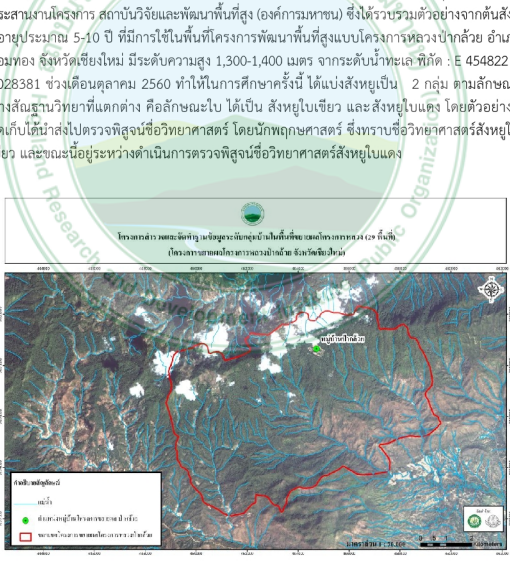
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1

ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่างๆ ของสังหยู่ใบเขียวและใบแดง โดยแยกสารสกัดหยาบของสังหยู่ใบเขียวและใบแดงด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและติดตามฤทธิ์ (bioassay guided isolation) ด้วยฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชัน

4.1.1 เก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างสังหยู่ใบเขียวและสังหยู่ใบแดง จากนั้นนำมาแยกส่วนต่างๆ สังหยู่ใบเขียวได้แก่ ใบ รากปม รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้ สังหยู่ใบแดง ได้แก่ ใบ รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้ จากการเก็บตัวอย่าง โดยได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ประสานงานโครงการ สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ซึ่งได้รวบรวมตัวอย่างจากต้นสังหยู่อายุประมาณ 5-10 ปี ที่มีการใช้ในพื้นที่โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงป่ากล้วย อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ มีระดับความสูง 1,300-1,400 เมตร จากระดับน้ำทะเล พิกัด : E 454822 N 2028381 ช่วงเดือนตุลาคม 2560 ทำให้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แบ่งสังหยู่เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่าง คือลักษณะใบ ได้เป็น สังหยู่ใบเขียว และสังหยู่ใบแดง โดยตัวอย่างที่จัดเก็บได้นำส่งไปตรวจพิสูจน์ชื่อวิทยาศาสตร์ โดยนักพฤกษศาสตร์ ซึ่งทราบชื่อวิทยาศาสตร์สังหยู่ใบเขียว และขณะนี้อยู่ระหว่างดำเนินการตรวจพิสูจน์ชื่อวิทยาศาสตร์สังหยู่ใบแดง



การศึกษาในครั้งนี้ มีจำนวนตัวอย่าง รวม 13 ตัวอย่าง จากสังหยูทั้ง 2 ชนิด และมีการแยกส่วน เป็น ราก (รากที่เป็นปม และรากขนาดใหญ่) กิ่ง (ขนาดใหญ่ และขนาดเล็ก) เปลือกและแก่นหรือเนื้อไม้ และใบ ตามรายละเอียดในตารางที่ 1

4.1.2 การเตรียมวัตถุดิบสมุนไพร

วัตถุดิบสมุนไพรในแต่ละตัวอย่าง นำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำประปา จากนั้นลดขนาดโดยการสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณครึ่งนิ้ว และอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C จนมีความชื้นไม่เกิน 10 % w/w จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบดสมุนไพร ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 1

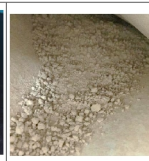
ตารางที่ 1 รายละเอียดการเตรียมตัวอย่างสมุนไพรสังหยู

No.	ตัวอย่าง		น้ำหนักสด (kg)	น้ำหนักแห้ง (kg)
1	สังหยูใบเขียว	ใบ	4.8	2.1
2		รากปม	11	4.8
3		รากใหญ่	33.5	17.5
4		กิ่งใหญ่	15.4	5.4
5		กิ่งเล็ก	3.7	2.1
6		เปลือก	1.3	0.6
7		แก่น	9.9	6.3
8	สังหยูใบแดง	ใบ	7.2	2.8
9		รากใหญ่	16	7.4
10		กิ่งใหญ่	8.0	4.0
11		กิ่งเล็ก	7.9	4.6
12		เปลือก	4.0	1.4
13		แก่น	25.5	14.2

4.1.3 การเตรียมสารสกัด

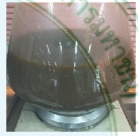
สังหยูทั้ง 13 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างนำมาสกัดด้วยวิธีการต้มด้วยน้ำ (ตามวิธีการใช้ตามภูมิปัญญา) สารสกัดน้ำที่ได้นำไปทำให้แห้งด้วยการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ตามรายละเอียดในแผนภาพที่ 3 และตารางที่ 2 ผลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 กระบวนการเตรียมตัวอย่าง-สารสกัดสมุนไพรสังหยู

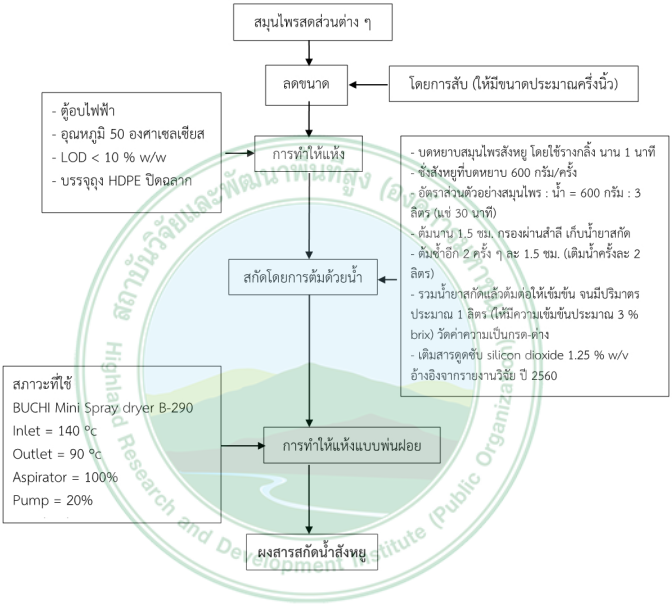
ตัวอย่างสังหยูอบแห้ง		สารสกัด	สารสกัดที่ทำให้แห้ง
สังหยูใบเขียว			
แก่น			
กิ่งเล็ก			
รากปม			
รากขนาดใหญ่ใหญ่			

ตัวอย่างสังหยูอบแห้ง		สารสกัด	สารสกัดที่ทำให้แห้ง
กิ่งใหญ่			
ใบ			
เปลือก			

ตัวอย่างสังหยูอบแห้ง		สารสกัด	สารสกัดที่ทำให้แห้ง
สังหยูใบแดง			
กิ่งใหญ่			
รากขนาดใหญ่			
เปลือก			
แก่น			

ตัวอย่างสังหยูอบแห้ง		สารสกัด	สารสกัดที่ทำให้แห้ง
กิ่งเล็ก			
ใบ			

ลักษณะของสารสกัดที่ได้มีลักษณะเป็นผงแห้งสีน้ำตาลอ่อน-น้ำตาลแดง โดยผลการสกัดจากสังหยูทั้งสองชนิดมีลักษณะทางกายภาพที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ความแตกต่างจะมาจากส่วนที่ใช้ โดยความต่างสารสกัดจากเปลือกพบว่ามีสีเข้มกว่าส่วนอื่น และสารสกัดจากใบที่จะออกสีน้ำตาลแกมเขียว

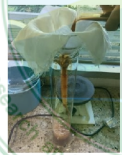


ภาพที่ 3 การเตรียมสารสกัดน้ำของตัวอย่างสังหยู


ชั่งสมุนไพร 600 กรัม เติมน้ำ 3 ลิตร แล้วแช่ทิ้งไว้ 30 นาที



ต้มนาน 1.5 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วกรองด้วยสำลี แล้วนำกากต้มซ้ำอีก 2 รอบ




วัดปริมาตรสารละลายที่ได้ทั้งหมด วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter


เติมสารดูดซับ silicon dioxide 1.25 % w/v แล้วผสมให้เข้ากัน ทำให้แห้งด้วย spray dryer

ภาพที่ 4 การสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการต้ม

ตารางที่ 3 แสดงผลการเตรียมสารสกัดน้ำของสังหยู

ข้อมูลการสกัด								ระยะเวลา spray (hr)	อัตราการ feed (ml/min)	นน.ผงสารสกัด* (g)
ชนิดตัวอย่าง		ปริมาณน้ำที่ใช้ต้มทั้งหมด (L)	ปริมาตรที่ได้ (L)	ปริมาตรหลังทำให้เข้มข้น (L)	%Brix	pH	Cab-O-Sil® ที่ใช้(g)			
สังหยูใบเขียว	รากปม	7	2.60	2.17	3	5	27.12	6.30	5.56	58.29
	รากใหญ่	7	2.50	1.62	3	5	20.25	4.45	5.68	43.31
	กิ่งใหญ่	7	2.50	0.82	3	5	10.25	2.20	5.85	20.76
	กิ่งเล็ก	7	2.40	1.47	3	5	18.37	4.15	5.76	37.30
	เปลือก	7	2.38	2.38	3	5	29.75	7.05	5.60	68.25
	แก่น	7	2.60	0.53	3	5	6.62	1.30	5.88	15.87
	ใบ	14	6.5	3.18	3	5	39.75	9.30	5.57	101.19
สังหยูใบแดง	รากใหญ่	7	2.30	1.37	3	5	17.12	4.10	5.48	37.21
	กิ่งใหญ่	7	2.40	0.65	3	5	8.12	2.00	5.41	17.63
	กิ่งเล็ก	7	2.30	0.96	3	5	12.00	3.00	5.33	6.68
	เปลือก	7	2.50	2.50	3	5	31.25	8.00	5.20	68.02
	แก่น	7	3.10	0.52	3	5	6.50	1.35	5.47	13.47
	ใบ	14	6.00	2.80	3	5	35.00	9.00	5.18	79.71

*เป็นน้ำหนักของสารสกัด+น้ำหนัก Cab-O-Sil®

สำหรับสังหยู่ใบเขียวส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No. 3) จะทำการสกัดด้วย 95 % Ethanol โดยการสกัดต่อเนื่อง (Soxhlet's extraction) สกัดจนสมบูรณ์ สารสกัดที่ได้ นำมาทำให้แห้งด้วย rotary evaporator กากนำมาสกัดด้วยน้ำ ด้วยวิธีการ reflux สารสกัดน้ำที่ได้ นำมาทำให้แห้งด้วย spray dryer ซึ่งตัวอย่างสังหยู่ใบเขียวส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No. 3) จะเป็นตัวอย่างที่นำไปแยกส่วนเพื่อติดตามฤทธิ์ ที่ดำเนินการไปพร้อม ๆ กับการทดสอบตัวอย่างอื่น ผลที่ได้ แสดงในตารางที่ 4-5

ในกระบวนนี้ได้ทำการสกัดเพื่อให้ได้สารองค์ประกอบทั้งหมดที่มีในสังหยู ทั้งที่มีความเป็นขั้วต่ำจนถึงขั้วสูง หลังจากนั้นจึงนำสารสกัดในส่วนนี้มาแยกส่วนตามความเป็นขั้วตัวทำละลายต่างๆ เพื่อตรวจสอบหาส่วนสกัดที่ฤทธิ์ดีเพื่อติดตามหาสารออกฤทธิ์ต่อไป แต่ในตัวอย่างอื่น (ส่วนที่ใช้ที่แตกต่างจากการศึกษาเดิม) ใช้วิธีสกัดเลียนแบบการใช้ตามข้อมูลที่ชุมชนใช้จริง

ตารางที่ 4 แสดงผลการสกัดสังหยู่ใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ด้วยวิธี Soxhlet's extraction

น้ำหนักพืช (g)	95% EtOH (ml)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (g)	% Yield (w/w)
400	6,000	20.43	5.10

ตารางที่ 5 แสดงผลการสกัดสังหยู่ใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ด้วยวิธี Reflux

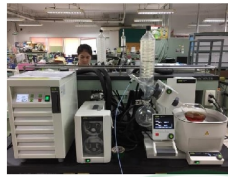
น้ำหนักพืช (g)	ปริมาณน้ำที่ใช้ (ml)	ปริมาตรหลังกรอง (ml)	ปริมาตรก่อน spray dry* (ml)	% Brix	Cab-O-Sil® ที่ใช้ (g)	น้ำหนักผงที่ได้(g)	% Yield (w/w)
387	4,000	3,070	770	3	9.62	20.83	5.38

* ก่อนการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย สารสกัดน้ำที่ได้นำไปทำให้เข้มข้นด้วย Rotary evaporator ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

การสกัดสังหยู่โดยการสกัดต่อเนื่องด้วย Soxhlet's apparatus

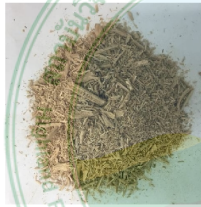
สังหยู่ใบเขียว (รากขนาดใหญ่)

สกัดต่อเนื่องด้วย Soxhlet's apparatus



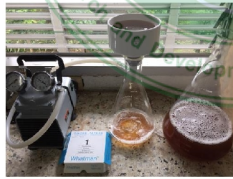
ระเหยแห้งด้วย Rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบเข้มข้น

การสกัดสังหยู่ใบเขียวและใบแดงด้วย Reflux extraction



ลักษณะภากสังหยูภายหลังจากการสกัดด้วยแอลกอฮอล์

การสกัดด้วย Reflux extraction



กรองสารสกัดน้ำด้วยชุดกรอง

สารสกัดน้ำที่ได้

ทำให้แห้งด้วย spray dryer

ผงสารสกัดน้ำของสังหยูใบเขียวจากส่วนราก

4.1.4 การแยกและการทำให้บริสุทธิ์ควบคู่กับการตรวจสอบฤทธิ์

สารสกัดจากสังหยูใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ในส่วนของ 95 % Ethanol และสารสกัดน้ำ นำมาแยกสารสำคัญควบคู่กับการตรวจสอบฤทธิ์ โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี หรือการสกัดแยกด้วย partition technique

