

แบบสรุปผู้บริหาร

[Executive Summary]

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย / แผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

(ภาษาไทย) การศึกษาการเตรียมและการควบคุมคุณภาพและความเป็นพิษของสารสกัดจากใบ
กฤษณาในสัตว์ทดลอง

(ภาษาอังกฤษ) Studies of preparation, Quality Control Methods and toxicity of *Aquilaria subintegra*
Leave Extract

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย (นาย นาง นางสาว)

1. รองศาสตราจารย์ ดร.เนติ วรรณุช หัวหน้าโครงการ

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง
จังหวัดพิษณุโลก 65000 โทรศัพท์ 0-5596-8606 โทรสาร 0-5596-8606

2. รองศาสตราจารย์ ดร.กรกนก อิงคนินันท์

ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง
จังหวัดพิษณุโลก 65000 โทรศัพท์ 0-5596-1860 โทรสาร 0-5596-3731

3. ดร.นิทรา เนื่องจำนง

ศูนย์วิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ พิษณุโลก อ.เมือง จ.พิษณุโลก
โทรศัพท์ 0-5524-7581 โทรสาร 0-5524-7581

4. ดร.พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก
โทรศัพท์ 0-5596-4650 โทรสาร 0-5596-4770

e-mail : taepavap@yahoo.com

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2553 จำนวนเงิน 1,135,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน, ปี) 9 มิถุนายน 2553 ถึง 9 มิถุนายน 2554

2. **สรุปโครงการวิจัย** [เขียนภาพรวมโครงการในลักษณะย่อและกะทัดรัดที่สามารถใช้ในการเผยแพร่ผลงานวิจัยได้ โดยแสดงถึงความสำคัญและที่มาของปัญหาในการวิจัย สรุปวัตถุประสงค์ของการวิจัยและระเบียบวิธีการวิจัย ผลการวิจัย คุณสมบัติ/จุดเด่นของผลิตภัณฑ์หรือเทคโนโลยีที่ได้รับ กลุ่มเป้าหมายและประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการ การนำไปใช้ประโยชน์ และข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย (ข้อเสนอแนะเชิงนโยบาย ข้อเสนอแนะเชิงวิชาการ ข้อเสนอแนะในการนำไปใช้ประโยชน์)]

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

สมุนไพรเป็นทรัพยากรธรรมชาติซึ่งมนุษย์ใช้ประโยชน์สืบต่อกันมานาน ทั้งในด้านอาหาร ยารักษาโรค เครื่องสำอาง และอื่น ๆ ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา กระแสการดูแลสุขภาพโดยใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติกำลังกลับมาได้รับความนิยมอีกครั้ง ทั้งในสหรัฐอเมริกา ยุโรป และประเทศไทย ในปี 2541 พบว่ายอดขายผลิตภัณฑ์สมุนไพรในสหรัฐนั้น สูงถึงประมาณหนึ่งพันล้านเหรียญดอลลาร์สหรัฐ โดยที่ขยายตัวจากปีก่อนหน้านั้นถึงร้อยละ 54 ตลาดสมุนไพรขนาดมหาศาลนี้ เป็นโอกาสอันดีของประเทศไทยในการพัฒนาสมุนไพรไทยสู่ระดับอุตสาหกรรมเพื่อการใช้ในประเทศและการส่งออก ผู้ผลิตจะต้องพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพรให้ได้มาตรฐาน กระบวนการเหล่านี้รวมถึงการเลือกวัตถุดิบ กระบวนการผลิตที่ดี และวิธีการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ที่ดี

