจารณ์

ผลการทดสอบพิษเฉียบพลันโดยป้อนสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถแก่หนูถีบจักรทางปากในขนาด 2.5,

5.0 และ 10.0 ก./กก. แสดงให้เห็นว่า สารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถในขนาดที่ทดสอบไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย นอกจากนี้ สารสกัดไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของอวัยวะสำคัญในระดับมหพยาธิวิทยา (gross pathology) ขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตายครึ่งหนึ่ง (LD50) มีค่ามากกว่า 10.0 ก./กก. ซึ่งสูงกว่าขนาดที่ใช้ในคนประมาณ 1,000 เท่า

ผลการศึกษาพิษเรื้อรังแสดงให้เห็นว่า สารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต การกินอาหารและสุขภาพทั่วไปของหนูแรด หนูเพศผู้ และเพศเมียกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก./วัน มีน้ำหนักสัมผัสของตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความผิดปกติของค่าเคมีคลินิกที่เกี่ยวข้องรวมทั้งรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่ตับ ดังนั้นอาจเกิดจากน้ำหนักตัวที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมทำให้ได้ค่าสัมผัสเพิ่มขึ้น หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถขนาด 500 มก./กก./วัน และกลุ่ม 500-R มีน้ำหนักสัมผัสของไตข้างซ้ายสูงกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอาจเกิดจากน้ำหนักตัวที่น้อยกว่า นอกจากนี้อาจ

ตารางที่ 7 ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดยาสมุนไพรโอสถ เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง - ขนาดสารสกัด (มก./กก./วัน)			
		น้ำกลั่น	Tragacanth	10	100	500	500-R
ปอด	BALT proliferation	8/12	7/11	2/11 *,#	6/12	7/12	10/12
หัวใจ	Myocardiosis	2/12	3/11	1/11	1/12	1/12	1/11
ตับ	Centrilobular fatty degeneration	2/12	2/11	2/11	7/12 *,#	2/12	6/12
	Centrilobular hydropic degeneration	4/12	1/11	0/11	3/12	1/12	0/12
ไต	Congestion	1/12	0/12	0/12	4/12 #	0/12 *,#	7/12 *,#
	Hydronephrosis	0/12	0/12	0/12	1/12	0/12	1/12
ลำไส้เล็ก	GALT proliferation in submucosa	2/12	1/11	1/11	1/12	2/12	2/12
ลำไส้ใหญ่	GALT proliferation in submucosa	2/12	1/11	1/11	1/12	2/12	2/12
ต่อมหมวกไต	Cortical fatty infiltration	6/12	6/11	2/11	1/12 *,#	7/12	10/12

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของจำนวนหนูที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วย tragacanth อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

BALT : Bronchiole - associated lymphoid tissue

GALT : Gut - associated lymphoid tissue

ตารางที่ 8 ผลการตรวจเนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแรพเพศเมียที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ เป็นเวลา 6 เดือน

อวัยวะ	การเปลี่ยนแปลงที่พบ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง - ขนาดสารสกัด (มก./กก./วัน)			
		น้ำกลั่น	Tragacanth	10	100	500	500-R
ปอด	BALT proliferation	4/12	3/12	4/12	6/12	2/12	3/12
	Centrilobular fatty degeneration	0/12	1/12	0/12	0/12	1/12	2/12
	Centrilobular hydropic degeneration	0/12	0/12	0/12	0/12	1/12	1/12
ไต	Hydronephrosis	2/12	2/12	0/12	1/12	1/12	2/12
ลำไส้เล็ก	GALT proliferation	1/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
ลำไส้ใหญ่	GALT proliferation	2/12	2/12	2/12	0/12	1/12	2/12

ตัวเลขในตารางแสดงในรูปของจำนวนหนูที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูทั้งหมดในกลุ่ม

BALT : Bronchiole - associated lymphoid tissue

GALT : Gut - associated lymphoid tissue

เกิดจากการมีภาวะคั่งเลือดที่ไตร่วมด้วยซึ่งส่งผลต่อมวลน้ำหนักของอวัยวะ การตรวจค่าทางโลหิตวิทยาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยาของหนูทุกกลุ่มที่สัมพันธ์กับขนาดสารที่ได้รับ ผลการตรวจวิเคราะห์ค่าเคมีคลินิกต่างๆ พบว่าหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก./วัน มีเพียงระดับโปรตีนรวมในซีรัมสูงชันอย่างมีนัยสำคัญแต่การเปลี่ยนแปลงนี้ยังอยู่ในช่วงค่าอ้างอิงของหนูแรพปกติ¹⁵ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถในขนาดที่ทดลองไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของค่าเคมีคลินิก

ผลการตรวจอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถขนาด 10 มก./กก./วัน มีอุบัติการณ์การเพิ่มหย่อมลิมโฟด์เซลล์ที่ปอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากสารสกัดเนื่องจากการลดลงอย่างไม่มีสัมพันธ์กับขนาด ภาวะเลือดคั่งที่ไต (kidney congestion) ในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 100 และ 500 มก./กก./วัน มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามขนาดสารสกัดที่ได้รับและยังคงพบได้ในกลุ่ม 500-R ภายหลังหยุดให้สารสกัด ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดจากสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถส่งผลเพิ่มปริมาณเลือดจากหัวใจและไปยังไตมากขึ้น จึงตรวจพบการคั่งของเลือดในหลอดเลือดดำบริเวณรอยต่อของเนื้อไตส่วนนอกและส่วนใน (cortico-medullary junction congestion) เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามไม่พบพยาธิสภาพ

ในส่วนของโกลเมอรูลัสและท่อไตส่วนต่างๆ ในขณะที่หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดขนาดเท่ากันไม่พบภาวะเลือดคั่งที่ไต ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเป็นการตอบสนองต่อยาที่แตกต่างระหว่างเพศ (gender difference) เช่นเดียวกับการให้ยาหอมในขนาดที่เท่ากันแก่หนูทั้งสองเพศ พบว่า ยาหอมลดความดันโลหิตในหนูขาวเพศผู้ได้ดีกว่าเพศเมีย¹ ในสารสกัดตำรับยาเบญจทิพย์โอสถอาจมีสารยูจีนอล (eugenol) ซึ่งพบได้ในกานพลู สารชนิดนี้มีคุณสมบัติขยายหลอดเลือด (vasorelaxant) ทำให้อัตราการไหลของเลือดเพิ่มขึ้นและความดันโลหิตลดลง^{16,17} นอกจากนี้มีรายงานว่า eugenol สามารถป้องกันการเกิดพิษต่อไตของหนูแรพ¹⁸ จึงอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับภาวะเลือดคั่งที่ไตแต่ไม่ทำให้โครงสร้างของไตเสียหาย ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในด้านสารออกฤทธิ์ต่างๆ ที่จะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณการไหลเวียนของเลือดหรือความดันเลือด การเปลี่ยนแปลงที่พบในอวัยวะอื่นๆ ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดที่ได้รับจึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถไม่ทำให้เกิดพิษเรื้อรังที่รุนแรงต่อสัตว์ทดลอง แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาเบญจทิพย์โอสถขนาดสูงเป็นเวลานานติดต่อกันอาจเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตและการไหลเวียนเลือดที่ไตจึงไม่ควรใช้ในผู้ที่มีความดันโลหิตต่ำและผู้ป่วยโรคไต

สรุป

การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถโดยวิธีป้อนทางปากแก่หนูถีบจักรครั้งเดียวในขนาด 2.5, 5.0 และ 10.0 ก./กก. พบว่าไม่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันและความผิดปกติทางพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน นอกจากนี้พบว่าสารสกัดมีค่า LD₅₀ > 10.0 ก./กก. ซึ่งสูงกว่าขนาดที่ใช้ในคนประมาณ 1,000 เท่า ผลการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถในหนูแรดพื้นฐาวิสูตรโดยป้อนทางปากในขนาด 10, 100, 500 มก./กก./วัน หรือเทียบเท่าประมาณ 1, 10 และ 50 เท่าของขนาดที่ใช้ในคน เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่า สารสกัดไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร สุขภาพ พฤติกรรม ค่าทางโลหิตวิทยา สารสกัดไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของค่าเคมีคลินิก ผลการตรวจอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก./วัน มีอุบัติการณ์ของภาวะเลือดคั่งที่หลอดเลือดดำบริเวณรอยต่อของเนื้อไตส่วนนอกและส่วนในสูงชันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนอุบัติการณ์ของการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอื่นๆ ที่พบในบางอวัยวะมีอุบัติการณ์ที่ไม่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัด จึงคาดว่ามิได้เกิดจากสารสกัด ดังนั้นสรุปได้ว่า สารสกัดยาเบญจทิพย์โอสถไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังที่รุนแรงต่อสัตว์ทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ที่สนับสนุนทุนโครงการวิจัย “การศึกษาพิษของยาตำรับเบญจทิพย์โอสถ” ภญ.นลินภัทร์ ศักดิ์ศิยสุนทร ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสมุนไพรที่ให้การคำแนะนำและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน รศ.น.สพ. ดร.อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยช่วยตรวจสอบผลเลือดอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยา และภญ. ดร.อัญชลี จูฑะพุทธิ กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือกที่ช่วยตรวจแก้ไขต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

1. มนต์ หวังหมัด, กัลยา อนุรักษณาปรณ, กมล สวัสดิ์มงคล. การศึกษาฤทธิ์ในการบำรุงหัวใจของยาหอม. ว. กรมวิทย์.พ. 2529; 28(4): 427-35.
2. วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์; 2540. 620 หน้า.
3. Hajiniwa J, Harada M and Morishita I. Properties of essential oil components of aromatics and their pharmacological effect on mouse intestine. Pharmacological studies in crude drugs. VII. Yakugaku Zasshi 1963;83:624.
4. Aphsariyakul A. Pharmacological study of some medicinal plants on rat ileums. Chiang Mai Pharm 1987;3(1):8.
5. Hollander F, Lauber FU and Stein JJ. The pH of gastric mucous secretion. Am J Physiol 1948; 152:645-51.
6. Hollander F and Lauber Fu. Eugenol as a stimulus for gastric mucous secretion. Proc Soc Exptl Bid Med 1948;67(1):34-7.
7. Dar A , Behbahanian S, Malik A and jahan N. Hypotensive effect of the methanolic extract of *Mimusops elengi* in normotensive rats. Phytomedicine 1999;6(5):373-8.
8. Gunasekera SP, Kinghorn AD, Cordell GA and Farnsworth NR. Plant anticancer agents. XIX Constituents of *Aquilaria malaccensis*. J Nat Prod 1981;44:569-72.
9. Soonthorncharenonn N , Ubonopas L , Kaewsawan S and Wuttiudomlert M. Lupinifolin , a bioactive flavanone from *Myriopteron extensum* (Wight) K. Schum. stem. Thai J Phytopharm 2004;11(2):19-28.
10. Reutrakul V, Leewanich P, Tuchinda P, Pohmakoir M, Jaipetch T, Sophasan S and Santisuk T. Cytotoxic coumarins from *Mammea hamandii*. Planta Med. 2003; 69(11):1048-51.
11. Kumphune S, Prompurt E, Phaebuaw K, Sriudwong P, Pankla R, Thongyoo P. Anti - inflammatory effects of the ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* inhibits LPS-induced tumour necrosis factoralpha production by attenuating P38 MAPK activation. Int J Green Pharm 2011;5(1):43-8.

12. Chen SW, Min L, Li WJ, Kong WX, Li JF and Zhang YJ. The effects of angelica essential oil in three murine tests of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;79:377-82.
13. Taufiq Hassan Md, Shawkat Ali M, Alimuhammad Md and Zahir Raihan S. Analgesic Activity of *Mesua ferrea* Linn. *Dhaka Univ J Pharm Sci* 2006;5(1-2):73-5.
14. Grover JK, Khandkar S, Vats V, Dhunnoo Y and Das D. Pharmacological studies on *Myristica fragrans*-antidiarrheal , hypnotic , analgesic. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;24(10):675-80.
15. Gad SC. The rat; pathology. In: Gad SC, Chengelis CP, editors. *Animal Models in Toxicology*. New York : Marcel Dekker : 1932. p. 78-81.
16. Nolf Diamiani CE , Rossoni LV , Vassallo DV. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta . *Vascul Pharmacol* 2003;40(1):59-66.
17. Lahlou S, IL, Leal Interaminense LF, Caldas Magalhaes PJ, Lealcordoso JH, et al. Cardiovascular effects of eugenol, a phenolic compound present in many plant essential oils, in normotensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;43(2):250-5.
18. Said MM. The protective effect of eugenol against gentamicin- induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Fundam Clin Pharmacol* 2010 (original article).

Abstract

Acute and Chronic Toxicity Study of Benjathiposoth Extract

Songpol Chivapat *, Pornchai Sincharoenpokai *, Pranee Chavalittumrong *

* Medicinal Plant Research Institute, + Senior Technical Office, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi

A Thai traditional medicine called Benjathiposoth has been reported to possess hypotensive activity. The recipe for preparing medication contains 10 types of herbal materials. An acute toxicity study in mice by gavaging the ethanolic extract of Benjathiposoth at single doses of 2.5, 5.0 and 10.0 g/kg showed that the extract produced neither abnormal signs nor mortality and its LD50 value was more than 10.0 g/kg , which is approximately 1,000 times greater than the human therapeutic dose. The oral six-month chronic toxicity study of the extract was investigated in 144 Wistar rats divided into six groups (each of 12 per sex). Groups 1 and 2 were control groups given with distilled water orally and 1.0% tragacanth solution respectively. Groups 3 to 6 were experimental groups administered orally extract of Benjathiposoth at doses of 10, 100, 500 and 500 mg/kg/day. After six months, the last group (500-R) was further raised without the extract for two weeks in order to assess reversibility of any adverse effects. The results revealed that the Benjathiposoth extract did not affect growth, food intake, health and behaviors of the test animals. The extract at the doses given caused no significant differences in any hematological parameters between the treatment and control groups. Clinical chemistry assays revealed a significant increase in total serum protein in the female group treated with the highest dose of the extract, which was still within the reference interval of normal rats, whereas other parameters showed no significant deviation from the controls. Histopathology of various visceral organs showed that the male groups receiving the extract at 100 mg/kg and higher have a higher incidence of fatty liver. Moreover, these male groups as well as the 500-R group, had higher incidence of kidney congestion when compared with their corresponding control groups. Nevertheless, no pathological change was found in glomerular and tubular kidneys. The incidence of histopathological findings in some organs did not show any dose dependency; therefore, it was considered as not having been contributed by the extract. In summary, the extract of Benjathiposoth produced no serious acute or chronic toxicity in experimental animals.

Key words: Benjathiposoth, acute toxicity, chronic toxicity

Acute and Chronic Toxicity of *Moringa oleifera* Linn Leaves Extracts

Songpol Chivapat¹ Pornchai Sincharoenpokai¹ Nalinphat Saktiyasuthorn¹
Aussavachai Shuaprom¹ Pratom Thongsrirak¹ Apirak Sakpetch¹ Anudep Rungsipat²

ABSTRACT

Moringa oleifera leaves have been reported to possess potential hypotensive and hypocholesterolemic and hypoglycemic activities; nevertheless toxicological data of this herb in animal models have still been scanty. The objective of this study was to evaluate both acute and chronic toxicity of the water extract of *M. oleifera* leaves by oral administration. Acute toxicity test in mice by gavage with the extract twice, each at the dose of 10 g/kg, revealed that the extract produced no acute toxic symptoms and gross lesions of vital organs. Chronic toxicity study was investigated in eighty Wistar rats allocated into four groups, each of ten per sex. Group 1 was the control group receiving distilled water. Group 2 to 4 were experimental groups receiving the extract at the doses of 10, 100 and 1000 mg/kg/day for six months consecutively. The results revealed that the extract at different doses did not affect growth, food consumption, general health status and any hematological values of the animals. Blood chemistry profiles of the extract-treated male rats were not significantly different from those of the control-group male rats. In the female, when compared to the control group, the group receiving the extract at the doses of 100 mg/kg/day had significantly higher albumin and the highest dose-treated group had significantly lower potassium levels. Histopathological results revealed that the incidence of lesions in some organs of all extract-treated groups were not significantly different from those of the control group. In conclusion, the water extract of *M. oleifera* leaves at the tested doses produce no acute toxicity and serious chronic toxicity in experimental animals.

Keywords: *M. oleifera* leaves extract, acute, chronic toxicity, mice, rat

¹ Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Mueang District Nonthaburi Province, Thailand 11000

² Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

*Corresponding author: E-mail: songpol.c@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

พิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดใบมะรุม

ทรงพล ชั่วพัฒน์¹ พรชัย สิมเจริญโกโดย¹ นลินภัทร์ ศักดิ์ติยะสุนทร¹ อัศวชัย ช่วยพรหม¹ ประภม ทองศรีรักษ์¹
อภิรักษ์ ศักดิ์เพชร² อุเทน รังสีพัฒน์¹

ใบมะรุมมีคุณสมบัติลดความดันเลือด ไซมันโคเลสเตอรอล และลดน้ำตาลในเลือดได้ดี แต่รายงานการศึกษาความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองยังมีน้อยมาก การศึกษาค้นคว้ามีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงความเป็นพิษทั้งระยะเฉียบพลันและเรื้อรังของสารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำโดยวิธีป้อนทางปาก การทดสอบพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดใบมะรุมขนาด 20 ก./กก. โดยแบ่งให้สองครั้งๆ ละ ขนาด 10 ก./กก. เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยน้ำกลั่น แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบมะรุมไม่ก่อให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและความผิดปกติของอวัยวะสำคัญของทางพยาธิวิทยา ในการศึกษาพิษเรื้อรังในหนูแรท พันธุ์วิสตาจำนวน 80 ตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 20 ตัว (เพศละ 10 ตัว) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่น กลุ่มที่ 2 ถึง 4 เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดใบมะรุมขนาด 10, 100 และ 1000 มก./กก./วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 6 เดือน ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดใบมะรุมในขนาดต่างๆ ไม่มีผลต่ออาการเจริญเติบโต การกินอาหารสุขภาพทั่วไป น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ และค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีคลินิกต่างๆ ในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดใบมะรุมไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 1000 มก./กก./วัน มีระดับโปรแตสเซียมในซีรัมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการตรวจอวัยวะภายในทางจุลพยาธิวิทยา พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบมะรุมทั้งหมดมีอุบัติการณ์ของการเปลี่ยนแปลงในบางอวัยวะไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาค้นคว้านี้สรุปได้ว่า สารสกัดใบมะรุมด้วยน้ำไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังที่รุนแรงต่อสัตว์ทดลอง

คำสำคัญ: สารสกัดใบมะรุม พิษเฉียบพลัน พิษเรื้อรัง หนูโมซท์ หนูแรท

INTRODUCTION

Moringa oleifera Lam. is a short, slender and perennial tree belonging to the Moringaceae family. It is widely cultivated and naturalized in tropical India, Africa, tropical America, Sri Lanka, Mexico, Malaysia and the Phillipine Islands (Sabale, 2008). The plant is used widely as antispasmodic, stimulant, expectorant, diuretics and also for the treatment of hiccough, influenza and internal abscess in Indian traditional medicines (Mishra et al., 2000). Moreover, leaves, fruit flowers and immature pods of this plant are used as a highly nutritive vegetable in many countries such as India, Pakistan,

Hawaii and many parts of Africa (Sabale, 2008). In Thailand it is commonly known as "Marum" and immature fruits or pods of this plant have long been used as vegetable or as food ingredient (Wutythamawech, 1997). The leaves were proven to be a rich source of β -carotene, protein, vitamin C, calcium, potassium and antioxidant compounds such as ascorbic acid, flavonoids, carotenoids, phenolics (Sabale, 2008) and various amino acids (Mishra et al., 2000). Biological and pharmacological studies of the compounds and the crude extract from *M. oleifera* leaves have been extensively investigated. Gilani

¹ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพญา 11000

² ภาควิชาพืชสวน คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

* ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: songpol.c@dmsc.mail.go.th

(1994) demonstrated that pure compounds from the leaves had hypotensive and spasmolytic activities. The glycosides, niaziminins A and B and isothiocyanate isolated from the leaves extract were shown to have hypotensive effects on normotensive rats (Faizi et al., 1995). Small peptides from the aqueous extract of *M. oleifera* leaves possess antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella aerogenes* and *Aspergillus niger* (Dahot, 1998). The methanol fractions of its leaf extract were reported to possess antiulcer activity and enhancement of healing process in chronic lesions (Pal et al., 1995). The water extract of *M. oleifera* leaves had a significant cholesterol lowering action in the high fat diet rats (Ghasi et al., 2000) including hypoglycemic and antidiabetic activities (Jaiswal et al., 2009). Recently, it has been demonstrated that the aqueous extract of *M. oleifera* leaves possesses antimutagenicity in *Salmonella typhimurium* strain TA100 (Charoensin and Wongpoomchai, 2010). Although many studies have confirmed various health benefits of *M. oleifera* leaves, very little information is available regarding the toxicology of this plant. Thus, this study aimed to investigate acute and chronic toxicity of the water extract of *M. oleifera* leaves in animal models, which may be useful to assess whether the leaves are safe or possibly harmful for the employment as food supplement or health herb.

MATERIALS AND METHODS

Plant material: The leaves of *M. oleifera* were collected from Chanthaburi Medicinal Plant garden of Department of Medical Sciences, Chanthaburi Province, Thailand. The

plant specimen were identified by Thawatchai Wongprasert, Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation. A voucher specimen of *M. oleifera* Lam. (DMSC 5174) was deposited at the DMSC Herbarium, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Thailand.

Preparation of *M. oleifera* extract (MOE): *M. oleifera* leaves were washed, dried at 40°C for 10 hours and were then pulverized into coarse powder. The dried powder was refluxed with distilled water twice, each for two hours. The solution from both extraction were pooled together and then dried using lyophilizer. The yield of the dried extract was about 19.15%. Total phenol content in the extract was determined using the method modified from Folin Ciocalteu (Obanda and Owvor, 1997). It was found that the total polyphenol content was equal to 53.7 mg gallic acid equivalents/g extract. The extract was suspended in distilled water and was adjusted for the differently desired concentration for further acute and chronic toxicity study in mice and rats, respectively.

