

พิษกึ่งเฉียบพลัน พิษเฉียบพลันและองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบสดแป๊ะตำปิ้ง

ศศมล ผาสุข¹ ประเสริฐ มีรัตน์²

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1. ศึกษาความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวของหนูขาวหลังจากให้สารสกัด 2. ศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวของหนูถีบจักรหลังจากให้สารสกัด 3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด โดยนำใบสดแป๊ะตำปิ้ง มาสกัดโดยการแช่อยู่ด้วยเอทานอล นำ สารสกัดหยาบที่ได้ไปศึกษาความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน และพิษเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวหนูถีบจักร แยกและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดที่แยกได้ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมทรี (GC-MS)

ผลการวิจัยพบว่า

1. ไม่พบความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวของหนูขาวหลังจากให้สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้ง โดยไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของหนูขาวกลุ่มที่ให้สารสกัด 2.9 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักตัว เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติและกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบ แต่พบว่าน้ำหนักตัวของหนูขาวกลุ่มควบคุมเบาหวาน กลุ่มที่ให้สารสกัด 5.79 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักตัว และกลุ่มที่ให้สารสกัด 11.43 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักตัว มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ($249.6 \pm 14.5^*$ $270.2 \pm 61.9^*$ และ $289.0 \pm 43.9^*$ ตามลำดับ)

2. ไม่พบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้ง โดยมีค่า LD₅₀ เท่ากับ 8 กรัม/กิโลกรัม คิดเป็น 2,800 เท่าของขนาดที่คนได้รับปกติ (200 มิลลิกรัม/น้ำหนัก 70 กิโลกรัม)

3. สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้งมีปริมาณแทนนินทั้งหมด เท่ากับ 2.17 mg of tannic acid/g extract และมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 49.84 mg of rutin/g extract องค์ประกอบทางเคมีของสารที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมทรี พบสาร (+)-Aromadendrene ; 4, 7, 10-Cycloundecatriene, 1, 1, 4, 8-tetramethyl-, cis, cis, cis- ; delta-Cadinene ; 2-Pentadecanone, 6, 10, 14-trimethyl ; Hexadecanoic acid, ethyl ester ; Neophytadiene ; Octadecanoic acid และ 1, 19-Eicosadiene

คำสำคัญ : สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้ง ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน ความเป็นพิษเฉียบพลัน

SUBACUTE TOXICITY, ACUTE TOXICITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF *Gynura divaricata* DC. FRESH LEAVES CRUDE EXTRACT.

Sasamol Phasuk¹ Prasert Meeratana²

Abstract

The work aimed to 1) study subacute toxicity against weight of Spraque-Dawley's rats after received crude extract. 2) acute toxicity was studied against weight of mice after received crude extract and 3) determined chemical composition of *Gynura divaricata* DC. leaves crude extract. Fresh leaves of *Gynura divaricata* DC were macerated and extracted with ethanol. The crude extract was studied subacute toxicity in streptozotocin induced diabetes Spraque-Dawley's rats and acute toxicity in mice. Chemical composition of *Gynura divaricata* DC. fresh leaves crude extract was separated and analyzed by GC-MS.

The results showed as follow:

1. There is no subacute toxicity against weight of rats after feed fresh leaves crude extract. There is no difference in average weight of the rats that feed crude extract 2.9 $\mu\text{g/g}$ b.w as compared with normal control and compared control groups. It was found that the weight of rats in diabetes control and the experimental groups that feed 5.79 and 11.43 $\mu\text{g/g}$ b.w. significantly decreased ($p < 0.05$) ($249.6 \pm 14.5^*$, $270.2 \pm 61.9^*$ and $289.0 \pm 43.9^*$ respectively).
2. There is no acute toxicity found [n *Gynura divaricata* DC. fresh leaves crude extract. The LD_{50} of *Gynura divaricata* DC. crude extract is more than 8 gm/kg which is 2,800 times of the 200 mg/70 kg. b.w.
3. The *Gynura divaricata* DC. fresh leaves crude extract also had total tannin content as 2.17 mg of tannic acid/ g extract and total flavonoid content as 49.84 mg rutin/ g extract. Chemical composition of the extract were analyzed by GC-MS were : (+)-Aromadendrene ; 4, 7, 10-Cycloundecatriene, 1, 1, 4, 8-tetramethyl-, *cis, cis, cis-* ; delta-Cadinene ; 2-Pentadecanone, 6, 10, 14-trimethyl ; Hexadecanoic acid, ethyl ester ; Neophytadiene ; Octadecanoic acid and 1, 19-Eicosadiene.

