รายงานฉบับสมบูรณ์

การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรบัวบกเพื่อใช้ในผู้ป่วยโรคลมชัก

Research and Development of Medicinal Plants *Centella asiatica* for the Treatment of Epileptic Patients

(ปีที่ 2 ของโครงการต่อเนื่อง 2548-2550)

ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย
รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติสิระ

หน่วยปฏิบัติการวิจัยประสาทสรีรวิทยาและประสาทเภสัชวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิงหาคม 2550

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปี 2549

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ แบบ ต-1ด

แบบรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงงานวิจัย (Research Project)

(ปีที่ 2)

.....

1. ชื่อโครงงานวิจัย*

(ภาษาไทย) การวิจัยและพัฒนาสมุนไพรบัวบกเพื่อใช้ในผู้ป่วยโรคลมชัก

(ภาษาอังกฤษ) Research and Development of Medicinal Plants *Centella asiatica* for the Treatment of Epileptic Patients

*** เสนอขอเป็นชุดโครงการต่อเนื่อง 3 ปี (พ.ศ. 2548-2550)**

2. รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัดและ หมายเลขโทรศัพท์

2.1 รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติสิระ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร. 02-2188325

2.2 รองศาสตราจารย์ ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร. 02-2188341

2.3 รองศาสตราจารย์ ดร.รพีพล ภโววาท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร. 02-2188358

2.4 รองศาสตราจารย์ ดร.เอกรินทร์ สายฟ้า คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-2188358

2.5 รองศาสตราจารย์ ดร.พจน์ กุลวานิช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-2188261

2.6 รองศาสตราจารย์ นวลศรี นิวัติศัยวงศ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-2188310

2.7 รองศาสตราจารย์ สุวรรณา เหลืองชลธาร คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-2188310

2.8 รองศาสตราจารย์ ดร.รุทธ์ สุทธิศรี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร. 02-2188358

2.9 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-3218-8310

2.10 พันตำรวจโทหญิง รองศาสตราจารย์ ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-2188324/5

2.11 เรืออากาศโทหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัสราภา ชัยกุล คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร..02-2188324/5

2.12 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-2188324/5

2.13 อาจารย์ ดร.รัตยา ลือชาพุฒิพร คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-2188324/5

2.14 อาจารย์ จิตติมา ศรีสมบูรณ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-2188345

2.15 อาจารย์ เพ็ญพิมล พงศ์พันธุ์ภาณี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-2188340

2.16 อาจารย์ ดร.พรชัย โรจน์สิทธิ์ศักดิ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โทร.02-2545195

2.17 ดร.ชฎา พิศาลพงศ์ สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม โทร.02-2038115

2.18 เภสัชกรหญิงปราณี ชวลิตธำรง กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โทร.02-5899850

2.19 พันโท นายแพทย์ โยธิน ชินวลัญช์ รพ. พระมงกุฎเกล้า โทร. 02-254-5526

2.20 พ.ต.หญิง ดร. อนุสรา วัฒนจันทร์ วิทยาลัยแพทย์ศาสตรพระมงกุฎเกล้า โทร.02-3547762

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2549 (ปีที่ 2) จำนวน 4,500,000 บาท
4. เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2548 ถึง กันยายน 2549
5. **รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย**

5.1 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย (โดยสรุป)

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านชักและความเป็นพิษของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านชักจากบัวบก รวมทั้งศึกษาผลของสารสกัดดังกล่าวในผู้ป่วยลมชัก ทั้งนี้จะต้องดำเนินการทดลองด้วยวิธี activity-guided

isolation แยกสารสกัดบัวบกและทดสอบฤทธิ์ต้านชักของสารดังกล่าวทีละส่วนจนสามารถกำหนดมาตรฐานของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านชักที่จะนำไปทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง และเมื่อพิสูจน์ได้ว่าสารสกัดนั้นมีความปลอดภัยจึงนำไปทดสอบต่อในคน

5.2 การดำเนินการวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการวิจัยเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

ได้รับอนุมัติงบประมาณประจำปีพ.ศ. 2549 จำนวน 4,500,000 บาท และได้รับงบประมาณมาแล้วดังนี้

งวดที่ 1 1,237,537 บาท เมื่อ 8 มกราคม 2549

งวดที่ 2 972,700 บาท เมื่อ 30 มิถุนายน 2549

งวดที่ 3 1,055,113 บาท เมื่อ 19 ตุลาคม 2549

มีโครงการย่อยทั้งหมดรวม 8 โครงการ คือ

โครงการที่ 1 การสกัด การแยก และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดสมุนไพรบัวบก

โตรงการที่ 2 การสร้างมาตรฐานของสารสกัดบัวบกเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับยาต้านชัก

โครงการที่ 3 การประเมินฤทธิ์ต้านชัก และพิษเฉียบพลันของสารสกัดมาตรฐานบัวบก

โครงการที่4 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาทกรดอะมิโนในสมองหนูขาว

โครงการที่ 5 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อตัวรับที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นบนผนังเซลลีไข่กบ *(Xaenopus laevis)*

โครงการที่ 6 ความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดมาตรฐานบัวบก

โครงการที่ 7 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในหนูขาว

โครงการที่ 8 การพัฒนารูปแบบยาเตรียมที่เหมาะสมในการนำเอาสารสกัดมาตรฐานบัวบกไปใช้ทางคลินิก

5.3 รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว โดยให้แนบบทความผลงานความก้าวหน้าทางวิชาการของแผนงานวิจัยระหว่างดำเนินการ ที่พิมพ์ในวารสารทางวิชาการและเผยแพร่ในการประชุมวิชาการ คือ

5.3.1 Vattanajun A., Watanabe,H., Tantisira M.H. and Tantisira B. Isobolographically Additive Anticonvulsant Activity between Centella asiatica's Ethyl Acetate Fraction and Some Antiepilcptic Drugs. J Med Assoc Thai 2005; 88(Suppl 3): S131 – 40 (โครงการที่ 3)

5.3.2 Ausara Vattanajun, Mayuree H. Tantisira, Boonyong Tantisira and Hiroshi Watanabe:Effects of Centella Asiatica's Ethyl Acetate Fraction on Some Hippocampal Amino Acid Neurotransmitter Levels in Pentylenetetrazole Treated Freely Moving Rats . เวชสารแพทย์ทหารบก ปีที่ 59 ฉบับพิเศษ (1) พฤศจิกายน 2549 (โครงการที่ 4) (ได้รางวัลที่ 1 ในการประกวดผลงานวิจัยเป็นภาษาอังกฤษ (Oral presentation)ในการประชุม วิชาการพระมงกุฎเกล้าครั้งที่ 34 วันที่ 22-24 พฤศจิกายน 2549 ณ ห้องประชุมใหญ่ อาคารพระมงกุฎเกล้าเวชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า)

