

เภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกชื่อเอ 233 หลังการรับประทานแบบครั้งเดียวและ  
แบบหลายครั้งติดต่อกันในหนูแรท

นางสาวบัณฑิตา พรหมจำรัส

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา  
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2553  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PHARMACOKINETICS OF SINGLE AND MULTIPLE ORAL DOSES OF  
STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa 233 IN RATS

Miss Banthita Promjamrat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology

Department of Pharmacology and Physiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์               | เภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกชื่อซีเอ 233<br>หลังการรับประทานแบบครั้งเดียวและแบบหลายครั้ง<br>ติดต่อกันในหนูแรท |
| โดย                             | นางสาว บัณฑิตา พรหมจำรัส  |
| สาขาวิชา                        | เภสัชวิทยา  |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก | รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.มยุรี ตันตีสิริระ   |
| อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช   |

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พิณทิพย์ พงษ์ไพฑูริ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง พันตำรวจโทหญิง ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.มยุรี ตันตีสิริระ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุรีย์ เจียรณมงคล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(เภสัชกร ดร.พิสิฐ เขมาวุฒม์)

บัณฑิตา พรหมจำรัส : เกสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 หลังการรับประทานแบบครั้งเดียวและแบบหลายครั้งติดต่อกันในหนูแรท.

(PHARMACOKINETICS OF SINGLE AND MULTIPLE ORAL DOSES OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENNELLA ASIATICA* ECa 233 IN RATS)

อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ญ. ดร.มยุรี ดันตีสิริระ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ. ภก. ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช, 77 หน้า.

สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 มีสารสำคัญคือ madecassoside และ asiaticoside และมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการพัฒนาการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลอง และมีความเป็นพิษต่ำ แต่ยังคงขาดข้อมูลทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 หลังการรับประทานในหนูแรท โดยทำการศึกษาในหนูแรทเพศผู้พันธุ์ Sprague-Dawley ซึ่งได้รับการป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 แบบครั้งเดียว และแบบต่อเนื่อง 7 วัน วันละ 2 ครั้ง ในขนาด 30 และ 60 มก./กก. แล้วตรวจวัดระดับ madecassic acid ในพลาสมา ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซิลิควิดโครมาโตกราฟีที่ได้ยืนยันความถูกต้องแล้ว ซึ่งวิธีนี้สามารถวิเคราะห์ madecassic acid ในช่วง 0.6-24 มคก./มล. และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้เท่ากับ 0.6 มคก./มล. ความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ทั้งภายในวันเดียวกันและต่างวันกันในค่าของ % bias และ % RSD มีค่าน้อยกว่า 10 % และมีประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่างไม่ต่ำกว่า 90 % วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงไม่ถูกรบกวนด้วยสารอื่นในร่างกาย เมื่อนำมาใช้ศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 พบว่าในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดครั้งเดียวในขนาด 30 และ 60 มก./กก. มีค่าเวลาที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 2.25 และ 4 ชม. ค่าความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 1.16 และ 3.80 มคก./มล. ค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้งเท่ากับ 1.83 และ 9.34 มคก. ชม./มล. และค่าครึ่งชีวิตเท่ากับ 0.54 และ 0.96 ชม. ตามลำดับ และเมื่อศึกษาในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแบบต่อเนื่องพบว่ามีความเข้มข้นใต้เส้นโค้งและค่าครึ่งชีวิตสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดแบบครั้งเดียวทั้งสองขนาด แสดงว่า madecassic acid อาจมีการสะสมในร่างกาย คาดว่าข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ในการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์หรือเภสัชพลศาสตร์ของอีซีเอ 233 ต่อไป

ภาควิชา เกสัชวิทยาและสรีรวิทยา

สาขาวิชา เกสัชวิทยา

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนิติ.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

# # 5076573233 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS : PHARMACOKINETIC / ECa 233, STANDARDIZED EXTRACT OF  
*CENTELLA ASIATICA* / MADECASSIC ACID

BANTHITA PROMJAMRAT : PHARMACOKINETICS OF SINGLE AND  
MULTIPLE ORAL DOSES OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA*  
*ASIATICA* ECa 233 IN RATS. ADVISOR : ASSOC. PROF. MAYUREE  
TANTISIRA, Ph.D., CO-ADVISOR : ASST. PROF. CHAMNAN PATARAPANICH,  
Ph.D., 77 pp.

The standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 (ECa 233) containing mainly madecassoside and asiaticoside. Pharmacological evaluation of ECa 233 in animals demonstrated positive effect on learning and memory. ECa 233 has been found to exhibit a favorable safety profile. However, information on pharmacokinetics of ECa 233 is not currently available. The aim of this study was to investigate the pharmacokinetic profiles of ECa 233 after oral administration in rats. Male Sprague-Dawley rat received ECa 233 at single dose (30 or 60 mg/kg) and multiple doses for 7 days (30 or 60 mg/kg twice daily) by oral administration. Madecassic acid levels in plasma were determined by validated high performance liquid chromatography method. The concentrations of madecassic acid were linearly related to the response in the range of 0.6-24 µg/ml and the lower limit of quantification (LLOQ) was 0.6 µg/ml. The intra-day and inter-day accuracy and precision in term of % bias and % RSD were less than 10 %. The extraction recoveries of madecassic acid was not less than 90 %. No endogenous interference was detected. The method was applied to pharmacokinetic studies of ECa 233. After single oral administration of 30 and 60 mg/kg of ECa 233, the main pharmacokinetic parameters obtained were:  $T_{max}$ , 2.25 and 4 h;  $C_{max}$ , 1.16 and 3.80 µg/ml;  $AUC_{0-24h}$ , 1.83 and 9.34 µg.h/ml; and  $t_{1/2}$ , 0.54 and 0.96 h, respectively. However, after multiple doses administration with both 30 and 60 mg/kg,  $AUC_{0-24h}$  and  $t_{1/2}$  were higher than those observed after single dose administration, indicating that madecassic acid was possibly accumulated. Preliminary pharmacokinetic profiles obtained in the present study is expected to be further pharmacokinetic or pharmacodynamic studies of ECa 233.

Department : Pharmacology and Physiology

Field of Study : Pharmacology

Academic Year : 2010

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร.มยุรี ตันติสิระ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร.ชำนาญ ภัทรพานิช ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ รศ. ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ ที่ให้ความรู้ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ รวมถึง ดร.พิสิฐ เขมาวุฒม์ ที่ช่วยให้แนวทางและให้คำปรึกษาเทคนิค ในการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณพรณี ชินเจริญพันธ์ ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในทุกด้านทำให้ งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จออกมาได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ครอบครัวที่ให้โอกาสและสนับสนุนให้การศึกษาสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

## สารบัญ

|  | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....   | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....  | จ    |
| กิตติกรรมประกาศ.....   | ฉ    |
| สารบัญ.....  | ช    |
| สารบัญตาราง.....   | ฅ    |
| สารบัญภาพ.....   | ฎ    |
| คำอธิบายลักษณะและคำย่อ.....  | ฏ    |
| บทที่  |      |
| 1 บทนำ   |      |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....  | 1    |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....   | 2    |
| 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง   |      |
| ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....  | 3    |
| 3 วิธีดำเนินการวิจัย   |      |
| สัตว์ทดลอง.....  | 15   |
| สารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์.....  | 15   |
| ขั้นตอนการวิจัย.....   | 17   |
| การเก็บรวบรวมและการวิเคราะห์ข้อมูล.....  | 24   |
| 4 ผลการวิจัย   |      |
| การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ระดับ madecassic acid ในพลาสมา<br>โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography..... | 25   |

|   |    |
|---|----|
| ผลการศึกษากลัซจอนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกชื่อเอ 233 โดยการวัด<br>ระดับของ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid<br>Chromatography..... | 32 |
| 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....   | 42 |
| รายการอ้างอิง.....  | 47 |
| ภาคผนวก.....  | 52 |
| ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....   | 77 |



## สารบัญตาราง

| ตารางที่   | หน้า |
|--|------|
| 1. ค่า % absolute recovery ของการเตรียมตัวอย่าง madecassic acid ในพลาสมา...  | 26   |
| 2. การยืนยันสภาพเชิงเส้นของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมา.....  | 28   |
| 3. ความเข้มข้นต่ำสุดของ madecassic acid ในพลาสมาที่วิธีสามารถวิเคราะห์ได้.....   | 29   |
| 4. ความแม่นยำของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมาในวันเดียวกัน.....  | 30   |
| 5. ความเที่ยงของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมาในวันเดียวกัน.....  | 30   |
| 6. ความแม่นยำของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมาต่างวันกัน.....   | 31   |
| 7. ความเที่ยงของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมาต่างวันกัน.....   | 31   |
| 8. ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ของหนูแรทที่รับประทานสารสกัด<br>มาตรฐานบัวบกอีซีไอ 233 ขนาด 30 mg/kg ครั้งเดียว.....                     | 33   |
| 9. ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ของหนูแรทที่รับประทานสารสกัด<br>มาตรฐานบัวบกอีซีไอ 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว.....                     | 35   |
| 10. ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ของหนูแรทที่รับประทานสารสกัด<br>มาตรฐานบัวบกอีซีไอ 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน..... | 37   |
| 11. ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ของหนูแรทที่รับประทานสารสกัด<br>มาตรฐานบัวบกอีซีไอ 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน..... | 39   |
| 12. แสดงค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ในพลาสมาทั้ง 4 กลุ่ม.....   | 41   |
| 13. ระดับ madecassic acid ในเลือดของหนูแรท กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก<br>อีซีไอ 233 ขนาด 30 mg/kg แบบครั้งเดียว.....                      | 57   |
| 14. ระดับ madecassic acid ในเลือดของหนูแรท กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก<br>อีซีไอ 233 ขนาด 60 mg/kg แบบครั้งเดียว.....                      | 58   |
| 15. ระดับ madecassic acid ในเลือดของหนูแรท กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก<br>อีซีไอ 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน.....      | 59   |

16. ระดับ madecassic acid ในเลือดของหนูแรท กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก  
สีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน..... 60

## สารบัญภาพ

| ภาพที่   | หน้า |
|--|------|
| 1. <i>Centella asiatica</i> (Linn.) Urban.....   | 3    |
| 2. สูตรโครงสร้างของ asiaticoside, madecassoside, madecassic acid และ asiatic acid.....   | 4    |
| 3. สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีไอ 233 (ECa 233).....  | 5    |
| 4. แสดงการ metabolism ของ asiaticoside.....  | 14   |
| 5. แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ madecassic acid ในพลาสมา ชุดที่ 1....  | 27   |
| 6. แสดงโครมาโตแกรมของ blank plasma (A) เทียบกับโครมาโตแกรมของ พลาสมา madecassic acid (B).....  | 32   |
| 7. ระดับของ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ ของหนูแรทที่ รับประทานสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีไอ 233 ขนาด 30 mg/kg ครั้งเดียว.....  | 34   |
| 8. ระดับของ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ ของหนูแรทที่ รับประทานสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีไอ 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว.....  | 36   |
| 9. ระดับของ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ ของหนูแรทที่ รับประทานสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีไอ 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน.....   | 38   |
| 10. ระดับของ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ ของหนูแรทที่ รับประทานสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีไอ 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน.....  | 40   |
| 11. แสดงโครมาโตแกรมของ blank plasma (A) โครมาโตแกรมของ blank plasma ที่ spiked madecassic acid และ asiatic acid (B) และโครมาโตแกรมของพลาสมาหนูแรทที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีไอ 233 (C)..... | 56   |

12. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 4  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg ครั้งเดียว..... 61
13. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 5  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg ครั้งเดียว..... 62
14. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 1  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว..... 63
15. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 2  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว..... 64
16. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 3  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว..... 65
17. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 4  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว..... 66
18. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 3  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน..... 67
19. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 4  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน..... 68
20. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 5  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน..... 69
21. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 6  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน..... 70

|  |    |
|--|----|
| 22. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 1<br>กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง<br>ต่อเนื่อง 7 วัน..... | 71 |
| 23. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 2<br>กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง<br>ต่อเนื่อง 7 วัน..... | 72 |
| 24. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 3<br>กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง<br>ต่อเนื่อง 7 วัน..... | 73 |
| 25. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 4<br>กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง<br>ต่อเนื่อง 7 วัน..... | 74 |
| 26. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 5<br>กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง<br>ต่อเนื่อง 7 วัน..... | 75 |
| 27. แสดงความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 6<br>กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง<br>ต่อเนื่อง 7 วัน..... | 76 |

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

|                  |   |                              |
|------------------|---|------------------------------|
| %                | = | percent                      |
| μg               | = | microgram                    |
| μl               | = | microlitre                   |
| °C               | = | degree Celsius               |
| AUC              | = | area under the curve         |
| C <sub>max</sub> | = | maximum concentration        |
| g                | = | gram                         |
| h                | = | hour                         |
| k                | = | kappa                        |
| kg               | = | kilogram                     |
| M                | = | Molar                        |
| mg               | = | milligram                    |
| min              | = | minute                       |
| ng               | = | nanogram                     |
| nm               | = | nanometer                    |
| pg               | = | picogram                     |
| R <sup>2</sup>   | = | coefficient of determination |

**คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)**

|            |   |                                     |
|------------|---|-------------------------------------|
| RSD        | = | relative standard deviation         |
| SD         | = | standard deviation                  |
| SE         | = | standard error                      |
| $t_{1/2}$  | = | half-life                           |
| $T_{\max}$ | = | time to reach maximum concentration |
| UV         | = | ultraviolet                         |
| $\alpha$   | = | alpha                               |
| $\beta$    | = | beta                                |

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บัวบกมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (Linn.) Urban อยู่ในวงศ์ Umbelliferae พบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย ศรีลังกา จีน มาดากัสการ์ แอฟริกาใต้และอเมริกาใต้ สารสำคัญที่พบในบัวบกส่วนมากเป็น triterpene acid และ glycoside ได้แก่ asiatic acid, madecassic acid, asiaticoside และ madecassoside ซึ่งในสมัยก่อนมีการนำบัวบกมาใช้รักษาแผลสด แผลเรื้อรัง แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก และแก้อาการฟกช้ำ (Jamil *et al.*, 2007; วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

ต่อมาได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบัวบกทั้งในสัตว์ทดลองและทางคลินิก พบว่าบัวบกมีฤทธิ์ในการสมานแผล (Maquart *et al.*, 1999; Shukla *et al.*, 1999) มีผลต่อการเรียนรู้และความจำ (Veerendra and Gupta, 2003) รักษาแผลในทางเดินอาหาร (Cheng and Koo, 2000; Guo *et al.*, 2004) รักษาความผิดปกติของหลอดเลือดดำ (Cesarone *et al.*, 2001) และฤทธิ์ลดการอักเสบ (Punturee *et al.*, 2004) จะเห็นได้ว่าบัวบกเป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจ ควรมีการพัฒนาเป็นยาใช้รักษาโรคต่อไป แต่การทำสมุนไพรให้เป็นยานั้นค่อนข้างยาก เนื่องจากสมุนไพรมีความแปรปรวนสูง สารสกัดที่ได้ในแต่ละครั้งอาจไม่เหมือนกัน ดังนั้นกลุ่มนักวิจัยในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจึงได้ร่วมกันพัฒนาวิธีการสกัดสารมาตรฐานบัวบกชื่อซีเอ 233 (ECa 233) เป็นสารสกัดที่มีปริมาณสารสำคัญที่สม่ำเสมอ โดยกำหนดให้มีปริมาณ triterpenoid glycosides ไม่น้อยกว่า 80% และมีอัตราส่วนของ madecassoside ต่อ asiaticoside เป็น  $1.5 \pm 0.50 : 1$  (Tantisira, 2009) เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบกชื่อซีเอ 233 มีฤทธิ์แก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (มยุรี ตันติสิระและคณะ, 2551; Kam-eg *et al.*, 2009) และมีฤทธิ์เร่งการสมานแผลทั้งในแผลกรีดและแผลไหม้ (มยุรี ตันติสิระและคณะ, 2551; Tanintaraard *et al.*, 2009) จากนั้นได้ทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและ



พิษกึ่งเรื้อรัง โดยการให้สารสกัดมาตรฐานบัวบกทางปากต่อเนื่อง 3 เดือน พบว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 มีความเป็นพิษต่ำ (Chivapat *et al.*, 2011) แม้จะมีการศึกษาทั้งฤทธิ์และพิษของสารสกัดมาตรฐานบัวบกแล้ว แต่ยังคงขาดข้อมูลทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ ซึ่งจำเป็นต่อการนำเอาสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ไปพัฒนาใช้เป็นยารักษาโรค ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 หลังให้รับประทานแบบครั้งเดียวและแบบหลายครั้งติดต่อกันในหนูแรท เพื่อให้ได้ข้อมูลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ซึ่งจำเป็นต่อการพิจารณากำหนดขนาดและความถี่ของการบริหารในการทดลองขั้นตอนต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 หลังให้รับประทานแบบครั้งเดียวและแบบหลายครั้งติดต่อกันในหนูแรท

### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

- Pharmacokinetics
- ECa 233, Standardized extract of *Centella asiatica*
- Madecassic acid

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ในสัตว์ทดลอง ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการกำหนดขนาดและวิธีใช้ที่เหมาะสมกับการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ในมนุษย์ต่อไป

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

##### บัวบก

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ (Jamil *et al.*, 2007; วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

|                     |  |
|---------------------|--|
| ชื่อสามัญ (ไทย)     | บัวบก                                  |
| ( อังกฤษ )          | Asiatic pennywort , Gotu kola          |
| ชื่อวิทยาศาสตร์     | <i>Centella asiatica</i> (Linn.) Urban |
| ชื่อวงศ์            | Umbelliferae                           |
| ชื่อพื้นเมืองอื่น ๆ | ผักหนอก, ผักแว่น                       |

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

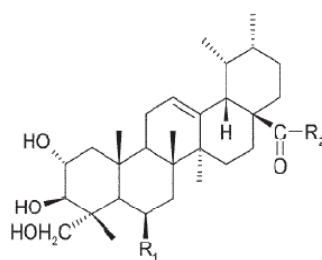
บัวบกเป็นพืชล้มลุก ขึ้นเป็นกอติดดิน มีอายุหลายปี ลำต้นเลื้อยไปตามพื้นดิน แตกรากและใบตามข้อ ใบเป็นใบเดี่ยว รูปไต ออกเป็นกระจุกตามข้อ ขอบใบหยัก ก้านใบยาว ดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อเล็ก ๆ ประมาณ 3-4 ดอก ดอกสีม่วงแดง ผลแบน



รูปที่ 1 *Centella asiatica* (Linn.) Urban (<http://www.centerchem.com>)

องค์ประกอบทางเคมี (Jamil *et al.*, 2007)

1. Triterpene acid ได้แก่ asiatic acid, madecassic acid, terminolic, centic, centellic, centolic acid, indocentolic acid, isobrahmic, betulic, brahmic และ madasiatic acid
2. Volatile และ Fatty oil ได้แก่ glyceride ของ palmitic, stearic, lignoceric, oleic, linoleic และ linolenic acid
3. Alkaloid ได้แก่ hydrocotylin
4. Glycoside ได้แก่ asiaticoside A, asiaticoside B, asiaticoside, madecassoside และ centelloside
5. Flavonoid ได้แก่ 3-glucosylquercetin, kaempferol, 3-glucosylkaempferol, 7-glucosylkaempferol, quercetin
6. อื่น ๆ ได้แก่ mesoinositol, oligosaccharide centellose, stigmasterol, sitosterol, campesterol, polyacetylenes, carotenoids, vitamin B และ vitamin C เป็นต้น



|                 | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | Mol. formula                                    | Mol. wt. |
|-----------------|----------------|----------------|---|----------|
| Asiaticoside    | H              | O-glu-glu-rham | C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> O <sub>19</sub> | 958      |
| Madecassoside   | OH             | O-glu-glu-rham | C <sub>43</sub> H <sub>78</sub> O <sub>20</sub> | 974      |
| Madecassic acid | OH             | OH             | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>  | 504      |
| Asiatic acid    | H              | OH             | C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>  | 488      |

รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของ asiaticoside, madecassoside, madecassic acid และ asiatic acid

สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 (ECa 233) (Tantisira, 2009)

สกัดสารมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 (ECa 233) มีลักษณะเป็นผงสีขาวนวลถึงเหลืองนวล ซึ่งมีปริมาณ triterpenoid glycosides ไม่น้อยกว่า 80% และมีอัตราส่วนของ madecassoside ต่อ asiaticoside เป็น  $1.5 \pm 0.50 : 1$