Animals: Twenty ICR mice, (10 males and 10 females), each weighing 20-22 g, and eighty Wistar rats, 40 males weighing 180-200 g and 40 females weighing 170-190 g, were purchased from The National Laboratory Animal Center, Mahidol University. The animals were housed in strict hygienic conventional mice and rat rooms at the laboratory animal center, Department of Medical Sciences where the environment of the room was maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ with 60% humidity and 12 hour-light-dark cycle. They were raised with commercial pellet diet (082 CP[®] feed, Perfect Companion

Group, Thailand) and clean water *ad libitum*. The mice were fasted for two hours before the acute toxicity testing. Prior to the chronic toxicity study, the rats were acclimatized with the environment for two weeks. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Department of Medical Sciences (Approval No. 52-031)

Acute toxicity test: The mice were randomly divided into two groups, each of ten animals (five male and five female). The experimental group was orally given MOE suspension at dose of 10 g/kg and observed for five hours. The process was then repeated with an equal dose. The control group was given distilled water at the volume of 20 ml/kg twice. Following administration, they were observed for abnormal signs and mortality for 14 days. At the end of the observation period, the mice were sacrificed with CO₂ inhalation and necropsy was performed to examine gross pathology of their visceral organs.

Chronic toxicity study: The wistar rats were randomly allocated to four groups of ten animals of each sex. Group 1 was the control group receiving distilled water at the volume of 10 ml/kg. Group 2 to 4 were treatment groups orally administered with MOE at the doses of 10, 100 and 1000 mg/kg/day for six months, which were approximately equivalent to 1, 10 and 100 times of the dried Marum leaf used in human food supplement, respectively. During the experimental period, body weight and food intake were recorded weekly and the animals were observed for general appearance, behavior and signs of abnormalities. At the end of the six-month treatment period, the animals were fasted overnight and anesthetized with diethyl

ether inhalation. blood samples were collected from posterior vena cava for determining hematological and serum clinical chemistry values.

Hematological analysis was performed using automatic hematological analyzer Cell Dyn[®] 3500 (Abbot Laboratories Ltd., USA). Parameters examined were hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb), erythrocyte (RBC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), white blood cell (WBC), neutrophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes, basophils and platelets. Clinical chemistry values were measured by using automatic chemistry analyzer Cobas[®] Integra 400 plus (Roche Diagnostics Ltd., Switzerland) and parameters assayed were alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total protein, albumin, bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium and chloride ions. A complete necropsy was performed to determine gross lesions of various visceral organs. The brain, heart, lung, liver, kidney, stomach, spleen, testis, uterus urinary bladder and adrenal glands were weighed by using Mettler Toledo[®] PB 153 balance (Metler Toledo International Inc, Switzerland). Organ weight was calculated into relative organ weight (g/1000 g body weight). Visceral organs were fixed in 10% buffered formalin, and subjected to conventional histological process. Histopathological examination was performed on the above mentioned organs including trachea, lymph node, esophagus, pancreas, intestines, thyroid gland, lacrimal and salivary gland, prostate gland, seminal vesicle, ovary, uterus, and mammary glands

Statistical analysis: The data were statistically evaluated by one way ANOVA. Comparison between treatment and control groups were made by Bonferroni test. For histopathological results, Fisher's exact was applied. Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Acute toxicity testing: Mice receiving MOE extract at dose of 10.0 g/kg twice did not manifest any clinical signs or behaviors during the observation period when compared to the control group. All MOE-treated mice survived until the end of the experiment. Necropsy revealed no gross lesions of their visceral

organs when compared with the control group.

Chronic toxicity study:

Effect of MOE on body weight, food consumption health status and relative organ weights: Both male and female rats receiving MOE at different doses showed no significant difference in their average body weight and food consumption when compared with the corresponding control group over the whole experimental period (Figs 1 and 2). All of the MOE-treated groups revealed healthy and showed no clinically toxic signs, as compared to the control group. Relative organ weights of all MOE-treated groups were not significantly different from those of the control group (Table 1).

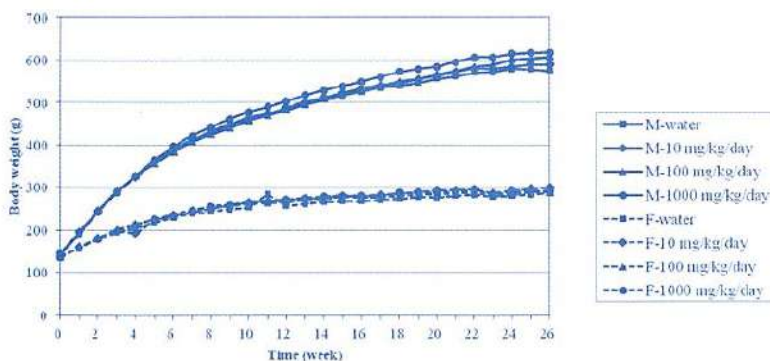


Figure 1 Growth curves of male (M) and female (F) rats receiving MOE for 6 months.

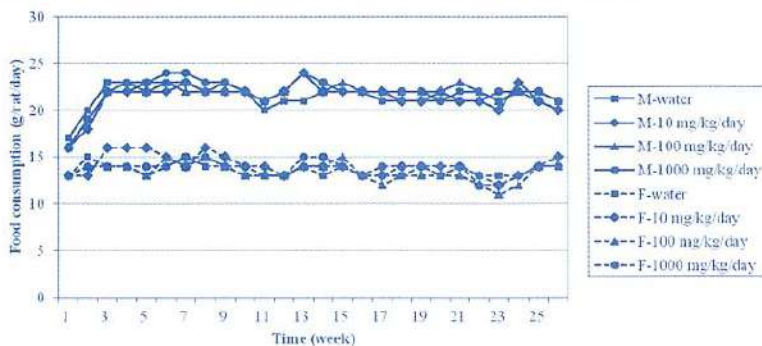


Figure 2 Food consumption of male (M) and female (F) rats receiving MOE for 6 months.

Effect of MOE on hematological and biochemical value: As shown in table 2 there were no significant differences in any hematological values between all MOE-treated and control groups. Blood chemistry profiles showed no significant differences in almost all of the studied parameters between the treatment and control groups. Except in the females, the group receiving 100 mg/kg/day of MOE had significantly higher albumin and the highest dose-treated group had significantly lower potassium level than their corresponding control group (Table 3).

Effects of MOE on histopathological lesions: At necropsy, there was no remarkable macroscopic lesion in any organs of both MOE-treated and control groups. Except a male rat receiving the extract at dose of 100 mg/kg had splenomegaly caused by splenic lymphoma confirmed by histopathology. The incidence of histopathological lesions in the lung, heart, liver, kidney, intestines, adrenal glands of both sexes and female mammary glands of the MOE-treated groups revealed no significant differences when compared with those of the corresponding control group (Table 4). Furthermore, there were no remarkable histopathological changes in the other organs in both treatment and control groups.

Table 1 Relative organs weight (g/1000 g body weight) of male and female rats receiving MOE for 6 months

Organs	Male				Female			
	Dose of MOE (mg/kg/day)				Dose of MOE (mg/kg/day)			
	0	10	100	1000	0	10	100	1000
	n=10	n=10	n=9#	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Brain	3.95±0.36	3.84±0.30	3.90±0.56	3.67±0.45	7.15±0.74	6.83±0.61	7.03±0.58	7.15±0.55
Heart	2.72±0.19	2.59±0.20	2.70±0.26	2.63±0.20	3.35±0.29	3.30±0.17	3.34±0.26	3.35±0.21
Lung	3.34±0.23	3.12±0.24	3.21±0.37	3.12±0.38	4.46±0.44	4.44±0.53	4.43±0.46	4.30±0.32
Liver	25.59±2.25	25.32±1.74	26.30±0.60	26.21±1.64	26.02±2.60	26.12±5.90	27.53±2.42	27.48±1.46
Stomach	4.07±0.33	3.96±0.56	4.12±0.55	3.77±0.53	5.73±0.56	5.56±0.71	5.82±0.54	5.58±0.77
Spleen	1.62±0.21	1.69±0.16	1.72±0.29	1.61±0.19	2.27±0.28	2.24±0.23	2.39±0.21	2.04±0.18
Rt Kidney	2.46±0.24	2.41±0.22	2.46±0.29	2.37±0.24	3.00±0.19	2.93±0.20	2.96±0.30	3.02±0.24
Lt Kidney	2.40±0.24	2.30±0.20	2.32±0.23	2.19±0.20	2.80±0.30	2.71±0.17	2.75±0.27	2.82±0.20
Rt Adrenal	0.07±0.01	0.07±0.02	0.07±0.02	0.06±0.01	0.17±0.03	0.15±0.03	0.16±0.03	0.17±0.03
Lt Adrenal	0.07±0.02	0.07±0.02	0.08±0.01	0.07±0.01	0.16±0.02	0.17±0.03	0.16±0.02	0.16±0.02
Bladder	0.29±0.03	0.28±0.05	0.29±0.04	0.27±0.06	0.32±0.05	0.30±0.05	0.30±0.08	0.31±0.06
Rt Testis	5.26±0.72	5.32±0.66	5.24±0.68	4.70±0.87				
Lt Testis	5.38±0.73	5.32±0.56	5.32±0.68	4.84±1.02				
Uterus					2.28±0.69	2.45±0.53	2.43±1.10	2.11±0.49
Rt Ovary					0.30±0.09	0.26±0.07	0.25±0.06	0.30±0.06
Lt Ovary					0.29±0.07	0.28±0.06	0.30±0.08	0.33±0.10

Data shown were mean±SD. #Autopsy revealed one male rat with splenic lymphoma

Table 2 Hematological values of male and female rats receiving *Moringa oleifera* extract (MOE) for 6 months.

Parameters	Male				Female			
	Dose of MOE (mg/kg BW/day)				Dose of MOE (mg/kg BW/day)			
	0	10	100	1000	0	10	100	1000
	n=10	n=10	n=9#	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Hematocrit (%)	31.58±1.43	32.02±1.54	31.38±2.09	30.38±0.86	32.64±1.63	33.68±2.52	32.41±2.49	31.07±1.26
Hemoglobin (g/dl)	16.26±0.77	16.56±0.68	16.13±1.09	15.55±0.35	16.93±0.82	17.47±1.22	16.76±1.22	16.18±0.48
RBC (x 10 ⁶ cells/mm ³)	9.26±0.37	9.50±0.51	9.33±0.71	9.06±0.21	9.06±0.49	9.24±0.84	8.78±0.77	8.61±0.27
MCV (fl)	34.11±0.68	33.74±0.62	33.67±0.76	33.54±0.68	36.06±0.65	36.50±1.00	36.94±1.30	36.08±0.66
MCH (pg)	17.57±0.33	17.44±0.44	17.31±0.39	17.18±0.31	18.70±0.38	18.94±0.54	19.10±0.51	18.79±0.27
MCHC (g/dl)	51.50±0.48	51.69±0.74	51.43±0.74	51.19±0.77	51.87±0.30	51.88±0.64	51.73±0.46	52.08±0.99
WBC (x 10 ³ cells/mm ³)	3.37±0.45	3.38±0.90	2.96±0.90	3.58±1.56	2.19±0.54	2.24±1.06	2.42±0.51	1.73±0.31
Neutrophil (%)	22.67±4.38	26.74±8.00	27.23±6.28	31.95±13.27	25.90±4.77	29.23±9.60	26.73±5.34	26.83±3.75
Eosinophil (%)	1.54±0.95	1.64±0.43	1.70±0.68	1.59±0.76	1.85±0.61	1.31±0.49	1.52±0.58	2.37±2.13
Lymphocyte (%)	71.51±6.62	67.80±8.44	66.06±9.37	61.23±12.94	69.97±5.59	66.41±9.28	67.42±6.01	66.26±6.74
Monocyte (%)	3.12±2.51	2.76±2.99	3.67±3.32	3.45±2.98	1.85±1.74	2.44±2.17	3.39±3.46	3.59±3.37
Basophil (%)	1.16±1.19	1.05±1.14	1.32±1.51	1.78±1.74	0.44±0.65	0.61±0.65	0.95±0.73	0.95±0.98
Platelet (x 10 ³ cells/mm ³)	962.60±76.68	976.10±120.91	957.72±98.32	960.65±63.02	931.96±80.74	960.30±90.95	959.25±88.04	921.55±98.96

Data shown were mean±SD.

#Autopsy revealed one male rat with splenic lymphoma

Table 3 Clinical chemistry values of male and female rats receiving *Moringa oleifera* extract (MOE) for 6 months.

Parameters	Male				Female			
	Dose of MOE (mg/kg BW/day)				Dose of MOE (mg/kg BW/day)			
	0	10	100	1000	0	10	100	1000
	n=10	n=10	n=9#	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
ALP (U/l)	46.60±4.70	51.30±8.94	49.78±7.69	50.80±8.87	25.60±8.03	22.30±3.50	25.00±5.19	21.70±6.17
ALT (U/l)	38.60±12.29	47.40±22.59	34.78±12.25	38.30±6.88	23.50±5.40	30.30±14.35	27.90±6.14	28.50±10.50
AST (U/l)	90.20±17.87	96.90±27.60	102.56±74.88	84.20±6.78	75.10±9.30	81.10±15.78	82.80±11.24	79.80±9.15
BUN (mg/dl)	18.05±1.68	16.66±2.11	16.71±5.17	16.03±2.07	22.00±2.88	20.59±2.78	20.91±3.02	22.24±2.91
Creatinine (mg/dl)	0.53±0.05	0.49±0.03	0.55±0.09	0.51±0.07	0.48±0.03	0.47±0.05	0.50±0.09	0.51±0.04
Total Protein (g/dl)	6.61±0.27	6.59±0.21	6.41±0.20	6.56±0.22	6.27±0.31	6.53±0.34	6.55±0.39	6.37±0.36
Albumin (g/dl)	4.51±0.11	4.52±0.10	4.43±0.14	4.43±0.14	4.77±0.18	4.86±0.24	4.95±0.26*	4.81±0.24
Bilirubin (mg/dl)	0.08±0.01	0.08±0.02	0.07±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.09±0.02	0.11±0.02	0.08±0.02
Glucose (mg/dl)	279.60±47.61	285.37±50.94	256.41±70.79	271.91±90.10	119.56±33.14	115.81±21.83	113.43±21.95	111.95±18.13
Uric acid (mg/dl)	5.58±1.11	6.59±1.08	5.68±1.38	5.92±1.96	2.32±0.50	2.76±0.49	2.65±0.44	2.06±0.38
Triglyceride (mg/dl)	71.68±25.36	83.29±35.74	93.69±38.44	96.20±61.54	37.80±5.61	38.32±4.90	44.90±14.38	43.19±14.15
Cholesterol (mg/dl)	68.53±16.98	68.22±11.60	69.93±12.85	78.98±19.77	65.48±16.34	69.70±10.67	69.37±21.30	63.26±17.92
Na ⁺ (mmol/l)	144.90±1.10	144.10±1.52	144.11±1.05	144.70±1.42	142.10±0.99	142.70±1.25	142.40±1.26	142.90±0.88
K ⁺ (mmol/l)	7.54±0.34	7.20±0.44	7.79±0.80	7.23±0.89	8.00±0.86	7.83±0.57	7.56±0.46	7.21±0.68*
Cl ⁻ (mmol/l)	104.40±1.35	104.40±1.07	104.67±0.87	104.70±1.16	106.50±1.27	106.60±1.71	106.10±0.88	107.90±1.29

Data shown were mean±SD.

*Significantly different from control group (p<0.05)

#Autopsy revealed one male rat with splenic lymphoma

Table 4 Histopathological results of male and female rats receiving MOE for 6 months.

Organs	Microscopic findings	Male				Female			
		Dose of MOE (mg/kg/day)				Dose of MOE (mg/kg/day)			
		0	10	100	1000	0	10	100	1000
Lung	BALT proliferation	8/10	8/10	9/10	4/10	6/10	7/10	5/10	5/10
Heart	Focal myocardiosis	0/10	0/10	0/10	1/10	NRL	NRL	NRL	NRL
Liver	Centrilobular fatty degeneration	2/10	4/10	4/10	2/10	2/10	1/10	0/10	1/10
	Centrilobular hydropic degeneration	3/10	1/10	0/10	4/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Bile ductule proliferation	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Spleen	Lymphoma	0/10	0/10	1/10	0/10	NRL	NRL	NRL	NRL
Kidney	Dilated tubule	0/10	1/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	Chronic interstitial nephritis	0/10	0/10	1/10	1/10	NRL	NRL	NRL	NRL
Small intestine	GALT proliferation in submucosa	NRL	NRL	NRL	NRL	1/10	1/10	0/10	0/10
Large intestine	GALT proliferation in submucosa	2/10	2/10	1/10	2/10	1/10	1/10	2/10	0/10
Adrenal gland	Cortical fatty infiltration	4/10	5/10	7/10	8/10	NRL	NRL	NRL	NRL
Mammary gland	Glandular hyperplasia					2/10	3/10	5/10	2/10

Data shown were number of rats with histopathological lesions / total number of rat in each group

(NRL : No remarkable lesions, BALT : Bronchiole-associated lymphoid tissue, GALT : Gut-associated lymphoid tissue)

DISCUSSION

In acute toxicity study, total dose of MOE administered to mice within 24 hours was 20 g/kg which do not cause any acute toxic signs, gross lesions of visceral organs and induced mortality rate. Hence, the median lethal dose (LD50) of MOE should be more than 20 g/kg and this given dose was approximately 500 times higher than dried Marum leaf powder used in human food supplement (~40 mg/kg/day).

Chronic toxicity study in Wistar rats showed that MOE did not affect body weight, food consumption, general health status, relative organ weight and hematological parameters values in both sexes. Blood chemistry analysis suggested that MOE did not cause any significant changes in almost all of the examined parameters. A significant increase in albumin in the female rats treated with MOE at the dose of 100 mg/kg did not show any dose dependency

and was still within the rat reference range (Pimainog et al, 2003). Therefore, it may not be caused by MOE. However, the significant decrease in serum potassium in the female rats receiving the highest dose of MOE might contribute to MOE effects since it tended to show dose dependency. However, this group of rats did not show any abnormal signs related to hypokalemia status such as muscular weakness. Caceres et al. (1994) demonstrated that the hot water infusion of *M. oleifera* leaves exerted diuretic activity in the rats. Thus, MOE may possibly act as a potassium-losing diuretic and result in the decreased potassium level, which needs further investigation. The incidence of histopathological lesions in some organs showed no significant differences between the MOE-treated and control groups of both sexes. In addition, no remarkable lesions was found in other studied organs. Taken together,

these findings may be indicative that MOE does not induce any histological lesions in various visceral organs. The finding of splenic lymphoma in a male rat receiving MOE at dose of 100 mg/kg may not be attributable to MOE since this finding was not found in any of the MOE-treated groups. Moreover, this type of tumor was also found in histopathological study in control laboratory rats (Peckham, 1995)

In conclusion, MOE produced no acute toxic effect and had LD50 value in mice more than 20 g/kg. The chronic toxicity study in Wistar rats revealed that MOE at different doses did not affect growth, food consumption, organ weight, hematological values and almost all of clinical chemistry values. In addition MOE did not cause any abnormalities in the studied visceral organs. However, the decrease in potassium level in the female rats receiving the highest dose of MOE suggest that the long term consumption of highest dose of MOE may affect potassium level, and therefore it may not be suitable for patients with hypokalemia and arrhythmia.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank staffs of the Laboratory Animal Center of Department of Medical Sciences for animal facilities. This study was supported by grants from the budget of The Department of Medical Sciences 2009.

REFERENCES

Charoensin, S. and Wongpoomchai, R. 2010. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves. *Thai J Toxicol.* 25(2): 96-103.

Dahot, M.U. 1998. Antimicrobial activity of small protein of *Moringa oleifera* leaves. *J Islamic Ace Sci.* 11(1): 27-32.

Fahey, J.W. 2005. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic and prophylactic properties. Part1. *Trees for Life J.* 1(5) [Online]. Available: <http://www.tfljournal.org/article.php/20051201124931566>.

Faizi, S., Siddiqui, B.S., Saleem, R., Siddiqui, S., Aftab, K. and Gilani, A.H. 1995. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera* *Phytochemistry.* 38(34): 957-963.

Gad, S.C. 1992. *The Rat In: Animal Model in Toxicology.* S.C. Gad and C.P. Chengelis (eds). New York: Marcel Dekker: 78-95.

Ghasi, S., Nwobodo, E. and Ofili, J.O. 2000. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 69: 21-25.

Gilani, A.H., Aftab, K., Suria, A., Siddiqui, S., Salem, R., Siddiqui, B.S. and Faizi, S. 1994. Pharmacological studies on hypotensive and spasmolytic activities of pure compounds from *Moringa oleifera*. *Phytotherapy Res.* 8: 87-91.

Jaiswal, D., Rai, P.K., Kumar, A., Mehta, S. and Watal, G. 2009. Effect of *Moringa oleifera* Lam. Leaves aqueous extract therapy. *J Ethnopharmacol.* 123: 392-396.

Mishra, G., Singgh, P., Verma, R., Kumar, S., Srivastav, S., Jha, K.K. and Khosa, R.L. 2011. Traditional uses, Phytochemistry and pharmacological properties of *Moringa oleifera* plant: An overview. *Der Pharmacia Lettre.* 3(2): 141-164.

Pal, S.K., Mukherjee, P.K. and Saha, B.P. 1995. Studies on the antiulcer activity of *Moringa oleifera* Leaf extract on gastric ulcer models in rats. *Phytotherapy Res.* 9: 463-465.

Peckham, J.C. *Animal histopathology.* In: *CRC Handbook of Toxicology.* M.J. Derelanko and M.A. Hollinger (eds.) New York: CRC Press: 485-514.

- Pimainog, Y., Yothinarak, A. and Jornrakate, P. 2003. Reference ranges for hematological and clinical chemistry values in Wistar rats. Bull Dept. Med. Sci. 45(1): 27-36.
- Sabale, V., Patel, V., Paranjape, A., Arya, C., Sakarkar, S.N. and Sabale, P.M. 2008. *Moringa oleifera* (Drumstick): An Overveiw. Phcog Rev. 2(4): 7-13.
- Wutythamawech, W. 1997. Encyclopedia of Thai Herbs. Bangkok: OS Printing. 365 pp (in Thai).