ซึ่งในการแยกส่วนเบื้องต้น สำหรับการทดสอบฤทธิ์เปรียบเทียบกับสารสกัดน้ำจากทั้ง 13 ตัวอย่าง ตามรายละเอียดในตารางที่ 1-2 นั้น ใช้วิธีการสกัดแยกส่วนด้วย partition technique ด้วยตัวทำละลาย *n*-hexane และ $CHCl_3$ ตามลำดับ สารสกัดหยาบในส่วนของ *n*-hexane, $CHCl_3$ และ aqueous ethaol นำไปทำให้แห้งด้วย rotary evaporator ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการสารสกัดหยาบสังหยูใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ที่ได้จากการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (g)
สารสกัดหยาบแอลกอฮอล์จากสังหยูใบเขียว ส่วนรากขนาดใหญ่	15
n-Hexane crude extract	3.08
$CHCl_3$ crude extract	2.89
Aqueous ethanol crude extract	4.98

จากการเตรียมตัวอย่าง และสารสกัดน้ำจากสังหยูทั้ง 2 กลุ่ม คือส่วนต่างๆ ของสังหยูใบเขียว และ สังหยูใบแดง รวมทั้งการสกัดแยกส่วนสารสกัดหยาบแอลกอฮอล์จากจากสังหยูใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ได้รวบรวมตัวอย่างส่งทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั้งหมด 17 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดในตารางที่ 7

การสกัดแยกสารสกัดหยาบแอลกอฮอล์จากจากสังหยูใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ด้วย partition technique

ลักษณะ *n*-Hexane crude extract

ลักษณะ $CHCl_3$ crude extract

ลักษณะ Aqueous ethanol crude extract)

ภาพที่ 5 การสารสกัดหยาบสังหยูใบเขียว ส่วนรากที่มีขนาดใหญ่ (No.3) ที่ได้จากการสกัดแยกด้วยตัวทำละลายต่างๆ

ตารางที่ 7 ตัวอย่างของสารสกัดสังหยูที่ส่งทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

หมายเลขตัวอย่าง	รายละเอียด	น้ำหนัก (g)
1	สารสกัดหยาบแอลกอฮอล์จากสังหยูใบเขียว ส่วนรากขนาดใหญ่	1.50
2	*n*-Hexane crude extract	2.20
3	$CHCl_3$ crude extract	2.11
4	Aqueous ethanol crude extract	2.58
5	สังหยูใบเขียว (รากปม) Spray dry: water extract	1.50
6	สังหยูใบเขียว (รากใหญ่) Spray dry: water extract	1.50
7	สังหยูใบเขียว (กิ่งใหญ่) Spray dry: water extract	1.50
8	สังหยูใบเขียว (กิ่งเล็ก) Spray dry: water extract	1.50
9	สังหยูใบเขียว (เปลือก) Spray dry: water extract	1.50
10	สังหยูใบเขียว (แก่น) Spray dry: water extract	1.50
11	สังหยูใบเขียว (ใบ) Spray dry: water extract	1.50
12	สังหยูใบแดง (รากใหญ่) Spray dry: water extract	1.50
13	สังหยูใบแดง (กิ่งใหญ่) Spray dry: water extract	1.50
14	สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก) Spray dry: water extract	1.50
15	สังหยูใบแดง (เปลือก) Spray dry: water extract	1.50
16	สังหยูใบแดง (แก่น) Spray dry: water extract	1.50
17	สังหยูใบแดง (ใบ) Spray dry: water extract	1.50

4.2 ศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชัน และฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง *(in vitro)*

จากส่วนต่างๆ ของสังหยูใบเขียว ได้แก่ ใบ รากปม รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้ และสังหยูใบแดง ได้แก่ ใบ รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้ ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้ดำเนินการศึกษาฤทธิ์ของส่วนสกัดแล้วตามตารางที่ 7

4.2.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.2.1.1 การทดลองฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH[5]

จากการศึกษาฤทธิ์ antioxidant activity ของสารสกัดสังหยูกับสารมาตรฐาน (Gallic acid) โดยใช้การทดลอง DPPH และ superoxide radical scavenging assays ซึ่งในการทดลองจะใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน แล้วใช้สถิติ one-way ANOVA และ post hoc test เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของสารสกัดกับ gallic acid ซึ่งค่าที่จะเลือกไปทำการทดลองต่อไปคือ ค่าที่ให้ผล IC_{50}ไม่ต่างจาก gallic acid หรือให้ผลใกล้เคียงกับ gallic acid มากที่สุด เนื่องจากจะเป็นตัวที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดี ผลการทดลองดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant activity ของสังหยู

Samples		IC_{50} (ug/ml)	
		DPPH	Superoxide
No.1	Crude extract	44.20 ± 2.3***	259.29 ± 28.9***
No.2	Hexane extract	233.80 ± 21.7***	593.46 ± 9.7***
No.3	Chloroform extract	57.00± 1.6***	417.73 ± 10.1***
No.4	Ethanol extract	32.40± 1.5**	58.87 ± 5.2
No.5	สังหยูใบเขียว (รากปม)	145.27± 7.8***	462.35 ± 34.6 ***
No.6	สังหยูใบเขียว (รากใหญ่)	58.76± 4.1***	118.60 ± 10.4 ***
No.7	สังหยูใบเขียว (กิ่งใหญ่)	43.48± 1.8***	57.35 ± 3.9
No.8	สังหยูใบเขียว (กิ่งเล็ก)	60.47± 5.2***	77.24 ± 1.2 *
No.9	สังหยูใบเขียว (เปลือก)	21.63± 1.9*	39.95 ± 1.2
No.10	สังหยูใบเขียว (แก่น)	38.09± 4.6***	59.70 ± 2.8
No.11	สังหยูใบเขียว (ใบ)	56.17± 3.5***	48.86 ± 4.9
N.o.11.1	สังหยูเขียว(ใบ) Ethyl acetate fraction	35.3 ± 2.1 ***	49.7 ± 3.0
N.o.11.2	สังหยูเขียว(ใบ) Butanol fraction	45.7± 0.7 ***	47.4 ± 2.4
N.o.11.3	สังหยูเขียว(ใบ) Water fraction	68.8± 10.9 ***	80.6 ± 9.7 *
No.12	สังหยูใบแดง (รากใหญ่)	54.07± 2.4***	77.14 ± 5.8*
No.13	สังหยูใบแดง (กิ่งใหญ่)	28.48± 2.4**	38.91± 2.3
No.14	สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก)	28.78± 3.7**	49.47± 2.9
No.15	สังหยูใบแดง (เปลือก)	24.77± 3.2*	47.74 ± 2.0
No.16	สังหยูใบแดง (แก่น)	30.47± 3.5**	48.15 ± 4.6
No.17	สังหยูใบแดง (ใบ)	76.78± 6.9***	53.24 ± 5.8
No.18	สารบริสุทธิ์ Gallic acid (Positive control)	2.70	23.18 ± 3.9

ผลการศึกษาฤทธิ์ antioxidant activity ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของสังหยู

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ antioxidant activity จากการทดลอง DPPH radical scavenging assay ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของสังหยู พบว่า

สารสกัดสังหยูใบเขียวที่มีฤทธิ์ antioxidant activity ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดส่วนที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) สารสกัดส่วนที่ 11.1 สังหยูใบเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction สารสกัดส่วนที่ 10 สังหยูใบเขียว (แก่น) สารสกัดส่วนที่ 7 สังหยูใบเขียว (กิ่งใหญ่) และสารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูใบเขียว (ใบ) Butanol fraction ตามลำดับ

ส่วนในสารสกัดสังหยูใบแดงที่มีฤทธิ์ antioxidant activity ดีที่สุด 5 อันดับแรกได้แก่ สารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) สารสกัดที่ 13 สังหยูใบแดง (กิ่งใหญ่) สารสกัดที่ 14 สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก) สารสกัดที่ 16 สังหยูใบแดง (แก่น) และสารสกัดที่ 12 สังหยูใบแดง (รากใหญ่) ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ antioxidant activity จากการทดลอง superoxide radical scavenging assay ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของสังหยูแล้ว พบว่าสารสกัดสังหยูใบเขียวที่มีฤทธิ์ antioxidant activity ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดส่วนที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) สารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction สารสกัดส่วนที่ 11 สังหยูใบเขียว (ใบ) สารสกัดส่วนที่ 11.1 สังหยูเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction และสารสกัดส่วนที่ 7 สังหยูใบเขียว (กิ่งใหญ่) ตามลำดับ ส่วนในสารสกัด สังหยูใบแดงที่มีฤทธิ์ antioxidant activity ดีที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ สารสกัดที่ 13 สังหยูใบแดง (กิ่งใหญ่) สารสกัดที่ 15สังหยูใบแดง (เปลือก) สารสกัดที่ 16 สังหยูใบแดง (แก่น) สารสกัดที่ 14 สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก) และสารสกัดที่ 17 สังหยูใบแดง (ใบ) ตามลำดับ

ผลการศึกษาฤทธิ์ antioxidant activity ของสารสกัดหยาบและสารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ (Crude extract, Ethanol extract, Hexane extract, Chloroform extract)

จากผลการทดลองการศึกษาฤทธิ์ antioxidant activity โดยใช้การทดลอง DPPH และ superoxide radical scavenging assay แล้ว พบว่าในสารสกัดหยาบ (crude extract) และสารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ ของสังหยูอีก 3 ชนิด สารสกัดเอทานอล (ethanol extract) จะมีฤทธิ์ anti-oxidant activity ดีกว่าสารสกัดหยาบและสารสกัดจากตัวทำละลายชนิดอื่นๆ เช่น Hexane/chloroform extract

4.2.2 การศึกษาผลของสารทดสอบต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง

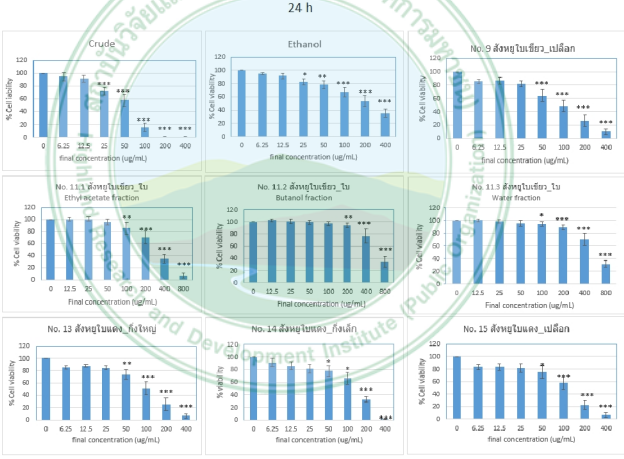
4.2.2.1 โดยวิธี Cell proliferation assay

ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากบ่มเซลล์กับสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์เกิดการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือสารสกัด Crude extract และ Ethanol extract ที่ความเข้มข้น 25-400 µg/mL สารสกัดสังหยูใบเขียว ส่วนที่ 9 (เปลือก) ซึ่งทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 50-400 µg/mL สารสกัดที่ 11.1 สังหยูใบเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction และสารสกัดที่ 11.3 สังหยูใบเขียว (ใบ) Water fraction ทำให้เซลล์เกิดการตายในช่วงความเข้มข้น 100-800 µg/mL ส่วนสารสกัดที่ 11.2 สังหยูใบเขียว (ใบ) Butanol fraction ทำให้เซลล์เกิดการตายของเซลล์ในช่วงความเข้มข้น 200-800 µg/mL ส่วนผลของสารสกัดสังหยูใบแดงต่อการตายของเซลล์พบว่า สารสกัดที่ 13 สังหยูใบแดง (กิ่งใหญ่) สารสกัดที่ 14 สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก) และสารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) ที่ความเข้มข้น 50-400 µg/mL ทำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการตายของเซลล์จะเป็นแบบ concentration response ดังผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 6

ส่วนผลการทดลองที่เวลา 48 ชั่วโมงแสดงในรูปที่ 7 สำหรับสารสกัดสังหยูใบเขียวพบว่าสารสกัดสังหยูที่เป็น Crude extract ที่ความเข้มข้น 50-400 µg/mL และสารสกัดส่วน Ethanol extract ในช่วงความเข้มข้นในช่วง 100-400 µg/mL ทำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ

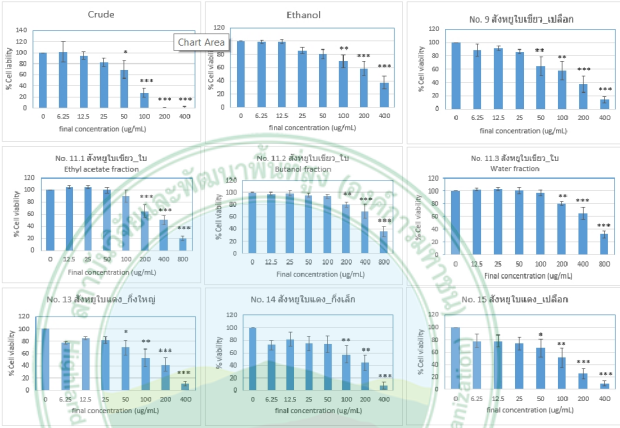
ทางสถิติ สารสกัดสังหยู่ใบเขียวส่วนที่ 9 (เปลือก) ทำให้เกิดการตายของเซลล์ในช่วงความเข้มข้นในช่วง 50-400 µg/mL สารสกัดที่ 11.1 สังหยู่ใบเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction สารสกัดที่ 11.2 สังหยู่ใบเขียว (ใบ) Butanol fraction และสารสกัดที่ 11.3 สังหยู่ใบเขียว (ใบ) Water fraction ทำให้เซลล์เกิดการตายในช่วงความเข้มข้น 200-800 µg/mL ส่วนผลของสังหยู่ใบแดงต่อการตายของเซลล์พบว่า ที่ความเข้มข้น 50-400 µg/mL สารสกัดที่ 13 สังหยู่ใบแดง (กิ่งใหญ่) และสารสกัดที่ 15 สังหยู่ใบแดง (เปลือก) ทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สารสกัดที่ 14 สังหยู่ใบแดง (กิ่งเล็ก) มีผลต่อการตายของเซลล์ในช่วงความเข้มข้น 100-400 µg/mL

ทั้งนี้ ไม่ได้นำ Hexane/chloroform extract มาทดลอง เนื่องจากผลการทดลองต้านออกซิเดชั่นของสารสกัดทั้งสองชนิดนี้ ให้ผลไม่ดี (ตารางที่ 8)



ภาพที่ 6 ผลของสารสกัดสังหยู่ส่วนต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์ LX-2 ที่เวลา 24h ข้อมูลแสดงในรูปของ mean±SEM จากการทำ 3 ครั้ง