รูปที่ 3 สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 (ECa 233)

**งานวิจัยเกี่ยวกับบัวบกและสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 (ECa 233)**

**ข้อมูลการศึกษาทางเภสัชวิทยา**

1. ฤทธิ์ในการสมานแผล

1.1 การศึกษาใช้ titrated extract จากบัวบก (TECA) ซึ่งประกอบด้วย asiatic acid, madecassic acid และ asiaticoside ในหนูแรท โดยผ่าตัดฝัง stainless steel ได้ผิวหนัง และฉีด TECA ลงบนแผลของหนู จากนั้นนำ wound chamber มาวิเคราะห์ทางชีวเคมีและฮิสโตวิทยา พบว่าเพิ่มการ remodeling ของ collagen matrix และกระตุ้นการสร้าง glycosaminoglycan มากขึ้น (Maquart *et al.*, 1999)

1.2 การศึกษาใช้ asiaticoside ความเข้มข้น 0.2% ทาบนแผลของหนูตะเภาปกติ และ 0.4% ทาบนแผลของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน พบว่ามีผลเพิ่ม hydroxyproline, tensile strength, collagen และกระบวนการ epithelisation (Shukla *et al.*, 1999)

1.3 การศึกษาฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของ asiaticoside ขนาดต่ำต่อการสมานแผลใหม่ในหนูถีบจักร พบว่าเมื่อทาขี้ผึ้งที่มี asiaticoside ขนาด 10 pg, 1 ng และ 100 ng/wound area พบว่าประสิทธิภาพการสมานแผลใหม่ด้วยขี้ผึ้ง asiaticoside เพิ่มขึ้น ผ่านกระบวนการ angiogenesis ระหว่างการซ่อมแซมแผล ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นการสร้าง vascular endothelial growth factor จากการเพิ่มขึ้นของ monocyte chemoattractant protein-1 ใน keratinocyte และการเพิ่มขึ้นของ interleukin-1 $\beta$  ใน macrophage เกิดจากการเหนี่ยวนำร่วมกันด้วย asiaticoside และ monocyte chemoattractant protein-1 (Kimura *et al.*, 2008)

1.4 การศึกษาฤทธิ์ต่อผิวหนังของหนุตะเภาของครีมกัลยโคไซด์ของไบบัวบก โดยใช้ครีมกัลยโคไซด์ที่สกัดได้จากไบบัวบก ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ทาผิวหนังของหนุตะเภาที่โกนขนออกแล้วเป็นวงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร วันละครั้ง เป็นเวลา 1 เดือน แล้วสังเกตปฏิกิริยาต่อผิวหนังของครีมยานี้เปรียบเทียบกับผลจากการทาผิวหนังด้วยครีมเบส ผลการทดลองไม่พบความผิดปกติของผิวหนังหนุตะเภาโดยการสังเกตด้วยตาเปล่า และการศึกษาชิ้นเนื้อผิวหนังทางพยาธิวิทยาพบว่าครีมกัลยโคไซด์ของไบบัวบกทำให้มี keratinization เพิ่มขึ้น มี papillomatosis และเซลล์ในชั้น epidermis และ dermis บวมขึ้นเล็กน้อย และมี small round cell infiltration เพิ่มขึ้นเล็กน้อย รวมทั้งไม่พบความผิดปกติของหลอดเลือด ต่อผิวหนังหรือรูขุมขน (บุญเจือ ธรณินทร์และคณะ, 2527)

1.5 การศึกษาการหายของแผลทางคลินิกโดยการใช้ครีมไบบัวบก 1% รักษาแผลเรื้อรังในผู้ป่วย 22 ราย แล้ววัดขนาดแผลในวันที่ 7, 14 และ 21 พบว่าขนาดของแผลลดลงทั้งด้านกว้าง ด้านยาว และด้านลึก และเมื่อสิ้นสุดการรักษาพบว่าขนาดของแผลที่วัดทางด้านกว้าง ด้านยาว และด้านลึกมีขนาดเล็กลงจากเดิมเฉลี่ยร้อยละ 47.47, 46.98 และ 76.68 ตามลำดับ และในวันที่ 21 ของการศึกษามีแผลหายสนิท 17 ราย และยังไม่หายสนิท 5 ราย (ศิริรัตน์ โกศลยวัฒน์และคณะ, 2531)

1.6 การศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลของสารสกัดหยาบบัวบกแยกส่วน (fractional extracts) ในหนูแรท ทำการทดสอบด้วยการทำ burn wound ซึ่งเป็นแผลจากความร้อนและ incision wound ซึ่งเป็นแผลจากการกรีด เมื่อทาสารสกัดดังกล่าวลงบนแผล พบว่าทำให้แผล

ใน burn wound มีขนาดเล็กลง และทำให้ tensile strength ของ incision wound มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (มยุรี ตันติสิระและคณะ, 2551)

1.7 การศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกชื่อเอ 233 ต่อการสมานแผลที่เกิดจากการกรีดในหนูแรท โดยทาเจลสารสกัดมาตรฐานบัวบก 0.05% ที่แผลวันละครั้ง เป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีฤทธิ์เร่งการสมานแผล โดยมีค่าแรงดึงสูงสุด (tensile strength) และความหนาของชั้นหนังกำพร้าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเจลที่ไม่มีสารทดสอบ (Tanintaraard *et al.*, 2009)

1.8 การศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกชื่อเอ 233 ต่อโรคแผลร้อนในชนิดไม่รุนแรงในอาสาสมัคร โดยได้รับยาป้ายปากชื่อเอ 233 เทียบกับยาหลอก ป้ายปากวันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 10 วัน พบว่ายาป้ายปากชื่อเอ 233 มีผลลดระดับความปวด การอักเสบและขนาดของแผลร้อนในชนิดไม่รุนแรงได้ (Ruengprasertkit *et al.*, 2010)

## 2. ฤทธิ์ต่อการเรียนรู้และความจำ

2.1 การศึกษาผลของสารสกัดบัวบกด้วยน้ำต่อการเรียนรู้ของหนูแรทที่ได้รับสาร streptozotocin เข้าทาง intracerebroventricular เพื่อทำให้มีอาการคล้ายโรค Alzheimer's ในมนุษย์ และมีความผิดปกติของการเรียนรู้จากการที่มีการสร้าง free radical เพิ่มขึ้น จากนั้นป้อนสารสกัดบัวบกด้วยน้ำในขนาด 100, 200 และ 300 mg/kg ต่อเนื่อง 21 วัน พบว่าช่วยเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้ของหนูโดยสัมพันธ์กับขนาดที่ให้ และพบว่าในขนาด 200 และ 300 mg/kg มีผลลดระดับของ malondialdehyde และเพิ่มระดับของ glutathione และ catalase (Veerendra and Gupta, 2003)

2.2 การศึกษาผลต่อการเรียนรู้และความจำของสารสกัดบัวบกด้วยน้ำในหนูถีบจักร โดยป้อนสารสกัดในขนาด 200 mg/kg ต่อเนื่องกัน 15 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้น้ำกลั่นแล้วนำไปทดสอบทางพฤติกรรม โดยในการทดสอบวัด open field, dark/bright arena, hole board และ radial arm maze test ทางชีวเคมี ได้แก่การวัด acetylcholine esterase activity และทางเนื้อเยื่อวิทยา (dendritic arborization) พบว่าหนูขาวที่ได้รับสารสกัดบัวบกด้วยน้ำแสดงผลการพัฒนากการเรียนรู้และความจำเมื่อทดสอบด้วย radial arm maze และ hole board

test โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าในสมองส่วน hippocampus ซึ่งเกี่ยวข้องกับความจำมีการทำงานของ acetylcholine esterase เพิ่มขึ้น และเซลล์ประสาทส่วน dendrite มีการแตกแขนงมากขึ้น (Rao *et al.*, 2005)

2.3 การศึกษาผลต่อการเรียนรู้และความจำของสารสกัดใบบัวบกด้วยน้ำในหนูแรท โดยป้อนสารสกัดในขนาด 2, 4 และ 6 ml/kg ต่อเนื่อง 2, 4 และ 6 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ประสาทส่วน dendrite ในเส้นประสาท hippocampal CA3 มีการแตกแขนงและความยาวของเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้น ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 4 และ 6 ml/kg นาน 4 และ 6 สัปดาห์ (Rao *et al.*, 2006)

2.4 การศึกษาผลของอนุพันธ์ของ asiatic acid ในการป้องกันเซลล์ประสาท โดยการให้ glutamate ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท ลงในที่เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทส่วน cortex ของหนู พบว่าอนุพันธ์ของ asiatic acid บรรเทาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทจาก glutamate ได้ โดยไปชะลอการลดระดับของ glutathione, glutathione peroxidase และเอนไซม์อื่น ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกของเซลล์ในร่างกายที่จะช่วยลด oxidative stress และยังพบว่าเมื่อมีการผลิต nitric oxide ที่เกินต้องการซึ่งเกิดจากการเหนี่ยวนำของ glutamate ได้ (Lee *et al.*, 2000)

2.5 การศึกษาผลในการเร่งสร้างเซลล์ประสาทโดยใช้สารสกัดบัวบกด้วยเอทานอลขนาด 100 µg/ml ใน human SH-SY5Y cells ที่มี nerve growth factor พบว่าทำให้เส้นประสาทยาวขึ้น แต่เมื่อใช้สารสกัดบัวบกด้วยน้ำในขนาดเท่ากันไม่พบฤทธิ์ดังกล่าว และเมื่อทดลองเอา sub-fraction ของสารสกัดบัวบกด้วยเอทานอลที่เป็น non-polar และ polar จากการแยกด้วย silica-gel chromatography ก็ยังคงพบฤทธิ์ดังกล่าว โดยพบว่า asiatic acid ที่มีอยู่ใน sub-fraction มีฤทธิ์ทำให้เส้นประสาทยาวขึ้น เมื่อให้หนูแรทดื่มน้ำที่ผสมสารสกัดบัวบกด้วยเอทานอลวันละ 300-330 mg/kg พบว่าเซลล์ประสาทฟื้นตัวได้เร็วขึ้นและมีการสร้าง axon ใหม่เพิ่มขึ้น โดยเป็น axon ที่มีขนาดใหญ่และเป็น myelinated axon จำนวนมาก (Soumyanath *et al.*, 2005)

2.6 การศึกษาฤทธิ์ต่อการเรียนรู้และความจำของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ในหนูถีบจักร พบว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 แสดงฤทธิ์ในการแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในโมเดลของการปิดกั้นหลอดเลือดคาโรติดชั่วคราว (2 vessels occlusion, 2VO) ได้ในขนาด 10 และ 30 mg/kg ทั้งใน Morris Water Maze test และ Step-down test

รวมทั้งมีฤทธิ์ลดปริมาณ malondialdehyde ของสมอง โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity (มยุรี ตันติสิระและคณะ, 2551)

2.7 การศึกษาฤทธิ์ต่อการเรียนรู้และความจำของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ในหนูถีบจักร ซึ่งถูกเหนี่ยวนำด้วย  $\beta$ -amyloid peptide ให้มีความบกพร่องต่อการเรียนรู้และความจำ โดยศึกษาทั้งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ในขนาด 10 หรือ 30 mg/kg ก่อนและหลังฉีด  $\beta$ -amyloid peptide พบว่าในหนูทั้งสองกลุ่มสารทดสอบแสดงฤทธิ์แก้ไขภาวะบกพร่องต่อการเรียนรู้และความจำเมื่อทดสอบด้วย Morris Water Maze และไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity (Kam-eg *et al.*, 2009)

### 3. ฤทธิ์รักษาแผลในทางเดินอาหาร

3.1 การศึกษาฤทธิ์ของบัวบกในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยเอทานอล เมื่อทำการศึกษาดังวิธี *ex-vivo* gastric chamber โดยการทำให้เกิดแผลที่กระเพาะอาหารด้วย 50% เอทานอล และหลังจากนั้นให้น้ำสกัดบัวบกขนาด 0.50 g/kg พบว่าทำให้ gastric transmucosal potential difference กลับมาดีขึ้นได้ และเมื่อศึกษาในหนูทดลองโดยป้อนน้ำสกัดบัวบกขนาด 0.05, 0.25 และ 0.5 g/kg แก่หนูทดลองก่อนที่จะให้เอทานอล พบว่าสามารถลดอัตราการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ 58 - 82 % และสามารถลดการทำงานของเอนไซม์ mucosal myeloperoxidase ได้ตามขนาดของน้ำสกัดบัวบกที่ให้ ซึ่งน่าจะเกิดจากน้ำสกัดบัวบกช่วยเพิ่มความแข็งแรงของ mucosal barrier และลดการทำลายกระเพาะอาหารจากอนุมูลอิสระได้ (Cheng and Koo, 2000)

3.2 การศึกษาผลการยับยั้ง inducible nitric oxide synthase (iNOS) ของน้ำสกัดบัวบก และ asiaticoside ในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคกระเพาะอาหารด้วยกรดอะซิติก เมื่อป้อนน้ำสกัดบัวบกขนาด 0.10 และ 0.25 g/kg และ asiaticoside ขนาด 5 และ 10 mg/kg พบว่าสามารถลดขนาดของแผลอักเสบของกระเพาะอาหารได้ตามขนาดของสารสกัดบัวบกที่ให้ และยังสามารถยับยั้งการทำงานของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ได้ (Guo *et al.*, 2004)



#### 4. ฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

4.1 การศึกษาผลของ total triterpenic fraction ของบัวบก (TTFCA) ขนาด 60 mg วันละ 2 ครั้ง ในผู้ป่วยที่มีภาวะ venous hypertension และ microangiopathy พบว่าอาการบวมของข้อเท้า, capillary filtration และปริมาตรของขาลดลง ทำให้การไหลเวียนเลือดที่ขาดีขึ้น (Cesarone *et al.*, 2001)

4.2 การศึกษาผลของสารสกัดบัวบกในการลดความดันเลือด โดยใช้สารสกัดจากบัวบกด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ทดลองในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้ความดันเลือดสูงแบบ Goldblatt 2 kidney-1 clip (2K-1C) คือการหนีบหลอดเลือดแดงไต และความดันเลือดสูงด้วยการให้สาร NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ให้มีค่าความดันซิสโตลิกสูงกว่า 180 มม.ปรอท จากนั้นป้อนสารสกัดบัวบกในขนาด 1 กรัม/น้ำหนักหนู 1 กก./วัน เป็นเวลา 7 วัน พบว่าค่าความดันซิสโตลิก ความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial blood pressure, MAP) และค่าความต้านทานของหลอดเลือดบริเวณอวัยวะส่วนล่างและขาหลัง (hindlimb vascular resistance, HVR) มีค่าลดลงในขณะที่อัตราการไหลของเลือดที่ไปเลี้ยงบริเวณอวัยวะส่วนล่างและขาหลังของหนูทดลอง (hindlimb blood flow, HBF) มีค่าเพิ่มขึ้น (นภดล เลือดนักรบ, 2542)

#### 5. ฤทธิ์ลดการอักเสบ

5.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของบัวบกโดยศึกษาผลต่อการสร้าง nitric oxide และ tumor necrosis factor- $\alpha$  ใน J774.2 mouse macrophage พบว่าสารสกัดบัวบกด้วยน้ำเพิ่มการสร้าง nitric oxide โดยมีความสัมพันธ์กับขนาดที่ให้ และเสริมฤทธิ์ของ lipopolysaccharide ในการกระตุ้นการสร้าง nitric oxide ในขณะที่สารสกัดบัวบกด้วยเอทานอลมีผลต่อการสร้าง nitric oxide แต่เมื่อให้ร่วมกับ lipopolysaccharide พบว่ามีผลยับยั้งการสร้าง nitric oxide และ inducible nitric oxide synthase gene expression รวมทั้งมีผลลดการสร้าง tumor necrosis factor- $\alpha$  ด้วย (Punturee *et al.*, 2004)

5.2 การศึกษาผลลดการอักเสบของสารสกัดบัวบกในหนูแรท โดยการฉีดสารสกัดบัวบกขนาด 2 และ 4 mg/kg ทาง intraperitoneal เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ จากนั้นกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยการฉีด prostaglandin E<sub>2</sub> ทาง intraplantar พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดบัวบกการบวมของอุ้งเท้าหนูแรทน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีผลเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับขนาดสารสกัดบัวบกที่ได้รับ (Somchit *et al.*, 2004)

5.3 การศึกษาผลลดการอักเสบของ madecassic acid ในเซลล์ RAW 264.7 macrophage ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ซึ่ง LPS จะทำให้เกิดการอักเสบผ่าน NF-κB pathway ทำให้มีปริมาณของ nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub>, tumor necrosis factor-α, interleukin-1β และ interleukin-6 เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการอักเสบตามมา ซึ่งพบว่า madecassic acid มีผลด้านการอักเสบจากการกระตุ้นด้วย LPS โดยจะยับยั้งทำให้ปริมาณของ inducible nitric oxide synthase, COX-2, tumor necrosis factor-α, interleukin-1β และ interleukin-6 ลดลง ผ่านการลดการกระตุ้น NF-κB (Won., *et al.*, 2010)

## 6. ฤทธิ์ระงับปวด

6.1 การศึกษาผลระงับปวดของสารสกัดบัวบกในหนูขาว โดยการฉีดสารสกัดบัวบกขนาด 10, 30, 100 และ 300 mg/kg ทาง intraperitoneal เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ หลังจากนั้นกระตุ้นให้เกิดความเจ็บปวดด้วยการฉีด acetic acid ทาง intraperitoneal แล้วดูการบิดตัวด้วยความปวดของหนูขาวและทำ hot-plate test เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดบัวบกมีผลระงับปวดได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีผลเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับขนาดสารสกัดบัวบกที่ได้รับ (Somchit *et al.*, 2004)

6.2 การศึกษาผลของใบบัวบกต่อพฤติกรรมตอบสนองต่อความเจ็บปวดในหนูแรท หลังเกิดการอักเสบบริเวณฝ่าเท้า โดยป้อนสารสกัดบัวบกความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 mg/kg เทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นทำให้เกิดความเจ็บปวด โดยการฉีดฟอรัมาลินความเข้มข้น 10% เข้าที่บริเวณฝ่าเท้าขวาของหนูทดลอง จากนั้นศึกษาพฤติกรรมการเลียฝ่าเท้าเพื่อลดอาการ

ปวกระคายเคืองที่เปลี่ยนแปลงไปของหนูทดลอง พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดบัวบกมีพฤติกรรมการเลียเท้าข้างที่ได้รับความเจ็บปวดน้อยลงเมื่อเทียบกลับกลุ่มควบคุม (Tianwattanatada *et al.*, 2010)

## การศึกษาทางพิษวิทยา

### พิษเฉียบพลัน

จากการศึกษาพิษเฉียบพลันของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 โดยการป้อนสารสกัดทางปากในขนาด 10 g/kg เพียงครั้งเดียวให้แก่หนูถีบจักรเพศผู้และเพศเมีย เพศละ 10 ตัว พบว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ไม่ทำให้หนูถีบจักรเสียชีวิตหรือทำให้เกิดอาการพิษใด ๆ เมื่อสังเกตผลเป็นเวลา 14 วัน (Chivapat *et al.*, 2011)

