

## บทคัดย่อ

การศึกษาในปีนี้เป็นการศึกษาเตรียมผลิตภัณฑ์ขับสารพิษจากใบสังหยูเขียวเพื่อการทดสอบในทางคลินิก พัฒนาสารสกัดสังหยูให้อยู่ในรูปแบบของยาเม็ดที่มีปริมาณสารสกัดสังหยูต่อเม็ด 200 มก. ลักษณะที่ปรากฏเป็นยาเม็ดมีลักษณะกลมยกขอบสีน้ำตาล ความแข็ง 150.30 N ความกร่อน - 0.37 % การแตกกระจายตัว 7.79 นาที ความแปรผันของน้ำหนักเม็ดยา + 7.98 - + 14.72 % ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.59 และไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งผลการประเมินผ่านเกณฑ์มาตรฐาน

ผลการศึกษาผลิตภัณฑ์สังหยูต่อมนุษย์ในระยะคลินิกในระยะที่ 1 ในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 8 คน แบ่งเป็นกลุ่มที่ 1 ได้รับสังหยู จำนวน 6 คน และกลุ่มที่ 2 ได้รับยาหลอกจำนวน 2 คน โดยการศึกษาในระยะที่ 1 เป็นการศึกษาแบบสุ่ม เปิดเผย และเพิ่มขนาดยา ซึ่งขนาดสังหยูเริ่มจาก 800 มิลลิกรัม ครั้งเดียว, 1600 มิลลิกรัม ครั้งเดียว, 800 มิลลิกรัม ก่อนอาหารเช้า-กลางวัน-เย็น (รวม 2400 มิลลิกรัมต่อวัน) เป็นเวลา 14 วัน ติดต่อกัน และขนาดสูงสุด 1600 มิลลิกรัม ก่อนอาหารเช้า-กลางวัน-เย็น (รวม 4800 มิลลิกรัมต่อวัน) เป็นเวลา 14 วัน ติดต่อกัน พบว่า มีความปลอดภัย ไม่พบความผิดปกติของเม็ดเลือด การทำงานของตับและไตเป็นปกติ การแข็งตัวของเลือดปกติ ปัสสาวะปกติ คลื่นไฟฟ้าหัวใจปกติ ไม่พบผลข้างเคียงที่มีนัยสำคัญทางคลินิก ในระยะที่ 2 ของการวิจัยในเกษตรกรสุขภาพดีที่มีประวัติการใช้สารกำจัดศัตรูพืช จำนวน 39 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เกษตรกร จำนวน 19 คนได้รับประทานสังหยู ขนาด 4800 มิลลิกรัมต่อวัน ติดต่อกัน 14 วัน และกลุ่มที่ 2 เกษตรกร จำนวน 20 คนได้รับประทานยาหลอกขนาดที่เท่ากัน จากนั้นตรวจติดตามอาสาสมัครในช่วงที่มีการพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชพบว่าเกษตรกรที่ได้รับสังหยูในด้านความปลอดภัย พบว่าเกษตรกรมากกว่าร้อยละ 84.2 ไม่เกิดผลข้างเคียง ร้อยละ 15.8 (3 คน) มีถ่ายเหลว 1-3 ครั้งต่อวัน อาการข้างเคียงอื่นที่พบเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับยาหลอก คือ ไอ เจ็บคอ ปวดศีรษะ ผื่นคัน ปวดแสบ ใจสั่น เหนื่อยออก ผลทางห้องปฏิบัติการได้แก่ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง (ฮีโมโกลบินต่อฮีมาโตคริตเท่ากับ  $13.69 \pm 1.40$  กรัมต่อเดซิลิตรต่อ  $42.88 \pm 3.78\%$  ในกลุ่มที่ได้สังหยู เทียบกับ  $13.97 \pm 1.69$  กรัมต่อเดซิลิตรต่อ  $44.04 \pm 3.83\%$  ในกลุ่มที่ได้ยาหลอก), จำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด (เม็ดเลือดขาว  $6976.84 \pm 1738.81$  ตัวต่อตารางมิลลิเมตร และเกล็ดเลือด  $259210.53 \pm 65880.85$  ตัวต่อตารางมิลลิเมตร ในกลุ่มเกษตรกรได้รับสังหยู และ เม็ดเลือดขาว  $6445.00 \pm 1873.38$  ตัวต่อตารางมิลลิเมตร และเกล็ดเลือด  $253085.00 \pm 76948.08$  ตัวต่อตารางมิลลิเมตร ในกลุ่มเกษตรกรได้รับยาหลอก) การทำงานของตับ และการทำงานของไต อยู่ในเกณฑ์ปกติ และไม่มีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ผลอัตราการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR), สารอักเสบ interleukine-6 (IL-6) และ Tumor necrotic factor alpha (TNFalpha) ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับสังหยู และกลุ่มที่ได้ยาหลอก ส่วนค่าทำงานของเอนไซม์ Acetylcholine esterase enzyme (AChE) และ Butylcholinesterase enzyme (BChE) มีการทำงานที่ลดลงหลังจากเกษตรกรใช้ยาฆ่าแมลง อย่างไรก็ตาม การได้รับสังหยูทำให้การทำงานของเอนไซม์ AChE และ BChE กลับมาทำงานได้ไม่แตกต่างจากการได้ยาหลอก การเกิดขบวนการ lipid peroxidation โดยวัดจากปริมาณการผลิตสาร Malondialdehyde (MDA) และการสร้าง nitric oxide ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มเกษตรกรที่ได้รับสังหยูและยาหลอก ในด้านความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยประเมินจาก ABTS และ FRAP assay พบว่าการได้รับสังหยู 4800 มิลลิกรัมเป็นเวลา 7 วัน และ 14 วันทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระซึ่งได้แก่เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione reductase (GR) activities พบว่าการได้รับสังหยูทำให้การทำงาน

