



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไฟน้ำต่อการ
เกิดภาวะไตวายเรื้อรังในหนูแรท

Investigation of a Crude Water Soluble Extract of *Tradescantia
fluminensis* in Chronic Renal Failure Rat Model

กัลยรัตน์ บุญประเสริฐ

31 พฤษภาคม 2559

สัญญาเลขที่ TRG5680058

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำต่อการ
เกิดภาวะไตวายเรื้อรังในหนูแรท

Investigation of a Crude Water Soluble Extract of *Tradescantia
fluminensis* in Chronic Renal Failure Rat Model

กัลยรัตน์ บุญประเสริฐ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและวิทยาลัย
แพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และต้นสังกัด
ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัย เรื่อง การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่สำหรับการเกิดภาวะไตวายเรื้อรังในหนูแรท ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี ด้วยความอนุเคราะห์จากทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้อง และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.เกศรา ณ บางช้าง อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย และศาสตราจารย์ (พิเศษ) พญ. สมบูรณ์ เกียรตินันท์ ผู้ให้แนวคิดและริเริ่มโครงการวิจัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่าง ๆ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งและทำให้งานวิจัยฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณหน่วยงานต่าง ๆ ในมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ได้แก่ วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ ศูนย์สัตว์ทดลอง ศูนย์วิจัย คันคว่ำ และพัฒนาฯ เป็นต้น ที่ได้อำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยขึ้นแก่ผู้วิจัย รวมทั้งผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำวิจัยครั้งนี้ทุกท่านที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์แก่อาจารย์ นักวิจัย และผู้สนใจทั่วไป ตลอดจนจะเป็นประโยชน์ในการสร้างองค์ความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์และการแพทย์แผนไทยต่อไป

กัลยรัตน์ บุญประเสริฐ

31 พฤษภาคม 2559

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5680058

ชื่อโครงการ: การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำต่อการเกิดภาวะไตวายเรื้อรังในหนูแรท

ชื่อนักวิจัย: กัลยรัตน์ บุญประเสริฐ วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

E-mail Address : noei noey@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

บทนำ: ในประเทศไทยได้มีการนำสมุนไพรหญ้าไผ่น้ำมาช่วยรักษาอาการของโรคไตวายเบื้องต้น อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของหญ้าไผ่น้ำต่อการเกิดโรคไตวายอย่างจริงจัง อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาความเป็นพิษและกลไกการออกฤทธิ์ของหญ้าไผ่น้ำทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง

วัตถุประสงค์: 1) ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำในสัตว์ทดลอง 2) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากหญ้าไผ่น้ำต่อการเกิดภาวะไตวายเรื้อรังในสัตว์ทดลอง

วิธีการทดลอง: การศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากหญ้าไผ่น้ำ โดยการป้อนสารสกัดในขนาด 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แก่หนูครั้งเดียว แล้วสังเกตอาการต่อเนื่อง 14 วัน สำหรับการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน ทำการป้อนสารสกัดในขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แก่หนูเป็นระยะเวลา 28 วัน แล้วสังเกตอาการอย่างต่อเนื่องทุกวัน ส่วนการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าไผ่น้ำในหนูที่มีภาวะไตวายเรื้อรัง จะแบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่ม และให้สารต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ได้แก่ 1)กลุ่มควบคุม 2) กลุ่มสารสกัดจากหญ้าไผ่น้ำในน้ำดื่ม 7.5%, w/v 3)กลุ่มสารสกัดจากหญ้าไผ่น้ำในน้ำดื่ม 15%, w/v 4) กลุ่มสาร Adenine ในอาหาร 0.75%, w/w 5)กลุ่มสาร Adenine ในอาหาร 0.75%+สารสกัดจากหญ้าไผ่น้ำในน้ำดื่ม 7.5%, w/v 6)กลุ่มสาร Adenine ในอาหาร 0.75%+สารสกัดจากหญ้าไผ่น้ำในน้ำดื่ม 15%, w/v จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และเลือด เพื่อตรวจวิเคราะห์การทำงานของไต (Creatinine, Blood urea nitrogen) ทุกวันที่ 0, 14, 21 และ 28 และในวันที่ 28 นี้จะทำการเก็บอวัยวะไต เพื่อทำการประเมินพยาธิสภาพของไตภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลอง: สารสกัดจากหญ้าไผ่น้ำไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังในสัตว์ทดลอง ไม่มีการตายของสัตว์ทดลองเกิดขึ้น รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของอวัยวะภายใน สาร Adenine สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังในสัตว์ทดลองได้ และสารสกัดจากหญ้าไผ่น้ำสามารถป้องกันอวัยวะไตจากการถูกทำลายและช่วยทำให้ไตกลับคืนหน้าที่และทำงานได้ดีขึ้น

วิจารณ์การทดลอง: สารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำมีความปลอดภัยและสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาโรคไตวายเรื้อรังได้จริง กลไกการเกิดฤทธิ์ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่น่าจะเกิดจากฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชันและการอักเสบ การทำวิจัยต่อไปในอนาคตควรมีการศึกษาวิจัยในคน

คำหลัก : สมุนไพรหญ้าไผ่น้ำ, สาร Adenine, ภาวะไตวายเรื้อรัง, การศึกษาความเป็นพิษ

Abstract

Project Code : TRG5680058

Project Title : Investigation of a Crude Water Soluble Extract of *Tradescantia fluminensis* in Chronic Renal Failure Rat Model

Investigator : Kanyarat Boonprasert, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University

E-mail Address : noei noey@hotmail.com

Project Period : 3 years

Background: *Tradescantia fluminensis* (TF) has been used as an alternative treatment of renal failure in Thai traditional medicine by local peoples. However, information on its toxicity and ability reduces renal failure has not been investigated.

Aims: To (i) determine the toxicity of crude water soluble extract from *T. fluminensis*, (ii) determine if a crude water soluble extract from *T. fluminensis* administered orally helps to protect against chronic renal failure (CRF) in rat.

Method: For acute toxicity, the extract was administered orally at the highest starting dose level (5,000 mg/kg body weight) and signs of toxicity were observed during the first 30 minutes, periodically during first 24 hours, and then daily for 14 days. For subacute toxicity, the extract was given at the daily dose of 1,000 mg/kg body weight for 28 days and signs of toxicity were observed daily. For CRF experiment, rats were divided into six groups and treated for 4 weeks as follows: control, TF (7.5%, w/v), TF in drinking water (15%, w/v), adenine in feed (0.75%, w/w), adenine+TF 7.5%, w/v, and adenine+TF 15%, w/v. Urine creatinine, blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine were determined at days 0, 14, 21 and 28. At day 28, the animals were killed and their kidneys removed for light microscope evaluation.

Results: Crude water soluble extract from *T. fluminensis* exerts no significant sign of toxicity (physiology and laboratory parameters) and none of the animals died during the observation period. All rats given adenine developed marked structural renal damage involving the tubule and interstitium. Treatment with TF significantly attenuated renal dysfunction in this model of CRF.

Discussion: *T. fluminensis* show a promising potential for it in protecting against renal failure progression. The mechanism(s) of this nephroprotection is uncertain but may involve anti-oxidant and/or anti-inflammatory actions. Further study will be performed to confirm its clinical efficacy in the treatment of renal failure in human.

Keywords : *Tradescantia fluminensis*, Adenine, Chronic renal failure, Toxicity

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	vi
สารบัญภาพ	vii
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
1. โรคไตวาย (Renal failure)	4
2. สมุนไพรหญ้าไผ่น้ำ (<i>Tradescantia fluminensis</i>)	6
3. การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง	9
4. การทดสอบความเป็นพิษในหลอดทดลอง	11
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	13
1. การสกัดสมุนไพรหญ้าไผ่น้ำ	13
2. การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ	13
3. การแยกองค์ประกอบทางเคมีและการกำหนดมาตรฐาน (Standardization) ของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ	16
4. การทดสอบความเป็นพิษของหญ้าไผ่น้ำในหลอดทดลอง	17
5. การทดสอบความเป็นพิษของหญ้าไผ่น้ำในสัตว์ทดลอง	18
6. การทดสอบฤทธิ์ของหญ้าไผ่น้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง	19
7. การประเมินการทำงานและพยาธิสภาพของไต	20
8. การวิเคราะห์ทางสถิติ	20
บทที่ 4 ผลการทดลอง	21
1. การสกัดสมุนไพรหญ้าไผ่น้ำ	21

หน้า

	2. การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัด แบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ	22
	3. การแยกองค์ประกอบทางเคมีและการกำหนดมาตรฐาน (Standardization) ของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ	22
	4. การทดสอบความเป็นพิษของหญ้าไผ่น้ำในหลอดทดลอง	25
	5. การทดสอบความเป็นพิษของหญ้าไผ่น้ำในสัตว์ทดลอง	27
	6. การทดสอบฤทธิ์ของหญ้าไผ่น้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังใน สัตว์ทดลอง	34
บทที่ 5	บทวิจารณ์	41
	บทวิจารณ์	41
บทที่ 6	สรุปผลการทดลอง	45
	สรุปผลการทดลอง	45
	เอกสารอ้างอิง	46
	ประวัติผู้วิจัย	49

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1. แสดงการจำแนกความเป็นพิษเฉียบพลัน
2. การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ
3. ระยะทางเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของสารพิษเคมีที่แยกได้ของสารสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ
4. น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทดลองในการศึกษาพิษเฉียบพลัน
5. ค่าเคมีโลหิตของหนูทดลองในการศึกษาพิษเฉียบพลัน
6. น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทดลองในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน
7. ค่าเคมีโลหิตของหนูทดลองในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน
8. ค่าโลหิตวิทยาของหนูทดลองในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน
9. น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในของหนูทดลองในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน
10. น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทดลองและน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะไตในการทดสอบฤทธิ์ของหญ้าไผ่น้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง
11. ระดับความรุนแรงของการเกิดพยาธิสภาพในอวัยวะไตในการทดสอบฤทธิ์ของหญ้าไผ่น้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง

สารบัญภาพ

ภาพที่

หน้า

1. กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย
2. แสดงอัตราผู้ป่วยโรคไตวายต่อประชากร 100,000 คน พ.ศ. 2547-2550
3. หน้้าใฝ่ใน้ำ (*Tradescantia fluminensis*)
4. โครงสร้างและรูปแบบทั่วไปของฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)
5. โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ที่พบในใฝ่ใน้ำสกุล *Tradescantia*
6. ต้นหน้้าใฝ่ใน้ำ
7. ผงสกัดอย่างหยาบจากหน้้าใฝ่ใน้ำ
8. รูปแบบการแยกของสารพฤษาคเคมีของสารสกัดอย่างหยาบจากหน้้าใฝ่ใน้ำ
9. โครมาโตแกรม (Chromatogram) ของสารสกัดอย่างหยาบจากหน้้าใฝ่ใน้ำ
10. กราฟแสดงค่าที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหน้้าใฝ่ใน้ำต่อเซลล์ Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293T) โดยวิธี MTT
11. กราฟแสดงค่าที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหน้้าใฝ่ใน้ำต่อเซลล์ Normal Human Embryonic Fibroblasts (OUMS-36T-6) โดยวิธี MTT
12. กราฟเปรียบเทียบการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหน้้าใฝ่ใน้ำต่อเซลล์ Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293T) และเซลล์ Normal Human Embryonic Fibroblasts (OUMS-36T-6) โดยวิธี MTT
13. ผลทางพฤษาสภาพของอวัยวะภายในของหนูทดลองในการศึกษาพิษเฉียบพลัน
14. ผลทางพฤษาสภาพของอวัยวะภายในของหนูทดลองในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน
15. ค่า Blood urea nitrogen (BUN) ในการทดสอบฤทธิ์ของหน้้าใฝ่ใน้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง
16. ค่า Serum creatinine ในการทดสอบฤทธิ์ของหน้้าใฝ่ใน้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง
17. ค่า Creatinine clearance ในการทดสอบฤทธิ์ของหน้้าใฝ่ใน้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคไต นับว่าเป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขและมีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทย โดยมีแนวโน้มการเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยในแต่ละปี จากข้อมูลผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาลทั่วประเทศในสังกัดกระทรวงสาธารณสุข พบว่าคนไทยเป็นโรคไตวายเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า ตลอดระยะเวลา 4 ปี ตั้งแต่ พ.ศ. 2547-2550 (สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข, 2552) โรคไตวาย (Renal failure) หรือโรคไตล้มเหลว แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ไตวายเฉียบพลัน (Acute renal failure) และไตวายเรื้อรัง (Chronic renal failure) ผู้ป่วยโรคไตในระยะแรกสามารถชะลอความเสื่อมของไตลงได้โดยการควบคุมปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ปรับเปลี่ยนวิถีชีวิตและทำการรักษาด้วยยา แต่หากปล่อยให้ไตเสื่อมลงมากๆ ก็อาจจะเกิดภาวะไตวายได้ โรคไตวายเฉียบพลัน เป็นภาวะที่การทำงานของไตเสื่อมลงอย่างรวดเร็ว ทำให้มีของเสียคั่งค้างอยู่ในร่างกาย ทำให้สมดุลของเกลือแร่ กรด ด่าง และการควบคุมน้ำในร่างกายผิดปกติ ภาวะไตวายเฉียบพลันนี้มักพบร่วมกับความเจ็บป่วยอื่นๆ อาจทำให้ภาวะแทรกซ้อนขึ้นได้ ในขณะที่ภาวะไตวายเรื้อรัง (Chronic renal failure) เป็นภาวะที่เนื้อไตถูกทำลายอย่างถาวร ทำให้สูญเสียการทำงานของไตเป็นไปอย่างช้าๆ ซึ่งการรักษาทำได้ด้วยการฟอกเลือดล้างไตด้วยไตเทียมและการผ่าตัดเปลี่ยนไต ถ้าหากไตเกิดความเสื่อมอย่างมาก จนทำงานได้น้อยกว่า 15% ของคนปกติ จะเรียกว่า “โรคไตระยะสุดท้าย” (end-stage renal disease: ESRD) ซึ่งหากไม่ได้ทำการรักษาจะทำให้มีโอกาเสียชีวิตในระยะเวลาอันสั้น (พญ.มาลินี, 2548) โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ขาดแคลนทุนทรัพย์ในการรักษา เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคไตวายมีราคาสูง ดังนั้นมาตรการป้องกันการเกิดโรคและการชะลอการพัฒนาของโรคไตวายจึงเป็นสิ่งจำเป็น

ในปัจจุบันมีความพยายามที่จะนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรคไต โดยปราศจากความเป็นพิษหรือเป็นพิษน้อยที่สุด เพื่อเป็นแนวทางการรักษาใหม่ๆ และพัฒนาสมุนไพรนั้นๆ เป็นยารักษาโรคไตวายในอนาคต สมุนไพรที่มีชื่อว่า หนุ่ยไผ่น้ำ หรือ *Tradescantia fluminensis* มีชื่อสามัญว่า River spiderwort หรือ small-leaf spiderwort เป็นไม้ล้มลุกจำพวกกิงเลื่อย ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไป และปลูกได้ง่าย โดยในประเทศไทยได้มีการนำหนุ่ยไผ่น้ำมาใช้ในการรักษาอาการโรคไต ขับปัสสาวะ บรรเทาอาการบวม ลดอาการอักเสบของทางเดินปัสสาวะ และยังใช้ในการรักษาต่อมน้ำเหลืองอักเสบได้อีกด้วย ด้วยสรรพคุณทั้งหลายเหล่านี้จึงมีผู้ป่วยโรคไตวายนำหนุ่ยไผ่น้ำมาต้มดื่มเป็นระยะเวลา 6 เดือน และผลปรากฏว่าอาการของโรคไตวายดีขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของหนุ่ยไผ่น้ำต่อการเกิดโรคไตวายอย่างจริงจัง อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาความเป็นพิษและกลไกการออกฤทธิ์ของหนุ่ยไผ่น้ำทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง ซึ่งทางกลุ่มวิจัยเล็งเห็นความสำคัญของสมุนไพรหนุ่ยไผ่น้ำที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคไตวายในอนาคต

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดสารสำคัญอย่างหายาจากสมุนไพรหนุ่ยไผ่น้ำ, ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์สำคัญ, ศึกษาความเป็นพิษ (Toxicity) ทั้งในหลอดทดลอง

(*In vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*In vivo*) รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญของสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) จากหญ้าไผ่น้ำ ต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรัง ในสัตว์ทดลอง ซึ่งโครงการนี้เป็นโครงการวิจัยเบื้องต้นก่อนจะนำไปศึกษาความเป็นพิษในคนปกติ และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าไผ่น้ำ ในผู้ป่วยโรคไตวายต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสกัดสารสำคัญอย่างหยาบด้วยน้ำ (Water crude extract) จากหญ้าไผ่น้ำ
2. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและสารออกฤทธิ์สำคัญในสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) จากหญ้าไผ่น้ำ
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษ (Toxicity) ของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ ทั้งในหลอดทดลอง (*In vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*In vivo*)
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ ต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรัง ในสัตว์ทดลอง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ปีที่ 1

1. ทำการสกัดสารสำคัญอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำด้วยน้ำ
2. ทำการตรวจสอบพหุพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ
3. ทำการแยกองค์ประกอบทางเคมีและกำหนดมาตรฐาน (Standardization) ของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ
4. ทำการทดสอบหาความเป็นพิษของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ ในหลอดทดลอง

ปีที่ 2

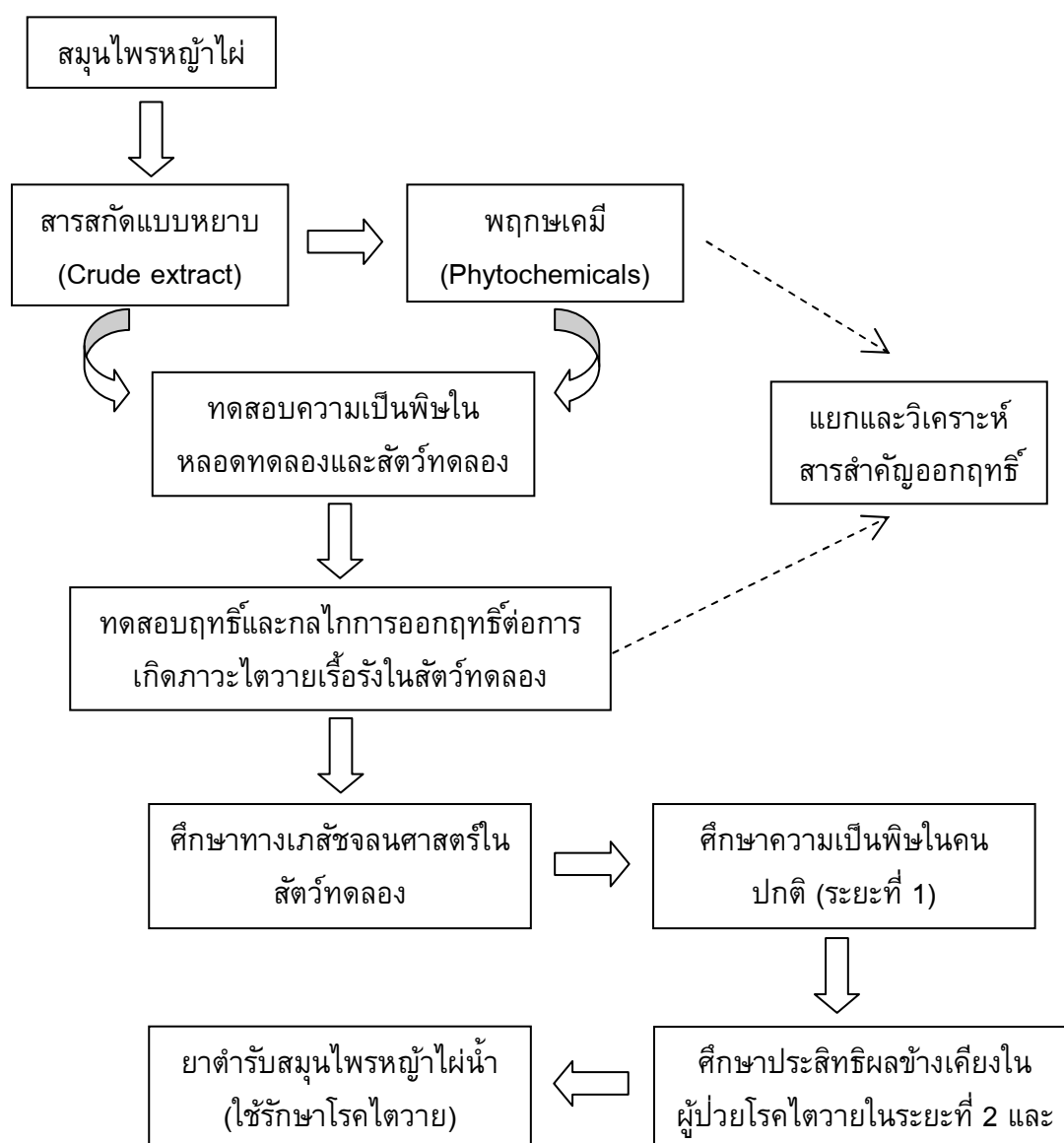
5. ทำการทดสอบหาความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) และกึ่งเฉียบพลัน (Sub-acute toxicity) ของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ ในสัตว์ทดลอง
6. ทำการกระตุ้นการเกิดภาวะไตวายเรื้อรังในสัตว์ทดลอง
7. ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ ในสัตว์ทดลองที่เกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรัง

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในปัจจุบันผู้ป่วยโรคไตวายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี และมีผู้ป่วยจำนวนมากที่ต้องอาศัยเครื่องล้างไตในการรักษา เนื่องจากค่ารักษาที่มีราคาสูง ทำให้ผู้ป่วยบางรายไม่มีทุนทรัพย์ในการรักษาและอาจเสียชีวิตไปในที่สุด การพัฒนารักษาโรคไตวายโดยเฉพาะจากพืชสมุนไพรนั้น จึงเป็นแนวทางเลือกใหม่ที่สำคัญที่ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษา จากภูมิปัญญาชาวบ้านที่นำสมุนไพรหญ้าไผ่น้ำมาช่วย

รักษาอาการของโรคไตเบื้องต้น หญ้าใต้น้ำจึงเป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจและสามารถนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคไตวายได้ในอนาคต การศึกษาความเป็นพิษ, กลไกการออกฤทธิ์ในด้านต่างๆ ของสารสกัดหญ้าใต้น้ำต่อการเกิดโรคไตวายทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองจึงเป็นแนวทางเบื้องต้นที่สำคัญในการพัฒนาสมุนไพรหญ้าใต้น้ำให้มีประสิทธิภาพและรักษาโรคไตวายได้จริง ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้จะรวบรวมข้อมูลทั้งหมด แล้วนำไปสู่การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ในสัตว์ทดลอง และการทำวิจัยในคน (Clinical trial) ระยะที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

กรอบแนวความคิดเป็นไปตามแผนผังดังต่อไปนี้ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

บทที่ 2

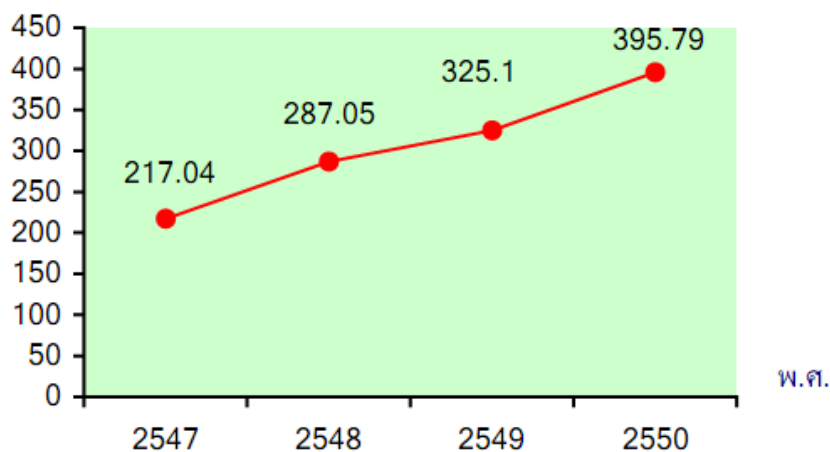
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคไตวาย (Renal failure)

ไตเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญของร่างกายโดยทำหน้าที่กรองของเสียออกจากร่างกาย ควบคุมระดับน้ำและเกลือแร่ รักษาสมดุลของกรดและด่าง ช่วยดูดซึมสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย อีกทั้งยังสามารถสร้างฮอร์โมนที่จำเป็นต่อร่างกาย เมื่อไตเกิดพยาธิสภาพทำให้เกิดผลกระทบต่อระบบอื่นในร่างกาย เกิดเป็นผลเสียจนอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้

โรคไตวาย หรือ Renal failure เป็นภาวะที่ไตถูกทำลายจนทำงานไม่ได้หรือทำงานได้น้อยกว่าปกติ ไตวายเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์สูงมากในประเทศไทย และคาดว่าอัตราการเพิ่มจำนวนผู้ป่วยจะสูงขึ้นในแต่ละปี โดยจากจากข้อมูลผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาล พบว่าคนไทยเป็นโรคไตวายเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่าตัว ตลอดระยะเวลา 4 ปี ตั้งแต่ พ.ศ. 2547-2550 จากจำนวนผู้ป่วยโรคไตวาย 217.04 คนต่อประชากร 100,000 คน ใน พ.ศ. 2547 เป็น 395.79 คนต่อประชากร 100,000 คน (รูปที่ 2) โดยสาเหตุของโรคไตวาย ร้อยละ 70 เกิดจากโรคเบาหวาน ส่วนสาเหตุรองลงมาที่ทำให้เกิดโรคไตวาย คือ โรคความดันโลหิตสูง (สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข, 2552)

อัตรา : ประชากร 100,000 คน



ที่มา : กลุ่มภารกิจด้านข้อมูลข่าวสาร ฯ สำนักนโยบาย
และยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข

รูปที่ 2 แสดงอัตราผู้ป่วยโรคไตวายต่อประชากร 100,000 คน พ.ศ. 2547-2550
(สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข, 2552)

โรคไตวาย (Renal failure) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ไตวายเรื้อรัง (Chronic renal failure) และ ไตวายเฉียบพลัน (Acute renal failure)

1.1 ไตวายเรื้อรัง (Chronic renal failure)

เป็นภาวะที่เนื้อไตถูกทำลายอย่างช้าๆ และถาวร โดยไตจะค่อยๆ ฝ่อ และมีขนาดเล็กกว่าปกติ การสูญเสียการทำงานของไตจะเป็นไปอย่างช้าๆ นานเป็นแรมปี สาเหตุของการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง ส่วนใหญ่เกิดจากภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูง ส่วนปัจจัยอื่นที่สามารถทำให้เกิดโรคได้ คือ กรวยไตอักเสบเรื้อรัง หลอดเลือดที่ไปเลี้ยงไตตีบตัน โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (SLE) โรคตับแข็ง ภาวะหัวใจวาย นิ่วในไต โรคไตอักเสบเรื้อรังจากการติดเชื้อ โรคไตฟอสเฟต และผลข้างเคียงจากการใช้ยาบางชนิด เป็นต้น อาการของโรคไตวายเรื้อรังขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรค ซึ่งในระยะเริ่มต้นของโรคผู้ป่วยจะไม่มีอาการ แต่สามารถตรวจพบระดับ Creatinine ในเลือดสูงเกินปกติเล็กน้อย ผู้ป่วยจะมีอาการชัดเจนขึ้นเมื่อไตเริ่มเสื่อมมากขึ้น ผู้ป่วยจะมีอาการบวมตามร่างกาย ปัสสาวะกลางคืนบ่อย เหนื่อยง่าย คลื่นไส้ อาเจียน เมื่อระดับการทำงานของไตลดลงเหลือ 5-10 เปอร์เซ็นต์ ผู้ป่วยจะมีกลุ่มอาการที่เรียกว่า ยูรีเมีย (Uremic symptom) ซึ่งเป็นกลุ่มอาการที่เกิดจากของเสียในร่างกายคั่งค้าง ทำให้มีกลิ่นของยูเรียออกมาที่ลมหายใจ มีอาการซีด เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย นอนไม่หลับ ซาตามปลายมือ ปลายเท้า คันตามผิวหนัง และสมรรถภาพในการทำงานด้อยลง สำหรับภาวะโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย จะเกิดขึ้นเมื่อระดับการทำงานของไตเสื่อมลงจนลดลงเหลือต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ของภาวะปกติ ถ้าผู้ป่วยในระยะนี้ไม่ได้รับการบำบัดทดแทนไต เช่น การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม ผู้ป่วยมักจะมีชีวิตได้อีกไม่นาน

การรักษาโรคไตวายเรื้อรังในปัจจุบัน คือ การรักษาโรคที่เป็นสาเหตุของโรคไตวาย โดยมุ่งเน้นการชะลอการเสื่อมของไตให้ช้าลง และให้รักษาตามอาการที่เกิดขึ้นพร้อมทั้งรักษาภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้น (พญ.มาลินี, 2548)

1.2 ไตวายเฉียบพลัน (Acute renal failure)

เป็นภาวะที่การทำงานของไตเสื่อมลงอย่างรวดเร็ว ทำให้มีของเสียที่เกิดจากเมตาบอลิซึม (Metabolism) คั่งค้างอยู่ในร่างกาย ทำให้สมดุลของเกลือแร่ กรด ด่าง และการควบคุมน้ำในร่างกายผิดปกติ ภาวะไตวายเฉียบพลันมีความรุนแรงตั้งแต่น้อยไปหามาก ซึ่งสามารถฟื้นคืนกลับมาเป็นปกติได้ หากได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที อย่างไรก็ตามโรคไตวายเฉียบพลันนี้มักพบร่วมกับความเจ็บป่วยอื่นๆ อาจทำให้ภาวะแทรกซ้อนขึ้นได้ ดังนั้นอัตราการเสียชีวิตจึงค่อนข้างสูง (พญ.มาลินี, 2548) ในรอบ 20 ปีมานี้ อุบัติการณ์การเกิดโรคไตวายเฉียบพลันนั้นเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก และพบว่าผู้ป่วยที่พักรักษาตัวในโรงพยาบาลมีโอกาสเสียชีวิตมากกว่า 50% โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ต้องการการฟอกไต (Nash *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010)

สาเหตุของการเกิดโรคไตวายเฉียบพลัน แบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่

- (1) Prerenal failure เป็นภาวะที่มีเลือดไปเลี้ยงไตลดลง โดยที่การทำงานของท่อไต (Tubule) และโกลเมอรูลัส (Glomerulus) เป็นปกติ ผู้ป่วยจะมีการทำงานของไต หรือ

Glomerular filtration rate (GFR) ลดลง ท่อไตจะดูดกลับโซเดียม ยูเรียและน้ำเข้าสู่ร่างกาย ภาวะนี้เป็นภาวะที่สามารถหายเป็นปกติได้ หากได้รับการแก้ไขอย่างรวดเร็ว ทำให้ GFR เพิ่มขึ้นเป็นปกติ (น.อ.นพ.อนุตตร และ น.อ.นพ.กลศร, 2538)

- (2) Postrenal failure เป็นภาวะที่การทำงานของไตผิดปกติเพราะมีการอุดตันของทางเดินปัสสาวะทั้งสองข้าง หรือ อุดตันเพียงข้างเดียวในกรณีที่มีไตทำงานเพียงข้างเดียว ภาวะนี้พบได้ประมาณ 2-10 เปอร์เซ็นต์ ของผู้ป่วยไตวายเฉียบพลัน โดยสาเหตุเกิดจากก้อนนิ่วในไต มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปากมดลูก นอกจากนี้การอุดตันยังสามารถเกิดจากการตกตะกอนของสารบางชนิด เช่น Uric acid, Oxalic acid, Methotrexate เป็นต้น (น.อ.นพ.อนุตตร และ น.อ.นพ.กลศร, 2538)
- (3) Intrinsic renal failure เป็นภาวะที่เกิดความผิดปกติของไต โดยสามารถแบ่งสาเหตุได้ตามพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในไต คือ ท่อไต หลอดเลือด interstitium และโกลเมอรูลัส ภาวะที่เกิดขึ้นได้บ่อยที่สุดของกลุ่มนี้ คือ Acute tubular necrosis (ATN) ซึ่งเกิดจากเกิดภาวะ Prerenal failure เป็นเวลานานโดยไม่ได้รับการรักษา ทำให้ท่อไตเสื่อมและตายได้ นอกจากนี้อาจเกิดจาก Nephrotoxin เช่น กลุ่มยา Aminoglycoside, radiocontrast agent เป็นต้น เกิดจากภาวะ pigmenturia เช่น rhabdomyolysis เป็นต้น และเกิดจากภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือด (Schrier and Wang, 2004; น.อ.นพ.อนุตตร และ น.อ.นพ.กลศร, 2538) ส่วนกรณีเกิดไตวายเฉียบพลันจาก Acute interstitial nephritis มักมีสาเหตุจากยา เช่น ยาปฏิชีวนะ NSAIDs เป็นต้น นอกจากนี้ อาจเกิดจากอาการแพ้ยา หรือเกิดจากโรคออโตอิมมูน

การดูแลรักษาผู้ป่วยโรคไตวายเฉียบพลันมักทำการรักษาตามอาการของโรคที่เป็นสาเหตุ หากรักษาได้ทันท่วงทีการทำงานของไตมักจะกลับมาสู่สภาวะปกติภายใน 4-6 สัปดาห์ การป้องกันไม่ให้เกิดโรคไตวายเฉียบพลันเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยลดอัตราการตายลงได้

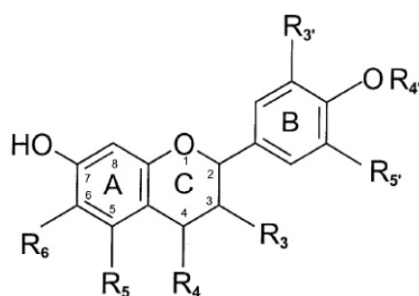
2. สมุนไพรรักน้ำ (Tradescantia fluminensis)

หญ้าน้ำ (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Tradescantia fluminensis*) มีชื่อสามัญว่า River spiderwort หรือ small-leaf spiderwort โดยเป็นพืชในตระกูล Commelinaceae ซึ่งมีถิ่นกำเนิดจากแถบประเทศอเมริกาใต้ (Del Pero Martinez and Martinez, 1993) หญ้าน้ำเป็นไม้ล้มลุกจำพวกกิ่งเลื้อย มีลำต้นเป็นข้อปล้อง กลมอวบ น้ำ มีรากออกตามข้อต่างๆ และใบเป็นรูปรี ปลายแหลม สีเขียว (รูปที่ 3) พืชชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วประเทศไทยและพบได้ตลอดทั้งปี คนไทยนิยมนำมาใช้ในการรักษา แก้อ่อนใน ลดการอักเสบของทางเดินปัสสาวะ บำบัดอาการต่อมลูกหมากโต บรรเทาอาการบวม ขับปัสสาวะ รวมทั้งผู้ที่เริ่มมีอาการของโรคไต



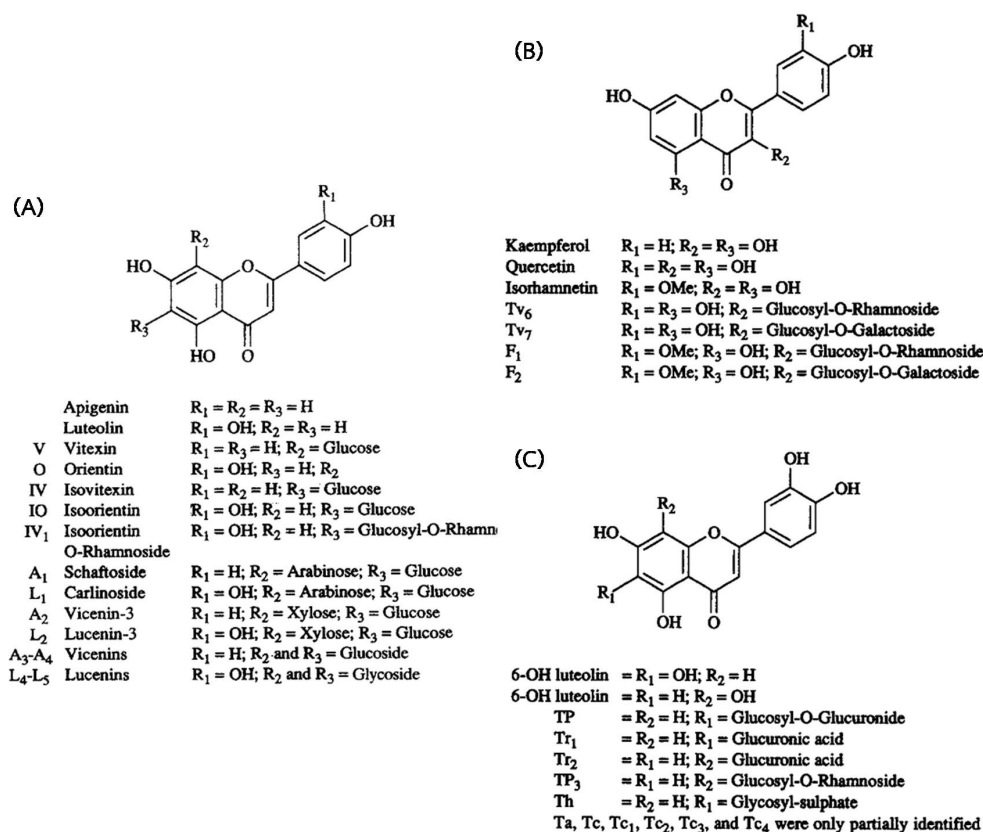
รูปที่ 3 หญ้าไผ่น้ำ (*Tradescantia fluminensis*), (Langeland *et al.*, 2008).

พืชในสกุล *Tradescantia* จะประกอบไปด้วย 60 สปีชีส์ (Species) ซึ่งจะกระจายตัวเฉพาะในทวีปอเมริกา สารสำคัญของพืชในสกุล *Tradescantia* ที่เคยมีการศึกษาก่อนหน้านี้อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบเคมีกลุ่มใหญ่ที่ได้มาจากพืช จัดได้ว่าเป็นสาร nutraceutical ซึ่งหมายถึงอาหารหรือองค์ประกอบของอาหารที่สามารถนำมาใช้เป็นยาหรือมีประโยชน์ต่อสุขภาพทั้งในด้านการป้องกันและรักษาโรค โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์จะเป็นอนุกรมของคาร์บอน โดยมีโครงสร้างของวงแหวนไพแรน (Pyrane ring) เชื่อมต่อกับวงแหวนเบนซีน (Benzene ring) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ฟีนิลเบนโซไพแรน (2-phenylbenzopyran nucleus) ดังรูปที่ 4 โดยฟลาโวนอยด์ทำหน้าที่กำจัดหรือทำลายอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (oxygen-derived free radicals) ในการทดลองในหลอดทดลองพบว่าฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Antiinflammatory) ต้านภูมิแพ้ (Antiallergic) ต้านไวรัส (Antiviral) และต้านการเกิดมะเร็ง (Anticarcinogenic) (Middleton, 1998)



รูปที่ 4 โครงสร้างและรูปแบบทั่วไปของฟลาโวนอยด์ (Flavanoids), (Beecher, 2003).

สารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ที่พบมากในพืชสกุล *Tradescantia* ได้แก่ เอพิจินิน ซี-ไกลโคไซด์ (C-glycosides of apigenin) และ ลูทีโอลิน ซี-ไกลโคไซด์ (C-glycosides of Luteolin) โดยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ (Glycosides of flavonols) เช่น 6-ไฮดรอกซีลูทีโอลิน (6-hydroxyluteolin) และ ทริซิน (tricin) ก็สามารถพบได้เช่นกัน แต่พบได้ไม่บ่อยนัก โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ที่พบในพืชสกุล *Tradescantia* แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) ที่พบในพืชสกุล *Tradescantia* โดย (A) คือ โครงสร้างของ ซี-ไกลโคไซด์ (C-glycosides), (B) คือ โครงสร้างของ ฟลาโวนอยด์ ไกลโคไซด์ (Glycosides of flavonols) และ (C) คือ 6 และ 8-ไฮดรอกซีลูทีโอลิน ไกลโคไซด์ (6-and 8-hydroxyluteolin glycosides) (Del Pero Martinez and Martinez, 1993)

การกระจายตัวของสารเหล่านี้ในแต่ละสปีชีส์ (Species) ของ *Tradescantia* ขึ้นอยู่กับการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ของ *Tradescantia* สปีชีส์ *T. virginiana* พบได้ที่ทวีปอเมริกาเหนือ สปีชีส์นี้มีความแตกต่างจากสปีชีส์อื่นโดยจะมี sulphated phenolic acids ส่วน *T. crassifolia* จากประเทศเม็กซิโก และ *T. ambigua* จากทวีปอเมริกาใต้ สามารถแยกออกจากสปีชีส์อื่นได้ด้วยการพบสาร 6-ไฮดรอกซีลูทีโอลิน สปีชีส์ *T. fluminensis* ซึ่งพบเฉพาะในทวีปอเมริกาใต้นั้นจะพบ ซี-ไกลโคไซด์ เป็นลักษณะเฉพาะ (Del Pero Martinez and Martinez, 1993)

จากการทดลองในเซลล์ตับของหนูพบว่าสารประกอบ เอพิจินิน ซี-ไกลโคไซด์ และ ลูทีโอลิน ซี-ไกลโคไซด์ มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Huang *et al.*, 2012) นอกจากนี้ลูทีโอลินยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็งอีกด้วย (Lee *et al.*, 2012)

3. การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สัตว์หลากหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ ทั้งทางด้านวิทยาศาสตร์ และทางการแพทย์ สัตว์ทดลองใช้เป็นโมเดลในการศึกษาสาเหตุ กลไกการเกิดโรค ความก้าวหน้าของโรค และวิธีการรักษาโรคที่เกิดขึ้นกับมนุษย์ เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาคุณภาพชีวิตของมนุษย์ การทดสอบความเป็นพิษ (Toxicity) ในสัตว์ทดลองนั้นดำเนินการเพื่อระบุผลกระทบที่เป็นไปได้จากการสัมผัสสารต่าง ๆ เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์ ความเข้าใจช่วงเวลา, ความถี่, ความรุนแรง, เส้นทางของการสัมผัสและการสลายของสาร จะช่วยเป็นแนวทางในการกำหนดสูตรยา การศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลองมักทำในหนู กระต่ายและสุนัข แต่โดยส่วนใหญ่นิยมทำในหนู โดยในการทดสอบความเป็นพิษต้องทดสอบอย่างน้อยสามความเข้มข้น และจะต้องมีกลุ่มควบคุมด้วย (National Academy Press, 2006) ในการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง แบ่งออกเป็น 3 แบบ ได้แก่ การศึกษาพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity), พิษกึ่งเฉียบพลัน (Subacute toxicity) และพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity)

3.1 การศึกษาพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity)

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันจะประเมินผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์จากการสัมผัสสารในระยะสั้น โดยอาจจะให้สารเพียงครั้งเดียวหรือให้หลายครั้งภายในหรืออย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่การให้สารเพียงครั้งเดียวเป็นวิธีที่พบมากที่สุดในการศึกษาพิษเฉียบพลัน โดยจะสังเกตอาการของสัตว์ทดลองเป็นระยะเวลาตลอด 2 สัปดาห์ ระหว่างดำเนินการทดลองจะต้องสังเกตพฤติกรรม การเจริญเติบโต และการเสียชีวิตของสัตว์ทดลอง ในการรายงานผลจะรายงานเป็นค่า Lethal Concentration (LC_{50}) ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิต ร้อยละ 50 การทดสอบจะเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง และลดความเข้มข้นลง (EPA, 1998b; OECD, 2001) โดยถ้ามีค่า LC_{50} มากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง จะไม่มีการทดสอบความเป็นพิษต่อ เพื่อคำนึงถึงสวัสดิภาพและจริยธรรมในการใช้สัตว์ทดลอง

สารพิษหรือยา สามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทาง ได้แก่ ทางปาก ทางผิวหนัง และทางการสูดดม ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการทดสอบพิษเฉียบพลันสำหรับการสูดดม สัมผัสทางผิวหนัง และทางปาก สำหรับการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลองโดยการให้สารทางปากนั้น ตามคำแนะนำของ Guideline for testing of chemicals, 2001 (OECD, 2001) ระดับความเข้มข้นของสารเริ่มต้นจะถูกเลือกจากหนึ่งในสี่ระดับ คือ 5, 50, 300 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง โดยระดับความเข้มข้นเริ่มต้นควรมีแนวโน้มมากที่สุดที่จะทำให้มีอัตราการตายของสัตว์ทดลองมาก

ที่สุด อย่างไรก็ตามถ้าเริ่มต้นที่ระดับความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวสัตว์ทดลอง โดยการทดสอบนั้นต้องมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการปกป้องสุขภาพของมนุษย์หรือสัตว์หรือสิ่งแวดล้อม

นอกจากนี้ทาง Environmental Protection Agency (EPA) ได้มีการจำแนกระบบการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน ดังตารางที่ 1 ซึ่งอาศัยค่า LC₅₀ เป็นหลัก โดยทาง OECD ก็ได้มีการจัดระบบที่คล้ายคลึงกัน

ตารางที่ 1 แสดงการจำแนกความเป็นพิษเฉียบพลัน, (EPA, 1998a).

Study	Category I	Category II	Category III	Category IV
Oral LD ₅₀	≤50 mg/kg	>50-500 mg/kg	>500-5,000 mg/kg	>5,000 mg/kg
Dermal LD ₅₀	≤200 mg/kg	>200-2,000 mg/kg	>2,000-5,000 mg/kg	>5,000 mg/kg
Inhalation (4-h) LC ₅₀	≤0.05 mg/L	>0.05-0.5 mg/L	>0.5-2 mg/L	>2 mg/L

3.2 การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน (Subacute toxicity)

การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันจะประเมินผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์จากการสัมผัสสารอย่างต่อเนื่องหรือซ้ำๆ กัน โดยการศึกษาแบบกึ่งเฉียบพลันนั้นได้ออกแบบมาเพื่อประเมินความเป็นพิษของอวัยวะเป้าหมายและความเป็นพิษหลังจากได้รับสารที่สะสมมาเป็นเวลา 2 ถึง 4 สัปดาห์ และใช้ประเมินค่า NOAEL (no-observed-adverse-effect level) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารเคมีที่มากที่สุดที่ได้รับทุกวันแล้วไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย แต่การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันไม่ได้ ออกแบบมาประเมินผลกระทบที่มีระยะเวลายาว เช่น การเกิดมะเร็ง แต่สามารถนำมาเป็นข้อมูลในการตั้งค่าความเป็นพิษเรื้อรังและสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้โดยทั่วไประดับความเข้มข้นของสารที่ได้จากการทดสอบนี้จะถูกนำไปใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารและการตอบสนองต่อสารนั้นๆ (Dose-response relationship) อย่างไรก็ตามในการทดสอบนี้มีข้อจำกัด เนื่องจากมีกลุ่มตัวอย่างมีขนาดเล็กซึ่งทำให้ความไวในการตรวจสอบผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์ลดลง

3.3 การศึกษาพิษเรื้อรัง (Chronic toxicity)

การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังจะประเมินผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์จากการสัมผัสสารอย่างต่อเนื่องหรือซ้ำๆ กัน อย่างน้อย 2 สัปดาห์ ถึง 12 เดือน โดยการศึกษานี้จะประเมินผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการได้รับสารที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าในการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน เป็นระยะเวลานาน โดยทั่วไประยะเวลาที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษจะเริ่มตั้งแต่ 1, 3, 6 และ 12 เดือนตามลำดับ และการทดสอบมักทำในหนูและสุนัข เนื่องจากมีฐานข้อมูลขนาดใหญ่ และสายพันธุ์เหล่านี้ก็

ง่ายต่อการควบคุม และหาซื้อได้ง่าย ในการเลือกระดับความเข้มข้นนั้น ต้องเลือกที่ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษเพียงเล็กน้อย และความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้กันนั้นต้องไม่ก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ใดๆต่อสัตว์ทดลอง เพื่อที่จะนำมาใช้ในการประเมินค่า NOAEL

วิธีมาตรฐานในการทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังจะศึกษาในสัตว์ทดลองทั้งสองเพศ เท่าๆกัน และได้รับระดับความเข้มข้นของสารอย่างน้อย 3 ระดับ และต้องมีกลุ่มควบคุมควบคู่ไปด้วย ระหว่างดำเนินการทดลองจะต้องสังเกตอาการผิดปกติต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นทุกวัน เช่น การบันทึกน้ำหนักตัว น้ำหนักอาหาร และการทางคลินิก เป็นต้น หลังจบการทดลองสัตว์ทดลองทุกตัวต้องมีการผ่าชันสูตร เก็บอวัยวะภายในที่สำคัญ เช่น อวัยวะในระบบย่อยอาหาร ระบบประสาท ระบบต่อม ระบบหายใจ ระบบหัวใจ, หลอดเลือดและเม็ดเลือด และระบบอวัยวะเพศและทางเดินปัสสาวะ เป็น และควรเก็บรักษาไว้สำหรับการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยา (National Academy Press, 2006; Shallie *et al*, 2012)

4. การทดสอบความเป็นพิษในหลอดทดลอง

เนื่องจากการวิจัยในสัตว์ทดลองค่อนข้างมีค่าใช้จ่ายสูง ประกอบกับมีความกังวลเกี่ยวกับสวัสดิภาพสัตว์ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาระบบการศึกษาในหลอดทดลอง (*In vitro* biological system) ขึ้นมาใช้แทนการใช้สัตว์ทดลอง เพื่อลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองและลดค่าใช้จ่าย

โดยทั่วไปการทดสอบความเป็นพิษในหลอดทดลองถูกนำมาใช้สำหรับสองวัตถุประสงค์ด้วยกัน คือ เพื่อทราบกลไกของสารเคมีที่กระตุ้นการเกิดพิษในสัตว์และมนุษย์ และเพื่อเป็นระบบการคัดกรองอย่างรวดเร็วสำหรับการประเมินการเกิดพิษของสารเคมีนั้นๆ รูปแบบสำหรับการประเมินความเป็นพิษในหลอดทดลองนั้นมีมากมาย เช่น Perfused organ preparations, Isolated tissue preparations, Single-cell suspension และ Cell-culture systems (Primary cell cultures and Mammalian cell lines) การใช้ Cell-culture systems หรือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นระบบที่นิยมใช้ในการทดลอง เนื่องจากเป็นระบบที่มีความน่าเชื่อถือ ทำซ้ำได้และไม่แพง การทดสอบความเป็นพิษในหลอดทดลองจะเป็นการประเมินความเป็นพิษในระดับเซลล์ ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของเซลล์หรือวัดอัตราการตายของเซลล์ การวัดการทำงานของเซลล์ (Functional assay) เป็นการวัดอันตรายที่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงไปแต่ไม่ทำให้เซลล์ตาย (Reversible cell injury or toxicity) ส่วนการวัดการตายของเซลล์ (Cell-death assay) เป็นการวัดการล้มเหลวในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งบ่งบอกถึงอันตรายที่ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงไปจนกระทั่งเซลล์ตาย ไม่สามารถเปลี่ยนกลับสู่สภาพเดิมได้ (Irreversible cell injury or toxicity) หรือการสูญเสียการมีชีวิตของเซลล์ (Loss of cell viability) (National Academy Press, 2006)

วิธีการการวัดความเป็นพิษที่เกิดขึ้นในเซลล์สามารถทำได้หลายวิธี ยกตัวอย่าง เช่น

- **MTT colorimetric assay** เป็นการวิเคราะห์ Cell viability โดยในเซลล์ที่มีชีวิตจะใช้เอ็นไซม์ succinate dehydrogenase ใน mitochondria มาทำปฏิกิริยากับสาร MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ที่มีสีเหลือง เปลี่ยนเป็น Formazan ซึ่งมีสีม่วง โดยหลักการนี้สามารถวัดปริมาณ Formazan ได้ด้วยการวัดการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร หลังจากเติม Dimethyl Sulphoxide (DMSO)

- **Lactate Dehydrogenase (LDH) leakage assay** เป็นการวิเคราะห์ปริมาณของ เอ็นไซม์ Lactate dehydrogenase ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง จนกระทั่งเซลล์ตาย ไม่สามารถเปลี่ยนกลับสู่สภาพเดิมได้ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหาย โดยเอ็นไซม์ LDH นี้จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน L-lactate และ NAD^+ ไปเป็น pyruvate และ NADH ต่อมาเอ็นไซม์ diaphorase ใช้ NADH และ H^+ เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน tetrazolium salt (INT) เป็น Formazan ซึ่งมีสีม่วง
- **The Trypan Blue assay** เป็นการวิเคราะห์ Cell viability เช่นเดียวกัน Trypan Blue เป็นสีย้อมที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเซลล์ที่ตายแล้ว เซลล์ที่มีชีวิตอยู่หรือเซลล์ที่เนื้อหุ้มเซลล์ไม่ได้รับความเสียหายจะย้อมไม่ติดสี การตรวจดูความมีชีวิตของเซลล์จึงทำได้ด้วยการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. การสกัดสมุนไพรหญ้าไผ่น้ำ

1.1 การเตรียมสมุนไพร

นำหญ้าไผ่น้ำ (*Tradescantia fluminensis*) ไปล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อน แล้วนำไปหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนนำมาอบแห้งในที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบดไฟฟ้า

1.2 การสกัดสมุนไพรด้วยน้ำ (Water extraction)

การสกัดสมุนไพรหญ้าไผ่น้ำ จะทำการสกัดด้วยน้ำ โดยนำผงของหญ้าไผ่น้ำปริมาณ 100 กรัม มาต้มในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกส่วนที่เป็นกากกับของเหลว ส่วนกากที่เหลืออาจนำไปกรองอีก 2 ครั้ง เพื่อให้ได้ปริมาณสารเยื่อที่สุก จากนั้นนำส่วนที่เป็นของเหลวไปทำให้เย็นจนแข็งตัว และระเหิดเอาน้ำแข็งออกไป จะได้สารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) โดยนำไปเก็บรักษาไว้ที่ตู้ดูดความชื้น จนกว่าจะนำมาทำการวิเคราะห์

2. การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical screening) ของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ

ทำการตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ 15 กลุ่ม ได้แก่ ฟีนอล (Phenols), ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids), แอนโทไซยานิน (Anthocyanins), ไตรเทอร์พีน/สเตียรอยด์ (Triterpenes/steroids), อัลคาลอยด์ (Alkaloids), แอนทราควิโนน (Anthraquinones), คูมาริน (Coumarin), ซาโปนิน (Saponins), ควิโนน (Quinone), แทนนิน (Tannins), น้ำตาล (Sugar), โปรตีน และกรดอะมิโน (Proteins and Amino acid), ไกลโคไซด์ (Glycosides), ไขมันและน้ำมันหอมระเหย (Fat and essential oil), และฟลอโรกลูซินอล (Phloroglucinol)

2.1 การตรวจสอบฟีนอล (Phenols)

ใช้วิธี Ferric chloride test ในการตรวจสอบฟีนอลในสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารสกัดด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วย 5 % ferric chloride จากนั้นทำการสังเกตการเกิดสีน้ำเงินเข้มหรือสีดำ

2.2 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายในเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำสารสกัดมากรองด้วยกระดาษกรองและนำมาตรวจสอบฟลาโวนอยด์ดังวิธีต่อไปนี้

- วิธี Ammonium test: นำสารสกัด 4 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายแอมโมเนีย (1%) 1 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าจนเกิดการแยกชั้น สังเกตการเกิดสีเหลืองในชั้นของแอมโมเนีย แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์
- วิธี Aluminum chloride test: นำสารสกัด 4 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลาย Aluminum chloride (1%) 1 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่า สังเกตการเกิดสารละลายสีเหลืองอ่อน แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

2.3 การตรวจสอบแอนโทไซยานิน (Anthocyanins)

- ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารสกัดด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% สังเกตการเกิดสีน้ำเงิน แสดงว่าพบแอนโทไซยานิน
- ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายสารสกัดด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น สังเกตการเกิดสีเหลือง/ส้ม แสดงว่าพบแอนโทไซยานิน

2.4 การตรวจสอบไตรเทอร์พีน/สเตียรอยด์ (Triterpenes/steroids)

- วิธี Salkowski's test: ชั่งสารสกัด 1 กรัม สกัดในคลอโรฟอร์ม แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น แล้วทำการเขย่าจนเกิดการแยกชั้น หากเกิดสีน้ำตาลแดงระหว่างรอยต่อของสารละลาย แสดงว่าพบเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids)
- วิธี Libermann Burchard's test: ชั่งสารสกัด 1 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม เติมกรดอะซิติก 3 มิลลิลิตร และสารละลายอะซิติก แอนไฮไดรต์ 3 มิลลิลิตร. ทำให้สารละลายอุ่นและเย็น โดยการให้น้ำประปาไหลผ่านเบาๆ จากนั้นเอียงหลอดทดลองแล้วค่อยๆ หยดกรดซัลฟิวริกเข้มข้น หากเกิดสีน้ำตาลแดงอมม่วงระหว่างรอยต่อของสารละลาย และเกิดสีน้ำเงินอมเขียวในชั้นกรดอะซิติก แสดงว่าพบสเตอรอลชนิดไม่อิ่มตัวและ/หรือไตรเทอร์พีน

2.5 การตรวจสอบอัลคาลอยด์ (Alkaloids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม แล้วต้มใน 2% กรดไฮโดรคลอริก 5 มิลลิลิตร บนเครื่องกำเนิดไอน้ำ (Steam bath) นำสารละลายมากรองผ่านกระดาษกรอง แบ่งสารละลายเป็น 3 หลอดทดลอง หลอดทดลองละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบน้ำยาต่างๆ ดังนี้

- หลอดทดลองที่ 1 Mayer's test: เติมน้ำยา Mayer's reagent (สารละลายโปแตสเซียมเมอร์คิวริกไอโอไดน์) สังเกตการเกิดตะกอนสีเหลือง แสดงว่าพบอัลคาลอยด์
- หลอดทดลองที่ 2 Wagner's test: เติมน้ำยา Wagner's reagent (ไอโอไดน์ในสารละลายโปแตสเซียมไอโอไดด์) สังเกตการเกิดตะกอนสีน้ำตาล/แดง แสดงว่าพบอัลคาลอยด์
- หลอดทดลองที่ 3 Dragendorff's test: เติมน้ำยา Dragendorff's reagent (สารละลายโปแตสเซียมบิสมัทไอโอไดด์) สังเกตการเกิดตะกอนสีแดง แสดงว่าพบอัลคาลอยด์

2.6 การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthraquinones)

ใช้วิธี Borntranger's test ในการตรวจสอบแอนทราควิโนนในสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ โดยชั่งสารสกัด 0.5 กรัม ผสมในสารละลายเบนซีน 10 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นเติม 10% แอมโมเนีย สังเกตการเกิดสีชมพูแดง แสดงว่าพบแอนทราควิโนน

2.7 การตรวจสอบคูมาริน (Coumarin)

ชั่งสารสกัด 1 กรัม วางบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง แล้วนำมาให้ความร้อน โดยอังกระดาษกรองบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ จากนั้นนำกระดาษกรองมาส่องใต้ส่องไฟแสง UV สังเกตการเกิดสีเหลืองเรืองแสง แสดงว่าพบคูมาริน

2.8 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

- วิธี Froth Test: ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายอย่างแรงเป็นเวลา 15 นาที สังเกตการเกิดฟองหนาประมาณ 1 เซนติเมตร แสดงว่าพบซาโปนิน
- วิธี Foam Test: ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายอย่างแรง สังเกตการเกิดฟองเป็นเวลานาน 10 นาที แสดงว่าพบซาโปนิน

2.9 การตรวจสอบควิโนน (Quinone)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมกับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 มิลลิลิตร สังเกตการเกิดสีแดง แสดงว่าพบควิโนน

2.10 การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ต้มใน 45% เอทานอล เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง จากนั้นนำสารละลายที่ผ่านการกรองมาทดสอบแทนนิน ดังวิธีต่อไปนี้

- วิธี Ferric chloride test: นำสารละลายที่ผ่านการกรองมาทำให้เจือจาง แล้วเติมเฟอร์ริกคลอไรด์ 2 หยด สังเกตการเกิดสีเขียวถึงดำ แสดงว่าพบแทนนิน
- วิธี Gelatin test: เติมหาสารละลายเจลาติน 1% ในโซเดียมคลอไรด์ สังเกตการเกิดตะกอนสีขาว แสดงว่าพบแทนนิน

2.11 การตรวจสอบน้ำตาล (Sugar)

ใช้วิธี Fehling's test ในการตรวจสอบน้ำตาล โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยา Fehling's solution A และ B ในขณะที่กำลังให้ความร้อน สังเกตการเกิดตะกอนสีแดงอิฐ แสดงว่าพบน้ำตาล

2.12 การตรวจสอบโปรตีนและกรดอะมิโน (Proteins and Amino acid)

ซังสารสกัด 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารสกัดมา 2 มิลลิลิตร แล้วเติม 1% คอปเปอร์ซัลเฟต (Hydrated copper sulphate) จำนวน 5 หยด เติม 40% โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน สังเกตการเกิดสีม่วง แสดงว่าพบโปรตีน

2.13 การตรวจสอบไกลโคไซด์ (Glycosides)

- วิธี Fehling's Test: ซังสารสกัด 0.1 กรัม ละลายในกรดซัลฟิวริกเจือจาง 5 มิลลิลิตร แล้วนำมาต้ม เป็นเวลา 15 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เมื่อสารละลายเย็นแล้ว เติม 20% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นเติมน้ำยา of Fehling's solution A และ B อย่างละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มอีก 5 นาที สังเกตการเกิดตะกอนสีแดงเข้ม แสดงว่าพบไกลโคไซด์
- วิธี Keller-killiani test: เติมกรดแกดเดิลแอซิด 1 มิลลิลิตร สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 5% จำนวน 5 หยด และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น สังเกตการเกิดวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นสารละลายแล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำเงิน แสดงว่าพบน้ำตาลดีออกซี

2.14 การตรวจสอบไขมันและน้ำมันหอมระเหย (Fat and essential oil)

- วิธี Spot test: นำผงสารสกัดมาบีบและถูกับกระดาษกรอง สังเกตการเกิดผลิตภัณฑ์หล่อลื่นที่มีลักษณะกึ่งของแข็งและกึ่งของเหลว (จาระบี) แสดงว่าพบ fixed oil
- วิธี Sudan test: เติมน้ำยา Sudan III solution 2-3 หยด ในสารสกัด 1 มิลลิลิตร สังเกตการเกิดสีส้มสว่าง แสดงว่าพบ fixed oil และไขมัน

2.15 การตรวจสอบฟลอโรกลูซินอล (Phloroglucinol)