Chronic Toxicity Study of *Kaempferia parviflora* Wall ex. Extract

Songpol Chivapat^{1*} Pranee Chavalittumrong¹ Aimmanas Attawish¹ Anudep Rungsipipat²

ABSTRACT

K. parviflora is a medicinal plant possessing high potential for development of various health products. The objective of this chronic toxicity study was to investigate the safety of ethanolic extract of chronic *Kaempferia parviflora* Wall ex Bak in Wistar rats. The animals were randomly divided into five groups, twenty four rats each (12 males and 12 females). Three treatment groups were orally administered with *K. parviflora* extract at doses of 5, 50 and 500 mg/kg/day for six months respectively, which were equivalent to 1, 10 and 100 times of human use, while two control groups were orally given with distilled water and 1.0% tragacanth, respectively. The results showed that male rats receiving *K. parviflora* extract at dose of 500 mg/kg had significantly lower body weight than both control groups ($p < 0.05$). The alterations of a few hematological parameters in the highest dose-treated groups were within the normal range. Male rats receiving the highest dose of *K. parviflora* extract had significantly lower triglyceride level than their two control groups ($p < 0.05$) whereas female rats receiving the same dose had significantly higher glucose and cholesterol levels than their control groups ($p < 0.05$). Histopathological study of visceral organs revealed no remarkable lesions related to the toxicity of *K. parviflora* extract.

Keywords: Chronic toxicity test, *K. parviflora* extract, rat

บทคัดย่อ

การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดกระชายดำ

ทรงพล ชิวะพัฒน์^{1*} ปราณีย์ ชาวลิตตุมรอง¹ อิมมานัส อัตตวิชัย¹ อนูเทพ รุ่งสีพิพัฒน์²

กระชายดำ เป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ การศึกษาพิษเรื้อรังครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดกระชายดำด้วยเอทานอล ในหนูแรพพันธุ์วีสตาร์จำนวน 120 ตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 24 ตัว (เพศละ 12 ตัว) โดยกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มได้รับสารสกัดกระชายดำ โดยการป้อนทางปากในขนาด 5, 50 และ 500 มก./กก./วัน เป็นเวลา 6 เดือน หรือเทียบเท่ากับ 1, 10 และ 100 เท่าของขนาดกระชายดำที่คนรับประทาน กลุ่มควบคุม 2 กลุ่ม ได้รับน้ำกลั่นและสารละลายทรากานท์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 ผลการทดลองพบว่า สารสกัดกระชายดำขนาด 500 มก./กก./วัน ทำให้หนูเพศผู้มีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำและทรากานท์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การเปลี่ยนแปลงบางค่าทางโลหิตวิทยาในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก./วัน ยังคงอยู่ในช่วงปกติ กลุ่มหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดกระชายดำขนาด 500 มก./กก./วัน พบค่าไตรกลีเซอไรด์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลการตรวจจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะต่างๆ ไม่พบความผิดปกติใดๆ ที่บ่งชี้การเป็นพิษเรื้อรังที่เกิดจากสารสกัดกระชายดำ

คำสำคัญ : การทดสอบพิษเรื้อรัง สารสกัดกระชายดำ หนูแรพ

1 Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Mueang District Nonthaburi Province, Thailand 11000

2 Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

*Corresponding author; E-mail: songpol.c@dmrc.mail.go.th

1 สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อ.เมือง นนทบุรี 11000

2 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

* ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: song.c@dmrc.mail.go.th

INTRODUCTION

Kaempferia parviflora Wall Ex. Baker or Krachaidam is a plant belonging to the family Zingiberaceae (Sirirugs, 1992). The rhizomes of this plant have been traditionally used for leucorrhea, oral diseases, abdominal pain, health promotion and aphrodisiac (Wutythamawech, 1997). Phytochemical studies revealed that the rhizomes of *K. parviflora* contained volatile oil (Wongsinkongman et al., 2003), chalcones (Herunsalee, 1987), phenolic glycosides (Azuma et al., 2008) and many flavonoids such as 5-hydroxy-7-methoxyflavone, 5,7-dimethoxyflavone and 3,5,7-trimethoxyflavone (Jaipetch et al., 1983). The *K. parviflora* has been demonstrated to possess antifungal, antiplasmodial, antimycobacterial (Yenjai et al., 2004), anti HIV-1 protease (Sookkongwaree et al., 2006), anti-allergic (Tewtrakool et al., 2008) and anti-gastric ulcers (Rujjanawate et al., 2005). It has been reported that the ethanolic extract and 5-hydroxy-3,7,3',4',-tetramethoxyflavone of this plant exhibit appreciable inhibitory effects on nitric oxide and PGE2 release from murine macrophage cells (Tewtrakool and Subhadhirasakul, 2008). In addition, the ethanolic extract of Krachaidam has been shown to induce relaxation of both aortic rings and ileum precontracted with phenylephrine and acetylcholine (Wattanapitayakul et al., 2008). Although *K. parviflora* has been shown to possess high potentials for development of health products, chronic toxicity study of its extracts has never been reported. In this study, we investigated chronic toxicity of the *K. parviflora* ethanolic extract in Wistar rats to support the use of health products from *K. parviflora*.

MATERIALS AND METHODS

Kaempferia parviflora extract: *K. parviflora* was cultivated in Chatrakarn District, Phitsanulok Province, Thailand and two-month aged rhizomes were harvested in January 2004. The plant materials were identified by Dr. Bungorn Sripanidkulchai and the voucher specimen (KP-CRD10D) was kept in Herbarium at the Center for Research and Development of Herbal Health Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand. The 95% ethanolic extract of *K. parviflora* rhizome (KPE) was prepared by the Center for Research and Development of Herbal Health Products, Khon Kaen University, Thailand. The KPE powder was brown in color and had a yield of 4.09% of *K. parviflora* dried rhizome powder. The content of total flavonoids were 35.52 mg/g of dried powder and the amount of three major markers: 5,7-dimethoxyflavone, 5,7,4'-trimethoxyflavone and 3,5,7,3',4'-pentamethoxyflavone assayed by Gas chromatography were 24.138 mg/g dried powder. The KPE was homogeneously suspended in 1.0% tragacanth solution and adjusted to the desired concentrations for chronic toxicity study.

Animals: One hundred and twenty Wistar rats (60 male rats and 60 female rats weighing approximately 180-200 and 170-190 g, respectively) were purchased from The National Laboratory Animal Center, Mahidol University. Animals were housed in a hygienic conventional animal room of the laboratory animal center, Department of Medical Sciences, where the environment of the room was maintained at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ with 60% humidity and 12 hour-light-dark cycle. They were raised with commercial pellet diet and clean water *ad libitum*. Prior to

the chronic toxicity study, the animals were acclimatized to the environment for two weeks. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, Department of Medical Sciences as (permission No. 49-011).

Experimental design: The Wistar rats were randomly divided to five groups, 12 males and 12 females in each group. Three experimental groups were orally administered with KPE at the doses of 5, 50 and 500 mg/kg /day, respectively for six months. These doses were approximately equivalent to 1, 10 and 100 times of dried Krachaidam in human use (5-10 g/day/person). The other two control groups orally received distilled water and 1.0% tragacanth at the volume of 10 ml/kg respectively. Body weight and food consumption were recorded weekly and the animals were closely observed for general appearance, behavior and signs of abnormalities. At the end of the six-month treatment period, the animals were fasted overnight, anesthetized with diethyl ether inhalation. Blood samples were collected from posterior vena cava for determining hematological and serum clinical chemistry values.

Hematological analysis was performed using automatic hematological analyzer Cell Dyn[®] 3500 (Abbott Laboratories Ltd., USA). Parameters examined were hematocrit (Hct), hemoglobin, total red blood cell count (RBC), mean corpuscular volume (MCV), mean concentration hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC), total white blood cell count (WBC) including differential cell count (neutrophils, eosinophils, lymphocytes, monocytes and basophils) and total platelet count. Clinical chemistry values

were measured by using automatic chemistry analyzer Hitachi®912 (Hitachi Ltd., Japan) and parameter assays were alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total protein, albumin, bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium and chloride ions.

A complete necropsy was performed to determine gross pathological alterations of various visceral organs. The brain, heart, lung, liver, kidney, stomach, spleen, testis, uterus and adrenal glands were weighed by using Mettler Toledo[®]PB 153 balance (Mettler Toledo International Inc., Switzerland). The visceral organ weights were calculated into relative organ weight (g/1000 g body weight). The visceral organs were fixed in 10% buffered formalin and subjected to conventional histological process. Histopathological examination of visceral organs was performed on the brain, heart, lung liver, stomach, spleen, kidney, pancreas, intestines, bladder, adrenal and thyroid gland, lacrimal gland, salivary gland including testis, prostate gland, seminal vesicle in the male, ovary, uterus and mammary glands in the female.

Statistical analyses: The data was analyzed using one way ANOVA and Bonferroni test in multiple comparison. Histopathological result was analyzed using Fisher's exact. Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of KPE on body weight, food consumption and relative organs weight: All KPE-treated groups had no significant differences in body weight compared to both water

and tragacanth control groups, whereas male rats receiving KPE at dose of 500 mg/kg/day had significantly lower body weight than both control groups at week 8 till the end of the experiment (Figure 1). Male rats receiving KPE at dose of 500 mg/kg/day had significantly less food consumption than the water control group during week 12 to 15 and week 20 till the end of the experiment. Moreover, this group had significantly less food consumption than their tragacanth control group in some weeks. All KPE-treated female groups had no significant reduction in food consumption throughout the experiment (Figure 2).

Only the highest dose-treated group, had significant increases in relative weight of some organs. Both male and female rats of this group had significantly higher relative weight of heart, liver, stomach, right kidney than both water and tragacanth control groups. The relative lung weight of the females was higher than that of the males and the tragacanth control groups and significantly higher than that of the water control group. The relative left kidney and bladder weight of the male rats was significantly higher than that of both water and tragacanth control groups (Table 1).

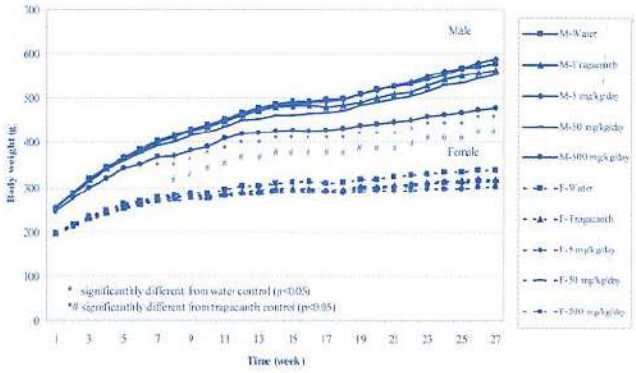


Figure 1. Growth curves of male and female rats receiving KPE for 6 months

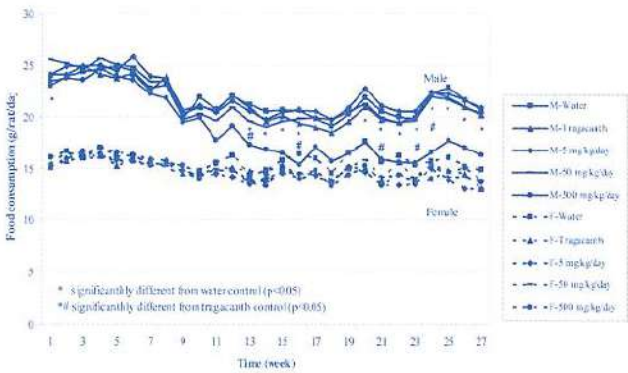


Figure 2. Food consumption of male and female rats receiving KPE for 6 months.

Table 1 Body weight (g) and relative organ weight (g/1000g body weight) of male and female rats receiving *Kaempferia parviflora* extract (KPE) for 6 months

Organs	Male rats						Female rats					
	Control		Dose of KPE (mg/kg/day)		Dose of KPE (mg/kg/day)		Control		Dose of KPE (mg/kg/day)		Dose of KPE (mg/kg/day)	
	Water n=12	Tragacanth n=12	5 n=12	50 n=12	500 n=11	Water n=12	Tragacanth n=12	5 n=12	50 n=12	500 n=11		
Initial body weight	252.08±19.86	253.93±20.46	252.79±17.19	252.30±23.11	244.31±27.31	197.17±10.64	197.92±9.95	197.57±14.08	193.23±8.93	198.15±13.68		
Final body weight	558.87±54.49	544.86±31.06	567.71±36.35	509.53±114.01	454.34±38.59a,b	327.36±40.58	305.95±25.43	302.01±12.80	302.86±26.25	279.70±34.99a		
Brain	3.87±0.36	3.95±0.22	3.74±0.31	3.93±0.39	4.61±0.65	6.17±0.78	6.51±0.47	6.49±0.25	6.51±0.48	7.01±0.78		
Heart	2.55±0.29	2.53±0.25	2.50±0.20	2.61±0.18	3.05±0.59a,b	2.99±0.26	3.14±0.21	3.14±0.16	3.13±0.20	3.45±0.39a,b		
Lung	3.08±0.29	3.23±0.23	2.97±0.38	3.17±0.42	3.56±0.54a	4.24±0.45	4.25±0.29	4.38±0.31	4.41±0.29	4.76±0.30a,b		
Liver	23.62±2.16	25.24±2.22	23.56±1.95	25.16±2.87	31.33±4.20a,b	25.24±3.06	26.46±3.71	25.52±3.36	25.87±2.04	39.57±5.47a,b		
Stomach	3.81±0.42	3.83±0.34	3.59±0.43	3.90±0.52	5.31±1.12a,b	5.10±0.73	5.23±0.49	5.45±0.77	5.71±0.58	8.70±0.82a,b		
Spleen	1.57±0.13	1.54±0.19	1.46±0.13	1.55±0.16	1.54±0.54	2.10±0.38	2.25±0.39	2.16±0.31	2.06±0.15	2.31±0.27		
Right Kidney	2.20±0.19	2.23±0.13	2.13±0.16	2.31±0.17	2.96±0.45a,b	2.74±0.28	2.88±0.32	2.78±0.27	2.84±0.33	3.33±0.32a,b		
Left Kidney	2.10±0.24	2.14±0.17	2.03±0.12	2.23±0.16	2.91±0.64a,b	2.61±0.30	2.73±0.22	2.66±0.27	2.70±0.18	2.84±0.84		
Right Testis	5.34±0.59	5.16±0.99	5.10±0.51	5.48±0.71	5.89±1.59							
Left Testis	5.35±0.74	5.45±0.83	5.17±0.43	5.49±0.75	5.97±1.51							
Right Adrenal	0.06±0.02	0.07±0.01	0.05±0.01	0.06±0.02	0.07±0.02	0.15±0.04	0.13±0.02	0.12±0.02	0.12±0.02	0.13±0.03		
Left Adrenal	0.07±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.07±0.02	0.08±0.02	0.15±0.04	0.14±0.02	0.14±0.02	0.12±0.01	0.14±0.03		
Bladder	0.31±0.05	0.31±0.04	0.33±0.09	0.34±0.08	0.41±0.08a,b	0.31±0.45	0.32±0.05	0.32±0.06	0.31±0.04	0.36±0.08		
Uterus						2.15±0.82	2.33±0.59	2.40±0.78	2.10±0.57	2.98±1.43		
Right Ovary						0.25±0.05	0.25±0.06	0.24±0.06	0.23±0.05	0.34±0.11		
Left Ovary						0.26±0.09	0.25±0.05	0.25±0.06	0.24±0.05	0.29±0.06		

The values are expressed as mean±SD.

a significantly different from water control group (p<0.05) b significantly different from tragacanth control group (p<0.05)

Table 2 Hematological values of male and female rats receiving *Kaempferia parviflora* extract (KPE) for 6 months

Parameters	Male rats						Female rats					
	Control		Dose of KPE (mg/kg/day)		Control		Dose of KPE (mg/kg/day)		Control		Dose of KPE (mg/kg/day)	
	Water n=12	Tragacanth n=12	5 n=12	50 n=12	500 n=11	Water n=12	Tragacanth n=12	5 n=12	50 n=12	500 n=11		
Hematocrit (%)	50.09±2.02	48.53±1.58	48.37±2.89	49.33±3.64	48.67±4.80	49.26±2.87	48.20±5.26	49.28±4.37	46.47±1.28	48.51±2.06		
Hemoglobin (g/dl)	15.48±0.61	15.07±0.45	15.17±0.86	15.43±0.98	15.12±1.44	15.44±0.74	15.55±0.89	15.48±1.18	14.64±0.44	15.18±0.59		
REC (x10 ⁶ /mm ³)	9.20±0.44	8.94±0.27	8.88±0.54	9.06±0.56	8.76±0.61	8.47±0.57	8.38±0.50	8.43±0.48	8.00±0.35	8.95±0.48		
MCV (µm ³ /red cell)	54.50±2.42	54.30±1.21	54.49±1.59	54.40±1.56	55.55±3.14	58.46±1.10	59.05±1.91	58.88±2.39	58.15±2.07	58.16±1.55		
MCH (pg/red cell)	16.83±0.76	16.86±0.36	17.11±0.56	17.02±0.40	17.27±1.00	18.24±0.57	18.56±0.57	18.38±0.61	18.33±0.74	18.19±0.61		
MCHC (g/dl RBC)	30.91±0.42	31.06±0.47	31.39±0.42	31.29±0.46	31.10±0.53	31.35±0.58	31.45±0.49	31.47±0.50	31.53±0.48	31.26±0.45		
WBC (x10 ³ /mm ³)	3.7±0.81	3.70±1.15	3.28±0.71	4.38±1.35	3.96±1.10	1.98±0.38	2.32±0.89	2.06±0.57	2.51±0.89	2.70±0.76		
Neutrophil (%)	26.90±5.12	27.60±6.18	25.13±5.69	26.48±4.83	28.07±5.19	22.06±4.79	20.93±6.02	19.34±5.14	22.89±6.54	14.82±3.98a		
Eosinophil (%)	1.61±0.50	1.80±0.65	2.04±0.93	1.76±0.55	0.83±0.29ab	1.55±0.75	1.20±0.46	1.28±0.79	1.07±0.39	0.61±0.40ab		
Lymphocyte (%)	66.36±6.64	65.26±7.05	66.60±5.4	66.65±7.61	68.43±3.62	69.40±9.75	73.86±5.31	76.01±6.41	73.55±6.25	82.22±4.33ab		
Monocytes (%)	3.92±3.99	4.01±3.55	3.28±2.76	3.72±4.49	1.79±2.46	3.42±2.99	3.09±2.95	2.49±2.11	1.51±0.99	1.36±0.70		
Basophil (%)	1.21±1.02	1.33±1.03	0.56±0.87	1.16±0.75	0.89±0.61	1.08±0.56	0.95±0.65	0.96±0.60	1.03±0.50	0.98±0.51		
Platelet (x10 ³ /mm ³)	864.131±138.32	877.88±210.06	842.96±88.76	903.54±99.18	820.15±147.05	932.08±114.32	865.46±104.46	880.54±56.13	835.67±42.71	914.63±100.76		

The values are expressed as mean±SD.

a significantly different from water control group (p<0.05) b significantly different from tragacanth control group (p<0.05)

Effects of KPE on hematological and clinical chemistry values: Eosinophils in both male and female rats treated with 500 mg/kg/day of KPE were significantly lower than those in both water and tragacanth control groups. Lymphocytes in the highest dose female group were significantly higher than those in both water and tragacanth control groups whereas neutrophils were significantly lower than those in only the water control group (Table 2). In the male rats, ALP and triglyceride levels of the highest dose-treated group were significantly lower than those of the water control group and the latter's were also lower than those of the tragacanth control group. Creatinine value of the 50 mg/kg/day treated males was significantly lower than that of both water and tragacanth control groups. In the female rats, uric acid in the group receiving KPE at dose of 50 mg/kg/day was significantly lower than that in the water control group. Glucose and triglyceride levels of the highest dose treated group were significantly higher than those of both water and tragacanth control groups. Besides, BUN and sodium levels of the 50 mg/kg/day treated females were significantly higher than those of the water control group (Table 3).

Effects of KPE on histopathological alterations of the visceral organs: Necropsy revealed no remarkable gross lesions in any organs in all KPE-treated groups including both water and tragacanth control groups. Histopathological alterations found in all KPE-treated groups were not significantly different from those in both water and tragacanth control groups except male rats receiving KPE at doses of 50 and 500 mg/kg/day had significantly lower incidence of mild centrilobular fatty degenera-

tion in the liver and GALT proliferation in large intestine than both of water and tragacanth control groups. In other organs, there was no remarkable histopathological lesions in KPE-treated groups and both control groups. Histopathological results are shown in table 4.