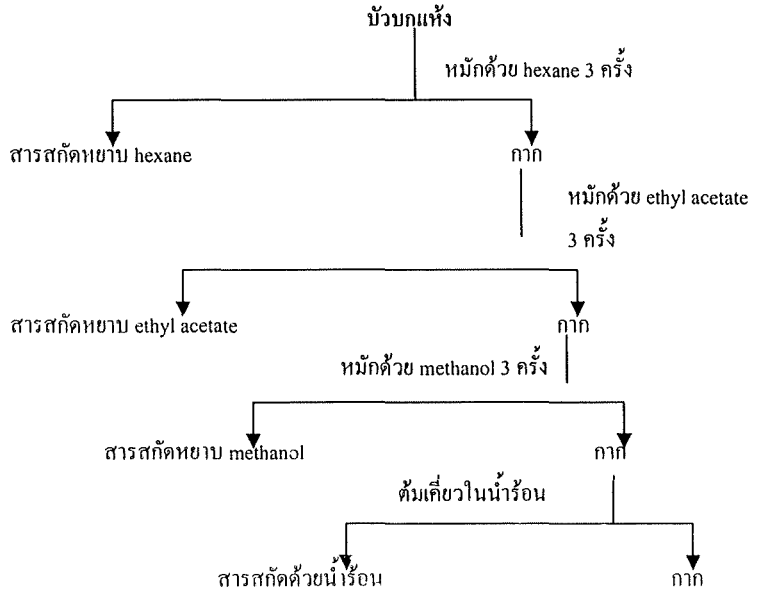
5.3.3 อนุสรา วัฒนจันทร์ มยุรี ตันติสิระ บุญยงค์ ตันติสิระ และ Hiroshi Watanabe ฤทธิ์กันชักและพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของสารสกัดบัวบก (*Centella asiatica*) ในหนูถีบจักร Oral Presentation ในการประชุมวิชาการประจำปีการแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน การแพทย์ทางเลือกแห่งชาติ ครั้งที่ 4 วันที่ 29-31 สิงหาคม 2550 ณ ห้องประชุมฟีนิกซ์ 1-6 ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพ็ค เมืองทองธานี(โครงการที่ 3)

5.3.4 Anusara Vattanajun Mayuree H. Tantisira Boonyong Tantisira and Hiroshi Watanabe. Anticonvulsant activity of *Centella asiatica*'s ethyl acetate fraction in animal model of epilepsy จะนำเสนอเป็น Poster presentation ในการประชุมวิชาการพระมงกุฎเกล้าครั้งที่ 35 พฤศจิกายน 2550(โครงการที่ 3)

5.4 ผลการดำเนินการโดยสรุปของโครงการย่อยทั้ง 8 โครงการมี ดังนี้

โครงการที่ 1 การสกัด การแยก และการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดสมุนไพรบัวบก

จากการเตรียมสารสกัดหยาบตามแผนภูมิข้างล่างนี้(รายงานฉบับสมบูรณ์ปีพ.ศ. 2547)



สารสกัดหยาบจากสมุนไพรบัวบกทั้ง 4 ชนิด คือ สารสกัดหยาบ hexane, สารสกัดหยาบ ethyl acetate, สารสกัดหยาบ methanol และสารสกัดด้วยน้ำร้อน ถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์ต้านชักในสัตว์ทดลองโดยโครงการวิจัยที่ 3 พบว่า สารสกัดหยาบ ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านชักได้ดีที่สุด

2. การสกัดแยกสารสำคัญที่บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบ ethyl acetate มาสกัดแยกสารสำคัญที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography โดยแยกสารสกัดปริมาณ 52 กรัมด้วย silica gel column (ปริมาณ silica gel 500 กรัม) ชะด้วยตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วย dichloromethane-methanol ในอัตราส่วน 18:1 เก็บ fraction ครั้งละ 100 มล. จำนวนทั้งหมด 98 fraction แล้วล้าง column ด้วย methanol เมื่อพิจารณา pattern ใน thin layer chromatography (TLC) ของแต่ละ fraction แล้ว สามารถรวม fraction ทั้งหมดเป็น fraction ใหญ่ ตามความคล้ายคลึงกันใน TLC ได้ 8 fraction ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Fraction ที่แยกได้จาก column chromatography ของสารสกัดหยาบ ethyl acetate จากสมุนไพรบัวบก

หมายเลข fraction	น้ำหนัก (กรัม)
1	5.7
2	7.7
3	5.8
4	2.8
5	1.7
6	1.9
7	1.5
8	13.6

ส่งสารสกัดทั้ง 8 fractionsไปทดสอบฤทธิ์ต้านชักในโครงการย่อยที่ 3 ซึ่งพบฤทธิ์ต้านชักอ่อนๆในทุก fraction ได้ทำการแยกซ้ำอีกหลายครั้งเพื่อให้ได้ปริมาณสารสกัดแต่ละ fraction เพียงพอสำหรับการทดสอบฤทธิ์ในขนาดที่สูงขึ้น แต่ผลการทดสอบ activity ก็ไม่แตกต่างจากเดิมแม้จะทำซ้ำๆอีกหลายครั้ง จึงได้ทดลองแยกสารสกัดด้วยวิธีใหม่ได้ fraction ทั้งหมด 5 fractions แล้วส่งไปทดสอบฤทธิ์ต้านชัก แล้วนำ fraction ที่มีฤทธิ์มาแยกต่อโดยทำการแยกสกัดร่วมกับการพิสูจน์เอกลักษณ์สารในโครงการย่อยที่ 2

โครงการที่ 2 การสร้างมาตรฐานของสารสกัดบัวบกเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับยาต้านชัก

ดำเนินการทดลองเพื่อแยกหาสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านชักในสารสกัดหยาบจาก ethyl acetate โดยการใช้ column chromatography ได้ fractionsที่ส่งตรวจสอบฤทธิ์ต้านชัก 4 fraction คือ A, B, C, D, E (ตารางที่ 1) และได้นำfraction C มาแยกต่อโดยดำเนินการร่วมกับโครงการย่อยที่ 1 และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัด

ตารางที่1 แสดงสัดส่วนตัวทำละลายและปริมาตรที่ใช้ในการแยกส่วนสารสกัด

Fraction	Weight (g.)	% methylene chloride	% ethyl acetate	volume of solvent (ml)	No of elution
02A01 (A)	2.301	100	0	250	4
		90	10	250	4
		80	20	250	4
02A02 (B)	1.989	70	30	250	4
		60	40	250	4
02A03 (C)	0.747	50	50	250	4
		40	60	250	4
		30	70	250	4
02A04 (D)	1.896	20	80	250	4
		10	90	250	4
		0	100	250	4
02A05(E)	2.418	Methanol 250 ml			3
02A06	0.175	Methanol 250 ml.			5
Total	7.526				

จากการแยกสารสกัด 02A03 (fraction c) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านชักในขนาด30 mg/kg ด้วย column chromatography ได้ fraction 03A01 – 03A04 ได้รับแจ้งว่าผลการทดสอบเบื้องต้นทางเภสัชวิทยาว่าส่วนดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านชักที่ขนาดความเข้มข้น 1 mg/kg และได้ตรวจสอบเอกลักษณ์ด้วย Infrared spectrophotometry, Thin layer chromatography, 1H-NMR และ 13C-NMR จากผลการทดลองที่ได้คาดว่าสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านชักในสมุนไพรบัวบกเป็น very long chain fatty acid (VLFA) ซึ่งคาดว่าเป็นสารผสมของ VLFA ที่ประกอบด้วยสายโซ่ยาวขนาดต่างๆกัน ซึ่งเป็น new finding ที่ไม่มีการรายงานมาก่อน แต่เนื่องจากปริมาณ

VLFA ในบัวบกมีอยู่น้อยมาก จึงได้ทำการสังเคราะห์สาร methyl ester ของ VLFA ที่ได้ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ส่วนผสมของ VLFA ด้วยวิธี GC-MS โดยได้ว่าจ้างให้ห้องปฏิบัติการของเอกชน วิเคราะห์หาส่วนผสมของ methyl ester VLFA ในขณะเดียวกันผู้วิจัยก็ได้พัฒนาวิธีแยกและวิเคราะห์fraction 03A02 ด้วย

โครงการที่ 3 การประเมินฤทธิ์ต้านชัก และพิษเฉียบพลันของสารสกัดมาตรฐานบัวบก

ผลจากการทดสอบฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์อันอาจเกิดจากสารสกัดบัวบก EACA พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีความปลอดภัยสูงมาก (ค่า LD 50 มากกว่า 5,000 มก/กก.) และไม่มีผลเปลี่ยนแปลงเวลาการนอนหลับจากการได้รับ pentobarbital (50 มก/กก) ที่ให้โดยการฉีดเข้าช่องท้องเปลี่ยนแปลงไปแต่อย่างใดซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดบัวบกไม่น่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งหรือใช้เอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในกระบวนการ เมแทบอลิซึม อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดบัวบกในขนาดที่มีฤทธิ์ต้านชัก (700 และ 1,000 มก/กก) มีผลกดการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักร (locomotor activity) อย่างมีนัยสำคัญ ดังจะเห็นได้จากผลรวมของ Horizontal counts ในเวลา 120 นาที ของ EACA ในขนาด 700 และ 1,000 มก/กกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มที่ได้รับ vehicle ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องหาวิธีสกัดแยกสารซึ่งมีฤทธิ์ต้านชักออกจากสารที่มีฤทธิ์กดการเคลื่อนไหวซึ่งโดยปกติแล้วก็คือฤทธิ์ที่ทำให้เกิด ataxia ในคน

นอกจากนั้นได้ทดสอบฤทธิ์ต้านชักของ subfractions ซึ่งแยกโดยนักวิจัยในโครงการย่อยที่ 1 และ 2 อีก 17 subfractions โดยให้สารทดสอบในขนาด 10,30,100 และ 300 มก/กกโดยการป้อนทางปาก จากข้อมูลที่ได้พบว่าสารสกัดบาง subfractions แสดงฤทธิ์ต้านการชักใน PTZ mode ได้ แต่ไม่พบว่ามี Subfraction ใดที่แสดงฤทธิ์ต้านชักที่มีลักษณะของการแปรตามขนาดหรือมีความแรงกว่า Subfraction อื่นๆอย่างชัดเจน จนสามารถนำมากำหนดเป็น marker ของสารสกัดมาตรฐานได้ และมีข้อที่น่าสังเกตุว่าในสัตว์ทดลองที่สารสกัดบัวบกไม่สามารถป้องกันการชักได้นั้น หลายตัวจะชักจนตายไปหรือมีอาการชักรุนแรงกว่าการได้รับสาร pentylenetetrazole ซึ่งใช้เหนี่ยวนำการชักเพียงชนิดเดียว จึงได้ทำการทดลองซ้ำ ปรับเปลี่ยนpretreatment time รวมทั้งทดลองให้สารสกัดติดต่อกัน 5 วัน ก็ยังไม่สามารถจะชี้ชัดได้ว่า fraction ใด มีฤทธิ์ต้านชักที่ดี คือ มีการออกฤทธิ์ที่แปรตามขนาดการใช้ และdose range ของการออกฤทธิ์ต้านชักอยู่ห่างจากขนาดที่อาจทำให้เกิดพิษ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านชักของสารสกัดบัวบกน่าจะอยู่ใกล้กันมากกับขนาดที่ทำให้เกิดพิษรวมทั้งมีฤทธิ์เป็น proconvulsant ซึ่งทำให้สัตว์ทดลองที่สารสกัดไม่สามารถป้องกันการชักจาก

pentylentetrazol ได้มีอาการชักที่รุนแรงกว่าที่เกิดจาก pentylentetrazol แต่เพียงอย่างเดียวและทำให้ตายในที่สุด

โครงการที่4 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาทกรดอะมิโนในสมองหนูขาว

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสื่อประสาททั้ง 4 ชนิด (glutamate,aspartate, glycine และ GABA) จาก microdialysis probe ที่ฝังไว้ที่สมองส่วน hippocampus ด้วย HPLC พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับ vehicle + PTZ จะมีอาการชักเกิดขึ้นทุกตัวและมีระดับของ aspartate สูงกว่าหนูกลุ่มปกติ อย่างมีนัยสำคัญ การได้รับสารสกัดบัวบก (EACA 700 มก/กก) ก่อนจะได้รับ PTZ จะช่วยป้องกันการชักจาก PTZ ในหนูขาว 5 ตัวแต่ไม่สามารถป้องกันได้ในหนูขาว 2 ตัว