ใช้วิธี Vanillin-hydrochloric acid test ในการตรวจสอบฟลอโรกลูซินอล โดยเติมน้ำยา Vanillin-hydrochloric acid reagent (วานิลลิน 1 กรัม แอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร กรดไฮโดรคลอริก 10 มิลลิลิตร) สังเกตการเกิดสีชมพูแดง แสดงว่าพบฟลอโรกลูซินอล

3. การแยกองค์ประกอบทางเคมีและการกำหนดมาตรฐาน (Standardization) ของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ

3.1 การแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

- การเตรียมแผ่นไมโครสไลด์: โครมาโทกราฟีแบบผิวบาง (Microslide TLC) โดยการเตรียมแผ่นไมโครสไลด์ที่สะอาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เย็นแล้วเช็ดด้วยอะซิโตน ผสมซิลิกาเจล จีเอฟ 524 (Silica gel 60 GF254) กับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:2 โดยมวล ผสมให้เข้ากันดีจนมีลักษณะเป็น Slurry ใช้ซิลิกาเจลเคลือบบนแผ่นไมโครสไลด์ ทิ้งไว้ให้ซิลิกาเจลแห้งแล้วจึงนำไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม: โดยเตรียมสารละลายของสารตัวอย่างจากตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สามารถละลายสารตัวอย่างได้ดีที่สุด ใช้หลอดแคพพิลลารีแต้มสารลงบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี แล้ววางในแก้วที่มีตัวทำละลายอิ่มตัวยู่ ปล่อยให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปจนสุดพื้นผิวหน้าตัวดูดซับ นำทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ไปตรวจสอบหาตำแหน่งสารโดยส่องด้วยเครื่องส่องรังสีเหลือม่วงเปลี่ยนระบบตัวทำละลายอินทรีย์จนกระทั่งได้ระบบตัวทำละลายที่ให้ผลการแยกที่ดีที่สุด

3.2 การตรวจวัดปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

สารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่หน้าจะถูกนำไปประเมินคุณภาพ เปรียบเทียบกับสารเคมีมาตรฐาน เพื่อกำหนดมาตรฐานและควบคุมคุณภาพของสารสกัดให้คงที่ โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น 1260 series (Agilent Technologies, USA) โดยกระบวนการแยกสารจะเกิดขึ้นระหว่าง 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) และ เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน การทดสอบเริ่มจากเตรียมความพร้อมของเครื่อง HPLC ให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์ จากนั้นฉีดสารมาตรฐาน (Standard solution) ของสารสกัดจากหญ้าไผ่หน้า เช่น สารในกลุ่มกรดฟีนอลิก (Phenolic acid) เข้าเครื่อง HPLC ด้วยระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันเพื่อทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ต่อมาฉีดสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่หน้าเข้าเครื่อง HPLC ผลการทดสอบจะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยเครื่องวัดโมเลกุล (detector) การวิเคราะห์ปริมาณของสารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของหญ้าไผ่หน้าคำนวณจากการเปรียบเทียบ Peak height ของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่หน้าเข้ากับกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ที่สร้างจาก Peak height และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นสารสกัด

4. การทดสอบความเป็นพิษของหญ้าไผ่หน้าในหลอดทดลอง

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ความเป็นพิษของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่หน้าจะทำการทดสอบในเซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293T) และเซลล์ Normal human embryonic fibroblasts (OUMS-36T-6) โดยเซลล์ HEK293 และ OUMS-36T-6 จะเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี 10% Fetal bovine serum และ 1% ยาปฏิชีวนะ (Penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) การเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด จะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศซึ่งมี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂)

4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหญ้าไผ่หน้าจะทดสอบโดยวิธี MTT colorimetric assay การทดสอบจะทำใน 96-well flat-bottomed plates เริ่มจากการเตรียมเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 10,000 เซลล์

ต่อหลุม จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% CO₂ จนกระทั่ง เซลล์เจริญเติบโตจนมีความหนาแน่น 80% จากนั้นเติมสารละลายสารสกัดอย่างหยาบและส่วนสกัดแยก จากหญ้าไผ่ น้ำ โดยในแต่ละหลุมจะมีสารสกัดหญ้าไผ่ น้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ลงไปหลุมละ 10 ไมโครลิตร นำไปอบที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% CO₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทของเหลว ทั้งหมดออก แล้วเติม Dimethyl Sulphoxide (DMSO) ลงไป 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำ Plate ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

5. การทดสอบความเป็นพิษของหญ้าไผ่ น้ำ ในสัตว์ทดลอง

คัดเลือกสายพันธุ์หนูขาว อายุ 6 สัปดาห์ น้ำหนัก 120±20 กรัม ที่มีสุขภาพดี โดยสั่งซื้อจาก สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาลัยมติดล ก่อนเริ่มทำการทดลองต้องพักสัตว์ทดลองเป็นระยะเวลา 3-7 วัน โดยเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 22°C (±3°C) มีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 30% และไม่เกิน 70% มีความสะอาดและเปลี่ยนถ่ายที่พักรอย่างสม่ำเสมอ อาหารเป็นอาหารเม็ดเฉพาะที่ใช้สำหรับการเลี้ยงหนู ควบคุมอาหารและน้ำให้มีความสะอาด โดยน้ำที่ใช้เป็นน้ำที่ผ่านการกรองแล้ว

5.1 การศึกษาพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity)

หนูขาวทุกตัวต้องอดน้ำและอาหารเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ก่อนการทดสอบพิษเฉียบพลัน แล้ว ทดสอบสารสกัดอย่างหยาบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัวหนูขาว และจะลดความเข้มข้นลงตามคำแนะนำของ OECD Guideline for Testing of Chemicals No.423 หนู ขาวจะถูกแบ่งโดยวิธีสุ่มออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว (เพศละ 5 ตัว) ประกอบด้วยกลุ่มควบคุมซึ่ง ได้รับน้ำ 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลองซึ่งได้รับสารสกัดอย่างหยาบ 1 กลุ่ม โดยการให้สารผ่านหลอดป้อนสาร เพียงครั้งเดียว จากนั้นสังเกตอาการเปลี่ยนแปลงชั่วโมงที่ 1 และ 4 จนครบ 24 ชั่วโมง และบันทึก จำนวนหนูตายเป็นระยะเวลา 14 วัน และชั่งน้ำหนักตัวหนูทุกวันที่ 1, 3, 10 และ 14 เพื่อเปรียบเทียบ การเปลี่ยนแปลงระหว่างกลุ่มทดลอง รายงานค่าความเป็นพิษขนาดสูงสุดที่หนูขาวทนได้ (Maximum tolerate dose) หลังจากนั้นผ่าชันสูตรตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในที่สำคัญ เช่น หัวใจ ตับ ไต ปอด และม้าม โดยการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา

5.2 การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน (Subacute toxicity)

สำหรับการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันได้ทำตามคำแนะนำตาม OECD Guideline for Testing of Chemicals No.407 โดยหนูขาวทุกตัวต้องอดน้ำและอาหารเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ก่อนการทดสอบพิษกึ่ง เฉียบพลัน หนูขาวจะถูกแบ่งโดยวิธีสุ่มออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว (เพศละ 5 ตัว) ประกอบด้วยกลุ่ม ควบคุมซึ่งได้รับน้ำ 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลองซึ่งได้รับสารสกัดอย่างหยาบความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม ของน้ำหนักตัวหนูขาว 1 กลุ่ม โดยการให้สารผ่านหลอดป้อนสารวันละ 1 ครั้ง จนครบ 28 ครั้ง

จากนั้นสังเกตอาการเปลี่ยนแปลงชั่วโมงที่ 1 และ 4 จนครบ 24 ชั่วโมง และบันทึกจำนวนหนูตายเป็นระยะเวลา 28 วัน และชั่งน้ำหนักตัวหนูทุกวันที่ 1, 7, 14, 21 และ 28 เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระหว่างกลุ่มทดลอง รายงานค่าความเป็นพิษและผ่าชันสูตรตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในที่สำคัญเช่นเดียวกับการศึกษาพิษเฉียบพลัน

6. การทดสอบฤทธิ์ของหญ้าไฟ่น้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง

6.1 การกระตุ้นการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง

คัดเลือกสายพันธุ์หนูขาว อายุ 6 สัปดาห์ น้ำหนัก 120 ± 20 กรัม ที่มีสุขภาพดี โดยเลี้ยงใน metabolic cage ก่อนการทดสอบหนูขาวทุกตัวต้องอดน้ำเป็นเวลา 16 ชั่วโมง หนูขาวจะถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังโดยให้อาหารที่ผสมสาร adenine ร้อยละ 0.25-0.75 (0.25-0.75% w/w) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อหาความเข้มข้นของ adenine ที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรัง จากนั้นตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และเลือด จะเก็บในวันที่ 0, 14, 28 เพื่อหาค่า Creatinine และ Blood urea nitrogen (BUN) สำหรับกลุ่มควบคุมจะถูกให้อาหารที่ปราศจากสาร adenine ในปริมาณที่เท่ากันกับกลุ่มทดลอง

6.2 Experimental protocol

หนูขาวจะถูกแบ่งโดยวิธีสุ่มออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว และได้รับอาหารและสารสกัด ตลอด 4 สัปดาห์ ดังต่อไปนี้

- กลุ่ม 1 : กลุ่มควบคุม : ได้รับอาหารธรรมดา
- กลุ่ม 2 : กลุ่ม *T. fluminensis* 1 (TF1) : ได้รับอาหารธรรมดา + ได้รับสารสกัดอย่างหยابจากหญ้าไฟ่น้ำที่ผสมในน้ำดื่ม 7.5%, w/v
- กลุ่ม 3 : กลุ่ม *T. fluminensis* 2 (TF2) : ได้รับอาหารธรรมดา + ได้รับสารสกัดอย่างหยابจากหญ้าไฟ่น้ำที่ผสมในน้ำดื่ม 15%, w/v
- กลุ่ม 4 : กลุ่ม Chronic renal failure (CRF) : ได้รับอาหารที่ผสมสาร adenine 0.75%, w/w
- กลุ่ม 5 : กลุ่ม CRF + TF1 : ได้รับอาหารที่ผสมสาร adenine 0.75%, w/w + ได้รับสารสกัดอย่างหยابจากหญ้าไฟ่น้ำที่ผสมในน้ำดื่ม 7.5%, w/v
- กลุ่ม 6 : กลุ่ม CRF + TF2 : ได้รับอาหารที่ผสมสาร adenine 0.75%, w/w + ได้รับสารสกัดอย่างหยابจากหญ้าไฟ่น้ำที่ผสมในน้ำดื่ม 15%, w/v

โดยทุกวันที่ 0, 14, 21 และ 28 สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงใน metabolic cage เพื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และเลือด, ภู่วัดความดันโลหิต และถูกชั่งน้ำหนัก

7. การประเมินการทำงานและพยาธิสภาพของไต

7.1 การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีคลินิก

หนูขาวจำนวน 10 ตัวในแต่ละกลุ่ม จะถูกเลี้ยงใน metabolic cage โดยทุกวันที่ 0, 14, 21 และ 28 หนูขาวจะถูกเก็บตัวอย่างปัสสาวะ 24 ชั่วโมง และเลือด เพื่อตรวจวิเคราะห์การทำงานของไต (Creatinine, BUN, Albumin, Creatinine clearance) ที่โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ค่า Creatinine และ BUN วัดโดยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ DADE ARX ซึ่งการวัด Creatinine ใช้หลักการของ Alkaline picrate (Jaffe reaction) ส่วนการวัด BUN ใช้หลักการของ Coupled urease/glutamate dehydrogenase

7.2 การตรวจพยาธิสภาพ

ในวันที่ 28 หนูขาวจะถูกวางยาสลบและเก็บอวัยวะภายใน เช่น ไต เป็นต้น โดยเก็บอวัยวะในสารละลาย Formalin เพื่อเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อทางพยาธิวิทยา การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อไตจะเตรียมใน paraffin block โดยจะถูกตัดให้มีความหนาประมาณ 4 ไมโครเมตร สไลด์เนื้อเยื่อไตจะถูกย้อมด้วยสี Haematoxylin-eosin และประเมินพยาธิสภาพของไตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสุ่มเลือกทั้งหมด 20 พื้นที่ การจำแนกความเสียหายที่เกิดขึ้นในไตจะวัดจากเปอร์เซ็นต์ของ Necrotizing cells, Granular casts และ Cellular fragments ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมด

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้ซอฟต์แวร์สถิติโปรแกรม SPSS 17.0 คำนวณผลแสดงเป็นค่า mean + standard error ($\bar{X} + S.E.$) สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลองระหว่างกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุมใช้ one way ANOVA และ t-test ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ ส่วนลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา วิเคราะห์โดยวิธีพรรณนาความผิดปกติเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และใช้การคำนวณ Histopathological scores

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสกัดสมุนไพรหญ้าไผ่น้ำ

หลังจากนำต้นหญ้าไผ่น้ำ (รูปที่ 6)หนัก 12 กิโลกรัม ไปอบแห้ง พบว่าได้น้ำหนักแห้งสุทธิทั้งหมด 593.7 กรัม หรือคิดเป็น 4.95% ของน้ำหนักจริงของหญ้าไผ่น้ำแบบสด จากนั้นนำหญ้าไผ่น้ำแบบแห้งหนัก 500 กรัม ไปต้มในน้ำกลั่น 15 ลิตร แล้วนำน้ำสกัดจากสมุนไพรหญ้าไผ่น้ำไปทำให้เป็นผงแห้ง โดยใช้เทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying) ซึ่งทำให้ได้สารสกัดหญ้าไผ่น้ำในรูปผงละเอียด สีเหลือง-น้ำตาล (รูปที่ 7) ทั้งหมด 77.3212 กรัม หรือคิดเป็น 15.46% จากน้ำหนักแห้งของหญ้าไผ่น้ำ



รูปที่ 6 ต้นหญ้าไผ่น้ำ



รูปที่ 7 ผงสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ

2. การทดสอบพฤษเคมี (Phytochemical screening) ของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ

การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น 15 ชนิด ได้แก่ ฟีนอล (Phenols), ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids), แอนโทไซยานิน (Anthocyanins), ไตรเทอร์เพน/สเตียรอยด์ (Triterpenes/steroids), อัลคาลอยด์ (Alkaloids), แอนทราควิโนน (Anthraquinones), คูมาริน (Coumarin), ซาโปนิน (Saponins), ควิโนน (Quinone), แทนนิน (Tannins), น้ำตาล (Sugar), โปรตีนและกรดอะมิโน (Proteins and Amino acid), ไกลโคไซด์ (Glycosides), ไขมันและน้ำมันหอมระเหย (Fat and essential oil), และฟลอโรกลูซินอล (Phloroglucinol) พบว่าสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำมีสารพฤษเคมี 3 ชนิด คือ ฟีนอล แทนนิน และซาโปนิน ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยสารแทนนินที่พบ เป็นสารในกลุ่ม Hydrolyzable tannins ที่มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยกรดฟีนอลิก (Phenolic acids) และน้ำตาล ในปริมาณระดับปานกลาง และพบสารแทนนินในกลุ่ม True tannins ในปริมาณระดับต่ำ นอกจากนี้ฟีนอลและซาโปนินที่พบมีปริมาณในระดับปานกลางและต่ำตามลำดับ

3. การแยกองค์ประกอบทางเคมีและการกำหนดมาตรฐาน (Standardization) ของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ

3.1 การแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง

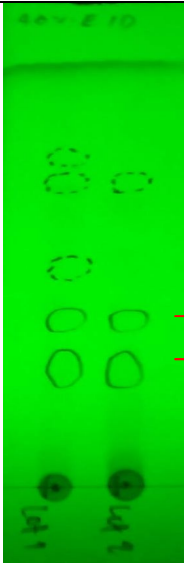
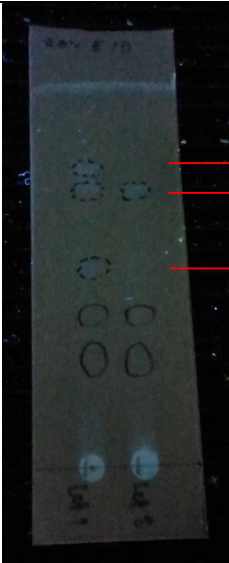
ในการศึกษาครั้งนี้ได้หารูปแบบการแยกของสารพฤษเคมี (Fingerprint profile) โดยเปรียบเทียบกับระบบ mobile phase ซึ่งเป็นสารทำละลายที่นำสารพฤษเคมีให้เคลื่อนที่แยกกันด้วยระยะทางต่างกัน แล้วแต่คุณสมบัติทางเคมีของสารแต่ละชนิด แล้วตรวจระยะทางเคลื่อนที่สัมพัทธ์ หรือ R_f ของ TLC chromatogram ภายใต้แสงสว่าง (VIS) UV ที่ 254 nm และ 365 nm ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้ Mobile phase systems จนได้ระบบที่เหมาะสมสามารถแยกสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำได้ คือ Ethyl acetate: Dichloromethane ในอัตราส่วน 40:60 (v/v) จะเห็นได้ว่า Mobile phase

systems นี้ สามารถแยกสารเคมีได้ 5 จุด (รูปที่ 8) ซึ่งมีระยะทางเคลื่อนที่สัมพัทธ์หรือ R_f บนแผ่น TLC ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ

No.	Phytoconstituents	Tests	<i>T. Fluminensis</i>
1	Phenols	Ferric chloride test	++
2	Flavonoids	Ammonium test	-
		Aluminum chloride test	-
3	Anthocyanins	Sodium hydroxide	-
		Sulfuric acid	-
4	Triterpenes/	Salkowski's test	-
	steroids	Libermann Burchard's test	-
5	Alkaloids	Mayer's test	-
		Wagner's test	-
		Dragendroff's test	-
6	Anthraquinones	Borntranger's test	-
7	Coumarin	Sodium hydroxide + heat + under UV light	-
8	Saponins	Froth test	+
		Foam test	+
9	Quinone	Sulphuric acid	-
10	Tannins	Ferric Chloride test	++
		Gelatin test	+
11	Sugar	Fehling's test	-
12	Proteins & Amino acid	Burette test	-
13	Glycosides	Fehling's test	-
		Keller-killiani test	-
14	Fat and essential oil	Spot test	-
		Sudan III solution	-
15	Phloroglucinol	Vanillin-hydrochloric acid test	-

หมายเหตุ: (-) หมายถึง ตรวจไม่พบ, (+) หมายถึง ตรวจพบในระดับต่ำ, (++) หมายถึง ตรวจพบในระดับปานกลาง

	
254 nm (Detected spot 4 and spot 5)	366 nm (Detected spot 1, 2 and 3)

รูปที่ 8 รูปแบบการแยกของสารพฤษาเคมีของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ

ตารางที่ 3 ระยะทางเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) ของสารพฤษาเคมีที่แยกได้ของสารสกัดแบบหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ

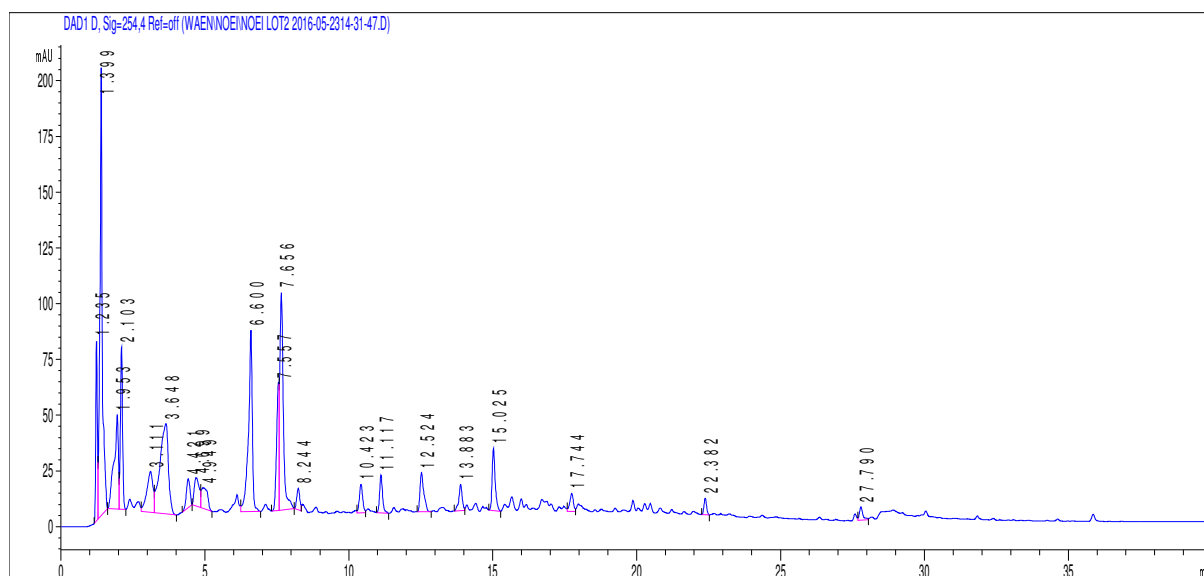
Spot No.	R_f values	Inference		
		Alkaloids	Terpenoids	Flavonoid
1	0.74	-	-	-
2	0.70	-	-	-
3	0.50	-	-	-
4	0.38	-	-	-
5	0.26	-	-	-