DISCUSSION

In the present study, KPE at the dose of 500 mg/kg/day affected the body weight in only male rats after receiving KPE for two months onwards. This finding is in accordance with previous finding in the male rats receiving *K. parviflora* rhizome powder at 2000 mg/kg/day in the sixth month of chronic toxicity study (Chivapat et al., 2004). The significantly lower body weight in the highest dose treated male group may contribute to the decrease in their food consumption. These alterations indicated that the highest dose of KPE may affect some regulation signal of food intake and metabolism of the animals (Berdanier, 2004). However, there were no overt signs of toxicity and sign and ill health animal found in this group. The increase of relative heart, lung, liver stomach, kidney weights in the highest dosetreated male and female rats including urinary bladder in the male may be due to the decrease of body weight as histopathology of these organs did not show any associated abnormalities. Hematological results revealed a significant decrease in neutrophils and an increase in lymphocytes in the highest dosetreated female group including a decrease of eosinophils in both male and female treated with the highest dose, however these alterations were within the normal range (Gad, 1992). In addition, the decrease of eosinophils in both males and females treated

Table 3 Biochemical values of male and female rats receiving *Kaempferia paiviflora* extract (KPE) for 6 months

Parameters	Male rats						Female rats						
	Control		Dose of KPE (mg/kg/day)		Dose of KPE (mg/kg/day)		Control		Dose of KPE (mg/kg/day)		Dose of KPE (mg/kg/day)		
	Water n=12	Tragacanth n=12	5 n=12	50 n=12	500 n=11	500 n=11	50 n=12	5 n=12	Water n=12	Tragacanth n=12	5 n=12	50 n=12	500 n=11
ALT (U/L)	46.83±17.00	37.56±6.36	40.83±4.95	44.00±15.31	48.40±9.76	48.40±9.76	44.00±15.31	37.27±9.30	37.58±15.13	35.33±6.95	40.75±19.26	44.42±10.98	44.42±10.98
AST (U/L)	93.59±15.01	89.92±9.85	95.85±10.20	99.00±17.60	94.80±12.79	94.80±12.79	99.00±17.60	97.58±22.75	100.17±48.81	90.33±13.17	101.92±37.04	86.50±19.43	86.50±19.43
ALP (U/L)	54.42±6.12	50.67±6.49	57.58±9.96	50.67±6.40	40.50±10.22a	40.50±10.22a	50.67±6.40	23.33±11.41	25.33±5.00	24.67±8.27	20.83±6.91	26.42±9.69	26.42±9.69
BUN (mg/dl)	19.89±1.90	19.38±1.67	18.94±1.73	19.53±2.34	20.63±3.86	20.63±3.86	19.53±2.34	21.69±1.53	20.06±3.47	24.66±4.37	24.63±5.55	25.83±4.73a	25.83±4.73a
Creatinine (mg%)	0.60±0.06	0.60±0.06	0.58±0.04	0.50±0.08ab	0.54±0.09	0.54±0.09	0.50±0.08ab	0.60±0.08	0.61±0.07	0.62±0.07	0.63±0.14	0.61±0.16	0.61±0.16
Albumin (g/dl)	4.20±0.15	4.19±0.17	4.25±0.19	4.20±0.16	4.24±0.42	4.24±0.42	4.20±0.16	5.84±0.37	6.93±0.33	6.91±0.28	6.80±0.23	6.91±0.30	6.91±0.30
Bilirubin (mg/dl)	0.10±0.02	0.10±0.03	0.09±0.04	0.10±0.04	0.09±0.04	0.09±0.04	0.10±0.04	4.76±0.25	4.77±0.19	4.76±0.17	4.69±0.18	4.82±0.25	4.82±0.25
Total protein (g/dl)	6.73±0.33	6.74±0.39	6.81±0.30	6.62±0.27	6.57±0.59	6.57±0.59	6.62±0.27	0.16±0.03	0.14±0.03	0.16±0.05	0.15±0.05	0.14±0.04	0.14±0.04
Glucose (mg/dl)	193.07±28.55	210.71±41.20	193.06±24.25	199.10±53.24	192.21±35.06	192.21±35.06	199.10±53.24	140.84±20.16	141.58±19.03	130.25±25.65	155.56±24.09	174.96±21.43ab	174.96±21.43ab
Uric acid (mg/dl)	2.45±0.97	3.36±1.71	2.93±1.25	3.30±2.20	3.14±1.02	3.14±1.02	3.30±2.20	2.52±1.42	2.76±1.29	2.11±0.92	1.44±0.58a	2.52±0.87	2.52±0.87
Triglyceride (mg/dl)	10879±50.52	127.13±42.80	100.73±35.55	114.42±37.02	41.90±16.24ab	41.90±16.24ab	114.42±37.02	46.00±13.65	46.69±12.75	37.20±7.93	43.39±8.44	64.36±28.31	64.36±28.31
Cholesterol (mg/dl)	82.31±22.07	79.65±15.68	77.83±13.73	81.95±22.88	95.87±34.00	95.87±34.00	81.95±22.88	62.67±1.37	68.93±21.49	68.86±13.93	81.85±16.98	116.18±20.30ab	116.18±20.30ab
Na+ (mmol/l)	144.58±106	145.83±127	146.25±1.71	146.17±1.03	146.40±2.32	146.40±2.32	146.17±1.03	145.67±1.44	144.92±1.51	145.75±1.48	146.25±1.36	147.17±1.40a	147.17±1.40a
K+ (mmol/l)	6.27±0.50	5.75±0.58	5.85±1.28	6.27±1.50	5.79±1.76	5.79±1.76	6.27±1.50	6.28±1.82	6.36±1.42	6.01±1.50	4.69±0.88a	5.68±1.19	5.68±1.19
Cl- (mmol/l)	104.17±1.19	104.67±1.37	105.67±1.44	104.58±1.88	104.20±2.30	104.20±2.30	104.58±1.88	106.50±1.31	105.75±1.71	106.92±2.39	106.42±1.24	105.50±1.62	105.50±1.62

The values are expressed as mean±SD.

a significantly different from water control group (p<0.05); b significantly different from tragacanth control group (p<0.05)

Table 4 Histopathological results of visceral organs in male and female rats receiving Kaempferin parviflora extract (KPE) for 6 months

Organs	Microscopic findings	Male rats						Female rats					
		Dose of KPE (mg/kg/day)			Dose of KPE (mg/kg/day)			Dose of KPE (mg/kg/day)			Dose of KPE (mg/kg/day)		
		control	5	50	500	control	5	50	500	control	5	50	500
Lung	BALT proliferated	6/12	11/12	9/12	10/11	6/12	11/12	9/12	10/11	6/12	4/12	8/12	6/12
Heart	Focal myocardiosis	3/12	3/12	2/12	2/11	1/12	3/12	2/12	2/11	3/12	0/12	2/12	0/12
Liver	Centriobular fatty degeneration	4/12	7/12	1/12b	0/11b	9/12	7/12	1/12b	0/11b	0/12	0/12	0/12	1/12
Kidney	Bile ductile proliferation	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	0/12	0/12	0/12	0/12
	Cystic nephrosis	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	2/12	1/12	1/12	0/12
	Chronic pyelonephritis	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL	2/12	1/12	1/12	0/12
Small intestine	GALT proliferation in submucosa	3/12	2/12	2/12	1/11	1/12	2/12	2/12	1/11	0/12	0/12	0/12	1/12
Large intestine	GALT proliferation in submucosa	2/12	5/12	0/12	0/11	5/12	1/12	0/12	0/11	3/12	3/12	0/12	1/12
Testis	Testicular atrophy	1/12	0/12	0/12	0/11	1/12	0/12	0/12	0/11	1/12	0/12	0/12	1/12
	Orchitis	0/12	0/12	1/12	0/11	0/12	0/12	1/12	0/11	0/12	2/12	0/12	1/12
Adrenal gland	Cortical fatty infiltration	3/12	4/12	5/12	4/11	4/12	8/12	5/12	4/11				

The results were expressed as the number of rats with pathological findings per total number of rats treated
 b significantly different from tragacanth control group (p<0.05)
 (NRL: No remarkable lesions, BAL.T: Bronchial associated lymphoid tissue, GALT: Gut associated lymphoid tissue)

with the highest dose of KPE was consistent with our previous study (Chivapat et al., 2004). Although the decreases in ALP and triglyceride level in the male rats receiving the highest dose were observed, these findings did not indicate any clinically pathologic states (Stockham and Scott, 2002). The significant decreases in uric acid and potassium levels in the female rats receiving KPE at 50 mg/kg bw/day showed no dose dependency and thus might not be related to KPE. There were increases of BUN and sodium level in the highest dose female group; however these alterations were in the normal range (Gad, 1992). It was found that the highest dose-treated female group had higher glucose level, compared to their control groups whereas our previous report revealed no alterations in glucose level in the female group receiving the highest dose of *K. parviflora* rhizome powder (Chivapat et al., 2004). This discrepancy may be due to the difference in chemical constituents and their contents between KPE and the crude drug. The elevated level of cholesterol of only the highest dose of KPE-treated female rats was similar to that found in the six-month treatment of *K. parviflora* crude powder (Chivapat et al., 2004). The significant decrease of centrilobular fatty degeneration in the liver of the male groups receiving KPE at doses of 50 and 500 mg/kg/day compared to the tragacanth group may be due to KPE. Wu et al. (2006) demonstrated that total flavonoids from the aerial parts of *Laggera alata* possessed both in vitro and in vivo hepatoprotective effects and nine flavonoids such as 3', 4', 5-trihydroxyl-3, 7- dimethoxyflavone, 5-hydroxy-3,3',4',7-tetramethoxyflavone were isolated. As there are various flavonoids in Krachaidam rhizomes

(Sutthanut et al., 2007) and thus some of them might be responsible for hepatoprotective effect. The decrease of large intestinal lymphoid tissue proliferation in the male rats receiving KPE at the dose of 50 and 500 mg/kg/day compared to the tragacanth control group may contribute to anti-inflammatory effect of KPE. It is demonstrated that the ethanolic extract of *K. parviflora* and some of its methoxyflavones exhibit high activity against the release of inflammatory mediators i.e. nitric oxide and PGE2 from LPS-induced macrophage (Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2008). Histopathological findings in some organs of all KPE-treated groups were not different from those of both control groups, therefore these may not contribute to KPE.

In conclusion, our chronic toxicity study of KPE in rats at doses of 5, 50 and 500 mg/kg/day indicated that KPE did not produce any overt pharmacotoxic signs and abnormality in hematological values including most of clinical chemistry values. Moreover, KPE did not cause any histopathological alterations in various studied organs. However, female rats receiving KPE at dose of 500 mg/kg or approximately 100 folds higher than the dose of dried Krachaidam in human use had significantly higher level of glucose and cholesterol whereas the male rats receiving this dose had less food consumption and body weight than their control groups. Hence, this information will be beneficial guidance to consider the appropriate dose level of KPE in further health product developments.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank Dr. Bungorn Sripanidkulchai and Dr. Kattaleya Sutthanat for providing *K. parviflora* extract

and chemical profile. We also thank staffs of the Laboratory Animal Center of Department of Medical Sciences for animal facilities. This study was supported by grants from The National Research Council of Thailand 2006.

REFERENCES

- Azuma, T., Tanaka, Y. and Kikuzaki, H. 2008. Phenolic glycosides from *Kaempferia parviflora*. *Phytochemistry*. 69: 2743-2748.
- Berdanier, CD. 2004. Gastrointestinal system and metabolism. In: *The Laboratory Mouse*. H.J. Hedrich and G. Bullock (eds.) Amsterdam: Elsevier. 245-259.
- Chivapat, S., Chavalittumrog, P., Phadungpat, S., Kumar P.K., Chansuvanich N., Attawish A. and Punyamong, S. 2004. Acute and chronic toxicity study of *Kaempferia parviflora* Wall ex. Bak powder. *J. Thai Tradit. Alternat. Med.* 2(2): 3-16.
- Gad, S.C. 1992. The Rat. In: *Animal Model in Toxicology*: S.C. Gad and C.P. Chengelis (eds.). New York: Marcel Dekker: 78-95.
- Herunsalee, A., Pancharoen, O. and Tuntiwachwuttikul, P. 1987. Further studies of flavonoids of the black rhizomes *Boesenbergia pandurata*. *J. Sci. Soc. Thai.* 13:119-122.
- Jaipetch, T., Teutrakul, V., Tuntiwahwuttikul, P. and Santisak, T. 1983. Flavonoids in the black rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. *Phytochem.* 22: 625-626.
- Rujjanawate., C. Kanjanapothi D. and Amornlerdpison, D. 2005. Anti-gastric ulcer effect of *Kaempferia parviflora*. *J. Ethnopharmacol.* 102:120-122.
- Sirirugsa, P. 1992. Taxonomy of the genus *Kaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand. *Thai. For. Bull.* 19: 1-15.
- Sookkongwaree, K., Geitmann, M., Roengsumran, S., Petsom, A. and Danielson, U.H. 2006. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavonoids isolated from *Kaempferia parviflora*. *Pharmazie* 61: 717-721.
- Stockham, S.L. and Scott, M.A. 2002. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Ames: Iowa State Press. 610 pp.
- Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B., Yenjai, C. and Jay, M. 2007. Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *J. Chromatogr.* 1143: 227-233.
- Tewtrakul, S., Subhadhirasakul, S. and Kunmee, S. 2008. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *J. Ethnopharmacol.* 116: 191-193.
- Tewtrakul, S. and Subhadhirasakul, S. 2008. Effects of compounds from *Kaempferia parviflora* on nitric oxide, prostaglandin E2 and tumor necrosis factor-alpha productions in RAW264.7 macrophage cells. *J. Ethnopharmacol.* 120(1): 81-84.
- Wattanapitayakul, S.K., Chularojmontri, L., Herunsalee, A., Charuchongkolwongse, S. and Chansuvanich, N. 2008. Vasorelaxation and antispasmodic effects of *Kaempferia parviflora* ethanolic extract in isolated rat organ studies. *Fitoterapia.* 79(3): 214-216.
- Wutythamawech, W. 1997. *Encyclopedia of Thai Herbs*. Bangkok: OS Printing. 626 pp. (in Thai).
- Wongsinkongman, P., Mongkolchaipak, N., Chansuvanich, N., Techadumrongsin, Y. and Boonruad, T. 2003. Quality evaluation of crud drugs and volatile oil of Krachai-dam rhizomes. *Bull. Dept. Med. Sci.* 45(1): 1-16.

- Wu, Y., Wang, F., Zheng, Q., Lu, L., Yao, H., Zhou, C, Wu, X. and Zhao, Y. 2006. Hepatoprotective effect of total flavonoids from *Laggera alata* against carbon tetrachloride-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes and in rats with hepatic damage. J. Biomed. Sci. 13: 569-578.
- Yenjai, C, Prasanphen, K., Daodee, S., Wongpanich, V. and Kittakoo, P. 2004. Bioactive flavonoids from *Kaempferia parviflora*. Fitoterapia.75: 89-92.

Chronic toxicity study of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in rats

Aimmanas Attawish¹, Songpol Chivapat²,
Pranee Chavalittumrong³, Songpol Phadungpat⁴,
Jaree Bansiddhi⁵ and Bunjong Chaora⁶

ABSTRACT

Attawish, A., Chivapat, S., Chavalittumrong, P., Phadungpat, S., Bansiddhi, J. and Chaora, B.

Chronic toxicity study of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in rats

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(5) : 1027-1036

The effect of water extract of *Hyptis suaveolens* (*H. suaveolens*) was evaluated for 6-month chronic toxicity in Wistar rats. Control group received distilled water orally 10 ml/kg/day. The extract was orally given to five treatment groups at the doses of 5, 50, 250, 500 and 500 mg/kg/day for 6 months. The last group was served as the recovery group. Changes in the body weights, actual and relative organ weights were not significantly demonstrated in all groups throughout the study. The results of hematological, biochemical parameters and histopathological lesions showed that the extract did not produce any significant dose related changes. Therefore, it may be concluded that the extract of *H. suaveolens* at the given doses did not produce any significant toxic effect in rats during 6-month period of the treatment.

Key words : *Hyptis suaveolens*, chronic toxicity, rat

บทคัดย่อ

เอมมนัส อัครวิชญ์ ทรงพล ชีวะพัฒน์ ปราณีย์ ชาวลิตอำรง ทรงพล ผดุงพัฒน์ จารีย์ บันลิตธี และ บรรจง ชาวไร่
การศึกษาพิษเรื้อรังของแมงลักคาในหนูขาว

ว. สงขลานครินทร์ วทพ. 2548 27(5) : 1027-1036

ประเมินผลการศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดด้วยน้ำของแมงลักคาในหนูขาวเป็นระยะเวลา 6 เดือนเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นขนาด 10 มล./กก./วัน โดยป้อนสารสกัดให้หนูกลุ่มทดลอง 5 กลุ่มในขนาด 5, 50, 250, 500 และ 500 มก./กก./วัน โดยหนูกลุ่มสุดท้ายเป็นหนูกลุ่มสังเกตอาการหลังการหยุดยา การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวหนูขาว และน้ำหนักอวัยวะในหนูกลุ่มทดลองทุกกลุ่มไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาทางโลหิตวิทยา ชีวเคมีคลินิก และจุลพยาธิวิทยา ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในหนูขาวที่ลัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ได้รับ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าสารสกัดแมงลักคาในขนาดที่ให้หนูขาวไม่ก่อให้เกิดอาการพิษตลอดระยะเวลา 6 เดือนที่ทำการศึกษา

¹M.Sc. (Nutritional Toxicology) ²M.Sc.(Pathobiology), D.V.M. ³M.S.(Phytochemistry), B.Sc. in Pharm. ⁴B.Sc. (Biotechnology) ⁵M.Sc.(Botany) ⁶B.Sc.(Botany), Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000, Thailand. Corresponding e-mail: aimmanas@dmrc.moph.go.th

Received, 24 September 2004 Accepted, 11 February 2005

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี 11000

Hyptis suaveolens (L.) Poit (*H. suaveolens*) (Labiatae) is commonly called in Thai as “Maeng lak kha” (Smitinand, 2001). It is a strong-scented herb, 30-150 cm high; spreading stem hispid. Leaves are ovate to broadly ovate, 2-8 cm long, 2-6 cm wide, pubescent; and have serrulate margins. Flowers are arranged in verticillate cymes, calyx campanulate, 5-toothed, spine-like teeth; corolla, blue or bluish violet, 2-lipped. Fruitlets are flattened, broadly obovoidal and emarginated at apex; pericarp swelling to a gelatinous mass when soaked in water (Keng, 1978; Li and Hedge, 1994). The plant is naturalized as weeds in open areas, found throughout Thailand. The main chemical constituents were 1,8-cineole and β -caryophyllene obtained from distillation (Peerzada, 1997). Azevedo *et al.* (2001) reported that the essential oils of *H. suaveolens* were sabinene, limonene, bi-cyclogermacrene, β -phellandrene and 1,8-cineole. After that Ziegler *et al.* (2002) isolated dehydro-abietinol from this plant. *H. suaveolens* was reported to be of therapeutic value as a stimulant carminative, antiseptic, sudorific and galactagogue (Saluja and Santani, 1993). The essential oil of *H. suaveolens* inhibited the growth of both gram-positive and gram-negative bacteria as well as had mild antifungal activity against *Candida albicans* and *Aspergillus niger* (Iwu *et al.*, 1990). Ethanol extract of *H. suaveolens* leaves showed wound healing activity. The activity may be due to free radical scavenging action of the plant and enhancing level of antioxidant enzymes in granuloma tissue (Shirwaikar *et al.*, 2003).

However, no report for long-term toxicity test has been made. Thus in order to obtain

safety data of this plant extract prior to the clinical trial of *H. suaveolens* in humans, six-month toxicity study of *H. suaveolens* water extract was performed in rats.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The aerial part of *H. suaveolens* was collected from Kanchanaburi Province. The botanical identifications were determined using description of Keng (1978) and Li and Hedge (1994), and compared with the authentic specimen (Kerr 10204) at the Bangkok Herbarium (BK), Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperative, Bangkok, Thailand. A voucher specimen (Bansiddhi 45-1) was deposited at the Botanical Laboratory, Medicinal Plant Research Institute, Nonthaburi, Thailand.

Plant extraction

H. suaveolens aerial part, was washed with water, cut and dried in an oven at 50°C then refluxed. The filtrate was dried to give a residue (yield: 13.0 % w/w). The residue was dissolved in distilled water to concentrations needed for the study.

Animals

Ninety male Wistar rats weighing 150±10 g and 90 female rats weighing 130±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, Ministry of Public Health, maintained in standard environmental conditions and were allowed to have free access to food and clean water.

Six-month toxicity study

According to the WHO guideline (2000), ninety Wistar rats of each sex were randomly

divided into 6 groups of 15 animals per sex. Group 1 (water control) received distilled water 10 ml/kg/day for 6 months. Groups 2-5 were orally treated with the water extract at the doses of 5, 50, 250 and 500 mg/kg/day which were equivalent to 1,10, 50 and 100 folds the therapeutic dose in human, respectively. A further group, group 6, was treated with 500 mg/kg/day and used as a recovery group. Body weight and food-intake were measured weekly and the animals were observed for signs of abnormalities during the six-month of the treatment. At the end of the treatment period, the 1st-5th 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 6th group of the rats, the recovery group, was withdrawn from the feeding of the extract for 14 days before being sacrificed in order to determine whether toxic effects observed in high-dose group were reversible or permanent.

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 cells (RBC), mean cell volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), white blood cells (WBC), % neutrophil (%N), % lymphocyte (%L), % monocyte (%M), % eosinophil (%E), % basophil (%B) and platelet.

Biochemical analysis of serum samples was performed using an automatic chemistry analyzer (Hitachi Model 912, Roche). Biochemical parameters measured were alkaline

phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), total protein, albumin, bilirubin, creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium and chloride.

The positions, shapes, sizes and colors of the internal organs; namely, brain, heart, both kidneys, lungs, salivary gland, thyroid gland, parathyroid gland, trachea, esophagus, stomach, liver, pancreas, intestine, spleen, bladder, adrenal gland 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% phosphate buffered formalin solution. Tissue slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin. Histopathological examination was performed by a pathologist.

Statistical Analysis

The data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett multiple ranges test to determine significant differences between groups at $P < 0.05$. Histopathological data were evaluated by the Fisher exact test and the significance level was set at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of *H. suaveolens* extract on body weight, food-intake and relative organ weight

In both male and female rats, there was no difference in the average body weights between extract-treated groups and control groups through out the experimental period of six months (Figure1). However, relative food consumption of rats receiving the extract was

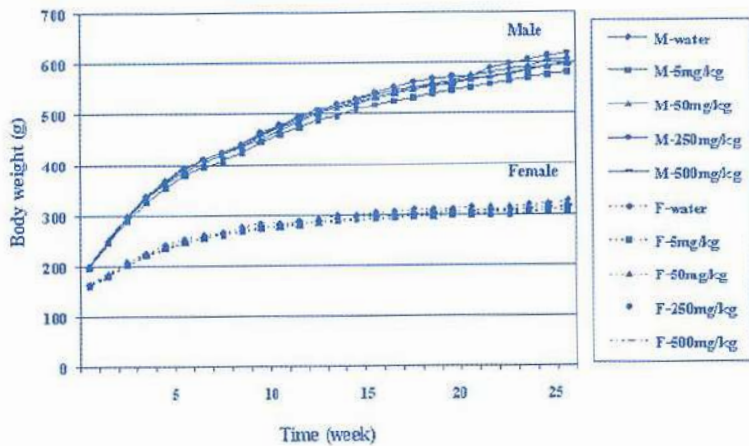
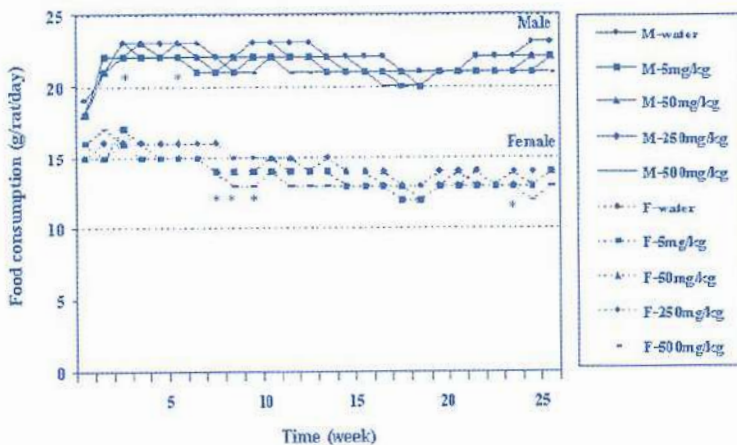


Figure 1. Growth curves of male and female rats receiving *H. suaveolens* for 6 months.