ของ SOD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 1 และ 8 เทียบกับกลุ่มที่ได้ยาหลอก ส่วนการทำงานของ CAT มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับสังหยาเทียบกับยาหลอก ในการทำงานของ GR ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ได้รับสังหยาเทียบกับยาหลอก สรุปว่า สังหยาขนาด 4800 มิลลิกรัมต่อวันติดต่อกัน 14 วันมีความปลอดภัย และมีความสามารถในการเพิ่มการต่อต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase และชะลอการกีดการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholine esterase ซึ่งอาจอนุมานได้ว่าสังหยาที่มีแนวโน้มที่จะสามารถขับสารพิษในเกษตรกรที่ได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาวิจัยในกลุ่มเกษตรกรที่ใหญ่ขึ้น และการได้รับยาสังหยาในระยะเวลาที่นานขึ้นจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม

ข้อกำหนดเฉพาะของสมุนไพร 3 ชนิด (เหาะที่ คมน้ำเม็กซีโก และหม่อน) ได้จัดทำในงานวิจัยนี้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบต่อไป การจัดทำข้อมูลลักษณะทางมหภาค จุลทรรศน์ลักษณะ และคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ ของแต่ละตัวอย่าง ใช้วิธีการตามที่ระบุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ปี 2563 สมุนไพรแต่ละชนิดนำไปทำให้แห้งที่ 50 องศาเซลเซียส ลดขนาด จากนั้นนำไปสกัดด้วยวิธีการต้มโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย สารสกัดน้ำที่ได้ นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยจนได้ผงแห้งสีน้ำตาล ผลพบว่าได้ปริมาณผลผลิต 29.95, 29.89, และ 32.90 % w/w ตามลำดับ สารสกัดที่ได้นำไปตรวจสอบรูปแบบองค์ประกอบทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีผิวบาง แต่ละชนิดมีลักษณะเฉพาะที่นำไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพทางเคมี สารสกัดที่ได้ถูกนำไปศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากคมน้ำเม็กซีโก ใบหม่อน และเหาะที่ ในการกระตุ้นเซลล์ทางระบบภูมิคุ้มกันในหนูแก่ การทดลองทำในหนูถีบจักรเพศผู้และเพศเมีย อายุ 40 สัปดาห์ โดยแบ่งหนูออกเป็นกลุ่มต่างๆ หนูในกลุ่มทดสอบจะได้รับสารสกัดจากคมน้ำเม็กซีโก ใบหม่อน และเหาะที่ ในขนาดที่ต่างกัน 3 ความเข้มข้น (200-800 mg/kg) ทำการป้อนสารทดสอบเป็นเวลา 28 วัน เมื่อครบเวลา ฝ่าเก็บม้ามหนูเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากม้าม และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ B lymphocyte (CD19), total T lymphocyte (CD3), helper T lymphocyte (CD4) และ cytotoxic T lymphocyte (CD8) โดยการย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะ แล้วตรวจวัดโดยใช้เครื่อง flow cytometer ผลจากการทดลองพบว่า CD19 เพิ่มขึ้นในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดจากคมน้ำเม็กซีโกและใบหม่อน โดยเฉพาะกลุ่มได้รับสารสกัดคมน้ำเม็กซีโก 200 mg/kg มีเปอร์เซ็นต์ CD19 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเหาะที่มี CD19 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในส่วนของ CD3 หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดจากเหาะที่ทั้ง 3 ความเข้มข้น มีเปอร์เซ็นต์ CD3 เพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด และต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับ CD8 และ CD4 พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากคมน้ำเม็กซีโก และใบหม่อน มีเปอร์เซ็นต์ CD8 และ CD4 ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดจากเหาะที่เมื่อดูภาพรวมทั้งหมดมีแนวโน้มที่จะสามารถเพิ่มทั้งระดับ CD8 และ CD4 โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ขนาด 800 mg/kg ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับระดับ CD3 ที่เพิ่มขึ้น สำหรับผลในหนูเพศเมียพบว่า หนูที่ได้รับสารสกัดจากคมน้ำเม็กซีโก ใบหม่อน และเหาะที่ในภาพรวมมี CD19 ลดลงแต่มีแนวโน้มในการเพิ่มของ CD3 โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดคมน้ำเม็กซีโก 200-400 mg/kg, ใบหม่อน 400 mg/kg และเหาะที่ 200 mg/kg หนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดคมน้ำเม็กซีโก 400 mg/kg ใบหม่อนในขนาด 200 mg/kg และเหาะที่ 800 mg/kg มีแนวโน้มที่จะมี CD8 และ CD4 เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการทดลองทั้งหมด สารสกัดจากคมน้ำเม็กซีโก (400 mg/kg), ใบหม่อน (200 mg/kg) และเหาะที่ (800 mg/kg) สามารถเพิ่มระดับ T lymphocytes ในหนูได้ ผลที่ได้นี้สอดคล้องกันทั้งการเพิ่มขึ้นของระดับ CD8 , CD4 และ CD3 สามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากคมน้ำเม็กซีโกและใบหม่อนอาจจะช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้าน humoral mediated immunity ในหนูเพศผู้ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดคมน้ำเม็กซีโก ในขนาด 200