### พิษกึ่งเรื้อรัง

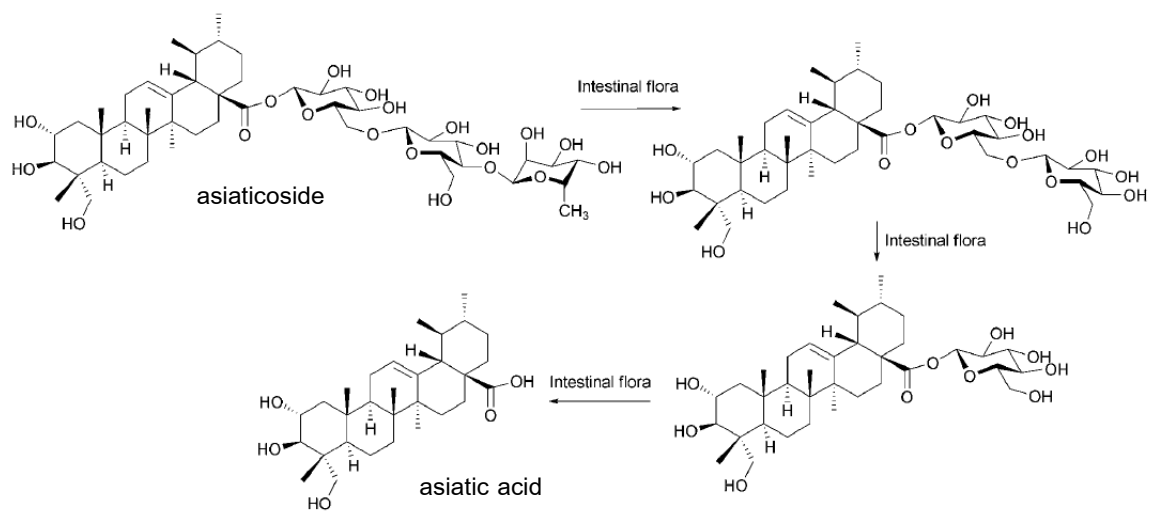
ผลการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังในหนูแรทที่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มควบคุมที่ได้รับการป้อนน้ำและกลุ่มทดลองที่ได้รับการป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ในน้ำขนาด 10, 100 และ 1000 mg/kg/วัน เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดทุกขนาดมีน้ำหนักตัว การกินอาหารและสุขภาพไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้น้ำ นอกจากหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดบัวบกขนาด 1000 mg/kg ซึ่งพบว่ามีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะภายในที่สัมพันธ์กันแต่อย่างใด หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดบัวบกขนาด 1000 mg/kg มีระดับโซเดียมสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่คงอยู่ในช่วงค่าปกติ ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่มีอุบัติการณ์และความรุนแรงสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดบัวบกที่ให้ (Chivapat *et al.*, 2011)

### การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดบัวบก

การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดบัวบกมีการศึกษาที่ค่อนข้างน้อย ในปี 1990 Grimaldi และคณะ ได้ทำการศึกษาในมนุษย์ โดยให้อาสาสัมคร 12 คน รับประทานสารสกัดบัวบก TTF (total triterpenic fraction of *Centella asiatica*) ที่ประกอบด้วย asiatic acid และ madecassic acid รวมกันประมาณ 60% กับ asiaticoside 40% แล้ววิเคราะห์ปริมาณของ asiatic acid ในพลาสมา โดยให้สารสกัดในขนาด 30 และ 60 มิลลิกรัม ครั้งเดียว พบว่าเวลาที่ระดับ asiatic acid สูงสุดในพลาสมา ( $T_{max}$ ) มีค่าเป็น 4.5 และ 4.2 ชั่วโมง ค่าความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมา ( $C_{max}$ ) มีค่าเป็น 0.70 และ 1.36  $\mu\text{g/ml}$  และมีค่าครึ่งชีวิต ( $t_{1/2}$ ) เป็น 2.2 และ 3.4 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อให้รับประทานสารสกัดขนาดเดิมต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน พบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมา ( $C_{max}$ ) ค่าครึ่งชีวิต ( $t_{1/2}$ ) และค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้ง (AUC) เพิ่มขึ้นกว่าการรับประทานแบบครั้งเดียว

ต่อมาในปี 2009 Zheng และ Wang ได้ทำการศึกษาในในสุนัขบีเกิ้ล โดยป้อนสารสกัดบัวบกที่มีส่วนประกอบของ asiaticoside 72% กับ madecassoside 6% แล้วทำการวัดปริมาณของ asiatic acid เช่นเดียวกัน โดยป้อนสารสกัดบัวบกขนาด 540 mg จำนวน 2 แคปซูล เพียงครั้งเดียว พบว่าระดับ asiatic acid สูงสุดในพลาสมา ( $T_{max}$ ) ที่เวลา 2.70 ชั่วโมง ค่าความเข้มข้นสูงสุดในพลาสมา ( $C_{max}$ ) มีค่าเป็น 0.74  $\mu\text{g/ml}$  และมีค่าครึ่งชีวิต ( $t_{1/2}$ ) เป็น 4.29 ชั่วโมง

ซึ่งการที่ทั้งสองการศึกษาทำการวัดระดับของ asiatic acid ในพลาสมา เนื่องจากพบว่า asiaticoside เมื่อเข้าสู่ร่างกายผ่านทางปากนั้นจะถูก hydrolysis ที่หมู่น้ำตาลเปลี่ยนไปเป็น asiatic acid ด้วยจุลชีพที่ลำไส้ (Sheng and Sun, 2011) ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 แสดงการ metabolism ของ asiaticoside

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### สัตว์ทดลอง

หนูแรท เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 350-450 กรัม ได้มาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม แล้วนำมาเลี้ยงในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างน้อย 7 วัน ก่อนนำมาทำการทดลอง มีการควบคุมสลับเวลามืดและสว่างช่วงละ 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิประมาณ  $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์และน้ำโดยไม่จำกัด โดยจะงดอาหารอย่างน้อย 12 ชั่วโมงก่อนนำมาทดสอบ

โครงการวิจัยนี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และปฏิบัติตามสัตว์ทดลองตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ พ.ศ.2542 (Approval No. 09-33-01, ภาคผนวก ก)

#### สารเคมี วัสดุและอุปกรณ์

##### สารเคมี

- สารสกัดมาตรฐานบัวบกชื่อซีเอ 233 ซึ่งประกอบด้วย madecassoside 42.90% and asiaticoside 38.8% จาก ดร.เอกรินทร์ สายฟ้า และคณะ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- Madecassic acid (98.4% purity), [LKT Laboratories, Inc, China]
- Ammonium chloride (99.5 %), Analytical grade [Fluka, Germany]
- Tetrabutyl ammonium bisulfate, Analytical grade [Sigma, USA]
- 85% Phosphoric acid, Analytical grade [RCI Labscan Limited, Thailand]
- Ethyl acetate, Analytical grade [RCI Labscan Limited, Thailand]

- Acetonitrile, HPLC grade [RCI Labscan Limited, Thailand]
- Ultra pure water, For HPLC analysis [Simplicity 185 millipore S.A. 67120 Molshem, France ]
- Heparin sodium solution [Nuparin<sup>®</sup>, Troikaa Pharmaceuticals Limited, India]

#### วัสดุและอุปกรณ์

- Syring 1 ml with needle 27G1/2
- Cap-lock tube 1.5 ml
- Gavage tube
- Plexiglas restraint box
- Centifuge tube ขนาด 15 ml
- Test tube ขนาด 10 ml

#### เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- ชุดเครื่องมือ High-performance liquid chromatography (HPLC) : HPLC Shimadzu รุ่น LC-20A (LC-20A prominence Liquid Chromatograph, SIL-20AC prominence Auto Sampler, SPD-20A prominence UV/VIS Detector, CTO-20AC prominence Column Oven, CBM-20A prominence Communications Bus Module), HPLC Column (Phenomenex C<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm , 5 μ), USA)
- เครื่อง centrifuge รุ่น Rotina 420R
- Vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- เครื่องชั่งสำหรับวิเคราะห์ที่มีความละเอียดถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius BL210S, Germany)

## ขั้นตอนการวิจัย

สารสกัดมาตรฐานบัวบกอัสีเอ 233 มีส่วนประกอบของ madecassoside และ asiaticoside ในอัตราส่วน  $1.5 \pm 0.50 : 1$  ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาวิธีวิเคราะห์ปริมาณของ madecassic acid และ asiatic acid ในตัวอย่างพลาสมาเดียวกันพร้อมกันนั้น พบว่าเมื่อ spike สารละลายของ madecassic acid และ asiatic acid ลงใน blank plasma จะสามารถตรวจพบพีคของสารทั้งสองตัว ในขณะเดียวกันแต่เมื่อนำพลาสมาของหนูแรทที่ถูกป้อนสารสกัดมาตรฐาน บัวบกอัสีเอ 233 มาวิเคราะห์กลับพบเพียงพีคของ madecassic acid เท่านั้น (ภาคผนวก ข) จึงมีความเป็นไปได้ที่ asiaticoside อาจมีวิถีเมแทบอลิซึมในหนูที่แตกต่างจากมนุษย์และสุนัข ซึ่ง asiaticoside จะถูกเปลี่ยนเป็น asiatic acid จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบระดับ asiatic acid ในพลาสมาของหนูแรทได้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอัสีเอ 233 ซึ่งมี ส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็น madecassoside โดยการวัดระดับของ madecassic acid ในพลาสมา โดยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาระดับ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography โดยประยุกต์จากวิธีวิเคราะห์ของ Thongnopnua (2008)
2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ระดับ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography
3. การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอัสีเอ 233 โดยการวัดระดับของ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography



## 1. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาระดับ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography

### 1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ madecassic acid (stock solution)

เตรียม stock solution ของ madecassic acid ใน methanol ที่ความเข้มข้น 1.0 mg/ml โดยชั่ง madecassic acid หนัก 10 mg เติม methanol จนปริมาตรครบ 10 ml ใน volumetric flask

### 1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ madecassic acid ในพลาสมาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ madecassic acid ความเข้มข้น 9, 18, 36, 90, 180 และ 360  $\mu\text{g/ml}$  ใน methanol โดยการทำให้ serial dilution จากสารละลายมาตรฐาน stock solution

เมื่อปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นข้างต้นมา 10  $\mu\text{l}$  เติมลงในพลาสมา 150  $\mu\text{l}$  จะได้พลาสมาที่มี madecassic acid ความเข้มข้น 0.6, 1.2, 2.4, 6, 12 และ 24  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ

### 1.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC

- นำ blank plasma 150  $\mu\text{l}$  แล้วเติมสารละลายมาตรฐาน madecassic acid 10  $\mu\text{l}$
- เติม 42.5% phosphoric acid ปริมาณ 10  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที
- เติมสารละลาย 0.01 M tetrabutyl ammonium bisulfate 15  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที
- เติมสารละลาย 6.0 M aqueous ammonium chloride 20  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

- เติม ethyl acetate 1.5 ml ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 3 นาที นำไป centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาเฉพาะ organic layer และระเหยแห้งภายใต้ nitrogen gas ที่อุณหภูมิห้อง
- ทำการละลายส่วนแห้งด้วย methanol 120  $\mu$ l นำไป centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูผลการละลายส่วนนี้ใส่ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 50  $\mu$ l

#### 1.4 การเตรียมระบบวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

|                  |   |
|------------------|---|
| Column           | : Phenomenex C <sub>18</sub> ( 250 x 4.6 mm , 5 $\mu$ ) |
| Mobile phase     | : Acetonitrile : Ultra pure water ( 56:44 v/v )         |
| Flow rate        | : 0.6 ml/min  |
| Detector         | : UV detector at wavelength 217 nm                      |
| Injection volume | : 50 $\mu$ l  |

## 2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ระดับ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography

### 2.1 ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน madecassic acid ความเข้มข้น 1.5, 5.0 และ 15.0 µg/ml แล้วใส่ลงในพลาสมา ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และคำนวณค่า % การคืนกลับสัมบูรณ์ ตามสมการ (1)

$$\% \text{ การคืนกลับสัมบูรณ์} = 100 \frac{(\text{Peak area}) \text{ วิเคราะห์}}{(\text{Peak area}) \text{ มาตรฐาน}} \dots\dots\dots(1)$$

โดยเกณฑ์การพิจารณาค่า % การคืนกลับสัมบูรณ์ ควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 60 %

### 2.2 สภาพเชิงเส้น

เตรียมสารละลายมาตรฐาน madecassic acid ความเข้มข้น 0.6, 1.2, 2.4, 6, 12 และ 24 µg/ml แล้วใส่ลงในพลาสมา สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมากับ peak area ที่วัดได้ โดยทำซ้ำ 3 ชุด และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอยเชิงเส้น (linear regression coefficient) ควรมีค่าอย่างน้อย 0.99 จากนั้นคำนวณค่า % RSD ของค่า slope และ R<sup>2</sup> ตามสมการ (2) โดยเกณฑ์การพิจารณาค่า % RSD ควรมีค่า ≤ 15 %

$$\% \text{ RSD} = 100 \frac{\text{SD}}{\text{Mean}} \dots\dots\dots(2)$$

### 2.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้แสดงด้วยค่า lower limit of quantitation (LLOQ)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน madecassic acid ความเข้มข้น 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 µg/ml แล้วใส่ลงในพลาสมา ทำซ้ำ 5 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จากนั้นคำนวณค่า % bias ตามสมการ (3) และ % RSD

$$\% \text{ Bias} = 100 \frac{(\text{ค่าเข้มข้นที่วิเคราะห์}) - (\text{ค่าเข้มข้นจริง})}{(\text{ค่าเข้มข้นจริง})} \dots\dots\dots(3)$$

โดยเกณฑ์การพิจารณาค่า % bias และ % RSD ควรมีค่า  $\leq \pm 20$  % และ  $\leq 20$  % ตามลำดับ

#### 2.4 ความแม่นยำและความเที่ยง

โดยเกณฑ์การพิจารณาค่า % bias และ % RSD ควรมีค่า  $\leq \pm 15$  % และ  $\leq 15$  % ตามลำดับ

##### 2.4.1 การวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน madecassic acid ความเข้มข้น 1.5, 5.0 และ 15.0  $\mu\text{g/ml}$  แล้วใส่ลงในพลาสติก ทำซ้ำความเข้มข้นละ 5 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และคำนวณค่า % bias และ % RSD

##### 2.4.2 การวิเคราะห์ต่างวันกัน

เตรียมสารละลายมาตรฐาน madecassic acid ความเข้มข้น 1.5, 5.0 และ 15.0  $\mu\text{g/ml}$  แล้วใส่ลงในพลาสติก ทำซ้ำ 5 วัน วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และคำนวณค่า % bias และ % RSD

#### 2.5 สภาพจำเพาะของวิธีวิเคราะห์

วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยดูลักษณะ peak และค่า retention time ของ madecassic acid เปรียบเทียบกันระหว่าง

- blank plasma
- plasma ที่มี standard solution ของ madecassic acid

### 3. การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 โดยวัดระดับของ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography

#### 3.1 การเตรียมสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233

เตรียมสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ในน้ำ ที่ความเข้มข้น 20 mg/ml ให้สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 โดยผ่านทาง gavage tube เข้าสู่กระเพาะอาหารหนูแรท ครั้งละ ประมาณ 0.6 – 1.2 ml

#### 3.2 การแบ่งกลุ่มการทดลอง

3.2.1 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดแบบครั้งเดียว (Single oral administration) โดยสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ถูกป้อนให้แก่หนูแรทครั้งเดียว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 : ให้สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 30 mg/kg
- กลุ่มที่ 2 : ให้สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 60 mg/kg

3.2.2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดแบบหลายครั้งติดต่อกัน (Multiple oral administration) โดยสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ถูกป้อนให้แก่หนูแรท วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 : ให้สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 30 mg/kg/ครั้ง
- กลุ่มที่ 2 : ให้สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 60 mg/kg/ครั้ง

#### 3.3 การเก็บตัวอย่างเลือด

หนูแต่ละตัวจะถูกใส่ไว้ใน restrainer ที่สามารถให้หางหนูหลุดออกมาได้ (นำหนูออกจาก restrainer เพื่อให้อาหารและน้ำ ก่อนใส่กลับเข้าไปใหม่ก่อนเจาะเลือดในช่วงเวลาที่ 4, 8 และ 12 ชั่วโมง) โดยเจาะเส้นเลือดดำที่หางหนู เก็บเลือดครั้งละ 0.4 มิลลิลิตร (Diehl *et al.*, 2001)

3.3.1 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดแบบครั้งเดียว (Single oral administration) โดยเจาะเลือดที่เวลา 0 คือก่อนป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 และที่เวลา 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233

3.3.2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดแบบหลายครั้งติดต่อกัน (Multiple oral administration) โดยเจาะเลือดที่เวลา 0 คือก่อนป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ในวันที่ 7 และที่เวลา 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ในวันที่ 7

3.3.3 นำเลือดที่ได้ไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเก็บพลาสมา และนำไปเก็บที่ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ต่อไป

#### 3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสาร madecassic acid ในตัวอย่างพลาสมาหนู

- นำพลาสมาที่เก็บที่เวลาต่าง ๆ ปริมาณ 150  $\mu$ l จากนั้นเติม 42.5% phosphoric acid 10  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

- เติม 0.01 M tetrabutyl ammonium bisulfate solution 15  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

- เติม 6.0 M aqueous ammonium chloride solution 20  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที

- เติม ethyl acetate 1.5 ml ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 3 นาที นำไป centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาเฉพาะ organic layer และระเหยแห้งภายใต้ nitrogen gas ที่อุณหภูมิห้อง

- ทำการละลายส่วนแห้งด้วย methanol 120  $\mu$ l นำไป centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และดูดสารละลายส่วนใสฉีดเข้าเครื่อง HPLC ครั้งละ 50  $\mu$ l ตามระบบในข้อ 1.4

- คำนวณความเข้มข้นของ madecassic acid โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

### การเก็บรวบรวมและการวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลที่ได้มาคำนวณค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ ได้แก่ เวลาที่ความเข้มข้นสูงสุด ( $T_{max}$ ), ค่าความเข้มข้นสูงสุด ( $C_{max}$ ) ค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้งที่เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาในพลาสมา กับเวลา (Area under the curve,  $AUC_{0-t}$ ) และค่าครึ่งชีวิต (Half-life,  $t_{1/2}$ )

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  standard error of mean) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่า  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$  และ  $t_{1/2}$  ระหว่างกลุ่มทดลอง 2 กลุ่ม โดยใช้ Student's t-test พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ( $p < 0.05$ )

การวิเคราะห์ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid โดยค่า  $T_{max}$ ,  $C_{max}$  ใช้ข้อมูลจริงมาหาค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

การคำนวณ  $AUC_{0-t}$  ใช้หลัก trapezoidal rule ดังนี้

$AUC_{0-t} =$  พื้นที่สามเหลี่ยมและพื้นที่สี่เหลี่ยมคางหมูที่ได้จากการแบ่งพื้นที่ภายใต้เส้นกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารในพลาสมา กับเวลาออกเป็น ส่วน ๆ แล้วนำพื้นที่ทั้งหมดที่คำนวณได้ตั้งแต่เวลา 0-t มารวมกันจะได้เป็น  $AUC_{0-t}$  โดย

$$\text{พื้นที่สามเหลี่ยม} = \frac{1}{2} \times \text{ฐาน} \times \text{สูง}$$

$$\text{พื้นที่สี่เหลี่ยมคางหมู} = \frac{1}{2} \times \text{สูง} \times \text{ผลบวกของด้านคู่ขนาน}$$

การหาค่าครึ่งชีวิต (Half-life,  $t_{1/2}$ ) คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการกำจัดยาออกจากร่างกายครึ่งหนึ่งของปริมาณทั้งหมด ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$t_{1/2} = 0.693 / K_e \text{ เมื่อ}$$

$K_e =$  ค่าคงที่ของอัตราการกำจัดยา (Elimination Rate Constant) คำนวณจากความชันของเส้นตรงที่เกิดจากการพล็อตระหว่างล็อกความเข้มข้นของยาในพลาสมา กับเวลา ในช่วงเฟสของการกำจัดยา

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ระดับ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography

#### 1. ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง

ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง madecassic acid ในพลาสมาแสดงด้วยค่า % การคืนกลับสัมบูรณ์ (absolute recovery) พบว่า % การคืนกลับสัมบูรณ์ของ madecassic acid ที่ความเข้มข้น 1.5, 5 และ 15  $\mu\text{g/ml}$  มีค่าดังตารางที่ 1 โดย % การคืนกลับสัมบูรณ์ มีค่าไม่ต่ำกว่า 60 %