48 h



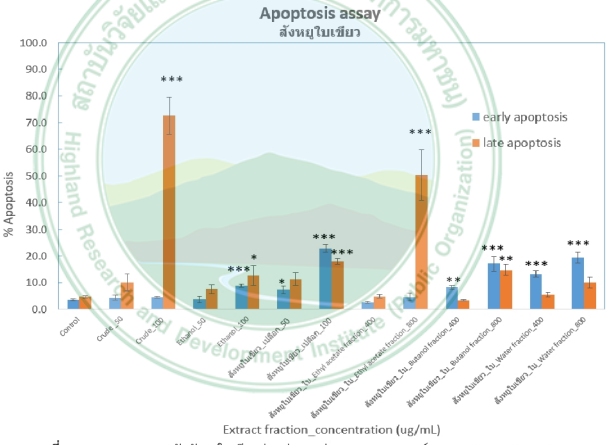
ภาพที่ 7 ผลของสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์ LX-2 ที่เวลา 48 h ข้อมูลแสดงในรูปของ mean±SEM จากการทำ 3 ครั้ง

จากผลการทดลอง Cell proliferation assay (หรือ cytotoxicity assay) สรุปได้ว่า จะนำสารสกัดในความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไปทดสอบ apoptosis assay ต่อไป

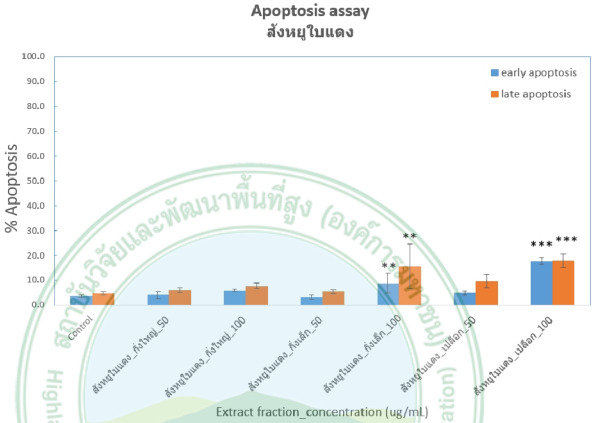
4.2.2.2 โดยวิธี Apoptosis analysis

สำหรับสังหยูเขียว จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของสารสกัดทุกส่วนที่ความเข้มข้น 25 μg/mL ไม่มีผลต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์ LX-2 ส่วนที่ความเข้มข้นของสารสกัด 50 μg/mL จะเริ่มเห็นการเกิด apoptosis ในเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัดที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) และเห็นการเกิด apoptosis มากที่สุดที่ความเข้มข้น 100 μg/mL สารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูใบเขียว (ใบ) Butanol fraction และสารสกัดส่วนที่ 11.3 สังหยูใบเขียว (ใบ) Water fraction จะใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงถึง 400 และ 800 μg/mL จึงจะเห็นการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่สารสกัดส่วนที่ 11.1 สังหยูใบเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction ไม่มีผลต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์นี้

การศึกษาในสังหยูแดงพบว่า สารสกัดที่ 14 สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก) และสารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) ทำให้เซลล์เกิด apoptosis อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ในขณะที่สารสกัดส่วนอื่นๆ ค่าเพิ่มขึ้นไม่ชัดเจน ไม่ต่างจากเซลล์ควบคุม ในการทดลองนี้สารสกัด crude extract และสารสกัดที่ 11.1 สังหยูใบเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis โดยรวมสูงที่สุด แต่การตายของเซลล์เป็นแบบ late apoptosis สารสกัดที่น่าสนใจได้แก่ สารสกัดที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) สารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูใบเขียว (ใบ) Butanol fraction สารสกัดส่วนที่ 11.3 สังหยูใบเขียว (ใบ) Water fraction และสารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) ซึ่งให้ผลการเกิด apoptosis ที่ดี โดยเห็นทั้ง early apoptosis และ late apoptosis ดังผลการทดลองซึ่งแสดงในรูปที่ 8 และ 9 ตามลำดับ



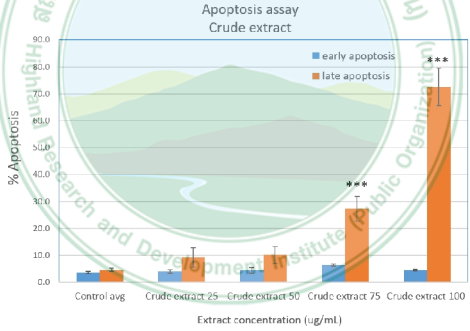
ภาพที่ 8 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบเขียวส่วนต่าง ๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis



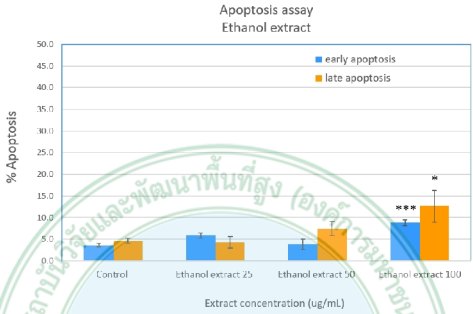
ภาพที่ 9 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบแดงส่วนต่าง ๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด เซลล์จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis มากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 10-18 ในการทดลองนี้สารสกัด crude extract ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis โดยรวมสูงที่สุด แต่เมื่อดูข้อมูลแยกระหว่าง early apoptosis และ late apoptosis พบว่าเปอร์เซ็นต์ late apoptosis สูงมากถึง 72.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจจะเกิดจากความเป็นพิษของสารสกัดเองทำให้เซลล์เริ่มจะตาย จึงได้ลองลดความเข้มข้นของสารสกัดดูเพื่อจะดูว่าเปอร์เซ็นต์ early apoptosis จะเพิ่มขึ้นหรือไม่ พบว่าที่ความเข้มข้น 75 µg/mL สารสกัด Crude extract ทำให้เซลล์ตายแบบ late apoptosis มากขึ้น 27 เปอร์เซ็นต์ แต่การตายแบบ early apoptosis ยังคงไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 10) ส่วนสารสกัด Ethanol จะเห็นการตายแบบ apoptosis ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL (ภาพที่ 12) สารสกัดทุกส่วนที่ความเข้มข้น 25 µg/mL จะไม่มีผลต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์ LX-2 ส่วนที่ความเข้มข้นของสารสกัด 50 µg/mL จะเริ่มเห็นการเกิด apoptosis อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัดที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) และการเกิด apoptosis จะเห็นได้ชัดเจนที่สุดที่ความเข้มข้น 100 µg/mL (ภาพที่ 12) ในการทดลองนี้สารสกัดส่วนที่ 11.1 สังหยูใบเขียว (ใบ) Ethyl acrtate fraction มีรูปแบบการเกิด apoptosis คล้าย Crude extract เนื่องจากมีเปอร์เซนต์การเกิด late apoptosis ที่สูงมากแต่ไม่มี early apoptosis (ภาพที่ 13) สารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูใบเขียว (ใบ) Butanol fraction ที่ความ

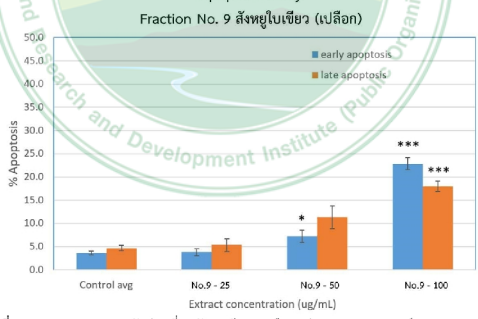
เข้มข้น 400 และ 800 µg/mL ทำให้เซลล์เกิด apoptosis อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 14-15) ในขณะที่ความเข้มข้น 200 µg/mL ค่าไม่ต่างจากเซลล์ควบคุม ส่วนการศึกษาในสังหยูใบแดงพบว่า สารสกัดที่ 14 สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก) สารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) พบว่าที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ทำให้เซลล์เกิดการตายทั้งแบบ early apoptosis และ late apoptosis อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 17-18) สารสกัดที่ให้ผลดีที่สุดในการทดลองได้แก่สารสกัดที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) และสารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) ซึ่งให้ผลการเกิด apoptosis ที่ดี โดยเห็นทั้ง early apoptosis และ late apoptosis โดยสารสกัดที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ early apoptosis โดดเด่นกว่าสารสกัดอื่น ส่วนสารสกัดที่ 11.2 และ 11.3 ที่ความเข้มข้นขนาดสูง 800 µg/mL ก็เป็นส่วนที่น่าสนใจเนื่องจากทำให้เซลล์เกิดการตายทั้งแบบ early apoptosis และ late apoptosis ได้เช่นเดียวกับสารสกัดส่วนที่ 9 และ 15 ส่วนสารสกัดที่ 13 สังหยูใบแดง (กิ่งใหญ่) ไม่ทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis เลย (ภาพที่ 16) ส่วนผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis ของสารสกัดสังหยูใบเขียวและสังหยูใบแดงส่วนต่างๆ แสดงในภาพที่ 19-22



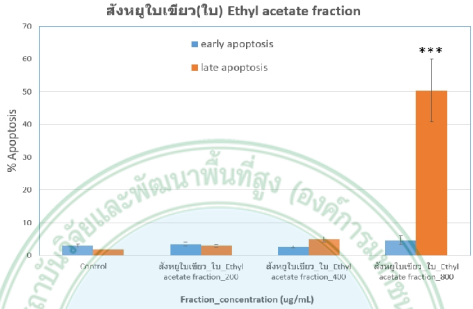
ภาพที่ 10 แสดงผลของสารสกัดสังหยู Crude extract ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis



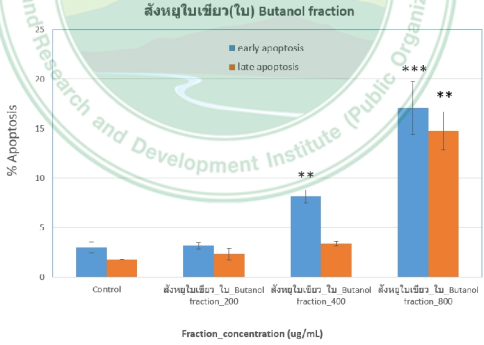
ภาพที่ 11 แสดงผลของสารสกัดสังหยู Ethanol extract ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis



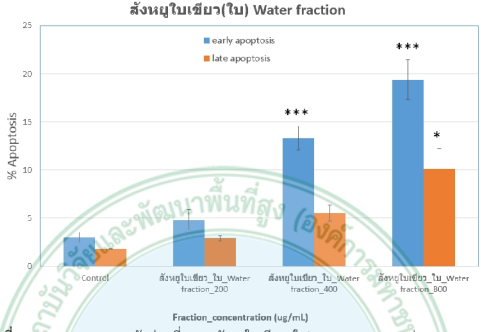
ภาพที่ 12 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 9 สังหยูเขียว (เปลือก) ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis



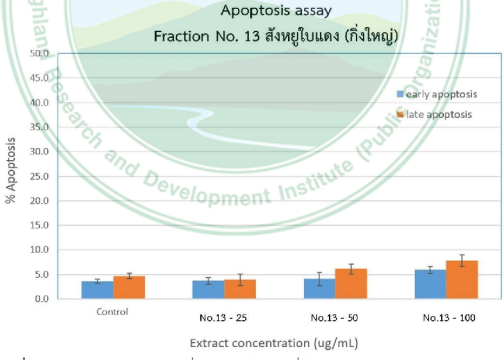
ภาพที่ 13 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.1 สังหยูเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis



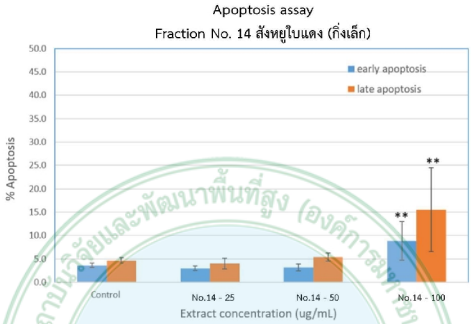
ภาพที่ 14 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis



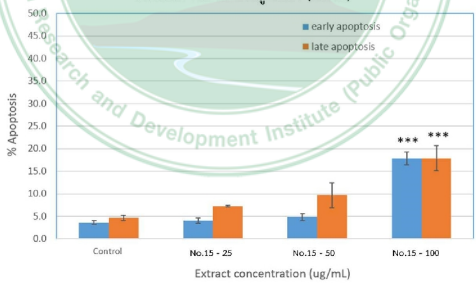
ภาพที่ 15 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.3 สังหยูใบเขียว (ใบ) Water fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis



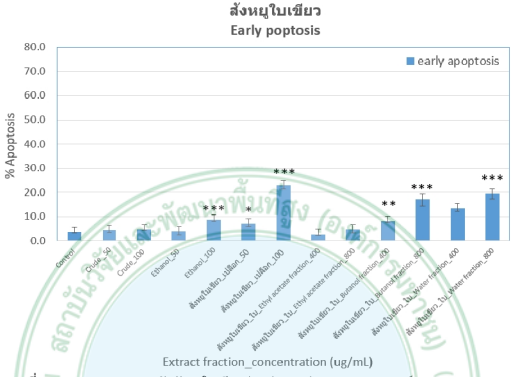
ภาพที่ 16 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 13 สังหยูใบแดง (กิ่งใหญ่) ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis



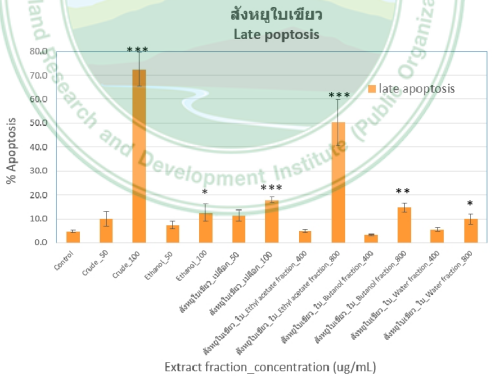
ภาพที่ 17 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 14 สังหยูใบแดง (กิ่งเล็ก) ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis



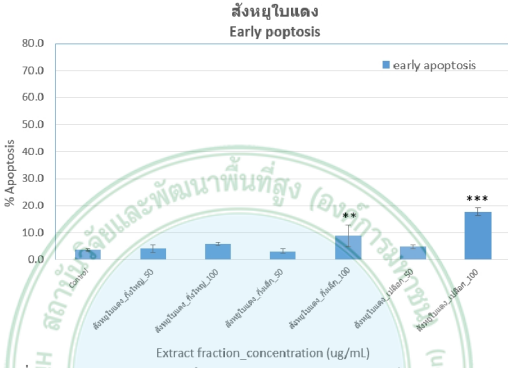
ภาพที่ 18 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis



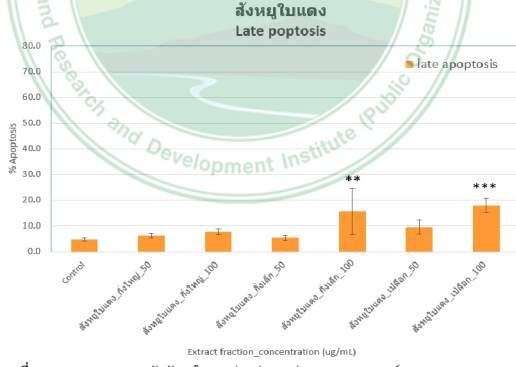
ภาพที่ 19 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบเขียวส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ early apoptosis



ภาพที่ 20 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบเขียวส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ late apoptosis



ภาพที่ 21 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบแดงส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ early apoptosis



ภาพที่ 22 แสดงผลของสารสกัดสังหยูใบแดงส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ late apoptosis

4.3 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1 (รอบที่ 2)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Thin layer chromatography ของส่วนสกัดที่ให้ฤทธิ์ที่ดี (ในปีนี้)

ในการศึกษาทำการเปรียบเทียบรูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างดังนี้

1. สารสกัดน้ำของรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
2. ส่วนสกัดที่ 5-1 (*n*-hexane fraction)
3. ส่วนสกัดที่ 5-2 (ethyl acetate fraction)
4. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำของรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
5. สารสกัดน้ำของใบจากสังหยู่ใบเขียว
6. ส่วนสกัดที่ 11-1 (*n*-hexane fraction)
7. ส่วนสกัดที่ 11-2 (ethyl acetate fraction)
8. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำของใบจากสังหยู่ใบเขียว

เนื่องจากผลการศึกษาเบื้องต้น ส่วนสกัดที่ให้ฤทธิ์ที่ดีคือ สารสกัดที่ 9 สังหยู่ใบเขียว (เปลือก) สารสกัดที่ 15 สังหยู่ใบแดง (เปลือก) แต่เนื่องจากในการใช้ในชุมชน ส่วนรากปมและใบ เป็นส่วนที่มีการนำไปใช้ จึงนำมาศึกษาเพิ่มเติม โดยทำการสกัดแยกด้วย partition technique โดยใช้ความแตกต่างของขั้วของตัวทำละลาย สารสกัดแต่ละส่วนที่ได้ จึงนำมาตรวจสอบด้วย TLC ซึ่งขณะนี้ยังไม่ทราบชนิดสาร จึงเป็นเพียงการจัดทำ TLC chromatogram เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีของแต่ละส่วนเท่านั้น ในการตรวจสอบใช้ UV 254, 366 nm และฉีดพ่นด้วยน้ำยาฉีดพ่น

โดยใช้สภาวะที่ใช้ มีรายละเอียด ดังนี้

สภาวะที่ 1

Stationary phase	Silica gel GF254 (Merk®)
Mobile phase	Ethanol : Ethyl acetate : H_2O (5 : 40 :5)
Detection	UV ที่ความยาวคลื่น 254 366 nm และฉีดพ่นด้วย anisaldehyde in H_2SO_4 และ Natural product reagent

TLC chromatogram ของสารสกัดจากรากปมและใบสังหยู่ใบเขียว ตรวจสอบภายใต้ UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm

1. สารสกัดน้ำของรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
2. ส่วนสกัดที่ 5-1 (*n*-hexane fraction)
3. ส่วนสกัดที่ 5-2 (ethyl acetate fraction)
4. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำของของใบรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
5. สารสกัดน้ำของใบจากสังหยู่ใบเขียว
6. ส่วนสกัดที่ 11-1 (*n*-hexane fraction)
7. ส่วนสกัดที่ 11-2 (ethyl acetate fraction)
8. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำจากสังหยู่ใบเขียว

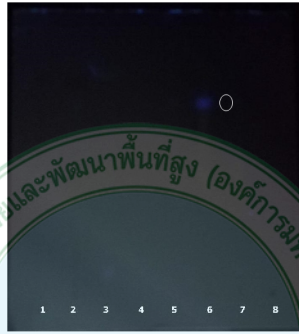
TLC chromatogram ของสารสกัดจากรากปมและใบสังหยู่ใบเขียว ภายใต้ UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm

1. สารสกัดน้ำของรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
2. ส่วนสกัดที่ 5-1 (*n*-hexane fraction)
3. ส่วนสกัดที่ 5-2 (ethyl acetate fraction)
4. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำของของใบรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
5. สารสกัดน้ำของใบจากสังหยู่ใบเขียว
6. ส่วนสกัดที่ 11-1 (*n*-hexane fraction)
7. ส่วนสกัดที่ 11-2 (ethyl acetate fraction)
8. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำจากสังหยู่ใบเขียว

การตรวจสอบภายใต้ UV 366 ในส่วนสกัดหมายเลข 3, 6 พบการเรืองแสงสีฟ้า-น้ำเงิน

TLC chromatogram ของสารสกัดจากรากปมและใบสังหยู่ใบเขียว ฉีดพ่นด้วย anisaldehyde in H_2SO_4

1. สารสกัดน้ำของรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
2. ส่วนสกัดที่ 5-1 (*n*-hexane fraction)
3. ส่วนสกัดที่ 5-2 (ethyl acetate fraction)
4. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำของ ของใบรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
5. สารสกัดน้ำของใบจากสังหยู่ใบเขียว
6. ส่วนสกัดที่ 11-1 (*n*-hexane fraction)
7. ส่วนสกัดที่ 11-2 (ethyl acetate fraction)
8. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำจากสังหยู่ใบเขียว



TLC chromatogram ของสารสกัดจากรากปมและใบสังหยู่ใบเขียว ฉีดพ่นด้วย Natural product reagent และส่อง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm

1. สารสกัดน้ำของรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
2. ส่วนสกัดที่ 5-1 (*n*-hexane fraction)
3. ส่วนสกัดที่ 5-2 (ethyl acetate fraction)
4. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำของของใบรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
5. สารสกัดน้ำของใบจากสังหยู่ใบเขียว
6. ส่วนสกัดที่ 11-1 (*n*-hexane fraction)
7. ส่วนสกัดที่ 11-2 (ethyl acetate fraction)
8. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำจากสังหยู่ใบเขียว

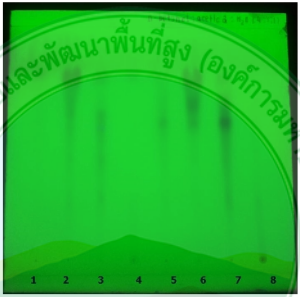
ภายหลังการฉีดพ่นด้วย Natural product reagent และส่องด้วย UV 366 nm ในส่วนสกัดหมายเลข 6 พบการเรืองแสงสีฟ้า-น้ำเงิน ที่เด่นชัด

จากการทำ TLC ในสภาวะที่ 1 เป็นการเปรียบองค์ประกอบของสารในกลุ่มที่มีขั้วต่ำ-ปานกลาง จะพบว่าแต่ละส่วนสกัดมีรูปแบบองค์ประกอบที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แสดงว่าในการสกัดแยก มีประสิทธิภาพในการแยกที่ดี ซึ่งหากผลการทดสอบฤทธิ์ทราบถึงส่วนที่ให้ฤทธิ์ที่ดีที่สุดน่าจะเป็นข้อมูลในการติดตามที่ชัดเจนขึ้น

สำหรับสภาวะที่ 2 เป็นการเปรียบเทียบองค์ประกอบของสารที่มีความเป็นขั้วที่สูงขึ้น สภาวะที่ใช้มีรายละเอียด ดังนี้

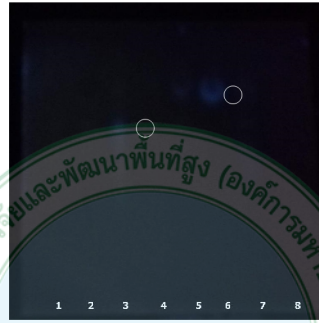
สภาวะที่ 2

Stationary phase	Silica gel GF254 (Merk®)
Mobile phase	n-butanol : acetic acid : H_2O (4 : 1 :1)
Detection	UV ที่ความยาวคลื่น 254 366 nm และฉีดพ่นด้วย anisaldehyde in H_2SO_4 และ Natural product



TLC chromatogram ของสารสกัดจากรากปมและใบสังหยู่ใบเขียว ภายใต้ UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm

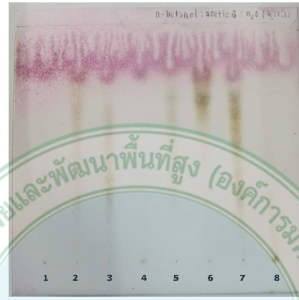
1. สารสกัดน้ำของรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
2. ส่วนสกัดที่ 5-1 (*n*-hexane fraction)
3. ส่วนสกัดที่ 5-2 (ethyl acetate fraction)
4. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำของ ของใบรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
5. สารสกัดน้ำของใบจากสังหยู่ใบเขียว
6. ส่วนสกัดที่ 11-1 (*n*-hexane fraction)
7. ส่วนสกัดที่ 11-2 (ethyl acetate fraction)
8. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำ จากสังหยู่ใบเขียว



TLC chromatogram ของสารสกัดจากรากปมและใบสังหยู่ใบเขียว ภายใต้ UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm

1. สารสกัดน้ำของรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
2. ส่วนสกัดที่ 5-1 (*n*-hexane fraction)
3. ส่วนสกัดที่ 5-2 (ethyl acetate fraction)
4. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำของของใบรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
5. สารสกัดน้ำของใบจากสังหยู่ใบเขียว
6. ส่วนสกัดที่ 11-1 (*n*-hexane fraction)
7. ส่วนสกัดที่ 11-2 (ethyl acetate fraction)
8. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำจากสังหยู่ใบเขียว

การตรวจสอบภายใต้ UV 366 ในส่วนสกัดหมายเลข 3, 6 พบการเรืองแสงสีฟ้า-น้ำเงิน



TLC chromatogram ของสารสกัดจากรากปมและใบสังหยู่ใบเขียว ฉีดพ่นด้วย anisaldehyde in H_2SO_4

1. สารสกัดน้ำของรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
2. ส่วนสกัดที่ 5-1 (*n*-hexane fraction)
3. ส่วนสกัดที่ 5-2 (ethyl acetate fraction)
4. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำของของใบรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
5. สารสกัดน้ำของใบจากสังหยู่ใบเขียว
6. ส่วนสกัดที่ 11-1 (*n*-hexane fraction)
7. ส่วนสกัดที่ 11-2 (ethyl acetate fraction)
8. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำจากสังหยู่ใบเขียว

TLC chromatogram ของสารสกัดจากรากปมและใบสังหยู่ใบเขียว ฉีดพ่นด้วย Natural product และส่อง UV ที่ความยาวคลื่น 366 nm

1. สารสกัดน้ำของรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
2. ส่วนสกัดที่ 5-1 (*n*-hexane fraction)
3. ส่วนสกัดที่ 5-2 (ethyl acetate fraction)
4. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำของ ของใบรากปมจากสังหยู่ใบเขียว
5. สารสกัดน้ำของใบจากสังหยู่ใบเขียว
6. ส่วนสกัดที่ 11-1 (*n*-hexane fraction)
7. ส่วนสกัดที่ 11-2 (ethyl acetate fraction)
8. Aq. Alcohol fraction จากสารสกัดน้ำ จากสังหยู่ใบเขียว

ภายหลังการฉีดพ่นด้วย Natural product reagent และส่องด้วย UV 366 nm ในส่วนสกัดหมายเลข 3, 6 พบการเรืองแสงสีฟ้า-น้ำเงิน ที่เด่นชัด

จากการทำ TLC ในสภาวะที่ 2 เป็นการเปรียบองค์ประกอบของสารในกลุ่มที่มีขั้วปานกลาง-ค่อนข้างสูง จะพบว่าแต่ละส่วนสกัดมีรูปแบบองค์ประกอบที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

4.4 ศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชัน และฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (*in vitro*) (รอบที่ 2)

จากผลการทดลองในครั้งก่อนพบว่าสารสกัดสังหยูที่มีแนวโน้มให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ที่ดีได้แก่สารสกัดส่วนที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) และ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) แต่เนื่องจากมีความคลาดเคลื่อนเรื่อง number ของสารสกัดทำให้มีการสกัดสารส่วนที่ 5 สังหยูใบเขียว (รากปม) และสารส่วนที่ 11 สังหยูเขียว (ใบ) มาแทน สารที่ได้รับมามี 6 fractions ได้แก่

1. สารสกัดส่วน 5.1 สังหยูเขียว (รากปม) Ethyl acetate fraction
2. สารสกัดส่วน 5.2 สังหยูเขียว (รากปม) Butanol fraction
3. สารสกัดส่วน 5.3 สังหยูเขียว (รากปม) Water fraction
4. สารสกัดส่วน 11.1 สังหยูเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction
5. สารสกัดส่วน 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction
6. สารสกัดส่วน 11.3 สังหยูเขียว (ใบ) Water fraction

<u>ผลการศึกษาฤทธิ์ antioxidant activity ของสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของสังหยู</u>

จากผลการทดลอง DPPH assay พบว่าสารสกัดทุกส่วนมีค่า IC_{50} ที่ต่างจากสาร gallic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อเปรียบเทียบในสารแต่ละส่วนพบว่าสารสกัดส่วน 5.1 สังหยูเขียว (รากปม) Ethyl acetate fraction สารส่วน 5.2 สังหยูเขียว (รากปม) Butanol fraction สารส่วน 11.1 สังหยูเขียว(ใบ) Ethyl acetate fraction สารส่วน 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดีในการทดลองนี้ สารสกัดส่วน 11.3 สังหยูเขียว (ใบ) Water fraction ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดีรองลงมาจากสารสกัดส่วน 5.1, 5.2, 11.1 และ 11.2 โดยสารสกัดส่วน 11.3 นี้มีค่า IC_{50} 68.8± 10.9 μg/mL ส่วนสารสกัด 5.3 สังหยูเขียว (รากปม) Water fraction ให้ผลไม่ดีเท่าส่วนอื่นโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 398 μg/mL

