



รายงานการวิจัย
เรื่อง

การศึกษาพัฒนาพรมมิเพื่อใช้เป็นสมุนไพรบำรุงความจำ ระยะที่ 4
The development of Brahmi as memory enhancer phase IV

โดย

รศ. ดร. กรกนก อิงคินันท์^{1,2}

ผศ. พญ. พูนศรี รังสีศรี³

ผศ. ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์⁴

ผศ. ดร. นิวัตติ เทพวราพฤกษ์⁴

ดร. ดำรงค์ดี เป็กทอง¹

ผศ. ดร. สิวบูรณ์ สิรีรัฐวงศ์⁵

¹คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, ²ศูนย์เทคโนโลยีสมุนไพร มหาวิทยาลัยนเรศวร,
³คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ⁴คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร,
⁵สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิกคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ตุลาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอพระขอบคุณ ผู้บริหาร อาจารย์ เจ้าหน้าที่ และนิสิต นักศึกษาจาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร , คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, University of Franche-Comté ประเทศฝรั่งเศส และ ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์พิษณุโลก ที่ช่วยให้โครงการนี้สำเร็จลงด้วยดี และขอพระขอบคุณ Dr. Frederic Muyard ที่ให้ความอนุเคราะห์สารบาโคปาไซค์วันจากการแยกบริสุทธิ์, ดร.วฐุ พรหมพิทยรัตน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสารบาโคปาไซค์วัน, ดร. นิตรา เนื่องจางค์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านการวิเคราะห์ด้วยวิธี LC-MS/MS ขอขอบคุณนิสิตนักศึกษาในโครงการที่ได้เป็นกำลังสำคัญให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลง

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2552 จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

การศึกษาพัฒนาสมุนไพรพรมมิเพื่อใช้เป็นสมุนไพรบำรุงความจำ (ระยะที่ 4)

The development of Brahmi as memory enhancer phase IV

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2552

จำนวนเงิน 5,000,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ 28 ตุลาคม 2552 ถึง 27 ตุลาคม 2553

หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัยพร้อมหน่วยงานที่สังกัด

ผู้ประสานงาน รศ. ดร. กรกนก อิงคินันท์^{1,2}

หัวหน้าโครงการวิจัย

- | | |
|------------------|---|
| โครงการย่อยที่ 1 | ผศ.พญ. พูนศรี รังสีศรี ¹ |
| โครงการย่อยที่ 2 | ผศ. ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์ ⁴ |
| โครงการย่อยที่ 3 | ผศ. ดร. นิวัตติ เทพวาราทฤกษ์ ⁴ |
| โครงการย่อยที่ 4 | ดร. ดำรงค์ดี เป็กทอง ⁵ |
| โครงการย่อยที่ 5 | รศ. ดร. กรกนก อิงคินันท์ ^{1,2} |
| โครงการย่อยที่ 6 | ผศ. ดร. สิวบูรณ์ สิริรัฐวงศ์ ⁶ |
| โครงการย่อยที่ 7 | รศ. ดร. กรกนก อิงคินันท์ ^{1,2} |

¹ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก

²ศูนย์เทคโนโลยีสมุนไพร มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จ. พิษณุโลก

³ภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

⁴ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จ. พิษณุโลก

⁵ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จ. พิษณุโลก

⁶สาขาเภสัชวิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิกคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ อ. คลองหลวง จ.ปทุมธานี

บทคัดย่อ

พรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. วงศ์ Scrophularaceae) เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณบำรุงความจำ จากการศึกษาทางสัคว์ทดลองและทางคลินิกที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดที่มีการ stanadardized แล้วของพรมมิมิมีผล เพิ่มกระบวนการเรียนรู้และความจำ ในการวิจัยเชิงบูรณาการครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีความประสงค์เพื่อศึกษา ประสิทธิภาพและกลไกในการบำรุงความจำของพรมมิทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ ศึกษาการเกิดอันตรกิริยา กริยาและเภสัชจลนศาสตร์ของพรมมิ ศึกษาพิษวิทยาเรื้อรังเพื่อยืนยันความปลอดภัยของพรมมิ นอกจากนี้ยังได้ จัดทำคู่มือแนวทางในการผลิต และควบคุมคุณภาพสมุนไพรพรมมิและผลิตภัณฑ์ยาเม็ดพรมมิเพื่อเป็นข้อมูลใน การถ่ายทอดเทคโนโลยีต่อไป

คณะผู้วิจัยศึกษาผลทางคลินิกของพรมมิ โดยอาสาสมัครถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ได้รับยาหลอก และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 และ 600 มิลลิกรัม อาสาสมัครทุกคนได้รับสารเป็นเวลาานาน 3 เดือน ผลการศึกษาพบว่าอาสาสมัครที่บริโภคสารสกัดจะมี การกกดการทำงานของ acetylcholinesterase AChE ตลอดจนเพิ่มการทำงานของ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) แต่ลดระดับ malondialdehyde (MDA) ใน serum ดังนั้นสารสกัดพรมมิจึงน่าจะออกฤทธิ์เพิ่ม working memory โดยการเพิ่มระดับ ACh และ ลดระดับ oxidative stress ทำให้เพิ่ม working memory

ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของพรมมิต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตบนผิวเปลือกสมอง ความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ ของหนูแรทที่ได้รับสมุนไพรโดยการกินติดต่อกันนาน 2 เดือน และได้รับโดยการ ฉีดสารสกัดโดยตรงเข้าทางหลอดเลือดดำ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับผลของสารสกัดแปะก๊วย และยามาตรฐาน Donepezi จากผลการวิจัยเมื่อให้สารสกัดพรมมิ (40 mg/kg BW) หรือ สารสกัดแปะก๊วย (60 mg/kg BW) ทาง ปากเป็นเวลาานานติดต่อกัน 2 เดือน พบว่ามีผลเพิ่มการไหลเวียนโลหิตบริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง โดยประสิทธิภาพของสารสกัดพรมมิกับสารสกัดแปะก๊วยไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ยามาตรฐาน Donepezil (1 mg/kg BW) ไม่มีผลใด ๆ ต่อการไหลเวียนโลหิตบริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง สารสกัด และยามาตรฐานไม่มีผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ ในทางตรงกันข้ามการให้สารสกัดพรมมิ (20, 40, 60 mg/kg BW) หรือ สารสกัดแปะก๊วย (20, 40, 60 mg/kg BW) โดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำส่งผล ลดทั้งความดันโลหิต และการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง แต่ไม่มีผลต่อ อัตราการเต้นของหัวใจ ในขณะที่การฉีดยา Donepezile (1 mg/kg BW) ไม่มีผลใด ๆ ต่อความดันโลหิต และการ ไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง แต่มีผลลดอัตราการเต้นของหัวใจ

ที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาถึงผลทางสรีรวิทยาของสารสกัดพรมมิต่อการเปลี่ยนแปลงการถ่ายทอด สัญญาณประสาทหรือผลต่อปริมาณสารสื่อประสาทในสมองส่วน hippocampus ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการ ทดสอบข้อมูลในส่วนนี้โดยศึกษาเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) และยา donepezil

ต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ ต่อการเกิดปรากฏการณ์ถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่ดีขึ้นอย่างยาวนาน (LTP) และต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในสมองของหนูแรทที่แก่ตามธรรมชาติ ผลการทดลองหลังจากป้อนสารสกัดหรือยาติดต่อกันนาน 3 เดือน พบว่า หนูแก่ที่ได้รับสารสกัดพรมมิ (40 มก./กก.) มีการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ และความสามารถในการจดจำสิ่งของ ได้ดีพอๆ กับหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดจากใบแปะก๊วย (60 มก./กก.) และกลุ่มที่ได้รับยา donepezil (1 มก./กก.) เมื่อเปรียบเทียบกับผลของหนูแก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่น นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ทางชีวเคมีของน้ำปัสสาวะส่วนฮิปโปแคมปัส จากหนูที่ได้รับพรมมิมีการเพิ่มของกลูตาเมต กลูตามีน เซอริน และกาบ้า ในขณะที่สมองของหนูกลุ่มที่ได้รับแปะก๊วยมีการเพิ่มของกลูตาเมต และเซอริน และสมองของหนูกลุ่มที่ได้รับยา donepezil มีการเพิ่มของกลูตามีน และการลดลงของไกลซีน ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารสกัดพรมมิอาจจะออกฤทธิ์ผ่านทาง การเปลี่ยนแปลงระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนเพื่อที่เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูแก่

การศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 (CYP) ในตับหนูและในมนุษย์โดยวิธีการ *in vitro* ทำการประเมินความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A ในไมโครโซมโดยใส่สารสกัดตั้งแต่ความเข้มข้น 1 ถึง 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดพรมมิมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้น้อยเมื่อเทียบกับสารยับยั้งมาตรฐาน โดยสารสกัดยับยั้งปฏิกิริยา O-deethylation ของสาร 7-ethoxyresorufin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะต่อ CYP1A2 โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 59.4 และ 836.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในไมโครโซมหนูและในมนุษย์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งปฏิกิริยา tolbutamide hydroxylation ที่ IC_{50} เท่ากับ 222.1 และ 297.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของ CYP2E1 ทั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง CYP3A อย่างอ่อนทั้งในไมโครโซมหนูและในมนุษย์

ความสามารถในการเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP ในเซลล์ตับของสารสกัดพรมมิทำการประเมินโดยการใส่สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.045 ถึง 0.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หรือ 0.05-0.5 ไมโครโมลาร์) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนูเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมรวมถึงการแสดงออกของ mRNA พบว่าสารสกัดพรมมิมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์และการแสดงออกของ mRNA เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับสารเหนี่ยวนำมาตรฐานในแต่ละเอนไซม์ โดยสรุปแล้วสารสกัดพรมมิ มีผลยับยั้งการทำงานของ CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A ได้ต่ำโดยดูจากค่า IC_{50} ที่มีค่าค่อนข้างสูงและไม่ มีผลในเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำงานของ CYP ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนู ผลดังกล่าวจึงสามารถประเมินได้ว่ามีโอกาสน้อยที่สารสกัดพรมมิในขนาดปกติจะก่อให้เกิดอันตรกิริยากับยาแผนปัจจุบัน ที่อาศัยเอนไซม์ดังกล่าวในการเปลี่ยนแปลงเพื่อการขจัดออกจากร่างกาย

ในการศึกษาการเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หนึ่งในสารกลุ่ม pseudojubilogenin ในหนูสายพันธุ์ wistar ภายหลังการบริหารสารดังกล่าวโดยการป้อนและการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำในปริมาณ

10 มก./กก. ของน้ำหนักรับของหนูทดลอง โดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและ อุจจาระที่เก็บ ณ เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงหลังการบริหารยา ด้วยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (an on-membrane analysis) จากการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบสาร Bacopaside I ในตัวอย่างอุจจาระของหนูกลุ่มที่ได้รับสาร Bacopaside I โดยการป้อน ส่วนในหนูกลุ่มที่ได้รับสารทางหลอดเลือดดำพบว่าสามารถตรวจพบสาร ดังกล่าวได้ทั้งในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ โดยปริมาณของ Bacopaside I ที่ตรวจพบไม่มีความสัมพันธ์กับ ระยะเวลาหลังการบริหารสาร และปริมาณที่ตรวจพบในตัวอย่างอุจจาระของหนูทดลองที่ได้รับสาร โดยการ ป้อนมีปริมาณมากกว่าที่ตรวจพบในอุจจาระของหนูที่ได้รับสาร โดยการบริหารทางหลอดเลือดดำ

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดพรมมิในหนูขาวเพศผู้และเพศเมียทดสอบโดยป้อนสารสกัดขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวทางปากครั้งเดียว สังเกตอาการแสดงความเป็นพิษและพฤติกรรม โดยทั่วไปเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งไม่พบความผิดปกติ ลักษณะอาการ พฤติกรรมและการตายของหนูขาวที่ได้รับสาร สกัดพรมมิเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่น ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการป้อนสารสกัดพรมมิครั้งเดียว ทางปากในขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว ไม่มีผลก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลัน ทดสอบความ เป็นพิษเรื้อรังในหนูขาวโดยป้อนสารสกัดพรมมิขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน ประเมินอาการ พฤติกรรมและสุขภาพสัตว์ พบว่าไม่มีความผิดปกติใดๆ ในหนูขาวกลุ่มที่ ได้รับสารสกัดเมื่อเทียบกับหนูขาวกลุ่มควบคุม นอกจากนี้หนูขาวกลุ่มทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มติดตามผล การออกฤทธิ์ของสารจะได้รับการประเมินน้ำหนักตัว สุทธิ และน้ำหนักอวัยวะ ลักษณะทางพยาธิวิทยาของ อวัยวะภายใน การประเมินค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกในเลือด ตลอดจนการตรวจทางพยาธิวิทยา พบว่ามี การเพิ่มหรือลดลงของน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะภายในบางอวัยวะ มีค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกบาง ค่าที่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามการพิจารณาค่าต่างๆ ดังกล่าวร่วมกับ ข้อมูลเกี่ยวกับอาการที่แสดง พฤติกรรมและการตรวจสุขภาพสัตว์อาจกล่าวได้ว่าการให้สารสกัดพรมมิในขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวเป็นเวลา 270 วัน ไม่ได้ก่อให้เกิดความเป็นพิษเรื้อรัง

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการจัดทำคู่มือแนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิ แนวทางการวิเคราะห์ ปริมาณสารซาโปนินในสมุนไพรพรมมิ และแนวทางการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิขึ้น โดยใช้ข้อมูลที่ได้ผ่าน การทดลองปฏิบัติจริง พรมมิสามารถเก็บเกี่ยวได้หลังเพาะปลูกเป็นเวลา 2 เดือน ส่วนที่ใช้คือส่วนเหนือดินที่ตัด จากยอดประมาณ 10-20 ซม เมื่อเก็บเกี่ยวแล้ว พรมมิจะถูกทำให้แห้งที่ จากนั้นบดเป็นชิ้นเล็กๆ ผงพรมมิแห้ง ต้องมี total saponin glycosides ซึ่งประกอบด้วย Bacoside A₃, Bacopasaponin C, Bacopaside I, II, และ Bacopaside X ไม่ต่ำกว่า 1 % w/w และสารสกัดพรมมิต้องมี total saponin glycosides ไม่ต่ำกว่า 5 % w/w การ ผลิตพรมมิได้ผลผลิต 40 กก ต่อไร่ต่อเดือน ราคาต้นทุนพรมมิคือ 2.3 บาทต่อเม็ด

Abstract

Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Scrophulariaceae family) is well known as herbal medicine for memory enhancing. Previous data from animal studies and clinical trial study in middle-aged and elderly healthy volunteers showed that Brahmi standardized extract could enhance learning and memory. In this integrative project, we aimed at investigation of the efficacy and mechanisms of the extract in animals and human. In addition, drug interaction and pharmacokinetics of the extract were studied. The chronic toxicity was conducted in order to assure the safety of the plant extract. The guidelines for production and quality control of Brahmi tablet and the raw material were made for technology transferring to industries.

In clinical study, total 60 healthy elderly volunteers were divided into 3 separated groups including placebo, Brahmi extract at doses of 300 and 600 mg per day. The results showed that Brahmi extract treated groups showed the reduction of acetylcholinesterase (AChE) activity. The enhanced activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) and the reduction of malondialdehyde (MDA) were also observed. Therefore, Brahmi extract might enhance working memory by increasing the level of ACh and by decreasing oxidative stress leading to the increased working memory.

The effect of Brahmi ethanolic extract, in comparison with ginkgo extract and standard drug for Alzheimer's disease, Donepezil, on superficial cerebral blood flow, blood pressure and heart rate in rats were investigated. Two experimental protocols were implemented including 1) Subchronic effect: Rats were orally administered with Brahmi extract (40 mg/kg BW), ginkgo extract (60 mg/kg BW) or Donepezil (1 mg/kg BW) daily for 2 months and 2) Acute effect: Rats were intravenously injected with Brahmi extract (20, 40, 60 mg/kg BW), ginkgo (20, 40, 60 mg/kg BW), and Donepezil (1 mg/kg BW). We found that subchronic administration of either Brahmi extract (40 mg/kg BW) or ginkgo (60 mg/kg BW) significantly increased superficial cerebral blood flow, but had no effect on blood pressure and heart rate when compared with control group. On the other hand, treatment with Donepezil (1 mg/kg BW) for 2 months had no significant effect on superficial cerebral blood flow, blood pressure and heart rate. Intravenous injection (i.v.) of Brahmi extract (20, 40, 60 mg/kg BW) or ginkgo (20, 40, 60 mg/kg BW) produced a dose-dependent, transient hypotensive effect and decreased superficial cerebral blood flow, but had no effect on heart rate in anaesthetized rats. On the contrary, Donepezil (1 mg/kg BW, i.v.) had no effect on blood pressure and superficial blood flow, but decreased heart rate.

Due to a lack of information regarding its physiological actions on changes in synaptic transmission and neurotransmitters in the hippocampus, we, therefore, investigated these issues by comparing the effects of Brahmi extract to those of *Ginkgo biloba* and donepezil on learning and memory, induction of long term potentiation (LTP), and changes of amino acid neurotransmitters in naturally aging rats. The results following 3 month oral administration of the extract/drug demonstrated that 40 mg/kg Brahmi extract -treated group showed a similar efficacy of both spatial memory and object recognition as 60 mg/kg Ginkgo extract -treated and 1 mg/kg donepezil-treated groups which were significantly better than those of the vehicle control group. In addition, a biochemical assay of homogenized hippocampal tissues isolated from Brahmi extract group showed increases of glutamate, glutamine, serine and GABA levels, whereas those from Ginkgo extract -treated group showed increases of glutamate and serine and those from donepezil -treated group showed an increase of glutamine and a decrease of glycine. These results indicate that Brahmi extract may act via the changes of amino acid neurotransmitters in the hippocampus to improve a cognitive function of aging rats.

The ability of Brahmi extract to affect rat and human cytochrome P450 (CYP) activities was examined *in vitro*. The potential for inhibition of CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 and CYP3A by BME (1-10,000 µg/mL) was evaluated with pooled rat and human liver microsomes. BME exhibited minimal capacity to inhibit any CYP enzyme, compare to the reference inhibitors. Brahmi extract inhibited the O-deethylation of 7-ethoxyresorufin, a marker substrate for CYP1A2 with IC₅₀ value of 59.4 and 836.1 µg/mL in rat and human liver microsomes, respectively. Brahmi extract also inhibited tolbutamide hydroxylation both in rat and human microsomes with IC₅₀ value of 222.1 and 297.6 µg/mL, respectively but did not affect rat and human CYP2E1. BME was found to be a weak inhibitor of CYP3A in rat and human liver microsomes with IC₅₀ value of 321.9 and 481.8 µg/mL, respectively.

The potential for induction of CYP activity was evaluated by exposing primary cultured of rat hepatocytes to Brahmi extract (0.045-0.45 µg/mL). Enzymatic activities were performed by the direct incubation of hepatocyte monolayers with the specific substrates of each CYP. The mean activities and expression of CYP1A2, CYP2C and CYP3A from Brahmi extract -treated hepatocytes were slightly higher than those in the solvent-treated controls but were less than those produced by reference inducers of these enzymes. In summary, BME has been demonstrated *in vitro* to be a low potent of CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 and CYP3A both in rat and human liver microsomes and a modest inducer of CYP *in vitro* in rat hepatocytes. Due to the relatively low degree of alteration of the enzyme activities *in vitro* and to the concentrations of BME required to obtain appreciable effects, a high incidence of clinically significant interactions would not be

expected. However, these *in vitro* results are being used in evaluation of clinical reports of apparent herb-drug interaction and in the design of subsequent studies targeted at further elucidation of the clinical relevance, if any, of those *in vitro* findings.

The metabolism of Bacopaside I, one of pseudojubilogenin type glycosides, was studied in wistar rats after oral and intravenous administration at the dose of 10 mg/kg body weight. An on-membrane analysis; one of an immunoassay technique was used to analyze for Bacopaside I and its metabolites in urine and feces samples collected after dosing at 12, 24, 36 and 48 h. The results showed that only feces samples after oral administration could be detected for Bacopaside I while this compound could be detected in both urine and feces samples from rats after intravenous administration. In addition, the results from quantitative analysis of Bacopaside I in the samples showed non-relationship between Bacopaside I amount and time after administration. More Bacopaside I was detected in feces samples after oral administration compared to intravenously.

Acute toxicity of Brahmi extract was conducted in male and female rats by single oral administration with the extract at 5,000 mg/kg body weight. The toxic signs and behaviors were observed within 14 days. The results showed no sign of differences as compared the control rats. In conclusion, single oral administration with the Brahmi extract at 5,000 mg/kg body weight did not significantly cause acute toxicity. For the chronic toxicity test, after oral feeding both male and female rats daily with the Brahmi extract at 30, 60, 300 and 1,500 mg/kg body weight for 270 days, signs, animal behavior and health monitoring were then investigated. There were no abnormalities in the test groups as compared to the control rats. Furthermore, the test and control groups (the day of 270th) and the satellite group (298th) were analyzed by measuring their final body and organ weights, taking necropsy, and examining hematology, blood clinical chemistry, and microanatomy. The results show an increase or decrease of body and some organ weights, significantly difference of some hematological and clinical blood chemical values when compared with the control groups. However, analyses of these results combined with the information of signs, behavior and health monitoring can finally make a conclusion that an oral administration of the Brahmi extract at the doses of 30, 60, 300 and 1,500 mg/kg body weight for 270 days does not produce chronic toxicity.

The guidelines on good agricultural and collection practices for Brahmi, the Guidelines for analysis of saponins in Brahmi and the guidelines for manufacturing of Brahmi tablets were established from the experimental work. Brahmi was ready for harvesting 2 month after cultivation. The shoot of Brahmi which was 10-20 cm from the topmost of the plant was collected, dried at 55 °C and ground. the dried Brahmi

powder should contain total saponin glycosides consisting of BacosideA₃, Bacopasaponin C, Bacopaside I, II, and Bacopaside X not less than 1 % w/w. The standardized extract of Brahmi should contain not less than 5 % total saponin. The production of Brahmi dried powder was approximately 40 kg/rai/month. The cost of tablet was calculated as 2.3 baht /tablet.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ(ภาษาไทย)	iv
บทคัดย่อ(ภาษาอังกฤษ)	vii
สารบัญเรื่อง	xi
สารบัญตาราง	xv
สารบัญรูป	xix
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	xxiv
บทนำ	xxvii
โครงการย่อยที่ 1 ฤทธิ์สารสกัดพรมมิในการลดปัญหาการบกพร่องเรื่องการเรียนรู้และ ความจำในผู้ป่วยที่มีความจำบกพร่อง	1-i
กิตติกรรมประกาศ	1-ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	1-iii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	1-iv
สารบัญเรื่อง	1-v
สารบัญตาราง	1-vi
สารบัญรูป	1-vii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	1-viii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	1-7
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	1-12
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	1-19
บรรณานุกรม	1-20
โครงการย่อยที่ 2 ฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิต่อการไหลเวียนโลหิตบริเวณผิวหนังเปลือกสมอง ความ ดันโลหิต และ อัตราการเต้นของหัวใจในหนูแรท	2-i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	2-ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	2-iii
สารบัญเรื่อง	2-iv
สารบัญตาราง	2-v

สารบัญรูป	2-vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	2-vii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	2-4
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	2-9
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	2-18
บรรณานุกรม	2-19
โครงการย่อยที่ 3 ผลของสารสกัดพรมมิต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูแรท	3-i
กิตติกรรมประกาศ	3-ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	3-iii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	3-iv
สารบัญเรื่อง	3-v
สารบัญตาราง	3-vi
สารบัญรูป	3-vii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	3-viii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	3-5
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	3-20
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	3-38
บรรณานุกรม	3-39
โครงการย่อยที่ 4 การศึกษาเมตาบอลิซึมและอันตรกริยาต่อยาของพรมมิ	4-i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	4-ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	4-iii
สารบัญเรื่อง	4-iv
สารบัญตาราง	4-v
สารบัญรูป	4-vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	4-vii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	4-5
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	4-9

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	4-14
บรรณานุกรม	4-16
ภาคผนวก	4-18
โครงการย่อยที่ 5 การศึกษาเมตาบอลิซึมของบาโคปาล์เซดวันในหนู	5-i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	5-ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	5-iii
สารบัญเรื่อง	5-iv
สารบัญตาราง	5-v
สารบัญรูป	5-vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	5-vii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	5-4
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	5-16
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	5-32
บรรณานุกรม	5-33
โครงการย่อยที่ 6 การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-i
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	6-ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	6-iii
สารบัญเรื่อง	6-iv
สารบัญตาราง	6-v
สารบัญรูป	6-vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	6-vii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	6-4
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	6-6
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	6-20
บรรณานุกรม	6-23
ภาคผนวก	6-25
โครงการย่อยที่ 7 การศึกษาเพื่อส่งต่อเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิสู่	7-i
 อุตสาหกรรม	
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	7-ii

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	7-iii
สารบัญเรื่อง	7-iv
สารบัญตาราง	7-v
สารบัญรูป	7-vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	7-vii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	7-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	7-3
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	7-14
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	7-35
บรรณานุกรม	7-36
ภาคผนวก	7-38
สรุปภาพรวมของโครงการวิจัย	1
ประวัติคณະนักวิจัย	4

สารบัญตาราง

หน้า

โครงการย่อยที่ 1 ฤทธิ์สารสกัดพรมมิในการลดปัญหาการบกพร่องเรื่องการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วยที่มีความจำบกพร่อง

ตารางที่ 1-1	ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัคร	1-12
ตารางที่ 1-2	การเปลี่ยนแปลงของ acetylcholinesterase	1-13

โครงการย่อยที่ 2 ฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิต่อการไหลเวียนโลหิตบริเวณผิวเปลือกสมอง ความดันโลหิต และ อัตราการเต้นของหัวใจในหนูแรท

ตารางที่ 2-1	ผลของสารสกัดพรมมิ, สารสกัดแปะก๊วย และ ยา Donepezil เมื่อให้ทางปาก เป็นระยะเวลา 2 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต (Systolic blood pressure) ในหนูทดลองที่มีสติ	2-9
ตารางที่ 2-2	ผลของสารสกัดพรมมิ, สารสกัดแปะก๊วย, และยา Donepezil ขนาด 1 mg/kg BW เมื่อให้ทางปาก เป็นระยะเวลา 2 เดือน ต่ออัตราการเต้นของหัวใจ (Heart rate) ในหนูทดลองที่มีสติ	2-10

โครงการย่อยที่ 3 ผลของสารสกัดพรมมิต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูแรท

ตารางที่ 3-1	ค่าน้ำหนักโมเลกุลและการคำนวณความเข้มข้นหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ (mM) และ ปริมาณเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)ของสารมาตรฐานกรดอะมิโนที่ 5 ความเข้มข้น	3-9
ตารางที่ 3-2	ค่าพื้นที่ใต้กราฟของกรดอะมิโน แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และ กาบา 5 ความเข้มข้นหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการฉีด 3 ครั้ง	3-11
ตารางที่ 3-3	intraday variation (ค่า mean, SD, % CV) ของสารมาตรฐานกรดอะมิโน แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน และกลูตามีน ที่ 3 ความเข้มข้น	3-12
ตารางที่ 3-4	intraday variation (ค่า mean, SD, % CV) ของสารมาตรฐานกรดอะมิโน ไกลซีน และกาบา ที่ 3 ความเข้มข้น	3-13

โครงการย่อยที่ 4 การศึกษาเมตาบอลิซึมและอันตรกิริยาต่อยาของพรมมิ

ตารางที่ 4-1	ชื่อเอนไซม์ ชื่อปฏิกิริยา สารตั้งต้น สารผลิตภัณฑ์และสารยับยั้งมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง	4-6
ตารางที่ 4-2	ค่า IC_{50} ของสารสกัดพรมมิและสารยับยั้งมาตรฐานต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในไมโครโซมหนูและมนุษย์	4-10

ตารางที่ 4-3	ค่าจำนวนเท่าของ CYP activity ของเซลล์ที่ treat ด้วยสารสกัดพรมมิและสาร เหนียวนำมามาตรฐานเทียบกับกลุ่มควบคุม	4-13
ตารางที่ 4-4	ค่าจำนวนเท่าของการแสดงออกของ mRNA CYP ของเซลล์ที่ treat ด้วยสารสกัด พรมมิและสารเหนียวนำมามาตรฐานเทียบกับกลุ่มควบคุม	4-13
ตารางที่ 4-5	ตัวอย่างผลการทดสอบวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ในการวัดการทำงานของ ของเอนไซม์ไซโตโครม P450 3A	4-25

โครงการย่อยที่ 5 การศึกษามาตรฐานของบาโคปาสิดวันในหนู

ตารางที่ 5-1	ค่าน้ำหนักโมเลกุลและการคำนวณความเข้มข้นหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ (mM) และ ปริมาณเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)ของสารมาตรฐานกรดอะมิโนที่ 5 ความเข้มข้น	5-10
ตารางที่ 5-2	สภาวะที่ใช้ของเครื่องวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร รุ่น API 4000	5-10
ตารางที่ 5-3	สารที่ทดสอบ มวลโมเลกุล และการแตกตัวเป็นไอออน ค่าพลังงานที่ใช้	5-11
ตารางที่ 5-4	Mass spectrometry conditions	5-11
ตารางที่ 5-5	ชื่อตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองที่เก็บ ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการป้อนสาร Bacopaside I	5-18
ตารางที่ 5-6	ชื่อตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองที่เก็บ ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการบริหารสาร Bacopaside I ทางหลอดเลือดดำ	5-19
ตารางที่ 5-7	ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการป้อน สาร Bacopaside I	5-20
ตารางที่ 5-8	ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการบริหารสาร Bacopaside I ทางหลอดเลือดดำ	5-21
ตารางที่ 5-9	ปริมาณสาร Bacopaside I ที่ตรวจพบในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระหลังการ ป้อนสารBacopaside I	5-22
ตารางที่ 5-10	ปริมาณสาร Bacopaside I ที่ตรวจพบในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระหลังการ บริหารสาร Bacopaside I ทางหลอดเลือดดำ	5-23
ตารางที่ 5-11	Intraday coefficient of variation ของการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่าง ปัสสาวะและอุจจาระ	5-27
ตารางที่ 5-12	Interday coefficient of variation ของการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่าง ปัสสาวะและอุจจาระ	5-27
ตารางที่ 5-13	Recovery ของการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ	5-28

โครงการย่อยที่ 6 การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

ตารางที่ 6-1	ผลของสารสกัดพรมมิต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน	6-6
ตารางที่ 6-2	ผลของสารสกัดพรมมิต่อน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน	6-7
ตารางที่ 6-3	น้ำหนักตัวของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-9
ตารางที่ 6-4	น้ำหนักตัวของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-10
ตารางที่ 6-5	น้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-11
ตารางที่ 6-6	น้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-12
ตารางที่ 6-7	ค่าโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-14
ตารางที่ 6-8	ค่าโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-15
ตารางที่ 6-9	ค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัด พรมมิ	6-16
ตารางที่ 6-10	ค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-17
ตารางที่ 6-11	ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-18
ตารางที่ 6-12	ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-19

โครงการย่อยที่ 7 การศึกษาเพื่อส่งต่อเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิสู่อุตสาหกรรม

ตารางที่ 7-1	ส่วนผสมสำหรับการเตรียมยาเม็ดสารสกัดพรมมิขนาด 300 มิลลิกรัม	7-9
ตารางที่ 7-2	ผลการวิเคราะห์ดิน	7-14
ตารางที่ 7-3	ความหนาแน่นของดินพรมมิในช่วงระยะเวลาต่างๆ	7-14
ตารางที่ 7-4	ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในผงพรมมิแห้ง	7-25
ตารางที่ 7-5	สรุปผลการทดสอบคุณภาพด้านต่างๆ ของยาเม็ดสารสกัดสมุนไพรพรมมิ	7-26
ตารางที่ 7-6	ค่า cross reactivities (CRs) ของสารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนต่อ bacoside A ₃ ต่อสารจากธรรมชาติชนิดต่างๆ ในการทดสอบโดยใช้วิธี ELISA	7-28

ตารางที่ 7-7	ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์หาปริมาณสาร bacoside A ₃ ด้วยวิธี ELISA	7-29
ตารางที่ 7-8	ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์หาปริมาณสาร bacoside A ₃ ด้วยวิธี ELISA	7-29
ตารางที่ 7-9	ปริมาณสารกลุ่ม jujubogenin glycosides จากพืชพรมมิจากการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA และ HPLC (n=3)	7-30
ตารางที่ 7-10	ค่าใช้จ่ายในการปลูกพรมมิ	7-31
ตารางที่ 7-11	ค่าใช้จ่ายในการสกัดสมุนไพรพรมมิ	7-32
ตารางที่ 7-12	ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สารสกัดสมุนไพรพรมมิ	7-32
ตารางที่ 7-13	ค่าใช้จ่ายในการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิ	7-33
ตารางที่ 7-14	ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	7-33
ตารางที่ 7-15	ค่าใช้จ่ายทั้งหมด	7-34

สารบัญรูป

	หน้า
โครงการย่อยที่ 1 ฤทธิ์สารสกัดพรมมิในการลดปัญหาการบกพร่องเรื่องการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วยที่มีความจำบกพร่อง	
รูปที่ 1-1 แผนภูมิแสดงการดำเนินการวิจัย	1-9
รูปที่ 1-2 การเปลี่ยนแปลงระดับ malondialdehyde (MDA) ใน serum	1-14
รูปที่ 1-3 การทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ใน serum	1-15
รูปที่ 1-4 การทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT) ใน serum	1-16
รูปที่ 1-5 การทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ใน serum	1-17
โครงการย่อยที่ 2 ฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิต่อการไหลเวียนโลหิตบริเวณผิวเปลือกสมอง ความดันโลหิต และ อัตราการเต้นของหัวใจในหนูแรท	
รูปที่ 2-1 การฝึกให้สัตว์ทดลองให้คุ้นเคยกับ Restrainer และ ชุดอุปกรณ์การวัดความดันโลหิตทางหางหนู	2-6
รูปที่ 2-2 ชุดศึกษาความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจ และชุดศึกษาการไหลเวียนโลหิตที่ผิวสมอง และ หนูทดลองที่สลบกำลังถูกตรึงกะโหลกศีรษะด้วย Stereotaxic apparatus และตำแหน่งการวาง Laser Doppler flow (LDF) probe	2-7
รูปที่ 2-3 ผลของสารสกัดพรมมิ, สารสกัดแปะก๊วย และยา Donepezil เมื่อให้ทางปาก เป็นระยะเวลา 2 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตในหลอดเลือดแดงที่ผิวเปลือกสมองในหนูทดลองที่สลบ	2-11
รูปที่ 2-4 ผลการทดสอบสารหรือยาที่มีฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิต และการไหลเวียนโลหิตที่ผิวสมอง เมื่อนิโคตตินต่าง ๆ แก่หนู	2-12
รูปที่ 2-5 ผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ เมื่อนิโคตตินสกัดพรมมิ, สารสกัดแปะก๊วย, Donepezil, Norepinephrine และ Sodium nitroprusside เข้าทางหลอดเลือดดำในหนูที่สลบ	2-13
รูปที่ 2-6 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง เมื่อนิโคตตินสกัดพรมมิ, สารสกัดแปะก๊วย, Donepezil, Norepinephrine และ Sodium nitroprusside เข้าทางหลอดเลือดดำในหนูที่สลบ	2-14
โครงการย่อยที่ 3 ผลของสารสกัดพรมมิต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูแรท	
รูปที่ 3-1 วิธีการศึกษาการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส	3-8

รูปที่ 3-2	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.02 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	3-14
รูปที่ 3-3	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	3-15
รูปที่ 3-4	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.125 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	3-16
รูปที่ 3-5	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	3-17
รูปที่ 3-6	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	3-18
รูปที่ 3-7	กราฟเปรียบเทียบมาตรฐาน (standard calibration curves) ของ aspartate, glutamate, glutamine, serine, glycine และ GABA	3-19
รูปที่ 3-8	รูปแบบการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ทดสอบด้วย Morris Water Maze	3-20
รูปที่ 3-9	ผลการทดสอบความจำเกี่ยวกับสถานที่ด้วยวิธี probe trial	3-21
รูปที่ 3-10	เปรียบเทียบความสามารถในการจดจำวัตถุทดสอบด้วย Novel Object Recognition	3-22
รูปที่ 3-11	ตัวอย่างผลของศักย์ไฟฟ้าหลังซินแนปส์ชนิด EPSP ที่บันทึกได้จาก CA1	3-23
รูปที่ 3-12	ผลการวิเคราะห์ศักย์ไฟฟ้าหลังซินแนปส์ (EPSP) ของหนูแก่กลุ่มควบคุม	3-24
รูปที่ 3-13	ผลการวิเคราะห์ EPSP ของหนูแก่กลุ่มได้รับสารสกัดสมุนไพร	3-25
รูปที่ 3-14	ผลการวิเคราะห์ EPSP ของหนูแก่กลุ่มได้รับสารสกัดแปะก๊วย	3-26
รูปที่ 3-15	ผลการวิเคราะห์ EPSP ของหนูแก่กลุ่มได้รับยา Donepezil	3-27
รูปที่ 3-16	ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่กลุ่มควบคุม	3-29
รูปที่ 3-17	ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่ที่ได้รับ Donepezil	3-30
รูปที่ 3-18	ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร	3-31
รูปที่ 3-19	ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดใบแปะก๊วย	3-32
รูปที่ 3-20	เปรียบเทียบระดับของแอสปาร์เตต กลูตาเมต และกลูตามีน ที่วัดได้จาก supernatant	3-33

รูปที่ 3-21	เปรียบเทียบระดับของเซอร์อิน ไกลซีน และกาบ้า ที่วัดได้จาก supernatant	3-34
โครงการย่อยที่ 4 การศึกษาเมตาบอลิซึมและอันตรกิริยาต่อยาของพรมมิ		
รูปที่ 4-1	การแยกเซลล์ตับหนูโดยใช้วิธี perfuse ด้วยเอนไซม์ collagenase	4-7
รูปที่ 4-2	ขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay) ของสารสกัดพรมมิ	4-8
รูปที่ 4-3	ขั้นตอนการทดสอบผลของสารสกัดพรมมิต่อความสามารถในการเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP และการแสดงออกของ mRNA CYP	4-8
รูปที่ 4-4	ภาพถ่ายเซลล์ตับหนูกลุ่มควบคุมและที่ treated ด้วยสารสกัดพรมมิ	4-11
รูปที่ 4-5	ค่า % cell viability ในเซลล์ตับหนูกลุ่มควบคุมและที่ treated ด้วยสารสกัดพรมมิที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	4-11
รูปที่ 4-6	ค่าร้อยละของความเข้มข้นของ protein จาก rat hepatocytes ในกลุ่มทดลองที่ treat ด้วย BME เทียบกับกลุ่มควบคุม	4-12
โครงการย่อยที่ 5 การศึกษาเมตาบอลิซึมของบาโคปาสิดวันในหนู		
รูปที่ 5-1	โครงสร้างของสารกลุ่ม jujubogenin glycosides และ pseudojujubogenin glycosides ที่พบในพรมมิ	5-2
รูปที่ 5-2	ขั้นตอนการศึกษาเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หลังการบริหารโดยการป้อน	5-6
รูปที่ 5-3	ขั้นตอนการศึกษาเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หลังการบริหารทางหลอดเลือดดำ	5-8
รูปที่ 5-4	การเกิดปฏิกิริยาจับกับโปรตีนและสารกลุ่ม pseudojujubogenin glycosides บนแผ่น PES membrane	5-15
รูปที่ 5-5	HPLC Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ enriched saponin extract ที่ความเข้มข้น 3 mg/ml และ chromatogram ของ fraction 14	5-16
รูปที่ 5-6	HPLC Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ enriched saponin extract ที่ความเข้มข้น 3 mg/ml และ chromatogram ของ fraction 15-17	5-16
รูปที่ 5-7	LC/MS/MS ของ fraction 15-17 สาร Bacopaside I แสดง peak ที่ 19.3 นาที	5-17
รูปที่ 5-8	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของผลการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ	5-25
รูปที่ 5-9	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Bacopaside I ที่แต่ละความเข้มข้น	5-26
รูปที่ 5-10	กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Bacopaside I	5-26
รูปที่ 5-11	โครมาโตแกรมตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองภายหลังการป้อนสาร Bacopaside I	5-29

รูปที่ 5-12	โครมาโตแกรมตัวอย่างปีศาจและอุจจาระของหนูทดลองภายหลังการบริหารสาร Bacopaside I ทางเส้นเลือดดำ	5-30
-------------	--	------

โครงการย่อยที่ 6 การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

รูปที่ 6-1	จุดตายวิภาคของสมองจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-27
รูปที่ 6-2	จุดตายวิภาคของหัวใจจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-28
รูปที่ 6-3	จุดตายวิภาคของปอดจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-29
รูปที่ 6-4	จุดตายวิภาคของตับจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-30
รูปที่ 6-5	จุดตายวิภาคของไตจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-31
รูปที่ 6-6	จุดตายวิภาคของต่อมหมวกไตจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-32
รูปที่ 6-7	จุดตายวิภาคของม้ามจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-33
รูปที่ 6-8	จุดตายวิภาคของกระเพาะอาหารจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษถึงเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-34
รูปที่ 6-9	จุดตายวิภาคของลำไส้จากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-35
รูปที่ 6-10	จุดตายวิภาคของรังไข่และมดลูกจากหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-36
รูปที่ 6-11	จุดตายวิภาคของอัมตะและเอพิดิไดมิสจากหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-37

โครงการย่อยที่ 7 การศึกษาเพื่อส่งต่อเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิสู่อุตสาหกรรม

รูปที่ 7-1	แปลงที่ใช้ในการเพาะปลูกพรมมิ	7-3
รูปที่ 7-2	การปลูกพรมมิ	7-4
รูปที่ 7-3	การเก็บเกี่ยวพรมมิ	7-4
รูปที่ 7-4	การตากแห้งพรมมิ	7-5
รูปที่ 7-5	การอบแห้งพรมมิ	7-6
รูปที่ 7-6	การอบแห้งพรมมิโดยใช้ตู้อบพลังงานแสงอาทิตย์	7-6

รูปที่ 7-7	แผนภาพการกระตุ้นหนูให้สร้างสารภูมิต้านทาน	7-11
รูปที่ 7-8	<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Wettst. (aerial part)	7-16
รูปที่ 7-9	ลักษณะของการ cross section ใบพรมมิ	7-17
รูปที่ 7-10	ปากใบ จากการ cross section ใบพืชมรมมิ	7-17
รูปที่ 7-11	ลำต้นพรมมิ	7-18
รูปที่ 7-12	reticulated vessel	7-18
รูปที่ 7-13	trichome	7-19
รูปที่ 7-14	glandular trichome	7-19
รูปที่ 7-15	Epidermis	7-20
รูปที่ 7-16	stoma	7-20
รูปที่ 7-17	parenchyma cells	7-21
รูปที่ 7-18	ตัวอย่าง โครมาโทแกรมของสารสกัดพรมมิ ที่ความเข้มข้น 0.02 g/mL จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ 205 nm	7-23
รูปที่ 7-19	Calibration curve สารซาโปนินที่พบในพรมมิ	7-24

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มก. มิลลิกรัม

ก. กรัม

ก./กก. กรัมต่อกิโลกรัม

มก./กก. มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

มม. มิลลิเมตร

มล. มิลลิลิตร

BME *Bacopa monnieri* Extract

cDNA Complementary deoxyribonucleic acid

CYP Cytochrome P450

Ct Cycle Threshold

DMEM Dulbecco's modified eagle medium

DMSO Dimethylsulfoxide

EROD Ethoxyresorufin-O-Deethylase

HEPES N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]

HMM Hepatocyte maintenance medium

HPLC High performance liquid chromatography

ITS Insulin transferrin selenium supplement premix

LLOQ Lower limit of quantification

mRNA Messenger ribonucleic acid

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

ND Not done

NR Not reported

OD Optical density

PBS	Phosphate buffered saline
PB	Phenobarbital
PC	Positive control
PCR	Polymerase chain reaction
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane
S.D./SD	Standard deviation
ACh	Acetylcholine
AChE	Acetylcholinesterase
GPx	Glutathione peroxidase
MDA	Malondialdehyde
mg	Milligram
ms	Millisec
SOD	Superoxide dismutase
mg/kg	Milligram per kilogram
mg/ml	Milligram per milliter
µg/kg	Microgram per kilogram
g/mL	Gram per milliliter
µl, µL	Microliter
BW	Body weight
NE	Norepinephrine
DNP	Donepezil
SNP	Sodium nitroprusside
DP	Diastolic blood pressure
SP	Systolic blood pressure
S.E.M.	Standard error of the mean

AChEI	Acetylcholinesterase inhibitor
LTP	Long-term potentiation
DG	Dentate gyrus
CA	Cornu ammonis
SC	Schaffer collateral pathway
EPSP	Excitatory post-synaptic potential
NOR	Novel Object Recognition
BM	<i>Bacopa monnieri</i>
5-HT	5 hydroxytryptamine
LOQ	Limit of quantification
LOD	Limit of detection
r^2	Coefficient of determination or correlation
$^{\circ}\text{C}$	Degree celcius
ng	Nanogram
PES	Polyethersulphone
PBS	Phosphate buffer solution
rpm	Round per minute
ppm	Part per million
M	Molar

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันอายุเฉลี่ยของประชากรโลกเพิ่มมากขึ้น อัตราส่วนของคนสูงอายุกับคนหนุ่มสาวก็เพิ่มขึ้น โรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทและความทรงจำ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคเรื้อรังและเป็นสาเหตุให้คุณภาพชีวิตของประชากรสูงอายุน้อยลง ยาหรือสมุนไพรที่จะสามารถนำมารักษาหรือบรรเทาอาการ โรคที่เกิดจากการเสื่อมนี้ จึงมีความสำคัญทั้งทางด้านสุขภาพและเศรษฐกิจ สมุนไพรที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อบำรุงสมอง บำรุงความจำ ที่มีขายอยู่ในท้องตลาด ได้แก่ ginkgo และ โสม ซึ่งเป็นพืชที่ไม่สามารถปลูกได้ในประเทศไทย คณะผู้วิจัยจึงขอเสนอโครงการศึกษาพัฒนาพรมมิเพื่อใช้เป็นสมุนไพรบำรุงความจำ (ระยะที่ 4) ซึ่งทางคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติได้ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยมาแล้วเป็นเวลา 3 ปี (ปีงบประมาณ 2548-2550)

พรมมิ (*Bacopa monnieri* Wettst.) เป็นพืชที่หาทั่วไปในประเทศไทย และสามารถขยายพันธุ์ได้ง่าย มีอายุในการเก็บเกี่ยวสั้นมีประวัติการใช้ในการแพทย์อายุเวทมาช้านานแล้ว โดยระบุว่ามีส่วนช่วยบำรุงสมอง ในปัจจุบัน มีข้อมูลทางด้านเคมีและเภสัชวิทยาที่ส่งเสริมสรรพคุณด้านการเพิ่มความสามารถในการจำ และการเรียนรู้ทั้งในสัตว์ทดลองและในคน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นศักยภาพของสมุนไพรพรมมิในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยาสมุนไพรบำรุงความจำ บำรุงสมอง หรืออาจนำมาพัฒนาใช้เพื่อรักษา ป้องกัน หรือชะลออาการของโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมของระบบประสาทส่วนกลางและความจำ เช่น โรคอัลไซเมอร์ได้ จึงสมควรที่จะทำการศึกษาสมุนไพรนี้โดยละเอียดก่อนเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการวิจัยพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

ในปี 2548 คณะผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนการวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางเคมี คณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาวิธีการสกัด และการควบคุมคุณภาพของสารสกัดพรมมิ ได้สารสกัดที่มีมาตรฐานและมีความคงตัว เมื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าสารสกัดพรมมิที่ได้ มีผลกระตุ้นความจำและการเรียนรู้ในหนูปกติและหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่อง นอกจากนี้ ยังพบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ประสาทอีกด้วย ส่วนการทดสอบพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรัง พบว่าสารสกัดพรมมิในขนาดที่ใช้ ไม่มีพิษต่อสัตว์ทดลอง สำหรับปีงบประมาณ 2549 คณะผู้วิจัยมุ่งเน้นการวิจัยที่จำเป็นสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากพรมมิ ครอบคลุมตั้งแต่การพัฒนาการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยว การพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาเม็ดพรมมิ การพัฒนาการควบคุมคุณภาพโดยใช้เทคนิคทาง ELISA นอกจากนี้ ยังศึกษาการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของพรมมิต่อระบบประสาทส่วนกลางและระบบหัวใจหลอดเลือดเพิ่มเติม และยังศึกษาในการหาข้อบ่งชี้ใหม่ๆของสารสกัดพรมมิเช่น ศักยภาพของพรมมิต่อการลดกลุ่มอาการเนื่องจากการใช้ในผู้ติดสุราและยาเสพติด ส่วนในปี 2550 คณะผู้วิจัยได้นำผลิตภัณฑ์ยาเม็ดพรมมิที่ได้มาทำการศึกษาทางคลินิก เพื่อให้ทราบประสิทธิภาพของพรมมิเปลี่ยนแปลงคุณภาพชีวิตในอาสาสมัครวัย

กลางคนและสูงอายุ โดยจะศึกษาผลิตภัณฑ์พรมมิที่พัฒนาได้ต่อ Physical and psychological fitness และต่อการเรียนรู้และความจำของคนวัยกลางคนและผู้สูงอายุ รวมทั้งศึกษาผลทางเภสัชจลนศาสตร์ และศึกษาผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นในอาสาสมัคร โดยผลการศึกษาพบว่า การให้ผลิตภัณฑ์พรมมิขนาด 300 และ 600 มก. ในอาสาสมัครเป็นเวลา 3 เดือน มีแนวโน้มทำให้อาสาสมัครมีการเรียนรู้และความจำที่ดีขึ้น รวมทั้งไม่พบผลข้างเคียงที่รุนแรงในอาสาสมัคร

จะเห็นได้ว่าการศึกษาระยะที่ 1-3 ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการศึกษาการเตรียมวัตถุดิบ การควบคุมคุณภาพ การเตรียมสารสกัด (ได้อนุสิทธิบัตรแล้ว) การศึกษาประสิทธิภาพของยาในสัตว์ทดลอง และกลไกการออกฤทธิ์ การศึกษาทางพิษวิทยาทั้งเรื้อรัง การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์การศึกษา และการศึกษาทางคลินิกในผู้กลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี เพื่อให้การพัฒนาสมุนไพรพรมมิไปสู่อาหารเสริมเพื่อบำรุงความจำได้อย่างสมบูรณ์ ในการศึกษาครั้งที่ 4 นี้ ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาฤทธิ์สารสกัดพรมมิในการลดปัญหาการบกพร่องเรื่องการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วยที่มีความจำบกพร่องเล็กน้อย (mild cognitive impairment) เพื่อพิสูจน์ประสิทธิภาพของพรมมิในผู้ป่วย และเนื่องจากพรมมิ เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จะต้องรับประทานติดต่อกันเป็นประจำ การศึกษาพิษเรื้อรัง รวมทั้ง การศึกษาเมตาบอลิซึมและอันตรกิริยาต่อยาของพรมมิ จึงมีความสำคัญไม่ยิ่งหย่อนไปกว่ากัน

จากการวิจัยที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากพรมมิ แล้วพบว่า สารสกัดจากพรมมิ มีฤทธิ์เพิ่มความจำและการเรียนรู้ และมีฤทธิ์ในการปกป้องการเสื่อมของเซลล์สมอง (neuroprotective) โดยทำให้ระดับ cholinesterase ลดลง เพิ่มสารสื่อประสาท acetyl choline แล้วยังมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน อย่างไรก็ดีตาม ยังเป็นที่น่าสนใจว่า สารสกัดจากพรมมิ จะมีผลเพิ่มความจำโดยผ่านกลไกอื่นอีกหรือไม่ เช่นการเพิ่มการไหลเวียนโลหิตของสมอง และผลต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่ซินแนปส์ของเซลล์ประสาทที่เพิ่มขึ้นอย่างยาวนาน คณะผู้วิจัย จึงเสนอโครงการการศึกษาดังกล่าว เพื่อให้ได้ข้อมูลการออกฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิที่ครอบคลุมและครบถ้วนขึ้น

จากการศึกษา pharmacokinetics ของสารสกัดพรมมิขนาด 300 และ 600 mg ในอาสาสมัคร ไม่พบว่ามีสาร saponins จากพรมมิอยู่ในเลือด แสดงว่าพรมมิ ได้เปลี่ยนรูปไปเป็น metabolites ตัวอื่น ดังนั้นผู้วิจัย จึงมีความสนใจที่จะศึกษาและพิสูจน์เอกลักษณ์ ของสาร metabolites จาก bacopaside I ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในพรมมิ โดยจะแยกสกัดสาร metabolite ใน urine และ feces ของสัตว์ทดลองที่ได้รับ bacopaside I โครงการนี้ จะเป็นโครงการวิจัยที่ได้รับความร่วมมือจาก Faculty of Medical and Pharmaceutical Sciences, Franche-Comté University, Besançon ประเทศฝรั่งเศส ภายใต้โครงการ Plantasafe (Bioasia Program) ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากประเทศฝรั่งเศส และยังได้รับความร่วมมือในการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วย High resolution Mass Spectrometer จาก Department of Analytical Chemistry and Applied Spectrometry, Vrije Universiteit, Amsterdam ประเทศเนเธอร์แลนด์ซึ่งทั้งความร่วมมือระหว่างประเทศจากทั้งสองสถาบันนี้ เป็นเพื่อการวิจัย และไม่ได้หวังผลทางการค้า

นอกจากนี้ การศึกษาเพื่อส่งต่อเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิสู่อุตสาหกรรม ก็มีความจำเป็น การศึกษานี้ครอบคลุมไปถึงการศึกษาด้านการปลูกพรมมิในปริมาณมาก มาตรฐานวัตถุดิบ มาตรฐานสารสกัด และมาตรฐานกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนในการส่งมอบเทคโนโลยีให้แก่ผู้ผลิต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผล และ กลไกการออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์พรมมิในการลดความบกพร่องการเรียนรู้และความจำของผู้ป่วยความจำบกพร่องเล็กน้อย
2. เพื่อศึกษาผลและ/หรือกลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรพรมมิในประเด็นต่อไปนี้
 - ผลต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตบนผิวเปลือกสมองในหนูทดลอง
 - ผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลองที่ไม่สลับและได้รับสารสกัดสมุนไพรพรมมิโดยการกินติดต่อกันนาน 2 เดือน
 - กลไกการเพิ่มการเรียนรู้และความจำโดยศึกษาผลการถ่ายถอดสัญญาณประสาทที่ซินแนปส์ของเซลล์ประสาทที่เพิ่มขึ้นอย่างยาวนานในหนูแก่
 - ผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่
3. เพื่อศึกษาเมตาบอลิซึมและอันตรกิริยาต่อยาของพรมมิ
4. เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์สารเมตาบอไลต์ของสาร bacopaside I ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในพรมมิ
5. เพื่อประเมินความปลอดภัยของสารสกัดพรมมิ โดยศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังในหนูขาว
6. เพื่อเตรียมข้อมูลด้านมาตรฐานการผลิตวัตถุดิบ การผลิตสารสกัด และการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิสู่อุตสาหกรรม

รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย

โครงการศึกษาพัฒนาพรมมิเพื่อใช้เป็นสมุนไพรบำรุงความจำ ซึ่งทางคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติได้ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยดำเนินการมาแล้วเป็นเวลา 3 ปี (ปีงบประมาณ 2548-25 50) ในการศึกษาในระยะที่ 1-3 พบว่าพรมมิ มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความจำและการเรียนรู้ในสัตว์ทดลอง ทั้งสัตว์ที่ปกติ และที่ถูกเหนี่ยวนำให้ความจำเสื่อม โดยวิธีต่างๆ มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์สมอง สารสกัดพรมมิที่ใช้ในการทดลองมีการพัฒนาวิธีการสกัดและการควบคุมคุณภาพ โดยควบคุมปริมาณ saponins หลักที่มีอยู่ 5 ชนิดในพรมมิ โดยใช้วิธีทาง HPLC และ ELISA และ มีการพัฒนายาเม็ดขนาด 300 mg ใด้ยาเม็ดที่มีความคงตัวดี จากผลการ

ทดลองทาง clinic พบว่าการให้ผลิตภัณฑ์พรมมีขนาด 300 และ 600 มก ในอาสาสมัครเป็นเวลา 3 เดือน มีแนวโน้มทำให้อาสาสมัครมีการเรียนรู้และความจำที่ดีขึ้น รวมทั้งไม่พบผลข้างเคียงที่รุนแรงในอาสาสมัคร ผลการทดลองเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่าพรมมีมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อบำรุง ความจำ

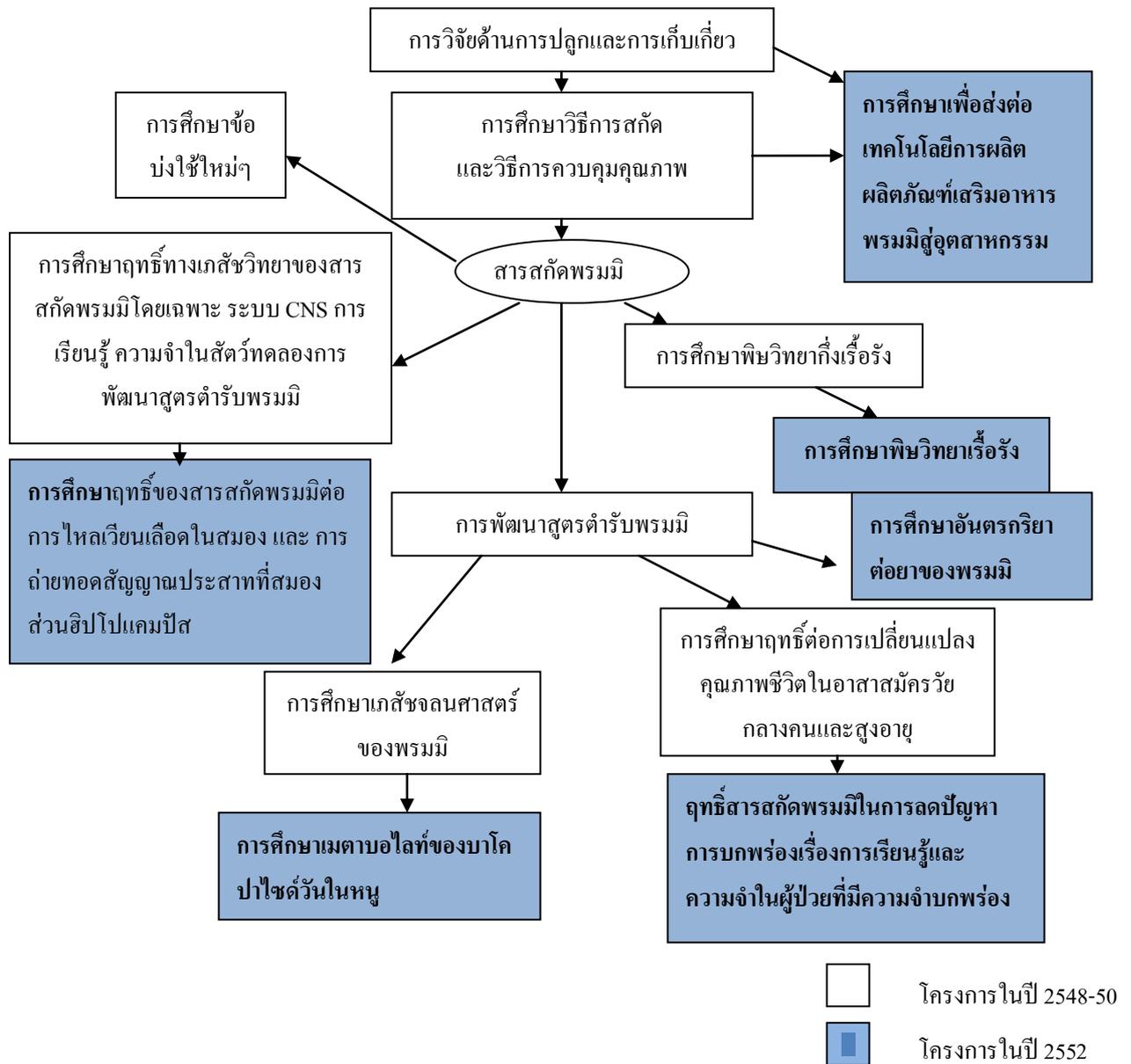
เพื่อให้การพัฒนาสมุนไพรพรมมีไปสู่ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ก่อให้เกิดประโยชน์อย่างกว้างขวาง ในระยะที่ 4 (ปีงบประมาณ 2552) คณะผู้วิจัยจะศึกษาศักยภาพในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วยที่มี ปัญหาจากภาวะสูญเสียความสามารถของสมองเล็กน้อย (Mild Cognitive Impairment หรือ MCI) ซึ่งจะ ทำการศึกษาที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยขอนแก่น ส่วนทางด้านกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมีนั้น จากการวิจัยทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดพรมมีมีฤทธิ์ปกป้องการเสื่อมของ เซลล์ประสาท โดยเพิ่มระดับสารสื่อประสาท acetyl choline โดยลดการทำงานของเอนไซม์ cholineesterase และ choline acetylase และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของพรมมีต่อการไหลเวียนโลหิต ในสมอง ซึ่งอาจเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้พรมมีมีฤทธิ์เพิ่มความจำและการเรียนรู้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงจัดทำโครงการ เพื่อศึกษาผลของพรมมีต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตบนผิวเปลือกสมองในหนูทดลอง และต่อ ระบบหัวใจและหลอดเลือด ตลอดจนได้เสนอโครงการเพื่อศึกษากลไกการเพิ่มการเรียนรู้และความจำโดย ศึกษาผลการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่ซินแนปส์ของเซลล์ประสาทที่เพิ่มขึ้นอย่างยาวนานในหนูแก่ และ ผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับสารสื่อประสาทชนิดรโคเดมิโนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่ เพื่อให้ กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมี เป็นที่ชัดเจนขึ้น

จากการที่ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมี แสดงผลการกระตุ้นความจำและการเรียนรู้ของอาสาสมัคร สุขภาพดี ทำให้มีแนวโน้มว่าจะสามารถนำไปสู่ท้องตลาดได้ ดังนั้น เพื่อให้ข้อมูลแก่ผู้บริโภค ด้านอันตราย ภัยต่อยาของพรมมีจึงมีความสำคัญ คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาผลของสารสกัดพรมมีที่มีต่อเอนไซม์ CytochromeP450 ที่สำคัญต่อการเกิดกระบวนการอันตรกิริยาของยา อันจะส่งผลให้ทำนายผลของสารสกัด พรมมีต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของยาได้ นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาแยกสกัด และพิสูจน์ เอกลักษณ์ของเมตาบอไลต์ของสาร bacopaside I จาก urine และ feces ของสัตว์ทดลองที่ได้รับ bacopaside I ซึ่งการบ่งชี้เมตาบอไลต์ของสาร saponin ในพรมมีนั้น จะเป็นก้าวสำคัญไปสู่การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ ของสารนี้ ในระดับลึก และส่งผลให้สามารถศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารนี้ ในร่างกายได้ด้วย

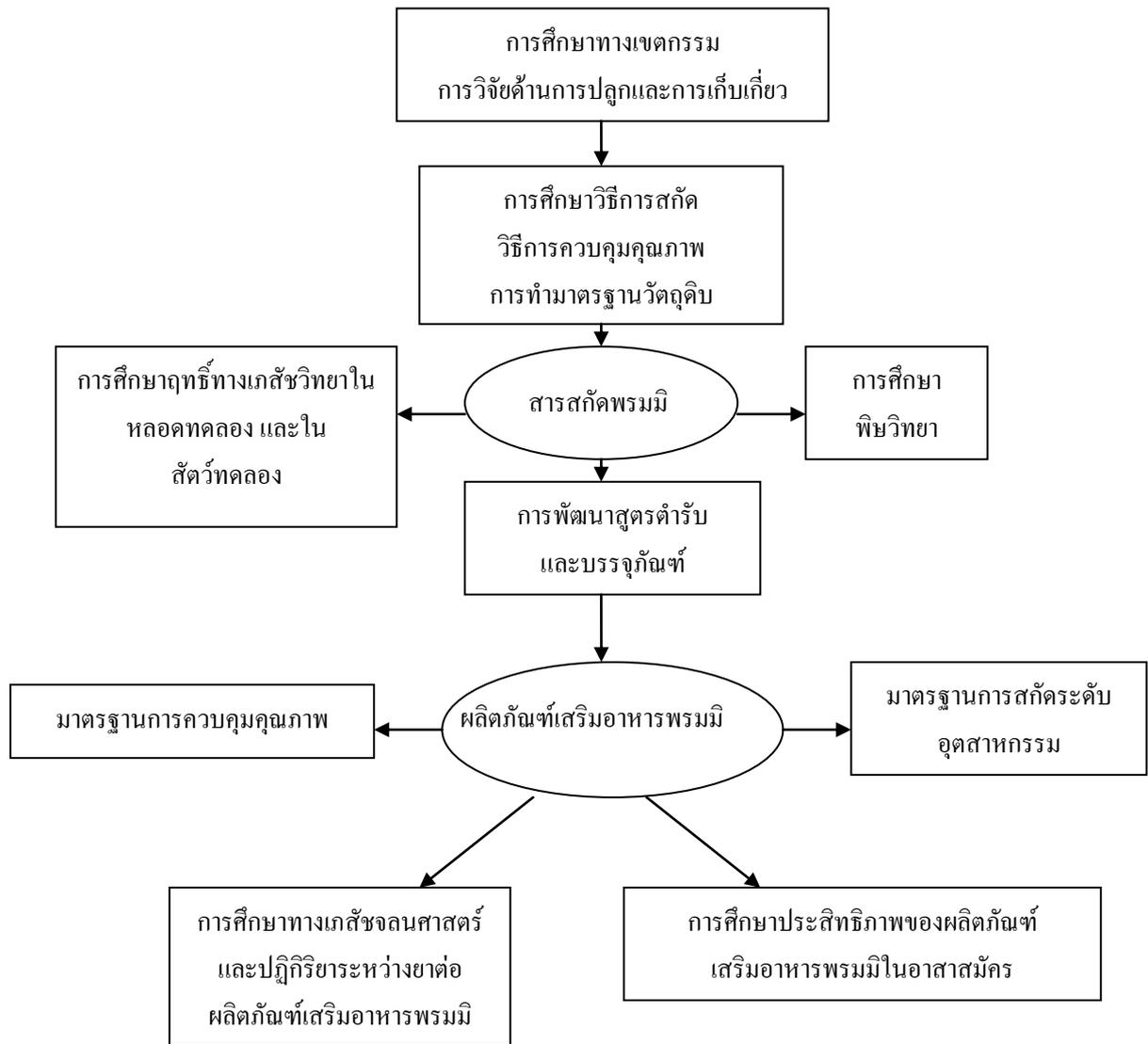
แม้ว่าทางคณะผู้วิจัยได้ทำการวิจัยพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดจากพรมมีมาแล้ว และไม่พบการเกิดพิษ ใดๆ แต่เนื่องจากพรมมีเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่จะต้องรับประทานติดต่อกันเป็นประจำ การศึกษาพิษ เรื้อรังจึงมีความสำคัญ หากพบว่าสมุนไพรไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษทั้งในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน และเรื้อรังเป็นเวลา 9 เดือน แสดงว่าสมุนไพรดังกล่าวในขนาดที่ทำการทดสอบมีความปลอดภัย สามารถนำ สมุนไพรในขนาดที่ทำการทดลองไปปรับใช้ในการทดสอบกับมนุษย์ได้โดยไม่มีข้อจำกัดของเวลา

นอกจากนี้ การศึกษาเพื่อส่งต่อเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิสู่อุตสาหกรรม ก็มีความจำเป็น การศึกษานี้ จะต่อยอดจากการศึกษาระดับห้องปฏิบัติการในเรื่องของการเพาะปลูก ควบคุมคุณภาพ การพัฒนาสารสกัด และการผลิตยาเม็ด โดยจะทำการศึกษาด้านการปลูกพรมมิในระดับอุตสาหกรรม มาตรฐานวัตถุดิบ มาตรฐานสารสกัด และมาตรฐานกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนในการส่งมอบเทคโนโลยีให้แก่ผู้ผลิต

ความสัมพันธ์และความต่อเนื่องของการวิจัยพัฒนาพรมมิเป็นสมุนไพรบำรุงความจำในปี 2548-2550 รวมทั้งโครงการที่กำลังนำเสนอในปี 2552 นี้ สรุปได้ตามแผนภูมิ 1 และ การพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีคุณภาพแสดงไว้ในแผนภูมิ 2



แผนภูมิ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ของการวิจัยพัฒนาพรมมิเป็นสมุนไพรบำรุงความจำในปี 2548-2550 รวมทั้งโครงการที่กำลังนำเสนอในปี 2552 นี้



แผนภูมิ 2 แผนภูมิแสดงการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรพรมมิเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีคุณภาพ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่ใช้ประโยชน์จากผลการวิจัย

1. ได้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมีที่มีข้อมูลการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ทางด้านเคมี ชีวภาพ และทางเภสัชวิทยา พืชวิทยา รวมทั้งมีการวิจัยด้านคลินิก
2. จดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรชุดทดสอบมีความไว ที่เชิงตรง และแม่นยำในการตรวจวัด saponins ในพรมมี
3. ได้ชุดข้อมูล วัตถุประสงค์ กระบวนการผลิต การควบคุมคุณภาพ ประสิทธิภาพ ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมี รวมทั้งอันตรกิริยาที่เกิดกับยาต่างๆ โดยพร้อมจะนำไปสู่การถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ภาคเอกชน
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับฤทธิ์ และ กลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพรพรมมี รวมทั้งข้อมูลด้านเมตาบอลิซึมและอันตรกิริยากับยาสำหรับการศึกษาวิจัยขั้นสูงต่อไป
5. เผยแพร่ผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการ และ /หรือ วารสารนานาชาติและ /วารสารทางวิชาการที่มี peer review
6. พัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ และ พัฒนานิสิตบัณฑิตศึกษาให้มีความรู้ความสามารถด้านการวิจัย



รายงานวิจัย

โครงการย่อยที่ 1

เรื่อง

ฤทธิ์สารสกัดพรมมิในการลดปัญหาการบกพร่องเรื่องการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วย
ที่มีความจำบกพร่อง

**Effect of *Bacopa monnieri* to attenuate memory impairment in cognitive
impairment patient**

โดย

รศ.พญ.พูลศรี รังษิณีจี้

ผศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัฒนธร

ผศ.ดร.สุภาพร มัชฌิมะประ

ผศ.นพ.เทอดไทย ทองอ่อน

รศ.พญ.นวนันท์ ปิยะวัฒน์กุล

รศ.ดร.กรกนก อิงคนินันท์

รศ.ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล

ผศ.พญ.ปณศพร วรรณานนท์

ผศ.ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีงบประมาณ 2552

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ฤทธิ์สารสกัดพรมมิในการลดปัญหาการบกพร่องเรื่องการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วยที่มีความจำบกพร่อง” ได้ด้วยการสนับสนุนทุนวิจัยของสภาวิจัยแห่งชาติ ตลอดจนการสนับสนุนจาก ศูนย์วิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และการสนับสนุนของคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น นอกจากนี้ยังได้รับความอนุเคราะห์ และน้ำใจจากบุคลากร และบุคคลหลายฝ่าย ทั้งเจ้าหน้าที่ฝ่ายสนับสนุนของภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพรและที่สำคัญคือนักศึกษาและบุคลากรใน Neuroscience Laboratory Unit ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และขอขอบคุณ นางสาวภัทราวรรณ เพ็ชรนุ้ย และ นางสาววิภาวี บุญกว้าง ที่ได้ช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณทุกๆท่านที่มีส่วนช่วยเหลือให้งานวิจัยชิ้นนี้ เป็นอย่างดี

คณะผู้วิจัยขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

บทคัดย่อ

พรมมิ หรือ *Bacopa monnieri* เป็นสมุนไพรตัวหนึ่งที่มีศักยภาพค่อนข้างสูง ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งในสัตว์ทดลองและในอาสาสมัครวัยกลางคนและสูงอายุสุขภาพดีพบว่าสารสกัดพรมมิสามารถเพิ่มการเรียนรู้และความจำได้ อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งที่จะหาความชัดเจนในประเด็นดังกล่าว โดยอาสาสมัครจำนวน ๖๐ คนจะถูกแบ่งเป็น ๓ กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับยาหลอก และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 และ 600 มิลลิกรัม อาสาสมัครทุกคนจะได้รับสารเป็นเวลา 3 เดือน อาสาสมัครเหล่านี้จะถูกประเมิน การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งใช้เป็นดัชนีทางอ้อมแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของ acetylcholine ซึ่งมีบทบาทสำคัญเรื่องการเรียนรู้และความจำ ตลอดจนประเมินการเปลี่ยนแปลงของ oxidative stress markers ได้แก่ การทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) และระดับ malondialdehyde (MDA) ใน serum ทุกเดือน เป็นเวลา 3 เดือนและหลังจากหยุดบริโภคสารสกัดพรมมิไปเป็นเวลา 1 เดือน ผลการศึกษาพบว่าอาสาสมัครที่บริโภคสารสกัดจะมี การกุดการทำงาน ของ AChE ตลอดจนเพิ่มการทำงานของ SOD, CAT และ GPx แต่ลดระดับ MDA ใน serum ดังนั้นสารสกัดพรมมิจึงน่าจะออกฤทธิ์เพิ่ม working memory โดยการเพิ่มระดับ ACh และ ลดระดับ oxidative stress ทำให้เพิ่ม working memory ข้อมูลจากการศึกษานี้จึงช่วยยืนยันว่าพรมมิเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อเพิ่มการเรียนรู้และความจำในผู้สูงอายุได้ นอกจากนี้ยังอาจเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มผู้มีความบกพร่องในเรื่องการเรียนรู้และความจำอื่นๆ เช่น mild cognitive impairment อย่างไรก็ตามยังคงต้องการการวิจัยเพิ่มเติมอีกมากในประเด็นดังกล่าวตลอดจนการศึกษาถึง possible active ingredient ที่เป็นตัวออกฤทธิ์ในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำ

Abstract

Bacopa monnieri is one of the potential herbs. Previous data from animal studies and clinical trial study in middle-aged and elderly healthy volunteers showed that *B.monnieri* extract could enhance learning and memory. However, the precise underlying mechanism is still unclearly known. Therefore, this study aimed to clarify the effect of *B.monnieri* on this aspect. Total 60 healthy elderly volunteers were divided into 3 separated groups including placebo, *B.monnieri* at doses of 300 and 600 mg per day. All volunteers had been administered the assigned substances for 3 months. They were evaluated the activity of acetylcholinesterase (AChE) enzyme, the indirect indices indicating the level of ACh and which played the important role in learning and memory. The assessment of serum oxidative markers including sueroxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) and the level of malondialdehyde (MDA) were also performed. All evaluations mentioned earlier were performed after 1, 2 and 3 months of treatment and at 1-month after the treatment cessation.

The results showed that *B.monnieri* treated groups showed the reduction of AChE activity. The enhanced activities of SOD, CAT and GPx and the reduction of MDA were also observed. Therefore, *B.monnieri* might enhance working memory by increasing the level of ACh and by decreasing oxidative stress leading to the increased working memory. The current data support that *B.monnieri* is the potential herb to develop as nutraceutical product in order to enhance learning and memory in elderly. In addition, it may also provide benefit for other types of cognitive impairment such as mild cognitive impairment. However, further researches are still required including the possible active ingredient responsible for the cognitive enhancing effect.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1-ii
บทคัดย่อ(ภาษาไทย)	1-iii
บทคัดย่อ(ภาษาอังกฤษ)	1-iv
สารบัญเรื่อง	1-v
สารบัญตาราง	1-vi
สารบัญรูป	1-ii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	1-viii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	1-7
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	1-12
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	1-19
บรรณานุกรม	1-20

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1-1 ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัคร	1-12
1-2 การเปลี่ยนแปลงของ acetylcholinesterase	1-13

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1-1 แผนภูมิแสดงการดำเนินการวิจัย	1-9
1-2 การเปลี่ยนแปลงระดับ malondialdehyde (MDA) ใน serum	1-14
1-3 การทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ใน serum	1-15
1-4 การทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT) ใน serum	1-16
1-5 การทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ใน serum	1-17

คำอธิบายสัญลักษณ์และตัวย่อ

ACh	acetylcholine
AChE	acetylcholinesterase
GPx	glutathione peroxidase
MDA	malondialdehyde
mg	milligram
ms	millisec
SOD	superoxide dismutase

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันประชากรผู้สูงอายุในประเทศไทยจะมีจำนวนมาก ข้อมูลจากการสำรวจจำนวนประชากรผู้สูงอายุของสำนักงานสถิติแห่งชาติเมื่อปี 2550 รายงานว่ามีจำนวนประชากรผู้สูงอายุถึงร้อยละ 11.6 ของประชากรของประเทศไทย โดยจำนวนประชากรผู้สูงอายุในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะมีสูงถึงร้อยละ 11.8 ซึ่งสูงกว่าค่าเฉลี่ยของประเทศ สถานการณ์การเพิ่มจำนวนประชากรผู้สูงอายุนั้นไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในประเทศไทยแต่ยังเกิดขึ้นทั่วโลก ปัญหาหนึ่งที่เราพบได้มากในผู้สูงอายุคือความจำบกพร่อง โดยเฉพาะกลุ่มอาการสมองเสื่อมซึ่งมีแนวโน้มสูงขึ้นและมีผลกระทบต่อชีวิตอย่างมาก โดยพบว่ามีความชุกสูงถึงร้อยละ 3.04²

ปัญหาหนึ่งที่พบมากในกลุ่มประชากรผู้สูงอายุได้แก่ ปัญหาความจำบกพร่อง โดยจะพบว่าส่วนใหญ่จะมีปัญหาเรื่องกระบวนการใส่รหัส (encoding) ความจำใหม่³ ยิ่งกว่านั้นผู้สูงอายุยังมีปัญหาเรื่องใช้เวลาในการจัดการข้อมูลนานขึ้น การให้ความสนใจและรักษาความสนใจต่อสิ่งเร้าได้ไม่ค่อยดี⁴ โดยความบกพร่องเหล่านี้จะเกิดจากการที่ระบบประสาทส่วนกลางมีการตายของเซลล์ประสาทและการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทและการลดการแตกกิ่งก้านสาขาของเดนไดรต์ตลอดจนการมีจุดประสานลดลง⁵ ทำให้สมองบริเวณ prefrontal cortex ที่เกี่ยวข้องกับการให้ความสนใจต่อสิ่งเร้าและการเรียนรู้⁶ และสมองส่วน hippocampus ซึ่งมีบทบาทเรื่องการเรียนรู้และความจำ⁷ การลดลงของสารสื่อประสาท⁸

ในคนสูงอายุบางคน อาจมีปัญหาด้านความจำมากกว่าคนปกติวัยเดียวกัน แต่ก็ไม่มากถึงกับภาวะสมองเสื่อม เราเรียกภาวะนี้ว่า ภาวะสูญเสียความสามารถของสมองเล็กน้อย (Mild Cognitive Impairment หรือ MCI) ภาวะนี้จะอยู่ตรงกลางระหว่างภาวะสมองเสื่อม (dementia) กับ ภาวะหลงลืมของคนปกติ (normal forgetfulness) แต่ในคนที่ มี MCI ผู้ป่วยจะลืมสิ่งที่ไม่ควรลืม เช่น ลืมวันเวลานัดหมายที่สำคัญ ๆ และจะเกิดขึ้นบ่อย ๆ จนรบกวนการทำงานหรือชีวิตประจำวัน แต่จะไม่สูญเสียหน้าที่การทำงาน การดำเนินชีวิต การตัดสินใจ การใช้เหตุผล เป็นต้น การวินิจฉัยอาจทำได้ยาก ส่วนมากจะทราบข้อมูลได้จากคนข้างเคียงมากกว่าที่จะรู้โดยตัวของผู้ป่วยเอง อย่างไรก็ตามประชากรกลุ่มผู้สูงอายุที่มีปัญหาจากภาวะสูญเสียความสามารถของสมองเล็กน้อย (Mild Cognitive Impairment หรือ MCI) มีความเสี่ยงในการที่จะเกิดเป็นโรคสมองเสื่อมเพิ่มขึ้น มีรายงานว่าประมาณไม่น้อยกว่า 12 % จะมีความก้าวหน้าของโรคต่อไปเป็นโรคความจำเสื่อม (dementia) ดังนั้นการลดความบกพร่องในเรื่องการเรียนรู้และความจำในภาวะ MCI จึงนับเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคสมองเสื่อมซึ่งกำลังกลายเป็นมหันตภัยชนิดหนึ่งในสังคมปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากภาวะดังกล่าวส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ

สืบเนื่องจากการที่ความจำบกพร่องมีผลกระทบอย่างมากต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและครอบครัว และหากมีปัญหารุนแรงมักทำให้เกิดภาวะพึ่งพิงช่วยเหลือตัวเองได้ลดลง ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการพยายาม ป้องกันและลดความรุนแรงในปัญหาดังกล่าว โดยพัฒนาวิธีต่างๆที่จะป้องกันและชะลอความเสื่อมหรือ ความบกพร่องเรื่องการเรียนรู้และความจำในผู้สูงอายุขึ้นมากมาย วิธีหนึ่งที่ได้รับคามนิยมเป็นอย่างมากคือ การบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริม อย่างไรก็ตามในปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่ใช้ในประเทศไทยนั้น มักเป็นผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศทำให้สูญเสียเงินไปต่างประเทศแต่ละปีเป็นมูลค่าไม่น้อย ทั้งที่ประเทศไทยเองมีสมุนไพรที่มีศักยภาพในการป้องกันและเสริมสุขภาพด้านต่างๆรวมทั้งเรื่องเพิ่มการเรียนรู้และความจำ ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อเพิ่มการเรียนรู้และความจำจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรของ ประเทศไม่เพียงแต่จะลดปัญหาด้านสุขภาพของผู้สูงอายุซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่นับวันจะทวีความสำคัญ เพิ่มขึ้น แต่ยังลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจและเป็นโอกาสเพิ่มมูลค่าตลอดจนศักยภาพการแข่งขันของ สมุนไพรอีกด้วย ดังนั้นเพื่อให้สามารถดำเนินการได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีมาตรฐานการศึกษาวิจัยทาง วิทยาศาสตร์เพื่อให้ทราบถึงศักยภาพและกลไกการออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ในมนุษย์เองจึงเป็นเรื่องจำเป็น ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความผิดปกติในเรื่องการเรียนรู้และความจำในภาวะดังกล่าว เกี่ยวข้องกับการทำงานที่บกพร่องของระบบประสาทโคลิเนอร์จิก⁹ นอกจากนี้ยังพบว่าอนุมูลอิสระเองก็ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในภาวะดังกล่าว มีรายงานว่าในภาวะ MCI จะมีระดับอนุมูลอิสระและมีการทำลายโครงสร้างของเซลล์จากอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น¹⁰⁻¹¹ เมื่อเร็วๆนี้ได้มีการพยายามใช้การเปลี่ยนแปลง เรื่องของอนุมูลอิสระโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของ oxidative stress และ nitrosative stress เป็น biomarker แสดงถึงภาวะ MCI และ Alzheimer's disease¹²

พรมมิ (*Bacopa monniera*) เป็นสมุนไพรที่มีการประวัตินิยการใช้ยาวนาน ในการแพทย์อายุรเวทของ อินเดียระบุว่าพรมมิมีสรรพคุณ บำรุงความจำ บำรุงสมอง แก้ไข้ แก้ปวด มีการศึกษาพบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลางและความจำมากมายทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง สารสกัดจากพรมมิมีฤทธิ์ antidepressant¹³ memory enhancing¹⁴ sedative และ antiepileptic จากการศึกษา พบว่า สารสกัดจากพรมมิมีฤทธิ์เกี่ยวข้องกับ cholinergic system โดยลดการทำงานของ choline esterase และ choline acetylase นอกจากนี้ พรมมียังมีฤทธิ์ anti-inflammatory และ antioxidant อีกด้วย การศึกษา ทางคลินิกพบว่าพรมมิช่วยเพิ่มความสามารถในการจำในอาสาสมัครสุขภาพดี เมื่อได้รับพรมมิเป็นเวลา 3 เดือน¹⁵ สารที่มีฤทธิ์ในพรมมิคือสารกลุ่ม saponin ชื่อ bacoside A, B^{16-17,13} อย่างไรก็ตามถึงแม้พรมมิจะเป็นสมุนไพรที่มีการใช้ในการบำรุงสมองและมีฤทธิ์กระตุ้นการเรียนรู้และความจำโดยเฉพาะในคัมภีร์ อายุรเวทของอินเดียมาเป็นเวลานาน และผลงานวิจัยเบื้องต้นของจินตนาภรณ์และคณะ (2551)¹⁸ พบว่าสาร สกัดพรมมิมีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และปกป้องสมองในสัตว์ทดลองได้ดีทั้งในภาวะปกติและในภาวะความจำ บกพร่อง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้ในอาสาสมัครปกติด้วยสูงอายุ (unpublished data) โดยเพิ่มความสามารถในการให้ความสนใจต่อสิ่งเร้าเพิ่มสมาธิของอาสาสมัคร ทำให้ working memory ของ

อาสาสมัครดีขึ้น จากฤทธิ์ของสมุนไพรที่มีสามารเพิ่มประสิทธิภาพของ working memory ในผู้สูงอายุทำให้คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าพรมมิน่าจะมีศักยภาพในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วยที่มีปัญหาจากภาวะสูญเสียความสามารถของสมองเล็กน้อย (Mild Cognitive Impairment หรือ MCI) ได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่พบข้อมูลทั้งเรื่องประสิทธิผลและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมุ่งที่จะศึกษาในประเด็นดังกล่าว

1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เมื่ออายุเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำจะลดลง โดยเชื่อว่าความบกพร่องในเรื่องนี้จะเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทโคลิเนอร์จิกที่ลดลง¹⁹⁻²⁰ มีรายงานว่าระบบประสาทโคลิเนอร์จิกมีบทบาทสำคัญมากทั้งต่อเรื่องการให้ความสนใจต่อสิ่งเร้าและ spatial orientation ความจำเกี่ยวกับตำแหน่งและทิศทาง²¹⁻²⁵ มีรายงานการศึกษาว่าภาวะความจำบกพร่องที่เกิดขึ้นนั้นจะมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับ²⁶ และ choline acetyltransferase โดยพบว่าในผู้ป่วยที่มีความจำบกพร่องจะมีระดับ ACh ลดลงในสมองของผู้ป่วยความจำบกพร่องเช่น ผู้ป่วยโรคสมองเสื่อม และ choline acetyltransferase โดยพบว่าในผู้ป่วยที่มีความจำบกพร่องจะมีระดับ ACh ลดลงในสมองของผู้ป่วยความจำบกพร่องเช่น ผู้ป่วยโรคสมองเสื่อม²⁷⁻²⁹ โดยระดับระดับของ ACh ที่พบในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยจะมีความสัมพันธ์กับ cognitive function ที่ประเมินโดย Mini-mental state examination (MMSE) score และเมื่อเร็วๆนี้ยังพบว่าระดับของเอนไซม์ AChE ในเลือดของผู้ที่มีความจำบกพร่องจะสูงกว่ากลุ่มปกติที่อายุเท่ากัน และยังพบว่าระดับการลดความบกพร่องของความจำมีความสัมพันธ์กับระดับการเพิ่มขึ้นของ AChE³⁰

ปัจจุบันการรักษาโรคสมองเสื่อมจึงนิยมใช้ยาที่ยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase enzyme³¹ ซึ่งทำให้เพิ่มปริมาณของสารสื่อประสาท acetylcholine มีรายงานว่ายาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้ acetylcholine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีบทบาทต่อการเรียนรู้และความจำตัวหนึ่งนั้นสามารถเพิ่มความจำได้ในอาสาสมัครปกติ³²⁻³³ ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการใช้ยาในกลุ่ม cholinesterase inhibitor ในกลุ่ม donepezil, galantamine, rivastigmine เป็น first line pharmacotherapy ของ Alzheimer's disease ในกรณีที่มีความรุนแรงระดับ mild และ moderate³⁴

นอกจากระบบประสาทโคลิเนอร์จิกแล้วระบบประสาทกลุ่มที่ใช้สาร monoamine เป็นสารสื่อประสาทเองก็มีบทบาทสำคัญต่อการเรียนรู้และความจำ³⁵ เมื่ออายุมากขึ้นจะมีประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำจะเสื่อมถอยลง มีรายงานว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวนั้นจะเป็นผลจากการที่มีปริมาณของ norepinephrine และ dopamine ในสมองส่วน prefrontal cortex ลดลงทำให้ attention และ working memory ต่ำลง³⁶

มีรายงานว่า dopamine นั้นจะมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดความจำที่เกี่ยวข้องกับทิศทางหรือ spatial memory³⁷ ในขณะที่สารสื่อประสาท acetylcholine นั้นจะมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับ visual recognition

memory³⁸ และ spatial memory³⁹ นอกจากนั้นยังพบว่ามียารักษาการศึกษาว่าการทำงานของ mesocortical และ frontal catecholaminergic system มีบทบาทต่อกระบวนการของ attention และ working memory⁴⁰ โดยผู้ที่มียาหรือ attention มักมีระดับ norepinephrine และ metabolite คือ MHPG ต่ำ⁴¹

การศึกษาที่ผ่านมาเมื่อเร็วๆ นี้รายงานว่าในภาวะความจำบกพร่องเช่นใน mild cognitive impairment หรือ Alzheimer's disease จะมี oxidative stress เพิ่มขึ้นโดยจะมี activity ของ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ลดลงแต่มีปริมาณ malondialdehyde (MDA) เพิ่มขึ้น⁴²⁻⁴³

เมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระมีศักยภาพในการทำให้การเรียนรู้และความจำในทั้งในภาวะปกติ⁴⁴ และในภาวะสมองเสื่อม และโรคหลอดเลือดสมอง ดีขึ้น ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาถึงผลของสาร flavonoid ที่พบในผักผลไม้ทั่วไปว่า มีศักยภาพในการลดการตายของเซลล์ประสาทโดยการลดปริมาณอนุมูลอิสระและลดปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์⁴⁵

ปัจจุบันประชากรผู้สูงอายุในประเทศไทยจะมีจำนวนมาก ข้อมูลจากการสำรวจจำนวนประชากรผู้สูงอายุของสำนักงานสถิติแห่งชาติเมื่อปี 2550 รายงานว่ามีจำนวนประชากรผู้สูงอายุถึงร้อยละ 11.6 ของประชากรของประเทศไทย โดยจำนวนประชากรผู้สูงอายุในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะมีสูงถึงร้อยละ 11.8 ซึ่งสูงกว่าค่าเฉลี่ยของประเทศ¹ สถานการณ์การเพิ่มจำนวนประชากรผู้สูงอายุนั้น ไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในประเทศไทยแต่ยังเกิดขึ้นทั่วโลก ปัญหาหนึ่งที่พบได้มากในผู้สูงอายุคือความจำบกพร่อง โดยจะพบว่าส่วนใหญ่จะมีปัญหาเรื่องกระบวนการใส่รหัส (encoding) ความจำใหม่ๆ³ ยิ่งกว่านั้นผู้สูงอายุยังมีปัญหาเรื่องใช้เวลาในการจัดการข้อมูลนานขึ้น การให้ความสนใจและรักษาความสนใจต่อสิ่งเร้าได้ไม่ค่อยดี⁴ โดยความบกพร่องเหล่านี้จะเกิดจากการที่ระบบประสาทส่วนกลางมีการตายของเซลล์ประสาทและการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทและการลดการแตกกิ่งก้านสาขาของเดนไดรต์ตลอดจนการมีจุดประสานลดลง⁵ ทำให้สมองบริเวณ prefrontal cortex ที่เกี่ยวข้องกับการให้ความสนใจต่อสิ่งเร้าและการเรียนรู้⁶ และสมองส่วน hippocampus ซึ่งมีบทบาทเรื่องการเรียนรู้และความจำฝ่อลง⁷ การลดลงของสารสื่อประสาท⁸

ในคนสูงอายุบางคน อาจมีปัญหาด้านความจำมากกว่าคนปกติด้วยเช่นกัน แต่ก็ไม่มากถึงกับภาวะสมองเสื่อม เราเรียกภาวะนี้ว่า ภาวะสูญเสียความสามารถของสมองเล็กน้อย (Mild Cognitive Impairment หรือ MCI) ภาวะนี้จะอยู่ตรงกลางระหว่างภาวะสมองเสื่อม (dementia) กับ ภาวะหลงลืมของคนปกติ (normal forgetfulness) แต่ในคนที่ MCI ผู้ป่วยจะลืมสิ่งที่ไม่ควรลืม เช่น ลืมวันเวลานัดหมายที่สำคัญๆ และจะเกิดขึ้นบ่อยๆ จนรบกวนการทำงานหรือชีวิตประจำวัน แต่จะไม่สูญเสียหน้าที่การทำงาน การดำเนินชีวิต การตัดสินใจ การใช้เหตุผล เป็นต้น การวินิจฉัยอาจทำได้ยาก ส่วนมากจะทราบข้อมูลได้จากคนข้างเคียงมากกว่าที่จะรู้โดยตัวของผู้ป่วยเอง อย่างไรก็ตามประชากรกลุ่มผู้สูงอายุที่มีปัญหาจากภาวะสูญเสียความสามารถของสมองเล็กน้อย (Mild Cognitive Impairment หรือ MCI) มีความเสี่ยงในการที่จะเกิดเป็นโรคสมองเสื่อมเพิ่มขึ้น มีรายงานว่าประมาณไม่น้อยกว่า 12% จะมีความก้าวหน้าของโรคต่อไปเป็นโรคความจำเสื่อม (dementia) ดังนั้นการลดความบกพร่องในเรื่องการเรียนรู้และความจำในภาวะ MCI จึง

นับเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดอุบัติการณ์ของโรคสมองเสื่อมซึ่งกำลังกลายเป็นมหันตภัยชนิดหนึ่งในสังคมปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากภาวะดังกล่าวส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ

พรมมิ (*Bacopa monniera*) เป็นสมุนไพรที่มีการประวัตินิยามมานาน ในการแพทย์อายุรเวทของอินเดียระบุว่าพรมมิมีสรรพคุณ บำรุงความจำ บำรุงสมอง แก้ไข้ แก้ปวด มีการศึกษาพบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลางและความจำมากมายทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง สารสกัดจากพรมมิมิฤทธิ์ antidepressant¹³ memory enhancing¹⁴ sedative และ antiepileptic จากการศึกษาพบว่า สารสกัดจากพรมมิมิฤทธิ์เกี่ยวข้องกับ cholinergic system โดยลดการทำงานของ choline esterase และ choline acetylase นอกจากนี้ พรมมิมิยังมีฤทธิ์ anti-inflammatory และ antioxidant อีกด้วย การศึกษาทางคลินิกว่าพรมมิช่วยเพิ่มความสามารถในการจำในอาสาสมัครสุขภาพดี เมื่อได้รับพรมมิเป็นเวลา 3 เดือน¹⁵ สารที่มีฤทธิ์ในพรมมิคือสารกลุ่ม saponin ชื่อ bacoside A, B^{16-17,13} อย่างไรก็ตามถึงแม้พรมมิจะเป็นสมุนไพรที่มีการใช้ในการบำรุงสมองและมีฤทธิ์กระตุ้นการเรียนรู้และความจำโดยเฉพาะในคัมภีร์อายุรเวทของอินเดียมาเป็นเวลานาน และผลงานวิจัยเบื้องต้นของจินตนาภรณ์และคณะ (2551)¹⁸ พบว่าสารสกัดพรมมิมิฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และปกป้องสมองในสัตว์ทดลองได้ดีทั้งในภาวะปกติและในภาวะความจำบกพร่อง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้ในอาสาสมัครปกติวัยสูงอายุ (unpublished data) โดยเพิ่มความสามารถในการให้ความสนใจต่อสิ่งเร้า เพิ่มสมาธิของอาสาสมัคร ทำให้ working memory ของอาสาสมัครดีขึ้น จากฤทธิ์ของสมุนไพรพรมมิที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของ working memory ในผู้สูงอายุทำให้คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าพรมมิน่าจะมีศักยภาพในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วยที่มีปัญหาจากภาวะสูญเสียความสามารถของสมองเล็กน้อย (Mild Cognitive Impairment หรือ MCI) ได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่พบข้อมูลทั้งเรื่องประสิทธิผลและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมุ่งที่จะศึกษาในประเด็นดังกล่าว

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกของผลิตภัณฑ์สารสกัดพรมมิในการลดความบกพร่องการเรียนรู้และความจำของอาสาสมัครปกติและผู้ป่วยความจำบกพร่องเล็กน้อย

1.4 ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual Framework) ของโครงการวิจัย

สารสกัดพรมมิสามารถเพิ่มความสามารถในการให้ความสนใจต่อสิ่งเร้า เพิ่มสมาธิและเพิ่ม working memory ในผู้สูงอายุที่มีสุขภาพปกติได้ดี และข้อมูลจากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสามารถทำให้ระบบประสาทโคลิเนอร์จิก และระบบต้านอนุมูลอิสระทำงานดีขึ้น ดังนั้นจึงน่าจะมีศักยภาพในการลดความบกพร่องในภาวะความจำบกพร่องเล็กน้อย โดยกลไกการออกฤทธิ์น่าจะเกี่ยวข้องผ่านปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งหรือหลายปัจจัยซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการดังกล่าวดังต่อไปนี้ การเปลี่ยนแปลงการ

ทำงานของระบบประสาทโคลิเนอร์จิก การทำงานระบบด้านอนุมูลอิสระ การทำงานของระบบ monoamine system

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป
กลุ่มเป้าหมาย.กระทรวงอุตสาหกรรม ภาคธุรกิจ องค์กรอาหารและยา
- บริการความรู้แก่ประชาชน
กลุ่มเป้าหมาย..ประชาชนผู้สนใจทั่วไป
- บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ
กลุ่มเป้าหมาย.ผู้ผลิตด้านอุตสาหกรรมอาหาร
- นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์
กลุ่มเป้าหมาย.ผู้ผลิตด้านอุตสาหกรรมอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม องค์กรอาหาร
และยา
- เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย
กลุ่มเป้าหมายกลุ่มผู้สูงอายุ ผู้ดูแลผู้สูงอายุ และครอบครัวผู้สูงอายุ

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 ผลลัพธ์ที่คาดหวัง

ผลลัพธ์ที่คาดหวังและ placebo ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับการเตรียมและควบคุมคุณภาพโดย รศ.กรรณก อิงคนินันท์และรศ.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีกุล คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2.2 แผนการศึกษา

2.2.1 การศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิในอาสาสมัครปกติ

2.2.1.1 กลุ่มตัวอย่าง

อาสาสมัครสุขภาพปกติอายุตั้งแต่ 55-70 ปีในชุมชนภาคอีสาน จำนวน 45 คน โดยมีลักษณะดังนี้ ไม่มีโรคประจำตัวทางกายที่รุนแรง เช่น เบาหวาน ความดันเลือดสูง โรคหัวใจ โรคปอดหรือภูมิแพ้ และไม่มี ความผิดปกติทางจิต , ไม่ได้รับยาใดๆหรือยาสมุนไพรประเภทอื่นในระหว่างการทดลองและก่อนการ ทดลองไม่น้อยกว่า 1 เดือน, ไม่สูบบุหรี่มากกว่า 10 มวนต่อวัน, วันทำการทดสอบต้องไม่ดื่ม ชา กาแฟ มา ก่อน และต้องไม่ดื่มสุรามาอย่างน้อย 12 ชั่วโมงก่อนทำการทดสอบ มีสุขภาพปกติ

2.2.1.2 แผนการทดลอง

จะเก็บเลือดของอาสาสมัครปกติไว้เพื่อตรวจประเมินการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE), monoamine oxidase (MAO) ทั้ง MAO A และ MAO B และประเมินภาวะ oxidative stress damage โดยใช้ malondialdehyde level เป็นดัชนี และประเมินการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) หลังจากนั้นจะเก็บเลือด อาสาสมัครมาประเมินการเปลี่ยนแปลงดัชนีที่กล่าวข้างต้นหลังบริโภคพรมมิไป 1, 2 และ 3 เดือน และหลัง หยุดบริโภคไป 1 เดือน

2.2.2 การศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิในการลดความบกพร่องการเรียนรู้และ ความจำของผู้ป่วยความจำบกพร่องเล็กน้อย

เป็นการวิจัยแบบ double-blinded randomized control study

2.2.2.1 กลุ่มตัวอย่าง

Inclusion Criteria

1. ชาย/ หญิง ที่มีอายุระหว่าง 50-65 ปี ผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจที่คลินิกจิตเวช โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น
2. มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวใดๆทั้งทางร่างกายและจิตใจ
3. มีค่า MoCA Test น้อยกว่า 26 คะแนน จาก 30 คะแนน ซึ่งบ่งบอกว่า เป็นผู้ที่มีความบกพร่องทางด้านพุทธิปัญญา
4. มีค่าคะแนน TMSE ระหว่าง 23 - 26 จากคะแนนเต็ม 30

Exclusion Criteria

1. ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น โรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease)

อาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัย จะได้รับการอธิบายสำหรับการปฏิบัติตัวในการวิจัยอย่างละเอียด และลงนามยินยอมเข้าร่วมการวิจัยทุกคน หลังจากนั้นอาสาสมัครจะถูกสุ่มแบ่งแบบปิด (double- blinded randomized control) ออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่ม ที่ได้รับยาหลอก และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิ ขนาด 300 mg และกลุ่มที่ได้รับยา Donepezil 5 mg อาสาสมัครที่เข้าร่วมจะได้รับการตรวจวัดค่าตัวแปรที่เกี่ยวกับความจำและการเรียนรู้ดังนี้

1. MoCA-Thai (Montreal Cognitive Assessment test) ฉบับภาษาไทย ใช้เวลาในการทดสอบและแปลผลประมาณ 30 นาที
2. ADULT-ADHD screening test ใช้ตรวจเพื่อประเมินภาวะสมาธิสั้น ใช้เวลาทดสอบและแปลผลประมาณ 20 นาที
3. SCL-90 (Symptom Checklist-90 i times) ใช้ตรวจเพื่อประเมินอาการทางจิตใจ (อาการวิตกกังวลเศร้า) ใช้เวลาทดสอบและแปลผลประมาณ 20 นาที

ทั้ง 2 กลุ่มได้รับยาประมาณ 12 สัปดาห์ ตั้งแต่ ณ วันแรกของการเข้าร่วม (visit 1), สัปดาห์ที่ 4 (visit 2), สัปดาห์ที่ 12 (visit 3) หลังจากสัปดาห์ที่ 12 จะไม่ได้รับยา และอาสาสมัครจะต้องกลับมาตรวจวัดค่าคะแนนต่างๆใหม่ในสัปดาห์ที่ 16 (visit 4) เป็นสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง ซึ่งสามารถสรุป ได้ดังแผนภูมิด้านล่าง

Inclusion Criteria

1. ชาย/ หญิง ที่มีอายุระหว่าง 50-65 ปี ผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจที่คลินิกจิตเวช โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จังหวัดขอนแก่น
2. มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวใดๆทั้งทางร่างกายและจิตใจ

- มีค่า MoCA Test น้อยกว่า 26 คะแนน จาก 30 คะแนน ซึ่งบ่งบอกว่า เป็นผู้ที่มีความบกพร่องทางด้านพุทธิปัญญา

Exclusion Criteria

- ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น โรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease)
- ค่า MoCA test มากกว่า 26 คะแนน จาก 30 คะแนน

อาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัย จะได้รับการอธิบายสำหรับการปฏิบัติตัวในการวิจัยอย่างละเอียด และลงนามยินยอมเข้าร่วมการวิจัยทุกคน หลังจากนั้นอาสาสมัครจะถูกสุ่มแบ่งแบบปิด (double blind randomize control) ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม ที่ได้รับยาหลอก และ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิ อาสาสมัครที่เข้าร่วม จะได้รับการตรวจวัดค่าตัวแปรที่เกี่ยวกับความจำและการเรียนรู้ดังนี้

1. แบบประเมินสมรรถภาพทางสมองของไทย (Thai Mental State Examination: TMSE) ใช้เวลาในการทดสอบและแปลผลประมาณ 30 นาที

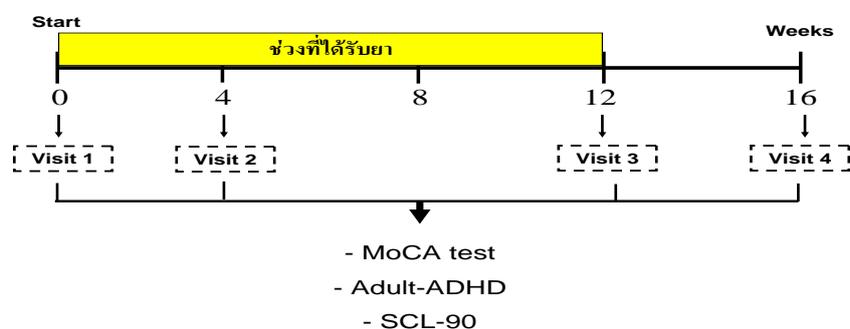
2. MoCA-Thai (Montreal Cognitive Assessment test) ฉบับภาษาไทย ใช้เวลาในการทดสอบและแปลผลประมาณ 30 นาที

3. ADULT-ADHD screening test ใช้ตรวจเพื่อประเมินภาวะสมาธิสั้น ใช้เวลาทดสอบและแปลผลประมาณ 20 นาที

4. SCL-90 (Symptom Checklist-90 items) ใช้ตรวจเพื่อประเมินอาการทางจิตใจ ใช้เวลาทดสอบและแปลผลประมาณ 20 นาที

ทั้ง 3 กลุ่มได้รับยานาน 12 สัปดาห์ ตั้งแต่ วันแรกของการเข้าร่วม (visit 1), สัปดาห์ที่ 4 (visit 2), สัปดาห์ที่ 12 (visit 3) หลังจากสัปดาห์ที่ 12 จะไม่ได้รับยา แต่อาสาสมัครจะต้องกลับมาตรวจวัดค่าคะแนนต่างๆ ในสัปดาห์ที่ 16 (visit 4) เป็นสัปดาห์สุดท้ายของการศึกษา

สรุปเป็นแผนภูมิดังนี้



รูปที่ 1-1 แผนภูมิแสดงการดำเนินการวิจัยในอาสาสมัครที่เข้าร่วมการศึกษาฤทธิ์สารสกัดพรมมิในการลดปัญหาการบกพร่องเรื่องการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วยที่มีความจำบกพร่อง

ในแต่ละครั้งที่อาสาสมัครมาติดตามการศึกษาจะถูก ตรวจสอบประเมินระดับ activity ของ acetylcholinesterase enzyme, ระดับ scavenger enzymes activity, lipid peroxidation และระดับ monoamine oxidase

เพื่อเป็นการเฝ้าระวังผู้ป่วย ผู้ป่วยจะได้รับการตรวจ clinical chemistry profile ประกอบด้วย ระดับน้ำตาล ไขมัน liver function test BUN และ creatinine และ cortisol ใน plasma และ ตรวจประเมินด้าน โภชนาวิทยา อื่นๆ

2.3 การตรวจประเมินการเปลี่ยนแปลง biomarkers

2.3.1 การประเมินเอนไซม์ acetylcholinesterase

จะประเมินปริมาณ acetylcholinesterase ในเลือดหลังจากที่ได้รับเลือดนำเลือดไปปั่นนาน 10 นาที ความเร็ว 5000xg ทำการเจือจางด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 8 นำ plasma 10 ไมโครลิตรลงใน plate ใส่ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตรใส่ dithiobisnitrobenzoate (DTNB) 0.01M จำนวน 20 ไมโครลิตรทิ้งไว้ 5 นาทีเพื่อรอปฏิกิริยาเติม acetylthiocholine iodide (ATChI) 0.075M จำนวน 10 ไมโครลิตรแล้วนำไปวัดที่ 412 นาโนเมตร⁴⁶

2.3.2 การประเมินระดับ monoamine oxidase

นำ plasma เจือจาง sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and ปั่นที่ 15,000xg นาน 20 นาที หลังจากนั้นนำส่วนที่ใส Supernatant ใช้วัด MAO โดยเติม Tris buffer (0.1 M, pH 7.4) จำนวน 2.75 มิลลิลิตร เติม 4 mM 5-hydroxytryptamine จำนวน 100 ไมโครลิตรปั่นให้เข้ากันทำการวัด of were mixed in spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร 5 นาที⁴⁷

2.3.3 การประเมินระดับ malondialdehyde (MDA) และการทำงานของ scavenger enzymes

วิธีการวัด MDA โดยการนำ plasma ใส่หลอดแก้ว เติม 10% TCA (Trichloroacetic Acid) จำนวน 125 ไมโครลิตร, 8% SDS (Sodium dodecyl sulfate) 200 ไมโครลิตร, 5Mm EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), โดยมี TEP (1, 1, 3, 3-tetramethoxy propane) ใช้เตรียม standard ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที เติม 0.6% TBA (thiobarbituric acid). นำไปต้มนาน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสนาน 30 นาทีทิ้งไว้ให้เย็นนำไปปั่นปล่อยให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรความเร็ว 4,000xg นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวัดที่ ความยาวแสง 532 นาโนเมตร⁴⁸

2.3.4 วิธีการวัด catalase

นำ plasma หรือ standard ใน plate ทำการใส่ hydrogen peroxide 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที ใส่กรดซัลฟูริก 25 ไมโครลิตรใส่ โปแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต 100 ไมโครลิตร ทำการวัด ที่ 515 นาโนเมตร⁴⁹

2.3.5 วิธีการวัด superoxide dismutase

ใส่ plasma หรือ standard ใน plate หลังจากเตรียมสารตามข้างต้นแล้วนำมาผสมกันดังนี้ 50 mM potassium phosphate, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.01 mM cytochrome C, 0.05 mM xanthineใส่ใน plate 200 μ l ใส่ xanthine oxidase 20 ไมโครลิตร นำไปวัดที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร⁵⁰

2.3.6 วิธีการวัด GPx

ใส่ plasma หรือ standard ใน plate ใส่สารประกอบด้วย 48 mM sodium phosphate, 0.38 mM EDTA, 0.12 mM β -NADPH, 0.95 mM sodium azide, 3.2 units of glutathione reductase, 1 mM glutathione (GSH), 0.02 mM DL-dithiothreitol, 0.0007% H_2O_2 จำนวน 200 μ l นำไปวัดที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร⁵¹

2.4 Statistical analysis

การวิเคราะห์ผลการวิจัยจากการเปลี่ยนแปลง ค่าเฉลี่ย (Mean) ของ MoCA Thai และ TMSE ระดับนัยสำคัญทางสถิติจะรายงานเมื่อมีค่า $P < 0.05$

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของ biomarkers จะวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างก่อนและหลังรับประทาน โดยใช้ student pair t-test แบบ two-tailed ที่ $P\text{-value} < 0.05$

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากตารางที่ 1-1 จะเห็นว่าไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเรื่องข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม ไม่ว่าจะเป็นอายุ ระดับการศึกษา IQ ดังแสดงในตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ (N=20)

ข้อมูลพื้นฐาน	Pre-dose baseline value
Age (years)	59.12±7.37
Education(years)	7.27±4.14
Full scale IQ	94.95±9.22
Blood sugar (mg/dl)	90.18±11.31
Blood pressure (mmHg)	119.97±8.94 / 80.45±4.34

3.1 การเปลี่ยนแปลง biomarkers ของอาสาสมัครปกติ

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ acetylcholinesterase(AChE) ดังแสดงในตารางที่ 1-1 พบว่าอาสาสมัครกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 มิลลิกรัมจะมีการทำงานของเอนไซม์ AChE ลดลงหลังบริโภคไป 1 เดือน (p-value<.05 เทียบกับbaseline) และเมื่อยังบริโภคนานขึ้นเป็น 2 และ 3 เดือน ก็จะพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวชัดเจนมากขึ้น (p-value<.001 เทียบกับbaseline) และถึงแม้หยุดบริโภคไป 1 เดือนแล้วก็ยังพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว (p-value<.05 เทียบกับbaseline) การลดลงของการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในเดือนที่ 2 และ 3 จะลดลงมากกว่าในเดือนที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ (p-value<.001 ทั้งหมดเทียบกับbaseline) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการบริโภคสารสกัดขนาดดังกล่าวไป 2 และ 3 เดือน

นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวระหว่างกลุ่มที่ได้รับ placebo และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิ จะพบว่าอาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 มิลลิกรัมจะมีการทำงานของเอนไซม์ AChE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดดังกล่าวข้างต้นไปเป็นเวลา 1 เดือน (p-value<.01 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ placebo) เมื่อเพิ่มระยะเวลาการบริโภคเป็น 2 และ 3 เดือนก็ยังพบการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญ (p-value<.001 ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ placebo) แม้หยุดบริโภคไป 1 เดือนก็ยังพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว(p-value<.01 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ placebo) ในอาสาสมัครกลุ่ม

ที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 600 มิลลิกรัมก็พบการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกัน แต่จะพบการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญเพียงหลังบริโภคไป 1, 3 เดือนและหลังหยุดบริโภคไป 1 เดือน (p-value<.01, 05 และ .01 ตามลำดับเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ placebo)

ตารางที่ 1-2 แสดงการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ acetylcholinesterase (AChE)ของอาสาสมัครที่ได้รับ placebo และอาสาสมัครปกติที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 และ 600 มิลลิกรัม (n=20 กลุ่ม)

Dose/time		Baseline	1- month	2- month	3- month	Delay
AChE (umol/min. g.protein)	Placebo	21.31±4.70	23.88±4.32	21.22±3.48	21.77±3.39	23.15±4.04 F(0.0500,4,95) = 1.7499 P = 0.1455
	300mg	22.47±4.81	19.82±3.16 [#]	14.31±2.52 ^{###@@@ddd}	15.87±3.28 ^{###@@@dd}	19.73±3.01 [#] F(0.0500,4,95) = 18.2771 p = 3.647E-011
	600mg	20.77±3.96	19.16±2.58	19.62±3.32	19.50±3.60	19.67±2.83 F(0.0500,4,95) = 0.6844 P = 0.6044
Dose/time		Baseline	1- month	2- month	3- month	Delay
AChE (umol/min. g.protein)	Placebo	21.31±4.70	23.88±4.32	21.21±3.48	21.77±3.39	23.15±4.04
	300mg	22.47±4.81	19.82±3.16 ^{**}	14.31±2.52 ^{***}	15.87±3.28 ^{***}	19.73±3.01 ^{**}
	600mg	20.77±3.96 F(0.0500,2,57) = 0.7371 P = 0.4830	19.16±2.58 ^{**} F(0.0500,2,57) = 11.1355 P = 8.273E-005	19.62±3.32 ^{!!!} F(0.0500,2,57) = 26.5942 P = 6.943E-009	19.498±3.60 ^{!!!} F(0.0500,2,57) = 15.1186 P = 5.401E-006	19.669±2.83 ^{**} F(0.0500,2,57) = 7.1453 P = 0.0017

= p-value <0.05 เปรียบเทียบกับ baseline, ## = p-value <0.01เปรียบเทียบกับ baseline, ### = p-value <0.001 เปรียบเทียบกับ baseline

* = p-value <0.05 เปรียบเทียบกับplacebo, ** = p-value <0.01เปรียบเทียบกับplacebo, *** = p-value <0.001 เปรียบเทียบกับ placebo

@ = p-value <0.05 เปรียบเทียบกับ1-month., @@ = p-value <0.01เปรียบเทียบกับ1-month, @@@ = p-value <0.001 เปรียบเทียบกับ1-month.