Keywords: *Gynura divaricata* DC. fresh leaves crude extract., Subacute toxicity, Acute toxicity

¹ Department of Science Education, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage, Pathumthanni

² Faculty of Allied Health Science, Burapa University

บทนำ

ปัจจุบันมีการนำพืชสมุนไพรของไทยมาใช้เป็นยาช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด ในคนที่โรคเบาหวานกันมาก เช่น มะระ บอระเพ็ด ตำลึง กระเจี๊ยบ แก่นตะวัน เห็ดหลินจือ เป็นต้น สมุนไพรได้เข้ามามีบทบาทในการรักษาและควบคุมความรุนแรงของโรคที่มีผลต่อสุขภาพชีวิตของคนไทยได้หลายๆ โรค เบาหวานก็เป็นอีกโรคหนึ่งที่สามารถใช้สมุนไพรในการควบคุมความรุนแรงของโรคได้ (สมุนไพรบำบัดและรักษาโรคเบาหวาน, <http://www.alternativecomplete.com/alternative1.php>) จากการศึกษาค้นคว้าและสอบถามจากผู้ป่วยโรคเบาหวาน พบว่ามีการนำใบสดแป๊ะตำปึงมารับประทาน และพบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ จากการศึกษาวิจัยพบว่าหนูขาวที่ได้รับสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปึง 2.9 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลงจนอยู่ในระดับที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมภายหลังได้รับสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปึงในสัปดาห์ที่ 1 และ 3 (118.0 ± 75.1 และ 155.9 ± 81.8 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะเดียวกันกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 5.79 และ 11.43 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว มีระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตลอดระยะเวลาการศึกษา (ศศมล ผาสุขและประเสริฐ มีรัตน์, 2555) นอกจากนี้ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันและความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดก็เป็นสิ่งที่จะต้องศึกษาวิจัย ซึ่งมีการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปึงจากการตรวจค่าทางชีวเคมีในเลือดของหนูขาวที่ได้รับสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปึงพบว่าสารสกัดไม่มีความเป็นพิษต่อระบบไหลเวียนโลหิต ระบบทางเดินปัสสาวะ ระบบน้ำดี อย่างไรก็ตาม ค่าชีวเคมีของเลือดที่บ่งชี้การทำงานของตับมีระดับสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มควบคุมเบาหวานและกลุ่มทดลองที่สัมพันธ์กับภาวะเบาหวานที่เกิดขึ้น โดยกลุ่มทดลองมีค่าชีวเคมีของเลือด คือ ALP, AST, ALT และ direct bilirubin เพิ่มขึ้น มากกว่ากลุ่มควบคุมเบาหวาน นอกจากนี้ กลุ่มที่ได้รับสารสกัด 2.9 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว มีความเป็นพิษต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ (ศศมล ผาสุขและประเสริฐ มีรัตน์, 2555) แต่สิ่งบ่งชี้ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันและความเป็นพิษเฉียบพลันนอกจากจะศึกษาจากค่าชีวเคมีในเลือดของหนูแล้ว สิ่งที่บ่งบอกได้อีกอย่างหนึ่งคือน้ำหนักตัวของหนู ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวของหนูถีบจักร หลังจากให้สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปึงกับหนูขาวและหนูถีบจักรเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นอกจากนี้องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดก็เป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องทำการศึกษาวิจัยเพื่อจะได้ทราบว่ามีสารใดเป็นองค์ประกอบอยู่ เพราะจะเป็นประโยชน์ในการอธิบายกลไกการเกิดปฏิกิริยาฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษของสาร ซึ่งจากการนำสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปึงมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีและนำสารที่แยกให้เป็นสารบริสุทธิ์ ไปวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีพบว่า มีโครงสร้างเป็นสาร triterpenoidal saponin ชื่อ bellericagenin B 3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranoside (ศศมล ผาสุขและประเสริฐ มีรัตน์, 2555) แต่ยังมีสารที่แยกได้ที่มีปริมาณน้อยมาก (น้อยกว่า 3 มิลลิกรัม) ที่ยังไม่ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรเมตรี เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์สารในปริมาณน้อยมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการวิจัยจะเป็นข้อมูลและประโยชน์ในทางเภสัชวิทยา ในการที่จะนำสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปึงไปพัฒนาเป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานต่อไป ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้ายาจากต่างประเทศ ช่วยส่งเสริมเศรษฐกิจของชาติและทำให้ยาที่มีราคาถูกลง ประเทศสามารถพึ่งพาตนเองด้านสาธารณสุขได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวของหนูขาวหลังจากให้สารสกัดหยาบจากใบสดแป๊ะตำปิ้ง
2. ศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวของหนูถีบจักรหลังจากให้สารสกัดหยาบจากใบสดแป๊ะตำปิ้ง
3. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบสดแป๊ะตำปิ้งที่แยกได้ด้วยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโทรสโกปี

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสารจากใบสดแป๊ะตำปิ้งด้วยวิธีการแช่เย็น
 - ซึ่งใบสดแป๊ะตำปิ้งหนัก 5 กิโลกรัม ใส่ในโหลแก้ว เติมน้ำเอทานอล 10 ลิตร ปิดฝาภาชนะให้สนิทแช่ทิ้งไว้ 7 วัน กรองแยกกากออกและแช่กากซ้ำในเอทานอลอีกครั้ง ทิ้งไว้ 5 วัน กรองแยกกากออก รวมสารสกัดที่ได้ นำสารสกัดเอทานอล มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งสารสกัดหยาบที่ได้
 2. การตรวจองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้ง
 - 2.1 การหาปริมาณแทนนินทั้งหมด (Total tannin)
 - 2.1.1 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง
 - ซึ่งสารสกัดหยาบ 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย 99.9 % เอทานอล ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร
 - 2.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน
 - ซึ่งสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิก (Tannic acid) 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย 99.9 % เอทานอล ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วย 99.9 % เอทานอล ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ (1.0 0.8 0.4 0.2 0.1 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
 - 2.1.3 การเตรียมสารไร้ตัวอย่าง (Blank)
 - ปิเปตน้ำกลั่น 8,500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำ Folin-Ciocalteu reagent 500 ไมโครลิตร เขย่า 1 นาที เติมน้ำ Na_2CO_3 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร
 - 2.1.4 การหาปริมาณแทนนินทั้งหมด
 - ปิเปตน้ำกลั่น 8,400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองปิเปตสารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำ Folin-Ciocalteu reagent 500 ไมโครลิตร เขย่า 1 นาที เติมน้ำ Na_2CO_3 1,000 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร
 - 2.2 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid)
 - 2.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ซังสารละลายมาตรฐานรูทีน (Rutin) 10 มิลลิกรัม ละลายด้วย 80 % เอทานอล ปรับปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาเจือจางด้วย 80 % เอทานอล ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ (1.0 0.8 0.4 0.2 0.1 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

2.2.2 การเตรียมสารไรต์ตัวอย่าง

เปิดน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ที่เวลา 0 นาที เติม 0.3 มิลลิลิตร ของ 5% NaNO_2 ที่เวลา 5 นาที เติม 0.3 มิลลิลิตร ของ 10% AlCl_3 ที่เวลา 6 นาที เติม 2 มิลลิลิตร ของ 1 M NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

2.2.3 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

เปิดสารตัวอย่าง/สารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) ที่เวลา 0 นาที เติม 0.3 มิลลิลิตร ของ 5% NaNO_2 ที่เวลา 5 นาที เติม 0.3 มิลลิลิตร ของ 10% AlCl_3 ที่เวลา 6 นาที เติม 2 มิลลิลิตร ของ 1 M NaOH ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

3. การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวหนูขาวหลังให้สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปึง

3.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาววัยเจริญพันธุ์ สายพันธุ์ Sprague-Dawley ทั้งเพศผู้และเพศเมีย น้ำหนักตัวระหว่าง 200 – 350 กรัม เลี้ยงและวิจัยที่อาคารวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3.2 การเหนี่ยวนำให้หนูขาวเป็นเบาหวาน