ผลการทดลอง Superoxide radical assay พบว่าสารส่วน 5.1 สังหยูเขียว (รากปม) Ethyl acetate fraction สารส่วน 5.2 สังหยูเขียว (รากปม) Butanol fraction สารส่วน 11.1 สังหยูเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction สารส่วน 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นที่ดีในการทดลองนี้ โดยให้ค่า IC_{50} ไม่แตกต่างจาก gallic acid ส่วนสารสกัด 5.3 สังหยูเขียว (รากปม) Water fraction และสารสกัดส่วน 11.3 สังหยูเขียว (ใบ) Water fraction ให้ค่า IC_{50} 806.4 และ 80.6 μg/mL ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ต่างจาก gallic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการศึกษาฤทธิ์ Antioxidant activity ของสังหยู รอบ 2

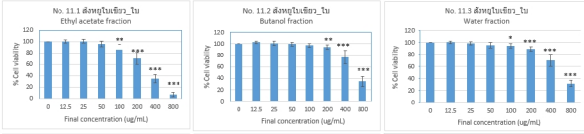
Fractions	IC_{50} (μg/mL)	
	DPPH assay	Superoxide radical assay
5.1 สังหยูเขียว (รากปม) Ethyl acetate fraction	20.6 ± 1.1 ***	49.3 ± 3.4
5.2 สังหยูเขียว(รากปม) Butanol fraction	27.8 ± 0.9 ***	55.6 ± 3.0
5.3 สังหยูเขียว(รากปม) Water fraction	398.2 ± 37.8 ***	806.4 ± 26.5 ***
11.1 สังหยูเขียว(ใบ) Ethyl acetate fraction	35.3 ± 2.1 ***	49.7 ± 3.0
11.2 สังหยูเขียว(ใบ) Butanol fraction	45.7± 0.7 ***	47.4 ± 2.4
11.3 สังหยูเขียว(ใบ) Water fraction	68.8± 10.9 ***	80.6 ± 9.7 *
Gallic acid	2.7 ± 0.01	23.18 ± 3.9

จากผลการทดลองที่ได้สารสกัดส่วนที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อคือ fraction 5.1 สังหยูเขียว (รากปม) Ethyl acetate fraction สารสกัด 5.2 สังหยูเขียว(รากปม) Butanol fraction สารสกัด 11.1 สังหยูเขียว(ใบ) Ethyl acetate fraction สารสกัด 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction แต่เนื่องจากในงานวิจัยต้องการสารสกัดส่วนที่ใช้แทนรากและใน traditional use ของพืชนี้ก็มีการใช้ใบเป็นหลักจึงได้เลือกสารสกัดสังหยูส่วน 11 สังหยูเขียว(ใบ) มาทดลองต่อ โดยสารที่ได้นำมาทดลองต่อได้แก่ สารสกัด No. 11.1 Ethyl acetate fraction สารสกัด 11.2 Butanol fraction และ สารสกัด 11.3 water fraction

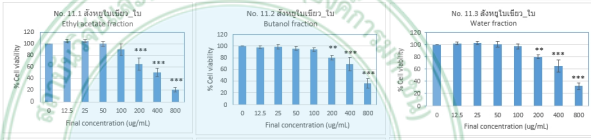
ผลการทดลอง Cell proliferation assay

ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากบ่มเซลล์กับสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์เกิดการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือสาร No.11.1 Ethyl acetate fraction และสาร 11.3 water fraction ที่ ความเข้มข้น 100-800 ug/mL และสารสกัดส่วนที่ 11.2 ทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 200-800 ug/mL โดยการตายของเซลล์จะเป็นแบบ concentration response ดังผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 23 ส่วนผลการทดลองที่เวลา 48 ชั่วโมงแสดงในรูปที่ 2 พบว่าสารสกัดสังหยูทั้งสามส่วนได้แก่ No. 11.1 Ethyl acetate fraction สารสกัด 11.2 Butanol fraction และ สารสกัด 11.3 water fraction ที่ความเข้มข้น 200-800 ug/mL ทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 24)

จากผลการทดลองจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้แก่สารสกัด 11.1 Ethyl acetate fraction และสาร 11.3 water fraction ที่ความเข้มข้น 100-800 ug/mL และสารสกัดส่วนที่ 11.2 ความเข้มข้น 200-800 ug/mL ไปทำการศึกษาต่อ



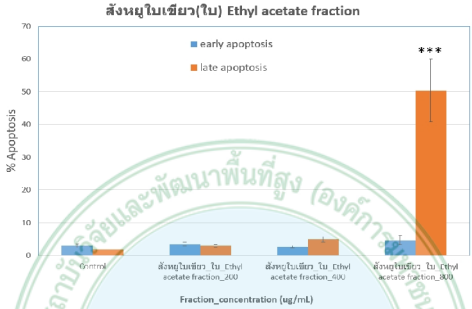
รูปที่ 23 ผลของสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์ LX-2 ที่เวลา 24h ข้อมูลแสดงในรูปของ mean±SEM จากการทำ 3 ครั้ง (รอบ 2)



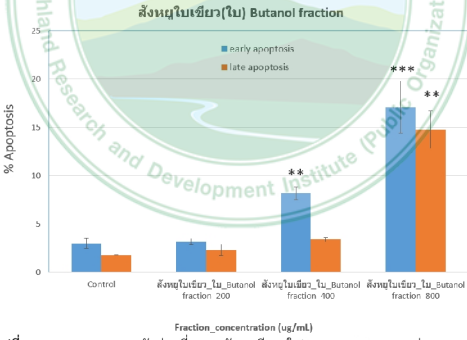
รูปที่ 24 ผลของสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์ LX-2 ที่เวลา 48h ข้อมูลแสดงในรูปของ mean±SEM จากการทำ 3 ครั้ง (รอบ 2)

ผลการทดลอง Apoptosis analysis

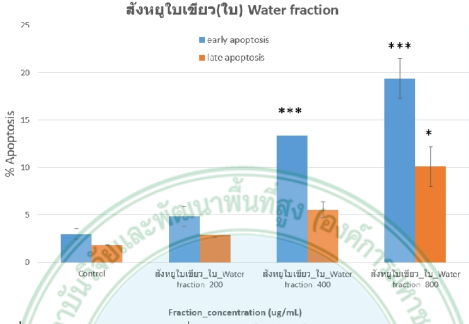
ผลการทดลองที่ได้จาก cell proliferation assay ได้เลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่เริ่มทำให้เกิดการตายของเซลล์มาทดสอบ พบว่าสารสกัด 11.1 สังหยูเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 ug/mL ไม่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ LX-2 ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีการตายแบบ apoptosis คือที่ความเข้มข้น 800 ug/mL โดยพบการตายของเซลล์แบบ late apoptosis ดังแสดงในรูปที่ 24 ส่วนสารสกัด 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction ที่ความเข้มข้น 400 ug/mL ทำให้เซลล์เกิดการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการตายของเซลล์เป็นแบบ early apoptosis โดยเซลล์มีเปอร์เซนต์การตายเท่ากับ 8 % แต่ไม่พบการตายแบบ late apoptosis ส่วนที่ความเข้มข้น 800 ug/mL จะเห็นการตายของเซลล์ทั้งแบบ early apoptosis และ late apoptosis ที่ 17 % และ 14 % ตามลำดับ (รูปที่ 25) สารสกัด 11.3 สังหยูเขียว (ใบ) Water fraction มีลักษณะการเกิด apoptosis คล้ายที่พบใน fraction 11.2 โดยที่ความเข้มข้น 400 ug/mL ทำให้เซลล์เกิดการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการตายของเซลล์เป็นแบบ early apoptosis พบเปอร์เซนต์การตายเท่ากับ 13 % ส่วนที่ความเข้มข้น 800 ug/mL จะเห็นการตายของเซลล์ทั้งแบบ early apoptosis และ late apoptosis โดยเซลล์มีเปอร์เซนต์การตาย 19 % และ 10 % (รูปที่ 26) ตามลำดับ ซึ่ง fraction ที่น่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อได้แก่สารสกัดส่วน 11.3 สังหยูเขียว(ใบ) water fraction เนื่องจากมีการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิด early apoptosis และ late apoptosis แต่มีส่วน early apoptosis โดดเด่น (รูปที่ 27) และมีฤทธิ์ต้านอ็อกซิเดชั่นที่ดี



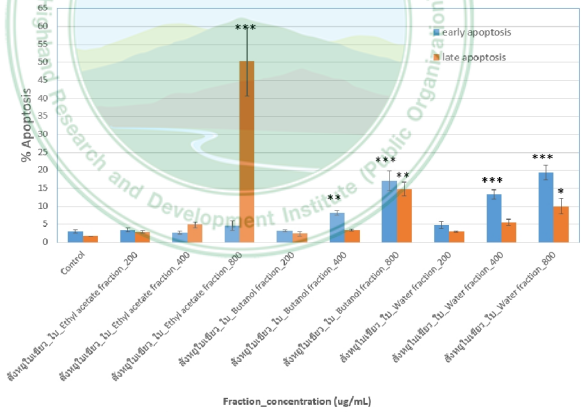
รูปที่ 25 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.1 สังหยูเขียว (ใบ) Ethyl acetate fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis (รอบ 2)



รูปที่ 26 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.2 สังหยูเขียว (ใบ) Butanol fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis (รอบ 2)



รูปที่ 27 แสดงผลของสารสกัดส่วนที่ 11.3 สังหยูใบเขียว (ใบ) Water fraction ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis (รอบ 2)



รูปที่ 28 แสดงผลของสารสกัดสังหยูส่วนต่างๆ ต่อการตายของเซลล์ LX-2 แบบ apoptosis (รอบ 2)

4.5 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ปีที่ 1 (รอบที่ 3)

ในการศึกษาข้างต้น พบว่าส่วนเปลือกของสังหยูให้ผลการทดสอบที่ดี จึงทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยทำการสกัดส่วนเปลือก โดยนำเปลือกต้นของสังหยูบดหยาบ 600 กรัม นำไปต้มด้วยน้ำ สารสกัดที่ได้นำมากรอง ทำให้เข้มข้น ให้ได้ % Brix ประมาณ 3 % แล้วนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติม Cab-O-Sil 1.25 % w/v เขย่าให้เข้ากันนำไปพ่นแห้ง ด้วยสภาวะ ดังนี้

เครื่องมือที่ใช้ BUCHI Mini Spray dryer B-290

Inlet = 140 °c

Outlet = 90 °c

Aspirator = 100%

Pump = 30%

Nozzle cleaner = 2

พบว่าได้ผงสารสกัด 54.06 กรัม ซึ่งสารสกัดที่ได้ จะนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อไป

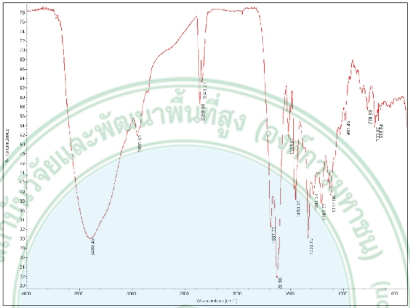
หมายเหตุ ผลการทดลองสำหรับเปลือกต้น ยังอยู่ระหว่างการดำเนินการ เนื่องจากดำเนินการต่อเนื่องจากผลการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้น

สำหรับผลการศึกษาทางเคมีเพิ่มเติมของส่วนสกัดจากรากปมและใบ ที่ผ่านการสกัดแยก ได้นำไปศึกษารูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีด้วย IR เพื่อเป็นข้อมูลในด้านเอกลักษณ์ทางเคมี ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของรูปแบบองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกันของแต่ละส่วนสกัด ซึ่งข้อมูลของ IR fingerprint สามารถใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบในการศึกษาความคงตัวต่อไป

FT-IR สารสกัดสังหยู

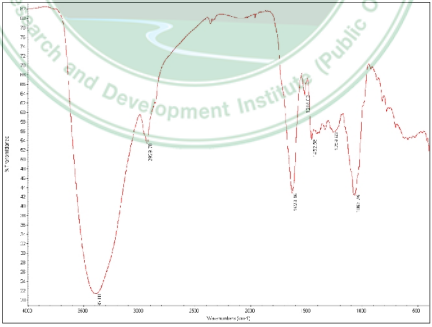
5-1 สังหยูใบเขียวส่วนรากปม (Ethyl acetate fraction)

ความเข้มข้นที่ใช้ : 20.2 mg/ml ละลายด้วย Ab.Ethanol



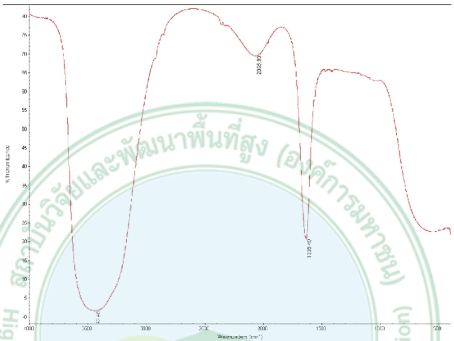
5-2 สังหยูใบเขียวส่วนรากปม (n-Butanol fraction)

ความเข้มข้นที่ใช้ : 20.1 mg/ml ละลายด้วย Ab.Ethanol



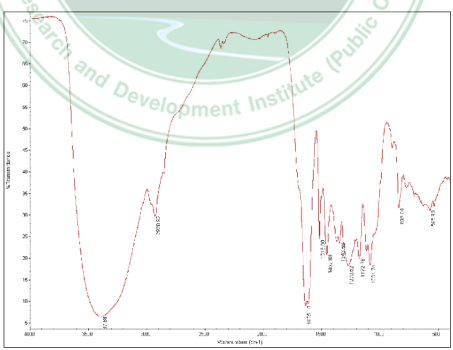
5-3 สังหยูใบเขียวส่วนรากปม (Aq.H_2O fraction)

ความเข้มข้นที่ใช้ : 20.1 mg/ml ละลายด้วย Ab.Ethanol



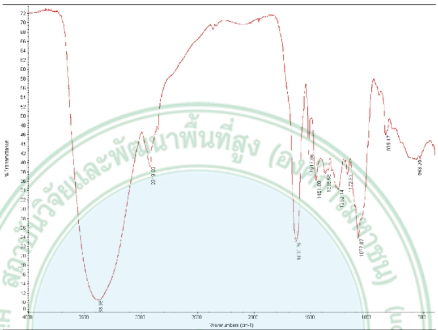
11-1 สังหยูใบเขียวส่วนใบ (Ethyl acetate fraction)

ความเข้มข้นที่ใช้ : 20.6 mg/ml ละลายด้วย Ab.Ethanol



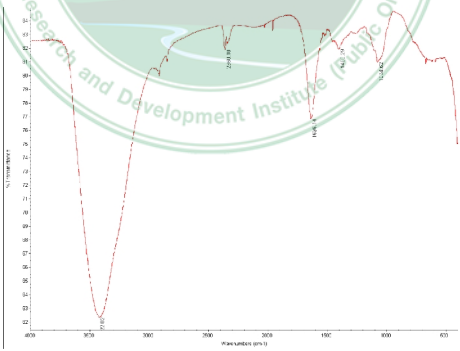
11-2 สังหยูใบเขียวส่วนใบ (*n*-Butanol fraction)