mg/kg ส่วนสกัดจากเหาะที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในด้าน cell mediated immunity ในหนูเพศผู้โดยสามารถเพิ่มปริมาณของ T lymphocyte ได้ สำหรับหนูเพศเมียเมื่อพิจารณาในภาพรวมพบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในด้าน humoral mediated immunity ได้ อย่างไรก็ตามสารสกัดคานธีนาเม็กซีโก 400 mg/kg, ใบหม่อน 200 mg/kg และเหาะที่ 800 mg/kg อาจจะมีผลในการช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในด้าน cell mediated immunity ในหนูเพศเมีย



## Abstract

Product preparation of *Litsea martabanica* (Kurz) Hook.f. extract for clinical trial was performed in this year. The water extract of *L. martabanica* (leaves) was formulated into the tablet dosage form with 200 mg of active ingredient. The tablets passed the specification of quality control for finished herbal products guidelines of Thai FDA; hardness = 150.30 N, friability = - 0.37 %, disintegration = 7.79 min, weight variation = + 7.98 - + 14.72 %, pH = 5.59, and without microbial contamination.

The current study is a clinical trial phase 1 of Sungyu product in 8 healthy volunteers divided into 2 groups. The first group (6 volunteers) received Sungyu, the second group (2 volunteers) was placebo. The first phase of this study was a randomized study where the dose of Sungyu was increased. Sungyu at 800 mg was taken once a day, 1600 mg once a day, and 2400 mg a day (3 times: 800 mg in the morning, afternoon, and evening) for 14 days. The highest dose was 4800 mg a day (3 times: 1600 mg in the morning, afternoon, and evening) for 14 days. Results showed that administration of Sungyu was safe, and there was no hematologic aberration. Liver and kidney functions were normal. Blood coagulation, urine analysis, and electrocardiogram were also normal. There was no clinically significant side effect. In phase 2 study in 39 healthy volunteers with a history of using pesticides, it was divided into 2 groups. Groups 1 (19 volunteers) received Sungyu at 4800 mg/day for 14 days. Groups 2 (20 volunteers) received placebo at the same dose and duration. All volunteers were monitored in the period of their pesticide spraying. For safety evaluation, it was found that more than 84.2% of volunteers had no side effect. Three of them (15.8%) had frequent liquid defecate (1-3 times a day). Slightly, other side effects could be found but it was not statistically different from placebo. Those side effects included cough, sore throat, headache, rash, burning feeling, palpitations, and sweating. Laboratory results showed that in the Sungyu group, the ratio of hematocrit (Hct) to hemoglobin (Hb) was  $13.69 \pm 1.40$  g/dL to  $42.88 \pm 3.78\%$  while this ratio was  $13.97 \pm 1.69$  g/dL to  $44.04 \pm 3.83\%$  in placebo. The Sungyu group exhibited  $6976.84 \pm 1738.81$  cells/mm<sup>2</sup> of white count and  $259210.53 \pm 65880.85$  cells/mm<sup>2</sup> of platelet count while placebo showed  $6445.00 \pm 1873.38$  cells/mm<sup>2</sup> of white count and  $253085.00 \pm 76948.08$  of platelet count. Liver and kidney functions of the two groups were in normal range and had no statistical difference. Results of Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR), inflammatory mediator including interleukine-6 (IL-6) and Tumor necrotic factor alpha (TNF- $\alpha$ ) showed no difference between Sungyu and placebo groups. Data from functional assay of acetylcholine esterase enzyme (AChE) and butylcholinesterase enzyme (BChE) indicated that the activity of these 2 enzymes was reduce after the volunteers had used pesticides. However, the enzyme function was restored in volunteers receiving Sungyu or placebo with no significant difference between the groups. Results of lipid peroxidation determined by malondialdehyde (MDA) and nitric oxide production