งดอาหารและน้ำหนูขาวที่ต้องการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานเป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นสังเกตและบันทึกลักษณะร่างกายและอาการแสดงทั่วไป ซึ่งน้ำหนัก แล้วทำการเจาะเลือดจากปลายหางเพื่อตรวจวัดค่าระดับน้ำตาลในเลือดด้วยชุดตรวจ Acutest แล้วฉีด streptozotocine เข้าทางช่องท้อง ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตรวจวัดค่าระดับน้ำตาลในเลือดด้วยชุดตรวจ Acutest เมื่อครบ 24 ชั่วโมง และสัปดาห์ละครั้งในระยะเวลาต่อไป หนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่า 150 มิลลิกรัม/เดซิลิตร จัดว่าเป็นเบาหวาน

แบ่งหนูขาวแบบสุ่มเลือกทั้งเพศผู้และเพศเมียออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 9 ตัว ได้แก่ กลุ่มควบคุมปกติป้อนน้ำ กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับอนตัวทำลาย Tween 80 กลุ่มควบคุมเบาหวานป้อนตัวทำลาย กลุ่มทดลอง 1 ป้อนสารสกัด 2.9 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักตัว กลุ่มทดลอง 2 ป้อนสารสกัด 5.79 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักตัว และกลุ่มทดลอง 3 ป้อนสารสกัด 11.43 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักตัว ในวันก่อนทำการทดลอง งดอาหารหนูแต่ละกลุ่ม 18 ชั่วโมงแล้วชั่งน้ำหนักหนูขาว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง จนครบ 4 สัปดาห์ บันทึกผล

4. การศึกษาพิษเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวหนูถีบจักรหลังให้สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปึง

4.1 กลุ่มที่ศึกษาโดยวิธีป้อน ใช้หนูถีบจักร 20 ตัว เป็นเพศเมีย 10 ตัว เพศผู้ 10 ตัว แบ่งหนูทั้งสองเพศออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว แต่ละกลุ่มประกอบด้วยเพศละ 5 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ป้อนตัวทำลาย Tween 80 ขนาด 20 มิลลิลิตร/กิโลกรัม กลุ่มที่ 2 ป้อนสารสกัดละลายในตัวทำลาย Tween 80 ขนาด 8 กรัม/กิโลกรัม ปริมาณสารสกัดที่ให้คิดเป็น 2800 เท่าของสารสกัดที่ใช้รับประทานในคนที่ เป็นเบาหวาน (คำนวณจากคนที่ เป็นเบาหวานรับประทานใบสดแป๊ะตำปึงครั้งละ 5 ใบ วันละครั้ง)

4.2 กลุ่มที่ศึกษาโดยวิธีฉีดเข้าช่องท้องใช้หนูถีบจักร 40 ตัว เป็นเพศเมีย 20 ตัว เพศผู้ 20 ตัว แบ่งหนูทั้งสองเพศออกเป็น 4 กลุ่มๆละ 10 ตัว แต่ละกลุ่มประกอบด้วยเพศละ 5 ตัว ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ฉีดตัวทำละลาย Tween 80 ขนาด 20 มิลลิลิตร/กิโลกรัม กลุ่มที่ 2 ฉีดสารสกัดละลายในตัวทำละลาย ขนาด 2.9 ไมโครกรัม/กรัม กลุ่มที่ 3 ฉีดสารสกัดละลายในตัวทำละลาย ขนาด 5.79 ไมโครกรัม/กรัม กลุ่มที่ 4 ฉีดสารสกัดละลายในตัวทำละลาย ขนาด 11.43 ไมโครกรัม/กรัม บันทึกน้ำหนักหนูทุกตัวในวันที่ป้อนและฉีดในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 2

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ศึกษาการกระจายของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk normality test แล้วเปรียบเทียบผลการทดลองทางสถิติของน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองระหว่างกลุ่มด้วย ANOVA test กรณีข้อมูลมีการกระจายปกติ และ Kruskal-Wallis test ในกรณีที่มีข้อมูลมีการกระจายไม่ปกติ และเปรียบเทียบภายในกลุ่มด้วย paired t-test โดยกำหนดความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p < .05$ เปรียบเทียบน้ำหนักตัวของหนูตัวเดียวกับกลุ่มควบคุมโดยใช้ Student-test

6. การแยกองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้งมาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ใช้ซิลิกาเจล MERCK No.7734 เป็นตัวดูดซับ ขั้นตอนการชะคอลัมน์เริ่มจากการใช้ตัวทำละลายเฮกเซนที่มีขั้วต่ำสุดก่อนจากนั้นเพิ่มตัวทำละลายเอทิลเอซีเทตครั้งละ 3 - 20 % จนถึง 100 เปอร์เซ็นต์แล้วใช้เมทานอลเป็นตัวถูกละลายในเอทิลเอซีเทตจนได้เมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์จึงหยุดชะคอลัมน์ เก็บส่วนย่อย (sub fraction) และรวมส่วนย่อยที่เหมือนกันเข้าด้วยกันด้วยเทคนิคแรงคผลขมิ้วบาง

7. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารที่แยกได้

นำสารที่ได้จากการรวมส่วนย่อยที่เหมือนกันที่มีปริมาณมากนำไปแยกให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปี ส่วนสารที่มีปริมาณน้อยมาก (น้อยกว่า 3 มิลลิกรัม) นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี

ผลการวิจัย

1. การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวหนูขาวภายหลังให้สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้ง ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวระหว่างกลุ่มก่อนและหลังให้สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้งในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

กลุ่ม	กลุ่มควบคุม ปกติ		กลุ่มควบคุม เปรียบเทียบ		กลุ่มควบคุม เบาทวาน		กลุ่มทดลอง 1		กลุ่มทดลอง 2		กลุ่มทดลอง 3	
	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4
สัปดาห์	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4
ค่าเฉลี่ย น้ำหนัก (กรัม)	283.7± 21.0	402.0 ±24.3	276.2 ±29.1	378.6 ±30.1	275.5 ±24.9	249.6 ±14.5*	290.9 ±17.4	319.2 ±24.2	302.9 ±19.6	270.2 ±61.9*	291.9 ±17.6	289.0 ±43.9*

Mean ± SD, * = $p < 0.05$

จากตารางที่ 1 พบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของหนูขาวระหว่างกลุ่มก่อนทำการทดลองทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน แต่ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า น้ำหนักตัวของหนูขาวกลุ่มควบคุมเบาหวาน กลุ่มทดลอง 2 และกลุ่มทดลอง 3 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ($249.6 \pm 14.5^*$ $270.2 \pm 61.9^*$ และ $289.0 \pm 43.9^*$ ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติและกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบ (402.0 ± 24.3 และ 378.6 ± 30.1 ตามลำดับ) ในขณะที่เดียวกัน ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของหนูขาวกลุ่มทดลอง 1 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติและกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบ

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวภายในกลุ่มก่อนและหลังให้สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้งในการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

กลุ่ม	กลุ่มควบคุมปกติ		กลุ่มควบคุมเปรียบเทียบ		กลุ่มควบคุมเบาหวาน		กลุ่มทดลอง 1		กลุ่มทดลอง 2		กลุ่มทดลอง 3	
	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4
ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก (กรัม)	283.7 ± 21.0	402.0 ± 24.3*	276.2 ± 29.1	378.6 ± 30.1*	275.5 ± 24.9	249.6 ± 14.5*	290.9 ± 17.4	319.2 ± 24.2*	302.9 ± 19.6	270.2 ± 61.9	291.9 ± 17.6	289.0 ± 43.9

Mean ± SD, * = $p < 0.05$

จากตารางที่ 2 การศึกษาค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวภายในกลุ่มก่อนและหลังให้สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 4 พบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของหนูขาวกลุ่มควบคุมปกติและกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวก่อนและหลังทำการทดลองของหนูขาวกลุ่มควบคุมเบาหวาน กลุ่มทดลอง 2 และกลุ่มทดลอง 3 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวก่อนและหลังทำการทดลองของหนูขาวกลุ่มทดลอง 1 ไม่มีความแตกต่างกัน

2. การศึกษาพิษเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวหนูขาวของสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้ง

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวภายในกลุ่มก่อนและหลังให้สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้งด้วยวิธีป้อนในการศึกษาพิษเฉียบพลัน

กลุ่ม	น้ำหนัก (กรัม)					
	สัปดาห์ที่ 0		สัปดาห์ที่ 1		สัปดาห์ที่ 2	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
ป้อน Tween 80 20 มิลลิตร/กิโลกรัม	39.06	32.66	40.86	35.7	40.64	36.32
ป้อน สารสกัด 8 กรัม/กิโลกรัม	37.54	34.4	40.86	36.36	42.3	37.58