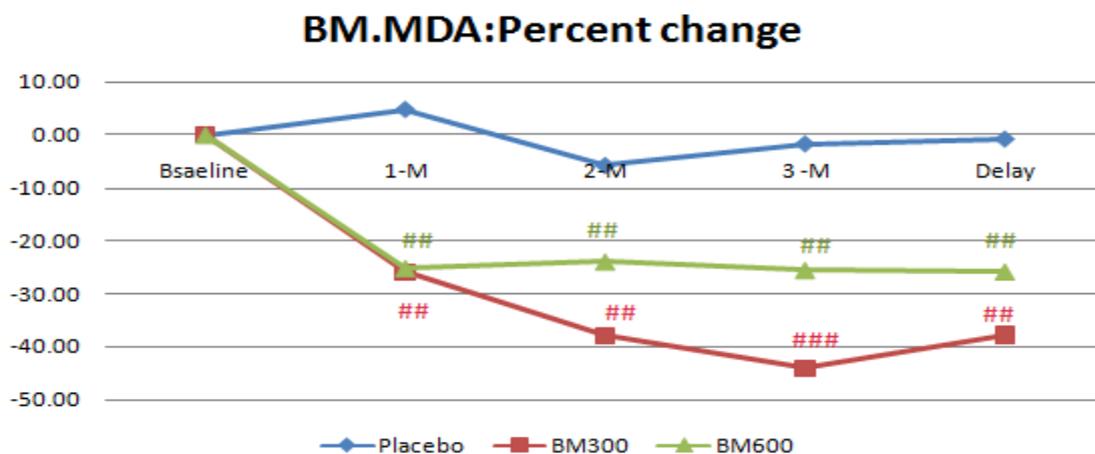
b = p-value <0.05 เปรียบเทียบกับ2-month., bb = p-value <0.01เปรียบเทียบกับ2-month, bbb = p-value <0.001 เปรียบเทียบกับ2-month.

! = p-value <0.05 เปรียบเทียบกับdose 300 mg, !! = p-value <0.01เปรียบเทียบกับdose 300 mg, !!! = p-value <0.001 เปรียบเทียบกับdose 300 mg

d = p-value <0.05 เปรียบเทียบกับ delay dose, dd= p-value <0.01เปรียบเทียบกับ delay dose, ddd = p-value <0.001 เปรียบเทียบกับ delay dose

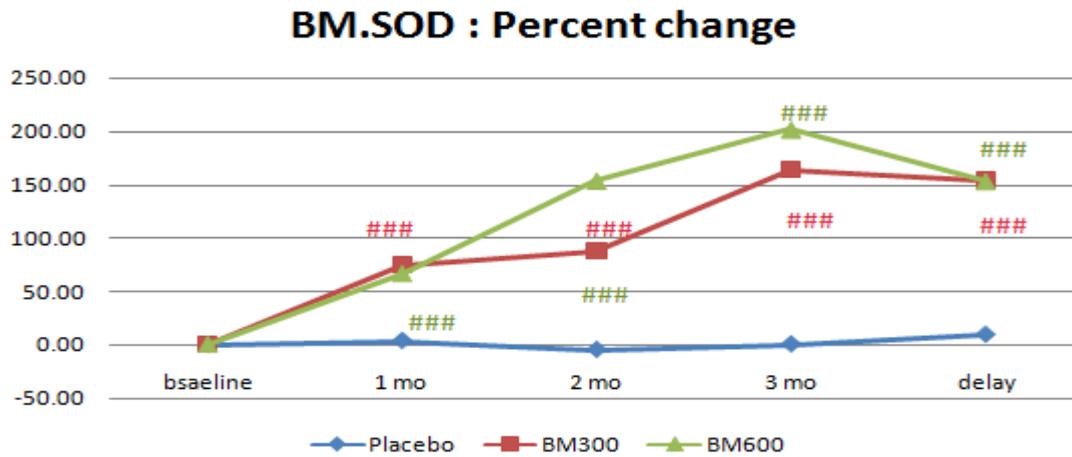
คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ oxidative stress markers ได้แก่การเปลี่ยนแปลงของระดับ malondialdehyde (MDA), การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ดังแสดงในรูปที่ 1-2 ถึง 1-5

จากรูปที่ 1-2 จะเห็นว่าอาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 และ 600 มิลลิกรัมจะมีระดับ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่หลังบริโภคได้ 1 เดือน (p-value<.01 ทั้งหมดเทียบกับ baseline) เมื่อเพิ่มระยะเวลาการบริโภคเป็น 2, 3 เดือน และ หลังหยุดบริโภคไป 1 เดือน ก็ยังพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว (เดือนที่ 2: p-value<.01 ทั้งหมดเทียบกับ baseline; เดือนที่ 3: p-value<.001 และ .01 ตามลำดับ เทียบกับ baseline; delay: p-value<.01 ทั้งหมดเทียบกับ baseline)



รูปที่ 1-2 การเปลี่ยนแปลงระดับ malondialdehyde (MDA) ในพลาสมาของอาสาสมัครปกติที่ได้รับ placebo และอาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 และ 600 มิลลิกรัม (n=20 กลุ่ม), ## = p-value <0.01เปรียบเทียบกับ baseline, ### = p-value <0.001 เปรียบเทียบกับ baseline

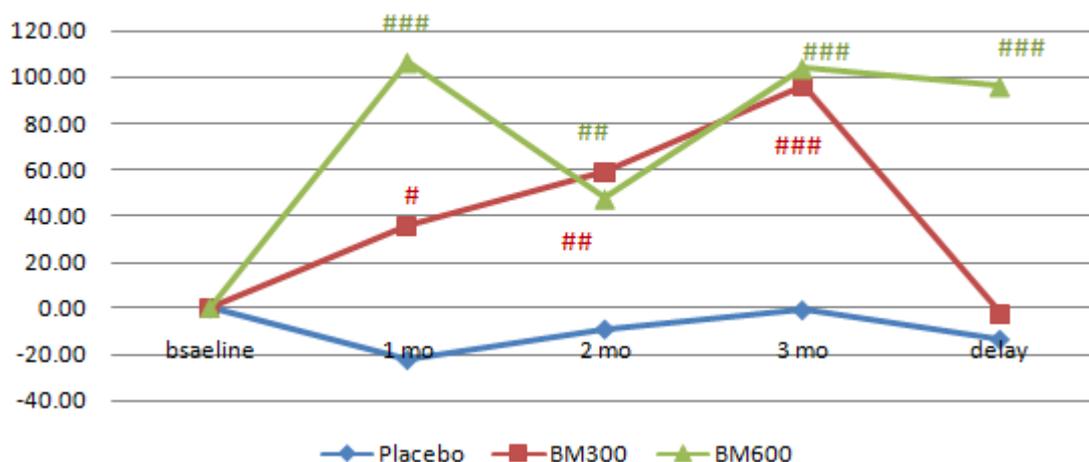
จากรูปที่ 1-3 จะเห็นว่าอาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิทั้งสองขนาดจะมีความทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase เพิ่มขึ้นตั้งแต่หลังบริโภคไปได้ 1 เดือนและยังคงพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไปตลอดระยะเวลาการทดลอง



รูปที่ 1-3 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในพลาสมาของอาสาสมัครปกติที่ได้รับ placebo และอาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 และ 600 มิลลิกรัม (n=20 กลุ่ม) ### = p-value < 0.001 เปรียบเทียบกับ baseline

จากรูปที่ 1-4 จะพบว่าอาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 มิลลิกรัมไป 1, 2 และ 3 เดือนจะมีความทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < .05, .01 และ .001 ตามลำดับเทียบกับ baseline) แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะหายไปหลังหยุดบริโภคสารสกัดไป 1 เดือน ในขณะที่อาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 600 มิลลิกรัมจะมีความทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นตั้งแต่บริโภคไป 1 เดือนและการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังคงพบที่ 2, 3 เดือนและแม้ในภายหลังจากหยุดบริโภคไป 1 เดือน (p-value < .001, .01, .001 และ .001 ตามลำดับเทียบกับ baseline)

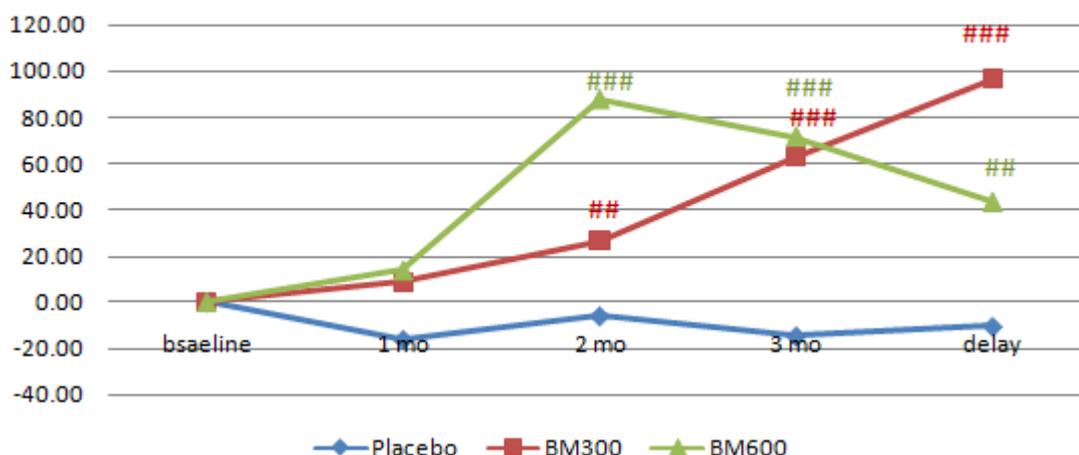
BM.Catalase : Percent change



รูปที่ 1-4 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT) ในพลาสมาของอาสาสมัครปกติที่ได้รับ placebo และอาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 และ 600 มิลลิกรัม (n=20 กลุ่ม) # = p-value <0.05เปรียบเทียบกับ baseline, ## = p-value <0.01เปรียบเทียบกับ baseline, ### = p-value <0.001 เปรียบเทียบกับ baseline

นอกจากนั้นยังพบว่าอาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 มิลลิกรัมจะมีการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase เพิ่มขึ้นและจะเห็นการเปลี่ยนแปลงที่มีนัยสำคัญเมื่อบริโภคไปได้ 2, 3 เดือนและหลังหยุดบริโภคไปได้ 1 เดือน (p-value<.01, .001 และ .001 ตามลำดับเทียบกับ baseline) อาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 600 มิลลิกรัมเองก็มีการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกัน (p-value<.001, .001 และ .01 ตามลำดับเทียบกับ baseline) ดังแสดงในรูปที่ 1-5

BM.GPX :Percent change



รูปที่ 1-5 การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ในพลาสมาของอาสาสมัครปกติที่ได้รับ placebo และอาสาสมัครที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 และ 600 มิลลิกรัม (n=20 กลุ่ม) ## = p-value <0.01เปรียบเทียบกับ baseline, ### = p-value <0.001เปรียบเทียบกับ baseline

3.2 การศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิในการลดความบกพร่องการเรียนรู้และความจำของผู้ป่วยความจำบกพร่องเล็กน้อย

การดำเนินงานในส่วนนี้มีปัญหาไม่สามารถดำเนินการตามแผนได้เนื่องจากจำนวนผู้ป่วยที่ครบตาม inclusion criteria มีน้อย ได้ปรับแผนการทำงานไปดำเนินการตามชุมชน ทำให้ต้องยื่นขอจริยธรรมใหม่ ดังเอกสารตามที่ส่งมา และรอผลการอนุมัติอยู่

อภิปรายผล

มีรายงานว่าสารสื่อประสาทในกลุ่ม acetylcholine ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อ working memory โดยเฉพาะความจำในกลุ่มที่เรียกว่า spatial memory หรือความจำที่เกี่ยวข้องกับทิศทาง⁵² อย่างไรก็ตาม acetylcholine ไม่ได้มีอิทธิพลต่อ spatial memory เท่านั้นแต่ยังมีอิทธิพลต่อ digit working memory⁵³ และ numeric working memory ร่วมด้วย⁵⁴ มีรายงานว่าการเพิ่ม cholinergic transmission โดยการยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase enzyme ด้วย physostigmine สามารถลด reaction ที่ใช้ใน recognition test⁵⁵⁻⁵⁶

นอกจากสารสื่อประสาทในกลุ่ม acetylcholine แล้วสารสื่อประสาทในกลุ่ม monoamine เองก็มีอิทธิพลต่อ working memory อย่างมาก โดย dopamine นั้นจะมีอิทธิพลทั้งต่อ spatial และ non-spatial memory⁵⁷ และสารที่ยับยั้งการหลั่งสารสื่อประสาท norepinephrine จะทำให้อาสาสมัครปกติมีความจำชนิด spatial working memory แย่ลง⁵⁸ ส่วน serotonin นั้นจะมีอิทธิพลต่อ working memory โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ dopamine และ cholinergic system ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อความจำโดยอ้อม⁵⁷

สารสื่อประสาทเหล่านี้ไม่เพียงจะมีผลโดยตรงต่อ working memory แต่ยังมีผลต่อ attention ซึ่งจะส่งผลต่อการเรียนรู้และความจำ มีรายงานว่า attention โดยเฉพาะ low level attention เช่นการให้ความสนใจต่อสิ่งเร้าจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของ norepinephrine และ acetylcholine ในขณะที่ high level attention ซึ่งเกี่ยวข้องกับการให้ความสนใจเพื่อตัดสินใจและ working memory จะเกี่ยวข้องกับ dopamine⁵⁸

ดังนั้นกลไกที่สารสกัดพรมมิเพิ่ม working memory ในอาสาสมัครปกติวัยกลางคนและสูงอายุน่าจะผ่านการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE และลด oxidative stress โดยเพิ่มการทำงานของ scavenger enzymes และทำให้อนุมูลอิสระลดลงไปทำลายโครงสร้างเซลล์ประสาทได้น้อยลง ลดความบกพร่องในการทำหน้าที่ของเซลล์เหล่านั้น

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดพรมมิสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ AChE ได้ซึ่งน่าจะทำให้มีระดับของ acetylcholine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีผลต่อการเรียนรู้และความจำตลอดจนกระบวนการ attention ของอาสาสมัคร ทำให้การเรียนรู้และความจำของอาสาสมัครปกติ นอกจากนั้นข้อมูลในอาสาสมัครปกติก็สอดคล้องกับในสัตว์ทดลองซึ่งพบว่าสารสกัดพรมมิทำให้เกิด oxidative damage ดังจะเห็นจากการลด MDA ซึ่งการลดลงของ oxidative damage ที่ประเมินใน serum นี้ อาจมีส่วนหนึ่งจากการลด oxidative damage ในสมองทำให้ลดการทำลายของเซลล์ประสาทและอาจส่งผลให้มีความบกพร่องในการทำหน้าที่ของสมองในส่วนนั้นๆ น้อยลง ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในอาสาสมัครปกตินั้นน่าจะมีกลไกส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการกีด AChE และการลด oxidative stress damage

ถึงแม้คณะผู้วิจัยจะได้นำผลที่กล่าวข้างต้นตั้งสมมุติฐานว่าสารสกัดพรมมิน่าจะมีศักยภาพในการลดความบกพร่องเรื่องการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วย mild cognitive impairment แต่เนื่องจากปัญหาอุปสรรคในการดำเนินการที่ต้องเปลี่ยน setting ไปศึกษาผู้ป่วยในชุมชน ทำให้ต้องเริ่มกระบวนการใหม่ตั้งแต่ขอจริยธรรม ซึ่งผู้วิจัยได้ดำเนินการไปแล้ว และกำลังรอผล ทำให้การดำเนินการวิจัยล่าช้า ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปผลในส่วนนี้ได้

บรรณานุกรม

1. รายงานการสำรวจประชากรสูงอายุในประเทศไทย พ.ศ. 2550 สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร
2. รายงานการสำรวจประชากรสูงอายุในประเทศไทยสำนักงานสถิติแห่งชาติ พ.ศ. 2537 และ 2545. สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร
3. Hedden T, Gabrieli JD. (2004) Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 5(2), 87-96
4. Bertsch K, Hagemann D, Hermes M, Walter C, Khan R, Naumann E. (2009) Resting cerebral blood flow, attention, and aging. *Brain Res.* 1267, 77-88.
5. Reuter-Lorenz, P.A. (2000) Cognitive neuropsychology of the aging brain. In: Park, D.C., Schwarz, N. (Eds.), *Cognitive Aging: A Primer.* Psychology Press 93–114, Philadelphia.
6. Posner MI. (2004) *Cognitive Neuroscience of Attention,* The Guilford Press, New York
7. Raz N. (2000) Aging of the brain and its impact on cognitive performance: integration of structural and functional findings. In: Craik FIM and Salthouse TA, Editors, *The Handbook of Aging and Cognition Vol. 2,* 1-90, Lawrence Erlbaum Associates, Mahwah, NJ.
8. Nyberg L. and Bäckman L. (2004) Cognitive aging: a view from brain imaging. In: R.A. Dixon, L. Bäckman and L.-G. Nilsson, Editors, *New Frontiers in Cognitive Aging,* 135–159, Oxford Press, Oxford.
9. Muth K, Schönmeier R, Matura S, Haenschel C, Schröder J, Pantel J. (2010) Mild cognitive impairment in the elderly is associated with volume loss of the cholinergic basal forebrain region. *Biol Psychiatry.* 67(6):588-91.
10. Markesbery WR., Kryscio RJ., Lovell MA.,Morrow JD. (2005) Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 5, 730-5.
11. Markesbery WR.,Lovell M.A. (2007) Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Arch Neurol;* 7, 954-6
12. Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R, Mecocci P. (2009) Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev.*8(4), 285-305.

13. Sairam K., Dorababu M., Goel R.K., Bhattacharya S.K. (2002) Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomed* 9, 207–211.
14. Das A., Shanker G., Nath C., Pal R., Singh S., Singh H. (2002) A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 893–9006.
15. Stough C, Downey LA, Lloyd J et al. (2008). "Examining the nootropic effects of a special extract of *Bacopa Monniera* on human cognitive functioning: 90 day double-blind placebo-controlled randomized trial." *Phytother Res.* 22, 1629-1634
16. Garay S., Mahato SB., Ohtani K., Yamasaki K. (1996a) Dammarane-type triterpenoid saponins from *Bacopa monniera*. *Phytochem* 42, 815–820.
17. Garay S., Mahato S.B., Ohtani K., Yamaski K. (1996b) Bacosaponin D-a pseudojujubogenin glycoside from *Bacopa monniera*. *Phytochem* 43, 447–449
18. จินตนาภรณ์ วัฒนธร, สุภาพร มัชฌิมะปุระ, กรกนก อิงคินันท์, เทอดไทย ทองอุ่น, อรพิน ผาสุริย์วงษ์ 2549 (2006) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ การศึกษาฤทธิ์พรมมิในการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทใน Alzheimer's disease
19. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217,: 408-414.
20. McGeer E, McGeer PL. (1976) Age changes in the human for some enzymes associated with some metabolism of catecholamine and GABA In Ordee GM, Brizee RR (Eds) *Neurobiology of aging*, 389: New York: Raven Press.
21. Davidson MT, Marrocco RT. (2000) Local infusion of scopolamine into intraparietal cortex slows convert orienting in rhesus monkey. *J Neurophysiol.* 83, 1536-1549.
22. Gill TM, Sarter M, Givens B. (2000) Sustained visual attention performance-associated medial prefrontal neuronal activity: evidence for cholinergic modulation. *J. NeuroSci* 20, 4745-5454.
23. Chiba AA, Bushell PJ, Oshiro WM, Gollagher M. (1999) Selective removal of cholinergic neurons in basal forebrain alters cues target detection. *Neuroreport* 10, 3119-3123.
24. Robbin TW. (1998) Arousal and attention : psychopharmacological and neuropsychological studies in experimental animals In: Parsuraman R. (Ed) . *The Alternative Brain*, 189-220, MIT Press, Cambridge, MA

25. McGaghy J, Sarter M. (1998) Sustained attention performance in rats intracortical infusion of 192-Ig G-saponin induced cortical deafferentation: effects of physostigmine and FG1742. *Behav Neurosci* 112, 1519-1525.
26. Lleo A, Greenberg S M, Growdon J H. (2006) Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med.* 57, 513-533.
27. Perry E K, Gibson P H, Blessed G, Perry R H, Tomlinson B E. (1977) Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci.* 34(2), 247-265.
28. Sakurada T, Alufuzoff I, Winblad B, Nordberg A. (1990) Substance P-like immunoreactivity, choline acetyltransferase activity and cholinergic muscarinic receptors in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Brain Res.* 521(1-2), 329-332.
29. Waller SB, Ball MJ, Reynolds MA, London ED (1986) Muscarinic binding and choline acetyltransferase in postmortem brains of demented patients. *Can J Neurol Sci* 13(4 Suppl), 528-532.
30. Li H, Yao MJ, Zhao WM, Guan J, Cai LL, Cui L. (2008) A randomized, controlled, double-blind trial of Huannao Yicong capsule in senile patients with mild cognitive impairment. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 6(1), 25-31.
31. Herholz K, Weisenbach S, Zündorf G, Lenz O, Schröder H, Bauer B, Kalbe E, Heiss WD. (2004) In vivo study of acetylcholine esterase in basal forebrain, amygdala, and cortex in mild to moderate Alzheimer disease. *Neuroimage* 21(1), 136-143.
32. Bentley P, Husian M, Dolan RJ. (2004) Effect of cholinergic enhancement on visual stimulation, spatial attention and spatial working memory. *Neuron* 41(6), 969-982.
33. Bentley P, Vuillieumier P, Thiel CM, Driver J, Dolan RJ. (2003) Cholinergic enhancement modulates neural correlates of selective attention and emotional processing. *Neuroimage* 20 (1), 58-70.
34. Birks J. (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* (1), CD005593.
35. Luine VN, Richards ST, Wu VY, Beck KD. (1998) Estradiol enhances learning and memory in spatial memory task and effects levels of monoamine transmitters. *Horm Behav* 34, 149-162
36. Arnsten AF. (1997) Catecholamine regulation of the prefrontal cortex. *J Psychopharmacol.* 11(2),151-62.

37. Beatty WW, Rush JR. (1983) Spatial working memory in rats: effects of monoaminergic antagonists. *Pharmacol Biochem Behav.* 18(1), 7-12.
38. Turchi J, Saunders RC, Mishkin M. (2005) Effects of cholinergic deafferentation of the rhinal cortex on visual recognition memory in monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(6), 2158-2161.
39. Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ, Fisher LJ. (1995) Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature* 375, 484 – 487.
40. Oades RD. (2002) Dopamine may be ‘hyper’ with respect to noradrenaline metabolism, but ‘hypo’ with respect to serotonin metabolism in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res.*130(1-2), 97-102.
41. Hanna GL, Ornitz EM., Hariharan M. (1996) Urinary catecholamine excretion and behavioral differences in ADHD and normal boys. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 6, 63–73.
42. Murali G, Panneerselvam C. (2008) Modulatory role of glutathione monoester in augmenting age-associated neuronal antioxidant system. *Exp Aging Res.* 34(4), 419-436.
43. Wang XM, Fu H, Liu GX, Zhu W, Li L, Yang JX. (2007) Effect of modified wuzi yanzong granule on patients with mild cognitive impairment from oxidative damage aspect. *Chin J Integr Med.* 13(4), 258-263.
44. Summers WK, Martin RL, Cunningham M, DeBoynton VL, Marsh GM. (2010) Complex antioxidant blend improves memory in community-dwelling seniors. *J Alzheimers Dis.* 19(2), 429-439.
45. Ishige K., Schubert D., and Sagary Y. (2001) Flavonoids protects neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med* 30(4), 433–446.
46. Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. (1999) Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta.* 288(1-2), 73-90.
47. Anderson, M.C., Hasan, F., McCrodden, J.M., and Tipton, K.F. (1993) Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. *Neurochem. Res.* 18(11), 1145-1149
48. Rael LT, Thomas GW, Craun ML, Curtis CG, Bar-Or R, Bar-Or D. (2004) Lipid peroxidation and the thiobarbituric acid assay: standardization of the assay when using saturated and unsaturated fatty acids. *J Biochem Mol Biol.* 37(6), 749-52.
49. Sohal RS, Weindruch R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59-63.
50. McCord JM, Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055

51. Wendel A. (1980) *Enzymatic Basic of Detoxication Volume 2*, 333–353, New York: Academic Press.
52. Rassmusson DD, Dudar JD. (1979) Effects of scopolamine on maze learning performance in humans. *Experientia* 15, 1069–1070.
53. Mewaldt SP, Ghoneim MM. (1979) The effects and interactions of scopolamine, physostigmine and methamphetamine on human memory. *Pharm Biochem Behav* 10, 205–210.
54. Duka T, Ott H, Rohloff A, Voet B. (1996) The effects of benzodiazepine receptor antagonist beta-carboline ZK93426 on scopolamine induced impairment on attention, memory and psychomotor skills. *Psychopharm* 123, 361–373.
55. Furey ML, Pietrini P, Alexander GE, Schapiro MB, Horwitz B. (2000a) Cholinergic enhancement improves performance on working memory by modulating the functional activity in distinct brain regions: a positron emission tomography regional blood flow study in healthy humans. *Brain Res Bull* 51, 213–218.
56. Furey ML, Pietrini P, Haxby JV. (2000b) Cholinergic enhancement and increased selectivity of perceptual processing during working memory. *Science* 290, 2315–2319.
57. Ellis KA, Nathan PJ. (2001) The pharmacology of human working memory. *Int J Neuropsychopharmacol.* 4(3), 299-313.
58. Coull JT, Middleton HC, Robbins TW, Sahakian BJ. (1995) Contrasting effects of clonidine and diazepam on test of working memory and planning. *Psychopharmacol* 120, 311–321.



รายงานวิจัย

โครงการย่อยที่ 2

เรื่อง

ฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิต่อการไหลเวียนโลหิตบริเวณผิวเปลือกสมอง ความดันโลหิต
และ อัตราการเต้นของหัวใจในหนูแรท

**Effects of Brahmi extract on superficial cerebral blood flow, blood pressure and
heart rate in rats**

โดย

ผศ. ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์

ผศ. ดร. นิวัตติ เทพวราพฤกษ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีงบประมาณ 2552

บทคัดย่อ

สมุนไพรพรมมิเป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณบำรุงความจำแต่กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่ชัดเจน โดยเฉพาะกลไกที่เกี่ยวข้องกับไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงสมอง การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของพรมมิต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตบนผิวเปลือกสมอง ความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ ของหนูแรทที่ได้รับสมุนไพร โดยการกินติดต่อกันนาน 2 เดือน และได้รับโดยการฉีดสารสกัดโดยตรงเข้าทางหลอดเลือดดำ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับผลของสารสกัดแปะก๊วย และยามาตราฐาน Donepezil จากผลการวิจัยเมื่อให้สารสกัดพรมมิ (40 mg/kg BW) หรือ สารสกัดแปะก๊วย (60 mg/kg BW) ทางปากเป็นเวลานานติดต่อกัน 2 เดือน พบว่ามีผลเพิ่มการไหลเวียนโลหิตบริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง โดยประสิทธิภาพของสารสกัดพรมมิกับสารสกัดแปะก๊วยไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่ยามาตราฐาน Donepezil (1 mg/kg BW) ไม่มีผลใด ๆ ต่อการไหลเวียนโลหิตบริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง สารสกัดและยามาตราฐานไม่มีผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ ในทางตรงกันข้ามการให้สารสกัดพรมมิ (20, 40, 60 mg/kg BW) หรือ สารสกัดแปะก๊วย (20, 40, 60 mg/kg BW) โดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำส่งผลลดทั้งความดันโลหิต และการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ ในขณะที่การฉีดยา Donepezil (1 mg/kg BW) ไม่มีผลใด ๆ ต่อความดันโลหิต และการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง แต่มีผลลดอัตราการเต้นของหัวใจ

โดยสรุปผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสมุนไพรพรมมิในการเพิ่มการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง เมื่อให้สารสกัดทางปากนานติดต่อกัน 2 เดือน ทั้งนี้กลไกที่ส่งผลให้เพิ่มการไหลเวียนโลหิตที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองต้องทำการศึกษาต่อไป

Abstract

Bacopa monniera (Brahmi) is well known as herbal medicine for memory enhancing, but its mechanism of action, in particular, regarding the effect on blood flow to the brain is still unknown. Therefore, the present study aimed to investigate effect of Brahmi ethanolic extract, in comparison with ginkgo extract and standard drug for Alzheimer's disease, Donepezil, on superficial cerebral blood flow, blood pressure and heart rate in rats. Two experimental protocols were implemented including 1) Subchronic effect: Rats were orally administered with Brahmi extract (40 mg/kg BW), ginkgo extract (60 mg/kg BW) or Donepezil (1 mg/kg BW) daily for 2 months and 2) Acute effect: Rats were intravenously injected with Brahmi extract (20, 40, 60 mg/kg BW), ginkgo (20, 40, 60 mg/kg BW), and Donepezil (1 mg/kg BW). We found that subchronic administration of either Brahmi extract (40 mg/kg BW) or ginkgo (60 mg/kg BW) significantly increased superficial cerebral blood flow, but had no effect on blood pressure and heart rate when compared with control group. On the other hand, treatment with Donepezil (1 mg/kg BW) for 2 months had no significant effect on superficial cerebral blood flow, blood pressure and heart rate. Intravenous injection (i.v.) of Brahmi extract (20, 40, 60 mg/kg BW) or ginkgo (20, 40, 60 mg/kg BW) produced a dose-dependent, transient hypotensive effect and decreased superficial cerebral blood flow, but had no effect on heart rate in anaesthetized rats. On the contrary, Donepezil (1 mg/kg BW, i.v.) had no effect on blood pressure and superficial blood flow, but decreased heart rate.

In conclusion, the present study demonstrated the efficiency of Brahmi extract in increasing superficial cerebral blood flow, when given orally for 2 months. Future study on its mechanism of action regarding the increase of blood flow is still required.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	2-ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	2-iii
สารบัญ	2-iv
สารบัญตาราง	2-v
สารบัญรูป	2-vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	2-vii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	2-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	2-4
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	2-9
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	2-18
บรรณานุกรม	2-19

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 ผลของสารสกัดพรมมิ, สารสกัดแปะก๊วย และ ยา Donepezil เมื่อให้ทางปาก เป็นระยะเวลา 2 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต (Systolic blood pressure) ในหนูทดลองที่มีสติ	2-9
2-2 ผลของสารสกัดพรมมิ, สารสกัดแปะก๊วย, และยา Donepezil ขนาด 1 mg/kg BW เมื่อให้ทางปาก เป็นระยะเวลา 2 เดือน ต่ออัตราการเต้นของหัวใจ (Heart rate) ในหนูทดลองที่มีสติ	2-10

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	การฝึกให้สัตว์ทดลองให้คุ้นเคยกับ Restrainer และ ชุดอุปกรณ์การวัดความดันโลหิตทางหางหนู	2-6
2-2	ชุดศึกษาความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจ และชุดศึกษาการไหลเวียนโลหิตที่ผิวสมอง และ หนูทดลองที่สลบกำลังถูกตรึงกะโหลกศีรษะด้วย Stereotaxic apparatus และตำแหน่งการวาง Laser Doppler flow (LDF) probe	2-7
2-3	ผลของสารสกัดพรมมิ, สารสกัดแปะก๊วย และยา Donepezil เมื่อให้ทางปาก เป็นระยะเวลา 2 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตในหลอดเลือดแดงที่ผิวเปลือกสมองในหนูทดลองที่สลบ	2-11
2-4	ผลการทดสอบสารหรือยาที่มีฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิต และการไหลเวียนโลหิตที่ผิวสมอง เมื่อนิโคตตินต่าง ๆ กำหนด	2-12
2-5	ผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ เมื่อนิโคตตินสกัดพรมมิ, สารสกัดแปะก๊วย, Donepezil, Norepinephrine และ Sodium nitroprusside เข้าทางหลอดเลือดดำในหนูที่สลบ	2-13
2-6	ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง เมื่อนิโคตตินสกัดพรมมิ, สารสกัดแปะก๊วย , Donepezil, Norepinephrine และ Sodium nitroprusside เข้าทางหลอดเลือดดำในหนูที่สลบ	2-14

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มก.	มิลลิกรัม
ข.	กรัม
ก./กก.	กรัมต่อกิโลกรัม
มก./กก.	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
mg/kg	Milligram per kilogram
µg/kg	Microgram per kilogram
BW	Body weight
NE	Norepinephrine
DNP	Donepezil
SNP	Sodium nitroprusside
DP	Diastolic blood pressure
SP	Systolic blood pressure

บทที่ 1

บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

บทนำ

ปัจจุบันอายุเฉลี่ยของประชากรโลกเพิ่มมากขึ้น โดยองค์การอนามัยโลก (WHO) รายงานว่าตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000-2050 ประชากรโลกที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีเป็นต้นไปจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นประมาณสามเท่าคือจากหก ร้อยล้านคนเป็นสองพันล้านคน (WHO) และจะเห็นได้อย่างชัดเจนในในประเทศที่กำลังพัฒนา ทั้งนี้การ เปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้างของประชากรในลักษณะเช่นนี้ทำให้เราต้องคำนึงถึงผลกระทบทั้งเชิงเศรษฐกิจ และเชิงสุขภาพที่จะเกิดขึ้นตามมาในผู้สูงอายุ โดยเฉพาะการมีภาวะ โรคเรื้อรังที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของ ผู้สูงอายุ เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ซึ่งเป็นโรคสมองเสื่อมที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุโดยพบ มากเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมทั้งหมด (Small et al., 1997) ดังนั้นการวิจัยเกี่ยวกับยาหรือ สมุนไพรที่สามารถป้องกันหรือรักษาโรคอัลไซเมอร์จึงมีความสำคัญในการได้มาซึ่งองค์ความรู้ที่จะนำไปสู่ การแก้ไขปัญหาเชิงสุขภาพดังกล่าวให้กับผู้สูงอายุและประเทศที่กำลังพัฒนา สมุนไพรไทยที่มีศักยภาพใน การพัฒนาเป็นยาหรืออาหารเสริมเพื่อบำรุงความจำได้แก่สมุนไพรที่มีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคเอเชีย การพัฒนาเป็นยาหรืออาหารเสริมเพื่อบำรุงความจำได้แก่สมุนไพรเนื่องจากมีหลักฐานเชิง วิทยาศาสตร์สนับสนุนในหลาย ๆ แง่มุม เช่น มีรายงานว่าสารสกัดจากพรมมีฤทธิ์ ลดความกังวล และเพิ่ม ความจำ (Das et al., 2002; Sairam et al., 2002; Joshi and Parle, 2006) การศึกษาทางคลินิกพบว่า การ บริโภคพรมมีนานเป็นเวลา 3 เดือน ช่วยเพิ่มความสามารถในการจำในอาสาสมัครสุขภาพดี (Stough et al., 2001) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ประการหนึ่งของอาการสมองเสื่อมคือการที่สมองขาดเลือดมาเลี้ยง (Cerebral ischemia) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์สมองเกิดภาวะขาดออกซิเจน และตายในที่สุด ภาวะการขาด เลือดไปเลี้ยงสมองอย่างเฉียบพลันสามารถทำให้เกิดภาวะช็อค และ Stroke ได้ (Li et al., 2006; Masamoto et al., 2007) แต่ถ้าการขาดเลือดไปเลี้ยงสมองเป็นไปทีละน้อย อาจส่งผลให้เกิดภาวะสมองเสื่อมได้ ซึ่งจะ ส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมและการเรียนรู้และความจำ (Niedermeyer, 2006; Shibata et al., 2008) เนื่องจากที่ผ่านมา ยังไม่มีรายงานใด ๆ กล่าวถึงผลของสารสกัดพรมมีต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียน โลหิตที่สมอง งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมีในการเพิ่มความจำซึ่งอาจเป็น ผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตบนผิวสมอง รวมถึงผลต่อความดันโลหิต และ อัตราการ เต้นของหัวใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลในเชิงเปรียบเทียบกับตัวยามาตรฐาน เช่น Donepezil ซึ่งเป็นยารักษา โรคอัลไซเมอร์ หรือ เปรียบเทียบกับสมุนไพรแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่เป็นที่ยอมรับใน วงกว้างในปัจจุบันทั่วโลกว่ามีฤทธิ์เพิ่มความจำและมีงานวิจัยเชิงวิทยาศาสตร์สนับสนุนเป็นจำนวนมาก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรพรมมิในประเด็นต่อไปนี้

1. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตบนผิวเปลือกสมอง ความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลองที่สลบ โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการฉีดสารโดยตรงทางหลอดเลือดดำ (intravenous injection) กับการให้สัตว์ทดลองได้รับสมุนไพรโดยการกินติดต่อกันนาน 2 เดือน
2. ผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลองที่ไม่สลบและได้รับสารสกัดสมุนไพรพรมมิโดยการกินติดต่อกันนาน 2 เดือน
3. เปรียบเทียบผลของสมุนไพรพรมมิ กับสารสกัดแปะก๊วย และยามาตรฐาน Donepezil

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

สมุนไพรพรมมิเป็นสมุนไพรที่มีประวัติการใช้ยาวนานในการแพทย์อายุรเวทของอินเดียโดยมีสรรพคุณ บำรุงความจำ บำรุงสมอง แก้ไข้ แก้ปวด มีรายงานว่าสารสกัดจากพรมมิมิฤทธิ์ Antidepressant (Sairam et al., 2002) และ เพิ่มความจำ (Memory enhancing) (Das et al., 2002) การศึกษาทางคลินิกพบว่า การให้พรมมินานติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือน ช่วยเพิ่มความสามารถในการจำในอาสาสมัครสุขภาพดี (Stough, 2001) สารที่มีฤทธิ์ในพรมมิคือ สารกลุ่ม Saponin ได้แก่ Bacoside A, B และ Bacopaside I (Garai et al., 1996a, b; Rastogi et al., 1994; Sairam et al., 2002) มีรายงานว่าถ้าหนูทดลองได้รับสาร Bacosides ก่อนทำการชักนำให้ความจำบกพร่องด้วย Scopolamine (3 มก./กก.), Sodium nitrite (75 มก./กก.) หรือ BN52021 (15 มก./กก.) จะสามารถช่วยปกป้องภาวะความจำบกพร่องเมื่อทดสอบด้วย Morris water maze เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Kishore and Singh, 2005) อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มีการวิจัยใดศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิในการเพิ่มความจำซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตบนผิวสมอง รวมถึงผลต่อความดันโลหิต และ อัตราการเต้นของหัวใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลในเชิงเปรียบเทียบกับตัวยาหรือสารสกัดมาตรฐาน เช่น Donepezil หรือ สารสกัดแปะก๊วย สำหรับยา Donepezil นั้นเป็นยาที่ผ่านการรับรองโดย FDA ของประเทศสหรัฐอเมริกา (<http://www.fda.gov>) และถูกใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันเพื่อรักษาโรค Alzheimer โดยมีกลไกการออกฤทธิ์คือเป็น Acetylcholine esterase inhibitor ถึงแม้กลไกการออกฤทธิ์หลัก ๆ ของ Donepezil จะเป็นการเพิ่มระดับของ Acetylcholine ในสมอง โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholine esterase แต่ก็มีรายงานประสิทธิภาพของ Donepezil ในด้านอื่น ๆ ที่น่าสนใจ คือ ผลต่อการเพิ่มขึ้นของ LTP (Barnes et al., 2000) และการเพิ่มขึ้นของ Cerebral blood flow (Tsukada et al., 2000; Nakano et al., 2001; Hanyu et al., 2003; Imamura et al., 2008) ซึ่งเชื่อว่ามีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพของยา Donepezil ในการรักษาโรค Alzheimer ส่วนสมุนไพรแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) นั้นเป็นสมุนไพรที่มีรายงานอย่างแพร่หลายเกี่ยวกับฤทธิ์ในการบำรุงสมองและการช่วยบำรุงความจำ กล่าวคือ มีรายงานว่า สารสกัดจากใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) และ สารสำคัญของแปะก๊วย

ซึ่งเป็นสมุนไพรจีน มีฤทธิ์ช่วยปกป้องระบบประสาท (Neuroprotective) และ การเพิ่มความจำ (Memory enhancing effects) (Mahadevan and Park, 2008) โดยมีรายงานผลการวิจัยทั้งในสัตว์ทดลอง (Winter, 1998; Paganelli et al., 2006; Takuma et al., 2007; Walesiuk and Braszko, 2007; Nooshinfar et al., 2008) และ ในมนุษย์ (Diamond et al., 2000; Kennedy et al., 2000; Birks et al., 2002; Dodge et al., 2008) สำหรับ การศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสมุนไพร และ สมุนไพรแปะก๊วย ในแง่มุมต่างๆ ปัจจุบันมีเพียงรายงานเดียวที่เปรียบเทียบผลของพรมมิ และ แปะก๊วย ด้านการต้านฤทธิ์ Acetylcholinesterase และ ฤทธิ์ Antidementia (Das et al., 2002) ในหนูถีบจักร ซึ่งพบว่าสารสกัดแปะก๊วย มีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดพรมมิทั้งการต้าน Acetylcholinesterase และ ฤทธิ์ Antidementia (Das et al. 2002)

คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าการศึกษาเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ของสมุนไพรพรมมิ กับยามาตรฐาน Donepezil และ สมุนไพรแปะก๊วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตบนผิวสมอง ความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ จะนำมาซึ่งข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการพัฒนาสมุนไพร เนื่องจากสาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งของอาการสมองเสื่อมคือการที่สมองขาดเลือดมาเลี้ยง (Cerebral ischemia) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์สมองเกิดภาวะขาดออกซิเจน และตายในที่สุด ภาวะการขาดเลือดไปเลี้ยงสมองอย่างเฉียบพลันสามารถทำให้เกิดภาวะช็อก และ Stroke ได้ (Li et al., 2006; Masamoto et al., 2007) แต่ถ้าการขาดเลือดไปเลี้ยงสมองเป็นไปทีละน้อย อาจส่งผลให้เกิดภาวะสมองเสื่อมได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมและการเรียนรู้และความจำ (Niedermeyer, 2006; Shibata et al., 2008) เนื่องจากที่ผ่านมา ยังไม่มีรายงานใด ๆ กล่าวถึงผลของสารสกัดพรมมิต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตที่สมอง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสมุนไพรพรมมิมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัว (Channa et al., 2003) โดยกลไกการออกฤทธิ์น่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการไหลของ Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์ (Dar & Channa, 1999; Chootip et al., 2008) และ อาจเกี่ยวข้องกับ Prostacyclin pathway (Dar & Channa, 1997; Chootip et al., 2008) ตลอดจนยังพบว่า การคลายตัวของหลอดเลือดไม่ขึ้นกับ Endothelium และ ไม่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น Mucarinic receptors (Dar & Channa, 1997) ทีมผู้วิจัยจึงได้ออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาผลของสมุนไพรพรมมิต่อการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่ ณ บริเวณผิวสมองของหนูทดลองที่สลบ ตลอดจนวัดค่าความดันโลหิต และ อัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลองที่มีสติควบคุมกันไปด้วย

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

โครงการนี้ได้ผ่านการอนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์มหาวิทยาลัยนเรศวร (เลขที่โครงการ 53040010) โดยมีรายละเอียดของการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองดังต่อไปนี้

หลักการและเหตุผลที่เกี่ยวข้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาผล และ กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิในหนูแรท โดยใช้เทคนิคการศึกษาการไหลเวียนโลหิตบนผิวสมอง ซึ่งการศึกษาวิจัยดังกล่าวเป็นชนิด Invasive ไม่เหมาะสมที่จะกระทำการศึกษาโดยตรงในมนุษย์ และไม่สามารถทำการทดลองโดยใช้ *In vitro* model อื่น ๆ เช่น การใช้ Cell culture หรือ Brain slice ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความจำเป็นต้องเลือกทำการศึกษาใน *In vivo* (Anesthetized) model ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะมีความสำคัญต่อการนำไปอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมิในมนุษย์ และ ข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาสารสกัดให้เป็นอาหารเสริมหรือยา เพื่อการป้องกันและรักษาอาการความจำเสื่อม และ โรคสมองเสื่อม

แนวทางปฏิบัติในการใช้สัตว์

- 1) สัตว์ทดลองจะได้รับการดูแลอย่างดี ในสภาพแวดล้อมที่สะอาดและเหมาะสม
- 2) โครงการวิจัยนี้ได้คำนวณจำนวนหนูทดลองในปริมาณที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงคุณค่าของชีวิตสัตว์ที่นำมาทดลอง และค่าของผลการทดลองที่จะทำให้เกิดนัยสำคัญทางสถิติ
- 3) ทีมผู้วิจัยมีความชำนาญในการ Handling หนูทดลองเป็นอย่างดี และจะปฏิบัติต่อสัตว์ด้วยความระมัดระวัง และด้วยความมีเมตตา
- 4) สัตว์จะถูกทำให้ตายอย่างสงบ (Euthanasia) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่จะใช้สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้หนูแรทเพศผู้ (Wistar rats) น้ำหนัก 200-250 กรัม อายุประมาณ 1.5 เดือน ซึ่งหนูทดลองเหล่านี้จะสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต. ศาลายา อ.ศาลายา จ. นครปฐม หนูทดลองจะถูกแบ่งกลุ่มเพื่อแยกเลี้ยงในกล่อง ๆ ละ 4 ตัว เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 25.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส ที่ตั้งเวลาเปิดของแสงไฟในห้องเลี้ยง ในช่วงเวลา 07:00-19:00 น. และได้รับอาหารเม็ด (สูตร G082, สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม. มหิดล) และน้ำอย่างบริบูรณ์

การศึกษาผลของสารสกัดต่อความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจ และการไหลเวียนเฉพาะที่ ซึ่ง
จะแบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยสุ่ม ได้แก่

- 1) กลุ่มควบคุม (Control) ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย (Distilled water)
 - 2) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรพรมมิ ขนาด 40 มก./กก. น้ำหนักตัว (Taepavarapruk et al., 2006)
 - 3) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดแปะก๊วย 60 มก./กก. น้ำหนักตัว (Wang et al., 2006)
 - 4) กลุ่มที่ได้รับยา Donepezil ขนาด 1 มก./กก. น้ำหนักตัว (V.N. Luine et al., 2002)
- หนูทุกกลุ่มได้รับยา/สารสกัดติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 2 เดือน

เกณฑ์การคัดเลือกหรือคัดแยกสัตว์ทดลอง (Inclusion and Exclusion criteria)

ก่อนเริ่มทำการวิจัย ทีมผู้วิจัยจะคัดเลือกหรือคัดแยกหนูทดลอง โดยใช้หลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้

- 1) จะเลือกเฉพาะหนูทดลองเพศผู้ ที่มีสายพันธุ์แน่นอน คือ พันธุ์ Wistar rat ซึ่งจะสั่งซื้อจากสำนัก
สัตว์ทดลองแห่งชาติ อ.สาขลา จ.นครปฐม เท่านั้น
- 2) จะเลือกเฉพาะหนูหนุ่มที่มีขนาดน้ำหนักตัวระหว่าง 200-250 กรัม
- 3) จะไม่เลือกหนูทดลองที่กำลังป่วย มีไข้ หรือมีการติดเชื้อ

เกณฑ์การให้เลิกจากการศึกษา (Discontinuation criteria)

ในขณะที่กำลังดำเนินการวิจัย ทีมผู้วิจัยมีเกณฑ์ยุติการศึกษา (นอกเหนือจากการสิ้นสุดการวิจัย) โดย
ใช้หลักดังต่อไปนี้

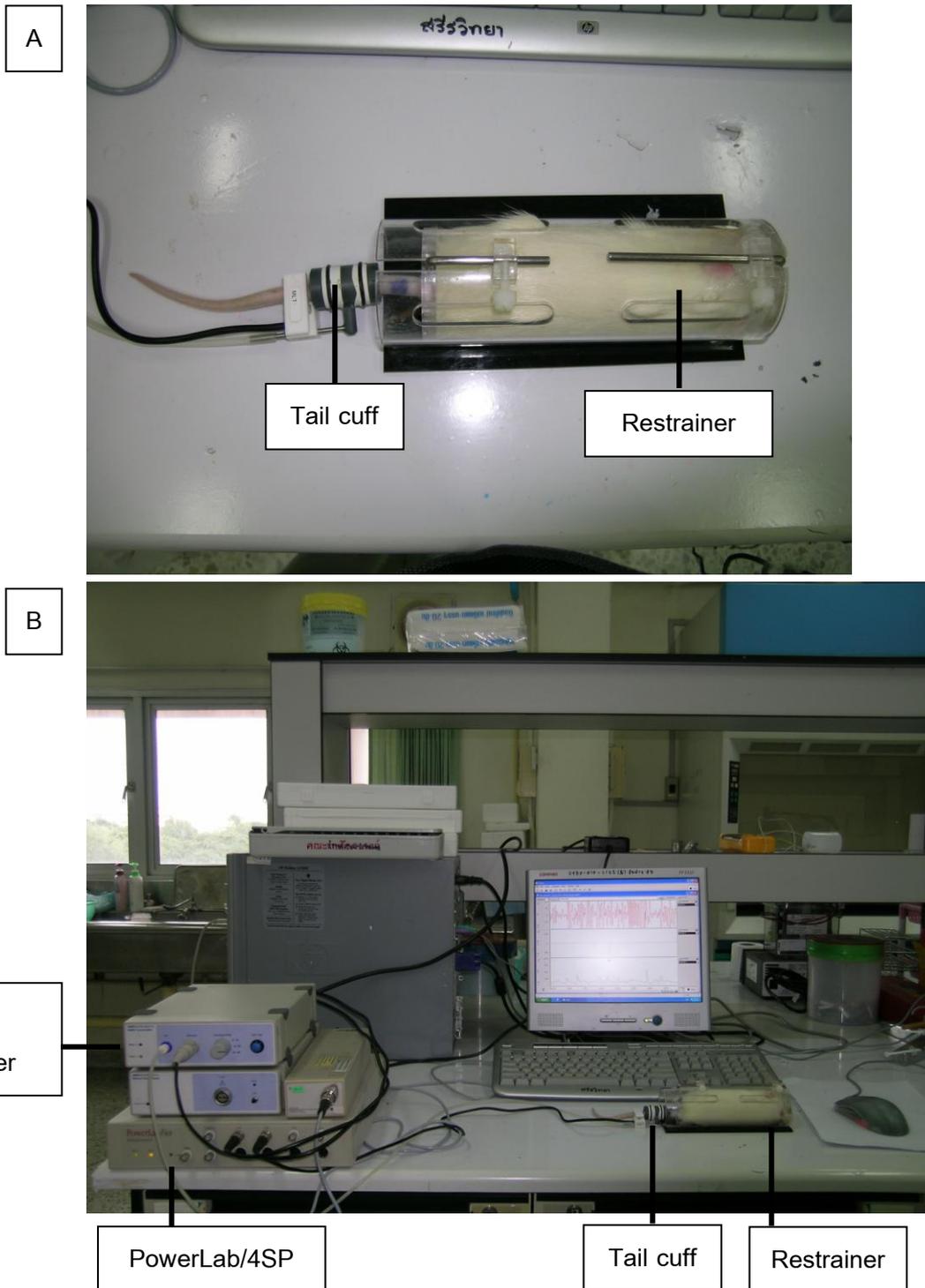
- 1) หนูทดลองที่มีสภาพร่างกายไม่สมบูรณ์
- 2) หนูทดลองที่ป่วย มีไข้ ติดเชื้อ หรือได้รับบาดเจ็บ
- 3) หนูทดลองที่มีความผิดปกติทางจิตและพฤติกรรม เช่น หวาดระแวง คุร้าย หรือ ก้าวร้าว เป็น
ต้น

2.2 วิธีการวิจัย

1. การศึกษาผลของสารสกัดต่อความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจ ในหนูทดลองที่ไม่สลบและได้รับสาร สกัดสมุนไพรพรมมิโดยการกินติดต่อกันนาน 2 เดือน

หนูทดลองจะได้รับสารตัวทำละลาย (Distilled water) ขนาด 0.1 มล./100 ก. น้ำหนักตัว สารสกัด
พรมมิ ขนาด 40 มก./กก. หรือ ยา Donepezil ขนาด 1 มก./กก. หรือสารสกัดแปะก๊วย ขนาด 60 มก./กก. ทุก
วัน เป็นเวลา 2 เดือน โดยจะมีการฝึกให้สัตว์ทดลองได้คุ้นเคยกับ Restrainer (รูปที่ 2-1 A) ก่อนจะเริ่มวัด
ความดันโลหิต ซึ่งเป็นการวัดความดันโลหิตทางหาง (Tail cuff) ในขณะที่สัตว์ทดลองมีสติ โดยอุปกรณ์ที่
ใช้คือ NIBP Controller (Model ML 125, ADInstruments) ที่เชื่อมต่อกับ PowerLab/4SP (ADInstruments)
(รูปที่ 2-1 B)

วัดความดันโลหิตเดือนละ 1 ครั้งติดต่อกัน เริ่มตั้งแต่ก่อนได้รับสารสกัดหรือยาจนกระทั่งสิ้นสุดการได้รับสารสกัดหรือยา

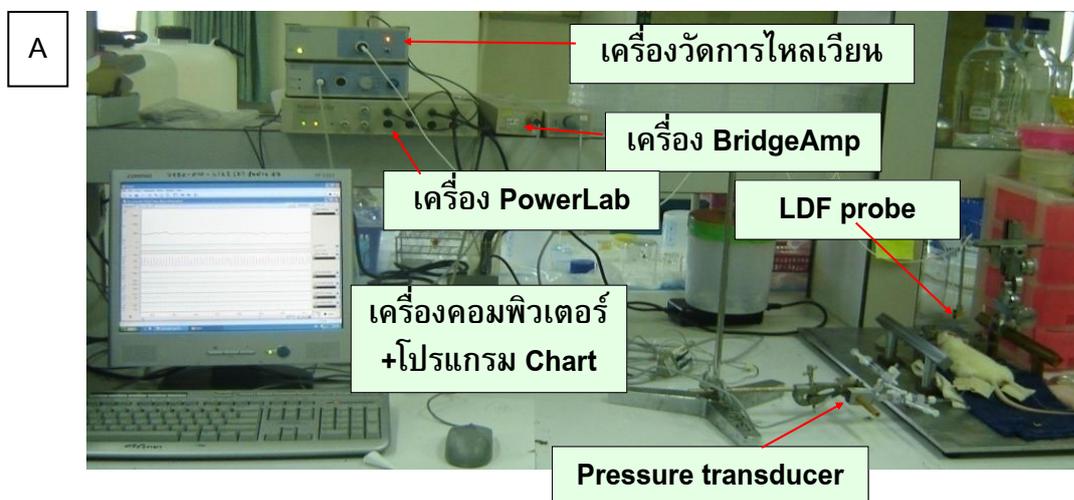


รูปที่ 2-1 A: การฝึกให้สัตว์ทดลองให้คุ้นเคยกับ Restrainer B: ชุดอุปกรณ์การวัดความดันโลหิตทางหางหนู

2. การวัดการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลองที่สลบ

การวัดความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลองที่สลบ

ทำให้สัตว์ทดลองสลบโดยการฉีดยา Urethane (1.5 ก./กก. น้ำหนักตัว) เข้าในช่องท้อง เมื่อหนูสลบดีแล้วทำการผ่าตัดบริเวณขาหนีบ (Femoral) เพื่อสอดสาย Polyethylene tube (PE 50) ไปยัง Femoral vein เพื่อฉีดสารสกัดหรือยาต่างๆ และสอดสาย Polyethylene tube อีกอันไปยัง Femoral artery และเชื่อมต่อกับ Pressure transducer (ADInstruments) และ PowerLab 4SP (ADInstruments) เพื่อวัดความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ ดังแสดงในรูปที่ 2-2 A



รูปที่ 2-2 A: ชุดศึกษาความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจ และชุดศึกษาการไหลเวียนโลหิตที่ผิวสมอง

B: หนูทดลองที่สลบกำลังถูกตรึงกะโหลกศีรษะด้วย Stereotaxic apparatus และตำแหน่งการวาง Laser Doppler flow (LDF) probe

ขณะเดียวกันทำการวัดการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง โดยวิธีการทดลองจะทำตามวิธีการของ He และคณะ (He et al., 2007) หรือ Tonnesen และคณะ (Tonnesen et al., 2005) กล่าวคือตรึงกระโหลกศีรษะด้วย Stereotaxic apparatus (Lab Standard Stereotaxic model 51600, Stoelting co.) จากนั้นจะทำความสะอาดบนผิวหนังศีรษะด้วยแอลกอฮอล์ และนำยามาเช็ดโรค จากนั้นจะทำการผ่าหนังศีรษะตามแนวยาว (Midline incision) ทำความสะอาดกะโหลกศีรษะโดยไม่ให้มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดใดขังปกคลุมผิวกะโหลก แล้วใช้สว่านความเร็วสูงเจาะกะโหลกศีรษะให้เป็นช่องสี่เหลี่ยมขนาด 3 x 3 มม. เนื้อเปลือกสมองส่วน Primary somatosensory cortex (5–8 mm lateral and 1–4 mm posterior to bregma) จากนั้นจะทำความสะอาดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจนสามารถมองเห็นหลอดเลือดแดงอย่างชัดเจน ซึ่งในขณะที่ทำการทดลองจะทำการรักษาภาวะความชุ่มชื้นของเยื่อหุ้มสมองด้วย Normal saline ตลอดเวลา โพรบที่ใช้วัดการไหลเวียน (Model MNP100XP, ADIstruments) จะยึดด้วย Adjustable clamp และขาตั้งปรับ และค่อย ๆ เลื่อนปลายโพรบให้แตะบนผิวของหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง ซึ่งจะสังเกตได้โดยการส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ในการผ่าตัด (Stereozoom dissecting microscope, model SMZ800, Nikon) สำหรับปลายหัวต่อของโพรบจะต่อเข้ากับเครื่องวัดการไหลเวียน (Flow meter, model ML191, ADIstruments) ซึ่งต่ออยู่กับ PowerLab 4SP (ADIstruments) สัญญาณการไหลเวียน ความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจจะแสดงบนคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม Chart v.5.4 (ADIstruments) (รูปที่ 2-2 B)

การทดลองนี้จะเปรียบเทียบปริมาณและอัตราการไหลของโลหิตที่หลอดเลือดแดงบริเวณผิวสมอง ความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูแต่ละกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ฉีด (Intravenous injection) สารสกัดสมุนไพร (20, 40, 60 mg/kg BW) สารสกัดแปะก๊วย (20, 40, 60 mg/kg BW) ยาเพิ่มความดัน Norepinephrine (1 µg/kg BW) ยาลดความดัน Sodium nitroprusside (25µg/kg BW) และยามาตรฐาน Donepezil (1 mg/kg BW) โดยเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการฉีดสารสกัดหรือยา รวมทั้งศึกษาผลดังกล่าว ในกรณีหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร (40 mg/kg BW) สารสกัดแปะก๊วย (60 mg/kg BW) หรือยามาตรฐาน Donepezil (1 mg/kg BW) เป็นเวลา 2 เดือน โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้สารสกัดหรือยา

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจ และการเปลี่ยนแปลงของแอมพลิจูดของการไหลเวียนโลหิต จะถูกรวบรวมเพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สถิติที่จะใช้ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของข้อมูลคือ One-way repeated measures ANOVA และตามด้วย Dunnett's pos hoc test และใช้ Student's paired *t*-test ทดสอบความแตกต่างของข้อมูล โดยตั้งค่านัยสำคัญเท่ากับ 0.05

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1. ผลของการได้รับสารสกัดหรือยามาตรฐานการโดยการกินติดต่อกันนาน 2 เดือน (Subchronic effect)

3.1.1 ผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลองที่ไม่สลบ (Subchronic effect)

เมื่อให้หนูทดลองได้รับสารสกัดพรมมิ ขนาด 40 mg/kg BW หรือ สารสกัดแปะก๊วย ขนาด 60 mg/kg BW หรือ ยา Donepezil ขนาด 1 mg/kg BW ทุกวัน ทางปาก เป็นเวลา 2 เดือน แล้ววัดความดันโลหิต ซึ่งเป็นค่าความดันโลหิตสูงสุดขณะหัวใจบีบตัว (Systolic blood pressure) ทางหาง และวัดอัตราการเต้นของหัวใจในขณะที่สัตว์ทดลองมีสติอยู่ในอุปกรณ์ Restrainer พบว่าความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจในกลุ่มควบคุมที่ให้ตัวทำละลายสารสกัด (Distilled water) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มที่ให้สารสกัดหรือยา ($p > 0.05$, ANOVA) เมื่อเปรียบเทียบภายในช่วงระยะเวลาเดียวกัน ดังนั้นการให้สารสกัดพรมมิ สารสกัดแปะก๊วย หรือ ยา Donepezil ติดต่อกันนาน 2 เดือนจึงไม่มีผลต่อความดันโลหิต (ตารางที่ 2-1) และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลอง (ตารางที่ 2-2)

ตารางที่ 2-1 ผลของสารสกัดพรมมิ (Brahmi extract) ขนาด 40 mg/kg BW สารสกัดแปะก๊วย (Ginkgo extract) ขนาด 60 mg/kg BW และ ยา Donepezil ขนาด 1 mg/kg BW เมื่อให้ทางปาก เป็นระยะเวลา 2 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต (Systolic blood pressure) ในหนูทดลองที่มีสติ (Conscious rats) ค่าต่าง ๆ คือ Mean \pm SEM (n = 5)

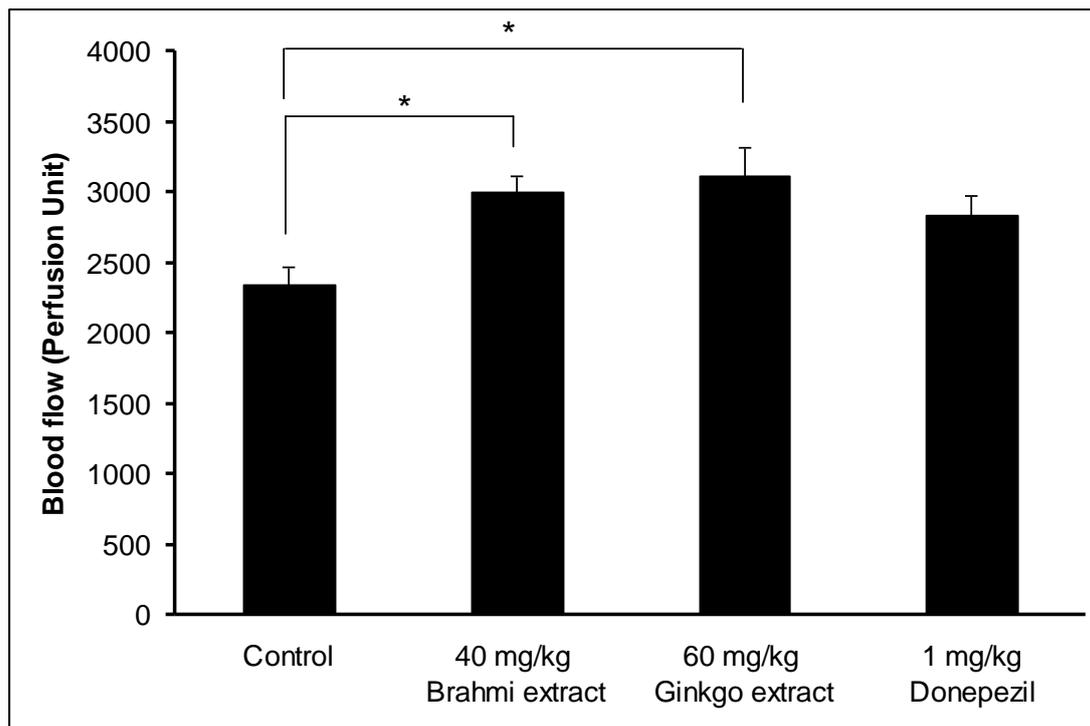
Drugs	Systolic blood pressure (mmHg)		
	Month 0	Month 1	Month 2
Control	114.6 \pm 4.92	129.4 \pm 2.66	122.2 \pm 5.45
40 mg/kg BW Brahmi extract	105.8 \pm 3.10	124.8 \pm 2.69	114.8 \pm 2.84
60 mg/kg BW Ginkgo extract	114.4 \pm 4.46	138.4 \pm 6.25	118.0 \pm 4.34
1 mg/kg BW Donepezil	120.8 \pm 4.88	123.4 \pm 5.38	114.6 \pm 5.65

ตารางที่ 2-2 ผลของสารสกัดพรมมิ (Brahmi extract) ขนาด 40 mg/kg BW สารสกัดแปะก๊วย (Ginkgo extract) ขนาด 60 mg/kg BW, และยา Donepezil ขนาด 1 mg/kg BW เมื่อให้ทางปาก เป็นระยะเวลา 2 เดือน ต่ออัตราการเต้นของหัวใจ (Heart rate) ในหนูทดลองที่มีสติ (Conscious rats) ค่าต่าง ๆ คือ Mean \pm SEM (n = 5)

Drugs	Heart rate (BPM)		
	Month 0	Month 1	Month 2
Control	402.28 \pm 12.78	345.44 \pm 29.89	333.44 \pm 10.58
40 mg/kg Brahmi extract	385.64 \pm 10.24	325.40 \pm 5.49	336.74 \pm 1.80
60 mg/kg Ginkgo extract	399.82 \pm 11.18	329.52 \pm 17.92	336.00 \pm 12.85
1 mg/kg Donepezil	368.10 \pm 14.39	314.26 \pm 12.82	290.98 \pm 12.34

3.1.2 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองในหนูทดลองที่สลบ (Subchronic effect)

เมื่อสิ้นสุดการให้สารสกัดเป็นระยะเวลา 2 เดือน หนูทดลองถูกทำให้สลบ แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองโดยวัดในตำแหน่งที่หลอดเลือดแดงมีขนาดเท่ากัน (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100 μ m) ในทุกกลุ่มการทดลอง พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิ (40 mg/kg BW) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแปะก๊วย (60 mg/kg BW) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$, one-way repeated measures ANOVA และ Tukey's test) กล่าวคือ ค่าเฉลี่ยของอัตราการไหลเวียนโลหิตกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิ และสารสกัดแปะก๊วยมีค่าเท่ากับ 2337 \pm 125, 3002 \pm 108 (เพิ่มขึ้น 28.45% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม), และ 3110 \pm 206 (เพิ่มขึ้น 33.08% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) Perfusion unit (PU) ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิ กับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแปะก๊วย (รูปที่ 2-3) ส่วนการให้ยา 1 mg/kg BW Donepezil (2834 \pm 144 PU) พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มการไหลเวียนโลหิตแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$, ANOVA) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2-3)

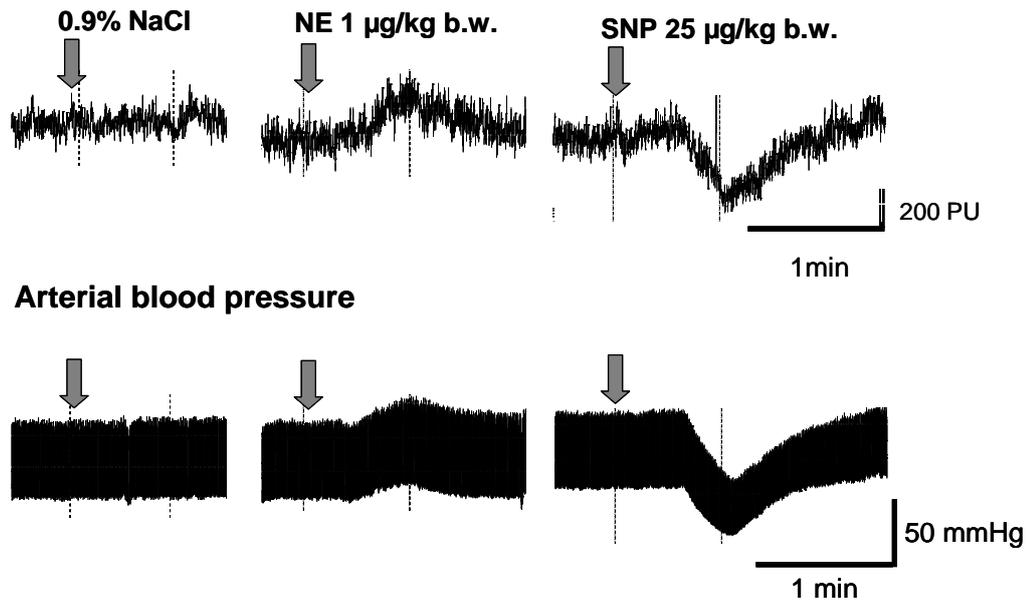


รูปที่ 2-3 ผลของสารสกัดพรมมิ (Brahmi extract) ขนาด 40 mg/kg BW สารสกัดแปะก๊วย (Ginkgo extract) ขนาด 60 mg/kg BW, และยา Donepezil ขนาด 1 mg/kg BW เมื่อให้ทางปาก เป็นระยะเวลา 2 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตในหลอดเลือดแดงที่ผิวเปลือกสมองในหนูทดลองที่สลบ ค่าต่าง ๆ คือ Mean \pm SEM (n = 5-6), * p <0.05 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ให้สารสกัด

3.2 ผลของการได้รับสารสกัดหรือยามาตรฐานการโดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ (Acute effect)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาผลแบบ Acute effect ของสารสกัดต่าง ๆ ที่มีต่อความดันโลหิต อัตราการเต้นของหัวใจ และการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองในหนูทดลองที่สลบ ซึ่งทำโดยสอดสาย Polyethylene tube ไปยัง Femoral vein เพื่อฉีดสารสกัดต่าง ๆ ผ่านเข้าทาง Intravenous injection โดยใช้สารสกัดพรมมิขนาด 20, 40, 60 mg/kg BW หรือ สารสกัดแปะก๊วยขนาด 20, 40, 60 mg/kg BW หรือยามาตรฐานต่าง ๆ ได้แก่ 1 mg/kg BW Donepezil (DNP), 1 μ g/kg BW Norepinephrine (NE) และ 25 μ g/kg BW Sodium nitroprusside (SNP) และสอดสาย Polyethylene tube อีกอันไปยัง Femoral artery สำหรับวัดความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ ขณะเดียวกันทำการวัดการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองไปพร้อมกัน ตัวอย่างกราฟค่าความดันโลหิตและอัตราการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่เกิดจากการให้ยามาตรฐาน NE และ SNP แสดงดังรูปที่ 2-4

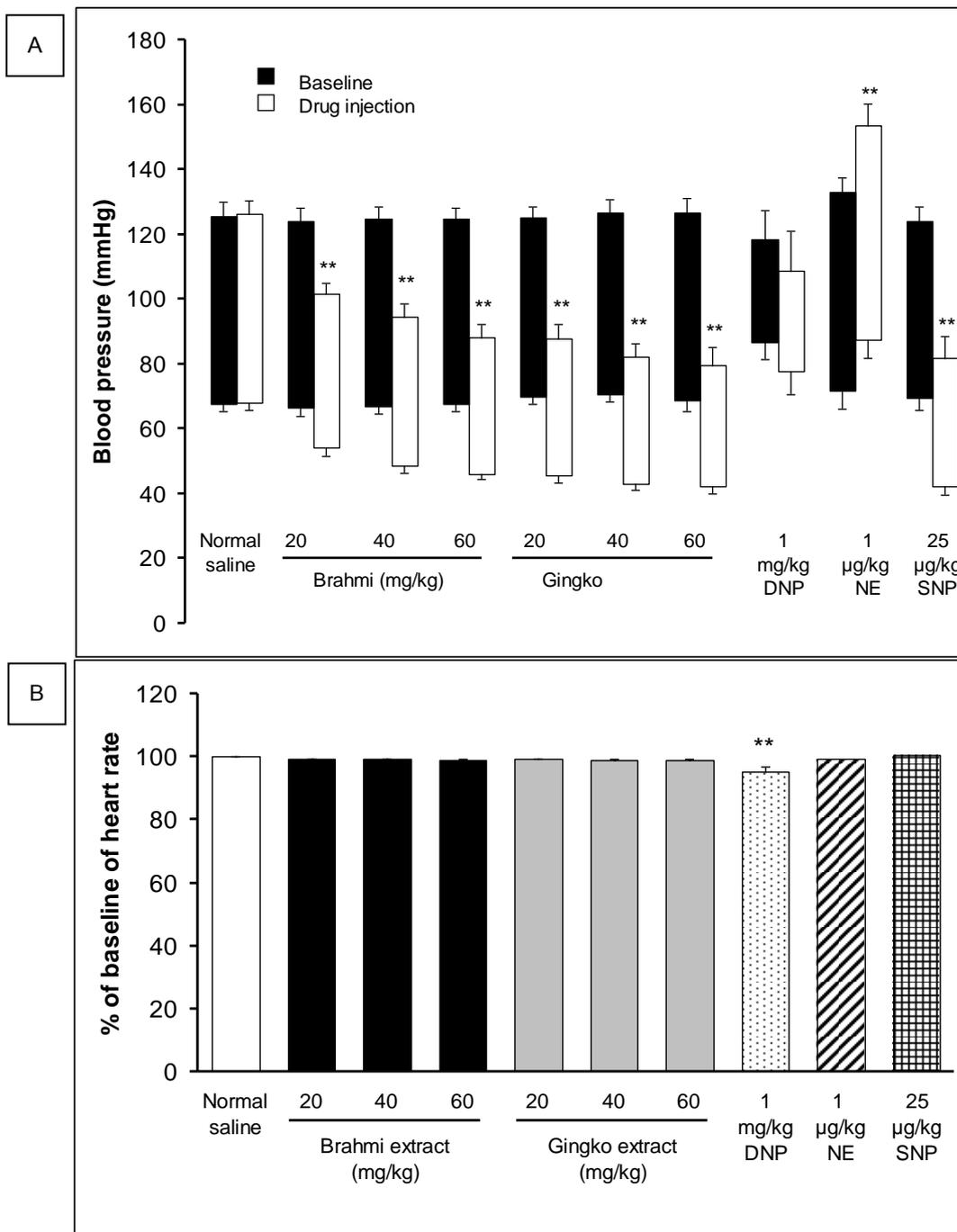
Cerebral blood flow



รูปที่ 2-4 ผลการทดสอบสารหรือยาที่มีฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิต และการไหลเวียนโลหิตที่ผิวสมอง โดยเริ่มจากการฉีดตัวทำละลาย (0.9% NaCl) ด้วยปริมาตร 0.2 มล./10 วินาที ไม่ส่งผลใดๆ ต่อการเปลี่ยนแปลง ความดันโลหิต หรือการไหลเวียนโลหิตที่ผิวสมอง แต่เมื่อนฉีด Norepinephrine (NE, 1 µg/kg BW) ซึ่งเป็นสารที่เพิ่มการทำงานของหัวใจบีบ ทำให้หลอดเลือดหดตัวและส่งผลเพิ่มความดันโลหิต สามารถทำให้ความดันโลหิตและการไหลเวียนโลหิตที่ผิวสมองเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ตรงกันข้ามกับผลเมื่อนฉีดสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวและลดความดันโลหิต เช่น Sodium nitropruside (SNP, 25 µg/kg BW) สามารถทำให้การไหลเวียนโลหิตที่ผิวสมองลดต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด

3.2.1 ผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจในหนูทดลองที่สลบ (Acute effect)

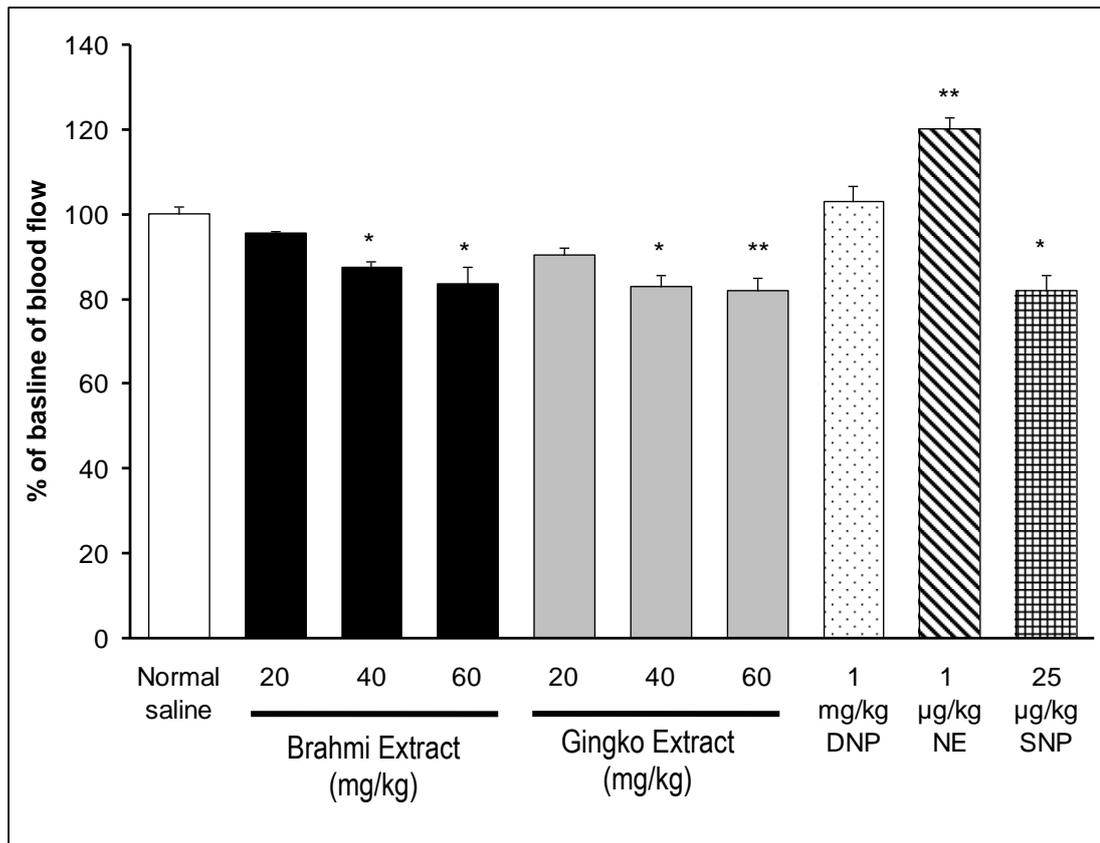
เมื่อให้สารทางหลอดเลือดดำแล้ววัดความดันโลหิตโดยตรง พบว่า Normal saline ไม่ทำให้ความดันโลหิตทั้งความดัน Systolic blood pressure (SP) และ Diastolic blood pressure (DP) เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อนฉีดสารสกัดพรมมิ (20, 40, 60 mg/kg BW) หรือสารสกัดแปะก๊วย (20, 40, 60 mg/kg BW) ทำให้ทั้งความดัน SP และ DP ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$, Student's paired t-test) เมื่อเปรียบเทียบค่าความดันก่อนให้สารสกัด โดยค่าความดันลดลงมากขึ้นตามขนาดของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น (Dose-dependent manner) (รูปที่ 2-5 A) ทั้งนี้สารสกัดแปะก๊วยมีแนวโน้มในการลดความดันโลหิตมากกว่าสารสกัดพรมมิ แต่การให้สารสกัดพรมมิ หรือสารสกัดแปะก๊วยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการเต้นของหัวใจ (รูปที่ 2-5 B) ในขณะที่การให้ยามาตรฐาน Donepezil (1 mg/kg BW) ไม่มีผลต่อความดันโลหิต (รูปที่ 2-5 A) แต่มีผลลดอัตราการเต้นของหัวใจ (รูปที่ 2-5 B)



รูปที่ 2- 5 ผลต่อความดันโลหิต (A) และอัตราการเต้นของหัวใจ (B) เมื่อฉีดสารสกัดพรมมิ (Brahmi extract) (20, 40, 60 mg/kg BW), สารสกัดแปะก๊วย (20, 40, 60 mg/kg BW), 1 mg/kg BW Donepezil (DNP), 1 µg/kg Norepinephrine (NE), หรือ 25 µg/kg Sodium nitroprusside (SNP) เข้าทางหลอดเลือดดำในหนูที่สลบ รูป A แสดงความดันโลหิตเปรียบเทียบระหว่างก่อนฉีด (Baseline) กับหลังฉีดสารสกัดและยาต่างๆ (Drug injection) โดยจุดสูงสุดของกราฟคือ Systolic blood pressure และจุดต่ำสุดของกราฟคือ Diastolic blood pressure รูป B แสดงค่าอัตราการเต้นของหัวใจแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงหลังให้สารสกัดหรือยาเมื่อกำหนดให้ก่อนให้สารสกัดหรือยาเป็น Baseline (100%) ค่าต่าง ๆ คือ Mean ± SEM (n = 5-10), ** = $p < 0.01$, Student's paired t-test

3.2.2 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองในหนูทดลองที่สลบ (Acute effect)

เมื่อแสดงค่าของการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยกำหนดให้ค่าการไหลเวียนโลหิตก่อนฉีดสารเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับ Normal saline ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตที่เปลือกสมอง (รูปที่ 2-6)



รูปที่ 2-6 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง เมื่อฉีดสารสกัดพรมมิ (Brahmi extract) (20, 40, 60 mg/kg BW), สารสกัดแปะก๊วย (20, 40, 60 mg/kg BW), 1 mg/kg BW Donepezil (DNP), 1 µg/kg Norepinephrine (NE), หรือ 25 µg/kg Sodium nitroprusside (SNP) เข้าทางหลอดเลือดดำในหนูที่สลบ ค่าการไหลเวียนโลหิตแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ (% of Baseline) โดยกำหนดให้ค่าการไหลเวียนโลหิตก่อนที่จะฉีดสารสกัดหรือยา (Baseline) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตที่เกิดขึ้นเมื่อฉีดสารสกัดหรือยา ค่าต่าง ๆ คือ Mean ± SEM (n = 5-8), ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ให้ Normal saline และกลุ่มที่ให้สารสกัดหรือยาต่าง ๆ (Student's paired t-test)

เมื่อให้สารสกัดพรมมิ (20, 40, 60 mg/kg BW) หรือสารสกัดแปะก๊วย (20, 40, 60 mg/kg BW) พบว่าสารสกัดพรมมิและสารสกัดแปะก๊วยทำให้การไหลเวียนโลหิตที่เปลือกสมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$, Student's paired t-test) และเมื่อเพิ่มขนาดยาพบว่ามึผลลดการไหลเวียนโลหิตมากขึ้น (Dose-dependent manner) (รูปที่ 2-6)

การให้ยาหรือสารมาตรฐาน ได้แก่ ยาเพิ่มความดันโลหิต ได้แก่ 1 $\mu\text{g/kg}$ BW Norepinephrine (NE) มีผลเพิ่ม การไหลเวียนโลหิตที่เปลือกสมอง ในขณะที่ยา ลดความดันโลหิต 25 $\mu\text{g/kg}$ BW Sodium nitroprusside (SNP) มีผลลดการไหลเวียนโลหิตที่เปลือกสมอง และเมื่อฉีดยารักษาโรค Alzheimer ได้แก่ 1 mg/kg BW Donepezil (DNP) พบว่าไม่มีผลต่อการไหลเวียนโลหิตที่เปลือกสมอง (รูปที่ 2-6)

อภิปรายผล

จากการศึกษาผลแบบ Subchronic effect ของสารสกัดต่อความดันโลหิต ในหนูทดลองที่ไม่สลบ และได้รับสารสกัดสมุนไพรพรมมิทางปาก ติดต่อกันนาน 2 เดือน พบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดพรมมิ ขนาด 40 mg/kg BW หรือสารสกัดแปะก๊วย ขนาด 60 mg/kg BW หรือ ยา Donepezil ขนาด 1 mg/kg ไม่มีผลต่อความดันโลหิต Systolic blood pressure (SP) และ อัตราการเต้นของหัวใจ ซึ่งผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Kubota และคณะ (Kubota et al., 2006) ที่รายงานว่า การให้หนูกินอาหารที่มี ส่วนผสมของแปะก๊วยนานติดต่อกัน 30 วัน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความดันโลหิต SP ในหนูปกติ ส่วนผลของการให้สารสกัดพรมมิระยะยาวต่อความดันโลหิตนั้นยังไม่มีรายงานมาก่อน การที่สารสกัดพรมมิไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตในหนูปกติ นับเป็นข้อดีที่บ่งชี้ให้เห็นว่าการได้รับพรมมิติดต่อกันเป็นเวลานาน จะไม่ส่งผลข้างเคียงต่อความดันโลหิต

การได้รับสารสกัดพรมมิ หรือสารสกัดแปะก๊วยเป็นเวลา 2 เดือนมีผลเพิ่มการไหลเวียนโลหิต เฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง ทั้งนี้ผลดังกล่าวของสารสกัดแปะก๊วยสอดคล้องกับงานวิจัย อื่นที่รายงานว่าแปะก๊วยมีผลเพิ่มการไหลเวียนโลหิตในสมองของหนูแรท (Krieglstein et al., 1986) และ อาจเป็นหนึ่งในกลไกที่สำคัญที่ทำให้ สารสกัดแปะก๊วยมีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และความจำ โดยมีรายงานการ วิจัยสนับสนุนทั้งในสัตว์ทดลอง (Winter, 1998; Paganelli et al., 2006; Takuma et al., 2007; Walesiuk and Braszko, 2007; Nooshinfar et al., 2008) และ ในมนุษย์ (Diamond et al., 2000; Kennedy et al., 2000; Birks et al., 2002; Dodge et al., 2008) ส่วนผลของสารสกัดพรมมิที่มีต่ออัตราการไหลของเลือดนั้นยังไม่เคยมี รายงานมาก่อน เช่นเดียวกันกับกรณีของสารสกัดแปะก๊วย อาจกล่าวได้ว่าการเพิ่มการไหลเวียนโลหิต เฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองจากการได้รับสารสกัดพรมมิอาจเป็นหนึ่งในกลไกที่ส่งผล เพิ่มการเรียนรู้และความจำ ที่มีรายงานสนับสนุน ทั้งในคน และ สัตว์ทดลอง กล่าวคือ จาก การศึกษาทาง คลินิกพบว่า การให้พรมมิ (300 mg/day) นานติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ช่วยเพิ่มความสามารถในการจำ ในอาสาสมัครสุขภาพดี (Stough, 2001) และเพิ่มความจำในผู้สูงอายุ (≥ 65 ปี) (Calabrese et al., 2008) ส่วน

ในสัตว์ทดลองมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่พบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์ของพรมมีมีผลเพิ่มการเรียนรู้และความจำทั้งในหนูแรทและหนูถีบจักร (Singh and Dhawan, 1982; Das et al., 2002; Uabundit et al., 2008; Yun et al., 2009; Uabundit et al., 2010)

เมื่อเปรียบเทียบผลในการ เพิ่มการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองของสารสกัดพรมมีกับสารสกัดแปะก๊วย พบว่าสารสกัดแปะก๊วยมีแนวโน้มเพิ่มไหลเวียนโลหิตได้ดีกว่าพรมมีเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการให้ยามาตรฐาน Donepezil ติดต่อกันนาน 2 เดือน ผู้วิจัยพบว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงใด ๆ ต่อการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับฤทธิ์ของ Donepezil ต่อการเพิ่มไหลเวียนเลือดในสมอง อนึ่งการศึกษาที่ผ่านมาของ Donepezil ทั้งหมดเป็นการศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วย Alzheimer หรือ Parkinson (Nakano et al., 2001; Hanyu et al., 2003; Imamura et al., 2008)

กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดพรมมี และแปะก๊วยในการเพิ่มการไหลเวียนโลหิตน่าจะเกี่ยวข้องกับการที่พรมมีและแปะก๊วยมีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัว ดังรายงานการวิจัยที่ผ่านมาที่รายงานว่าสมุนไพรมมีมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัว (Channa et al., 2003) โดยกลไกการออกฤทธิ์น่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการไหลของ Ca^{2+} เข้าเซลล์ (Dar & Channa, 1999; Chootip et al., 2008) และ อาจเกี่ยวข้องกับ Prostacyclin pathway (Dar & Channa, 1997; Chootip et al., 2008) ตลอดจนยังพบว่า การคลายตัวของหลอดเลือดไม่ขึ้นกับ Endothelium และไม่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น Mucarinic receptors (Dar & Channa, 1997) ทำนองเดียวกันกับรายงานการออกฤทธิ์ของสมุนไพรรแปะก๊วยที่สนับสนุนว่าสารสกัดแปะก๊วยมีฤทธิ์ในการทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยออกฤทธิ์ผ่านทาง Endothelium และส่งผลเพิ่มการผลิต Nitric oxide (Nishida and Satoh, 2004; Kubota et al., 2006; Koltermann et al., 2007; Wu et al., 2008)

จากการศึกษาผลแบบ Acute effect ของสารสกัดพรมมี (20, 40, 60 mg/kg BW) หรือ สารสกัดแปะก๊วย (20, 40, 60 mg/kg BW) โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำในหนูที่สลบพบว่ามีผลลดความดันโลหิตทั้ง Systolic blood pressure (SP) และ Diastolic blood pressure (DP) ทำให้ความดันโลหิตโดยรวมทั่วร่างกายลดลงจึงส่งผลให้อัตราการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองลดลงตามไปด้วย การที่สารสกัดมีผลลด SP เป็นการบ่งชี้ว่าสารสกัดน่าจะมีผลลดความแรงในการบีบตัวของหัวใจ ส่วนการที่สารสกัดมีผลลด DP เป็นการบ่งชี้ว่าสารสกัดน่าจะมีผลลดความต้านทานการไหลของเลือดโดยรวม (Total peripheral resistance) ซึ่งคาดว่าเกิดจากที่สารสกัดมีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัว ทั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาแบบ Acute effect ของสารสกัดพรมมีที่ผู้วิจัยได้ศึกษามาแล้วก่อนหน้านี้ว่ามีผลลดความดันโลหิตเมื่อให้แบบฉีดเข้าหลอดเลือดดำ และมีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวเมื่อศึกษาในหลอดเลือดทดลองโดยการประยุกต์สารสกัดโดยตรงกับให้กับหลอดเลือด (Chootip et al., 2008) เช่นเดียวกันกับสารสกัดแปะก๊วยที่มีรายงานว่า มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัวดังกล่าวไปแล้วข้างต้น (Nishida and Satoh, 2004; Kubota et al., 2006; Koltermann et al., 2007; Wu et al., 2008)

ส่วนการให้ยา Donepezil (1 mg/kg BW) โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำในหนูที่สลบพบว่าไม่ส่งผลใด ๆ ต่อความดันโลหิตทั้ง SP และ DP และไม่มีผลเปลี่ยนแปลง อัตราการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง แต่ Donepezil มีผลทำให้อัตราการเต้นของหัวใจลดลง ซึ่งน่าจะอธิบายได้จากกลไกการออกฤทธิ์ของยา Donepezil ที่มีผลยับยั้งเอนไซม์ Acetylcholine esterase ที่ส่งผลเพิ่มระดับ Acetylcholine ที่ปลายประสาท Parasympathetic ที่ไปเลี้ยงบริเวณ SA node ของหัวใจและมีผลลดความเร็วในการสร้างสัญญาณไฟฟ้าทำให้อัตราการเต้นของหัวใจลดลงตามลำดับ

ในการศึกษาผลแบบ Acute effect จึงสรุปได้ว่าการลดลงความดันโลหิตน่าจะเป็นสาเหตุหลักที่ส่งผลลดการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนแปลงเพียงชั่วคราว เมื่อเวลาผ่านไปค่าความดันโลหิตและการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองก็กลับสู่ปกติ

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดพรมมิ (40 mg/kg BW) มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการไหลเวียนโลหิตบริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองเมื่อมีการให้สารสกัดพรมมินานติดต่อกัน 2 เดือน ทางปาก โดยผลดังกล่าวไม่แตกต่างจากการให้สารสกัดแปะก๊วย (60 mg/kg BW) ในขณะที่ยามาตรฐาน Donepezil (1 mg/kg BW) ไม่มีผลใด ๆ ต่อการไหลเวียนโลหิตบริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง สารสกัดและยามาตรฐานไม่มีผลใด ๆ ต่อความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ เมื่อให้ทางปากติดต่อกัน นาน 2 เดือน

ในทางตรงกันข้ามการให้สารสกัดพรมมิ (20, 40, 60 mg/kg BW) หรือสารสกัดแปะก๊วย โดยตรงทางหลอดเลือดดำส่งผลต่อทั้งความดันโลหิตและอัตราการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ ในขณะที่ยามาตรฐาน Donepezil (1 mg/kg BW) ไม่มีผลใด ๆ ต่อทั้งความดันโลหิตและอัตราการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง แต่มีผลลดอัตราการเต้นของหัวใจ

กลไกที่ส่งผลให้เพิ่มการไหลเวียนโลหิตที่บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมองในกรณีที่ให้สารสกัดพรมมินานติดต่อกัน 2 เดือนต้องทำการศึกษาต่อไป

บรรณานุกรม

1. Barnes CA, Meltzer J, Houston F, Orr G, McGann K and Wenk GL. (2000) Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. *Neuroscience*. 99(1):17-23
2. Birks J, Grimley Evans J. (2002) Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 18(2):CD003120.
3. Channa, S., Dar, A., Yaqoop, M., Anjum, S., Sultani, Z., Rahman, A. Bronchovasodilatory activity of fractions and pure constituents isolated from *Bacopa monniera*. (2003) *J. Ethno. Pharmacol.* 86: 27-35.
4. Chootip K, Bualeong T, Mahasiripanth T. (2008) Pharmacological actions of *Bacopa monnieri* on rat isolated aorta. The 3rd International Conference on Forensic Science and Medical Science 2008.
5. Dar, A. and Channa, S. Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig. *J. Ethno. Pharmacol.* 66: 167-174. 1999.
6. Dar, A. and Channa, S. Relaxant effect of ethanol extract of *Bacopa monniera* on trachea, pulmonary artery and aorta from rabbit and guinea-pig. *Phytother. Res.* 11: 323-325. 1997.
7. Das A, Shanker G, Nath C, Pal R, Singh S, and Singh H (2002) A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*: anticholinesterase and cognitive enhancing activities, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 893–900.
8. Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwei N, Matheis RJ, Noskin O, Richards JA, and Schoenberger NE (2000) *Ginkgo biloba* extract: mechanisms and clinical indications, *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 81, 668–678.
9. Dodge HH, Zitzelberger T, Oken BS, Howieson D, and Kaye J. (2008) A randomized placebo-controlled trial of ginkgo biloba for the prevention of cognitive decline. *Neurology*. doi:10.1212/01.wnl.0000303814.13509.db
10. Garai S, Mahato SB, Ohtani K, Yamasaki K (1996a) Bacopasaponin D-a pseudojubilogenin glycoside from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry*. 43:447-449.
11. Garai S, Mahato SB, Ohtani K, Yamasaki K (1996b) Dammarane-type triterpenoid saponins from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry*. 42:815-820.

12. Hanyua H, Shimizua T, Tanakaa Y, Takasakia M, Koizumib K, and Abeb K. (2003) Regional Cerebral Blood Flow Patterns and Response to Donepezil Treatment in Patients with Alzheimer's Disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 15:177-182 (DOI: 10.1159/000068785)
13. Imamura K, Wada-Isoe K, Kowa H, Tanabe Y, Nakashima K. (2008) The effect of donepezil on increased regional cerebral blood flow in the posterior cingulate cortex of a patient with Parkinson's disease dementia. *Neurocase*. 14: 271 – 275 (DOI: 10.1080/13554790802269984)
14. Joshi H and Parle M. (2006) Brahmi rasayana improves learning and memory in mice. *Evid Based Complement Alternat. Med*. 3:79-85.
15. Kennedy DO, Scholey AB, and Wesnes KA (2000) The dose-dependent cognitive effects of acute administration of *Ginkgo biloba* to healthy young volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 151, 416–423.
16. Kishore K and Singh M (2005) Effect of bacosides, alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi), on experimental amnesia in mice. *Indian J Exp Biol* 43:640-645.
17. Koltermann A., Hartkorn A., Koch E., Vollmar A. M., Zahler, S. (2007) Ginkgo biloba extract EGb_761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci* 64: 1715-1722.
18. Li M, Ratcliffe SJ, Knoll F, Wu J, Ances B, Mardini W and Floyd TF (2006) Aging: impact upon local cerebral oxygenation and blood flow with acute isovolemic hemodilution. *J Neurosurg Anesthesiol* 18:125-131.
19. Mahadevan S and Park Y. (2008) Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L.: chemistry, efficacy, safety, and uses. *J. Food Sci.* 73(1):R14-9.
20. Masamoto K, Kershaw J, Ureshi M, Takizawa N, Kobayashi H, Tanishita K and Kanno I (2007) Apparent diffusion time of oxygen from blood to tissue in rat cerebral cortex: implication for tissue oxygen dynamics during brain functions. *J. Appl. Physiol.* 103:1352-1358.
21. Nakano S, Asada T, Matsuda H, Uno M, and Takasaki M (2001). Donepezil hydrochloride preserves regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease. *J Nucl Med*, 42, 1441-1445.
22. Nathan PJ, Tanner S, Lloyd J, Harrison B, Curran L, Oliver C and Stough C. (2004) Effects of a combined extract of *Ginkgo biloba* and *Bacopa monniera* on cognitive function in healthy humans. *Hum Psychopharmacol* 19:91-96.
23. Niedermeyer E (2006) Alzheimer disease: caused by primary deficiency of the cerebral blood flow. *Clin EEG Neurosci* 37:175-177.