ในหนูกลุ่มที่ EACA สามารถ protect ฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้ชักจาก PTZ (ไม่แสดงการชัก)ได้นั้น ระดับของ excitatory amino acid transmitters สองชนิด คือ glutamate (ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างจากกลุ่ม vehicleเมื่อได้รับ PTZ) และ aspartate (เพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่ม vehicleเมื่อได้รับ PTZ) จะลดลง ในขณะที่ inhibitory amino acid neurotransmitter (glycine และ GABA) จะเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ PTZ ถึงแม้การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่การเปลี่ยนแปลงโดยรวมของสารสื่อประสาทชนิดกรดอมิโนทั้ง 4 ชนิดจะเป็นกลไกอย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการปกป้องการชักจาก PTZ ในหนูทั้ง 5 ตัวนี้ และจะพบการเปลี่ยนแปลงของ glutamateในลักษณะเดียวกันนี้ ในหนูอีก 2 ตัวที่ EACA ไม่สามารถปกป้องฤทธิ์เหนี่ยวนำการชักจาก PTZ ได้ แต่สิ่งที่แตกต่างคือระดับ aspartate ในหนูกลุ่มนี้จะไม่ลดลงแต่กลับจะเพิ่มขึ้น และไม่พบการเพิ่มขึ้นของ inhibitory neurotransmitters ทั้ง glycine และ GABA แต่อย่างใด เช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงในหนูกลุ่มที่ EACA สามารถป้องกันการชักได้ อาจอธิบายได้ว่าฤทธิ์ต้านชักของสารสกัดบัวบก (EACA)ที่พบใน whole animal modelน่าจะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของสารสื่อประสาทที่มีฤทธิ์ตรงข้ามกันมากกว่าการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทเพียงตัวใดตัวหนึ่ง

ผลการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทซึ่งพบว่าสารสกัดบัวบกมีฤทธิ์ต่อทั้ง excitatory และ inhibitory amino acid neurotransmitter ในสมองหนูขาวสอดคล้องกับผลทั้งที่เป็น anticonvulsant และ proconvulsant ของสารสกัดบัวบกที่พบในหนูถีบจักร

โครงการที่ 5 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อตัวรับที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นบนผนังเซลล์ไข่กบ *(Xaenopus laevis)*

ผลของสารสกัดบัวบก (EACA)ต่อตัวรับ GABA

เนื่องจากถูกตัดงบประมาณในหมวดครุภัณฑ์และกำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินการจัดซื้อครุภัณฑ์ด้วยงบประมาณอื่น จึงได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดบัวบกต่อตัวรับ GABA โดยเทคนิก patch clampแทน โดย บันทึกการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าที่เกิดขึ้นบน เซลล์สมองส่วน hippocampus ของหนูขาวซึ่งก็พบว่าสารสกัดบัวบก (EACA) ในขนาด 10, 30 and 50 µg/ml แต่เพียงอย่างเดียว ไม่มีผลทำให้ hippocampal membrane current เกิดการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด แต่ถ้าให้ร่วมกับ GABA (3 µM) พบว่า สารสกัดบัวบกในขนาด 0.1 – 3 µg/ml จะเสริมฤทธิ์กับ GABA current โดยมี maximal.potentiation ที่ 3 µg/ml ในขณะที่ สารสกัดบัวบกในขนาดที่สูงขึ้น (EACA 10, 30 and 50 µg/ml) จะยับยั้งการเกิด GABA current ในลักษณะที่แปรตามความเข้มข้น โดยแสดงการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก= 50 µg/ml การเสริมฤทธิ์กับ GABA เป็นกลไกที่อาจใช้อธิบายฤทธิ์ anticonvulsant ในขณะที่การต้านฤทธิ์ GABA ก็อาจเป็นกลไกหนึ่งของการมีฤทธิ์เป็น proconvulsant ของสารสกัดบัวบกได้

ผลการทดลองโดยเทคนิก electrophysiology สอดคล้องกับผลที่พบในหนูถีบจักร(โครงการที่ 3)และผลต่อสารสื่อประสาทสารสื่อประสาทกรดอะมิโนในสมองหนูขาวสมองหนูขาว ซึ่งก็คือสารสกัดบัวบกมีฤทธิ์เป็นได้ทั้ง anticonvulsant และ proconvulsant

โครงการที่ 6 ความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดมาตรฐานบัวบก

กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีความพร้อมที่จะดำเนินการทดสอบความเป็นพิษระยะยาวได้เมื่อมีสารมาตรฐาน

โครงการที่ 7 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในหนูขาว

ได้จัดซื้อสารเคมีและทดลองวิธีการประเมินการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 โดยได้ทดสอบความเที่ยงของการใช้ Ethoxyresorufin O-dealkylation (EROD), Meththoxyresorufin O-dealkylation (MROD), Benzyloxyresorufin O-dealkylation (BROD), Aniline 4-hydroxylation และ Erythromycin N-demethylation ซึ่งจะใช้ในการตรวจสอบสมรรถนะของCYP 1A1, CYP1A2, CYP 2B1/2B2, CYP 2E1 และ CYP 3A แล้ว พบว่ามีความเป็น linearity สามารถใช้วัดสมรรถนะของเอนไซม์ Cytochrome P 450 ของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก

โครงการที่ 8 การพัฒนารูปแบบยาเตรียมที่เหมาะสมในการนำเอาสารสกัดมาตรฐานบัวบกไปใช้ทางคลินิก

ได้พัฒนาสูตรยาเม็ดสำหรับสารสกัดบัวบกและทดลองเตรียมเป็นยาเม็ดและตรวจสอบคุณสมบัติตามที่ต้องการเรียบร้อยแล้ว พร้อมที่จะผลิตยาเม็ดสำหรับสารสกัดมาตรฐานบัวบกที่จะใช้ในการทดสอบในผู้ป่วยลมชักในปีที่ 3

5.5 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มดำเนินการเป็นเงินทั้งสิ้น 3,265, 350บาท

5.6 งานตามแผนงานโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ทุกขั้นตอนตามที่เสนอในโครงการ

5.7 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา และหรืออุปสรรค (ถ้ามี)

5.7.1 ถึงแม้จะพบว่าสารสกัดบัวบกที่มีฤทธิ์ต้านชักจะมีความปลอดภัยในการใช้สูง (ในขนาดที่สูงถึง 5,000 มก/กก ไม่พบว่าทำให้สัตว์ทดลองตาย) แต่จากผลการทดลองที่พบว่าสารสกัดบัวบกที่มีฤทธิ์ต้านชักมีฤทธิ์กดการเคลื่อนไหวในหนูถีบจักรอย่างชัดเจน (ผลการทดลองในข้อ 5.2.1) และมีฤทธิ์ทำให้เกิดความบกพร่องของ motor co-ordination (รายงานฉบับสมบูรณ์ของปี งบประมาณ 2548) อาจเป็นปัญหาในการนำเอาสารสกัดมาใช้ในคนหากสารที่แสดงฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ดังกล่าวเป็นสารเดียวกันกับสารซึ่งออกฤทธิ์ต้านชัก ดังนั้นจึงต้องพยายามแยก fractions ของสารสกัดดังกล่าวหลายๆวิธีเพื่อแยกฤทธิ์ต้านชักออกจากฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์อื่นๆ