* สารสกัด 8 กรัม/กิโลกรัม คิดเป็น 2,800 เท่าของขนาดที่คนได้รับปกติ (200 มิลลิกรัม/น้ำหนัก 70 กิโลกรัม)

จากตารางที่ 3 การเปรียบเทียบน้ำหนักตัวภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่มของหนูถีบจักรกลุ่มควบคุม (ป้อน Tween 80 ขนาด 20 มิลลิลิตร/กิโลกรัม) และกลุ่มป้อนสารสกัด (ขนาด 8 กรัม/กิโลกรัม) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่า น้ำหนักตัวหนูถีบจักรทั้งเพศผู้และเพศเมียในสัปดาห์ที่ 0 และ สัปดาห์ที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวภายในกลุ่มก่อนและหลังให้สารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้งด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้องในการศึกษาพิษเฉียบพลัน

กลุ่ม	น้ำหนัก (กรัม)					
	สัปดาห์ที่ 0		สัปดาห์ที่ 1		สัปดาห์ที่ 2	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
ฉีด Tween 80 20 มิลลิลิตร/กิโลกรัม	42.24	35.48	-	-	-	-
ฉีด สารสกัด 2.9 ไมโครกรัม/กรัม	40.6	35.42	41.3	35.58	42.86	36.78
ฉีด สารสกัด 5.79 ไมโครกรัม/กรัม	36.46	36.9	38.43	36.28	40.37	35.25
ฉีด สารสกัด 11.43 ไมโครกรัม/กรัม	39.54	39.08	-	-	-	-

*หมายเหตุ หนูถีบจักรกลุ่มที่ฉีด tween 80 และฉีดสารสกัด 11.43 มคก./ก.ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ตายในเวลา 1-3 ชม.ทั้งหมด

จากตารางที่ 4 การเปรียบเทียบน้ำหนักตัวภายในกลุ่มและระหว่างกลุ่มของหนูถีบจักรกลุ่มควบคุม (ฉีด Tween 80 ขนาด 20 มิลลิลิตร/กิโลกรัม) และกลุ่มฉีดสารสกัด (ขนาด 2.9, 5.79 และ 11.43 ไมโครกรัม/กรัม) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่า น้ำหนักตัวหนูถีบจักรทั้งเพศผู้และเพศเมียในสัปดาห์ที่ 0 และ สัปดาห์ที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกัน

3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้ง

พบว่าปริมาณแทนนินทั้งหมดของสารสกัดหยาบใบสดแป๊ะตำปิ้งเท่ากับ 2.17 mg of tannic acid/g extract ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 49.84 mg of rutin/g dry extract แยกสารสกัดหยาบแป๊ะตำปิ้งด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สาร 8 กลุ่ม นำสารกลุ่ม 4 และ 5 ไปแยกให้บริสุทธิ์และนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี พบว่ามีโครงสร้างเป็นสาร triterpenoidal saponin ชื่อ bellericagenin B 3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-glucopyranoside (ศศมล ผาสุขและประเสริฐ มีรัตน์, 2555) สารกลุ่ม 2 พบว่าเป็น stigmaterol สารกลุ่ม 3 เป็นของแข็งไม่ละลายในตัวทำละลายใดๆ จึงไม่ได้ทำการวิเคราะห์ สารกลุ่มที่ 1, 6, 7 และ 8 มีปริมาณน้อยมาก (น้อยกว่า 3 มิลลิกรัม) ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีได้ จึงนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี พบว่ามีองค์ประกอบเป็นสาร (+)-Aromadendrene ; 4, 7, 10-Cycloundecatriene, 1, 1, 4, 8-tetramethyl-, *cis*, *cis*, *cis*-

; delta-Cadinene ; 2-Pentadecanone, 6, 10, 14-trimethyl ; Hexadecanoic acid, ethyl ester ; Neophytadiene ; Octadecanoic acid และ 1, 19-Eicosadiene