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

Figure 2. Food consumption of male and female rats receiving *H. suaveolens* for 6 months.

significantly different from the control groups for several weeks. Male rats receiving 5 mg/kg/day and 5, 50 mg/kg/day of the extract had significantly lower relative food-intake than the control group during 3rd and 6th weeks, respectively. All female rats receiving the same amount of extract as male rats also had

significantly lower relative food-intake than the control group at 8th week. During 9th, 10th and 24th weeks they showed the same incidence at the dose of 500 mg/kg/day (Figure 2). In both male and female rats, there was no difference in the relative organ weight between extract treated groups and control groups (Tables 1 and 2).

Table 1. Body weight (g) and relative organ weight (g/kg) of male rats receiving *H. suaveolens* for 6 months.

Organs	Dose of <i>H. suaveolens</i> (mg/kg BW/day)					
	control	5	50	250	500	500-R
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Initial body weight	151±9	146±9	147±7	146±9	147±8	149±10
Final body weight	606±49	581±38	599±56	618±48	596±60	586±60
Brain	3.74±0.34	3.72±0.32	3.65±0.42	3.50±0.37	3.70±0.33	3.73±0.40
Heart	2.48±0.25	2.40±0.21	2.40±0.20	2.36±0.18	2.37±0.22	2.58±0.24
Lung	3.08±0.41	3.03±0.33	3.06±0.25	2.93±0.25	3.00±0.31	2.82±0.61
Liver	24.43±1.71	23.70±1.30	23.98±1.71	23.55±1.49	23.81±1.32	24.42±1.51
Stomach	3.79±0.49	3.59±0.36	3.82±0.43	3.56±0.45	3.69±0.36	3.74±0.40
Spleen	1.71±0.33	1.71±0.25	1.78±0.50	1.60±0.17	1.67±0.24	1.70±0.20
Right Kidney	2.28±0.20	2.23±0.20	2.28±0.20	2.16±0.21	2.27±0.25	2.31±0.21
Left Kidney	2.18±0.19	2.23±0.20	2.21±0.23	2.09±0.19	2.21±0.20	2.25±0.18
Right Testis	5.50±0.68	5.47±0.71	5.08±0.60	5.22±0.52	5.29±0.56	5.47±0.66
Left Testis	5.47±0.58	5.47±0.68	5.19±0.63	5.23±0.57	5.40±0.62	5.56±0.63
Right Adrenal	0.058±0.018	0.062±0.020	0.035±0.012	0.057±0.008	0.061±0.013	0.057±0.013
Left Adrenal	0.065±0.020	0.064±0.021	0.060±0.014	0.063±0.010	0.067±0.011	0.065±0.015
Bladder	0.287±0.076	0.268±0.048	0.242±0.055	0.261±0.068	0.278±0.065	0.303±0.055

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 *E. suaveolens* for 6 months

Organs	Dose of <i>H. suaveolens</i> (mg/kg BW/day)					
	control	5	50	250	500	500-R
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Initial body weight	137±10	134±10	137±13	135±10	134±12	138±11
Final body weight	327±20	314±31	309±23	318±44	318±27	327±36
Brain	6.32±0.43	6.51±0.77	6.61±0.58	6.30±0.72	6.45±0.52	6.27±0.56
Heart	2.78±0.25	2.86±0.31	3.00±0.28	2.85±0.30	2.85±0.28	3.04±0.34
Lung	4.20±0.43	4.34±0.39	4.41±0.38	4.04±0.49	4.16±0.45	4.14±0.38
Liver	23.64±1.99	24.45±3.25	25.22±2.23	22.70±1.68	23.80±2.37	24.79±1.44
Stomach	5.08±0.43	5.13±0.72	5.27±0.76	4.80±0.58	5.09±0.61	5.09±0.44
Spleen	2.35±0.37	2.27±0.31	2.50±0.52	2.18±0.28	2.25±0.32	2.32±0.32
Right Kidney	2.69±0.24	2.72±0.25	2.73±0.20	2.70±0.28	2.62±0.24	2.76±0.24
Left Kidney	2.54±0.24	2.56±0.23	2.63±0.23	2.55±0.30	2.51±0.23	2.66±0.26
Right Adrenal	0.124±0.020	0.127±0.030	0.136±0.030	0.125±0.024	0.122±0.016	0.131±0.025
Left Adrenal	0.134±0.018	0.138±0.030	0.143±0.021	0.130±0.022	0.125±0.057	0.145±0.024
Bladder	0.278±0.054	0.265±0.036	0.298±0.051	0.289±0.055	0.268±0.038	0.296±0.043

R: Recovery group

The values are expressed as mean±SD.

Table 3. Hematological values of male rats receiving *H. suaveolens* for 6 months.

Parameters	Dose of <i>H. suaveolens</i> (mg/kg BW/day)					
	control	5	50	250	500	500-R
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Hematocrit (%)	49.95±3.51	50.03±1.56	50.29±2.57	50.78±2.55	51.91±1.55	50.40±2.21
RBC (x10 ⁶ cells/mm ³)	9.21±1.00	9.42±0.43	9.36±0.50	9.38±0.64	9.61±0.46	9.33±0.46
Hemoglobin (g/dl)	16.29±1.18	16.29±0.55	16.44±0.71	16.58±0.75	16.99±0.49	15.94±2.16
MCV (µm ³ /red cell)	54.51±3.12	53.17±1.46	53.74±1.56	54.21±1.41	54.06±1.80	54.03±1.67
MCH (pg/red cell)	17.77±0.94	17.32±0.43	17.59±0.47	17.70±0.55	17.69±0.53	17.58±0.57
MCHC (g/dl RBC)	32.06±0.45	32.57±0.46	32.70±0.59	32.65±0.47	32.74±0.40	32.53±0.49
WBC (x10 ³ cells/mm ³)	5.00±1.43	4.65±0.98	4.68±1.08	4.87±1.67	4.56±0.78	4.67±1.14
Neutrophil (%)	18.26±7.74	14.87±3.44	16.79±4.31	18.38±7.60	17.87±6.67	14.86±3.35
Eosinophil (%)	1.43±0.54	1.55±0.40	1.38±0.56	1.47±0.50	2.13±2.43	1.40±0.38
Lymphocyte (%)	65.97±9.90	71.34±6.15	69.60±5.34	68.02±9.55	67.97±7.78	71.14±4.88
Monocyte (%)	8.81±2.76	7.78±3.36	7.43±2.89	7.74±4.39	8.01±2.33	7.34±2.59
Basophil (%)	5.53±1.93	4.46±1.63	4.80±1.59	4.38±1.68	5.25±2.78	5.26±2.03
Platelet (x10 ³ cells/mm ³)	1070±172	1007±106	977±134	952±150	1024±108	1023±109

R: Recovery group

The values are expressed as mean±SD.

Table 4. Hematological values of female rats receiving *H. suaveolens* for 6 months.

Parameters	Dose of <i>H. suaveolens</i> (mg/kg BW/day)					
	control	5	50	250	500	500-R
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Hematocrit (%)	49.59±1.91	51.13±2.77	50.64±2.28	50.16±1.26	51.09±2.39	50.46±2.62
RBC (x10 ⁶ cells/mm ³)	8.49±0.44	8.70±0.49	8.75±0.41	8.64±0.31	8.72±0.50	8.50±0.41
Hemoglobin (g/dl)	16.15±0.55	16.72±0.86	16.56±0.67	16.36±0.40	16.56±0.74	16.32±0.88
MCV (µm ³ /red cell)	58.51±1.86	58.77±1.60	57.93±2.21	58.05±1.61	58.65±1.12	59.37±1.63
MCH (pg/red cell)	19.67±0.63	19.23±0.51	18.95±0.64	18.94±0.47	19.02±0.50	19.21±0.62
MCHC (g/dl RBC)	32.57±0.37	32.73±0.54	32.72±0.46	32.64±0.32	32.42±0.34	32.36±0.71
WBC (x10 ³ cells/mm ³)	2.12±0.46	2.15±0.55	2.33±0.46	2.18±0.75	2.27±0.53	2.42±0.69
Neutrophil (%)	16.88±3.96	18.12±3.81	18.39±4.58	18.26±5.62	15.74±5.41	14.51±4.46
Eosinophil (%)	1.51±0.46	1.62±0.56	1.57±0.58	1.60±0.58	1.56±0.56	1.40±0.73
Lymphocyte (%)	67.71±7.59	65.22±4.54	64.90±6.21	65.33±9.11	66.68±9.10	62.05±12.01
Monocyte (%)	10.50±5.35	11.01±3.72	10.70±4.67	10.65±4.59	11.48±5.98	16.32±8.82*
Basophil (%)	3.41±1.27	4.03±1.53	4.44±2.13	4.16±2.04	4.19±1.68	5.72±3.01*
Platelet (x10 ³ cells/mm ³)	942±79	922±106	959±95	956±120	993±103	950±72

* significantly different from control group (p<0.05)

R: Recovery group

The values are expressed as mean±SD.

Effect of *H. suaveolens* on hematological parameters

There was no difference of the number of red blood cells, hemoglobin, hematocrit, MCV, MCH, MCHC, the number of white blood cells, %N, %L, platelet between extract-treated groups and control groups of either male or female rats (Tables 3 and 4). Whereas in female rats, %M and %B of the recovery group were significantly higher than those of the control group, %M and %B of other extract-treated groups were not different from those of the control. Hence, these changes may not be due to the effect of the extract.

Effect of *H. suaveolens* on biochemical parameters

In both male and female rats, no differences (Tables 5 and 6) in the serum levels of ALP, ALT, AST, total protein, albumin, bilirubin, creatinine, triglyceride, cholesterol, sodium and potassium were found between *H. suaveolens* treated groups and the control groups. It was found that serum BUN of male rats receiving *H. suaveolens* at the dose of 500 mg/kg/day was significantly lower than that of the control group; however, the value was still within normal range (Semler *et al.*, 1992). Serum glucose of male rats receiving *H. suaveolens* at the dose of 50 mg/kg/day was significantly lower than that of the control group. Since this change did not occur in other *H. suaveolens*-treated groups, it was not a dose-dependent change and should not be due to the plant extract. Male rats receiving *H. suaveolens* at the dose of 250 mg/kg/day and the recovery group had significantly higher and lower levels of chloride ion compared to the control group, respectively; however, the values were within normal range (100-110 mmol/l) (Semler *et al.*, 1992) and the

changes were not dose-dependent. In female rats, the group receiving *H. suaveolens* at the dose of 500 mg/kg had significantly higher serum uric acid than the control group but the value was still within normal range (1.2-7.5 mg/dl) (Semler *et al.*, 1992).

Effect of *H. suaveolens* on histopathology of related changes of internal organs

No abnormal signs of internal organs were observed by gross examination. Histopathological examinations of the brain, lung, salivary gland, 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 performed. Pathological changes were observed in some tissue samples in some groups of animals. Fatty changes of the liver, myocarditis of the heart, nephrocalcinosis, pyelonephritis and hydrocalyx of the kidney, splenomegaly and spermatoc granuloma were found (Tables 7 and 8). However, all of these histopathological findings occurred in a small number of animals and were neither a significant change nor dose-related, and some changes occurred in the control group only.

The result indicated that the water extract of *H. suaveolens* given orally at doses of 5, 50, 250 and 500 mg/kg/day did not produce any sign of toxicity in the rats during the 6-month administration period. *H. suaveolens* was a Thai medicinal plant that was tested for anti-HIV activity in the "Project Herbs for AIDS" of the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. It was found that water extract of this plant possessed *in vitro* anti-HIV activity. Using enzyme inhibition assay, it was found that the mechanism of action of

this plant extract might be due to the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease. Chronic toxicity study of this plant extract was therefore performed in rats in order to obtain safety data of this extract prior to the evaluation of its therapeutic efficacy in humans.

CONCLUSION

Six-month chronic toxicity study of *H. suaveolens* in Wistar rats indicated that the water extract of *H. suaveolens* at the doses of 5, 50, 250 and 500 mg/kg/day, which were equivalent to 1, 10, 50 and 100 folds the therapeutic dose, respectively, did not produce any significant dose-related changes of hematological parameters, serum biochemistry or histopathology of any internal organs.

Therefore, it is concluded that the water extract of *H. suaveolens* at the given doses does not produce any significant toxic effect in rats during a six-month treatment period.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. Somnuek Jesdapatarakul, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, for histopathological examinations of tissue samples. Thanks are also due to Mr. Manas Attawish for his comment of the manuscript preparation, Miss Orntita Mitrijit, for laboratory assistance, the staff of the Animal Facility, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, for taking care of the animals throughout the study.

Table 5. Biochemical values of male rats receiving *H. suaveolens* for 6 months.

Parameters	Dose of <i>H. suaveolens</i> (mg/kg BW/day)					
	control	5	50	250	500	500-R
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
ALP (U/L)	60.60±10.67	59.13±10.96	58.73±9.35	63.60±10.89	61.00±15.60	60.27±9.97
ALT (U/L)	33.00±8.94	30.13±2.85	30.73±3.90	29.67±4.29	34.27±6.12	30.87±3.96
AST (U/L)	81.00±14.76	82.33±7.22	81.40±9.69	76.60±7.96	80.67±9.98	83.93±8.03
Total protein (g/dl)	6.67±0.38	6.59±0.23	6.74±0.33	6.76±0.25	6.79±0.33	6.71±0.21
Albumin (g/dl)	4.21±0.42	4.26±0.17	4.32±0.18	4.28±0.24	4.41±0.14	4.34±0.09
Bilirubin (mg/dl)	0.08±0.03	0.09±0.03	0.08±0.03	0.08±0.04	0.10±0.04	0.08±0.04
BUN (mg/dl)	19.64±1.84	18.50±1.41	19.00±2.25	18.56±1.67	17.73±2.41*	18.19±2.75
Creatinine (mg/dl)	0.72±0.06	0.73±0.06	0.72±0.06	0.73±0.04	0.75±0.05	0.72±0.04
Glucose (mg/dl)	216.06±49.73	190.04±27.21	179.06±28.33*	200.14±30.71	206.16±33.71	202.84±56.76
Uric acid (mg/dl)	3.98±1.75	3.03±1.71	2.77±1.75	3.06±1.88	3.61±1.88	3.77±1.90
Triglyceride (mg/dl)	103.72±29.00	99.11 27.65	110.42±28.19	111.67±31.59	117.32±28.18	112.84±35.42
Cholesterol (mg/dl)	87.83±14.58	80.97±12.42	84.68±18.12	85.53±20.07	78.98±15.39	80.84±11.18
Na ⁺ (mmol/l)	145±2	145±2	146±3	146±3	147±3	144±1
K ⁺ (mmol/l)	6.17±0.98	6.10±1.57	5.70±1.63	5.74±1.05	5.70±0.99	6.02±1.16
Cl ⁻ (mmol/l)	105±2	105±1	106±2	107±1*	106±2	103±1*

* significantly different from control group (p<0.05)

R: Recovery group

The values are expressed as mean±SD.

Table 6. Biochemical values of female rats receiving *H. suaveolens* for 6 months.

Parameters	Dose of <i>H. suaveolens</i> (mg/kg BW/day)					
	control	5	50	250	500	500-R
	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
ALP (U/L)	23.27±4.30	24.50±5.67	22.27±5.19	23.60±4.12	23.53±3.81	22.60±4.94
ALT (U/L)	26.67±7.28	33.53±16.87	32.00±12.82	31.07±10.21	31.53±9.19	25.47±6.84
AST (U/L)	84.33±13.99	97.13±29.39	96.60±21.16	94.27±18.99	88.67±11.11	83.67±15.96
Total protein (g/dl)	6.85±0.41	6.92±0.31	6.93±0.34	6.83±0.46	7.07±0.34	7.01±0.29
Albumin (g/dl)	4.85±0.30	4.89±0.20	4.88±0.24	4.87±0.33	5.10±0.30	4.93±0.21
Bilirubin (mg/dl)	0.13±0.04	0.13±0.04	0.12±0.03	0.14±0.06	0.13±0.03	0.11±0.04
BUN (mg/dl)	25.35±4.07	22.13±2.49	23.51±2.43	24.40±3.56	24.65±5.13	21.29±3.48
Creatinine (mg/dl)	0.87±0.10	0.80±0.07	0.84±0.09	0.88±0.12	0.87±0.12	0.87±0.06
Glucose (mg/dl)	125.00±19.95	120.27±28.32	116.69±26.06	127.27±27.42	138.90±32.45	138.33±27.30
Uric acid (mg/dl)	2.07±0.89	2.74±1.18	2.60±1.23	2.64±1.05	3.51±1.37*	3.00±0.91
Triglyceride (mg/dl)	52.16±21.83	49.10±15.86	49.14±14.74	51.30±17.38	62.58±17.60	45.94±5.05
Cholesterol (mg/dl)	68.56±18.32	73.32±17.01	67.98±15.28	60.69±12.76	75.74±17.98	72.21±10.54
Na ⁺ (mmol/l)	145±2	145±1	145±2	146±2	145±2	145±1
K ⁺ (mmol/l)	5.17±1.34	6.32±1.36	6.02±1.48	5.53±1.17	6.43±1.47	6.05±1.61
Cl ⁻ (mmol/l)	108±2	109±3	109±2	109±2	109±2	107±1

* significantly different from control group (p<0.05)

R: Recovery group

The values are expressed as mean±SD.

Table 7. Histopathological values of male rats receiving *H. suaveolens* for 6 months.

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>H. suaveolens</i> (mg/kg BW/day)					
		control	5	50	250	500	500-R
		n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Lung		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Heart	Myocarditis	1/15	0/15	0/15	3/15	0/15	0/15
Liver	Fatty change	1/15	0/15	0/15	2/15	0/15	0/15
Kidney	Hydrocalyx	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Spleen	Splenomegaly	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Pancreas		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
GI tract		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Testis	Spermatic granuloma	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15
Adrenal gland		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Salivary gland		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15

R: Recovery group

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

Table 8. Histopathological values of female rats receiving *H. suaveolens* for 6 months.

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>H. suaveolens</i> (mg/kg BW/day)					
		control	5	50	250	500	500-R
		n=15	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15
Lung		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Heart		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Liver	Fatty change	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15	0/15
Kidney	Nephrocalcinosis	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15
	Pyelonephritis And hydrocalyx	0/15	0/15	0/15	1/15	0/15	0/15
Spleen		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Pancreas		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
GI tract		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Ovary		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Uterus		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Cervix		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Adrenal grand		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Salivary grand		0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15

R: Recovery group

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

References

- Azevedo, N.R., Campos, I.F., Ferreira, H.D., Portes, T.A., Santos, S.C., Seraphim, J.C., Paula, J.R. and Ferri, P.H. 2001. Chemical variability in the essential oil of *H. suaveolens*. *Phytochem.*, 57(5): 733-736.
- Iwu, M.M., Ezeugwu, CO., Okunji, CO., Sanson, D.R. and Tempesta, M.S. 1990. Antimicrobial activity and terpenoids of the essential oil of *H. suaveolens*. *Int. J. Crude Drug Res.*, 28(1): 73-76.
- Keng, H. 1978. Labiatae. *Flora Malesiana*, 8(3): 368-372.
- Li, H.W. and Hedge, I.C. 1994. *Lamiaceae*. *Flora of China*, 17:267-268.
- Peerzada, N. 1997. Chemical composition of the essential oil of *H. suaveolens*. *Molecules*, 2: 165-168.
- Saluja, A.K. and Santani, D.D. 1993. Pharmacological investigation of the unsaponifiable matter of *Hyptis suaveolens*. *Fitoterapia*, 64(1): 3-6.
- Semler, D.E., Gad, S.C. and Chengelis, C.P. 1992. The Rat. In, *Animal Models in Toxicology* (Gad SC and Chengelis CP, eds) Marcel Dekker, New York.
- Shirwaikar, A., Shenoy, R., Udupa, A.L., Udupa, S.L. and Shetty, S. 2003. Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. *Indian J. Exp. Biol.*, 41(3): 238-241.
- Smitinand, T. 2001. *Thai Plant Names. The Forest Herbarium*, Royal Forest Department, Bangkok, Thailand.
- WHO. 2000. *General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicines*. WHO, Geneva.
- Ziegler, H.L., Jensen, T.H., Christensen, J., Staerk, D., Hagerstrand, H., Sittie, A.A., Olsen, C.E., Staalso, T., Ekpe, P. and Jaroszewski, J.W. 2002. Possible artefacts in the in vitro determination of antimalarial activity of natural products that incorporate into lipid bilayer: apparent antiplasmodial activity of dehydroabietinol, a constituent of *H. suaveolens*. *Planta Med.*, 68(6): 547-549.

Chronic toxicity of *Passiflora foetida* L. extract

Chivapat S ^{1*}, Bunjob M ¹, Shuasoprom A ¹, Bansidhi J ¹,
Chavalittumrong P ¹, Rangsriripat A ², Sincheroenpokai P ¹

¹ Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, 88/7 Tiwanon road, Mnang, Nonthaburi 11000, Thailand. ² Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

Summary: The extract of *Passiflora foetida* leaf has been reported to possess various interesting biological benefits. The objective of this study was to investigate the safety of ethanolic extract, containing 0.84% vitexin in Wistar rats. The animals were randomly allocated into five groups, each of twenty four rats (12 male and 12 female). Four experimental groups were orally given the *P. foetida* extract at the doses of 16, 160, 800 and 1600 mg/kg/day for six months respectively, whereas the control received distilled water. The extract did not affect the body weights, food intake and relative organ weights of the animals, and nor did cause the abnormal changes of hematological and biochemical values. Histopathological alterations in the various organs of all extract-treated group did not show any significance, except the adrenal glands of the highest dose male group showed the appearance of fatty infiltration in the cortex; however this phenomenon might be physiological rather than pathological change. The results suggested that the ethanolic extract of *P. foetida* extract at the given doses did not induce any harmful effects in the rats.