exhibited no difference in Sungyu or placebo. For the anti-oxidant ability examined by ABTS and FRAP assay, it was found that the volunteers who had received Sungyu at 4800 mg for 7 days and 14 days showed a significant increase in anti-oxidant ability. The functions of other anti-oxidant related enzymes, including Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione reductase (GR) were determined. The farmers in Sungyu group has significantly increased in superoxide dismutase activity compare to placebo group. However, catalase activity was significantly reduced in Sungyu group compare to placebo group. There is no significantly changed of GR activity between those groups. In conclusion, Sungyu 4800 mg per day for 14 days are safe. Sungyu has significantly increase antioxidant capacity through an increased in SOD activity. Sungyu has trend to delay AChE inhibition. Sungyu may reduce toxicity of pesticides usage agriculturists. However, further investigation in a large farmer population and longer Sungyu application should be considered.

Pharmacognostic specifications, of the three species (*Asplenium unilaterale*, *Cnidocolus chayamansa* McVaugh, and *Morus alba* L.) were performed in this research for use as a guideline for quality control in further study. Macroscopic character, microscopic character, and physico-chemical properties of each sample were determined with the methods followed by THP 2020. Each sample was dried in the hot air oven at 50 °C, and then reduces their size. The plant powder was extracted by decoction method. The water extract was dried by spray dryer to obtain the brownish powder. Thin layer chromatography was used as the tool for chemical quality control. Each extract was investigated their pharmacological activities.

This study was to determine the effect of extracts of *Cnidocolus chayamansa* (CC), *Morus alba* (MA) leaf, and *Asplenium unilaterale* Lam. (AU) in stimulating immune cells in aging mice. The experiment was performed in male and female mice, age of 40 weeks. The mice were divided into different groups. The experiment groups received extracts from CC, MA leaf, and AU at three doses (200-800 mg/kg) for 28 days. At the end of the time, removed the mice's spleen and separated the white blood cells from the spleen. The changes in immune cells, including B lymphocyte (CD19), total T lymphocyte (CD3), helper T lymphocyte (CD4), and cytotoxic T lymphocyte (CD8), were studied by staining with a specific antibody and then measured using a flow cytometer. The result found that the percentage of CD19 increased in male mice that received CC and MA extract, especially those given 200 mg/kg of CC had significantly increased CD19 levels. In the AU extract group, there was a significant reduction in CD19. For the CD3 marker, the male mice receiving the three concentrations of AU showed an increase in the percentage of CD3 compared with the control group. The percentage CD8 and CD4 of mice treated with CC and MA extracts were not different from the mice in the control group. Overall, male mice fed AU extracts were more likely to increase both CD8 and CD4 levels, especially at a dose of 800 mg/kg, which was consistent with an increase of CD3 levels. In female mice, the overall results revealed

that CD19 had decreased in mice treated with CC, MA, and AU extracts, but CD3 tended to increase, especially in the group receiving 200-400 mg/kg of CC extract, 400 mg/kg of MA leaf extract, and 200 mg/kg of AU extract. The percentage of CD8 and CD4 tended to increase, but no statistically significant difference. The results from all experiments revealed that CC extract (400 mg/kg), MA leaf extract (200 mg/kg), and AU extract (800 mg/kg) was able to increase the levels of T lymphocytes in mice. These results correlated with the increase of CD8, CD4, and CD3 levels. It can conclude that CC and MA extracts may promote humoral mediated immunity in male mice, especially CC extract at a dose of 200 mg/kg. The AU extract was able to induce cell-mediated immunity in male mice by increasing the amount of T lymphocytes. For female mice, all test extracts could not induce humoral mediated immunity. However, 400 mg/kg of CC extract, 200 mg/kg of MA leaf extract, and 800 mg/kg of AU extract may have a beneficial effect on stimulating cell-mediated immunity in female mice.