24. Nishida S., Satoh H. (2004) Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in Ginkgo biloba extract. *Clinica Chimica Acta* 339: 129–133.
25. Nooshinfar E, Lashgari R, Haghparast A and Sajjadi S. (2008) NMDA receptors are involved in Ginkgo extract-induced facilitation on memory retention of passive avoidance learning in rats. *Neurosci Lett.* 432(3):206-11.
26. Paganellia RA, Benetolia A, and Milani H. (2006) Sustained neuroprotection and facilitation of behavioral recovery by the *Ginkgo biloba* extract, EGb 761, after transient forebrain ischemia in rats *Behavioural Brain Research* 174 (1), 70-77.
27. Preedapirom W, Sombutthaweekul R, Nakdook W, Ingkaninan K, Taepavarapruk N, Taepavarapruk P (2008b) Investigation of Cognitive Restoring Property of Some Thai Herbs Using Experimental Models of Amnesia. The 3rd International Conference on Forensic Science and Medical Science, 3:24.
28. Rastogi S, Pal R, and Kulshreshtha Dk (1994) Bacoside A3--a triterpenoid saponin from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 36:133-137.
29. Roodenrys S, Booth D, Bulzomi S, Phipps A, Micallef C, and Smoker J (2002) Chronic effects of Brahmi (*Bacopa monnieri*) on human memory. *Neuropsychopharmacology* 27:279-281.
30. Sairam K, Dorababu M, Goel RK, and Bhattacharya SK (2002) Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine* 9:207-211.
31. Shibata K, Narumoto J, Kitabayashi Y, Ushijima Y, and Fukui K (2008) Correlation between anosognosia and regional cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 435:7-10.
32. Singh HK and Dhawan BN (1982) Effect of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi) extract on avoidance responses in rat. *J Ethnopharmacol* 5:205-214.
33. Small, G., Rabins, P., and Barry, P. (1997). Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society. *Journal of the American Medical Association*, 278(16), 1363-1371.
34. Stough C, Lloyd J, Clarke J, Downey LA, Hutchison CW, Rodgers T, and Nathan PJ (2001) The chronic effects of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 156:481-484.

35. Taepavarapruk P, Sewana S, Jenapongsa R, Taepavarapruk N (2006) Investigation of Nootropic Effects of *Bacopa monnieri* Extract on Global Amnesic Rats. Poster presentation, The 35th Annual Meeting of the Physiology Society of Thailand, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. May 3-5, 2006.
36. Takuma K, Hoshina Y, Arai S, Himeno Y, Matsuo A, Funatsu Y, Kitahara Y, Ibi D, Hayase M, Kamei H, Mizoguchi H, Nagai T, Koike K, Inoue M, and Yamada K (2007) *Ginkgo biloba* extract EGb 761 attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction resulting from chronic restraint stress in ovariectomized rats. *Neuroscience* 149, Issue 2, 256-262.
37. Tonnesen J, Pryds A, Larsen EH, Paulson OB, Hauerberg J, Knudsen GM (2005) Laser Doppler flowmetry is valid for measurement of cerebral blood flow autoregulation lower limit in rats. *Exp Physiol* 90:349-355.
38. Tripathi YB, Chaurasia S, Tripathi E, Upadhyay A, Dubey GP (1996) *Bacopa monniera* Linn. as an antioxidant: mechanism of action. *Indian J Exp Biol* 34:523-526.
39. Tsukada H, Sato K, Kakiuchi T, Nishiyama S. (2000) Age-related impairment of coupling mechanism between neuronal activation and functional cerebral blood flow response was restored by cholinesterase inhibition: PET study with microdialysis in the awake monkey brain. *Brain Res.* 857(1-2):158-64.
40. US FDA: <http://www.fda.gov/CDER/foi/label/2001/20690s161bl.pdf>.
41. V.N. Luinea, G. Mohana, Z. Tub, S.M.N. Efangeb (2002) Chromaprolin and Chromaperidine, nicotine agonists, and Donepezil, cholinesterase inhibitor, enhance performance of memory tasks in ovariectomized rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 74: 213–220.
42. Walesiuk A and Braszko JJ (2007) Preventive action of *Ginkgo biloba* in stress- and corticosterone-induced impairment of spatial memory in rats. *Phytomedicine* (in press).
43. Wang Y, Wang L, Wu J, Cai J (2006) The *in vivo* synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. *Br J Pharmacol* 148:147-153.
44. WHO: What are the public health implications of global ageing?
<http://www.who.int/features/qa/42/en/index.html>, <http://www.who.int/ageing/en/index.html>
45. Winter JC. (1998) The effects of an extract of *Ginkgo biloba*, EGb 761, on cognitive behavior and longevity in the rat. *Physiol Behav.* 63(3):425-33.

46. Wu Y., Li S., Cui W., Zu X., Du J., Wang F. (2008) Ginkgo biloba extract improves coronary blood flow in healthy elderly adults: Role of endothelium-dependent vasodilation. *Phytomedicine* 15: 164–169.



รายงานการวิจัย
โครงการย่อยที่ 3
เรื่อง

ผลของสารสกัดพรมมิต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่
สมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูแรท

Effect of Brahmi extract on hippocampal neurotransmission in rats

โดย

ผศ. ดร. นิวัตติ เทพวราพฤกษ์

ดร. พรนรินทร์ เทพวราพฤกษ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีงบประมาณ 2552

กิตติกรรมประกาศ

สารศักดิ์สมุนไพรรพรมิติที่ใช้งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.กรกนก อิงคินันท์ และคณะ จากภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ทางคณะผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ สาธารณูปโภคที่จำเป็นในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง และสถานที่ทำการวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2552 ด้วยงบประมาณ 350,000 บาท

บทคัดย่อ

พรมมิ หรือ *Bacopa monnieri* เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการช่วยบำรุงสมองและบำรุงความทรงจำ เนื่องจากที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาถึงผลทางสรีรวิทยาของสารสกัดพรมมิต่อการเปลี่ยนแปลงการถ่ายทอดสัญญาณประสาทหรือผลต่อปริมาณสารสื่อประสาทในสมองส่วน hippocampus ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบข้อมูลในส่วนนี้โดยศึกษาเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบแปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) และยา donepezil (Don) ต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ ต่อการเกิดปรากฏการณ์ถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่ดีขึ้นอย่างยาวนาน (LTP) และต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในสมองของหนูแรทที่แก่ตามธรรมชาติ ผลการทดลองหลังจากป้อนสารสกัดหรือยาติดต่อกันนาน 3 เดือน พบว่า หนูแก่ที่ได้รับสารสกัดพรมมิ (40 มก./กก.) มีการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ และความสามารถในการจดจำสิ่งของได้ดีพอๆ กับหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดจากใบแปะก๊วย (60 มก./กก.) และกลุ่มที่ได้รับยา donepezil (1 มก./กก.) เมื่อเปรียบเทียบกับผลของหนูแก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่น นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ทางชีวเคมีของน้ำปัสสาวะส่วนฮิปโปแคมปัสจากหนูที่ได้รับพรมมิมิการเพิ่มของกลูตาเมต กลูตามีน เซอรีน และกาบ้า ในขณะที่สมองของหนูกลุ่มที่ได้รับแปะก๊วยมีการเพิ่มของกลูตาเมต และเซอรีน และสมองของหนูกลุ่มที่ได้รับยา donepezil มีการเพิ่มของกลูตามีน และการลดลงของไกลซีน ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารสกัดพรมมิอาจจะออกฤทธิ์ผ่านทางกลไกการเปลี่ยนแปลงระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนเพื่อที่เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูแก่

คำสำคัญ: พรมมิ, ความจำเกี่ยวกับสถานที่, ความจำเกี่ยวกับวัตถุ, การถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่ดีขึ้นอย่างยาวนาน, สารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโน

Abstract

Brahmi or *Bacopa monnieri* (BM) is an herbal plant which has been used for brain boosting and memory enhancing remedy. Due to a lack of information regarding its physiological actions on changes in synaptic transmission and neurotransmitters in the hippocampus, we, therefore, investigated these issues by comparing the effects of BM to those of ginkgo biloba (GK) and donepezil (Don) on learning and memory, induction of long term potentiation (LTP), and changes of amino acid neurotransmitters in naturally aging rats. The results following 3 month oral administration of the extract/drug demonstrated that 40 mg/kg BM-treated group showed a similar efficacy of both spatial memory and object recognition as 60 mg/kg GK-treated and 1 mg/kg Don-treated groups which were significantly better than those of the vehicle control group. In addition, a biochemical assay of homogenized hippocampal tissues isolated from BM group showed increases of glutamate, glutamine, serine and GABA levels, whereas those from GK-treated group showed increases of glutamate and serine and those from Don-treated group showed an increase of glutamine and a decrease of glycine. These results indicate that BM may act via the changes of amino acid neurotransmitters in the hippocampus to improve a cognitive function of aging rats.

Keywords : *Bacopa monnieri*, spatial memory, object recognition, LTP, amino acid neurotransmitters

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3-ii
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	3-iii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	3-iv
สารบัญ	3-v
สารบัญตาราง	3-vi
สารบัญรูป	3-vii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	3-viii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	3-5
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	3-20
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	3-38
บรรณานุกรม	3-39

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3-1 ค่าน้ำหนักโมเลกุลและการคำนวณความเข้มข้นหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ (mM) และปริมาณเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)ของสารมาตรฐานกรดอะมิโนที่ 5 ความเข้มข้น	3-9
3-2 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของกรดอะมิโน แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบ้า 5 ความเข้มข้นหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเฉลี่ยที่ได้จากการฉีด 3 ครั้ง	3-11
3-3 intraday variation (ค่า mean, SD, % CV) ของสารมาตรฐานกรดอะมิโน แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน และกลูตามีน ที่ 3 ความเข้มข้น	3-12
3-4 intraday variation (ค่า mean, SD, % CV) ของสารมาตรฐานกรดอะมิโน ไกลซีน และกาบ้า ที่ 3 ความเข้มข้น	3-13

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
3-1	วิธีการศึกษาการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส	3-8
3-2	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.02 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	3-14
3-3	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	3-15
3-4	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.125 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	3-16
3-5	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	3-17
3-6	ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ	3-18
3-7	กราฟเปรียบเทียบมาตรฐาน (standard calibration curves) ของ aspartate, glutamate, glutamine, serine, glycine และ GABA	3-19
3-8	profile รูปแบบการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ทดสอบด้วย Morris Water Maze	3-20
3-9	ผลการทดสอบความจำเกี่ยวกับสถานที่ด้วยวิธี probe trial	3-21
3-10	เปรียบเทียบความสามารถในการจดจำวัตถุทดสอบด้วย Novel Object Recognition	3-22
3-11	ตัวอย่างผลของศักย์ไฟฟ้าหลังซินแนปส์ชนิด EPSP ที่บันทึกได้จาก CA1	3-23
3-12	ผลการวิเคราะห์ศักย์ไฟฟ้าหลังซินแนปส์ (EPSP) ของหนูแก่กลุ่มควบคุม	3-24
3-13	ผลการวิเคราะห์ EPSP ของหนูแก่กลุ่มได้รับสารสกัดสมุนไพร	3-25
3-14	ผลการวิเคราะห์ EPSP ของหนูแก่กลุ่มได้รับสารสกัดแป๊ะก๊วย	3-26
3-15	ผลการวิเคราะห์ EPSP ของหนูแก่กลุ่มได้รับยา Donepezil	3-27
3-16	ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่กลุ่มควบคุม	3-29
3-17	ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่ที่ได้รับ Donepezil	3-30
3-18	ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร	3-31
3-19	ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดใบแป๊ะก๊วย	3-32
3-20	เปรียบเทียบระดับของแอสปาร์เตต กลูตาเมต และกลูตามีน ที่วัดได้จาก supernatant	3-33
3-21	เปรียบเทียบระดับของเซอรีน ไกลซีน และกาบ้า ที่วัดได้จาก supernatant	3-34

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ก./กก.	กรัมต่อกิโลกรัม
มก./กก.	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
S.E.M.	standard error of the mean
AChE	acetylcholinesterase
AChEI	acetylcholinesterase inhibitor
LTP	long-term potentiation
DG	dentate gyrus
CA	cornu ammonis
SC	Schaffer collateral pathway
EPSP	excitatory post-synaptic potential
NOR	Novel Object Recognition
BM	<i>Bacopa monnieri</i>
SOD	superoxide dismutase
5-HT	5 hydroxytryptamine

บทที่ 1

บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

สมุนไพรพรมมิ (*Bacopa monnieri*) เป็นสมุนไพรที่มีรายงานอย่างแพร่หลายเกี่ยวกับฤทธิ์ในการบำรุงสมองและการช่วยบำรุงความทรงจำ กล่าวคือ มีรายงานว่า สมุนไพรพรมมินั้น เป็นสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพใ้ยาวนานในการแพทย์อายุรเวทของอินเดียโดยมีสรรพคุณ บำรุงความจำ บำรุงสมอง แก้ไข แก้ปวด มีรายงานว่าสารสกัดจากพรมมิมี่ฤทธิ์ antidepressant (Sairam et al., 2002; Gohil and Patel, 2010) และเพิ่มความจำ (memory enhancing) (Das et al., 2002; Gohil and Patel, 2010) การศึกษาทางคลินิกพบว่าทำให้พรมมินานติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือน ช่วยเพิ่มความสามารถในการจำในอาสาสมัครสุขภาพดี (Stough, 2001) สารที่มีฤทธิ์ในพรมมิคือ สารกลุ่ม saponin ได้แก่ bacoside A, B และ bacopaside I (Garai et al., 1996a, b; Rastogi et al., 1994; Sairam et al., 2002) ถ้าหนูทดลองได้รับสาร bacosides ก่อนทำการชักนำให้ความจำบกพร่องด้วย scopolamine (3 มก./กก.), sodium nitrite (75 มก./กก.) หรือ BN5201 (15 มก./กก.) จะสามารถช่วยปกป้องภาวะความจำบกพร่องเมื่อทดสอบด้วย Morris water maze เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Kishore and Singh, 2005) นอกจากนี้ จากการศึกษาเบื้องต้นจากทีมผู้วิจัย และคณะ ได้พบว่าสารสกัดขยายพรมมิขนาด 4, 40 หรือ 80 มก./กก. ถ้าได้รับติดต่อกัน 2 สัปดาห์ สามารถปกป้องภาวะความจำบกพร่องของหนูถีบจักรที่ถูกชักนำโดยการฉีดสาร scopolamine เข้าสู่ช่องท้อง (Taepavarapruk et al., 2006a) และฟื้นฟูความจำในหนูแรทที่ถูกฉีด kainic acid เพื่อทำลายสมองส่วน CA1 ของ hippocampus (Taepavarapruk et al., 2006b) เนื่องจากที่ผ่านมา มีเพียงงานวิจัยของ Dulcy และ Rajan (2009) ที่รายงานว่าหนูแรทเกิดที่ได้รับสารสกัดพรมมินาน 2 สัปดาห์ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณซีโรโทนิน (serotonin) ในสมองส่วนหน้า (forebrain) และสมองส่วนหลัง (hindbrain) และยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดพรมมิต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทร่วมกับผลต่อปริมาณสารสื่อประสาทในสมองส่วน hippocampus ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบข้อมูลในส่วนนี้โดยศึกษาเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบแปะก๊วย(*Ginkgo biloba*) และยามาตราฐานที่ใช้ในผู้ป่วยที่มีอาการสมองเสื่อม คือ donepezil (Aricept[®])

แปะก๊วย (*Ginkgo*) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Ginkgo biloba* อยู่ในวงศ์ Ginkgoaceae มีสารสำคัญ 2 กลุ่มใหญ่ๆ ที่เป็นสารในกลุ่มของ glycosides มีชื่อว่า Ginkgo flavone glycoside มีประมาณ 22-27 % และสารในกลุ่มของ terpine lactone อีกประมาณ 5-7 % (Ding et al., 2008; van Beek, 2009) ที่ผ่านมามีการศึกษาผลของสารสกัดใบแปะก๊วย (*ginkgo biloba* extract หรือ EGb) โดยพบว่า EGb มีฤทธิ์ในการป้องกันระบบประสาทโดยผลของการเป็น antioxidant, free-radical scavenger, membrane stabilizer และ platelet-activating factor inhibitor นอกจากนี้ยังพบว่า EGb สามารถที่จะทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดโดยการยับยั้ง cGMP phosphodiesterase, ยับยั้งการสูญเสีย muscarinergic cholinceptor, adrenoceptor เนื่องจากความชรา, กระตุ้นการเก็บกลับของ acetylcholine ใน สมองส่วน hippocampus, (Victor et al.,

2003; Smith et al., 1996) การทดสอบโดยใช้ passive avoidance test และ AChE assay ในหนู mice หนูพบว่า EGb มีฤทธิ์เป็น anticholinesterase และ cognitive enhancer (Das et al., 2002) ยับยั้งการสะสมเกาะกลุ่มกันของ beta-amyloid (Victor et al., 2003) และช่วยให้ glutamate exocytosis บริเวณปลายประสาทของสมองส่วน hippocampus ในหนูหนูมดคีขึ้น (Williams et al., 2004; Christen et al., 2004) มีการศึกษาผลของการให้ EGb หรือสารสกัดจากใบแปะก๊วยในหนูแก่ธรรมชาติแล้วทำการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze test พบว่าสามารถที่จะฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ได้ ส่วนการทดสอบโดยสรีรวิทยาทางไฟฟ้าก็ชี้ให้เห็นว่า EGb สามารถที่จะฟื้นฟูการเหนี่ยวนำให้เกิด LTP ในหนูแก่ธรรมชาติได้เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแก่ธรรมชาติกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากใบแปะก๊วย (Wang et al., 2006)

สำหรับยา Donepezil มีชื่อทางการค้าว่า Aricept[®] เป็นยาที่ผ่านการรับรองโดย FDA ของประเทศสหรัฐอเมริกา (<http://www.fda.gov>) และถูกใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันเพื่อรักษาโรค Alzheimer โดยมีกลไกการออกฤทธิ์คือเป็น acetylcholine esterase inhibitor (AChEI) ถึงแม้กลไกการออกฤทธิ์หลักๆ ของ Donepezil จะเป็นการเพิ่มระดับของ acetylcholine ในสมองโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholine esterase แต่ก็มีรายงานประสิทธิผลของ Donepezil ในด้านอื่น ๆ ที่น่าสนใจ คือ ผลต่อการเพิ่มขึ้นของ LTP (Barnes et al., 2000) และการเพิ่มขึ้นของ cerebral blood flow (Nakano et al., 2001; Hanyu et al., 2003; Hatip-Al-Khatib et al., 2004) ซึ่งเชื่อว่ามีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพ ในการรักษาโรค Alzheimer คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าการศึกษาเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ของสมุนไพร และ ยา Donepezil ในด้านกลไกการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในระดับการถ่ายทอดสัญญาณประสาทของเซลล์ประสาทอย่างยาวนาน โดยดูผลของสารสกัดและยาเมื่อหนูทดลองได้รับอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 3 เดือน ต่อการเปลี่ยนแปลงปรากฏการณ์ long-term potentiation (LTP) ที่เชื่อว่าเป็นพื้นฐานของกระบวนการเกิดความจำ (Frey and Morris, 1998)

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยจะทำการทดสอบโดยใช้สารสกัดพรมมิเปรียบเทียบ และยา Donepezil โดยถ้าสารสกัดพรมมิมีส่วนช่วยบำรุงความจำด้วยกลไกที่มีผลต่อ LTP เมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารสกัดดังกล่าว น่าจะเพิ่มการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ซึ่งเป็นสมองที่อยู่ในระบบลิมบิก (limbic system) มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเรียนรู้และความจำ อยู่ภายในบริเวณ medial temporal lobe โครงสร้างที่ประกอบไปด้วยเซลล์จำนวนมากเรียงตัวกันอยู่เป็นกลุ่มๆ ได้แก่ dentate granule cells พบอยู่ที่บริเวณ dentate gyrus (DG) และ hippocampal pyramidal cells พบอยู่ที่บริเวณ cornu ammonis area 1 (CA1) และ cornu ammonis area 3 (CA3) นอกจากนั้นลักษณะของทางเดินประสาทเป็นแบบ “trisynaptic circuit” กล่าวคือ มีทางเดินของ axon ในการส่งสัญญาณประสาทที่ประกอบไปด้วย synapse จำนวน 3 จุด โดยทั้งหมดทำหน้าที่ในการส่งผ่านสัญญาณประสาทชนิดกระตุ้น (excitatory synapses) เริ่มจากสัญญาณขาเข้าที่เกิดจาก entorhinal cortex จะผ่านไปตาม perforant pathway ซึ่งจะทอดตัวเข้ามา synapse กับ dentate granule cells ของ DG เมื่อ dentate granule cells ถูกกระตุ้นจะสร้างสัญญาณประสาท

ส่งไปตาม mossy fiber ไปยังเซลล์พิวรามิดที่ CA3 ซึ่งกลุ่มเซลล์พิวรามิดที่ CA3 นี้จะส่ง Schaffer collateral pathway ไปกระตุ้นเซลล์พิวรามิดที่ CA1 (Kandel et al., 2000) ในทางสรีรวิทยาทางไฟฟ้าพบว่า เมื่อกระตุ้น Schaffer collateral (SC) pathway ด้วยกระแสไฟฟ้าความถี่ต่ำ เช่น 1 Hz จะทำให้เกิดศักย์ไฟฟ้าเฉพาะที่บริเวณ dendritic spine ของเซลล์พิวรามิดที่ CA1 เรียกว่า excitatory post-synaptic potential หรือ EPSP ที่มีแอมพลิจูดสูงในระดับหนึ่ง แต่ถ้ากระตุ้น pathway ดังกล่าวด้วยกระแสไฟฟ้าความถี่สูงในระยะสั้นๆ เช่น 5 pulses, 50 Hz เพียงครั้งเดียว แล้วตามด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าความถี่ต่ำ 1 Hz ต่อไปอีก จะพบว่าแอมพลิจูดของ EPSP จะมีขนาดสูงขึ้นหลายเท่าตัว ซึ่งถ้าการเพิ่มขึ้นของแอมพลิจูดคงอยู่ได้นานเป็นชั่วโมงจะเรียกว่าเกิดภาวะ long-term potentiation หรือ LTP (Bliss and Lomo, 1973; Kandel et al., 2000; Stanton et al., 1987) ซึ่งปรากฏการณ์นี้สามารถพบได้ในการศึกษาในหนูทดลองที่สลบ

เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มียานวิจัยใดที่ระบุถึงผลของสารสกัดพรมมีต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางในเชิงสรีรวิทยาทางไฟฟ้า และการเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในสมอง โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดพรมมีโดยตั้งสมมติฐานการวิจัยนี้ว่าหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดพรมมีติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือน มีการเรียนรู้แล้วความจำที่ดีเช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบแปะก๊วย หรือยา Donepezil และดีกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย (vehicle) โดยทำให้แอมพลิจูดและความลาดชัน (slope) ของ EPSP เพิ่มขึ้นมากกว่าระดับที่เพิ่มขึ้นของและเกิดภาวะ LTP เกิดได้ยาวนานมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ หนูทดลองที่ได้รับสารสกัดพรมมีนาน 3 เดือนน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดยอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในทางเพิ่มขึ้นของสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้น ได้แก่ กลูตาเมต ในระดับที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจบ่งบอกถึงผลในการกระตุ้นพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ แต่ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงในทางเพิ่มขึ้นของสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง ได้แก่ ไกลซีน (glycine) และ กาบ้า (GABA) อาจบ่งบอกถึงผลในเชิงยับยั้งระบบประสาทส่วนกลาง โดยทำให้ซึม (sedation) และลดการแสดงพฤติกรรมต่างๆ ลง ซึ่งประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้ จะทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานของพรมมี เพื่อเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางคลินิกในเฟสต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objectives)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อหนูแก่ธรรมชาติได้รับยาที่ใช้ในการรักษาโรค Alzheimer คือ Donepezil เป็นเวลาติดต่อกันสามารถขยายเวลาของปรากฏการณ์ long-term potentiation (LTP) ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแก่กลุ่มควบคุม (Barnes et al., 2000) งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ของสมุนไพรพรมมิ เปรียบเทียบกับสารสกัดใบแปะก๊วย ยา Donepezil และตัวทำละลาย ในประเด็นต่อไปนี้

1. พฤติกรรมการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ และการจดจำสิ่งของ
2. การถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่ซินแนปส์ของเซลล์ประสาทที่เพิ่มขึ้นอย่างยาวนาน (LTP)
3. การเปลี่ยนแปลงระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็น หนูแรท (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley อายุประมาณ 16 เดือน ซึ่งสัตว์ทดลองดังกล่าวจะตั้งชื่อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล ต.สาธิต อ.สาธิต จ.นครปฐม หนูทดลองจะถูกแบ่งกลุ่มเพื่อแยกเลี้ยงในกล่องๆ ละ 3 ตัวตามความเหมาะสม มีวัฏจักรนอน ซึ่งจะเปลี่ยนทุกๆ 2 วันหรือเมื่อมีสภาพขึ้นและ เลี้ยงในห้องของคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส ที่ตั้งเวลาเปิดของแสงไฟในห้องเลี้ยงในช่วงเวลา 06:00-18:00 น. และได้รับอาหารเม็ด (สูตร G082, สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล) และน้ำอย่างบริบูรณ์

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหรือยา ใช้หนูจำนวน 30 ตัว สำหรับการศึกษาค้นคว้าเมื่อป้อนติดต่อกัน 3 เดือน (subchronic treatment) โดยการป้อนน้ำกลั่น สารละลายพรมมิ หรือยา จะป้อนโดยใช้เข็มป้อนสารที่มีปลายมน และกระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. ซึ่งจะป้อนวันละครั้งด้วยปริมาตร 0.1 มล./ 100 ก. น้ำหนักตัว แบ่งกลุ่มหนูทดลองออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

1.1 กลุ่มควบคุม (control) ที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย (น้ำกลั่น) จำนวน 10 ตัว

1.2 กลุ่มที่ได้รับสารละลายพรมมิ (*Bacopa monnieri*, BM) ขนาด 40 มก./กก. น้ำหนักตัว (Taepavarapruk et al., 2006) จำนวน 10 ตัว

1.3 กลุ่มที่ได้รับ สารสกัดใบแปะก๊วย (*ginkgo biloba*, GK; Nutrakal, Vita International Healthfood) ขนาด 60 มก./กก. น้ำหนักตัว (Das et al., 2002) จำนวน 10 ตัว

1.4 กลุ่มที่ได้รับยา Donepezil (N-Benzylpiperidine-4-carboxaldehyde; cat. No. 664081-5G, Sigma-Aldrich Co.) ขนาด 1 มก./กก. น้ำหนักตัว (Hatip-Al-Khatib et al., 2004) จำนวน 10 ตัว

หนูทดลองในกลุ่มนี้จะถูกทำการทดสอบพฤติกรรมต่างๆ หลังจากได้รับการป้อนน้ำกลั่น สารละลายหรือยา เป็นเวลา 10 สัปดาห์ หลังจากทำการทดสอบพฤติกรรมภายในเวลา 2 สัปดาห์ ครบแล้ว หนูจะถูกนำมาสลับและได้รับการผ่าตัดและทำการทดลอง ดังรายละเอียดในข้อ 2.2 และ ข้อ 2.3 ตามลำดับ

2. วิธีการวิจัย

การวิจัยทั้งหมดนี้จะกระทำที่หน่วยวิจัยทางประสาทวิทยาศาสตร์ (MD 411) ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ม.นเรศวร โดยที่ขั้นตอนในการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองจะกระทำตามคู่มือ จรรยาบรรณการใช้สัตว์ (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, พ.ศ. 2542)

วิธีการวิจัยมี 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

2.1 การทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ

1. Morris Water Maze Test เป็นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อความจำเกี่ยวกับทิศทางและสถานที่ (spatial memory) ถูกคิดค้นโดย Morris และคณะ ในปี ค.ศ. 1982 การทดสอบเริ่มจากการนำหนูมาฝึกให้เคยชินกับการว่ายน้ำในอ่างทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 150 ซม. แบ่งเป็น 4 ส่วน หรือ quadrant ที่มีสัญลักษณ์ 4 ชนิดติดอยู่ที่ขอบอ่างเหนือระดับน้ำ 3 ซม. มีแท่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. ซึ่งอยู่ใต้ระดับน้ำ 1 ซม. วางอยู่ในบริเวณของ 1 quadrant และน้ำที่ใช้จะผสมแป้งหรือนมผงเพื่อให้หนูขาว จากนั้นจะค่อยๆ ปลดปล่อยหนูตามจุดต่างๆ 3 จุด และจับเวลาที่หนูทดลองสามารถค้นหาแท่นซึ่งอยู่ใต้ระดับน้ำ (escape latency) มาหาค่าเฉลี่ย โดยกำหนดระยะเวลาสูงสุดที่ให้หนูว่ายน้ำในอ่างเท่ากับ 90 วินาที หากหนูยังหาแท่นไม่เจอผู้วิจัยจะนำสัตว์ทดลองขึ้นมาพัก และจับวางบนแท่นให้คุ้นเคยก่อนทำการฝึกในช่วงเวลาต่อไป การฝึกจะกระทำวันละครั้ง นานติดต่อกัน 7 วัน หนูสามารถจดจำที่อยู่ของแท่นได้น้ำโดยระยะเวลาที่ใช้ค้นหาแท่นน้อยลงและคงที่ จะทำการเอาแท่นออก และจับเวลาที่หนูว่ายน้ำในแต่ละส่วนหรือ quadrant รวมเวลาทั้งหมด 90 วินาที เพื่อที่จะเช็คความสามารถของหนูในการดึงเอาความจำเก่าออกมาใช้ (retention test) ผลการทดลองจะถูกบันทึกอย่างต่อเนื่องด้วยกล้องบันทึกภาพวิดีโอที่ติดตั้งเหนือชุดศึกษาพฤติกรรม เพื่อการวิเคราะห์ข้อมูลในภายหลัง

2. Novel Object Recognition (NOR) Test เป็นการทดสอบความคุ้นเคยต่อวัตถุที่เคยเห็นหรือสัมผัสก่อนหน้าในเวลาผ่านไปเพียงไม่กี่นาที ว่าสามารถจำได้หรือไม่ ซึ่งตามธรรมชาติหนูจะเป็นสัตว์ที่มិនิสัยอยากรู้อยากเห็นในสิ่งใหม่ๆ (novel object) เปรียบเสมือนกับ exploratory behavior อย่างหนึ่ง โดยการทดสอบจะใช้วัตถุที่มีรูปร่างและสีสรรแตกต่างกัน เช่น ถ้วยกระเบื้อง แจกัน และ ตัวต่อเลโก้ ฯลฯ เลือกวัตถุที่ต่างกัน 2 อัน (วัตถุ A กับ B) วางห่างกันประมาณ 20 ซม. ภายในกรงศึกษาพฤติกรรม ในการทดลองนี้จะดำเนินการหลังจากการทดลองที่ทดสอบ MWM เรียบร้อยแล้ว การทดสอบเริ่มจากในช่วง training phase ผู้วิจัยปล่อยหนูภายในกล่องศึกษาพฤติกรรม ทำการจับเวลาที่หนูคลุกคลีกับวัตถุอันใดอันหนึ่ง โดยใช้เวลาประมาณ 10 นาที จากนั้นนำหนูกลับเข้ากรงเลี้ยงประมาณ 10 นาที ระหว่างนี้ผู้วิจัยจะทำความสะอาดวัตถุทั้งสองแล้วเปลี่ยนอันใดอันหนึ่งเป็นวัตถุอันใหม่ (novel object) ตัวอย่างเช่น วางวัตถุ C แทนวัตถุ B เป็นต้น จากนั้นเริ่มปล่อยหนูกลับไปในการทดสอบอีกครั้ง ซึ่งเป็นการทดสอบในช่วง testing phase โดยจับเวลาที่หนูคลุกคลีกับวัตถุ A กับ C ซึ่งถ้าหนูยังใช้เวลาอยู่กับวัตถุ A (familial object) มากกว่าวัตถุ C อย่างมี

นัยสำคัญจะถือว่าหนูจำวัตถุเดิมที่เคยคลุกคลีไม่ได้ ผลการทดลองจะถูกบันทึกอย่างต่อเนื่องด้วยกล้องบันทึกภาพวิดีโอที่ติดตั้งภายในกล่องศึกษาพฤติกรรม

ค่าดัชนีการจดจำวัตถุ (recognition index, Ri) ของหนูแต่ละตัวคิดได้จาก

$$Ri = [T_A / (T_A + T_C)] \times 100$$

โดยที่ T_A เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้น A ในช่วง testing phase
 T_C เป็นเวลาที่หนูทดลองสำรวจวัตถุชิ้น C ในช่วง testing phase

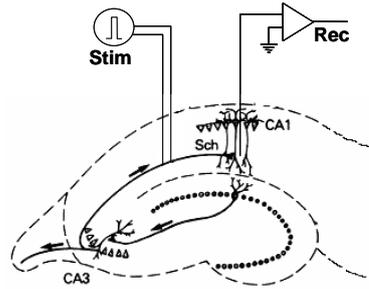
2.2 การศึกษาผลของสารสกัดต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ผู้วิจัยจะนำหนูแรทมาสลบ ด้วยการฉีดยาสลบ urethane ขนาด 1.5 ก./กก. นำหนักตัว ที่ช่องท้องเมื่อหนูสลบดีแล้วจึงโกนขนบนศีรษะ แล้วนำหนูไปยึดตรึงศีรษะด้วยอุปกรณ์ stereotaxic apparatus (Model Stoelting's Lab Standard, Stoelting Co., Illinois, USA) จากนั้นจึงเริ่มการผ่าตัด ใช้มีดผ่าตัดกรีดหนังศีรษะตามแนว midline ประมาณ 2 ซม. แล้วใช้สว่านความเร็วสูงและดอกสว่านขนาดเล็กเจาะกะโหลกศีรษะเหนือตำแหน่งของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสตามแผนที่สมองของหนูแรท (Paxinos and Watson, 1998) ขนาด (กว้าง x ยาว) 4 x 4 ตร.มม.

2. การกระตุ้นและการบันทึกสัญญาณประสาท

งานวิจัยส่วนนี้ ผู้วิจัยจะทำการบันทึกสัญญาณประสาทโดยรวม (field potentials) ในหนูทดลองที่สลบตามวิธีการของ Freir และคณะ (Freir et al., 2001) โดยจะใช้ไมโครอิเล็กโทรดสำหรับบันทึกชนิด tungsten (Cat. No. 563410, A-M Systems, WA, USA) ปักลงไปบนเนื้อสมองจนถึงตำแหน่งที่อยู่ของเซลล์พีรามิดที่ CA1 (ความลึกประมาณ 2 มม.) ดังรูปที่ 3-1 และปักไมโครอิเล็กโทรดสำหรับกระตุ้น (Steraid concentric bipolar electrode, model NE-100, USA) บริเวณ Schaffer collateral (Sch) สัญญาณประสาทที่บันทึกได้ (ดังตัวอย่างในรูปที่ 3-1) จะถูกนำไปขยายด้วยเครื่อง microelectrode amplifier (model 1800, A-M Systems) และนำไปแสดงผลบนหน้าจอคอมพิวเตอร์โดยผ่านเครื่อง PowerLab 4SP (ADInstruments, Australia) ใช้โปรแกรม Chart Pro v5.5 (ADInstruments) เพื่อแสดงสัญญาณประสาทที่จะบันทึกได้จะเป็นศักย์ไฟฟ้าโดยรวม เรียกว่า evoked field potential หรือ population EPSP (pEPSP) ดังรูปที่ 3-1 เกิดจากการกระตุ้นใยประสาทนำเข้า CA3 Schaffer collateral (Sch) ที่ไปเลี้ยง CA1 pyramidal cell ด้วยกระแสความถี่ต่ำ (กระตุ้น 1 ครั้งในทุกๆ 2 นาที) การวิเคราะห์จะกระทำโดยการบันทึกค่าความสูงของแอมพลิจูด (EPSP amplitude) และความลาดชัน (EPSP slope) ของศักย์ไฟฟ้านำมาพล็อตเป็นเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงในช่วงควบคุม หลังจากนั้นจะทำการกระตุ้นด้วยกระแสความถี่สูง (10 trains of pulses [20 pulses, 200 Hz], 2 sec inter-train interval) แล้วทดสอบด้วยกระแสความถี่ต่ำต่อไปอีก 2-3 ชั่วโมง ถ้า EPSP ที่เกิดมีแอมพลิจูดที่สูงและคงอยู่ได้เป็นเวลายาวนานมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ชั่วโมงจะถือว่าเป็นการเกิด LTP (Bliss and Lomo, 1973)



รูปที่ 3-1 วิธีการศึกษาการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดยการปักขั้วกระตุ้น (Stim) ที่ Schaffer collateral (SC) ซึ่งเป็นแอกซอนของ CA3 pyramidal cell และขั้วบันทึกที่ CA1 pyramidal cell

งานวิจัยนี้จะศึกษาผลของการรักษาประสิทธิภาพในการถ่ายทอดสัญญาณประสาทได้อย่างยาวนาน (LTP) จากแอกซอนของ Schaffer collateral (SC) ไปยังเดนไดรต์ของเซลล์พิวรามิดที่ CA1 ในหนูกลุ่มที่ได้รับเฉพาะตัวทำลาย เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารละลายพรมมิ และยา Donepezil ในขนาดดังกล่าวข้างต้น

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

Evoked field potential (EPSP) จะถูกบันทึกเพื่อการนำมาวิเคราะห์ภายหลัง โดยใช้โปรแกรม Peak analysis ร่วมกับโปรแกรม Chart 5.5 (ADInstruments) ซึ่งจะได้ค่าเฉลี่ยสโลป (slope) และค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้ peak ของกราฟของ EPSP (ดังรูปที่ 3-2) นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ เพื่อวิเคราะห์ผลของสารสกัดต่อ การส่งผ่านสัญญาณประสาท จะถูกรวบรวมเพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน สถิติที่จะใช้ในการทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของข้อมูลคือ one-way repeated measures ANOVA และตามด้วย Dunnett's pos hoc test โดยตั้งค่านัยสำคัญเท่ากับ 0.05

2.3 การศึกษาผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทชนิดอะมิโน

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หลังจากที่ทำการทดลองทางสรีรวิทยาไฟฟ้าในหนูกลุ่มต่างๆเสร็จสิ้นแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการฉีด ยาสลบ urethane (ethylurethane; cat. No. U2500-500G, Sigma-Aldrich co.) ขนาด 3 ก./กก. น้ำหนักตัว (overdose) เข้าทางช่องท้องของหนูทดลอง หลังจากมั่นใจว่าหนูสลบลึก (deeply anesthetized) โดยการ ตรวจ withdrawal reflex ที่เท้าหนู จากนั้นนำมาตัดคอด้วยเครื่องตัดศีรษะ (rodent decapitator, Harvard Apparatus, USA) และเลาะสมองออกมาแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัสมาทำการชั่งน้ำหนักก่อนนำไปล้างชิ้น เนื้อสมองที่แยกได้ใน phosphate buffered saline (PBS; cat. No. P3813, Sigma-Aldrich co.) และใส่ใน หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 15 มล. และเติม phosphate buffer pH 7.4 ที่อัตราส่วน 5 มล. ต่อชิ้นส่วนของสมอง 2 กรัม จากนั้นทำการปั่นด้วยเครื่องปั่น (homogenizer) ที่ความเร็วระดับ 5 เป็น เวลานานประมาณ 3 นาที หรือจนเห็นว่าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บน้ำสมองที่เป็นของเหลวออกอยู่ส่วนบน

(supernatants) เพื่อนำไปวิเคราะห์ทันทีหรือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ต่อไป

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารสื่อประสาทด้วยเทคนิค HPLC

ขั้นตอนนี้จะทำโดยการนำ supernatants ที่ได้จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส มาวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอะมิโน ได้แก่ กลูตาเมต แอสปาเตท ไกลซีน และกาบ้า เป็นต้น โดยเครื่อง HPLC และ fluorescence detector (Waters detector model 474) ตามวิธีของ Lindroth และ Mopper (1979) โดยที่สารจะถูกนำมาทำ precolumn fluorescence derivatization กับสารผสมระหว่าง *O*-phthaldialdehyde (OPA; cat. No. P0657, Sigma-Aldrich co.) และ mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol; cat. No. M6250, Sigma-Aldrich co.) ปริมาณสารสื่อประสาทในสาร supernatant ที่ได้จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส จะคำนวณได้จากการทำ calibration curve ที่มีการ plot ระหว่างความสูงของพีคที่วัดได้ (peak height) กับความเข้มข้น (concentration) ของสารมาตรฐาน 3 ระดับ

ในการเตรียมสารมาตรฐานได้คำนวณเป็นความเข้มข้น หน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ (mM) และได้คำนวณกลับเป็นหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μ g/ml) ดังแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 คำนวณน้ำหนักโมเลกุลและการคำนวณความเข้มข้นหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ (mM) และปริมาณเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μ g/ml) ของสารมาตรฐานกรดอะมิโนที่ 5 ความเข้มข้น

	concentration	0.025 mM	0.050 mM	0.125 mM	0.250 mM	0.500 mM
Standard	MW	μ g/ml				
Aspartate	133.11	3.50	7.00	17.50	35.00	70.00
Glutamate	147.13	3.67	7.33	18.33	36.67	73.33
Serine	105.09	2.83	5.67	14.17	28.33	56.67
Glutamine	146.15	3.83	7.67	19.17	38.33	76.67
Glycine	75.07	2.67	5.33	13.33	26.67	53.33
GABA	103.12	2.83	5.67	14.17	28.33	56.67

ผลการวิเคราะห์สารมาตรฐาน 6 ชนิด ชนิดละ 5 ความเข้มข้นๆ ละ 3 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยของสารมาตรฐานต่างๆ แสดงดังตารางที่ 3-2 และตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานต่างๆ ความเข้มข้น 0.02 , 0.05, 0.125, 0.25, และ 0.5 มิลลิโมลาร์ แสดงดังรูปที่ 3-2 ถึง 3-6 ตามลำดับ และเมื่อนำข้อมูลมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟโครมาโตแกรมและปริมาณความเข้มข้นหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารมาตรฐานแอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอริน กลูตามีน ไกลซีน และกาบ้า จะได้กราฟดังรูปที่ 3-7 ข้อมูลนี้ใช้ในการคำนวณหาระดับกรดอะมิโนจากตัวอย่าง supernatant ของสมองต่อไป

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบความแม่นยำของการฉีดสารมาตรฐานชนิดต่างๆด้วยเครื่อง HPLC และ fluorescence detector นี้ เพื่อหา intraday variation ด้วยการเตรียมสาร 3 ความเข้มข้นต่อชนิดของสารมาตรฐาน แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบ้า ทำการฉีด 6 ครั้งภายในวันเดียวกัน คำนวณหาค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation , SD) และค่า % coefficients of variation (%CV) ข้อมูลที่ได้แสดงดังตารางที่ 3-3

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะเป็นข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี Student's *t*-test หรือ ANOVA ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและจำนวนกลุ่มของข้อมูลที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่าง และตั้งค่านัยสำคัญที่ $\alpha = 0.05$

ตารางที่ 3-2 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของกรดอะมิโน แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบ้า 5 ความเข้มข้นหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเฉลี่ยที่ได้จากการฉีด 3 ครั้ง

Aspartate				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
3.50	582,489	591,851	609,810	594,717
7.00	1,177,263	1,073,284	1,104,069	1,118,205
17.50	3,018,231	2,956,524	3,000,139	2,991,631
35.00	5,411,950	5,039,178	5,575,224	5,342,117
70.00	10,240,378	9,996,989	11,165,377	10,467,581

Glutamate				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
3.67	564,584	604,973	604,029	591,195
7.33	1,243,140	1,227,711	1,188,840	1,219,897
18.33	2,845,374	2,733,587	2,544,745	2,707,902
36.67	5,287,021	5,105,304	5,371,255	5,254,527
73.33	10,208,899	9,851,666	10,921,887	10,327,484

Serine				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
2.83	477,575	469,378	483,206	476,720
5.67	1,094,930	1,031,534	1,028,826	1,051,763
14.17	2,162,947	2,200,949	2,083,776	2,149,224
28.33	4,288,870	4,184,739	4,239,633	4,237,747
56.67	7,982,842	7,929,683	9,078,621	8,330,382

Glutamine				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
3.83	586,324	566,769	574,592	575,895
7.67	1,280,017	1,169,044	1,174,654	1,207,905
19.17	2,880,441	2,790,697	2,761,089	2,810,742
38.33	5,708,374	5,485,879	5,916,320	5,703,524
76.67	11,278,242	10,840,357	11,980,609	11,366,403

Glycine				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
2.67	483,499	483,148	498,533	488,393
5.33	1,026,187	915,846	967,944	969,992
13.33	2,322,171	2,337,904	2,394,803	2,351,626
26.67	5,265,884	5,247,970	4,738,974	5,084,276
53.33	9,917,786	9,995,206	10,760,687	10,224,560

GABA				
Conc. (ug/ml)	Area 1	Area 2	Area 3	Mean
2.83	776,218	757,639	779,703	771,187
5.67	1,493,974	1,642,633	1,435,131	1,523,913
14.17	3,535,381	3,369,680	3,390,747	3,431,936
28.33	6,985,891	7,052,891	6,851,129	6,963,304
56.67	13,585,276	12,878,375	14,351,146	13,604,932

ตารางที่ 3-3 แสดง intraday variation (ค่า mean, SD, % CV) ของสารมาตรฐานกรดอะมิโน แอสปาร์เตต กลูตามัต เซอรีน และกลูตามีน ที่ 3 ความเข้มข้น

Standard	Aspartate						
	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	
conc. (ug/ml)	3.5 ug/ml	(ug/ml)	17.5 ug/ml	(ug/ml)	70 ug/ml	(ug/ml)	
1	571,615	2.6852	2,801,855	17.7892	8,678,259	57.5863	
2	667,495	3.3345	3,094,517	19.7712	9,607,798	63.8815	
Day 1	3	625,105	3.0475	3,086,905	19.7197	10,522,635	70.0771
	4	653,319	3.2385	3,237,009	20.7362	11,423,067	76.1752
	5	667,136	3.3321	3,121,546	19.9543	11,415,775	76.1258
	6	669,228	3.3463	3,261,353	20.9011	10,698,220	71.2662
Mean		3.1640		19.8119		69.1853	
SD		0.2604		1.1102		7.2776	
%CV		8.23		5.60		10.52	

Standard	Glutamate						
	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	
conc. (ug/ml)	3.67 ug/ml	(ug/ml)	18.33 ug/ml	(ug/ml)	73.33 ug/ml	(ug/ml)	
Day 1	1	561,484	2.9771	2,821,171	19.2378	9,654,635	68.4114
	2	547,352	2.8754	2,977,952	20.3660	9,982,849	70.7733
	3	557,978	2.9518	2,897,676	19.7883	10,581,129	75.0785
	4	626,582	3.4455	2,945,446	20.1321	11,623,549	82.5797
	5	640,459	3.5454	3,023,063	20.6906	11,452,275	81.3473
	6	631,452	3.4806	2,889,349	19.7284	10,406,804	73.8240
Mean		3.2126		19.9905		75.3357	
SD		0.3079		0.5152		5.6520	
%CV		9.58		2.58		7.50	

Standard	Serine						
	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	
conc. (ug/ml)	2.83 ug/ml	(ug/ml)	14.17 ug/ml	(ug/ml)	56.67 ug/ml	(ug/ml)	
Day 1	1	594,055	3.1759	2,216,402	14.3932	7,690,031	52.2392
	2	551,523	2.8818	2,341,212	15.2561	7,647,111	51.9424
	3	600,718	3.2219	2,286,550	14.8782	7,852,899	53.3653
	4	509,782	2.5932	2,318,906	15.1019	8,757,937	59.6229
	5	501,863	2.5384	2,434,884	15.9038	8,611,340	58.6093
	6	520,633	2.6682	2,434,879	15.9038	7,956,433	54.0811
Mean		2.8466		15.2395		54.9767	
SD		0.2972		0.5914		3.3131	
%CV		10.44		3.88		6.03	

Standard	Glutamine						
	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	
conc. (ug/ml)	3.83	conc. (ug/ml)	19.17	conc. (ug/ml)	76.67	conc. (ug/ml)	
Day 1	1	590,094	3.8289	3,096,573	20.7752	10,851,006	73.2029
	2	597,186	3.8768	3,274,831	21.9804	11,311,119	76.3138
	3	565,050	3.6595	3,229,776	21.6758	11,945,339	80.6017
	4	655,475	4.2709	3,301,070	22.1578	13,179,901	88.9486
	5	675,799	4.4083	3,209,917	21.5415	13,068,052	88.1924
	6	689,304	4.4996	3,382,162	22.7061	11,867,160	80.0732
Mean		4.0907		21.8061		81.2221	
SD		0.3466		0.6502		6.2990	
%CV		8.47		2.98		7.76	

ตารางที่ 3-4 แสดง intraday variation (ค่า mean, SD, % CV) ของสารมาตรฐานกรดอะมิโน ไกลซีน และกาบ้า ที่ 3 ความเข้มข้น

Standard	Glycine						
	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	
conc. (ug/ml)	2.67 ug/ml	(ug/ml)	13.33 ug/ml	(ug/ml)	53.33 ug/ml	(ug/ml)	
Day 1	1	518,456	3.1518	2,420,056	12.9978	10,098,665	52.7560
	2	564,248	3.3889	2,554,313	13.6930	9,396,453	49.1201
		495,571	3.0333	2,518,821	13.5092	9,426,832	49.2774
	4	592,077	3.5330	2,520,377	13.5173	10,533,060	55.0052
	5	594,850	3.5473	2,555,727	13.7003	10,205,152	53.3073
	6	616,365	3.6587	2,514,729	13.4880	8,920,645	46.6564
Mean		3.3855		13.4843		51.0204	
SD		0.2455		0.2564		3.1564	
%CV		7.25		1.90		6.19	

Standard	GABA						
	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	conc. ที่เตรียม	conc. ที่ได้จากการฉีด	
conc. (ug/m)	2.83 ug/ml	(ug/ml)	14.17 ug/ml	(ug/ml)	56.67 ug/ml	(ug/ml)	
Day 1	1	736,736	2.5572	3,664,409	14.8424	15,126,095	62.9386
	2	651,804	2.2008	3,905,199	15.8529	14,108,522	58.6686
		693,906	2.3775	3,768,901	15.2809	14,346,998	59.6693
	4	779,703	2.7375	3,723,626	15.0909	15,974,952	66.5006
	5	824,930	2.9273	3,647,688	14.7723	15,293,324	63.6403
	6	763,939	2.6713	3,931,228	15.9621	15,348,621	63.8723
Mean		2.5786		15.3003		62.5483	
SD		0.2604		0.5052		2.9003	
%CV		10.10		3.30		4.64	

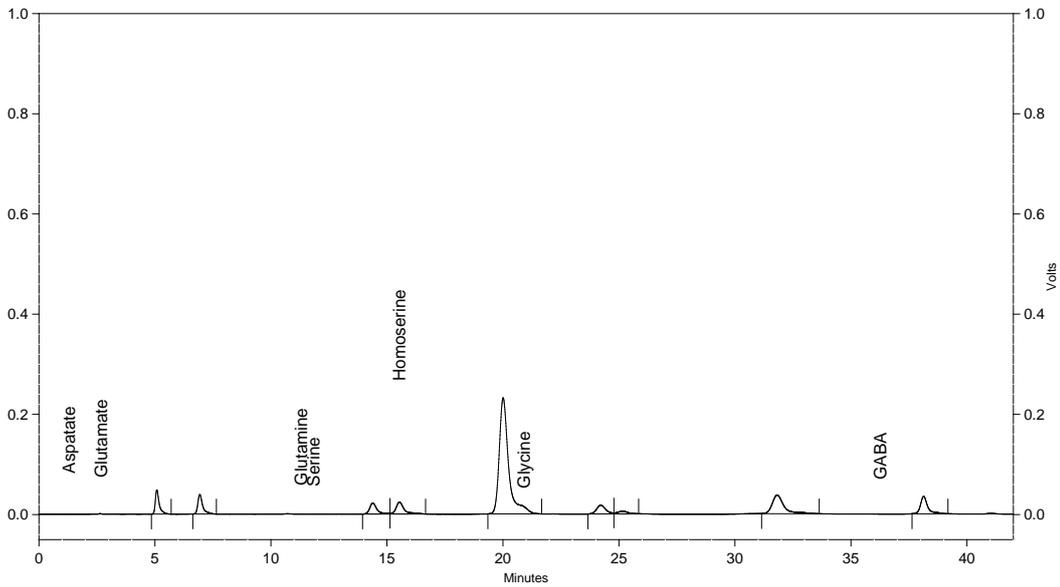
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\RID Pa\18-02-53\Glucose.met

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Standard-%CV\Standard Mix 0.025 mM-004

User: System

Acquired: 4/28/2010 10:30:47 AM

Printed: 4/30/2010 11:03:23 AM

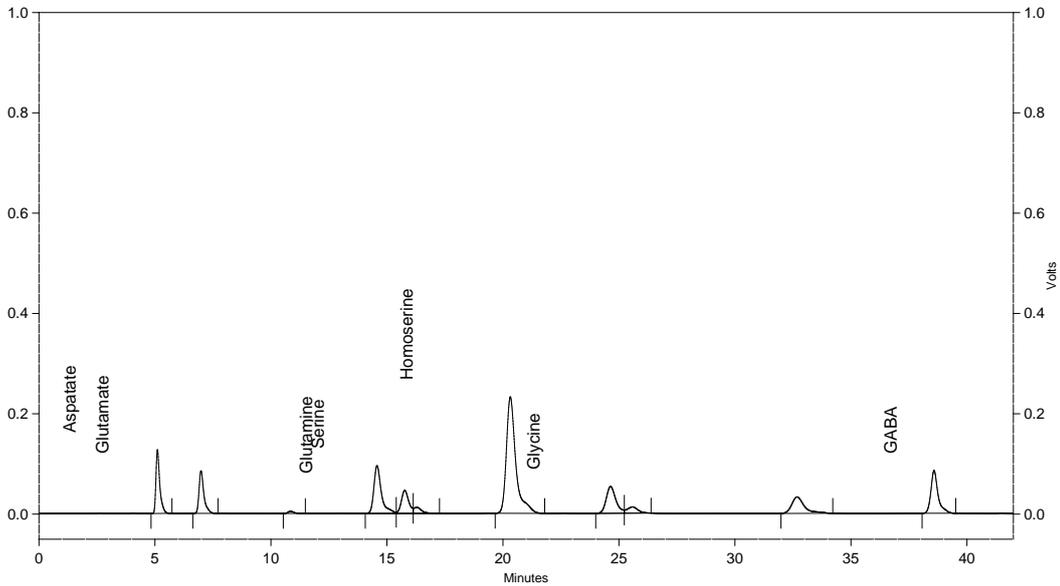


Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1	Aspartate	5.077	555767	47967
2	Glutamate	6.929	561484	38629
3	Serine	14.387	477575	21824
4	Glutamine	15.537	574592	23908
5	Homoserine	20.004	6507827	231592
6	Glycine	24.213	483499	17532
9	GABA	38.129	757639	34877
Totals			9918384	416327

รูปที่ 3-2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.02 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆคือ แอสปาร์เตต กลูตามेट เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบ้า

Method Name: C:\CLASS-VP\Data\RID Pa\18-02-53\Glucose.met
 Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Standard-%CV\Standard Mix 0.05 mM-003
 User: System
 Acquired: 4/27/2010 2:39:06 PM
 Printed: 4/30/2010 11:38:32 AM



Detector C				
Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1	Aspartate	5.104	1464591	126559
2	Glutamate	6.982	1227711	84415
4	Serine	14.568	2136431	94930
5	Glutamine	15.762	1014556	45871
7	Homoserine	20.314	6545876	231958
8	Glycine	24.635	1544782	53452
11	GABA	38.579	1816312	85192
Totals			15750260	722377

รูปที่ 3-3 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.05 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ คือ แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบ้า

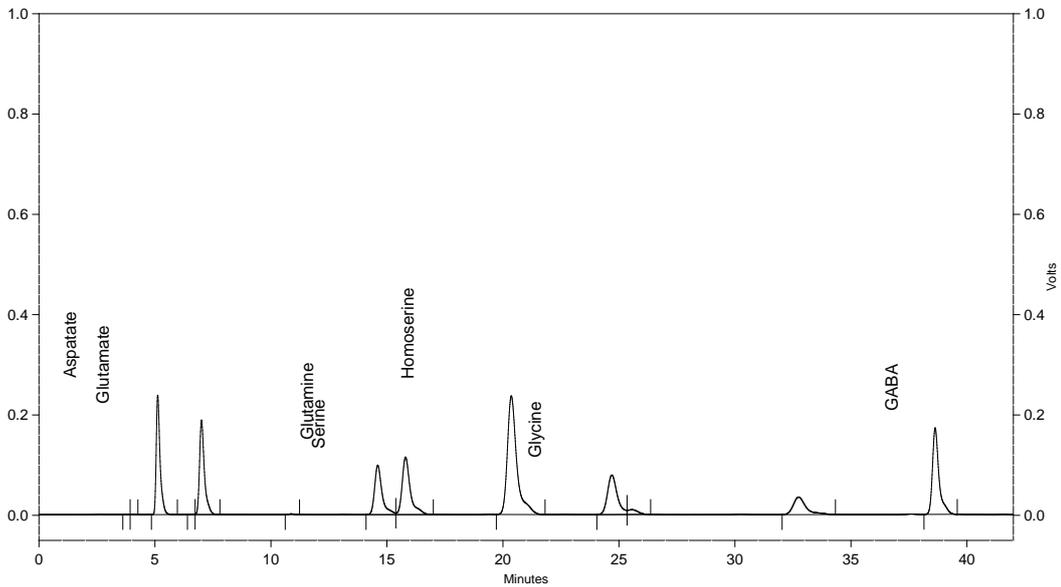
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\RID Pa\18-02-53\Glucose.met

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Standard-%CV\Standard Mix 0.125 mM-002

User: System

Acquired: 4/27/2010 4:05:06 PM

Printed: 4/30/2010 11:22:10 AM



Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
3	Aspartate	5.116	2754393	235983
5	Glutamate	7.004	2733587	187812
7	Serine	14.599	2200949	98046
8	Glutamine	15.798	2790697	114587
9	Homoserine	20.357	6676427	236363
10	Glycine	24.691	2322171	78779
13	GABA	38.627	3369680	172309
Totals			22847903	1123881

รูปที่ 3-4 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.125 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ คือ แอสปาร์เตต กลูตามेट เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบ้า

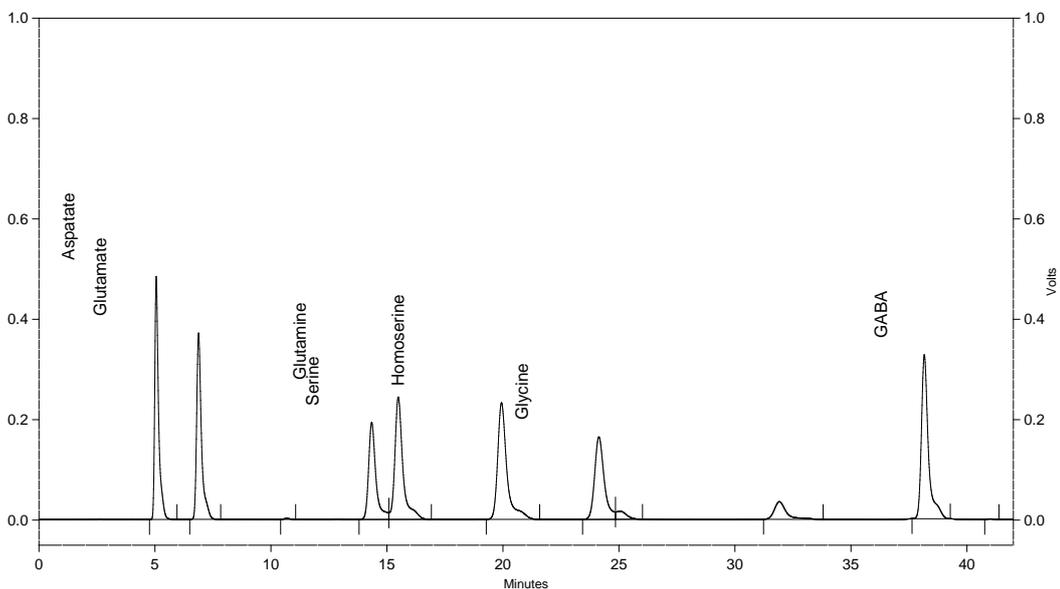
Method Name: C:\CLASS-VP\Data\RID Pa\18-02-53\Glucose.met

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Standard-%CV\Standard Mix 0.25 mM-003

User: System

Acquired: 4/28/2010 11:14:33 AM

Printed: 4/30/2010 10:19:11 AM

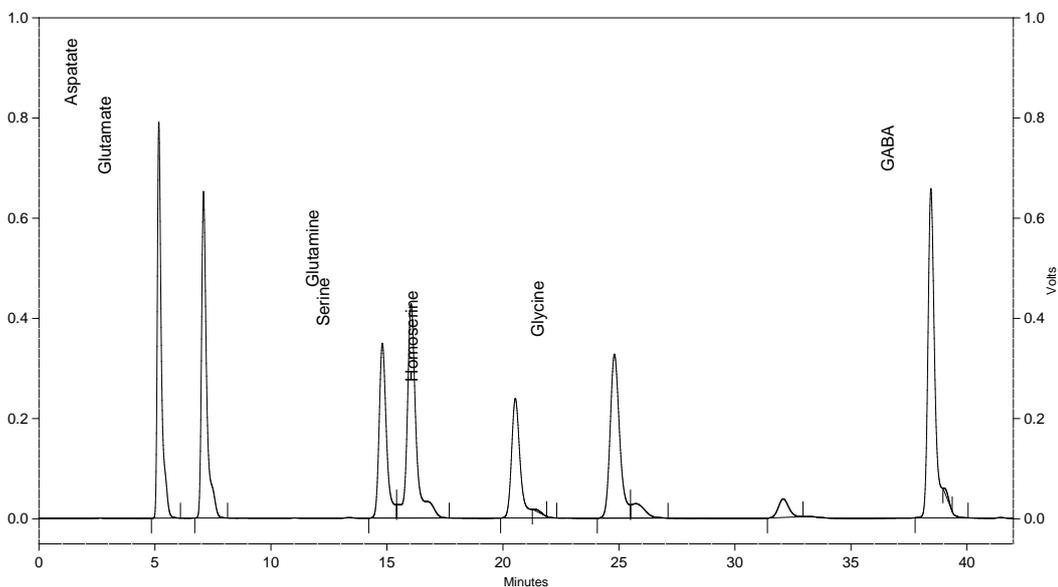


Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1	Aspartate	5.051	5575224	480865
2	Glutamate	6.877	5371255	370865
4	Serine	14.339	4239633	193107
5	Glutamine	15.484	5916320	243313
6	Homoserine	19.935	6463737	232031
7	Glycine	24.132	4738974	164181
10	GABA	38.159	6851129	326550
Totals			39156273	2010912

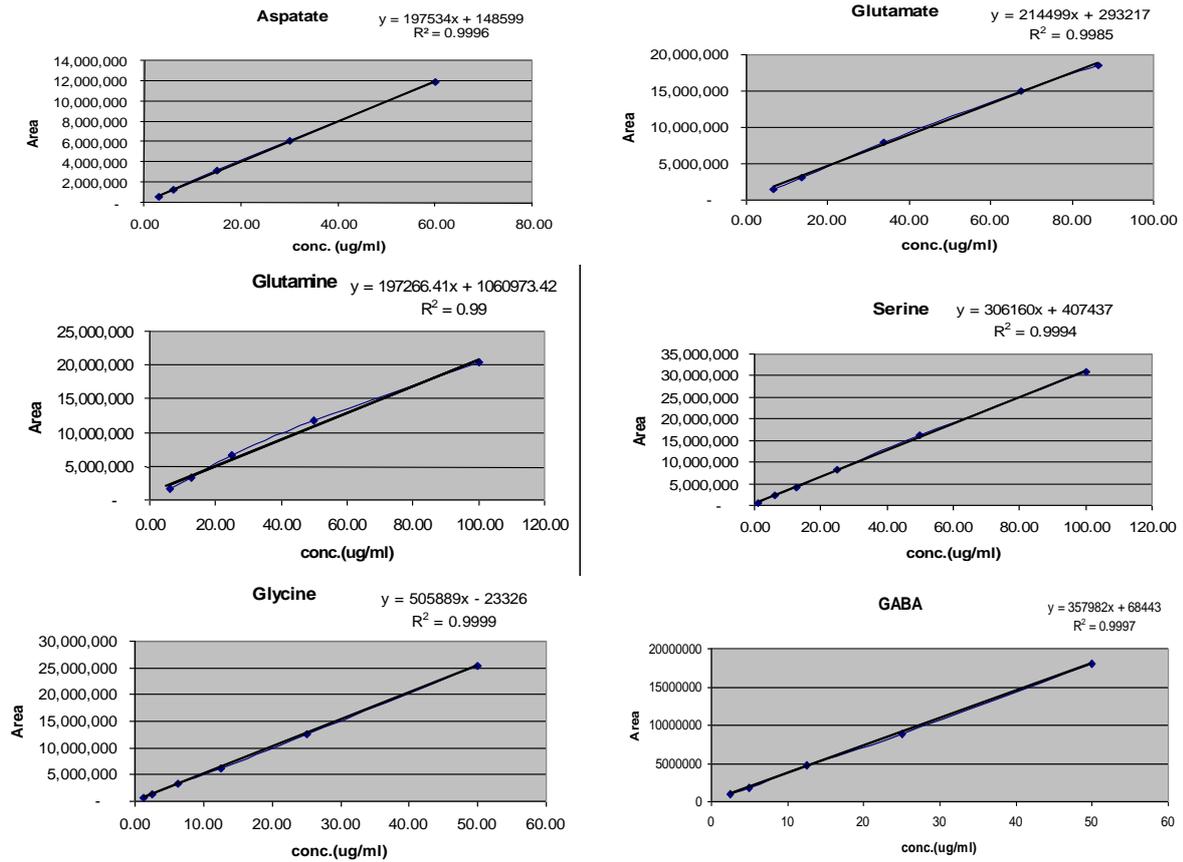
รูปที่ 3-5 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.25 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ คือ แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบ้า

Method Name: C:\CLASS-VP\Data\RID Pa\18-02-53\Glucose.met
 Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\Standard-%CV\Standard Mix 0.5 mM-006
 User: System
 Acquired: 4/30/2010 12:01:26 PM
 Printed: 4/30/2010 3:41:37 PM



Detector C				
Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
1	Aspartate	5.165	9607798	785333
2	Glutamate	7.091	9982849	651292
3	Serine	14.799	7647111	348159
4	Glutamine	16.038	11311119	427292
5	Homoserine	20.531	6512263	238185
7	Glycine	24.803	9396453	327064
10	GABA	38.443	14108522	657050
Totals			68566114	3434375

รูปที่ 3-6 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 mM ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ คือ แอสปาร์เตต กลูตามेट เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบ้า



รูปที่ 3-7 กราฟเปรียบเทียบมาตรฐาน (standard calibration curves) ของ aspartate, glutamate, glutamine, serine, glycine และ GABA สำหรับใช้หาค่าความเข้มข้นจากพื้นที่ใต้ peak ของโครมาโตแกรม

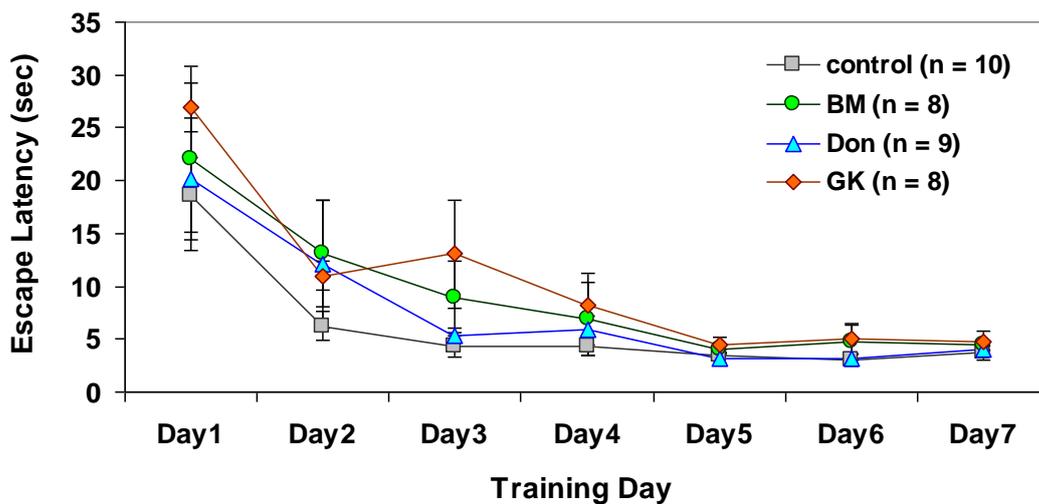
บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลของสารสกัดต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ

1.1 Morris Water Maze Test

การทดสอบการเรียนรู้และความจำโดยใช้ Morris Water Maze Test เป็นวิธีที่ใช้ศึกษา spatial reference memory พบว่าเวลาของหนูแก่ทุกกลุ่มที่มีอายุ 19 เดือนใช้ในการหาแท่นได้น้ำ (หรือ Escape latency) ตั้งแต่แรกของการฝึก (Day1) จนถึงวันสุดท้ายของการฝึกมีค่าใกล้เคียงกันและลดลงเป็นลำดับเมื่อฝึกว่ายน้ำเป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 3-8) แสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกหนูที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้หนูแก่ที่มีความสามารถในการจดจำใกล้เคียงกัน แม้ว่าค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการหาแท่นในช่วง 2-3 วันแรกจะแตกต่างกันก็ตาม



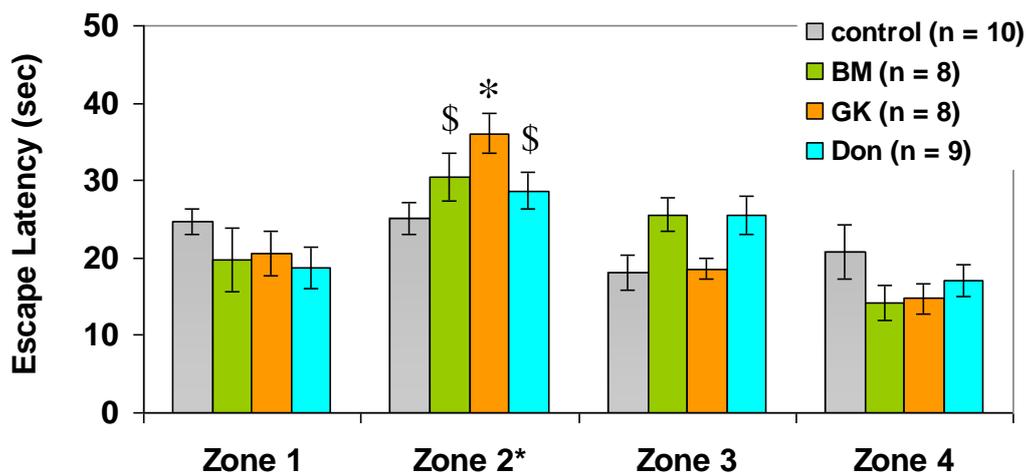
รูปที่ 3-8 แสดง profile รูปแบบการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ทดสอบด้วย Morris Water Maze โดยเปรียบเทียบระยะเวลาในการว่ายน้ำหาแท่นได้น้ำ (escape latency) ระหว่างหนูแก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลาย (control) กับหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดพรมมิ (BM) แปะก๊วย (GK) และยา donepezil (Don) ซึ่งพบว่าหลังจากการฝึกนาน 1 สัปดาห์ หนูแก่ทุกตัวมีความสามารถในการจดจำตำแหน่งแท่นได้น้ำได้พอๆ กัน

ในวันที่ 8 นำหนูทุกกลุ่มมาทดสอบความจำอีกครั้งด้วยวิธี Probe Trial ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการดึงความจำหรือ retention memory โดยเอาแท่นได้น้ำออก แบ่งขอบเขตที่หนูว่ายน้ำออกเป็น 4 zone และจับเวลาที่หนูทดลองว่ายน้ำอยู่ในแต่ละ zone ของอ่างน้ำทรงกลมโดยคิดค่าเวลาที่หนูทดลองอยู่ในแต่ละ zone เป็นเปอร์เซ็นต์จากเวลาทั้งหมด 90 วินาทีที่ให้หนูทดลองว่ายน้ำ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3-11 พบว่าหนูทดลองกลุ่มควบคุม (Control) ใช้เวลาในการว่ายน้ำในแต่ละ zone ดังนี้ zone 1

คือ 24.8 ± 1.7 sec, zone 2 คือ 25.1 ± 2.1 sec, zone 3 คือ 18.2 ± 2.3 sec และ zone 4 คือ 20.8 ± 3.5 sec ซึ่งแสดงว่าหนูกลุ่มนี้จำไม่ได้ว่า zone 1, zone 2 หรือ zone 4 เป็นโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำมาก่อน สังเกตได้จากระยะเวลาที่หนูทดลองว่ายใน 3 โซนนี้มีค่าใกล้เคียงกัน (รูปที่ 3-9)

ในทางตรงกันข้าม หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 40 มก./กก. น้ำหนักตัว (BM) มี pattern ของการว่ายน้ำคล้ายกับหนูในกลุ่มที่ได้รับยา donepezil (Don) กล่าวคือ ใช้เวลาว่ายวนอยู่ในโซนที่เคยมีแท่น (Zone 2 = 30.5 ± 3.1 sec) มากกว่า Zone 1 (19.8 ± 4.1 sec) และ Zone 4 (14.2 ± 2.3 sec) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ANOVA and Dunnett's test) สำหรับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยา donepezil (Don) คือใช้เวลาว่ายวนอยู่ในโซนที่เคยมีแท่น (Zone 2 = 28.7 ± 2.4 sec) มากกว่า Zone 1 (18.7 ± 2.6 sec) และ Zone 4 (17.2 ± 2.1 sec) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ANOVA and Dunnett's test) และสำหรับหนูที่ได้รับสารสกัดใบแปะก๊วย (GK) ได้ใช้เวลาในการว่ายใน Zone 2 (36.1 ± 2.6 sec) มากกว่า Zone 1, 3, 4 (20.6 ± 2.9 sec, 18.6 ± 1.4 sec, 14.8 ± 2.0 sec) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ANOVA and Dunnett's test) แสดงว่าหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดหรือยาสามารถจดจำได้ว่าโซนใดเคยมีแท่นอยู่

Morris Water Maze Probe Trail



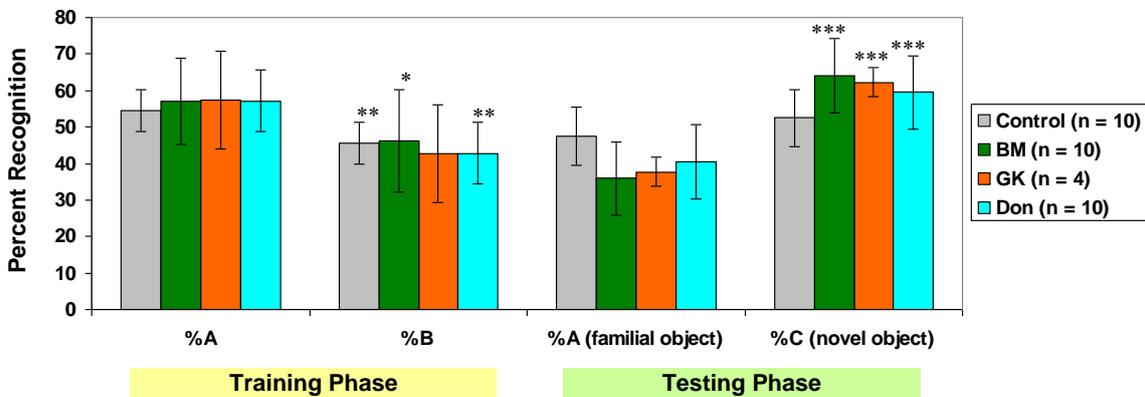
รูปที่ 3-9 ผลการทดสอบความจำเกี่ยวกับสถานที่ด้วยวิธี probe trial ซึ่งกระทำในวันที่ 8 ของการฝึกด้วย Morris Water Maze โดย Zone 2 เป็นโซนที่เคยมีแท่นได้น้ำวางอยู่ พบว่าหนูแก่กลุ่มควบคุม (Control) ไม่สามารถจดจำโซนที่เคยมีแท่นอยู่ได้ดีเท่ากับหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดพรมมิ (BM) แปะก๊วย (GK) และยา donepezil (Don) (*, \$ = $P < 0.05$, ANOVA; * เปรียบเทียบกับ Zone 1, 3, 4 แต่ \$ เปรียบเทียบกับ Zone 1 และ 4 เท่านั้น)

1.2 Novel Object Recognition (NOR) Test

การทดสอบความจำโดยใช้ Novel Object Recognition (NOR) Test เป็นการทดสอบความจำต่อวัตถุที่เคยเห็นหรือสัมผัสก่อนหน้านี้ (familiar object) ในเวลาผ่านไปเพียงไม่กี่นาที เพื่อดูว่าสามารถจำได้หรือไม่ ซึ่งผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3-10

ในช่วง training phase หนูทดลองแต่ละกลุ่มแสดงพฤติกรรมการสำรวจโดยดมวัตถุ A บ่อยครั้งหรือนานกว่าการดมวัตถุ B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, $P < 0.01$; paired t-test) อย่างไรก็ตาม ในช่วง testing phase เมื่อทำการทดสอบหนูแก่กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การจดจำวัตถุที่เคยพบมาก่อน (familiar object, วัตถุ A) เท่ากับ 47.5 ± 7.9 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การจดจำวัตถุใหม่ (novel object, วัตถุ C) เท่ากับ 52.5 ± 7.9 ($P > 0.05$; paired t-test) แสดงว่าหนูแก่กลุ่มนี้ไม่สามารถแยกได้ว่าวัตถุชิ้นใดเป็นวัตถุอันเก่าที่เคยดมสำรวจมาก่อนระหว่างวัตถุ A กับวัตถุ C

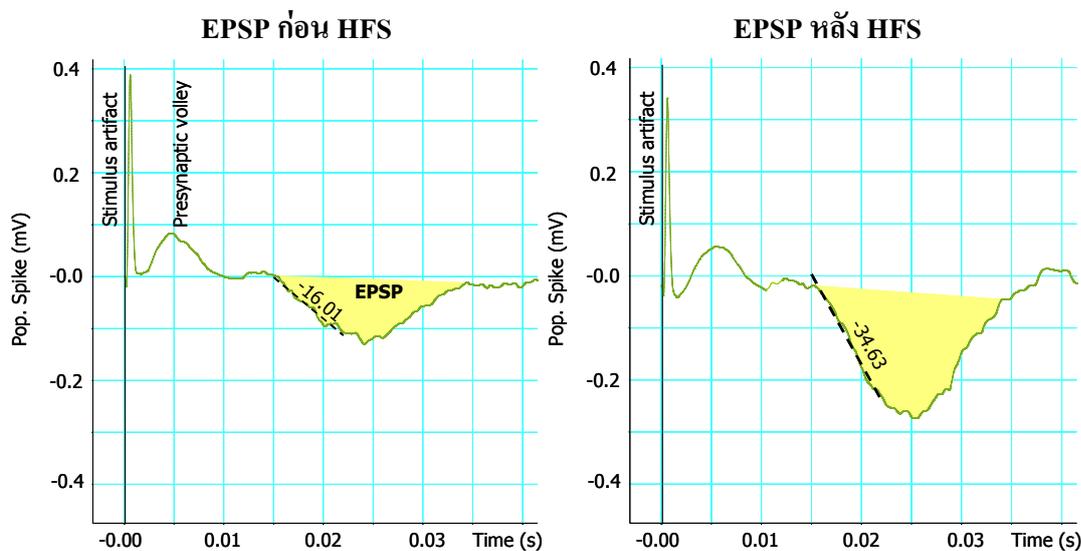
สำหรับหนูทุกกลุ่มทั้งกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิ (BM) สารสกัดใบแปะก๊วย (GK) และยา donepezil (Don) มีเปอร์เซ็นต์การจดจำวัตถุที่เคยพบมาก่อน (familiar object, A) เท่ากับ 35.9 ± 10.1 (BM), 37.7 ± 3.9 (GK) และ 40.5 ± 10.1 (Don) ซึ่งน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การจดจำวัตถุใหม่ (novel object, C) เท่ากับ 64.1 ± 10.1 (BM), 62.3 ± 3.9 (GK) และ 59.5 ± 10.1 (Don) ตามลำดับ ($P > 0.001$, paired t-test) แสดงให้เห็นว่าหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดหรือยาสามารถจดจำดีกว่าหนูแก่ที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่น โดยสามารถแยกแยะได้ว่าวัตถุ C เป็นวัตถุอันใหม่ที่ไม่เคยดมสำรวจมาก่อน



รูปที่ 3-10 เปรียบเทียบความสามารถในการจดจำวัตถุทดสอบด้วย Novel Object Recognition (NOR) Test ในหนูแก่กลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิ (BM) สารสกัดใบแปะก๊วย (GK) และยา donepezil (Don) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วง คือ training phase และ testing phase (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$; paired t-test)

2. การถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส

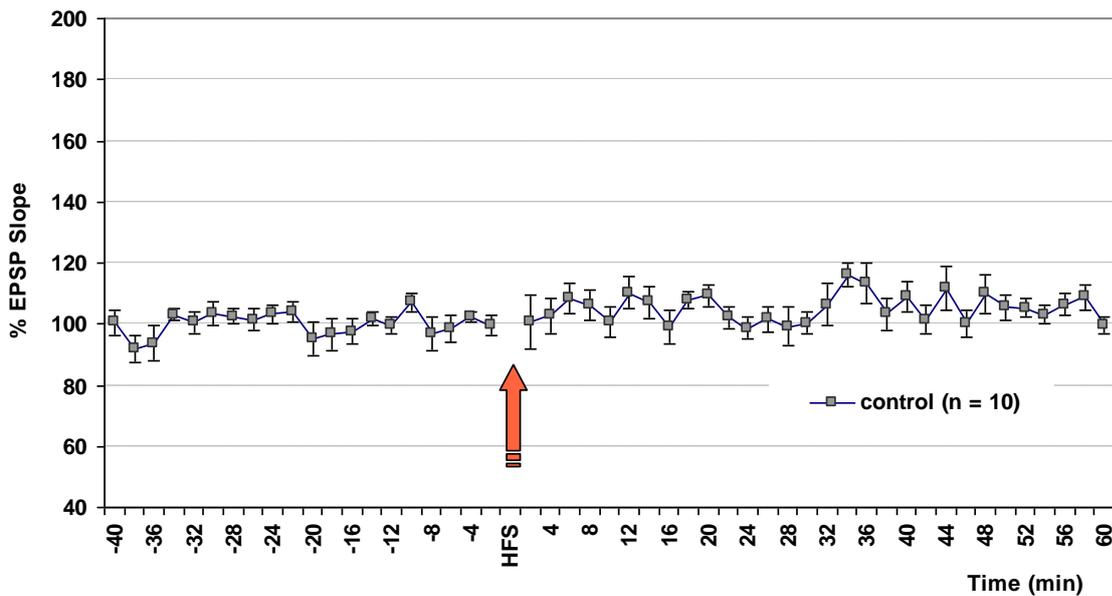
ลักษณะของสัญญาณประสาทโดยรวมที่เรียกว่า “ศักย์ไฟฟ้าเชิงกระตุ้นหลังซินแนปส์” หรือ “excitatory post synaptic potential” (EPSP) ที่เกิดจากกระตุ้นด้วย bipolar electrode ที่บริเวณ Schaffer collateral และบันทึกที่บริเวณ CA1 pyramidal neuron ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส จะแสดงเป็นสัญญาณประสาทดังรูป 11 ซึ่งศักย์ไฟฟ้าชนิดนี้เป็นผลรวมจากเซลล์ประสาทที่ตอบสนองต่อสัญญาณกระตุ้นเพียงครั้งเดียวและกระตุ้นซ้ำๆ ทุกๆ 2 นาที (low frequency stimulation, LFS) โปรแกรมชาร์ทซึ่งมีฟังก์ชันพิเศษที่สามารถคำนวณหาค่าความลาดชัน (slope) ของ EPSP ได้



รูปที่ 3-11 ตัวอย่างผลของศักย์ไฟฟ้าหลังซินแนปส์ชนิด EPSP ที่บันทึกได้จาก CA1 pyramidal cell layer ในช่วงก่อน (ซ้าย) และหลัง (ขวา) จากการกระตุ้นด้วยกระแสความถี่สูง (HFS) เพื่อชักนำให้เกิดภาวะ LTP ในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิ ซึ่งจะสังเกตได้ว่าความลาดชันของ EPSP ภายหลังจาก HFS มีค่าเพิ่มขึ้น

2.1 ผลของตัวทำละลายต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส

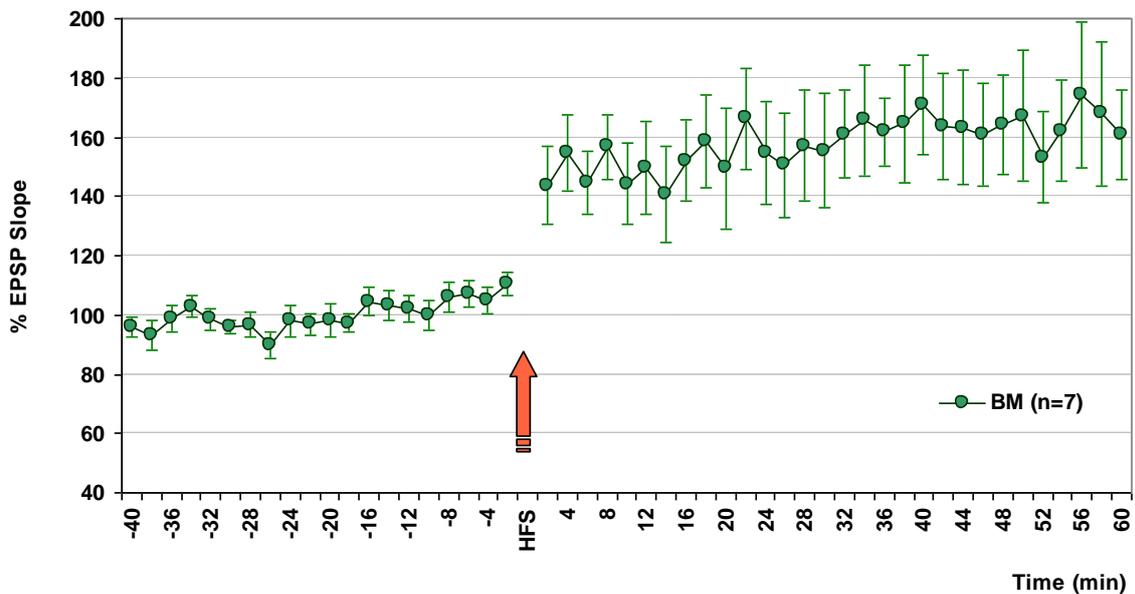
จากผลการวัดศักย์ไฟฟ้าหลังซินแนปส์ชนิด EPSP ในหนูแก่กลุ่มควบคุมจำนวน 10 ตัว พบว่าให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความลาดชันก่อนทำการกระตุ้นด้วยกระแสความถี่สูง (HFS) เท่ากับ 100.0 ± 3.8 (range = 91.8 – 107.2) และค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความลาดชันภายหลังทำ HFS เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 5.11% โดยมีเฉลี่ยค่าเท่ากับ 105.1 ± 4.7 (range = 98.7 – 105.1) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทั้งสองช่วงนี้แล้วไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจน (รูปที่ 3-12) แสดงว่าการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่กลุ่มนี้ไม่สามารถชักนำให้เกิดปรากฏการณ์ LTP ได้



รูปที่ 3-12 ผลการวิเคราะห์ศักย์ไฟฟ้าหลังซินแนปส์ (EPSP) ของหนูแก่กลุ่มควบคุม (n = 10) ที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย (น้ำกลั่น) โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความลาดชัน (slope) ของ EPSP ในช่วงก่อน (ช่วงเวลาที่ติดลบ) และหลังจากการชักนำให้เกิดปรากฏการณ์ LTP ด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความถี่สูง (HFS, ลูกศรชี้)

2.2 ผลของสารสกัดพรมมิต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส

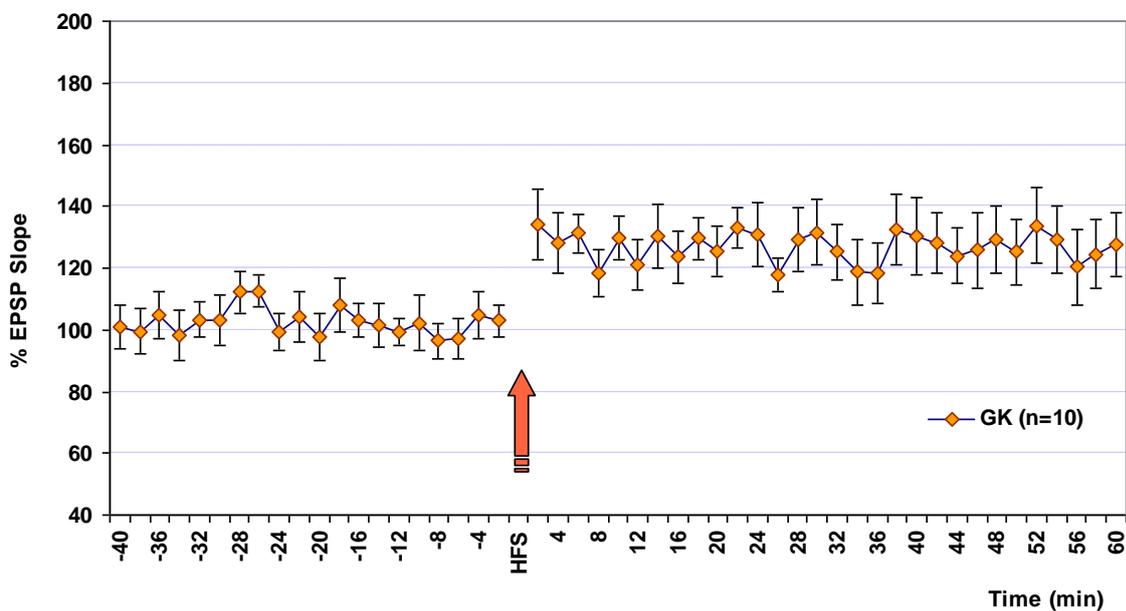
ผลการวัดศักย์ไฟฟ้าหลังซินแนปส์ชนิด EPSP ในหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 40 มก./กก. เป็นเวลา 3 เดือน จำนวน 7 ตัว พบว่าให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความลาดชันก่อนทำการกระตุ้นด้วยกระแสความถี่สูง (HFS) เท่ากับ 100.0 ± 5.0 (range = 89.9 – 110.5) และค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความลาดชันภายหลังทำ HFS เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 58.02% โดยมีเฉลี่ยค่าเท่ากับ 158.0 ± 8.5 (range = 140.7 – 174.4) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทั้งสองช่วงนี้แล้วจะเห็นว่าการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนและยาวนานเป็นชั่วโมง แสดงว่าการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่กลุ่มนี้มีประสิทธิภาพที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม โดยสามารถชักนำให้เกิดปรากฏการณ์ LTP ได้ดังแสดงในรูปที่ 3-13



รูปที่ 3-13 ผลการวิเคราะห์ EPSP ของหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรพรมมิ (n = 7) โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความลาดชันของ EPSP ในช่วงก่อน (ช่วงเวลาที่ติดลบ) และหลังจากการชักนำให้เกิดปรากฏการณ์ LTP ด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟที่ความถี่สูง (HFS, ลูกศรชี้)

2.3 ผลของสารสกัดแปะก๊วยต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส

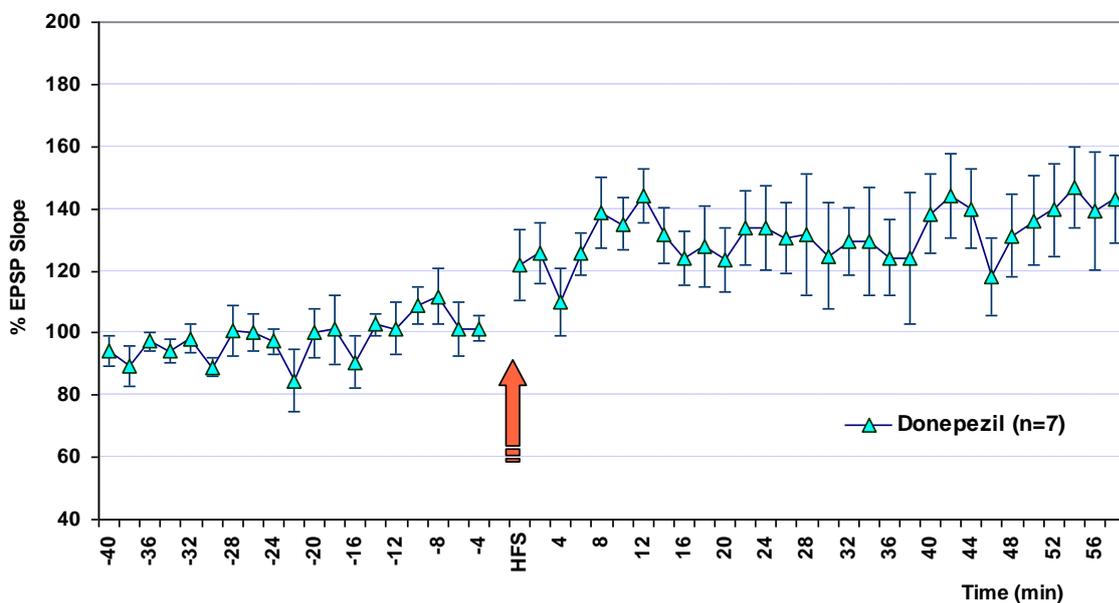
ผลการวัดศักย์ไฟฟ้าหลังซินแนปส์ชนิด EPSP ในหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดแปะก๊วยขนาด 60 มก./กก. เป็นเวลา 3 เดือน จำนวน 10 ตัว พบว่าให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความลาดชันก่อนทำการกระตุ้นด้วยกระแสความถี่สูง (HFS) เท่ากับ 102.6 ± 4.5 (range = 96.4 – 112.6) และค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความลาดชันภายหลังจาก HFS เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 26.94% โดยมีเฉลี่ยค่าเท่ากับ 126.9 ± 4.9 (range = 117.9 – 134.1) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทั้งสองช่วงนี้แล้วจะเห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนและยาวนานเป็นชั่วโมง แสดงว่าการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่กลุ่มนี้มีประสิทธิภาพที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม และสามารถชักนำให้เกิดปรากฏการณ์ LTP เช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิได้ดังแสดงในรูปที่ 3-14



รูปที่ 3-14 ผลการวิเคราะห์ EPSP ของหนูแก่กลุ่มได้รับสารสกัดแปะก๊วย (n = 10) โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความลาดชันของ EPSP ในช่วงก่อน (ช่วงเวลาที่ติดลบ) และหลังจากการชักนำให้เกิดปรากฏการณ์ LTP ด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟที่ความถี่สูง (HFS, ลูกศรชี้)

2.4 ผลของยา donepezil ต่อการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส

รูปที่ 3-15 แสดงผลการวัดศักย์ไฟฟ้าหลังซินแนปส์ชนิด EPSP ในหนูแก่กลุ่มที่ได้รับยา donepezil ขนาด 1 มก./กก. เป็นเวลา 3 เดือน จำนวน 10 ตัว พบว่าให้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความลาดชันก่อนทำการกระตุ้นด้วยกระแสความถี่สูง (HFS) เท่ากับ 98.1 ± 6.6 (range = 84.7 – 111.8) และค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความลาดชันภายหลังทำ HFS เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 31.6% โดยมีเฉลี่ยค่าเท่ากับ $131.6.9 \pm 8.6$ (range = 110.0 – 146.9) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทั้งสองช่วงนี้แล้วจะเห็นว่ามี的增加อย่างชัดเจนและยาวนานเป็นชั่วโมง แสดงว่าการถ่ายทอดสัญญาณประสาทที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่กลุ่มนี้มีประสิทธิภาพที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม และสามารถชักนำให้เกิดปรากฏการณ์ LTP เช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิและแปะก๊วย



รูปที่ 3-15 ผลการวิเคราะห์ EPSP ของหนูแก่กลุ่มที่ได้รับยา Donepezil (n = 7) โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความลาดชันของ EPSP ในช่วงก่อน (ช่วงเวลาที่ติดลบ) และหลังจากการชักนำให้เกิดปรากฏการณ์ LTP ด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความถี่สูง (HFS, ลูกศรชี้)

3. การศึกษาผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทชนิดอะมิโน

ตัวอย่างโครมาโตแกรมที่ประกอบด้วย peak ของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ แอสปาร์เตต กลูตาเมต เซอรีน กลูตามีน ไกลซีน และกาบ้า ที่ได้จากการฉีด supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ของหนูแก่กลุ่ม vehicle (control), Donepezil, BM และ ginkgo แสดงดังรูปที่ 16-19 ตามลำดับ เมื่อได้ค่าพื้นที่ใต้ peak ของสารต่างๆ จากโครมาโตแกรม จึงนำมาคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นโดยเทียบกับ standard calibration curve (รูปที่ 3-7) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย และ plot กราฟแยกตามกรดอะมิโนแต่ละตัว โดยมีหน่วยเป็นต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเนื้อสมอง ดังแสดงในรูปที่ 3-20 และ 3-21 ตามลำดับ

จากผลการทดลอง พบว่า หนูแก่กลุ่ม vehicle (control) มีค่าเฉลี่ยของแอสปาร์เตต กลูตาเมต กลูตามีน เซอรีน ไกลซีน และกาบ้า ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส เท่ากับ 5.91 ± 0.27 , 16.61 ± 0.59 , 1.79 ± 0.36 , 1.72 ± 0.06 , 0.88 ± 0.05 และ 6.66 ± 0.1 $\mu\text{g/ml/mg protein}$ ตามลำดับ

หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบแปะก๊วย มีค่าเฉลี่ยของแอสปาร์เตต กลูตาเมต กลูตามีน เซอรีน ไกลซีน และกาบ้า ในสมองส่วนนี้ เท่ากับ 5.8 ± 0.4 , 20.03 ± 1.43 , 3.03 ± 0.89 , 1.96 ± 0.09 , 0.97 ± 0.13 และ 7.05 ± 0.44 $\mu\text{g/ml/mg protein}$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเฉพาะกลูตาเมตกับเซอรีนเท่านั้นที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Dunnett post hoc test) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control

หนูกลุ่มที่ได้รับยา Donepezil มีค่าเฉลี่ยแอสปาร์เตต กลูตาเมต กลูตามีน เซอรีน ไกลซีน และกาบ้า ในสมองส่วนนี้ เท่ากับ 5.85 ± 0.4 , 17.58 ± 0.92 , 4.23 ± 0.47 , 1.6 ± 0.09 , 0.54 ± 0.04 และ 6.28 ± 0.67 $\mu\text{g/ml/mg protein}$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเฉพาะกลูตามีนและไกลซีนเท่านั้นที่มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Dunnett post hoc test) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control

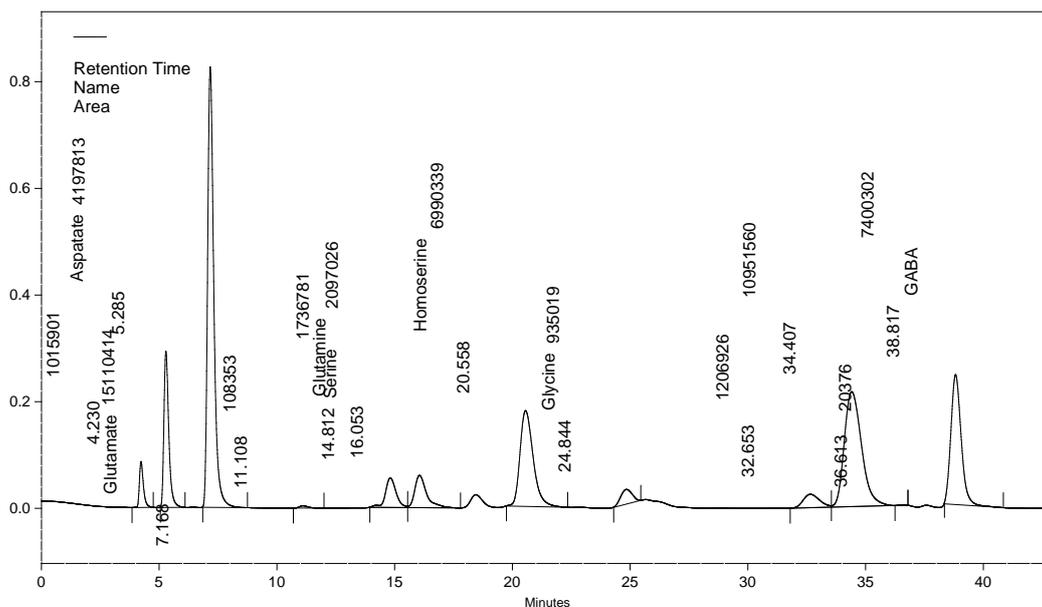
สำหรับหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิ มีค่าเฉลี่ยแอสปาร์เตต กลูตาเมต กลูตามีน เซอรีน ไกลซีน และกาบ้า ในสมองส่วนนี้ เท่ากับ 6.09 ± 0.44 , 19.47 ± 0.56 , 3.24 ± 0.4 , 2.1 ± 0.09 , 0.85 ± 0.05 และ 7.6 ± 0.32 $\mu\text{g/ml/mg protein}$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าระดับของกลูตาเมต กลูตามีน และเซอรีนมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$; one-way ANOVA and Dunnett post hoc test)

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\prommi old rat\Control\hippocampus 1 -002

User: System

Acquired: 9/21/2010 10:46:01 AM

Printed: 1



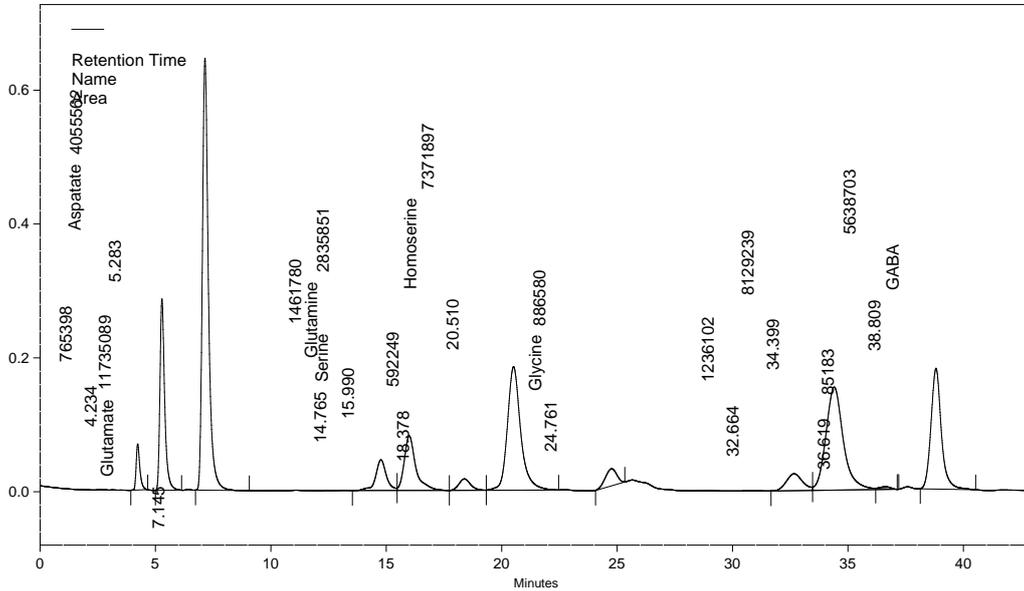
Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
2	Aspartate	5.285	4197813	287727
3	Glutamate	7.168	15110414	817299
5	Serine	14.812	1736781	55250
6	Glutamine	16.053	2097026	60031
7	Homoserine	20.558	6990339	178851
8	Glycine	24.844	935019	27329
12	GABA	38.817	7400302	242754

Totals			38467694	1669241
--------	--	--	----------	---------

รูปที่ 3-16 ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่กลุ่มควบคุม

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\prommi old rat\Aricept\hippocampus 4 -002
 User: System
 Acquired: 9/22/2010 2:47:00 PM
 Printed: 1



Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
2	Aspartate	5.283	4055562	270204
3	Glutamate	7.145	11735089	620582
4	Serine	14.765	1461780	45498
5	Glutamine	15.990	2835851	80589
7	Homoserine	20.510	7371897	183717
8	Glycine	24.761	886580	25464
12	GABA	38.809	5638703	178052

Totals			33985462	1404105
--------	--	--	----------	---------

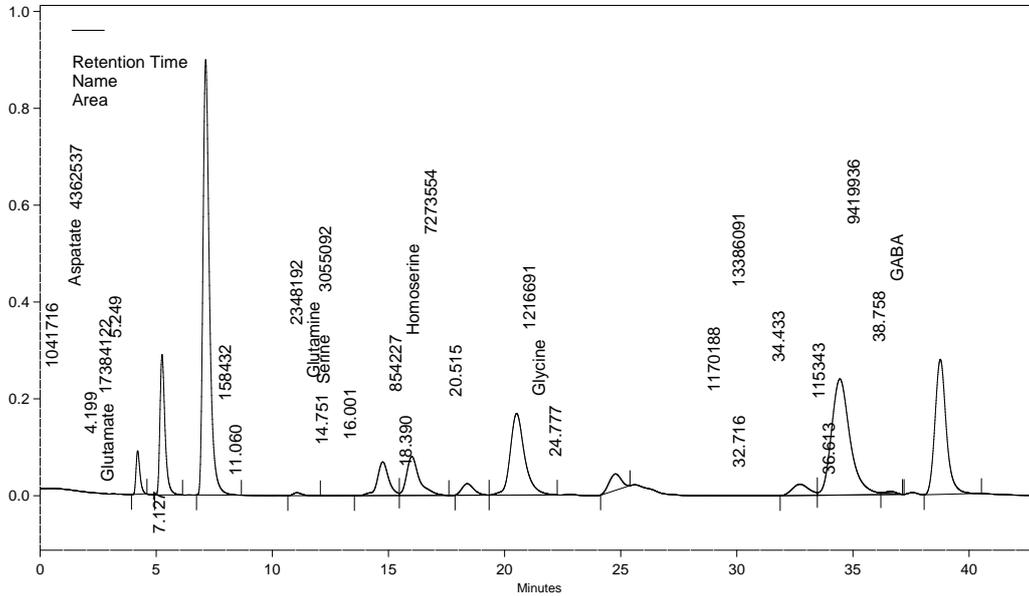
รูปที่ 3-17 ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่ที่ได้รับ Donepezil