Industrial relevance: In this study, 40% ethanolic extract from *Passiflora foetida* leaves contained 0.84% vitexin which was reported to possess potent anti-inflammatory effect. In addition, other compounds i.e. Kaempferol, apigenin and luteolin in this plant were found to exert anti-histamine release. The present toxicity study revealed no harmful effect in the experimental animal. Therefore, the quality control of the above mentioned compounds in the extract could lead to anti-inflammatory and anti-allergic drug development for compensation of excessive steroidal drugs usage.

Keywords : Chronic toxicity; *Passiflora foetida*; rat

INTRODUCTION

Passiflora foetida (Passifloraceae) is a herbaceous vine with the auxillary tendrils and yellowish white hairy stems (Backer et al, 1963; De Wilde, 1963; Satterthwait, 1982). This plant is native to the West Indies, North South America and naturalized weed in Taiwan and China (Yinzheng et al., 2007). It is also widely

distributed in Thailand (Radanachaless and Maxwell, 1997). The leaves of this plant have been widely used as traditional therapeutics for insomnia, hysteria, emmenagogue, biliousness, asthma and skin inflammation in some countries such as India, Nigeria, Brazil and also in La Reunion (Dhawan et al., 2004). The major phytochemical constituents of *P.foetida* leaves

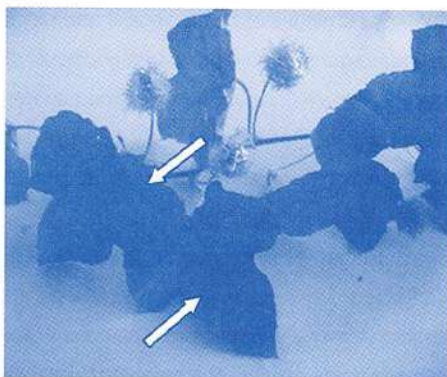
*Corresponding Author :
E-mail: songpol.c@dmisc.msil.go.th
Tel. +66-25899850

are C-glycosyl flavonoids such as chrysoeriol, apigenin, luteolin, kaempferol, isoschaftoside, 2''-xylosylvitexin, isovitexin and vitexin (Ulubelen et al., 1982). There are many reports indicating biological benefits of these flavonoids and crude extracts of *P.foetida* leaves. Vitexin exhibited potent hypotensive, anti-inflammatory and anti-spasmodic properties (Prabhakar et al., 1981). Recently vitexin and isovitexin have been shown to effectively inhibit the formation of advanced glycation endproducts (AGEs) which are found to be implicated in diabetic complications (Peng et al., 2008). Kaempferol, apigenin and luteolin were demonstrated to possess anti-allergic effect by inhibition of histamine release (Kawasaki et al., 1994). Regarding the crude extract of the leaf, the ethanolic extract of *P.foetida* displayed antiproliferative activity on human breast adenocarcinoma in potential range of IC50 (Moongkarndi et al., 2004). It was shown that the ethanolic extract possesses remarkable antibacterial against *Ps. putida*, *V. cholerae*, *S. flexneri* and *St. pyogenes* (Mohanasundari et al., 2007). Chan et al (2008) reported the analgesic activity of the hydro-alcoholic extract in mice. Furthermore, the extract from the callus of *P.foetida* leaf has been demonstrated to exert promising hepatoprotective effect in CCl4 induced hepatic injury rats (Rasool et al., 2011). Even though *P.foetida* is abundant in Thailand and it has been extensively used in the folklore medicine of some countries, there has been no report on the long-term toxicity of *P.foetida*. The present study aimed to investigate the safety or possibly harmful systemic effects of the *P.foetida* leaves extract in animal model. The results may be beneficial to assist safety assessment for

further clinical trial and phytopharmaceutical development in the future.

Materials and methods

Plant material. *Passiflora foetida* L. leaves were collected from the central part of Thailand (Figure 1). The botanical identification were determined using the description of Backer (Backer and Bakhuizen van den Brick, 1963) and de Wilde (De Wilde, 1963), and compared with the authentic specimens at the Bangkok Herbarium (BK) of the Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperative, Thailand. A voucher specimen of *P. foetida* L. (Bansiddhi 48-1) was deposited at the Botanical Laboratory, Medicinal Plant Research Institute,



Department of Medical Sciences, Thailand.

Figure 1. Aerial parts of *Passiflora foetida* L., leaves (arrow) were used for extract preparation

Extraction preparation and Phytochemical Analysis of *P. foetida* extract.

P.foetida leaves, washed with water and dried at 50°C, were coarsely pulverized into powder. The powder was macerated with 40 % ethanol (ratio 1:3) at 70°C for three consecutive days. The ethanol extract was evaporated under reduced pressure using rotary evaporator and then lyophilized to give brown extract powder.

The yield of dried extract from dried leaves was 14.9%. The high-performance thin layer chromatograms (HPTLC) of the standard vitexin and *P. foetida* extract were determined by the applied method of Vunduc' et al (2005). Chromatography was performed on 10 x 20 cm silica gel 60 F₂₅₄ HPTLC plates (Merck). Standard vitexin and *P. foetida* extract solution, each of 10 µL, were spotted on the plates by use a Camag automatic TLC Sampler IV (Muttentz, Switzerland). The plates were developed in a saturated chromatographic chamber with ethyl acetate: methanol: distilled water: formic acid in the proportion 50:2:3:6 (v/v) as mobile phase. The chromatograms were then subjected to densitometric analysis at $\lambda = 340$ nm using a CamagTLC Scanner III with Wincats software V 1.3.4 (Muttentz, Switzerland).

Animals. Twenty ICR mice weighing 18 to 20 g (10 of each sex) and 120 Wistar rats (60 of each sex) were purchased from The National Laboratory Animal Center, Mahidol university, Nakornpathom Province. The body weight range of male and female rats were 140 to 160 g and 120 to 140 g respectively. The animals were housed in the strict hygienic conventional room of Laboratory animal center, Department of Medical Sciences, where the environment of the room was maintained at 25°C with 60% relative humidity and 12-hour alternate light-dark cycle. Prior to acute toxicity testing, the mice were fasted for two hours. In the chronic toxicity study, the rats were acclimatized in that environment for two weeks and they were raised with commercial food and free access to clean water. The protocol of animal housing and treatment used in this study was approved by the Institutional Animal Care

and Use Committee of Department of Medical Science, Thailand (permission no.49-009)

Acute toxicity testing. Mice of each sex were randomly allocated into two groups containing 5 animals per sex. Control group was given distilled water while the tested group was orally administered with the suspension of *P. foetida* extract at the dose of 20 g/kg twice. The second dose was given after administration the initial dose for six hours. Mice were daily observed for fourteen days and the number of dead animals in each day were recorded. At the end of the testing, they were euthanized with CO₂ inhalation and were necropsied for determining macroscopic alterations of the visceral organs.

Chronic toxicity study. The experimental design was conducted according to WHO guideline (WHO, 2000). Wistar rats of each sex were randomly divided into five groups containing 12 animals per sex. Group 1 (water control) received water 10 ml/kg/day and group 2-5 were orally treated with the water suspension of *P. foetida* extract at the doses of 16, 160, 800 and 1600 mg/kg/day respectively for six months. Body weight and food consumption were measured weekly and the animals were observed daily for signs of abnormality throughout the study. At the end of the treatment, the animals were fasted for overnight and then anesthetized with diethyl ether inhalation. Blood samples were collected from the inferior vena cava of each animal for determining hematological and biochemical values using automatic hematological analyzer Cell Dyn[®] 3500 (Abbot, USA) and Hitachi[®] 912 (Hitachi, Japan) respectively. Hematological parameters measured were hematocrit,

hemoglobin, red blood cell (RBC), mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC), white blood cell (WBC), neutrophil, eosinophil, lymphocyte, monocyte, basophil and platelet. Biochemical parameters measured were alanine aminotransaminase (ALT), aspartate aminotransaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP), Total protein, albumin, bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium and chloride ions. A complete necropsy was performed to determine various visceral organs. Organ weights were recorded and calculated into relative organ weight (g /1000 g of body weight). The organs were then preserved in 10 % phosphate buffered formalin and subjected to conventional histological process for histopathological examination.

Statistical Analysis. All quantitative data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni test in multiple comparison. Histopathological result

was incidence was analyzed by Fisher's exact test. Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$. The significant level of analysis was set at $p < 0.05$.

Results

Phytochemical analysis of *P. foetida* extract. The vitexin was used as a marker component of *P. foetida* extract. The retention factor (Rf) of vitexin was found at 0.7 and the content of vitexin in the *P. foetida* extract was found to be 0.84 %. The HPTLC chromatograms of the standard vitexin and the *P. foetida* extract was shown in Figure 2.

Acute toxicity testing. The tested group treated with the extract at the dose of 20 g/kg did not show any signs of abnormality. After repeated with the same dose, all extract-treated mice were still normal, as compared with the control group. All animals survived till the end of the testing and there was no macroscopic alteration of the visceral organs in both treated and control groups.

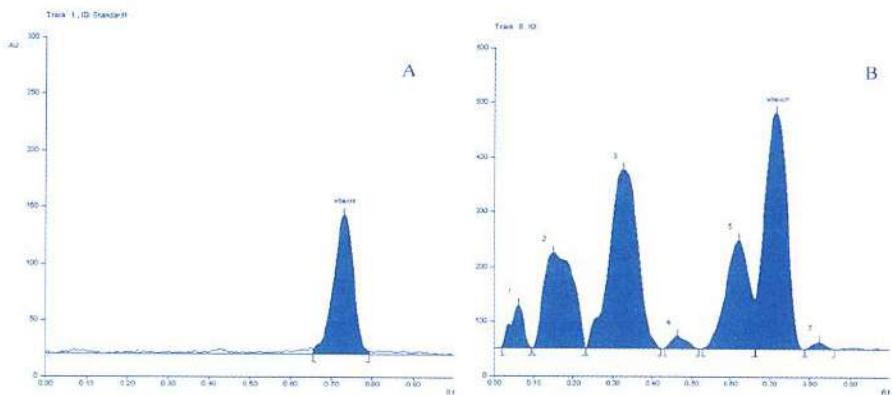


Figure 2. Chromatograms of the standard vitexin (A) and the *P. foetida* extract (B)

Effect of *P. foetida* extract on body weight, food intake, and relative organ weight. The average body weight and food intake in both male and female extract-treated groups were not significantly different from those of their corresponding control groups throughout the six-month experimental period (data not shown). There was no significant difference in relative organs weight of both male and female extract-treated rats when compared with their control groups (Table 1 and 2). In addition, the extract-treated rats did not show any signs of abnormality and nor did the control groups during the study.

Effect of *P.foetida* extract on hematological parameters. Male rats receiving the extract at the doses of 800 and 1600 mg/kg/

day had significantly higher neutrophil whereas lymphocytes were significantly lower, compared to the control group (Table 3). However, these changes were still within the normal range (Gad, 1992). There was no significant difference in hematological values of all extract-treated female rats compared to those of their control group (Table 4).

Effects of *P. foetida* extract on biochemical parameters. In both male and female rats, there was no significant difference in most biochemical parameters between the extract-treated and the control groups, with the exception that creatinine level in the male group receiving the extract at the doses of 800 and 1600 mg/kg/day was significantly lower than that in the control group (Table 5 and 6).

Table 1. Body weight (g) and relative organ weight (g/kg) of male rats receiving *P. foetida* extract for 6 months

Organs	Dose of <i>P. foetida</i> extract (mg/kg/day)				
	0	15	160	800	1600
	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12
Initial body weight	179.74±7.94	175.73±16.79	180.17±11.59	180.15±12.65	176.97±21.26
Final body weight	306.83±20.26	300.50±38.89	308.65±26.59	300.88±22.46	296.78±34.62
Brain	6.42±0.39	6.70±0.72	6.47±0.45	6.50±0.40	6.65±0.84
Heart	2.88±0.31	2.96±0.33	3.06±0.28	3.14±0.31	3.19±0.31
Lung	4.39±0.62	4.30±0.50	4.20±0.70	4.17±0.48	4.32±0.47
Liver	24.67±2.26	24.32±1.43	25.19±2.64	25.39±3.47	26.85±4.28
Stomach	5.26±0.70	5.20±0.52	5.08±0.72	5.41±0.47	5.61±0.50
Spleen	2.22±0.30	2.16±0.20	2.11±0.20	2.17±0.29	2.21±0.27
Right kidney	2.70±0.30	2.76±0.22	2.91±0.33	2.81±0.30	2.96±0.17
Left kidney	2.58±0.22	2.63±0.18	2.74±0.23	2.68±0.27	2.84±0.16
Right adrenal	0.13±0.04	0.14±0.03	0.13±0.03	0.12±0.04	0.13±0.03
Left adrenal	0.14±0.04	0.15±0.04	0.14±0.02	0.13±0.03	0.14±0.03
Bladder	0.29±0.03	0.32±0.09	0.29±0.06	0.30±0.04	0.32±0.12
Uterus	2.00±0.55	2.38±0.58	2.38±1.03	2.17±0.42	2.95±1.60
Right ovary	0.22±0.07	0.22±0.05	0.23±0.05	0.23±0.06	0.22±0.08
Left ovary	0.23±0.05	0.24±0.05	0.23±0.06	0.25±0.07	0.23±0.07

The values are expressed as mean±S.D.

Table 2. Body weight (g) and relative organ weight (g/kg) of female rats receiving *P. foetida* extract for 6 months

Organs	Dose of <i>P. foetida</i> extract (mg/kg/day)				
	0	16	160	800	1600
	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12
Initial body weight	179.74±7.94	175.73±16.79	180.17±11.59	180.15±12.65	176.97±21.26
Final body weight	306.83±20.26	300.50±38.89	308.65±26.59	300.88±22.46	296.78±34.62
Brain	6.42±0.39	6.70±0.72	6.47±0.45	6.50±0.40	6.65±0.84
Heart	2.88±0.31	2.96±0.33	3.06±0.28	3.14±0.31	3.19±0.31
Lung	4.39±0.62	4.30±0.50	4.20±0.70	4.17±0.48	4.32±0.47
Liver	24.67±2.26	24.32±1.43	25.19±2.64	25.39±3.47	26.85±4.28
Stomach	5.26±0.70	5.20±0.52	5.06±0.72	5.41±0.47	5.61±0.50
Spleen	2.22±0.30	2.16±0.20	2.11±0.20	2.17±0.29	2.21±0.27
Right kidney	2.70±0.30	2.76±0.22	2.91±0.33	2.81±0.30	2.96±0.17
Left kidney	2.58±0.22	2.63±0.18	2.74±0.23	2.68±0.27	2.84±0.16
Right adrenal	0.13±0.04	0.14±0.03	0.13±0.03	0.12±0.04	0.13±0.03
Left adrenal	0.14±0.04	0.15±0.04	0.14±0.02	0.13±0.03	0.14±0.03
Bladder	0.29±0.03	0.32±0.09	0.29±0.06	0.30±0.04	0.32±0.12
Uterus	2.00±0.55	2.38±0.58	2.38±1.03	2.17±0.42	2.95±1.60
Right ovary	0.22±0.07	0.22±0.05	0.23±0.05	0.23±0.06	0.22±0.08
Left ovary	0.23±0.05	0.24±0.05	0.23±0.06	0.25±0.07	0.23±0.07

The values are expressed as mean±S.D.

Table 3. Hematological values of male rats receiving *P. foetida* extract for 6 months

Parameters	Dose of <i>P. foetida</i> extract (mg/kg/day)				
	0	16	160	800	1600
	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12
Hematocrit (%)	49.30±2.17	47.92±2.04	48.88±1.87	48.45±2.59	47.10±1.42
Hemoglobin (g/dl)	15.73±0.61	15.55±0.58	15.74±0.45	15.68±0.77	15.18±0.54
RBC (x10 ⁶ cells/mm ³)	9.10±0.41	9.03±0.49	9.08±0.38	8.92±0.54	8.86±0.31
MCV (um ³ /red cell)	54.24±2.17	53.10±2.05	53.90±2.39	54.37±2.31	53.17±1.45
MCH (pg/red cell)	17.29±0.55	17.22±0.65	17.35±0.52	17.58±0.76	17.13±0.45
MCHC (g/dl RBC)	31.91±0.68	32.43±0.31	32.22±0.53	32.35±0.58	32.23±0.60
WBC (x10 ³ cells/mm ³)	3.70±0.59	3.65±0.72	3.83±0.68	2.99±0.64	4.42±1.35
Neutrophil (%)	18.75±3.58	23.58±5.59	20.04±5.89	25.70±4.57*	31.31±12.06*
Eosinophil (%)	1.64±0.77	1.76±0.51	1.94±0.54	1.91±0.53	1.35±0.63
Lymphocyte (%)	77.63±3.92	71.00±6.98	75.51±5.42	68.62±5.49*	63.68±13.06*
Monocyte (%)	1.35±1.34	2.86±2.48	1.77±1.60	2.93±1.86	2.82±2.99
Basophil (%)	0.66±0.40	0.80±0.38	0.72±0.42	0.85±0.40	0.95±0.58
Platelet (x10 ³ cells/mm ³)	931.71±93.42	898.92±107.50	908.96±72.20	874.92±87.44	904.88±75.27

The values are expressed as mean ±S.D.

* Significantly different from control group (p<0.05)

Table 4. Hematological values of female rats receiving *P. foetida* extract for 6 months

Parameters	Dose of <i>P. foetida</i> extract (mg/kg/day)				
	0	16	160	800	1600
	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12
Hematocrit (%)	47.22±2.88	47.10±2.32	48.08±2.63	46.45±2.58	46.12±1.52
Hemoglobin (g/dl)	15.44±0.74	15.40±0.81	15.67±0.82	15.23±0.73	15.12±0.53
RBC (x10 ⁶ cells/mm ³)	8.17±0.51	8.19±0.36	8.34±0.41	7.83±0.67	8.07±0.25
MCV (um ³ /red cell)	57.84±1.41	57.51±1.70	57.65±0.84	58.13±1.98	57.19±1.42
MCH (pg/red cell)	18.93±0.45	18.81±0.67	18.80±0.27	19.08±0.74	18.75±0.43
MCHC (g/dl RBC)	32.70±0.62	32.74±0.73	32.61±0.34	32.80±0.58	32.79±0.40
WBC (x10 ³ cells/mm ³)	2.31±0.89	2.21±0.74	2.00±0.84	2.61±0.93	2.73±1.33
Neutrophil (%)	19.72±5.60	20.92±5.53	20.25±5.14	21.55±5.07	19.61±4.93
Eosinophil (%)	1.50±0.61	1.45±0.66	1.50±0.94	1.75±1.16	1.25±0.47
Lymphocyte (%)	76.84±6.16	74.77±4.96	75.53±6.72	74.78±5.92	76.75±5.06
Monocyte (%)	1.31±0.72	2.14±1.79	2.08±1.93	1.27±1.13	1.59±1.05
Basophil (%)	0.65±0.36	0.72±0.34	0.62±0.21	0.65±0.38	0.81±0.34
Platelet (x10 ³ cells/mm ³)	859.88±73.00	859.55±67.81	891.58±111.41	857.46±97.07	844.38±65.82

The values are expressed as mean ±S.D.

Table 5. Biochemical values of male rats receiving *P. foetida* extract for 6 months

Parameters	Dose of <i>P. foetida</i> extract (mg/kg/day)				
	0	16	160	800	1600
	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12
ALT (U/L)	34.83±7.54	39.33±8.37	39.08±12.51	42.50±11.45	35.33±7.87
AST (U/L)	80.33±10.71	88.75±8.43	79.67±14.57	82.08±15.42	77.67±12.28
ALP (U/L)	54.58±5.68	49.00±6.35	57.92±10.06	55.17±10.08	56.67±13.12
Total protein (g/dl)	7.00±0.29	7.04±0.21	7.10±0.20	7.08±0.21	7.07±0.27
Albumin (g/dl)	4.49±0.15	4.52±0.14	4.54±0.18	4.62±0.16	4.52±0.29
Bilirubin (mg/dl)	0.08±0.03	0.08±0.03	0.09±0.03	0.08±0.02	0.08±0.03
BUN (mg/dl)	19.78±1.93	18.22±1.75	18.89±1.62	18.43±1.95	19.30±2.80
Creatinine (mg/dl)	0.66±0.06	0.62±0.07	0.60±0.05	0.59±0.04*	0.58±0.06*
Glucose (mg/dl)	198.19±43.33	179.55±22.80	203.89±33.32	204.58±51.62	186.99±21.94
Uricacid (mg/dl)	2.83±1.45	1.94±0.95	2.77±1.43	2.68±2.01	2.56±0.99
Triglyceride (mg/dl)	120.38±45.93	118.88±38.81	162.43±54.84	117.06±32.40	128.15±51.23
Cholesterol (mg/dl)	75.87±14.57	77.83±18.45	165.15±241.07	78.83±14.47	84.99±16.77
Na ⁺ (mmol/l)	144.25±9.12	145.67±9.95	142.58±13.27	142.08±16.29	145.42±9.83
K ⁺ (mmol/l)	6.42±1.26	5.83±1.18	5.57±1.01	5.54±1.18	5.58±1.30
Cl ⁻ (mmol/l)	101.33±6.84	103.33±7.35	100.50±9.71	100.00±12.11	102.58±7.56

The values are expressed as mean S.D.