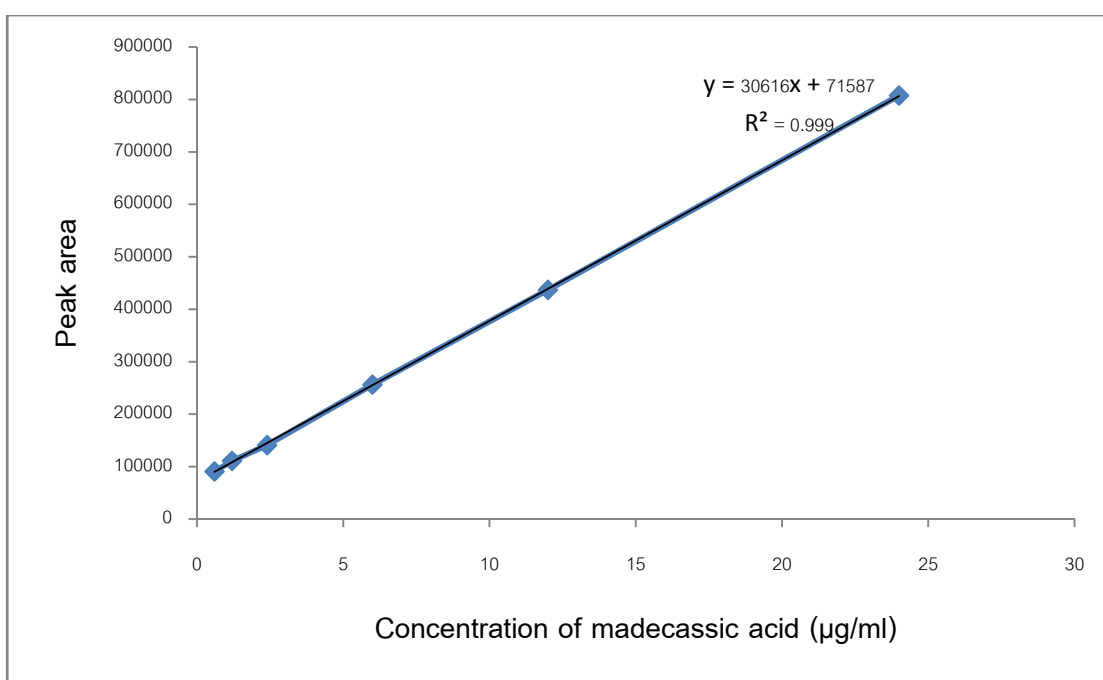


ตารางที่ 1 ค่า % absolute recovery ของการเตรียมตัวอย่าง madecassic acid ในพลาสมา

| Madecassic acid concentration (µg/ml) | Peak area in plasma | Peak area in methanol | % absolute recovery |
|---------------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| 1.5                                   | 114963              | 83817                 | 137.16              |
|                                       | 111576              |                       | 133.12              |
|                                       | 111983              |                       | 133.60              |
| Mean                                  | 112840.67           |                       | 134.63              |
| SD                                    | 1849.23             |                       | 2.21                |
| 5                                     | 228472              | 206263                | 110.77              |
|                                       | 229027              |                       | 111.04              |
|                                       | 224171              |                       | 108.68              |
| Mean                                  | 227223.33           |                       | 110.16              |
| SD                                    | 2657.92             |                       | 1.29                |
| 15                                    | 521309              | 543995                | 95.83               |
|                                       | 556182              |                       | 102.24              |
|                                       | 561521              |                       | 103.22              |
| Mean                                  | 546337.33           |                       | 100.43              |
| SD                                    | 21838.94            |                       | 4.01                |

## 2. สภาพเชิงเส้น

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมา กับ peak area มีลักษณะเป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0.6 – 24  $\mu\text{g/ml}$  แสดงตัวอย่างของชุดที่ 1 มีค่า coefficient of determination ( $R^2$ ) ของ madecassic acid มีค่าเท่ากับ 0.999 ดังรูปที่ 5 โดยมีค่า % RSD ของ slope และ  $R^2$  เท่ากับ 11.44 และ 0.08 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 5 แสดงตัวอย่างกราฟมาตรฐานของ madecassic acid ในพลาสมา ชุดที่ 1

ตารางที่ 2 การยืนยันสภาพเชิงเส้นของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมา

| N     | Parameters of calibration curve |                |
|-------|---------------------------------|----------------|
|       | Slope                           | R <sup>2</sup> |
| 1     | 30616                           | 0.9996         |
| 2     | 33237                           | 0.9981         |
| 3     | 38282                           | 0.9989         |
| Mean  | 34045                           | 0.9989         |
| SD    | 3896                            | 0.0008         |
| % RSD | 11.44                           | 0.08           |

### 3. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้

ความเข้มข้นต่ำสุดของ madecassic acid ในพลาสมาที่วิธีสามารถวิเคราะห์ได้คือ 0.6  $\mu\text{g/ml}$  ดังแสดงตามตารางที่ 3 โดยมีค่า % bias และ % RSD เท่ากับ 1.83 และ 3.35 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นต่ำสุดของ madecassic acid ในพลาสมาที่วิธีสามารถวิเคราะห์ได้

| Concentration of madecassic acid ( $\mu\text{g/ml}$ ) | N | Peak area of madecassic acid | % Bias |
|---|---|------------------------------|--------|
| 0.6   | 1 | 90932                        | -2.93  |
|   | 2 | 97443                        | 4.02   |
|   | 3 | 97782                        | 4.38   |
|   | 4 | 97748                        | 4.35   |
|   | 5 | 93045                        | -0.67  |
| Mean  |   | 95390                        | 1.83   |
| SD  |   | 3196.46                      |        |
| %RSD  |   | 3.35                         |        |

#### 4. ความแม่นยำและความเที่ยง

##### 4.1 การวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน

ความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 1.5, 5 และ 15 µg/ml พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำของการวิเคราะห์ มีค่าอยู่ในช่วง -7.54 – +7.68 % ดังตารางที่ 4 และความเที่ยงของการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วง 5.44 - 9.11 % ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมา ในวันเดียวกัน

| Madecassic acid concentration (µg/ml) | % Bias (n=5) |       |       |        |        | Mean  |
|---------------------------------------|--------------|-------|-------|--------|--------|-------|
|                                       | 1            | 2     | 3     | 4      | 5      |       |
| 1.5                                   | -7.34        | -4.56 | 2.81  | -14.75 | -13.85 | -7.54 |
| 5                                     | 2.27         | 2.63  | 23.83 | -0.56  | 10.22  | 7.68  |
| 15                                    | -1.87        | 5.75  | 6.92  | -4.67  | -3.90  | 0.45  |

ตารางที่ 5 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมา ในวันเดียวกัน

| Madecassic acid concentration (µg/ml) | Analyzed madecassic acid concentration (n=5) |       |       |       |       | Mean  | SD   | %RSD |
|---------------------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
|                                       | 1  | 2     | 3     | 4     | 5     |       |      |      |
| 1.5                                   | 1.39   | 1.43  | 1.54  | 1.28  | 1.29  | 1.39  | 0.11 | 7.91 |
| 5                                     | 5.11   | 5.13  | 6.19  | 4.97  | 5.51  | 5.38  | 0.49 | 9.11 |
| 15                                    | 14.72  | 15.86 | 16.04 | 14.30 | 14.42 | 15.07 | 0.82 | 5.44 |

#### 4.2 การวิเคราะห์ต่างวันกัน

ความแม่นยำและความเที่ยงของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 1.5, 5 และ 15 µg/ml พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำของการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วง -4.17 - +7.50 % ดังตารางที่ 6 และความเที่ยงของการวิเคราะห์มีค่าอยู่ในช่วง 5.74 – 9.78 % ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ความแม่นยำของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมาต่างวันกัน

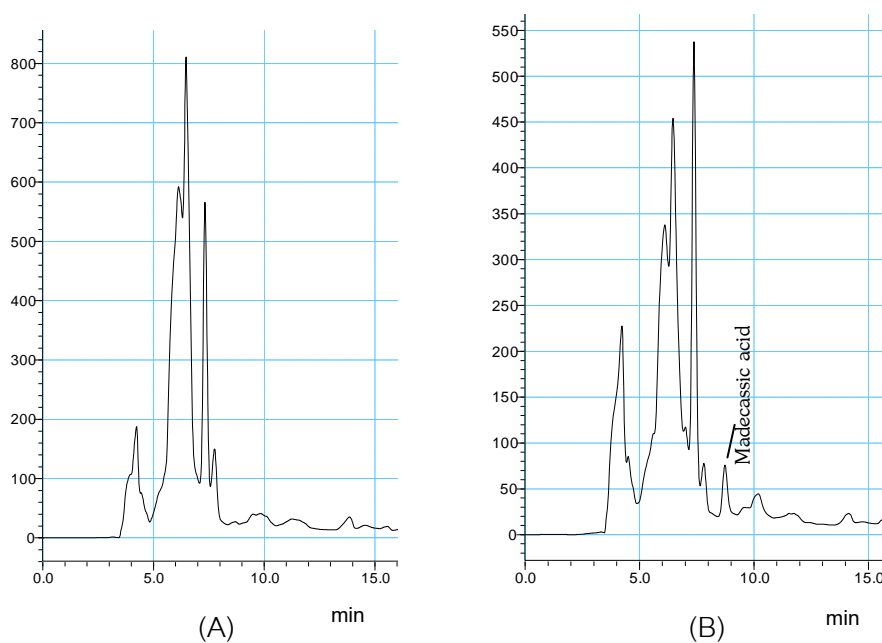
| Madecassic acid concentration (µg/ml) | % Bias |       |       |        |        | Mean  |
|---------------------------------------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|
|                                       | 1      | 2     | 3     | 4      | 5      |       |
| 1.5                                   | 2.81   | 12.67 | 0.67  | 22.67  | -1.33  | 7.50  |
| 5                                     | -0.56  | 8.40  | 13.00 | 6.80   | -12.80 | 2.97  |
| 15                                    | -1.87  | 2.40  | -1.60 | -10.13 | -9.67  | -4.17 |

ตารางที่ 7 ความเที่ยงของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมาต่างวันกัน

| Madecassic acid concentration (µg/ml) | Analyzed madecassic acid concentration |       |       |       |       | Mean±SD    | %RSD |
|---------------------------------------|--|-------|-------|-------|-------|------------|------|
|                                       | 1                                      | 2     | 3     | 4     | 5     |            |      |
| 1.5                                   | 1.54                                   | 1.69  | 1.51  | 1.84  | 1.48  | 1.61±0.15  | 9.34 |
| 5                                     | 4.97                                   | 5.42  | 5.65  | 5.34  | 4.36  | 5.15±0.50  | 9.78 |
| 15                                    | 14.72                                  | 15.36 | 14.76 | 13.48 | 13.55 | 14.37±0.82 | 5.74 |

### 5. สภาพจำเพาะของวิธีวิเคราะห์

สภาพจำเพาะของการวิเคราะห์ พบว่าค่า retention time ของ madecassic acid ในพลาสมามีค่า 8.7 นาที เมื่อเทียบกับ blank plasma และโครมาโตแกรมของ madecassic acid ไม่ถูกรบกวนด้วยสารอื่น ๆ ในพลาสมา ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงโครมาโตแกรมของ blank plasma (A) เทียบกับโครมาโตแกรมของพลาสมา madecassic acid (B)

การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 โดยการวัดระดับของ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography

1. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดแบบครั้งเดียว (Single oral administration) โดยสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 จะถูกป้อนให้แก่หนูแรทครั้งเดียว

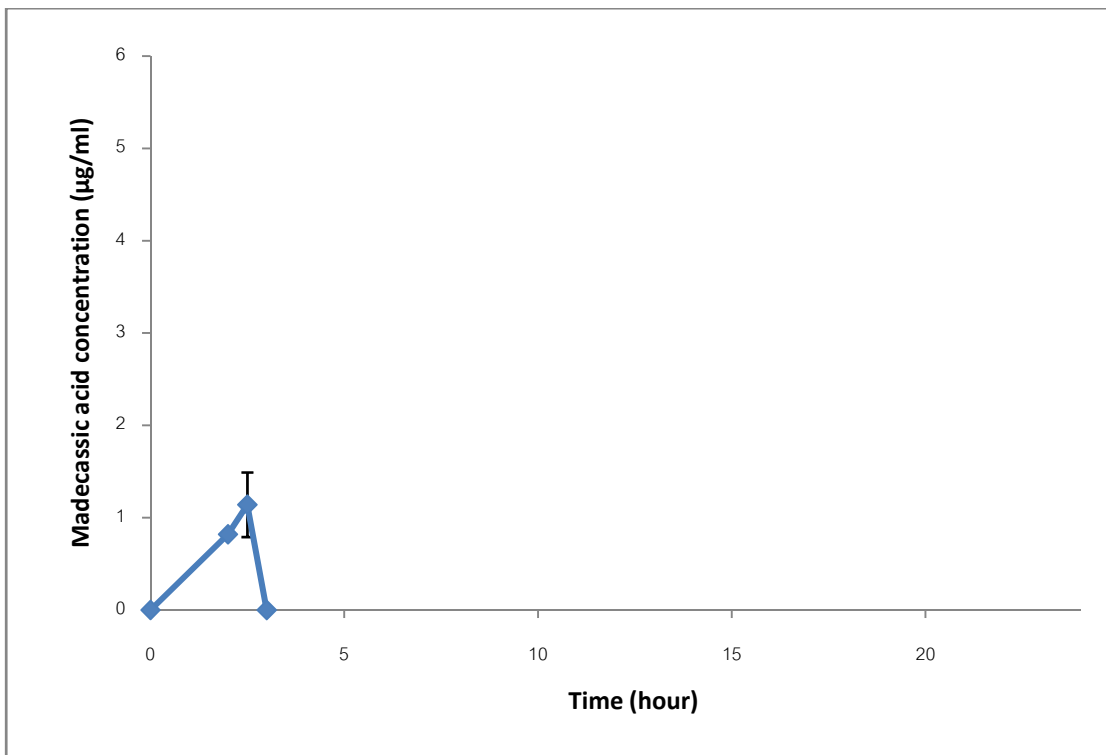
1.1 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 30 mg/kg

ผลระดับ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลา 0 คือก่อนป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 และที่เวลาดังแต่ 0.5 ชั่วโมงจนถึง 24 ชั่วโมงหลังป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ของหนูแรท 6 ตัว แสดงไว้ในตารางที่ 8 และกราฟความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยระดับ ในพลาสมากับเวลา แสดงไว้ในรูปที่ 7 ได้ค่า  $T_{max}$  เท่ากับ  $2.25 \pm 0.25$  ชั่วโมง ค่า  $C_{max}$  เท่ากับ  $1.16 \pm 0.34$   $\mu\text{g/ml}$  ค่า  $AUC_{0-24h}$  เท่ากับ  $1.83 \pm 0.41$   $\mu\text{g.h/ml}$  และ  $t_{1/2}$  เท่ากับ  $0.54 \pm 0.30$  ชั่วโมง

ตารางที่ 8 ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 30 mg/kg ครั้งเดียว (n=6) ได้แก่ ค่า  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-24h}$  และ  $t_{1/2}$

| Subject No. | $T_{max}$<br>(hour) | $C_{max}$<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | $AUC_{0-24h}$<br>( $\mu\text{g.h/ml}$ ) | $K_e$ | $t_{1/2}$<br>(hour) |
|-------------|---------------------|-----------------------------------|---|-------|---------------------|
| 1           | -                   | <LLOQ                             | -                                       | -     | -                   |
| 2           | -                   | <LLOQ                             | -                                       | -     | -                   |
| 3           | -                   | <LLOQ                             | -                                       | -     | -                   |
| 4           | 2                   | 0.82                              | 1.42                                    | 0.82  | 0.85                |
| 5           | 2.5                 | 1.49                              | 2.23                                    | 2.98  | 0.23                |
| 6           | -                   | <LLOQ                             | -                                       | -     | -                   |
| Mean        | 2.25                | 1.16                              | 1.83                                    | 1.90  | 0.54                |
| SE          | 0.25                | 0.34                              | 0.41                                    | 1.09  | 0.30                |





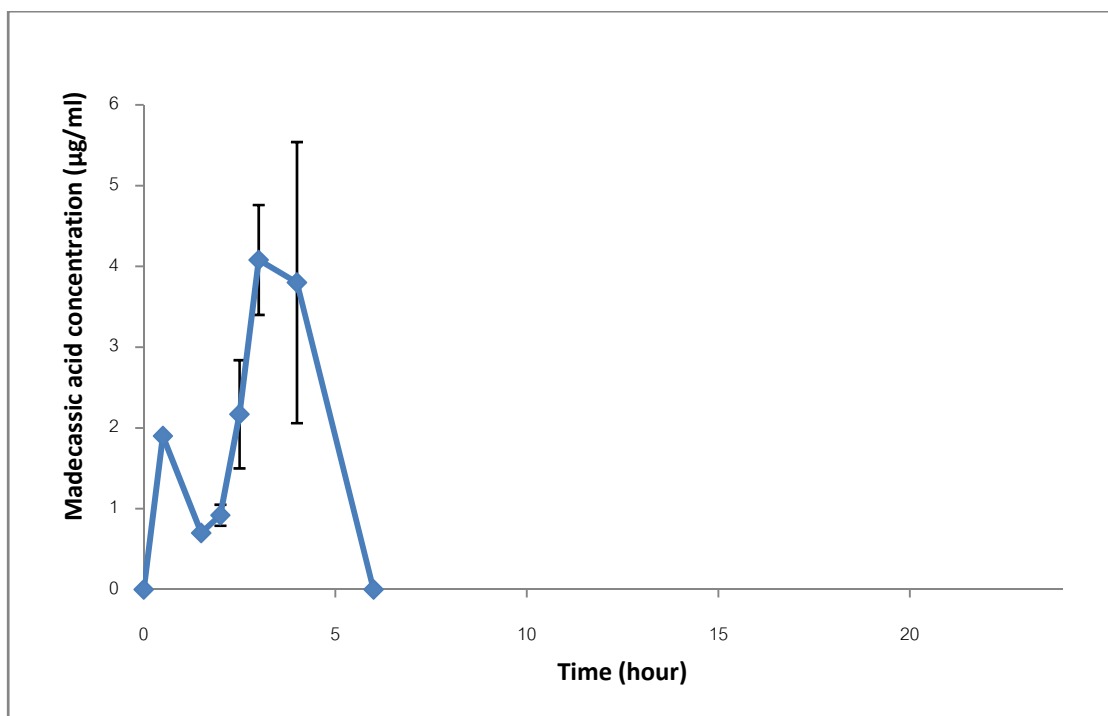
รูปที่ 7 ระดับของ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ ของหนูแรทที่ได้รับ สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 30 mg/kg ครั้งเดียว (n=6)

1.2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 60 mg/kg

ผลระดับ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลา 0 คือก่อนป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 และที่เวลาตั้งแต่ 0.5 ชั่วโมงจนถึง 24 ชั่วโมงหลังป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ของหนูแรท 6 ตัว แสดงไว้ในตารางที่ 9 และกราฟความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยระดับ ในพลาสมาที่เวลา แสดงไว้ในรูปที่ 8 ได้ค่า  $T_{max}$  เท่ากับ 4 ชั่วโมง ค่า  $C_{max}$  เท่ากับ  $3.80 \pm 1.74$   $\mu\text{g/ml}$  ค่า  $AUC_{0-24h}$  เท่ากับ  $9.34 \pm 3.88$   $\mu\text{g.h/ml}$  และ  $t_{1/2}$  เท่ากับ  $0.96 \pm 0.50$  ชั่วโมง

ตารางที่ 9 ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว (n=6) ได้แก่ ค่า  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-24h}$  และ  $t_{1/2}$

| Subject No. | $T_{max}$<br>(hour) | $C_{max}$<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | $AUC_{0-24h}$<br>( $\mu\text{g.h/ml}$ ) | $K_e$ | $T_{1/2}$<br>(hour) |
|-------------|---------------------|-----------------------------------|---|-------|---------------------|
| 1           | 4                   | 5.33                              | 13.79                                   | 2.67  | 0.26                |
| 2           | 4                   | 7.98                              | 17.94                                   | 3.99  | 0.17                |
| 3           | 4                   | 1.28                              | 3.84                                    | 0.64  | 1.08                |
| 4           | 4                   | 0.60                              | 1.80                                    | 0.30  | 2.31                |
| 5           | -                   | <LLOQ                             | -                                       | -     | -                   |
| 6           | -                   | <LLOQ                             | -                                       | -     | -                   |
| Mean        | 4                   | 3.80                              | 9.34                                    | 2.43  | 0.96                |
| SE          | 0                   | 1.74                              | 3.88                                    | 0.85  | 0.50                |



รูปที่ 8 ระดับของ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ ของหนูแรทที่ได้รับ สารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว (n=6)