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\prommi old rat\BM\hippocampus 2 -002

User: System

Acquired: 9/23/2010 3:54:48 PM

Printed: 1



Detector C

Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
2	Aspartate	5.249	4362537	280280
3	Glutamate	7.127	17384122	866245
5	Serine	14.751	2348192	68844
6	Glutamine	16.001	3055092	79220
8	Homoserine	20.515	7273554	167898
9	Glycine	24.777	1216691	33607
13	GABA	38.758	9419936	277547

Totals			45060123	1773641
--------	--	--	----------	---------

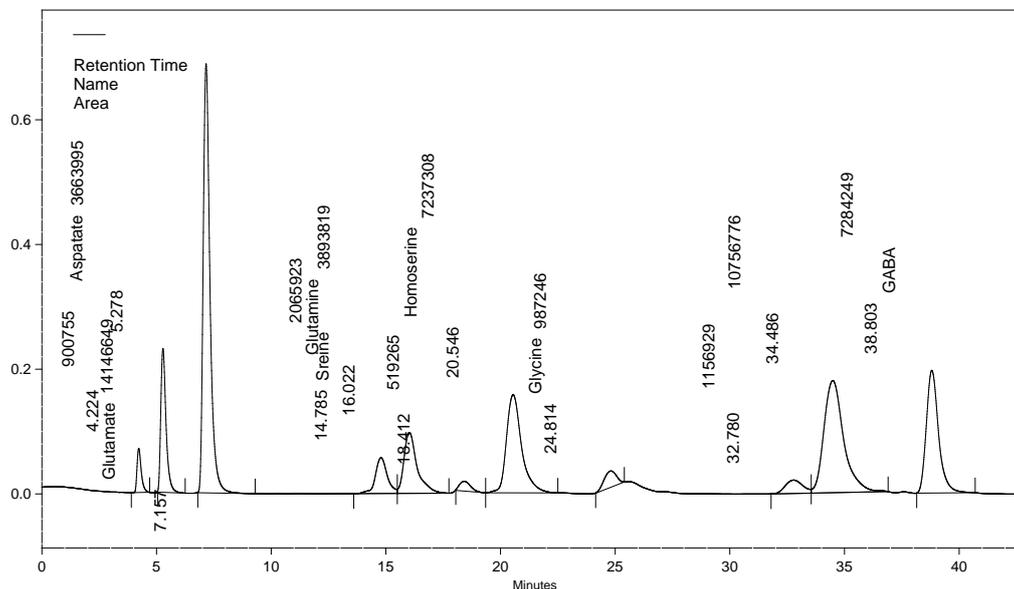
รูปที่ 3-18 ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดพรมมิ

Data Name: C:\CLASS-VP\Data\Pornnarin\prommi old rat\GK\hippocampus 8 -002

User: System

Acquired: 9/27/2010 10:30:04 AM

Printed: 1

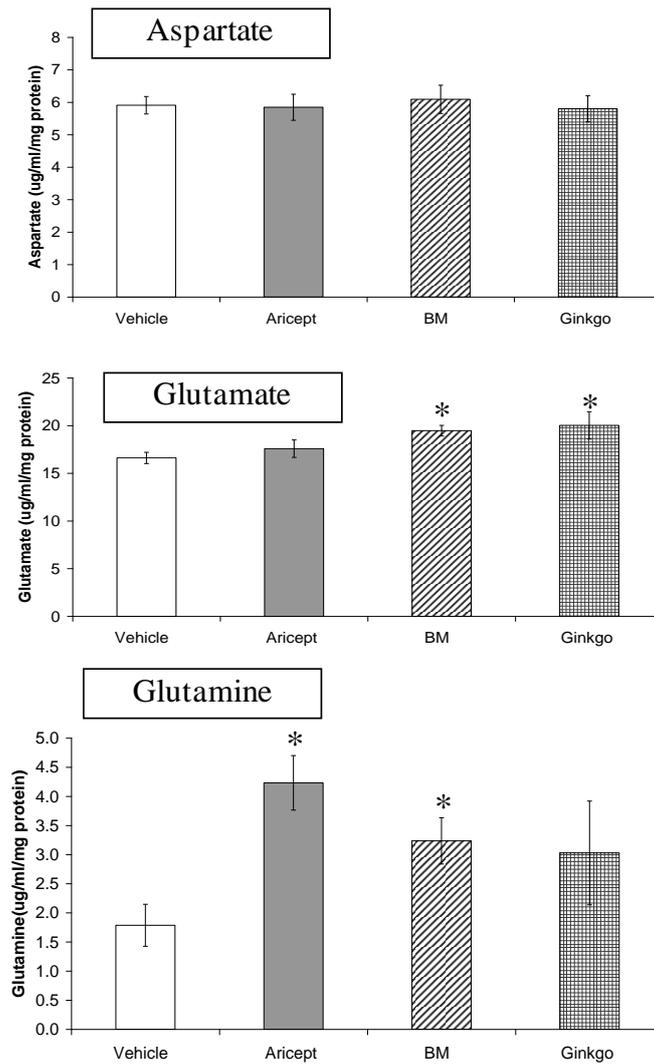


Detector C

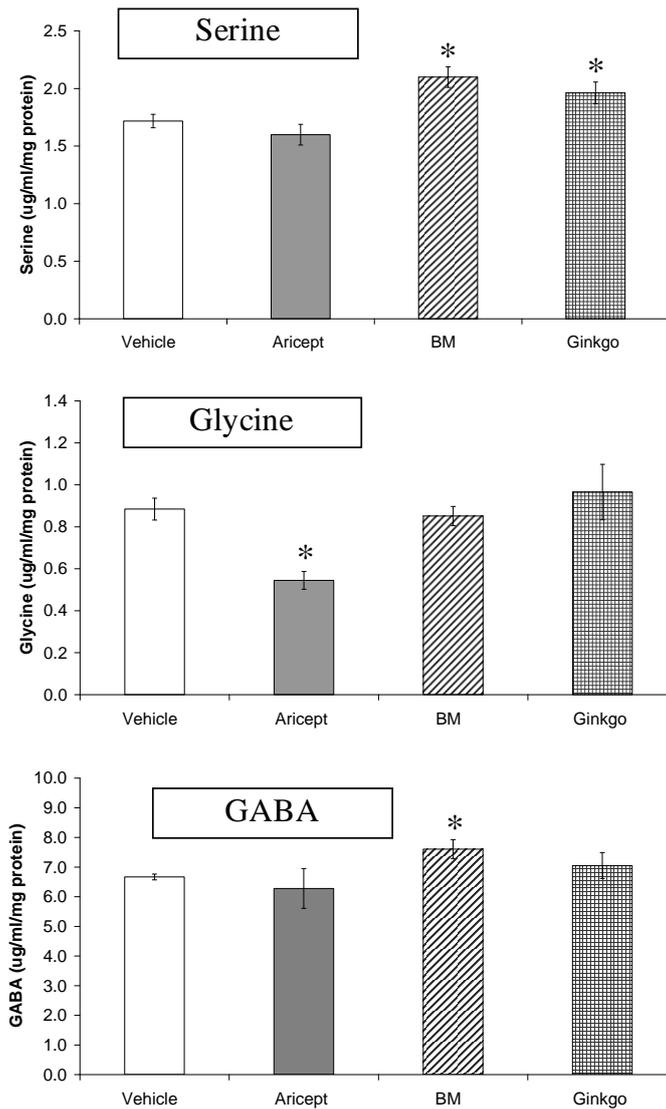
Pk #	Name	Retention Time	Area	Height
2	Aspartate	5.278	3663995	228144
3	Glutamate	7.157	14146649	677005
4	Serine	14.785	2065923	57205
5	Glutamine	16.022	3893819	97543
7	Homoserine	20.546	7237308	156798
8	Glycine	24.814	987246	25970
11	GABA	38.803	7284249	195397

Totals			39279191	1438061
--------	--	--	----------	---------

รูปที่ 3-19 ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ supernatant ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดใบแปะก๋วย



รูปที่ 3-20 เปรียบเทียบระดับของแอสปาร์เตต กลูตาเมต และกลูตามีน ที่วัดได้จาก supernatant สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่กลุ่ม vehicle (control), Aricept, BM และ ginkgo (* = $p < 0.05$; one-way ANOVA and Dunnett post hoc test เปรียบเทียบกับกลุ่ม vehicle)



รูปที่ 3-21 เปรียบเทียบระดับของเซอรีน ไกลซีน และกาบ้า ที่วัดได้จาก supernatant สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่กลุ่ม vehicle (control), Aricept, BM และ ginkgo (* = $p < 0.05$; one-way ANOVA and Dunnett post hoc test เปรียบเทียบกับกลุ่ม vehicle)

อภิปรายผลการทดลอง

1. ผลของสารสกัดต่อความสามารถในการเรียนรู้และความจำ

อาการหลงๆ ลืมๆ จำไม่ได้ เป็นอาการแสดงที่เด่นที่สังเกตในผู้สูงอายุ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าหนูที่แก่ตามธรรมชาติจะมีความบกพร่องด้านความจำเกี่ยวกับสถานที่และการจดจำวัตถุสิ่งของ (ปราโมทย์ และ ปัทมา, พ.ศ. 2547) เช่นเดียวกับ ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อป้อนสารสกัดหยาบพรมมิติดต่อกันเป็นระยะเวลา 90 วัน ในหนูแก่ตามธรรมชาติ พบว่า หนูที่ได้รับสารสกัดหยาบพรมมิมิพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ (spatial memory) ดีกว่ากลุ่มควบคุม โดยสังเกตจากระยะเวลาที่หนู

ว่ายาอยู่ในไซโซนที่เคมีแทนได้น้ำมากกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่น ซึ่งจากผลการวิจัยนี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาในแบบจำลองความจำบกพร่องด้วยสัตว์ทดลองที่ผ่านมา อาทิเช่น เมื่อป้อนสารสกัดพรมมินานเป็นเวลา 14 วันในหนูถีบจักร สามารถช่วยฟื้นฟูความจำในหนูถีบจักรที่มีความจำบกพร่องจากการฉีด scopolamine ซึ่งยับยั้งการถ่ายทอดสัญญาณประสาทในระบบโคลิเนอร์จิก เข้าที่ช่องท้องด้วยขนาด 0.6 มก./กก. (Taepavarapruk et al., 2006a; Preedapirom et al., 2008a) หรือฉีดด้วยสาร ethylcholine aziridinium ion (AF64A) ซึ่งมีพิษต่อเซลล์ประสาทโคลิเนอร์จิก ด้วยขนาด 2 นาโนโมล/2 ไมโครลิตร เข้าในโพรงสมอง (Uabundit et al., 2010)

ผลการศึกษาในแบบจำลองภาวะความจำบกพร่องจากการผูกหลอดเลือดแดงที่คอ (2 vessel occlusion [2VO] method) ในหนูแรท ซึ่งได้รับสารสกัดพรมมินานเป็นเวลา 14 วันหลังจากพักฟื้นจากการผ่าตัดผูกหลอดเลือดสามารถฟื้นฟูความจำได้ดีกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ถูกผูกหลอดเลือดแต่ได้รับเฉพาะตัวทำละลาย propylene glycol (PG) โดยที่หนูกลุ่มที่มีภาวะความจำบกพร่องที่ได้รับสารสกัดพรมมินาน จะมีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการหาแท่นได้น้ำแตกต่างจากหนูกลุ่ม sham คือหนูที่ได้รับการผ่าตัดแต่ไม่ได้ผูกหลอดเลือด (Taepavarapruk et al., 2006b) นอกจากนี้ผลการวิจัยนี้ยังสอดคล้องกับรายงานวิจัยในมนุษย์ ที่ผ่านมา ซึ่งระบุไว้ว่าพรมมินานเมื่อทานติดต่อกันสามารถช่วยบำรุงความจำชนิด retention memory ในอาสาสมัครสูงอายุ (Stough et al., 2001; Rooderys et al., 2002)

2. สารสกัดพรมมินานต่อการชักนำให้เกิด long-term potentiation

จากการศึกษาผลของสารสกัดพรมมินานเมื่อให้เป็นระยะเวลา 16 วัน ต่อการชักนำให้เกิด long-term potentiation ในหนูแก่ตามธรรมชาติพบว่าค่า % EPSP slope ในหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมินานไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแก่ในกลุ่มควบคุม ยังไม่พบการศึกษาผลของสารสกัดพรมมินานต่อการชักนำให้เกิด long-term potentiation ในหนูแก่ตามธรรมชาติ แต่ก็มีกรรายงานที่ผ่านมาระบุว่าสาร bacosides ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสมุนไพรพรมมินานสามารถที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของการส่งผ่านสัญญาณประสาท ดังนั้นจึงน่าจะช่วยให้ความจำและการรับรู้ต่างๆไปดีขึ้น (Parris et al., 1999) และมีการศึกษาผลของการให้สารสกัดสมุนไพรพรมมินานในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียความทรงจำโดยใช้ NOS inhibitor แล้วทำการทดสอบการเรียนรู้และความจำโดย Morris water maze test พบว่าพรมมินานสามารถที่จะฟื้นฟูการสูญเสียความทรงจำที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย NOS inhibitor ได้ ซึ่งทราบกันว่า NOS เป็นเอนไซม์ที่สำคัญใน nitric oxide-mediated pathway ทำให้เกิด LTP (Saraf et al., 2009)

สำหรับผลการศึกษาในหนูแก่ตามธรรมชาติที่ได้รับสารสกัดใบแปะก๊วยติดต่อกันเป็นระยะเวลา 90 วัน สามารถชักนำให้เกิด long-term potentiation ได้เช่นกัน ซึ่งแปะก๊วยเป็นสมุนไพรแผนจีนที่เชื่อว่าช่วย

บำรุงความจำ เป็นอาหารเสริมที่นิยมบริโภคโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ (Mix and Crews, 2002; Solomon et al., 2002) ออกฤทธิ์เป็น anticholinesterase และ cognitive enhancer (Das et al., 2002)

3. ผลของพรมิตต่อปริมาณสารสื่อประสาทในสมอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษารั้งแรกที่แสดงผลของการประยุกต์สารสกัดพรมิตต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนในสมองใหญ่ซีรีรัมและโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ (Kandel et al., 2000) นับตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน การศึกษาผลของสารสกัดพรมิตต่อการเปลี่ยนแปลงระดับสารสื่อประสาท (neurotransmitters) ในสมองยังมีน้อยมาก ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่มุ่งเน้นศึกษาระดับสารสื่อประสาทกลุ่ม monoamine เช่นงานวิจัยของ Dulcy และ Rajan (2009) ที่รายงานไว้ว่าเมื่อป้อนสารสกัดพรมิตให้แก่ลูกหนูที่เกิดได้ 15 วัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ด้วยขนาด 60 มก./กก. สามารถกระตุ้นให้ลูกหนูมีพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำที่ดี และเมื่อพวกเขาได้วิเคราะห์ปริมาณสารสื่อประสาทกลุ่ม amine ที่สมองส่วน forebrain และ hindbrain ก็พบว่ามีความเข้มข้นของซีโรโตนิน (serotonin, 5-HT) มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกรางงานวิจัยหนึ่งเป็นของ Joshi และ Parle (2006) ที่ศึกษาระดับการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งทำหน้าที่ลดบทบาทของสารสื่อประสาทชนิด acetylcholine โดยภายหลังการป้อนสาร phenytoin ขนาด 12 มก./กก. ซึ่งในหนูถีบจักรกลุ่มควบคุม เขาพบว่ามีระดับการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase อย่างชัดเจน แต่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมิตขนาด 100 หรือ 200 มก./กก. และหนูที่ได้รับยา Piracetam ขนาด 200 มก./กก. มีระดับการทำงานของเอนไซม์นี้ลดลงอย่างชัดเจนและมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลองนี้นับว่าเป็นรายงานวิจัยเดียวที่พบว่าเมื่อหนูแก่ได้รับสารสกัดพรมิตและแปะก๊วย ติดต่อกัน เป็นเวลา 3 เดือนสามารถชักนำให้ระดับกลูตาเมตในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสสูงขึ้นกว่าหนูแก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่นซึ่งเป็นตัวทำละลาย โดยที่ระดับที่เพิ่มขึ้นนี้ยังต่ำกว่าระดับปกติที่พบในฮิปโปแคมปัสของหนูหนุ่ม และยังอยู่ใน physiological range (จากข้อมูลงานวิจัยนาร์อง) โดยการเพิ่มขึ้นของกลูตาเมตนี้ สอดคล้องกับประสิทธิภาพที่เพิ่มขึ้นของการถ่ายทอดสัญญาณประสาทในกระบวนการเกิด long-term potentiation (LTP) หรืออาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดทั้งสองช่วยให้การเกิด glutamate exocytosis บริเวณปลายประสาทดีขึ้น (Wang et al., 2005, 2006; Christen et al., 2004) หรือออกฤทธิ์ผ่านทาง nitric oxide ที่บริเวณซินแนปส์ (Saraf et al., 2009) เมื่อเปรียบเทียบกับผลของยา donepezil ซึ่งเป็นยากลุ่ม acetylcholinesterase inhibitor สามารถชักนำให้เกิด LTP ในหนูแก่เช่นเดียวกัน แต่อาจผ่านทางกลไกอื่น เช่น การเพิ่มระดับของ acetylcholine ซึ่งเป็นตัว modulator ที่สำคัญในวงจรประสาทภายในฮิปโปแคมปัส (Barns et al., 2000)

ที่น่าสนใจอีกจุดหนึ่ง คือ ทั้งสารสกัดพรมิตและแปะก๊วยสามารถเพิ่มปริมาณเซอรินในฮิปโปแคมปัสของหนูแก่ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเซอรินเป็นกรดอะมิโนที่เชื่อว่าสร้างและปลดปล่อยจาก astroglia

ทำหน้าที่คอยควบคุมการหลั่งกลูตาเมตจากเซลล์คำจุนเหล่านี้และมีอิทธิพลต่อกระบวนการเกิด LTP ในฮิปโปแคมปัสด้วยเช่นกัน (Henneberger et al., 2010) ผลในการเพิ่มระดับเซอรีนในสมองส่วนนี้จึงเป็นอีกสิ่งที่น่าสนใจในการทำการศึกษานี้ในเชิงลึกต่อไป

สำหรับผลการทดลองที่พบว่าหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดพรมมิสามารถเพิ่มระดับกาบ้าในฮิปโปแคมปัสได้อย่างมีนัยสำคัญ น่าจะสอดคล้องกับผลการศึกษานำร่องของทีมผู้วิจัย (รายงานวิจัย วช. ปี พ.ศ. 2548 ของ นิวัติ เทพาวราพฤษ และคณะ) ที่ระบุว่า หนูถีบจักรที่ได้รับสารสกัดพรมมิครั้งเดียวในขนาด 4, 40 หรือ 80 มก./กก. ประมาณ 30-40 นาที จะมีอาการลดการเคลื่อนไหวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย (propylene glycol) แต่ผลการทดลองนี้ค้ำกับผลเมื่อป้อนติดต่อกัน 2 สัปดาห์ ซึ่งพบว่าสามารถต้านฤทธิ์ของยาสลบชนิด sodium pentobarbital เมื่อฉีดเข้าช่องท้องขนาด 40 มก./กก. พบว่าหนูที่ได้รับพรมมิในขนาด 4 มก./กก. มีระยะเวลาที่เริ่มสลบ (onset time) ยาวนานขึ้น และกลุ่มที่ได้รับในขนาด 40 หรือ 80 มก./กก. จะไม่สลบถึง 80-89 เปอร์เซ็นต์ (Taepavarapruk et al., 2006c)

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการให้สารสกัดหยาบพรมมิ ยา donepezil (Aricept) และสารสกัดใบแปะก๊วย ติดต่อกันเป็นเวลา 90 วัน มีส่วนช่วยป้องกันหรือฟื้นฟูความสามารถในการเรียนรู้และความจำ ในหนูแก่ตามธรรมชาติ โดยแสดงจากผลด้านพฤติกรรม โดยการทดสอบด้วย Morris water maze ซึ่งทดสอบความจำเกี่ยวกับสถานที่ และ novel object recognition ซึ่งใช้ทดสอบเกี่ยวกับการจดจำวัตถุสิ่งของ โดยผลทางพฤติกรรมดังกล่าวสามารถยืนยันได้จากผลทางสรีรวิทยาทางไฟฟ้า โดยการกระตุ้นกระบวนการ long-term potentiation ที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งผลของสารสกัดพรมมิมีระดับใกล้เคียงกับผลของยา donepezil และสารสกัดใบแปะก๊วย นอกจากนี้ยังพบว่า หนูแก่ที่ได้รับสารสกัดพรมมิจะมีการเพิ่มของระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโน ได้แก่ กลูตาเมต กลูตามีน เซอรีน และกาบ้า อย่างมีนัยสำคัญในฮิปโปแคมปัส ซึ่งแตกต่างจากผลของสารสกัดแปะก๊วยหรือยา donepezil ที่มีผลต่อสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิโนเพียงบางตัว

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาที่จะทำการศึกษาต่อในอนาคตควรที่จะทำการศึกษาเพิ่มเติมในด้านเภสัชวิทยาของสารสกัดหยาบพรมมิ เพื่อให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ที่ผ่านทางรีเซปเตอร์ใด ทำให้ช่วยเพิ่มการเรียนรู้ความจำและการชักนำให้เกิด long-term potentiation ในหนูทดลองที่แก่ตามธรรมชาติหรือหนูที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องซึ่งคล้ายกับผู้ป่วยอัลไซเมอร์ ข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้จำเป็นต่อการพัฒนาสารสกัดพรมมิให้เป็นอาหารเสริมบำรุงสมองและความจำ ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ต่อผู้ป่วยที่เริ่มมีอาการสมองเสื่อมหรือกำลังเป็นโรคอัลไซเมอร์ได้

บรรณานุกรม

1. ปราโมทย์ ประสาทกุล, ปัทมา ว่าพัฒน์วงศ์. Aged Population of Thailand 1960-2020. วารสารประชากรและสังคม. มกราคม 2547. ปีที่ 12 ฉบับที่ 2: หน้า 33-60.
2. Barnes CA, Meltzer J, Houston F, Orr G, McGann K and Wenk GL. (2000) Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. *Neuroscience*. 99(1):17-23
3. Bliss TV and Lomo T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*. 232(2):331-56.
4. Das A, Shanker G, Nath C, Pal R, Singh S, and Singh H (2002) A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*: anticholinesterase and cognitive enhancing activities, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 893–900.
5. Ding S, Dudley E, Song Q, Plummer S, Tang J, Newton RP, Brenton AG (2008) Mass spectrometry analysis of terpene lactones in *Ginkgo biloba*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:766-772.
6. Dulcy CP, Rajan E (2009) *Bacopa monniera* extract enhance the cognitive ability of rats by increasing serotonin level. P1-i01 doi:10.1016/j.neures.2009.09.503
7. Freir DB, Holscher C, Herron CE (2001) Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. *J Neurophysiol* 85:708-713.
8. Frey U and Morris RG. (1998) Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology*. 37:545-552.
9. Garai S, Mahato SB, Ohtani K, Yamasaki K (1996a) Bacopasaponin D--a pseudojubilogenin glycoside from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry*. 43:447-449.
10. Garai S, Mahato SB, Ohtani K, Yamasaki K (1996b) Dammarane-type triterpenoid saponins from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry*. 42:815-820.
11. Gohil KJ, Patel JA. (2010) A review on *Bacopa monniera*: Current research and future prospects. *Int J Green Pharm* 4:1-9.
12. Hatip-Al-Khatib I, Takashi A, Egashira N, Iwasaki K, and Fujiwara M. (2004) Comparison of the effect of TAK-147 (zanapezil) and E-2020 (donepezil) on extracellular acetylcholine level and blood flow in the ventral hippocampus of freely moving rats. *Brain Res*. 1012(1-2):169-76.
13. Kandel ER, Schwartz JH, and Jessell TM. (2000) Principles of Neural Science. McGraw-Hill Medical. Appleton & Lang.

14. Kishore K and Singh M (2005) Effect of bacosides, alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi), on experimental amnesia in mice. *Indian J Exp Biol* 43:640-645.
15. Lindroth, P. & Mopper, K. (1979). High Performance Liquid Chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with O-Phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry*, 51, 1667-1674.
16. Mahadevan S and Park Y. (2008) Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L.: chemistry, efficacy, safety, and uses. *J. Food Sci.* 73(1):R14-9.
17. Mix JA, Crews WD Jr. (2002) A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in a sample of cognitively intact older adults: neuropsychological findings. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 17: 267–277.
18. Nakano, S, Asada T, Matsuda H, Uno M, and Takasaki M (2001). Donepezil hydrochloride preserves regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease. *J Nucl Med*, 42, 1441-1445.
19. Nathan PJ, Tanner S, Lloyd J, Harrison B, Curran L, Oliver C and Stough C. (2004) Effects of a combined extract of *Ginkgo biloba* and *Bacopa monniera* on cognitive function in healthy humans. *Hum Psychopharmacol* 19:91-96.
20. Paxinos, G. and Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4 th ed.). USA: Academic Press.
21. Preedapirom W, Nakdook W, Phruttipat S, Ingkaninan K, Taepavarapruk P, Taepavarapruk N (2008a) The Investigation of Nootropic Effects of Some Thai Medicinal Plants Using Experimental Models of Amnesia. The 37th Physiological Society of Thailand's Annual Conference, 37:63.
22. Preedapirom W, Sombutthaweekul R, Nakdook W, Ingkaninan K, Taepavarapruk N, Taepavarapruk P (2008b) Investigation of Cognitive Restoring Property of Some Thai Herbs Using Experimental Models of Amnesia. The 3rd International Conference on Forensic Science and Medical Science, 3:24.
23. Rastogi S, Pal R, and Kulshreshtha Dk (1994) Bacoside A3--a triterpenoid saponin from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 36:133-137.
24. Sairam K, Dorababu M, Goel RK, and Bhattacharya SK (2002) Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine* 9:207-211.
25. Solomon PR, Adams F, Silver A, Zimmer J, DeVeaux R. (2002) Ginkgo for memory enhancement; a randomized controlled trial. *JAMA* 288: 835–840.

26. Stanton PK, Sarvey JM, and Moskal JR (1987) Inhibition of the production and maintenance of long-term potentiation in rat hippocampal slices by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1684-1688.
27. Stough C, Lloyd J, Clarke J, Downey LA, Hutchison CW, Rodgers T, and Nathan PJ (2001) The chronic effects of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 156:481-484.
28. Taepavarapruk N, Sopradit P, Taepavarapruk P (2006a) Nootropic Action of *Tabernaemontana divaricata* Root Extract in Amnesic Mice Induced by Scopolamine. Poster presentation, The 35th Annual Meeting of the Physiology Society of Thailand, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. May 3-5, 2006.
29. Taepavarapruk P, Sewana S, Jenapongsa R, Taepavarapruk N (2006b) Investigation of Nootropic Effects of *Bacopa monnieri* Extract on Global Amnesic Rats. Poster presentation, The 35th Annual Meeting of the Physiology Society of Thailand, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. May 3-5, 2006.
30. Taepavarapruk P, Taepavarapruk N, Jenapongsa R (2006c) Investigations of the effects of *Bacopa monniera* on locomotor activity, learning and memory. A research report to The National Research Council of Thailand.
31. Uabundit N, Wattanathorn J, Mucimapura S, Ingkaninan K (2010) Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *J Ethnopharmacol* 127:26-31.
32. van Beek TA, Montoro P (2009) Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals. *J Chromatogr A* 1216:2002-2032.
33. Wang Y, Wang L, Wu J, Cai J (2006) The *in vivo* synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. *Br J Pharmacol* 148:147-153.
34. Williams B, Watanabe CMH, Schultz PG, Rimbachd G, and Krucker T (2004) Age-related effects of *Ginkgo biloba* extract on synaptic plasticity and excitability. *Neurobiology of Aging* 25: 955-962.



รายงานการวิจัย
โครงการย่อยที่ 4
เรื่อง

การศึกษาเมตาบอลิซึมและอันตรกิริยาต่อยาของพรมมิ
Metabolism and drug interaction study of Brahmi

โดย
ดร. ดำรงค์ดี เป็กทอง
ผศ. ดร. กรองกาญจน์ ชูทิพย์
รศ. ดร. กรกนก อิงคนินันท์
ดร. สราวุฒิ อุ่พุดินันท์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปีงบประมาณ 2552

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารสกัดพรมมีต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 (CYP) ในตับหนูและในมนุษย์โดยวิธีการ *in vitro* ทำการประเมินความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A ในไมโครโซมโดยใส่สารสกัดตั้งแต่ความเข้มข้น 1 ถึง 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดพรมมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้น้อยเมื่อเทียบกับสารยับยั้งมาตรฐาน โดยสารสกัดยับยั้งปฏิกิริยา O-deethylation ของสาร 7-ethoxyresorufin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะต่อ CYP1A2 โดยมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 59.4 และ 836.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในไมโครโซมหนูและในมนุษย์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งปฏิกิริยา tolbutamide hydroxylation ที่ IC_{50} เท่ากับ 222.1 และ 297.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของ CYP2E1 ทั้งนี้ยังพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้ง CYP3A อย่างอ่อนทั้งในไมโครโซมหนูและในมนุษย์

ความสามารถในการเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP ในเซลล์ตับของสารสกัดพรมมีทำการประเมินโดยการใส่สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.045 ถึง 0.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (หรือ 0.05-0.5 ไมโครโมลาร์) ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนูเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมรวมถึงการแสดงออกของ mRNA พบว่าสารสกัดพรมมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์และการแสดงออกของ mRNA เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับสารเหนี่ยวนำมาตรฐานในแต่ละเอนไซม์ โดยสรุปแล้วสารสกัดพรมมีผลยับยั้งการทำงานของ CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A ได้ต่ำโดยดูจากค่า IC_{50} ที่มีค่าค่อนข้างสูงและไม่มีผลในเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำงานของ CYP ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนู ผลดังกล่าวจึงสามารถประเมินได้ว่ามีโอกาสน้อยที่สารสกัดพรมมีในขนาดปกติจะก่อให้เกิดอันตรายกับยาแผนปัจจุบันที่อาศัยเอนไซม์ดังกล่าวในการเปลี่ยนแปลงเพื่อการขจัดออกจากร่างกาย

Abstract

The ability of *Bacopa monnieri* extract (BME) to affect rat and human cytochrome P450 (CYP) activities was examined *in vitro*. The potential for inhibition of CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 and CYP3A by BME (1-10,000 µg/mL) was evaluated with pooled rat and human liver microsomes. BME exhibited minimal capacity to inhibit any CYP enzyme, compare to the reference inhibitors. BME inhibited the O-deethylation of 7-ethoxyresorufin, a marker substrate for CYP1A2 with IC₅₀ value of 59.4 and 836.1 µg/mL in rat and human liver microsomes, respectively. BME also inhibited tolbutamide hydroxylation both in rat and human microsomes with IC₅₀ value of 222.1 and 297.6 µg/mL, respectively but did not affect rat and human CYP2E1. BME was found to be a weak inhibitor of CYP3A in rat and human liver microsomes with IC₅₀ value of 321.9 and 481.8 µg/mL, respectively.

The potential for induction of CYP activity was evaluated by exposing primary cultured of rat hepatocytes to BME (0.045-0.45 µg/mL). Enzymatic activities were performed by the direct incubation of hepatocyte monolayers with the specific substrates of each CYP. The mean activities and expression of CYP1A2, CYP2C and CYP3A from BME-treated hepatocytes were slightly higher than those in the solvent-treated controls but were less than those produced by reference inducers of these enzymes. In summary, BME has been demonstrated *in vitro* to be a low potent of CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 and CYP3A both in rat and human liver microsomes and a modest inducer of CYP *in vitro* in rat hepatocytes. Due to the relatively low degree of alteration of the enzyme activities *in vitro* and to the concentrations of BME required to obtain appreciable effects, a high incidence of clinically significant interactions would not be expected. However, these *in vitro* results are being used in evaluation of clinical reports of apparent herb-drug interaction and in the design of subsequent studies targeted at further elucidation of the clinical relevance, if any, of those *in vitro* findings.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	4-ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	4-iii
สารบัญ	4-iv
สารบัญตาราง	4-v
สารบัญรูป	4-vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	4-vii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	4-5
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	4-9
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	4-14
บรรณานุกรม	4-16
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	4-18
ภาคผนวก ข	4-20
ภาคผนวก ค	4-28

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4-1 ชื่อเอนไซม์ ชื่อปฏิกิริยา สารตั้งต้น สารผลิตภัณฑ์และสารยับยั้งมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง	4-6
4-2 ค่า IC_{50} ของสารสกัดพรมมิและสารยับยั้งมาตรฐานต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในไมโครโซมหนูและมนุษย์	4-10
4-3 ค่าจำนวนเท่าของ CYP activity ของเซลล์ที่ treat ด้วยสารสกัดพรมมิและสารเหนี่ยวนำมาตรฐานเทียบกับกลุ่มควบคุม	4-13
4-4 ค่าจำนวนเท่าของการแสดงออกของ mRNA CYP ของเซลล์ที่ treat ด้วยสารสกัดพรมมิและสารเหนี่ยวนำมาตรฐานเทียบกับกลุ่มควบคุม	4-13
4-5 ตัวอย่างผลการทดสอบวิธีการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ในการวัดการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 3A	4-25

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
4-1	การแยกเซลล์ตับหนูโดยใช้วิธี perfuse ด้วยเอนไซม์ collagenase	4-7
4-2	ขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay) ของสารสกัดพรมมิ	4-8
4-3	ขั้นตอนการทดสอบผลของสารสกัดพรมมิต่อความสามารถในการเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP และการแสดงออกของ mRNA CYP	4-8
4-4	ภาพถ่ายเซลล์ตับหนูกลุ่มควบคุมและที่ treated ด้วยสารสกัดพรมมิ	4-11
4-5	ค่า % cell viability ในเซลล์ตับหนูกลุ่มควบคุมและที่ treated ด้วยสารสกัดพรมมิ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	4-11
4-6	ค่าร้อยละของความเข้มข้นของ protein จาก rat hepatocytes ในกลุ่มทดลองที่ treat ด้วย BMEเทียบกับกลุ่มควบคุม	4-12

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BME	<i>Bacopa monnieri</i> Extract
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CYP	Cytochrome P450
Ct	Cycle Threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EROD	Ethoxyresorufin-O-Deethylase
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HMM	Hepatocyte Maintenance Medium
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ITS	Insulin Transferrin Selenium Supplement Premix
LLOQ	Lower Limit of Quantification
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ND	Not Done
NR	Not Reported
OD	Optical Density
PBS	Phosphate Buffered Saline
PB	Phenobarbital
PC	Positive Control
PCR	Polymerase Chain Reaction
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethane
S.D.	Standard Deviation

บทที่ 1

บทนำ และการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันการใช้สมุนไพรเพื่อการรักษาโรคและส่งเสริมสุขภาพได้รับการยอมรับและเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลาย โดยการใช้สมุนไพรในการรักษาอาจเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้ป่วยที่ไม่พึงพอใจกับประสิทธิภาพของยาแผนปัจจุบันหรืออาจเลือกใช้ควบคู่กับยาแผนปัจจุบันเพื่อเสริมฤทธิ์ ทำให้สามารถลดขนาดการใช้ยาซึ่งผลให้ลดการเกิดผลข้างเคียงจากยาแผนปัจจุบันได้ อีกทั้งยังมีการสนับสนุนและเผยแพร่การใช้สมุนไพรในแง่ของอาหารเสริมสุขภาพหรือเครื่องสำอางสุขภาพทำให้แนวโน้มการบริโภคสมุนไพรในประเทศไทยเพิ่มขึ้นทุกปี¹

อย่างไรก็ตามโดยข้อเท็จจริงแล้วสมุนไพรส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยสารเคมีจากธรรมชาติหลายชนิดซึ่งสารเคมีเหล่านี้เมื่อได้รับเข้าสู่ร่างกายแล้วจะต้องถูกเปลี่ยนแปลงโดยขบวนการทางชีวเคมีหรือที่เรียกว่าเมแทบอลิซึม (Metabolism) เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและช่วยเร่งการกำจัดออกจากร่างกายรวมทั้งการทำลายฤทธิ์หรือพิษของสารเหล่านั้นด้วย โดยที่ขบวนการเหล่านี้เป็นขบวนการเดียวกับที่ร่างกายใช้เปลี่ยนแปลงหรือทำลายยาแผนปัจจุบันเพื่อขับออกทางปัสสาวะหรือทางน้ำดีผ่านทางตับ ทั้งนี้ขบวนการเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่อาศัยเอนไซม์ในร่างกายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่กลุ่มเอนไซม์ที่เรียกว่า xenobiotic metabolizing enzymes หรือ drug metabolizing enzymes ซึ่งมีอยู่หลายชนิดด้วยกันยกตัวอย่างที่สำคัญคือ Cytochrome P450 (CYPs), UDG-glucuronosyltransferase (UGTs), Sulfotransferase (SULTs), N-acetyltransferase (NATs) เป็นต้น โดยทั่วไปใน ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารเคมีหรือยาในร่างกาย เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนแรก (Phase I metabolism) คือ CYPs ซึ่งมักทำงานได้ช้ากว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์ในขั้นตอนที่สอง (Phase II metabolism) จึงจัดเป็น rate-limiting step ของการกำจัดยาส่วนใหญ่ นั่นเอง เอนไซม์นี้พบมากในเซลล์ตับ (Hepatocytes) จัดเป็นตัวเร่งชีวภาพที่มีความหลากหลายมากที่สุด CYPs ที่พบในสิ่งมีชีวิตสามารถแบ่งเป็นตระกูล (Family) และตระกูลย่อย (Subfamily) ตามความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่ทำนายจากลำดับเบสของ cDNA ของยีน โดย CYP ในตระกูล 1 2 และ 3 จะทำหน้าที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารเคมีหรือยาที่ได้รับจากภายนอกในร่างกาย ซึ่งการทำงานของเอนไซม์นี้อาจเปลี่ยนแปลงได้ทั้งในเชิงปริมาณหรือเชิงคุณภาพโดยจากปัจจัยภายในเช่น พันธุกรรม อายุ เพศ เชื้อชาติ พยาธิสภาพ ภาวะเครียด หรือการตั้งครรภ์ เป็นต้น นอกจากนี้การทำงานของเอนไซม์นี้อาจถูกควบคุมจากปัจจัยภายนอกในร่างกายเช่นการได้รับยา สารพิษ อาหาร ที่มีผลโดยตรงต่อการเหนี่ยวนำ (Induction) หรือยับยั้ง (Inhibition) การทำงานของ CYPs เป็นผลทำให้ฤทธิ์หรือเกิดพิษของยาที่ให้ร่วมด้วยเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม²

จากรายงานการวิจัยพบว่าการใช้สมุนไพรบางชนิดร่วมกับยาแผนปัจจุบันหลายชนิดอาจก่อให้เกิดอันตรกิริยา (Interaction) ระหว่างสมุนไพรกับยาแผนปัจจุบันได้³⁻⁵ เช่น St John's wort (*Hypericum perforatum*) เป็นสมุนไพรที่ใช้เพื่อระงับอาการซึมเศร้า แต่สารสำคัญในสมุนไพรนี้มีความสามารถในการเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP โดยเฉพาะ CYP1A2, 2C9 และ 3A4 ส่งผลให้ยาสำคัญหลายชนิดที่อาศัยเอนไซม์เหล่านี้ในการทำยาถูกขับออกอย่างรวดเร็ว เช่น Warfarin ซึ่งเป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือดทำให้ระดับยาในเลือดต่ำ การรักษาไม่ได้ผล หรือ cyclosporin ซึ่งออกฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันในคนไข้ที่ผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะเมื่อใช้ร่วมกับ St John's wort ทำให้ระดับยาลดลงจนนำไปสู่การปฏิเสธอวัยวะ (Graft rejection) ได้⁶ จากเหตุผลดังกล่าวจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่ต้องทำการประเมินเพื่อป้องกันว่าเมื่อใช้สมุนไพรร่วมกับยาแผนปัจจุบันจะมีโอกาสที่จะเกิดอันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรและยาแผนปัจจุบันหรือไม่และทำความเข้าใจกลไกการเกิดการเหนี่ยวนำหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยเฉพาะ CYPs ทั้งนี้เพื่อให้การใช้ยาของผู้ป่วยเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยสูงสุด

พรมมิ (*Bacopa monnieri* Wettst.) เป็นสมุนไพรที่มีการประวัตินิยมใช้ในการแพทย์อายุรเวท โดยมีสรรพคุณในการบำรุงความจำ บำรุงสมอง ไม่นานมานี้ มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพรมมิต่อระบบทางสรีรวิทยาหลายระบบ โดยเฉพาะระบบประสาทส่วนกลางและความจำ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสมุนไพรพรมมิในการเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือยาสมุนไพรบำรุงความจำ⁷⁻⁸

ในปีพ.ศ. 2548 และ 2549 คณะผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนการวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางเคมี คณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาวิธีการสกัด และการควบคุมคุณภาพของสารสกัดพรมมิ ได้สารสกัดที่มีมาตรฐานและมีความคงตัว รวมทั้งได้พัฒนาการเพาะปลูกเพื่อให้ได้พรมมิที่มีคุณภาพดี เมื่อนำไปศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าสารสกัดพรมมิที่ได้ มีผลกระตุ้นความจำและการเรียนรู้ในหนูปกติและหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่อง⁹ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ประสาทอีกด้วย¹⁰ ส่วนการทดสอบพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรัง พบว่าสารสกัดพรมมิในขนาดที่ใช้ ไม่มีพิษต่อสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ยาเม็ดพรมมิ จนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและความคงตัวดี¹¹

การศึกษาผลของการรับประทานสารสกัดพรมมิในปริมาณ 300 มิลลิกรัม (มก.) ต่อวัน ติดต่อกัน 12 สัปดาห์ ในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 46 คน อายุระหว่าง 18 และ 60 ปี พบว่าช่วยเพิ่มความเร็วในการประมวลผลข้อมูลจากการมองเห็น และเพิ่มอัตราการเรียนรู้ และกระตุ้นความจำได้อย่างมีนัยสำคัญ¹² ผลของพรมมิในขนาด 300 มก. (น้ำหนักน้อยกว่า 90 กก.) และ 450 มก. ต่อวัน (น้ำหนักมากกว่า 90 กก.) เป็นระยะเวลา 3 เดือน ในอาสาสมัครอายุระหว่าง 40 และ 65 ปี จำนวน 76 คน ในอีกการศึกษาหนึ่งพบว่าช่วยเพิ่มความสามารถในการเก็บข้อมูลใหม่ได้ ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ที่แท้จริงของสารสกัดพรมมิในการกระตุ้นการจำยังไม่ทราบชัดเจนแต่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการทำงานของระบบโคลิเนอร์จิก (cholinergic) หรือฤทธิ์ antioxidant^{8, 12} สารองค์ประกอบที่สำคัญในพรมมิ คือ สารกลุ่ม saponins ได้แก่ bacosaponin A,

bacosaponin B, bacosaponin C, bacopaside I, bacopaside II, bacopaside IV, bacopaside V, bacopasaponin D และ bacosaponin G โดย สารองค์ประกอบหลักในพรมมีที่มีการทดลองแล้วว่า มีฤทธิ์ในการกระตุ้น ความจำ คือ bacosides A และ B อย่างไรก็ตาม สาร saponins ตัวอื่นในพรมมีก็อาจจะมีฤทธิ์ได้เช่นกันซึ่งต้อง มีการศึกษาต่อไป

ความปลอดภัยของสารสกัดพรมมีได้รับการทดสอบในการศึกษาข้างต้น (มีปริมาณ bacosides A และ B รวมไม่น้อยกว่า 55%) ซึ่งมีการให้ติดต่อกันทุกวันเป็นระยะเวลา 3 เดือน อาการไม่พึงประสงค์ที่พบ มากกว่ากลุ่มควบคุม ได้แก่ คลื่นไส้, ปากแห้ง และอ่อนล้า (fatigue) การศึกษาในด้านความปลอดภัยล่าสุด ของสารสกัดพรมมี (Bacomind™) ที่ให้ในขนาด 300 และ 450 มก.ต่อวัน ใน 15 วันแรก และ 15 วันหลัง ตามลำดับ ไม่พบอาการไม่พึงประสงค์ที่ร้ายแรง พบเพียงอาการไม่พึงประสงค์ในระบบทางเดินอาหาร เล็กน้อยเท่านั้นซึ่งหายไปตัวเอง โดย Bacomind™ ประกอบไปด้วยสาร bacoside A3 (>5.0% w/w), bacopaside I (>7.0% w/w), bacopaside II (>5.5% w/w), jujubogenin isomer of bacopasaponin C (>7.0% w/w), bacopasaponin C (>4.5% w/w), bacosine (>1.5% w/w), luteolin (>0.2% w/w), apigenin (>0.1% w/w) and β -sitosterol-D-glucoside (>0.3% w/w)¹³ ซึ่งสารสกัดพรมมีที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นมีปริมาณ saponin glycosides ประมาณ 5% w/w โดยมีปริมาณ bacoside A3 (0.59% w/w), bacopaside II (1.22% w/w), bacopasaponin C (0.63% w/w), bacopaside I (1.88% w/w) และ 3-O- α -L-ara₁-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glc-(1 \rightarrow 3)]- α -L-ara₂ pseudojujubogenin อีก 0.72% w/w¹¹ ซึ่งจะเห็นว่ามีปริมาณสาร saponins ต่ำกว่าของ Bacomind™

ในการนำผลิตภัณฑ์ยาเม็ดพรมมีมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพในมนุษย์ ควรมีการศึกษาข้อมูลด้าน เภสัชจลนศาสตร์ของสารองค์ประกอบหลัก รวมทั้ง metabolites ที่เกิดขึ้นของพรมมี ซึ่งจะนำมาใช้ในการ ประเมินประสิทธิผลของพรมมีได้อย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ทั้งนี้รวมถึงข้อมูลเกี่ยวกับอันตรกิริยาระหว่าง สมุนไพรพรมมีกับยาแผนปัจจุบัน เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความปลอดภัยและสามารถหลีกเลี่ยง ไม่ให้เกิดอันตร กิริยาของยา ซึ่งจะนำไปสู่การรักษาที่ได้ผลอย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้อมูลเหล่านี้ ยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน ผู้วิจัย จะทำการศึกษาทั้งใน *in vitro* โดยวัดค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ต่างๆ ของสารองค์ประกอบหลัก saponins ใน พรมมี และศึกษาวิเคราะห์ metabolites ด้วยเทคนิค LC-MS/MS สำหรับการทดลองเพื่อทำนายการเกิด อันตรกิริยาระหว่างสมุนไพรพรมมีกับยาแผนปัจจุบัน ผู้วิจัยจะทำการศึกษาใน *in vitro* ในเอนไซม์ตับระดับ ต่ำกว่าเซลล์ (subcellular fraction) และเซลล์ตับเพาะเลี้ยงทั้งในสัตว์ทดลอง ทั้งนี้เพื่อทำนายการเกิดอันตร กิริยาทางคลินิกในมนุษย์และเปรียบเทียบผลต่างระหว่าง species และข้อมูลจากการทดลอง *in vitro* จะเป็น ประโยชน์ในการใช้คำนวณขนาดสารสกัดที่จะใช้ในการทดลอง *in vivo* ในสัตว์ทดลองอีกด้วย

การศึกษาสารสกัดพรมมิทั้งในสัตว์ทดลอง และในมนุษย์ พบว่ามีผลในการเพิ่มความจำ แต่เมื่อให้ร่วมกับยาแผนปัจจุบันยังไม่มีรายงานข้อมูลของการเกิดอันตรกิริยา การศึกษานี้เป็นการบอกความเป็นไปได้เบื้องต้นอันจะทำให้สามารถใช้ทำนายการเกิดอันตรกิริยาในทางคลินิกต่อไป

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

การเตรียมสารสกัดพรมมิ

ใช้ส่วนใบของพรมมิ หั่นให้มีขนาดเล็กและทำให้แห้งในตู้อบ (hot-air oven) ที่ความร้อน 50 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้เป็นผงหยาบเพื่อนำไปเตรียมสารสกัด ชั่งผงพรมมิหนัก 18 กิโลกรัม แช่ในน้ำกลั่นนาน 24 ชั่วโมง คั้นเอาเฉพาะส่วนผงพรมมิออก แล้วนำไปสกัดต่อใน เอทานอล นาน 8 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนกากที่เหลือมาทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งด้วยวิธีเดียวกัน นำสารสกัดที่ได้รวมกัน กรองและทำให้แห้งภายใต้ความดันต่ำโดยเครื่อง rotary evaporator

สารสกัดที่ได้จะมีปริมาณ total saponin ประมาณ 5% (โดยน้ำหนัก) ซึ่งเป็นส่วนผสมของ bacosideA3, bacopasideII, bacopasoponinX, bacopasaponinC และ bacopasideI วัดปริมาณ total saponin โดย HPLC เก็บสารสกัดที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในขวดทึบแสงจนกว่าจะใช้เพื่อการทดลอง

การเตรียม Liver Subcellular Fractions และ การศึกษาเมตาบอลิซึมของพรมมิในหลอดทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนู (Wistar Rat) เพศผู้ สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม หนูทุกตัวจะถูกนำมาเลี้ยงอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนการทดลอง โดยถูกเลี้ยงอย่างอิสระ ภายใต้การควบคุมแสงสว่าง 12:12 hr light:dark cycle และปรับอุณหภูมิให้เหมาะสม สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงไว้อย่างน้อยเป็นเวลาให้ปรับสภาพ แล้วจึงทำให้เสียชีวิตโดยวิธีการคั่งคอ (neck dislocation) แยกเอาตับออกมาล้าง 3 ครั้งด้วย ice-cold buffered KCl (1.15% w/v KCl in 0.01 M Na^+/K^+ phosphate buffer, pH 7.4) ซับเนื้อตับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง และ ชั่งน้ำหนัก จากนั้นขั้นตอนที่จะกล่าวต่อไปนี้ต้องทำที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส ทำการตัดตับเป็นชิ้นเล็กๆ และ homogenize ด้วย buffered KCl ปริมาตรเจ็ดเท่า (7 volume) ใน Teflon pestle-glass tube homogenizer จากนั้นนำ homogenate ไปปั่น (centrifuge) ที่ 9,000xg เป็นเวลา 15 นาที เพื่อกำจัด cell debris, nuclei และ mitochondria หลังจากปั่นแล้วนำส่วนไขมันที่ลอยอยู่ทิ้งไป และ ดูดส่วน supernatant เก็บไว้ด้วย Pasteur pipette ส่วนของ supernatant ที่ได้คือ postmitochondrial fraction ซึ่งมีเอนไซม์จากตับอยู่ และ จะถูกนำไปใช้ต่อไปสำหรับศึกษา *in vitro* hepatic drug metabolism โดย 1 ml ของ supernatant จะเทียบเท่า 0.125 g liver นำ supernatant ปริมาณครึ่งหนึ่งไปปั่นต่อที่ 100,000xg เป็นเวลา 60 นาที นำส่วน pellet ไปละลายใน ice-cold 0.1 M Na^+/K^+ phosphate buffer, pH 7.4 โดยใช้ small Teflon pestle-glass tube homogenizer และ นำ suspension ที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนต่อไป

นำสารสกัดพรมมิ และ/หรือ สาร active compound มา incubate กับ postmitochondria fraction และ cofactor ได้แก่ NADP, nicotinamide, glucose-6-phosphate, MgCl₂ ใน 0.05 M Na⁺/K⁺ buffer pH 7.4 ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ หยุดปฏิกิริยาเคมีด้วย 20%TCA นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนของ supernatant ไปวิเคราะห์หาเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นด้วย HPLC/MS/MS เปรียบเทียบกับ Blank (กรณีไม่มีสารสกัดพรมมิ และ/หรือ สาร active compound)

การศึกษาอันตรกิริยาต่อยาของพรมมิในหลอดทดลอง (*In vitro* study of Herb-drug interaction)

เตรียม pooled liver microsome ของหนูและมนุษย์ ใน phosphate buffer pH 7.6 (ภาคผนวก ก) ทำ การ incubate กับสารตั้งต้นที่จำเพาะเจาะจงกับชนิดของเอนไซม์ในระดับ ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น ต่างๆกันดำเนินปฏิกิริยาโดยเติม 1 mM NADPH ยับยั้งปฏิกิริยาโดยเติม Acetonitrile จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณ เมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นด้วย HPLC เปรียบเทียบกับ Blank (กรณีไม่มีสารสกัด พรมมิ) เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ระดับ (ภาคผนวก ข)

ตารางที่ 4-1 แสดงชื่อเอนไซม์ ชื่อปฏิกิริยา สารตั้งต้น สารผลิตภัณฑ์และสารยับยั้งมาตรฐานที่ใช้ ในการ ทดลอง

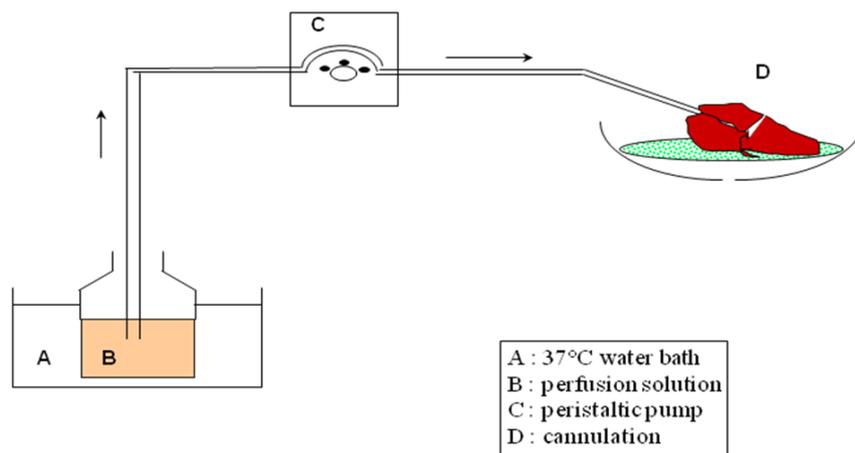
Isoforms	ปฏิกิริยา	สารตั้งต้น	สารผลิตภัณฑ์	สารยับยั้งมาตรฐาน
CYP1A	ethoxyresorufin-O-deethylation (EROD)	7-ethoxyresorufin (6.5 μM)	resorufin	α-naphthoflavone
CYP2C	tolbutamide hydroxylation (ToOH)	tolbutamide (250 μM)	4-OH-tolbutamide	sulfaphenazole
CYP2E	<i>p</i> -nitrophenol hydroxylation (PNPOH)	<i>p</i> -nitrophenol (500 μM)	4-nitrocatechol	disulfiram
CYP3A	6β-testosterone hydroxylation (TestoOH)	testosterone (250 μM)	6β OH-testosterone	ketoconazole

การหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ร้อยละ 50 (The half maximal Inhibitory Concentration; IC₅₀)

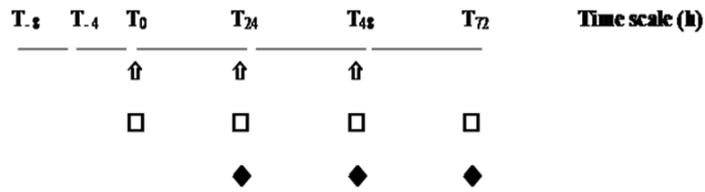
หาค่า IC₅₀ โดยการ incubate สารตั้งต้นของแต่ละ isoform ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม (ตารางที่ 4-1) กับ rat liver microsomes และ human liver microsomes โดย incubate ร่วมกับสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ (0-8000 µg/mL) หรือสารยับยั้งมาตรฐาน (Reference inhibitor) เช่น α -naphthoflavone (CYP1A2 inhibitor), sulfaphenazole (CYP2C inhibitor), disulfiram (CYP2E inhibitor), และ ketoconazole (CYP3A inhibitor) จากนั้น หาค่า IC₅₀ (ตารางที่ 4-2) โดยวิธี nonlinear regression analysis โดยพลอตระหว่าง log scale ของความเข้มข้นสารยับยั้งมาตรฐานหรือสารสกัดกับความถี่ของการทำงานของการทำงานของเอนไซม์ที่เหลือ (วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 5) โดยในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดหรือสารยับยั้งมาตรฐาน ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate)

ศึกษาผลของสารสกัดพรมมิ (Crude extract of Bhrami) ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ตับหนูเพาะเลี้ยง (rat hepatocytes culture)

ทำการแยกเซลล์ตับหนูจากหนูตัวผู้สายพันธุ์ Wistar อายุ 8 สัปดาห์โดยใช้วิธี perfuse ด้วย collagenase 2 ขั้นตอนเพื่อให้ได้ rat hepatocytes ตามแสดงในรูปที่ 4-1 (รายละเอียดในภาคผนวก ก) นำ freshly rat hepatocytes ที่แยกได้ใส่ลงในถาดเพาะเลี้ยงตามขนาดนี้ ขนาด 96 หลุมเพื่อทำการวัดประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดพรมมิ (Cytotoxicity assay) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 µM หรือ 0-90 µg/mL นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับเซลล์ที่มีชีวิต คำนวณหา % cell viability โดยวิธี MTT test (ภาคผนวก ก) ดังแสดงในรูปที่ 4-2



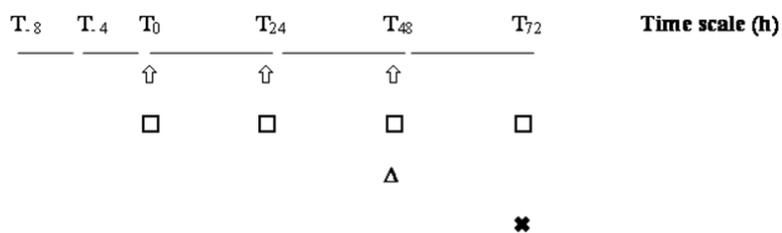
รูปที่ 4-1 แสดงการแยกเซลล์ตับหนูโดยใช้วิธี perfuse ด้วยเอนไซม์ collagenase



- ↑ Addition of bacopa, positive control compounds or DMSO only
- Morphological observations
- ◆ Determination of cell viability

รูปที่ 4-2 แสดงขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay) ของสารสกัดพรมมิ

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน culture medium (Williams' E culture ที่มี 10% Fetal Bovine serum, insulin, dexamethasone, penicillin และ streptomycin) โดยใช้เซลล์ที่ความเข้มข้น 3.5 ล้านเซลล์ต่อ 1 dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 mm ที่เคลือบด้วย collagen ทำการเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณอากาศต่อ CO₂ 95% ต่อ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4-8 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ติด attach และก่อตัวเป็นเซลล์เรียงตัวแบบชั้นเดียว (monolayer) จากนั้นเปลี่ยนไปใช้ culture medium ที่ไม่มี Fetal Bovine serum ทำการ treated cell ด้วยสารสกัดพรมมิต่างความเข้มข้น (0.05, 0.25 และ 0.5 µM) เทียบเท่าความเข้มข้น 0.045, 0.225 และ 0.45 µg/ml ของสารสกัดพรมมินาน 72 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยน culture medium ทุกวัน



- ↑ Addition of positive control compounds or DMSO only
- Morphological observations
- Δ Determination of CYP mRNA expression
- × Determination of CYP activities on hepatocyte monolayers

รูปที่ 4-3 แสดงขั้นตอนการทดสอบผลของสารสกัดพรมมิต่อความสามารถในการเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP และการแสดงออกของ mRNA CYP

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการศึกษาอันตรกิริยาของสารสกัดพรมมีต่อการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450 ในตับ
ผลของสารยับยั้งมาตรฐานต่อการยับยั้งการทำงานของ CYP ในไมโครโซมหนูและมนุษย์

ทำการ incubate สารตั้งต้นที่จำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ดังแสดงในตารางที่ 1 กับสารสกัดพรมมีที่ความเข้มข้นต่างๆ (1-8000 $\mu\text{g/mL}$) จากนั้นวัด enzyme activity โดยใช้ α -naphthoflavone, sulfaphenazole, disulfiram และ ketoconazole เพื่อเป็นสารยับยั้งมาตรฐานของ CYP1A, 2C, 2E และ 3A ตามลำดับ จากนั้นหาค่า IC_{50} ของการยับยั้งปฏิกิริยาของสารมาตรฐานและสารสกัดพรมมี โดยวิธี linear regression analysis plot ระหว่าง logarithm ของความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$) กับร้อยละของ enzyme activity ที่เหลือของปฏิกิริยา โดยใช้ program GraphPad 5 เปรียบเทียบ enzyme activity กับกลุ่มควบคุม (control) ที่ incubate ในตัวทำละลายเดียวกับที่ใช้ในการละลายสารยับยั้งมาตรฐานหรือสารสกัดพรมมี

สารยับยั้งมาตรฐานที่เลือกใช้ในการทดลอง มีความสามารถในการยับยั้ง CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A อย่างจำเพาะเจาะจง ดังแสดงในตารางที่ 2 α -naphthoflavone ยับยั้งการทำงานของ CYP1A2 activity ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 2.3 และ 626.3 $\mu\text{g/mL}$ ในไมโครโซมหนูและมนุษย์ ตามลำดับ ซึ่งตรงกับรายงานก่อนหน้า (Kim และคณะ ค.ศ.2003)¹⁴ Disulfiram ลดการทำงานของ CYP2E1 ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 299.5 และ 29.6 $\mu\text{g/mL}$ และ sulfaphenazole ยับยั้งการทำงานของ CYP2C ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 31.4 และ 4.4 $\mu\text{g/mL}$, ketoconazole ยับยั้ง CYP3A activity ทั้งในไมโครโซมหนูและมนุษย์ ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 15.4 และ 2.1 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่รายงานก่อนหน้า (Emoto และคณะ ค.ศ.2003)¹⁵ จากผลดังกล่าว ยืนยันการค้นพบก่อนหน้าที่ว่า ผลการยับยั้งการทำงานของ CYP มีความแตกต่างกันระหว่าง species แม้ใช้สารตั้งต้นและตัวยับยั้งมาตรฐานเดียวกัน

ผลของสารสกัดพรมมีต่อการยับยั้งการทำงานของ CYP ในไมโครโซมหนูและมนุษย์

จากผลการทดลอง ค่า IC_{50} ดังตาราง 2 แสดงให้เห็นว่า BME มีความสามารถในการยับยั้ง CYP1A, 2C และ 3A อย่างอ่อนในหนู ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 59.4, 222.1 และ 321.9 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ในทางตรงข้าม BME ไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของ CYP2E1 ($\text{IC}_{50} > 5000 \mu\text{g/mL}$)

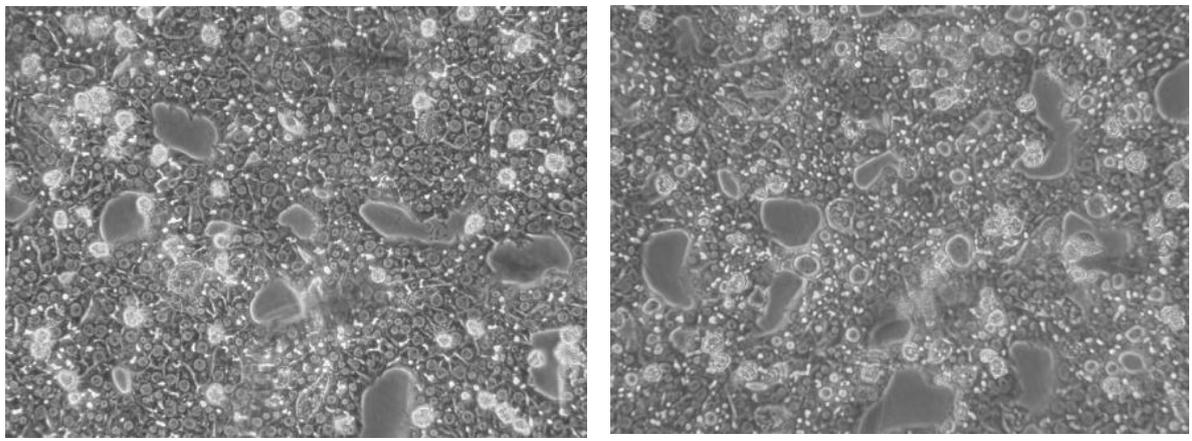
ในการทดลองกับไมโครโซมมนุษย์ผลของ BME ต่อการยับยั้งการทำงานของ CYP แสดงดังตารางที่ 4-2 โดย BME ยับยั้ง CYP1A, 2C และ 3A ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 836.1, 297.6 และ 481.8 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ BME ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1

ตารางที่ 4-2 แสดงค่า IC₅₀ ของสารสกัดพรมมิและสารยับยั้งมาตรฐานต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในไมโครโซมหนูและมนุษย์

CYP isoform	Reaction	Inhibitor	IC ₅₀ (µg/mL)	
			Rat microsomes	Human microsome
CYP1A	EROD	BME	59.4	836.1
		α-naphthoflavone	2.3	626.3
CYP2C	ToIOH	BME	222.1	297.6
		sulfaphenazole	31.4	4.4
CYP2E	PNPOH	BME	>5000	>5000
		disulfiram	299.5	29.6
CYP3A	TestoOH	BME	321.9	481.8
		ketoconazole	15.4	2.1

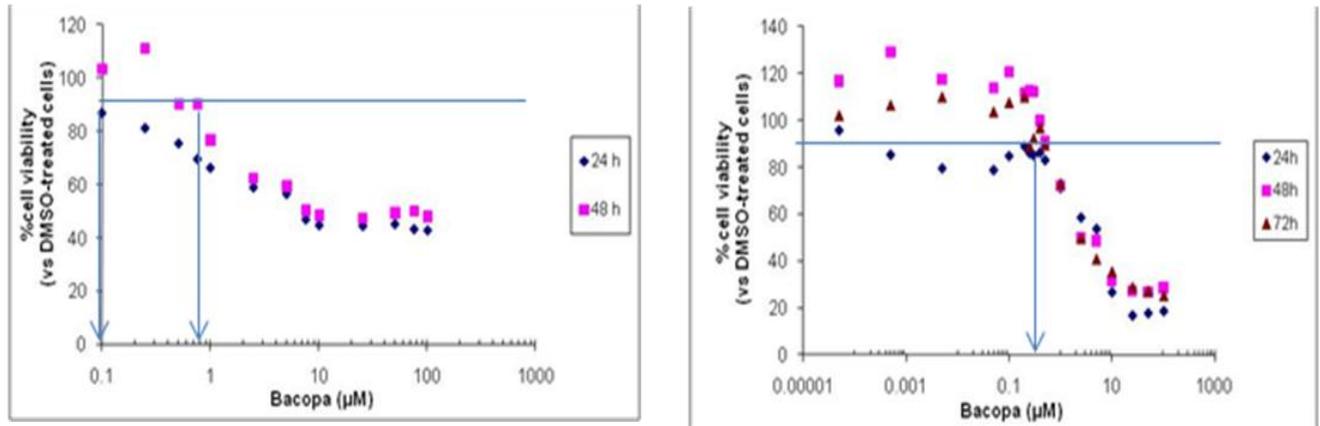
BME = สารสกัดพรมมิ (Crude extract of *Bacopa monnieri*)

ผลของสารสกัดพรมมิ (Crude extract of Bhrami) ต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ตับหนูเพาะเลี้ยง (rat hepatocytes culture)

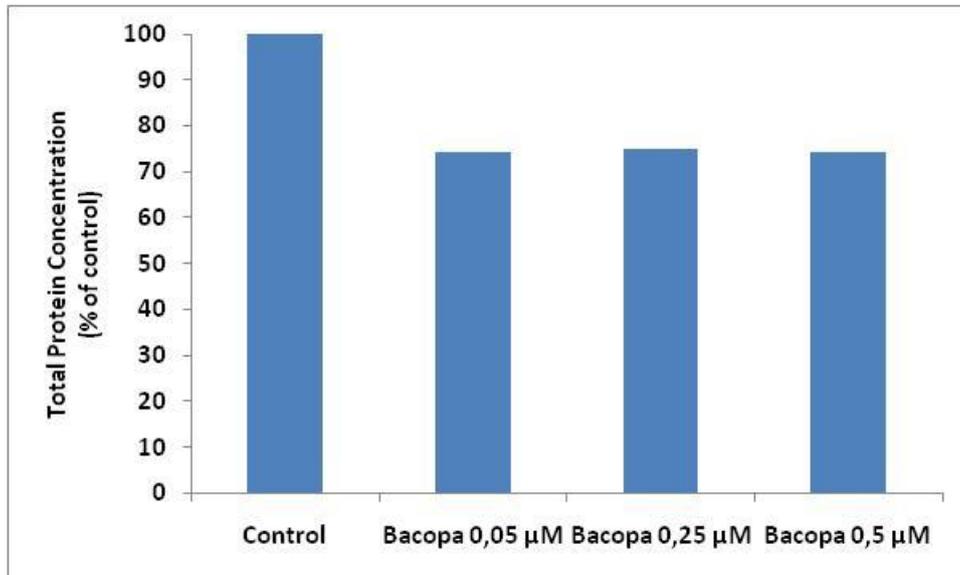


(A) (B)

รูปที่ 4-4 แสดงภาพถ่ายเซลล์ตับหนู control (A) และที่ treated ด้วยสารสกัดพรมมิ 0.45 µg/mL (0.5 µM) กำล้างขยาย 100 เท่า (B)



รูปที่ 4-5 แสดงค่า % cell viability ในเซลล์ตับหนู (n=2) ที่ treated ด้วยสารสกัดพรมมิ (ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 µM หรือ 0-90 µg/mL) ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง



รูปที่ 4-6 แสดงค่าร้อยละของความเข้มข้นของ protein จาก rat hepatocytes ในกลุ่มทดลองที่ treat ด้วย BME (0.05-0.5 µM) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ตับหนูพบว่าสกัดพรมมิ ที่ความเข้มข้น 1 µM (0.9 µg/mL) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ดังแสดงค่า % cell viability ที่สูงกว่า 90% (รูปที่ 4-5) ร่วมกับการสังเกต cell morphology ที่ความเข้มข้น 0.5 µM (0.45 µg/mL) (รูปที่ 4-4) และไม่พบผลของสารสกัดพรมมิ ต่อความผิดปกติต่อเซลล์ตับที่ความเข้มข้นดังกล่าว รวมถึงค่าความเข้มข้นของ protein จาก rat hepatocytes ในกลุ่มทดลองที่ treat ด้วย BME (0.05-0.5 µM) มีค่ามากกว่า 75% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4-6) จึงสามารถสรุปได้ว่าควรทดสอบผลของสารสกัดพรมมิที่ 3 ความเข้มข้นคือที่ 0.05 µM (low), 0.25 µM (middle) และ 0.5 µM (high) เทียบเท่าความเข้มข้น 0.045 µg/ml, 0.225 µg/ml และ 0.45 µg/ml ของสารสกัดพรมมิ

ผลของสารสกัดพรมมิ (Crude extract of Bhrami) ต่อการทำงานของ CYPs ในเซลล์ตับหนูเพาะเลี้ยง (rat hepatocytes culture)

ผลของสารเหนี่ยวนำมาตรฐาน (reference inducers) ดังแสดงในตารางที่ 3-4 พบว่า α -naphthoflavone (50 µM) สามารถเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 ได้เกินกว่า 26.5-44.4 เท่า สอดคล้องกับการแสดงออกของ mRNA CYP1A2 ที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 83.1-282.4 เท่า เช่นเดียวกับ dexamethasone (50 µM) ที่สามารถเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP3A ได้ 1.5-3.5 เท่าเทียบกับกลุ่มควบคุมร่วมกับการแสดงออกของ mRNA CYP3A ที่เพิ่มขึ้น 2.5-24.3 เท่า ผลของ BME ต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2 พบว่ามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง -3.0 ถึง 2.9 เท่าเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยที่การแสดงออกของ mRNA เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยระหว่าง 1.1 ถึง 1.3 เท่า ผลต่อ CYP3A activity BME ที่ขนาดต่ำ (0.05 µM) เหนี่ยวนำ

การทำงานเพียงเล็กน้อย (1.3 เท่า) BME ในขนาดที่เพิ่มขึ้นมีผลลดการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว 1.1-1.4 เท่า ในขณะที่การแสดงออกของ mRNA CYP3A ลดลงระหว่าง 1.4-27.5 เท่า โดยสรุป BME มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ CYP เมื่อเปรียบเทียบกับสารเหนี่ยวนำมาตรฐาน (ตารางที่ 4-3 ถึง 4-4)

ตารางที่ 4-3 แสดงค่าจำนวนเท่าของ CYP activity ของเซลล์ที่ treat ด้วยสารสกัดพรมมิและสารเหนี่ยวนำมาตรฐานเทียบกับกลุ่มควบคุม

Treatment	CYP1A2		CYP3A	
	Rat1	Rat2	Rat1	Rat2
Control	1.0	1.0	1.0	1.0
BME 0.05 μ M	2.0	-3.0	1.3	1.0
BME 0.25 μ M	2.9	-1.7	-1.1	1.0
BME 0.5 μ M	1.6	-1.4	-1.4	-1.2
β -naphthoflavone (50 μ M)	44.4	26.5	-	-
Dexamethasone (50 μ M)	-	-	3.5	1.5

ตารางที่ 4-4 แสดงค่าจำนวนเท่าของการแสดงออกของ mRNA CYP ของเซลล์ที่ treat ด้วยสารสกัดพรมมิและสารเหนี่ยวนำมาตรฐานเทียบกับกลุ่มควบคุม

Treatment	CYP1A2		CYP2C		CYP3A	
	Rat1	Rat2	Rat1	Rat2	Rat1	Rat2
Control	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
BME 0.05 μ M	-1.3	-1.1	-1.1	1.0	-1.4	-3.8
BME 0.25 μ M	-1.3	1.3	-1.2	1.0	-1.0	-5.9
BME 0.5 μ M	-1.1	1.3	-1.2	-1.2	-1.2	-27.5
β -naphthoflavone (50 μ M)	83.1	282.4	-	-	-	-
Dexamethasone (50 μ M)	-	-	1.1	1.5	24.3	2.5

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

คณะวิจัยได้ทำการศึกษาผลของ BME ต่อความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ CYP1A, 2C, 2E และ 3A ในไมโครโซมหนูและมนุษย์, CYP isoform เหล่านี้ถูกเลือกเพื่อศึกษา เนื่องจากเป็น isoform หลักที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงยาหรือสารเคมีที่เข้าสู่ร่างกาย (xenobiotic metabolizing enzyme) และมีสัดส่วนรวมกันเกินกว่าร้อยละ 70 ของปริมาณที่มีอยู่ทั้งหมดในตับ (Ortiz de Montellano ค.ศ. 1995)¹⁶ การทำงานของ CYP1A2 และ CYP2E1 มีความสำคัญในแง่การเปลี่ยนแปลงสาร procarcinogen ให้เป็น carcinogen (Gonzalez และ Gelboin ค.ศ. 1994)¹⁷ ยกตัวอย่างเช่น benzo [a] pyrene เปลี่ยนเป็น benzo [a] pyrene-7, 8-dihydrodiol 9, 10 epoxide โดยอาศัย CYP1A ทำให้มีความสามารถจับกับ DNA นำไปสู่การเป็นสารก่อมะเร็งได้ ในผลการทดลองพบว่า BME มีฤทธิ์ยับยั้ง CYP1A2 อย่างอ่อนทั้งในไมโครโซมหนูและมนุษย์ ดังนั้น BME อาจมีฤทธิ์เป็น anticarcinogen ในมนุษย์ได้ ทั้งนี้ BME ยังมีการรายงานพบว่าแสดงฤทธิ์เป็น antioxidant ด้วย¹⁸

CYP3A เป็นกลุ่ม enzyme สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการทำลายยามากกว่าร้อยละ 55 ของยาในท้องตลาด (Ortiz de Montellano 1995)¹⁶ ketoconazole ซึ่งเป็นสารยับยั้งมาตรฐานของเอนไซม์นี้ แสดงความสามารถในการยับยั้ง enzyme ได้อย่างสมบูรณ์ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 15.4 และ 2.1 $\mu\text{g/mL}$ ในไมโครโซมหนูและในมนุษย์ อย่างไรก็ตาม พบว่า BME มีฤทธิ์ยับยั้ง enzyme นี้ที่ค่า IC_{50} ก่อนข้างสูง และเนื่องด้วย CYP3A มีปริมาณมากในตับ (เฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 45 ของปริมาณ CYP ทั้งหมดในตับ) ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่า BME มีแนวโน้มน้อยมากที่จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ในทางคลินิก

นอกจากนี้ยังพบว่า BME สามารถยับยั้ง CYP2C ที่ค่า IC_{50} 221.1 และ 297.6 $\mu\text{g/mL}$ ในไมโครโซมหนูและมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นนี้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับปริมาณ BME ที่แนะนำให้รับประทานต่อวันซึ่งเท่ากับ 300-600 มิลลิกรัมต่อวัน ความเป็นไปได้ที่ BME จะเกิดอันตรกิริยากับยาที่ metabolize ผ่าน CYP2C จึงมีน้อย อย่างไรก็ตาม ควรระวังการใช้ BME ร่วมกับยาที่ทำลายผ่าน CYP2C และมีความปลอดภัยในการรักษาที่ค่อนข้างแคบ ทั้งนี้เพื่อให้การใช้ยาของผู้ป่วยเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัยสูงสุด จากผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในไมโครโซมหนูและมนุษย์จึงแสดงเป็นค่า IC_{50} ซึ่งมีค่าที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสารยับยั้งมาตรฐาน (IC_{50} มากกว่า 10 เท่า) แสดงให้เห็นว่ามีโอกาสน้อยที่สารสกัดพรมมิในขนาดปกติจะก่อให้เกิดอันตรกิริยากับยาแผนปัจจุบันที่อาศัยเอนไซม์ดังกล่าวในการเปลี่ยนแปลงเพื่อการขจัดยาออกจากร่างกาย

ในแง่การทดสอบความสามารถของสารสกัดพรมมิในการเหนี่ยวนำการทำงานของ CYP ทดสอบโดยใช้ rat hepatocyte culture โดยเฉพาะเลี้ยงนาน 3 วัน จากนั้นวัดการทำงานและการแสดงออกของ mRNA CYP เทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้สารเหนี่ยวนำมาตรฐานแสดงผลการเหนี่ยวนำอย่างจำเพาะเจาะจงต่อ

enzyme activity และการแสดงออกของ mRNA CYP ที่เพิ่มขึ้นตามรายงานก่อนหน้านี้¹⁹ อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดพรมมีต่อการทำงานของเอนไซม์ CYP และการแสดงออกของ mRNA CYP เปลี่ยนแปลงไม่มากนักเมื่อเทียบกับสารเหนี่ยวนำมาตรฐาน โดยสรุปแล้วสารสกัดพรมมี ผลยับยั้งการทำงานของ CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A ได้ต่ำโดยดูจากค่า IC_{50} ที่มีค่าค่อนข้างสูงและไม่มีผลในเหนี่ยวนำการแสดงออกและการทำงานของ CYP ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนู ผลดังกล่าวจึงสามารถประเมินได้ว่ามีโอกาสน้อยที่สารสกัดพรมมีในขนาดปกติจะก่อให้เกิดอันตรกิริยากับยาแผนปัจจุบันที่อาศัยเอนไซม์ดังกล่าวในการเปลี่ยนแปลงเพื่อการขจัดออกจากร่างกาย

บรรณานุกรม

1. คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ. 2549. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด พ.ศ.2549.
2. Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R., Waxman, D.J., 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA and Cell Biology* 10, 397–398.
3. Brazier, N.C., Levine, M.A.H., 2003. Drug–herb interaction among commonly used conventional medicines: a compendium for health care professionals. *American Journal of Therapeutics* 10, 163–169.
4. Ioannides, C., 2002. Pharmacokinetics interactions between herbal remedies and medicinal drugs. *Xenobiotica* 32, 451–478.
5. Sorensen, J.M., 2002. Herb-drug, food-drug, nutrient-drug, and drug–drug interactions: mechanisms involved and their medical implication. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 8, 293–308.
6. Moschella, C., Jaber, B.L., 2001. Interaction between cyclosporine and *Hypericum perforatum* (St. John’s wort) after organ transplantation. *American Journal of Kidney Diseases* 38, 1105–1107.
7. Das, A., Shanker, G., Nath, C., Pal, R., Singh, S., Singh, H., 2002. A comparative study in rodents of standardized extracts of *Bacopa monniera* and *Ginkgo biloba*: anticholinesterase and cognitive enhancing activities. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 73, 893–900.
8. Roodenrys, S., Booth, D., Bulzomi, S., Phipps, A., Micallef, C., Smoker, J., 2002. Chronic effects of Brahmi (*Bacopa monnieri*) on human memory. *Neuropsychopharmacology* 27, 279–281.
9. Uabundit, N., Wattanathorn, J., Mucimapura, S., Ingkaninan, K., 2010. Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer’s disease model. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 26-31.
10. Limpeanchob, N., Jaipan, S., Rattanakaruna, S., Phrompittayarat, W., Ingkaninan, K., 2008. Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 112-117.

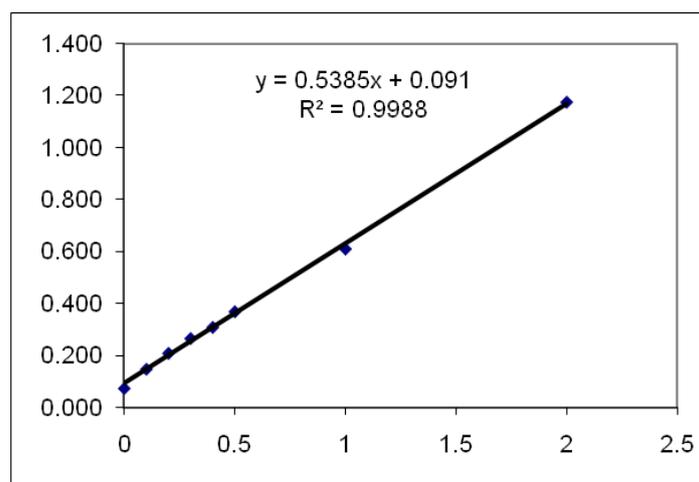
11. กรกนก อิงคนินันท์, พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์, จินตนาภรณ์ วัฒนธร, สุทิสสา ถาน้อย, นันท์ทิพ ลี้มเพียรชอบ, สุภาพร ชื่นชูจิตร, ชนศักดิ์ เทือกทอง, อรสร สารพันโชติวิทยา, สุธีรา เลิศตระกูล. รายงานการวิจัย เรื่อง การศึกษาพัฒนาสมุนไพรพรมมิ. ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. พ.ศ. 2549.
12. Stough, C., Lloyd, J., Clarke, J., et al. 2001. The chronic effects of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. *Psychopharmacology (Berl)* 156, 481-484.
13. Pravina K., Ravindra K.R., Goudar K.S., et al. 2007. Safety evaluation of BacoMind™ in healthy volunteers: a phase I study. *Phytomedicine* 14(5), 301-308.
14. Kim, K.H., Cho, U.S., Park, E.Y., Dong, M.S., Park, B.S., Kim, K., 2003. Tightbinding inhibition by α -naphthoflavone of human cytochrome P450 1A2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1648, 195–202.
15. Emoto, C., Murase, S., Sawada, Y., Jones, B.C., Iwasaki, K., 2003. *In vitro* inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations catalyzed by human cytochrome P450 enzymes: a comparison with SKF-525A and ketoconazole. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 18, 287–295.
16. Ortiz de Montellano, P.R., 1995. *Cytochrome P450: Mechanism, and Biochemistry*. Plenum, New York.
17. Gonzalez, F.J., Gelboin, H.V., 1994. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metabolism Reviews* 26, 165–183.
18. Jobin M., Jes P., Nandhu M.S., Paulose C.S., 2010. *Bacopa monnieri* and Bacoside-A for ameliorating epilepsy associated behavioral deficits. *Fitoterapia* 81, 315-322.
19. Pekthong D, Blanchard N, Abadie C, Bonet A, Heyd B, Manton G, Berthelot A, Richert L, Martin H., 2009. Effects of *Andrographis paniculata* extract and Andrographolide on hepatic cytochrome P450 mRNA expression and monooxygenase activities after *in vivo* administration to rats and *in vitro* in rat and human hepatocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions* 179, 247-255.

ภาคผนวก ก

การปั่นแยก microsomes จากตับ

เตรียม liver subcellular fraction จากชิ้นตับโดยใช้เทคนิคปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Ultra-centrifugation) ล้างชิ้นตับด้วย Normal saline จากนั้นทำการปั่นชิ้นตับด้วยเครื่องบด ในสารละลาย homogenizing buffer โดยใช้สารละลาย 3 mL ต่อตับ 1 g นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลายเพื่อนำไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ความเร็ว 100,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงจนได้ microsomal pellets จากนั้นละลายในสารละลาย sucrose (0.5 M) เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หาปริมาณโปรตีนทั้งของ rat liver microsomes และ pool human liver microsomes โดยใช้วิธีของ Pierce เทียบปริมาณโปรตีนกับ bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 0.1-2 mg/mL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

ความเข้มข้น (mg/mL)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (n=2)
0	0.073
0.1	0.147
0.2	0.208
0.3	0.265
0.4	0.308
0.5	0.368
1	0.609
2	1.173



การวัดการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในตับ

ทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 (isoform 1A, 2C, 2E และ 3A) ใน rat liver microsomes และ pool human liver microsomes โดย incubate ร่วมกับสารสกัดพรมมิที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับ control (เติมเฉพาะสารละลายที่ใช้ในการละลาย crude extract ของพรมมิ) เทคนิคการวิเคราะห์ดูรายละเอียดในภาคผนวก ข.)

ภาคผนวก ข

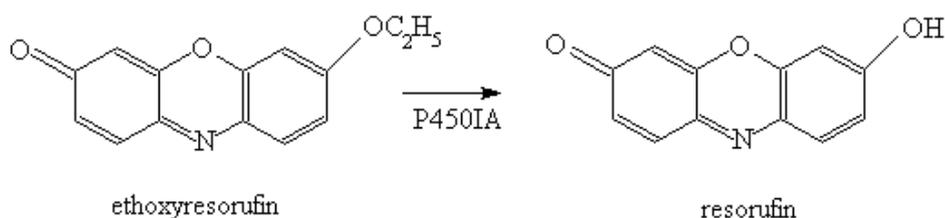
การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์

Cytochrome P450 ในตับ

CYP1A2 Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)

Burke และคณะ¹ (ปีค.ศ. 1985) แสดงให้เห็นว่า อนุพันธ์ของสาร alkyphenoxazone เช่น 7-ethoxyresorufin เป็นสารตั้งต้นที่จำเพาะเจาะจงกับไซโตโครม P450 1A ได้ผลิตภัณฑ์เป็น resorufin ที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยตรง โดยวิธี Fluorimetric ซึ่งสารผลิตภัณฑ์นี้สามารถดูดซับคลื่นความยาวแสงที่ 530 นาโนเมตร และกระจายแสงที่ความยาวคลื่นสูงกว่า คือ 580 นาโนเมตร

ปฏิกิริยาการเปลี่ยน 7-ethoxyresorufin โดย ไซโตโครม P450 1A ได้ผลิตภัณฑ์เป็น resorufin ตามแสดง



สารเคมี (Reagents)

- 0.1M Tris buffer pH 7.8 (in water bath at 37°C)
- 0.53mM 7-Ethoxyresorufin (253µg/2mL DMSO)
- 50µM NADPH (41.7mg/mL)
- 0.1mM Resorufin

เครื่องมือ (Instrument)

Multilabel plate reader ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Enspire

วิธีการทดลอง (Method)

เตรียมสารละลายที่มีส่วนผสมดังต่อไปนี้ (ปริมาตร ต่อ 1 well plate)

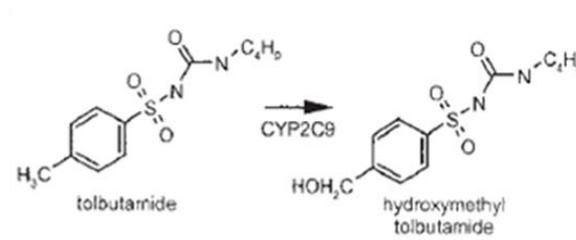
100 มิลลิโมล tris buffer, pH 7.6	65 ไมโครลิตร
Liver microsome (ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	10 ไมโครลิตร
7-Ethoxyresorufin (ความเข้มข้น 130 ไมโครโมล)	5 ไมโครลิตร

เริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย NADPH ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล จากนั้น incubate ใน shake incubator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Methanol แข่งขัน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ Excitation wavelength 530 นาโนเมตร และ Emission

wavelength 580 นาโนเมตร หาปริมาณ resorufin ที่ได้จากปฏิกิริยาเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน นำไปคำนวณความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นของ ไซโตโครม P450 1A2 (enzyme activity) ในหน่วย pmol/min/mg protein เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่เติมสารสกัดผลไม้ หรือ สารยับยั้งมาตรฐาน (reference inhibitor)

CYP2C Tolbutamide hydroxylase

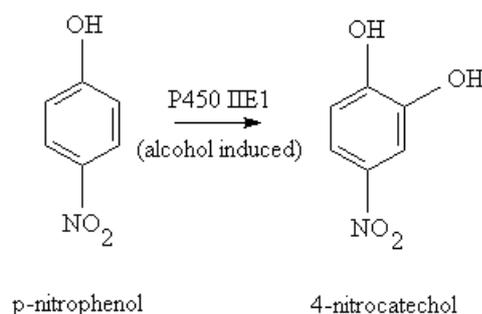
ปฏิกิริยา Tolbutamide Hydroxylation เป็นการวัดการทำงานของ ไซโตโครม P450 2C อ้างอิงตามวิธีการของ Relling² และคณะ (ค.ศ. 1990) ดังสมการ



ทำการ incubate liver microsome (0.2 มิลลิกรัมโปรตีน) กับสารตั้งต้น คือ Tolbutamide ความเข้มข้น 250 ไมโครโมล ในสารละลาย Phosphate buffer pH 7.4 ที่มี MgCl₂ และ EDTA อยู่ปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร เริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติม NADPH 25 ไมโครลิตร incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม Acetonitrile แข็งเย็น 125 ไมโครลิตร ตกตะกอนโปรตีนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำสารละลายใส วัดหาปริมาณ 4-hydroxy Tolbutamide เทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน คำนวณหาความสามารถของการเปลี่ยนสารตั้งต้น (enzyme activity) โดยมีหน่วยเป็น pmol/min/mg protein

CYP2E1 p-nitrophenol hydroxylase

การวัดการทำงานของเอนไซม์ Cytochrome P450 2E1 ทำได้โดยวัดจากปฏิกิริยา Hydroxylation ของสารตั้งต้น คือ para-nitrophenol โดยอาศัยเอนไซม์ Cytochrome 2E1 ในตับ และ co-factors คือ NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced form) ได้ผลิตภัณฑ์ คือ 4-nitrocatechol ดังแสดง



ผลิตภัณฑ์ที่ได้ (4-nitrocatechol) ในสภาวะสารละลายเป็นค่า สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้ที่ค่า ความยาวคลื่น 536 นาโนเมตร

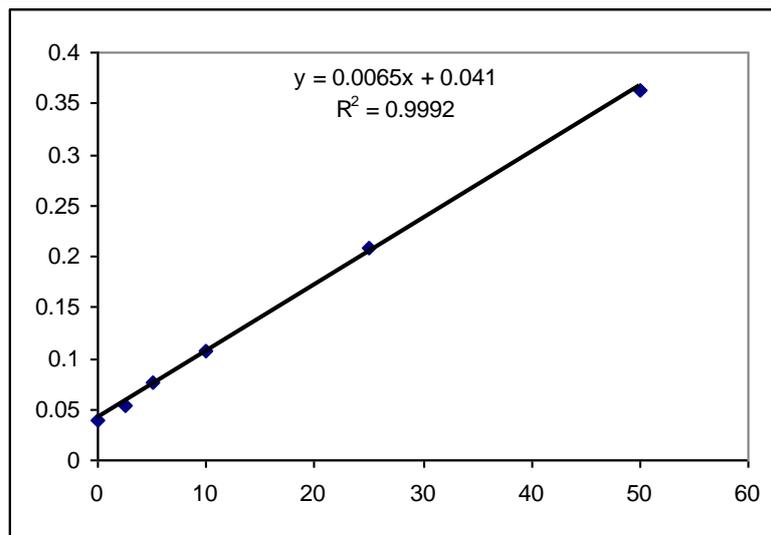
สารเคมี (Reagents)

0.2M Potassium phosphate buffer, pH 6.8
1mM Ascorbate (17.6mg/100mL)
1mM p-nitrophenol (13.9mg/100mL)
0.5mM nitrocatechol (7.8mg/100mL)
10mM NADPH (8mg/ml in 1% NaHCO₃)
10M NaOH
0.6N ice-cold perchloric acid

วิธีการทดลอง (Method)

ปฏิกิริยา Hydroxylation ของ p-nitrophenol อ้างอิงตามวิธีของ Allis และ Robinson (ปีค.ศ. 1994)³ โดยเปลี่ยนแปลงบางรายละเอียด สารละลายมาตรฐาน (Standard solution) และสารละลายตัวอย่าง (Sample solutions) ทำการทดลองใน potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8, สารตั้งต้น p-nitrophenol และ ascorbic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยทั้งหมดมีปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร อุณหภูมิใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ร่วมกับ liver microsomal protein ความเข้มข้น 2 mg/mL จากนั้นเติมสารละลาย NADPH ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยาใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรด perchloric แข็งเย็นที่มีความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ที่สภาวะกรด สีของสารละลายจะหายไป จากนั้นตกตะกอนโปรตีนโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วัดการดูดกลืนแสงที่ 536 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายมาตรฐานของ 4-nitrocatechol กำหนด enzyme activity แสดงค่าเป็น pmol ของ 4-nitrocatechol ต่อนาทีต่อมิลลิกรัม microsomal protein (pmol/mg/min) Ascorbate ที่เติมลงในปฏิกิริยาเพื่อป้องกันไม่ให้ p-nitrophenol เปลี่ยนเป็น quinone

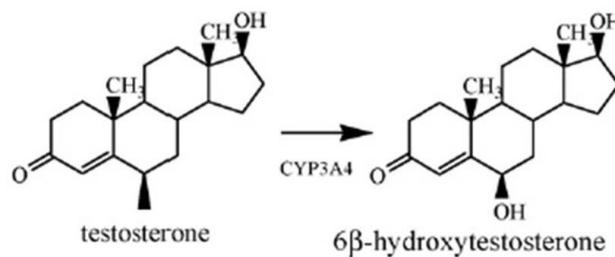
4-nitrocatechol (pmol/tube)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย (n=2)
50	0.3633
25	0.2086
10	0.1078
5	0.0758
2.5	0.0536
0	0.0386



4-nitrocatechol (pmol/tube)

CYP3A testosterone 6 β -hydroxylase assay

ปฏิกิริยา Testosterone 6 β - Hydroxylation เป็นการวัดการทำงานของ ไซโตโครม P450 3A อ้างอิงตามวิธีการของ Pearce และคณะ⁴ (ค.ศ. 1996) ดังสมการ



ทำการ incubate liver microsome (0.2 มิลลิกรัมโปรตีน) กับสารตั้งต้น คือ Testosterone ความเข้มข้น 250 ไมโครโมล ในสารละลาย Phosphate buffer pH 7.4 ที่มี MgCl₂ และ EDTA อยู่ปริมาตรรวม 200 ไมโครลิตร เริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยการเติม NADPH 25 ไมโครลิตร incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม Acetonitrile แฉะเย็น 125 ไมโครลิตร ตกตะกอนโปรตีนโดยการปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็วสูง 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นนำสารละลายใส่ วัดหาปริมาณ 6- β hydroxyTestosterone เทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน คำนวณหาความสามารถของการเปลี่ยนสารตั้งต้น (enzyme activity) โดยมี หน่วยเป็น pmol/min/mg protein

ตารางที่ 4-5 แสดงตัวอย่างผลการทดสอบวิธีการวิเคราะห์ (method validation) โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ในการวัดการทำงานของเอนไซม์ไฮโดรอกซิโคโรม P450 3A

Accuracy and precision study of 6 β -testosterone hydroxylase assay

	Calculated amount ^b	Accuracy (%) ^c	Precision (%) ^d
<i>Intra-day (n=4)</i>			
Calibration standards ^a			
75	67.13±5.83	-10.49	8.68
150	137.70±13.65	-8.20	9.92
300	311.50±14.73	3.83	4.73
600	548.65±26.00	-8.56	4.74
1500	1526.86±36.34	1.79	2.38
3000	2974.40±76.52	-0.85	2.57
Quality control samples ^a			
200	207.95±24.62	3.98	11.84
500	523.55±32.72	4.71	6.25
2000	2065.21±58.91	3.26	2.85
<i>Inter-day (n=4)</i>			
Calibration standards ^a			
75	72.99±8.34	-2.67	11.43
150	143.35±12.23	-4.43	8.53
300	320.37±28.69	6.79	8.95
600	556.39±24.27	-7.27	4.36
1500	1490.35±35.65	-0.64	2.39
3000	3019.82±15.08	0.66	0.50

ตารางที่ 4-5 (ต่อ)

	Calculated amount ^b	Accuracy (%) ^c	Precision (%) ^d
Quality control samples ^a			
200	188.33±18.51	-5.83	9.83
500	493.29±27.94	-1.34	5.66
2000	2005.61±41.06	0.28	2.05

a Amounts of 6β-hydroxytestosterone added per 0.5 ml sample in pmol.

b Mean±SD in pmol.

c Defined as: [(measured conc.-target conc.) / target conc.]x100%.

d Assessed by expressing the standard deviation of the measurement as a percentage of the mean value.

บรรณานุกรม

1. Burke, M.D., Thomson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T., Mayer, R.T., 1985. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxasones and homologues; a series of substrate to distinguish between different induced cytochrome P450. *Biochemical Pharmacology* 34, 3337–3345.
2. Relling, M.V., Aoyama, T., Gonzalez, F.T., Meyer, U.A., 1990. Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450s in the CYP2C subfamily. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 252, 442–447.
3. Allis, J.W., Robinson, B.L., 1994. A kinetic assay for *p*-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes. *Analytical Biochemistry* 219, 49–52.
4. Pearce, R.E., McIntyre, C.J., Madan, A., Sanzgiri, U., Draper, A.J., Bullock, P.L., Cook, D.C., Burton, L.A., Latham, J., Nevins, C., Parkinson, A., 1996. Effect of freezing, thawing and storing human liver microsome on cytochrome P450 activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 331, 145–169.

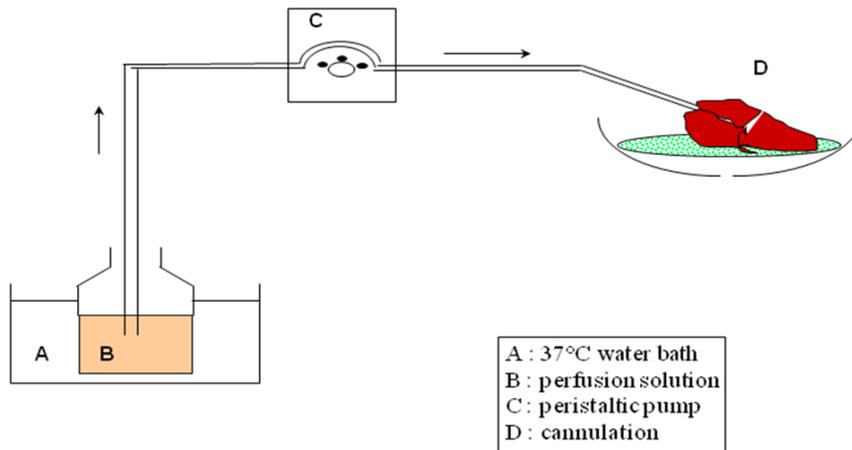
ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ CYPs ในเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (Primary hepatocyte culture)

การทดสอบการเกิดอันตรกิริยาของสารสกัดพรมมิในเซลล์ตับเพาะเลี้ยงของหนู

- การแยกเซลล์ตับหนูและเพาะเลี้ยงเซลล์

ทำการดมยาสลบหนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ ผ่าตัดเพื่อเปิดหน้าท้อง จากนั้นทำการ cannulate ผ่าน hepatic vein ทำการ clamp จากนั้น pump perfusion buffer (ประกอบด้วย EGTA, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, HEPES) ที่ความเร็ว 20 มิลลิลิตรต่อนาที ขณะเปิด pump on ทำการตัดเส้นเลือด superior vena cava เพื่อให้สารละลายที่ผ่านตับไหลออก จากนั้นแยกเซลล์โดยใช้การ perfuse เอนไซม์ collagenase ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตัดชิ้นตับที่ย่อยแล้วด้วยกรรไกร ชะด้วยสารละลาย HBSS ทำการกรองเพื่อคัดแยกเฉพาะ hepatocyte suspension ด้วยตะแกรงขนาด 400-500, และ 100 ไมครอน นำเซลล์ที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 100 g, 25 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนเซลล์ตับ เจือจางเซลล์ตับด้วย Williams'E culture medium ที่มีส่วนผสมของ fetal calf serum 10%, insulin 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, dexamethasone 1 ไมโครโมล และ Penicilling 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้เซลล์ตับย้อมสีด้วย trypan blue เพื่อนับจำนวน หา % viability โดยต้องมีค่ามากกว่า 80% ถ้า % viability น้อยกว่า 80% ทำการแยกเซลล์ตับที่ตายออก (ย้อมติดสี trypan blue) โดยใช้ใน 90% Percoll แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 50 g นาน 20 นาที นำเซลล์ตับหนูที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงใน collagen-coat plate ขนาด 24 หลุมๆละ 500,000 เซลล์ เพื่อทดสอบการทำงานของเอนไซม์ CYPs และเพาะเลี้ยงใน plate ขนาด 6 หลุมๆละ 1.5 ล้านเซลล์ เพื่อวัดการแสดงออกของ CYPs mRNA นำ plate เข้าตู้ incubator ที่ควบคุมความชื้นและปริมาณอากาศต่อก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 95% ต่อ 5% ตามลำดับ นาน 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับ plate เป็นแบบชั้นเดียว (monolayer culture) จากนั้นเปลี่ยนสารเลี้ยงเชื้อ Williams'E culture medium เป็นแบบไม่มี fetal calf serum โดยลดปริมาณ dexamethasone เหลือ 0.1 ไมโครโมล



นำ freshly rat hepatocytes ที่แยกได้ใส่ลงใน plate ขนาด 96 หลุมเพื่อทำการวัดประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดพรมมิ (Cytotoxicity assay) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 μM หรือ 0-90 $\mu\text{g/mL}$ นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับเซลล์ที่มีชีวิต (cellular viability) โดยวิธี MTT test โดยเติมสารละลาย MTT 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ทำการคว่ำ plate เพื่อกำจัดสารละลาย MTT เติม DMSO 100 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเบาๆ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer คำนวณหา % cell viability ตามสูตร

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{OD of test compound treated cells} - \text{OD blank}}{\text{OD of control treated cells}} \times 100$$

ทำการทดสอบผลของสารสกัดพรมมิต่อการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 โดยการละลายสารสกัดพรมมิ หรือสารเหนี่ยวนำมาตรฐาน (positive CYP inducers) เช่น β -naphthoflaven (50 ไมโครกรัม) dexamethasone (50 ไมโครกรัม) ลงใน Williams'E culture medium โดยให้มีปริมาณตัวทำละลาย dimethylsulfoxide เท่ากับ 0.1% ทำการเปลี่ยนสารเลี้ยงเชื้อทุกวันจนครบ 3 วัน (72 ชั่วโมง)

- การวัดการทำงานของเอนไซม์

ทำการ incubate สารตั้งต้นในแต่ละปฏิกิริยา เพื่อวัดการทำงานของเอนไซม์ CYP เช่น testosterone สำหรับ CYP3A, tolbutamide สำหรับ CYP2C และ 7-Ethoxyresorufin สำหรับ CYP1A2 เป็นต้น โดยใน cell monolayer ของ plate ขนาด 24 หลุม ล้างด้วย phosphate buffer saline 2 ครั้ง ที่ใช้นาน 5 นาที เพื่อกำจัดสารเหนี่ยวนำมาตรฐาน หรือสารสกัดพรมมิ ทำการ incubate สารตั้งต้นใน Williams'E culture medium ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที แล้วแต่ปฏิกิริยา ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม Methanol แข็งเย็น จากนั้น ดูดเอาส่วนของสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 g 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำส่วนสารละลายใส่ไปวิเคราะห์หาปริมาณผลิตภัณฑ์ (metabolite) ที่ได้จากปฏิกิริยา ตามภาคผนวก ข

- การวัดการแสดงออกของ CYP mRNA โดย RT-PCR

หลังการ incubate เซลล์นาน 72 ชั่วโมง ด้วยสารสกัดหรือสารเหนี่ยวนำมาตรฐาน ใน plate ขนาด 6 หลุม ทำการย่อยเซลล์ด้วยสารละลาย trizol ปริมาณ 500 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำการสกัดแยก total RNA แล้ววัดปริมาณ RNA โดยวิธี Spectrophotometry ที่ 260 นาโนเมตรและ 280 นาโนเมตร ทำการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ total RNA 1 ไมโครกรัม และ iScript kit (บริษัท Biorad) ที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ใช้ cDNA 5 ไมโครลิตรในปฏิกิริยา real-time PCR amplification โดยใช้สารละลาย SYBR Green kit (บริษัท Biorad) ดังโปรแกรมต่อไปนี้ ขั้นตอน denature ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และทำ PCR ทั้งหมด 40 รอบ (denature 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที, annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส 1 นาที) ทำการวัดคุณภาพของ PCR product โดย monitor ที่ fusion step ในตอนสิ้นสุดปฏิกิริยา rat sense และ reverse primers ดังแสดง

5 -GACCAGGA ACTATGGGGTGATCC-3

5 -CTCCAG TCGGCCAATGGTCT-3 rat CYP1A2

5 -AATCATTGGAAACACCCTTCAGA-3

5 -AAGGGCTTCATGCCCAAATAC3 rat CYP2C11

5 -GGGACTACCTCCATTTGTTTCTGG-3

5 -CCCCTGGGGATTTTAAAGAAGTG-3 rat CYP3A1

5 -TATCGGCAATGAGCGGTTCC-3

5 -GCCTGGGTACATGGTGGTG-3 rat actin

วัดการแสดงออกของ mRNA CYPs โดยดูค่า Ct (cycle threshold) หมายถึงจำนวนรอบของการสังเคราะห์เพื่อให้สามารถวัดสัญญาณ fluorescent ได้ ค่า Ct เป็นค่าตรงกันข้ามกับปริมาณ nucleic acid ในตัวอย่าง (เช่น ค่า Ct ต่ำ หมายถึงปริมาณ nucleic acid ในตัวอย่างมีค่าสูง). ค่า Ct ของ housekeeping genes (ในที่นี้ใช้ actin) ใช้เป็น positive control เพื่อวัดปริมาณ PCR. ค่า Fold change คำนวณจากค่า Ct จากกลุ่ม treatment cell เทียบกับกลุ่มควบคุม (Control) แสดงดังสูตร โดยค่า E คือ efficiency ของ qPCR

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CT_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{actin}})^{\Delta CT_{\text{actin}}(\text{control-sample})}}$$



รายงานการวิจัย
โครงการย่อยที่ 5
เรื่อง

การศึกษาเมตาบอไลต์ของบาโคปไซด์วันในหนู
Study of the metabolites of Bacopaside I in rats

โดย

รศ.ดร.กรกนก อิงคนินันท์
ดร.ศราวุฒิ อุ่พุดินันท์
ดร.วฐุ พรหมพิทยารัตน์
ดร.นิทรา เนื่องจำนงค์
น.ส.สนธยา สุขยิ่ง

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีงบประมาณ 2552

บทคัดย่อ

พรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Scrophulariaceae family) เป็นพืชที่มีการใช้ทางการแพทย์อายุรเวทของอินเดียมาเป็นระยะเวลานาน โดยเฉพาะในด้านการบำรุงความจำและสมอง ทั้งนี้มีการศึกษาหลายการศึกษาเกี่ยวกับพรมมิ ไม่ว่าจะเป็นฤทธิ์ทางการรักษาโรค หรือ สารสำคัญในพรมมิ ซึ่งได้แก่สารกลุ่มซาโปนินไกลโคไซด์ ประกอบด้วย jujubogenin และ pseudojujubogenin แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการเมตาบอลิซึมของสารสำคัญในพืชชนิดนี้

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยและคณะได้ทำการศึกษาการเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หนึ่งในสารกลุ่ม pseudojujubogenin glycosides ในหนูสายพันธุ์ wistar ภายหลังการบริหารสารดังกล่าวโดยการป้อนและการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำในปริมาณ 10 มก./กก. ของน้ำหนักตัวของหนูทดลอง โดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระที่เก็บ ณ เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง หลังการบริหารยา ด้วยเทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา (an on-membrane analysis)

ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจพบสาร Bacopaside I ในตัวอย่างอุจจาระของหนูกลุ่มที่ได้รับสาร Bacopaside I โดยการป้อน ส่วนในหนูกลุ่มที่ได้รับสารทางหลอดเลือดดำพบว่าสามารถตรวจพบสารดังกล่าวได้ทั้งในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ โดยปริมาณของ Bacopaside I ที่ตรวจพบไม่มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาหลังการบริหารสาร และปริมาณที่ตรวจพบในตัวอย่างอุจจาระของหนูทดลองที่ได้รับสารโดยการป้อนมีปริมาณมากกว่าที่ตรวจพบในอุจจาระของหนูที่ได้รับสารโดยการบริหารทางหลอดเลือดดำ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี on membrane analysis ยังตรวจพบสารอื่นนอกจากสาร Bacopaside I ในตัวอย่างอุจจาระของหนูกลุ่มที่ได้รับสารโดยการป้อนด้วย

Abstract

Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Scrophulariaceae family) is used in Ayurvedic medicine for long times, especially for memory enhancement and neuroprotective effect. Its pharmacological effects and chemical constituents i.e. jujubogenin and pseudojujubogenin saponin glycosides have been studied extensively. However, up to now, no metabolism study of these compounds is available.