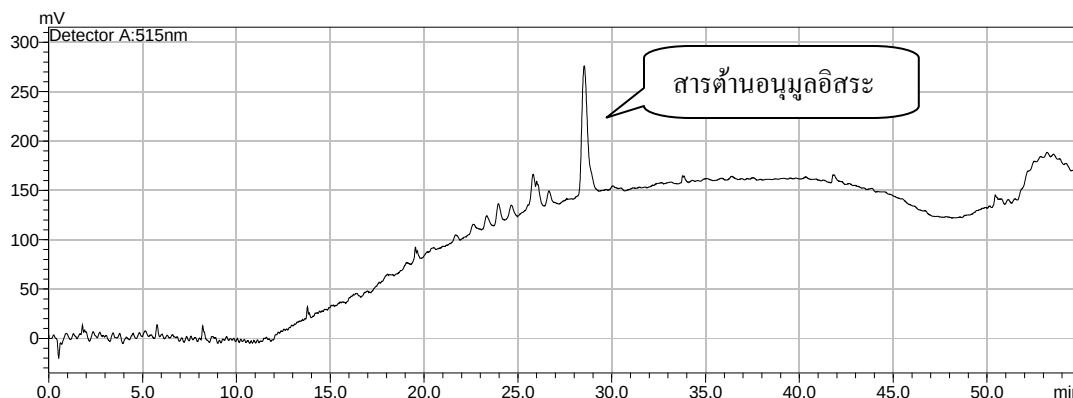
กฤษณา เป็นไม้สกุล *Aquilaria* วงศ์ *Thymelaeaceae* เป็นพืชที่พบได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นที่รู้จักกันในแง่ที่เนื้อไม้ให้น้ำมันหอมระเหยที่มีมูลค่าสูง มีกลิ่นหอมทนนาน และใช้ประโยชน์ได้ในทางยาและเครื่องสำอางมากมาย อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาเชิงวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับใบกฤษณาน้อยมาก จากการทดลองเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ของใบกฤษณามี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ เช่น ลดการสร้างฮอโมนเพศชายอย่างอ่อนๆ มีแนวโน้มจะทำให้หลอดเลือดหดตัว และ ด้านการอักเสบ รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดไขมัน จากการทดสอบฤทธิ์ของกฤษณาต่อเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดใบกฤษณาไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ และสารสกัดไม่มีพิษต่อเซลล์ผิวหนังและเซลล์ macrophage ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกฤษณามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ควรที่จะนำมาศึกษาในระดับลึกต่อไป เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนและครบถ้วนขึ้น

จากการศึกษาทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นของสารสกัดจากต้นกฤษณา (*Aquilaria malaccensis* Benth.) พบว่ามีฤทธิ์กระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งเมื่อหนูทดลองได้รับสารสกัดขนาด 1,000 มก./กก. จะเกิดอาการซึม เคลื่อนไหวน้อยลง ลดอาการเจ็บปวด เสริมฤทธิ์ยาสลบบาร์บิทูเรต และทำให้อุณหภูมิกายลดลง (Okugawa et al., 1993) ซึ่งอาจเกิดจากฤทธิ์ของสารสำคัญอย่างน้อย 2 ชนิดในกฤษณา คือ jinkoh-cremol และ agarospiol ที่กระตุ้นการหลั่งสารสื่อประสาทชนิดซีโร โดนินในสมอง ทำให้รู้สึกผ่อนคลาย (Okugawa et al., 1996) ซึ่งข้อมูลนี้สามารถใช้อธิบายถึงผลการประยุคน้ำมันหอมระเหยในด้านกลิ่นบำบัดเพื่อสุขภาพ หรือ aromatherapy

ถึงแม้ว่าผลการวิจัยในมนุษย์จะพบว่าน้ำมันกฤษณาไม่ได้ช่วยให้นอนหลับง่ายขึ้น และไม่มีผลต่อพฤติกรรมกรนอน ระยะเวลา รวมทั้งรูปแบบการนอนหลับในคนปกติแต่อย่างใด (Tanaka et al., 2002) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยในสัตว์ทดลองเมื่อเร็วๆ นี้ พบว่าเมื่อหนูทดลองได้รับสารสกัดจากน้ำมันหอมระเหยของต้นกฤษณาโดยการสูดดมในกล่องศึกษาพฤติกรรมประมาณ 30-60 นาที หนูทดลองมีการเคลื่อนไหวที่ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีผลมากกว่าน้ำมันหอม lavender หรือสารหอมระเหยที่เป็นตัวทำละลายเพียงอย่างเดียว (Takemoto et al., 2008)

สำหรับรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากส่วนใบของต้นกฤษณา ยังมีค่อนข้างน้อยเช่นกัน โดยผลงานวิจัยของ Zhou และคณะ ได้รายงานว่าสารสกัดแอลกอฮอล์ของใบกฤษณา (*Aquilaria sinensis*) มีฤทธิ์ด้านความเจ็บปวดและลดการอักเสบในหนูทดลอง (Zhou et al., 2008) นอกจากนี้ Hara และคณะ (2008) ได้ระบุว่าเมื่อหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดหยาบด้วยอะซิโตนของใบกฤษณา (*Aquilaria sinensis*) ทางปากด้วยขนาด 1,000 มก./กก. สามารถกระตุ้นระบบขับถ่ายดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (โดยไม่ทำให้ท้องเสีย) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาถึงความเป็นพิษเมื่อได้รับสารสกัดในปริมาณที่มากแบบครั้งเดียวและเมื่อได้รับสารสกัด 3 ขนาดแบบเรื้อรังนาน 6 เดือน ซึ่งข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้เป็นสิ่งสำคัญต่อการนำไปสู่การวิจัยในเชิงลึกและการพัฒนาสารสกัดจากใบกฤษณานี้ให้เป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ

โครงการวิจัยนี้ เป็นการศึกษาการวิเคราะห์ และ การควบคุมคุณภาพ จากที่ผู้วิจัยได้ทำ preliminary study โดยวิเคราะห์สารที่ออกฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระโดยต่อวิธีวิเคราะห์ DPPH assay เข้ากับ HPLC-MS (LC/MS/MS online coupling with DPPH assay) เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารออกฤทธิ์ ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในรูปที่ 1 พบ peak ที่น่าสนใจของสารด้านอนุมูลอิสระ และมีแนวโน้มที่จะบ่งชี้เอกลักษณ์ และนำมาใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพ (marker) ได้ ตลอดจนศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบกึ่งเรื้อรัง รวมทั้งความเป็นพิษต่อระบบประสาทรอบนอก เมื่อได้ควบคุมคุณภาพสารสกัดแล้ว ผู้วิจัยจะส่งต่อสารสกัดให้นักวิจัยอื่นๆ ในแผนงานวิจัยต่อไป ข้อมูลที่ได้จากโครงการนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาสารสกัดใบกฤษณาเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพ



รูปที่ 1. chromatogram จาก LC/MS/MS online coupling with DPPH assay เมื่อวิเคราะห์สารสกัด ethanol ของ ใบกฤษณา

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเตรียมสารสกัดใบกฤษณา (*Aquilaria subintegra*) เพื่อใช้ในการทดลองของโครงการอื่นๆ ภายใต้งานวิจัยนี้
2. เพื่อพัฒนาวิเคราะห์และควบคุมคุณภาพสารสกัดใบกฤษณา (*Aquilaria subintegra*)
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์ total polyphenol ในสารสกัดใบกฤษณา
4. เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบกฤษณา (*Aquilaria subintegra*) เมื่อได้รับสารสกัดอย่างเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรัง รวมทั้งความเป็นพิษต่อระบบประสาทรอบนอก

ระเบียบวิธีการวิจัย

การศึกษารวบรวม การควบคุมคุณภาพ

1. เก็บตัวอย่างใบกฤษณา และทำการอบและย่อยขนาด โดยบันทึกแหล่งที่เก็บ ช่วงเวลาที่เก็บ ช่วงอายุของสมุนไพรที่เก็บ รวมทั้งทำตัวอย่างพืชแห้งเพื่อเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชเพื่อเป็นหลักฐานอ้างอิงต่อไป
2. พัฒนาระบบการสกัดสารสกัดหยาบ โดยเริ่มจากวิธีการที่มีรายงานว่าให้สารสกัดใบกฤษณาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สกัดโดยการหมักด้วย Hexane หรือ สกัดด้วยน้ำ แล้วนำกากมาหมักใน 90 % ethanol โดยใช้ทดลองใช้วิธีสกัดหลายรูปแบบเช่น maceration ด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน หรือวิธีการสกัดอื่นๆ วิเคราะห์สารสกัดแต่ละวิธีที่ได้ เพื่อเปรียบเทียบวิธีที่ทำให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดมากที่สุด
3. การวิเคราะห์ total polyphenol ทำโดยใช้วิธีของ Folin-Ciocalteu ใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ค่าที่ได้คำนวณเป็น gallic equivalent (Maksimovic et al., 2005) รายละเอียดในการทดลองเป็นดังนี้ นำสารตัวอย่างในแอลกอฮอล์ที่เตรียมไว้ 0.1 มล. ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 0.5 มล. จากนั้น