5.7.2 จากการทดสอบฤทธิ์ต้านชักของ subfractions ซึ่งแยกมาโดยวิธีต่างๆ 17 fractions ยังไม่มีความชัดเจนว่า fractions ใดน่าจะเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านชักที่มี profile ของการ ออกฤทธิ์ที่สัมพันธ์กับขนาดที่ใช้ สามารถนำมากำหนดเป็น marker ของสารสกัดมาตรฐาน และเมื่อทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนแปลงเวลาการให้สารทดสอบ ให้สารทดสอบล่วงหน้าหลายๆครั้งก่อนจะนำมาเหนี่ยวนำให้ชักโดยการฉีด pentylentetrazol ก็ไม่สามารถจะบอกได้ชัดเจนว่าควรจะกำหนดให้สารใดเป็น Biomarker

5.7.3 จากการทดสอบในโครงการที่3,4 และ 5 ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันว่าสารสกัด

บัวบกที่มิฤทธิ์ต้านชักมีฤทธิ์เป็น proconvulsant ด้วย ซึ่งอาจอธิบายฤทธิ์ต้านชักได้โดยการเสริมฤทธิ์กับ GABA ซึ่งเป็น inhibitory neurotransmitter และอธิบายฤทธิ์ proconvulsant ได้ด้วยการเพิ่ม aspartate ซึ่งเป็น excitatory neurotransmitter และที่สำคัญคือ ไม่สามารถกำหนดได้ว่ามีปัจจัยใดที่จะทำให้การออกฤทธิ์เป็น anticonvulsant หรือ proconvulsant

5.7.4 จากการแยกสกัด ตรวจสอบเอกลักษณ์ ร่วมกับการทดสอบฤทธิ์ต้านชักในโครงการย่อยที่ 1,2 และ 3 โดยวิธี activity-guided isolation พบว่าสารสำคัญตัวหนึ่งที่มีฤทธิ์ต้านชักที่ potentเป็น very long chain fatty acid (VLFA) ซึ่งไม่มีผู้รายงานมาก่อน แต่ก็พบในปริมาณที่น้อยมาก จนต้องแก้ปัญหาโดยการไปแยกสกัด VLFAจากเปลือกอ้อยเพื่อให้ได้ปริมาณสารที่เพียงพอสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านชัก ซึ่งก็พบว่าฤทธิ์ต้านชักของสารสกัดไม่มี ลักษณะของ dose dependent เช่นกัน

ข้อสรุป

จากการทดสอบที่ทำมาอย่างเป็นขั้นตอนเพื่อนำไปสู่การ identify ส่วนประกอบหลักที่มีฤทธิ์ต้านชัก ที่ชัดเจนแน่นอน เพื่อนำไปกำหนดมาตรฐานของสารสกัดบัวบกซึ่งจะต้องนำไปทดสอบฤทธิ์และ และพิษ (โครงการย่อยที่ 6,7)รวมทั้งหาวิธีสกัดเพื่อให้ได้ yield ของสารตามมาตรฐานดังกล่าวสูง สามารถนำไปเตรียม เป็นยาเตรียม (โครงการย่อยที่ 8) เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการเสริมฤทธิ์ยากันชักในคน (โครงการย่อยที่ 9) หากพิสูจน์ได้ว่ามีความปลอดภัยเพียงพอ จากข้อมูลที่ได้จากการดำเนินการในปีที่1 และระยะแรกของปีที่ 2 แสดงว่าอาจมีความเป็นไปได้ที่ฤทธิ์ต้านชักในสารสกัดบัวบกเป็นผลจากสารบริสุทธิ์หลายๆชนิดที่มีความแรงไม่แตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถกำหนดปริมาณสารหลักที่ออกฤทธิ์ได้ และ/หรือสารเหล่านั้นอาจมีบางชนิดที่ ออกฤทธิ์ตรงข้ามกัน ในอีกประเด็นหนึ่งที่สำคัญมากสำหรับการพัฒนาสารไปใช้ในคน ก็คือฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์และความปลอดภัยเนื่องจากพบว่าการชักในหนูถีบจักรที่สารทดสอบไม่ สามารถป้องกันการชักจาก Pentylenetetrazole ได้นั้นจะชักอย่างรุนแรงจนถึงตายได้ ดังนั้น คณะผู้วิจัยจะต้องหาวิธีสกัดแยกสารสกัดบัวบกด้วยวิธีอื่นๆจนกว่าจะสามารถกำหนดและสร้างสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านชักสูงโดยไม่มีฤทธิ์เป็น proconvulsant หรือกด motor co-ordinationm ก่อนจะนำไปทดสอบต่อในคน

ในเวลาต่อมา คณะผู้วิจัยในโครงการที่ 1-3 จึงได้พยายามทำ activity guided isolation โดยวิธีการต่างๆมากมายหลายวิธี เพื่อให้สามารถแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านชักที่ชัดเจน คือมีฤทธิ์ต้านชักที่เป็น dose dependent และไม่มีฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ คือไม่ทำให้เกิด ataxia หรือมีฤทธิ์เป็น proconvulsant

พร้อมๆกับที่ผู้วิจัยในโครงการที่4 และ 5 ก็ได้ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์เพื่อนำมาเป็นข้อมูลประกอบอันสำหรับการแยกหรือกำหนดมาตรฐานของสารสกัดที่จะนำมาใช้เป็นยาเสริมยากันชักในผู้ป่วยลมชัก ซึ่งผลการทดลองทั้งหมดเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ สารสกัดบัวบกใน fraction ต่างๆรวมทั้งที่แยกออกมาเกือบเป็นสารบริสุทธิ์แล้วมีการออกฤทธิ์ที่เป็น biphasic คือเป็นได้ทั้ง anticonvulsant(ต้านการชัก) และ proconvulsant (ส่งเสริมให้ชัก) โดยไม่สามารถจะบอกได้ว่า ปัจจัยใดจะทำให้สารสกัดบัวบกมีฤทธิ์ต้านหรือเสริมการชัก ซึ่งอาจเป็นปัญหาหากนำไปใช้ในผู้ป่วยลมชักซึ่ง prone ต่อการถูกกระตุ้นอยู่แล้ว ประกอบกับการที่สารออกฤทธิ์ต้านชักในบัวบกถึงแม้จะมีอยู่หลายชนิด แต่ก็ไม่ชนิดใดที่มีคุณสมบัติในด้านการออกฤทธิ์และความปลอดภัยที่ดีพอที่จะนำมากำหนดเป็น biomarker ได้ แม้แต่ สารVLFA ซึ่งเป็น new finding ว่าเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านชักตัวหนึ่งในบัวบกนั้น ก็มีอยู่ในปริมาณน้อยมากๆ ไม่สามารถจะนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเพื่อใช้ในผู้ป่วยได้ ดังนั้นจึงควรพิจารณาปรับโครงการให้เป็นโครงการวิจัยเพื่อองค์ความรู้ใหม่ นำการค้นพบที่ได้เสนอเป็นบทความวิจัยหรือในการประชุมวิชาการเพื่อเผยแพร่ต่อไป (ตามหัวข้อ 5.3)