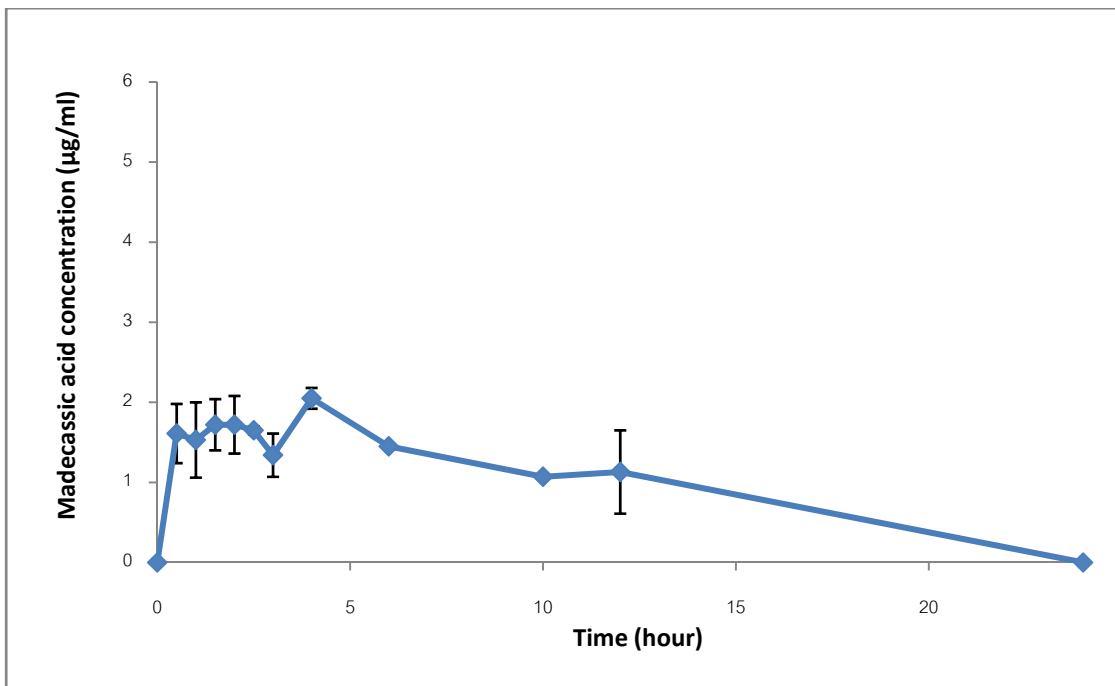
2. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดแบบหลายครั้งติดต่อกัน (Multiple oral administration) โดยสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ถูกป้อนให้แก่หนูแรท วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน

2.1 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 30 mg/kg

ผลระดับ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลา 0 คือก่อนป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ในวันที่ 7 และที่เวลาตั้งแต่ 0.5 จนถึง 24 ชั่วโมงหลังได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ในวันที่ 7 ของหนูแรท 6 ตัว แสดงไว้ในตารางที่ 10 และกราฟความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยระดับ ในพลาสมากับเวลา แสดงไว้ในรูปที่ 9 ได้ค่า  $T_{max}$  เท่ากับ  $2.50 \pm 0.54$  ชั่วโมง ค่า  $C_{max}$  เท่ากับ  $1.98 \pm 0.12$   $\mu\text{g/ml}$  ค่า  $AUC_{0-24h}$  เท่ากับ  $15.28 \pm 4.95$   $\mu\text{g.h/ml}$  และ  $t_{1/2}$  เท่ากับ  $4.80 \pm 1.99$  ชั่วโมง

ตารางที่ 10 ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน (n=6) ได้แก่ ค่า  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-24h}$  และ  $t_{1/2}$

| Subject No. | $T_{max}$<br>(hour) | $C_{max}$<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | $AUC_{0-24h}$<br>( $\mu\text{g.h/ml}$ ) | $K_e$ | $t_{1/2}$<br>(hour) |
|-------------|---------------------|-----------------------------------|---|-------|---------------------|
| 1           | -                   | <LLOQ                             | -                                       | -     | -                   |
| 2           | -                   | <LLOQ                             | -                                       | -     | -                   |
| 3           | 4                   | 1.92                              | 16.98                                   | 0.09  | 7.70                |
| 4           | 2.5                 | 1.70                              | 3.78                                    | 1.16  | 0.60                |
| 5           | 2                   | 2.27                              | 12.59                                   | 0.31  | 2.24                |
| 6           | 1.5                 | 2.04                              | 26.90                                   | 0.08  | 8.66                |
| Mean        | 2.50                | 1.98                              | 15.28                                   | 0.41  | 4.80                |
| SE          | 0.54                | 0.12                              | 4.95                                    | 0.26  | 1.99                |



รูปที่ 9 ระดับของ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ ของหนูแรทที่ได้รับ

สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน

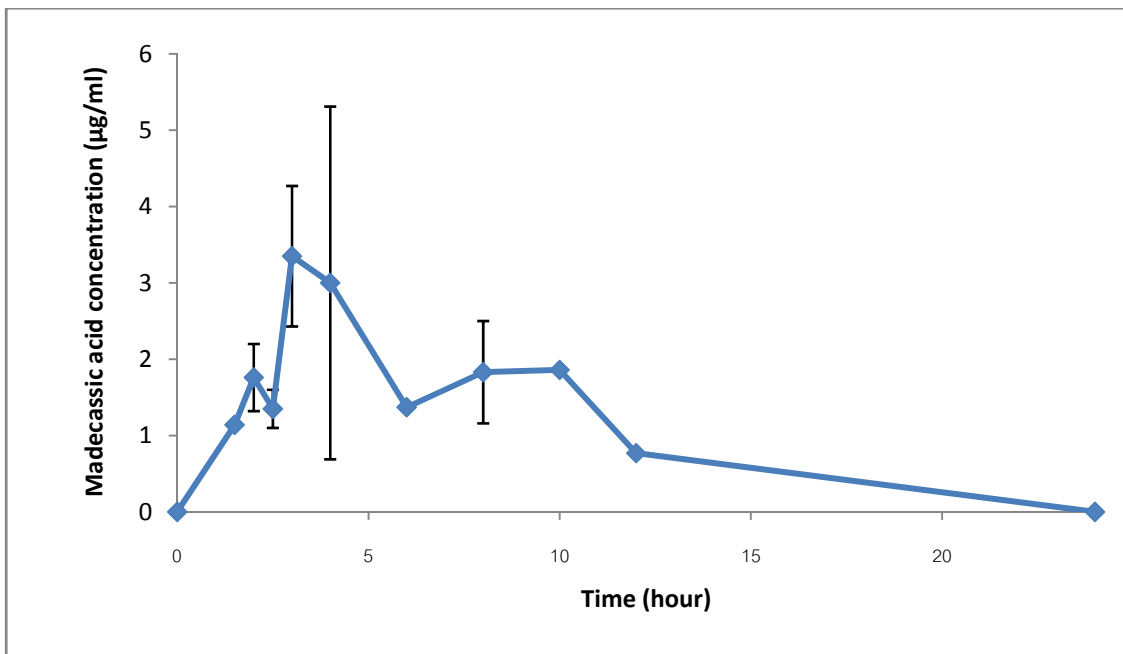
(n=6)

2.2 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 60 mg/kg

ผลระดับ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลา 0 คือก่อนป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ในวันที่ 7 และที่เวลาตั้งแต่ 0.5 จนถึง 24 ชั่วโมงหลังได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ในวันที่ 7 ของหนูแรท 6 ตัว แสดงไว้ในตารางที่ 10 และกราฟความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยระดับ ในพลาสมา กับเวลา แสดงไว้ในรูปที่ 11 ได้ค่า  $T_{max}$  เท่ากับ  $3.83 \pm 0.86$  ชั่วโมง ค่า  $C_{max}$  เท่ากับ  $3.23 \pm 0.61$   $\mu\text{g/ml}$  ค่า  $AUC_{0-24h}$  เท่ากับ  $12.55 \pm 3.24$   $\mu\text{g.h/ml}$  และ  $t_{1/2}$  เท่ากับ  $2.70 \pm 1.41$  ชั่วโมง

ตารางที่ 11 ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน (n=6) ได้แก่ ค่า  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-24h}$  และ  $t_{1/2}$

| Subject No. | $T_{max}$<br>(hour) | $C_{max}$<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | $AUC_{0-24h}$<br>( $\mu\text{g.h/ml}$ ) | $K_e$ | $t_{1/2}$<br>(hour) |
|-------------|---------------------|-----------------------------------|---|-------|---------------------|
| 1           | 3                   | 4.31                              | 6.48                                    | 4.31  | 0.16                |
| 2           | 3                   | 3.84                              | 5.79                                    | 3.84  | 0.18                |
| 3           | 4                   | 5.30                              | 15.01                                   | 2.65  | 0.26                |
| 4           | 2.5                 | 1.50                              | 3.76                                    | 0.35  | 1.98                |
| 5           | 8                   | 2.49                              | 23.39                                   | 0.14  | 4.95                |
| 6           | 2.5                 | 1.91                              | 19.42                                   | 0.08  | 8.66                |
| Mean        | 3.83                | 3.23                              | 12.55                                   | 1.90  | 2.70                |
| SE          | 0.86                | 0.61                              | 3.24                                    | 0.80  | 1.41                |



รูปที่ 10 ระดับของ madecassic acid ในพลาสมาที่เวลาต่าง ๆ ของหนูแรทที่ได้รับ สารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง ต่อเนื่อง 7 วัน (n=6)

3. เปรียบเทียบค่าทางเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ในพลาสมาทั้ง 4 กลุ่ม พบว่าเวลาที่ระดับของ madecassic acid ในเลือดสูงสุด ( $T_{max}$ ) ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีชีเอ 233 แบบครั้งเดียว ในขนาด 60 mg/kg มีค่าสูงกว่าขนาด 30 mg/kg แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และค่าระดับความเข้มข้นของ madecassic acid สูงสุดในเลือด ( $C_{max}$ ) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีชีเอ 233 แบบต่อเนื่อง 7 วัน ในขนาด 30 mg/kg มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีชีเอ 233 ขนาด 30 mg/kg แบบครั้งเดียว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  และพบว่าค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้งความเข้มข้นของ madecassic acid ( $AUC_{0-24h}$ ) และค่าครึ่งชีวิต ( $t_{1/2}$ ) เมื่อให้สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีชีเอ 233 แบบต่อเนื่อง 7 วัน จะมีค่าสูงกว่าการให้แบบครั้งเดียวในทั้ง 2 ขนาด แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ madecassic acid ในพลาสมาทั้ง 4 กลุ่ม

| Parameter                  | Single dose |                | Multiple doses           |              |
|----------------------------|-------------|----------------|--------------------------|--------------|
|                            | 30 mg/kg    | 60 mg/kg       | 30 mg/kg                 | 60 mg/kg     |
| $T_{max}$ (hour)           | 2.25 ± 0.25 | 4 <sup>a</sup> | 2.50 ± 0.54              | 3.83 ± 0.86  |
| $C_{max}$ (µg/ml)          | 1.16 ± 0.34 | 3.80 ± 1.74    | 1.98 ± 0.12 <sup>b</sup> | 3.23 ± 0.61  |
| $AUC_{0-24h}$<br>(µg.h/ml) | 1.83 ± 0.41 | 9.34 ± 3.88    | 15.28 ± 4.95             | 12.55 ± 3.24 |
| $t_{1/2}$ (hour)           | 0.54 ± 0.30 | 0.96 ± 0.50    | 4.80 ± 1.99              | 2.70 ± 1.41  |

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs. 30 mg/kg single dose; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  vs. 30 mg/kg single dose



## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ระดับ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography

ประสิทธิภาพของการเตรียมตัวอย่าง madecassic acid ในพลาสมาแสดงด้วยค่า % การคืนกลับสัมบูรณ์ พบว่า % การคืนกลับสัมบูรณ์ของ madecassic acid ที่ความเข้มข้น 1.5, 5 และ 15  $\mu\text{g/ml}$  มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $115.07 \pm 17.62$  % วิธีการสกัดที่ใช้คือ organic extraction ด้วย ethyl acetate แล้วนำมาทำแห้งด้วยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดคือ ไม่ต่ำกว่า 60% (เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 2553)

สภาพเชิงเส้นความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมากับ peak area ในช่วงความเข้มข้น 0.6 – 24  $\mu\text{g/ml}$  พบว่ามีค่า coefficient of determination ( $R^2$ ) ของ madecassic acid เท่ากับ 0.999 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงถึงความเป็นเส้นตรง โดยมีค่า % RSD ของค่า slope และ  $R^2$  เท่ากับ 11.44 และ 0.08 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดคือไม่เกิน 15 % (เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 2553)

ความเข้มข้นต่ำสุดของ madecassic acid ในพลาสมาที่วิธีสามารถวิเคราะห์ได้คือ 0.6  $\mu\text{g/ml}$  โดยมีค่า % bias และ % RSD เท่ากับ 1.83 และ 3.35 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดคือต่ำกว่า  $\pm 20$  % และ 20 % (เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 2553) ตามลำดับ

ความแม่นยำของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 1.5, 5 และ 15  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ในวันเดียวกันมีค่าอยู่ในช่วง -7.54 – +7.68 % และต่างวันกันมีค่าอยู่ในช่วง -4.17 - + 7.50 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดคือไม่เกิน  $\pm 15$  % (เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 2553) วิธีวิเคราะห์นี้จึงมีความแม่นยำเชื่อถือได้

ความเที่ยงของการวิเคราะห์ madecassic acid ในพลาสมา ที่ความเข้มข้น 1.5, 5 และ 15  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ในวันเดียวกันมีค่าอยู่ในช่วง 5.44 - 9.11 % และใน

ระหว่างวันมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.74 – 9.78 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดคือไม่เกิน 15% (เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ, 2553) วิธีวิเคราะห์นี้จึงมีความเที่ยงเชื่อถือได้

นอกจากนี้ยังพบว่าโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมา ไม่ถูกรบกวนด้วยพีคใดในพลาสมาเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของ blank plasma แสดงว่าวิธีนี้มีสภาพจำเพาะในการวิเคราะห์หาความเข้มข้น madecassic acid ในพลาสมา

จากการที่วิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาด้วยวิธีนี้มีความจำเพาะ แม่นยำ เที่ยงตรง และมีประสิทธิภาพในการสกัดเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด จึงมีความเหมาะสมและเชื่อถือได้ที่จะนำไปใช้ในการหาความเข้มข้นของ madecassic acid ในพลาสมาในการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ต่อไป

#### **การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 โดยการวัดระดับของ madecassic acid ในพลาสมา โดยวิธี High-Performance Liquid Chromatography**

การศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดบัวบกมีค่อนข้างน้อย ในปี 1990 Grimaldi และคณะได้ทำการศึกษาในมนุษย์ โดยให้อาสาสมัครรับประทานสารสกัดบัวบก TTF (total triterpenic fraction of *Centella asiatica*) ที่ประกอบด้วย asiatic acid และ madecassic acid รวมกันประมาณ 60% กับ asiaticoside 40% แล้ววิเคราะห์ปริมาณของ asiatic acid ในพลาสมา ต่อมาในปี 2009 Zheng และ Wang ได้ทำการศึกษาในในสุนัขบีเกิล โดยป้อนสารสกัดบัวบกที่มีส่วนประกอบของ asiaticoside 72% กับ madecassoside 6% แล้ววัดเฉพาะปริมาณของ asiatic acid ซึ่งคณะผู้วิจัยทั้งสองการศึกษาพบว่า asiaticoside เมื่อเข้าสู่ร่างกายผ่านทางปากนั้นจะถูก hydrolysis ตัดหมู่น้ำตาลออกเปลี่ยนไปเป็น asiatic acid แล้วจึงถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็น madecassoside 42.90% และ asiaticoside 38.8% โดยคาดว่าทั้ง madecassoside และ asiaticoside ซึ่งเข้าสู่ร่างกายผ่านทางปากจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น madecassic acid และ asiatic acid ตามลำดับ

โดยที่การวิเคราะห์ปริมาณของ madecassic acid และ asiatic acid ในพลาสมาของหนูแร่นั้นยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ในงานวิจัยนี้จึงได้ประยุกต์วิธีวิเคราะห์ของ Thongnopnua (2008) ซึ่งใช้สำหรับการวิเคราะห์ asiatic acid มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของทั้ง madecassic acid และ asiatic acid เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ใช้พลาสมาในปริมาณน้อยเหมาะกับปริมาณเลือดที่เก็บได้จากหนูแร่นั้นที่มีปริมาณน้อย ในขณะที่วิธีวิเคราะห์ asiatic acid ในมนุษย์และสุนัขจะใช้ปริมาณพลาสมาที่มากกว่า วิธีการนี้ใช้หลักการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรด  $H_3PO_4$  (42.5%) สารละลาย tetrabutyl ammonium bisulfate (0.01M) และสารละลาย aqueous ammonium chloride (6.0M) จากนั้นสกัดแยก madecassic acid ด้วย ethyl acetate

ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาวิธีวิเคราะห์ปริมาณของ madecassic acid และ asiatic acid ในตัวอย่างพลาสมาเดียวกันพร้อมกันนั้น พบว่าเมื่อ spike สารละลายของ madecassic acid และ asiatic acid ลงใน blank plasma จะสามารถตรวจพบพีคของสารทั้งสองตัวในขณะเดียวกันแต่เมื่อนำพลาสมาของหนูแร่นั้นที่ถูกลบสารสกัดมาตรฐานบวบกี้ซีเอ 233 มาวิเคราะห์กลับพบเพียงพีคของ madecassic acid เท่านั้น (ภาคผนวก ข) จึงมีความเป็นไปได้ที่พีคของ asiatic acid อาจถูกบดบังด้วยสารอื่น ๆ ในพลาสมา หรือ asiaticoside อาจมีวิถีเมแทบอลิซึมในหนูที่แตกต่างจากมนุษย์และสุนัข ซึ่ง asiaticoside จะถูกเปลี่ยนเป็น asiatic acid จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบระดับ asiatic acid ในพลาสมาของหนูแร่นั้นได้

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดจากสมุนไพรอื่น ๆ เช่น Milk thistle ซึ่งมีสารสำคัญคือ silybin, isosilybin, silydianin และ silychristin โดยผู้วิจัยได้ทำการศึกษาวิเคราะห์เฉพาะปริมาณของ silybin ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักเพียงชนิดเดียว (Bhattaram *et al.*, 2002) และใน TTF ซึ่งเป็นสารสกัดจากสมุนไพรบวบกี้ซีเอ 233 ที่มีส่วนประกอบของ asiatic acid และ madecassic acid รวมกันประมาณ 60% กับ asiaticoside 40% (Tantisira, 2009) ซึ่งผู้วิจัยก็ได้ศึกษาเภสัชจลนศาสตร์โดยวิเคราะห์ปริมาณของ asiatic acid ที่ถูกเปลี่ยนแปลงมาจาก asiaticoside ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักเพียงชนิดเดียวเช่นกัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบวบกี้ซีเอ 233 ซึ่งมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็น madecassoside โดยการวัดระดับของ madecassic acid

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกชื่อซีเอ 233 ในหนูแรท 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ถูกป้อนสารสกัดเพียงครั้งเดียวและกลุ่มที่ถูกป้อนสารสกัดต่อเนื่อง 7 วัน วันละ 2 ครั้ง โดยในแต่ละกลุ่มสัตว์ทดลองจะถูกแบ่งกลุ่มเพื่อให้สารสกัด 2 ขนาดคือ 30 mg/kg และ 60 mg/kg พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดแบบครั้งเดียวในขนาด 60 mg/kg เวลาที่ระดับ madecassic acid สูงสุดในเลือดคือ 4 ชั่วโมง ซึ่งมีค่ายาวกว่ากลุ่มที่ได้รับในขนาด 30 mg/kg ที่มีค่าเท่ากับ 2.25 ชั่วโมง อาจเนื่องจากขนาดยาที่สูงขึ้นและถ้าหากอัตราการดูดซึมเท่าเดิม ส่งผลให้เวลาที่ระดับ madecassic acid สูงสุดในเลือดยาวออกไป ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบการดูดซึมได้ตั้งแต่วินาทีแรก แสดงว่ามีการดูดซึมได้ดี และเมื่อเพิ่มขนาดสารสกัดพบว่าค่า  $C_{max}$  และ  $AUC_{0-24h}$  สูงขึ้น แสดงว่ามีการดูดซึมได้มากขึ้นและมีปริมาณยาอยู่ในกระแสเลือดสูงขึ้น แต่การดูดซึมมีความแปรปรวนระหว่างหนูแต่ละตัว จึงทำให้ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าค่าครึ่งชีวิตของยามีค่าอยู่ใน ช่วง 0.5 ถึง 1 ชั่วโมง แสดงว่ามีการกำจัดยาที่ค่อนข้างเร็ว จึงไม่สามารถตรวจวัดระดับยาได้หลังชั่วโมงที่ 4 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดในขนาดต่ำและหลังชั่วโมงที่ 6 ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดในขนาดสูง

นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มที่ถูกป้อนสารสกัดต่อเนื่องในขนาด 30 mg/kg นั้นมีค่า  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-24h}$  และ  $t_{1/2}$  สูงกว่ากลุ่มที่ถูกป้อนเพียงครั้งเดียว ในขณะที่ขนาด 60 mg/kg นั้นมีเพียงค่า  $AUC_{0-24h}$  และ  $t_{1/2}$  ที่สูงกว่าการป้อนแบบครั้งเดียว แสดงว่ามีการสะสมของ madecassic acid ในร่างกาย ทำให้มีปริมาณยาอยู่ในร่างกายได้มากขึ้น ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับการศึกษาในมนุษย์ที่พบว่าเมื่อรับประทานสารสกัดบัวบกแบบต่อเนื่องจะมีค่า  $AUC_{0-24h}$  และ  $t_{1/2}$  ของ asiatic acid สูงขึ้นกว่าการรับประทานเพียงครั้งเดียว

แต่ในงานวิจัยนี้พบปัญหาว่าในกลุ่มที่ถูกป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกชื่อซีเอ 233 แบบต่อเนื่องในขนาดต่ำกลับมีค่า  $AUC_{0-24h}$  และ  $t_{1/2}$  สูงกว่าในกลุ่มที่ได้รับในขนาดสูง ทั้งนี้เนื่องจากหนูแรทบางตัวมีการดูดซึมยาได้มากแตกต่างจากตัวอื่น ส่งผลให้มีค่า  $AUC_{0-24h}$  และ  $t_{1/2}$  ที่สูงแตกต่างจากตัวอื่น นอกจากนี้ยังแตกต่างจากการศึกษาในมนุษย์ที่เมื่อให้ขนาดยาที่สูงขึ้นแบบต่อเนื่องจะมีค่า  $AUC_{0-24h}$  และ  $t_{1/2}$  สูงกว่าการได้รับยาในขนาดต่ำ

ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าสามารถตรวจพบสาร madecassic acid ในพลาสมาได้หลังจากให้ สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ไปแล้ว 12 ชั่วโมง ในหนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดแบบต่อเนื่อง และจากข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ต่อการเรียนรู้และความจำในหนูถีบจักร โดยป้อนสารสกัดมาตรฐาน บัวบกอีซีเอ 233 ให้ในขนาด 30 mg/kg ต่อเนื่อง 8 วัน พบว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 แสดงผลแก้ไขภาวะบกพร่องในการเรียนรู้และความจำได้ดีในระยะท้าย ๆ ของการทดสอบ (มยุรี ตันตสิระและคณะ, 2551) ซึ่งน่าจะสัมพันธ์กับปริมาณของ madecassoside ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกาย และแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

แม้ว่าในงานวิจัยนี้จะพบปัญหาว่าในหนูแรทบางตัวนั้นมีระดับ madecassic acid ต่ำกว่า ค่าต่ำสุดที่วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ได้ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาดต่ำ ทำให้ข้อมูลที่ได้ใน บางกลุ่มการทดลองไม่ครบถ้วนสมบูรณ์ ซึ่งอาจจะเกิดจากปัจจัยภายในร่างกายของหนูแรทที่ ส่งผลให้การดูดซึมยาน้อยหรืออาจจะเกิดจากสภาพความไวของวิธีวิเคราะห์ไม่เพียงพอ ดังนั้นอาจจะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ที่มีความไวมากกว่านี้หรือใช้เครื่องมือตรวจวัดระดับ madecassic acid ที่มีความละเอียดในการวิเคราะห์มากขึ้นกว่าวิธี HPLC เช่น LC/MS-MS เป็นต้น

จากข้อมูลการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ดังกล่าวเบื้องต้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการกำหนดขนาดและวิธีใช้ที่เหมาะสมในการ วางแผนการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์หรือเภสัชพลศาสตร์ทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ เพื่อ พัฒนาสารสกัดมาตรฐานอีซีเอ 233 ขึ้นมาใช้ประโยชน์ในทางคลินิกต่อไป

## รายการอ้างอิง

- นภดล เลือดนักรบ. ผลของสารสกัดบัวบก (Centella asiatica (L.) Urban.) ในการลดความดันเลือดของหนูขาวที่ทำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2542.
- บุญเจือ ธรณินทร์, ประสิทธิ์ จงเสริมศิริสกุล, สุทธิ ลีละเศรษฐกุล และ สมพงษ์ ศรีอำไพ. การศึกษาฤทธิ์ต่อผิวหนังหนูตะเภาของครีมกัลยโคไลด์ของใบบัวบก. สารศิริราช. 36 (พฤศจิกายน 2527): 721-724
- เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ. การวิเคราะห์ตัวยาในชิวสาร. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.
- มยุรี ตันติสิริระ, บุญยงค์ ตันติสิริระ และ จุไรพร สมบุญวงศ์. การศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลและผลต่อการเรียนรู้และความจำของสารสกัดมาตรฐานบัวบกในโมเดลสัตว์ทดลอง. คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)
- วันดี กฤษณพันธ์. สมุนไพรสารพัดประโยชน์. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539.
- ศิริรัตน์ โกศลยวัฒน์, จันทรา ชัยพานิช และ เกษียร กังคานนท์. การใช้ครีมใบบัวบก 1% รักษาแผลเรื้อรัง. สารศิริราช. 40 (มิถุนายน 2531): 455-461
- Bhattaram, V. A., Graefe, U., Kohlert, C., Veit, M., and Derendorf, H. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. Phytomedicine. 2002; 9: 1-33.
- Cesarone, M. R., et al. Effects of the total triterpenic fraction of Centella asiatica in venous hypertensive microangiopathy: a prospective, placebo-controlled, randomized trial. Angiology. 2001; 52: 15-8.
- Cesarone, M. R., et al. Microcirculatory effects of total triterpenic fraction of Centella asiatica in chronic venous hypertension: measurement by laser Doppler, TcPO2-CO2, leg volumetry. Angiology. 2001; 52: 45-8.

- Cheng, C. L., and Koo, M. W.L. Effects of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. Life Sciences. 2000; 67: 2647-53.
- Chivapat, S.; Chavalittumrong, P., and Tantisira, M.H. Acute and sub-chronic toxicity studies of a Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa233. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011 accepted.
- Diehl, K.H., *et al.* A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology. 2001; 21: 15-23.
- Grimaldi, R., *et al.* Pharmacokinetics of the total triterpenic fraction of *Centella asiatica* after single and multiple administrations to healthy volunteers. A new assay for asiatic acid. Journal of Ethnopharmacology. 1990; 28: 235-241.
- Guo, J. S., Cheng, C. L., and Koo, M. W. L. Inhibitory Effects of *Centella asiatica* Water Extract and Asiaticoside on Inducible Nitric Oxide Synthase During Gastric Ulcer Healing in Rats. Planta Medica. 2004; 70: 1150-54.
- Jamil, S.S., Nizami, Q., and Salam, M. *Centella asiatica* (Linn.) Urban Review. Natural Product Radiance. 2007; 6: 158-170.
- Kam-eg, A., Tantisira, B., and Tantisira, M. H. Preliminary Study on Effects of a Standardized Extract of *Centella asiatica*, ECa 233, on Deficit of Learning and Memory induced by an Intracerebroventricular Injection of  $\beta$ -Amyloid Peptide in Mice. Thai Journal of Pharmacology. 2009; 31: 79-82.
- Kimura, Y., Sumiyoshi, M., Samukawa, K., Satake, N., and Sakanaka, M. Facilitating action of asiaticoside at low doses on burn wound repair and its mechanism. European Journal of Pharmacology. 2008; 584: 415-423.

- Lee, M. K., *et al.* Asiatic acid derivatives protect cultured cortical neurons from glutamate-induced excitotoxicity. Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology. 2000; 108: 75-86.
- Maquart, F. X., *et al.* Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. European Journal of dermatology. 1999; 9: 289-96.
- Punturee, K., Wild, C. P., and Vinitketkumneun U. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  in J774.2 mouse macrophages. Journal of Ethnopharmacology. 2004; 95: 183-189.
- Rao, S. B., Chetana, M., and Devi, P. U. *Centella asiatica* treatment during postnatal period enhances learning and memory in mice. Physiology & Behavior. 2005; 86: 449-457.
- Rao, K. G. M., Rao, S. M., and Rao, G. S. *Centella asiatica* (L.) Leaf Extract Treatment During the Growth Spurt Period Enhances Hippocampal CA3 Neuronal Dendritic Arborization in Rats. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2006; 3: 349-357.
- Ruengprasertkit, C., Hongprasong, N., Tantisira, B., and Tantisira, M.H. Preliminary study of effects of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 on minor aphthous ulcers. Chulalongkorn University Dental Journal. 2010; 33: 131-42.
- Sheng, H., and Sun, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. Natural Product Report. 2011; 28: 543-593.
- Shukla, A., *et al.* In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. Journal of Ethnopharmacology. 1999; 65: 1-11.



- Somchit, M. N., *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Centella asiatica*.  
Indian Journal of Pharmacology. 2004; 36: 377-380.
- Soumyanath, A., *et al.* *Centella asiatica* accelerates nerve regeneration upon oral administration and contains multiple active fractions increasing neurite elongation in-vitro. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2005; 57: 1221-9.
- Tanintaraard, H., Tantisira, M. H., and Tantisira, B. Preliminary study of healing effects of ECa 233, standardized extract of *Centella asiatica*, on incision wound in rats. Proceeding of 35<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, 15-17 October, 2009, Bangkok, Thailand.
- Tantisira, M. H. Bioactive standardized extract of *Centella asiatica* (ECa 233). Proceeding of The Eighth NRCT-JSPS Joint Seminar, pp. 25, 2-3 February, 2009, Bangkok, Thailand.
- Thongnopnua, P. High-performance liquid chromatographic determination of asiatic acid in human plasma. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008; 32: 10-16.
- Tianwattanatada, S., Piyaboon, O., and Chompoopong, S. The effects of *Centella asiatica* on pain behavior following acute inflammatory pain in rats' hindpaw. Proceeding of 36<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, 26-28 October, 2010, Bangkok, Thailand.
- Veerendra, M. H., and Gupta, Y. K. Effect of *Centella asiatica* on Cognition and Oxidative Stress in An Intracerebroventricular Streptozotocin model of Alzheimer's Disease in Rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2003; 30: 336-342.

Won, J. H., *et al.* Anti-inflammatory Effects of Madecassic acid via Suppression of NF- $\kappa$ B Pathway in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophage Cells. Planta Medica. 2010; 76: 251-257.

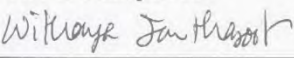
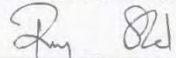
Zheng, X. C., and Wang, S. H. Determination of asiatic acid in beagle dog plasma after oral administration of *Centella asiatica* extract by precolumn derivation RP-HPLC. Journal of Chromatography B. 2009; 877: 477-481.

ภาคผนวก

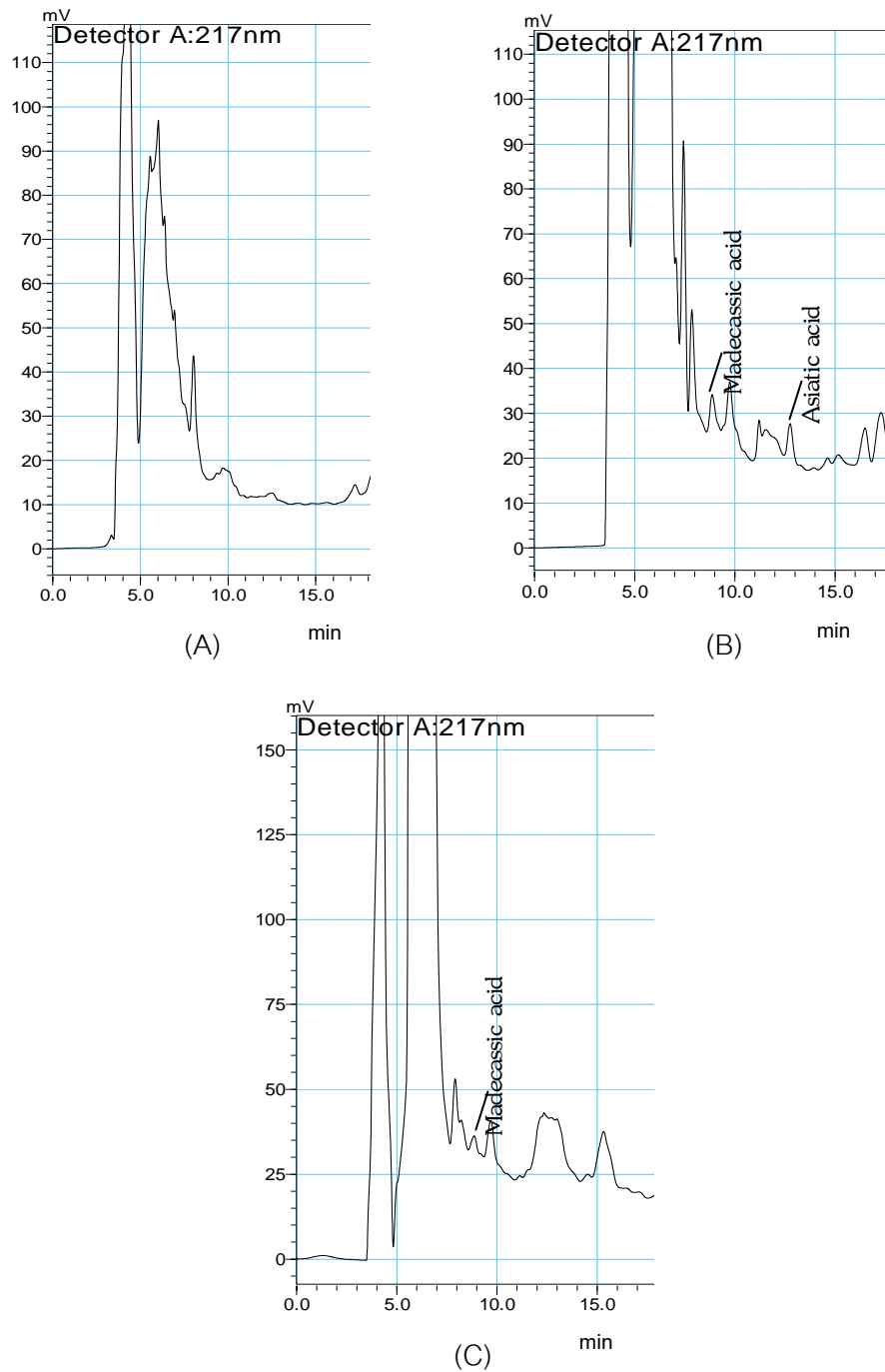
ภาคผนวก ก  
เอกสารรับรองโครงการวิจัย

ศส 0512.14 ศสจ 033/ 2552

### Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee

|  |   |
|--|---|
| <b>Certificate of Project Approval</b>   | <input type="checkbox"/> Original <input type="checkbox"/> Renew                          |
| <b>Animal Use Protocol No. 09-33-011</b>   | <b>Approval No. 09-33-011</b>   |
| <b>Protocol Title</b>  |   |
| Pharmacokinetics of single and multiple doses of standardized extract of Centella asiatica ECa233 in rats  |   |
| <b>Principal Investigator</b>  |   |
| Mayuree Tantisira, Ph.D.   |   |
| <b>Certification of Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)</b>  |   |
| This project has been reviewed and approved by the IACUC in accordance with university regulations and policies governing the care and use of laboratory animals. The review has followed guidelines documented in Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals for Scientific Purposes edited by the National Research Council of Thailand.   |   |
| <b>Date of Approval</b>  | <b>Date of Expiration</b>   |
| June 29, 2009  | June 29, 2010   |
| <b>Applicant Faculty/Institution</b>   |   |
| Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai Rd.,<br>Pathumwan BKK-THAILAND. 10330   |   |
| <b>Signature of Chairperson</b>  | <b>Signature of Authorized Official</b>   |
|   |       |
| <b>Name and Title</b>  | <b>Name and Title</b>   |
| <b>WITHAYA JANTHASOAT</b><br>Chairman  | <b>RUNGPETCH SAKULBUMRUNGSIL, Ph.D.</b><br>Associate Dean (Research and Academic Service) |
| <p><i>The official signing above certifies that the information provided on this form is correct. The institution assumes that investigators will take responsibility, and follow university regulations and policies for the care and use of animals.</i></p> <p><i>This approval is subjected to assurance given in the animal use protocol and may be required for future investigations and reviews.</i></p> |   |

ภาคผนวก ข  
ข้อมูลการศึกษา



รูปที่ 11 แสดงโครมาโตแกรมของ blank plasma (A), โครมาโตแกรมของ blank plasma ที่ spiked madecassic acid และ asiatic acid (B) และโครมาโตแกรมของพลาสมา หนูแรทที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกชื่อ 233 (C)

ตารางที่ 13 ระดับ Madecassic acid ในเลือดของหนูแรท กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg แบบครั้งเดียว

| Subject No. | Madecassic level (µg/ml) ที่เวลาต่าง ๆ |        |       |        |       |        |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------|--|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|             | 0 hr                                   | 0.5 hr | 1 hr  | 1.5 hr | 2 hr  | 2.5 hr | 3 hr  | 4 hr  | 6 hr  | 8 hr  | 10 hr | 12 hr | 24 hr |
| 1           | 0                                      | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |
| 2           | 0                                      | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ | ND    | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ |
| 3           | 0                                      | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | ND    | <LLOQ | ND    |
| 4           | 0                                      | ND     | ND    | <LLOQ  | 0.82  | 0.79   | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ |
| 5           | 0                                      | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | 1.49   | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | ND    |
| 6           | 0                                      | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ | ND    | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | ND    |
| Mean        | 0                                      | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | 0.82  | 1.14   | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ |
| SE          | 0                                      | N/A    | N/A   | N/A    | N/A   | 0.35   | N/A   | N/A   | N/A   | N/A   | N/A   | N/A   | N/A   |

ND = Not detected



ตารางที่ 14 ระดับ Madecassic acid ในเลือดของหนูแรท กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg แบบครั้งเดียว

| Subject No. | Madecassic level (µg/ml) ที่เวลาต่าง ๆ |        |       |        |       |        |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------|--|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|             | 0 hr                                   | 0.5 hr | 1 hr  | 1.5 hr | 2 hr  | 2.5 hr | 3 hr  | 4 hr  | 6 hr  | 8 hr  | 10 hr | 12 hr | 24 hr |
| 1           | 0                                      | 1.90   | <LLOQ | 0.70   | 1.05  | 1.50   | 3.40  | 5.33  | <LLOQ | ND    | ND    | ND    | ND    |
| 2           | 0                                      | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | 0.78  | 2.84   | 4.76  | 7.98  | <LLOQ | <LLOQ | ND    | ND    | ND    |
| 3           | 0                                      | <LLOQ  | ND    | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | 1.28  | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |
| 4           | 0                                      | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | 0.60  | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | ND    |
| 5           | 0                                      | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |
| 6           | 0                                      | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ | ND    | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ |
| Mean        | 0                                      | 1.90   | <LLOQ | 0.70   | 0.92  | 2.17   | 4.08  | 3.80  | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ |
| SE          | 0                                      | N/A    | N/A   | N/A    | 0.13  | 0.67   | 0.68  | 1.74  | N/A   | N/A   | N/A   | N/A   | N/A   |

ND = Not detected

ตารางที่ 15 ระดับ Madecassic acid ในเลือดของหนูแรท กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน

| Subject No. | Madecassic level (µg/ml) ที่เวลาต่าง ๆ |        |       |        |       |        |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------|--|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|             | 0 hr                                   | 0.5 hr | 1 hr  | 1.5 hr | 2 hr  | 2.5 hr | 3 hr  | 4 hr  | 6 hr  | 8 hr  | 10 hr | 12 hr | 24 hr |
| 1           | <LLOQ                                  | <LLOQ  | <LLOQ | ND     | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | ND    | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ |
| 2           | <LLOQ                                  | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ |
| 3           | <LLOQ                                  | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | 1.04  | <LLOQ  | 0.89  | 1.92  | <LLOQ | <LLOQ | ND    | 0.61  | <LLOQ |
| 4           | <LLOQ                                  | <LLOQ  | 0.60  | 1.40   | <LLOQ | 1.70   | 1.33  | <LLOQ | ND    | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | ND    |
| 5           | <LLOQ                                  | 1.98   | 2.09  | <LLOQ  | 2.27  | 1.60   | <LLOQ | 2.18  | 1.45  | <LLOQ | ND    | <LLOQ | <LLOQ |
| 6           | <LLOQ                                  | 1.24   | 1.89  | 2.04   | 1.85  | <LLOQ  | 1.80  | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | 1.07  | 1.65  | ND    |
| Mean        | <LLOQ                                  | 1.61   | 1.53  | 1.72   | 1.72  | 1.65   | 1.34  | 2.05  | 1.45  | <LLOQ | 1.07  | 1.13  | <LLOQ |
| SE          | N/A                                    | 0.37   | 0.47  | 0.32   | 0.36  | 0.05   | 0.27  | 0.13  | N/A   | N/A   | N/A   | 0.52  | N/A   |