ใส่ Folin-Ciocalteu reagent 0.25 มล. และ 20% aqueous sodium carbonate solution 1.25 มล. จากนั้นนำหลอดทดลอง vortex ทิ้งไว้ 40 นาที แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ 725 nm เทียบกับ blank (ตัวทำละลายของตัวอย่าง) ค่าที่ได้คำนวณเป็น gallic equivalent (มก. Gallic acid ใน 100 กรัมของพืชแห้ง) โดยการทำให้ calibration curve ของ gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.1-1.0 มก./มล. การทดลองทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ

- 4 วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากสารสกัดแบบต่างๆ ด้วยวิธี DPPH assay α , α diphenyl- β -pycryl-hydrazyl (DPPH) เป็นอนุมูลอิสระที่มีการดูดกลืนแสงที่ 510 nm ถ้าสารตัวอย่างสามารถที่จะ reduce DPPH การดูดกลืนแสงก็จะลดลง สามารถคำนวณเทียบกับ blank แล้วคิดเป็น % การต้านอนุมูลอิสระได้ การตรวจวัดนี้ ทำใน 96-welled microplate
- 5 วิเคราะห์และบ่งชี้เอกลักษณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบกฤษณา โดยจะใช้วิธี LC/MS/MS online coupling with DPPH assay) ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นโดยกลุ่มผู้วิจัย สารตัวอย่างจะถูกแยกด้วย HPLC column แล้วต่อเข้ากับเครื่องตรวจวัดคือ UV, MS/MS ซึ่งจะได้ข้อมูลในการพิสูจน์เอกลักษณ์แล้วยังผ่านสารที่ออกมาจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC เข้าไปยัง reaction coil เพื่อทำปฏิกิริยากับ DPPH ที่ตรวจวัดได้ที่ 510 nm เมื่อสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันผ่านเข้าไปใน reaction coil การดูดกลืนแสงก็จะน้อยลง เกิดเป็น peak ซึ่งจะสามารถเชื่อมโยง peak ที่เกิดขึ้นกับ peak ที่ได้จาก MS/MS
- 6 พัฒนาการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบกฤษณา ทำ method validation
- 7 ผลิตสารสกัดใบกฤษณา และทำการ standardized เพื่อนำไปศึกษาในโครงการอื่นๆต่อไป
- 8 สรุปและรายงานผลการทดลองสรุปวิเคราะห์ผลและเขียนบทความรายงานผลการทดลอง

การศึกษาความเป็นพิษ

(เดือนที่ 1-2)

ขั้นตอนที่ 1 ดำเนินการขออนุมัติการทำวิจัยในสัตว์จากกรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ขั้นตอนที่ 2 ผู้วิจัยได้เตรียมอุปกรณ์และชุดศึกษาพฤติกรรมสำหรับการทดสอบพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity test)

ขั้นตอนที่ 3 ผู้วิจัยได้ทำการส่งสัตว์ทดลองคือหนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้และเพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์จำนวนเพศละ 12 ตัวสำหรับการศึกษาพิษวิทยาแบบเฉียบพลัน (acute toxicity test) จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ซึ่งกำหนดการรับสัตว์ทดลองจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ คือ 19 สิงหาคม 2553 จากนั้นจะนำสัตว์ทดลองมาพักเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนจะเริ่มป้อนสารสกัดจากใบกฤษณาที่ขนาด 2000 มก/กก น้ำหนักตัว ทางปากครั้งเดียว (limit test) ในวันที่ 26 สิงหาคม 2553