หมายเหตุ: (-) หมายถึง ตรวจไม่พบ

3.2 การตรวจวัดปริมาณสารสำคัญด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

สารสกัดหญ้าไผ่น้ำถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญและควบคุมคุณภาพ โดยเปรียบเทียบกับสารเคมีมาตรฐาน จำนวน 13 สาร ดังนี้ (+)-catechin, Apigenin, Astragalin, Caffeic acid, Isoquercitrin, Kaemferol, Myricetin, Protocatechin acid ethyl ester, Quercetin, Rutin, Scopoletin, Syringic acid และ Vitexin โดยสารเคมีมาตรฐานนี้อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วยเครื่อง HPLC

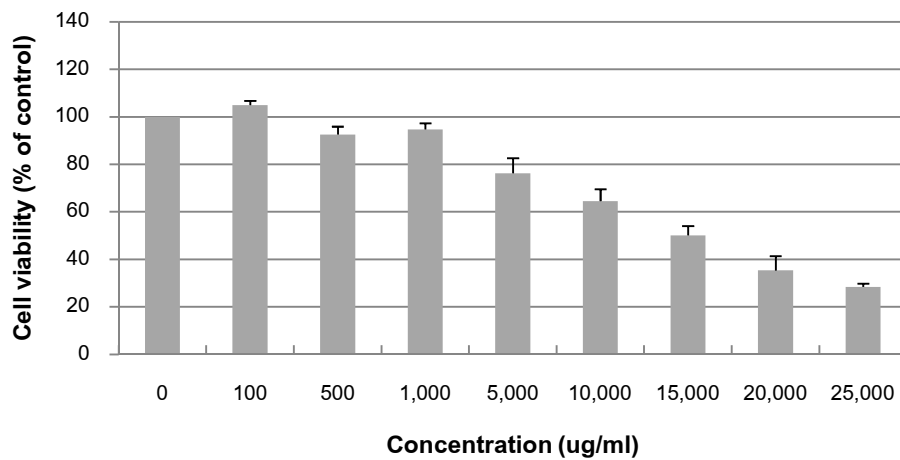
รุ่น 1260 series (Agilent Technologies, USA) ในการวิเคราะห์ที่ตรวจวัดสัญญาณด้วย photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 203, 210, 230, 254, 280, 310, 340 และ 370 นาโนเมตร เมื่อพิจารณาจากโครมาโตแกรม (chromatogram) ของสารสกัดหญ้าไผ่น้ำ (รูปที่ 9) เทียบกับสารเคมีมาตรฐานดังกล่าว พบว่าสารสำคัญที่พบมากในสารสกัดหญ้าไผ่น้ำอยู่ในกลุ่มของกรดฟีนอลิก (Phenolic acid)



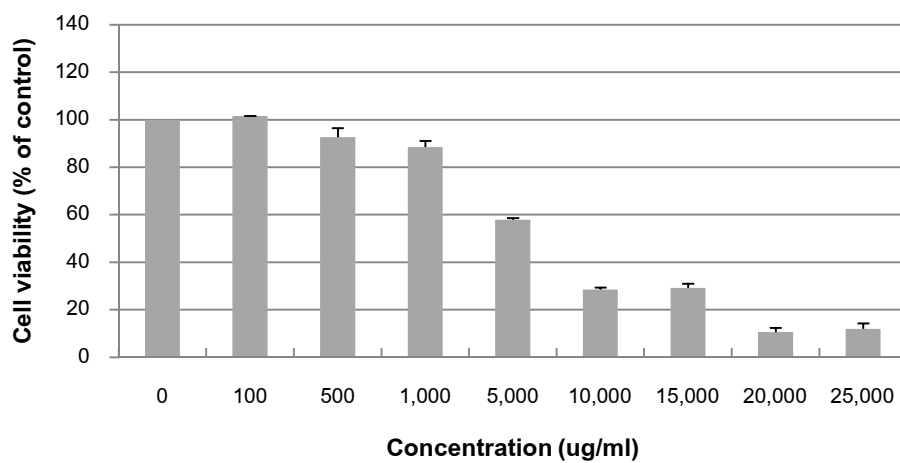
รูปที่ 9 โครมาโตแกรม (chromatogram) ของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ

4. การทดสอบความเป็นพิษของหญ้าไผ่น้ำในหลอดทดลอง

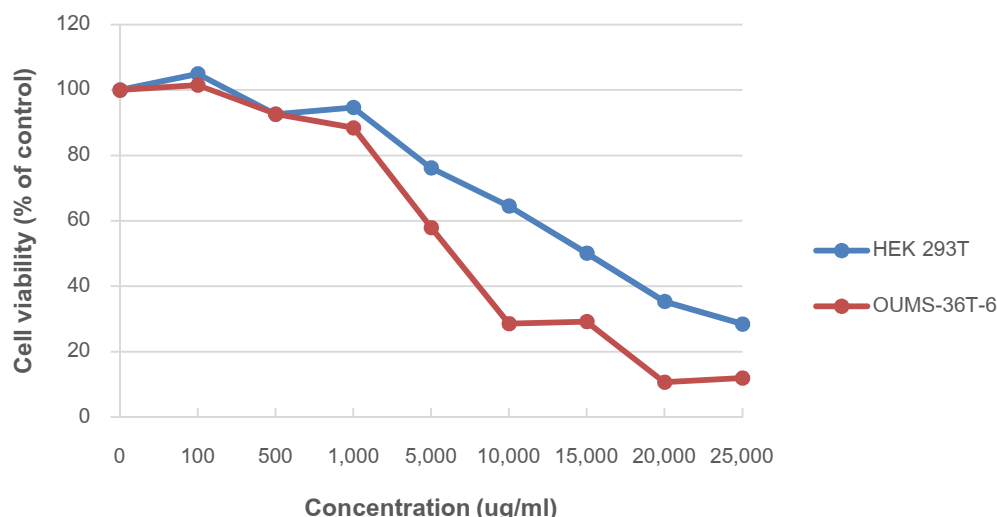
หลังจากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำต่อเซลล์ Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293T) และเซลล์ Normal Human Embryonic Fibroblasts (OUMS-36T-6) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 50,000 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร พบว่าสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไต HEK293T และเซลล์ Fibroblasts OUMS-36T-6 ในระดับต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $12,819 \pm 2,179.43$ ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และ $6,470.26 \pm 793.58$ ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษระหว่างเซลล์ไต HEK293T และเซลล์ Fibroblasts OUMS-36T-6 พบว่าเซลล์ไต HEK293T มีความไวต่อความเป็นพิษของสารสกัดน้อยกว่าเซลล์ Fibroblasts OUMS-36T-6 (รูปที่ 12)



รูปที่ 10 กราฟแสดงค่าที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหญ้าไผ่น้ำต่อเซลล์ Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293T) โดยวิธี MTT



รูปที่ 11 กราฟแสดงค่าที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหญ้าไผ่น้ำต่อเซลล์ Normal Human Embryonic Fibroblasts (OUMS-36T-6) โดยวิธี MTT



รูปที่ 12 กราฟเปรียบเทียบการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหญ้าไผ่ต่อเซลล์ Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293T) และเซลล์ Normal Human Embryonic Fibroblasts (OUMS-36T-6) โดยวิธี MTT

5. การทดสอบความเป็นพิษของหญ้าไผ่ในสัตว์ทดลอง

5.1 การศึกษาพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity)

- อาการความเป็นพิษ

หลังจากหนูทดลองได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัวหนูทดลอง พบว่ามีการหายใจปกติ ขับถ่ายปัสสาวะและอุจจาระปกติ ลักษณะการเคลื่อนไหวเป็นปกติ และไม่พบอาการชัก อาการซึมเศร้า อาเจียน เบื่ออาหาร นอกจากนี้ยังไม่พบหนูทดลองตาย และเมื่อสังเกตอาการต่อไปอีก 14 วัน ก็ไม่พบหนูทดลองตายและไม่พบอาการเป็นพิษใดๆ ดังนั้นแสดงว่าค่าความเป็นพิษขนาดสูงสุดที่หนูทดลองทนได้ (Maximum tolerate dose) มีค่ามากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัวหนูทดลอง และขนาดของสารสกัดที่ทำให้หนูทดลองตายไปครั้งหนึ่ง (LD₅₀) มีค่ามากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักตัวหนูทดลอง

- น้ำหนักตัวเฉลี่ย

หนูที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากหนูทดลองกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของหนูทดลอง (ตารางที่ 4)

- ค่าทางเคมีโลหิต

หนูที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่มีค่าเคมีโลหิต คือ Blood urea nitrogen (BUN), Creatinine (Crea), Aspartate transferase (AST), Alanine transaminase (ALT), Alkaline

phosphatase (ALP), Total protein (TP), Albumin (Alb), Cholesterol (Chol), Low-density lipoprotein (LDL), High-density lipoprotein (HDL), และค่า Electrolyte ได้แก่ Sodium, Potassium, Chloride, Bicarbonate ไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากหนูทดลองกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีผลต่อตับและไต แต่อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่าสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำทำให้ค่า Triglyceride (Trig) ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในหนูทดลองเพศผู้ เมื่อเทียบกับหนูทดลองเพศผู้กลุ่มควบคุม (ตารางที่ 5)

- การตรวจพยาธิสภาพ

1) การตรวจด้วยตาเปล่า (Macroscopic Examination)

จากการผ่าชันสูตรตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในที่สำคัญ คือ หัวใจ ตับ ไต ปอด และม้าม ด้วยตาเปล่า พบว่าสี ขนาด และรูปร่างอวัยวะต่างๆ ที่ได้จากหนูที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำนั้น อยู่ในสภาพปกติและไม่พบรอยโรคใดๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม

2) การตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic Examination)

จากการตรวจพยาธิสภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในที่สำคัญจากหนูที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำ พบว่า ไม่พบรอยโรคและความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

หัวใจ : ผนังหัวใจชั้นในมีลักษณะปกติและไม่พบก้อนเลือดเกาะติดกับผนังหัวใจ ชั้นกล้ามเนื้อ myocardium ไม่มีการอักเสบหรือการตาย ผนัง epicardium ไม่พบการตายของชั้นไขมันที่อยู่ที่ผนังหัวใจชั้นนอก

ปอด : เนื้อปอดอยู่ในลักษณะปกติที่ประกอบไปด้วย alveolar septae และเซลล์ pneumocyte แขนงหลอดลมและเส้นเลือดในปอดไม่พบว่ามีเลือดออกหรือสารคัดหลั่งไปอุดตัน แต่มีการพบลักษณะ septal thickening ทั้งในหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดหญ้าไผ่น้ำและในหนูทดลองกลุ่มควบคุม

ตับ : ไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อและการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อของตับ ไม่พบว่ามี การตายของเซลล์ตับและ Kupffer's cell ไม่พบเซลล์ซึ่งแสดงถึงการอักเสบและการคั่งของน้ำดีภายในตับ พบ Cytoplasmic glycogen สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อปริมาณเล็กน้อยในเซลล์ตับของหนูทดลองเพศผู้ทั้งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าไผ่น้ำและกลุ่มควบคุม

ม้าม : ไม่พบการทำลายของเซลล์หรือการติดสีที่ผิดปกติในส่วน of red pulp และส่วน white pulp ลักษณะเส้นเลือดที่อยู่ในบริเวณนี้มีลักษณะปกติ

ไต : เยื่อหุ้มไตอยู่ในลักษณะปกติ ไม่พบการทำลายที่เฉพาะเจาะจงของเซลล์ ไม่พบมีการแทรกซึมที่ผิดปกติของเซลล์ ลักษณะท่อไตซึ่งเป็นส่วนประกอบของ renal medulla ปกติ แต่อย่างไรก็ตามในหนูทดลองเพศผู้ทั้งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าไผ่น้ำและกลุ่มควบคุมพบ Tubular degeneration ในระดับปานกลาง

ตารางที่ 4 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทดลองในการศึกษาพิษเฉียบพลัน

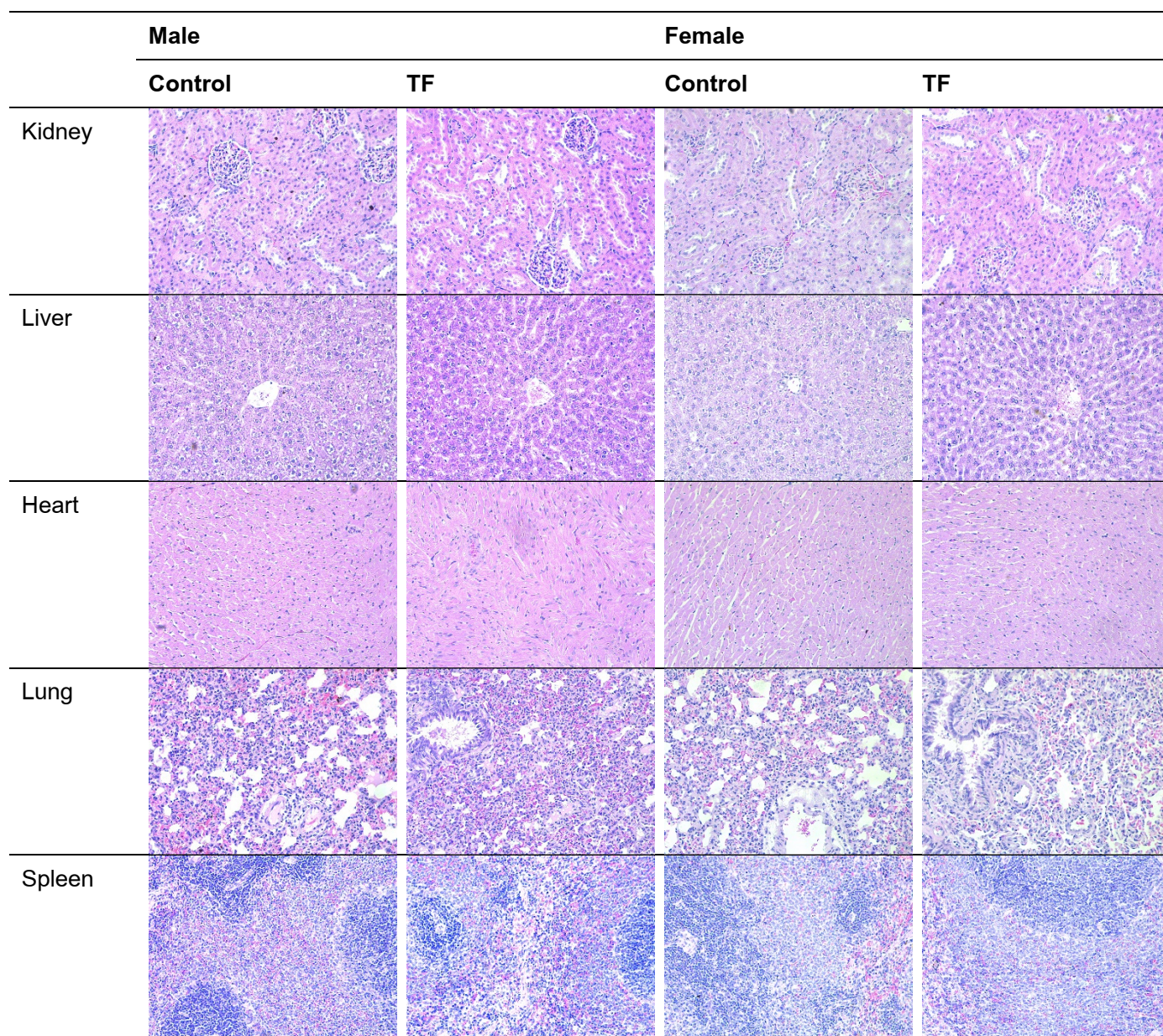
Group		Body weight		
		0 th Day	7 th Day	14 th Day
Male	Control	151.50 ± 1.25	210.73 ± 2.34	242.24 ± 3.33
	Treated	151.28 ± 1.72	212.27 ± 2.91	248.03 ± 3.10
Female	Control	135.32 ± 1.59	167.95 ± 2.52	184.93 ± 1.66
	Treated	138.40 ± 0.89	161.94 ± 3.95	176.80 ± 5.45

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SE โดย $n = 5$ ในแต่ละกลุ่ม

ตารางที่ 5 ค่าเคมีโลหิตของหนูทดลองในการศึกษาพิษเฉียบพลัน

Parameters	Male		Female	
	Control	Treated	Control	Treated
<i>Liver function test</i>				
ALT (IU/L)	23 ± 4.04	25.4 ± 2.77	20 ± 1.41	18.8 ± 0.65
AST (IU/L)	71.4 ± 5.45	75.5 ± 4.5	67 ± 3.67	67.2 ± 1.56
ALP (IU/L)	167.2 ± 17.63	163.2 ± 13.71	115.4 ± 5.94	119.8 ± 6.65
Total Protein (g/dl)	4.46 ± 0.19	4.32 ± 0.19	4.34 ± 0.09	4.14 ± 0.10
Albumin (g/dl)	3.54 ± 0.12	3.44 ± 0.09	3.5 ± 0.06	3.42 ± 0.13
<i>Kidney function tests</i>				
Creatinine (mg/dl)	0.1	0.22 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.1
BUN (mg/dl)	23.8 ± 0.58	26 ± 1.23	21.8 ± 2.78	25.6 ± 1.44
<i>Metabolic function tests</i>				
Cholesterol (mg/dl)	67.4 ± 2.96	67.8 ± 5.25	62.4 ± 1.75	64.8 ± 3.09
Triglyceride (mg/dl)	130 ± 12.94	78.8 ± 8.92	56.4 ± 15.39	51.6 ± 13.17
LDL (mg/dl)	8.4 ± 0.93	10.6 ± 1.29	9.2 ± 0.86	10.4 ± 1.04
HDL (mg/dl)	60.8 ± 3.12	62.8 ± 3.94	59.4 ± 1.29	63.2 ± 3.65
<i>Electrolyte tests</i>				
Sodium (mEq/l)	144.2 ± 0.58	139.8 ± 1.77	143.6 ± 0.81	143.2 ± 1.29
Potassium (mEq/l)	8.02 ± 0.25	8.34 ± 0.79	6.82 ± 0.2	7.9 ± 0.1
Chloride (mEq/l)	99.6 ± 0.51	95.6 ± 1.12	103.6 ± 0.4	102.8 ± 0.22
Bicarbonate (mEq/l)	21.4 ± 0.81	19.4 ± 1.36	19.4 ± 1.21	20.8 ± 0.42

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SE โดย $n = 5$ ในแต่ละกลุ่ม



รูปที่ 13 ผลทางพยาธิสภาพของอวัยวะภายในของหนูทดลองในการศึกษาพิษเฉียบพลัน

5.2 การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน (Subacute toxicity)

- อาการความเป็นพิษ

หลังจากหนูทดลองได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ของน้ำหนักร่างตัวของหนูทดลอง แล้วสังเกตอาการเปลี่ยนแปลงชั่วโมงที่ 1 และ 4 จนครบ 24 ชั่วโมง พบว่ามีการหายใจปกติ ขับถ่ายปัสสาวะและอุจจาระปกติ ลักษณะการเคลื่อนไหวเป็นปกติ และไม่พบอาการชัก อาการซึมเศร้า อาเจียน เบื่ออาหาร นอกจากนี้ยังไม่พบหนูทดลองตาย และเมื่อสังเกตอาการของหนูทดลองเป็นระยะเวลา 28 วัน ก็ไม่พบหนูทดลองตายและไม่พบอาการเป็นพิษใดๆ

- น้ำหนักตัวเฉลี่ย

หนูที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากหนูทดลองกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของหนูทดลอง (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทดลองในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

Group		Body weight				
		0 th Day	7 th Day	14 th Day	21 th Day	28 th Day
Male	Control	147.14 ± 2.94	193.44 ± 2.19	243.42 ± 1.21	287.80 ± 3.30	324.80 ± 2.89
	Treated	144.89 ± 1.71	193.86 ± 3.64	239.91 ± 2.82	281.91 ± 5.97	320.75 ± 7.83
Female	Control	141.45 ± 2.86	160.98 ± 3.36	178.44 ± 2.73	194.10 ± 1.61	209.79 ± 3.15
	Treated	142.74 ± 1.10	159.25 ± 3.39	174.89 ± 3.06	189.07 ± 3.77	205.14 ± 2.53

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SE โดย $n = 5$ ในแต่ละกลุ่ม

- ค่าทางเคมีโลหิต

หนูที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน มีค่าเคมีโลหิต คือ Blood urea nitrogen (BUN), Creatinine (Crea), Alanine transaminase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP), Total protein (TP), Albumin (Alb), Cholesterol (Chol), Triglyceride (Trig), Low-density lipoprotein (LDL), และ High-density lipoprotein (HDL) ไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากหนูทดลองกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ไม่มีผลต่อดัชนีและไต แต่อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มว่าสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ทำให้ค่า Aspartate transferase (AST) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในหนูทดลองเพศผู้ เมื่อเทียบกับหนูทดลองเพศผู้กลุ่มควบคุม (ตารางที่ 7)