ดังนั้นถึงแม้ว่าการทดลองในโครงการที่6,7 และ 8ซึ่งเป็นโครงการที่เตรียมขึ้นมาเพื่อรองรับการศึกษาความปลอดภัย และสำหรับการเตรียมยาเม็ดเพื่อใช้ในการทดลองทางคลินิกในโครงการที่ 9จะได้ดำเนินการไปแล้วในด้าน methodology แต่เนื่องจากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นโดยชัดเจนว่าว่า ไม่เป็นการเหมาะสมที่จะพัฒนาสารสกัดจากบัวบกเพื่อนำไปใช้เป็นยาเสริมในผู้ป่วยลมชัก ด้วยเหตุผลที่สำคัญคือ อาจทำให้เกิดการชักได้ในผู้ป่วยบางคน ถึงแม้ว่าโดย isobologram analysis จะแสดงว่าสารสกัดบัวบกสามารถเสริมฤทธิ์กับยากันชัก Gabapentin แต่ไม่ใช่ valproate หรือ phenytoin

(ลายเซ็น)

(รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติสิระ)
ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย
วันที่ 29 เดือน สิงหาคม .พ.ศ. 2550

แบบรายงานความก้าวหน้าของโครงการวิจัย (Project)

1. ชื่อโครงการวิจัย (โครงการย่อยที่1)

   (ภาษาไทย) การสกัด การแยก และการพิสูจน์ของสารสกัดสมุนไพรบัวบก

   (ภาษาอังกฤษ) Extraction, isolation and identification of bioactive constituents from *Centella asiatica*

2. รายนามคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

(1) รศ.ดร. รุทธ์ สุทธิศรี

ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-218-8353 โทรสาร 02-254-5195

E-mail: srutt@chula.ac.th

(2) รศ.ดร. เอกรินทร์ สายฟ้า

ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-218-8353 โทรสาร 02-254-5195

E-mail: sekarin@hotmail.com

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณของหน่วยงานประจำปี 2549

   จำนวนเงิน 325,600 บาท

4. เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน ปี) ตุลาคม 2548 ถึง (เดือน ปี) มีนาคม 2549

5. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

   5.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (โดยสรุป)

   - เพื่อเตรียมสารสกัดสมุนไพรบัวบกสำหรับนำไปประเมินฤทธิ์ต้านชัก และพัฒนาเป็นรูปแบบยาเตรียมเพื่อใช้ทางคลินิก
   - เพื่อศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์ต้านชักซึ่งมีอยู่ในสมุนไพรบัวบก

5.2 การดำเนินงานวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการวิจัยกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

ขั้นตอนการวิจัย	เดือนที่								
	2	4	6	8	10	12	14	16	18
1. การเตรียมสารสกัดเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านชัก	←····→	←····→	←····→						
	←——→	←——→	←——→						
2. การสกัดแยกสารสำคัญที่บริสุทธิ์			←····→	←····→	←····→	←····→	←····→	←····→	←····→
			←——→	←——→	←——→	←——→	←——→	←——→	←——→
3. การพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ					←····→	←····→	←····→	←····→	
4. รายงานความก้าวหน้าและสรุปผลงาน			←····→			←····→			←····→
			←——→			←——→			←——→

หมายเหตุ ←····→ งาน/กิจกรรมที่เสนอไว้ในโครงการ

←——→ งาน/กิจกรรมที่ได้ดำเนินการ

5.3 รายละเอียดเพิ่มเติมของการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว โดยให้แนบบทความเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าทางวิชาการของโครงการวิจัยระหว่างดำเนินการ ที่เคยพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้ว หรือบทความที่จะนำเผยแพร่ทางสื่อมวลชนได้ (ถ้ามี)

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

สมุนไพรบัวบกทั้งต้นถูกนำมาผึ่งให้แห้งบนพื้นราบประมาณ 3-4 วันก่อนที่จะนำไปอบในตู้อบสมุนไพรที่ตั้งอุณหภูมิไว้ไม่เกิน 50°C จนแห้งสนิทดี เมื่ออบแห้งแล้วน้ำหนักแห้งของบัวบกจะเหลืออยู่ประมาณ 1 ใน 10 ของน้ำหนักพืชสด สมุนไพรบัวบกที่แห้งแล้วถูกนำไปบดละเอียด แล้วจึงนำไปบรรจุลงในถุงผ้าขาวบาง ถุงละประมาณ 5 กิโลกรัม ใส่ลงในถังหมัก

ทำการแช่สกัดสมุนไพรบัวบกด้วยวิธี sequential maceration โดยเลือกใช้ตัวทำละลายที่มีระดับความเป็นขั้ว (polarity) เรียงลำดับจากน้อยไปมาก เริ่มจาก hexane ในปริมาณที่สามารถแช่สมุนไพรทั้งหมดได้จนท่วม หมักด้วยตัวทำละลายดังกล่าวไว้ครั้งละ 3 วัน ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง สารละลายที่ได้จากการแช่หมักจะถูกนำไประเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 45°C ได้เป็นสารสกัดหยาบ hexane (hexane extract)