เดือนที่ 3 ทำการทดสอบพิษวิทยาแบบเฉียบพลัน (acute toxicity test) (ต่อ) โดยทำการป้อนสารสกัดจากใบกฤษณาที่ขนาด 2000 มก/กก น้ำหนักตัว ทางปากครั้งเดียว (limit test) และสังเกตอาการและพฤติกรรมของหนูทดลองหลังจากป้อนสาร และที่เวลาชั่วโมงที่ 1, 2, 4, และ 6 นอกจากนี้ทำการสังเกตอาการและพฤติกรรมหนูทุกวันๆละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์หลังจากสังเกตอาการและพฤติกรรมของหนูเป็นเวลา 2 สัปดาห์แล้ว ทำการอดอาหาร สัตว์ทดลองประมาณ 12 ชั่วโมง ก่อนนำมา terminate ในวันที่ 15 ซึ่งเริ่มโดยทำหนูสลบด้วยการฉีดยาสลบ urethane แบบ overdose ขนาด 3 ก/กน้ำหนักตัว หลังจากเช็ครีเฟล็กซ์ต่างๆเพื่อให้มั่นใจว่าหนูสลบลึกดีแล้ว ทำการผ่าช่องท้องเพื่อตรวจสอบลักษณะของอวัยวะภายใน (gross morphology) และทำการเก็บอวัยวะ เช่น ปอด หัวใจ สมอง ตับ และไต ฯลฯ ซึ่งนำหนกอวัยวะและนำไปแช่ใน 10% ฟอรัมาลิน จากนั้นผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา general morphology และตรวจหาพยาธิสภาพของอวัยวะ (histopathology) นอกจากนี้จะทำการเก็บเลือดหนูแต่ละตัวส่งตรวจที่ รพ. มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อหาค่าโลหิตวิทยา (ได้แก่ white blood cell, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil, red blood cell, platelet, hemoglobin, hematocrit) ค่าทางชีวเคมีในเลือด (ได้แก่ creatinine, total protein, albumin, globulin) และวัดค่าทางชีวเคมี (ได้แก่ aspartate aminotransferase (AST), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), alanine aminotransferase (ALT), serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, urea nitrogen (BUN) เป็นต้น) รวมทั้งวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้

เดือนที่ 4 ผู้วิจัยได้ทำการส่งสัตว์ทดลองคือหนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้และเพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์จำนวนเพศละ 40 ตัวสำหรับการศึกษาพิษวิทยาแบบเรื้อรัง (chronic toxicity test) จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ซึ่งกำหนดการรับสัตว์ทดลองจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ คือ 20 กย 2553 จากนั้นจะนำสัตว์ทดลองมาพักเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนจะเริ่มป้อนสารสกัดจากใบกฤษณา 3 ขนาดทุกวันเป็นเวลาติดต่อกันนาน 6 เดือน

เดือนที่ 5-10 เป็นช่วงเวลาระหว่างทำการป้อนสารสกัดจากใบกฤษณาให้แก่หนูเพศผู้และเพศเมีย รวมทั้งหมด 8 กลุ่มแบ่งเป็นเพศละ 4 กลุ่มคือกลุ่มที่ได้รับตัวทำละลาย 1 กลุ่ม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 3 ขนาด คือ 50, 250 และ 500 มก/กน้ำหนักตัวหนู

เดือนที่ 11 ทำการอดอาหาร สัตว์ทดลองประมาณ 12 ชั่วโมง ก่อนนำมา terminate ในวันถัดไปซึ่งเริ่มโดยทำหนูสลบด้วยการฉีดยาสลบ urethane แบบ overdose ขนาด 3 ก/กน้ำหนักตัว หลังจากเช็ครีเฟล็กซ์ต่างๆเพื่อให้มั่นใจว่าหนูสลบลึกดีแล้ว ทำการผ่าช่องท้องเพื่อตรวจสอบลักษณะของอวัยวะภายใน (gross morphology) และทำการเก็บอวัยวะ เช่น ปอด หัวใจ สมอง ตับ และไต ฯลฯ ซึ่งนำหนกอวัยวะและนำไปแช่ใน 10% ฟอรัมาลิน จากนั้นผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา general morphology และตรวจหาพยาธิสภาพของอวัยวะ (histopathology) นอกจากนี้จะทำการเก็บเลือดหนูแต่ละตัวส่งตรวจที่ รพ. มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อหาค่าโลหิตวิทยา (ได้แก่ white blood cell, neutrophil, lymphocyte, monocyte,

eosinophil, basophil, red blood cell, platelet, hemoglobin, hematocrit) ค่าทางชีวเคมีในเลือด (ได้แก่ creatinine, total protein, albumin, globulin) และวัดค่าทางชีวเคมี (ได้แก่ aspartate aminotransferase (AST), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), alanine aminotransferase (ALT), serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, urea nitrogen (BUN) เป็นต้น)