In this experiment, we studied on the metabolism of Bacopaside I, one of pseudojujubogenin type glycosides, in wistar rats after oral and intravenous administration at the dose of 10 mg/kg body weight. An immunoassay technique, 'on-membrane analysis'; was used to analyze for Bacopaside I and its metabolites in urine and feces samples collected after dosing at 12, 24, 36 and 48 h.

From rats taking bacopaside I orally, Bacopaside I was found only in feces while this compound could be detected in both urine and feces samples from rats taking intravenous administration. In addition, the results from quantitative analysis of Bacopaside I in the samples showed that amount of Bacopaside I did not depend on time. Higher level of Bacopaside I was detected in feces samples after oral administration comparing to intravenous administration. In addition, on membrane analysis showed that there was an unknown compound with the related structure to Bacopaside I in feces sample collected from rat after oral administration.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	5-ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	5-iii
สารบัญ	5-iv
สารบัญตาราง	5-v
สารบัญรูป	5-vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	5-vii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	5-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	5-4
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	5-16
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	5-32
บรรณานุกรม	5-33

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
5-1	ค่าน้ำหนักโมเลกุลและการคำนวณความเข้มข้นหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ (mM) และปริมาณเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$)ของสารมาตรฐานกรดอะมิโนที่ 5 ความเข้มข้น	3-9-10
5-2	สภาวะที่ใช้ของเครื่องวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร รุ่น API 4000	5-10
5-3	สารที่ทดสอบ มวลโมเลกุล และการแตกตัวเป็นไอออน ค่าพลังงานที่ใช้	5-11
5-4	Mass spectrometry conditions	5-11
5-5	ชื่อตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองที่เก็บ ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการป้อนสาร Bacopaside I	5-18
5-6	ชื่อตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองที่เก็บ ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการบริหารสาร Bacopaside I ทางหลอดเลือดดำ	5-19
5-7	ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการบริหารสาร Bacopaside I ทางหลอดเลือดดำ	5-20
5-8	ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการป้อน สาร Bacopaside I	5-21
5-9	ปริมาณสาร Bacopaside I ที่ตรวจพบในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระหลังการป้อนสาร Bacopaside I	5-22
5-10	ปริมาณสาร Bacopaside I ที่ตรวจพบในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระหลังการบริหารสาร Bacopaside I ทางหลอดเลือดดำ	5-23
5-11	Intraday coefficient of variation ของการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ	5-27
5-12	Interday coefficient of variation ของการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ	5-27
5-13	Recovery ของการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ	5-28

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
5-1	5-2
โครงสร้างของสารกลุ่ม jujubogenin glycosides และ pseudojujubogenin glycosides ที่พบ ในพรมมิ	3-8
5-2	3-14
ขั้นตอนการศึกษาเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หลังการบริหารโดยการป้อน	5-6
5-3	5-8
ขั้นตอนการศึกษาเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หลังการบริหารทางหลอดเลือดดำ	5-15
5-4	5-16
การเกิดปฏิกิริยาจับกับโปรตีนและสารกลุ่ม pseudojujubogenin glycosides บนแผ่น PES membrane	5-16
5-5	5-17
HPLC Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ enriched saponin extract ที่ความเข้มข้น 3 mg/ml และ chromatogram ของ fraction 14	5-16
5-6	5-17
HPLC Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ enriched saponin extract ที่ความเข้มข้น 3 mg/ml และ chromatogram ของ fraction 15-17	5-25
5-7	5-26
LC/MS/MS ของ fraction 15-17 สาร Bacopaside I แสดง peak ที่ 19.3 นาที	5-26
5-8	5-29
ตัวอย่างโครมาโตแกรมของผลการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและ อุจจาระ	5-26
5-9	5-26
โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Bacopaside I ที่แต่ละความเข้มข้น	5-29
5-10	5-30
กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Bacopaside I	5-30
5-11	5-30
โครมาโตแกรมตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองภายหลังการป้อนสาร Bacopaside I	5-30
5-12	5-30
โครมาโตแกรมตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองภายหลังการบริหารสาร Bacopaside I ทางเส้นเลือดดำ	

คำอธิบายสัญลักษณ์ และตัวย่อ

LOQ	Limit of quantification
LOD	Limit of detection
r^2	Coefficient of determination or correlation
SD	Standard deviation
$^{\circ}\text{C}$	Degree celcius
ng	Nanogram
mg	Milligram
μg	Microgram
kg	Kilogram
ml	Milliliter
μl	Microliter
PES	Polyethersulphone
PBS	Phosphate buffer solution

บทที่ 1

บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย และการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

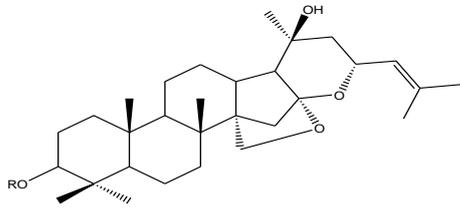
เนื่องด้วยในปัจจุบันมีการนำสมุนไพรมานำมาใช้แก้ปัญหาลักษณะทางกายภาพในทางการแพทย์มากขึ้น รวมไปถึงในด้านส่งเสริมสุขภาพ พรมมิเป็นสมุนไพรมีการใช้มากในการแพทย์อายุรเวทของอินเดีย การศึกษาหลายการศึกษาพบว่าพืชดังกล่าวมีฤทธิ์ในทางเภสัชวิทยา เช่น เพิ่มความจำ บำรุงสมอง ลดการอักเสบ เป็นต้น¹⁻⁶ ในปัจจุบันจึงมีการนำพรมมิมาใช้มากขึ้น จากการศึกษาของ ดร. วรุตและคณะ ได้ทำการควบคุมมาตรฐานของพรมมิ โดยตรวจวัดระดับสารกลุ่ม ซาโปนินไกลโคไซด์ อันได้แก่ jujubogenin และ pseudojujubogenin glycosides โดยสารสำคัญในกลุ่ม jujubogenin glycosides ได้แก่ Bacoside A₃, Bacopaside II, Bacopasaponin C, และสารในกลุ่ม pseudojujubogenin glycosides ได้แก่ Bacopaside I, และ Bacopaside X⁷

อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่ผ่านมาเป็นการศึกษาเกี่ยวกับสารสำคัญและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพรมมิ แต่ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาว่า เมื่อให้พรมมิเข้าสู่ร่างกายแล้ว สารที่ออกฤทธิ์และให้ผลทางเภสัชวิทยาเหล่านั้นคือสารใด และเกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงใดในร่างกาย

จากการทบทวนวรรณกรรมของสารในกลุ่มเดียวกันนี้ พบว่าส่วนใหญ่ได้แก่ สารกลุ่ม ginsenoside ซึ่งเป็นสารสำคัญที่พบได้ใน โสม พืชที่ได้รับความนิยมเป็นอันดับหนึ่งในสหรัฐอเมริกา การศึกษาเหล่านั้นเป็นการศึกษาเพื่อทำนายกระบวนการเมตาบอลิซึมและหาสารเมตาบอไลต์ที่เกิดจาก ginsenosides โดยวิเคราะห์จากตัวอย่างอุจจาระและปัสสาวะที่เก็บได้ ณ เวลาต่างๆ หลังการให้สารเหล่านั้นแก่หนูทดลอง ทั้งทางหลอดเลือดดำและทางปาก⁸⁻¹⁵ ผลการทดลองพบว่า กระบวนการเมตาบอลิซึมหลักได้แก่ กระบวนการ deglycosylation และ oxygenation การศึกษาเหล่านี้ต่างอภิปรายผลการศึกษาไปในแนวทางเดียวกันว่าความคงตัวในระบบทางเดินอาหารของสารกลุ่มนี้ไม่ดัดแปร โดยมีผลการทดลองในหลอดทดลอง (in vitro) ยืนยันสมมติฐานดังกล่าวด้วย และจากการศึกษาฤทธิ์ของสารซาโปนินจากพรมมิในการต้านอาการซึมเศร้าโดย Yun Zhou และคณะ⁴ พบว่า Bacopaside I เป็นหนึ่งในสารที่แสดงผลดังกล่าว ผู้ทำการวิจัยจึงใช้สาร Bacopaside I ในการศึกษาคั้งนี้

การศึกษานี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาการเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หลังจากการรับประทานและการบริหารทางหลอดเลือดดำ ทำการทดลองในหนูทดลองสายพันธุ์ wistar โดยขนาดอ้างอิงของสาร Bacopaside I ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้จากขนาดของสารซาโปนินทั้ง 5 ชนิด (Bacopaside I, Bacopaside II,

Bacoside A₃, Bacopaside X และ Bacopasaponin C) ในสารสกัดชาโปนินสูงที่ใช้ในการศึกษาก่อนหน้า แล้วตรวจพบสารชาโปนินในตัวอย่างอุจจาระ



Jujubogenins

Jujubogenins

Bacoside A ₃	α -L-arabinofuranosyl(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl
Bacopasaponin X	α -L-arabinofuranosyl(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopyranosyl

Pseudojujubogenins

Bacopasaponin C	α -L-arabinofuranosyl(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopyranosyl
Bacopaside I	α -L-arabinofuranosyl(1 \rightarrow 2)-[6-O-sulfonyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopyranosyl
Bacopaside II	α -L-arabinofuranosyl(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl

รูปที่ 5-1 โครงสร้างของสารกลุ่ม jujubogenin glycosides และ pseudojujubogenin glycosides ที่พบในพรมมิ

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบวิธีวิเคราะห์สาร Bacopaside I โดยวิธี on membrane analysis โดยใช้ polyclonal antibody ต่อสาร Bacopaside I
2. เพื่อวิเคราะห์สาร Bacopaside I และสารเมตาบอไลต์ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองที่ได้รับสาร Bacopaside I โดยการป้อนและการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำโดยวิธี on membrane analysis โดยใช้ polyclonal antibody ต่อสาร Bacopaside I

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ผู้วิจัยจะทำการศึกษาการเมตาบอลิซึมของสารซาโปนิน Bacopaside I ในหนูทดลอง เมื่อให้รับประทานหรือให้ทางหลอดเลือดดำ ในขนาด 10 mg/kg เก็บตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง ที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา(an on membrane analysis) โดยใช้ polyclonal antibody ต่อสาร Bacopaside I

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

เพื่อให้ทราบแนวทางการเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I รวมไปถึงในส่วนของ การดูดซึม ในระบบทางเดินอาหาร หรือค่าชีวประโยชน์ของสาร Bacopaside I ทั้งนี้ข้อมูลดังกล่าวจะสามารถนำไปอธิบาย สารออกฤทธิ์ (active form) กระบวนการเมตาบอลิซึม รวมทั้งความแตกต่างระหว่างการบริหารสารนี้หรือ สารสกัดพรมมีอื่นๆ ทางหลอดเลือดดำและการรับประทาน

บทที่ 2

ระเบียบวิธีการวิจัย

สัตว์ทดลองและสารเคมี

Bacopaside I

- บริษัท Chromadex ประเทศสหรัฐอเมริกา
- บริษัท PhytoLab GmbH & Co. ประเทศเยอรมันนี
- ได้รับอนุเคราะห์จาก Dr. Frederic Muyard University of Franche-Comté ประเทศฝรั่งเศส

Polyclonal antibody ต่อสาร Bacopaside I

- ได้รับอนุเคราะห์จาก ดร. วฐุ พรหมพิทยารัตน์

หนูสายพันธุ์วิสตา

- บริษัท Janvier ประเทศฝรั่งเศส

วิธีการทดลอง

ผู้วิจัยได้จัดซื้อสารมาตรฐาน Bacopaside I จากบริษัท Chromadex แต่พบว่า ทางบริษัทมีปัญหาสารขาด stock คณะผู้วิจัยจึงได้ร่วมมือการทำวิจัยกับ Dr. Frederic Muyard จาก University of Franche-Comté ประเทศฝรั่งเศส ในการแยกสาร Bacopaside I จากสารสกัดพรมมิ ด้วยเทคนิคทาง Centrifugal Partition Chromatography (CPC) เพื่อให้ได้สารปริมาณที่พอเพียงในการทำวิจัย

วิธีทดลองเพื่อแยกสาร Bacopaside I

การแยกสารโดย CPC

ใช้ CPC condition ดังต่อไปนี้

Mobile phase: Chloroform: Methanol: i-Butanol: water (7:6:3:4)

Sample: Enriched saponin extract ของพรมมิ 294.3 mg

Mode: ascending

CPC condition

Tubes	Flow rate (ml/min)	Rotation speed (str/min)	Min/tube
[1-5]	8	1200	3
[6-8]	8	1200	2
[9-26]	8	1300	1
[27-50]	8	1400	1

การวิเคราะห์สารโดย HPLC

เครื่อง HPLC ผลิตโดย Shimadzu ประกอบด้วย Pump: LC-20AT, Detector: SPD-20A, Injector: 20 μ L
ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 205 nm

คอลัมน์ RP-18 column (150 mm x 4.6 mm, particle size 5 μ m)

Mobile phase: 0.2 % O-phosphoric acid: acetonitrile (65:35% v/v) pH 3.0 โดย ปรับ pH ด้วย 5M NaOH

Flow rate: 1.0 ml/min

การศึกษาเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I ในหนูสายพันธุ์วีสตาร์

1. การศึกษาเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หลังการบริหารโดยการป้อนในหนูสายพันธุ์วีสตาร์

วิธีการทดลอง

การคำนวณปริมาณสารที่จะให้แก่หนูทดลอง

คำนวณจากการศึกษาทางเมตาบอลิซึมครั้งก่อนหน้า (Preliminary study)

ปริมาณสาร Bacopaside I ที่ป้อนให้แก่หนูเทียบเท่ากับปริมาณสารซาโปนินไกลโคไซด์ 5 ชนิดในสารสกัดซาโปนินสูงของพรมมิ ที่ป้อนให้แก่หนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับสารดังกล่าวในขนาดสูง ในการศึกษาครั้งก่อนหน้า (10 มก./กก. ของสารซาโปนินไกลโคไซด์) ซึ่งเป็นขนาดรับประทานที่พบว่าสามารถตรวจพบได้ในอุจจาระของหนู

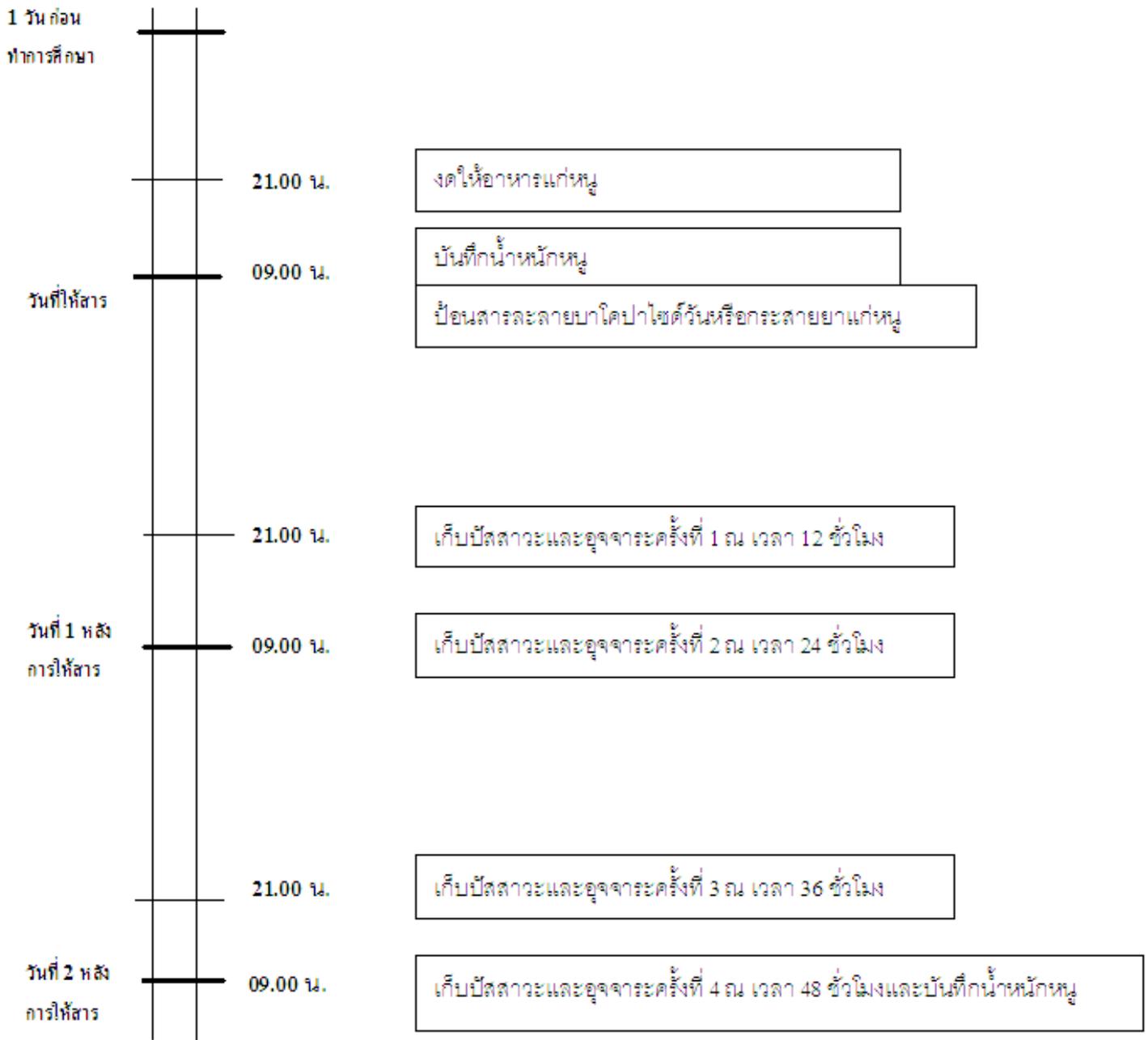
ดังนั้น จึงใช้สาร Bacopaside I 10 มก. ต่อ น้ำหนักตัวหนู 1 กก.

กลุ่มของสัตว์ทดลอง

- กลุ่มควบคุม จำนวน 3 ตัว
 - กลุ่มทดลอง จำนวน 3 ตัว
1. แบ่งหนูสายพันธุ์วีสตาร์จำนวน 6 ตัว ออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองจำนวนกลุ่มละ 3 ตัว
 2. แยกหนูแต่ละตัวในกรงสำหรับศึกษาการเมตาบอลิซึมก่อนทำการศึกษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน 12-12 ชั่วโมง light-dark cycle
 3. งดให้อาหารแก่หนูเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนการป้อนสาร Bacopaside I ให้แก่หนู
 4. ป้อนสารละลายของ Bacopaside I ใน DI water ขนาด 10 มก./กก. ของน้ำหนักตัว แก่หนูกลุ่มทดลอง และ DI water แก่หนูกลุ่มควบคุมในปริมาตรต่อน้ำหนักตัวที่เท่ากัน
 5. เก็บปัสสาวะและอุจจาระหลังการป้อนสารที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พร้อมทั้งบันทึก ปริมาตรและน้ำหนัก
 6. เก็บปัสสาวะและอุจจาระไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ผล

ปริมาตรของสารละลายในการป้อนสารแก่หนู = 0.5 มล. / 100 กรัม ของน้ำหนักตัว

การเตรียมสารละลาย = ละลาย Bacopaside I 8.66 มก. ใน DI water ปริมาตร 4.33 มล.



รูปที่ 5-2 ขั้นตอนการศึกษามาตบอติสมของสาร Bacopaside I หลังการบริหาร โดยการป้อน

2. การศึกษาเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หลังการบริหารทางหลอดเลือดดำในหนูสายพันธุ์ วิสตาร์

วิธีการทดลอง

การคำนวณปริมาณสารที่จะให้แก่หนูทดลอง

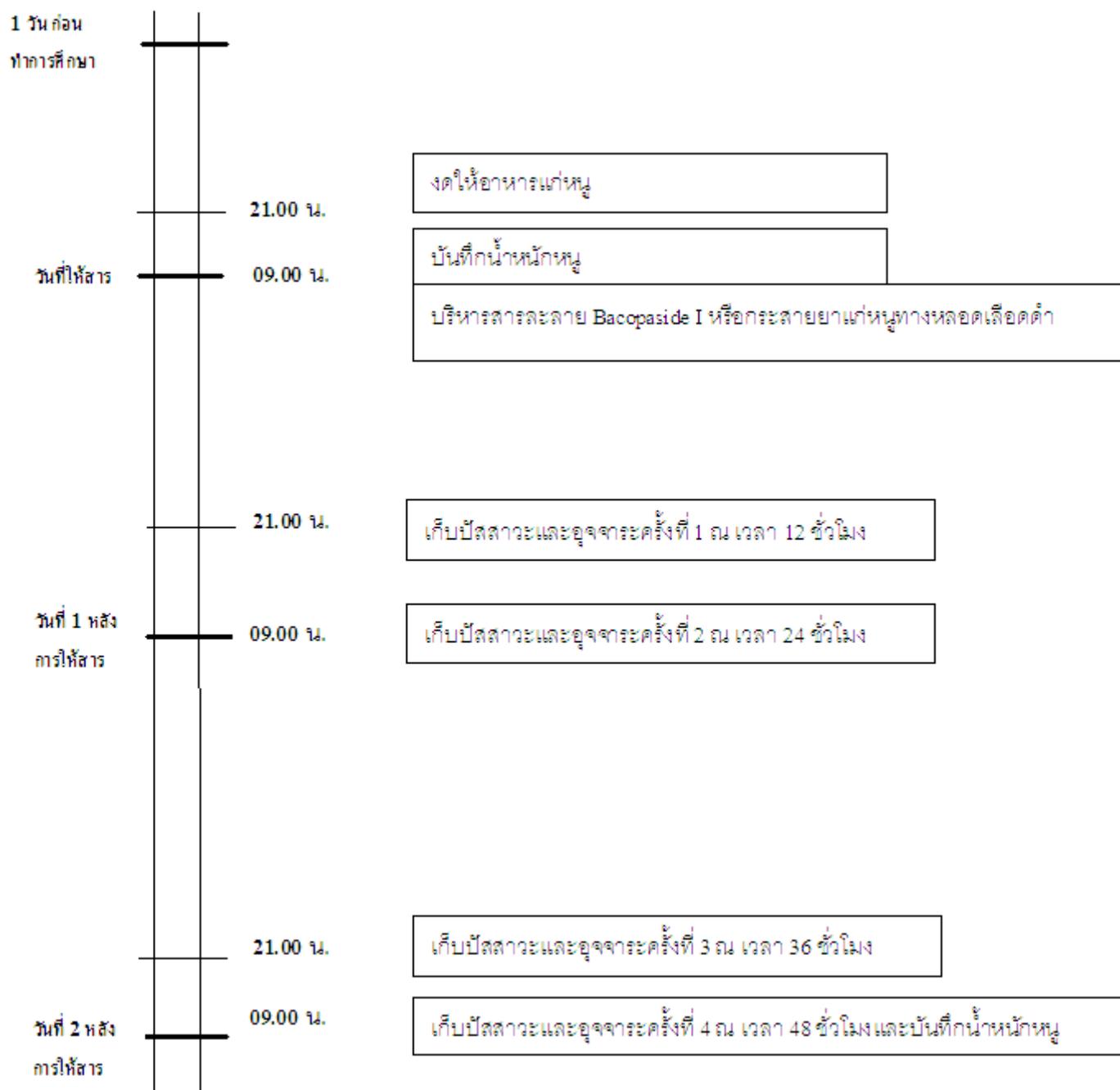
คำนวณจากการศึกษาทางเมตาบอลิซึมครั้งก่อนหน้า (Preliminary study)

ในการศึกษานี้ใช้สาร Bacopaside I 10 มก. ต่อ น้ำหนักตัวหนู 1 กก. ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับการบริหารโดยการป้อน เนื่องจาก หากการบริหารสาร Bacopaside I โดยการป้อนเกิดปัญหาชีวประโยชน์ของยาต่ำ การให้สารขนาดเดียวกันนี้ทางหลอดเลือดดำอาจยังช่วยให้สามารถตรวจพบสารดังกล่าวและเมตาบอลิที่ได้ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ

กลุ่มของสัตว์ทดลอง

- กลุ่มควบคุม จำนวน 3 ตัว
 - กลุ่มทดลอง จำนวน 3 ตัว
1. แบ่งหนูสายพันธุ์วิสตาร์จำนวน 6 ตัว ออกเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองจำนวนกลุ่มละ 3 ตัว
 2. แยกหนูแต่ละตัวในกรงสำหรับศึกษาการเมตาบอลิซึมก่อนทำการศึกษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน 12-12 ชั่วโมง light-dark cycle
 3. งดให้อาหารแก่หนูเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนการบริหารสาร Bacopaside I แก่หนู
 4. บริหารสารละลายของ Bacopaside I ใน 0.9% normal saline ขนาด 10 มก./กก. ของน้ำหนักตัวผ่านทางเส้นเลือด jugular vein แก่หนูกลุ่มทดลอง และ 0.9% normal saline แก่หนูกลุ่มควบคุมในปริมาณต่อน้ำหนักตัวที่เท่ากัน
 5. เก็บปัสสาวะและอุจจาระหลังการบริหารที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พร้อมทั้งบันทึกปริมาณและน้ำหนัก
 6. เก็บปัสสาวะและอุจจาระไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการวิเคราะห์ผล

ปริมาตรของสารละลายในการบริหารผ่านทางหลอดเลือดดำ = 0.1 มล. / 100 กรัม ของน้ำหนักตัว
การเตรียมสารละลาย = ละลาย Bacopaside I 12 มก. ใน 0.9% normal saline ปริมาตร 1.2 มล.



รูปที่ 5-3 ขั้นตอนการศึกษาเมตามอลิสมของสาร Bacopaside I หลังการบริหารทางหลอดเลือดดำ

วิธีการเตรียมสารตัวอย่าง

การสกัดสาร Bacopaside จากตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

นำตัวอย่างปัสสาวะที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20°C มาละลายในภาชนะที่บรรจุแล้วเขย่า (vortex) จนเข้ากันดี จากนั้นเปิดตัวอย่างปัสสาวะ 300 μL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง เติม 50 μL ของ internal standard (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ของ prednisolone ซึ่งละลายใน 90%เมทานอล) และผสมให้เข้ากันจากนั้นเติม ethyl acetate 2 ml และนำไป vortex เพื่อให้เกิดการ partition กันเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้สักพักเพื่อให้เกิดการแยกชั้นที่ชัดเจนขึ้น แล้วเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นชั้นของสารละลาย ethyl acetate มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กอันใหม่ หลังจากนั้นทำการ partition รอบที่สองและสามด้วย ethyl acetate อีกครั้งละ 2 ml แล้วเก็บส่วนของสารละลาย ethyl acetate มารวมกับส่วนที่เก็บไว้จากการสกัดรอบแรก นำไประเหยแห้งที่ 35°C และความดัน 15 psi โดยใช้เครื่อง Speed Vacuum เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการ reconstitution สารที่เหลืออยู่ด้วย 90%เมทานอลในปริมาตร 300 μL

การสกัดสาร Bacopaside จากตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธี Solid-Liquid extraction

ชั่งตัวอย่างอุจจาระของหนูทดลอง 100 g เติม 50 μL ของ internal standard (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ของ prednisolone ซึ่งละลายใน 90%เมทานอล) และผสมให้เข้ากัน เติม 90%เมทานอลปริมาตร 500 μL นำไป vortex และ sonicate ด้วยเครื่อง sonicator นาน 15 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 5000 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ และเติม 90%เมทานอล ปริมาตร 500 μL และทำตามขั้นตอนเดิมทั้งหมดอีกสามรอบ เก็บส่วนของสารละลายเมทานอลทั้งหมดมารวมกัน นำไประเหยแห้งที่ 35°C และความดัน 15 psi โดยใช้เครื่อง Speed Vacuum จนกระทั่งเมทานอลระเหยหมด จากนั้นทำการ reconstitution สารที่เหลืออยู่ด้วย 90% เมทานอลในปริมาตร 500 μL

การวิเคราะห์ Bacopaside I ด้วยวิธี LC-MS-MS

ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดด้วยเทคนิค LC/MS/MS โดยมีสภาวะของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังนี้

คอลัมน์	Clipeus C18(2) 150 x 4.6 mm i.d.,5 μm (Higgins Analytical,Inc,USA)
สารละลายเฟสเคลื่อนที่	A: 0.1% กรดฟอร์มิก B: acetonitrile
ปริมาตรที่ฉีด	5 ไมโครลิตร
อุณหภูมิคอลัมน์	40°C

สัดส่วนของสารละลายเฟสเคลื่อนที่ตามตารางที่ 5-1

ตารางที่ 5-1 อัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ ที่ใช้ในการแยกสารชนิดต่างๆ

เวลา(นาที)	อัตราการไหล(มล/นาที)	%A (0.1% formic acid)	%B (acetonitrile)
0.1	0.6	80	20
2	0.6	60	40
4	0.6	60	40
13	0.6	50	50
14	0.6	20	80
15	0.6	20	80
16	0.6	80	20
20	0.6	80	20

ตารางที่ 5-2 สภาวะที่ใช้ของเครื่องวิเคราะห์ชนิดมวลโมเลกุลของสาร รุ่น API 4000

Tune Parameter	Positive mode
Ionization Type	Electrospray (ESI)
Collision gas (CAD) psi	7
Curtain gas (CUR) psi	20
Temperature (°C)	450
Ion source gas 1(Air) psi	55
Ion source gas 2 (Air) psi	45
Ion spray(V)	5500
Dwell time (msec)	200

ตารางที่ 5-3 สารที่ทดสอบ มวลโมเลกุล และการแตกตัวเป็นไอออน ค่าพลังงานที่ใช้

Compound	Parent ion(<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Bacopaside I	979.5	900.0	75	30	13
	979.5	768.1	60	40	14
	979.5	587.3	95	18	13
	979.5	473.6	60	25	17
	979.5	455.5	75	40	14
Prednisolone	361.3	343.0	90	10	8
	361.3	147.1	90	30	8

ตารางที่ 5-4 Mass spectrometry conditions

Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	Time (sec)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
979.5	900.0	200	75	30	13
	768.1	200	60	40	14
	578.3	200	95	18	13
	473.6	200	60	25	17
	455.5	200	75	40	14
899.0	767.0	200	50	20	13
	605.0	200	75	18	13
	473.0	200	100	20	25
	587.0	200	50	20	13
	455.0	200	50	20	13
929.5	797.0	200	50	20	13
	635.0	200	50	20	13
	617.0	200	50	20	13
	473.0	200	160	50	10
	455.0	200	50	20	13
929.0	963.0	200	50	20	13
	779.0	200	50	20	13
	617.0	200	50	20	13
	455.0	200	60	24	10

ตารางที่ 5-4 Mass spectrometry conditions (ต่อ)

Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	Time (sec)	DP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
473.0	475.0	200	50	20	13
	455.0	200	50	20	13
	437.0	200	50	20	13
	396.0	200	50	20	13
455.0	441.0	200	50	20	13
	437.0	200	50	20	13
	369.0	200	50	20	13
	247.0	200	50	20	13
361.3	343.1	200	90	10	8
	147.1	200	90	30	8

แต่ทั้งนี้เครื่องมือ LC/MS/MS ดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เขต 9 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดพิษณุโลก และไม่สะดวกในการทำงานในระยะยาว ผู้ทำการวิจัยจึงพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (on membrane analysis) โดยใช้ polyclonal antibody ต่อสาร Bacopaside I จากผลงานวิจัยที่ผ่านมาโดย ดร. วฐุ พรหมพิทยารัตน์ พร้อมทั้งทำการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว ดังนี้

**การพัฒนาและการตรวจสอบวิธีการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและ
อุจจาระของหนูทดลองโดยวิธี on membrane analysis**

1. สิ่งที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (Characteristics to be analyzed)

สิ่งที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ คือ สาร Bacopaside I และตรวจหาเมตาบอไลต์ ของสารดังกล่าวในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง

2. วิธีการเตรียมสารตัวอย่าง

2.1 การสกัดสาร Bacopaside I จากตัวอย่างปัสสาวะด้วยวิธี Liquid-Liquid extraction

นำตัวอย่างปัสสาวะ (blank) ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20°C มาละลายในภาชนะที่บรรจุน้ำแล้วเขย่า (vortex) จนเข้ากันดี แล้วเติมสารมาตรฐาน Bacopaside I ที่ความเข้มข้น 40 และ 400 ng/ μL จากนั้นเปิดตัวอย่างปัสสาวะ 300 μL ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง จากนั้นเติม ethyl acetate 2 ml และนำไป vortex เพื่อให้เกิดการ partition กันเป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้สักพักเพื่อให้เกิดการแยกชั้นที่ชัดเจนขึ้น แล้วเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นชั้นของสารละลาย ethyl acetate มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กอันใหม่ หลังจากนั้น

ทำการ partition รอบที่สองและสามด้วย ethyl acetate อีกครั้งละ 2 ml แล้วเก็บส่วนของสารละลาย ethyl acetate มารวมกับส่วนที่เก็บไว้จากการสกัดรอบแรก นำไประเหยแห้งที่ 35°C และความดัน 15 psi โดยใช้เครื่อง Speed Vacuum เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการ reconstitution สารที่เหลืออยู่ด้วย 90% methanol ในปริมาตร 300 μ L

2.2 การสกัดสาร Bacopaside I จากตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธี Solid-Liquid extraction

ส่วนของอุจจาระทำการสกัดด้วยวิธี Solid-Liquid extraction โดยชั่งตัวอย่างอุจจาระของหนูทดลอง 100 g แล้วเติมสารมาตรฐาน Bacopaside I ที่ความเข้มข้น 40 และ 400 ng/ μ l จากนั้นเติม 90%methanol หรือ ethyl acetate ปริมาตร 500 μ l นำไป vortex และ sonicate ด้วยเครื่อง sonicator นาน 15 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 5000 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ และเติม 90%methanol หรือ ethyl acetate ปริมาตร 500 μ l และทำตามขั้นตอนเดิมทั้งหมดอีกสามรอบ เก็บส่วนของสารละลาย methanol หรือ ethyl acetate ทั้งหมดมารวมกัน นำไประเหยแห้งที่ 35°C และความดัน 15 psi โดยใช้เครื่อง Speed Vacuum จนกระทั่ง methanol ระเหยหมด จากนั้นทำการ reconstitution สารที่เหลืออยู่ด้วย 90%methanol ในปริมาตร 500 μ L

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (Analytical Method Validation)

3.1 Specificity and selectivity

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ ในโครมาโตแกรมที่ได้ ต้องไม่ตรวจพบสารรบกวนใดๆในปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง ต่อสาร Bacopaside I ที่ต้องการวิเคราะห์

3.2 Limit of detection (LOD) ของการวิเคราะห์

ทำการศึกษาโดยเตรียมสารที่ความเข้มข้นต่ำ (ng/ μ l) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณต่ำสุดของสาร Bacopaside I ที่วิธีวิเคราะห์จะสามารถตรวจพบได้ เตรียมความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่างตั้งแต่ 0.0001-1000ng/ μ l response ของตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้คือ ปริมาณ Bacopaside I ณ ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถมองเห็นได้

3.3 Limit of quantification (LOQ)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างสาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 ng/ μ l ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ปริมาณของสาร Bacopaside I ที่เลือกเป็น LOQ คือ ปริมาณสาร Bacopaside I ที่จุดต่ำสุดที่ให้กราฟมาตรฐานมีค่าความเป็นเส้นตรง (linearity) ที่ยอมรับได้

3.4 Linearity/ Standard calibration curve

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างสาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระดับความเข้มข้น 31.25-1000 ng/ μ l โดยความเข้มข้นต่ำสุดของ calibration curve เป็นความเข้มข้นที่ระดับ LOQ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง หาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linearity) ระหว่าง response ของสาร Bacopaside I ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ regression equation และคำนวณค่า coefficient of determination (r^2) ค่าที่คำนวณได้ควรมีค่าน้อยเท่ากับ 0.99 หรือดีกว่า

3.5 Precision (interday and intraday)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างสาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ 2 ความเข้มข้น (40 และ 400 ng) ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ภายในวันเดียวกัน (intraday) และระหว่างวัน (interday) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ไม่ควรเกิน 15% ยกเว้นที่ LOQ ไม่ควรเกิน 20%

3.6 Accuracy(%Recovery)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างสาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง โดยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ 2 ความเข้มข้น (40 และ 400 ng) ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง คำนวณ %recovery ค่าที่ได้ควรมีค่าใกล้เคียง 100% หรือไม่น้อยกว่า 85% และมีความคงที่ แม่นยำ

4.วิธีการวิเคราะห์ (Analysis method)

ตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระที่เก็บแต่ละช่วงเวลาจะถูกนำมาวิเคราะห์หาสาร Bacopaside I ด้วยเทคนิค on membrane analysis โดยใช้เฟสเคลื่อนที่คือ 0.2% *o*-phosphoric acid :acetonitrile ในอัตราส่วน 65:35, pH 3.0 membrane ที่ใช้คือ Polyethersulfone (PES) membrane

วิธีการวิเคราะห์ดังแสดงเป็นลำดับต่อไปนี้

4.1 ทำการ spot สารตัวอย่างลงบนแผ่น PES ในปริมาตร 1 μ l จากนั้นนำไปใส่ลงในแท่งซึ่งมีตัวทำละลาย 0.2% *o*-phosphoric acid:acetonitrile (65 : 35, v/v ; pH 3.0) เป็น mobile phase นำแผ่น PES ออกมาทิ้งไว้จนแห้งจึงนำไปวิเคราะห์ต่อไป

4.2 เติมสารละลาย NaIO₄ ความเข้มข้น 10 mg/ml ที่ละลายด้วยน้ำลงในกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด 4 x 6 นิ้ว ปริมาตร 40 ml จากนั้นจุ่มแผ่น PES ลงไปแล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง

4.3 เติม 1% gelatin ใน 50 mM Carbonate buffer pH 9.6 ปริมาตร 40 ml แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่านาน 3 ชั่วโมง และล้างด้วย PBS 3 ครั้ง น้ำ 1 ครั้ง

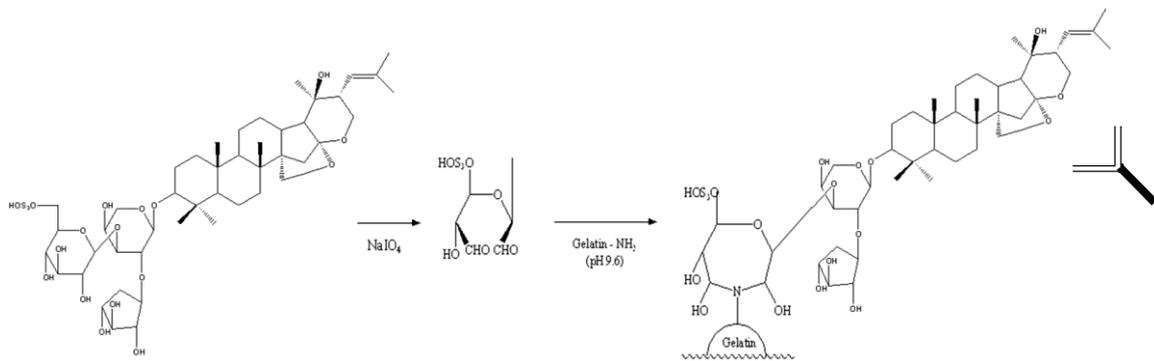
4.4 เติมสารละลายภูมิต้านทานโพลีโคลนของ Bacopaside I ที่ทำการเจือจางใน 1X PBS ความเข้มข้น 50 µg/ml ปริมาตร 40 ml แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่านาน 3 ชั่วโมง จากนั้น ล้าง 0.05% tween ใน phosphate buffer solution (T-PBS) 3 ครั้ง และน้ำ 1 ครั้ง

4.5 เติมแอนติบอดีตัวที่ 2, POD anti-rabbit IgG ละลายใน T-PBS ปริมาตร 40 ml แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่านาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย T-PBS 3 ครั้ง และน้ำ 1 ครั้ง

4.6 เติมสารตั้งต้น 4-chloro-1-naphthol (CN) ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน PBS ปริมาตร 40 ml แล้วเติม 0.03%v/v ของ H₂O₂ แล้วนำไปวางบนเครื่องเขย่านาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำเพื่อหยุดปฏิกิริยาทั้งหมด

4.7 นำแผ่น PES ที่แห้งแล้วไปสแกนด้วยเครื่องสแกนจากนั้นนำไฟล์ที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยโปรแกรม Photoshop CS3

4.8 นำค่าการดูดกลืนแสงของสาร Bacopaside I ในตัวอย่างมาหาปริมาณสาร โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน โดยคำนวณจากการทำกราฟของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 5-4 การเกิดปฏิกิริยาจับกับ โปรตีนและสารกลุ่ม pseudojубogenin glycosides บนแผ่น PES membrane

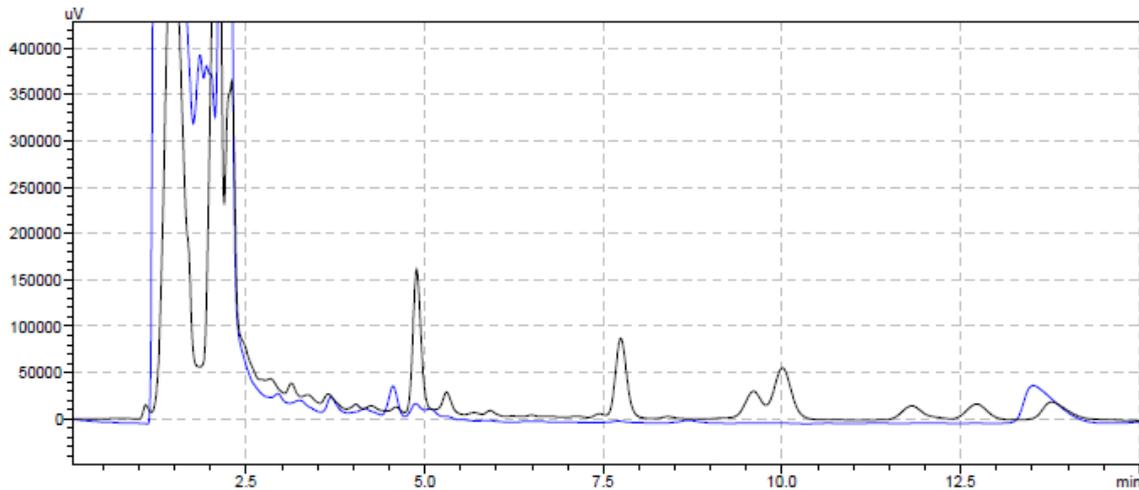
บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

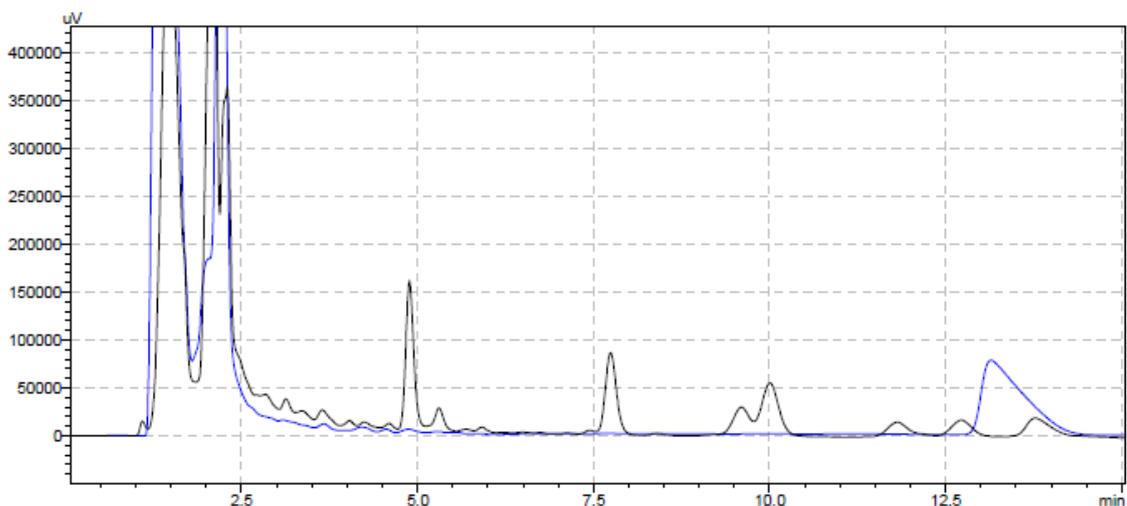
จากการดำเนินการวิจัยตามที่ได้กล่าวไว้ในระเบียบวิธีวิจัย พบว่าได้ผลการวิจัยในแต่ละส่วนดังต่อไปนี้

ผลการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ที่แยกด้วยวิธี centrifugal partition chromatography

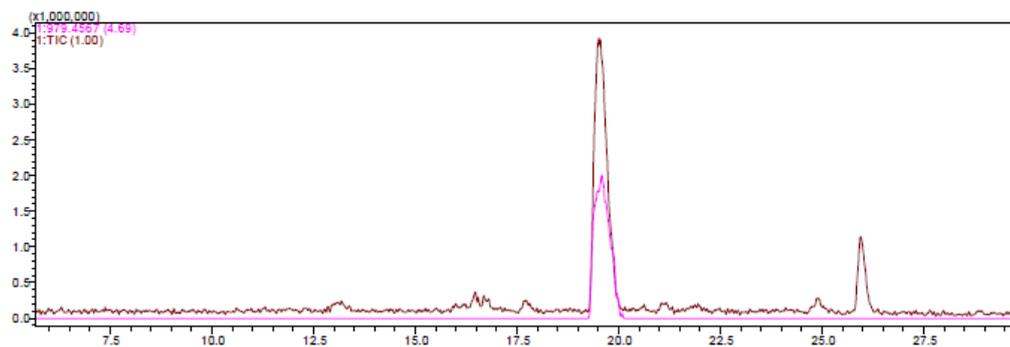
เมื่อวิเคราะห์ fraction ต่างๆ ตั้งแต่ 1-50 ด้วย HPLC พบว่า Bacopaside I ออกมาในช่วง fraction 14-17 ดังรูปที่ 5-5 และ 5-6 ส่วน saponin อื่นๆ พบใน fraction 23-40 สารที่แยกได้ใน fraction 14-17 ถูกพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าตรงกับ Bacopaside I โดยวิธี LC/MS/MS (รูปที่ 5-7)



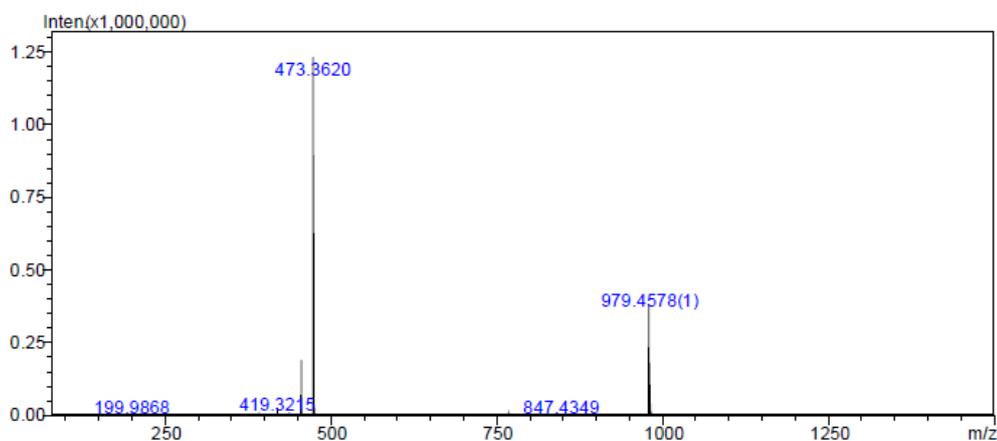
รูปที่ 5-5 HPLC Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ enriched saponin extract ที่ความเข้มข้น 3 mg/ml (เส้นสีเขียว) และ chromatogram ของ fraction 14



รูปที่ 5-6 HPLC Chromatogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ enriched saponin extract ที่ความเข้มข้น 3 mg/ml (เส้นสีเขียว) และ chromatogram ของ fraction 15-17



(a) LC/MS Chromatogram of fractions [15-17]



(b) MS/MS of fractions [15-17].

รูปที่ 5-7 LC/MS/MS ของ fraction 15-17 สาร Bacopaside I แสดง peak ที่ 19.3 นาที

ผลการศึกษามетаบอลิซึมของสาร Bacopaside I ในหนูสายพันธุ์วิสตา

ภายหลังการป้อนและฉีดสาร Bacopaside I แก่หนูสายพันธุ์วิสตา รหัสนี้และปริมาณตัวอย่าง อุจจาระและปัสสาวะที่เก็บ ณ เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ในหนูกลุ่มที่ได้รับสารโดยการป้อนและการ ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ แสดงดังในตารางที่ 5-5 ถึงตารางที่ 5-8 ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร Bacopaside I ในตัวอย่างทั้งหมดภายหลังการสกัดตามวิธีที่กล่าวไว้ใน ระเบียบวิธีวิจัยด้วยวิธี LC/MS/MS แสดงในตารางที่ 5-9 และ 5-10 ตามลำดับ

ตารางที่ 5-5 ชื่อตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองที่เก็บ ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการ
ป้อนสาร Bacopaside I

กลุ่มควบคุม	n = 3			
ตัวอย่างปัสสาวะ				
รหัสหนูทดลอง	0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
CT1	CT1-U12	CT1-U24	CT1-U36	CT1-U48
CT2	CT2-U12	CT2-U24	CT2-U36	CT2-U48
CT3	CT3-U12	CT3-U24	CT3-U36	CT3-U48
ตัวอย่างอุจจาระ				
รหัสหนูทดลอง	0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
CT1	N/S*	N/S	N/S	CT1-F48
CT2	CT2-F12	CT2-F24	N/S	N/S
CT3	N/S	CT3-F24	N/S	N/S
กลุ่มทดลอง	n = 3			
ตัวอย่างปัสสาวะ				
รหัสหนูทดลอง	0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
BC1	BC1-U12	BC1-U24	BC1-U36	BC1-U48
BC2	BC2-U12	BC2-U24	BC2-U36	BC2-U48
BC3	BC3-U12	BC3-U24	BC3-U36	BC3-U48
ตัวอย่างอุจจาระ				
รหัสหนูทดลอง	0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
BC1	N/S	BC1-F24	N/S	N/S
BC2	N/S	BC2-F24	N/S	BC2-F48
BC3	N/S	BC3-F24	BC3-F36	BC3-F48

*หมายเหตุ N/S = No sample

ตารางที่ 5-6 ชื่อตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองที่เก็บ ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการ
บริหารสาร Bacopaside I ทางหลอดเลือดดำ

กลุ่มควบคุม

n = 3

ตัวอย่างปัสสาวะ

รหัสหนูทดลอง

0-12 ชม.

12-24 ชม.

24-36 ชม.

36-48 ชม.

CT1_M2

CT1_M2_U12

CT1_M2_U24

CT1_M2_U36

CT1_M2_U48

CT2_M2

CT2_M2_U12

CT2_M2_U24

CT2_M2_U36

CT2_M2_U48

CT3_M2

CT3_M2_U12

CT3_M2_U24

CT3_M2_U36

CT3_M2_U48

ตัวอย่างอุจจาระ

รหัสหนูทดลอง

0-12 ชม.

12-24 ชม.

24-36 ชม.

36-48 ชม.

CT1_M2

CT1_M2_F12

N/S*

N/S

CT1_M2_F48

CT2_M2

CT2_M2_F12

CT2_M2_F24

N/S

CT2_M2_F48

CT3_M2

N/S

CT3_M2_F24

CT3_M2_F36

CT3_M2_F48

กลุ่มทดลอง

n = 3

ตัวอย่างปัสสาวะ

รหัสหนูทดลอง

0-12 ชม.

12-24 ชม.

24-36 ชม.

36-48 ชม.

BC1_M2

BC1_M2_U12

BC1_M2_U24

BC1_M2_U36

BC1_M2_U48

BC2_M2

BC2_M2_U12

BC2_M2_U24

BC2_M2_U36

BC2_M2_U48

BC3_M2

BC3_M2_U12

BC3_M2_U24

BC3_M2_U36

BC3_M2_U48

ตัวอย่างอุจจาระ

รหัสหนูทดลอง

0-12 ชม.

12-24 ชม.

24-36 ชม.

36-48 ชม.

BC1_M2

N/S

N/S

BC1_M2_F36

N/S

BC2_M2

N/S

N/S

N/S

BC2_M2_F48

BC3_M2

N/S

BC3_M2_F24

N/S

N/S

หมายเหตุ * N/S = No sample

ตารางที่ 5-7 ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการ
 ป้อนสาร Bacopaside I

	กลุ่มควบคุม(n = 3)	กลุ่มทดลอง(n = 3)
น้ำหนักตัว(กรัม)		
ก่อนการบริหาร	257.3 ± 9.5	263.8 ± 2.9
48 ช.ม.	234.0 ± 8.7	234 ± 1
ปริมาณน้ำที่หนูดื่มน้ำ (มล.)		
0-12 ช.ม.	4.2 ± 3.0	6.7 ± 3.5
12-24 ช.ม.	10.0 ± 10.1	7.0 ± 4.6
24-36 ช.ม.	4.0 ± 2.6	5.0 ± 2.0
36-48 ช.ม.	0.7 ± 0.6	4.7 ± 1.2
ปริมาณปัสสาวะ(มล.)		
0-12 ช.ม.	5.0 ± 3.0	5.7 ± 3.2
12-24 ช.ม.	10.7 ± 8.6	7.7 ± 5.5
24-36 ช.ม.	3.3 ± 1.2	6.7 ± 5.1
36-48 ช.ม.	1.7 ± 0.6	3.3 ± 1.5
น้ำหนักอุจจาระ (มล.)		
0-12 ช.ม.	111.3 ± 192.8	0.0 ± 0.0
12-24 ช.ม.	169.4 ± 176.9	676.5 ± 418.0
24-36 ช.ม.	0.0 ± 0.0	65.0 ± 112.5
36-48 ช.ม.	58.8 ± 101.8	177.3 ± 158.4

ตารางที่ 5-8 ปริมาณตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง ณ เวลา 12, 24, 36, 48 ชั่วโมง หลังการ
บริหารสาร Bacopaside I ทางหลอดเลือดดำ

	กลุ่มควบคุม(n = 3)	กลุ่มทดลอง(n = 3)
น้ำหนักตัว(กรัม)		
ก่อนการบริหาร	376.0 ± 3.6	369.0 ± 12.3
48 ชม.	345.0 ± 4.4	340.67 ± 12.097
ปริมาณน้ำที่หนูดื่มน้ำ (มล.)		
0-12 ชม.	9.0 ± 5.0	6.3 ± 1.2
12-24 ชม.	10.3 ± 8.5	10.0 ± 2.6
24-36 ชม.	6.0 ± 1.7	6.3 ± 2.5
36-48 ชม.	7.3 ± 1.2	10.0 ± 4.0
ปริมาณปัสสาวะ(มล.)		
0-12 ชม.	6.7 ± 1.5	2.0 ± 1.7
12-24 ชม.	6.0 ± 5.0	7.0 ± 2.6
24-36 ชม.	3.3 ± 0.6	3.3 ± 2.1
36-48 ชม.	4.0 ± 2.0	5.7 ± 3.2
น้ำหนักอุจจาระ (มล.)		
0-12 ชม.	661.0 ± 1124.0	0.0 ± 0.0
12-24 ชม.	341.5 ± 404.0	21.8 ± 37.8
24-36 ชม.	74.4 ± 128.8	601.0 ± 1041.0
36-48 ชม.	130.3 ± 225.7	392.2 ± 679.3

ตารางที่ 5-9 ปริมาณสาร Bacopaside I ที่ตรวจพบในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระหลังการป้อนสาร Bacopaside I จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี LC/MS/MS (ร้อยละของปริมาณ Bacopaside I ที่ได้รับ)

กลุ่มควบคุม		n = 3			
ตัวอย่างปัสสาวะ					
รหัสหนุทดลอง		0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
CT1		U/D*	U/D	U/D	U/D
CT2		U/D	U/D	U/D	U/D
CT3		U/D	U/D	U/D	U/D
ตัวอย่างอุจจาระ					
รหัสหนุทดลอง		0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
CT1		N/S**	N/S	N/S	U/D
CT2		U/D	U/D	N/S	N/S
CT3		N/S	U/D	N/S	N/S
กลุ่มทดลอง		n = 3			
ตัวอย่างปัสสาวะ					
รหัสหนุทดลอง		0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
BC1		U/D	U/D	U/D	U/D
BC2		U/D	U/D	U/D	U/D
BC3		U/D	U/D	U/D	U/D
ตัวอย่างอุจจาระ					
รหัสหนุทดลอง		0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
BC1		N/S	U/D	N/S	N/S
BC2		N/S	U/D	N/S	0.56
BC3		N/S	U/D	0.18	0.21

หมายเหตุ * U/D = Undetectable

** N/S = No sample

ตารางที่ 5-10 ปริมาณสาร Bacopaside I ที่ตรวจพบในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระหลังการบริหารสาร Bacopaside I ทางหลอดเลือดดำจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี LC/MS/MS (ร้อยละของปริมาณ Bacopaside I ที่ได้รับ)

กลุ่มควบคุม	n = 3			
ตัวอย่างปัสสาวะ				
รหัสหนุทดลอง	0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
CT1_M2	U/D*	U/D	U/D	U/D
CT2_M2	U/D	U/D	U/D	U/D
CT3_M2	U/D	U/D	U/D	U/D
ตัวอย่างอุจจาระ				
รหัสหนุทดลอง	0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
CT1_M2	U/D	N/S	N/S	U/D
CT2_M2	U/D	U/D	N/S	N/S
CT3_M2	N/S	U/D	U/D	U/D
กลุ่มทดลอง	n = 3			
ตัวอย่างปัสสาวะ				
รหัสหนุทดลอง	0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
BC1_M2	0.0146	0.0206	0.0008	0.0016
BC2_M2	0.0008	0.0094	0.0094	U/D
BC3_M2	U/D	U/D	U/D	U/D
ตัวอย่างอุจจาระ				
รหัสหนุทดลอง	0-12 ช.ม.	12-24 ช.ม.	24-36 ช.ม.	36-48 ช.ม.
BC1_M2	N/S	N/S	U/D	N/S
BC2_M2	N/S	N/S	N/S	1.9568
BC3_M2	N/S	0.0432	N/S	N/S

หมายเหตุ * U/D = Undetectable

** N/S = No sample

จากการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองภายหลังการป้อนสารดังกล่าวแก่หนู พบว่า มีเพียงตัวอย่างอุจจาระบางตัวอย่าง ณ เวลา 36 และ 48 ชั่วโมง (BC2-F48, BC3-F36, BC3-F48) ที่ตรวจพบ Bacopaside I โดยปริมาณของสาร Bacopaside I ที่พบคิดเป็นร้อยละ 0.18-0.56 และ 0.0008 -1.95 ของปริมาณ Bacopaside I ที่หนูได้รับโดยการป้อนและการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำตามลำดับ ทั้งนี้การตรวจพบสารดังกล่าวในตัวอย่างเหล่านี้ อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากการที่สาร Bacopaside I ถูกเปลี่ยนแปลง (metabolize) ในระบบทางเดินอาหาร และความไม่คงตัวของสารดังกล่าวในสภาวะของระบบทางเดินอาหาร กล่าวคือ สาร Bacopaside I อาจไม่คงตัวในสภาวะกรดในกระเพาะอาหารซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ต่ำมาก หรือการถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์จากตับ เป็นต้น รวมไปถึงต้องผ่านกระบวนการ first pass metabolism ก่อนจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตของร่างกายซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่สามารถตรวจพบ Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะ

นอกจากนี้แล้วด้วยโครงสร้างของสาร Bacopaside I ซึ่งเป็นสารกลุ่ม saponin glycoside ที่มีหมู่น้ำตาลเป็นส่วนประกอบมากกว่าหนึ่งชนิด ทำให้การดูดซึมผ่านทางเดินอาหารเป็นไปได้ไม่ดีนัก ปริมาณ Bacopaside I จึงเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตได้น้อย เป็นเหตุผลที่ทำให้ไม่สามารถตรวจพบสาร Bacopaside I ในปัสสาวะ และทำให้ Bacopaside I ในอุจจาระของหนูทดลองที่ได้รับสารโดยการป้อนมีปริมาณมากกว่าในกลุ่มที่ได้รับสารทางหลอดเลือดดำด้วย

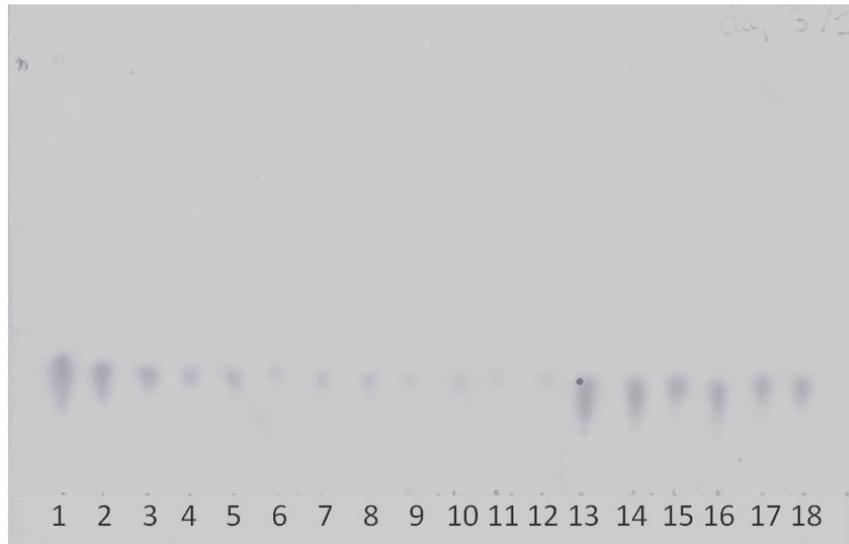
ด้านระยะเวลาที่สาร Bacopaside I ถูกขับออกจากร่างกายทางอุจจาระของหนูทดลอง พบว่า มีเพียงตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้ ณ เวลา 36 และ 48 ชั่วโมงที่ตรวจพบสาร Bacopaside I แต่ไม่พบในตัวอย่างที่เก็บ ณ เวลา 24 ชั่วโมง นั่นอาจพอสรุปได้ว่า ภายหลังจากได้รับสาร Bacopaside I โดยการป้อน สารดังกล่าวจะถูกขับออกจากร่างกายทางอุจจาระโดยใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 24 ชั่วโมง

ส่วนผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากการบริหารสาร Bacopaside I ทางหลอดเลือดดำที่คอของหนู (jugular vein) กลับพบว่า มีทั้งตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลอง (ที่เวลา 12-48 ชั่วโมง และ 24, 48 ชั่วโมง ตามลำดับ) ที่ตรวจพบสาร Bacopaside I ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก เมื่อหนูได้รับสารดังกล่าวทางกระแสเลือดโดยตรงนอกจากจะไม่ผ่านกระบวนการ first pass metabolism แล้ว ยังไม่ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์บางชนิด รวมไปถึงไม่มีผลของความคงตัวในสภาวะกรดต่างในระบบทางเดินอาหารเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย สารดังกล่าวในระบบหมุนเวียนโลหิตจึงมากพอที่จะถูกขับออกมาและตรวจพบได้ทั้งในปัสสาวะและอุจจาระ ทั้งนี้ Bacopaside I ยังคงอยู่ในร่างกายไม่ต่ำกว่า 48 ชั่วโมงและระหว่างนั้นจะถูกขับออกมาทั้งทางปัสสาวะและอุจจาระได้ แม้จะทราบว่า Bacopaside I ถูกขับออกมาทางปัสสาวะตั้งแต่ได้รับสารทางหลอดเลือดดำ แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างอุจจาระที่เก็บได้มีเพียงบางช่วงเวลานั้น จึงไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าสาร Bacopaside I ถูกขับออกมาทางอุจจาระโดยใช้เวลาน้อยที่สุดเท่าไรภายหลังจากได้รับสารดังกล่าว

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค on membrane analysis

ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการสกัดสาร Bacopaside I จากตัวอย่างอุจจาระและปัสสาวะของหนูทดลอง รวมไปถึงการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สารดังกล่าวและสาร metabolites ในตัวอย่างที่ผ่านการสกัดแล้วด้วยวิธี on membrane analysis ทั้งนี้การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นให้ผลการตรวจสอบดังต่อไปนี้

1. Specificity/ Selectivity



รูปที่ 5-8 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของผลการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ

Lane 1 Standard Bacopaside I 1000 ng, lane 2 Standard Bacopaside I 500 ng, lane 3 Standard Bacopaside I 250 ng, lane 4 Standard Bacopaside I 125 ng, lane 5 Standard Bacopaside I 62.5 ng, lane 6 Standard Bacopaside I 31.25 ng, lane 7-18 Feces and Urine samples spike with Bacopaside I

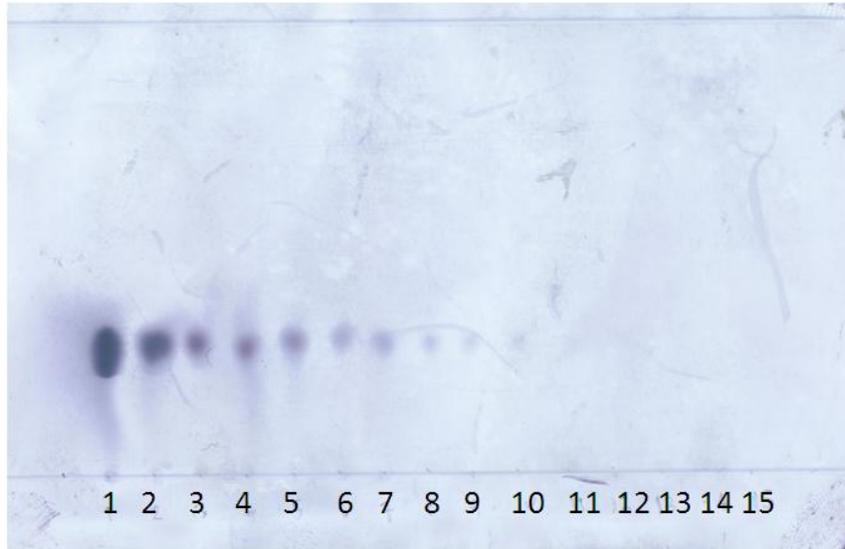
จากตัวอย่างโครมาโตแกรม (รูปที่ 5-8) ไม่ตรวจพบสารรบกวน(interference) ต่อสาร Bacopaside I ที่ใช้ในการศึกษานี้ กล่าวคือ โครมาโตแกรมที่ได้มีเพียงโครมาโตแกรมของสาร Bacopaside I เท่านั้น

2. Limit of detection (LOD) ของวิธีการวิเคราะห์

จากรูปที่ 5-9 ค่า LOD ของการหาปริมาณสาร Bacopaside I ที่ได้ คือ 1 ng

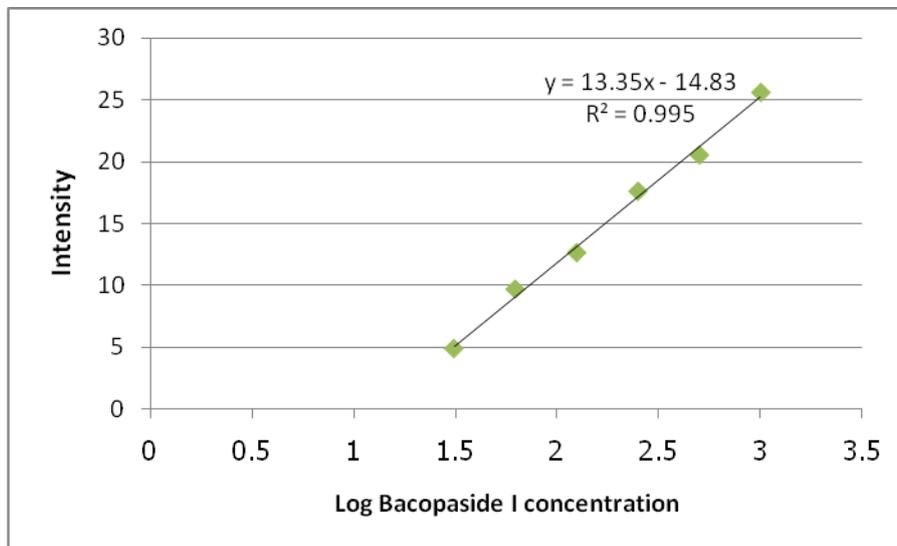
3. Limit of quantification (LOQ)

ผลการทดลองโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นพบว่า ค่า LOQ ของวิธีวิเคราะห์นี้มีค่าเท่ากับ 31.25 ng ดังแสดงในรูปที่ 5-10



รูปที่ 5-9 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน Bacopaside I ที่แต่ละความเข้มข้น

Lane 1 Standard Bacopaside I 1000 ng, lane 2 500 ng, lane 3 250 ng, lane 4 125 ng, lane 5 62.5 ng, lane 6 31.13 ng, lane 7 15.63 ng, lane 8 7.81 ng, lane 9 3.91 ng, lane 10 1.95 ng, lane 11 1 ng, lane 12 0.1 ng, lane 13 0.01 mg, lane 13 0.001 ng, lane 14 0.0001 ng, lane 15 0.0001 ng



รูปที่ 5-10 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Bacopaside I ที่ความเข้มข้น 31.25, 62.5 125, 250, 500 และ 1000 ng/μl

4. Linearity/ Standard calibration curve

จากรูปที่ 5-10 ค่าความเป็นเส้นตรง(linearity) ของวิธีวิเคราะห์แสดงได้ด้วยค่า correlation coefficient ซึ่ง มีค่าเท่ากับ 0.995 ซึ่งผ่านเกณฑ์ที่การตรวจสอบที่ได้กำหนดไว้

5. Precision (interday and intraday)

ทำการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่างสาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นภายในวันเดียวกัน (intraday) และระหว่างวัน (interday) แล้วคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) ได้ดังแสดงในตารางที่ 5-11 และ 5-12 ตามลำดับ

ตารางที่ 5-11 Intraday coefficient of variation ของการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ

ปริมาณ Bacopaside I	% coefficient of variation(n=3)		
	Urine sample	Feces sample สกัดด้วย methanol	Feces sample สกัดด้วย ethyl acetate
40 ng	14.77	11.35	7.05
400 ng	4.99	13.36	7.87

ตารางที่ 5-12 Interday coefficient of variation ของการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ

ปริมาณ Bacopaside I	% coefficient of variation(n=3)		
	Urine sample	Feces sample สกัดด้วย methanol	Feces sample สกัดด้วย ethyl acetate
40 ng	14.16	5.89	9.61
400 ng	4.80	9.01	14.93

จากการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ในส่วนของความแม่นยำ พบว่า ค่าความแม่นยำที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 4.80 - 14.93 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

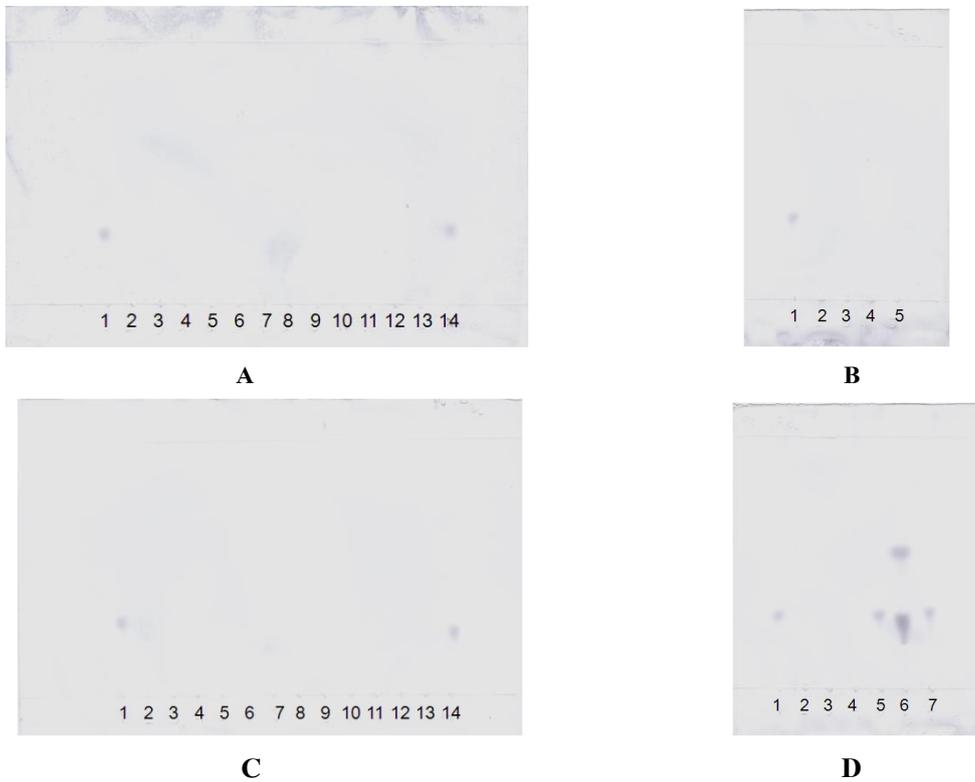
6. Accuracy(%Recovery)

ผลการทดลองพบว่า %recovery หรือร้อยละของการคืนกลับของสาร Bacopaside I ในตัวอย่าง ปัสสาวะและอุจจาระของหนูที่ผ่านการสกัด ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงในตารางที่ 5-13 ดังนั้น ในการ สกัดสาร Bacopaside I จากตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ จึงเลือกใช้การสกัดด้วย ethyl acetate และ methanol ตามลำดับ

ตารางที่ 5-13 Recovery ของการวิเคราะห์สาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ

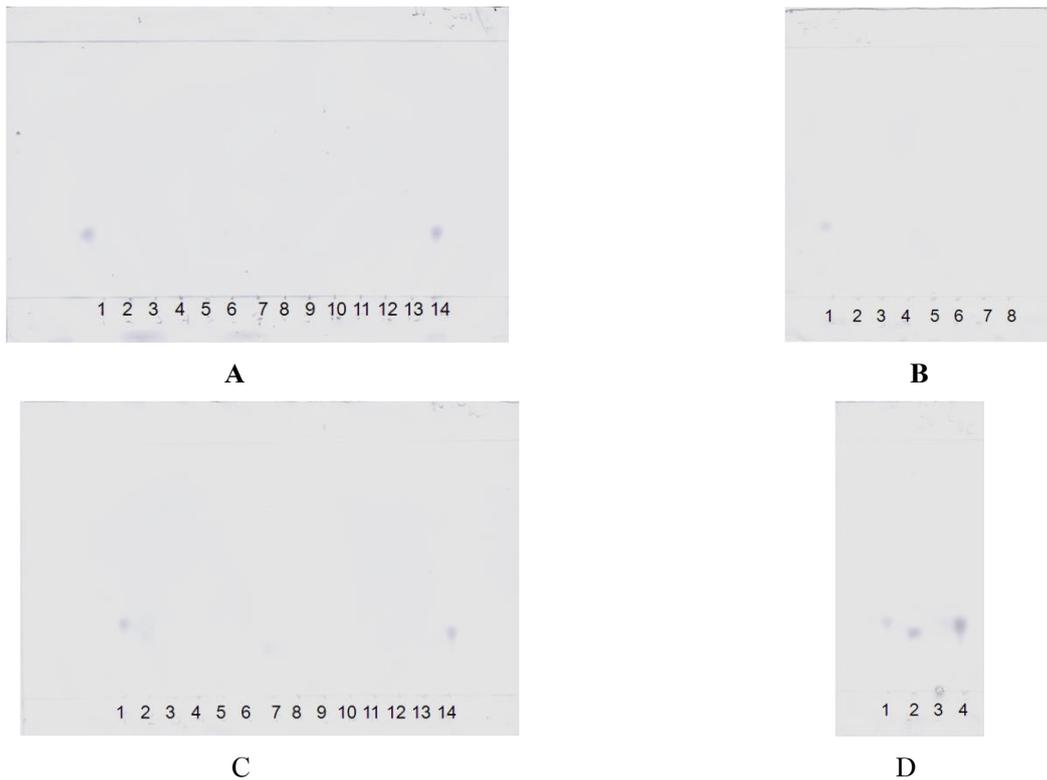
ปริมาณ Bacopaside I	% recovery(n=3)		
	Urine sample	Feces sample สกัดด้วย methanol	Feces sample สกัดด้วย ethyl acetate
40 ng	98.56	98.81	97.43
400 ng	87.14	98.97	90.51

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์ on membrane analysis



รูปที่ 5-11 โครมาโตแกรมตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารโดยการป้อน จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี on membrane analysis A. ตัวอย่างปัสสาวะของหนูกลุ่มควบคุม B.อุจจาระของหนูกลุ่มควบคุม C.ปัสสาวะของหนูกลุ่มทดลอง D.อุจจาระของหนูกลุ่มทดลอง

- A. Lane1 Standard Bacopaside I, lane 2 CT1-U12, lane 3 CT2-U12, lane 4 CT3-U12, lane 5 CT1-U24, lane 6 CT2-U24, lane 7 CT3-U24, lane 8 CT1-U36, lane 9 CT2-U36, lane 10 CT3-U36, lane 11 CT1-U48, , lane 12 CT2-U48, lane 13 CT3-U48, Lane 14 Standard Bacopaside I
- B. Lane1 Standard Bacopaside I, lane 2 CT2-F12, lane 3 CT2-F24, lane 4 CT3-F24, lane 5 CT1-F48
- C. Lane1 Standard Bacopaside I, lane 2 BC1-U12, lane 3 BC2-U12, lane 4 BC3-U12, lane 5 BC1-U24, lane 6 BC2-U24, lane 7 BC3-U24, lane 8 BC1-U36, lane 9 BC2-U36, lane 10 BC3-U36, lane 11 BC1-U48, , lane 12 BC2-U48, lane 13 BC3-U48, Lane 14 Standard Bacopaside I
- D. Lane1 Standard Bacopaside I, lane 2 BC1-F24, lane 3 BC2-F24, lane 4 BC3-F24, lane 5 BC3-F36, lane 6 BC2-F48, lane 7 BC3-F48



รูปที่ 5-12 โครมาโตแกรมตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารทางหลอดเลือดดำจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี on membrane analysis A.ตัวอย่างปัสสาวะของหนูกลุ่มควบคุม B.อุจจาระของหนูกลุ่มควบคุม C.ปัสสาวะของหนูกลุ่มทดลอง D.อุจจาระของหนูกลุ่มทดลอง

- A. Lane 1 Standard Bacopaside I, lane 2 CT1_M2_U12, lane 3 CT2_M2_U12, lane 4 CT3_M2_U12, lane 5 CT1_M2_U24, lane 6 CT2_M2_U24, lane 7 CT3_M2_U24, lane 8 CT1_M2_U36, lane 9 CT2_M2_U24, lane 10 CT3_M2_U36, lane 11 CT1_M2_U48, lane 12 CT2_M2_U48, lane 13 CT3_M2_U48, Lane 14 Standard Bacopaside I
- B. Lane 1 Standard Bacopaside I, lane 2 CT1_M2_F12, lane 3 CT2_M2_F12, lane 4 CT2_M2_F24, lane 5 CT3_M2_F24, lane 6 CT3_M2_F36, lane 7 CT1_M2_F48, lane 8 CT3_M2_F48
- C. Lane 1 Standard Bacopaside I, lane 2 BC1_M2_U12, lane 3 BC2_M2_U12, lane 4 BC3_M2_U12, lane 5 BC1_M2_U24, lane 6 BC2_M2_U24, lane 7 BC3_M2_U24, lane 8 BC1_M2_U36, lane 9 BC2_M2_U24, lane 10 BC3_M2_U36, lane 11 BC1_M2_U48, lane 12 BC2_M2_U48, lane 13 BC3_M2_U48, Lane 14 Standard Bacopaside I
- D. Lane 1 Standard Bacopaside I, lane 2 BC3_M2_F24, lane 3 BC1_M2_F36, lane 4 BC2_M2_F48

จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี on membrane analysis ผลการทดลองที่ได้ มีข้อจำกัดคือ ปริมาณ ตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระที่ได้จากการทดลองในหนูทั้งสองกลุ่มมีไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ด้วยวิธี on membrane analysis ผลการวิเคราะห์ที่ได้จึงรายงานผลได้เพียงเชิงคุณภาพเท่านั้น

จากผลการวิเคราะห์ดังกล่าวพบว่า สาร Bacopaside I สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างอุจจาระเท่านั้น (BC2F48, BC3F36, BC3F48 , BC2_M2_F48 และBC3_M2_F24) ในขณะที่ตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมดไม่ปรากฏสาร Bacopaside I อย่างไรก็ตามผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์ LC/MS/MS กล่าวคือ ตัวอย่างอุจจาระที่ตรวจพบสาร Bacopaside I ด้วยวิธี LC/MS/MS ซึ่งมีปริมาณของ Bacopaside I มากกว่าตัวอย่างปัสสาวะ สามารถตรวจพบสาร Bacopaside I ได้ด้วยวิธี on membrane analysis นอกจากนี้ตัวอย่างที่ BC2-F48 ยังตรวจพบสารอื่นซึ่งมีความเป็นขี้ผึ้งมากกว่าในตัวอย่างด้วย จึงคาดว่าอาจเป็นสารสเตอรอยด์ที่เกิดขึ้น และมีโครงสร้างหลักที่คล้ายคลึงกันคือ steroidal structure ซึ่งสามารถเกิด cross reaction ได้ ทั้งนี้การตรวจไม่พบสารดังกล่าว(สารที่มีความเป็นขี้ผึ้งมากกว่า)ในตัวอย่างอื่นๆในกลุ่มเดียวกัน อาจเกิดจากการที่สารเหล่านั้นมีปริมาณน้อยเกินกว่าจะตรวจพบได้ หรือยังไม่เกิดสารดังกล่าว ในตัวอย่างที่เก็บได้ที่เวลาน้อยกว่า 48 ชั่วโมง นอกจากนี้แล้วในกลุ่มที่ได้รับสารทางหลอดเลือดดำอาจมีกระบวนการในการเปลี่ยนแปลงสารต่างกัน เช่น ผลจากเอนไซม์บางชนิดที่พบได้เฉพาะในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น เป็นผลให้ไม่พบสารชนิดเดียวกันนี้ภายหลังการบริหารสาร โดยการฉีดเข้ากระแสเลือดโดยตรง

การวิเคราะห์ตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระที่ผ่านการสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา on membrane analysis โดยใช้ polyclonal antibody ต่อสาร Bacopaside I ที่พัฒนาขึ้น สามารถนำไปทดสอบสารดังกล่าวและอาจรวมไปถึงสารที่มีโครงสร้างหลักเหมือนกันคือ steroidal structure ได้ อันอาจนำไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์สารสเตอรอยด์ที่คงไว้ซึ่งโครงสร้างหลักดังกล่าว และจะนำมาซึ่งการวางแผนในการทำการทดลองทั้งในเชิงปริมาณวิเคราะห์และคุณภาพวิเคราะห์ต่อไป

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เพื่อศึกษาหาเมตาบอไลต์และกระบวนการเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หนึ่งในสารสำคัญชาโปนินไกลโคไซด์ในพืชพรมมิ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาดังกล่าวในหนูสายพันธุ์ wistar โดยแบ่งการศึกษาออกเป็นสองส่วน ได้แก่ การศึกษาการเมตาบอลิซึมและการหาเมตาบอไลต์ในหนูกลุ่มที่ได้รับสาร Bacopaside I โดยการป้อน และการฉีดเข้าหลอดเลือดดำที่คอ (jugular vein) ภายหลังจากรอดอาหารนาน 12 ชั่วโมง โดยทั้งสองส่วน ศึกษาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับเพียงน้ำกระสายยา จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระของหนู ที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดและวิเคราะห์ด้วยวิธีวิเคราะห์ on membrane analysis

จากการทดลอง เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี LC/MS/MS พบว่า หลังจากให้สาร Bacopaside I แก่หนูทดลองโดยการป้อน พบสาร Bacopaside I เพียงในตัวอย่างอุจจาระของหนู ณ เวลา 36 และ 48 ชั่วโมง เท่านั้น ส่วนในหนูกลุ่มที่ได้รับสาร โดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำที่คอ เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างอุจจาระแล้ว พบสาร Bacopaside I ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยสาร Bacopaside I ที่ตรวจพบในตัวอย่างอุจจาระของหนูในกลุ่มที่ได้รับสารดังกล่าว โดยการป้อนมีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับสาร โดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ นอกจากนี้ยังพบสาร Bacopaside I ในตัวอย่างปัสสาวะของหนูที่ได้รับสารทางหลอดเลือดดำที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ในขณะที่ไม่พบสารดังกล่าวเลยในตัวอย่างปัสสาวะของหนูกลุ่มที่ได้รับสาร โดยการป้อน

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี on membrane analysis พบสาร Bacopaside I ในตัวอย่างอุจจาระของหนูที่เก็บได้ ณ เวลา 36, 48 ชั่วโมง และ 24, 48 ชั่วโมง ในหนูกลุ่มที่ได้รับสาร โดยการป้อนและการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ ตามลำดับ และบางตัวอย่างที่ได้จากกลุ่มที่ได้รับสาร โดยการป้อนพบสารอื่นที่คาดว่า จะเป็นสารเมตาบอไลต์ของสาร Bacopaside I ซึ่งมีโครงสร้างหลักเหมือนกันอยู่ด้วย

จากผลการศึกษาที่ได้ สามารถสรุปได้ว่าสาร Bacopaside I ถูกขับออกทางอุจจาระในหนูที่ได้รับสาร โดยการป้อนที่เวลานานกว่า 24 ชั่วโมง และถูกขับออกจากร่างกายได้ทั้งทางปัสสาวะและอุจจาระในหนูที่ได้รับสารทางหลอดเลือดดำ โดยขับออกทางปัสสาวะที่เวลาน้อยกว่า 12 ชั่วโมง และขับออกทางอุจจาระตั้งแต่ก่อนครบ 24 ชั่วโมง โดยที่สารดังกล่าวจะคงค้างอยู่ในร่างกายไม่น้อยกว่า 48 ชั่วโมงในหนูทั้งสองกลุ่ม สารอื่นที่ตรวจพบในการวิเคราะห์ด้วยวิธี on membrane analysis ได้แก่ ตัวอย่างอุจจาระของหนูที่ได้รับสาร โดยการป้อน ซึ่งมีขั้วสูงกว่าสาร Bacopaside I และอาจเป็นสารเมตาบอไลต์ที่มีโครงสร้างหลักเหมือนกันกับสาร Bacopaside I ที่ให้แก่วัตถุทดลอง

บรรณานุกรม

1. Sprag, S. G., Light, M. E., Staden J. V. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 219-243.
2. Reas, K., Ameer, K., Paulose, C.S. (2008). Decrease glutamate receptor binding and NMDA R1 gene expression in hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats: Neuroprotective role of *Bacopa monnieri* extract. *Epilepsy & Behavior*, 12(1), 54-60.
3. Jobin, M., Jes, P., Nandhu, M.S., Paulose, C.S. (2010). Increase excitability and metabolism in pilocarpine induced epileptic rats: effect of *Bacopa monnieri*. *Fitoterapia*, [In press].
4. Yun, Z., Yun-Heng, S., Chuan, Z., Juan, S., Run-Hui, L., Wei-Dong, Z. (2009). Triterpene saponins from *Bacopa monnieri* and their antidepressant effects in two mice models. *Journal of Natural Products*, 70(4), 652-655.
5. Nongnut, U., Jintanaporn, W., Supaporn, M., and Kornkanok, I.(2010). Cognitive enhancement and neuroprotective effects of *Bacopa monnieri* in Alzheimer's disease model. *Journal of Ethnopharmacology*, 127 (1), 26–31.
6. Nanteetip, L., Somkiet, J., Saisunee, R., Watoo, P., and Kornkanok, I.(2008). Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *Journal of Ethnopharmacology*, 120 (1), 112–117.
7. Watoo, P., Sakchai, W., Kanchalee, J., Waraporn, P., Hiroyuki, T., Kornkanok, I. (2007). Determination of saponin glycosides in *Bacopa monnieri* by reversed phase high performance liquid chromatography. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 2(1), 26-32.
8. Tianxiu, Q., Zhi-Hong, J., Zongwei, C. (2006). High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applied for metabolic study of ginsenoside Rb1 on rat. *Analytical Biochemistry*, 352(1), 87-96.
9. Yi, G., Guang-Ji, W., Jian-Gou, S., Yuan-Wei, J., Wie, W. (2009). Pharmacokinetic characterization of ginsenoside Rh2, an anticancer nutrient from ginseng, in rats and dogs. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 2257-2268.
10. Yi, G., Guangji, W., Jianguo, S., Haitang, X., Yuanwei, J. (2006). Development of a sensitive LC-ESI-MS assay for 20(R)-ginsenoside Rh2 and its pharmacokinetic application in dogs: A case for the influence of micronization on traditional Chinese medicine. *International Journal of Mass Spectrometry*, 252(1), 11-19.

11. Lui, Y., Yuanhui, D., Shunjun, X., Xing, Z. (2007). In vivo pharmacokinetic and metabolism studies of ginsenoside Rd. *Journal of Chromatography B*, 854(1), 77-84.
12. Wei, W., Guang-Ji, W., Hai-Tang, X., Jian-Guo, S., Shuai Z., Xi-ling, J., et al. (2007). Determination of ginsenoside Rd in dog plasma by liquid chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction and its application in dog pharmacokinetics studies. *Journal of Chromatography B*, 852(1), 8-14.
13. Jayeul, L., Euiju, L., Donghyun, K., Junhee, L., Junghee, Yoo., Byunghee, K. (2009). Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(1), 143-148.
14. Zongwei, C., Tianxiu, Q., Ricky, N.S.W., Zhi-Hong, J. (2003). Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rg3. *Analytica Chemica Acta*, 492(1), 283-293.
15. Tianxiu, Q., Zongwei, C., Ricky, N.S. W., Nai, K.M., Zhi-Hong, J. (2005). In vivo rat metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rg3. *Journal of Chromatography B*, 816(1), 223-232.
16. Wato, P., Waraporn, P., Hiroyuki, T., Sakchai, W., Kanchalee, J., Kornkanok, I. (2007). An enzyme-linked immunosorbent assay using polyclonal antibodies against Bacopaside I. *Analytica Chemica Acta*, 584(1), 1-6.