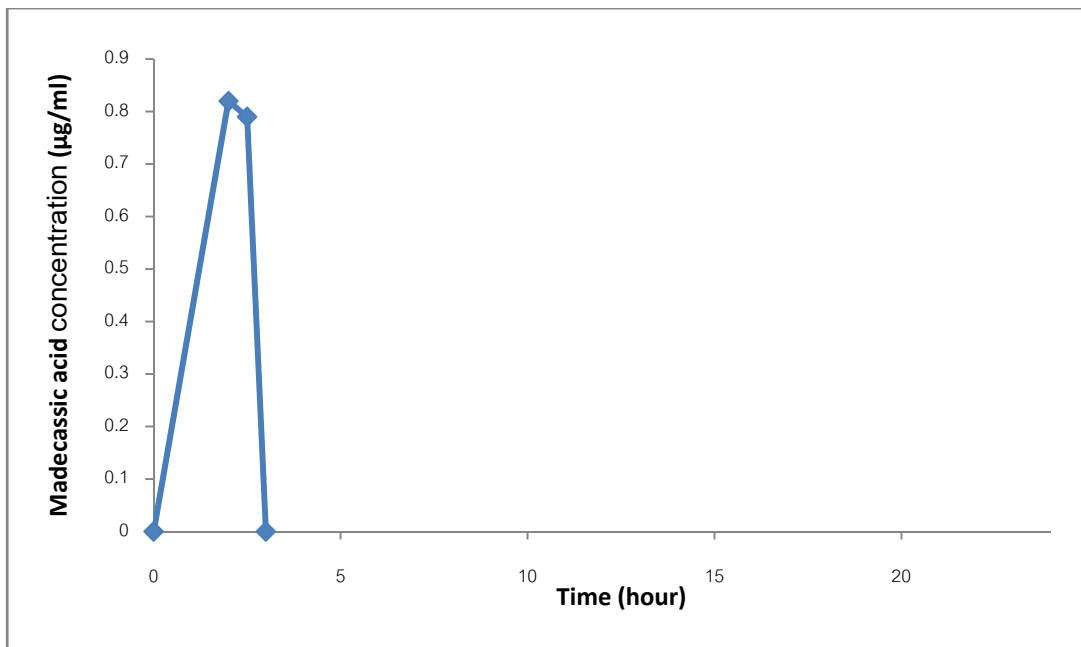
ND = Not detected

ตารางที่ 16 ระดับ Madecassic acid ในเลือดของหนูแรท กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน

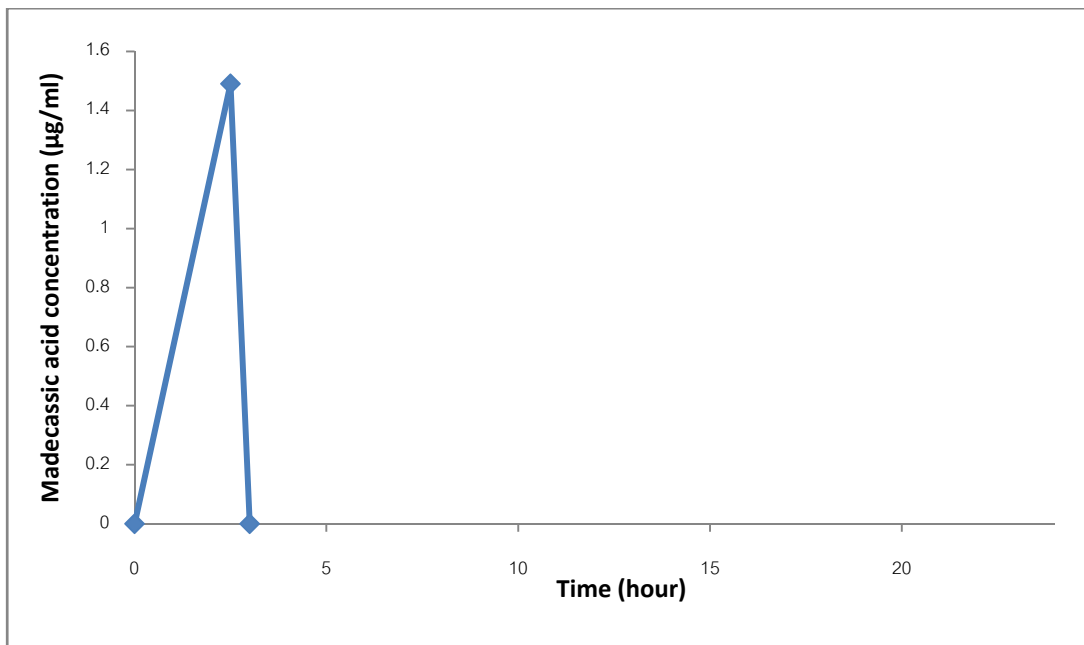
| Subject<br>No. | Madecassic level (µg/ml) ที่เวลาต่าง ๆ |        |       |        |       |        |       |       |       |       |       |       |       |
|----------------|--|--------|-------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                | 0 hr                                   | 0.5 hr | 1 hr  | 1.5 hr | 2 hr  | 2.5 hr | 3 hr  | 4 hr  | 6 hr  | 8 hr  | 10 hr | 12 hr | 24 hr |
| 1              | ND                                     | ND     | <LLOQ | <LLOQ  | 2.4   | <LLOQ  | 4.31  | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |
| 2              | ND                                     | ND     | ND    | <LLOQ  | 1.3   | <LLOQ  | 3.84  | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |
| 3              | ND                                     | <LLOQ  | ND    | <LLOQ  | 2.57  | 0.73   | 4.63  | 5.3   | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |
| 4              | <LLOQ                                  | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | 1.5    | 0.63  | 0.69  | ND    | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | ND    |
| 5              | <LLOQ                                  | <LLOQ  | <LLOQ | <LLOQ  | <LLOQ | 1.27   | <LLOQ | <LLOQ | <LLOQ | 2.49  | 1.86  | 0.75  | <LLOQ |
| 6              | <LLOQ                                  | <LLOQ  | <LLOQ | 1.14   | 0.76  | 1.91   | <LLOQ | <LLOQ | 1.37  | 1.16  | <LLOQ | 0.79  | <LLOQ |
| Mean           | <LLOQ                                  | <LLOQ  | <LLOQ | 1.14   | 1.76  | 1.35   | 3.35  | 3.00  | 1.37  | 1.83  | 1.86  | 0.77  | <LLOQ |
| SD             | N/A                                    | N/A    | N/A   | N/A    | 0.44  | 0.26   | 0.92  | 2.31  | N/A   | 0.67  | N/A   | 0.02  | N/A   |

ND = Not detect

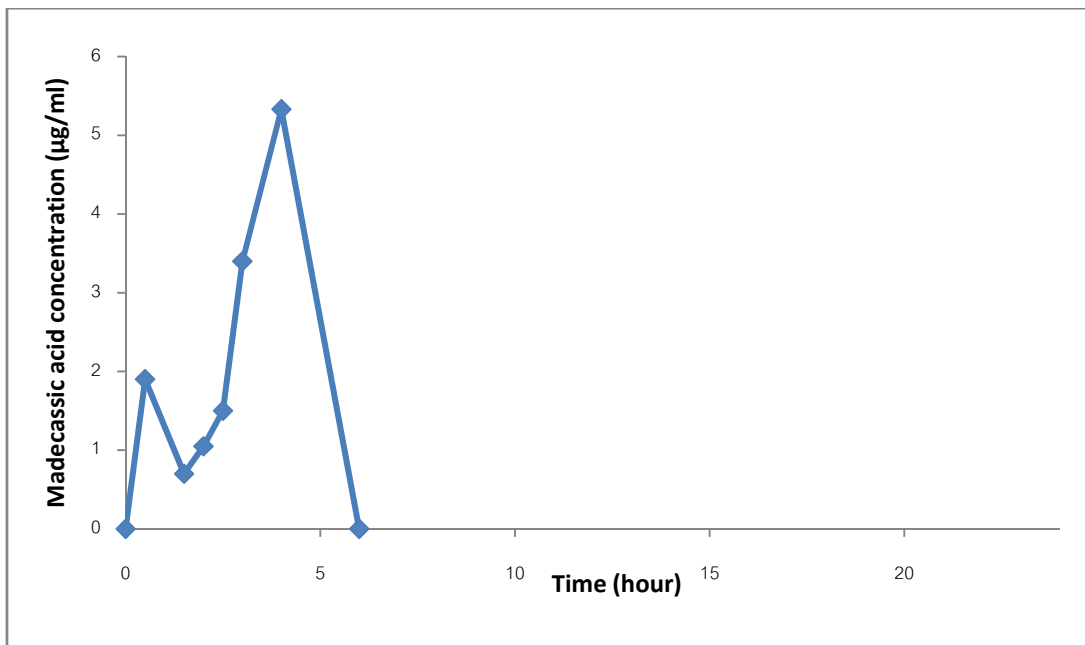
กราฟแสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทแต่ละตัว



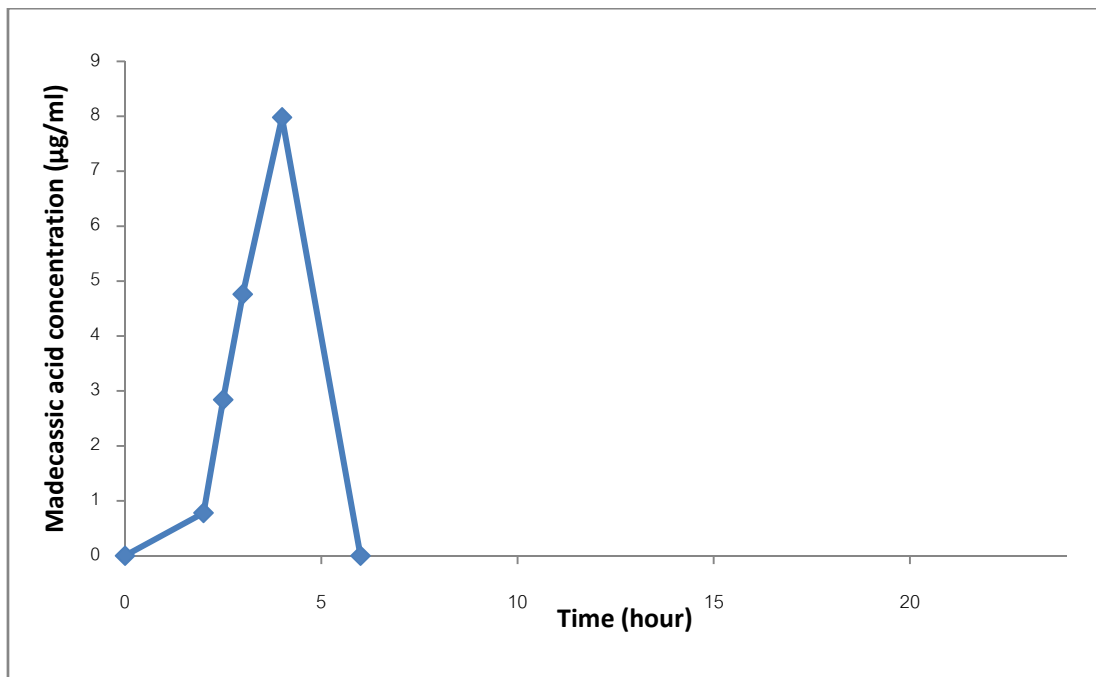
รูปที่ 12 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 4  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg ครั้งเดียว



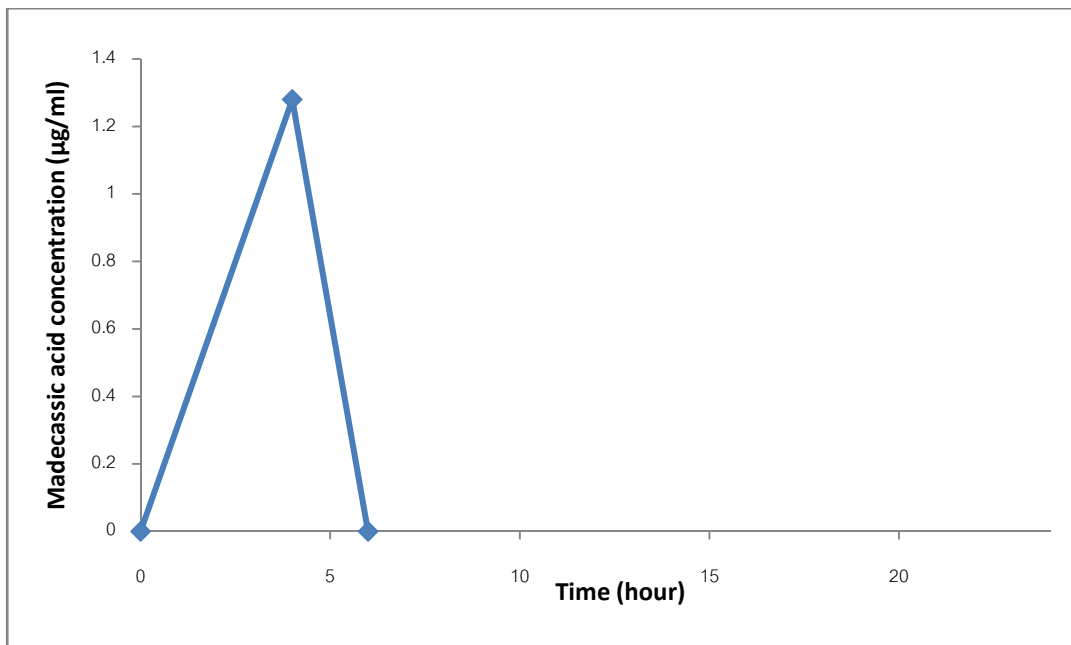
รูปที่ 13 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 5  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg ครั้งเดียว



รูปที่ 14 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 1  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว

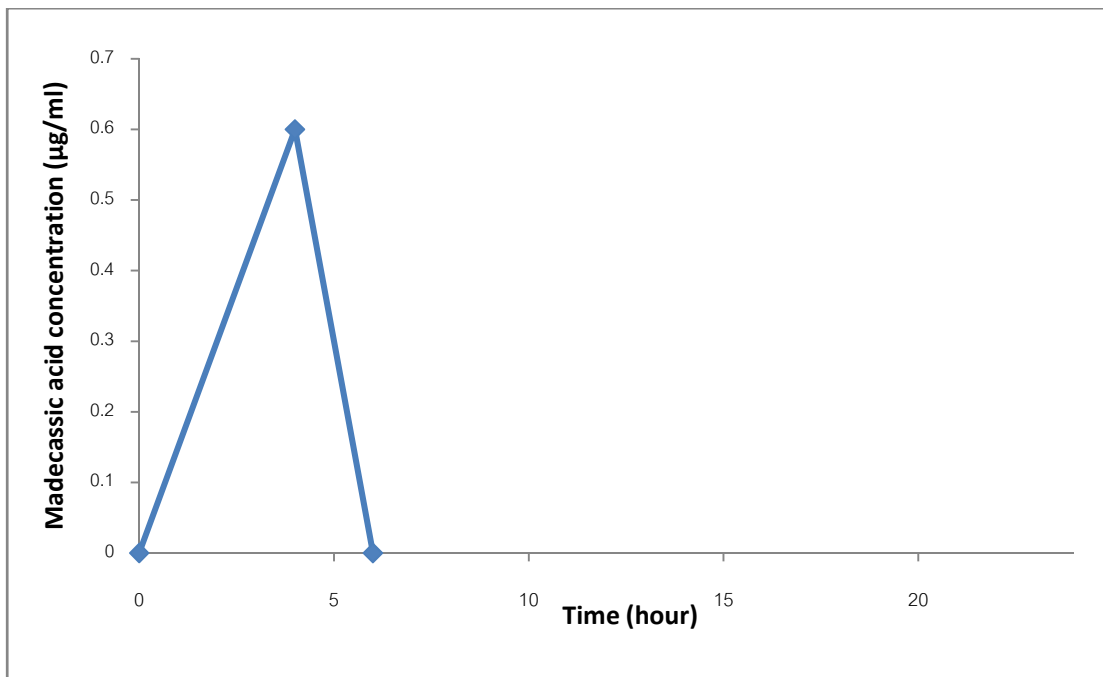


รูปที่ 15 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 2  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว

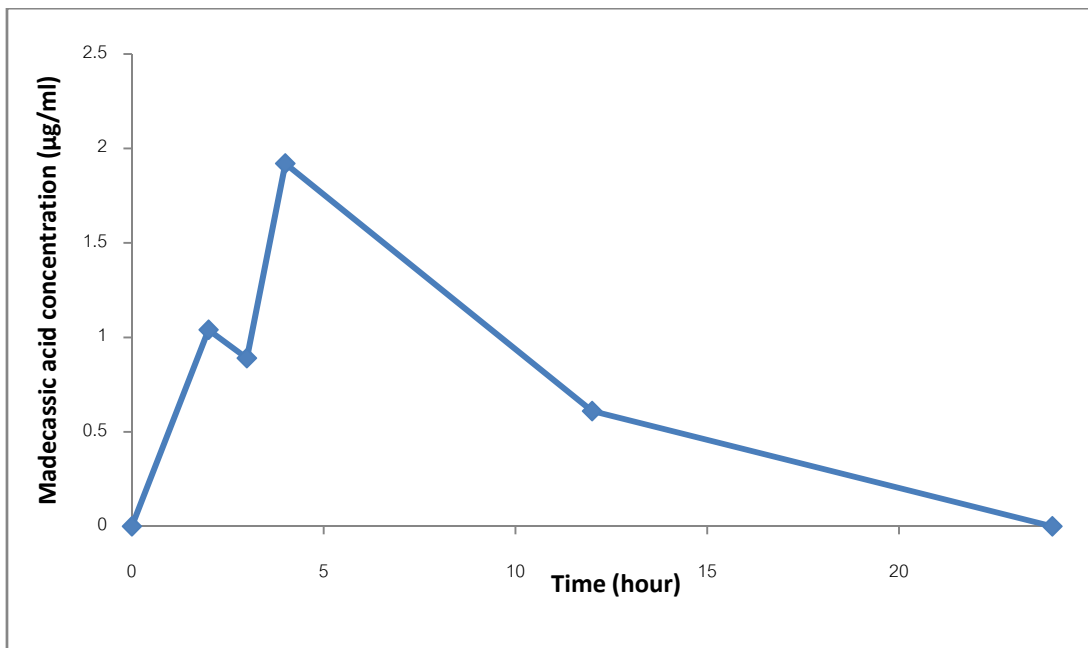


รูปที่ 16 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 3  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว

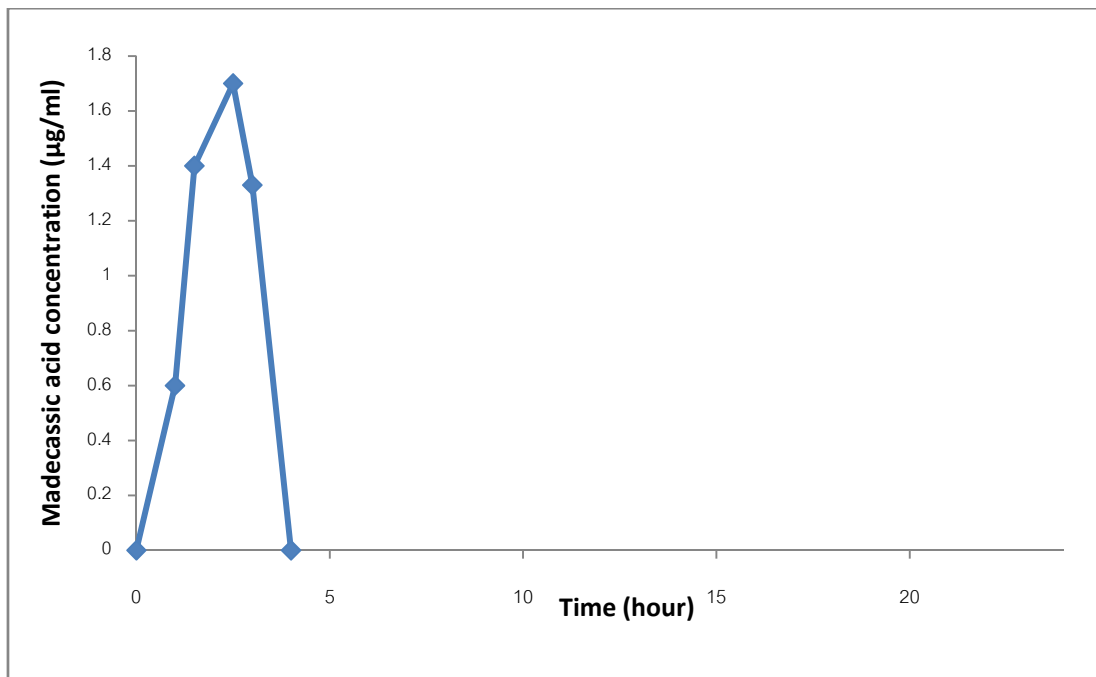




รูปที่ 17 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 4  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg ครั้งเดียว