ตอนที่ 12 รวบรวมผลทั้งหมดวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้และเขียนรายงานฉบับสมบูรณ์

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาการเตรียมการควบคุมคุณภาพ

ผู้วิจัยได้ทำการเตรียมสารสกัดน้ำของใบกฤษณา ตามรูปแบบการใช้ของวัดพระศรีรัตนศาสดาราม จังหวัดพิษณุโลก โดยทำให้สารสกัดแห้งด้วยวิธี freeze-dry ซึ่งจะให้ % สารสกัดสูงกว่า spray-dry สารสกัดที่ได้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี โดยสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในสารสกัดคือ mangiferin ซึ่งมีปริมาณ สูงถึง 13.88 ± 0.03 % นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ปริมาณ total polyphenol ในผงใบกฤษณาโดยใช้วิธีของ Folin-Ciocalteu มี พบว่าใบกฤษณามีปริมาณ total polyphenol สูงเทียบเท่ากับชาเขียว จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้ พบว่าสารสกัดด้วยน้ำที่ถูกทำแห้งโดยวิธี freeze dry และ spray dry ให้ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน และมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารสกัดชาเขียวประมาณ 3-5 เท่า ในขณะที่สาร mangiferin มีฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระสูงเทียบเท่ากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox

การวิจัยครั้งนี้ ได้ค้นพบศักยภาพของใบกฤษณาในด้านการนำมาใช้ต้านอนุมูลอิสระเป็นครั้งแรก โดยมี สารประกอบหลักคือ mangiferin การที่ mangiferin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงนี้ ทำให้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพ (marker) ของใบกฤษณา ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการ validate วิธีวิเคราะห์ mangiferin ในสารสกัดใบ กฤษณา เพื่อใช้เป็นวิธีการควบคุมคุณภาพสารสกัดใบกฤษณาต่อไปแล้ว

ผลการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

ผลการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันตามหลักเกณฑ์ของ OECD (1998, 2001) เมื่อป้อนสารตัวทำ ละลาย (น้ำ) และสารสกัดใบกฤษณาขนาด 2 ก./กก. ทางปากและให้เพียงครั้งเดียว พบว่าสารสกัดในขนาดที่สูง มากนี้ไม่ทำให้หนูทดลองตายการระหว่างการศึกษา มีอาการเพิ่มการขับถ่ายและอุจจาระเหลว ไม่มีผลต่อการ เจริญเติบโตของหนูทดลอง และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ผิดปกติของเซลล์ในอวัยวะภายใน (เช่น ตับ หัวใจ ปอด ไต กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น ม้าม มดลูก รังไข่ และอวัยวะ เป็นต้น) สำหรับผล เพิ่มการขับถ่าย (laxative effect) นั้นตรงกับสรรพคุณของสมุนไพร และรายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าเมื่อป้อนสาร

สกัดกฤษณาให้แก่หนูทดลองในขนาด 300 และ 600 มก./กก. นน.ตัว/วัน ติดต่อกันนาน 14 วัน สามารถกระตุ้นการขับถ่ายได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Hara et al, 2008; Kakino et al., 2010)

ผลการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการได้รับสารตัวละลายและสารสกัดใบกฤษณาด้วยขนาด 50, 250 และ 500 มก./กก. วันละครั้ง ติดต่อกันนาน 6 เดือน พบว่า ไม่ทำให้หนูทดลองตายการระหว่างการการศึกษา และไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติใดๆ ต่อจำนวนเม็ดเลือดชนิดต่างๆ รวมทั้งค่าชีวเคมีของเลือด นอกจากนี้ผลการบริโภคติดต่อกันอย่างยาวนานนี้ยังไม่ส่งผลทำให้เซลล์ในอวัยวะภายในเกิดความผิดปกติแต่อย่างใด แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกฤษณามีความปลอดภัยค่อนข้างสูง