- ค่าทางโลหิตวิทยา

หนูที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน มีค่าโลหิตวิทยา คือ WBC count, RBC count, Hemoglobin, Hematocrit, MCV, MCH, MCHC, Platelet count, และ Differential Leucocyte Count ได้แก่ Neutrophils, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils และ Basophils ไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากหนูทดลองกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 ค่าเคมีโลหิตของหนูทดลองในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

Parameters	Male		Female	
	Control	Treated	Control	Treated
<i>Liver function test</i>				
ALT (IU/L)	46.5 ± 11.48	44.2 ± 1.59	38.2 ± 2.50	38.5 ± 5.36
AST (IU/L)	113.67 ± 41.70	89.8 ± 6.58*	99.33 ± 4.37	99.33 ± 3.48
ALP (IU/L)	157.5 ± 11.85	164.6 ± 9.86	99.2 ± 4.49	102.67 ± 12.79
Total Protein (g/dl)	5.02 ± 0.33	5.92 ± 0.10	5.48 ± 0.06	5.8 ± 0.07
Albumin (g/dl)	3.85 ± 0.19	4.28 ± 0.08	4.04 ± 0.07	4.15 ± 0.13
<i>Kidney function tests</i>				
Creatinine (mg/dl)	0.28 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.2	0.28 ± 0.03
BUN (mg/dl)	24.6 ± 1.03	28.8 ± 0.97	29 ± 0.55	33.25 ± 1.11
<i>Metabolic function tests</i>				
Cholesterol (mg/dl)	54.5 ± 3.01	66.6 ± 2.99	73.4 ± 3.88	72 ± 6.57
Triglyceride (mg/dl)	120 ± 17.38	110 ± 11.52	94.4 ± 13.64	63.5 ± 17.19
LDL (mg/dl)	4.6 ± 0.68	7.33 ± 1.04	8.6 ± 0.93	8 ± 2.08
HDL (mg/dl)	51.2 ± 4.25	65.4 ± 2.77	72 ± 3.90	71 ± 6.29

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SE โดย $n = 5$ ในแต่ละกลุ่ม, * Significant differences compared with control group ($p < 0.05$)

- น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะ

น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในที่สำคัญ คือ หัวใจ ตับ ไต ปอด ม้าม และกระเพาะอาหาร ของหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่า ไม่แตกต่างจากหนูทดลองกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 9)

- การตรวจพยาธิสภาพ

1) การตรวจด้วยตาเปล่า (Macroscopic Examination)

จากการผ่าชันสูตรตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในที่สำคัญ คือ หัวใจ ตับ ไต ปอด ม้าม และกระเพาะอาหาร ด้วยตาเปล่า พบว่าสี ขนาด และรูปร่างอวัยวะต่างๆ ที่ได้จากหนูที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่นั้น อยู่ในสภาพปกติและไม่พบรอยโรคใดๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 8 ค่าโลหิตวิทยาของหนูทดลองในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

Parameters	Male		Female	
	Control	TF	Control	TF
WBC count ($10^3/\mu\text{l}$)	7.63 $\pm$ 0.66	8.32 $\pm$ 0.59	4.74 $\pm$ 0.66	5.75 $\pm$ 3.25
RBC count ($10^6/\mu\text{l}$)	7.51 $\pm$ 0.16	7.62 $\pm$ 0.32	7.17 $\pm$ 0.16	6.89 $\pm$ 0.27
Hemoglobin (g%)	14.05 $\pm$ 0.16	14.26 $\pm$ 0.57	13.58 $\pm$ 0.20	12.7 $\pm$ 0.55
Hematocrit (%)	43 $\pm$ 0.71	43.2 $\pm$ 1.59	41.8 $\pm$ 0.97	37.75 $\pm$ 1.60
MCV (Femto liter)	54.23 $\pm$ 0.70	54.52 $\pm$ 0.52	55.28 $\pm$ 0.49	53.78 $\pm$ 0.58
MCH (Pico grams)	18.73 $\pm$ 0.33	18.72 $\pm$ 0.09	18.96 $\pm$ 0.18	18.45 $\pm$ 0.12
MCHC (g%)	34.53 $\pm$ 0.35	34.32 $\pm$ 0.17	34.3 $\pm$ 0.32	34.3 $\pm$ 0.54
Platelet count ($10^3/\mu\text{l}$)	660.5 $\pm$ 56.81	450.8 $\pm$ 121.9	532 $\pm$ 124	455.3 $\pm$ 140.9
<i>Differential Leucocyte Count</i>				
Neutrophils (%)	15.75 $\pm$ 1.18	14.5 $\pm$ 1.56	11.4 $\pm$ 1.63	12.33 $\pm$ 1.86
Lymphocytes (%)	81.25 $\pm$ 1.93	83.4 $\pm$ 2.04	85.2 $\pm$ 1.93	78.75 $\pm$ 5.57
Monocytes (%)	2 $\pm$ 0.91	1.6 $\pm$ 0.6	2 $\pm$ 0.55	2.75 $\pm$ 1.03
Eosinophils (%)	1	1.8 $\pm$ 0.37	1.4 $\pm$ 0.25	1 $\pm$ 1
Basophils (%)	0	0	0	0

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SE โดย $n = 5$ ในแต่ละกลุ่ม

ตารางที่ 9 น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายในของหนูทดลองในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

Organ Weight (g)	Male		Female	
	Control	Treated	Control	Treated
Kidney	0.69 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.36	0.82 $\pm$ 0.02
Liver	4.1 $\pm$ 0.08	3.77 $\pm$ 0.10	3.93 $\pm$ 0.08	4.11 $\pm$ 0.18
Heart	0.34 $\pm$ 0.01	0.3 $\pm$ 0.1	0.38 $\pm$ 0.02	0.36 $\pm$ 0.04
Lung	0.59 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.04	0.75 $\pm$ 0.05	0.72 $\pm$ 0.03
Spleen	0.27 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.03
Stomach	0.52 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.03

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SE โดย $n = 5$ ในแต่ละกลุ่ม

2) การตรวจกายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic Examination)

จากการตรวจพยาธิสภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในที่สำคัญจากหนูที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่า ไม่พบรอยโรคและความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 14 ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

หัวใจ : ผนังหัวใจชั้นในมีลักษณะปกติและไม่พบก้อนเลือดเกาะติดกับผนังหัวใจ ชั้นกล้ามเนื้อ myocardium ไม่มีการอักเสบหรือการตาย ผนัง epicardium ไม่พบการตายของชั้นไขมันที่อยู่ที่ผนังหัวใจชั้นนอก

ปอด : เนื้อปอดอยู่ในลักษณะปกติที่ประกอบไปด้วย alveolar septae และเซลล์ pneumocyte แขนงหลอดลมและเส้นเลือดในปอดไม่พบว่ามีเลือดออกหรือสารคัดหลั่งไปอุดตัน แต่มีการพบลักษณะ septal thickening ทั้งในหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดหญ้าไผ่และในหนูทดลองกลุ่มควบคุม

ตับ : ไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อและการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อของตับ ไม่พบว่ามี การตายของเซลล์ตับและ Kupffer's cell ไม่พบเซลล์ซึ่งแสดงถึงการอักเสบและการคั่งของน้ำดีภายในตับ

ม้าม : ไม่พบการทำลายของเซลล์หรือการติดสีที่ผิดปกติ ลักษณะเส้นเลือดที่อยู่ในบริเวณนี้มีลักษณะปกติ

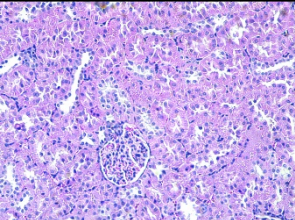
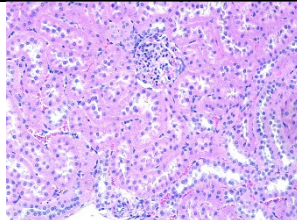
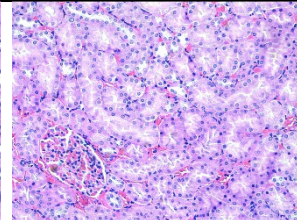
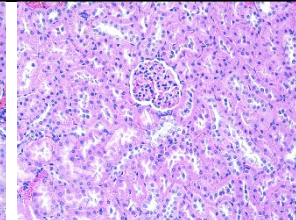
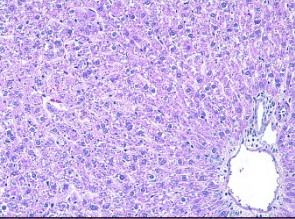
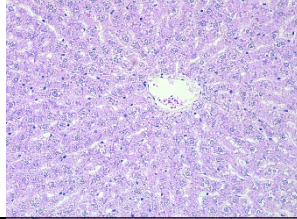
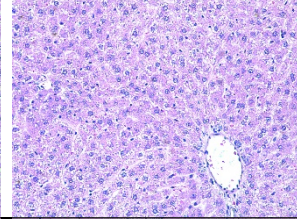
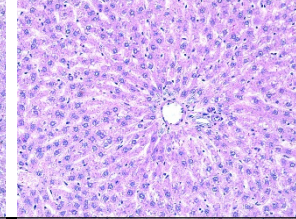
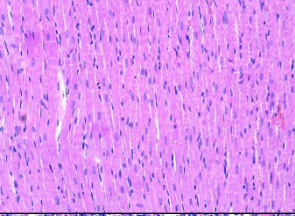
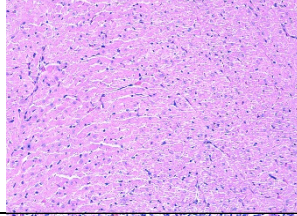
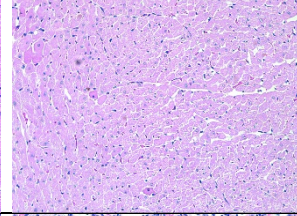
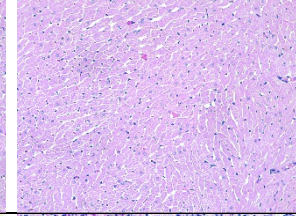
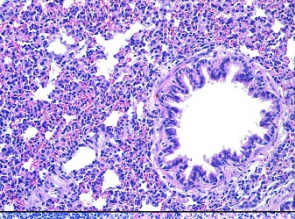
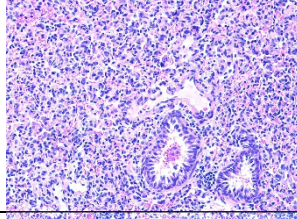
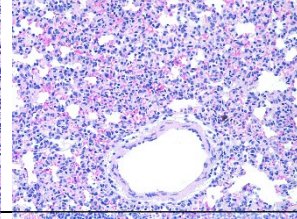
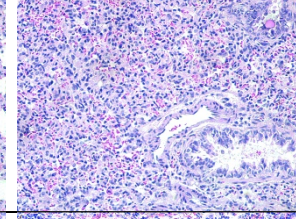
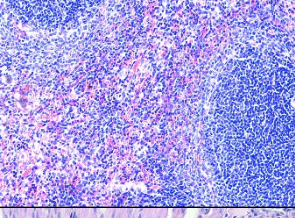
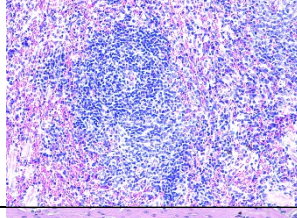
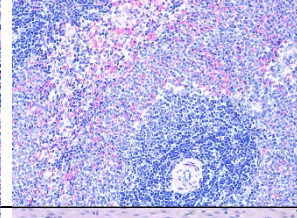
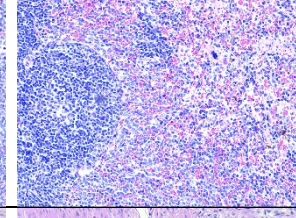
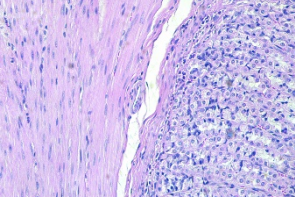
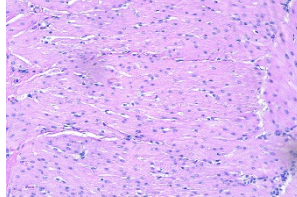
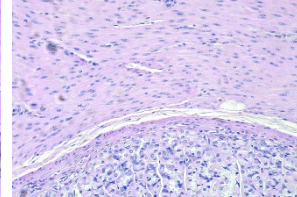
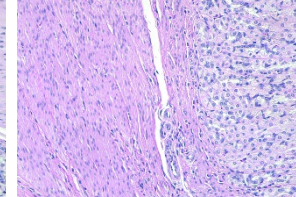
ไต : เยื่อหุ้มไตอยู่ในลักษณะปกติ ไม่พบการทำลายที่เฉพาะเจาะจงของเซลล์ ไม่พบมีการแทรกซึมที่ผิดปกติของเซลล์ ลักษณะท่อไตซึ่งเป็นส่วนประกอบของ renal medulla ปกติ แต่พบ Tubular degeneration ในระดับปานกลางทั้งในหนูทดลองเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าไผ่และหนูทดลองเพศผู้กลุ่มควบคุม

กระเพาะอาหาร : เนื้อเยื่อชั้นในของกระเพาะอาหารอยู่ในสภาพปกติ รวมทั้งผนังชั้นกล้ามเนื้ออยู่ในลักษณะปกติ

6. การทดสอบฤทธิ์ของหญ้าไผ่ต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง

6.1 การกระตุ้นการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง

ในการกระตุ้นการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง พบว่าความเข้มข้นของ adenine ที่เหมาะสมที่ในการกระตุ้นการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรัง คือ การให้อาหารที่ผสมสาร Adenine 0.75% w/w เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งจะให้หนูทดลองค่อยๆเกิดภาวะไตวายเรื้อรังตั้งแต่สัปดาห์แรก

	Male		Female	
	Control	TF	Control	TF
Kidney				
Liver				
Heart				
Lung				
Spleen				
Stomach				

รูปที่ 14 ผลทางพยาธิสภาพของอวัยวะภายในของหนูทดลองในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

6.2 การประเมินการทำงานและพยาธิสภาพของไต

- น้ำหนักตัวเฉลี่ยและน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะ

ในการทดสอบฤทธิ์ของหญ้าไผ่ต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลองนั้น หนูทดลองได้ถูกแบ่งโดยวิธีสุ่มออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว (เพศละ 5 ตัว) พบว่า Adenine ทำให้ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวของหนูทดลองลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดการทดลอง โดยหนูทดลองเพศผู้และเพศเมียมีน้ำหนักเฉลี่ยลดลงจากน้ำหนักเริ่มต้นถึง 45.56% และ 54.76% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมก็พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสาร Adenine (0.75% w/w) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) อย่างไรก็ตามในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับอาหารที่ผสมสาร Adenine พร้อมด้วยสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ 7.5%, w/v และ 15%, w/v ในน้ำดื่ม พบว่าสามารถช่วยพยุงหรือป้องกันน้ำหนักเฉลี่ยที่ลดลงอย่างต่อเนื่องของหนูทดลองได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งจะเห็นว่าหนูทดลองเพศผู้และเพศเมียในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 7.5% w/v มีน้ำหนักเฉลี่ยลดลงจากน้ำหนักเริ่มต้นเพียง 9.5% และ 19.81% ตามลำดับ และหนูทดลองเพศผู้และเพศเมียในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 15% w/v มีน้ำหนักเฉลี่ยลดลงจากน้ำหนักเริ่มต้นเพียง 6.13% และ 11.18% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับสาร Adenine (0.75% w/w) ก็พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมสาร Adenine พร้อมด้วยสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ 7.5%, w/v และ 15%, w/v ในน้ำดื่มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) (ตารางที่ 10)

สำหรับการวัดค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะไตนั้น พบว่าอวัยวะไตในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสาร Adenine (0.75% w/w) มีค่าน้ำหนักสัมพัทธ์เฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ในขณะที่อวัยวะไตในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมสาร Adenine พร้อมด้วยสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ 7.5%, w/v และ 15%, w/v ในน้ำดื่ม มีค่าน้ำหนักสัมพัทธ์เฉลี่ยที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ได้รับสาร Adenine (0.75% w/w) (ตารางที่ 10)

- ค่าทางเคมีคลินิก

จากการทดลองพบว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ 7.5%, w/v และ 15%, w/v ในน้ำดื่ม เป็นระยะเวลา 28 วัน มีค่าเคมีคลินิก คือ Blood urea nitrogen (BUN), Serum Creatinine (Crea) และ Creatinine clearance ไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากหนูทดลองกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ไม่มีผลต่อการทำงานของไต ซึ่งให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลัน (รูปที่ 15 และ 16)

ในขณะที่หนูทดลองทั้งเพศผู้และเมียที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังด้วยอาหารที่ผสมสาร Adenine (0.75% w/w) เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าค่า Blood urea nitrogen (BUN) และ ค่า Creatinine (Crea) ในซีรัมเพิ่มขึ้น และค่า Creatinine clearance ในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองทุกกลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า Adenine นั้นทำให้การทำงานของไตผิดปกติ (รูปที่ 15 และ 16)

ตารางที่ 10 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทดลองและน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะไตในการทดสอบฤทธิ์ของหญ้าไผ่ต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง

Group		Initial wt (g)	Final wt (g)	Change (%)	Kidney wt (%)
Male	1. Control	140.96 ± 1.14	321.08 ± 4.61	53.05 ± 0.94	0.64 ± 0.03
	2. TF 7.5%	142.25 ± 1.06	316.49 ± 3.32	55.04 ± 0.46	0.73 ± 0.02
	3. TF 15%	141.1 ± 0.84	306.31 ± 2.83	53.92 ± 0.45	0.75 ± 0.02
	4. CRF: Adenine	142.2 ± 1.02	97.9 ± 2.06*	-45.56 ± 3.76	2.14 ± 0.05*
	5. CRF+TF 7.5%	142.79 ± 1.83	130.5 ± 2.61* [#]	-9.5 ± 1.25	1.37 ± 0.03* [#]
	6. CRF+TF 15%	144.08 ± 1.04	135.78±1.19* [#]	-6.13 ± 0.77	1.31 ± 0.02* [#]
Female	1. Control	144.93 ± 1.54	207.21 ± 2.02	30.03 ± 0.95	0.81 ± 0.02
	2. TF 7.5%	144.01 ± 1.8	205.65 ± 1.65	29.93 ± 1.43	0.83 ± 0.37
	3. TF 15%	139.9 ± 1.48	200.59 ± 1.28	30.26 ± 0.52	0.85 ± 0.05
	4. CRF: Adenine	144.5 ± 1.66	93.45 ± 1.31*	-54.76 ± 2.87	1.74 ± 0.08*
	5. CRF+TF 7.5%	141.87 ± 0.97	122.51±1.59* [#]	-19.81 ± 0.22	1.13 ± 0.09* [#]
	6. CRF+TF 15%	142.48 ± 1.35	128.21±2.12* [#]	-11.18 ± 0.93	1.08 ± 0.09* [#]

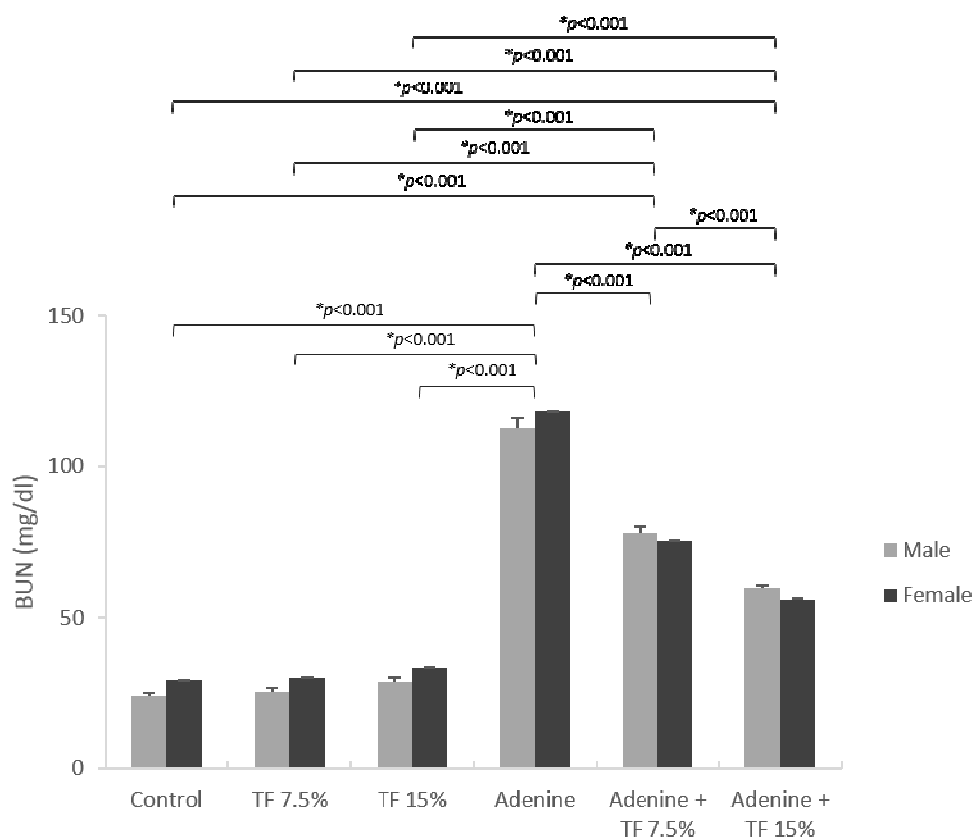
หมายเหตุ: ค่าที่แสดงเป็นค่า mean ± SE โดย $n = 5$ ในแต่ละกลุ่ม * Significant differences compared with control group ($p < 0.001$), [#] Significant differences compared with adenine group ($p < 0.001$)