* Significantly different from control group (p<0.05)

Toxicity of *P. foetida* L. extract

Table 6. Biochemical values of female rats receiving *P. foetida* extract for 6 months

Parameters	Dose of <i>P. foetida</i> extract (mg/kg/day)				
	0	16	160	800	1600
	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12	n = 12
ALT (U/L)	32.42±10.00	30.18±7.36	33.33±8.97	55.83±69.50	41.08±27.70
AST (U/L)	81.50±21.74	87.82±16.64	90.83±19.89	101.33±61.90	89.92±28.81
ALP (U/L)	21.33±2.74	21.55±5.03	23.42±4.27	20.83±4.24	24.75±10.28
Total protein (g/dl)	7.22±0.24	7.20±0.34	7.33±0.44	7.30±0.51	7.45±0.50
Albumin (g/dl)	5.15±0.20	5.05±0.28	5.26±0.38	5.15±0.28	5.21±0.40
Bilirubin (mg/dl)	0.10±0.03	0.11±0.03	0.10±0.05	0.12±0.05	0.13±0.05
BUN (mg/dl)	22.55±2.92	23.63±2.94	21.65±3.49	23.67±4.53	22.68±4.18
Creatinine (mg/dl)	0.64±0.09	0.66±0.07	0.64±0.08	0.66±0.11	0.60±0.10
Glucose (mg/dl)	151.17±26.15	147.74±21.70	155.73±14.96	144.96±19.51	161.54±23.98
Uricacid (mg/dl)	1.78±0.93	1.88±0.97	2.40±1.51	1.60±1.55	1.33±1.20
Triglyoeride (mg/dl)	63.77±20.67	45.88±9.67	46.88±12.96	47.59±11.91	53.49±13.84
Cholesterol (mg/dl)	70.89±13.40	63.59±14.67	75.69±18.62	76.18±29.34	86.77±32.76
Na ⁺ (mmol/l)	148.67±1.56	148.18±3.76	146.58±11.93	147.75±4.90	150.42±0.90
K ⁺ (mmol/l)	5.52±1.51	5.68±1.44	6.08±2.19	4.71±2.09	4.25±0.91
Cl ⁻ (mmol/l)	107.67±1.56	106.64±3.11	105.17±9.07	106.67±4.08	107.58±1.44

The values are expressed as mean ±S.D.

Effect of *P. foetida* extract on histopathological alterations of visceral organs. Necropsy revealed no remarkable gross lesions in any organs of all extract-treated groups as well as those in the control groups. Histopathological result of the adrenal glands in the male rats receiving the extract at dose of 1600 mg/kg/day showed significantly higher incidence of cortical fatty infiltration than that in the control group (Figure 3). There were no significant difference of histopathological findings in the heart, lung, liver, kidney, small and large intestine between all extract-treated groups and the control groups (Table 7 and 8). In addition, no remarkable histopathological lesion in the brain, stomach, spleen, pancreas, trachea, esophagus, urinary bladder, reproductive organs

(testes, prostate gland, seminal vesicle in the male, ovaries, mammary glands and uterus in the female), lymph nodes, thyroid, lacrimal and salivary glands was detected in all extract-treated groups as well as their corresponding control groups.

Table 7. Histopathological evaluation of male rats receiving *P. foetida* extract for 6 months

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>P. foetida</i> extract (mg/kg/day)				
		Control	16	160	800	1600
Heart	Focal myocardiosis	0/12	1/12	1/12	0/12	2/12
Lung	BALT	7/12	4/12	6/12	3/12	10/12
Liver	Centrilobular fatty degeneration	5/12	2/12	4/12	6/12	6/12
Kidney	Dilated tubule	2/12	0/12	2/12	1/12	1/12
Small intestine	GALT proliferation	1/12	1/12	0/12	3/12	1/12
Large intestine	GALT proliferation	1/12	1/12	1/12	2/12	0/12
Adrenal glands	Cortical fatty infiltration	0/12	1/12	0/12	4/12	5/12*

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

* Significant difference from control group ($p < 0.05$)

(BALT: Bronchiole associated lymphoid tissue, GALT: Gut associated lymphoid tissues)

Table 8. Histopathological evaluation of female rats receiving *P. foetida* extract for 6 months

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>P. foetida</i> extract (mg/kg/day)				
		Control	16	160	800	1600
Lung	BALT	6/12	2/12	6/12	8/12	4/12
Heart	Focal myocardiosis	0/12	1/12	0/12	1/12	0/12
Liver	Centrilobular fatty degeneration	3/12	0/12	1/12	0/12	3/12
Kidney	Tubular casts	1/12	1/12	2/12	1/12	0/12
	hydronephrosis	0/12	0/12	0/12	0/12	2/12
Small intestine	GALT proliferation	1/12	3/12	4/12	2/12	1/12
Large intestine	GALT proliferation	0/12	2/12	0/12	2/12	4/12

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

(BALT: Bronchiole associated lymphoid tissue, GALT: Gut associated lymphoid tissues)

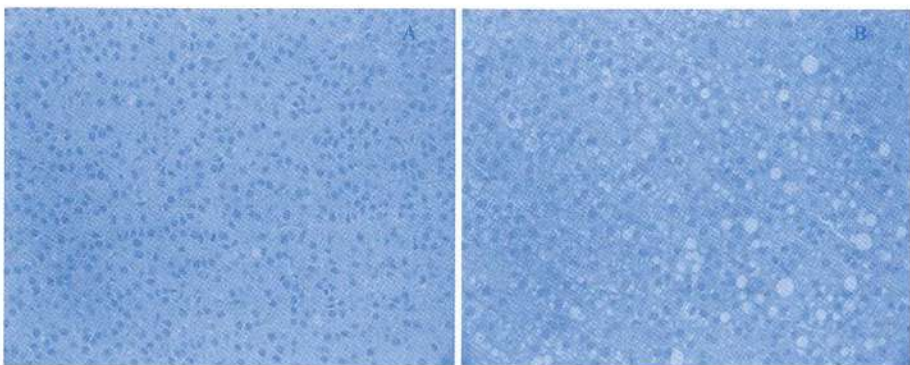


Figure 3. Histopathology of adrenal glands showing normal morphology from the control (A) and cortical fatty infiltration in the male rats treated with *P.foetida* extract at the dose of 1600 mg/kg/day (B).

DISCUSSION

In the present study, *P. foetida* extract did not cause any acute toxic effects and mortality in mice. Therefore its LD₅₀ should be more than 40 g/kg, which could be regarded as practically non toxic compounds (Frank, 1985). Chronic toxicity study suggesting that the extract at the given doses did not affect body weight gain, food intake, relative organs weight and nor did the animal health. Hematological result revealed the increase of neutrophil and the decrease of lymphocyte in the male groups receiving the extract at the doses of 800 and 1600 mg/kg; however these alterations were still within the rats normal range (Gad, 1992). The significant reduction of creatinine in the above mentioned two groups was not only within the normal range (Gad, 1992), but no clinical significance also (Stockham & Scott, 2002). While in the female, there was no hematological and biochemical alterations in the extract-treated groups. Taken together, it was suggestive that the extract causes no abnormality in hematological and biochemical values. The presence of cortical fatty infiltration in the adrenal glands of the male rats receiving the extract at dose of 800 and 1600 mg/kg tended to show dose dependency, this phenomenon may be due to the extract. Watanabe and Ayugase (2008) has demonstrated that the Buckwheat sprouts flavonoids containing about 40 % of vitexin and isovitexin caused the reduction in the plasma corticosterone and the flavonoids was proposed to suppress the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Phytochemical investigations showed that the leaves of the *P.foetida* containing major

C-glycosyl flavonoids such as vitexin and isovitexin (Ulubelen et al., 1982). Therefore the *P.foetida* extract might possibly play these roles causing the decrease of corticosteroids synthesis in the adrenal cortex. As a result, the lipids that are precursors of the steroids synthesis may accumulate or be retained in the cortical cells, which may be related to adrenal gland histological alteration, However, this change may be physiological response rather than pathological change and further evaluation of the *P.foetida* extract on plasma corticosterone and histopathology of the adrenal glands is required. Histopathological findings in some organs of the extract-treated groups were not suggestive of any toxicity caused by the extract. Therefore, it was conclusive that the extract at the given doses did not produce chronic toxicity in Wistar rats.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to Mrs. Aimmanas At-tawish for technical assistance, Thanks are also for the staff of Laboratory Animal Section, National Institute of health for the animal care and facilities.

REFERENCES

- Backer CA, Bakhuizen van den Brick RC. 1963. Passifloraceae, Flora of Java. 288-292.
- Chan Basha SK, Bajrang Raj D, Shashidhar SB, Jayaram RM. 2008. Evaluation of analgesic activity of hydro alcoholic leaf extract of *Passiflora foetida*. Indian J Pharmacol, supplement 2, 40: S75.
- De Wilde WJJO. 1963. Passifloraceae, Flora of Tropical East Africa. 11-18.
- Dhawan K, Dhawan S, Sharma A. 2004. Passiflora: a review update. J Ethnopharmacol. 94: 1-23.
- Frank C.Lu. 1985. Basic toxicology. Consulting Toxi-

- cologist Miami, Florida Hemisphere Publishing Corporation, New York, p. 104.
- Gad SC. 1992. The rat: pathology. In Animal models in toxicology. Gad SC, Chengelis CP (Eds). New York: Marcel Dekker; 111-113.
- Kawasaki M, Toyoda M, Teshima R, Sawada J, Hayashi T, Arisawa M, Shimizu M, Morita N, Inoue S, Saito Y. 1994. In vitro antiallergic activity of flavonoids in histamine release using rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. J. Food Hyg. Soc. Japan. 35: 497-503.
- Mohanasundari C, Natarajan D, Srinivasan K, Umamaheswari, Ramachandran A. 2007. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. - a common exotic medicinal plant. Afr. J. Biotechnol. 6: 2650-2653.
- Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. 2004. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. Fitoterapia. 75: 375-377.
- Peng X, Zheng Z, Cheng KW, Shan F, Ren GX, Chen F, Wang M. 2008. Inhibitory effect of Mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. Food Chem. 106:475-481.
- Prabhakar MC, Bano H, Kumar I, Shamsi MA, Khan SY. 1981. Pharmacological investigations on vitexin. Planta Med. 43: 396-403.
- Radanachalee T, Maxwell JF. 1997. Thai studies in Biodiversity No. 1, Work Press, Bangkok.
- Rasool SN, Jaheerunnisa S, Jayaveera KN, Suresh Kumar C. 2011. In vitro callus induction and in vivo antioxidant activity of *Passiflora foetida* L. leaves. International Journal of Applied Research in Natural Products. 4: 1-10.
- Satterthwait DR. 1982. Passifloraceae, Flora of Australia. 8: 147-158.
- Stockham SL, Scott MA. 2002. Fundamental of veterinary clinical pathology. Ames: Iowa State Press.
- Ulubalen A, Topcu G, Mabry TJ, Dellamonica G, Chopin J. 1982. C-Glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia mannii*. J. Nat. Prod. 45:103.
- Vundac VB, Males Z, Plazibat M, Golja P, Cetina-Cizmek B. 2005. HPTLC determination of flavonoids and phenolic acids in some croatian *Stachys* taxa. Journal of Planar Chromatography. 18: 269-273.
- Watanabe M, Ayugase J. 2008. Anti-stress effects of flavonoids from Buckwheat Sprouts in mice subjected to restraint stress. Food Sci. Technol. Res. 14: 253-260.
- WHO. 2000. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. WHO.Genev. 29-31.
- Yinzheng W, Krosnick SE, Jorgensen PM. 2007. Passifloraceae. In Flora of China, Wu ZY, Raven PH, Hong DY (Eds). Beijing and Missouri botanical Garden Press, St.Louis; 141-146.

Acute and Subchronic Toxicity Study of *Ardisia elliptica* Thunb. Fruit Extract

Nalinphat Saktiyasunthorn¹ Songpol Chivapat^{1*} Pornchai Sincharoenpokai²
 Arudep Rungsipat² Nongnuth Maneechai¹ Boonyanee Suphaphon¹
 Aussavashai Shuayprom¹

Abstract

Several plants species in the genus *Ardisia* contained various biologically active compounds. Ram Yai or Pilangkasa (*Ardisia elliptica* Thunb.) has been used in traditional medicines. The objective of this study was to evaluate the safety of ethanolic extract of *A. elliptica* fruit in animal models by oral administration. Acute toxicity test in mice by gavage the extract at each dose of 2.5 g/kg twice revealed no abnormal signs, mortality and gross lesion of vital organs. Subchronic toxicity study was investigated in one hundred Wistar rats separated into five groups, each of twenty (ten males and ten females). Two control groups received distilled water and 0.5% tragacanth respectively. While three experimental groups were orally administered with the extract at the doses of 20, 200 and 2000 mg/kg/day for 90 days consecutively. The results revealed that the extract at different doses did not affect growth, food consumption, health status, organ weights and clinical chemistry values of the rats. Hemalological results revealed that the male rats receiving the extract at 200 mg/kg had higher MCHC value than the water control group; however it did not show any dose dependency. The significant alterations of neutrophil and eosinophil in the highest dose-treated male group were within the reference range. The incidence of histopathological lesions in some organs did not show any dose response relationship. In conclusion, the ethanolic extract of Ram Yai fruit at the tested doses did not produce any acute and subchronic toxicity in experimental animals.

Keywords: *A. elliptica* extract, acute, mice, rat, subchronic toxicity

¹ Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Mueang District Nanthaburi Province, Thailand 11000

² Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

*Corresponding author. E-mail: songpol.c@dmsc.mail.go.th

บทคัดย่อ

พิษเห็บพลันและพิษกิ่งเรื้อรังของสารสกัดรามาใหญ่

นลินภัทร์ กักคัตติยสุนทร¹ ทรงพล ชีวะพัฒน์^{1*} พวชัย จินเจริญโกโคโย¹ อนุเทพ วังสีทิพัฒน์² นงนุช มณีฉาย¹
บุญญาณี ศุภผล¹ อัครชัย ช่วยพรม¹

พืชในสกุล *Ardisia* หลายชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายประการ รามาใหญ่หรือพิลังกาสาเป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งในสกุลนี้ที่มีการใช้ในตำราแพทย์แผนโบราณ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อประเมินความปลอดภัยของสารสกัดจากผลรามาใหญ่ในสัตว์ทดลอง โดยวิธีบ่อนทางปาก จาก การทดสอบพิษเห็บพลันในหนูถีบจักรโดยกรอกสารสกัดสองครั้งๆ ละ 2.5 ก./กก. พบว่าไม่ก่อให้เกิดอาการ ผิดปกติใดๆ และไม่ทำให้หนูเสียชีวิต ผลการศึกษาพิษกิ่งเรื้อรังในหนูแรพท์นอร์วีจิคาร์ จำนวน 100 ตัว แบ่ง ออกเป็นกลุ่มๆ ละ 20 ตัว (เพศละ 15 ตัว) โดยกลุ่มควบคุมสองกลุ่มได้รับน้ำกลั่นและสารละลายยาทรากาน ด์ ส่วนกลุ่มทดลอง 3 กลุ่ม ได้รับสารสกัดรามาใหญ่ขนาด 20, 200 และ 2000 มก./กก./วัน ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา 90 วัน พบว่า สารสกัดรามาใหญ่ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว สุขภาพ น้ำหนักอวัยวะระบบพีธี และค่าทางเคมี คลินิกแต่อย่างใด การตรวจค่าทางโลหิตวิทยาพบว่า หนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 200 มก./กก./วัน มี ค่า MCHC สูงกว่าค่ากลุ่มควบคุมด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่สัมพันธ์กับขนาดที่ได้รับ และกลุ่มที่ได้รับสาร สกัดขนาด 2000 มก./กก./วัน มีเซลล์นิวโทรฟิลลดลง แต่เซลล์ลีโอซิโนฟิล เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบ เทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยน้ำแต่ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติของหนูแรพท์ ผลทางพยาธิวิทยา พบรอยโรคทางจุลพยาธิ วิทยาได้ในบางอวัยวะอย่างไม่มีสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดรามาใหญ่ ดังนั้นสรุปได้ว่า สารสกัดรามาใหญ่หรือ พิลังกาสาไม่ก่อให้เกิดพิษเห็บพลันและพิษกิ่งเรื้อรังต่อสัตว์ทดลอง

คำสำคัญ : สารสกัดรามาใหญ่ พิษเห็บพลัน พิษเรื้อรัง หนูไม่ช หนูแรพท์

INTRODUCTION

The genus *Ardisia* is the largest in the family Myrsinaceae, and several species produce several groups of biologically active phytochemicals such as peptides, saponins, isocoumarins, quinines and alkylphenols (Kobayashi and Mejia, 2005). Of these, *Ardisia elliptica* Thunb., also known in Thailand as Ram Yai or Pilangkasa, is one of the interesting medicinal plants. In traditional medicines, the Malaysians used the decoction of the leaves to treat chest pain, herpes and measles. The fruits were prescribed in Thai traditional medicines for curing diarrhea with fever (Ling et al., 2009). The crude extract and some phytochemical constituents from *A. elliptica* were proven to possess various biological activities. Ethanolic

extract of the fruit showed antiproliferative activity on human breast adenoma cell line (Moongkarndi et al., 2004). β -amyrin exhibited more potent activity than aspirin in inhibiting platelet aggregation (Ching et al., 2010). Berginine exhibiting a wide range of biological activities including hepatoprotective, antifungal, antiarrhythmic and hypolipidemic was found in the highest content in *A. elliptica* when compared with other 16 species naturally occurring in China (Kobayashi and Mejia, 2005). Embellin was demonstrated to possess analgesic (Atal et al., 1984), wound healing (Swamy et al., 2007) antibacterial (Chitra et al., 2003) and antioxidant (Joshi et al., 2007). Recently, embellin extracted from the fruits of *A. elliptica* showed high potency of antiglycation

¹ สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ อ. เมือง จ. นนทบุรี 11000

² ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

* ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: songpol.c@dmsc.mail.go.th

activity and it has been developed for external use as cosmetics for aging (Shuayprom et al., 2010). Even though phytochemicals of *A. elliptica* indicate that it has potential for health products development, toxicological data of this plant has not been fully explored. The objectives of this study were to evaluate the safety of the ethanolic extract of *A. elliptica* fruits in animal models and the results may be useful to support the utilization of health products from *A. elliptica*.

MATERIALS AND METHODS

***Ardisia elliptica* extract (AE):** The fruits of *A. elliptica* were collected from the plantations in The Medicinal Plant Garden of the Department of Medical Sciences, Rayong Province, Thailand. The plant specimens were identified by Rachan Pooma, Office of the Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife, and Plant Conservation. A voucher specimen of *A. elliptica* (BKF No. 110703) was deposited at the Forest Herbarium, Thailand. The dried fruits of *A. elliptica* were coarsely pulverized into powder. The powder was extracted with 95% ethanol using soxhlet apparatus. The extract solution was evaporated using rotary evaporator at 50°C under reduced pressure and then the concentrated extract was dried using lyophilizer. The yield of dried extract from the dried fruits was about 28.28% (w/w). Embellin, a major biological active compound in AE, was found to be 2.04% according to HPTLC analysis. The extract was kept in well-closed container, protected from light at 20°C for further toxicological investigation.

Animals: Thirty ICR mice (15 males and 15 females weighing 20-22 g) and one

hundred Wistar rats (50 males weighing 180-200 g and 50 females weighing 170-190 g) were purchased from The National Laboratory Animal Center, Mahidol University. The animals were housed in a hygienic conventional animal room of the Laboratory Animal Center, Department of Medical Sciences where the environment of the room was maintained at 25±1°C with 60% humidity and 12 hour-light-dark cycle. They were raised with commercial pellet diet (082 CP® feed, Perfect Companion Group, Thailand) and clean water *ad libitum*. The mice were fasted for two hours before acute toxicity test. Prior to the subchronic toxicity study, the rats were acclimatized with the environment for two weeks. The protocol study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Department of Medical Sciences (Code No. 53-011).

Acute, toxicity test: The mice were randomly divided into three groups, each of ten animals (five males and five females). The experimental group was orally given AE suspension at dose of 2.5 g/kg while two control groups received distilled water and tragacanth solution at the volume of 10 ml/kg respectively. The animals were observed for four hours and the process was then repeated. Following administration, they were observed for abnormal signs and mortality for 14 days. At the end of the observation period, the mice were sacrificed with CO₂ inhalation and necropsy was performed, to examine gross pathology of their visceral organs.

Subchronic toxicity study: The Wistar rats were randomly divided into five groups of ten animals of each sex. Group 1 and 2 were control groups receiving distilled water and

0.5% tragacanth at the volume of 10 ml/kg, respectively. Group 3 to 5 were experimental groups orally administered with AE suspension at the doses of 20, 200 and 2000 mg/kg/day for 90 days consecutively. During the experimental period, body weight and food intake were recorded weekly and the animals were observed for general appearance, behavior and signs of abnormalities. At the end of the 90-day treatment period, the animals were fasted overnight, anesthetized with diethyl ether inhalation. Blood samples were collected from posterior vena cava for determining hematological and serum clinical chemistry values.

Hematological analysis was performed using automatic hematological analyzer Cell Dyn[®] 3500 (Abbot Laboratories Ltd, USA). Parameters examined were hematocrit (Hct), hemoglobin, erythrocyte (RBC), mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH), mean cell hemoglobin concentration (MCHC), white blood cell (WBC), neutrophil, eosinophil, lymphocyte, monocyte, basophil and platelet.

Clinical chemistry values were measured by using automatic chemistry analyzer Cobas[®] Integra 400 plus (Roche Diagnostics Ltd, Switzerland) and parameters assayed were alkaline phosphatase (ALP), alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total protein, albumin, bilirubin, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, glucose, uric acid, triglyceride, cholesterol, sodium, potassium and chloride ions.

A complete necropsy was performed to determine gross lesions of various visceral organs. Brain, heart, lung, liver, kidney, stomach, spleen, testis, uterus, urinary bladder and

adrenal glands were weighed by using Mettler Toledo[®] PB 153 balance (Mettler Toledo International Inc, Switzerland). Organ weights were calculated into relative organ weight (g/1000 g body weight). The visceral organs were fixed in 10% buffered formalin, and subjected to conventional histological process. Histopathological examination was performed on the above mentioned organs including trachea, lymph node, esophagus, pancreas, intestines, thyroid gland, lacrimal and salivary glands, prostate gland, seminal vesicle, ovary, uterus, and mammary glands.

Statistical analysis: The data were statistically evaluated by one way ANOVA. Comparison between treatment and control groups were made by Bonferroni test. For histopathological results, Fisher's exact was applied. Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Acute toxicity test: The mice receiving AE at the dose of 2.5 g/kg twice did not manifest any abnormal signs or behaviors during the observation period. All AE - treated mice survived until the end of the experiment. Necropsy revealed no gross lesions in the visceral organs when compared with both control groups.