สิ่งที่น่าสนใจสำหรับหนูที่ได้รับการป้อนสารสกัดใบกฤษณาอย่างยาวนานคือ ในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณาขนาด 500 มก./กก./วัน แสดงผลการลดน้ำหนักตัวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม แต่สำหรับหนูเพศผู้ เมื่อได้รับสารสกัดใบกฤษณาในขนาด 50, 250 และ 500 มก./กก./วัน มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มในอัตราที่น้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากงานวิจัยไม่ได้ออกแบบสำหรับการเก็บอุจจาระในแต่ละวัน แต่ก็อาจเป็นไปได้ว่าผลการลดน้ำหนักตัวอาจเกิดจาก laxative effect ของสารสกัดใบกฤษณาดังที่ Hara และคณะได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Hara et al, 2008; Kakino et al., 2010)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการเตรียมการสกัดใบกฤษณาที่มีคุณภาพ
2. ได้ความรู้องค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบกฤษณา และนำมาใช้เป็นตัวควบคุมคุณภาพ
3. ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดใบกฤษณา เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพสารสกัดใบกฤษณา
4. ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความเสี่ยงต่อการเป็นพิษเมื่อได้รับสารสกัดในปริมาณที่สูง

หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์คือ มหาวิทยาลัยนเรศวร และผู้ผลิต ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่จะได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยี

ข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยขั้นต่อไป น่าที่จะมีการศึกษาผลทางเภสัชวิทยาของใบกฤษณาที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ เช่น ฤทธิ์ต้านอักเสบ ฤทธิ์ป้องกันประสาทเสื่อม (neuroprotective) antiaging เป็นต้น เพื่อนำไปสู่การใช้ประโยชน์จากใบกฤษณาในทางการแพทย์และเครื่องสำอาง

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นความปลอดภัยในการประยุกต์ใช้สารสกัดใบกฤษณาเมื่อทดสอบในหนูทดลองทั้งสองเพศในขนาดสูงถึง 2000 มก./กก. เพียงครั้งเดียว หรือขนาด 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกันนาน 6 เดือน ซึ่งการศึกษาในขั้นตอนต่อไปน่าจะทำการสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารและน้ำ รวมทั้งเก็บข้อมูลการขับถ่าย (อุจจาระและปัสสาวะ) โดยแยกการศึกษาสำหรับหนูทดลองแต่ละตัวในกรงเลี้ยงแบบ metabolic chamber เพื่อตรวจสอบฤทธิ์กระตุ้นการขับถ่ายและยืนยันว่าสารสกัดนี้สามารถช่วยลดน้ำหนักได้หรือไม่อย่างไร ข้อมูลนี้จะเป็นสิ่งสำคัญในการยืนยันสรรพคุณของใบชากฤษณา และสามารถพัฒนาให้เป็นอาหารเสริมหรือยาเพื่อบำรุงระบบทางเดินอาหาร และใช้รับประทานเพื่อการลดน้ำหนักตัวโดยที่มีความปลอดภัยสูง ซึ่งอาหารเสริมชนิดนี้กำลังเป็นที่ต้องการมากในกลุ่มคนที่กำลังเป็นโรคอ้วน

3. บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

บทคัดย่อ

กฤษณา เป็นที่รู้จักกันในแง่ที่เนื้อไม้ให้น้ำมันหอมระเหยที่มีมูลค่าสูง ใช้ประโยชน์ได้ในทางยาและเครื่องสำอางได้ อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาเชิงวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับใบกฤษณาน้อยมากและยังไม่มีรายงานวิจัยใดที่ระบุถึงความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันหรือแบบเรื้อรัง ในประเทศไทยได้มีการขงชาใบกฤษณา ใช้บำรุงสุขภาพ เพื่อเป็นการศึกษาเบื้องต้นทางเคมี และเตรียมสารสกัดสำหรับการทดสอบทางเภสัชวิทยา และการพัฒนาผลิตภัณฑ์ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการเตรียม และการควบคุมคุณภาพ ของสารสกัดใบกฤษณา รวมถึงทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบกฤษณาในหนูทดลองแบบเฉียบพลัน เมื่อได้รับสารสกัดในขนาด 2 ก./กก. น้ำหนักตัว เพียงครั้งเดียว และทดสอบความเป็นพิษแบบเรื้อรังเมื่อได้รับสารสกัดด้วยขนาด 50, 250 หรือ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว ทุกวันๆ ละครั้ง เป็นเวลา 6 เดือน