รายงานการวิจัย
โครงการย่อยที่ 6
เรื่อง

ความเป็นพิษเฉียบพลันและเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ
Acute and Chronic Toxicities of Brahmi Extract

โดย
ผศ.ดร.สীবบูรณ์ สิริรัฐวงศ์
รศ.ดร.พญ.นิรัชร์ เดศประเสริฐสุข
น.ส.กาญจนา ใจจ้อย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปีงบประมาณ 2552

บทคัดย่อ

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดพรมมิในหนูขาวเพศผู้และเพศเมียทดสอบโดยป้อนสารสกัด ขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวทางปากครั้งเดียว สังเกตอาการแสดงความเป็นพิษและ พฤติกรรมโดยทั่วไปเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งไม่พบความผิดปกติ ลักษณะอาการ พฤติกรรมและการตายของหนู ขาวที่ได้รับสารสกัดพรมมิเมื่อเทียบกับหนูก่อนที่ได้รับน้ำกลั่น ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการป้อนสาร สกัดพรมมิครั้งเดียวทางปากในขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวไม่มีผลก่อให้เกิดความเป็นพิษ เฉียบพลัน ทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังในหนูขาวโดยป้อนสารสกัดพรมมิขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 270 วัน ประเมินอาการ พฤติกรรมและสุขภาพสัตว์ พบว่าไม่ มีความผิดปกติใดๆ ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมื่อเทียบกับหนูขาวกลุ่มควบคุม นอกจากนี้หนูขาวกลุ่ม ทดสอบ กลุ่มควบคุมและกลุ่มติดตามผลการออกฤทธิ์ของสารจะได้รับการประเมินน้ำหนักตัวสุทธิตาม และ น้ำหนักอวัยวะ ลักษณะทางพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน การประเมินค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกใน เลือด ตลอดจนการตรวจทางพยาธิวิทยา พบว่ามีการเพิ่มหรือลดลงของน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะภายใน บางอวัยวะ มีค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิกบางค่าที่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ ใดๆก็ตามการพิจารณาค่าต่างๆ ดังกล่าวร่วมกับข้อมูลเกี่ยวกับอาการที่แสดง พฤติกรรมและการตรวจ สุขภาพสัตว์อาจกล่าวได้ว่าการให้สารสกัดพรมมิในขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวเป็นเวลา 270 วันไม่ได้ก่อให้เกิดความเป็นพิษเรื้อรัง

Abstract

Acute toxicity of Brahmi extract was conducted in male and female rats by single oral administration with the extract at 5,000 mg/kg body weight. The toxic signs and behaviors were observed within 14 days. The results showed no sign of differences as compared the control rats. In conclusion, single oral administration with the Brahmi extract at 5,000 mg/kg body weight did not significantly cause acute toxicity. For the chronic toxicity test, after oral feeding both male and female rats daily with the Brahmi extract at 30, 60, 300 and 1,500 mg/kg body weight for 270 days, signs, animal behavior and health monitoring were then investigated. There were no abnormalities in the test groups as compared to the control rats. Furthermore, the test and control groups (the day of 270th) and the satellite group (298th) were analyzed by measuring their final body and organ weights, taking necropsy, and examining hematology, blood clinical chemistry, and microanatomy. The results show an increase or decrease of body and some organ weights, significantly difference of some hematological and clinical blood chemical values when compared with the control groups. However, analyses of these results combined with the information of signs, behavior and health monitoring can finally make a conclusion that an oral administration of the Brahmi extract at the doses of 30, 60, 300 and 1,500 mg/kg body weight for 270 days does not produce chronic toxicity.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	6-ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	6-iii
สารบัญ	6-iv
สารบัญตาราง	6-v
สารบัญรูป	6-vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	6-vii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	6-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	6-4
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	6-6
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	6-20
บรรณานุกรม	6-23
ภาคผนวก	6-25

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
6-1 ผลของสารสกัดพรมมีต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน	6-6
6-2 ผลของสารสกัดพรมมีต่อน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน	6-7
6-3 น้ำหนักตัวของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมี	6-9
6-4 น้ำหนักตัวของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมี	6-10
6-5 น้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมี	6-11
6-6 น้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมี	6-12
6-7 ค่าโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมี	6-14
6-8 ค่าโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมี	6-15
6-9 ค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมี	6-16
6-10 ค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมี	6-17
6-11 ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมี	6-18
6-12 ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมี	6-19

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
6-1	จุดกายวิภาคของสมองจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-27
6-2	จุดกายวิภาคของหัวใจจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-28
6-3	จุดกายวิภาคของปอดจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-29
6-4	จุดกายวิภาคของตับจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-30
6-5	จุดกายวิภาคของไตจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-31
6-6	จุดกายวิภาคของต่อมหมวกไตจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-32
6-7	จุดกายวิภาคของม้ามจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-33
6-8	จุดกายวิภาคของกระเพาะอาหารจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-34
6-9	จุดกายวิภาคของลำไส้จากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-35
6-10	จุดกายวิภาคของรังไข่และมดลูกจากหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-36
6-11	จุดกายวิภาคของอวัยวะและเอพิดิไดมิสจากหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ	6-37

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มก./กก.	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
มก.	มิลลิกรัม
กก.	กิโลกรัม

บทที่ 1

บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

การศึกษาและพัฒนาสารหรือสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารใดก็ตาม สิ่งทีจําเป็นทีต้องดำเนินการคือการทดสอบความเป็นพิษ (toxicity test) ในสัตว์ทดลอง กระบวนการทดสอบสามารถทำได้หลายรูปแบบเช่น การทดสอบความเป็นพิษของสารทีออกฤทธิ์อย่างเฉียบพลัน (acute toxicity) และฤทธิ์กึ่งเฉียบพลัน (subacute toxicity) ไปจนถึงการทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง (subchronic toxicity) และพิษเรื้อรัง (chronic toxicity) จุดประสงค์หลักของการศึกษาคือเพื่อกําหนดความปลอดภัยในการใช้สารนั้นๆ ซึ่งเป็นข้อมูลทีสำคัญอย่างยิ่งต่อการทดสอบทางคลินิกและการนำไปใช้ในคนต่อไป

การศึกษาความเป็นพิษของสารสําคัญในโครงการนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน และเรื้อรังในสัตว์ทดลอง การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) คือ การตรวจวัดและประเมินภาวะของการเกิดพิษโดยการได้รับสารเคมีเพียงครั้งเดียวหรือได้รับสารเคมีหลายครั้งภายใน 24 ชั่วโมง โดยมีวัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อให้ได้ค่า LD₅₀ ของสารเคมีทีทดสอบซึ่งใช้เปรียบเทียบความเป็นพิษเฉียบพลันกับสารเคมีอื่นๆ เพื่อประเมินโอกาสทีจะแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษทีเกิดขึ้นกับระบบต่างๆของร่างกายเมื่อเกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน รวมทั้งเป็นข้อมูลในการเลือกใช้ขนาดของสารทีเหมาะสมสำหรับการทดสอบในขั้นต่อไป ส่วนการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังเป็นการศึกษาทีสัตว์ทดลองจะได้รับยาในขนาดซ้ําๆ โดยการให้ด้วยทางใดทางหนึ่งหรือหลายทางและใช้เวลานานหนึ่งปีหรืออาจน้อยกว่า โดยมีวัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อกําหนดเกี่ยวกับความเป็นพิษแบบกว้างๆของสารทีให้ในขนาดซ้ําๆในสัตว์ทดลอง ทั้งในเชิงคุณรูปทีเกี่ยวกับอวัยวะเป้าหมายหรือผลกระทบทีเกิดขึ้น และในเชิงปริมาณ ได้แก่ขนาดของสารทดสอบทีใช้ ความสำคัญและระดับทีพบในพลาสมาหรือเนื้อเยื่อ มีผลกระทบทีปรากฏให้เห็นหรือไม่เห็น การศึกษาดังกล่าวยังให้ข้อมูลสนับสนุน ข้อเสนอแนะ ข้อควรระมัดระวัง ให้ข้อมูลเกี่ยวกับอาการแสดงถึงความเป็นพิษ ขนาดของสารทดสอบ รวมทั้งระยะเวลาในการให้สาร เพื่อกําหนดไปศึกษาต่อในขั้นคลินิกหรือนำไปใช้ในมนุษย์ต่อไป รวมทั้งเพื่อกําหนดไปสู่อื่นๆต่อไป ซึ่งการศึกษาดังกล่าวต้องให้ข้อมูลที่เพียงพอทีจะทำให้เกิดการเลือกขนาดของสารทีเหมาะสม ระยะเวลาในการศึกษา และในขณะที่เดียวกันก็ให้ข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาระยะยาว เช่น ให้ข้อมูลเกี่ยวกับค่าทีต้องวัด จำนวนสัตว์ทดลองทีต้องใช้ในการศึกษา เป็นต้น นอกจากนี้การออกฤทธิ์ของสารแบบ reversible ภายหลังจากหยุด

ได้รับสารทดสอบแล้วสามารถทดสอบได้ด้วยวิธีการนี้ และผลการทดสอบที่ได้นี้อาจสามารถบอกระเภทของของความเป็นพิษได้เช่น neurological, physiological, biochemical, hematological และ pathological effects เป็นต้น⁽¹⁻¹⁰⁾

สมุนไพรพรมมิ มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Bacopa monnieri* Pennell อยู่ในวงศ์ SCROPHULARIACEAE เป็นผักพื้นบ้านที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทยโดยมีถิ่นกำเนิดในเนปาลและอินเดีย เป็นพืชสะสมน้ำสะสมในบก ชอบขึ้นในที่ชื้นแฉะ เช่นขอบสระน้ำ ลักษณะลำต้นใหญ่ อวบน้ำ ไม่มีขน เลื้อยทอดไปตามพื้นและชูยอดขึ้น ใบเป็นใบเดี่ยว รูปไข่ค่อนข้างยาว โคนใบแคบ ปลายใบกว้างมนกลม ขอบใบเรียบ แตกจากลำต้นแบบตรงกันข้าม ดอกเป็นดอกเดี่ยว ออกตามซอกใบใกล้ดอกสีขาวหรือสีครามอ่อน ตอนโคนติดกันเป็นหลอด ตอนปลายแยกเป็น 5 กลีบ เกสรตัวผู้มี 4 อัน ติดอยู่กับกลีบดอก ส่วนของยอดจะมีสารสำคัญที่บำรุงความจำมากกว่าส่วนอื่นๆสรรพคุณทางการแพทย์อายุรเวท ทำหน้าที่บำรุงสมอง รักษาความจำอันมีค่าของมนุษย์ และช่วยเสริมความจำและการเรียนรู้ ปกป้องเซลล์ประสาทไม่ให้ถูกทำลายได้ง่าย

สารสกัดจากพรมมิมีสรรพคุณในการทำหน้าที่บำรุงสมอง รักษาความจำอันมีค่าของมนุษย์ ชะลอการเสื่อมของเซลล์สมอง มีผลกระตุ้นความจำและการเรียนรู้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ประสาท และช่วยให้เซลล์ประสาทสมองยืดอายุการใช้งานได้นานขึ้น ซึ่งสามารถช่วยป้องกันไม่ให้ผู้สูงอายุเป็นโรคอัลไซเมอร์ได้ด้วย

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพรมมิในทางเภสัชวิทยาทั้งในระดับหลอดทดลอง สัตว์ทดลอง การศึกษาพิษวิทยา รวมถึงการทดลองทางคลินิก พบว่าสารสกัดที่ได้จากต้นพรมมิมีสารซาโปนิน (saponins) สามารถชะลอการเสื่อมของเซลล์สมอง มีผลกระตุ้นความจำ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ประสาท ซึ่งสามารถช่วยป้องกันไม่ให้ผู้สูงอายุเป็นโรคอัลไซเมอร์ได้ การศึกษาผลของพรมมิในอาสาสมัครที่มีร่างกายปกติอายุ 55-70 ปี จำนวน 60 คน โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้ยาหลอกและได้สารสกัดพรมมิ ขนาด 300 และ 600 มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า สารสกัดพรมมิช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตให้กับผู้สูงอายุ โดยเพิ่มประสิทธิภาพการทรงตัว เพิ่มการตื่นตัวต่อสิ่งเร้า มีสมาธิมากขึ้น เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำ คลายอาการซึมเศร้า ไม่พบอาการพิษและภาวะข้างเคียงใดๆ ในอาสาสมัคร ส่วนการศึกษาในหนูเป็นเวลา 14 วัน พบว่าหนูมีการเรียนรู้และความจำที่ดีขึ้น นอกจากนี้ได้ทดลองในหนูที่เกิดจากการเหนี่ยวนำให้มีสภาวะความจำบกพร่องและความจำเสื่อมพบว่า เมื่อให้สารสกัดพรมมิตดต่อกันนาน 2 สัปดาห์ ก่อนสมองถูกทำให้บกพร่อง พบว่า พรมมิสามารถป้องกันความสูญเสียความทรงจำได้ ส่วนการศึกษาทางพิษวิทยา พบว่า สารสกัดพรมมิมิมีความปลอดภัยไม่พบผลข้างเคียงใดๆ

เนื่องจากสารซาโปนินที่พบในพรมมิเป็นสารชนิดเดียวกับที่พบในโสม หรือ แปะก๊วย (Ginkgo) ซึ่งพรมมิเป็นสมุนไพรของอินเดียในศาสตร์อายุรเวช แต่เป็นพืชล้มลุกที่สามารถเพาะปลูกและขยายพันธุ์ได้ง่ายในประเทศไทย ดังนั้นหากมีการนำพรมมิมาใช้ก็จะถือว่าการลดการนำเข้าสมุนไพรอย่างโสม หรือ แปะก๊วย ที่เป็นสมุนไพรที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดพรมมิในหนูขาว
- 2.2 ศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง (270 วัน) ของสารสกัดพรมมิในหนูขาว

บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Sprague Dawley น้ำหนัก 180-200 กรัม ทั้งเพศผู้และเมีย จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จ. นครปฐม นำมาเลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อมให้อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมแสงสว่าง -มืด 12 ชั่วโมง ให้อาหารและน้ำไม่จำกัดปริมาณ เลี้ยงสัตว์ทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง

การขออนุญาตใช้สัตว์ทดลอง

การใช้สัตว์ทดลองในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและเรื้อรังของสารสกัดพรมมิได้ผ่านการขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่ AE011/2552

การเตรียมสารทดสอบและวิธีทางให้สารทดสอบ

เตรียมสารทดสอบพรมมิโดยละลายในน้ำกลั่น และป้อนสารทดสอบพรมมิทางปากโดยใช้เข็มป้อนสารสัตว์ทดลองในปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

วิธีการทดสอบ

1. ความเป็นพิษเฉียบพลัน^(8,10)

1.1 แบ่งหนูขาวแต่ละเพศออกเป็น 2 กลุ่ม (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว) คือ
กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดสอบ ได้รับสารทดสอบพรมมิขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

1.2 ป้อนสารทดสอบพรมมิให้หนูขาวทางปาก สังเกตอาการเปลี่ยนแปลง เช่น ซึม อาเจียน กล้ามเนื้อเกร็ง ถ่ายเหลวเป็นน้ำ เป็นต้น ภายใน 24 ชั่วโมงและทุกวันจนครบ 14 วัน พร้อมทั้งบันทึกน้ำหนักหนูขาว และจำนวนหนูขาวที่ตาย

1.3 วันที่ 14 ทำการผ่าพิสูจน์ซากหาความผิดปกติของอวัยวะภายในต่างๆ (ปอด หัวใจ ตับ ไต กระเพาะอาหาร ลำไส้ ม้าม ต่อมหมวกไต รังไข่ มดลูก อัณฑะ ตา สมอง กระจกสันหลัง กล้ามเนื้อและเส้นประสาท) ด้วยตาเปล่า

1.4 ในการทดลองครั้งนี้หากหนูขาวได้รับสารทดสอบพรมมิขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวแล้วไม่ตายอาจกล่าวได้ว่าสารดังกล่าวมีความเป็นพิษต่ำหรือไม่มีความเป็นพิษ จึงไม่ต้องศึกษาหา LD₅₀

1.5 หากสารทดสอบพรมมิขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวทำให้สัตว์ทดลองตายจึงคำนวณหาขนาดของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครั้งหนึ่ง LD₅₀

2. ความเป็นพิษเรื้อรัง^(7,10)

2.1 แบ่งหนูขาวแต่ละเพศออกเป็น 5 กลุ่ม (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว) คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ใช้น้ำกลั่น

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดสอบ ได้รับสารทดสอบพรมมิขนาด 30 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดสอบ ได้รับสารทดสอบพรมมิขนาด 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 4 กลุ่มทดสอบ ได้รับสารทดสอบพรมมิขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 5 กลุ่มทดสอบ ได้รับสารทดสอบพรมมิขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 6 กลุ่มติดตามผล ได้รับสารทดสอบพรมมิขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว

2.2 ป้อนสารทดสอบพรมมิทางปากติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 270 วัน ระหว่างการทดลองสังเกตและบันทึกอาการเปลี่ยนแปลง น้ำหนักตัวของหนูขาวทุกวัน หากมีหนูขาวตายระหว่างการทดลองจะทำการผ่าพิสูจน์ซาก

2.3 เมื่อครบกำหนด 270 วัน เก็บเลือดเพื่อตรวจค่าทางโลหิตวิทยา ค่าทางชีวเคมีและผ่าพิสูจน์ซาก หาความผิดปกติของอวัยวะภายในต่างๆ (ปอด หัวใจ ตับ ไต กระเพาะอาหาร ลำไส้ รังไข่ มดลูก ต่อมหมวกไต อัณฑะ เอพิดิไดมิส ตา สมอง กระดูกสันหลัง กล้ามเนื้อและเส้นประสาท) ด้วยตาเปล่าและตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

2.4 ส่วนหนูขาวกลุ่มติดตามผลหลังได้รับสารทดสอบพรมมิครบ 270 วัน เลี้ยงต่อไปอีก 28 วัน โดยไม่ได้รับสารทดสอบ เมื่อครบ 28 วันจะเก็บเลือดและอวัยวะภายในสำหรับตรวจทางพยาธิวิทยา

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดพรมมิ พบว่าเมื่อป้อนสารทดสอบพรมมิขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ทางปากครั้งเดียวแก่หนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่พบการตาย การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของหนูขาว และไม่มีผลเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเฉลี่ย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงผลในตารางที่ 6-1 ในตารางที่ 6-2 แสดงน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาว พบว่าในหนูขาวเพศเมียมีน้ำหนักปอดเพิ่มสูงขึ้น และหนูขาวเพศผู้มีน้ำหนักตับเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

เมื่อผ่าพิสูจน์ซากเพื่อตรวจดูลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ของหนูขาวทั้งสองเพศทุกกลุ่มได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ตับอ่อน ไต ม้าม ต่อมหมวกไต กระเพาะอาหาร ลำไส้ รั้งไข่ มดลูก อัณฑะ ตา กล้ามเนื้อ กระดูกและสมอง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่า จากการตรวจพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในด้วยตาเปล่าไม่พบรอยโรค ลักษณะ ขนาด รูปร่างและสีที่ผิดปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 6-1 ผลของสารสกัดพรมมิต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน

	น้ำหนักตัว (กรัม)			น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในวันที่ 14
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	
เพศเมีย				
ควบคุม	218.00 ± 3.74	215.00 ± 2.24	233.00 ± 2.00	15.00 ± 7.58
พรมมิ 5,000 มก./กก.	234.00 ± 4.30	255.00 ± 6.12	260.00 ± 7.58*	26.00 ± 4.47
เพศผู้				
ควบคุม	265.00 ± 2.24	247.00 ± 3.39	290.00 ± 4.47	25.00 ± 2.24
พรมมิ 5,000 มก./กก.	287.00 ± 2.55	296.00 ± 2.91	313.00 ± 2.55	26.00 ± 3.32

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 6-2 ผลของสารสกัดพรมมีต่อน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน

	น้ำหนักอวัยวะภายใน (กรัม)	
	ควบคุม	พรมมี 5,000 มก./กก.
เพศเมีย		
สมอง	1.79 ± 0.08	1.73 ± 0.03
ปอด	1.27 ± 0.02	1.44 ± 0.06*
หัวใจ	0.84 ± 0.05	0.92 ± 0.03
ตับ	6.74 ± 0.29	9.10 ± 0.61
ตับอ่อน	0.62 ± 0.04	0.86 ± 0.08
ม้าม	0.65 ± 0.04	0.82 ± 0.04
ต่อมหมวกไต	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
ไต	0.83 ± 0.02	0.86 ± 0.02
รังไข่	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00
มดลูก	0.49 ± 0.02	0.47 ± 0.04
เพศผู้		
สมอง	1.77 ± 0.03	1.79 ± 0.02
ปอด	1.47 ± 0.04	1.51 ± 0.03
หัวใจ	0.95 ± 0.03	0.99 ± 0.03
ตับ	8.70 ± 0.67	8.39 ± 0.13*
ตับอ่อน	0.78 ± 0.04	0.72 ± 0.03
ม้าม	0.77 ± 0.03	0.84 ± 0.03
ต่อมหมวกไต	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
ไต	1.01 ± 0.03	1.05 ± 0.01
อัณฑะ	1.68 ± 0.02	1.69 ± 0.02
เอพิไดไมส	0.50 ± 0.01	0.53 ± 0.01

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดพรมมิไม่พบความเป็นพิษต่อหนูขาวทั้งสองเพศ ในขนาดของสารทดสอบ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวจึงทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังโดยป้อนสารทดสอบขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวแก่หนูขาวปกติทั้งเพศเมียและเพศผู้ ทางปากทุกวันเป็นเวลา 270 วัน จากการสังเกตอาการของหนูขาวหลังจากได้รับสารสกัดพรมมิ ทุกวันๆ ละ ครั้งเป็นเวลา 270 วัน ลักษณะภายนอกและพฤติกรรมต่างๆ ของหนูขาวไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม และไม่มีหนูขาวตัวใดตายในระหว่างการทดสอบทั้งในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิและกลุ่มติดตามผลการออกฤทธิ์ของสารทดสอบ

ตารางที่ 6-3 แสดงน้ำหนักตัวของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดพรมมิ พบว่า น้ำหนักตัวของหนูขาวเพศเมียมกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีน้ำหนักตัวในวันที่ 90 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีน้ำหนักตัวในวันที่ 270 ลดลงและมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวในวันที่ 270 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มติดตามผลที่ให้สารสกัดพรมมิขนาด 1,500 (กลุ่มบี) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีน้ำหนักตัวในวันที่ 180 เพิ่มขึ้น ในตารางที่ 6-4 แสดงน้ำหนักตัวของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดพรมมิ หนูขาวกลุ่มติดตามผลที่ให้สารสกัดพรมมิขนาด 1,500 (กลุ่มบี) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีน้ำหนักตัวในวันที่ 180 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของน้ำหนักตัวของหนูขาวทั้งสองเพศมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6-5 แสดงน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดพรมมิ พบว่าหนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีน้ำหนักตับลดลง และมีน้ำหนักรังไข่เพิ่มขึ้น หนูขาวที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีน้ำหนักสมองและรังไข่เพิ่มสูงขึ้น ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (กลุ่มเอ) มีน้ำหนักสมอง ตับอ่อนและรังไข่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ตารางที่ 6-6 แสดงน้ำหนักอวัยวะภายในของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดพรมมิ พบว่า หนูขาวเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีน้ำหนักไตเพิ่มสูงขึ้น หนูขาวที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 60 และ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีน้ำหนักตับลดลงและน้ำหนักเอพิไดมิสเพิ่มสูงขึ้น กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 1,500 (กลุ่มเอ) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีน้ำหนักปอดเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของน้ำหนักตัวของหนูขาวทั้งสองเพศมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6-3 น้ำหนักตัว (กรัม) ของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

กลุ่ม	น้ำหนักตัว (กรัม)					น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ในวันที่ 270
	วันที่ 1	วันที่ 90	วันที่ 180	วันที่ 270	วันที่ 298	
ควบคุม	231.00 ± 2.45	302.00 ± 3.00	317.00 ± 2.49	338.50 ± 9.95		107.50 ± 8.80
พรมมิ 30 มก./กก.	235.00 ± 2.69	290.50 ± 4.86*	321.50 ± 3.42	336.00 ± 6.78		101.00 ± 6.53
พรมมิ 60 มก./กก.	236.00 ± 2.67	301.50 ± 3.42	310.50 ± 1.38	315.50 ± 7.76*		79.50 ± 9.44*
พรมมิ 300 มก./กก.	231.50 ± 4.41	300.50 ± 4.31	321.00 ± 3.64	339.50 ± 5.98		108.00 ± 6.67
พรมมิ 1,500 มก./กก. ^a	229.00 ± 4.82	297.50 ± 4.43	321.50 ± 3.50	330.50 ± 7.97		101.50 ± 7.30
พรมมิ 1,500 มก./กก. ^b	232.50 ± 2.61	294.00 ± 3.40	331.00 ± 4.40*	337.50 ± 8.11	345.50 ± 5.94	105.00 ± 7.30

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

^a กลุ่มทดสอบได้รับสารทดสอบขนาด 1500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน

^b กลุ่มติดตามผลได้รับสารทดสอบขนาด 1500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วันโดยไม่ได้รับสารทดสอบ

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 6-4 น้ำหนักตัว (กรัม) ของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

กลุ่ม	น้ำหนักตัว (กรัม)					น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ในวันที่ 270
	วันที่ 1	วันที่ 90	วันที่ 180	วันที่ 270	วันที่ 298	
ควบคุม	238.50 ± 3.42	408.00 ± 3.35	510.00 ± 8.20	530.00 ± 17.45		291.50 ± 18.69
พรมมิ 30 มก./กก.	237.50 ± 4.30	429.50 ± 8.58	530.00 ± 3.65	547.50 ± 9.23		310.00 ± 11.25
พรมมิ 60 มก./กก.	236.00 ± 2.67	419.50 ± 4.62	522.50 ± 8.31	544.00 ± 7.56		308.00 ± 6.59
พรมมิ 300 มก./กก.	234.50 ± 3.61	412.50 ± 13.69	518.00 ± 9.26	538.50 ± 10.85		304.00 ± 10.08
พรมมิ 1,500 มก./กก. ^a	242.50 ± 3.27	387.50 ± 16.39	502.00 ± 8.83	502.00 ± 9.58		259.50 ± 9.65
พรมมิ 1,500 มก./กก. ^b	235.50 ± 3.02	396.00 ± 13.70	485.00 ± 11.25*	512.00 ± 7.20	513.50 ± 9.13	276.50 ± 9.43

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

^a กลุ่มทดสอบได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน

^b กลุ่มติดตามผลได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วัน โดยไม่ได้รับสารทดสอบ

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 6-5 น้ำหนักอวัยวะภายใน (กรัม) ของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

	ควบคุม			พรมมิ (มก./กก.)														
				30			60			300			1,500 ^a			1,500 ^b		
สมอง	1.97	±	0.02	1.94	±	0.03	1.94	±	0.03	2.07	±	0.04*	2.08	±	0.02*	2.01	±	0.03*
ปอด	2.16	±	0.26	2.16	±	0.26	2.00	±	0.14	2.14	±	0.13	2.32	±	0.19	2.00	±	0.13
หัวใจ	1.27	±	0.05	1.22	±	0.03	1.24	±	0.04	1.38	±	0.09	1.36	±	0.06	1.31	±	0.05
ตับ	9.90	±	0.32	9.55	±	0.28	8.71	±	0.30*	9.72	±	0.23	9.33	±	0.29	9.54	±	0.27
ม้าม	0.83	±	0.03	0.81	±	0.03	0.74	±	0.03	0.83	±	0.03	0.84	±	0.04	0.79	±	0.04
ตับอ่อน	1.03	±	0.09	1.09	±	0.08	1.21	±	0.14	1.34	±	0.13	1.42	±	0.14*	0.98	±	0.12
ต่อมหมวกไต	0.04	±	0.00	0.04	±	0.00	0.05	±	0.00	0.04	±	0.00	0.04	±	0.00	0.04	±	0.00
ไต	1.27	±	0.02	1.28	±	0.02	1.20	±	0.03	1.22	±	0.02	1.24	±	0.04	1.25	±	0.03
รังไข่	0.07	±	0.00	0.08	±	0.00	0.09	±	0.01*	0.09	±	0.01*	0.09	±	0.01*	0.07	±	0.00*
มดลูก	1.18	±	0.14	1.36	±	0.33	1.01	±	0.07	0.96	±	0.09	0.86	±	0.05	1.13	±	0.10

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

^a กลุ่มทดสอบได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน

^b กลุ่มติดตามผลได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วัน โดยไม่ได้รับสารทดสอบ

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 6-6 น้ำหนักอวัยวะภายใน (กรัม) ของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

	ควบคุม			พรมมิ (มก./กก.)														
				30			60			300			1,500 ^a			1,500 ^b		
สมอง	2.11	±	0.03	2.16	±	0.03	2.16	±	0.04	2.14	±	0.04	2.17	±	0.04	2.11	±	0.03
ปอด	2.34	±	0.10	2.60	±	0.13	2.58	±	0.14	2.58	±	0.20	3.59	±	0.21*	2.36	±	0.13
หัวใจ	1.84	±	0.07	1.89	±	0.05	1.76	±	0.03	1.79	±	0.06	1.97	±	0.07	1.67	±	0.06*
ตับ	15.80	±	0.44	16.80	±	0.34	14.22	±	0.23*	14.09	±	0.56*	14.61	±	0.61	14.75	±	0.37
ม้าม	0.97	±	0.06	1.05	±	0.04	0.99	±	0.04	1.05	±	0.04	0.98	±	0.04	0.96	±	0.03
ตับอ่อน	1.27	±	0.04	1.21	±	0.12	1.41	±	0.14	1.08	±	0.14	1.54	±	0.13	0.94	±	0.09
ต่อมหมวกไต	0.04	±	0.00	0.04	±	0.00	0.05	±	0.00	0.04	±	0.00	0.04	±	0.00	0.04	±	0.00
ไต	1.86	±	0.04	2.03	±	0.06*	1.82	±	0.04	1.76	±	0.04	1.76	±	0.06	1.74	±	0.03
อวัยวะ	2.13	±	0.03	2.11	±	0.09	2.11	±	0.03	2.13	±	0.03	2.05	±	0.07	2.00	±	0.04
เอพิไดไดมิต	0.86	±	0.02	0.93	±	0.03	0.99	±	0.03*	1.04	±	0.06*	0.93	±	0.03	0.87	±	0.02

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

^a กลุ่มทดสอบได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน

^b กลุ่มติดตามผลได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วัน โดยไม่ได้รับสารทดสอบ

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

ค่าโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง แสดงในตารางที่ 6-7 พบว่ากลุ่มติดตามผลที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (กลุ่มบี) มีค่าเฮโมโกลบิน (hemoglobin, HB) ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit, HCT) ค่าเม็ดเลือดแดง (red blood cell, RBC) ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ (mean corpuscular volume, MCV) เพิ่มสูงขึ้นและมีค่าความเข้มข้นของเฮโมโกลบินเฉลี่ยในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC) และจำนวนเกล็ดเลือด (platelet) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ส่วนค่าโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรัง แสดงในตารางที่ 6-8 พบว่า หนูขาวที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีจำนวนเกล็ดเลือดลดลง กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีค่าความเข้มข้นของเฮโมโกลบินเฉลี่ยในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ลดลง และในกลุ่มติดตามผล (กลุ่มบี) ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเพิ่มสูงขึ้นและมีค่าความเข้มข้นของเฮโมโกลบินเฉลี่ยในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

ผลของสารสกัดพรมมิต่อค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูขาวเพศเมียแสดงในตารางที่ 6-9 หนูขาวเพศเมียที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีจำนวนลิมโฟไซต์เพิ่มสูงขึ้น และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (กลุ่มเอ) มีจำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cell, WBC) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ส่วนตารางที่ 6-10 แสดงผลของหนูขาวเพศผู้พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีจำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวนนิวโทรฟิล (neutrophil) และจำนวนลิมโฟไซต์เพิ่มสูงขึ้น และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (กลุ่มเอ) มีจำนวนเม็ดเลือดขาวและจำนวนลิมโฟไซต์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาวเพศเมียแสดงในตารางที่ 6-11 พบว่าเพศเมียที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 30, 60 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีระดับของน้ำตาลลดลง ส่วนกลุ่มติดตามผลมีค่าครีเอตินิน (creatinine) เพิ่มขึ้นและมีค่าโปรตีนรวม (total protein) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) ส่วนค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาวเพศผู้แสดงในตารางที่ 6-12 พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาด 30, 60 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีปริมาณเอนไซม์ซีรั่ม กลูเทมิก ออกซาโลอะซีติก ทรานซามิเนส (serum glutamic-oxaloacetic transaminase; SGPT) ลดลง ส่วนกลุ่มติดตามผลมีปริมาณเอนไซม์ซีรั่ม กลูเทมิก ไพรูวิก ทรานซามิเนส (serum glutamic-pyruvic transaminase; SGPT) และมีค่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase, ALP) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

ตารางที่ 6-7 ค่าโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

	ควบคุม			พรมมิ (มก./กก.)														
				30		60		300		1,500 ^a		1,500 ^b						
RBC (x10 ⁶ /μl)	8.96	±	0.27	9.03	±	0.37	8.80	±	0.13	8.56	±	0.20	8.98	±	0.18	9.92	±	0.20*
HB (g/dl)	16.36	±	0.37	16.22	±	0.30	16.24	±	0.22	15.84	±	0.29	16.41	±	0.27	17.50	±	0.26*
HCT (%)	50.00	±	1.60	50.80	±	2.12	48.80	±	0.73	48.60	±	1.05	50.20	±	0.89	56.60	±	0.98*
MCV(fl)	55.70	±	0.30	56.10	±	0.43	55.40	±	0.27	56.50	±	0.31	55.80	±	0.59	57.00	±	0.30*
MCH (pg)	18.30	±	0.22	18.09	±	0.44	18.41	±	0.25	18.56	±	0.27	18.30	±	0.31	17.61	±	0.13
MCHC (g/dl)	32.83	±	0.45	32.18	±	0.79	33.13	±	0.38	32.82	±	0.37	32.75	±	0.38	30.90	±	0.17*
Platelet (x10 ⁵ /μl)	0.83	±	0.05	0.85	±	0.05	0.77	±	0.02	0.73	±	0.02	0.72	±	0.09	0.68	±	0.04*

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

^a กลุ่มทดสอบได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน

^b กลุ่มติดตามผลได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วันโดยไม่ได้รับสารทดสอบ

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ p<0.05

ตารางที่ 6-8 ค่าโลหิตวิทยาของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

	ควบคุม		พรมมิ (มก./กก.)									
			30		60		300		1,500 ^a		1,500 ^b	
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.76	\pm 0.18	8.53	\pm 0.89*	10.03	\pm 0.30	9.53	\pm 0.30	9.60	\pm 0.21	10.73	\pm 0.20
HB (g/dl)	16.99	\pm 0.23	16.73	\pm 0.50	16.92	\pm 0.43	16.73	\pm 0.51	16.77	\pm 0.41	17.82	\pm 0.28
HCT (%)	52.00	\pm 0.91	51.00	\pm 1.86	52.90	\pm 1.55	50.60	\pm 1.58	50.50	\pm 1.30	57.50	\pm 0.98*
MCV (fl)	53.00	\pm 0.21	53.40	\pm 0.31	52.60	\pm 0.27	53.00	\pm 0.30	52.50	\pm 0.27	53.50	\pm 0.31
MCH (pg)	17.38	\pm 0.17	17.54	\pm 0.09	16.85	\pm 0.15	17.54	\pm 0.11	16.41	\pm 1.03	16.56	\pm 0.12
MCHC (g/dl)	32.80	\pm 0.28	32.91	\pm 0.26	32.07	\pm 0.25*	33.16	\pm 0.19	33.18	\pm 0.22	30.92	\pm 0.12*
Platelet ($\times 10^5/\mu\text{l}$)	0.95	\pm 0.03	0.86	\pm 0.03	0.97	\pm 0.03	0.93	\pm 0.04	1.85	\pm 0.89	0.89	\pm 0.04

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย \pm ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

^a กลุ่มทดสอบได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน

^b กลุ่มติดตามผลได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วันโดยไม่ได้รับสารทดสอบ

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 6-9 ค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

	พรมมิ (มก./กก.)																	
	ควบคุม			30		60		300		1,500 ^a		1,500 ^b						
WBC (x10 ³ /μl)	5.18	±	0.34	4.96	±	0.38	5.87	±	0.36	6.32	±	0.61	7.03	±	0.63*	6.27	±	0.67
NEU (x10 ³ /μl)	1.37	±	0.16	1.28	±	0.15	1.30	±	0.14	1.53	±	0.42	1.41	±	0.19	2.03	±	0.26
LYMP (x10 ³ /μl)	3.18	±	0.39	3.40	±	0.24	4.27	±	0.28	9.59	±	5.25*	5.31	±	0.50	3.63	±	0.58
MONO (x10 ³ /μl)	0.15	±	0.03	0.23	±	0.06	0.21	±	0.06	0.27	±	0.07	0.19	±	0.03	0.23	±	0.04
EO (x10 ³ /μl)	0.04	±	0.02	0.04	±	0.03	0.09	±	0.03	0.04	±	0.02	0.06	±	0.02	0.03	±	0.02
BASO (x10 ³ /μl)	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

^a กลุ่มทดสอบได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน

^b กลุ่มติดตามผลได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วัน โดยไม่ได้รับสารทดสอบ

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ p<0.05

ตารางที่ 6-10 ค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

	พรมมิ (มก./กก.)																	
	ควบคุม			30			60			300			1,500 ^a			1,500 ^b		
WBC (x10 ³ /μl)	7.70	±	0.42	7.23	±	0.69	9.52	±	0.40	11.62	±	1.44*	10.01	±	0.72*	7.79	±	0.60
NEU (x10 ³ /μl)	1.37	±	0.16	1.80	±	0.23	2.12	±	0.22	2.89	±	1.19*	2.18	±	0.26	2.10	±	0.26
LYMP (x10 ³ /μl)	5.94	±	0.28	5.14	±	0.52	6.90	±	0.29	8.08	±	0.50*	7.31	±	0.50*	5.31	±	0.55
MONO (x10 ³ /μl)	0.27	±	0.06	0.21	±	0.07	0.30	±	0.07	0.49	±	0.17	0.45	±	0.12	0.35	±	0.06
EO (x10 ³ /μl)	0.11	±	0.05	0.08	±	0.03	0.20	±	0.08	0.06	±	0.05	0.07	±	0.03	0.02	±	0.02
BASO (x10 ³ /μl)	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00	0.00	±	0.00

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

^a กลุ่มทดสอบได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน

^b กลุ่มติดตามผลได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วันโดยไม่ได้รับสารทดสอบ

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ p<0.05

ตารางที่ 6-11 ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

	ควบคุม		พรมมิ (มก./กก.)											
			30		60		300		1,500 ^a		1,500 ^b			
Glucose (mg/dl)	177.30	± 5.66	159.90	± 7.50	147.50	± 6.55*	134.10	± 8.50*	132.20	± 7.96*	170.3	± 8.85		
BUN (mg/dl)	16.12	± 1.99	16.54	± 0.41	15.76	± 1.23	16.47	± 0.44	27.50	± 11.31	21.32	± 0.53		
Creatinine (mg/dl)	0.56	± 0.02	0.57	± 0.01	0.55	± 0.01	0.58	± 0.01	0.60	± 0.02	0.61	± 0.02*		
Total protein (g/dl)	6.29	± 0.08	6.20	± 0.08	6.15	± 0.09	6.22	± 0.12	6.16	± 0.10	5.86	± 0.03*		
Albumin (g/dl)	3.20	± 0.03	3.27	± 0.03	3.27	± 0.03	3.20	± 0.05	3.12	± 0.04	3.18	± 0.05		
Bilirubin														
Total (mg/dl)	0.10	± 0.01	0.10	± 0.01	0.11	± 0.01	81.18	± 81.09	0.10	± 0.00	0.25	± 0.02		
Direct (mg/dl)	0.18	± 0.02	0.17	± 0.02	0.23	± 0.03	0.28	± 0.08	0.22	± 0.03	0.11	± 0.01		
SGOT (U/L)	195.60	± 26.12	220.20	± 22.37	162.70	± 9.09	213.40	± 21.86	178.20	± 21.36	204.80	± 21.98		
SGPT (U/L)	57.60	± 9.00	77.70	± 10.96	49.70	± 5.35	73.40	± 9.83	61.10	± 9.88	63.20	± 7.79		
ALP (U/L)	43.20	± 2.92	40.60	± 3.03	41.90	± 3.22	48.00	± 7.90	48.10	± 6.03	43.10	± 3.94		

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

^a กลุ่มทดสอบได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน

^b กลุ่มติดตามผลได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วัน โดยไม่ได้รับสารทดสอบ

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 6-12 ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

	ควบคุม	พรมมิ (มก./กก.)									
		30		60		300		1,500 ^a		1,500 ^b	
Glucose (mg/dl)	209.10 ± 8.67	209.40 ± 15.59	181.40 ± 18.86	219.60 ± 14.18	196.40 ± 9.49	174.20 ± 8.07					
BUN (mg/dl)	17.52 ± 0.46	18.25 ± 0.45	17.29 ± 0.63	16.59 ± 0.32	16.94 ± 0.50	19.62 ± 0.31*					
Creatinine (mg/dl)	0.57 ± 0.03	0.56 ± 0.02	0.54 ± 0.02	6.09 ± 5.55	0.53 ± 0.01	0.61 ± 0.02					
Total protein (g/dl)	6.11 ± 0.12	5.85 ± 0.15	6.19 ± 0.09	6.11 ± 0.10	6.37 ± 0.13	6.25 ± 0.18					
Albumin (g/dl)	3.07 ± 0.05	3.03 ± 0.06	3.06 ± 0.03	3.07 ± 0.05	3.10 ± 0.04	3.21 ± 0.06					
Bilirubin											
Total (mg/dl)	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.02					
Direct (mg/dl)	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.18 ± 0.07					
SGOT (U/L)	193.00 ± 13.81	158.60 ± 9.13*	152.30 ± 13.61*	142.60 ± 8.27*	146.80 ± 10.34*	201.80 ± 22.31					
SGPT (U/L)	63.20 ± 6.35	61.90 ± 5.82	54.60 ± 5.27	51.30 ± 2.86	54.40 ± 3.99	83.40 ± 9.42*					
ALP (U/L)	55.80 ± 2.51	53.20 ± 2.28	52.90 ± 1.59	55.10 ± 2.61	61.10 ± 2.22	64.90 ± 3.40*					

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความผิดพลาดปกติของค่าเฉลี่ย, n = 10

^a กลุ่มทดสอบได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน

^b กลุ่มติดตามผลได้รับสารทดสอบขนาด 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 270 วัน และเลี้ยงต่อไปอีก 28 วันโดยไม่ได้รับสารทดสอบ

* ความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ p<0.05

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การป้อนสารสกัดพรมมิทางปากครั้งเดียวในขนาดสูง 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง โดยหนูขาวดังกล่าวไม่แสดงอาการผิดปกติใดให้เห็น สัตว์ทดลองมีสุขภาพที่แข็งแรง ไม่เจ็บป่วย การผ่าพิสูจน์ซากและตรวจหาพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน ก็ไม่พบความผิดปกติใดๆ

การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังโดยการป้อนสารสกัดพรมมิอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 270 วัน ในขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จากการสังเกตอาการและลักษณะภายนอก และการตรวจสุขภาพสัตว์ตลอดการทดลองเพื่อประเมินความเป็นพิษที่อาจเกิดจากสารทดสอบไม่พบลักษณะอาการ การเปลี่ยนแปลงของสัตว์ทดลอง แต่พบว่ามี的增加หรือลดลงของน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะภายในบางอวัยวะ ข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญในการประเมินความเป็นพิษของสารเนื่องจากการเพิ่มหรือลดลงของน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะภายในที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและค่ามาตรฐานอาจเป็นหลักฐานที่อาจชี้ถึงผลของสารทดสอบที่อาจมีผลต่อระบบของร่างกายได้ แต่อย่างไรก็ตามลักษณะดังกล่าวดังกล่าวอาจเกิดจากตัวของสัตว์ทดลองเองไม่ใช่ผลของสารทดสอบดังกล่าว การศึกษาลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ทางพยาธิวิทยาในหนูขาวทั้งสองเพศทุกกลุ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นขั้นตอนสุดท้ายและเป็นหลักฐานสำคัญที่จะชี้ให้เห็นว่าในสารทดสอบสามารถก่อพิษเรื้อรังได้หรือไม่ จากการตรวจพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในด้วยตาเปล่า ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ตับอ่อน ไต ม้าม ต่อมหมวกไต กระเพาะอาหาร ลำไส้ รั้งไข่มดลูก อัณฑะ ตา กล้ามเนื้อ กระดูกและสมอง ไม่พบรอยโรค ลักษณะ ขนาด รูปร่างและสีที่ผิดปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบพยาธิสภาพของโรคใดๆ เกิดขึ้นและไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกับกลุ่มควบคุม

การบ่งชี้ความผิดปกติของระบบต่างๆ ในสัตว์ทดลองเมื่อได้รับสารทดสอบติดต่อกันเป็นระยะเวลาสามารถประเมินได้จากค่าโลหิตวิทยา นอกจากนี้ค่าโลหิตวิทยายังสามารถใช้ประเมินอาการของโรคที่อาจเกิดขึ้นได้ ค่าเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว เกล็ดเลือด เป็นค่าที่ใช้ประเมินสุขภาพของสัตว์ทดลองได้ โดยจำนวนเม็ดเลือดแดงที่ต่ำกว่าเกณฑ์ปกติจะบ่งบอกถึงภาวะโลหิตจาง การสูญเสียเลือดปริมาณมากหรือความผิดปกติของการสร้างเม็ดเลือด ความสามารถในการขนส่งก๊าซออกซิเจน ส่วนค่าที่สูงกว่าเกณฑ์ปกติจะ

บอกถึงความเข้มข้นของเลือดที่มากเกินไป จากภาวะขาดแคลนออกซิเจน การสูญเสียน้ำ เป็นต้น สำหรับภาวะมีการติดเชื้อ ภาวะอัมพาต ความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันและความผิดปกติของระบบสารคัดหลั่งสามารถประเมินได้จากจำนวนเม็ดเลือดขาวส่วนระดับค่าของเกล็ดเลือดอาจใช้บ่งชี้ถึงระบบภูมิคุ้มกันและระบบการแข็งตัวของเลือด⁽¹¹⁻¹³⁾ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าโลหิตวิทยาบางค่าของหนูขาวทั้งเพศเมียและเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดพรมที่มีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่เมื่อนำค่าความผิดปกติดังกล่าวไปเทียบกับค่ามาตรฐานของสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติแล้วพบว่าค่าดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ปกติ⁽¹⁴⁻¹⁵⁾ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดพรมมีในขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัวไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของระบบไหลเวียนเลือด ไม่มีผลต่อการสร้างเลือดและเม็ดเลือดต่างๆ รวมทั้งไม่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย

การประเมินประสิทธิภาพการทำงานของตับอ่อน ไต และตับ สามารถประเมินได้จากค่าเคมีคลินิก โดยการตรวจระดับน้ำตาลในกระแสเลือดเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นของการทำงานของตับอ่อนเพราะหากมีระดับน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้นจากการได้รับสารทดสอบ การเพิ่มสูงขึ้นของระดับน้ำตาลนั้นอาจเป็นผลจากสารทดสอบไปทำลายเซลล์ของตับอ่อน ค่ายูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือดและค่าครีเอตินิน เป็นครรชนที่ใช้สำหรับชี้วัดการทำงานของตับและประสิทธิภาพของไต โดยค่าครีเอตินินเป็นค่าที่ค่อนข้างจำเพาะต่อในการตรวจสอบการทำงานของไตเพราะค่าดังกล่าวไม่เปลี่ยนแปลงแม้จะมีความแตกต่างของอายุ เพศ อาหารและกิจกรรมที่เกิดขึ้นในแต่ละวัน ค่าครีเอตินินที่เพิ่มสูงขึ้นสามารถพบได้ในภาวะขาดโซเดียม ขาดน้ำ เกิดความผิดปกติที่ท่อไต เนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างท่อไตและหลอดเลือด และเส้นเลือดของไต สำหรับค่ายูเรียไนโตรเจนซึ่งเกิดจากขบวนการเมแทบอลิซึมของโปรตีนในร่างกาย ถ้าหากร่างกายอยู่ในภาวะเครียดจะส่งผลให้ระดับยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือดลดลง ส่วนภาวะขาดอาหารโปรตีนมีผลให้มีการเพิ่มขึ้นของค่าดังกล่าว แม้ว่าค่ายูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือดจะไม่ใช่ค่าที่จำเพาะต่อไต แต่ค่าดังกล่าวก็มีความสำคัญทั้งนี้เพราะสามารถบอกสภาวะของสัตว์ทดลองได้ ค่าโปรตีนรวม (total protein) อัลบูมิน (albumin) บิลิรูบิน (bilirubin) อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และซีรั่มอะมิโนทรานเฟอเรส เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงการทำงานของตับ สำหรับค่าอัลบูมินและโปรตีนจะเป็นครรชนที่ใช้ชี้วัดการทำหน้าที่ของเซลล์ตับ และเมื่อใดที่ตับเกิดความผิดปกติหรือมีความเสียหายเกิดขึ้นจะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน ส่วนค่าบิลิรูบินเป็นค่าที่ได้จากการแยกสลายของฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุขัยหรือแตกสลายจากการถูกทำลาย เมื่อบิลิรูบินถูกขนส่งมาที่ตับจะถูกเรียกว่าอินคอนจูเกตบิลิรูบิน หรืออินไดเรกบิลิรูบิน และเมื่อถูกคอนจูเกตแล้วจะถูกเรียกคอนจูเกตบิลิรูบินหรือไดเรกบิลิรูบิน (direct bilirubin)

การเพิ่มสูงขึ้นของอินโดเรคบิลิรูบินอาจบ่งชี้ถึงภาวะการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง การทำลายเซลล์ต้น
ตอของเม็ดเลือดแดงส่วนการเพิ่มสูงขึ้นของโคเรคบิลิรูบินอาจบ่งชี้ถึงภาวะการอุดตันภายในตับ เช่น ภาวะ
โรคตับแข็ง ตับอักเสบ การอุดตันการไหลของน้ำดีจากตับอ่อนเนื่องจากยาหรือการอุดตันนอกตับ เช่น การ
เกิดก้อนนิ่วอุดตันท่อน้ำดี สำหรับค่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่สูงขึ้นก็สามารถบ่งชี้ถึงภาวะการถูกอุดตัน
ของตับได้ การตรวจเอนไซม์ซีรั่ม กลูแทมิค อ็อกซาโลอะซิติก ทรานซามิเนส และซีรั่ม กลูแทมิค ไพรูวิก
ทรานซามิเนสจะเป็นข้อบ่งชี้ถึงการเสียหายของเซลล์ตับเพราะเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีระดับสูงใน
ตับ^(13, 16-25) ดังนั้นแม้ว่าหนูขาวที่ได้รับสารสกัดพรมมีจะมีค่าเคมีคลินิกบางค่าที่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อ
เทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ค่าดังกล่าวมีความแตกต่างกันเล็กน้อยซึ่งไม่ได้แสดงให้เห็นว่าสมรรถภาพการ
ทำงานของตับอ่อน ไตและตับลดต่ำลงและค่าทุกค่ายังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน⁽²⁶⁾ นอกจากนี้ยังไม่พบความ
ผิดปกติทางร่างกายหรือพฤติกรรมใดที่แสดงได้ว่ามีความผิดปกติทางสรีรวิทยาของร่างกายสัตว์ทดลองและ
พยาธิสภาพของอวัยวะที่สำคัญคือ ตับ ไตและตับอ่อน เกิดขึ้น

จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันและเรื้อรัง อาจสรุปได้ว่าสารสกัดพรมมีไม่ก่อความเป็นพิษ
เนื่องจากการป้อนสารสกัดพรมมีในขนาดสูง (5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) ทางปาก ครั้งเดียว
และการป้อนสารสกัดพรมมีทุกวันเป็นเวลา 270 วันไม่ก่อให้เกิดสัญญาณและอาการแสดงของความเป็นพิษ

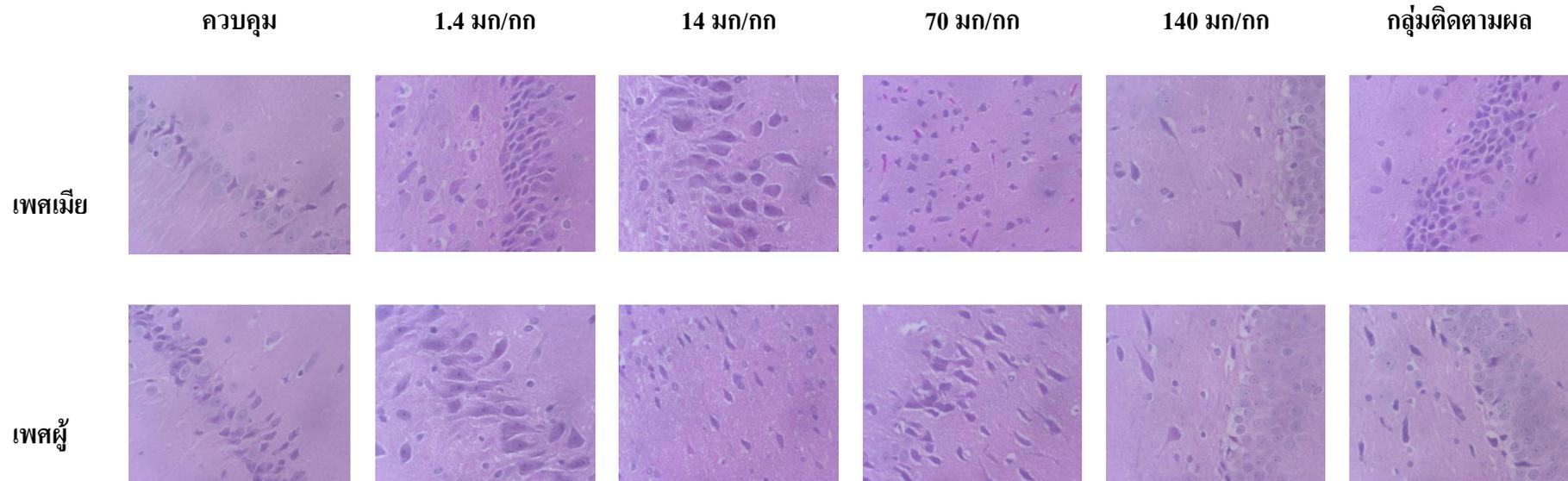
บรรณานุกรม

1. Derelanko MJ, Hollinger MA. (1995) CRC handbook of toxicology. CRC Press, Inc. Florida.
2. DeGeorge JJ, Ahn CH, Andrews PA, Brower ME, Giorgio DW, Goheer MA, Lee-Ham DY, McGuinn WD, Schmidt W, Sun CJ, Tripathi SC. (1998) Regulatory considerations for preclinical development of anticancer drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 41(3):173-85.
3. Gad SC. (1995) Safety assessment for pharmaceuticals. Van Nostrand Reinhold, New York.
4. Grieshaber CK, Marsoni S. (1986) Relation of preclinical toxicology to findings in early clinical trials. *Cancer Treat Rep* 70(1):65-72.
5. Malmfors T, Teiling A. (1983) LD50-its value for the pharmaceutical industry in safety evaluation of drugs. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 52 Suppl 2:229-246
6. Newell DR, Burtles SS, Fox BW, Jodrell DI, Connors TA. (1999) Evaluation of rodent-only toxicology for early clinical trials with novel cancer therapeutics. *Br J Cancer* 81(5):760-8.
7. OECD guideline for testing of chemical. Organization for economic cooperation and development. 1981.
8. OECD guideline for testing of chemical. Organization for economic cooperation and development. 2001.
9. Van Cauterem H, Bentley P, Bode G, Cordier A, Coussement W, Heining P, Sims J. (2000) The industry view on long-term toxicology testing in drug development of human pharmaceuticals. *Pharmacol Toxicol* 86 Suppl 1:1-5.
10. World Health Organization (WHO). (2000) General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. World Health Organization, Geneva.
11. Williams JW, Nelson DA, Morris MW. (1990) Examination of the blood. In: William JW., editor. *Hematology international*. 4th ed. New York: Mc Graw-Hell. p. 9-24.
12. Gregg LV. (2000) Anemias and Polychythenias. In: *Hematology Techniques and Concepts for Veterinary Technicians*. U.S.A: Iowa State University Press. p. 95-101.
13. Levine BS. (2002) Animal Clinical Pathology. In: Derelanko MJ, Hollinger MA, editors. *Handbook of Toxicology*. 2nd ed., U.S.A: CRC Press. p. 742-768.

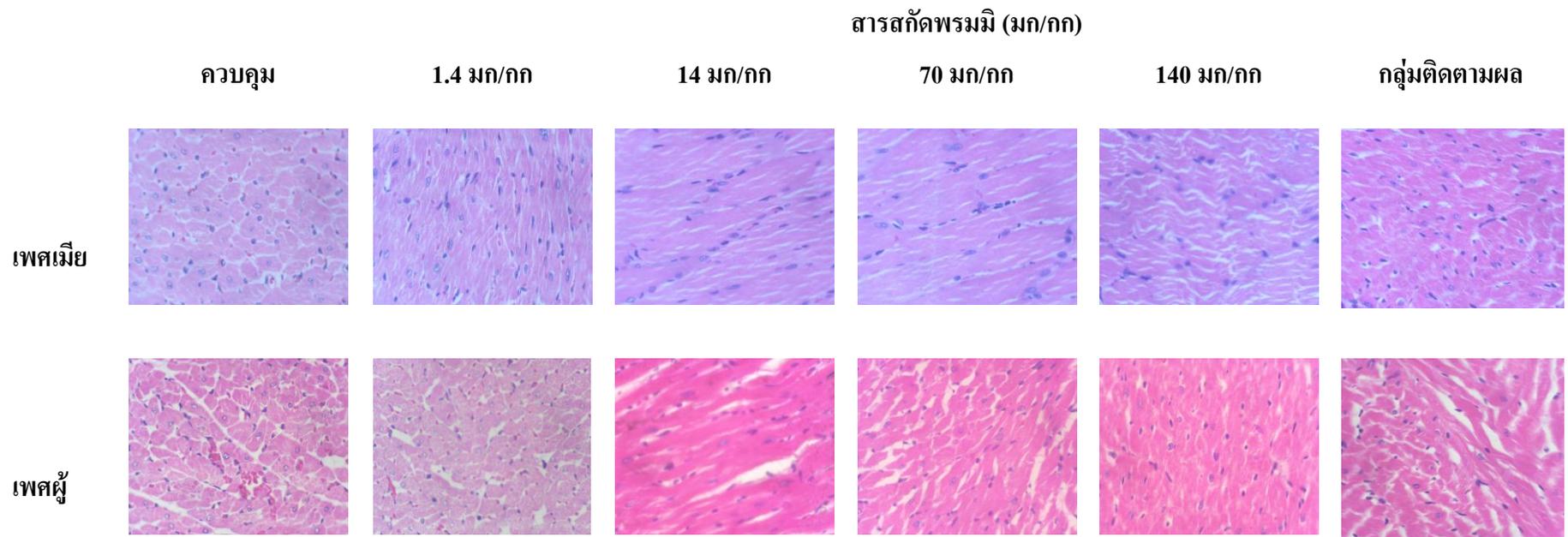
14. Inala P, Sirimontaporn A, Inpukaew R, Rungrojajinda K, Kengkoom K, Ratanasak W, Buripakdi Lawson D. (2002) Hematological analysis of outbred Sprague-Dawley rat in the Facility of National Laboratory Animal Centre. 28th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand.
15. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, Moor DM. (2000) Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Philadelphia: Lea Febiger.
16. วิบูล วิหรานันต์, กนกนาค ชูปัญญา, 2525. เคมีคลินิก. โครงการตำราศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล, 554 หน้า.
17. Anderson SC, Cockayne S. (1993) Clinical Chemistry Concepts and Applications. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 748 p.
18. Laird CW. (1997). Handbook of Laboratory Animal Science. Vol. II, Melby, E.C and Altman, N.H. (ed.), p. 365-396.
19. Ringler DH, Dabich L. (1979) The Laboratory Rat. Vol. I. Biology and Disease, Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. (ed.), p. 113-117.
20. Sacher RA, McPherson RA. (1991) General chemistry. In: Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Test, 10th ed., F.A. Davis Company, U.S.A., p. 318-365.
21. Sacher RA, McPherson RA. (1991) Test of liver function. In: Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Test, 10th ed., F.A. Davis Company, U.S.A., p. 416-443.
22. Caisey JD, King DJ. (1980) Clinical chemical values for some common laboratory animals. Clin Chem 26:1877-1879.
23. Young LY, Holland EG. (1995) The clinical use of drugs: Interpretation of clinical laboratory tests 6th ed., Vancouver: Lippincott Williams & Wilkins. p. 4-20.
24. John CP. (1995) Animal Histopathology. In: CRC Handbook of Toxicology, Michael, J.D. and Manfred, A.H. (ed.), CRC Press, Inc., U.S.A., p. 451-515.
25. Barry SL. (1995) Animal Clinical Pathology. In: CRC Handbook of Toxicology, Michael, J.D. and Manfred, A.H. (ed.), CRC Press, Inc., U.S.A., p. 517-537.
26. Angkhasirisap W, Inala P, Sirimontaporn A, Inpukaew R, Rungrojajinda K, Kengkoom K, Ratanasak W, Buripadi Lawson D. (2002) Blood chemistry profiles of outbred Sprague-Dawley rat in the Facility of National Laboratory Animal Centre. 28th Congress on Science and Technology of Thailand.

ภาคผนวก

สารสกัดพรมมิ (มก/กก)

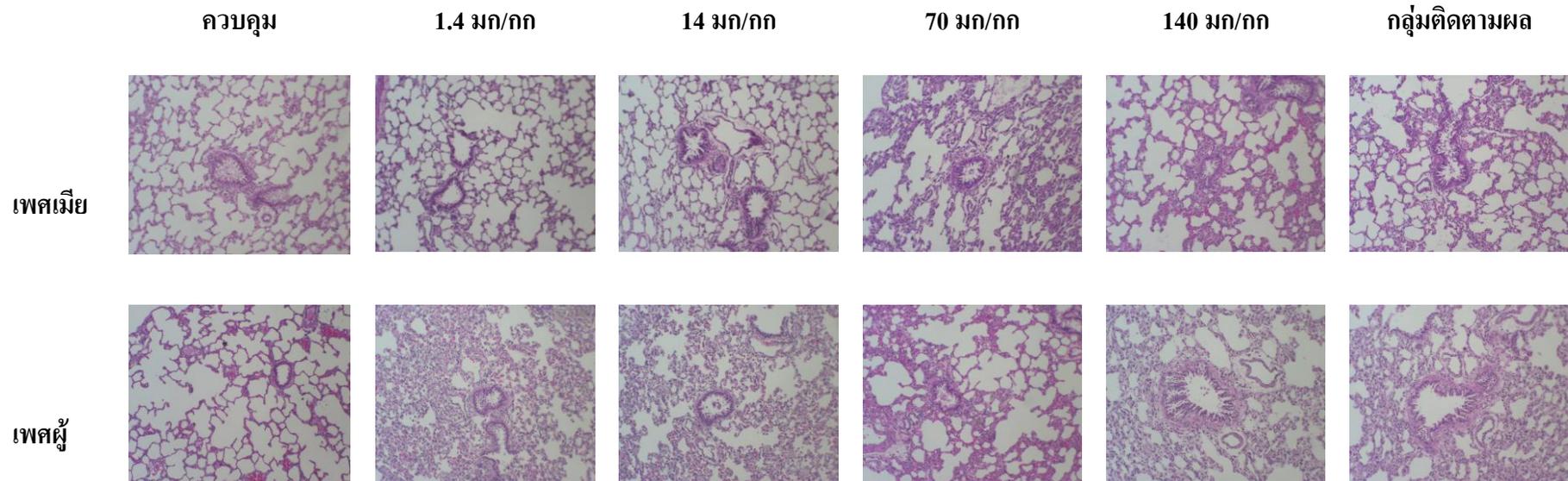


รูปที่ 6-1 จุดกายวิภาคของสมองจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ



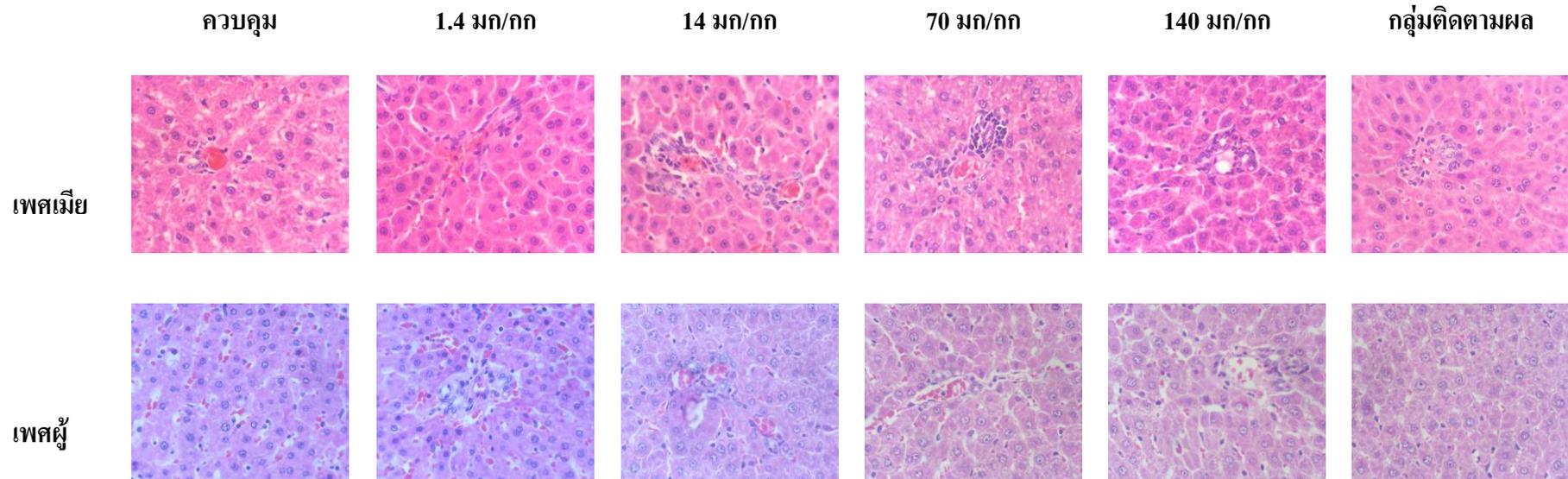
รูปที่ 6-2 จุลกายวิภาคของหัวใจจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

สารสกัดพรหมิ (มก/กก)



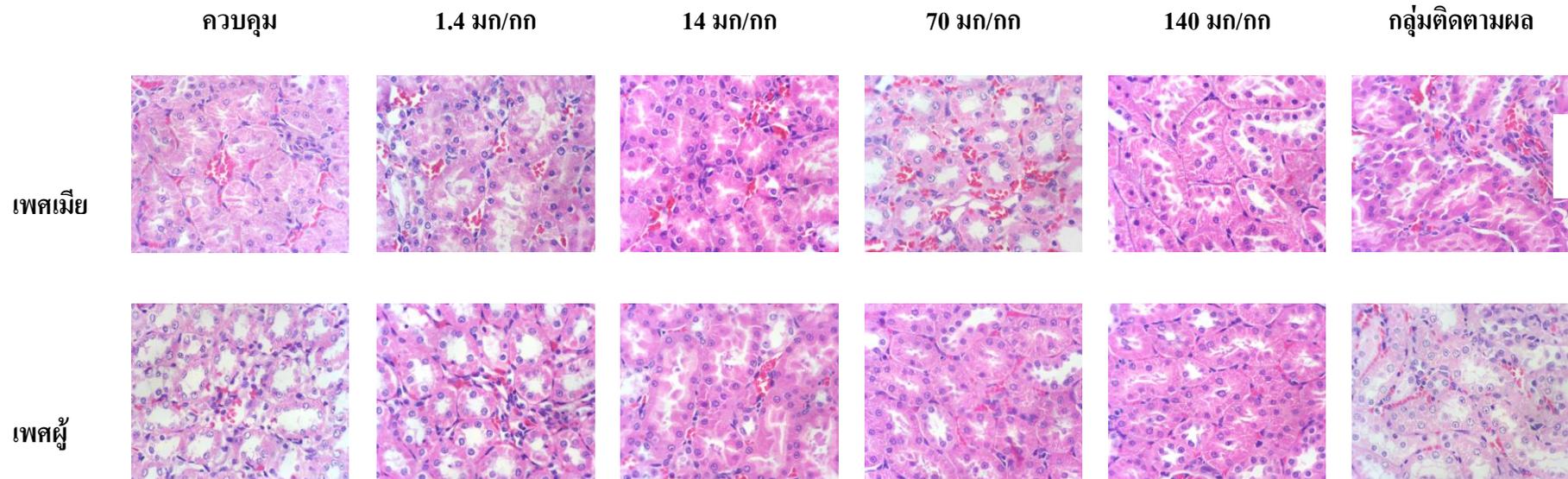
รูปที่ 6-3 จุลกายวิภาคของปอดจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรหมิ

สารสกัดพรมมิ (มก/กก)

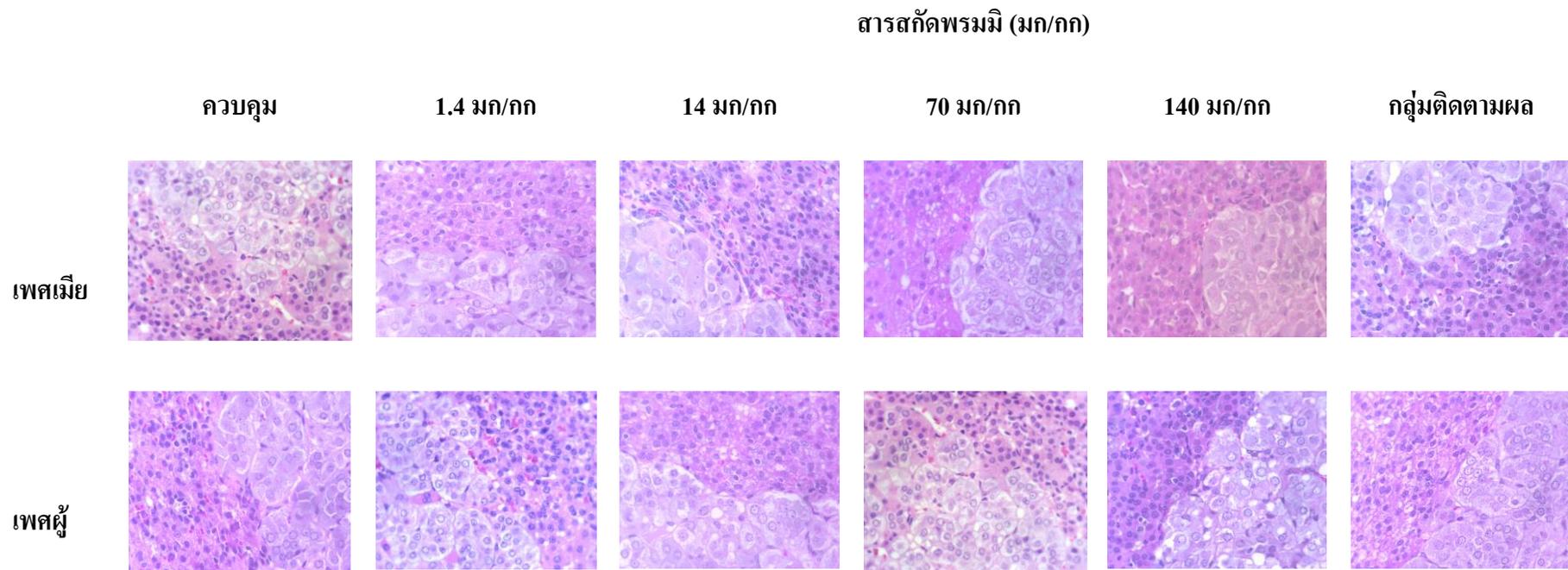


รูปที่ 6-4 จุดกายวิภาคของตับจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

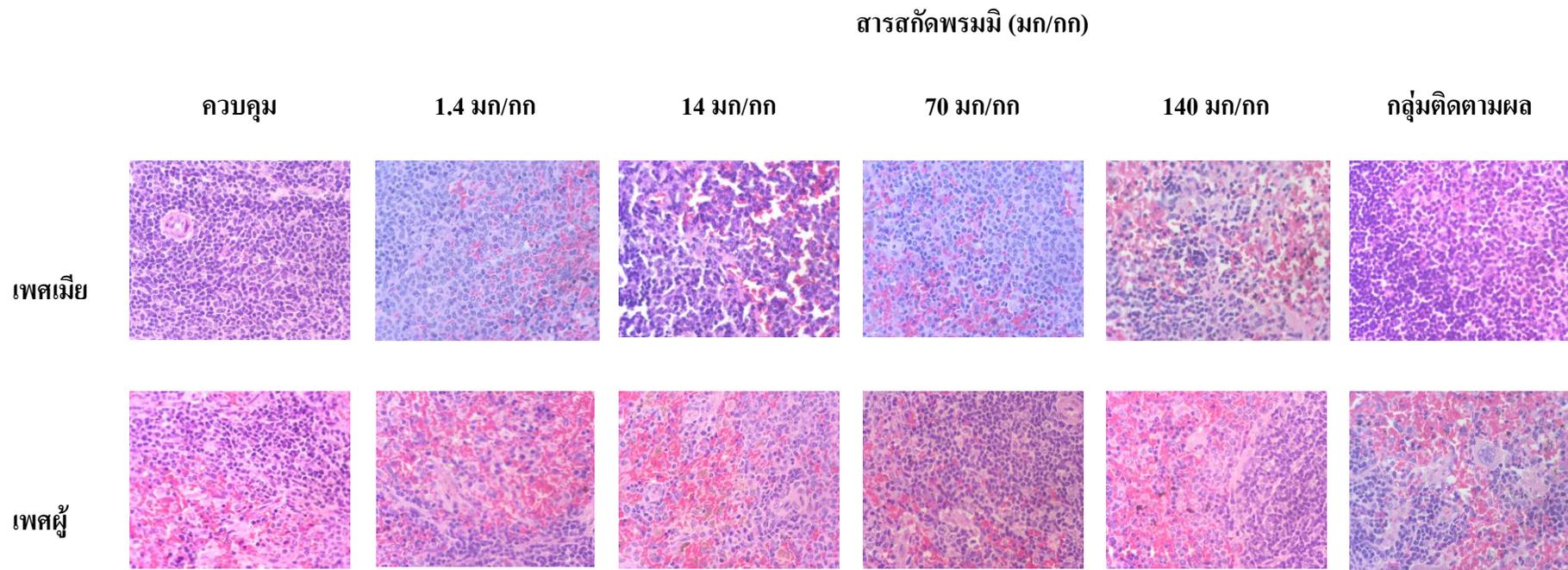
สารสกัดพรมมิ (มก/กก)



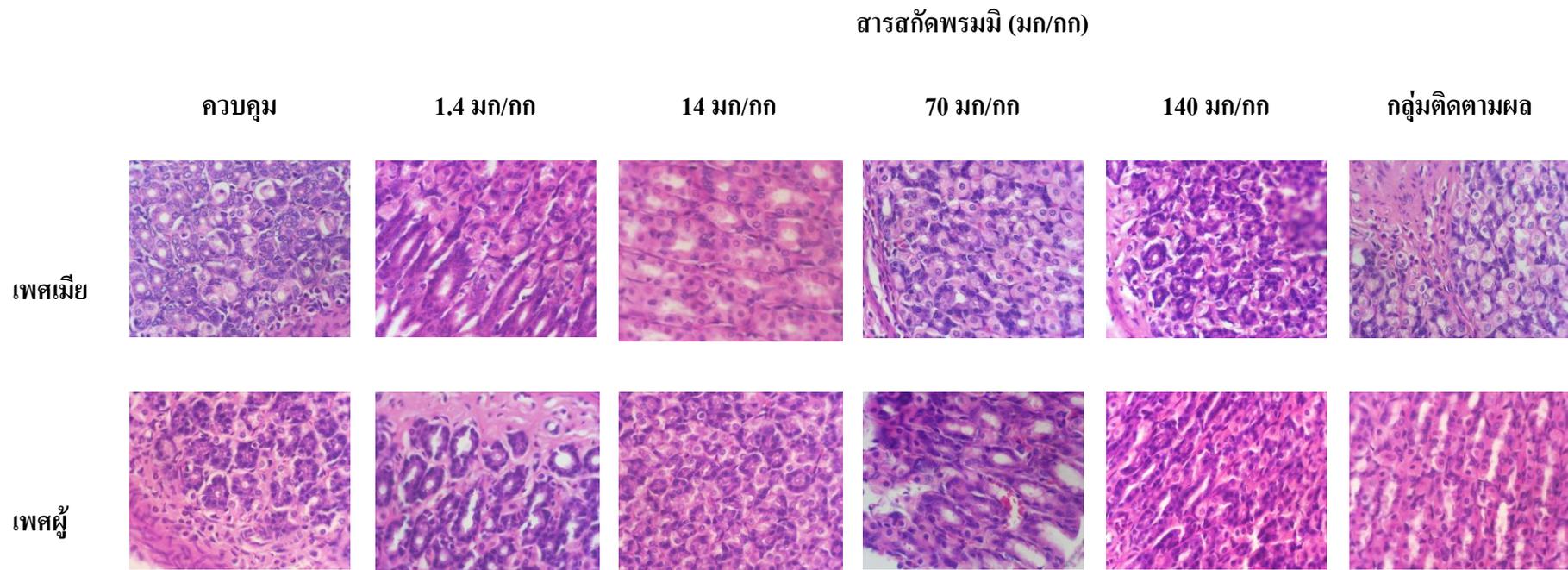
รูปที่ 6-5 จุลกายวิภาคของไตจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ



รูปที่ 6-6 จุดกายวิภาคของต่อมหมวกไตจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

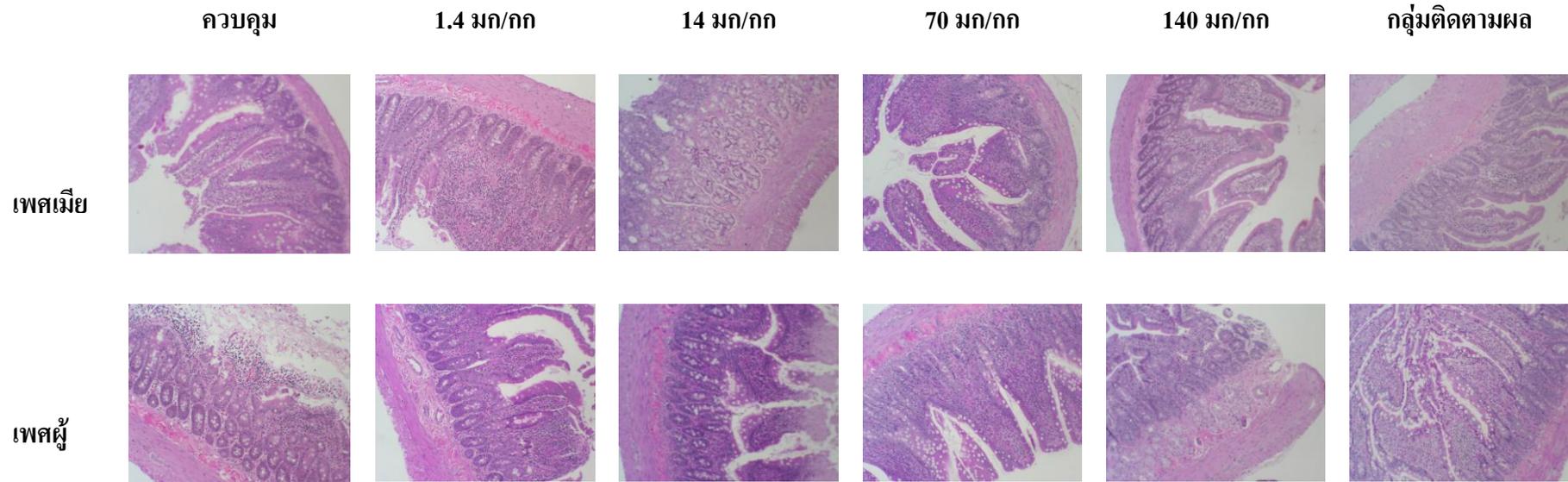


รูปที่ 6-7 จุดกายวิภาคของม้ามจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ



รูปที่ 6-8 จุดกายวิภาคของกระเพาะอาหารจากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ

สารสกัดพรหมิ (มก/กก)



รูปที่ 6-9 จุลกายวิภาคของลำไส้จากหนูขาวในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรหมิ

เพศเมีย

สารสกัดพรมมิ (มก/กก)

ควบคุม

1.4 มก/กก

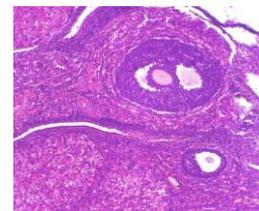
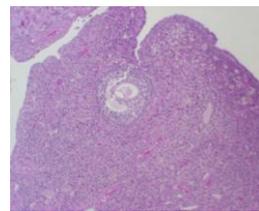
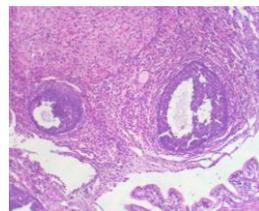
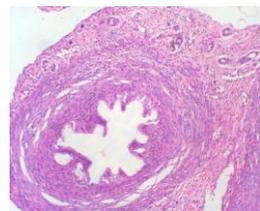
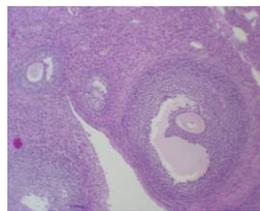
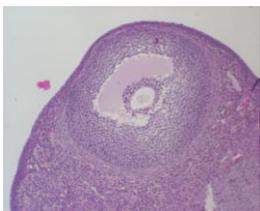
14 มก/กก

70 มก/กก

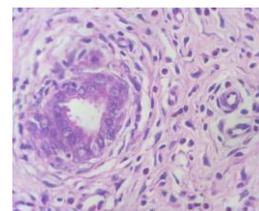
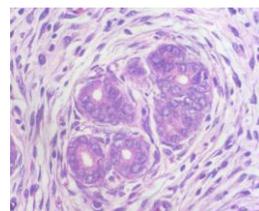
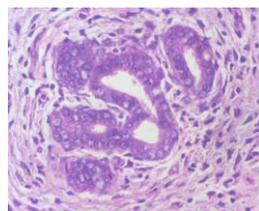
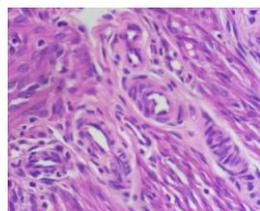
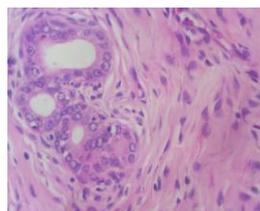
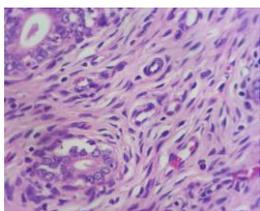
140 มก/กก

กลุ่มติดตามผล

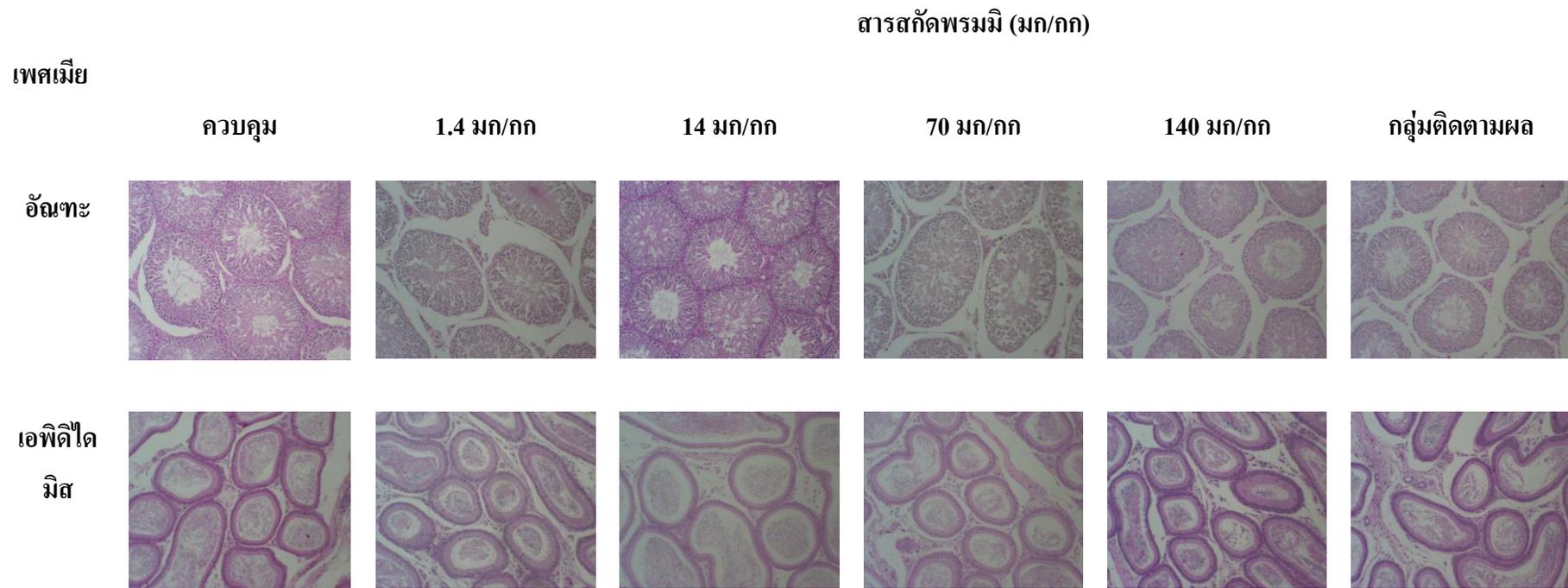
รังไข่



มดลูก



รูปที่ 6-10 จุดกายวิภาคของรังไข่และมดลูกจากหนูขาวเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ



รูปที่ 6-11 จุดกายวิภาคของอัณฑะและเอพิไดไดมิตจากหนูขาวเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดพรมมิ



รายงานการวิจัย
โครงการย่อยที่ 7
เรื่อง

การศึกษาเพื่อส่งต่อเทคโนโลยีการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิสู่อุตสาหกรรม

**Study on technology transfer of Brahmi food supplement
production for industry**

โดย

รศ.ดร.กรกนก อิงคินันท์

รศ.ดร. วราภรณ์ ภูตะลูน

ดร.วฐุ พรหมพิทยารัตน์

รศ. ดร. ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล

น.ส. ชรินทร์น์ โตเทียม

น.ส. อรยา เครื่องทิพย์

น.ส. นิตาชล ช่างเหล็ก

น.ส. รัตนาพร สิริบาล

น.ส. ศุภรัตน์ การุณย์วิจิตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปีงบประมาณ 2552

บทคัดย่อ

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยและพัฒนา พรหมมี (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Scrophulariaceae family) เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารบำรุงความจำอย่างต่อเนื่อง โครงการนี้จัดทำขึ้นเพื่อเตรียมข้อมูลที่สำคัญสำหรับการส่งต่อเทคโนโลยีการผลิตพรหมมีสู่ภาคอุตสาหกรรม ผู้วิจัยได้จัดทำคู่มือแนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรหมมี แนวทางการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในสมุนไพรพรหมมี และแนวทางการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรหมมี ขึ้น โดยใช้ข้อมูลที่ได้ผ่านการทดลองปฏิบัติจริง พรหมมีสามารถเก็บเกี่ยวได้หลังเพาะปลูกเป็นเวลา 2 เดือน ส่วนที่ใช้คือส่วนเหนือดินที่ตัดจากยอดประมาณ 10-20 ซม เมื่อเก็บเกี่ยวแล้วพรหมมีจะถูกทำให้แห้งที่ จากนั้นบดเป็นชิ้นเล็กๆ ผงพรหมมีแห้งต้องมี total saponin glycosides ซึ่งประกอบด้วย Bacoside A₃, Bacopasaponin C, Bacopaside I, II, และ Bacopaside X ไม่ต่ำกว่า 1 % w/w และสารสกัดพรหมมีต้องมี total saponin glycosides ไม่ต่ำกว่า 5 % w/w การผลิตพรหมมีได้ผลผลิต 40 กก ต่อไร่ต่อเดือน ราคาต้นทุนพรหมมีคือ 2.3 บาทต่อเม็ด

Abstract

Brahmi (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Scrophulareaceae family) has been intensively studied by our group to develop it as a food supplement for memory improvement. In this project, we aimed at preparing necessary information for technology transfer to industry. The guidelines on good agricultural and collection practices for Brahmi, the Guidelines for analysis of saponins in Brahmi and the guidelines for manufacturing of Brahmi tablets were established from the experimental work. Brahmi was ready for harvesting 2 month after cultivation. The shoot of Brahmi which was 10-20 cm from the topmost of the plant was collected, dried at 55 °C and ground. the dried Brahmi powder should contain total saponin glycosides consisting of BacosideA₃, Bacopasaponin C, Bacopaside I, II, and Bacopaside X not less than 1 % w/w. The standardized extract of Brahmi should contain not less than 5 % total saponin. The production of Brahmi dried powder was approximately 40 kg/rai/month. The cost of tablet was calculated as 2.3 baht /tablet.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	7-ii
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	7-iii
สารบัญ	7-iv
สารบัญตาราง	7-v
สารบัญรูป	7-vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	7-vii
บทที่ 1 บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	7-1
บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย	7-3
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	7-14
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	7-35
บรรณานุกรม	7-36
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	7-39
ภาคผนวก ข	7-62
ภาคผนวก ค	7-81

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
7-1 ส่วนผสมสำหรับการเตรียมยาเม็ดสารสกัดพรมมิขนาด 300 มิลลิกรัม	7-9
7-2 ผลการวิเคราะห์ดิน	7-14
7-3 ความหนาแน่นของดินพรมมิในช่วงระยะเวลาต่างๆ	7-14
7-4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในผงพรมมิแห้ง	7-25
7-5 สรุปผลการทดสอบคุณภาพด้านต่างๆ ของยาเม็ดสารสกัดสมุนไพรพรมมิ	7-26
7-6 ค่า cross reactivities (CRs) ของสารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนต่อ bacovirus A ₃ ต่อสารจากธรรมชาติชนิดต่างๆ ในการทดสอบโดยใช้วิธี ELISA	7-28
7-7 ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์หาปริมาณสาร bacovirus A ₃ ด้วยวิธี ELISA	7-29
7-8 ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์หาปริมาณสาร bacovirus A ₃ ด้วยวิธี ELISA	7-29
7-9 ปริมาณสารกลุ่ม jujubogenin glycosides จากพืชพรมมิจากการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA และ HPLC (n=3)	7-30
7-10 ค่าใช้จ่ายในการปลูกพรมมิ	7-31
7-11 ค่าใช้จ่ายในการสกัดสมุนไพรพรมมิ	7-32
7-12 ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์สารสกัดสมุนไพรพรมมิ	7-32
7-13 ค่าใช้จ่ายในการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิ	7-33
7-14 ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	7-33
7-15 ค่าใช้จ่ายทั้งหมด	7-34

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า	
7-1	แปลงที่ใช้ในการเพาะปลูกพรมมิ	7-3
7-2	การปลูกพรมมิ	7-4
7-3	การเก็บเกี่ยวพรมมิ	7-4
7-4	การตากแห้งพรมมิ	7-5
7-5	การอบแห้งพรมมิ	7-6
7-6	การอบแห้งพรมมิโดยใช้ตู้อบพลังงานแสงอาทิตย์	7-6
7-7	แผนภาพการกระตุ้นหนูให้สร้างสารภูมิคุ้มกัน	7-11
7-8	<i>Bacopa monnieri</i> (L.) Wettst. (aerial part)	7-16
7-9	ลักษณะของการ cross section ใบพรมมิ	7-17
7-10	ปากใบ จากการ cross section ใบพืชพรมมิ	7-17
7-11	ลำต้นพรมมิ	7-18
7-12	reticulated vessel	7-18
7-13	trichome	7-19
7-14	glandular trichome	7-19
7-15	Epidermis	7-20
7-16	stoma	7-20
7-17	parenchyma cells	7-21
7-18	ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารสกัดพรมมิ ที่ความเข้มข้น 0.02 g/mL จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ 205 nm	7-23
7-19	Calibration curve สารซาโปนินที่พบในพรมมิ	7-24

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

กก.	กิโลกรัม
ซม. เซนติเมตร	
ม.	เมตร
มก.	มิลลิกรัม
°C	Degree celcius
g/mL	Gram per milliliter
HPLC	High performance liquid chromatography
M	Molar
mg	Milligram
ml, mL	milliliter
mg/ml	Milligram per milliliter
rpm	Round per minute
ppm	Part per million
µg	Microgram
µl, µL	Microliter
µm	Micrometer

บทที่ 1

บทนำและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรไทยให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัย ตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก หรือมาตรฐานสากล มีความจำเป็นต่อการพัฒนาสมุนไพรของประเทศให้เป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพที่มีมาตรฐานสำหรับใช้รักษาโรค ตลอดจนการเป็นสินค้าส่งออกสู่ตลาดโลก ถึงแม้ว่ายาจากสมุนไพรไทยได้มีการผลิตขายในท้องตลาดแต่ก็จะเป็นยาแผนโบราณ มีการขายภายในประเทศ หรือ ประเทศเพื่อนบ้านใกล้เคียง แต่ยังไม่สามารถส่งออกไปทั่วโลก เนื่องจากตำรับยาดังกล่าวไม่มีการควบคุมคุณภาพ (quality assessment) การนำ Good Laboratory Practice (GLP) ซึ่งเป็นหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีของห้องปฏิบัติการมาใช้ในการควบคุมคุณภาพและปริมาณสารสำคัญของวัตถุดิบผลิตภัณฑ์ระหว่างผลิต และผลิตภัณฑ์ โดยจะต้องมีวิธีการควบคุมคุณภาพที่เชื่อถือได้ ไม่ว่าจะเป็นด้านการเพาะปลูก ชนิดของสมุนไพร การควบคุมคุณภาพการผลิต การตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ตลอดจนผลการทดสอบในคน ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นเรื่องที่สำคัญมาก

พรมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bacopa monniera* (L.) จัดอยู่ในวงศ์ Scrophulariaceae เป็นพืชสมุนไพรที่พบในเมืองไทยและประเทศแถบเอเชีย พรมมีใช้เป็นยาสมุนไพรในตำรายุทธเวทของอินเดียสำหรับช่วยเพิ่มความจำ มีสารออกฤทธิ์เป็นสารกลุ่ม saponins ซึ่งแบ่งเป็นสองกลุ่มย่อย คือ jujubogenin glycosides และ pseudojujubogenin glycosides โดยในปี 2548-2550 คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาพัฒนาสมุนไพรพรมมีเพื่อใช้เป็นสมุนไพรบำรุงความจำ ทั้งในด้านการศึกษาทางเคมี การพัฒนาการปลูก การสกัด การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพโดยใช้วิธี HPLC และ ELISA หาปริมาณของสาร saponins การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพรมมีในทางเภสัชวิทยาทั้งในระดับหลอดทดลอง สัตว์ทดลอง การศึกษาทางพิษวิทยา จนถึงการศึกษาทางคลินิก ในอาสาสมัครวัยกลางคนและสูงอายุ นับว่าเป็นการศึกษาที่ครอบคลุมความรู้พื้นฐานของพรมมี หากแต่ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของการขยาย scale การผลิต ทั้งในด้านมาตรฐานวัตถุดิบสมุนไพร สารสกัดจากพืช ผลิตภัณฑ์ยาเม็ดและการควบคุมคุณภาพ เพื่อให้มีความพร้อมในการส่งต่อเทคโนโลยีให้กับผู้ผลิตภาคเอกชน

การศึกษานี้จัดทำขึ้นเพื่อเป็นการวางมาตรฐานการผลิตวัตถุดิบ สารสกัด และผลิตภัณฑ์ tablet พรมมี เพื่อส่งถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ภาคเอกชน โดยครอบคลุมในด้านต่างๆ ดังนี้

1. การศึกษาทางเขตรกรรม เพื่อขยาย scale การผลิตของสมุนไพรพรมมี
2. การจัดทำมาตรฐานการปลูกและเก็บเกี่ยวสมุนไพรพรมมี

3. การจัดทำมาตรฐานวัตถุพิษสมุนไพร โดยมีการศึกษาทางลักษณะภายนอก จุลทรรศน์ ลักษณะ ปริมาณน้ำ ปริมาณเถ้า สิ่งปลอมปน และอื่นๆ โดยใช้ข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลกเป็น guideline
4. การจัดทำมาตรฐานการเตรียมผลิตภัณฑ์พรมมิในระดับอุตสาหกรรม
5. การจัดทำมาตรฐานวิธีการวิเคราะห์สมุนไพร โดยวิธีทาง HPLC
6. การพัฒนาชุดทดสอบที่สามารถตรวจสอบปริมาณของสาร saponins ในพรมมิ โดยใช้สารภูมิต้านทานแบบมอโนโคลนอลต่อ bacopaside I และ bacoside A₃ ที่ผลิตได้ด้วยวิธี ELISA และ immunochromatographic strip
7. การจัดทำมาตรฐานกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์พรมมิในระดับอุตสาหกรรม

บทที่ 2

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การศึกษาการขยาย scale การปลูกพรมมิและมาตรฐานการปลูก

1.1 การเตรียมดิน

แปลงเพาะปลูกตั้งอยู่ตรงข้ามวิทยาลัยพลังงานทดแทน ภายในมหาวิทยาลัยนเรศวร บนพื้นที่ 1.5 ไร่ ซึ่งในการเพาะปลูกจะทำการไถดิน 2 ครั้ง โดยไถครั้งแรก เพื่อเป็นการพลิกดินขึ้นมาแล้วเว้นช่วงให้เมล็ดวัชพืชงอกเป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วไถครั้งที่ 2 เพื่อฝังกลบต้นวัชพืชลงในดิน และเป็นการปรับระดับพื้นที่ให้เรียบสม่ำเสมอ เนื่องจากพรมมิเป็นพืชที่ชอบน้ำจึงต้องมีการทำคันดินกั้นน้ำ (กว้าง 0.5 ม. ยาว 60 ม.) เพื่อเก็บกักน้ำไว้ในแปลง มีการทำช่องทางระบายน้ำเข้าออกจากแปลงด้วย



รูปที่ 7-1 แปลงที่ใช้ในการเพาะปลูกพรมมิ

1.2 วิธีขยายพันธุ์

นำต้นอ่อนที่ได้จากการแตกจากต้นแม่มาตัดให้ได้ความยาวประมาณ 1 ฟุต โดยต้นอ่อนที่ตัดได้นั้นต้องมีข้อที่มีรากติดอยู่ แล้วนำต้นอ่อนที่ได้ไปปักดำลงในแปลงนาที่เตรียมไว้ ให้แต่ละต้นห่างกันเป็นระยะ 30 เซนติเมตร



รูปที่ 7-2 การปลูกพรมมิ

1.3 การดูแลรักษาพรมมิ

ใส่ปุ๋ยหลังจากปลูกพรมมิไปแล้ว 1 สัปดาห์ โดยใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 อัตราส่วนประมาณ 10 กก./ไร่/ครั้ง จากนั้นใส่อีกครั้งเมื่อพรมมิมิลักษณะเหลืองหรือไม่แข็งแรง โดยใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตราส่วนประมาณ 10 กก./ไร่/ครั้ง ควรรักษาระดับน้ำให้อยู่ในช่วง 2-10 ซม. เนื่องจากพื้นดินตลอดเวลาการเพาะปลูกคอยกำจัดวัชพืชหรือศัตรูพืชด้วยวิธีการทางธรรมชาติ เช่น ถอน เก็บไปทิ้งที่อื่น

1.4 การเก็บเกี่ยว

เก็บส่วนที่พื้นน้ำความยาวประมาณ 10-20 ซม. จากยอด เก็บเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ประมาณ 1.5-2 เดือนขึ้นไปหลังจากทำการปลูก วิธีเก็บใช้วิธีเด็ด ตัด หรือใช้เกี่ยวเกี่ยว



รูปที่ 7-3 การเก็บเกี่ยวพรมมิ

1.5 วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว

เมื่อเก็บเกี่ยวพืชสมุนไพรจากแปลงปลูกแล้วการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวเป็นสิ่งจำเป็นมาก เพื่อรักษาคุณภาพของพืชสมุนไพรให้ได้ผลดีที่สุดต่อการนำไปใช้

1. การทำความสะอาดและคัดแยกผลผลิตที่ได้มาตรฐาน

1.5.1. คัดแยกสิ่งปลอมปนออก เช่น หิน ดิน ทราย ส่วนของพืชที่ปะปน หรือสมุนไพรอื่นที่คล้ายคลึง กันปะปนมา รวมทั้งเตี๊ยะรากที่ติดมาขณะเก็บเกี่ยวทิ้ง

1.5.2. ล้างด้วยน้ำสะอาดประมาณ 3 รอบหรือจนกว่าจะไม่มีฝุ่นผงในน้ำ

1.5.3. นำไปผึ่งบนตะแกรงให้สะเด็ดน้ำ

การทำให้แห้ง

การทำสมุนไพรให้แห้งเพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาและการนำมาใช้ สมุนไพรที่มีความชื้นมากเกินไปจะทำให้เกิดเชื้อราและแบคทีเรีย และยังเร่งให้เกิดการสูญเสียสารสำคัญด้วยวิธีการทำแห้งทำได้โดยการตากแห้งหรืออบแห้ง

1. การตากแห้งสมุนไพร ควรตากบนตะแกรงโปร่ง สะอาดในสถานที่เปิดโล่ง ห่างไกลจากถนน หรือสิ่งแวดล้อมที่มีฝุ่นละอองมาก โดยทำการตากสมุนไพร 1-2 วัน หรือจนกว่าจะแห้ง ส่วนในตอนค่ำควรเก็บสมุนไพรเข้าภายในอาคาร หรือใช้ผ้าพลาสติกคลุมเพื่อป้องกันความชื้นจากน้ำค้าง



รูปที่ 7-4 การตากแห้งพรมมิ

2. การอบแห้ง เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถทำให้พืชสมุนไพรแห้ง ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและประหยัดเวลาและได้วัตถุดิบที่มีคุณภาพดี อุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้ง 55 °C นานประมาณ

48 ชั่วโมง เพื่อเป็นการประหยัดพลังงานอาจใช้วิธีการตากแดด 1 วัน พอให้สมุนไพรแห้งแล้ว นำเข้าตู้อบ 55 °C นาน 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าสมุนไพรจะแห้งสนิท



รูปที่ 7-5 การอบแห้งพรมมิ



รูปที่ 7-6 การอบแห้งพรมมิโดยใช้ตู้อบพลังงานแสงอาทิตย์

3. การย่อขนาดใช้เครื่องบดขยสมุนไพรอย่างหยาบบดสมุนไพรพรมมิแห้ง จะได้ผงสมุนไพรพรมมิหยาบ หรือใช้เครื่องบดสมุนไพรขนาดเล็ก

2. การศึกษามาตรฐานวัตถุผสมสมุนไพร

ผู้วิจัยได้เริ่มจัดทำมาตรฐานการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบ โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์วัตถุดิบดังนี้

การวิเคราะห์สารโดย HPLC

เครื่อง HPLC ผลิตโดย Shimadzu ประกอบด้วย Pump: LC-20AT, Detector: SPD-20A, Injector: 20 μ L

ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 205 nm

คอลัมน์ RP-18 column (150 mm x 4.6 mm, particle size 5 μ m)

Mobile phase: 0.2 % O-phosphoric acid: acetonitrile (65:35% v/v) pH 3.0 โดย ปรับ pH ด้วย 5M NaOH

Flow rate: 1.0 ml/min

Calibration curve

ขั้นตอนการทำ Calibration curve สารซาโปนิน

1. เจือจางสารมาตรฐาน Bacoside A3, Bacopaside II, Bacopaside X, Bacopasaponin C และ Bacopaside I จาก stock solution ด้วย methanol HPLC grade เพื่อให้ได้ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 6.25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml และ 200 μ g/ml ตามลำดับ
2. นำสารมาตรฐานรวมที่ได้ทั้ง 5 ความเข้มข้นไปหา Calibration curve ด้วย HPLC

ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดสมุนไพรเพื่อวิเคราะห์คุณภาพสมุนไพรแห้ง

1. นำพรมที่ผ่านการอบแห้งมาบดเพื่อลดขนาด โดยใช้เครื่องบดย่อยขนาดสมุนไพรอย่างหยาบหรือเครื่องบดสมุนไพรขนาดเล็ก
2. นำผงสมุนไพรผ่านร่อนเบอร์ 60
3. ชั่งผงพรมปริมาณ 500 mg

การสกัดสมุนไพร

1. นำลำโพงบริเวณก้นกระบอกฉีดขนาด 10 ml ที่เอาก้านสูบออกแล้ว
2. เติผงพรม 500 mg ลงในกระบอกฉีด เติมน้ำกลั่นประมาณ 5 ml เพื่อให้ผงพรมเปียกน้ำกลั่น จากนั้นปล่อยน้ำกลั่นออกจากกระบอกฉีดจนหมด แล้วใช้พาราฟินพันปลายกระบอกฉีด
3. เติมน้ำประมาณ 5 ml แล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง
4. แกะพาราฟินออก ใช้ก้านสูบดันน้ำออกให้หมด
5. นำผงสมุนไพรเปียกที่ได้ใส่ลงใน Erlenmeyer flask แล้ว เติม 95% เอทานอล ปริมาณ 5 ml
6. นำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองเอาเฉพาะสารละลายในส่วนหน้า

7. นำกากที่เหลือเติม 95% เอทานอลปริมาณ 3 ml แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที กรองเอาสารละลายเพื่อนำไปวิเคราะห์
8. นำกากที่เหลือเติม 95% เอทานอลปริมาณ 3 ml นำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที กรองเอาสารละลายเพื่อนำไปวิเคราะห์อีกครั้งหนึ่ง
9. นำสารละลายที่กรองในข้อ 2.6-2.8 มาปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้ได้ ปริมาตร 10 ml
10. ทำซ้ำ 3 ครั้ง (3 replicate)
11. กรองสารละลายที่ได้ด้วย 0.45 m nylon syringe filter
12. นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

3. การศึกษามาตรฐานการเตรียมผลิตภัณฑ์พรมมิในระดับอุตสาหกรรม

ก. สารที่ใช้เตรียมยาเม็ดสารสกัดพรมมิ

ผงพรมมิ 500 กรัม ประกอบด้วย

สารสกัดพรมมิ	225.0 กรัม	(45%)
สารเพิ่มปริมาณ 1	137.5 กรัม	(27.5%)
สารเพิ่มปริมาณ 2	137.5 กรัม	(27.5%)

วิธีเตรียมผงพรมมิ

1. ผสมสารเพิ่มปริมาณ 1 และ 2 ในเครื่องผสมให้เข้ากัน
2. ค่อย ๆ เติมสารสกัดพรมมิลงในเครื่องผสม เติมน้ำเพื่อผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
3. นำไปผ่านร่อนเบอร์ 16 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
4. นำไปผ่านร่อนเบอร์ 18 อีกครั้งก่อนนำไปใช้
5. ทำการวัดความชื้นของแกรนูลสารสกัดพรมมิด้วยวิธี Loss on drying ก่อนการตั้งตำรับ

ตารางที่ 7-1 ส่วนผสมสำหรับการเตรียมยาเม็ดสารสกัดพรมมิขนาด 300 มิลลิกรัม

ลำดับที่	ส่วนประกอบ	ปริมาณ (มิลลิกรัม)
1	ผงแห้งสารสกัดพรมมิ	667.00
2	สารเพิ่มปริมาณ	13.62
3	สารช่วยแตกตัว	37.50
4	สารช่วยป้องกันการติดสาก	22.50
5	สารหล่อลื่น 1	7.50
6	สารหล่อลื่น 2	1.87
น้ำหนักรวม		750.00

หมายเหตุ: ในผงแห้งพรมมิมีสารสกัดพรมมิ 45%

ข. วิธีเตรียมส่วนผสม และการตอกผงยาเพื่อเตรียมยาเม็ดสารสกัดพรมมิ

- นำส่วนผสมสารเพิ่มปริมาณลงในโถรงบคให้ละเอียด
- นำส่วนผสมอื่น ๆ ยกเว้น ผงแห้งสารสกัดพรมมิ ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
- นำผงแห้งสารสกัดพรมมิ ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน
- นำไปตอกด้วยเครื่องตอกยาเม็ดแบบใช้ไฟฟ้า โดยใช้เป้าและสากที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง ½ นิ้ว โดยให้น้ำหนักยาเม็ดพรมมิ 750 มิลลิกรัมต่อเม็ด

การเคลือบยาเม็ด

- เติม Methylene chloride : Ethanol (1:1) ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร แล้วค่อยๆ โพรยผง HPMC (15 cps) ลงไปในส่วนผสมที่ละเอียดจนหมด ทำการกวนโดยใช้ magnetic stirrer กวนตลอดเวลารอจน HPMC พองตัวเต็มที่ โดยจะเห็นเป็นสารละลายใสที่มีความหนืด ป้องกันการระเหยของตัวทำละลาย โดยปิดด้วย aluminium foil
- แบ่งสารละลายในข้อ 1 เติม PEG-4000 คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทส่วนผสมทั้งหมดลงในข้อ 1
- นำ Talcum และ Titanium dioxide คนให้เข้ากันในโถรงกระเบื้องที่แห้งและสะอาดให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
- แบ่งของผสมในข้อ 2 ประมาณ 500 มิลลิลิตร เติมลงในของผสมข้อ 3 แล้วค่อยๆ ผสมสารละลายอย่างช้าๆ ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน

5. นำส่วนผสมที่ได้ในข้อ 2 ที่เหลือประมาณ 200 มิลลิลิตรค่อยเทลงในสารละลายข้อ 4 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
6. ผสมสีผสมอาหาร สีเขียว 973 ในน้ำกลั่น (ความเข้มข้น 4%w/v) เทลงของผสมข้อ 5 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
7. ปรับปริมาตรจนครบ ด้วยส่วนผสมของ Methylene chloride: Ethanol (1:1) โดยในการผสมให้ทำการปิดปากภาชนะด้วย aluminium foil เพื่อลดการระเหยของตัวทำละลาย

สภาวะสำหรับการเคลือบยาเม็ดพรมมิ

หม้อเคลือบ	Thai Coater
หัวฉีดพ่น	IWATA
ความเร็วในการหมุนหม้อ	20 rpm
ความดันลม	2.5 bar (psi)
อุณหภูมิภายในเครื่อง	45-50 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิปล่องออก	40-45 องศาเซลเซียส
ปริมาณยา	2,000 เม็ด
ปริมาณน้ำยาเคลือบ	1,000 มิลลิลิตร

4. การพัฒนาชุดทดสอบสารชาโปนินในสมุนไพรพรมมิ

4.1. การผลิตสารภูมิต้านทานแบบมอโนโคลนอลต่อ bacopaside I และ bacoside A₃

4.1.1 วิธีการเตรียมสารก่อภูมิต้านทาน (antigen)

ทำการเตรียมสารก่อภูมิต้านทาน (antigen) โดยทำการเชื่อมต่อบacopaside I ซึ่งใช้เป็นสารก่อภูมิต้านทานนำมาทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่เพื่อสร้างแฮปเทน (hapten) โดยทำการเชื่อมต่อกับโปรตีน bovine serum albumin (BSA) และ human serum albumin (HSA) โดยนำมาทำปฏิกิริยากับสาร sodium periodate (NaIO₄) และทำการเชื่อมต่อกับโปรตีนโดยวิธีการสังเคราะห์และทำปฏิกิริยาเพื่อสร้างแฮปเทนมีดังนี้

1. เตรียมสารละลาย bacopaside I 4 mg ใน methanol 0.5 ml
2. เตรียมสารละลาย NaIO₄ ความเข้มข้น 4 mg/ml จำนวน 0.5 ml
3. ค่อยๆเติมสารละลายในข้อ 1 ลงในสารละลายในข้อ 2 ช้าๆ และทำการคนสารละลายโดยใช้แม่เหล็กคนสารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
4. เติมสารละลาย BSA ความเข้มข้น 4 mg ใน สารละลาย carbonate buffer (pH 9.6) 1 ml และทำการคนสารละลายเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

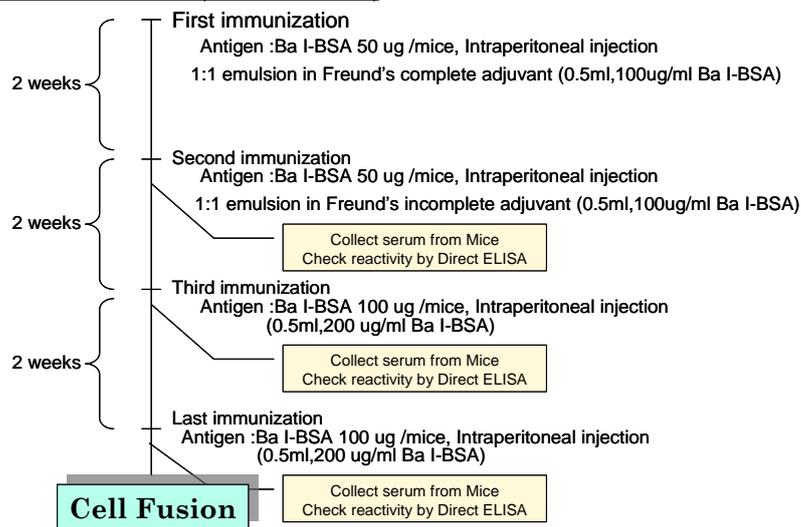
5. สารละลายที่ได้นำไป dialysis โดยใช้น้ำและทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง lyophilizer

จากนั้นทำการตรวจสอบการเชื่อมต่อกับโปรตีน โดยใช้วิธี MALDI mass spectroscopy
สำหรับการเตรียมสารก่อภูมิคุ้มกัน bacopside A₃ ทำด้วยวิธีเดียวกัน

4.1.2 การกระตุ้นหนูให้สร้างสารภูมิคุ้มกัน

ทำการกระตุ้นหนูให้สร้างสารภูมิคุ้มกัน โดยทำการฉีดสารกระตุ้น bacopside I-BSA หรือ bacopside A₃-BSA เข้าที่บริเวณหน้าท้องหนู (mouse, Balb/c strain) ทุกๆ 2 สัปดาห์โดยทำการกระตุ้นหนูทั้งหมดสี่ครั้ง ตามรายละเอียดดังรูปที่ 7-7 จากนั้นนำซีรัม (serum) หนูที่ได้รับการฉีดสารกระตุ้นมาทำการตรวจสอบการเกิดสารภูมิคุ้มกัน โดยวิธี direct ELISA

BALB/c male mice, 5-weeks-old,



รูปที่ 7-7 แผนภาพการกระตุ้นหนูให้สร้างสารภูมิคุ้มกัน

4.1.3 การหลอมเซลล์ร่วมกับเซลล์ไมอีโลมา (myeloma cell)

ทำการหลอมเซลล์โดยการนำเซลล์จากม้ามของหนูที่สร้างสารภูมิคุ้มกันต่อ bacopside I และเซลล์ไมอีโลมา (SP2/0-Ag14) มาผสมกันและนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นเติม polyethylene glycol (PEG) ลงไปในเซลล์เพื่อช่วยในการหลอมรวมกันของเซลล์และทำการเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C/5 % CO₂ incubator โดยใช้ HAT medium เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาโดยใช้ HAT medium จากนั้นทำการเลี้ยงไป 5 วันแล้วนำส่วน supernatant ของอาหารเลี้ยงมาทำการตรวจสอบการผลิตสารภูมิคุ้มกันโดยวิธี ELISA เมื่อได้เซลล์ที่ผลิตสารภูมิคุ้มกันแล้วทำการแยกเซลล์ที่ได้ให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ โดยใช้วิธี clone

by limiting dilution หลังจากได้โคลนีเดี่ยวๆ ที่สามารถผลิตสารภูมิคุ้มกันจำนวนมากพอที่จะทำการตรวจสอบได้โดย ELISA อีกครั้ง

สำหรับการเตรียมสารภูมิคุ้มกันต่อ bacopside A₃ ทำด้วยวิธีเดียวกัน

4.1.4 การทำให้สารภูมิคุ้มกันแบบมอโนโคลนอลบริสุทธิ์

ทำการเลี้ยงมอโนโคลนจนได้ปริมาณสารภูมิคุ้มกันจำนวนมากเพียงพอจากนั้นนำ supernatant ของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีสารภูมิคุ้มกันมาทำให้บริสุทธิ์ใช้ protein G column ในการแยกสารภูมิคุ้มกันออกมาโดยอาศัยหลักการในการจับกับ Fc ของสารภูมิคุ้มกันและแยกสารออกมาโดยใช้สารบัฟเฟอร์ (buffer) ที่มี pH ต่ำ

4.1.5 ทำการตรวจสอบคุณสมบัติของสารภูมิคุ้มกันแบบมอโนโคลนอล

ทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการจับกับ bacopside I หรือ bacopside A₃ และสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันจากสารภูมิคุ้มกันที่บริสุทธิ์โดยวิธี competitive ELISA และนำมาคำนวณหาค่าความจำเพาะเจาะจงของสารภูมิคุ้มกันที่ได้ต่อสารชนิดต่างๆ (cross reactivity) ตามวิธีการของ Weiler และ Zenk (1976)

$$\% \text{ Cross reactivity} = \left(\frac{\text{concentration of bacopside I} \\ \text{yeilding A} / A_0 = 50\%}{\text{concentration of compound under} \\ \text{investigation yeilding A} / A_0 = 50\%} \right) \times 100$$

A is the absorbance in the presence of the test compound

A₀ is the absorbance in the absence of the test compound.