ความเข้มข้นที่ใช้ : 20.6 mg/ml ละลายด้วย Ab.Ethanol



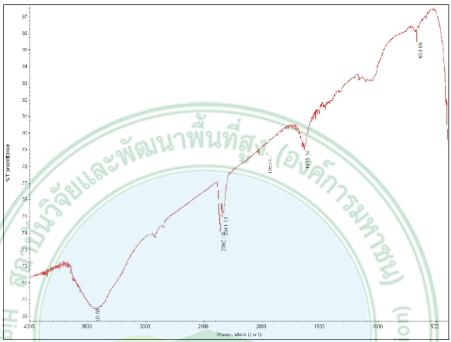
11-3 สังหยูใบเขียวส่วนใบ (Aq.H_2O fraction)

ความเข้มข้นที่ใช้ : 20.2 mg/ml ละลายด้วย Ab.Ethanol



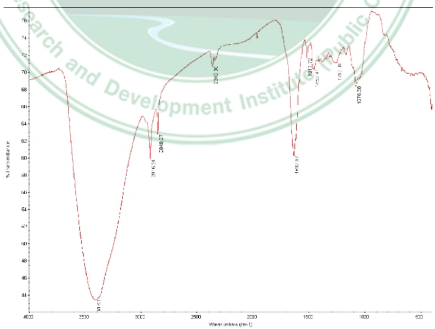
สารสกัดน้ำส่วนใบของสังหยู

ความเข้มข้นที่ใช้ : 51.7 mg/ml ละลายด้วย Ab.Ethanol



สารสกัดน้ำส่วนรากปมของสังหยู

ความเข้มข้นที่ใช้ : 50.9 mg/ml ละลายด้วย Ab.Ethanol



4.7 ศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลงของสมุนไพรกลุ่มขับสารพิษในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

ทั้งนี้หากผลการทดสอบฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชันและฤทธิ์ต่อเซลล์ตับเพาะเลี้ยง (ข้อ 4.2) ได้ผลไม่ดีเท่าส่วนราก จะไม่มีการดำเนินการศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลง

ในขณะนี้จากการศึกษาฤทธิ์ของส่วนสกัด 15 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดส่วนใบและเปลือกมีแนวโน้มที่มีฤทธิ์ที่ดีและอาจสามารถใช้ทดแทนส่วนรากปมได้เมื่อเข้าสู่เชิงพาณิชย์ แต่อย่างไรก็ตามในขณะนี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าสารสำคัญที่จะใช้ควบคุมสารสกัดมีอยู่ที่ใบหรือเปลือกและมากน้อยเท่าใด ในขณะที่รายงานนี้ผู้วิจัยยังคงทดสอบหาส่วนสกัดที่มีฤทธิ์จากใบและเปลือกอยู่เพื่อตัดสินว่าจะนำสารสกัดส่วนใดไปทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สำคัญสำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านพิษสารเคมีฆ่าแมลงในสัตว์ทดลอง ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด 15 ตัวอย่าง ยังไม่สามารถตัดสินได้ว่าส่วนสกัดที่ได้ทดสอบทั้งหมดมีฤทธิ์ที่เหมาะสมที่จะศึกษาในสัตว์ทดลอง ด้วยข้อจำกัดด้านจริยธรรมการวิจัย วัตถุประสงค์ และขอบเขตการวิจัย งานส่วนนี้จึงน่าจะไปรวมในโครงการวิจัยในระยะต่อไป เมื่อมีผลการทดสอบที่ชัดเจน

4.8 ศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (180 วัน) ในสัตว์ทดลองของสารสกัดสังหยูใบเขียว

จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมทั่วไปและอาการของหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ที่ได้รับการป้อนสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว ขนาดต่างๆ ทุกวันตลอดระยะเวลา 180 วัน ไม่มีพฤติกรรมที่ผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุม ลักษณะการกินอาหารเม็ดมาตรฐานและน้ำหนัก รวมทั้งการขับถ่ายของหนูแรทไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และไม่พบการตายของหนูแรททุกกลุ่ม

การประเมินน้ำหนักตัวของหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว แสดงในตารางที่ 9 พบว่า ในวันที่ 60 หนูแรทเพศเมียกลุ่มติดตามผลกลุ่มควบคุม มีน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูแรทกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ส่วนน้ำหนักตัวของหนูแรทเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียวขนาด 3750 และ 1250 mg/kg น้ำหนักตัว มีน้ำหนักตัวในวันที่ 14 ลดลง และในวันที่ 60 และ 90 หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียวขนาด 750 และ 250 mg/kg น้ำหนักตัวและสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียวขนาด 3750 และ 1250 mg/kg น้ำหนักตัว มีน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูแรทกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

น้ำหนักอวัยวะภายในของหนูแรทเพศเมียและเพศผู้แสดงผลใน**ตารางที่ 10 และ 11** ตามลำดับ พบว่าหนูแรทเพศเมียหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียวขนาด 750 และ 250 mg/kg น้ำหนักตัว มีน้ำหนักสมองลดลง หนูกลุ่มติดตามผลกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักหัวใจและตับเพิ่มขึ้น ส่วนกลุ่มติดตามผลสารสกัดมีน้ำหนักตับและไตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ส่วนหนูแรทเพศผู้พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียวขนาด 750 และ 250 mg/kg และสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียวขนาด 3750 และ 1250 mg/kg น้ำหนักตัว กลุ่มติดตามผลกลุ่มควบคุม และกลุ่มติดตามผลสารสกัด มีน้ำหนักสมองลดลง ส่วนกลุ่มติดตามผลกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักม้ามลดลง ส่วนกลุ่มติดตามผลสารสกัดมีน้ำหนักตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

ค่าโลหิตวิทยาของหนูแรทเพศเมียแสดงผลใน**ตารางที่ 12** พบว่าหนูแรทกลุ่มติดตามผลกลุ่มควบคุม มีจำนวนเม็ดเลือดแดง (Red blood cell, RBC) ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin, Hb) และค่า

ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นหรือค่าฮีมาโตคริต (Hematocrit, Hct) เพิ่มขึ้น กลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียวขนาดกลาง 750 และ 250 mg/kg น้ำหนักตัว มีปริมาตรเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย (Mean corpuscular volume, MCV) และปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular hemoglobin, MCH) เพิ่มขึ้น ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียวขนาดสูง 3750 และ 1250 mg/kg น้ำหนักตัว และกลุ่มติดตามผลสารสกัด มีค่า Hematocrit เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ค่าโลหิตวิทยาของหนูแรทเพศเมียแสดงผลใน**ตารางที่ 13** ส่วนหนูแรทเพศผู้ พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียวขนาดต่ำ 150 และ 50 mg/kg น้ำหนักตัว มีค่า MCH เพิ่มขึ้น ส่วนกลุ่มติดตามผลสารสกัดมีค่า RBC ลดลง และมีค่า MCH ลดลง

สำหรับค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูแรทเพศเมียแสดงผลใน**ตารางที่ 14** พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียวทุกกลุ่ม และกลุ่มติดตามผลกลุ่มควบคุม มีค่าเอโอซิโนฟิล (Eosinophil) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ส่วนค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูแรทเพศผู้แสดงผลใน**ตารางที่ 15** ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูแรทเพศเมียแสดงผลใน**ตารางที่ 16** พบว่าหนูแรทเพศเมียกลุ่มติดตามกลุ่มควบคุม และกลุ่มติดตามผลสารสกัดที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียวขนาดสูง 3750 และ 1250 mg/kg น้ำหนักตัวมีค่ายูเรียไนโตรเจนในเลือด (Blood Urea Nitrogen, BUN) และบิลิรูบินรวม (Total bilirubin) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) สำหรับค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูแรทเพศผู้แสดงผลใน**ตารางที่ 17** พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียวขนาดสูง 3750 และ 1250 mg/kg น้ำหนักตัว มีเอนไซม์ Serumglutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ส่วนกลุ่มติดตามสารสกัดมีค่าโปรตีนรวม (Total protein) เพิ่มสูงขึ้น และมีค่าบิลิรูบินรวม (Total bilirubin) ไดเรคบิลิรูบิน (Direct bilirubin) และเอนไซม์ SGOT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

การผ่าพิสูจน์ซากและสังเกตพยาธิสภาพด้วยตาเปล่าของอวัยวะภายในของหนูแรททั้งเพศเมียและเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว ได้แก่ ปอด หัวใจ ตับ ม้าม ต่อมหมวกไต ไต กระเพาะอาหาร ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้เล็ก ต่อมไทมัส กล้ามเนื้อและเส้นประสาท ตา สมอง รังไข่ มดลูก อัณฑะ เอพิดิไดมิส และกระดูกสันหลังไม่พบความผิดปกติใดๆ ทั้งขนาด รูปร่างและสีของอวัยวะเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วน การศึกษาทางพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในของหนูแรทไม่พบความผิดปกติใดที่แสดงให้เห็นถึงการทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ ของสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว โดยไม่พบการตายของเซลล์สมอง เนื้อปอดอยู่ในลักษณะปกติ ไม่พบว่ามีเลือดออกหรือสารคั่ดหลั่งอุดตัน ไม่พบการอักเสบหรือตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เนื้อเยื่อตับปกติไม่พบการตายของเซลล์ตับ ไม่พบการทำลายของเซลล์ม้ามและตับอ่อน ต่อมหมวกไตชั้นนอกและชั้นในแยกจากกันชัดเจน เซลล์เนื้อเยื่อไตมีลักษณะปกติ อัณฑะ เอพิดิไดมิส รังไข่และมดลูกปกติ ภาพที่ 11

ตารางที่ 10 น้ำหนักตัวของหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว

กลุ่ม	ขนาดของสารทดลองที่ใช้ (mg/kg)	น้ำหนักตัว (g)					
		วันที่ 1	วันที่ 14	วันที่ 30	วันที่ 60	วันที่ 90	วันที่ 180
เพศผู้							
ควบคุม	-	182.00 ± 5.17	231.50 ± 9.72	262.00 ± 2.71	334.00 ± 7.14	365.50 ± 6.73	372.00 ± 13.67
ติดตามผลควบคุม	-	181.00 ± 6.96	221.00 ± 4.30	263.00 ± 7.18	331.00 ± 13.17	359.00 ± 16.91	377.00 ± 12.81
สารสกัดรากใหญ่	150, 50	181.00 ± 5.10	221.00 ± 2.33	258.00 ± 3.35	320.50 ± 6.12	347.00 ± 7.46	390.00 ± 12.58
สังหยูใบเขียว	750, 250	187.00 ± 4.36	223.00 ± 3.09	258.50 ± 2.36	315.50 ± 6.60*	340.50 ± 7.89*	386.50 ± 7.75
	3750, 1250	181.00 ± 4.14	217.00 ± 1.53*	255.00 ± 3.61	311.00 ± 4.22*	359.00 ± 6.63*	378.00 ± 8.31
ติดตามผลสารทดสอบ	3750, 1250	180.00 ± 5.24	220.00 ± 6.12	255.00 ± 4.74	321.00 ± 8.28	349.00 ± 10.89	401.00 ± 18.67
เพศเมีย							
ควบคุม	-	177.50 ± 3.52	189.00 ± 3.32	214.00 ± 4.07	252.50 ± 4.23	268.00 ± 4.67	281.50 ± 5.00
ติดตามผลควบคุม	-	177.00 ± 3.74	194.00 ± 3.67	205.00 ± 2.74	232.00 ± 1.22*	256.00 ± 3.67	270.00 ± 7.91
สารสกัดรากใหญ่	150, 50	178.00 ± 3.09	195.50 ± 3.02	214.00 ± 2.77	244.50 ± 4.86	255.50 ± 5.75	272.00 ± 2.81
สังหยูใบเขียว	750, 250	179.50 ± 2.52	194.00 ± 2.56	211.00 ± 2.45	241.50 ± 4.02	257.00 ± 4.67	269.50 ± 5.65
	3750, 1250	177.00 ± 2.49	196.50 ± 2.59	210.50 ± 4.01	249.50 ± 4.80	262.50 ± 4.61	283.50 ± 5.27
ติดตามผลสารทดสอบ	3750, 1250	181.00 ± 4.30	198.00 ± 3.74	216.00 ± 5.34	248.00 ± 6.04	259.00 ± 6.96	278.00 ± 8.46

Values are expressed as mean ± S.E.M., n = 10, กลุ่มติดตามผล n =5.

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

ตารางที่ 10 น้ำหนักอวัยวะ (g) ของหนูแรทเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว

	ควบคุม	ติดตามกลุ่มควบคุม	สารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว(mg/kg)			
			150 และ 50	750 และ 250	3750 และ 1250	กลุ่มติดตามผลสารสกัด 3750 และ 1250
สมอง	1.96 ± 0.03	2.05 ± 0.05	1.91 ± 0.04	1.81 ± 0.06*	1.92 ± 0.04	1.96 ± 0.03
ปอด	1.67 ± 0.14	2.03 ± 0.24	1.53 ± 0.07	1.42 ± 0.09	1.53 ± 0.09	1.76 ± 0.08
หัวใจ	1.22 ± 0.05	1.44 ± 0.05*	1.27 ± 0.03	1.16 ± 0.05	1.20 ± 0.08	1.39 ± 0.02
ตับ	8.89 ± 0.20	10.92 ± 0.21*	8.98 ± 0.26	8.35 ± 1.18	8.75 ± 0.34	11.53 ± 0.38*
ม้าม	0.71 ± 0.03	0.82 ± 0.06	0.77 ± 0.06	0.68 ± 0.03	0.66 ± 0.03	0.81 ± 0.05
ต่อมหมวกไต	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
ไต	1.07 ± 0.02	1.15 ± 0.05	1.14 ± 0.02	1.10 ± 0.05	1.08 ± 0.03	1.27 ± 0.04*
รังไข่	0.11 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00
มดลูก	1.25 ± 0.20	1.64 ± 0.57	1.50 ± 0.54	1.13 ± 0.19	1.32 ± 0.26	1.33 ± 0.36

Values are expressed as mean ± S.E.M., n = 10, กลุ่มติดตามผล n =5.