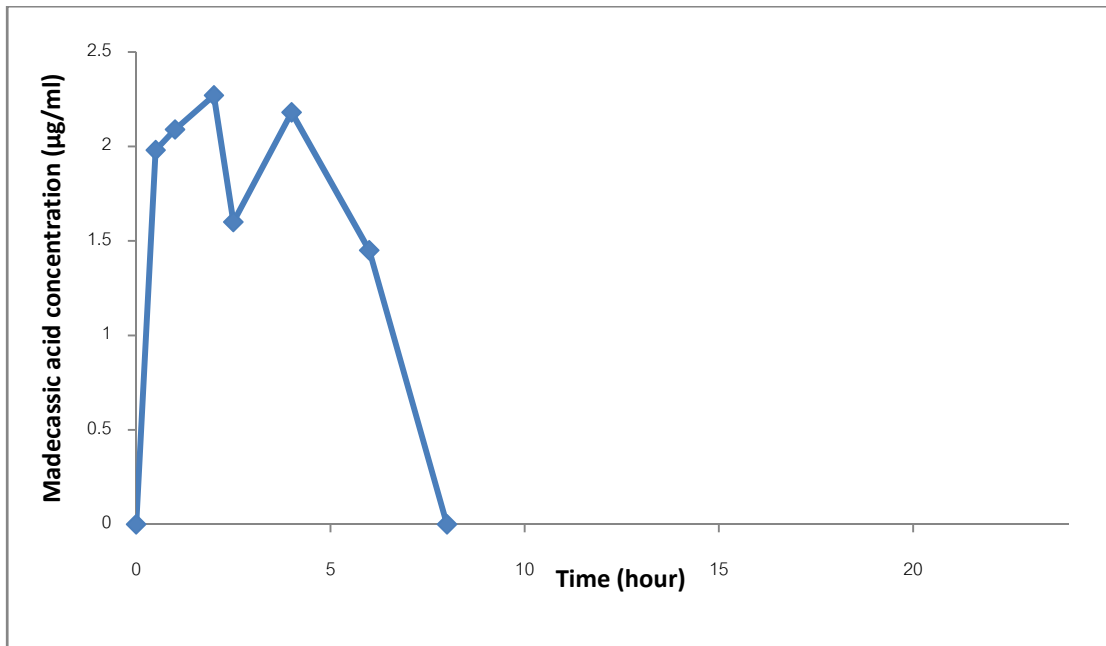
รูปที่ 18 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 3  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน



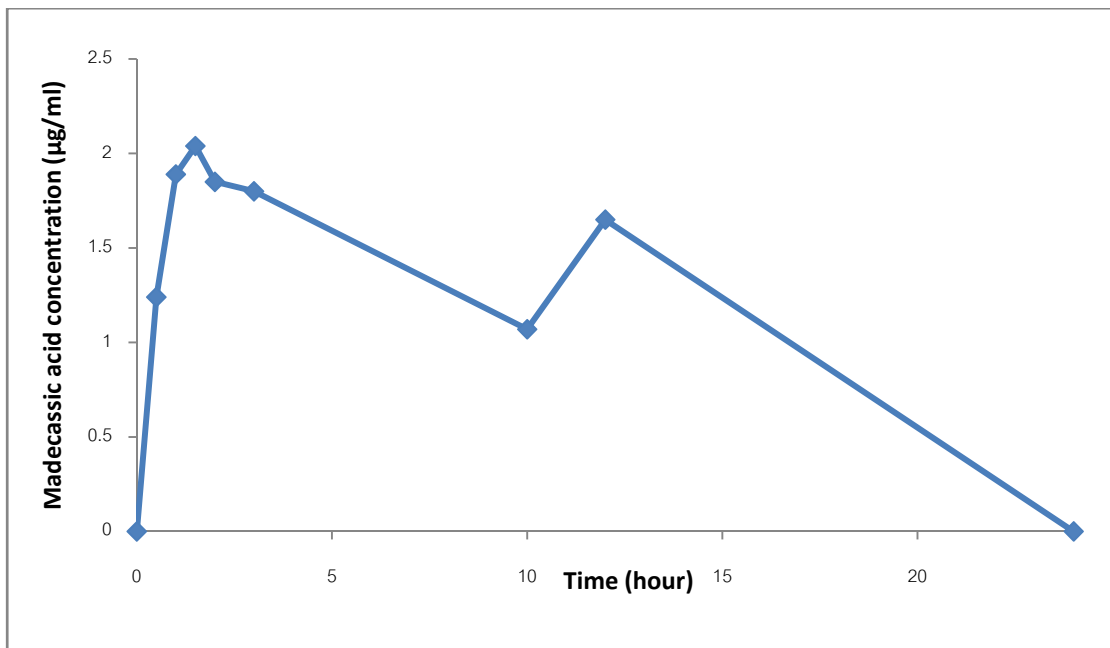
รูปที่ 19 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 4

กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง

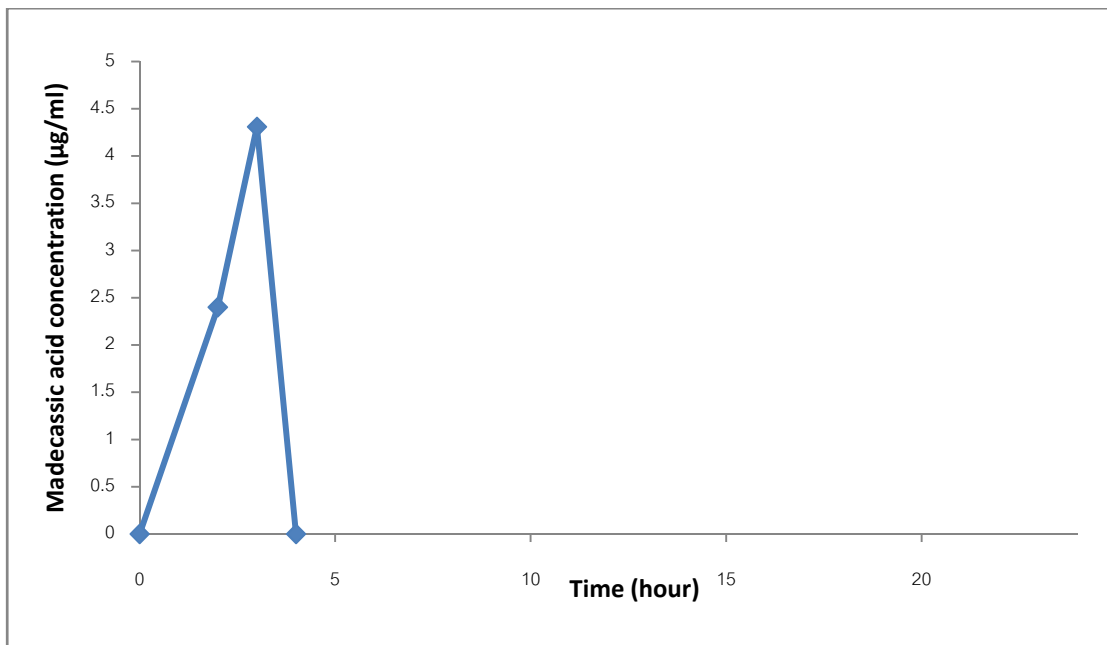
ต่อเนื่อง 7 วัน



รูปที่ 20 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 5  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน



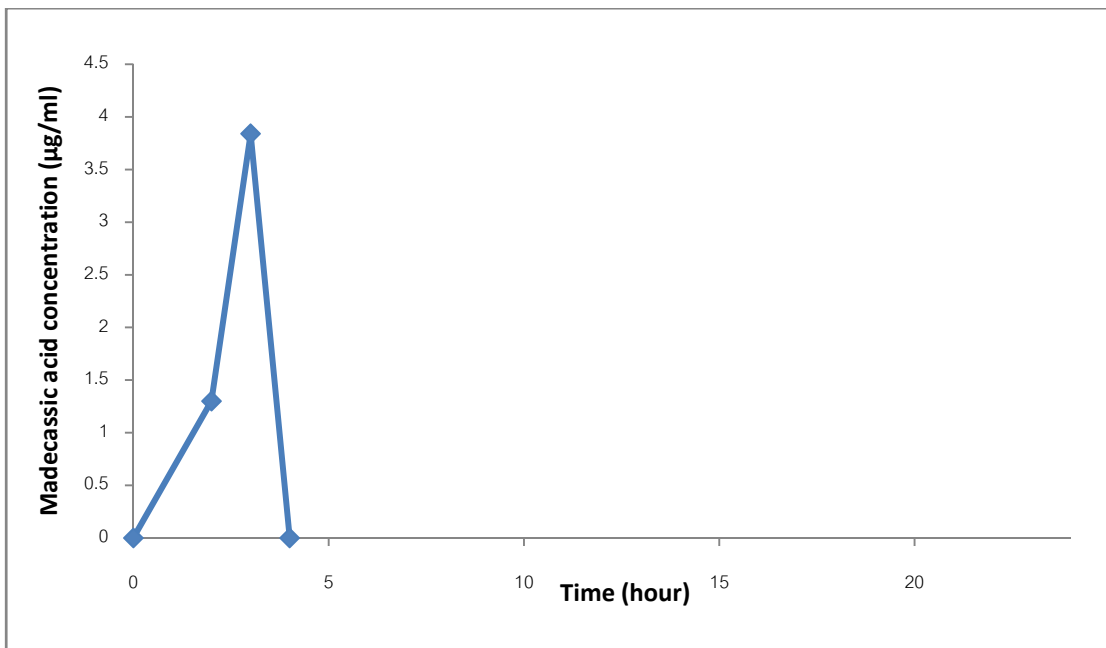
รูปที่ 21 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 6  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 30 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน



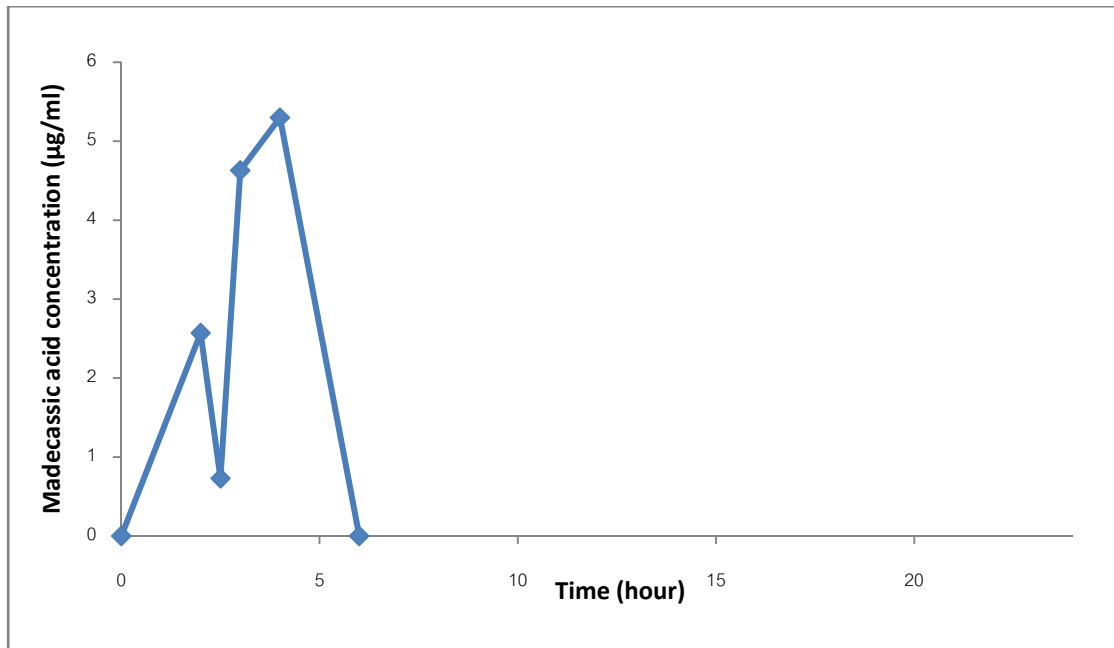
รูปที่ 22 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 1

กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง

ต่อเนื่อง 7 วัน

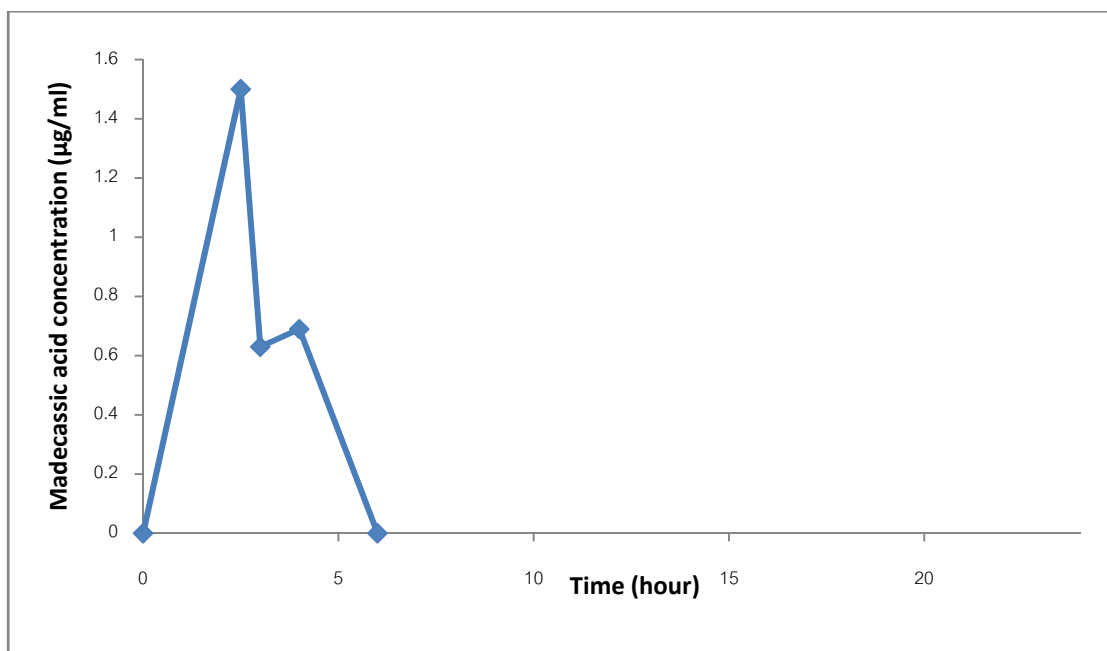


รูปที่ 23 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 2  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน

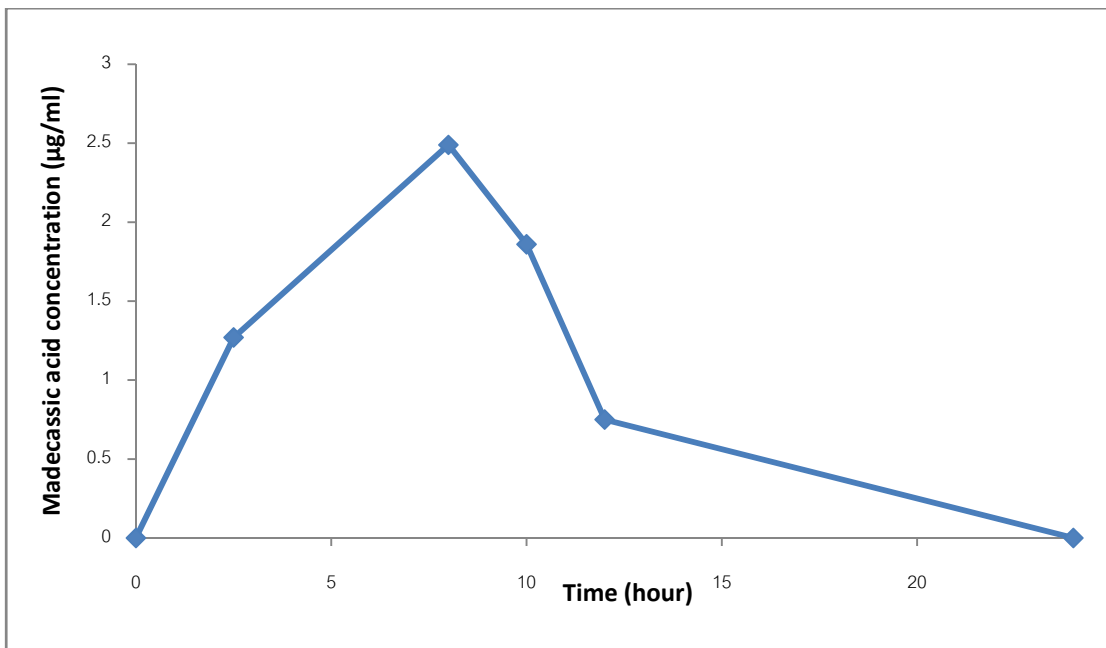


รูปที่ 24 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรดตัวที่ 3  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน

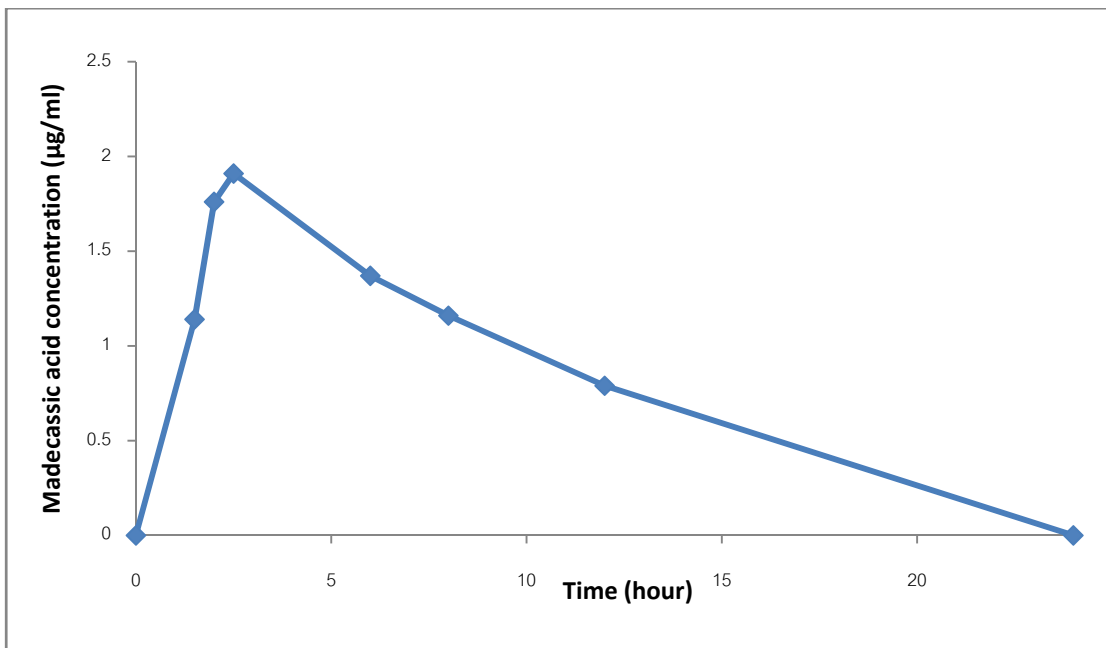




รูปที่ 25 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 4  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน



รูปที่ 26 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 5  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน



รูปที่ 27 แสดงความเข้มข้นของ Madecassic acid ในพลาสมาของหนูแรทตัวที่ 6  
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกสีเขียว 233 ขนาด 60 mg/kg วันละ 2 ครั้ง  
ต่อเนื่อง 7 วัน

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวบัณฑิตา พรหมจำรัส

เกิดวันที่ 21 เดือนกันยายน พ.ศ. 2523

สถานที่เกิด จังหวัดชุมพร

จบการศึกษาระดับปริญญาตรีจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

นิพนธ์ต้นฉบับเรื่อง “Preliminary Study on Pharmacokinetic Profiles of Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 in Rats” ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารเภสัชวิทยา ฉบับที่ 1 ปีที่ 33, 2011