4.1.6 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม pseudojубogenin glycosides และ jубogenin glycosides จากพืชพรมมิโดยวิธี ELISA

ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม pseudojубogenin glycosides ด้วยวิธีอิมมูโนออสซาโดยใช้สารภูมิคุ้มกันมอโนโคลนอลจากพืชสมุนไพรพรมมิตามรายละเอียดวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณดังนี้

1. เติมสารละลาย bacopside I-HSA ความเข้มข้น 1 µg/ml ที่ละลายด้วย carbonate buffer pH 9.6 ลงใน 96-well plate หลุมละ 100 µl บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย 0.02% tween ใน phosphate buffer saline (T-PBS) 3 ครั้ง

2. เติมหางนมผง (skim milk) ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffer saline (PBS) หลุมละ 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย T-PBS 3 ครั้ง
3. เติมสารละลายมาตรฐานของ bacopaside I ที่ทำการเจือจางในเมทานอล 20 เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 50 μ l หรือเติมสารสกัดตัวอย่างที่ทำการเจือจางในเมทานอล 20% หลุมละ 50 μ l ร่วมกับเติมแอนติบอดีตัวที่ 1 มอโนโคลนอลของ bacopaside I ที่ละลายด้วย T-PBS หลุมละ 50 μ l ทำการผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า 30 วินาที บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย T-PBS 3 ครั้ง
4. เติมแอนติบอดีตัวที่ 2, POD anti-mouse IgG ละลายใน T-PBS หลุมละ 100 μ l บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และล้างด้วย T-PBS 3 ครั้ง
5. เติมสารตั้งต้น (ABTS 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, H_2O_2 0.03% ที่ละลายใน citrate buffer 0.1 M) หลุมละ 100 μ l บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลตชนิดมัลติโหมดที่ค่าความถี่ 405 nm
7. นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดมาหาความเข้มข้นของปริมาณสารกลุ่ม pseudojujubogenin โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน โดยคำนวณจากการทำกราฟของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ

การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม jujubogenin glycosides มีขั้นตอนการทดลองเหมือนดังที่กล่าวมาข้างต้น เพียงแต่ใช้สาร bacoside A_3 แทน bacopaside I และใช้สารภูมิคุ้มกันมอโนโคลนอลต่อบacoside A_3 แทน bacopaside I

5. การคำนวณต้นทุนการผลิตยาเม็ดพรมมิ

คำนวณต้นทุนการผลิตพรมมิตามรายการค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้น ทั้งในด้านการผลิตวัตถุดิบ การวิเคราะห์ และการต่อกายาเม็ด

6. การพัฒนาคู่มือมาตรฐานกระบวนการผลิตวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์พรมมิ

รวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องจากการทดลองที่ผ่านมา วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง และการทดลองปฏิบัติจริง แล้วเรียบเรียงและจัดทำแนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิ แนวทางการวิเคราะห์สารชาโพนินในสมุนไพรพรมมิ แนวทาง กระบวนการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิ

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การศึกษาการขยาย scale การปลูกพรมมิและมาตรฐานการปลูก

ผู้วิจัยได้ทำการเพาะปลูกพรมมิ และอยู่ในระหว่างการรอการเก็บเกี่ยว ได้ทำการบันทึกการเจริญเติบโตตามช่วงเวลาต่างๆ ผลการวิเคราะห์ดินที่ใช้ในการปลูก เป็นดังตารางที่ 7-2

ตารางที่ 7-2 ผลการวิเคราะห์ดิน

ตัวแปร	ปริมาณในดินที่นำไปวิเคราะห์
Soil Texture	Sandy Clay Loam
pH	6.491
% อินทรีย์วัตถุ	1.46
Total Potassium	1,499 ppm หรือ 0.0001 %
Total Nitrogen (%)	0.0091
Phosphorus (%)	0
Total Cadmium	517.589 ppm หรือ 0.052 %
Total Lead	17.390 ppm หรือ 0.0017 %

ตารางที่ 7-3 ความหนาแน่นของดินพรมมิในช่วงระยะเวลาต่างๆ

วัน เดือน ปี	ความหนาแน่นของดินพีช (ตัน/ ตารางเมตร)
เริ่มปลูก (เดือน 0)	9
เดือนที่ 1	20
เดือนที่ 2	50
เดือนที่ 3	90
เดือนที่ 4	120
เดือนที่ 5	150

หมายเหตุ: การนับจำนวนดินพีชจะนับถึงที่แตกแขนงออกมา 6 กิ่งเท่ากับพรมมิ 1 ต้น

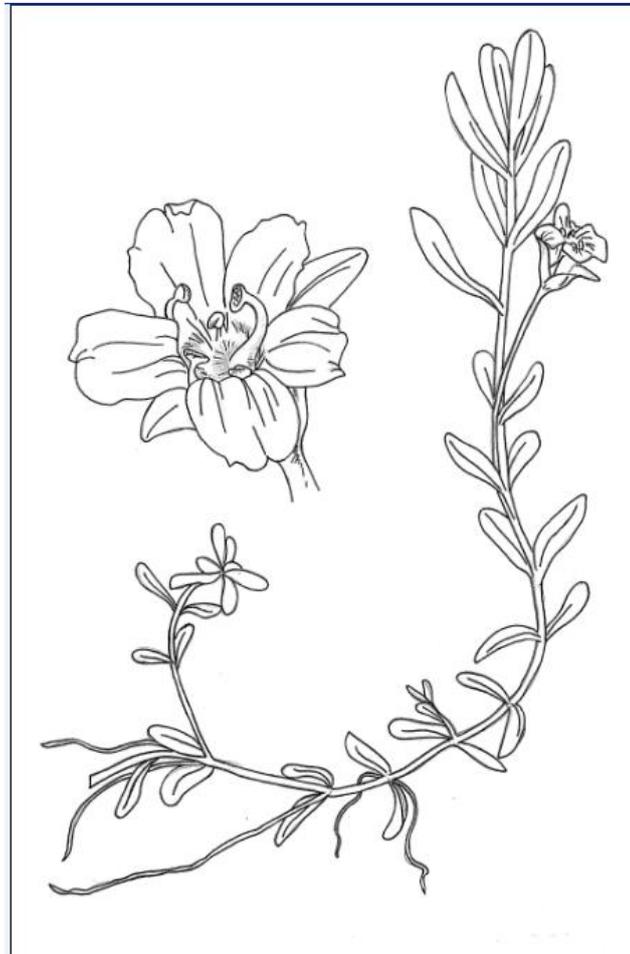
ศัตรูพืชและวัชพืชที่พบในการเพาะปลูกในครั้งนี้ ได้แก่ หอยเชอร์รี่ และตะไคร่น้ำ โดยจะพบในช่วง 1-2 เดือนแรกของการเพาะปลูก จะทำการกำจัดหอยเชอร์รี่โดยใช้กากชาซาโปนินในอัตราส่วน 13.3 กก.ต่อไร่ ส่วนกะเม็งจะพบในช่วง 2-3 เดือนแรกของการเพาะปลูก นอกจากนั้นแล้วยังมีวัชพืชที่สามารถพบได้ตลอดระยะเวลาในการเพาะปลูก คือ ผักบั้ง กกขนาท และผักตบชวา การกำจัดวัชพืชจะใช้วิธีการถอน หรือใช้วิธีการช้อนออกจากแปลงเพาะปลูก แล้วนำไปทำลายนอกแปลงเพาะปลูกอีกครั้งหนึ่ง

หลังจากที่พรมมิเจริญเติบโตเต็มที่ (หลังจากเพาะปลูกไปแล้ว 2 เดือน) ได้ทำการเก็บพรมมิ โดยเก็บส่วนที่อยู่เหนือน้ำวัดจากยอดลงมาประมาณ 10-20 ซม. ซึ่งจะใช้วิธีการเด็ด ตัด หรือใช้เกี่ยวเกี่ยว การเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวจะสิ้นสุดในเวลา 6 เดือน โดยได้ผลผลิตทั้งหมด 174 กก.แห้งต่อไร่

องค์ความรู้ที่ได้จากการปลูกนี้ ผู้วิจัยได้จัดทำแนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิดังแสดงในภาคผนวก ก

2. การศึกษามาตรฐานวัตถุบสมุนไพรรพรมมิ

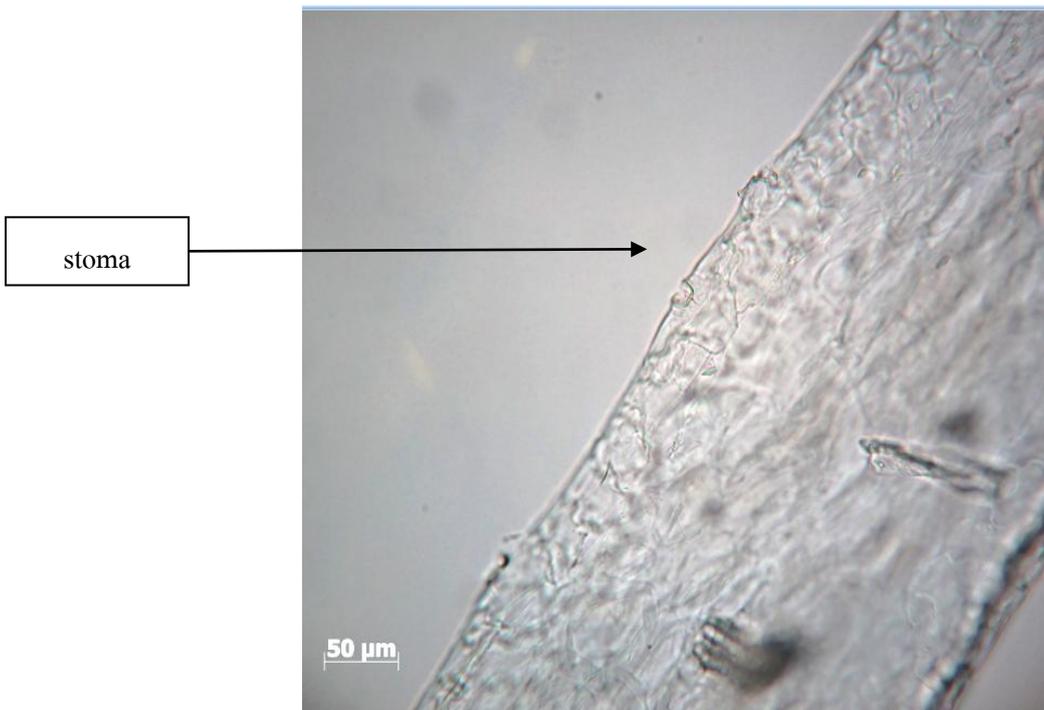
การศึกษาลักษณะทางกายภาพทั้งทาง macroscopic ดังรูปที่ 7-8 และลักษณะทาง microscopic จาก การตัด section ของใบและลำต้นพรมมิดังรูปที่ 7-9 ถึง 7-11



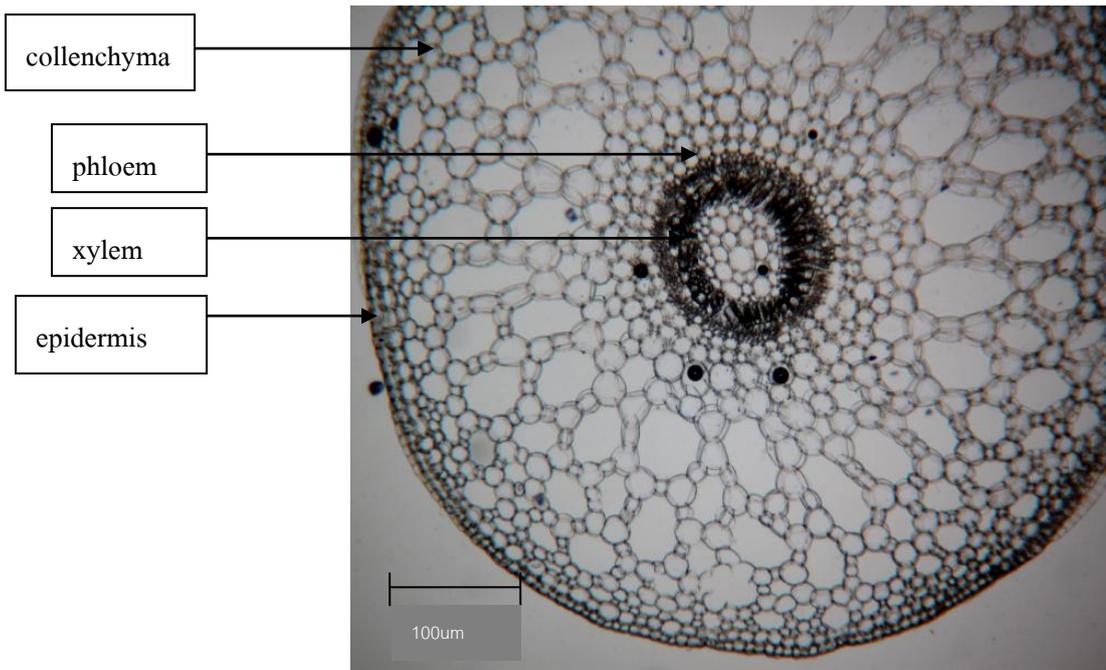
รูปที่ 7-8 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (aerial part)



รูปที่ 7-9 ลักษณะของการ cross section ใบพรมมิ



รูปที่ 7-10 ปากใบ จากการ cross section ใบพืชพรมมิ



รูปที่ 7-11 ลำต้นพรมมิ

ภาพผงพืชพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ reticulated vessel (รูปที่ 7-12), trichome (รูปที่ 7-13, รูปที่ 7-14), epidermis (รูปที่ 7-15), stomata (รูปที่ 7-16), parenchyma cell (รูปที่ 7-17)



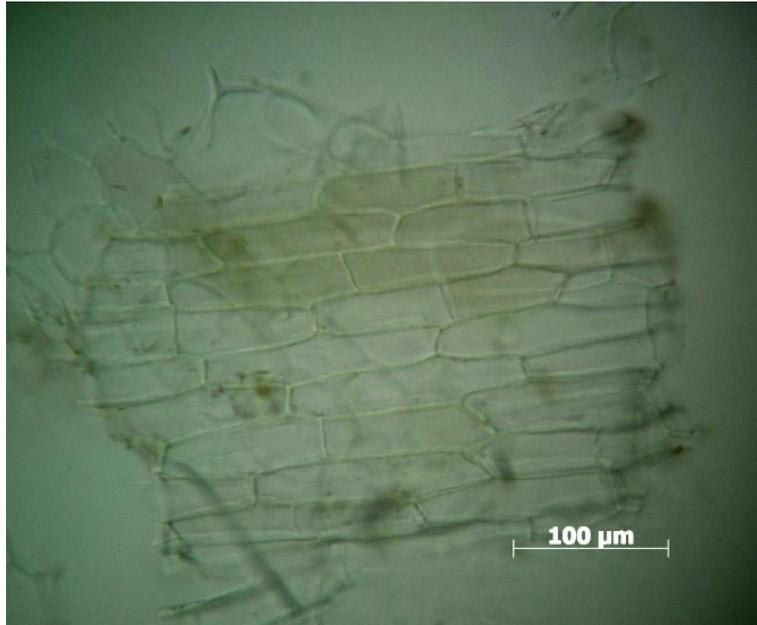
รูปที่ 7-12 reticulated vessel



รูปที่ 7-13 trichome



รูปที่ 7-14 glandular trichome



รูปที่ 7-15 Epidermis



รูปที่ 7-16 stoma



รูปที่ 7-17 parenchyma cells

การศึกษาทางเคมีและกายภาพอื่นๆ

ทำการควบคุมคุณภาพสมุนไพรพรมมิตามที่กำหนดไว้ใน Thai Herbal Pharmacopoeia ดังนี้

- น้ำหนักที่หายไปหลังการอบแห้ง (Loss on drying) 4.04 ± 0.02 %
- ปริมาณสารปนปลอม (Foreign matters) 0.06 ± 0.01 %
- ปริมาณสารสกัดที่ละลายน้ำ (Water-soluble extractive) 4.12 ± 0.49 %
- ปริมาณสารสกัดที่ละลาย ethanol (Ethanol-soluble extractive) 5.70 ± 0.32 %
- ปริมาณสารสกัดที่ละลาย methanol (Methanol-soluble extractive) 25.67 ± 0.46 %
- ปริมาณสารสกัดที่ละลาย petroleum ether (Petroleum ether-soluble extractive) 0.35 ± 0.03 %

การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารซาโปนินในพรมมิ

เนื่องจากยังไม่มีข้อกำหนดเกณฑ์มาตรฐานของพรมมิในประเทศไทย คณะผู้จัดทำจึงกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารซาโปนินขั้นต่ำที่ควรมีในผงพรมมิแห่งที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทำผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิ โดยรวบรวมจากงานวิจัยของไทย และต่างประเทศดังนี้

จากการศึกษาของ Phrompittayarat และคณะ ในปี ค.ศ.2007 พบว่าสารซาโปนินที่วิเคราะห์ได้จาก ส่วนยอดของสมุนไพรพรมมิในฤดูฝนมีปริมาณ $1.39 \pm 0.04\%w/w$ และในฤดูหนาวมีปริมาณ $1.21 \pm 0.14\%w/w$

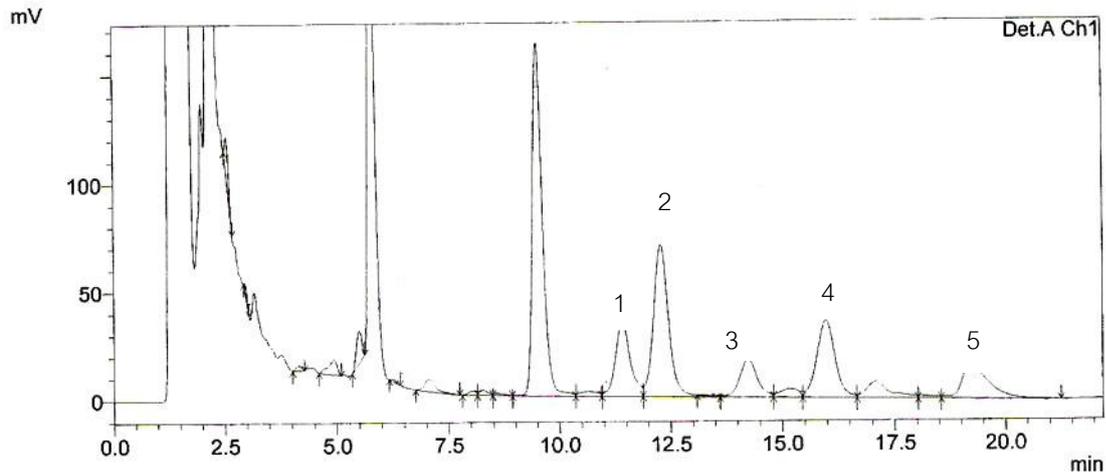
ในการศึกษาของ Sairam และคณะ ในปี ค.ศ.2002 ใช้สารสกัดจากสมุนไพรพรมมิส่วนยอดที่มี ปริมาณสารซาโปนินอยู่ $1.2\%w/w$

ในการศึกษาของ Ganzera และคณะ ในปี ค.ศ.2004 พบว่าสารซาโปนินที่วิเคราะห์ได้ในสมุนไพรพรมมิมีปริมาณ $1.67\%w/w$

จากข้อมูลการศึกษาต่างๆที่ได้กล่าวมาจะเห็นได้ว่าส่วนของยอดของสมุนไพรพรมมิมีปริมาณสาร ซาโปนินเฉลี่ย $1.3\%w/w$ เมื่อนำมาคำนวณค่าเบี่ยงเบน 30% จึงกำหนดให้สมุนไพรพรมมิ ควรมีปริมาณ สารซาโปนินอย่างน้อย $1\%w/w$

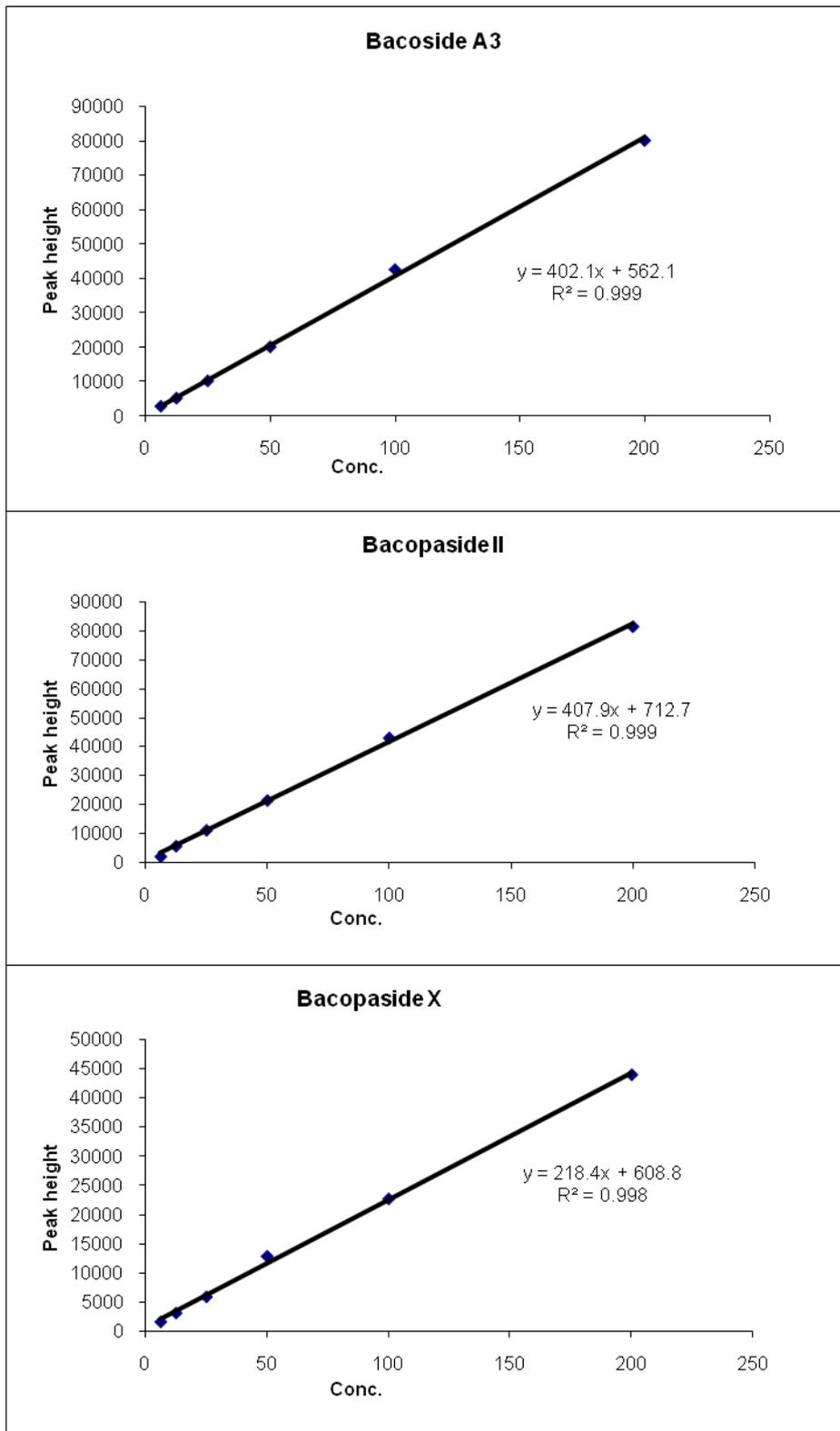
การวิเคราะห์สารซาโปนินในพรมมิด้วย HPLC

ได้พัฒนาขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์สาร saponins ในพรมมิ ตามที่ระบุไว้ในวิธีการทดลอง ตัวอย่างการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 7-18

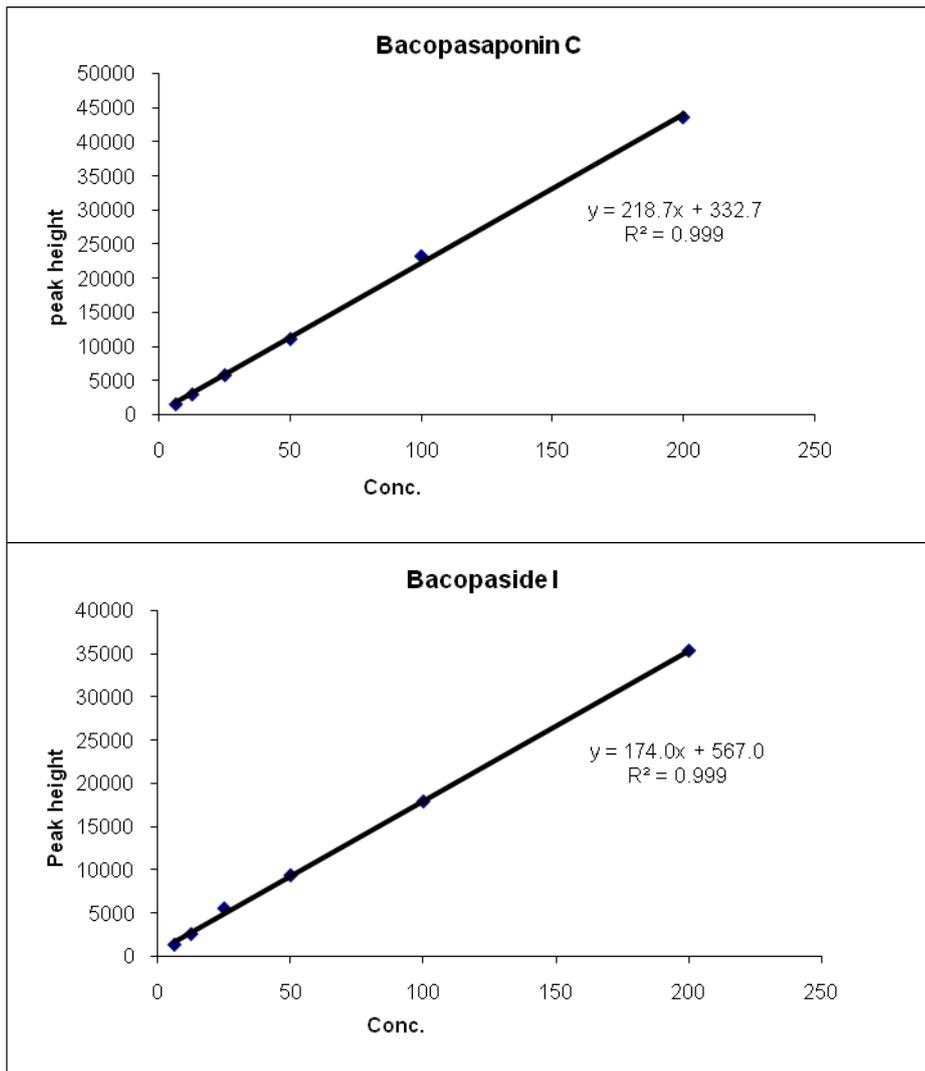


รูปที่ 7-18 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารสกัดพรมมิ ที่ความเข้มข้น 0.02 g/mL จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ 205 nm (1 = Bacoside A3, 2 = Bacopaside II, 3 = Bacopaside X, 4 = Bacopasaponin C, 5 = Bacopaside I)

การทำ calibration curve พบว่าสารซาโปนินมาตรฐาน Bacoside A₃, Bacopaside II, Bacopaside X, Bacopasaponin C และ Bacopaside I ให้กราฟเส้นตรงที่ความเข้มข้น 6.25-200 µg/ml (รูปที่ 7-19) และมี LOD: 1.56 µg/ml.



รูปที่ 7-19 Calibration curve สารซาโปนินที่พบในพรมมิ



รูปที่ 7-19 Calibration curve สารซาโปนินที่พบในพรมมิ(ต่อ)

ตารางที่ 7-4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในผงพรมมิแห้ง

% w/w	Average	SD
Bacoside A ₃	0.169	0.033
Bacopaside II	0.319	0.034
Bacopaside X	0.187	0.032
Bacopasaponin C	0.186	0.032
Bacopaside I	0.364	0.046
Total saponin	1.162	0.098

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าผงพรมมีแห้งมีปริมาณสารซาโปนินเฉลี่ย 1.2 ± 0.1 % w/w ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ว่าในผงพรมมีแห้งต้องมีปริมาณสารซาโปนินอย่างน้อย 1% w/w ผลการวิเคราะห์ที่ได้เป็นตัวชี้บ่งว่าสมุนไพรพรมมีที่ทำการเพาะปลูกเป็นไปตามมาตรฐานซึ่งสามารถนำไปใช้ในการผลิตยาเม็ดสมุนไพรต่อไป

จากการศึกษามาตรฐานวัตถุควบคุมสมุนไพรทั้งทางกายภาพและทางเคมีครั้งนี้ ผู้วิจัยได้กำหนดค่ามาตรฐานวัตถุควบคุมสมุนไพรที่จะใช้ในผลิตภัณฑ์ยาเม็ดพรมมีในงานวิจัย รวมทั้งได้จัดทำแนวทางการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในพรมมีดังแสดงในภาคผนวก 2

3. การศึกษามาตรฐานการเตรียมผลิตภัณฑ์พรมมีในระดับอุตสาหกรรม

คณะผู้วิจัยได้ทำการเตรียมผลิตภัณฑ์ยาเม็ดพรมมีที่มีสารสกัดพรมมี 300 มิลลิกรัม จากการทดลองพบว่าสารสกัดพรมมี 45.5 กก. ได้ยาเม็ดพรมมี 80,850 เม็ด ยาเม็ดเคลือบที่มีสารสกัดพรมมีขนาด 300 มก. ที่เตรียมได้แล้ว มีลักษณะเป็นเม็ดกลมแบน สีเขียวอ่อน

ได้มีการทดสอบคุณภาพยาเม็ดที่ผลิตได้ด้านความแปรปรวนของน้ำหนัก, ความกร่อน, การแตกตัว, ความแข็ง และความหนาของยาเม็ด

ผลการทดสอบคุณภาพของยาเม็ดสารสกัดสมุนไพรพรมมีในด้านต่างๆ สรุปได้ดังตารางที่ 7-4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ยาเม็ดสารสกัดสมุนไพรพรมมีขนาด 300 มก. ที่เตรียมขึ้นมีคุณภาพได้ตามมาตรฐานของยาเม็ด

ตารางที่ 7-5 สรุปผลการทดสอบคุณภาพด้านต่างๆ ของยาเม็ดสารสกัดสมุนไพรพรมมี

การทดสอบคุณภาพของยาเม็ด

	Weight variation (%)	ความกร่อน (%)	การแตกตัว (นาที)	ความแข็ง (Kg)	ความหนา (mm)
เกณฑ์มาตรฐาน	± 10	1.00	< 20	6-7	
ค่าที่วัดได้	+ 2.66 และ - 2.75	0.31	15-16	7	4.446 \pm 0.026
การประเมิน	ผ่านเกณฑ์	ผ่านเกณฑ์	ผ่านเกณฑ์	ผ่านเกณฑ์	

สำหรับการประเมินปริมาณสารสำคัญตามที่ระบุไว้ในฉลาก (% label amount) ในยาเม็ดพรมมี ยาเม็ดพรมมีต้องมีสารสกัดพรมมี 300 มก ต่อเม็ด และในสารสกัดนั้นจะต้องมีปริมาณซาโปนินรวมไม่ต่ำกว่า 5% พบว่ายาเม็ดพรมมีมี % label amount 97.53 % ขึ้นไป ซึ่งผ่านเกณฑ์มาตรฐาน USP ที่กำหนดไว้ว่ายาเม็ด

ต้องมีค่า % label amount อยู่ระหว่าง 80-120% ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายามีคัพรมมิที่ได้จากการทดลองมีคุณภาพ เป็นไปตามมาตรฐานสามารถนำไปใช้ในการทดลองทางคลินิกต่อไป ขั้นตอนกระบวนการเตรียมผลิตภัณฑ์ยาเม็ดเคลือบพรมมินี้ ได้จัดทำเป็นคู่มือการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิเพื่อใช้ในการถ่ายทอดเทคโนโลยีต่อผู้ผลิตภาคเอกชน (ภาคผนวก 3)

4. การพัฒนาชุดทดสอบสารซาโปนินในสมุนไพร

ในการวิจัยปี 2548 ได้รายงานการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร pseudojubilogenin glycosides ด้วยวิธี ELISA ที่ใช้สารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนและโพลีโคลนไปแล้ว (Phrompittayarat et al., 2007a,b) ในการวิจัยในปี 2552 นี้ ผู้วิจัยได้ผลิตสารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนต่อ bacoside A₃ และนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารซาโปนินในกลุ่ม jubilogenin glycosides รวมในพืชพรมมิโดยวิธี ELISA โดยพบว่าสารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนต่อ bacoside A₃ ที่ได้นั้น มีความจำเพาะเจาะจงกับสารที่มีส่วน aglycone เหมือนกัน คือเป็นสารกลุ่ม jubilogenin glycosides และไม่เกิด cross reactivity กับสารในกลุ่มอื่นดังแสดงในตารางที่ 7-6 ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับสารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนต่อ bacopaside I ซึ่งศึกษาในการวิจัยที่ผ่านมา ที่มีความจำเพาะกับสารกลุ่ม pseudojubilogenin glycosides และไม่เกิด cross reactivity กับสารในกลุ่มอื่นเช่นเดียวกัน เมื่อทำการตรวจสอบความเที่ยงของการวิเคราะห์ โดยทำการทดสอบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ แสดงดังตารางที่ 7-7 พบว่ามีค่าความเที่ยงอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม โดยดูจากค่า intra-assay และ inter-assay RSD อยู่ในช่วงไม่เกิน 10 ทั้งนี้ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์อาจเกิดจากอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มในขั้นตอนของการวิเคราะห์ เมื่อศึกษาความถูกต้องของการวิเคราะห์ โดยวัดจากส่วนเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (% recovery) ของสารจากการเติมสาร bacoside A₃ ลงไปในสารสกัดพรมมิแสดงดังตารางที่ 7-8 จะเห็นได้ว่าได้เปอร์เซ็นต์การกลับคืนอยู่ในช่วง 93-96% แสดงว่ามีค่าความถูกต้องของการวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (% recovery 90-110 %) จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าวิธีการ ELISA ที่ใช้สารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนต่อ bacoside A₃ สำหรับวิเคราะห์ jubilogenin glycosides มีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่มนี้ในพืชสมุนไพรได้

ตารางที่ 7-6 ค่า cross reactivities (CRs) ของสารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนต่อ bacoside A₃ ต่อสารจากธรรมชาติชนิดต่างๆ ในการทดสอบโดยใช้วิธี ELISA

Compounds	Classification	% Cross reactivity
Bacoside A ₃	Jujubogenin glycosides	100
Bacopaside X	Jujubogenin glycosides	84.77±4.61
Bacopaside IV	Jujubogenin glycosides	64.50±5.93
Bacopaside I	Pseudojujubogenin glycosides	< 0.01
Bacopaside II	Pseudojujubogenin glycosides	< 0.01
Bacopasaponin C	Pseudojujubogenin glycosides	< 0.01
Bacopaside V	Pseudojujubogenin glycosides	< 0.01
Albiflorin	Monoterpenoid glycosides	< 0.01
Rebaudioside A	Diterpene glycosides	< 0.01
Ginsenoside-Rb1	Triterpenoid saponins	< 0.01
Ginsenoside-Rd	Triterpenoid saponins	< 0.01
Ginsenoside-Re	Triterpenoid saponins	< 0.01
Glycyrrhizic acid	Triterpenoid saponins	< 0.01
Saikosaponin a	Triterpenoid saponins	< 0.01
Saikosaponin b2	Triterpenoid saponins	< 0.01
Saikosaponin c	Triterpenoid saponins	< 0.01
Saikosaponin d	Triterpenoid saponins	< 0.01
Senoside A	Anthraquinone glycosides	< 0.01
Senoside B	Anthraquinone glycosides	< 0.01
Baicalein	Flavonoids	< 0.01
Hesperidin	Flavonoids	< 0.01
Naringin	Flavonoids	< 0.01
Baicalin	Flavonoid glycosides	< 0.01
Plumbagin	Naphthoquinone	< 0.01
Pepstatin A	Peptides	< 0.01

ตารางที่ 7-6 ค่า cross reactivities (CRs) ของสารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนต่อ bacoside A₃ ต่อสารจากธรรมชาติชนิดต่างๆ ในการทดสอบโดยใช้วิธี ELISA (ต่อ)

Compounds	Classification	% Cross reactivity
Magnolol	Phenylpropanoids	< 0.01
Swertiamarin	Secoiridoids	< 0.01
Stevioside	Steviol glycosides	< 0.01

ตารางที่ 7-7 ค่าความเที่ยงของการวิเคราะห์หาปริมาณสาร bacoside A₃ ด้วยวิธี ELISA

ความเข้มข้นของ bacoside A ₃ (ng mL ⁻¹)	Intra-assay RSD (%) (n=5)	Inter-assay RSD (%) (n=3)
12.20	3.61	5.13
24.40	2.95	4.76
48.80	4.08	5.88
97.70	1.54	3.80

ตารางที่ 7-8 เปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสารจากการเติมสาร bacoside A₃ ลงไปในสารสกัดพรมมิ (n=3)

ความเข้มข้นของ bacoside A ₃ ที่เติมไปในสารสกัดพรมมิ (ng mL ⁻¹)	Recovery (%)
12.20	92.55
24.40	95.07
48.80	96.11

ตารางที่ 7-9 ปริมาณสารกลุ่ม jujubogenin glycosides จากพืชพรมมิจากการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA และ HPLC (n=3)

ส่วนของพรมมิ	ฤดูที่เก็บเกี่ยว	% total jujubogenin glycosides ในพรมมิ (average±SD)	
		ELISA (n=3)	HPLC (n=3)
ยอด ^a	ฤดูฝน	1.49±0.11	1.31±0.04
	ฤดูหนาว	1.30±0.35	1.21±0.14
	ฤดูร้อน	1.23±0.27	1.19±0.03
ส่วนเหนือดินที่ตัดยอด ออกแล้ว	ฤดูฝน	0.57±0.09	0.51±0.04
	ฤดูหนาว	0.96±0.05	0.85±0.10
	ฤดูร้อน	0.73±0.12	0.57±0.08

ยอด^aหมายถึงส่วนเหนือดินของพรมมิที่ตัดจากส่วนปลายยอดสุดลงมาประมาณ 10 cm

ตารางที่ 7-9 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณ jujubogenin glycosides รวมในพรมมิในส่วนยอดและส่วนที่ตัดยอดออกไปแล้วในฤดูกาลต่างๆ โดยเทียบกับวิธี HPLC พบว่าผลออกมาสอดคล้องกัน โดยที่ค่าที่ได้จาก ELISA มีค่าสูงกว่าเล็กน้อย อาจจะเป็นเพราะว่าจากการวิเคราะห์ HPLC เราวิเคราะห์สาร 2 ตัวที่เป็นกลุ่ม jujubogenin glycosides ซึ่งคือ bacoside A₃ และ bacopaside X ในขณะที่ในวิธีทาง ELISA อาจได้ค่าปริมาณจาก jujubogenin glycosides ตัวอื่นๆ ที่ไม่อาจวัดได้ด้วย HPLC ก็ได้ การนำสาร monoclonal antibody ต่อ bacopaside A₃ และ bacopaside I มาพัฒนาใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม jujubogenin glycosides และ pseudojujubogenin glycosides นั้น กลุ่มผู้วิจัยได้รับการทุนสนับสนุนในการทำวิจัยระหว่างนักวิจัยประเทศไทยและประเทศญี่ปุ่น (NRCT-JSPS) จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในโครงการ การผลิตสารภูมิต้านทานแบบโมโนโคลนต่อ bacopaside I และ bacoside A₃ เพื่อควบคุมคุณภาพและปรับปรุงพันธุ์สมุนไพรรพรมมิ (ปี 2552) และได้รายงานการพัฒนาชุดทดสอบโดยวิธี ELISA, Estern blotting และ immunochromatographic strip ไปในรายงานการวิจัยดังกล่าว

5. การคำนวณต้นทุนการผลิต

การคำนวณต้นทุนการผลิตยาเม็ดแบ่งเป็นส่วนต่างๆ ดังนี้

1. การคำนวณค่าใช้จ่ายในการปลูกโดยการจดบันทึกค่าใช้จ่าย เช่นค่ารถไถแต่งที่ดินทำแปลง ค่าท่อน้ำเข้าแปลง ค่าจ้างคนงาน เป็นต้น แล้วนำค่าใช้จ่ายที่ใช้ไปคำนวณค่าใช้จ่ายในการปลูก ดังตารางที่ 7-10

ตารางที่ 7-10 ค่าใช้จ่ายในการปลูก

ค่าใช้จ่าย	ราคา (บาท)
ค่ารถไถแต่งที่ดินทำแปลง	300
ค่าจ้างรถ Macro เตรียมดิน	7,700 (วันละ 6500 บวก 1 ชม 1200 บาท)
ค่าท่อน้ำเข้าแปลง	2,000
ค่ารถไถแต่งที่ดินทำแปลง	6,300 (วันละ 6500 บวก 1 ชม 1,200 บาท)
ค่าปุ๋ย NPK 15-15-15 จำนวน 1 ลูก	1,270
ค่าปุ๋ย 46-0-0	635
ค่ารถไถเล็กคันปุ๋ย	400
คนงาน	1,200
ค่าจ้างคนปลูก	2,700
ค่าเครื่องเช่น ไร่	200
ค่าวัสดุ	2,163
อุปกรณ์ในการเก็บ ทำความสะอาด ตาก	500
วิเคราะห์ดิน	4,000
คนงาน 2 คน คนละ 4500/เดือน 5 เดือน	45,000
ขนส่งมาเก็บไว้ 400 บาท/เดือน 5 เดือน	2,000
สารเคมีการบำรุงรักษา	2,000
รวม	64,368
จำนวนพรมมิแห้งที่ได้	261กก. แห้ง

2. การคำนวณค่าใช้จ่ายในการสกัดสมุนไพรพรมมิโดยการจดบันทึกค่าใช้จ่ายต่างๆที่ใช้ในการค่าขนส่งสมุนไพรแห้ง ค่าจ้างในการสกัด แล้วนำมาคำนวณค่าใช้จ่าย ดังตารางที่ 7-11

ตารางที่ 7-11 ค่าใช้จ่ายในการสกัดสมุนไพรพรมมิ

ค่าใช้จ่าย	จำนวนเงิน (บาท)
ค่าขนส่ง	1,500
ค่าจ้างสกัด kg ละ 300 บาท	13,650.00
รวม	15,150
หมายเหตุ พรมมิแห้ง 261 กก. ได้ สารสกัดพรมมิ 45.5 กก. (% yield=17.44%)	

3. การคำนวณค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์โดยการจดบันทึกค่าใช้จ่ายต่างๆที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ ค่าสารเคมี ค่า Standard bacopasides ค่าcolumnที่ใช้ในการวิเคราะห์ แล้วนำค่าใช้จ่ายที่ใช้ไปคำนวณค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 7-12

ตารางที่ 7-12 ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์

อุปกรณ์และสารเคมี	ราคา/หน่วย	จำนวนที่ใช้	คิดเป็นเงิน (บาท)
Methanol	642	ใช้ครั้งละ 625 ml/MP 1 L	160.5
Luna C18	16,800/1,000 ครั้ง	ใช้ 1 ครั้ง	16.8
Acetonitrile 2.5 L	1,080	ใช้ครั้งละ 375 ml/MP 1 L	162
Standard bacopasides	90,950/5 mg	1 ml ใช้ได้ 10 ครั้ง / สาร	181.9
รวม		521.2	
หมายเหตุ เตรียม MP 1 ครั้ง ใช้วิเคราะห์ ยามเม็ด สมุนไพรแห้ง และ standard			

4. การคำนวณค่าใช้จ่ายในการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิโดยการจดบันทึกค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิ ได้แก่ ค่า Lactose anhydrous ค่า Avicel PH 101 ค่า Aerosil เป็นต้น แล้วนำค่าใช้จ่ายที่ได้ไปคำนวณค่าใช้จ่ายในการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิ ดังตารางที่ 7-13

ตารางที่ 7-13 ค่าใช้จ่ายในการผลิตยาเม็ดผสมนไพรพรมมิ

สารเคมี	ราคา/หน่วย	เป็นเงิน (บาท)
Avicel PH 101	4,375บาท/25kg	4,133.28
Lactose anhydrous	80บาท/kg	1,990.8
Ac-Di-Sol	1000บาท/kg	2,469.54
Talcum	60บาท/kg	1,166.04
Magnesium stearate	200บาท/kg	127.98
Aerosil	1000บาท/kg	159.738
Methylene chloride	2500บาท//2.5L	7,584
Ethanol	1000บาท/2.5L	1,706.4
HPMC	1800บาท/20L	511.92
PEG – 4000	250บาท/kg	23.7
สีผสมอาหาร	5บาท/ซอง	118.5
รวม		19,991

5. การคำนวณค่าใช้จ่ายอื่นๆ โดยการจดบันทึกค่าใช้จ่าย แล้วนำค่าใช้จ่ายที่ได้ไปคำนวณ ดังตารางที่ 7-14

ตารางที่ 7-14 ค่าใช้จ่ายอื่นๆ

ค่าใช้จ่าย	จำนวนเงิน (บาท)
อุปกรณ์สำนักงาน	5,000
ค่านักวิจัย 10,000 บาท/เดือน จำนวน 5 เดือน	50,000
อุดหนุนมหาวิทยาลัย	16,666 ต่อปี
รวม	55,000

เมื่อนำค่าใช้จ่ายต่างๆที่ใช้ไปทั้งหมดเริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการปลูกผสมนไพรพรมมิ จนกระทั่งถึงการผลิตยาเม็ดผสมนไพรพรมมิ ได้ค่าใช้จ่ายรวมดังตารางที่ 7-15

ตารางที่ 7-15 รวมค่าใช้จ่ายทั้งหมด

ค่าใช้จ่าย	จำนวนเงิน (บาท)
ค่าใช้จ่ายในการปลูก	78,368
ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์	521
ค่าใช้จ่ายในการสกัด	15,150
ค่าใช้จ่ายในการทำยาเม็ด	19,991
ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	71,666
ค่าใช้จ่ายรวม	185,696

จากการคำนวณค่าใช้จ่ายในการผลิตยาเม็ดสมุนไพร 185,696 บาท ได้จำนวนยาเม็ดสมุนไพร 80,580 บาท ดังนั้นได้ต้นทุนการผลิตยาเม็ดสมุนไพร 2.3 บาทต่อเม็ด

6. การพัฒนาคู่มือมาตรฐานกระบวนการผลิตวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สมุนไพร

จากงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้จัดทำคู่มือ 3 เล่ม สำหรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีให้ภาคเอกชนดังในภาคผนวกที่ ก-ค ประกอบด้วย

1. แนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิ
2. แนวทางการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในสมุนไพร
3. แนวทางการผลิตยาเม็ดสมุนไพร

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยและพัฒนาพรมมิ เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และส่งต่อเทคโนโลยีสู่ภาคอุตสาหกรรมนั้น ผู้วิจัยได้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการผลิตวัตถุดิบพรมมิ ตั้งแต่กระบวนการปลูก การดูแลเชิงเกษตรกรรม การเก็บเกี่ยว การทำให้แห้ง การควบคุมมาตรฐานวัตถุดิบและสารสกัดที่ได้ ตลอดจนการผลิตยาเม็ดพรมมิ โดยได้จัดทำคู่มือแนวทางการแนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิ การควบคุมคุณภาพ และการผลิตยาเม็ด เพื่อที่จะเตรียมส่งต่อเทคโนโลยีให้ภาคอุตสาหกรรมต่อไป นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้คำนวณต้นทุนการผลิตของสารสกัด และผลิตภัณฑ์ ยาเม็ดพรมมิ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับทางภาคอุตสาหกรรมอีกด้วย

ในการปลูกพรมมิ 1.5 ไร่ เป็นเวลา 6 เดือน โดยวิธีปักชำ พบว่าสามารถเก็บเกี่ยวพรมมิได้ตั้งแต่เดือนที่ 2 และเมื่อสิ้นสุด 6 เดือนได้ผลผลิตพรมมิแห้ง 261 กิโลกรัม หรือคิดเป็น 174 กิโลกรัมต่อไร่ (เดือนละ 40 กิโลกรัมต่อไร่) วัตถุดิบพรมมิที่ใช้ในการผลิตยาเม็ด เป็นส่วนยอดที่ตัดจากปลายยอดประมาณ 10-20 ซม อบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส พรมมิแห้งมีสาร total saponin ไม่ต่ำกว่า 1 % ซึ่งวัดได้โดย HPLC หรือ ELISA ที่ใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะกับสารกลุ่ม jujubogenin glycosides และ pseudojujubogenin glycosides สารสกัดพรมมิมี % yield ประมาณ 17 % ต่อน้ำหนักพรมมิแห้ง และควบคุมมาตรฐานที่ % total saponin ไม่ต่ำกว่า 5 % ต้นทุนการผลิตยาเม็ดพรมมิอยู่ที่เม็ดละ 2.3 บาท

สิ่งที่ยังไม่ได้ศึกษาในการวิจัยครั้งนี้คือ ความแตกต่างของสายพันธุ์ต่างๆ ของพรมมิ แต่จาก preliminary study ไม่พบความแตกต่างด้านองค์ประกอบทางเคมีของพรมมิที่เก็บจากแหล่งต่างๆ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังไม่ได้ทำการศึกษาเรื่องความต้องการทางการตลาดของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิ ซึ่งเมื่อภาคอุตสาหกรรมสนใจที่จะนำผลิตภัณฑ์พรมมิไปผลิตต่อ นั้น อาจทำการศึกษาด้วยตนเองได้

บรรณานุกรม

1. Bhattacharya SK, Bhattacharya A, Kumar A, Ghosal S. Antioxidant activity of *Bacopa monniera* in rat frontal cortex, striatum and hippocampus. *Phytother Res.* 2000 May;14(3):174-9.
2. Bhattacharya SK, Kumar A, Ghosal S. Effect of *Bacopa monniera* on animal models of Alzheimer's disease and perturbed central cholinergic markers of cognition in rats. Siva Sankar: PJD Publications; 1999.
3. GMP [homepage on the internet]. Bangkok: siamhrm; 2010 [cited 2010 Feb 25]. Available from: <http://www.siamhrm.com/?name=management&file=readnews&max=296>
4. Good Laboratory Practice [homepage on the internet]. Bangkok: กรมโรงงานอุตสาหกรรม; date unknown [cited 2010 Feb 25] Available from: <http://www.diw.go.th/diw/index.asp>
5. High Performance Liquid Chromatography [homepage on the internet]. Bangkok: perkinelmer; date unknown [cited 2010 Feb 25] Available from: http://las.perkinelmer.com/local/Thailand/AS_HPLC.htm
6. Jyoti A, Sharma D. Neuroprotective role of *Bacopa monniera* extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain. *J Neurotoxicol.* 2006 Jul;27(4):451-7.
7. Limpeanchob N, Jaipan S, Rattanakaruna S, Phrompittayarat W, Ingkaninan K. Neuroprotective effect of *Bacopa monnieri* on beta-amyloid-induced cell death in primary cortical culture. *J Ethnopharmacol.* 2008 Oct 30;120(1):112-7.
8. Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Wittaya-Areekul S, Jetiyanon K, Ingkaninan K. An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Anal Chim Acta.* 2007a Feb 12;584(1):1-6.
9. Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Wittaya-areekul S, Jetiyanon K, and Ingkaninan K. Determination of pseudojubilogenin glycosides from Brahmi based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacopaside I. *Phytochem. Anal.* 2007b: 411-418.
10. Phrompittayarat W, Wittaya-areekul S, Jetiyanon K, Putalun W, Tanaka H, Ingkaninan K. Determination of saponin glycosides in *Bacopa monnieri* by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Thai Pharm Health Sci J* 2007;2(1):26-32.
11. Raghav S, Singh H, Dalal PK, Srivastava JS, Asthana OP. Randomized controlled trial of standardized *Bacopa monniera* extract in age-associated memory impairment. *Indian J Psychiatry.* 2006;48:238-42.

12. Russo A, Borrelli F, Campisi A, Acquaviva R, Raciti G, Vanella A. Nitric oxide-related toxicity in cultured astrocytes: effect of Bacopa monniera. *Life Sci.* 2003 Aug 8;73(12):1517-26.
13. Smitinand T, Larsen K, editors. *Flora of Thailand*. Vol 5 part 2. Bangkok: Chutima Press; 1990.
14. Stough C, Lloyd J, Clarke J, Downey L, Hutchison CW, Rodgers T et al. The chronic effects of extract of Bacopa monniera (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. *J Psychopharmacol* 2001 Aug;156(4):481-4.
15. WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants [homepage on the internet]. Geneva: World Health Organization; 2003 [cited 2010 Feb 25]. Available from: whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241546271.pdf
16. จิตรารักษ์ รัชชพันธุ์. หลักอนุกรมวิธานพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2548.
17. ชนก กลิ่นสุวรรณ. ปัจจัยทางการตลาดที่มีผลต่อพฤติกรรมผู้บริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร [วิทยานิพนธ์]. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, 2544
18. พจนานุกรมไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2542 [homepage on the internet]. กรุงเทพฯ: ราชบัณฑิตยสถาน; dated unknown [cited 2010 Feb 25] Available from: <http://rirs3.royin.go.th/new-search/word-search-all-x.asp>
19. มานิตย์ อรุณากร, วารุณี แสนสุภา. ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง คำชี้แจงประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 293) พ.ศ.2548 เรื่อง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 294) พ.ศ.2548 เรื่อง รอยัลเฮลตี้และผลิตภัณฑ์รอยัลเฮลตี้. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2549.

ภาคผนวก



แนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิ
Good Agricultural and Collection Practices
for *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.



ศูนย์เทคโนโลยีสมุนไพร มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาคผนวก ก

แนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิ

Guideline on Good Agricultural and Collection Practices

for *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.

1. แหล่งเพาะปลูก

1.1 สภาพพื้นที่

ควรเป็นสถานที่ที่ห่างไกลจากเขตอุตสาหกรรม เพื่อหลีกเลี่ยงสารเคมีหรือมลพิษต่างๆ ที่อาจจะตกค้างอยู่ในดินหรือปนเปื้อนในสมุนไพรมิ เป็นสถานที่ที่มีการคมนาคมสะดวก นอกจากนี้ ควรอยู่ใกล้กับแหล่งน้ำ เนื่องจากพรมมิชอบขึ้นบริเวณที่มีน้ำท่วมขัง

1.2 ลักษณะดิน

ควรเป็นลักษณะดินตามมาตรฐานดินที่ใช้ประโยชน์เพื่อการเกษตรกรรมของกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ดังแสดงในตารางที่ 1 (1)

ตารางที่ 1 ลักษณะดินที่เหมาะสมในการปลูกพืช

พารามิเตอร์	ดินที่ใช้ในการเพาะปลูก
ลักษณะของดิน	สามารถกักเก็บน้ำไว้ที่หน้าผิวดินได้
pH	5.8-7.7
อินทรีย์วัตถุ	1-2%
ฟอสฟอรัส	5-10 ppm
โพแทสเซียม	60-80 ppm
สารหนู	< 30 mg/kg
แคดเมียม	< 0.15 mg/kg
โคบอลต์	< 20 mg/kg
โครเมียม	< 80 mg/kg
ทองแดง	< 45 mg/kg
ปรอท	< 0.10 mg/kg
นิกเกิล	< 45 mg/kg
ตะกั่ว	< 55 mg/kg
สังกะสี	< 70 mg/kg

1.3 สภาพภูมิอากาศ

พรมเป็นสมุนไพรที่ชอบแสงแดด เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30-40 °C ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 65-80 (2)

1.4 แหล่งน้ำและคุณภาพน้ำ

1.4.1 ควรเป็นแหล่งน้ำสะอาด ปราศจากสารพิษปนเปื้อน อาจเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น คลองบึง บ่อขุด หรือมีการต่อน้ำประปาเข้าที่แปลงก็ได้

1.4.2 ไม่ควรเป็นแหล่งน้ำที่เกิดจากการทำลายสิ่งแวดล้อม

2. พันธุ์ (3)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.

ชื่อพ้อง : *Gratiola monnieri* Linn., *Herpestis monnieri* (L.) H.B.K., *Lysimachia monnieri* Linn.,
Bramia monnieri (L.) Pennell., *Septas repens* Lour.

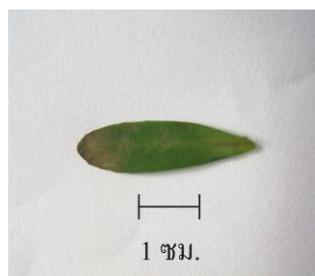
ชื่อวงศ์ : Scrophulariaceae

ลำต้น : อวบน้ำ ผิวเรียบไม่มีขน ทอดเลื้อยไปตามพื้นดินและชูส่วนยอดขึ้น มีกิ่งจำนวนมาก รากออกตามข้อ ยาวประมาณ 10-40 ซม.

ใบ : ใบเดี่ยวรูปไข่กลับ หรือรูปช้อน ก่อนข้างยาว ใบแคบ ปลายกว้างมน ขอบใบเรียบ การเรียงตัวของใบ แบบสลับ ยาวประมาณ 6-20 มม. กว้าง 1-5 มม.



รูปที่ 1 ยอดพรมมิ



รูปที่ 2 ใบของพรมมิ

ดอก : เป็นดอกเดี่ยว ออกตามซอกใบมีกลีบสีขาวหรือสีม่วงอ่อน ยาว 8-10 มม. โคนดอกห่อหุ้มรวมกันเป็นหลอด มีกลีบดอก 5 กลีบ เกสรตัวผู้ติดกับกลีบดอก กว้าง 4 มม. ยาว 2.5 มม.

กลีบเลี้ยง : ลักษณะเป็นรูปไข่ ปลายแหลมหรือเกือบแหลม กลีบเลี้ยง 1 อันอยู่ด้านบน 2 กลีบอยู่ด้านล่าง กว้าง 2.5 มม. ส่วนอีก 2 อันอยู่ด้านข้างมีลักษณะคล้ายหัวดอก ปลายเรียวแหลม กว้าง 1.5 มม.



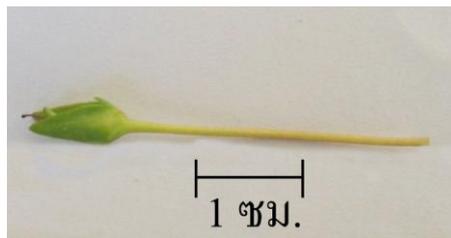
รูปที่ 3 ลักษณะดอกของพรมมิ



รูปที่ 4 ขนาดดอกของพรมมิ

ผล : ลักษณะเป็นแคปซูลรูปไข่ กว้าง 5 มม. ยาว 3 มม. โดยประมาณ

เมล็ด : กว้าง 0.5-0.6 มม. ยาว 0.3 มม. โดยประมาณ



รูปที่ 5 ขนาดผลของพรมมิ

3. การปลูก

3.1 การเตรียมแปลงเพาะปลูก

ในการเตรียมแปลงเพาะปลูกควรไถดิน 2 ครั้ง การไถครั้งแรกพลิกดินขึ้นมาแล้วเว้นช่วงให้วัชพืชงอกแล้วไถครั้งที่ 2 หรือไถแปรฝังกลบต้นวัชพืชลงในดิน และเป็นการปรับระดับพื้นที่ให้เรียบสม่ำเสมอ เนื่องจากพรมมิเป็นสมุนไพรที่ชอบน้ำจึงต้องมีการทำคันดินกั้นน้ำ (กว้างประมาณ 0.5 ม.) เพื่อเก็บกักน้ำไว้ในแปลง (ระดับน้ำสูงประมาณ 2-10 ซม.) นอกจากนั้นแล้วควรมีการทำช่องทางระบายน้ำเข้าออกจากแปลงด้วย



รูปที่ 6 การไถปรับหน้าดิน



รูปที่ 7 ลักษณะแปลงที่ไถและทำการกักเก็บน้ำแล้ว

3.2 วิธีเพาะปลูก

ตัดพรมมิแม่พันธุ์ให้ได้ความยาวประมาณ 1 ฟุต โดยส่วนที่ตัดได้นั้นต้องมีข้อที่มีรากติดอยู่ แล้วนำไปปักดำลงในแปลงเพาะปลูกที่เตรียมไว้



รูปที่ 8 ลักษณะของส่วนของพรมมิที่จะนำไปปลูก



รูปที่ 9 การปักดำพรมมิ

4. การดูแลรักษาสมุนไพรรพรมมิ

4.1 การใส่ปุ๋ย

จะใส่ปุ๋ยหลังจากปลูกพรมมิไปแล้ว 1 สัปดาห์ โดยใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 อัตราส่วนประมาณ 10 กก./ไร่/ครั้ง จากนั้นใส่อีกครั้งเมื่อพรมมิมิลักษณะเหลืองหรือไม่แข็งแรงโดยใช้ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตราส่วนประมาณ 10 กก./ไร่/ครั้ง

4.2 การให้น้ำ

ควรรักษาระดับน้ำให้อยู่ในช่วง 2-10 ซม. เนื่องจากพื้นดินตลอดเวลาการเพาะปลูก

4.3 ระยะเวลาในการเพาะปลูก

หลังจากทำการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวพรมมิ 5 เดือนขึ้นไป หากพบว่าพรมมิเจริญเติบโตจนแน่นแปลง หรือมีลักษณะเหลืองและกระแแกร็น ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อปริมาณสารซาโปนินที่อยู่ในพรมมิ ให้ไถกลับไร่พรมมิเพื่อเตรียมดินในการเพาะปลูกครั้งต่อไปหรือใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อีกครั้ง

5. สุขลักษณะและความสะอาด

5.1 การกำจัดวัชพืช ควรกำจัดวัชพืชขณะยังเล็กเพื่อไม่ให้แข่งกับพืชหลัก หรือเป็นแหล่งเพาะศัตรูพืช หรือติดไปกับผลผลิต

5.2 ควรเก็บวัชพืช เศษพืชไปทำลายนอกแปลงปลูก

5.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ หลังใช้งานแล้วต้องทำความสะอาด และเก็บให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งานเสมอ

6. การป้องกันและกำจัดศัตรูพืช

6.1 ศัตรูพืชที่สำคัญและการป้องกันกำจัด

6.1.1 หอยเชอรี่ เป็นหอยทากน้ำจืด สามารถวางไข่ได้ตลอดปี และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเมื่อมีขนาด 1.6 ซม. จะเริ่มกัดกินทำลายในระยะปักดำจนถึงแตกกอเต็มที่ การป้องกันกำจัดทำได้โดย

(1) ใช้วัสดุกั้นทางที่ไอน้ำเข้า เพื่อป้องกันการแพร่กระจายและระบาด

(2) ทำลายตัวหอยและไข่โดยใช้กระชอนที่มีด้ามซ้อนตัวหอยอย่างน้อยสัปดาห์ละ 1 ครั้งในเวลาเช้าหรือเย็น หรือใช้ไม้รวกปักรอบคันนาทุกระยะ 10 ม. เพื่อให้หอยมาไขบนหลักไม้

(3) ใช้สารชีวภาพฆ่าหอย เช่น กากซาซาโปนิน โดยใช้ปริมาณ 13.3 กก./ไร่



รูปที่ 10 ลักษณะของหอยเชอรี่



รูปที่ 11 ลักษณะไข่ของหอยเชอรี่

6.2 วัชพืชที่สำคัญและการป้องกันกำจัด

6.2.1 ตะไคร่น้ำ เป็นสาหร่ายเซลล์เดียวซึ่งเกาะยึดในพื้นที่น้ำไหล เนื่องจากน้ำไหลมีทั้งออกซิเจนคาร์บอนไดออกไซด์ และสารอาหารไหลเวียนดี รวมทั้งมีแสงสว่างที่เพียงพอ สาหร่ายพวกนี้จึงยึดเกาะและขยายเพิ่มจำนวนกลายเป็นผืนเขียวๆ ซึ่งสามารถหลุดลอยเป็นแผ่นๆไปได้ ถ้ามีมากเกินไป กลางคืนใช้ออกซิเจน อาจทำให้น้ำขาดออกซิเจน โดยเฉพาะในฤดูร้อน วิธีป้องกันและแก้ไขคือ เปลี่ยนถ่ายน้ำ ถ้าหากมีปริมาณมากให้ใช้ตะแกรงช้อนออกจากแปลง ไม่ควรใช้สารเคมีเพื่อแก้ปัญหา (5)



รูปที่ 12 ลักษณะของตะไคร่น้ำ 1



รูปที่ 13 ลักษณะของตะไคร่น้ำ 2

6.2.2 ผักบุ้ง เป็นพืชน้ำชนิดหนึ่ง ลักษณะใบกว้าง ลำต้นกลวงลอยน้ำได้ เมื่อมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นจะแย่งแสงแดดเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงและแย่งสารอาหารที่มีอยู่ในแปลง วิธีป้องกันและแก้ไขคือ กำจัดทิ้งโดยการถอน แล้วนำไปทำลายบริเวณนอกแปลงปลูก (5)



รูปที่ 14 ลักษณะของผักบุ้ง

6.2.3 กกขนาก เป็นวัชพืชลำต้นสามเหลี่ยมเว้าลึก ดอกเป็นแฉกทรงกลมสีเขียว ชอบขึ้นบริเวณดินชื้นแฉะ เมื่อมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นจะแย่งแสงแดดเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงและแย่งสารอาหารที่มีอยู่ในแปลง วิธีป้องกันและแก้ไข คือ กำจัดทิ้งโดยการถอน แล้วนำไปทำลายบริเวณนอกแปลงปลูก (5)



รูปที่ 15 ลักษณะของกกขนาก

6.2.4 ผักตบชวา เป็นพืชน้ำ มีลำต้นสั้นแตกใบเป็น ถ้าน้ำตื้นก็จะหยั่งรากลงดินเมื่อมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นจะแย่งแสงแดดเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงและแย่งสารอาหารที่มีอยู่ในแปลง วิธีป้องกันและแก้ไข คือ กำจัดทิ้งโดยการถอน แล้วนำไปทำลายบริเวณนอกแปลงปลูก (5)



รูปที่ 16 ลักษณะของผักตบชวา

6.2.5 กะเม็ง เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นตั้งตรง สูงประมาณ 30-50 ซม. ลำต้นกลม มีขนแข็งสากมือปกคลุม แตกแขนงมาก ที่โคนต้นอาจมีสีแดงอมม่วง ใบ เป็นใบเดี่ยวออกจากลำต้นในลักษณะตรงข้ามเป็นคู่ ใบค่อนข้างแคบเรียวยาว ปลายใบค่อนข้างแหลม ฐานใบมีรอยเว้าและบานออกทั้งสองด้านเล็กน้อย ขอบใบมีรอยหยักเล็กน้อย ไม่มีก้านใบ มีขนสั้นๆ สีขาวปกคลุมทั่วทั้งใบ ดอกออกเป็นช่อ ตามซอกใบและตามปลายยอด เป็นช่อแน่นสีขาว ดอกย่อยรอบนอกเป็นดอกตัวเมีย มีลักษณะเป็นแผ่นสีขาวปลายมน ดอกย่อยที่อยู่ตรงกลางเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีลักษณะคล้ายรูปถ้วย กลีบดอกจะติดกัน ปลายกลีบดอกแยกออกเป็นแฉก มีส่วนที่คล้ายกลีบเลี้ยง 5-6 กลีบ สีเขียวรองรับช่อดอก พบขึ้นบริเวณชุ่มชื้น เช่น ในนาข้าว ริมคลอง ริมบ่อน้ำ หรือในแปลงพืชไร่ต่างๆ ไป วิธีป้องกันและแก้ไข คือ กำจัดทิ้งโดยการถอน แล้วนำไปทำลายบริเวณนอกแปลงปลูก (6)



รูปที่ 17 ลักษณะของต้นกะเม็ง

7. การเก็บเกี่ยว

เก็บส่วนที่พื้นน้ำความยาวประมาณ 10-20 ซม.จากยอด เก็บเมื่อพรมมิเจริญเติบโตเต็มที่ประมาณ 2 เดือนขึ้นไปหลังจากทำการปลูก วิธีเก็บ ใช้วิธีเด็ด ตัด หรือใช้เกี่ยวเกี่ยว



รูปที่ 18 การเก็บเกี่ยวพรมมิ



รูปที่ 19 ขนาดของพรมมิที่เก็บเกี่ยวได้

8. วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว

เมื่อเก็บเกี่ยวพรมมิออกจากแปลงปลูกแล้วการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวเป็นสิ่งจำเป็นมาก เพื่อรักษาคุณภาพของพรมมิให้ได้ผลดีที่สุดต่อการนำไปใช้

8.1 การทำความสะอาดและคัดแยกผลผลิตที่ได้มาตรฐาน

8.1.1 คัดแยกสิ่งปลอมปนออก เช่น หิน ดิน ทราย ส่วนของพืชที่ปะปน หรือสมุนไพรอื่นที่คล้ายคลึงกันปะปนมา รวมทั้งเด็ดรากที่ติดมาขณะเก็บเกี่ยวทิ้ง



รูปที่ 20 การคัดแยกสิ่งแปลกปลอมออกจากพรมมิ

8.1.2 ล้างด้วยน้ำสะอาดประมาณ 3 รอบหรือจนกว่าจะไม่มีฝุ่นผงในน้ำ

8.1.3 นำไปทิ้งบนตะแกรงให้สะเด็ดน้ำ

8.2 การทำให้แห้ง

การทำสมุนไพรให้แห้งเพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาและการนำมาใช้ สมุนไพรที่มีความชื้นมากเกินไปจะทำให้เกิดเชื้อราและแบคทีเรีย และยังเร่งให้เกิดการสูญเสียสารสำคัญด้วยวิธีการทำแห้งทำได้โดยการตากแห้งหรืออบแห้ง

8.2.1 การตากแห้งพรมมิ ควรตากบนตะแกรงโปร่ง สะอาด และเป็นสถานที่ที่เปิดโล่ง ห่างไกลจากถนน หรือสิ่งแวดล้อมที่มีฝุ่นละอองมาก โดยทำการตากพรมมิ 1-2 วัน หรือจนกว่าจะแห้ง ส่วนในตอนค่ำ ควรเก็บสมุนไพรเข้าภายในอาคาร หรือใช้ผ้าพลาสติกคลุมเพื่อป้องกันความชื้นจากน้ำค้าง



รูปที่ 21 การตากแห้งพรมมิ

8.2.2 การอบแห้ง เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถทำให้พรมมิแห้ง ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและประหยัดเวลาและได้วัตถุดิบที่มีคุณภาพดี อุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้ง 55 °C นานประมาณ 48 ชั่วโมง เพื่อเป็นการประหยัดพลังงานอาจใช้วิธีการตากแดด 1 วัน พอให้สมุนไพรแห้งแล้ว นำเข้าสู่อบที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าสมุนไพรจะแห้งสนิท



รูปที่ 22 การอบพรมมิ



รูปที่ 23 ลักษณะพรมมิที่ผ่านการอบแล้ว

8.3 การย่อยขนาด

ใช้เครื่องบดย่อยสมุนไพรอย่างหยาบคดพรมมิแห้ง จะได้ผงพรมมิหยาบ



รูปที่ 24 เครื่องบดสมุนไพร

8.4 การเก็บรักษาสมุนไพรแห้ง

เมื่อสมุนไพรแห้งแล้ว การดูความชื้น การเข้าทำลายของแมลง เชื้อราและแบคทีเรีย เป็นองค์ประกอบสำคัญที่เร่งให้สมุนไพรเสื่อมคุณภาพเร็วขึ้น จึงควรปฏิบัติ ดังนี้

8.4.1 ควรเก็บในที่สะอาด เย็น ไม่อับชื้น มีอากาศถ่ายเทได้ดี และไม่ถูกแสงแดด หรือเก็บในห้องเย็น

8.4.2 เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท เช่น ถุงพลาสติกสีดำหรือถังพลาสติกที่มีฝาปิด

8.4.3 ไม่ควรเก็บไว้นานเกินไป โดยทั่วไปสมุนไพรไม่ควรเก็บนานเกินกว่า 1 ปี เพราะจะสูญเสียสารสำคัญที่ต้องการไป

8.4.4 การเก็บรักษาควรระบุชื่อยาชนิดสมุนไพร รวมทั้งวันที่เก็บให้ชัดเจน

8.5 การขนส่ง

8.5.1 เตรียมการเรื่องตลาดรับซื้อ และยานพาหนะในการขนส่งล่วงหน้า

8.5.2 ไม่กองผลผลิตบนพื้นรถบรรทุกโดยตรง ควรใส่ภาชนะ

8.5.3 การขนส่งระยะไกลควรขนส่งให้เร็วที่สุด

9. การควบคุมคุณภาพ

การควบคุมคุณภาพจะทำการวัดสารซาโปนินรวม (total saponins) ในพรมมิ ตามวิธีที่กำหนดในแนวทางการวิเคราะห์สารซาโปนินจากสมุนไพรพรมมิ โดยวัดดูดิบสมุนไพรพรมมิต้องมีสารซาโปนินรวมอยู่มากกว่า 1%

10. การบันทึกข้อมูล

บันทึกการปฏิบัติการในขั้นตอนต่างๆ ให้สามารถตรวจสอบได้ หากเกิดข้อผิดพลาดหรือบกพร่องจะได้จัดการแก้ไขหรือปรับปรุงได้ทันเวลาที่ เช่น

10.1 สภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ปริมาณน้ำฝน

10.2 ชื่อพันธุ์ แหล่งพันธุ์ วันที่เพาะปลูก

10.3 วันที่ใส่ปุ๋ย ชนิดสารเคมี

10.4 วันที่ศัตรูพืชระบาด

10.5 วันที่เก็บเกี่ยว ค่าใช้จ่าย ปริมาณผลผลิตและรายได้

10.6 ปัญหาและอุปสรรคอื่นๆ ในช่วงฤดูปลูก การเก็บเกี่ยวและการขนส่ง

แบบบันทึกข้อมูลการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวสมุนไพร

การระบุชนิดพืชสมุนไพรที่เพาะปลูก

ชื่อวิทยาศาสตร์ (สกุล, ชนิด, ผู้ตั้งชื่อ,

วงศ์)

ชื่อท้องถิ่น :

ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ (ถ้า

ทราบ) :

ส่วนของพืชที่เก็บเกี่ยว :

การระบุสถานที่เพาะปลูก

ที่ตั้งของพื้นที่

ปลูก :

การระบุการเพาะปลูก

ชื่อของผู้

เพาะปลูก :

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อ

ได้ :

วัน/เดือน/ปีที่การเพาะปลูก

เริ่มต้น :

วัน/เดือน/ปีที่การเพาะปลูก

สิ้นสุด :

ส่วนที่ใช้ขยายพันธุ์

แหล่งที่มาของสมุนไพรที่ใช้

ปลูก :

การเพาะปลูก

ขนาดของพื้นที่ปลูก : ขนาด

แปลง:

ระยะห่างระหว่างแถว : ระยะห่างระหว่าง

ต้น:

ที่มาของน้ำ น้ำประปา สาย แม่น้ำ อื่นๆ (ระบุ).....

ศัตรูพืชหรือวัชพืชที่พบ : หอยเชอรี่ ช่วงเวลาที่พบ.....

ตะไคร่น้ำ ช่วงเวลาที่

พบ.....

ผักนึ่ง ช่วงเวลาที่พบ.....

กกขนาด ช่วงเวลาที่พบ.....

ผักตบชวา ช่วงเวลาที่พบ

กะเม็ง ช่วงเวลาที่พบ.....

อื่นๆ (ระบุ)..... ช่วงเวลาที่พบ.....

ตารางบันทึกความหนาแน่น

วัน เดือน ปี	ความหนาแน่นของต้นพืช (ต้น/ ตารางเมตร)

สารเคมีการเกษตร

ปุ๋ยที่ใช้ก่อนปลูก (ปุ๋ยคอก/ปุ๋ยหมัก/ปุ๋ยวิทยาศาสตร์) :

1. ชื่อปุ๋ย : วิธีใช้:

วัน เดือน ปี ที่ใส่: อัตราที่ใช้ (กก./ไร่):

2. ชื่อปุ๋ย : วิธีใช้:

วัน เดือน ปี ที่ใส่: อัตราที่ใช้ (กก./ไร่):

3. ชื่อปุ๋ย : วิธีใช้:

วัน เดือน ปี ที่ใส่: อัตราที่ใช้ (กก./ไร่):

ปุ๋ยที่ใช้ระหว่างปลูก (ปุ๋ยคอก/ปุ๋ยหมัก/ปุ๋ยวิทยาศาสตร์) :

1. ชื่อปุ๋ย : วิธีใช้:

วัน เดือน ปี ที่ใส่: อัตราที่ใช้ (กก./ไร่):

2. ชื่อปุ๋ย : วิธีใช้:

วัน เดือน ปี ที่ใส่: อัตราที่ใช้ (กก./ไร่):

3. ชื่อปุ๋ย : วิธีใช้:

วัน เดือน ปี ที่ใส่: อัตราที่ใช้ (กก./ไร่):

สารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้:

1. ชื่อ.....

วิธีใช้:

วัน เดือน ปี ที่ใส่:.....

อัตราที่ใช้ (กก./ไร่):.....

2. ชื่อ.....

วิธีใช้:

วัน เดือน ปี ที่ใส่:.....

อัตราที่ใช้ (กก./ไร่) :.....

การเก็บเกี่ยว

วันเริ่มต้นเก็บเกี่ยว:

วันสิ้นสุดเก็บเกี่ยว:

วิธีเก็บเกี่ยว:

ปริมาณผลผลิตต่อไร่:.....

ตัวอย่างการบันทึกแบบบันทึกข้อมูลการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยวสมุนไพร

การระบุชนิดพืชสมุนไพรที่เพาะปลูก

ชื่อวิทยาศาสตร์ (สกุล, ชนิด, ผู้ตั้งชื่อ, *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.

วงศ์) : พรหมมิ หยคน้ำตา นมมิ ผักมิ

ชื่อท้องถิ่น :

ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ (ถ้า Brahmi, Babies tear, Monier water hyssop, Dwarf bacopa, English daisy,

ทราบ) : Thyme-leaved gratiola

ส่วนของพืชที่เก็บเกี่ยว : เก็บส่วนเหนือดินโดยตัดจากยอดลงมาประมาณ 10-20 ซม.

การระบุสถานที่เพาะปลูก

ที่ตั้งของพื้นที่ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

ปลูก :

การระบุการเพาะปลูก

ชื่อของผู้ น.ส. รัตนาพร สิริบาล นายสนั่น สิงหเดช นายบุญเชิด เอี่ยมสะอาด และคณะ

เพาะปลูก : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

ที่อยู่ที่สามารถติดต่อ

ได้ : 22 ต.ก. 2552

วัน/เดือน/ปีที่การเพาะปลูก

เริ่มต้น : 22 ม.ค. 2553

วัน/เดือน/ปีที่การเพาะปลูก

สิ้นสุด :

ส่วนที่ใช้ขยายพันธุ์

แหล่งที่มาของสมุนไพรที่ใช้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปลูก :

การเพาะปลูก

ขนาดของพื้นที่ปลูก : 1.5 ไร่ ขนาด กว้าง 40 ม. ยาว 60 ม.

แปลง : 30 ชม.

ระยะห่างระหว่างแถว : 30 ซม. ระยะห่างระหว่าง

ต้น :

ที่มาของน้ำ : น้ำประปา ทะเลสาบ แม่น้ำ บ่อ อื่นๆ(ระบุ).....

ศัตรูพืชหรือวัชพืชที่พบ : หอยเชอรี่ ช่วงเวลาที่พบ..... 1-2 เดือนแรก.....

ตะไคร่น้ำ ช่วงเวลาที่พบ..... 1-2 เดือนแรก.....

ผักบุ้ง ช่วงเวลาที่พบ..... ตลอดการเพาะปลูก.....

กกขนาก ช่วงเวลาที่พบ..... ตลอดการเพาะปลูก.....

ผักตบชวา ช่วงเวลาที่พบ ตลอดการเพาะปลูก.....

กะเม็ง ช่วงเวลาที่พบ..... 2-3 เดือนแรก.....

อื่นๆ (ระบุ)..... ช่วงเวลาที่พบ.....

ตารางบันทึกความหนาแน่น

วัน เดือน ปี	ความหนาแน่นของต้นพืช (ต้น/ ตารางเมตร)
24 ส.ค. 2552	9
24 ก.ย. 2552	20
24 ต.ค. 2552	50
24 พ.ย. 2552	90
24 ธ.ค. 2552	120
14 ม.ค. 2553	150

หมายเหตุ : การนับจำนวนต้นพืชจะนับกิ่งที่แตกแขนงออกมา 6 กิ่งเท่ากับพรมมิ 1 ต้น

สารเคมีการเกษตร

ปุ๋ยที่ใช้ก่อนปลูก (ปุ๋ยคอก/ปุ๋ยหมัก/ปุ๋ยวิทยาศาสตร์) :

- ชื่อปุ๋ย : วิธีใช้:
- วัน เดือน ปี ที่ใส่: อัตราที่ใช้ (กก./ไร่):
- ชื่อปุ๋ย : วิธีใช้:
- วัน เดือน ปี ที่ใส่: อัตราที่ใช้ (กก./ไร่):

ปุ๋ยที่ใช้ระหว่างปลูก (ปุ๋ยคอก/ปุ๋ยหมัก/ปุ๋ยวิทยาศาสตร์) :

- ชื่อปุ๋ย : ปุ๋ยยูเรีย สูตร 46-0-0 วิธีใช้: หว่านลงในแปลง
- วัน เดือน ปี ที่ใส่: 30 ส.ค. 2552 อัตราที่ใช้ (กก./ไร่): 10 กก./ไร่
- ชื่อปุ๋ย : ปุ๋ยยูเรีย สูตร 15-15-15 วิธีใช้: หว่านลงในแปลง
- วัน เดือน ปี ที่ใส่: 8 ก.ย. 2552 อัตราที่ใช้ (กก./ไร่): 10 กก./ไร่
- ชื่อปุ๋ย : วิธีใช้:
- วัน เดือน ปี ที่ใส่: อัตราที่ใช้ (กก./ไร่):

สารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้:

- ชื่อ..... กากชา (ซาโปนิน) ตรามายูนิกอร์น นำเข้าและจัดจำหน่ายโดยห้างหุ้นส่วนจำกัดยงฮงฮิ้น

วิธีใช้: หว่านกากชาให้ทั่วแปลง

วัน เดือน ปี ที่ใส่: 6 ต.ค. 2552

อัตราที่ใช่ (กก./ไร่): 13.3 กก./ไร่

5. ชื่อ.....

วิธีใช้:

วัน เดือน ปี ที่ใส่:.....

อัตราที่ใช่(กก./ไร่):

6. ชื่อ.....

วิธีใช้:

วัน เดือน ปี ที่ใส่:.....

อัตราที่ใช่ (กก./ไร่):.....

การเก็บเกี่ยว

วันเริ่มต้นเก็บเกี่ยว: 22 ต.ค. 2552

วันสิ้นสุดเก็บเกี่ยว: 22 ม.ค. 2553

วิธีเก็บเกี่ยว: วิธีเด็ด ตัด หรือใช้เคียวเกี่ยว

ปริมาณผลผลิตต่อไร่: 174 กก.แห้งต่อไร่

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

แนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิ เป็นแนวทางในการทำการเกษตร เพื่อผลิตวัตถุดิบสมุนไพรที่มีคุณภาพดี ตรงตามมาตรฐานที่กำหนด มีกระบวนการผลิตที่ปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค มีการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์สูงสุด และไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับแนวทางการเกษตรที่เหมาะสมในการผลิตวัตถุดิบสมุนไพรพรมมิสำหรับเกษตรกร ดังนี้

1. แหล่งเพาะปลูก ควรอยู่ห่างจากแหล่งมลพิษที่จะทำให้เกิดการตกค้าง หรือปนเปื้อนในผลผลิต และควรอยู่ใกล้กับแหล่งน้ำ พร้อมทั้งมีการคมนาคมสะดวก
2. การปลูกและดูแลรักษา จากนั้น ไถดิน 2 ครั้งแล้วทำคันดินเพื่อกักเก็บน้ำ นำดินอ่อนที่มีรากติดอยู่ปักค้ำลงในแปลง และหมั่นตรวจดูบริเวณแปลงว่ามีศัตรูพืชหรือไม่ เพื่อจะได้ทำการกำจัด
3. ใบและยอดอ่อนจะเก็บเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ และควรเก็บในเวลากลางวัน โดยใช้วิธีเด็ด ตัด หรือใช้เลื่อยเกี่ยว
4. มีการล้างทำความสะอาดและคัดแยกผลผลิตที่ได้มาตรฐาน และทำให้แห้งโดยวิธีการตาก หรือการอบ
5. เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท เช่น ถุงพลาสติกสีดำ หรือถังพลาสติกที่มีฝาปิด
6. การขอยุขขนาดจะใช้เครื่องบดขยี้สมุนไพรอย่างหยาบ
7. การขนส่ง เตรียมการเรื่องตลาดรับซื้อ และการขนส่งระยะไกลควรขนส่งให้เร็วที่สุด
8. การควบคุมคุณภาพ สมุนไพรพรมมิต้องมีสารซาโปนินรวมอยู่มากกว่า 1%*
9. บันทึกการปฏิบัติการในขั้นตอนต่างๆ ให้สามารถตรวจสอบได้ หากเกิดข้อผิดพลาดหรือบกพร่องจะได้จัดการแก้ไขหรือปรับปรุงได้ทันที่

การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารซาโปนินในพรมมิ

เนื่องจากยังไม่มีข้อกำหนดเกณฑ์มาตรฐานของพรมมิในประเทศไทย คณะผู้จัดทำจึงกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารซาโปนินขั้นต่ำที่ควรมีในพรมมิแห้งที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทำผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิ โดยรวบรวมจากงานวิจัยของไทย และต่างประเทศดังนี้

จากการศึกษาของ Phrompittayarat และคณะ (7) ในปี ค.ศ.2007 พบว่าปริมาณสารซาโปนินที่วิเคราะห์ได้จากส่วนยอดของสมุนไพรพรมมิ $1.39 \pm 0.04\%w/w$ ในฤดูผล และได้ $1.21 \pm 0.14\%w/w$ ในฤดูหนาว ในการศึกษาของ Sairam และคณะ (8) ในปี ค.ศ.2002 ได้ใช้สารสกัดจากสมุนไพรพรมมิส่วนยอดที่มีปริมาณสารซาโปนิน 1.2 %w/w ในการศึกษาของ Ganzera และคณะ (9) ในปี ค.ศ.2004 พบว่าปริมาณสารซาโปนินที่วิเคราะห์ได้สมุนไพรพรมมิ 1.67 %w/w และในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าปริมาณสารซาโปนินที่วิเคราะห์ได้จากส่วนยอดของสมุนไพรพรมมิ $1.3 \pm 0.2\%w/w$

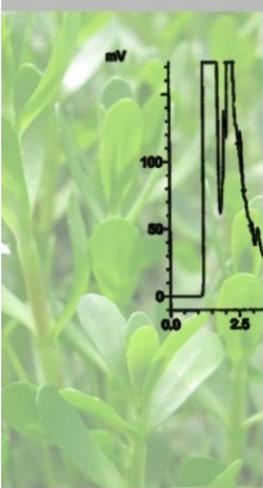
จากข้อมูลการศึกษาต่างๆที่ได้กล่าวมาจะเห็นได้ว่าส่วนของยอดของสมุนไพรรพรมมีมีปริมาณสารซาโปนินเฉลี่ย 1.3 %w/w เมื่อนำมาคำนวณค่าเบี่ยงเบน 30% จากผลที่ได้ส่วนของยอดของสมุนไพรรพรมมีมีปริมาณสารซาโปนินอย่างน้อย 1%w/w

บรรณานุกรม

1. PCD:Soil Quality Standards#s1 [homepage on the Internet]. Bangkok: Pollution control department. Ministry of natural resources and environment, 2004 [date unknown; cited 2010 Jan 14]. Available from: http://www.pcd.go.th/info_serv/en_reg_std_soil01.html
2. Central institute of medicinal and aromatic plants (IN). Organic cultivation of *Bacopa monnieri* and *Ocimum sanctum*. Bangalore:The Institute; 2007.
3. ดวงพร สุวรรณกุล, รังสิต สุวรรณเขตนิกม. วัชพืชในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2544. หน้า 152.
4. Smitinand T, Larsen K, editors. Flora of Thailand. Vol 5 part 2. Bangkok: Chutima Press; 1990.
5. วัชพืชในนาข้าว [homepage on the Internet]. ชลบุรี: ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี สำนักเมล็ดพันธุ์ข้าว กรมการข้าว, c2550 [date unknown; cited 2010 Jan 14]. Available from: <http://cbr-rsc.ricethailand.go.th/weed.htm>
6. วัชพืช [homepage on the Internet]. กรุงเทพฯ: โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, c2001 [date unknown; cited 2010 Jan 14]. Available from: http://www.rspg.or.th/plants_data/use/crop_d13.htm
7. Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Wittaya-Areekul S, Jetiyanon K, Ingkaninan K. An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. Anal Chim Acta. 2007 Feb 12;584(1):1-6.
8. Sairam K, Dorababu M, Goel RK, Bhattacharya SK. Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. Phytomedicine. 2002 Apr;9(3):207-11.
9. Ganzera M, Gampenrieder J, Pawar RS, Khan IA, Stuppner H. A separation of major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri* by high-performance liquid chromatography. Anal chim acta 2004 Jul 19;516:149-54.



แนวทางการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในสมุนไพรพรมมิ
Guidelines for analysis of saponins in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.



ศูนย์เทคโนโลยีสมุนไพรมหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาคผนวก ข

แนวทางการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในสมุนไพร

Guidelines for analysis of saponins in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารซาโปนินในสมุนไพรเพื่อการควบคุมคุณภาพนั้น ในที่นี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ การวิเคราะห์สารซาโปนินในผงสมุนไพรแห้ง และการวิเคราะห์ซาโปนินในยาเม็ด

การเตรียมการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในสมุนไพร

สถานที่และขั้นตอนการทำงานวิเคราะห์ต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ที่ดีของกรมโรงงานอุตสาหกรรมและผ่านการประเมินโดยกองควบคุมยา กระทรวงสาธารณสุข (หลักเกณฑ์ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ที่ดีได้จากภาคผนวก⁽²⁾)

เครื่องมือ และสภาวะการทดลองที่ใช้

HPLC system:

1. Isocratic หรือ gradient pump
2. Ultraviolet Detector ที่ตรวจวัดที่ 205 nm ได้
3. เครื่องประมวลผล
4. Injector 20 μ L loop

Column: RP-18 column (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m particle size)

Mobile phase: 0.2%O-phosphoric acid : acetonitrile (65:35%v/v) pH 3.0 โดย ปรับ pH ด้วย 5M NaOH

Flow rate: 1.0 ml/min

Calibration curve

ขั้นตอนการทำ Calibration curve สารซาโปนิน

1. เจือจางสารมาตรฐาน Bacoside A3, Bacopaside II, Bacopaside X, Bacopasaponin C และ Bacopaside I จาก stock solution ด้วย methanol HPLC grade เพื่อให้ได้ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 6.25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml และ 200 μ g/ml ตามลำดับ
2. นำสารมาตรฐานรวมที่ได้ทั้ง 5 ความเข้มข้นไปหา Calibration curve ด้วย HPLC

ก. การวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในผงพรมมิแห้ง

1. ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดพรมมิเพื่อวิเคราะห์คุณภาพสมุนไพรแห้ง

1.1 นำพรมมิที่ผ่านการอบแห้งมาบดเพื่อลดขนาด โดยใช้เครื่องบดย่อยขนาดสมุนไพรอย่างหยาบ หรือเครื่องบดสมุนไพรขนาดเล็ก



รูปที่ 2 เครื่องบดย่อยขนาดสมุนไพรอย่างหยาบ



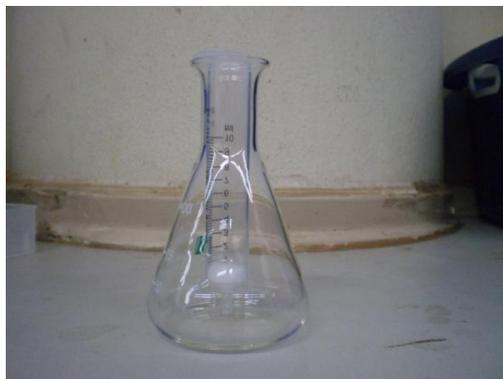
รูปที่ 3 เครื่องบดสมุนไพรขนาดเล็ก

1.2 นำผงสมุนไพรพรมมิผ่านร่อนเบอร์ 60

1.3 ชั่งผงพรมมิปริมาณ 500 mg

2. การสกัดสมุนไพร

2.1 นำสำลีสองบริเวณก้นกระบอกนิตยขนาด 10 ml ที่เอาก้านสูบออกแล้ว



รูปที่ 4 สำลีสองบริเวณก้นกระบอกนิตย

2.2 เติผงพรมมิ 500 mg ลงในกระบอกฉีดยา เติมน้ำกลั่นประมาณ 5 ml เพื่อให้ผงพรมมิเปียกน้ำกลั่น จากนั้นปล่อยน้ำกลั่นออกจากกระบอกฉีดยาจนหมด แล้วใช้พาราฟินพันปลายกระบอกฉีดยา

2.3 เติมน้ำประมาณ 5 ml แล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

2.4 แกะพาราฟินออก ใช้ก้านดูดต้นน้ำออกให้หมด

2.5 นำผงสมุนไพรเปียกที่ได้ใส่ลงใน Erlenmeyer flask แล้ว เติม 95% เอทานอล ปริมาณ 5 ml

2.6 นำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองเอาเฉพาะสารละลายในส่วนหน้า

2.7 นำกากที่เหลือเติม 95% เอทานอลปริมาณ 3 ml แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที กรองเอาสารละลายเพื่อนำไปวิเคราะห์

2.8 นำกากที่เหลือเติม 95% เอทานอลปริมาณ 3 ml นำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที กรองเอาสารละลายเพื่อนำไปวิเคราะห์อีกครั้งหนึ่ง

2.9 นำสารละลายที่กรองในข้อ 2.6-2.8 มาปรับปริมาตรใน volumetric flask ให้ได้ ปริมาตร 10 ml

2.10 ทำซ้ำ 3 ครั้ง (3 replicate)

2.11 กรองสารละลายที่ได้ด้วย 0.45 m nylon syringe filter



รูปที่ 5 การกรองสารละลายด้วย 0.45 m nylon syringe filter

2.12 นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

2.13 นำมาคำนวณปริมาณสารซาโปนินโดยคำนวณจาก peak height ของสาร

Bacoside A3, Bacopaside II, Bacopaside X, Bacopasaponin C และ Bacopaside I เทียบกับ Calibration curve สารซาโปนิน

การประเมินผลการวิเคราะห์

สมุนไพร 20 ซม. ที่วัดจากยอดลงมาต้องมีปริมาณสารซาโปนินอย่างน้อย 1% ^(1, 3, 4)
(ดูที่มาจากภาคผนวก)

ข. การวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในยาเม็ดสมุนไพร

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างยาเม็ดสำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ **saponins**

1. ทำการสับตัวอย่างยาเม็ดจำนวน 10 เม็ด
2. ชั่งน้ำหนักของยาแต่ละเม็ดและบันทึกน้ำหนักไว้
3. บดเม็ดยาแต่ละเม็ดแล้วใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml
4. เติมน้ำกลั่นลงไป 7 ml แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งพบว่ายาไม่สามารถละลายได้หมด แต่จะเป็นตะกอนชั้นๆอยู่บริเวณก้นภาชนะ จากนั้นนำไปกรองเอาเฉพาะส่วนสารละลายที่มีลักษณะใส
5. นำส่วนที่เป็นตะกอนใส่ลงใน Erlenmeyer flask แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาณ 7 ml อีกครั้ง แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที กรองเอาสารละลายใสส่วนหน้า ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
6. นำสารละลายที่กรองได้ไปปรับปริมาตรใน volumetric flask 25 ml ด้วยน้ำกลั่น
7. กรองสารละลายที่ได้ด้วย 0.45 µm nylon syringe filter
8. นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC
9. นำมาคำนวณปริมาณสารซาโปนินในยาเม็ดสมุนไพร โดยคำนวณจาก peak height ของสาร Bacoside A3, Bacopaside II, Bacopaside X, Bacopasaponin C และ Bacopaside I เทียบกับ Calibration curve สารซาโปนิน

การประเมินผลการวิเคราะห์

ยาเม็ดสมุนไพร ต้องมีปริมาณสารซาโปนินรวม 80-120 % จากที่ระบุไว้บนฉลากตามมาตรฐาน USP

เกณฑ์ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ที่ดีของกรมโรงงานอุตสาหกรรม
(Good Laboratory Practice/Department of Industrial Works, GLP/DIW)

เกณฑ์ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ที่ดีของกรมโรงงานอุตสาหกรรม แบ่งออกเป็น 9 หมวด ดังต่อไปนี้

1. องค์กร และ บุคลากร

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้อง

- 1.1 มีนโยบายชัดเจนที่จะให้การสนับสนุนให้ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์มีคุณภาพ ต้องประกาศใช้โดยผู้บริหารสูงสุดที่มีอำนาจหน้าที่
- 1.2 กำหนดแผนภูมิแสดงองค์กร โครงสร้างการบริหารของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ และการบริหารของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ สถานะของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ในองค์กรใหญ่ ซึ่งแสดงโดยมี
 - (1) แผนภูมิแสดงการจัดองค์กรที่เป็นแผนภูมิขององค์กร
 - (2) แผนภูมิของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์
 - (3) Job Description ของทุกตำแหน่ง ภายในห้องปฏิบัติการ
 - (4) Job Description ของทุกตำแหน่ง ในหน่วยงานอื่นๆที่เกี่ยวข้อง (ภายในองค์กร)
- 1.3 บุคลากรพร้อมระบุอำนาจหน้าที่ ความรับผิดชอบในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ ประกอบด้วย
 - (1) ผู้ควบคุมดูแลห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ที่ขึ้นทะเบียนกับกรมโรงงานอุตสาหกรรม
 - (2) เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ที่ขึ้นทะเบียนกับกรมโรงงานอุตสาหกรรม
- 1.4 บุคลากรผู้ปฏิบัติงาน ต้องมีบันทึกประวัติ การศึกษา ประสบการณ์ การฝึกอบรม และ /หรือ ความชำนาญ ที่แสดงให้เห็นตามความเหมาะสม
- 1.5 กำหนดเป้าหมาย หรือแผนในการพัฒนาบุคลากร โดยจัดมีการฝึกอบรมของบุคลากรภายในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จะต้องมีดังต่อไปนี้
 - (1) การทำ Training Need ประจำปี
 - (2) แผนการฝึกอบรมประจำปี
 - (3) การประเมินผลการฝึกอบรม
 - (4) ประวัติการฝึกอบรมในงาน (On the job training) ภายใน และภายนอก
- 1.6 องค์กรต้องมีการประเมินผลความสามารถด้านวิชาการของบุคลากร อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง รวมถึงประเมินก่อนมอบหมายงาน

2. การประกันคุณภาพผลการทดสอบ

- 2.1 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้องมีส่วนดำเนินการดำเนินงานในการควบคุมคุณภาพ และการตรวจติดตามความถูกต้องของผลการทดสอบ ทั้งนี้การควบคุมคุณภาพผลการทดสอบ ซึ่งอย่างน้อยจะดำเนินการด้วยวิธีต่อไปนี้
- (1) การติดตามแผนภูมิควบคุม (Control Chart)
 - (ก) ด้านเครื่องมือ
 - (ข) ด้านผลทดสอบ
 - (2) การวิเคราะห์เบี่ยงคล้
 - (3) การวิเคราะห์ซ้ำ
 - (4) การกลับคืนของสารที่ทราบปริมาณ (Recovery of QC Standard)
 - (5) การกลับคืนของสารที่ทราบปริมาณที่ใส่ไปในตัวอย่าง (Recovery of Spike Sample)
- 2.2 มีการกำหนดแผนการควบคุมคุณภาพ และมีการปฏิบัติงานเป็นไปตามแผนการควบคุมคุณภาพที่กำหนดไว้หรืออื่น ๆ
- (1) มีแผนการควบคุมคุณภาพ (ระบุในวิธีทดสอบ , มีตารางแสดงในเอกสาร)
 - (2) มีการปฏิบัติงานเป็นไปตามแผนการควบคุมคุณภาพที่กำหนดไว้
 - (3) มีการกำหนดเกณฑ์ในการควบคุมคุณภาพ ที่ถูกต้องตามหลักวิชาการ (เช่น เกณฑ์ยอมรับของ RPD, %Recovery)
- 2.3 มีการตรวจสอบผลการควบคุมคุณภาพ โดยบุคลากรที่ขึ้นทะเบียนกับกรมโรงงานอุตสาหกรรม และเก็บรักษาสันทึกของการควบคุมคุณภาพ ทั้งนี้ข้อมูลผลการควบคุมคุณภาพจะต้องได้รับการบันทึกไว้ และต้องมีการเก็บรักษาสันทึกดังกล่าวเพื่อการตรวจสอบ

3. การควบคุมคุณภาพภายนอก โดยการเข้าร่วมในการเปรียบเทียบผลระหว่างห้องปฏิบัติการ

(Interlaboratory Comparison) หรือ โปรแกรมการทดสอบความพร้อมของสถานที่และภาวะแวดล้อม โดยห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้อง

- 3.1 มีมาตรการเพื่อให้เกิดความมั่นใจในการดูแลรักษาความสะอาดเป็นอย่างดีในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์
- 3.2 ห้องปฏิบัติการต้องมีการควบคุมการเข้า - ออก ของบุคคลภายนอก
- 3.3 มีการเฝ้าระวัง ควบคุมและบันทึกภาวะแวดล้อมต่างๆ ตามเกณฑ์ที่กำหนด เช่น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ เป็นต้น
- 3.4 มีการแบ่งพื้นที่ภายในห้องปฏิบัติการ หากมีกิจกรรมที่เข้ากันไม่ได้ต้องมีการแบ่งแยกพื้นที่ข้างเคียงออกจากกัน ต้องมีป้องกันการปนเปื้อนหรือรบกวนซึ่งกันและกัน (Cross contamination)

- 3.5 มีสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ รวมถึงแหล่งพลังงาน ไฟฟ้า แสงสว่างเพียงพอ และภาวะแวดล้อม ต้องอยู่ในสภาพที่เอื้ออำนวยให้เกิดการทำการทดสอบได้อย่างถูกต้อง

4. สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- 4.1 มีขั้นตอนดำเนินงานในการจัดซื้อสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ ที่มีผลกระทบต่อคุณภาพงานของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์
- 4.2 มีการตรวจสอบสารเคมีที่สั่งซื้อว่าเป็นไปตามที่กำหนด Specification ไว้ และมีเอกสาร Certificate of Analysis หรือเอกสาร Material Safety Data Sheet; MSDS ยืนยัน
- 4.3 มีสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือที่จำเป็น เพียงพอต่อการปฏิบัติงาน
- 4.4 มีการจัดทำบัญชีรายชื่อสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ
- 4.5 มีขั้นตอนการดำเนินการเกี่ยวกับสารเคมี เช่น การจัดเก็บสารเคมี การเตรียมสารละลาย และการเก็บรักษาสารละลาย เป็นต้น
- 4.6 มีการจัดทำประวัติเครื่องมือ วิธีการใช้และการบำรุงรักษา และคู่มือของเครื่องมือ
- 4.7 เครื่องมือต้องถูกใช้งานโดยบุคลากรที่ได้รับมอบหมาย
(หมายเหตุ ต้องมีการมอบหมายผู้มีสิทธิ์ในการใช้เครื่องมือและมีการบันทึกการใช้เครื่องมือ)
- 4.8 มีแผนการสอบเทียบ แผนการบำรุงรักษา เครื่องมือหลัก และต้องมีการปฏิบัติตามแผนที่วางไว้
- 4.9 เครื่องมือที่ผ่านการสอบเทียบ ต้องมีการพิจารณาผลการสอบเทียบ และนำค่าแก้ (ถ้ามี) มาใช้ให้ถูกต้องตามหลักวิชาการและทันสมัยก่อนนำไปใช้งานต่อไป ในกรณีที่ผลการสอบเทียบให้ใช้ชุดของค่าแก้ ต้องพิจารณาค่าแก้ที่มีผลต่อการทดสอบ และนำค่าแก้ (ถ้ามี) มาใช้

5. วิธีทดสอบ

- 5.1 มีขั้นตอนการดำเนินงานสำหรับการวิเคราะห์ทดสอบ ทั้งนี้วิธีการเหล่านี้ รวมถึงการจัดการตัวอย่าง การเก็บรักษา การเตรียมตัวอย่างที่จะทดสอบ ภาวะแวดล้อมที่ต้องการ และอื่นๆ ตลอดจนจัดให้มีแบบบันทึกต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการทดสอบนั้น
- 5.2 มีการดำเนินการตามขั้นตอนวิธีการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการจัดทำขึ้น และบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกที่กำหนดขึ้น
- 5.3 เลือกใช้วิธีวิเคราะห์ทดสอบที่มีการตีพิมพ์ในมาตรฐานระหว่างประเทศ ระดับภูมิภาค และระดับประเทศก่อน โดยต้องมั่นใจว่าได้ใช้มาตรฐานฉบับที่ใช้ได้ล่าสุด
(หมายเหตุ วิธีวิเคราะห์ทดสอบมีการอ้างอิงถึงวิธีที่เป็นมาตรฐานได้แก่ Standard Method for the Examination of Water and Wastewater ของ APHA, AWWA และ WEF ฉบับล่าสุด หรือวิธีที่ได้รับการรับรองโดยสถาบันที่เป็นมาตรฐานระดับประเทศ เช่น ISO ASTM เป็นต้น)

- 5.4 มีการตรวจสอบ การคำนวณ และการถ่ายโอนข้อมูล โดยบุคลากรที่ขึ้นทะเบียนกับกรมโรงงานอุตสาหกรรม รวมถึงการรวบรวมข้อมูล และการเก็บรักษาบันทึก

6. มาตรฐานวิธีปฏิบัติงาน และระบบเอกสาร

- 6.1 มีการจัดทำเอกสาร มาตรฐานวิธีการปฏิบัติงานที่จำเป็น (เช่น วิธีปฏิบัติการในการจัดเก็บสารเคมี การเตรียมสารละลาย รวมถึงการควบคุมเอกสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องใช้งาน ตลอดจนเอกสารที่ใช้ดำเนินการทั่วไป วิธีการทดสอบ และคู่มือการใช้งานต่างๆ
- 6.2 การควบคุมเอกสาร
- (1) มีขั้นตอนในการควบคุมเอกสารทั้งหมดที่ออกให้แก่บุคลากรในห้องปฏิบัติการ วิเคราะห์ต้องได้รับการทบทวน และอนุมัติโดยผู้มีอำนาจก่อนนำออกใช้
 - (2) มีการชี้แจงสถานะที่เป็นปัจจุบันของเอกสารฉบับที่ใช้
 - (3) มีการประกาศใช้เอกสารของ GLP/DIW โดยผู้บริหารสูงสุด หรือผู้ที่ได้รับมอบหมาย
- 6.3 เอกสารต่าง ๆ ฉบับที่เป็นปัจจุบัน ต้องมีอยู่พร้อมใช้งานในทุกสถานที่ที่จำเป็นต่อการปฏิบัติงาน เอกสารฉบับที่ไม่ใช้แล้วหรือที่ยกเลิกแล้ว ต้องนำออกจากจุดใช้งานโดยทันที
- 6.4 มีขั้นตอนในการจัดเก็บเอกสาร บันทึกข้อมูลอย่างเป็นระเบียบ และการทำลายบันทึกคุณภาพ