สรุปผลและอภิปรายผล

จากการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันต่อน้ำหนักตัวหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน พบว่า สารสกัด 2.9 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว ไม่มีความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน เนื่องจากค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวก่อนและหลังทำการทดลองของหนูขาวไม่มีความแตกต่างกัน อาจเนื่องจากปริมาณสารสกัดที่หนูขาวได้รับมีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัด 5.79 และ 11.43 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักตัว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยของ GUO Ju-Xian และ YANG Xian (2003) ศึกษาในหนูถีบจักร พบว่า การได้รับสารสกัดหยาดแป๊ะตำปึงขนาดต่ำเป็นเวลา 1 เดือน ไม่มีความเป็นพิษ แต่ขนาดสูง (1000 mg/kg) ทำให้เกิดพิษต่อไตและตับได้ โดยพบค่า BUN, creatinine และ ALP เพิ่มขึ้น ตามลำดับ ซึ่งเชื่อว่าเกิดจากพิษสะสม นอกจากนี้สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และคณะ (2551) ศึกษา *in vitro* ในเซลล์ไลน์ชนิด L929 พบว่า สารสกัดในน้ำของแป๊ะตำปึงขนาด 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษ และพบว่าสารสกัดหยาดแป๊ะตำปึง ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang,X.F และคณะ (2000) ที่ศึกษาในหนูถีบจักร โดยการป้อน พบว่ามีค่า LD₅₀ มากกว่า 10,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เช่นเดียวกับ Mahmood, A. A. และคณะ(2010) พบว่าสารสกัดหยาดแป๊ะตำปึงในเอทานอลของแป๊ะตำปึง ไม่มีพิษจากการป้อนในหนูขาว โดยมีค่า LD₅₀ มากกว่า 5 กรัม/กิโลกรัม และจากการศึกษาวิจัยพบว่าสารสกัดหยาดแป๊ะตำปึงมีสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiang Man-hua และคณะ (2009) ที่พบว่าในสารสกัดใบแป๊ะตำปึงมีฟลาโวนอยด์ที่สามารถลดน้ำตาลในเลือดและเพิ่มการต่อต้านภาวะขาดออกซิเจนได้ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang Qi และคณะ (2006) ที่พบว่าในใบแป๊ะตำปึงมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 1.16% ดังนั้นใบสดแป๊ะตำปึงจึงมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาวิจัยต่อยอดโดยศึกษาวิจัยทางคลินิกในผู้ป่วยโรคเบาหวาน เพื่อเป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือดหรือเสริมกับยาแผนปัจจุบันได้

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาวิจัยพัฒนาต่อยอด นำสารสกัดหยาดแป๊ะตำปึงไปศึกษาวิจัยทางคลินิกในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ที่ใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- ศศมล ผาสุขและ ประเสริฐ มีรัตน์. (2555). การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี พิษกึ่งเฉียบพลันและพิษเฉียบพลันของสารสกัดแปะตำปึงที่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวาน. ปทุมธานี สุปัตรา โพธิ์เอี่ยม และคณะ. (2551). การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ที่มีต่อเซลล์ไลน์ชนิด L929 เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาวิทยาศาสตร์ การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 กรุงเทพฯ 29 ม.ค. - 1 ก.พ. 2551 หน้า 709.
- GUO Ju-Xian.,& YANG Xian. (2003) Toxicology Studies on *Gynura divaricate* DC. in the South China Wild Vegetable. FOOD SCIENCE, 24 (12):112-115.
- HUANG Qi~(1,2). *et al.* Determination of Total Flavonoid Content in *Gynura divaricata* (L.) DC.[J]; Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition); 2006-02
- JIANG Man-hua. *et al.* Hypoglycemic and anti-anoxia effect of polysaccharide and flavonoids in *Gynura divaricata* (L.) DC. Chinese Journal of Hospital Pharmacy 2009-13
- Mahmood, A. A. *et al.* (2010). Anti-ulcerogenic activity of *Gynura procumbens* leaf extract against experimentally-induced gastric lesions in rats Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(8), pp. 685-691, 18 April, 2010.
- Zhang, X.F., & B.K. Tan. (2000). Effects of an ethanolic extract of *Gynura procumbens* on serum glucose cholesterol and triglyceride levels in normal and streptomycin-induced diabetic rats. Singapore Med. J. 41: 9-13.
- สมุนไพรบำบัดและรักษาโรคเบาหวาน (ออนไลน์). แหล่งที่มา:
<http://www.alternativecomplete.com/alternative1.php>, 3 พฤศจิกายน 2557.