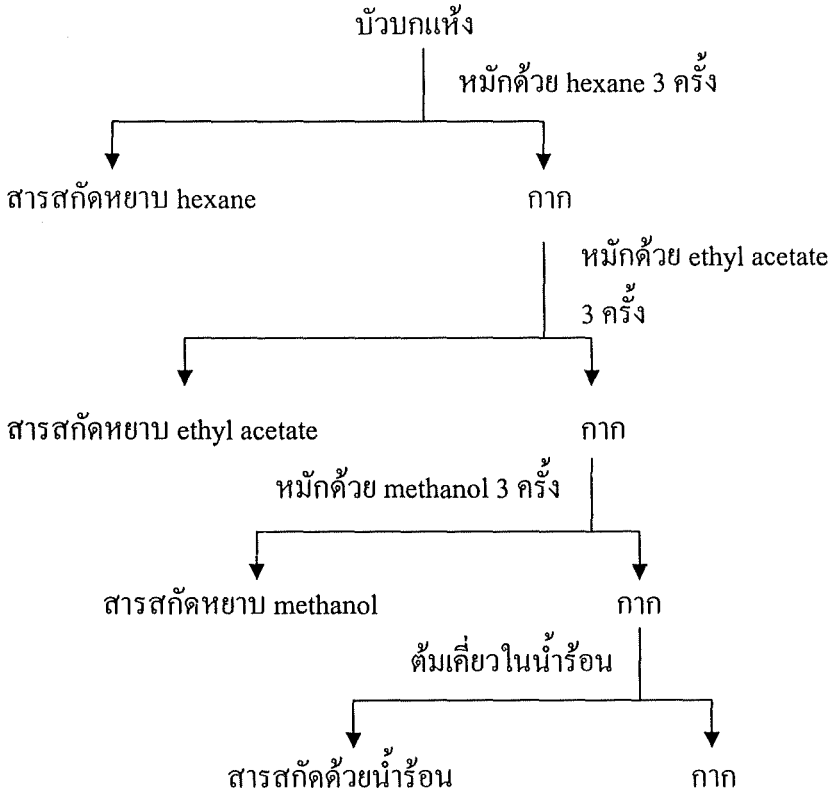
กากของบัวบกที่ผ่านการแช่หมักด้วย hexane มาแล้วถูกนำมาผึ่งให้แห้ง ก่อนที่จะแช่หมักด้วยตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งมีระดับความเป็นขั้วสูงขึ้น คือ ethyl acetate หมัก

ครั้งละ 3 วัน 3 ครั้ง สารละลายที่ได้นำไประเหยแห้งภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 45°C ได้เป็นสารสกัดหยาบ ethyl acetate (ethyl acetate extract)

ขั้นต่อไปคือการเตรียมสารสกัดหยาบ methanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูงขึ้นอีก โดยดำเนินการเช่นเดียวกับใน 2 ขั้นตอนก่อนหน้า แต่เปลี่ยนตัวทำละลาย

กากสมุนไพรบัวบกที่เหลืออยู่ หลังจากนำมาผึ่งให้ตัวทำละลาย methanol ระเหยออกไปหมดแล้ว ถูกนำมาต้มเดี่ยวในน้ำเดือดเป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วจึงกรอง นำสารสกัดด้วยน้ำร้อนที่ได้ไประเหยแห้ง เป็นสารสกัดด้วยน้ำร้อน (water extract)

ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดหยาบสามารถสรุปเป็นแผนภาพได้ดังนี้



สารสกัดหยาบจากสมุนไพรบัวบกทั้ง 4 ชนิด คือ สารสกัดหยาบ hexane, สารสกัดหยาบ ethyl acetate, สารสกัดหยาบ methanol และสารสกัดด้วยน้ำร้อน ถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์ต้านชักในสัตว์ทดลองโดยโครงการวิจัยที่ 3 พบว่า สารสกัดหยาบ ethyl acetate มีฤทธิ์ต้านชักได้ดีที่สุด

2. การสกัดแยกสารสำคัญที่บริสุทธิ์

นำสารสกัดหยาบ ethyl acetate มาสกัดแยกสารสำคัญที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography โดยแยกสารสกัดปริมาณ 52 กรัมด้วย silica gel column (ปริมาณ silica

gel 500 กรัม) ชะด้วยตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วย dichloromethane-methanol ในอัตราส่วน 18:1 เก็บ fraction ครั้งละ 100 มล. จำนวนทั้งหมด 98 fraction แล้วล้าง column ด้วย methanol เมื่อพิจารณา pattern ใน thin layer chromatography (TLC) ของแต่ละ fraction แล้ว สามารถรวม fraction ทั้งหมดเป็น fraction ใหญ่ ตามความคล้ายคลึงกันใน TLC ได้ 8 fraction ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Fraction ที่แยกได้จาก column chromatography ของสารสกัดหยาบ ethyl acetate จากสมุนไพรบัวบก

หมายเลข fraction	น้ำหนัก (กรัม)
1	5.7
2	7.7
3	5.8
4	2.8
5	1.7
6	1.9
7	1.5
8	13.6

Fraction เหล่านี้จะได้ถูกส่งไปทดสอบฤทธิ์ต้านชักในสัตว์ทดลองต่อไป ก่อนที่จะทำการเลือกเอา fraction ที่มีฤทธิ์น่าสนใจมาสกัดเพื่อหาสารออกฤทธิ์ เพื่อให้เป็นกระบวนการแบบ bioactivity-guided fractionation

นอกจากนี้ ยังได้ทดลองนำสารสกัดหยาบ ethyl acetate อีกส่วนหนึ่งมาแยกด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ตัวทำละลาย dichloromethane เป็นตัวชะ แล้วรวม fraction ที่รับได้ตาม pattern ใน TLC ได้เป็นทั้งหมด 5 fraction ใหญ่ๆ (fraction A-E) ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านชักในสัตว์ทดลอง พบว่า fraction C มีฤทธิ์ดีที่สุด จึงได้นำ fraction นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น โดยแยกผ่าน silica gel column อีกครั้งหนึ่ง โดยครั้งนี้ใช้ hexane เป็นตัวทำละลายสำหรับชะ เมื่อตรวจสอบ pattern ขององค์ประกอบใน fraction ย่อยๆ ที่รวบรวมจากการผ่าน column นี้แล้วด้วย TLC พบว่า สามารถรวมได้เป็น 4 fraction ใหญ่ๆ คือ fraction C1-C4 ซึ่งจะได้นำไปทดลองฤทธิ์ต้านชักในสัตว์ทดลองต่อไป

เมื่อนำ TLC pattern ของ column ที่แยกโดยใช้ dichloromethane-methanol (18:1) เป็นตัวชะ ซึ่งสามารถรวม fraction ที่แยกออกมาได้เป็น fraction ใหญ่ 8 fraction (fraction 1-8) มาเปรียบเทียบกับ 5 fraction ใหญ่ที่แยกได้โดย column ที่ใช้ dichloromethane เพียงอย่างเดียวเป็นตัวชะ (fraction A-E) พบว่า fraction ที่มีฤทธิ์ของ column แรก คือ fraction 2-7 มี TLC pattern ในลักษณะที่สอดคล้องกับ fraction B-D ซึ่งเป็น fraction ที่มีฤทธิ์ของ column ที่สอง