Subchronic toxicity study

Effect of AE on body weight, relative organ weights, food consumption and health status: Both male and female rats receiving AE at the doses of 20, 200 and 2000 mg/kg/day showed no significant difference in their average body weight (Fig 1) and relative organs weight (Table 1 and 2) when compared with their corre-

sponding water and tragacanth control groups. Measurement of the weekly food intake in the AE - treated male rats showed no significant difference over the whole experimental period as compared with the corresponding control groups. In the female, only the highest dose-treated group had significantly lower food intake than the tragacanth control group at week 6, 7, 9 and than the water control group at only week 10 (Fig 2). All of the AE-treated groups revealed healthy and showed no sign of abnormality, as compared to both control groups.

Effects of AE on hematological values:

Male rats receiving AE at dose of 200 mg/kg/day had significantly higher MCHC than the water control group. The highest dose-treated male rats had significantly higher neutrophil but significantly lower eosinophil when compared with those of the water control group (Table 3). In the female, there was no significant difference in any hematological parameters between the treatment and control groups (Table 4).

Effects of AE on clinical chemistry values: Both male and female rats receiving

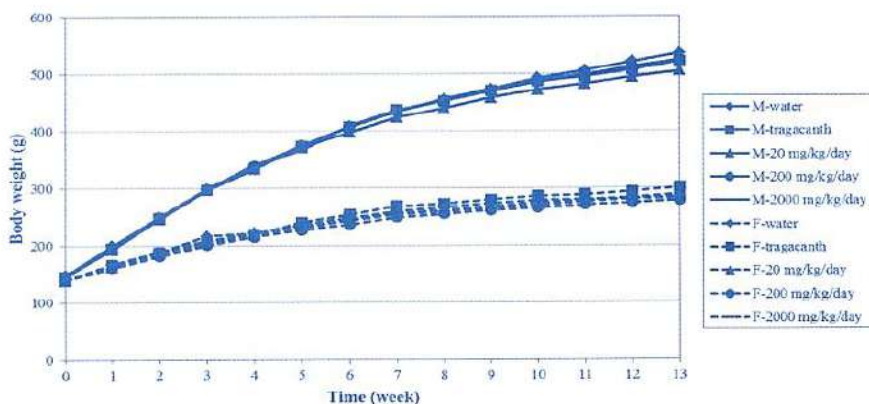


Figure 1 Growth curves of male (M) and female (F) rats receiving AE for 90 days.

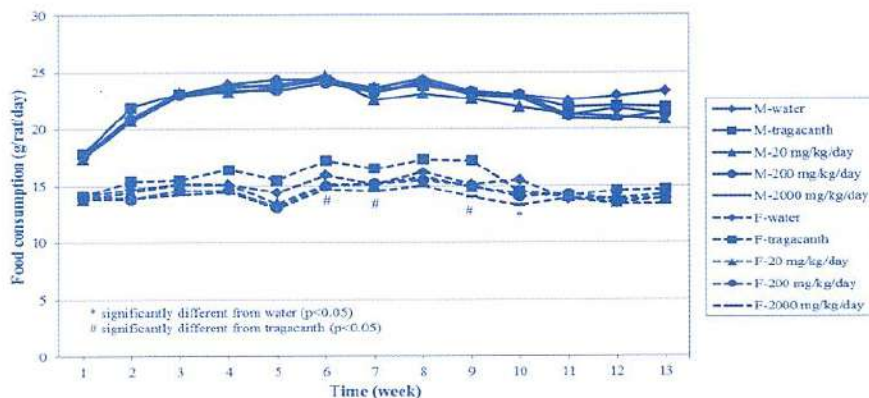


Figure 2 Food consumption of male (M) and female (F) rats receiving AE for 90 days

Table 1 Relative organ weight (g/1000g of body weight) of male rats receiving AE for 90 days

Organs	Dose of AE (mg/kg/day)				
	DW	0.5% Tragacanth	20	200	2000
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Brain	4.08±0.30	4.16±0.45	4.27±0.31	4.16±0.24	4.09±0.38
Heart	2.88±0.13	2.83±0.12	2.81±0.14	2.74±0.13	2.82±0.15
Lung	3.18±0.21	3.16±0.34	3.16±0.16	3.14±0.21	3.02±0.29
Liver	27.40±2.55	28.24±2.01	27.54±2.24	27.50±2.01	28.51±2.34
Stomach	4.10±0.38	4.08±0.45	4.00±0.47	4.11±0.43	4.23±0.24
Spleen	1.74±0.15	1.74±0.19	1.77±0.22	1.66±0.17	1.73±0.18
Right kidney	2.52±0.20	2.61±0.14	2.50±0.16	2.49±0.21	2.53±0.18
Left kidney	2.43±0.19	2.43±0.15	2.44±0.16	2.36±0.17	2.45±0.20
Right testis	5.70±0.62	5.82±0.54	5.76±0.58	5.62±0.49	5.65±0.53
Left testis	5.77±0.71	5.87±0.54	5.80±0.49	5.50±0.42	5.68±0.47
Right adrenal	0.08±0.01	0.07±0.02	0.07±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01
Left adrenal	0.09±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.09±0.01	0.08±0.02
Bladder	0.28±0.05	0.31±0.05	0.28±0.07	0.27±0.04	0.29±0.06

The values are expressed as mean±SD, DW: Distilled water, TG: Tragacanth

Table 2 Relative organ weight (g/1000g of body weight) of female rats receiving AE for 90 days

Organs	Dose of AE (mg/kg/day)				
	DW	0.5% TG	20	200	2000
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Brain	6.91±0.81	6.84±0.55	7.09±0.38	7.31±0.42	7.08±0.51
Heart	3.34±0.34	3.23±0.25	3.32±0.24	3.31±0.14	3.22±0.21
Lung	4.30±0.31	4.23±0.25	4.32±0.31	4.31±0.26	4.23±0.48
Liver	27.25±2.22	26.51±2.63	27.25±2.91	27.23±2.15	27.47±2.86
Stomach	5.62±0.52	4.85±1.05	5.48±0.66	5.30±0.37	5.28±0.66
Spleen	2.25±0.22	2.18±0.16	2.21±0.21	2.18±0.16	2.36±0.43
Right kidney	2.92±0.19	2.88±0.12	2.86±0.19	3.04±0.28	2.95±0.29
Left kidney	2.75±0.15	2.66±0.24	2.68±0.15	2.90±0.25	2.79±0.33
Right adrenal	0.15±0.04	0.15±0.02	0.16±0.04	0.17±0.02	0.15±0.03
Left adrenal	0.17±0.04	0.16±0.01	0.18±0.03	0.17±0.02	0.16±0.03
Bladder	0.33±0.04	0.27±0.03*	0.32±0.09	0.29±0.04	0.31±0.03
Uterus	2.24±0.66	1.94±0.46	2.03±0.73	1.97±0.27	2.08±0.50
Right ovary	0.27±0.06	0.28±0.05	0.28±0.04	0.30±0.04	0.30±0.06
Left ovary	0.33±0.06	0.32±0.08	0.31±0.07	0.33±0.05	0.30±0.09

The values are expressed as mean±SD

*significantly different from water control group (p< 0.05), DW: Distilled water, TG: Tragacanth

Table 3 Hematological values of male rats receiving AE for 90 days

Parameters	Dose of AE (mg/kg/day)				
	DW	0.5% TG	20	200	2000
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Hematocrit (%)	34.36±1.44	34.08±1.52	34.47±1.54	33.17±1.06	32.75±0.73
Hemoglobin (g/dl)	16.20±0.75	16.16±0.65	16.29±0.67	15.87±0.49	15.63±0.42
RBC (x 10 ⁶ cells/mm ³)	9.25±0.50	9.36±0.39	9.33±0.41	9.13±0.37	8.87±0.28
MCV (fl/red cell)	37.14±1.00	36.43±0.82	36.97±0.88	36.35±0.65	36.96±0.77
MCH (pg/red cell)	17.53±0.44	17.29±0.40	17.48±0.40	17.40±0.42	17.64±0.39
MCHC (g/dl RBC)	47.17±0.41	47.44±0.40	47.30±0.43	47.85±0.64*	47.70±.45
WBC (x 10 ³ cells/ mm ³)	3.35±0.62	3.56±0.59	3.55±0.79	3.33±0.56	3.29±1.23
Neutrophil (%)	21.64±3.13	24.56±6.17	21.58±2.83	24.71±5.57	28.65±4.82*
Eosinophil (%)	1.91±0.56	1.53±0.69	1.72±0.49	2.01±0.75	1.00±0.21*
Lymphocyte (%)	74.35±3.12	71.07±7.20	75.38±2.82	71.28±5.68	68.20±5.41
Monocyte (%)	1.40±1.49	2.20±3.02	0.86±.25	1.34±1.36	1.43±0.88
Basophil (%)	0.72±0.45	0.65±0.61	0.45±0.21	0.68±0.38	0.73±0.31
Platelet (x10 ³ cells/mm ³)	955.35±98.01	1,028.10±85.29	956.00±76.20	1,020.20±108.23	968.00±116.54

The values are expressed as mean±SD

*significantly different from water control group (p< 0.05), DW: Distilled water, TG: Tragacanth

Table 4 Hematological values of female rats receiving AE for 90 days

Parameters	Dose of AE (mg/kg/day)				
	DW	0.5% TG	20	200	2000
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Hematocrit (%)	31.70±5.07	33.02±1.70	33.17±1.35	32.55±1.77	32.53±1.52
Hemoglobin (g/dl)	16.06±0.63	15.77±0.83	15.93±0.66	15.59±0.88	15.80±0.65
RBC (x 10 ⁶ cells/mm ³)	8.54±0.42	8.48±0.57	8.48±0.40	8.33±0.48	8.43±0.42
MCV (fl/red cell)	39.20±0.74	38.98±1.16	39.13±0.68	39.07±0.73	38.58±0.89
MCH (pg/red cell)	18.83±0.41	18.61±0.52	18.81±0.45	18.71±0.34	18.78±0.77
MCHC (g/dl RBC)	48.00±0.41	47.76±0.55	48.02±0.53	47.88±0.58	48.69±1.75
WBC (x 10 ³ cells/ mm ³)	1.83±0.50	2.06±0.67	1.75±0.49	1.76±0.49	1.93±0.56
Neutrophil (%)	24.55±5.73	26.56±8.19	27.12±4.69	24.26±3.89	25.33±8.48
Eosinophil (%)	1.86±1.00	1.68±0.86	2.05±1.17	1.77±0.94	1.36±0.56
Lymphocyte (%)	71.76±6.00	68.93±8.06	69.25±4.31	72.21±3.73	70.43±8.33
Monocyte (%)	1.17±0.59	1.98±1.84	1.04±0.44	1.22±0.40	2.07±1.30
Basophil (%)	0.66±0.33	0.82±0.50	0.54±0.21	0.52±0.29	0.81±0.30
Platelet (x10 ³ cells/mm ³)	896.80±114.91	895.45±55.13	891.3±101.59	906.85±88.51	918.05±56.66

The values are expressed as mean±SD, DW: Distilled water, TG: Tragacanth

Table 5 Biochemical values of male rats receiving AE for 90 days

Parameters	Dose of AE (mg/kg/day)				
	DW	0.5% TG	20	200	2000
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
ALP (U/l)	54.00±8.93	51.80±6.53	52.50±4.86	52.40±5.99	53.00±5.29
ALT (U/l)	30.20±5.01	29.10±6.08	27.90±3.48	29.40±5.74	29.00±6.85
AST (U/l)	89.00±8.92	82.80±6.88	84.00±9.63	83.90±10.08	79.30±9.15
BUN (mg/dl)	20.45±2.92	20.21±3.61	18.69±2.30	20.35±3.19	18.46±3.50
Creatinine (mg/dl)	0.54±0.06	0.53±0.11	0.49±0.04	0.48±0.06	0.48±0.08
Total Protein (g/dl)	6.38±0.13	6.32±0.18	6.39±0.22	6.37±0.16	6.35±0.14
Albumin (g/dl)	4.49±0.10	4.45±0.009	4.54±0.15	4.51±0.15	4.49±0.15
Bilirubin (mg/dl)	0.05±0.03	0.06±0.02	0.05±0.02	0.07±0.03	0.04±0.02
Glucose (mg/dl)	238.32±58.06	243.43±46.93	219.21±29.60	213.55±63.22	219.53±27.14
Uric acid (mg/dl)	4.96±1.39	5.18±1.18	4.70±1.12	4.40±1.87	4.69±1.10
Triglyceride (mg/dl)	93.69±24.51	95.58±18.76	104.34±223.74	91.39±13.71	79.24±12.67
Cholesterol (mg/dl)	56.54±5.62	63.98±11.96	55.26±13.82	58.44±9.15	51.80±12.34
Sodium (mmol/l)	144.80±2.53	144.10±2.08	143.80±1.69	143.60±1.43	143.60±1.58
Potassium (mmol/l)	7.94±0.55	7.84±0.96	7.55±0.95	7.26±1.23	8.34±0.84
Chloride (mmol/l)	104.10±1.29	103.80±1.25	103.80±1.14	104.00±0.82	104.20±1.62

The values are expressed as mean±SD, DW: Distilled water, TG: Tragacanth

Table 6 Biochemical values of female rats receiving AE for 90 days

Parameters	Dose of AE (mg/kg/day)				
	DW	0.5% TG	20	200	2000
	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
ALP (U/l)	22.30±3.71	25.00±6.70	23.60±3.34	26.70±6.15	24.10±5.80
ALT (U/l)	20.40±3.17	20.90±4.36	18.00±1.76	18.40±2.12	19.40±1.84
AST (U/l)	82.40±14.47	80.30±6.43	78.60±5.78	84.40±9.83	80.30±8.84
BUN (mg/dl)	23.20±2.84	21.58±5.94	25.71±7.69	21.02±3.52	20.13±2.50
Creatinine (mg/dl)	0.50±0.08	6.46±18.81	0.57±0.14	0.47±0.05	0.43±0.06
Total Protein (g/dl)	6.32±0.15	6.17±0.22	6.28±0.19	6.32±0.33	6.23±0.16
Albumin (g/dl)	4.72±0.08	4.62±0.15	4.74±0.15	4.68±0.24	4.68±0.17
Bilirubin (mg/dl)	0.07±0.02	0.06±0.01	0.07±0.01	0.06±0.02	0.06±0.01
Glucose (mg/dl)	103.40±16.75	121.29±24.81	103.52±14.00	101.46±11.64	100.27±10.69
Uric acid (mg/dl)	2.38±0.99	2.39±0.85	2.21±0.65	2.08±0.82	2.39±0.59
Triglyceride (mg/dl)	34.35±4.81	30.76±5.52	34.16±8.27	33.82±5.05	28.07±4.09
Cholesterol (mg/dl)	62.72±13.03	56.39±13.72	58.30±14.48	58.98±11.49	52.38±10.44
Sodium (mmol/l)	142.50±1.90	142.90±1.91	142.90±1.37	143.20±0.79	142.80±1.55
Potassium (mmol/l)	6.64±1.61	6.64±1.24	6.61±1.57	6.51±1.64	6.69±1.13
Chloride (mmol/l)	106.50±0.97	107.20±1.40	107.30±1.49	106.90±0.88	106.70±1.34

The values are expressed as mean±SD, DW: Distilled water, TG: Tragacanth

Table 7 Histopathological results of visceral organs of rats receiving AE for 90 days

Organs	Microscopic findings	Male					Female				
		Dose of AE (mg/kg/day)					Dose of AE (mg/kg/day)				
		DW	0.5% TG	20	200	2000	DW	0.5% TG	20	200	2000
Lung	BALT proliferation	9/10	7/10	4/10	6/10	6/10	6/10	2/10	5/10	4/10	4/10
Heart	Focal myocardiosis	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	NRL	NRL	NRL	NRL	NRL
Liver	Centrilobular fatty degeneration	3/10	0/10	1/10	1/10	0/10	6/10	3/10	1/10	3/10	1/10
	Centrilobular hydropic degeneration	9/10	5/10	2/10*	1/10*	3/10*	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Small Intestine	GALT proliferation in submucosa layer	3/10	1/10	3/10	2/10	0/10	3/10	2/10	1/10	1/10	0/10
Large Intestine	GALT proliferation in submucosa layer	1/10	1/10	1/10	2/10	3/10	1/10	1/10	2/10	0/10	0/10
Adrenal Gland	Cortical fatty infiltration	7/10	6/10	5/10	7/10	3/10					
	Medullary congestion						0/10	0/10	0/10	3/10	1/10
Mammary gland	Glandular hyperplasia						1/10	0/10	0/10	4/10#	2/10

The results are expressed as the number of rats with pathological findings per total number of rats treated

* significantly different from the water control group ($p < 0.05$), # significantly different from the tragacanth control group ($p < 0.05$)

DW: Distilled water, TG: Tragacanth, NRL: No remarkable lesions, BALT: Bronchiole-associated lymphoid tissue, GALT: Gut-associated lymphoid tissue

AE had no significant difference in any of their clinical chemistry values as compared with the corresponding control groups (Table 5 and 6).

Effects of AE on histopathological alterations: At necropsy, there was no remarkable gross lesions in any visceral organs of all AE-treated and both control groups. Male rats receiving AE at the doses of 20, 200 and 2000 mg/kg/day had significantly lower incidence of hydropic degeneration of hepatocytes than the water control group. Female rats receiving AE at the dose of 200 mg/kg had significantly higher incidence of mammary glandular hyperplasia than the

tragacanth control group. The incidence of histopathological lesions in the lung, heart, intestines, adrenal glands of the AE-treated groups revealed no significant differences when compared with those of the corresponding control groups (Table 7). No remarkable histopathological lesions was observed in other organs in both treatment and control groups.

Discussion

The total dose of AE administered to mice within 24 hours in the acute toxicity test was 5 g/kg, which did not cause any acute toxic signs, gross lesions of visceral organs and mortality. Hence, the oral LD₅₀ value of

AE should be more than 5 g/kg and this result indicates that AE is practically nontoxic after acute oral exposure (Chan and Hayes, 1994).

The ninety-day subchronic toxicity study in Wistar rats showed that AE at the given dose range did not affect body weight, general health status and relative organ weight. The decrease of food consumption in the highest dose-treated female group was transient and could recover in the last three

weeks, therefore it may not be concluded that AE suppresses the animal food intake. Hematological results showed an increased MCHC in the male rats treated with AE 200 mg/kg/day. This phenomenon may not contribute to AE since it did not show any dose dependency. The alterations of neutrophil and eosinophil in the highest dose-treated male rats were within the normal range (Gad, 1992). In addition, hematological values in the AE-treated female rats did not show any significance. Taken together, it might be concluded that AE did not produce any abnormal changes in rat hematological values. Blood chemistry analysis in both sexes indicated that AE did not affect any examined parameters. The decrease in hepatocyte hydropic degeneration in the AE-treated male rats including the increase of female mammary glandular hyperplasia at the dose of 200 mg/kg/day may not be attributed to AE since it did not show any dose dependency. Other histopathological lesions in some organs of the males and females showed no significant difference between the treatment and the corresponding control groups, therefore these may not contribute to AE.

In conclusion, AE at the oral dose of 5 g/kg produced no acute toxic effect and

mortality in mice. The ninety-day subchronic toxicity study in Wistar rats revealed that AE at the doses of 20, 200 and 2000 mg/kg/day did not produce any abnormalities in growth, food consumption, organ weights, hematological and clinical chemistry values. Furthermore, it did not cause any dose-related histopathological lesions of visceral organs. Hence, these data suggest that AE has potential for further phytopharmaceutical or health product development.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank staffs of the Laboratory Animal Center of Department of Medical Sciences for animal facilities. This study was supported by grants from The Department of Medical Sciences 2009.

REFERENCES

- Atal, C.K., Siddiqui, M.A., Zutshi, U., Amla, V., Johri, R.K., Rao, P.G. and Kour, S. 1984. Non-narcotic orally effective, centrally acting analgesic from an ayurvedic drug. *J Ethnopharmacol.* 11: 309-317.
- Chan, P.K. and Hayes A.W. Acute toxicity and eye irritancy. In *Principle and Method of Toxicology*. A.W. Hayes (ed) 3rd ed New York: Raven Press. 579-647.
- Ching, J., Chua, T.K., Chin, L.C., Lau, A.J., Pang, Y.K. and Jaya, J.M. 2010. B-Amyrin from *Ardisia elliptica* Thunb. Is more potent than aspirin in inhibiting collagen-induced platelet aggregation. *Indian J Exp Biol.* 48: 275-279.
- Chitra, M., Shyamala Devi, C.S. and Sukumar, E. 2003. Antibacterial activity of embelin. *Fitoterapia.* 74: 401-403.
- Gad, S.C. 1992. The Rat. In: *Animal Model in Toxicology*. S.C. Gad and C.P. Chengelis (eds). New York: Marcel Dekker. 78-95.
- Joshi, R., Kamat, J.P. and Mukherjee, T. 2007. Free radical scavenging reactions and antioxidant activity of

- embellin: Biochemical and pulse radiolytic studies. *Chem Biol Interact.* 167(2): 125-134.
- Kobayashi, H. and de Meija, E. 2005. The genus *Ardisia*: A novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals. *J Ethnopharmacol.* 96(3): 347-354.
- Ling, K.H., Kian, C.T. and Hoon, T.C. 2009. *A Guide to Medicinal Plants: An Illustrated, Scientific and Medicinal Approach.* World Scientific Publishing. 292 pp.
- Moongkamdi, P., Kosem, N., Luanratana, O., Jongsomboonkusol, S. and Pongpan, N. 2004. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia.* 75: 375-377.
- Shuayprom, A., Povichit, N., Bunjob, M., Boonrod, T., Bucha, P. and Suphaphon, B. 2010. Development of the cosmeceutical formulation for aging mix with embelin. *J Rajamangala Univ Technol Srivijaya.* 2(2): 69-77.
- Swamy, H.M.K., Krishna, V., Shankarmuethy, K., Rahiman, B.A., Mankani, K.L., Mahadevan, K.M., Harish, B.G. and Naika, H.R. 2007. Wound healing activity of embelin isolated from the ethanol extract of leaves of *Embelia nives* Burm. *J Ethnopharmacol.* 109(3): 529-534.



กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
กระทรวงสาธารณสุข
www.dmasc.moph.go.th

978-616-111-552-4



9 786161 115524