ใบกฤษณามีปริมาณ Total polyphenol เทียบเท่ากับ gallic acid 72.10 ± 4.20 g ในผงพืช 1 kg ซึ่งใกล้เคียงกับชาเขียว ซึ่งเป็นสมุนไพรที่เป็นที่รู้จักว่ามีปริมาณ total polyphenol สูง ผู้วิจัยพบว่าการสกัดใบกฤษณาในน้ำร้อน แล้วทำให้แห้งโดยวิธีการ freeze dry และ spray dry ให้สารสกัดที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากเฮกเซน และสารสกัดน้ำที่ได้มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าสารสกัดชาเขียวประมาณ 3-5 เท่า

ผู้วิจัยได้ใช้วิธี LC/MS/MS online coupling with DPPH assay วิเคราะห์และบ่งชี้เอกลักษณ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบกฤษณา พบว่าสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีปริมาณสูงในกฤษณาคือ mangiferin ซึ่งมีปริมาณประมาณ 14 % ในสารสกัดน้ำจากกฤษณา จึงนำสารนี้มาใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพ (marker) ของสารสกัดกฤษณาต่อไป สาร mangiferin นี้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเทียบเท่ากับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox โดยสารทั้งคู่แสดงค่า IC50 ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 5 µg/ml

การวิจัยครั้งนี้ ได้ค้นพบศักยภาพของใบกฤษณาในด้านการนำมาใช้ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีการสกัดที่เหมาะสมคือการสกัดด้วยน้ำโดยใช้ความร้อนแล้วนำไป freeze dry สารประกอบหลักที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดคือ mangiferin ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการ validate วิเคราะห์ mangiferin ในสารสกัดใบกฤษณาโดยใช้ HPLC เพื่อใช้เป็นวิธีการควบคุมคุณภาพสารสกัดใบกฤษณาต่อไปแล้ว

จากผลการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน พบว่า ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีการถ่ายอุจจาระเหลวในชั่วโมงที่ 3 และ 4 หลังจากที่ได้รับสารสกัดใบกฤษณา ขนาด 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัว เพียงครั้งเดียว ส่วนหนูในกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะน้ำกลั่น (ตัวทำละลาย) ไม่พบการถ่ายอุจจาระเหลว ผลการตรวจเลือดและค่าทางชีวเคมีต่างๆ ในเลือดไม่พบว่ามีผลผิดปกติแต่อย่างใด นอกจากนี้ผลการสังเกตลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ ศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่ออวัยวะภายในและรูปร่างของเซลล์ ในหนูที่ได้รับสารสกัดทั้งสองเพศก็ไม่พบความผิดปกติเช่นกัน สำหรับผลการศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรัง เมื่อให้สารสกัด AS ที่ขนาด 50, 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว ทุกวันๆ ละครั้งเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าเฉพาะหนูที่ได้รับสารสกัด AS ขนาด 500 มก./กก. มีน้ำหนักตัวที่ต่ำกว่าหนูกลุ่มควบคุมภายหลังการป้อนติดต่อกันนาน 1 เดือน สำหรับผลการตรวจเลือด ผลการสังเกตลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ และผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่ออวัยวะภายในและรูปร่างของเซลล์ ในหนูทดลองทั้งสองเพศที่ได้รับสารสกัดไม่แสดงความผิดปกติหรือแตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าการบริโภคสารสกัดใบกฤษณาในปริมาณมากเพียงครั้งเดียว หรือครั้งละไม่เกิน 500 มก./กก./วัน ติดต่อกัน 6 เดือน ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายและต่ออวัยวะภายใน แต่ช่วยทำให้น้ำหนักตัวลดลงได้

คำสำคัญ : ใบกฤษณา การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน การทดสอบความเป็นพิษแบบเรื้อรัง