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

ตารางที่ 11 น้ำหนักอวัยวะ (g) ของหนูแรทเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว

	ควบคุม	ติดตามกลุ่มควบคุม	สารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว(mg/kg)			
			150 และ 50	750 และ 250	3750 และ 1250	กลุ่มติดตามผลสารสกัด 3750 และ 1250
สมอง	2.18 ± 0.05	1.99 ± 0.02*	2.03 ± 0.05*	2.04 ± 0.02*	2.13 ± 0.04	2.01 ± 0.04
ปอด	2.03 ± 0.31	1.58 ± 0.04	1.71 ± 0.10	1.84 ± 0.09	1.63 ± 0.06	1.80 ± 0.06
หัวใจ	1.55 ± 0.06	1.52 ± 0.06	1.54 ± 0.05	1.55 ± 0.03	1.59 ± 0.05	1.67 ± 0.08
ตับ	12.29 ± 0.86	11.71 ± 0.70	12.02 ± 0.55	11.15 ± 0.42	12.61 ± 0.51	14.53 ± 1.34*
ม้าม	0.83 ± 0.05	0.59 ± 0.13	0.81 ± 0.03	0.78 ± 0.03	0.80 ± 0.04	0.68 ± 0.16
ต่อมหมวกไต	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
ไต	1.40 ± 0.05	1.26 ± 0.21	1.25 ± 0.03	1.21 ± 0.04	1.39 ± 0.08	1.58 ± 0.08
อัณฑะ	1.99 ± 0.03	1.94 ± 0.01	1.92 ± 0.04	1.96 ± 0.04	2.01 ± 0.04	1.99 ± 0.02
เอพิดิไดมิส	0.86 ± 0.02	0.73 ± 0.01	0.79 ± 0.02	0.75 ± 0.02	0.91 ± 0.10	0.76 ± 0.03

Values are expressed as mean ± S.E.M., n = 10, กลุ่มติดตามผล n =5.

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

ตารางที่ 12 ค่าโลหิตวิทยาของหนูแรทเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว

	ควบคุม	ติดตามกลุ่มควบคุม	สารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว(mg/kg)			
			150 และ 50	750 และ 250	3750 และ 1250	กลุ่มติดตามผลสารสกัด 3750 และ 1250
Red blood cell ($x10^6$/µl)	6.98 ± 0.07	7.57 ± 0.12*	7.01 ± 0.19	6.80 ± 0.17	7.25 ± 0.12	7.45 ± 0.28
Hemoglobin (g/dl)	13.62 ± 0.15	14.48 ± 0.16*	13.79 ± 0.29	13.69 ± 0.18	14.10 ± 0.23	14.30 ± 0.19
Hematocrit (%)	42.21 ± 0.43	45.28 ± 0.42*	42.64 ± 1.03	42.75 ± 0.50	44.33 ± 0.70*	45.10 ± 0.57*
Mean corpuscular volume (fl)	60.46 ± 0.36	59.80 ± 0.54	60.91 ± 0.33	63.22 ± 1.58*	60.79 ± 0.50	60.62 ± 1.11
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	19.50 ± 0.13	19.14 ± 0.19	19.71 ± 0.18	20.24 ± 0.45*	19.34 ± 0.10	19.22 ± 0.23
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dl)	32.26 ± 0.11	31.98 ± 0.13	32.37 ± 0.22	32.03 ± 0.19	31.80 ± 0.14	31.68 ± 0.28
Platelet ($x10^5$/µl)	7.18 ± 0.22	7.67 ± 0.30	7.23 ± 0.57	8.42 ± 0.60	7.53 ± 0.46	7.00 ± 0.30

Values are expressed as mean ± S.E.M., n = 10, กลุ่มติดตามผล n =5.

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

ตารางที่ 13 ค่าโลหิตวิทยาของหนูแรทเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว

	ควบคุม	ติดตามกลุ่มควบคุม	สารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว(mg/kg)			
			150 และ 50	750 และ 250	3750 และ 1250	กลุ่มติดตามผลสารสกัด 3750 และ 1250
Red blood cell ($x10^6$/µl)	8.33 ± 0.43	8.12 ± 0.10	7.79 ± 0.12	7.95 ± 0.13	8.07 ± 0.16	7.43 ± 0.05*
Hemoglobin (g/dl)	15.50 ± 0.76	14.98 ± 0.23	14.87 ± 0.20	13.98 ± 1.15	15.28 ± 0.23	14.28 ± 0.23
Hematocrit (%)	48.44 ± 2.76	47.10 ± 0.77	45.92 ± 0.70	46.22 ± 0.54	47.31 ± 0.75	45.42 ± 0.18
Mean corpuscular volume (fl)	58.04 ± 0.40	58.00 ± 0.40	59.08 ± 0.30	58.19 ± 0.467	58.69 ± 0.51	58.86 ± 0.36
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	18.70 ± 0.09	18.50 ± 0.08	19.09 ± 0.11*	18.85 ± 0.14	18.95 ± 0.17	19.22 ± 0.18*
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dl)	32.24 ± 0.25	31.80 ± 0.23	32.46 ± 0.14	32.41 ± 0.09	32.29 ± 0.12	32.66 ± 0.23
Platelet ($x10^5$/µl)	7.18 ± 0.40	7.78 ± 0.37	7.21 ± 0.29	7.28 ± 0.19	7.22 ± 0.22	6.36 ± 0.45

Values are expressed as mean ± S.E.M., n = 10, กลุ่มติดตามผล n =5.

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

ตารางที่ 14 ค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูแรทเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว

	ควบคุม	ติดตามกลุ่มควบคุม	สารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว(mg/kg)			
			150 และ 50	750 และ 250	3750 และ 1250	กลุ่มติดตามผลสารสกัด 3750 และ 1250
White blood cell ($x10^3$ cells/µl)	2.51 ± 0.18	2.39 ± 0.14	2.14 ± 0.34	1.89 ± 0.19	1.96 ± 0.19	2.30 ± 0.17
Neutrophil (cells/µl)	0.61 ± 0.05	0.60 ± 0.04	0.62 ± 0.09	0.41 ± 0.03	0.47 ± 0.04	0.48 ± 0.05
Lymphocyte (cells/µl)	1.63 ± 0.14	1.59 ± 0.17	1.43 ± 0.16	1.32 ± 0.15	1.32 ± 0.14	1.61 ± 0.21
Monocyte (cells/µl)	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.05
Eosinophil (cells/µl)	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01*	0.05 ± 0.01*	0.03 ± 0.01*	0.04 ± 0.01*	0.03 ± 0.01*
Basophil (cells/µl)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Values are expressed as mean ± S.E.M., n = 10, กลุ่มติดตามผล n =5.

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

ตารางที่ 15 ค่าการนับแยกเม็ดเลือดขาวของหนูแรทเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว

	ควบคุม	ติดตามผล กลุ่มควบคุม	สารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว(mg/kg)			
			150 และ 50	750 และ 250	3750 และ 1250	กลุ่มติดตามผลสารสกัด 3750 และ 1250
White blood cell ($x10^3$ cells/µl)	2.66 ± 0.22	2.96 ± 0.35	2.84 ± 0.18	2.74 ± 0.19	2.47 ± 0.24	2.57 ± 0.16
Neutrophil (cells/µl)	0.48 ± 0.14	0.52 ± 0.14	0.45 ± 0.04	0.50 ± 0.07	0.52 ± 0.11	0.53 ± 0.06
Lymphocyte (cells/µl)	1.79 ± 0.12	2.05 ± 0.21	2.11 ± 0.16	1.88 ± 0.15	1.73 ± 0.16	1.83 ± 0.06
Monocyte (cells/µl)	0.35 ± 0.10	0.35 ± 0.11	0.24 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.05
Eosinophil (cells/µl)	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Basophil (cells/µl)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Values are expressed as mean ± S.E.M., n = 10, กลุ่มติดตามผล n =5.

ตารางที่ 16 ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูแรทเพศเมียในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว

	ควบคุม	ติดตามผล กลุ่มควบคุม	สารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว(mg/kg)			
			150 และ 50	750 และ 250	3750 และ 1250	กลุ่มติดตามผลสารสกัด 3750 และ 1250
BUN (mg/dl)	19.02 ± 1.09	25.40 ± 1.03*	20.83 ± 1.11	21.63 ± 1.43	21.59 ± 1.78	24.72 ± 1.27*
Creatinine (mg/dl)	0.69 ± 0.02	0.67 ± 0.01	0.72 ± 0.02	0.75 ± 0.03	0.73 ± 0.02	0.73 ± 0.03
Total protein (g/dl)	6.65 ± 0.12	6.32 ± 0.16	6.54 ± 0.20	6.85 ± 0.14	6.77 ± 0.16	6.60 ± 0.15
Albumin (g/dl)	3.24 ± 0.08	3.16 ± 0.07	3.26 ± 0.07	3.30 ± 0.04	3.28 ± 0.09	3.28 ± 0.07
Total bilirubin (mg/dl)	0.16 ± 0.01	0.22 ± 0.01*	0.14 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.02*
Direct bilirubin (mg/dl)	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00
SGOT (U/l)	145.10 ± 7.90	116.00 ± 12.89	113.00 ± 6.67	138.00 ± 12.21	153.30 ± 13.96	128.20 ± 32.19
SGPT (U/l)	50.40 ± 4.38	44.80 ± 5.46	37.80 ± 4.91	47.90 ± 6.35	53.90 ± 6.62	35.20 ± 3.23
Alkaline phosphatase (U/l)	39.10 ± 3.55	38.00 ± 2.41	37.10 ± 2.55	36.10 ± 2.39	49.90 ± 7.71	42.60 ± 8.61

Values are expressed as mean ± S.E.M., n = 10, กลุ่มติดตามผล n =5.

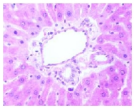
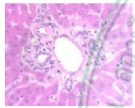
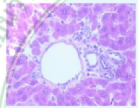
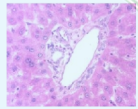
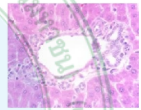
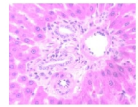
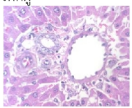
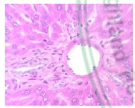
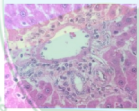
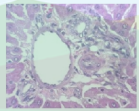
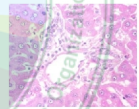
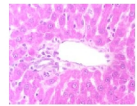
* Significantly different from the control group, $p<0.05$.

ตารางที่ 17 ค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูแรทเพศผู้ในการศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (เรื้อรัง) ของสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว

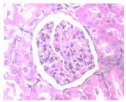
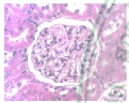
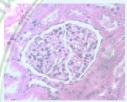
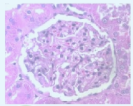
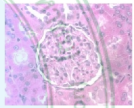
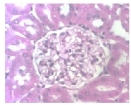
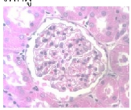
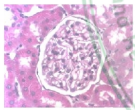
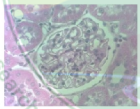
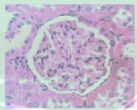
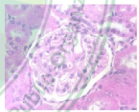
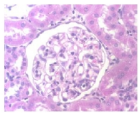
	ควบคุม	ติดตามผล	สารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว(mg/kg)			
		กลุ่มควบคุม	150 และ 50	750 และ 250	3750 และ 1250	กลุ่มติดตามผลสารสกัด 3750 และ 1250
BUN (mg/dl)	15.62 ± 1.18	15.71 ± 0.79	16.24 ± 0.97	14.25 ± 0.75	13.86 ± 1.02	14.46 ± 0.52
Creatinine (mg/dl)	0.59 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.60 ± 0.02	0.56 ± 0.03
Total protein (g/dl)	5.93 ± 0.06	6.77 ± 0.16	5.79 ± 0.08	5.79 ± 0.07	5.94 ± 0.06	6.30 ± 0.08*
Albumin (g/dl)	3.07 ± 0.03	3.28 ± 0.09	2.99 ± 0.03	4.07 ± 1.02	3.04 ± 0.03	2.98 ± 0.02
Total bilirubin (mg/dl)	0.20 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.08 ± 0.01*
Direct bilirubin (mg/dl)	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.06 ± 0.01*
SGOT (U/l)	126.10 ± 6.29	127.90 ± 4.82	125.30 ± 7.01	120.40 ± 5.30	103.60 ± 4.27*	102.20 ± 5.45*
SGPT (U/l)	41.80 ± 3.09	47.80 ± 5.47	45.50 ± 4.50	45.80 ± 4.08	36.80 ± 1.93	39.00 ± 1.26
Alkaline phosphatase (U/l)	76.10 ± 6.45	77.50 ± 5.54	72.00 ± 5.99	74.40 ± 5.68	67.60 ± 5.04	64.60 ± 4.37

Values are expressed as mean ± S.E.M., n = 10, กลุ่มติดตามผล n =5.