อย่างไรก็ตามเมื่อกลุ่มหนูทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับอาหารที่ผสมสาร Adenine 0.75% w/w พร้อมด้วยสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ในน้ำดื่ม ค่า Blood urea nitrogen (BUN) และ ค่า Creatinine (Crea) ในซีรัมลดลง และค่า Creatinine clearance ในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ได้รับสาร Adenine (0.75% w/w) แสดงว่าสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ช่วยทำให้ไตทำงานดีขึ้น และป้องกันการทำลายของไตจาก Adenine นอกจากนี้ยังพบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอาหารที่ผสมสาร Adenine พร้อมด้วยสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ 15%, w/v มีค่า Blood urea nitrogen (BUN) และ ค่า Creatinine (Crea) ในซีรัมลดลง และค่า Creatinine clearance ในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ 7.5%, w/v ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายิ่งหนูทดลองได้รับปริมาณสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ที่ความเข้มข้นมากขึ้นยิ่งทำให้การทำงานของไตดีขึ้น

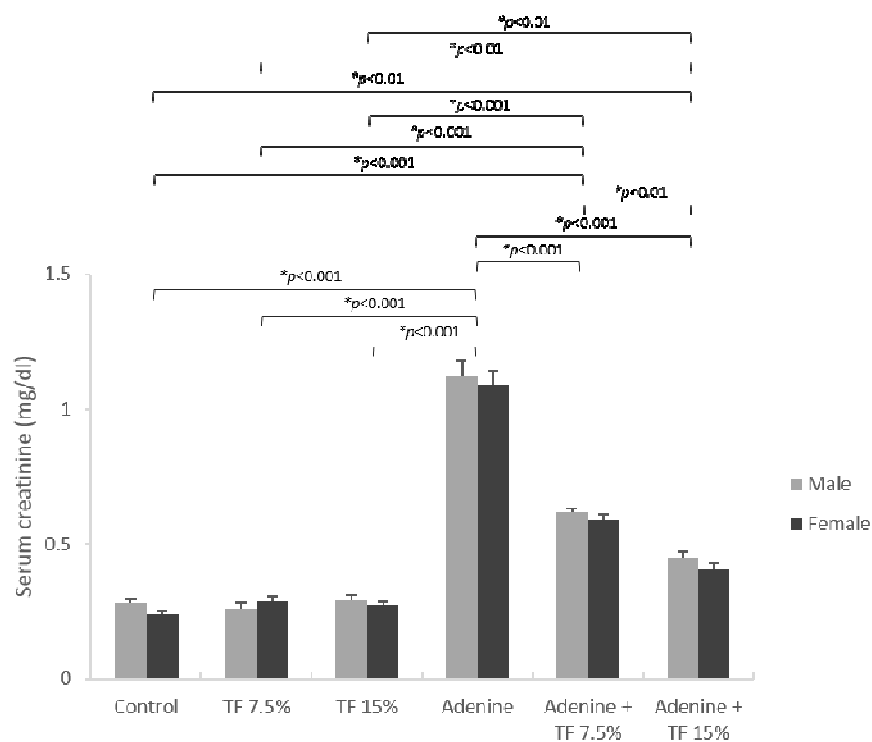
- การตรวจพยาธิสภาพ

จากการตรวจพยาธิสภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะไตของหนูทดลองที่ พบว่า หนูทดลองกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาดจากหญ้าไผ่ทั้ง 7.5%,

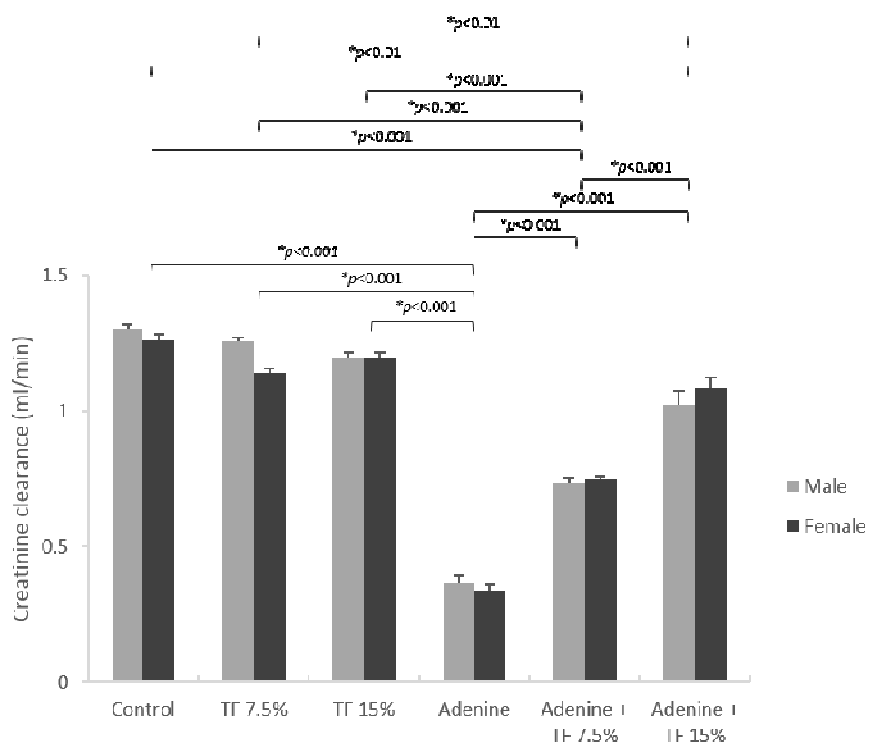
w/v และ 15%, w/v ในน้ำดื่ม ไม่พบรอยโรคและความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่างๆ เยื่อหุ้มไตอยู่ในลักษณะปกติ ไม่พบการทำลายที่เฉพาะเจาะจงของเซลล์ ไม่พบมีการแทรกซึมที่ผิดปกติของเซลล์ ลักษณะท่อไต ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ renal medulla ปกติ ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสาร Adenine (0.75% w/w) พบการเกิด Tubular degeneration หรือเกิดความเสียหายที่บริเวณ tubular ในระดับสูง พบ Neutrophil polymorph infiltration, Tubular necrosis, Hyaline cast, Granular casts, Tubular atrophy และ Interstitial fibrosis อย่างไรก็ตามความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่างๆ ในไต และความผิดปกติต่างๆ เช่น Neutrophil polymorph infiltration, Tubular necrosis, Hyaline cast และ Interstitial fibrosis เป็นต้น ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมสาร Adenine 0.75% w/w พร้อมด้วยสารสกัดอย่างหายาจากหญ้าไผ่ในน้ำดื่ม โดยความเสียหายต่างๆต่อเนื้อเยื่อไตได้ถูกประเมินเป็นค่า Histopathological score ดังแสดงในตารางที่ 11



รูปที่ 15 ค่า Blood urea nitrogen (BUN) ในการทดสอบฤทธิ์ของหญ้าไผ่ต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง (Adenine 0.75% w/w), ค่าที่แสดงในแต่ละคอลัมน์แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SE โดย $n = 5$ ในแต่ละกลุ่ม



รูปที่ 16 ค่า Serum creatinine (B) ในการทดสอบฤทธิ์ของหญ้าฝั่มน้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง (Adenine 0.75% w/w), ค่าที่แสดงในแต่ละคอลัมน์แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SE โดย $n = 5$ ในแต่ละกลุ่ม



รูปที่ 17 ค่า Creatinine clearance ในการทดสอบฤทธิ์ของหญ้าฝั่มน้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง (Adenine 0.75% w/w), ค่าที่แสดงในแต่ละคอลัมน์แสดงเป็นค่า mean $\pm$ SE โดย $n = 5$ ในแต่ละกลุ่ม

ตารางที่ 11 ระดับความรุนแรงของการเกิดพยาธิสภาพในอวัยวะไตในการทดสอบฤทธิ์ของหญ้าไผ่น้ำต่อการเกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรังในสัตว์ทดลอง

Group	Treatment	H-score
1	Control	0
2	TF (7.5% in drinking water, 4 weeks)	0
3	TF (15% in drinking water, 4 weeks)	0
4	Adenine (0.75% in feed, 4 weeks)	3.5
5	Adenine (0.75% in feed) + TF (7.5% in drinking water), 4 weeks	2
6	Adenine (0.75% in feed) + TF (15% in drinking water), 4 weeks	1.5

บทที่ 5

บทวิจารณ์

หญ้าไผ่น้ำที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นพืชที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและสามารถปลูกได้ตามบ้านทั่วไป โดยนำส่วนของใบและลำต้นมาใช้และสกัดด้วยน้ำร้อน ซึ่งใช้วิธีเดียวกับวิธีแบบภูมิปัญญาชาวบ้านที่นำสมุนไพรรักษาโรคไตเบื้องต้น แต่อย่างไรก็ตามเพื่อควบคุมปริมาณและคุณภาพของสารสกัด ผู้วิจัยจึงได้นำน้ำสกัดมาทำให้เย็นจนแข็งตัว และระเหิดเอาน้ำแข็งออกไปจนกลายเป็นผงของสารสกัด แล้วนำผงสารสกัดนี้มาทำการทดสอบพิษเฉียบพลัน ความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง ความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) และกึ่งเฉียบพลัน (Sub-acute toxicity) ในสัตว์ทดลอง และทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองที่เกิดภาวะไตวายชนิดเรื้อรัง ซึ่งแตกต่างจากภูมิปัญญาชาวบ้านที่นำน้ำที่สกัดได้จากหญ้าไผ่น้ำมาบริโภคหรือทำการรักษาเลย

ในการตรวจสอบสารพิษเฉียบพลันในสารสกัดอย่างหายาจากหญ้าไผ่น้ำพบสารพิษ 3 ชนิด คือ ฟีนอล (Phenol) แทนนิน (Tannins) และซาโปนิน (Saponins) โดยสารแทนนินที่พบเป็นสารในกลุ่ม Hydrolyzable tannins ที่มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยกรดฟีนอลิก (Phenolic acids) และน้ำตาล ในปริมาณระดับปานกลาง และพบสารแทนนินในกลุ่ม True tannins ในปริมาณระดับต่ำ นอกจากนี้ฟีนอลและซาโปนินที่พบมีปริมาณในระดับปานกลางและต่ำตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดหญ้าไผ่น้ำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญโดยเปรียบเทียบกับสารเคมีมาตรฐานโดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่า สารสำคัญที่พบมากในสารสกัดอย่างหายาจากหญ้าไผ่น้ำอยู่ในกลุ่มของกรดฟีนอลิก (Phenolic acid) เช่น แทนนิน เป็นต้น ซึ่งจากการตรวจพบสารพิษเฉียบพลันดังกล่าวช่วยยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่สามารถใช้ในการรักษาอาการโรคไต บรรเทาอาการบวม และลดอาการอักเสบของทางเดินปัสสาวะได้ เนื่องจากฟีนอล แทนนิน และซาโปนินมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน และสามารถลดความดันโลหิตสูงได้

แทนนินเป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลซับซ้อน มักเป็นสารผสมของสารจำพวกโพลีฟีนอล (Polyphenols) ประกอบด้วยเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดกัลลิก (Gallic acid) หรือสารประกอบโพลีไฮดริก (Polyhydric compound) จับกับน้ำตาลกลูโคส หรือเกิดจากสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) จับกับสารคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน ได้แก่ กรดแทนนิก (Tannic acid) และฮามามิลแทนนิน (Hamamelitannin) แทนนินเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญมากมาย โดยจากรายงานการศึกษาวินิจฉัยพบว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิด เช่น เปลือกไม้จากต้น *Myracrodruon urundeuva* และต้น *Anacardium occidentale* เป็นต้น ที่มีแทนนินเป็นสารประกอบหลัก มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Antiinflammation) สามารถลดการเกิดแผลหรือต้านแผลเปื่อย (Anti-ulcer) ได้ เนื่องจากแทนนินมีคุณสมบัติต้านการเกิดออกซิเดชัน (Mota *et al.*, 1985; Souza *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าแทนนิน ได้แก่ กรดแทนนิก (Tannic acid) และกรดเอลลาจิก (Ellagic acid) เป็นต้น สามารถลดความดันโลหิตสูงในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความดันโลหิตสูงได้ และยังส่งผลให้ Blood urea nitrogen, Urinary creatinine และปริมาตรของปัสสาวะลดลงด้วย (Bhargava and Westfall, 1969; Turgut Coşan *et al.*,

2015). สำหรับซาโปนินเป็นสารกลุ่มไกลโคไซด์ที่สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและไขมัน จะเกิดเป็นฟองเมื่อนำมาผสมกับสารละลายในน้ำ สารกลุ่มซาโปนินมักมีโครงสร้างเป็นไกลโคไซด์ชนิดไฮโดรฟิลิก (ละลายน้ำ) จับกับสารอนุพันธ์ไตรเทอร์พีนชนิดไลโปฟิลิก (ละลายในไขมัน) มีคุณสมบัติเป็น “adaptogen” ซึ่งช่วยให้ระบบเลือดไหลเวียนดีขึ้น ปรับความสมดุลของความดันโลหิต ป้องกันหลอดเลือด กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลาง มีผลให้รู้สึกมีชีวิตชีวา กระปรี้กระเปร่า และเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน และจากรายงานการศึกษาวิจัยยังพบว่าสารกลุ่มซาโปนินที่สกัดได้จาก *Bupleurum frutescens* และ *Bupleurum rotundifolium* ยังสามารถยับยั้งการอักเสบได้ (Just et al., 1998; Navarro et al., 2001) ซาโปนินที่สกัดจากโสมเวียดนาม *Panax vietnamensis* Ha & Grushv มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน (Huong et al., 1998) และซาโปนินที่สกัดได้จาก *Acorus calamus* L. สามารถลดระดับ Serum cholesterol และ Triglyceride ได้ในหนูทดลองที่กระตุ้นให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง (Dyslipidemia, Hyperlipidemia) (Parab and Mengi, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าคุณสมบัติลด cholesterol (Hypocholesterolemic effect) ของพืชตระกูล Allium species เช่น กระเทียม (Garlic) นั้นน่าจะมาจากคุณสมบัติของซาโปนิน (Wang and Ng, 1999; Matsuura, 2001)

ในการทดสอบความพิษของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำนั้นได้ทำการทดสอบในเซลล์ 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293T) และเซลล์ Normal human embryonic fibroblasts (OUMS-36T-6) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $12,819 \pm 2,179.43$ ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และ $6,470.26 \pm 793.58$ ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ สารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ เช่น สารสกัดจากผักกาดหอมอินเดีย (*Lactuca indica*) มีค่า IC_{50} มากกว่า 800 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ต่อเซลล์ HEK 293T (Park et al., 2014), สารสกัดจากใบของต้นปังกะเล (*Phoenix paludosa* Roxb) มีค่า IC_{50} ระหว่าง 6-500 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ต่อเซลล์ HEK 293T (Samarakoon et al., 2016) เป็นต้น

สำหรับการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำในหนูทดลอง เป็นการประเมินผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์จากการสัมผัสสารในระยะสั้นโดยให้สารเพียงครั้งเดียว และสังเกตอาการของสัตว์ทดลองเป็นระยะเวลาตลอด 2 สัปดาห์ ซึ่งการทดสอบได้เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูทดลอง ซึ่งพบว่าหนูทดลองมีการหายใจปกติ ขับถ่าย ปัสสาวะและอุจจาระปกติ ลักษณะการเคลื่อนไหวเป็นปกติ ไม่พบอาการชัก อาการซึมเศร้า อาเจียน เบื่ออาหาร ไม่พบหนูทดลองตาย ไม่พบอาการเป็นพิษใดๆ มีการเจริญเติบโตปกติ มีผลทางเคมีคลินิกปกติ และหลังจากผ่าชันสูตรตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในที่สำคัญ เช่น คือ หัวใจ ตับ ไต ปอด และม้าม ก็พบว่าไม่ตรวจเจอรอยโรคและความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่างๆ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อหนูทดลองเมื่อได้รับขนาดสูงในระยะเวลานั้น แม้หนูทดลองจะได้รับสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำที่ความเข้มข้นสูงถึง 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ก็ไม่ได้ทำให้หนูทดลองเสียชีวิต ดังนั้นค่า Lethal Concentration (LC_{50}) ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิต ร้อยละ 50 ของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่น้ำจึงมีค่ามากกว่า 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูทดลอง อย่างไรก็ตามถ้ามีค่า LC_{50} มากกว่า 5,000

มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูทดลอง จะไม่มีการทดสอบความเป็นพิษต่อ เพื่อคำนึงถึงสวัสดิภาพและจริยธรรมในการใช้สัตว์ทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่ในหนูทดลองเป็นการประเมินผลกระทบที่ไม่พึงประสงค์จากการสัมผัสสารอย่างต่อเนื่องหรือซ้ำๆ กัน โดยการศึกษาแบบกึ่งเฉียบพลันนี้ได้ออกแบบมาเพื่อประเมินความเป็นพิษของอวัยวะเป้าหมายและความเป็นพิษหลังจากได้รับสารที่สะสมมาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งการทดสอบได้เริ่มต้นที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูทดลอง ซึ่งพบว่าหนูทดลองมีการหายใจปกติ ขับถ่ายปัสสาวะและอุจจาระปกติ ลักษณะการเคลื่อนไหวเป็นปกติ ไม่พบอาการชัก อาการซึมเศร้า อาเจียน เบื่ออาหาร ไม่พบหนูทดลองตายและไม่พบอาการเป็นพิษใดๆ มีค่าทางเคมีโลหิตและโลหิตวิทยาปกติ ยกเว้นค่า Aspartate transferase (AST) ในหนูทดลองเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่มีระดับลดลงเมื่อเทียบกับหนูทดลองเพศผู้กลุ่มควบคุม กลไกการลดลงของ AST นี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเป็นผลมาจากที่ตัวอย่างซีรัมในกลุ่มควบคุมเกิดการ Hemolysis ซึ่งส่งผลให้การวัดค่า Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST) และ Alkaline phosphatase (ALP) สูงกว่าปกติได้ นอกจากนี้สาเหตุที่อาจส่งผลให้ระดับ AST ลดลงในกลุ่มที่ได้สารสกัดจากหญ้าไผ่นั้น อาจมาจากสารประกอบซาโปนินในสารสกัดจากหญ้าไผ่ ซาโปนินเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญมากมาย โดยจากรายงานการศึกษาวิจัยพบว่าซาโปนินนอกจากจะมีฤทธิ์ด้านการอักเสบและต้านการเกิดออกซิเดชันแล้วนั้น ซาโปนินยังมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ตับของหนูทดลองจากการถูกทำลายด้วยสารเคมีได้อีกด้วย ซึ่งมีผลทำให้ค่าเคมีคลินิกในซีรัม เช่น AST, ALT และ ALP ลดลง (Huang *et al.*, 2012) เมื่อทำการผ่าชันสูตรตรวจหาความผิดปกติของอวัยวะภายในที่สำคัญ เช่น หัวใจ ตับ ไต ปอด และม้าม หลังจากทดสอบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่ในหนูทดลอง ก็ไม่พบรอยโรคและความเสียหายต่อเนื้อเยื่อต่างๆ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่เป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อหนูทดลองเมื่อได้รับสารที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูทดลองอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ดังนั้นค่า NOAEL (no-observed-adverse-effect level) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารเคมีที่มากที่สุดที่ได้รับทุกวันแล้วไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย ของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่จึงมีค่าเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนูทดลอง

เนื่องจากในประเทศไทยได้มีการนำหญ้าไผ่มาใช้ในการรักษาและบรรเทาอาการโรคไตวาย แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของหญ้าไผ่ต่อการเกิดโรคไตวายเลย ในเบื้องต้นการพัฒนาหรือการรักษาแนวทางใหม่จำเป็นต้องทำการทดสอบกับสัตว์ทดลองก่อน โดยการกระตุ้นการเกิดไตวายเรื้อรังในสัตว์ทดลองสามารถทำได้หลายวิธี โดยวิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ การให้อาหารที่ผสมสาร adenine 0.75% w/w เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แก่หนูทดลอง โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถสร้างความเสียหายให้แก่ไต เกิดการอุดตันในส่วนของท่อไต ไม่สามารถขับของเสียได้ เกิดเป็นภาวะไตวายเรื้อรังในหนูทดลอง แต่ไม่ทำให้หนูทดลองเสียชีวิต (Adachi *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 1998) โดย Adenine จะถูกเปลี่ยนเป็น 2,8-dihydroxyadenine (DHA) โดยเอนไซม์ Xanthine dehydrogenase เนื่องจาก DHA มีคุณสมบัติในการละลายต่ำ ทำให้เกิดการตกตะกอนใน Proximal tubule เป็นเหตุให้เกิดการ