7. การจัดการตัวอย่างทดสอบ

- 7.1 มีขั้นตอนการดำเนินงานการจัดการตัวอย่าง เช่น การรับ การรักษาสภาพ การจัดเก็บตามระยะเวลาที่กำหนด การจำหน่ายตัวอย่าง เป็นต้น
- 7.2 มีระบบในการบ่งชี้ตัวอย่าง เช่น รหัสตัวอย่าง ชื่อตัวอย่าง เป็นต้น ทั้งนี้ขั้นตอนการดำเนินการชี้แจงต้องมั่นใจว่าจะไม่เกิดความสับสนของตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์
- 7.3 มีขั้นตอนการบันทึกสภาพตัวอย่างหรือข้อบกพร่องของตัวอย่างที่ได้รับ ทั้งนี้กรณีตัวอย่างมีความผิดปกติใดๆ หรือมีความแตกต่างจากสภาพปกติ หรือสถานะที่ระบุตามที่อธิบายในวิธีวิเคราะห์ทดสอบ รวมทั้งมีการบันทึกและดำเนินการแจ้งผู้ที่เกี่ยวข้องต่อไป

8. การรายงานผล

- 8.1 มีการรายงานผลการทดสอบอย่างถูกต้อง ชัดเจน ไม่คลุมเครือ และตรงตามวัตถุประสงค์ และเป็นไปตามคำแนะนำที่ระบุใดๆ ในวิธีการทดสอบ ซึ่งจะรายงานในรูปแบบของใบรายงานผลการทดสอบ
- (หมายเหตุ มีขั้นตอนที่จะไม่นำโลโก้ หรือข้อความใดๆ ที่บ่งบอกถึงการผ่านเกณฑ์ GLP/DIW มาแสดงในใบรายงานผลการทดสอบ)

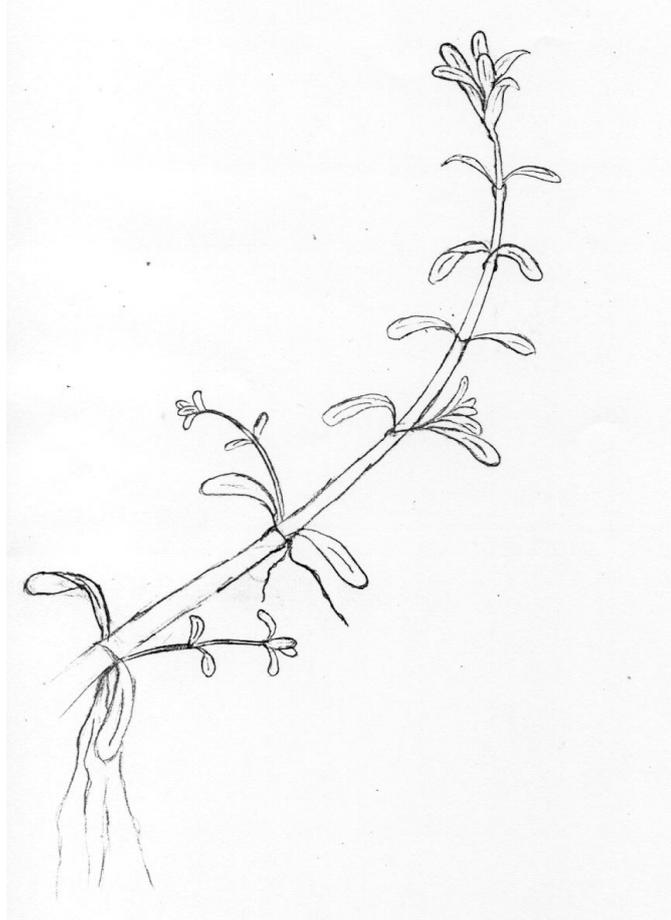
- 8.2 มีใบรายงานผลการทดสอบมีรายละเอียดครบถ้วน อย่างน้อยจะต้องประกอบด้วยข้อมูลดังต่อไปนี้
- (1) ประเภทของใบรายงานผล เช่น รายงานผลการทดสอบ เป็นต้น
 - (2) ชื่อและที่อยู่ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ และสถานที่ที่ทำการทดสอบ (ในกรณีที่อยู่คนละที่กับห้องปฏิบัติการวิเคราะห์)
 - (3) การชี้แจงเฉพาะของรายงานผลการทดสอบ (เช่น หมายเลขลำดับที่) และมีการชี้แจงแต่ละหน้าและมีการชี้แจงอย่างชัดเจนถึงการสิ้นสุดรายงานผลการทดสอบ
 - (4) ชื่อและที่อยู่ของลูกค้า หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง (กรณีภายในไม่ต้องรายงานที่อยู่)
 - (5) ระเบียบวิธีใช้ทดสอบและอ้างอิง
 - (6) รายละเอียดลักษณะ สภาพ และการชี้แจงอย่างไม่คลุมเครือ ของตัวอย่างที่ทดสอบ
 - (7) วัน เดือน ปีที่ รับตัวอย่างทดสอบ วัน เดือน ปีที่ทำการทดสอบ และวัน เดือน ปีที่เสร็จสิ้นการทดสอบ
 - (8) ผลการทดสอบ พร้อมกับหน่วยของการวัดตามความเหมาะสม
 - (9) ชื่อ หน้าที่ และลายมือชื่อของผู้ควบคุมดูแลห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ที่ขึ้นทะเบียนกับกรมโรงงานอุตสาหกรรม
 - (10) ข้อความที่ระบุว่า “รายงานนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น”
- 8.3 มีการจัดเก็บใบรายงานผลทดสอบไว้ในที่ปลอดภัย สามารถตรวจสอบได้
- 8.4 มีแนวทางการดำเนินการแก้ไขรายงานผลการทดสอบ กรณีที่มีการแก้ไขข้อความในรายงานผลการทดสอบที่ได้ออกไปแล้ว ต้องทำโดยการออกรายงานผลการทดสอบฉบับที่สมบูรณ์ใหม่ พร้อมทั้งมีการชี้แจงเฉพาะ และต้องมีการอ้างอิงถึงเอกสารต้นฉบับเดิมที่ออกแทน
- 8.5 กรณีที่มีการจ้างเหมาช่วงการทดสอบ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้องมีขั้นตอนในการรายงานผลการจ้างเหมาช่วง (เฉพาะดัชนีที่ได้รับอนุญาตให้ขึ้นทะเบียนกับกรมโรงงานอุตสาหกรรมเท่านั้น)

9. อาชีวอนามัย และความปลอดภัย ในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์

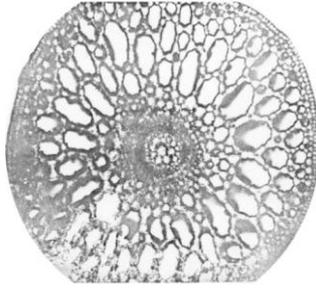
- 9.1 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้องมีนโยบายด้านความปลอดภัย และ อาชีวอนามัยในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์หรือองค์การ ประกาศใช้โดยผู้บริหารสูงสุดและมีการปฏิบัติงานตามนโยบายและแผนงานด้านความปลอดภัย และอาชีวอนามัยที่จัดทำไว้
- 9.2 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้องมีการจัดการ และการกำจัดของเสีย (Waste) ที่เกิดจากการวิเคราะห์ของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ ซึ่งวิธีการจัดการนี้รวมถึงการรวบรวม จัดเก็บ เคลื่อนย้าย และกำจัดของเสีย ทั้งนี้ของเสียที่เกิดจากการวิเคราะห์ต้องมีการจัดแบ่งประเภทต่างๆ เช่น ของเสียทั่วไป ของเสียอันตราย เป็นต้น

- 9.3 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้องมีการดำเนินการด้านความปลอดภัย และอาชีวอนามัย ให้สอดคล้องกับงานที่ปฏิบัติ ตลอดจนสร้างสภาวะแวดล้อมในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ให้ปลอดภัย ทั้งนี้ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ควรจัดให้มีสิ่งต่างๆ ดังนี้
- (1) อุปกรณ์ป้องกันภัยส่วนบุคคล เช่น หน้ากาก ถุงมือ แวนตา เลือ่กาวนั้ เป็นต้น
 - (2) ระบบระบายอากาศเสีย เช่น พัดลมดูดอากาศ ตู้ดูดควัน เป็นต้น
 - (3) เครื่องมือเพื่อความปลอดภัยจากเหตุฉุกเฉิน เช่น ฝักบัวอาบน้ำฉุกเฉิน น้ำสำหรับล้างตา เครื่องดับเพลิง เป็นต้น
- 9.4 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้องมีอุปกรณ์การปฐมพยาบาลเบื้องต้น เมื่อผู้ปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ได้รับอุบัติเหตุเล็กๆ น้อยๆ สามารถทำการปฐมพยาบาลได้ เช่น การทำความสะอาดแผล เป็นต้น รวมทั้งมีรายการยาที่จำเป็นและมีการตรวจสอบยาทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ
- 9.5 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต้องมีเอกสารขั้นตอนการดำเนินการด้าน ความปลอดภัยในขณะที่ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ พร้อมทั้งจัดให้มีป้ายคำเตือน อุปกรณ์ดับเพลิง และอุปกรณ์ระงับภัยฉุกเฉิน ตลอดจนข้อบังคับหรือวิธีการในการรักษาความปลอดภัยโดยทั่วๆ ไปในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์

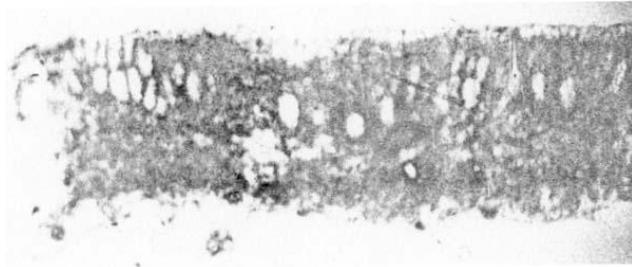
ตัวอย่างการวิเคราะห์ลักษณะทั่วไปสมุนไพร



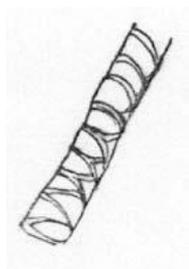
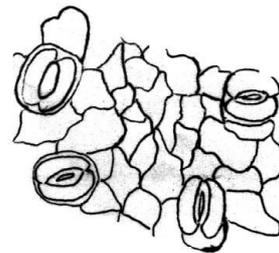
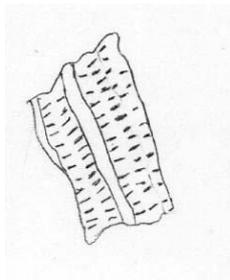
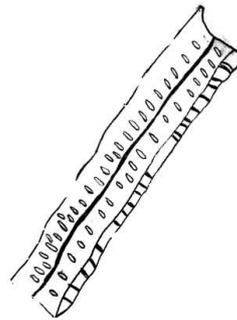
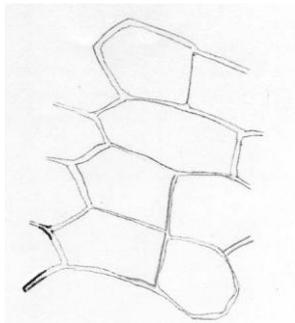
รูปที่ 6 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. (aerial part)



รูปที่ 7 Transverse section ลำต้นพรมมิ



รูปที่ 8 Transverse section ของลำต้นพรมมิ



รูปที่ 9 จุดทรนสันลักษณะของผงส่วนเหนือดินของพรมมิ

การศึกษาทางเคมีและกายภาพอื่นๆ

ทำการควบคุมคุณภาพสมุนไพรตามที่กำหนดไว้ใน Thai Herbal Pharmacopoeia ดังนี้

- น้ำหนักที่หายไปหลังการอบแห้ง (Loss on drying) 4.04 ± 0.02 %
- ปริมาณสารปนปลอม (Foreign matters) 0.06 ± 0.01 %
- ปริมาณสารสกัดที่ละลายน้ำ (Water-soluble extractive) 4.12 ± 0.49 %
- ปริมาณสารสกัดที่ละลาย ethanol (Ethanol-soluble extractive) 5.70 ± 0.32 %
- ปริมาณสารสกัดที่ละลาย methanol (Methanol-soluble extractive) 25.67 ± 0.46 %
- ปริมาณสารสกัดที่ละลาย petroleum ether (Petroleum ether-soluble extractive) 0.35 ± 0.03 %

การกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารซาโปนินในพรมมิ

เนื่องจากยังไม่มีข้อกำหนดเกณฑ์มาตรฐานของพรมมิในประเทศไทย คณะผู้จัดทำจึงกำหนดเกณฑ์ปริมาณสารซาโปนินขั้นต่ำที่ควรมีในผงพรมมิแห้งที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทำผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิ โดยรวบรวมจากงานวิจัยของไทย และต่างประเทศดังนี้

จากการศึกษาของ Phrompittayarat และคณะ ในปี ค.ศ.2007 พบว่าสารซาโปนินที่วิเคราะห์ได้จากส่วนยอดของสมุนไพรพรมมิในฤดูฝนมีปริมาณ $1.39 \pm 0.04\%$ w/w และในฤดูหนาวมีปริมาณ $1.21 \pm 0.14\%$ w/w

ในการศึกษาของ Sairam และคณะ ในปี ค.ศ.2002 ใช้สารสกัดจากสมุนไพรพรมมิส่วนยอดที่มีปริมาณสารซาโปนินอยู่ 1.2% w/w

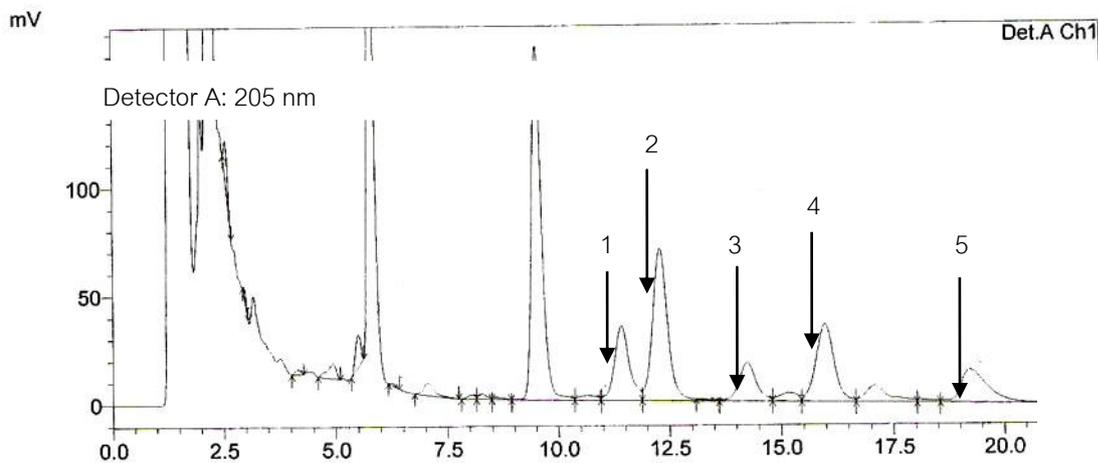
ในการศึกษาของ Ganzera และคณะ ในปี ค.ศ.2004 พบว่าสารซาโปนินที่วิเคราะห์ได้ในสมุนไพรพรมมิมีปริมาณ 1.67% w/w

และในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารซาโปนินที่วิเคราะห์ได้จากส่วนยอดของสมุนไพรพรมมิมีปริมาณ $1.3 \pm 0.2\%$ w/w

จากข้อมูลการศึกษาต่างๆที่ได้กล่าวมาจะเห็นได้ว่าส่วนของยอดของสมุนไพรพรมมิมีปริมาณสารซาโปนินเฉลี่ย 1.3% w/w เมื่อนำมาคำนวณค่าเบี่ยงเบน 30% จากผลที่ได้ส่วนของยอดของสมุนไพรพรมมิมีปริมาณสารซาโปนินอย่างน้อย 1% w/w

ตัวอย่างการวิเคราะห์สารชาโปนินสมุนไพรรพรมมิ

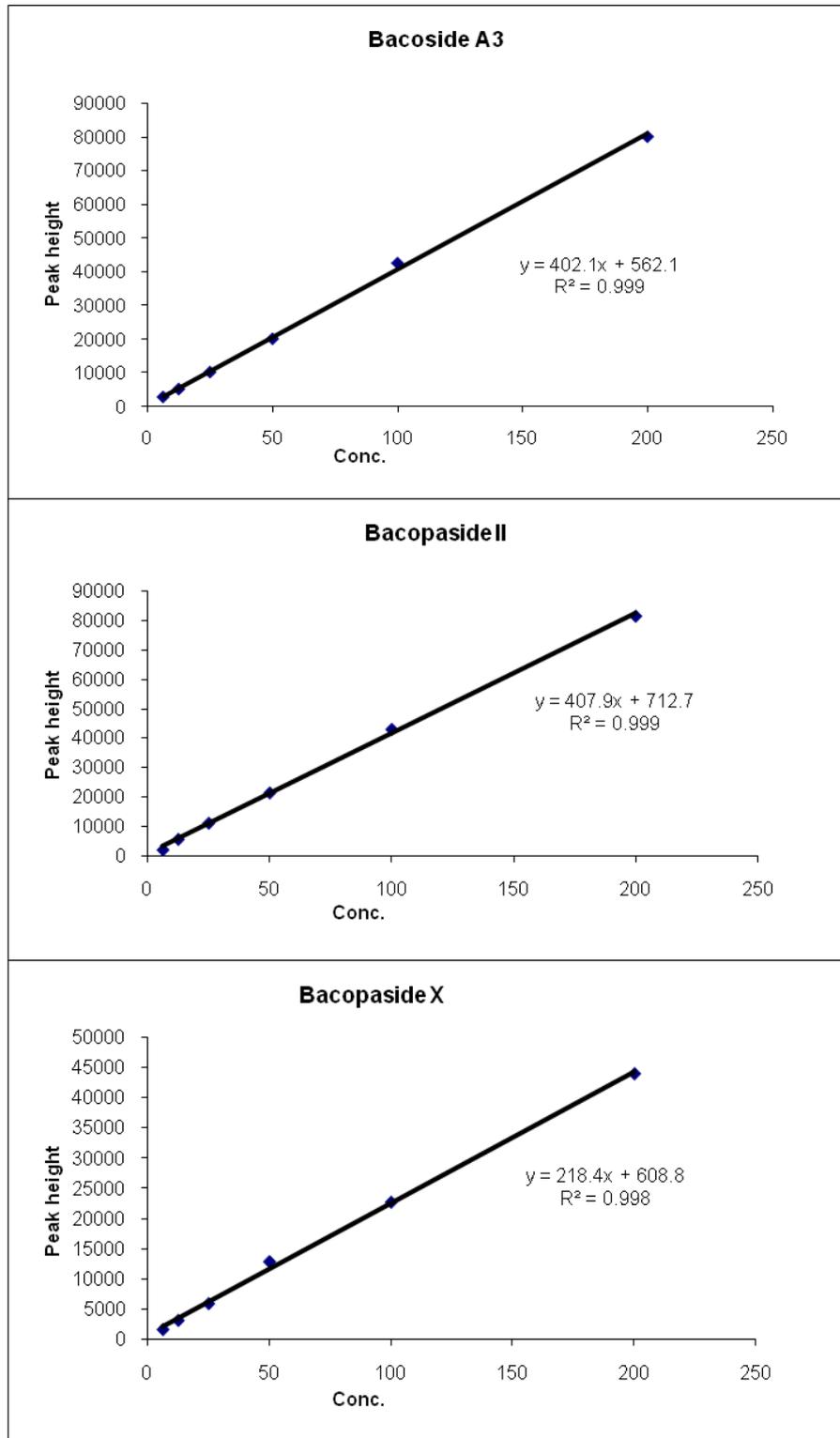
Shimadzu HPLC system: Pump: LC-20AT
Detector: SPD-20A
Injector: 20 μ L
Wave length (λ): 205 nm
Column: Luna RP-18 column (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m particle size)
Mobile phase: 0.2% O-phosphoric acid : acetonitrile (65:35%v/v) pH 3.0 โดย ปรับ pH ด้วย 5M NaOH
Flow rate: 1.0 ml/min



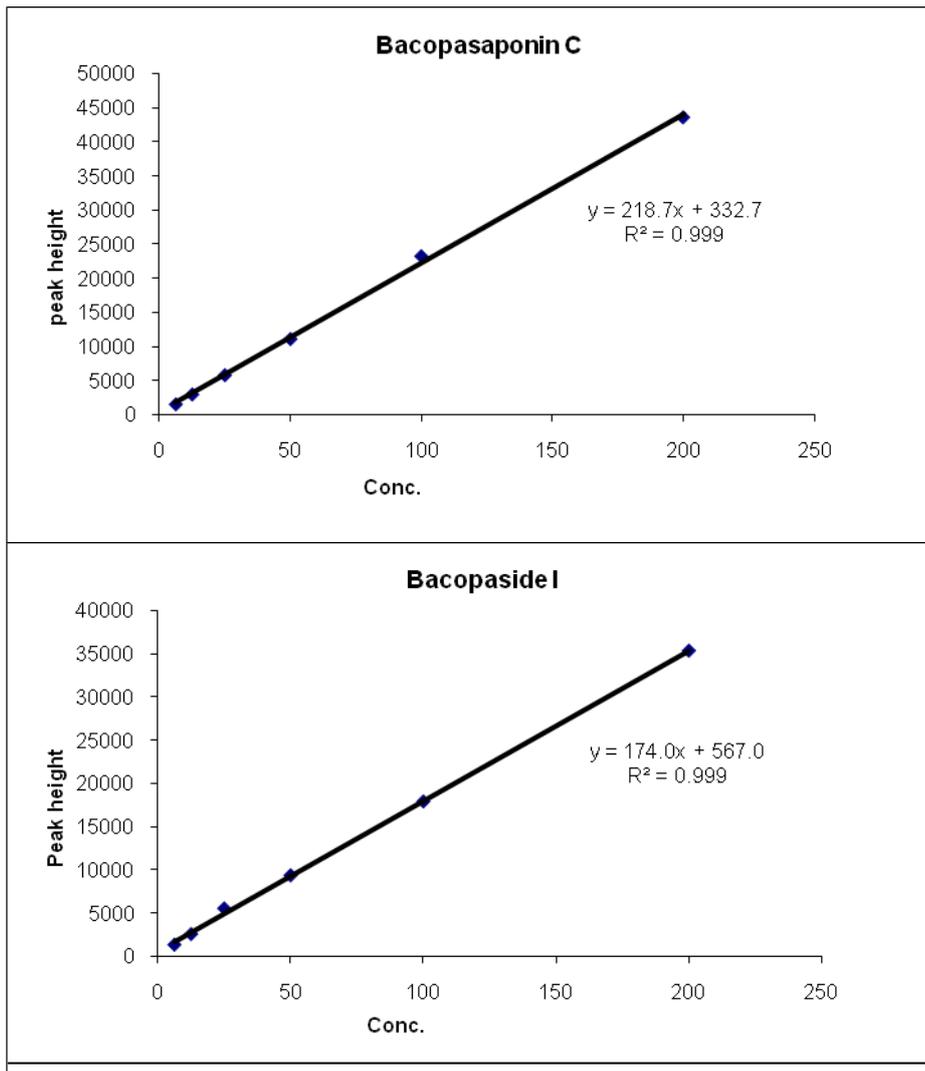
รูปที่ 10 ตัวอย่างโครมาโทแกรมของสารสกัดพรมมิ ที่ความเข้มข้น 0.02 g/mL จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่ 205 nm (1 = Bacoside A3, 2 = Bacopaside II, 3 = Bacopaside X, 4 = Bacopasaponin C , 5 = Bacopaside D)

การทำ calibration curve ความเข้มข้นของสารชาโปนินมาตรฐาน: 200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg/ml.

LOD: 1.56 µg/ml.



รูปที่ 11 Calibration curve สารชาโปนิน



รูปที่ 11 Calibration curve สารซาโปนิน(ต่อ)

Accuracy and Precision

การตรวจสอบความถูกต้องและความแม่นยำของวิธีที่ใช้ในการทดลอง ในที่นี้จะทดสอบโดยการทำ Calibration curve ของสารซาโปนินรวม 5 ความเข้มข้น ทำการเปรียบเทียบ %CV ทั้งภายในวันเดียวกันและต่างวัน ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Intra-assay and inter-assay of mixed standard saponins (n=3)

Concentration level of mixed std. saponin ($\mu\text{g/ml}$)	% CV	
	Intra assay	Inter assay
6.25	2.45	3.56
12.50	1.98	3.02
25.00	1.24	5.18
50.00	3.57	2.83
100.00	2.79	4.58

Specificity

การตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงของวิธีที่ใช้ในการทดลอง ในที่นี้ทำการทดสอบโดยการเติมสารสกัดพรมมิ เข้มข้น 2mg/ml ลงไปในสารมาตรฐานรวมที่ใช้ทำ Calibration curve แล้วนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณ % Recovery ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Recoveries of the investigated saponins from Brahmi extract (2mg/ml) spiked with various concentrations of mixed standard saponins (n=3)

Concentration level of mixed std. saponin added ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)
6.25	98.07
12.50	96.92
25.00	98.74

บรรณานุกรม

1. Phrompittayarat W, Putalun W, Tanaka H, Wittaya-Areekul S, Jetiyanon K, Ingkaninan K. An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Anal Chim Acta*. 2007 Feb 12;584(1):1-6.
2. Haider, Imtiaz S. *Pharmaceutical master validation plans the ultimate guide to FDA, GMP, and GLP compliance*. 1st ed. St.Lucie (ft): Boca Raton; C2002
3. Sairam K, Dorababu M, Goel RK, Bhattacharya SK. Antidepressant activity of standardized extract of *Bacopa monniera* in experimental models of depression in rats. *Phytomedicine*. 2002 Apr;9(3):207-11.
4. Ganzera M, Gampenrieder J, Pawar RS, Khan IA, Stuppner H. Aeparation of major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri* by high-performance liquid chromatography. *Anal chim acta* 2004 Jul 19;516:149-54.



แนวทางการผลิตยาเม็ด
สมุนไพรมณี
Guidelines for manufacturing
of Brahmi tablets



ศูนย์เทคโนโลยีสมุนไพร มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

ภาคผนวก ค

แนวทางการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิ

Guidelines for manufacturing of Brahmi tablets

1. การเตรียมยาเม็ดสารสกัดสมุนไพรพรมมิ

สถานที่ผลิตและขั้นตอนการผลิตต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยาสมุนไพรและผ่านการประเมินโดยกองควบคุมยา กระทรวงสาธารณสุข (หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยาสมุนไพรที่ได้จากภาคผนวก)(1)

ก. สารที่ใช้เตรียมยาเม็ดสารสกัดสมุนไพรพรมมิ

ผงพรมมิ 500 กรัม ประกอบด้วย

สารสกัดพรมมิ	225.0 กรัม	(45%)
Avicel PH 101	137.5	กรัม (27.5%)
Lactose anhydrous	137.5	กรัม (27.5%)

วิธีเตรียมผงพรมมิ

1. ผสม Avicel PH 101 และ Lactose anhydrous ในเครื่องผสมให้เข้ากัน
2. ค่อย ๆ เติมสารสกัดพรมมิลงในเครื่องผสม เติมน้ำเพื่อผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน



รูปที่ 1 เครื่องผสม

3. นำไปผ่านร่อนเบอร์ 16 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 ° C นาน 24 ชั่วโมง
4. นำไปผ่านร่อนเบอร์ 18 อีกครั้งก่อนนำไปใช้



รูปที่ 2 การผ่าน seive

5. ทำการวัดความชื้นของแกรนูลสารสกัดพรมมิด้วยวิธี Loss on drying ก่อนการตั้งตำรับ ส่วนผสมสำหรับการเตรียมยาเม็ดสารสกัดพรมมิ (Brahmi extract tablet) ในขนาด 300 มก. (สารสกัดพรมมิ 300 มิลลิกรัมต่อเม็ด) มีดังนี้

ตารางที่ 1 ส่วนผสมสำหรับการเตรียมยาเม็ดสารสกัดสมุนไพรพรมมิขนาด 300 มิลลิกรัม

ลำดับที่	ส่วนประกอบ	หน้าที่ในตำรับ	ปริมาณ (มิลลิกรัม)
1	ผงแห้งสารสกัดพรมมิ	สารสำคัญ	667.00
2	Lactose anhydrous	สารเพิ่มปริมาณ	13.62
3	Ac-Di-Sol	สารช่วยแตกตัว	37.50
4	Talcum	สารช่วยป้องกันการติดสาก	22.50
5	Magnesium Stearate	สารหล่อลื่น	7.50
6	Aerosil	สารหล่อลื่น	1.87
น้ำหนักรวม			750.00

*ในผงแห้งพรมมิมีสารสกัดสมุนไพรพรมมิ 45%

ข. วิธีเตรียมส่วนผสม และการตอกผงยาเพื่อเตรียมยาเม็ดสารสกัดพรมมิ

1. นำส่วนผสม Lactose anhydrous ลงในโถรงบดให้ละเอียด
2. นำส่วนผสมอื่น ๆ ยกเว้น ผงแห้งสารสกัดพรมมิ ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
3. นำผงแห้งสารสกัดพรมมิ ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน
4. นำไปตอกด้วยเครื่องตอกยาเม็ดแบบใช้ไฟฟ้า โดยใช้เข้าและสากที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง ½ นิ้ว โดยให้น้ำหนักยาเม็ดพรมมิ 750 มิลลิกรัมต่อเม็ด



รูปที่ 3 เครื่องตอกยาเม็ดแบบใช้ไฟฟ้า

สูตรน้ำยาเคลือบยาเม็ด

ส่วนประกอบ

1. HPMC (15 cps)	จำนวน 30 กรัม
2. PEG – 4000	จำนวน 2.5 กรัม
3. Talcum	จำนวน 35 กรัม
4. Titanium dioxide	จำนวน 30 กรัม
5. Green Solution (4 % Green)	จำนวน 15 มิลลิลิตร
6. Methylene chloride: Ethanol (1:1)	qs to 1000 มิลลิลิตร

วิธีเตรียมน้ำยาเคลือบยาเม็ด

1. เติม Methylene chloride : Ethanol (1:1) ลงในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ประมาณ 700 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ โปรมผง HPMC (15 cps) ลงไปในส่วนผสมที่ละเอียดจนหมด ทำการกวนโดยใช้ magnetic stirrer กวนตลอดเวลารอจน HPMC (15 cps) พองตัวเต็มที่ โดยจะเห็นเป็นสารละลายที่มีความหนืด ป้องกันการระเหยของตัวทำละลายโดยปิดด้วย aluminium foil
2. แบ่งสารละลายในข้อ 1. ประมาณ 100 มิลลิลิตร เติม PEG – 4000 คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเทส่วนผสมทั้งหมดลงในข้อ 1.
3. นำ Talcum และ Titanium dioxide คนให้เข้ากันในโถงกระเบื้องที่แห้งและสะอาดให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
4. แบ่งของผสมในข้อ 2. ประมาณ 500 มิลลิลิตร เติมลงในของผสมข้อ 3. แล้วค่อยๆ ผสมสารละลายอย่างช้าๆ ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกัน
5. นำส่วนผสมที่ได้ในข้อ 2. ที่เหลือประมาณ 200 มิลลิลิตรค่อยเทลงในสารละลายข้อ 4. ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
6. ผสมสีผสมอาหาร สีเขียว 973 ในน้ำกลั่น (ความเข้มข้น 4%w/v) เทลงในของผสมข้อ 5. ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
7. ปรับปริมาตรจนครบ ด้วยส่วนผสมของ Methylene chloride : Ethanol (1:1) โดยในการผสมให้ทำการปิดปากภาชนะด้วย aluminium foil เพื่อลดการระเหยของตัวทำละลาย



รูปที่ 4 หม้อเคลือบ

สถานะสำหรับการเคลือบยาเม็ดพรมมิ

หม้อเคลือบ	Thai Coater
หัวฉีดพ่น	IWATA
ความเร็วในการหมุนหม้อ	20 rpm
ความดันลม	2.5 bar (psi)
อุณหภูมิภายในเครื่อง	45-50 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิปล่องออก	40-45 องศาเซลเซียส
ปริมาณยา	2,000 เม็ด
ปริมาณน้ำยาเคลือบ	1,000 มิลลิลิตร



รูปที่ 5 สมุนไพรพรมมิในรูปแบบยาเม็ด

2. การควบคุมคุณภาพยาเม็ดผสมไพพรอมมิ

การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ยาเม็ดสารสกัดผสมไพพรอมมิ

ยาเม็ดเคลือบสารสกัดผสมไพพรอมมิขนาด 300 มก. ที่เตรียมได้แล้ว มีลักษณะเป็นเม็ดกลมแบน สีเขียวอ่อน ได้นำมาทดสอบคุณภาพด้านความแปรปรวนของน้ำหนัก, ความกร่อน, การแตกตัว, ความแข็ง และความหนาของยาเม็ด ว่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานหรือไม่ ดังต่อไปนี้

ก. ความแปรปรวนของน้ำหนักเม็ดยา (Weight variation)

เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. Forceps
3. ยาเม็ดผสมไพพรอมมิ จำนวน 20 เม็ด



รูปที่ 6 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีทำ

1. สุ่มตัวอย่างยาเม็ดมา 20 เม็ด
2. ชั่งน้ำหนักยาเม็ดทีละเม็ดจนครบ 20 เม็ด โดยให้บันทึกน้ำหนักเม็ดยาที่ชั่งไว้ในแต่ละครั้ง
3. คำนวณหาความถี่ยกของยาเม็ดทั้ง 20 เม็ด รวมทั้งค่าเบี่ยงเบน

ผลการทดสอบความแปรปรวนของน้ำหนักเม็ดยาเคลือบสารสกัดผสมไพพรอมมิ

คำนวณค่า % weight variation ของยาเม็ด

ตัวอย่างการคำนวณความแปรปรวนของน้ำหนักเม็ดยา

$$\% \text{ weight variation; positive} = \frac{(\text{น้ำหนักที่มากที่สุด} - \text{น้ำหนักเฉลี่ย})}{\text{น้ำหนักเฉลี่ย}} \times 100$$

$$\% \text{ weight variation; negative} = \frac{(\text{น้ำหนักที่น้อยที่สุด} - \text{น้ำหนักเฉลี่ย})}{\text{น้ำหนักเฉลี่ย}} \times 100$$

ได้ ค่าน้ำหนักเฉลี่ย เท่ากับ 763.85 mg

ค่าน้ำหนักเม็ดยาที่มากที่สุด เท่ากับ 778.1 mg

ค่าน้ำหนักเม็ดยาที่น้อยที่สุด เท่ากับ 753.1 mg

$$\% \text{ weight variation; positive} = \frac{(778.1 - 763.85)}{763.85} \times 100 = 1.8655$$

$$\% \text{ weight variation; negative} = \frac{(753.1 - 763.85)}{763.85} \times 100 = -1.4073$$

ดังนั้น % weight variation คือ + 1.8655 % และ - 1.4073 %

เกณฑ์การประเมินความแปรปรวนของน้ำหนักเม็ดยา

พบว่าไม่มียาเม็ดใดเลยที่มีน้ำหนักเบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ยตามมาตรฐานที่กำหนด ($\pm 10\%$) ดังนั้น ยาเม็ดสารสกัดสมุนไพรพรมมินี้มีความแปรปรวนของน้ำหนักเม็ดยาเป็นไปตามมาตรฐานของ USP

ข. การทดสอบความกร่อนของยาเม็ด (Friability Test)

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องทดสอบความกร่อนแบบโรช (Roche friabilator)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ PRECISA รุ่น 300 A บริษัท เบทไทยกรุงเทพฯเคมีภัณฑ์ จำกัด
3. แปรงปิดฝุ่น
4. ปากคีบ
5. ยาเม็ดพรมมินิ จำนวน 10 เม็ด



รูปที่ 7 เครื่องทดสอบความกร่อนแบบโรช (Roche friabilator)

วิธีทำ

1. สุ่มตัวอย่างยาเม็ดมา 10 เม็ด (น้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า 6.5 กรัม)
2. ใช้ปากคีบจับเม็ดยาและใช้แปรงปัดฝุ่นทำความสะอาดเม็ดยา ชั่งน้ำหนักเม็ดยาทั้งหมด (W_0)
3. ใส่เม็ดยาลงในเครื่องทดสอบความกร่อนเปิดเครื่องตั้งเวลาให้หมุนนาน 4 นาที
4. เมื่อเครื่องหยุด นำเม็ดยาออกมาทำความสะอาดโดยใช้แปรงปัดฝุ่นแล้วชั่งน้ำหนัก (W)
5. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความกร่อนของยาเม็ดจากสูตร

$$\% \text{ friability} = \frac{W_0 - W}{W_0} \times 100$$

6. ประเมินผลการทดสอบ

ตัวอย่างการคำนวณความกร่อน (Friability Test)

น้ำหนักเริ่มต้น (W_0) = 7.6953 กรัม

น้ำหนักสุดท้าย (W) = 7.0543 กรัม

$$\begin{aligned} \% \text{ friability} &= \frac{W_0 - W}{W_0} \times 100 \\ &= \frac{7.6953 - 7.0543}{7.6953} \times 100 \\ &= 8.33\% \end{aligned}$$

เกณฑ์การประเมินการทดสอบความกร่อนของยาเม็ดสารสกัดสมุนไพรพรมมิ

1. ไม่มีเม็ดยาแตกหรือ capping ถือว่าผ่านมาตรฐาน ของ USP XXV
2. ความกร่อนของยาเม็ดเคลือบสารสกัดสมุนไพรพรมมิ ต้องผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ USP XXV (ไม่เกิน 1 %)

ค. การทดสอบการแตกตัว (Disintegration Test)

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องทดสอบการกระจายตัว (Disintegration apparatus)
2. บีกเกอร์ 1000 ml
3. น้ำกลั่น
4. ยาเม็ดพรมมิ จำนวน 6 เม็ด

วิธีทดสอบ

1. ใส่เม็ดยาลงในหลอดแก้วทั้ง 6 หลอด ๆ ละ 1 เม็ด
2. ใช้น้ำเป็นของเหลวในการทดสอบปรับอุณหภูมิของน้ำให้ได้ $37 \pm 2 \text{ C}^\circ$
3. เปิดเครื่องประมาณ 30 นาที
4. เมื่อครบเวลา 30 นาที ให้ยก basket ขึ้นลงสังเกตการกระจายตัวของเม็ดยา บันทึกเวลา

เกณฑ์การประเมินยาเม็ดสารสกัดสมุนไพร

ยาเม็ดที่ทดสอบใช้ระยะเวลาในการแตกตัวต้องผ่านเกณฑ์มาตรฐาน (<20 นาที) และยาทุกเม็ดทุกเม็ดแตกตัวหมดภายในระยะเวลาที่กำหนด (30 นาที)

ง. การทดสอบความแข็งของยาเม็ด (Hardness Test)

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องทดสอบความแข็งแบบสโตกส์-มอนซานโต (Stokes – Monsanto hardness tester)
2. ยาเม็ดพรมมิเคลือบแล้ว จำนวน 10 เม็ด



รูปที่ 8 เครื่องทดสอบความแข็งแบบสโตกส์-มอนซานโต (Stokes – Monsanto hardness tester)

วิธีทำ

1. สุ่มตัวอย่างยาเม็ด 10 เม็ด
2. วัดความแข็งของเม็ดยาในแต่ละเม็ด
3. คำนวณหาความแข็งเฉลี่ย
4. ประเมินผล

จ. การทดสอบความหนาของยาเม็ด (Thickness Test)

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. เครื่องทดสอบความหนา (Micrometer caliper)
2. ยาเม็ดพรมมิที่ยังไม่ได้เคลือบ จำนวน 10 เม็ด



รูปที่ 9 เครื่องทดสอบความหนา (Micrometer caliper)

วิธีทำ

1. สุ่มตัวอย่างยาเม็ด 10 เม็ด
2. วัดความหนาของเม็ดยาในแต่ละเม็ด
3. คำนวณหาความหนาเฉลี่ย
4. ประเมินผล

ฉ. การควบคุมปริมาณสารซาโปนิน

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างยาเม็ดสำหรับนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ saponins

1. ทำการสุ่มตัวอย่างยาเม็ดจำนวน 10 เม็ด
2. ชั่งน้ำหนักของยาแต่ละเม็ดและบันทึกน้ำหนักไว้
3. บดเม็ดยาแต่ละเม็ดแล้วใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 ml
4. เติมเมทานอลลงไป 7 ml แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งพบว่ายาไม่สามารถละลายได้หมด แต่จะเป็นตะกอนชั้นๆอยู่บริเวณก้นภาชนะ จากนั้นนำไปกรองเอาเฉพาะส่วนสารละลายที่มีลักษณะใส
5. นำส่วนที่เป็นตะกอนใส่ลงใน Erlenmeyer flask แล้วเติมเมทานอลปริมาณ 7 ml อีกครั้ง แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที กรองเอาสารละลายใสส่วนหน้า ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
6. นำสารละลายที่กรองได้ไปปรับปริมาตรใน volumetric flask 25 ml ด้วยเมทานอล
7. กรองสารละลายที่ได้ด้วย 0.45 μ nylon syringe filter
8. นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC
9. นำมาคำนวณปริมาณสารซาโปนินในยาเม็ดสมุนไพรพรมมิ โดยคำนวณจาก peak height ของสาร Bacoside A3, Bacopaside II, Bacopaside X, Bacopasaponin C และ Bacopaside I เทียบกับ Calibration curve สารซาโปนิน

การประเมินผลการวิเคราะห์

ยาเม็ดสมุนไพรพรมมิ ต้องมีปริมาณสารซาโปนินรวม 80-120 % จากที่ระบุไว้บนฉลากตามมาตรฐาน USP

หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยาจากสมุนไพร

ปัจจุบันยาจากสมุนไพรเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมากยิ่งขึ้น เนื่องจากผู้บริโภคเห็นแล้วว่ายาจากสมุนไพรเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ อันตรายจากพิษภัยที่เกิดจากการใช้ยาจากสมุนไพร ส่วนใหญ่มีน้อยกว่าการใช้ยาแผนปัจจุบัน อย่างไรก็ตาม ยาจากสมุนไพร คือยาที่ผลิตจากสมุนไพรซึ่งมักได้จากแหล่ง ภูมิประเทศหรือการเพาะปลูกที่มีสภาพต่างกันซึ่งเป็นผลให้มีสารสำคัญไม่เท่ากัน และยังมีปัญหา การปนเปื้อน จุลินทรีย์ ฝุ่นละออง โลหะหนัก ยาฆ่าแมลง และสารพิษอื่น ๆ ในวัตถุดิบ ในกระบวนการผลิต หรือในยาสำเร็จรูป ดังนั้นกระบวนการเตรียมสมุนไพรข้างต้นและการดำเนินการผลิตจึงมีอิทธิพลโดยตรงต่อ คุณภาพของยาจากสมุนไพร จึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องนำเอาหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยาจากสมุนไพรมาใช้เพื่อให้เกิดความมั่นใจในคุณภาพของผลิตภัณฑ์

หลักเกณฑ์นี้ใช้เป็นแนวทางในการพัฒนามาตรฐานการผลิตยาแผนโบราณเพื่อให้เกิดความ เชื่อมั่นว่ายาที่ผลิตขึ้นมีคุณภาพมาตรฐานตามที่กำหนดไว้ โดยมีการควบคุมทุกขั้นตอนตั้งแต่วัตถุดิบที่นำมาใช้อาคารสถานที่ผลิต อุปกรณ์การผลิต บุคลากรในฝ่ายการผลิต การดำเนินการผลิตและการจัดทำเอกสาร ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องตามความจำเป็น เพื่อให้ได้ยาที่มีคุณภาพและปลอดภัย

นิยามศัพท์

หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยาจากสมุนไพร (Good Manufacturing Practice for Herbal Medicinal Products) หมายความว่า แนวทางวิธีการที่ดีในการผลิตและควบคุมคุณภาพยาจากสมุนไพร เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นว่ายาที่ผลิตขึ้นมีคุณภาพสม่ำเสมอและปลอดภัยในการใช้

ยาจากสมุนไพร (Herbal Medicinal products) หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ยาหรือยาเตรียมที่มีสารสำคัญที่ได้จากพืช สัตว์หรือแร่ธาตุ

ยาสำเร็จรูป (Finished Products) หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้ผ่านกรรมวิธีการผลิตยาทุก ขั้นตอนจนเสร็จการผลิต รวมทั้งการบรรจุใส่ภาชนะ ปิดฉลาก และจะบรรจุหีบห่อหรือไม่ก็ตาม

การผลิตยา (Manufacture) หมายความว่า การดำเนินการทุกอย่างเกี่ยวกับการจัดหาวัตถุดิบ วัสดุ สำหรับการบรรจุ การดำเนินการผลิต การควบคุมคุณภาพยา การอนุมัติให้ปล่อยหรือผ่าน การเก็บรักษาการขนส่งยาสำเร็จรูป และการควบคุมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

ครั้งที่ผลิต (Batch or lot) หมายความว่า การผลิต วัตถุดิบ วัสดุสำหรับการบรรจุ หรือ ยาสำเร็จรูปแต่ละครั้งในวงจรการผลิตเดียวกันในปริมาณที่แน่นอน มีคุณลักษณะและคุณภาพที่สม่ำเสมอตลอด

เลขที่แสดงครั้งที่ผลิต (Batch number or lot number) หมายความว่า ตัวเลขหรือตัวอักษร หรือทั้งสองอย่างรวมกันเพื่อบ่งถึงครั้งที่ผลิต

วัตถุดิบ (Starting material) หมายความว่า สารใดๆที่นำมาใช้ในการผลิตยา แต่ไม่หมายความรวมถึงวัสดุสำหรับการบรรจุ

วัสดุสำหรับการบรรจุ (Packaging Material) หมายความว่า วัสดุทุกอย่างที่ใช้ในขั้นตอน การบรรจุยาที่สัมผัสกับยาโดยตรงและไม่สัมผัสกับยาโดยตรง ไม่รวมถึงหีบห่อส่วนนอกที่ใช้เพื่อการขนส่ง

ยาระหว่างผลิต (Intermediate product) หมายความว่า สารเดี่ยวหรือสารผสมที่ผ่านกระบวนการผลิตบางขั้นตอนแล้วซึ่งจะต้องผ่านกระบวนการผลิตต่อไปก่อนที่จะเป็นยาหรือการบรรจุ

ยาหรือการบรรจุ (Bulk product) หมายความว่า ยาที่ผ่านกระบวนการผลิตแล้วพร้อมที่จะบรรจุเป็นยาสำเร็จรูปต่อไป

การควบคุมระหว่างผลิต (In-process Control) หมายความว่า การตรวจสอบในระหว่าง การดำเนินการผลิต เพื่อให้แน่ใจว่ายาที่ผลิตขึ้นได้มาตรฐานตามที่กำหนดไว้และรวมถึงการควบคุมสภาวะแวดล้อมหรืออุปกรณ์ต่างๆ

การดำเนินการผลิต (Production) หมายความว่า การดำเนินงานทุกอย่างที่เกี่ยวข้องกับการ ผลิตยา ตั้งแต่รับวัตถุดิบ วัสดุสำหรับการบรรจุ ผ่านกระบวนการผลิตและการบรรจุจนได้ยาสำเร็จรูป

วิธีการปฏิบัติ (Procedures) หมายความว่า รายละเอียดวิธีปฏิบัติและข้อควรระวังที่กำหนดขึ้นเป็นลายลักษณ์อักษร เพื่อใช้ในทางตรงและทางอ้อมเกี่ยวกับการผลิตยา

การบรรจุ (Packaging) หมายความว่า ขั้นตอนในการดำเนินการผลิต ซึ่งเริ่มตั้งแต่การบรรจุยาใส่ภาชนะ ปิดฉลาก บรรจุในภาชนะบรรจุสุดท้ายจนเป็นยาสำเร็จรูป

บุคลากร

พนักงานมีความสำคัญต่อการผลิตยาจากสมุนไพร ดังนั้นจึงต้องมีพนักงานที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมอย่างเพียงพอเพื่อการปฏิบัติงานทุกอย่าง ซึ่งอยู่ในความรับผิดชอบของผู้รับอนุญาตผลิตยา พนักงานแต่ละคนมีความเข้าใจในงานที่ปฏิบัติที่เขียนไว้เป็นลายลักษณ์อักษรอย่างชัดเจน พนักงานทุกคนจะต้องตระหนักถึงหลักการของวิธีการที่ดีในการผลิตในส่วนที่เกี่ยวข้องและได้รับการอบรมเบื้องต้นและต่อเนื่อง รวมถึงวิธีปฏิบัติเกี่ยวกับการรักษาสุขอนามัยที่จำเป็น

1. จัดฝึกอบรมพนักงานเกี่ยวกับความรู้ขั้นพื้นฐานเกี่ยวกับหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยา

ทั้งในทางด้านทฤษฎีและปฏิบัติ รวมทั้งความรู้เกี่ยวกับงานที่ได้รับมอบหมายจนสามารถปฏิบัติงานได้ดี และต้องจัดให้มีการฝึกอบรมอย่างต่อเนื่องและเพียงพอ พร้อมทั้งประเมินผลเป็นระยะๆ ทั้งนี้ หัวหน้าการฝึกอบรมต้องได้รับความเห็นชอบจากฝ่ายดำเนินการผลิตและจะต้องเก็บบันทึกการฝึกอบรม

2. ผู้ที่มาเยี่ยมชมหรือผู้ที่ยังไม่ผ่านการอบรม หากมีความจำเป็นต้องเข้าไปในบริเวณผลิต ให้ปฏิบัติตามคำแนะนำโดยเฉพาะเรื่องการแต่งกาย การรักษาความสะอาด และต้องเฝ้าดูแลอย่างใกล้ชิด

3. ให้มีวิธีปฏิบัติเกี่ยวกับสุขอนามัยของพนักงานเกี่ยวกับการดูแลสุขภาพ การรักษาสุขอนามัยและการแต่งกาย ซึ่งพนักงานทุกคนที่มีหน้าที่ปฏิบัติงานในบริเวณผลิตต้องถือปฏิบัติอย่างเคร่งครัด ผู้บริหารต้องให้การสนับสนุนการรักษาสุขอนามัยของพนักงานและการฝึกอบรมเกี่ยวกับสุขอนามัยส่วนบุคคล

4. พนักงานทุกคนต้องได้รับการตรวจสอบสุขภาพก่อนรับเข้าทำงาน ผู้ผลิตต้องตระหนักและมีความรับผิดชอบเกี่ยวกับวิธีปฏิบัติให้เกิดความมั่นใจในสุขภาพของพนักงานที่อาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ นอกจากการตรวจสอบสุขภาพก่อนรับเข้าทำงานแล้วจะต้องมีการตรวจสอบสุขภาพประจำปี

5. ห้ามมิให้พนักงานที่มีโรคติดต่อร้ายแรงหรือมีบาดแผลเปิดบริเวณผิวหนังของร่างกาย ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตยา

6. ผู้ที่เข้าในบริเวณผลิตทุกคนต้องสวมเครื่องแต่งกาย และอุปกรณ์ป้องกันที่เหมาะสม กับงานที่ปฏิบัติ

7. ห้ามรับประทานอาหาร เครื่องดื่ม สูบบุหรี่ หรือเก็บอาหาร เครื่องดื่ม บุหรี่และยา รักษาโรคประจำตัว ภายในบริเวณที่ใช้ในการผลิตยาและบริเวณที่ใช้ในการเก็บยา เก็บวัตถุดิบ และวัสดุอื่นๆ ตลอดจนห้ามทำกิจกรรมใดๆที่ไม่ถูกสุขลักษณะหรือสุขอนามัยในบริเวณผลิตยา หรือบริเวณที่อาจมี ผลต่อผลิตภัณฑ์

8. ห้ามมิให้พนักงานใช้มือสัมผัสกับยาโดยตรง ตลอดจนห้ามสัมผัสกับส่วนใดส่วนหนึ่งของอุปกรณ์การผลิต และภาชนะบรรจุที่สัมผัสกับยาโดยตรง

อาคารสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์

อาคาร สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ ต้องได้รับการออกแบบติดตั้ง ก่อสร้าง ปรับปรุง และบำรุงรักษาให้เหมาะสมกับการปฏิบัติงาน เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดความผิดพลาด สามารถทำความสะอาดและบำรุงรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อลดการปนเปื้อนของตัวยาต่างชนิดกันและการสะสมของฝุ่นละอองสิ่งสกปรก ซึ่งมีผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์

1. อาคาร สถานที่ผลิตยา ต้องตั้งอยู่ในทำเลที่ตั้งที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสม เพื่อป้องกันความเสี่ยงจากการปนเปื้อนสู่วัตถุดิบ วัสดุสำหรับการบรรจุและผลิตภัณฑ์

2. ต้องมีการบำรุงรักษาซ่อมแซมอาคารสถานที่อย่างระมัดระวังเพื่อมิให้เกิดผลเสียหาย ต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ต้องทำความสะอาดและฆ่าเชื้อตามความจำเป็นตามวิธีปฏิบัติที่เขียนไว้เป็นลายลักษณ์อักษร

3. มีแสงสว่างเพียงพอ มีอุณหภูมิ ความชื้นและการถ่ายเทอากาศที่เหมาะสมเพื่อมิให้เกิด ผลทั้ง

ทางตรงหรือทางอ้อมต่อผลิตภัณฑ์ในระหว่างการผลิตหรือเก็บรักษา

4. ออกแบบก่อสร้างให้สามารถป้องกันสัตว์และแมลงเข้าสู่อาคารสถานที่ผลิต
5. จัดให้มีพื้นที่อย่างเพียงพอและเป็นสัดส่วนสำหรับการผลิตและการเก็บยาระหว่างการผลิต จัดวางอุปกรณ์ และวัสดุต่างๆ อย่างเป็นระเบียบเพื่อลดความเสี่ยงต่อการสับสนของผลิตภัณฑ์หรือวัตถุดิบต่างชนิดกัน ป้องกันการปนเปื้อนของยาต่างชนิดกันและการผลิตที่ผิดขั้นตอน
6. พื้นผิวภายใน เช่น ฝา พื้น และเพดานต้องเรียบ ไม่มีรอยแตกร้าว สามารถทำความสะอาด สะอาดง่ายและทำการฆ่าเชื้อได้ในกรณีจำเป็น
7. ท่อระบายน้ำต้องเป็นท่อปิด มีขนาดพอเหมาะและมีที่ดักเศษผง ไม่ควรเป็นท่อเปิดถ้าเป็นท่อเปิดต้องมีความชันเพียงพอเพื่อให้ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อได้ง่าย
8. ในกระบวนการผลิตที่ก่อให้เกิดฝุ่นผง เช่น การชั่ง ผสม จะต้องมีการเป็นพิเศษ ในบริเวณดังกล่าวเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและทำความสะอาดได้ง่าย
9. ออกแบบบริเวณบรรจุยาเพื่อป้องกันการสับสนหรือปนเปื้อนยาต่างชนิดกัน
10. มีพื้นที่เพียงพอสำหรับแยกเก็บวัตถุดิบ วัสดุสำหรับการบรรจุ ยาระหว่างผลิต ยารอการบรรจุ และยาสำเร็จรูปอย่างเป็นสัดส่วนและเป็นระเบียบ
11. สะอาดและแห้งและมีการถ่ายเทอากาศที่ดี มีการควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นตามความจำเป็น
12. ทำความสะอาดภาชนะบรรจุวัตถุดิบและวัสดุอื่นๆ ที่รับเข้าก่อนนำไปจัดเก็บตามความจำเป็น
13. มีพื้นที่หรือบริเวณเฉพาะสำหรับเก็บวัตถุดิบ วัสดุสำหรับการบรรจุ และยาสำเร็จรูปที่ไม่ได้มาตรฐาน รวมทั้งยาคั้นหรือยาที่เรียกเก็บคืนจากท้องตลาดเป็นการเฉพาะตามความจำเป็นและเหมาะสม
14. จัดเก็บวัสดุสำหรับการบรรจุที่เป็นสิ่งพิมพ์ให้ปลอดภัย ป้องกันการสูญหาย
15. ต้องแยกสถานที่พักนอนหรือรับประทานอาหารออกจากบริเวณผลิตยา
16. จัดให้มีสถานที่เปลี่ยนเสื้อผ้า อุปกรณ์ล้างมือ ห้องส้วมที่ถูกสุขลักษณะและมีจำนวน เพียงพอ กับจำนวนพนักงาน ห้องส้วมต้องไม่ติดต่อกับบริเวณผลิตหรือบริเวณจัดเก็บสิ่งของต่าง ๆ
17. แยกบริเวณซ่อมบำรุงออกจากบริเวณผลิตยา ในกรณีที่เกี่ยวข้องกับเครื่องมือไว้ใน บริเวณผลิตยา ให้เก็บไว้ในห้องหรือตู้แยกเป็นสัดส่วน
18. บำรุงรักษาเครื่องมืออุปกรณ์ให้เหมาะสมกับการใช้ การบำรุงรักษาและซ่อมแซม เครื่องมือ และและอุปกรณ์ ให้บันทึกไว้และต้องไม่เกิดผลเสียต่อคุณภาพของยา
19. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตยา ต้องออกแบบให้สามารถทำความสะอาดได้ง่าย และทั่วถึง จัดเก็บในสถานะที่สะอาดและแห้ง
20. ให้มีอุปกรณ์สำหรับล้างและทำความสะอาดที่เหมาะสมไว้ใช้เพื่อการทำมาความสะอาด และไม่ เป็นแหล่งสะสมของสิ่งปนเปื้อน
21. ติดตั้งเครื่องมือ อุปกรณ์ในลักษณะที่สามารถป้องกันความผิดพลาดหรือปนเปื้อน

22. อุปกรณ์การผลิตต้องไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อยาที่ผลิต ชิ้นส่วนของอุปกรณ์ที่สัมผัส กับยาในระหว่างกระบวนการผลิตต้องไม่มีปฏิกิริยาหรือดูดซับยาเหล่านั้นไว้

23. ในกรณีที่เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้งานไม่ได้ ต้องเคลื่อนย้ายออกจากบริเวณผลิตยา หรืออย่างน้อยปิดฉากแสดงให้เห็นชัดเจนว่า “ชำรุด รอการซ่อมแซม”

การจัดทำเอกสาร

การจัดทำเอกสารที่ดีเป็นสิ่งจำเป็น การบันทึกเอกสารอย่างชัดเจนและถูกต้องจะช่วยป้องกันความผิดพลาดจากการสื่อสารด้วยวาจาและทำให้สามารถสืบย้อนทวนกลับได้ง่าย

1. เอกสารที่จัดทำขึ้นต้องได้รับความเห็นชอบจากผู้รับผิดชอบ โดยลงลายมือชื่อพร้อมวันที่กำกับไว้

2. เอกสารต้องมีข้อความที่ชัดเจน ควรจัดรูปแบบและลำดับขั้นตอนของเอกสารให้ตรวจสอบได้ง่าย

3. การลงบันทึกข้อมูลให้ใช้หมึกถาวร เขียนให้ชัดเจน อ่านง่าย ลบไม่ได้ แบบฟอร์ม ต้องมีพื้นที่เพียงพอสำหรับการบันทึก

4. การเปลี่ยนแปลงแก้ไขข้อมูลในเอกสาร ให้ใช้วิธีขีดฆ่าข้อความเดิมพร้อมลงลายมือชื่อ ของผู้แก้ไข และวันเดือนปีกำกับ เพื่อให้เห็นข้อความเดิมก่อนการแก้ไขอย่างชัดเจนและต้องบันทึกเหตุผล ในการแก้ไขกำกับไว้ในกรณีที่จำเป็น

5. การบันทึกต่างๆ ต้องทำการบันทึกให้เสร็จในขณะที่กำลังปฏิบัติงานนั้นๆ เพื่อให้ สามารถตรวจสอบย้อนกลับกิจกรรมสำคัญ ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตได้

6. ให้มีบันทึกการรับวัตถุดิบ ภาชนะบรรจุยา วัสดุสำหรับการบรรจุที่เป็นสิ่งพิมพ์ทุกครั้งที่ได้รับเข้า

7. ให้มีวิธีปฏิบัติและบันทึกเกี่ยวกับการทำความสะอาดสถานที่ผลิตยาและอุปกรณ์การผลิตที่สำคัญ การฝึกอบรมพนักงาน การแต่งกายของพนักงาน การรักษาสุขอนามัยของพนักงาน

8. ให้มีการจัดทำเอกสารแม่บทของยาทุกตำรับ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

(1.) ชื่อยา

(2.) ลักษณะ ความแรง และขนาดของรุ่นที่ผลิต

(3.) ชื่อและปริมาณวัตถุดิบที่ใช้

(4.) รายละเอียดของขั้นตอนวิธีการผลิตและรายชื่ออุปกรณ์การผลิตที่สำคัญ

(5.) รายละเอียดการควบคุมระหว่างผลิต

(6.) ขนาดบรรจุ

(7.) รายละเอียดวัสดุสำหรับการบรรจุที่ใช้ต่อหนึ่งหน่วยบรรจุ

(8.) รายละเอียด ขั้นตอนวิธีการบรรจุ และรายชื่ออุปกรณ์การบรรจุที่สำคัญ

(9.) รายละเอียดการควบคุมระหว่างบรรจุ การสุ่มตัวอย่าง และเกณฑ์ยอมรับ

9. ให้มีการจัดทำบันทึกกระบวนการผลิตของยาทุกรุ่นที่ผลิตที่สอดคล้องกับเอกสารแม่บทที่ได้รับอนุมัติจากผู้มีหน้าที่รับผิดชอบโดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

- (1) ชื่อยา
- (2) เลขที่หรืออักษรแสดงครั้งที่ผลิต และวันเดือนปีที่ผลิต
- (3) วัน เดือน ปีและเวลาของแต่ละขั้นตอนการผลิตที่สำคัญ ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุด
- (4) ลายมือชื่อ พนักงานที่ปฏิบัติงานในแต่ละขั้นตอนการผลิตที่สำคัญ และลายมือชื่อพนักงานที่ตรวจสอบแต่ละขั้นตอนการผลิตดังกล่าวตามความเหมาะสม (เช่น การชั่งยา)
- (5) ปริมาณวัตถุดิบแต่ละรายการที่แท้จริง
- (6) รายละเอียดของขั้นตอนวิธีการผลิตและรายชื่ออุปกรณ์การผลิตที่สำคัญ
- (7) บันทึกการควบคุมยาระหว่างผลิต และลายมือชื่อผู้ควบคุมและผลที่ได้
- (8) ปริมาณยาที่ผลิตได้ในขั้นตอนต่างๆที่สำคัญ
- (9) บันทึกปัญหาหรือสิ่งผิดปกติที่เกิดขึ้นรวมทั้งรายละเอียด ในกรณีปฏิบัติแตกต่างไปจากเอกสารแม่บท ต้องได้รับความเห็นชอบจากผู้มีหน้าที่รับผิดชอบ

10. ให้มีการจัดทำบันทึกการบรรจุของยาทุกรุ่น โดยมีรายละเอียดดังนี้ (1) ชื่อยา (2) เลขที่หรืออักษรแสดงครั้งที่ผลิต (3) ปริมาณยารอการบรรจุ (4) จำนวนยาสำเร็จรูปที่บรรจุได้จริง (5) วัน เดือน ปี และช่วงเวลาที่ใช้ในการบรรจุ (6) ลายมือชื่อพนักงานที่ปฏิบัติงานในแต่ละขั้นตอนที่สำคัญของการบรรจุ (7) รายละเอียดขั้นตอนวิธีการบรรจุ รายชื่ออุปกรณ์การบรรจุ และสายการบรรจุที่ใช้ (8) บันทึกการตรวจสอบวัสดุที่เบิกมาใช้รวมทั้งผลการตรวจสอบยาระหว่างการบรรจุ (9) ตัวอย่างวัสดุสำหรับการบรรจุที่พิมพ์ข้อความแล้วที่ใช้ (10) บันทึกปัญหาหรือสิ่งผิดปกติที่เกิดขึ้นรวมทั้งรายละเอียด ในกรณีที่ปฏิบัติแตกต่างไปจากเอกสารแม่บท ต้องได้รับความเห็นชอบจากผู้มีหน้าที่รับผิดชอบ (11) ชนิดและจำนวนวัสดุสำหรับการบรรจุ และปริมาณยารอการบรรจุที่เบิก ที่ใช้ ที่ทำลายหรือคืนคลัง รวมทั้งปริมาณยาที่ผลิตได้เพื่อตรวจสอบความสอดคล้องกัน

การดำเนินการผลิต

การดำเนินการผลิตต้องปฏิบัติตามวิธีปฏิบัติที่กำหนดไว้ โดยต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์วิธี การที่ดีในการผลิต ทั้งนี้เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ยาที่ได้มีคุณภาพมาตรฐานตามที่กำหนด

การควบคุมวัตถุดิบ

1. ให้ดำเนินการจัดซื้อวัตถุดิบจากแหล่งจำหน่ายที่ได้คัดเลือกและอนุมัติแล้ว
2. ตรวจสอบวัตถุดิบที่เข้ามาแต่ละรุ่นเกี่ยวกับสภาพความสมบูรณ์ของภาชนะบรรจุหรือ หีบห่อ และการปิดผนึก และตรวจสอบว่าวัตถุดิบที่ส่งมอบตรงกับใบสั่งซื้อหรือไม่ ทำความสะอาดภาชนะ บรรจุตามความจำเป็นและปิดผนึกไว้

3. ถ้าพบว่าภาชนะบรรจุหีบห่อได้รับความเสียหายหรือมีปัญหาที่อาจมีผลต่อคุณภาพของ วัสดุดิบ ต้องทำการตรวจสอบ และบันทึกการแก้ไขปัญหาดังกล่าว

4. ต้องจัดเก็บสมุนไพรที่ยังไม่เข้าสู่กระบวนการผลิตในบริเวณที่แยกเป็นสัดส่วน มีการถ่ายเท อากาศที่ดี สามารถป้องกันแมลงและสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์แทะ มีมาตรการป้องกันการแพร่กระจายของ สัตว์ ดังกล่าว ตลอดจนจุลินทรีย์ที่ติดมาพร้อมกับสมุนไพรและสามารถป้องกันการปนเปื้อนระหว่าง สมุนไพร ต่างชนิดกัน ให้จัดวางภาชนะบรรจุสมุนไพรในลักษณะที่มีการระบายอากาศได้ดี

5. จัดเก็บวัสดุดิบให้เป็นระเบียบโดยจัดเก็บแยกตามชนิดของวัสดุดิบและให้มีการเบิกจ่าย ตามลำดับ

6. ฉลากบนภาชนะบรรจุวัสดุดิบแต่ละชนิดจะต้องมีข้อความอย่างน้อยดังนี้

- ชื่อวัสดุดิบหรือ รหัสที่กำหนดขึ้น (ถ้ามี)
- เลขที่หรืออักษรแสดงครั้งที่ผลิตจากแหล่งผลิตหรือที่กำหนดขึ้นเอง
- วันที่รับเข้า

7. ในการผลิตยาแต่ละครั้งต้องมีการตรวจสอบวัสดุดิบที่ใช้ รวมทั้งตรวจสอบน้ำหนักหรือ ปริมาตร วัสดุดิบที่ใช้และบันทึกการตรวจสอบไว้

8. น้ำที่ใช้ผลิตยาเป็นน้ำที่ใสสะอาดไม่มีกลิ่น สี หรือตะกอนในน้ำ ใช้ น้ำที่มีคุณภาพตาม มาตรฐาน น้ำบริโภค

การควบคุมวัสดุสำหรับการบรรจุ

1. การจัดซื้อ การบริหารจัดการและควบคุมวัสดุสำหรับการบรรจุที่สัมผัสกับยาโดยตรง และที่เป็น สิ่งพิมพ์ให้ปฏิบัติในแนวทางเดียวกับวัสดุดิบ

2. ภาชนะบรรจุยาก่อนบรรจุยา ต้องสะอาดปราศจากสิ่งปนเปื้อน เช่น ฝุ่นผง เศษแก้ว หรือเศษ โลหะ

3. วัสดุสำหรับการบรรจุที่เป็นสิ่งพิมพ์ ให้เก็บไว้ในที่ปลอดภัย ผู้ที่ไม่เกี่ยวข้องห้ามเข้า ไปในบริเวณ ดังกล่าว การเก็บหรือขนย้ายวัสดุดังกล่าวของแต่ละตำรับต้องแยกเป็นสัดส่วนเพื่อป้องกันการ สับสน

4. วัสดุสำหรับการบรรจุที่เป็นสิ่งพิมพ์ที่ไม่ประสงค์จะใช้แล้วให้นำไปทำลายและบันทึก ไว้เป็น หลักฐาน

การควบคุมกระบวนการผลิต

1. ในระหว่างการผลิตให้บันทึกข้อมูลในขณะปฏิบัติงานและหลังจากปฏิบัติงานเสร็จ แต่ละ ขั้นตอนลงในบันทึกกระบวนการผลิต และหัวหน้าผู้รับผิดชอบกระบวนการผลิตต้องตรวจสอบบันทึก ดังกล่าว พร้อมทั้งลงลายมือชื่อและวันที่ไว้เป็นหลักฐาน

2. ดำเนินการควบคุมยาระหว่างผลิตภายในบริเวณผลิตยา

3. ก่อนที่จะเริ่มการผลิตต้องมีการตรวจสอบให้แน่ใจว่าบริเวณที่เกี่ยวกับการผลิตยาเครื่องมือ และอุปกรณ์การผลิตมีความสะอาด ต้องไม่มีวัตถุขี้ขี้ ผลิตภัณฑ์ยาอื่น วัสดุสำหรับการบรรจุ และเอกสาร ต่าง ๆ จากการผลิตครั้งก่อนหลงเหลืออยู่ โดยบันทึกการตรวจสอบไว้
4. ต้องไม่ดำเนินการผลิตยาต่างชนิดกันในเวลาเดียวกันหรือในห้องเดียวกัน นอกจากจะมีมาตรการป้องกันอย่างเพียงพอที่จะไม่ให้เกิดความเสี่ยงต่อการสับสนหรือปนเปื้อนยาต่างชนิดกัน
5. ต้องมีมาตรการป้องกันการฟุ้งกระจายของผงยาในระหว่างการดำเนินการผลิตที่มีการใช้ตัวยา ที่มีลักษณะเป็นผงแห้ง
6. ในระหว่างการผลิต ภาชนะบรรจุวัตถุดิบ ยาระหว่างผลิต ยารอการบรรจุ อุปกรณ์การผลิตที่สำคัญหรือห้องที่ใช้ผลิต ต้องติดป้ายหรือฉลาก แสดงชื่อยา เลขที่แสดงครั้งที่ผลิต
7. ผู้ที่ไม่เกี่ยวข้องห้ามเข้าไปในบริเวณผลิต

การควบคุมการบรรจุ

1. ในระหว่างการบรรจุให้บันทึกข้อมูลลงในบันทึกการบรรจุในขณะที่ปฏิบัติงาน และหลังจากปฏิบัติงานเสร็จแต่ละขั้นตอน หัวหน้าผู้รับผิดชอบการบรรจุต้องตรวจสอบบันทึกการบรรจุพร้อมทั้งลายมือชื่อและวันที่ไว้เป็นหลักฐาน
2. การบรรจุยา ให้ระมัดระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อนหรือเกิดการสับสนของยาต่างชนิดกัน ต้องไม่บรรจุยาต่างชนิดกันในบริเวณใกล้เคียงกันนอกจากจะแบ่งแยกพื้นที่เป็นสัดส่วนชัดเจน
3. ก่อนเริ่มการบรรจุให้ตรวจสอบบริเวณที่บรรจุยาในแต่ละสาย เครื่องพิมพ์และอุปกรณ์อื่น ๆ ว่าปราศจากผลิตภัณฑ์ยาอื่น ๆ หรือเอกสารใด ๆ ในการผลิตครั้งก่อนหลงเหลืออยู่โดยการบันทึกการตรวจสอบไว้เป็นหลักฐาน
4. ให้ตรวจสอบยาและวัสดุสำหรับบรรจุที่รับเข้ามายังฝ่ายบรรจุให้ถูกต้องทั้งชนิดและ ปริมาณ ก่อนดำเนินการบรรจุ และติดป้ายแสดงชื่อยาและเลขที่แสดงครั้งที่ผลิตของยาที่จะบรรจุของแต่ละสายการบรรจุ
5. หลังการบรรจุยาใส่ภาชนะและปิดผนึกแล้วต้องปิดฉลากทันที ในกรณีที่ไม่สามารถดำเนินการได้ต้องมีวิธีการที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการสับสนหรือปิดฉลากผิด
6. ตรวจสอบการพิมพ์ข้อความบนวัสดุสำหรับการบรรจุ เช่น เลขที่หรืออักษรแสดงครั้งที่ ผลิต วัน สิ้นอายุและบันทึกผลการตรวจสอบไว้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพิมพ์ด้วยมือต้องตรวจสอบเป็นระยะ ๆ
7. ให้มีการควบคุมการบรรจุตามหัวข้อต่อไปนี้
 - (1) ลักษณะภายนอกโดยทั่วไปของยาที่บรรจุแล้ว
 - (2) ความเรียบร้อยสมบูรณ์ของการบรรจุ
 - (3) ใช้ยาและวัสดุสำหรับการบรรจุถูกต้องหรือไม่
 - (4) สิ่งพิมพ์เพิ่มบนฉลากถูกต้องหรือไม่

27. เมื่อเสร็จการบรรจุแล้ว ให้ตรวจสอบความสอดคล้องของจำนวนยารอการบรรจุ วัสดุ สำหรับการบรรจุที่เป็นสิ่งพิมพ์ และจำนวนหน่วยของยาสำเร็จรูปที่ผลิตได้ ถ้าพบว่ามีจำนวนผิดปกติต้องตรวจสอบหาสาเหตุจนได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

การควบคุมยาสำเร็จรูป

1. ให้มีการตรวจสอบบันทึกกระบวนการผลิต และบันทึกการบรรจุว่ามีข้อมูลถูกต้องและ ครบถ้วน ก่อนอนุมัติให้นำยาไปจำหน่ายได้

บรรณานุกรม

1. กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตยาจากสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย; 2548
2. The United States Pharmacopoeia Convention (US). The United States Pharmacopoeia 28 The National formulary 23. Ontario: Webcom Limited; 2005.

สรุปภาพรวมของโครงการวิจัย

จากการศึกษาพัฒนาพรมมิเพื่อใช้พรมมิ (*Bacopa monnieri* (L.) Wettst.) เป็นสมุนไพรบำรุงความจำ จากการศึกษาทางสัตว์ทดลองและทางคลินิกที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดที่มีการ stanadardized แล้วของพรมมิมิมีผล เพิ่มกระบวนการเรียนรู้และความจำ ในการวิจัยเชิงบูรณาการครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีความประสงค์เพื่อศึกษา ประสิทธิภาพและกลไกในการบำรุงความจำของพรมมิทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ ศึกษาการเกิดอันตรกิริยา กริยาและเภสัชจลนศาสตร์ของพรมมิ ศึกษาพิษวิทยาเรื้อรังเพื่อยืนยันความปลอดภัยของพรมมิ นอกจากนี้ยังได้ จัดทำคู่มือแนวทางในการผลิต และควบคุมคุณภาพสมุนไพรพรมมิและผลิตภัณฑ์ยาเม็ดพรมมิเพื่อเป็นข้อมูลใน การถ่ายทอดเทคโนโลยีต่อไป

คณะผู้วิจัยศึกษาผลทางคลินิกของพรมมิในรูปแบบยาเม็ด โดยอาสาสมัครถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่ม ที่ได้รับยาหลอก และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพรมมิขนาดวันละ 300 และ 600 มิลลิกรัม อาสาสมัครทุกคนได้รับ สารเป็นเวลาานาน 3 เดือน พบว่าสารสกัดพรมมิมิมีฤทธิ์บำรุงความจำ (working memory) โดยการเพิ่มระดับ ACh และ ลดระดับ oxidative stress ในการศึกษาผลของพรมมิต่อการเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนโลหิตบนผิวเปลือก สมอง ความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ ของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดพรมมิ (40 mg/kg BW) โดยการ กินติดต่อกันนาน 2 เดือน โดยศึกษาเปรียบเทียบกับผลของสารสกัดแปะก๊วย (60 mg/kg BW) และ Donepezil (1 mg/kg BW) ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม acetylcholinesterase inhibitor พบว่าสารสกัดพรมมิ มีผลเพิ่มการไหลเวียนโลหิต บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง เทียบเท่ากับสารสกัดแปะก๊วย ในขณะที่ยามาตรฐาน Donepezil ไม่มีผล ใด ๆ ต่อการไหลเวียนโลหิตบริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง ที่น่าสนใจก็คือการให้สารสกัดเป็นเวลา 2 เดือน ไม่มีผลต่อความดันโลหิต และอัตราการเต้นของหัวใจ ในทางตรงกันข้ามการให้สารสกัดพรมมิ หรือ สาร สกัดแปะก๊วยโดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำส่งผลลดทั้งความดันโลหิต และการไหลเวียนโลหิตเฉพาะที่ บริเวณหลอดเลือดแดงบนเยื่อหุ้มสมอง นอกจากนี้ ในการทดลองที่ป้อนสารสกัดพรมมิหรือยาติดต่อกันนาน 3 เดือน พบว่า หนูแก่ที่ได้รับสารสกัดพรมมิ (40 มก./กก.) มีการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ และ ความสามารถในการจดจำสิ่งของได้ดีพอๆ กับหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดจากใบแปะก๊วย (60 มก./กก.) และกลุ่มที่ ได้รับยา donepezil (1 มก./กก.) เมื่อเปรียบเทียบกับผลของหนูแก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่น ผลการ ทดลองชี้ให้เห็นว่าสารสกัดพรมมิอาจจะออกฤทธิ์ผ่านทางกลไกการเปลี่ยนแปลงระดับสารสื่อประสาทชนิดกรดอะมิ โนเพื่อที่เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูแก่

ในการศึกษาโอกาสที่สารสกัดพรมมิจะมีเกิดอันตรกิริยากับยาอื่น ๆ โดยการศึกษาผลของสารสกัดพรมมิ ต่อการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 (CYP) ในตับหนูและในมนุษย์โดยวิธีการ *in vitro* พบว่าสารสกัด พรมมิมิมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 และ CYP3A ได้น้อยเมื่อเทียบกับสาร

ยั้งมาตรฐาน ผลดังกล่าวจึงสามารถประเมินได้ว่ามีโอกาสน้อยที่สารสกัดพรมมิในขนาดปกติจะก่อให้เกิด
อันตรกิริยากับยาแผนปัจจุบันที่อาศัยเอนไซม์ดังกล่าวในการเปลี่ยนแปลงเพื่อการขจัดออกจากร่างกาย

ในการศึกษาการเมตาบอลิซึมของสาร Bacopaside I หนึ่งในสารกลุ่ม pseudogujubogenin ในหนูสายพันธุ์ wistar ภายหลังการบริหารสารดังกล่าวโดยการป้อนและการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำในปริมาณพบว่าสามารถตรวจพบสาร Bacopaside I ในตัวอย่างอุจจาระของหนูกลุ่มที่ได้รับสาร Bacopaside I โดยการป้อน ส่วนในหนูกลุ่มที่ได้รับสารทางหลอดเลือดดำพบว่าสามารถตรวจพบสารดังกล่าวได้ทั้งในตัวอย่างปัสสาวะและอุจจาระ โดยปริมาณของ Bacopaside I ที่ตรวจพบไม่มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาหลังการบริหารสาร

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดพรมมิในหนูขาวเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรังจากสารสกัดพรมมิ โดยเมื่อทดสอบโดยป้อนสารสกัดขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวทางปากครั้งเดียวไม่มีผลก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงในหนูเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังในหนูขาวโดยป้อนสารสกัดพรมมิขนาด 30, 60, 300 และ 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 270 วันก็ไม่มีผลผิดปกติใดๆ ในหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมื่อเทียบกับหนูขาวกลุ่มควบคุม

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการจัดทำคู่มือแนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิ แนวทางการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในสมุนไพรพรมมิ และแนวทางการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิขึ้น เป็นการเตรียมความพร้อมที่จะถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ภาคเอกชน

ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการ

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ยาเม็ดพรมมิที่พัฒนาได้ รวมทั้งการศึกษาข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดพรมมิ ทั้งด้านฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา การควบคุมคุณภาพ พิษวิทยา เภสัชจลนศาสตร์ และอันตรกิริยาระหว่างยา ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการมีดังนี้

1. ได้ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิที่มีข้อมูลการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ ทางด้านวัตถุดิบ กระบวนการผลิต การควบคุมคุณภาพ ประสิทธิภาพ ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารพรมมิ รวมทั้งอันตรกิริยาที่เกิดกับยาต่างๆ โดยพร้อมจะนำไปสู่การถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ภาคเอกชน
2. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยขั้นสูงต่อไป
3. ได้คู่มือแนวทางการเกษตรที่เหมาะสมสำหรับพรมมิ แนวทางการวิเคราะห์ปริมาณสารซาโปนินในสมุนไพรพรมมิ และแนวทางการผลิตยาเม็ดสมุนไพรพรมมิ เพื่อการถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่ภาคเอกชน

หน่วยงานต่างๆที่สามารถนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์เพื่อต่อยอดเพื่อการค้า และ พัฒนาผลิตภัณฑ์ เช่น องค์การเภสัชกรรม หรือบริษัทเอกชนอื่นๆ

ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

สารสกัดจากพรมมีมีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นยาสมุนไพรและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยมีข้อมูลพื้นฐานทั้งทางด้านผลิตภัณฑ์ และประสิทธิภาพรวมทั้งความปลอดภัยแล้ว ดังนั้นจึงสมควรที่จะดำเนินการวิจัยต่อเพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์และเภสัชจลนศาสตร์ระดับลึก รวมทั้งการศึกษาทางคลินิกแบบ multi-center นอกจากนี้ ยังน่าที่จะทำการศึกษาในการนำสารสกัดพรมมีไปใช้ในข้อบ่งใช้อื่นๆ เช่นในเรื่องของการเพิ่มสมรรถภาพหรือด้านการซึมเศร้า หรือการศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์พรมมีในรูปแบบอื่นเช่น เป็นผลิตภัณฑ์พร้อมดื่มบำรุงสุขภาพ

ประวัติของคณะนักวิจัย

ผู้ประสานงานโครงการ

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นส. กรกนก อิงคนินันท์
(ภาษาอังกฤษ) Ms. Kornkanok Ingkaninan
- เลขประจำตัวประชาชน 3100504089629
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ระดับ 9
- สถานที่ทำงาน ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 081-4817350 โทรสาร 055-261057
e-mail: k_ingkaninan@yahoo.com
- ประวัติการศึกษา
2828-2533 เภสัชศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2535-2537 เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชเวท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2538-2543 คุยฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยไลเดน ประเทศเนเธอร์แลนด์
- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ phytochemistry, phytochemical analysis and isolation of active compounds from plant extracts guided by bioassays such as radioligand-receptor-binding assays and enzymatic assays.
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย สำหรับงานวิจัยที่กำลังทำอยู่
1. การศึกษาพัฒนาพรมมิเพื่อใช้เป็นสมุนไพรบำรุงความจำระยะ 4 (ทุนบูรณาการสมุนไพร คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ) (ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย)
7.2 ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
Selected publication
1. Ingkaninan, K. Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W. (2003): Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J. Ethnopharmacol* 89: 261-264.
2. Nuengchamnong, N., de Jong, C.F., Bruyneel, B., Niessen W.M.A., Ingkaninan, K., Irth I (2005) HPLC on-line coupled to mass spectrometry and bioactivity for screening the radical scavenger compounds in *Butea superba* Roxb. *Phytochemical Analysis*. 16: 422-428.

3. Markmee, S., Ruchirawat, S., Prachyawarakorn, V, Ingkaninan, K., Khorana, N. (2006) Isoquinoline Derivatives as Potential Acetylcholinesterase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16: 2170-2172.
4. Ingkaninan, K, Phengpa, P., Yuenyongsawad, S., Khorana, N. (2006) Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* Tuber. *J. Pharm. Pharmacol.*, 58:695-700.
5. Ingkaninan, K., Changwijita, K., Suwanborirux, K. (2006) Vobasinyl-Iboga Bisindole Alkaloids, Potent Acetylcholinesterase Inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 847-852.
6. Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Wittaya-Areekul, S., Jetiyanon, K., and Ingkaninan, K. (2007) An enzyme-linked immunosorbant assay using polyclonal antibodies against bacopaside I. *Anal. Chim. Acta* 584: 1-6.
7. Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Wittaya-Areekul, S., Jetiyanon, K., and Ingkaninan, K. (2007) Determination of pseudojujubogenin glycosides from Brahmi based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacopaside I. *Phytochemical Analysis*. 18: 411-418.
8. Nuengchamnong, N., Ingkaninan, K., Kaewruang, W., Wongareonwanakij, S., Hongthongdaeng B. (2007) Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 15: 853-858.
9. Temkitthawon, P., Viyoch, J., Limpeanchob, N., Pongamornkul, W., Sirikul, C., Kumpila, A., Suwanborirux, K., Ingkaninan K. (2008) Screening for phosphodiesterase inhibitory activity of Thai medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 119, (2): 214-217.
10. Phrompittayarat, W., Wittaya-areekul, S., Jetiyanon, K., Putalun, W., Tanaka, H., and Ingkaninan, K. (2008) Stability studies of saponins in *Bacopa monnieri* dried ethanolic extracts. *Planta Med.* 74:1756-1763.
11. Nuengchamnong, N., Ingkaninan, K. (2009) On-line Characterization of phenolic antioxidants in fruit wines from family myrtaceae by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry and radical scavenging detection. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, (1): 297-302.
12. Nuengchamnong, N., Krittasilp, K., Ingkaninan, K. (2009) Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay. *Food Chem.* 117: 750-756

13. Nuengchamnong, N., Ingkaninan, K. (2010) On-line HPLC-MS-DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine: *Antidesma thwaitesianum* Muell.” *Food Chem.* 118: 147-152
14. Paibon, W., Yimnoi, C.A., Tembap, N., Boonlue, W., Jampachaisri, K., Nuengchamnong, N., Waranuch, N., Ingkaninan, K. (2010) Comparison and evaluation of volatile oils from three different extraction methods for some Thai fragrant flowers. *Int J Cosmet Sci.* 23: 1-9.
15. Nuengchamnong, N., Krittasilp, K., Ingkaninan, K. (2011) Characterisation of phenolic antioxidants in aqueous extract of *Orthosiphon grandiflorus* tea by LC-ESI-MS/MS coupled to DPPH assay. *Food Chem.* 127: 1287-1293.
16. Tothiam, C., Phrompittayarat, W., Putalun, W., Tanaka, H., Sakamoto, S., Khan, I.A., Ingkaninan, K. (2011) An enzyme-linked immunosorbant assay using monoclonal antibody against Bacoside A₃ *Phytochem Anal.* In press.
17. Changwichit, K., Khorana, N., Suwanborirux, K., Waranuch, N., Limpeanchob, N., Wisuitiprot, W., Suphrom, N., Ingkaninan, K. (2011) Bisindole alkaloids and secoiridoids from *Alstonia macrophylla* Wall. ex G.Don *Fitoterapia.* In press.

อนุสิทธิบัตร

เรื่องกรรมวิธีการเตรียมสารสกัดที่มีซาโปนินสูงจากพรมมิ เลขที่อนุสิทธิบัตร 4018

คุ้มครองสิทธิตั้งแต่ 7 กุมภาพันธ์ 2551- 28 มกราคม 2556

หัวหน้าโครงการที่ 1

1. ชื่อ - สกุล (ภาษาไทย) นางพูนศรี รังษิณี

(ภาษาอังกฤษ) Mrs.Poonsri Rangseekajee

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3-4099-00357-75-3

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รองหัวหน้าภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาจิตเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โทร/ โทรสาร 043-348384 ภายใน 63027

E-mail: poonsri@kku.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

5.1 แพทยศาสตรบัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย

5.2 ประกาศนียบัตรบัณฑิตทางวิทยาศาสตร์การแพทย์บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

5.3 วุฒิบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาจิตเวชศาสตร์

แพทยสภา (สถานฝึกอบรม : โรงพยาบาลสมเด็จพระเจ้าพระยา ราชวรวงศ์วารานุชิต) ประเทศไทย

5.4 อนุมัติบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม สาขาเวชศาสตร์ครอบครัว
แพทยสภา ประเทศไทย

5.5 Certificate of Completion in the specialty of Geriatric Psychiatry St Vincent's Health and the
Department of Psychiatry, University of Melbourne, Australia

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Psychiatry, Geriatric Psychiatry

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

1. พูนศรี รังษิณี, นิรมล พัจจนสุนทร, ททัชวัน สนั่นเอื้อ. ความชุกของโรคซึมเศร้าในกลุ่มสมรสของผู้ป่วยโรค
ติดยาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์.วารสารสมาคมจิตแพทย์แห่งประเทศไทย 2549; 51(3):14-24. (มีส่วน
ร่วมในการวิจัย 50%)

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. สุวรรณ อรุณพงศ์ไพศาล, พูนศรี รังษิขจี, สุรพล วีระศิริ, สุทธาทิพย์ สระพรม . ความชุกของปัญหาการดื่มสุรานในนักศึกษาแพทย์. วารสารสมาคมจิตแพทย์แห่งประเทศไทย 2549; 51(3):2-13. (มีส่วนร่วมในการวิจัย 35%) แหล่งทุนคณะแพทยศาสตร์
2. นวนันท์ ปิยะวัฒน์กุล, ธวัชชัย กฤษณะประกรกิจ, พูนศรี รังษิขจี, ชีระเกียรติ เจริญเศรษฐศิลป์, สุชาติ พหลภาคย์, สุรพล วีระศิริ, สุนันท์ มหาทน , สุวรรณ ทองอ่อน. ความน่าเชื่อถือและความแม่นยำของแบบสอบถามสุขภาพทั่วไป-28 ฉบับภาษาไทย ในประชากรผู้ใหญ่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ . วารสารสมาคมจิตแพทย์แห่งประเทศไทย 2541; 43 (4): 325-35. (มีส่วนร่วมในการวิจัย 20%) แหล่งทุน คณะแพทยศาสตร์
3. นิรมล พังจันสุนทร, พูนศรี รังษิขจี, สรสพร จวงค์, สุชาติ พหลภาคย์ .การรับรู้ของผู้ปกครองเกี่ยวกับอาการเบื้องต้นของเด็กออทิสติก ที่มารับบริการที่แผนกจิตเวชเด็ก โรงพยาบาลศรีนครินทร์.วารสารสมาคมจิตแพทย์แห่งประเทศไทย 2549;51(3):71-75. (มีส่วนร่วมในการวิจัย 20%) แหล่งทุน คณะแพทยศาสตร์
4. สุวรรณ อรุณพงศ์ไพศาล,พูนศรี รังษิขจี,นิรมล พังจันสุนทร, สุรพล วีระศิริ,สุชาติ พหลภาคย์ , ธวัชชัย กฤษณะประกรกิจ. การพัฒนาเครื่องมือคัดกรองภาวะซึมเศร้าสำหรับคนไทยในชุมชนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.วารสารสมาคมจิตแพทย์แห่งประเทศไทย 2549;51(4):330-48. แหล่งทุน คณะแพทยศาสตร์ (มีส่วนร่วมในการวิจัย 25%).
5. ธวัชชัย กฤษณะประกรกิจ,พูนศรี รังษิขจี,สุชาติ พหลภาคย์,จิราพร เขียวอยู่. การศึกษาความแม่นยำและความเชื่อถือได้ของWHO– Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry , ฉบับภาษาไทย : หมวด Anxiety disorders. จดหมายเหตุนานาชาติทางการแพทย์ 2550;90(2):341-42 แหล่งทุน สกว.

7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

1. การศึกษาปัจจัยเสี่ยงของโรคซึมเศร้าในคนไทย ปี 2549 ใช้เวลาศึกษา 2 ปี (พ.ศ. 2548- 2550)/ ผู้ร่วมโครงการวิจัย แล้วเสร็จร้อยละ 80
2. การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโรคซึมเศร้าในคนไทย : ความสัมพันธ์ระหว่างโพลีมอร์ฟิซึมของยีน 5-HTR2A, 5-HT1A, CREB1 กับ โรคซึมเศร้าในคนไทย ใช้เวลาศึกษา 3 ปี (พ.ศ. 2548-2551)/ ผู้ร่วมโครงการวิจัย

หัวหน้าโครงการที่ 2

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว กรองกาญจน์ ชูทิพย์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Krongkarn Chootip

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3930100898528

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

4. หน่วยงานที่หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055 – 261200-5 ต่อ 4602 โทรสาร 055 – 261197

มือถือ: 081-7853618 e-mail: krongkarnc@nu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา (ตรี โท เอก และ ประกาศนียบัตร)	อักษรย่อปริญญา และชื่อเต็ม	สาขาวิชาเอก	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
พ.ศ.2535	ตรี	ภ.บ. (เภสัชศาสตร- บัณฑิต)	-	-	มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์	ไทย
พ.ศ.2537	โท	วท.ม. (วิทยาศาสตร์- มหาบัณฑิต)	เภสัชวิทยา	-	มหาวิทยาลัย มหิดล	ไทย
พ.ศ.2543	เอก	Ph.D. (Doctor of Philosophy)	Physiology & Pharmacology	-	University of Strathclyde	United Kingdom

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

การทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด การแยกหลอดเลือดขนาดเล็ก การแยกเซลล์หลอดเลือด การศึกษาคุณสมบัติสรีรวิทยาทางไฟฟ้าของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดโดยใช้เทคนิค patch clamp

7. ประสิทธิภาพที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. Chootip, K., Ness, K., Kennedy, C. and Gurney, A.M. 2000. Characterisation of P2 receptors mediating contraction of the rat isolated pulmonary vasculature. *Br. J. Pharmacol.*, 131, 167P.
2. Chootip, K., Ness, K., Wang, Y., Gurney, A.M. and Kennedy, C. 2002. Regional variation in P2 receptor expression in the rat pulmonary arterial circulation. *Br. J. Pharmacol.*, 137. 637-646.
3. Chootip, K., and Gurney, A. M. *Vascular Actions of Yathom Medicine*. (2003). The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare. OP01-08. P. 36.
4. Chootip, K., Gurney, A. M. and Kennedy, C. 2005. Multiple P2Y receptors couple to calcium-dependent, chloride channels in smooth muscle cells of the rat pulmonary artery. *Respiratory Research*, 6:124. doi:10.1186/1465-9921-6-124
5. Inchan, A. and Chootip, K. Vascular action and mechanism of action of black pepper (*Piper nigrum* L). Proceedings of Naresuan Research Conference 2006. p7-13.
6. Inchan, A. and Chootip, K. Vascular action and mechanism of action of *Piper longrum* (Long pepper). 36th Annual Scientific Meeting of The Physiological Society of Thailand. 2007. p78.
7. Promma, P., Chintana, P. and Chootip, K. Acute effect of Long Pepper (*Piper longrum*) on Cardiovascular System in Rat. 36th Annual Scientific Meeting of The Physiological Society of Thailand. 2007. p79.
8. Promma, P., Chintana, P. and Chootip, K. Acute effects of Ginger Extract on Cardiovascular System in Rat. The 2nd International Conference on Forensic Science and Medical Science. 2007. p67.
9. Anjaree Inchan and Krongkarn Chootip. Vascular Actions and Mechanism of Action of *Zingiber officinale*. The 2nd International Conference on Forensic Science and Medical Science. 2007. p121.
10. Anjaree Inchan and Krongkarn Chootip. Investigation of Crude Extract from Root of *Tabernaemontana divaricata* on Rat Isolated Aorta. The 2nd International Conference on Forensic Science and Medical Science. 2007. p123.
11. Inchan A, Promma P, Chintana P, Chootip K. Cardiovascular action of *Piper longum* PLANTA MEDICA. 2008. 74: 9, P: 942.

หัวหน้าโครงการที่ 3

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นิวัติ เทพาวราพฤกษ์
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Niwat Taepavarapruk
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3309800270541
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ 7
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต.ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
หมายเลขโทรศัพท์ 055 – 261000 ต่อ 4641 โทรสาร 055 – 261157
E-mail: taepavan@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
พ.ศ. 2528	ตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตร์บัณฑิต)	กายภาพบำบัด	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
พ.ศ. 2534	โท	วท.ม. (วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต)	สรีรวิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
พ.ศ. 2542	โท	M.Sc.	Neuroscience	The University of British Columbia	แคนาดา
พ.ศ. 2547	เอก	Ph.D.	Neuroscience	The University of British Columbia	แคนาดา
พ.ศ. 2551	การศึกษาหลังปริญญาเอก	Post-Doctoral Fellow	Neurobehavior and Neurochemistry	Dept. of Psychiatry, The University of British Columbia	แคนาดา

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สรีรวิทยาทางไฟฟ้า (electrophysiology), ประสาทเภสัชวิทยา (neuropharmacology), ทางประสาทพฤติกรรมศาสตร์ (behavioral neuroscience)

7. ประสพการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. Soja PJ, Pang W, Taepavarapruk N, Cairns BE, and McErlane SA (2001) On the reduction of spontaneous and glutamate-driven spinocerebellar and spinoreticular tract neuronal activity during active sleep. *Neuroscience* 104: 199-206.
2. Soja, PJ, Pang W, Taepavarapruk N, and McErlane SA (2001) Spontaneous spike activity of spinoreticular tract neurons during sleep and wakefulness. *Sleep* 24: 18-25.
3. Soja, PJ, Taepavarapruk N, Pang W, Cairns BE, and McErlane SA (2002) Transmission through the dorsal spinocerebellar and spinoreticular tracts. *Anesthesiology* 97: 1178-1188.
4. Taepavarapruk N, McErlane SA, and Soja PJ (2002) State-related inhibition by GABA and glycine of transmission in Clarke's column. *J. Neurosci.* 22(13): 5777-5788.
5. Taepavarapruk N, McErlane SA, and Soja PJ. (2004) State-related inhibition of sciatic nerve-evoked dorsal spinocerebellar tract responses. *J. Neurophysiol.* 92(3):1479-90.
6. Nakdook W, Taepavarapruk P, Taepavarapruk N and Khongsombat O. (2007) A preliminary study of *Tabernaemontana divaricata* root extract on amyloid β -peptide 35-25 induced cognitive deficits in mice. *Proceeding of the 3rd Naresuan University Research Conference*: 138-144.
7. Taepavarapruk N, Taepavarapruk P, Joshi J, Lai YY, Siegel J, Phillips AG, McErlane SA, and Soja, PJ (2008) State-Dependent Changes in Glutamate, Glycine, GABA, and Dopamine Levels in Cat Lumbar Spinal Cord. *J. Neurophysiol.* 100(2):598-608.

หัวหน้าโครงการที่ 4

- ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นาย ดำรงค์ศักดิ์ เป็กทอง
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Dumrongsak Pekthong
- หมายเลขประจำตัวประชาชน 3- 5401-00209-13-1
- ตำแหน่งปัจจุบัน พนักงานสายวิชาการ (อาจารย์)
- หน่วยงานที่สังกัดและที่ตั้ง ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
โทร 055-261000-4 ต่อ 3620
E-mail address: dumrongsakp@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
พ.ศ. 2539	ตรี	ภ.บ. เภสัชศาสตร์บัณฑิต	-	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
พ.ศ. 2543	โท	ว.ท.ม. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	เภสัชวิทยา	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
พ.ศ. 2551	เอก	Ph.D. Doctor of Philosophy	Cell Molecular	Université de Franche-Comté	ฝรั่งเศส

หัวข้อวิทยานิพนธ์ปริญญาโท Pharmacokinetics and the effects on psychomotor performance of caffeine in energy drinks in Thai healthy volunteers.

หัวข้อวิทยานิพนธ์ปริญญาเอก Evaluation of possible herb-drug interactions : The effects of *Andrographis paniculata* on hepatic metabolizing enzymes in rats and humans.

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- 1) Herb-drug interactions
- 2) Cell Biology
- 3) Clinical pharmacokinetics, Bioequivalence study of drug

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. Jeenapongsa, R., Pekthong, D., Thippayawan, T., Choorassamee, J., Buathong, J., Sommanus, R., Wannapun, J., Sangamnatdej, S. (2004) Glibenclamide and a Thai herbal medicine (*Momordica charantia*) powder increase HNF-1alpha gene transcription. *Drugs of the Future*. 29 (Suppl. A): 238.
2. Pekthong D., Martin H., Abadie C., Bonet A., Heyd B., Manton G., Richert L., (2008) Differential inhibition of rat and human hepatic cytochrome P450 enzymes by *Andrographis paniculata* extract and Andrographolide. *J Ethnopharmacology* 115 (3), 432-40.
3. Richert, L., Tuschl, G., Abadie, C., Blanchard, N., Pekthong D., Manton G., Weber J.C. and Otto-Müller, S.(2008) Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology* (revision).
4. Pekthong D., Blanchard N., Abadie C, Bonet A., Heyd B., Manton G., Berthelot A., Richert L., Martin H. (2008) Effects of *Andrographis paniculata* extract and Andrographolide on hepatic cytochrome P450 mRNA expression and monooxygenase activities after *in vivo* administration to rats and *in vitro* in rat and human hepatocyte cultures. *Chemico-Biological Interaction* (revision).

7.2 การนำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์

1. Tubthonglang, S., Cheawchanthanakit, D., Polnok, S . , Sirikaseam, S., Pekthong, D. and Viyoch, J. Average bioequivalence study of losartan tablets in healthy Thai male volunteers. A poster presentation at Annual Meeting of Hospital Pharmacist (Thailand): The Next Step of Hospital Pharmacist to Quality Pharmacy Service, Bangkok, Thailand, May 17-19, 2006.
2. Blanchard N., Baird H., Pappas J., Ratcliff A., Pekthong D., Heyd B., Manton G., Richert L., Use of rat, dog, monkey and human hepatocytes for metabolic stability studies: suspension or culture ? Poster at SOT, Charlotte, March 25-29, 2007.
3. Abadie C., Martin H., Blanchard N., Pekthong D., Heyd B., Manton G., Weber J. C., Schuler F., Coassolo P., Richert L., Optimisation of culture and treatment conditions of rat and human hepatocytes for cytochrome P450 expression and inductibility. Poster at ISSX, *Vienna*, May 18-21, 2008.

หัวหน้าโครงการที่ 6

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายสิ่วบูรณ์ สิริรัฐวงศ์
(ภาษาอังกฤษ) Mr Seewaboon Sireeratawong

2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

3. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

ที่ทำงาน สาขาเภสัชวิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง

จ .ปทุมธานี 12120

โทรศัพท์ 02-926-9741 โทรสาร 02-926-9711

E-mail seewaboon@gmail.com

4. ประวัติการศึกษา

ปีจบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา
ปี 2545	เอก	วท.ค.	เภสัชวิทยา	เภสัชวิทยาและ พิษวิทยาของ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปี 2539	ตรี	สพ.บ.	สัตวแพทยศาสตร์	-	มหาวิทยาลัยขอนแก่น

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

พิษวิทยา เภสัชวิทยา

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

6.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. S. Thanabhorn, K. Jaijoy, S. Thamaree, K. Ingkaninan and A. Panthong. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Lonicera japonica* Thunb. *J Ethnopharmacol.* 2006;107:370-373.
2. S.Thanabhorn, K. Jaijoy, S. Thamaree, K. Ingkaninan and A. Panthong. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Alternanthera philoxeroides* Griseb. *Mahidol University J Pharm Sci.* 2005;32 (1-2):4-14.
3. S.Thanabhorn, K. Jaijoy, S. Thamaree, K. Ingkaninan and A. Panthong. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from the rhizomes of *Cyperus rotundus* Linn. *Mahidol University J Pharm Sci.* 2005;32 (1-2):15-22.

4. S.Thanabhorn, K. Jaijoy, S. Thamaree, K. Ingkaninan and A. Panthong. Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from the fruits of *Terminalia belerica*. *Mahidol University J Pharm Sci.* 2006;33 (1-4):23-30.
5. S. Chunlaratthanaphorn, N. Lertprasertsuke, U. Srisawat, A. Thuppia, A. Ngamjariyawat, N. Suwanlikhid, K. Jaijoy. 2007. Acute and subchronic toxicities of the water extract from *Piper nigrum* L. *Songklanakarinn J. Sci Technol.*, 2007;29(Suppl.1):109-124.
6. S. Chunlaratthanaphorn, N. Lertprasertsuke, U. Srisawat, A. Thuppia, A. Ngamjariyawat, N. Suwanlikhid, K. Jaijoy. 2007. Acute and subchronic toxicities of the water extract from *Citrus aurantifolia* (Christm. et Panz.) Swingle. *Songklanakarinn J.Sci. Technol.*, 2007;29(Suppl.1):125-139.
7. S. Chunlaratthanaphorn, N. Lertprasertsuke, U. Srisawat, A. Thuppia, A. Ngamjariyawat, N. Suwanlikhid, K. Jaijoy. Acute and subchronic toxicities of the water extract from *Imperata cylindrica* (Linn.) Raeusch. *Songklanakarinn J. Sci Technol.*, 2007;29(Suppl.1):141-155.
8. S. Sireeratawong, N. Lertprasertsuke, U. Srisawat, A. Thuppia, A. Ngamjariyawat, N. Suwanlikhid, K. Jaijoy. 2007. Acute and subchronic toxicities of the water from root of *Sida rhombifolia* Linn.L. *Songklanakarinn J. Sci Technol.*, 2008 (inpress).
9. S. Sireeratawong, N. Lertprasertsuke, U. Srisawat, A. Thuppia, A. Ngamjariyawat, N. Suwanlikhid, K. Jaijoy. 2007. Acute and subchronic toxicities of the water extract from *Tiliacora triandra* (Colebr.) *Songklanakarinn J.Sci. Technol.*, 2008 (inpress).
10. S. Sireeratawong, N. Lertprasertsuke, U. Srisawat, A. Thuppia, A. Ngamjariyawat, N. Suwanlikhid, K. Jaijoy. Acute and subchronic toxicities of the water extract from *Harrisonia perforata* Merr.. *Songklanakarinn J. Sci Technol.*, 2008 (inpress).
11. K. Jaijoy, N. Soonthornchareonnon, A. Panthong, S. Sireeratawong. 2008. Acute and chronic toxicities of the water extract from *Phyllanthus emblica* Linn. *Songklanakarinn J. Ethnopharmaco.*, 2008 (inpress).
12. K. Jaijoy, N. Soonthornchareonnon, A. Panthong, S. Sireeratawong. 2008. Anti-inflammatory and analgesic activities of the water extract from *Phyllanthus emblica* Linn. *Songklanakarinn J. Ethnopharmaco.*, 2008 (inpress).