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

	กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	กลุ่มติดตามผล กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	สารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว 150 mg/kg และ 50 mg/kg	750 mg/kg และ 250 mg/kg	3750 mg/kg และ 1250 mg/kg	กลุ่มติดตามผลสารสกัด (3750 mg/kg และ 1250 mg/kg)
เพศเมีย						
เพศผู้						

ภาพที่ 29 Histopathology ของ portal triad ของตับในหนูกลุ่มควบคุม และหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว

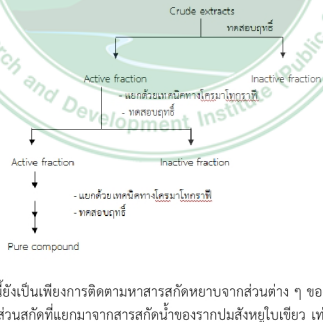
	กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	กลุ่มติดตามผล กลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น)	สารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว 150 mg/kg และ 50 mg/kg	750 mg/kg และ 250 mg/kg	3750 mg/kg และ 1250 mg/kg	กลุ่มติดตามผลสารสกัด (3750 mg/kg และ 1250 mg/kg)
เพศเมีย						
เพศผู้						

ภาพที่ 30 Histopathology ของ renal corpuscles (glomerulus and Bowman's capsule) ของหนูกลุ่มควบคุม และหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการวิจัย

โครงการวิจัยปีนี้ดำเนินการศึกษาต่อยอดสังหยู ซึ่งเป็นสมุนไพรเดี่ยว ที่ใช้ในการต้านพิษยาฆ่าแมลงตามภูมิปัญญา ซึ่งการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและการจัดทำมาตรฐานสารสกัดไม่ซับซ้อนเหมือนตำรับยา โครงการวิจัยปีนี้มุ่งเน้นศึกษางค์ประกอบทางเคมีจากส่วนต่าง ๆ ของสังหยูเพื่อหาสารออกฤทธิ์จากส่วนสกัด (fraction) เพื่อใช้ประโยชน์ในการจดสิทธิบัตร การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ และหาส่วนของพืช (ใบ รากปม รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้) เพื่อใช้ทดแทนราก ซึ่งจะทำให้สังหยูสามารถเข้าสู่กระบวนการเชิงพาณิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

ตัวอย่าง สังหยูใบเขียว (ได้แก่ ใบ รากปม รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้) สังหยูใบแดง (ได้แก่ ใบ รากใหญ่ กิ่งใหญ่ กิ่งเล็ก เปลือก แก่นหรือเนื้อไม้) นำมาลดขนาด อบให้แห้ง บดเป็นผง จากนั้นแต่ละตัวอย่างนำมาสกัดด้วย แอลกอฮอล์ และน้ำ ด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องหรือวิธีการต้ม จากนั้นทำให้แห้ง สารสกัดเฉพาะรากปมจากสังหยูใบเขียว (สารสกัดน้ำ) นำมาสกัดแยกด้วย partition technique โดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างขั้วกัน เนื่องจากรากปมของสังหยูใบเขียวเป็นตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาปีที่ผ่านมาและเป็นส่วนที่ใช้ตามภูมิปัญญา สารสกัดที่ได้ทั้งหมด 17 ตัวอย่าง นำไปทดสอบการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เพื่อคัดกรองเอาสารสกัดที่มีฤทธิ์ดีมาทำการทดลองต่อใน cell proliferation assay และ apoptosis assay ใน LX-2 cell line โดยกระบวนการในการสกัด แสดงดังแผนภาพข้างล่างนี้



ซึ่งในปีนี้ยังเป็นเพียงการติดตามหาสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของสังหยูทั้งชนิดใบเขียวและใบแดง และส่วนสกัดที่แยกมาจากสารสกัดน้ำของรากปมสังหยูใบเขียว เท่านั้น ซึ่งเมื่อติดตามผลจากการทดสอบฤทธิ์ จึงจะนำตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ที่ดีมาทำการแยกด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น

column chromatography (CC), preparative thin layer chromatography (prep. TLC) เป็นต้น ต่อไป เพื่อติดตามหาส่วนสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่ให้ฤทธิ์

ซึ่งตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ที่ดีในปีนี้ จากการทดสอบฤทธิ์ คือ ตัวอย่างที่ 9 สังหยู่ใบเขียว (เปลือก) และตัวอย่างที่ 15 สังหยู่ใบแดง (เปลือก) ซึ่งจะนำมาแยกสารองค์ประกอบและติดตามฤทธิ์ต่อไป และจากการศึกษาในปีนี้ได้ทำ chromatographic fingerprint ด้วย TLC ไว้

ขณะนี้ได้ดำเนินการทดลองฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น การทดลอง Cell proliferation assay และ Apoptosis analysis เสร็จเรียบร้อยแล้ว สรุปผลการดำเนินงานพบว่า สารสกัดที่ 9 สังหยู่ใบเขียว (เปลือก) และสารสกัดที่ 15 สังหยู่ใบแดง (เปลือก) ให้ผลดีในการทดลอง apoptosis assay โดยสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ทั้งแบบ early และ late apoptosis ดังนั้นในการดำเนินงานลำดับต่อไป จึงจะนำสารสกัดที่ 9 สังหยู่ใบเขียว (เปลือก) และสารสกัดที่ 15 สังหยู่ใบแดง (เปลือก) ไปสกัดแยกส่วน (partition) จนได้สาร fraction ต่างๆ ได้แก่ ethyl acetate, butanol และ water fractions จากนั้นจะนำส่วน fraction ที่ได้ไปทดลองฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น เพื่อหา fraction ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นดีที่สุด แล้วนำมาทดสอบในเซลล์ด้วยการทดลอง Cell proliferation assay และ Apoptosis analysis เพื่อหา fraction ที่มีฤทธิ์ apoptosis ดีที่สุด ที่จะนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป

การศึกษาความเป็นพิษระยะยาว (180 วัน) ของสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว โดยการป้อนสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียว 3 แบบคือ แบบที่ 1 ขนาด 150 และ 50 mg/kg แบบที่ 2 ขนาด 750 และ 250 mg/kg แบบที่ 3 ขนาด 3750 และ 1250 mg/ตลอด 180 วัน และทำการสังเกตอาการลักษณะภายนอกและการตรวจสุขภาพสัตว์ตลอดการทดลอง ไม่พบลักษณะอาการ การเปลี่ยนแปลงของสัตว์ทดลอง แต่พบว่ามีการเพิ่มหรือลดลงของน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะภายในบางอวัยวะ ข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญในการประเมินความเป็นพิษของสารเนื่องจากการเพิ่มหรือลดลงของน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะภายในที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและค่ามาตรฐานอาจเป็นหลักฐานที่อาจชี้ถึงผลของสารทดสอบที่อาจมีผลต่อระบบของร่างกายได้ แต่อย่างไรก็ตามลักษณะดังกล่าวดังกล่าวอาจเกิดจากตัวของสัตว์ทดลองเองไม่ใช่ผลของสารทดสอบดังกล่าว การศึกษาลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ทางพยาธิวิทยาในหนูแรททั้งสองเพศทุกกลุ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นขั้นตอนสุดท้ายและเป็นหลักฐานสำคัญที่จะชี้ให้เห็นว่าในสารทดสอบสามารถก่อพิษเรื้อรังได้หรือไม่ จากการตรวจพยาธิวิการของอวัยวะภายในด้วยตาเปล่า ได้แก่ หัวใจ ปอด ตับ ตับอ่อน ไต ม้าม ต่อมหมวกไต กระเพาะอาหาร ลำไส้ รังไข่ มดลูก อัณฑะ ตา กล้ามเนื้อ กระดูกและสมอง ไม่พบรอยโรค ลักษณะ ขนาด รูปร่างและสีที่ผิดปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบพยาธิสภาพของโรคใดๆ เกิดขึ้นและไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยู่ใบเขียวกับกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับน้ำกลั่น

การบ่งชี้ความผิดปกติของระบบต่างๆ ในสัตว์ทดลองเมื่อได้รับสารทดสอบติดต่อกันเป็นระยะเวลานานสามารถประเมินได้จากค่าโลหิตวิทยา ซึ่งค่าดังกล่าวยังสามารถใช้ประเมินอาการของโรคที่อาจเกิดขึ้นได้ โดยค่าเม็ดเลือดแดง (red blood cells) เม็ดเลือดขาว (white blood cells) และเกล็ดเลือด (platelet) เป็นค่าที่ใช้ประเมินสุขภาพของสัตว์ทดลองได้ หากจำนวนเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าเกณฑ์ปกติจะบ่งบอกถึงภาวะโลหิตจาง มีการสูญเสียเลือดในปริมาณมาก หรือมีความผิดปกติในการ

สร้างเม็ดเลือดและความสามารถในการขนส่งก๊าซออกซิเจน ส่วนค่าที่สูงกว่าเกณฑ์ปกติจะบอกถึงความเข้มข้นของเลือดที่มากเกินไป ซึ่งอาจเกิดจากภาวะขาดแคลนออกซิเจน การสูญเสียน้ำ เป็นต้น สำหรับภาวะติดเชื้อ อักเสบ ความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันและความผิดปกติของระบบสารคัดหลั่ง สามารถประเมินได้จากจำนวนเม็ดเลือดขาว ส่วนค่าเกล็ดเลือดอาจใช้บ่งชี้ถึงระบบภูมิคุ้มกันและระบบการแข็งตัวของเลือด[11-13] ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ค่าโลหิตวิทยาบางค่าของหนูแรททั้งเพศเมียและเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยุใบเขียวมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อนำค่าความผิดปกติดังกล่าวไปเทียบกับค่ามาตรฐานของสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติแล้วพบว่าค่าดังกล่าวอยู่ในเกณฑ์ปกติ (ภาคผนวก)[14,15] ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดรากใหญ่สังหยุใบเขียวไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของระบบโหลเวียนเลือด ไม่มีผลต่อการสร้างเลือดและเม็ดเลือดต่างๆ รวมทั้งไม่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย

ประสิทธิภาพการทำงานของไตและตับสามารถประเมินได้จากค่าเคมีคลินิก โดยค่ายูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือด (blood urea nitrogen, BUN) และค่าครีเอตินิน (creatinine) เป็นดรรชนีที่ใช้สำหรับชี้วัดของการทำงานและประสิทธิภาพของไต โดยค่าครีเอตินินเป็นค่าที่ค่อนข้างจำเพาะต่อในการตรวจสอบการทำงานของไต เพราะค่านี้จะไม่เปลี่ยนแปลงแม้จะมีความแตกต่างของอายุ เพศ อาหารและกิจกรรมที่เกิดขึ้นในแต่ละวัน โดยค่าครีเอตินินที่เพิ่มสูงขึ้นสามารถพบได้ในภาวะขาดโซเดียม ขาดน้ำ เกิดความผิดปกติที่ท่อไต เนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างท่อไตและหลอดเลือด และเส้นเลือดของไต ส่วนค่ายูเรียไนโตรเจนซึ่งเกิดจากขบวนการเมแทบอไลต์กรดอะมิโนในร่างกาย ถ้าหากร่างกายอยู่ในภาวะเครียดจะส่งผลให้ระดับยูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือดลดลง ส่วนภาวะขาดอาหารโปรตีนมีผลให้มีการเพิ่มขึ้นของค่าดังกล่าว แม้ว่าค่ายูเรียไนโตรเจนในกระแสเลือดจะไม่ใช่ค่าที่จำเพาะต่อไต แต่ค่าดังกล่าวก็มีความสำคัญเพราะสามารถบอกสภาวะของสัตว์ทดลองได้ ค่าโปรตีนรวม (total protein) อัลบูมิน (albumin) บิลิรูบิน (bilirubin) อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และซีรั่มอะมิโนทรานเฟอเรส (aminotrnferase) เป็นค่าที่บ่งชี้ถึงการทำงานและพยาธิสภาพของตับ โดยค่าอัลบูมินและโปรตีนจะเป็นดรรชนีที่ใช้ชี้วัดการทำหน้าที่ของเซลล์ตับ และเมื่อไตที่ตับเกิดความผิดปกติหรือมีความเสียหายเกิดขึ้นจะมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน ส่วนค่าบิลิรูบินเป็นค่าที่ได้จากการแยกสลายของฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดงที่หมดอายุชะลอหรือแตกสลายจากการถูกทำลาย เมื่อบิลิรูบินถูกขนส่งมาที่ตับจะถูกเรียกว่าอันคอนจูเกเตทบิลิรูบิน หรืออินไดเรคบิลิรูบิน (indirect bilirubin) และเมื่อถูกคอนจูเกทแล้วจะถูกเรียกคอนจูเกเตทบิลิรูบินหรือไดเรคบิลิรูบิน (direct bilirubin) การเพิ่มสูงขึ้นของอินไดเรคบิลิรูบินอาจบ่งชี้ถึงภาวะการแตกทำลายของเม็ดเลือดแดง การทำลายเซลล์ต้นตอของเม็ดเลือดแดงส่วนการเพิ่มสูงขึ้นของไดเรคบิลิรูบินอาจบ่งชี้ถึงภาวะการอุดตันภายในตับ เช่น ภาวะโรคตับแข็ง ตับอักเสบ การอุดตันการไหลของน้ำดีจากตับอ่อนเนื่องจากยาหรือการอุดตันนอกตับ เช่น การเกิดก้อนนิ่วอุดตันท่อน้ำดี สำหรับค่าอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่สูงขึ้นก็สามารถบอกถึงสภาวะการถูกอุดตันของตับได้ การตรวจเอนไซม์ซีรั่ม กลูแทมิค อ็อกซาโลอะซิติก ทรานซามิเนส และซีรั่ม กลูแทมิค ไพรูวิค ทรานซามิเนสจะเป็นข้อบ่งชี้ถึงการเสียหายของเซลล์ตับเพราะเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีระดับสูงในตับ[13, 16-25] ดังนั้นแม้ว่าหนูแรทที่ได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยุใบเขียวจะมีค่าเคมีคลินิกบางค่าที่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ค่าดังกล่าวมีความแตกต่างกันเล็กน้อยซึ่งไม่ได้แสดงให้เห็นว่าสมรรถภาพการทำงานของตับอ่อน ไต

และตับลดต่ำลงและค่าทุกค่ายังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน (ภาคผนวก) [26] นอกจากนี้ยังไม่พบความผิดปกติทางร่างกายหรือพฤติกรรมใดที่แสดงได้ว่ามีความผิดปกติทางสรีรวิทยาของร่างกายสัตว์ทดลองและพยาธิสภาพของอวัยวะที่สำคัญคือ ตับและไต

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น การทดลอง Cell proliferation assay และ Apoptosis analysis พบว่า สารสกัดที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) และสารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) ให้ผลดีในการต้านออกซิเดชั่น และการเกิด apoptosis โดยส่วนฤทธิ์ apoptosis นั้น สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ทั้งแบบ early และ late apoptosis ดังนั้นสารสกัดที่ 9 สังหยูใบเขียว (เปลือก) และสารสกัดที่ 15 สังหยูใบแดง (เปลือก) จึงควรจะนำไปแยกหาส่วนสกัดต่อ เพื่อหาสารออกฤทธิ์ที่จะนำไปศึกษาในสัตว์ทดลอง ศึกษาในมนุษย์ ควบคุมคุณภาพสารสกัด จดสิทธิบัตรและขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์

การศึกษาความเป็นพิษระยะยาวแบบเรื้อรัง โดยป้อนสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว 3 แบบ คือ แบบที่ 1 ขนาด 150 และ 50 mg/kg แบบที่ 2 ขนาด 750 และ 250 mg/kg แบบที่ 3 ขนาด 3750 และ 1250 mg/kg ตลอด 180 วัน และสังเกตอาการ ลักษณะภายนอกและการตรวจสุขภาพสัตว์ตลอดการทดลอง รวมทั้งประเมินค่าทางโลหิตวิทยา ค่าเคมีคลินิก และการตรวจพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในต่างๆ พบว่าการได้รับสารสกัดรากใหญ่สังหยูใบเขียว ติดต่อกันเป็นเวลานานๆ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษระยะยาว (180 วัน) ซึ่งข้อมูลในส่วนนี้เป็นส่วนสำคัญที่สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทดลองในมนุษย์ และขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์