เสื่อมสภาพของส่วนท่อไต (Renal tubule) และช่องว่างระหว่างเซลล์ไต (Interstitial) (Koeda *et al.*, 1988) ดังนั้นหนูทดลองที่ได้รับสาร Adenine เป็นเวลานานเกิดภาวะฟอสเฟตในเลือดสูง (hyperphosphatemia) ภาวะไฮเปอร์พาราไทรอยด์แบบทุติยภูมิ (Secondary hyperparathyroidism) โรคกระดูก และภาวะแคลเซียมที่เกาะหลอดเลือด (Vascular calcification) (Katsumata *et al.*, 2003) นอกจากนี้มีบางรายงานการวิจัยได้พบว่าการให้อาหารที่ผสมสาร adenine 0.04% w/w เป็นเวลา 38 วัน แก่หนูทดลอง อาจทำให้หนูทดลองบางตัวเกิดเสียชีวิตได้ (Ngai *et al.*, 2005) และบางงานวิจัยได้ รายงานว่าการให้อาหารที่ผสมสาร adenine 0.75% w/w สามารถกระตุ้นการเกิดภาวะไตวายเรื้อรังได้ เหมือนที่เกิดในคน ถึงแม้ว่าหนูทดลองเสียชีวิตถึง 50% (Aoyama *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตามในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ไม่พบการเสียชีวิตของหนูทดลองหลังจากให้อาหารที่ผสมสาร adenine 0.75% w/w เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และจากค่าเคมีคลินิก เช่น Blood urea nitrogen (BUN), Serum creatinine (Crea) และ Creatinine clearance และพยาธิสภาพในไตของหนูทดลองยืนยันได้ว่าเกิดภาวะไตวายเรื้อรังจริง

ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่ต่อการเกิดภาวะไตวายในหนูทดลอง พบว่าสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่นั้นสามารถแก้ไขให้ไตกลับคืนหน้าที่ได้ โดยความเข้มข้นของ สารสกัดหญ้าไผ่น้ำยิ่งมากขึ้นยิ่งช่วยฟื้นฟูไตให้กลับมาทำงานได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งเห็นได้จากหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่ที่ผสมในน้ำดื่ม 15%, w/v มีค่าเคมีคลินิกและพยาธิสภาพของ ไตดีกว่าหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่ที่ผสมในน้ำดื่ม 7.5%, w/v อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่ที่ช่วยฟื้นฟูไตให้กลับมาทำงานได้ดีขึ้นนั้น ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเกิดจากคุณสมบัติของสารพฤกษเคมี 3 ชนิดที่พบใน สารสกัด คือ ฟีนอล (Phenol) แทนนิน (Tannins) และซาโปนิน (Saponins) ทำงานร่วมกัน เนื่องจากฟีนอล แทนนิน และซาโปนินมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชัน และสามารถลดความดันโลหิตสูงได้ ซึ่งจะช่วยป้องกันไตจากการทำลายของสาร Adenine โดยจะเห็นได้จากรายงานการศึกษาวิจัยอื่นๆ ที่พบว่าสารพฤกษเคมีเหล่านี้ช่วยในปกป้องไตจากการถูกทำลาย และช่วยให้ไตทำงานดีขึ้น เช่น Wang และ Hikokichi (1994) รายงานว่าสารสกัดแบบแห้งของ *Herba Ephedra* ที่มีสารแทนนินเป็นส่วนประกอบช่วยลดสารพิษในเลือด ลดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น Blood urea nitrogen, creatinine, methylguanidine, guanidinosuccinic acid, blood phosphate เป็นต้น ในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดไตวายเรื้อรังด้วยสาร Adenine ในขณะที่ Peng และ Guo (2010) รายงานว่าหลังจากผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังที่ไม่มีภาวะมีของเสียคั่ง (Uremia) ได้รับ Total saponins ใน *Panax notoginseng* (PNS) เป็นเวลา 2 เดือน ช่วยลดค่า Blood urea nitrogen, Serum creatinine, Creatinine clearance และ 24-hour urinary protein ส่งผลให้ไตมีการทำงานที่ดีขึ้น

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่มีสารพฤษเคมี 3 ชนิด คือ ฟีนอล (Phenol) แทนนิน (Tannins) และซาโปนิน (Saponins) โดยสารพฤษเคมีที่พบมากที่สุดในการสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่มีอยู่ในกลุ่มของกรดฟีนอลิก (Phenolic acid) เช่น แทนนิน เป็นต้น ซึ่งสารพฤษเคมีดังกล่าวมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญมากมาย เช่น ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชัน และสามารถลดความดันโลหิตสูงได้

เมื่อทดสอบความพิษของสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่ในทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่นั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลองน้อยมาก ไม่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังในสัตว์ทดลอง ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยทั่วไปและไม่ก่อให้เกิดการตายในสัตว์ทดลอง รวมทั้งไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวและไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของอวัยวะภายใน

นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่นั้นสามารถป้องกันอวัยวะไตจากการถูกทำลายโดยสาร Adenine ช่วยทำให้ไตกลับคืนหน้าที่และทำงานได้ดีขึ้น หลังจากสัตว์ทดลองถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรัง ซึ่งจะเห็นได้จากค่า Blood urea nitrogen (BUN), Serum creatinine (Crea) ที่ลดลงและมีค่า Creatinine clearance ที่สูงขึ้น รวมทั้งพบการทำลายของเนื้อเยื่อในไตลดน้อยลง

ดังนั้นสารสกัดอย่างหยาบจากหญ้าไผ่มีความปลอดภัยและสามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาโรคไตวายเรื้อรังได้จริง การทำวิจัยต่อไปในอนาคตควรมีการศึกษาพัฒนาสารสกัดให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชจลนศาสตร์ในสัตว์ทดลอง และการทำวิจัยในคน (Clinical trial) ระยะที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. โรคไตวายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นกว่า 2 เท่าตัว: รัฐควรมีมาตรการป้องกันและเพิ่มการเข้าถึงบริการอย่างเร่งด่วน (2). สารสุขภาพ 2552; 14.
- แพทย์หญิงมาลินี ศรีคำม้วน. โรคไตเรื้อรังใกล้ตัว. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ใกล้หมอ, 2548.
- น.อ.นพ.อนุตตร จิตตินันท์, น.อ.นพ.กลศ ภัคโชตานนท์. การดูแลรักษาผู้ป่วยไตวายเฉียบพลัน. ใน นพ.สมชาย เอี่ยมอ่อง, นพ.เกรียง ตั้งสง่า บรรณาธิการ. โรคไต กลไก พยาธิสรีรวิทยา การรักษา. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ชวนพิมพ์, 2538.
- Adachi Y, Sasagawa I, Tateno T, Tomaru M, Kubota Y, Nakada T. Influence of adenine-induced chronic renal failure on testicular function in the rat. *Andrologia* 1998;30:115–8.
- Aoyama I, Miyazaki T, Niwa T. Preventive effects of an oral sorbent on nephropathy in rats. *Miner Electrolyte Metab* 1999;25:365–72.
- Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 2003; 133(10): 3248S-3254S.
- Bhargava UC, Westfall BA. The mechanism of blood pressure depression by ellagic acid. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1969 Nov;132(2):754-6.
- Del Pero Martinez MA, Martinez AJ. Flavanoid distribution in *Tradescantia*. *Biochem Syst Ecol* 1993; 21: 255-265.
- Deng H, Jin W, Liao X, He Y. Methodology for designing pathological models of acute renal failure. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1998;23: 48–52, 64.
- EPA. OPPTS 870.3800, Reproduction and Fertility Effects, Health Effects Test Guidelines, EPA 712-C-98-208, Washington, DC. 1998a.
- EPA. OPPTS 870.6300, Developmental Neurotoxicity Study, Health Effects Test Guidelines, EPA 712-C-98-239, Washington, DC. 1998b.
- Huang CS, Lii CK, Lin AH, *et al*. Protection by chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nrf2-dependent up-regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes. *Arch Toxicol* 2012.
- Huang Q, Zhang S, Zheng L, He M, Huang R, Lin X. Hepatoprotective effects of total saponins isolated from *Taraphochlamys affinis* against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol*. 2012 Mar;50(3-4):713-8.
- Huong NTT, Matsumoto K, Kasai R, Yamasaki K, Watanabe H. *In vitro* antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 1998; 21: 978–98.

- Just MJ, Recio MC, Giner RM, Cuéllar MJ, M añez S, Bilia AR, Rios JL. Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. *Planta Medica* 1998;64:404–407.
- Katsumata K, Kusano K, Hirata M, Tsunemi K, Nagano N, Burke SK, Fukushima N . Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats. *Kidney Int* 64: 441–450, 2003.
- Koeda T, Wakaki K, Koizumi F, Yokozawa T, Oura H. Early changes of proximal tubules in the kidney of adenine-ingesting rats, with special reference to biochemical and electron microscopic studies. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1988;30:239–246.
- Langeland KA, Cherry HM, McCormick CM, Burks KC. 2008. Identification and biology of non-native plants in Florida's Natural Areas, 2nd ed. Gainesville: University of Florida; 2008: 26.
- Lee EJ, Oh SY, Sung MK. Luteolin exerts anti-tumor activity through the suppression of epidermal growth factor receptor-mediated pathway in MDA-MB-231 ER-negative breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2012.
- Matsuura H. Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutrition* 2001; 131: 1000S–1005S.
- Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, *et al*. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. *Kidney Int* 2004; 66: 1613-21.
- Middleton EJ. Effect of plant flavanoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 1998; 439: 175-82.
- Mota ML, Thomas G, Barbosa Filho JM. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *J Ethnopharmacol.* 1985 Jul;13(3):289-300.
- Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 930-6.
- National Academy Press. Toxicity Testing for Assessment of Environmental Agents: Interim Report. Washington, DC. 2006.
- Navarro P, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Cerdá-Nicol as M, Rios JL. In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*. *Life Sciences* 2001;68,:1199–1206.
- Ngai HH, Sit WH, Wan JM. The nephroprotective effects of the herbal medicine preparation, WH30p, on the chemical-induced acute and chronic renal failure in rats. *Am J Chin Med* 2005;33:491–500.

- OECD. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, Guideline 423. The OECD Guideline for Testing of Chemical 2001.
- OECD. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents Method, Guideline 407. The OECD Guideline for Testing of Chemical 2008.
- Parab RS, Mengi SA. Hypolipidemic activity of *Acorus calamus* L. in rats. *Fitoterapia* 2002; 73: 451–455.
- Park JH, Shin J-H, Roy SK, Park HY. Evaluation of Cytotoxicity, Total Phenolic Content and Antioxidant Innate Reveal Efficient Medications in Native *Lactuca indica*. *Journal of Agricultural Science* 2014; 6(10): 135-146.
- Peng SL, Guo ZA. Effect of total saponins of *Panax notoginseng* on urinary albumin in patients with chronic renal failure. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2010 Dec;22(12):744-6.
- Samarakoon SR, Shanmuganathan C, Ediriweera M, Tennekoon KH, Piyathilaka P, Thabrew I, Silva ED. In vitro Cytotoxic and Antioxidant Activity of Leaf Extracts of Mangrove Plant, *Phoenix paludosa* Roxb. *Trop J Pharm Res* 2016; 15(1): 127-132.
- Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 2004; 351: 159-69.
- Shallie PD, Fakoya FA, Fakunle PB. Study of Acute, Subacute and Chronic Toxicity Test. *Int J Cur Biomed Phar Res* 2012; 2: 272-276.
- Souza SM, Aquino LC, Milach AC Jr, Bandeira MA, Nobre ME, Viana GS. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. *Phytother Res*. 2007 Mar;21(3):220-5.
- Turgut Coşan D, Saydam F, Özbayer C, Doğaner F, Soyocak A, Güneş HV, Değirmenci İ, Kurt H, Üstüner MC, Bal C. Impact of tannic acid on blood pressure, oxidative stress and urinary parameters in L-NNA-induced hypertensive rats. *Cytotechnology*. 2015 Jan;67(1):97-105.
- Wang GZ and Hikokichi O. Experimental study in treating chronic renal failure with dry extract and tannins of herba ephedra. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 1994 Aug;14(8):485-8.
- Wang HX, Ng TB. Natural products with hypoglycaemic, hypotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. *Life Sciences* 1999; 65: 2663–2677.
- Zhang HA, Wang M, Zhou J, *et al*. Protective effect of ginsenoside against acute renal failure and expression of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus. *Physiol Res* 2010; 59: 61-70.

CURRICULUM VITAE

NAME Kanyarat Boonprasert

NATIONALITY Thai

EDUCATION

2005-2012 Ph.D. (Biomedical Sciences)
Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani,
Thailand

2001-2005 B.Sc. Hons. (Medical Technology)
Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathumthani,
Thailand

ACADEMIC EXPERTISE

Environmental Toxicology and Pharmacology, Renal Pharmacology

WORK HISTORY

March 2013

Job title/Position: Lecturer, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat
University

CURRENT POSITION

Lecturer, Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat
University

HONORS & AWARDS

June 2005 – May 2010

Ph.D. Scholarship from The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program,
Thailand Research Fund, Thailand

March 2011

Travel Grant Award, The 11th Southeast Asian Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists and The 84th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society, Yokohama, Japan

October 2015

Travel Grant Award, Japan-Asia Youth Exchange Program in Science (SAKURA Exchange in Science), 2015

MEMBERS OF ACADEMIC SOCIETIES**April 2005-**

Member of the Medical Technology Association of Thailand

Present**January 2011-**

Member of the Pharmacological and Therapeutic Association of Thailand

Present**TRAINING****August 2006**

International Course on Research Ethics, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

February 2009

Short WHO/TDR Training Course for GCP-GCLP, Thammasat University, Pathumthani, Thailand

July 2010

Workshop on Requirements for working with biological material and Radiation safety with unsealed sources, University of Queensland, Brisbane, Australia

March 2014

Workshop on Pharmacokinetics/Pharmacodynamics Modeling, Faculty of Pharmacy, Chaingmai University, Chiangmai, Thailand

June 2015

Training course for Blood Smear Examination and Clinical Correlation, Faculty of Associated Medical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

October 2015

Diploma on Research and Development of Products to Meet Public Health Needs, Nagasaki University, Nagasaki, Japan

SELECTED INTERNATIONAL MEETINGS (Invited Speaker & Meeting Organizer):**February 2013**

Environmental cadmium conference 2013, Chiang Mai, Thailand

INTERNATIONAL RESEARCH PUBLICATION

1. Wisedpanichkij R, Chaijaroenkul W, Sangsuwan P, Tantisawat J, **Boonprasert K**, Na-Bangchang K. *In vitro* antimalarial interactions between mefloquine and cytochrome P450 inhibitors. *Acta Trop* 2009; 112: 12-5.
2. **Boonprasert K**, Ruengweerayut R, Satarug S, Na-Bangchang K. Study on the association between environmental cadmium exposure, cytochrome P450-mediated 20-HETE, heme-oxygenase-1 polymorphism and hypertension in Thai population residing in a malaria endemic areas with cadmium pollution. *Environ Toxicol Pharmacol* 2011; 31: 416-26.
3. **Boonprasert K**, Kongjam P, Limphanachote P, Ruengweerayut R, Na-Bangchang K. Urinary and blood cadmium levels in relation to types of food and water intake and smoking status in Thai population residing in cadmium-contaminated areas in Mae Sot. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2011; 42: 1521-30.
4. **Boonprasert K**, Ruengweerayut R, Audpad R, Na-Bangchang K. Expression of metallothionein isoforms in peripheral blood lymphocytes from Thai population residing in cadmium-contaminated areas in Mae Sot. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012; 34 (3): 935-40.
5. **Boonprasert K**, Satarug S, Morais C, Gobe GC, Johnson DW, Na-Bangchang K, and Vesey DA. The stress response of human proximal tubules cells to cadmium involves up-regulation of haemoxygenase-1 and metallothionein but not cytochrome P450 enzymes. *Toxicology Letters* 2016; 249: 5-14.
6. **Boonprasert K** and Na-Bangchang K (2016). Medicinal plants used in Thailand for treatment of kidney failure. *Manuscript in preparation*.

NATIONAL RESEARCH PUBLICATIONS

1. **Boonprasert K**, Ruengweerayut R, Satarug S, Na-Bangchang K. Genetic polymorphism of heme-oxygenase-1 in Thai population with low environmental cadmium exposure. *Thai Journal of Pharmacology* 2010; 32(1): 225-9.
2. **Boonprasert K**, Ruengweerayut R, Vesey DA, Na-Bangchang K. Role of environmental cadmium exposure, cytochrome P-450-mediate 20-HETE, metallothionein and heme oxygenase-1 polymorphisms on kidney dysfunction and hypertension. *Proceeding in Environmental Cadmium Conference 2013*, Chiang Mai, Thailand. February 14-15, 2013.

OTHER RESEARCH PUBLICATIONS

1. **Boonprasert K**, Wisespanichkij R, Chaijaroenkul W, and Na-Bangchang K (2007). Preliminary investigation of antimalarial activities of cytochrome P450 inhibitors against *Plasmodium falciparum* in vitro. Abstract: The 2nd International Conference on Forensic Science and Medical Science, Narsuan University, Pitsanulok, Thailand, 28-29 July, 2007.
2. **Boonprasert K**, Wisedpanichkij R, Chaijaroenkul W, and Na-Bangchang K (2008). Preliminary investigation of antimalarial activities of cytochrome P450 inhibitors against *Plasmodium falciparum* in vitro. Abstract: The 1st Allied Health Sciences Academic Meeting, Thammasat University, Pathumtanee, Thailand, 20 February 2008.
3. **Boonprasert K**, Ruengweerayut R, Satarug S, and Na-Bangchang K (2010). Study on the association between genetic polymorphism of hemeoxygenase-1 in Thai population with low environmental cadmium exposure. Abstract: The 3rd Allied Health Sciences Academic Meeting, Thammasat University, Pathumtanee, Thailand, 18-20 February 2010.
4. **Boonprasert K** and Na-Bangchang K (2010). Study on polymorphism of heme oxygenase-1 and cytochrome P450, cadmium-induced renal toxicity and hypertension. RGJ-Ph.D. Abstract: Congress XI. Jomtien Beach Resort, Pattaya, Chonburi, Thailand, 1-3 April, 2010.
5. **Boonprasert K**, Ruengweerayut R, Satarug S, and Na-Bangchang K (2011). Study on the association of environmental cadmium exposure, CYP450-mediated 20-HETE, HO-1 polymorphisms and hypertension in Thai population. Abstract: The 11th Southeast Asian Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists and The 84th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society, Yokohama, Japan, 22-24 March 2011.
6. **Boonprasert K**, Na-Bangchang K, Gobe GC, and Vesey DA (2011). Modulation of cytochrome P450, metallothionein and heme-oxygenase-1 by cadmium in primary culture of human proximal tubule cells. Abstract: The 47th Annual Scientific Meeting of the Australian and New Zealand Society of Nephrology, Adelaide Convention Centre, Adelaide, Australia, 19-21 September, 2011.
7. **Boonprasert K**, Chaijaroenkul W, Ruengweerayut R, Satarug S, and Na-Bangchang K (2011). The possible link between metallothionein gene expression and cadmium-induced renal injury in malaria endemic area. Abstract: Joint International Tropical Medicine Meeting. Centara Grand Hotel, Bangkok, Thailand, 1-2 December 2011.

8. **Boonprasert K**, Viyanant V, Vesey DA, Ruengweerayut R, Na-Bangchang (2012). The effect of cadmium through the link of renal cytochrome P450 on hypertension. Abstract: The 34th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. 22-24 March, 2012.
9. **Boonprasert K**, Vesey DA, Satarug S, Gobe GC, Na-Bangchang K. No evidence of a role for renal eicosanoid-producing cytochrome P450 enzymes in cadmium-linked kidney disease. Australasian Society of Clinical and Experimental Pharmacologists and Toxicologist (ASCEPT) – British Pharmacological Society (BPS) Joint Scientific Meeting, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong. 18-21 May, 2015.
10. **Boonprasert K**, Vesey DA, Satarug S, Gobe GC, Na-Bangchang K. No evidence of a role for renal eicosanoid-producing cytochrome P450 enzymes in cadmium-linked kidney disease. The 37th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting, Sunee Grand Hotel & Convention Center, Ubon Ratchathani, Thailand. 28-30 May, 2015.
11. **Boonprasert K**, Plengsuriyakarn T, Thiengsusuk A, Kiettinun S, Na-Bangchang K. Acute and subacute oral toxicity of crude water soluble extract of *Tradescantia fluminensis* in wistar rats. The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting, Berkeley Hotel, Bangkok, Thailand. 1-3 February, 2016.

ONGOING RESEARCH PROJECTS:

1. Study on the property of crude extracts and fraction of *Tradescantia fluminensis* against acute renal failure, National Research Council of Thailand 2013-2016.
2. Pharmacogenetics of Antimalarial Drugs in Acute Uncomplicated Falciparum Malaria, National Research Council of Thailand 2015-2017.
3. Study on absorption, hepatic metabolism and metabolic interactions (inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes) of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC., National Research Council of Thailand 2015-2017.