แต่ทั้งนี้ เนื่องจากปริมาณ fraction C1-C4 มีปริมาณค่อนข้างน้อย ทางผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่า ขณะนี้ควรมุ่งนำ fraction ที่มีปริมาณมากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง fraction 2-7 มาทำการแยกให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น ด้วยกระบวนการ bioactivity-guided fractionation ซึ่งจะได้ทำการทดลองในสัตว์เพื่อยืนยันฤทธิ์อีกครั้งหนึ่งต่อไปโดยอาศัยข้อมูลจากโครงการย่อยที่ 2 มาประกอบ

5.4 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มดำเนินการ (ต.ค. 48 – มี.ค. 49) เป็นเงินทั้งสิ้น จำนวนเงิน 325,600 บาท

5.5 งานตามแผนงานโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

(1) ทำการสกัดสารสำคัญบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านชัก และทำการพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารดังกล่าว

(2) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีหลักในสารสกัดสมุนไพรบัวบกส่วนที่มีฤทธิ์ เพื่อใช้เป็น marker ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัด

(3) ประสานงานกับโครงการอื่นๆ เพื่อผลิตสารสกัดบัวบกให้ได้คุณลักษณะตามที่ต้องการ เพื่อใช้ในการตั้งตำรับยาเตรียมจากสมุนไพรบัวบกสำหรับทดลองทางคลินิก

5.5 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหาและหรืออุปสรรค (ถ้ามี)

ปริมาณสารที่แยกได้มีค่อนข้างน้อยและไม่สามารถแยกได้ชัดเจนว่าสารที่มีฤทธิ์อยู่ใน fraction ใด

(ลายเซ็น) รุทธ์ สุทธิศรี

(รศ.ดร. รุทธ์ สุทธิศรี)
หัวหน้าโครงการวิจัย
วันที่ 29 สิงหาคม 2550

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ แบบ ต-1ด

แบบรายงานความก้าวหน้าของโครงงานวิจัย (Research Project)

.....

1. ชื่อโครงงานวิจัย (โครงการย่อยที่ 2)

(ภาษาไทย) **การสร้างมาตรฐานของสารสกัดบัวบกเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับยาต้านชัก**

(ภาษาอังกฤษ) Standardization of *Centella asiatica* Extracts used as raw material for antiepileptic drugs

2. รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และEmail

2.1 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชำนาญ ภัตรพานิช

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์...022188416..... โทรสาร.....

e-mail ...pchamnan@chula.ac.th.....

2.2 รองศาสตราจารย์ สุวรรณา เหลืองชลธาร

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ ...02-2188316..... โทรสาร.....

e-mail .....

2.3 อาจารย์ ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ ...022188314..... โทรสาร.....

e-mail ...rpornchai@chula.ac.th.....

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2549 จำนวน 651,200 บาท

4. เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2548 ถึง สิงหาคม 2550

5. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

5.1 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย (โดยสรุป)

5.1.1 พัฒนาวิธีวิเคราะห์หารปริมาณสาระสำคัญในสารสกัดบัวบก

5.1.2 พัฒนาวิธีที่ได้ให้เป็น stability indicating assay (SIA)

5.1.3 Validate วิธีวิเคราะห์ที่ได้ทำการพัฒนาขึ้น

5.1.4 ศึกษาความคงตัว (stability) ของสารสกัดบัวบก

5.2 การดำเนินการวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการวิจัยเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

5.2.1 การแยกส่วนชั้น ethyl acetate ด้วย ตัวทำละลายที่มีpolarity ต่าง

โดยได้ทำการแยก crude ethyl acetate extract ปริมาณ 10 g. ด้าย column chromatography (silica gel 355 g. diameter column 13 cm. column height 5.5 cm.) และทำการ elute column ด้วย ตัวทำละลายสัดส่วนต่างๆ ในปริมาตรที่กำหนด ดังแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่1 แสดงสัดส่วนตัวทำละลายและปริมาตรที่ใช้ในการแยกส่วนสารสกัด

Fraction	Weight (g.)	% methylene chloride	% ethyl acetate	volume of solvent (ml)	No of elution
02A01	2.301	100	0	250	4
		90	10	250	4
		80	20	250	4
02A02	1.989	70	30	250	4
		60	40	250	4
02A03	0.747	50	50	250	4
		40	60	250	4
		30	70	250	4
02A04	1.896	20	80	250	4
		10	90	250	4
		0	100	250	4
02A05	2.418	Methanol 250 ml			3
02A06	0.175	Methanol 250 ml.			5
Total	7.526				

5.2.2 characterization of the extracted fractions

5.2.2.1 Thin Layer Chromatography

Mobile phase: 100% ethyl acetate

Detection: spray with 20% sulfuric acid in methanol

รูปที่ 1 แสดง TLC chromatogram ของ fraction ต่างๆที่แยกได้

5.2.3 ได้ส่งสารตัวอย่างจาก fraction 02A01 - 02A06 เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเพื่อหาส่วนที่มีฤทธิ์ต้านซัก

ได้รับแจ้ง (เมื่อ วันที่ 10 ธันวาคม 2548) ถึงผลการทดสอบเบื้องต้นทางเภสัชวิทยาว่า **ส่วนที่มีฤทธิ์ต้านซักคือ** 02A03 **ที่ขนาดความเข้มข้น** 30 mg/kg ดังแสดงใน scheme 1

5.2.4 ได้ทำการสกัดด้วยวิธีที่ง่ายขึ้น โดยแยกสารสกัดเป็น 2 ส่วน คือ hexane (02B01) และ hexane (02B02) เมื่อส่งสารสกัดทั้ง 2 ส่วนไปทดสอบฤทธิ์ต้านซัก กลับพบว่าสารสกัดทั้ง 2 ส่วนมีฤทธิ์

5.2.5 ได้ทำการแยกส่วน 02A03 ด้วยเทคนิค column chromatography โดย elute ด้วย hexane : ethylacetate สัดส่วนต่าง ได้ fraction 03A01 – 03A04

5.2.6 ได้ส่งสารตัวอย่างจาก fraction 03A02 เพื่อทำการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เพื่อหาส่วนที่มีฤทธิ์ต้านซัก และได้รับแจ้งว่าผลการทดสอบเบื้องต้นทางเภสัชวิทยาว่าส่วนดังกล่าว**มีฤทธิ์ต้านซักที่ขนาดความเข็มข้น** 1 mg/kg ดังแสดงใน scheme 2

5.2.7 ได้ศึกษา Infrared spectrum ของ fraction 03A02 ดังแสดงในรูป 2 spectrumที่ได้แสดงว่า ส่วนผสมใน fraction 03A02 เป็น ester ของ hydrocarbon ที่มี hydroxyl คาดว่าเป็น terpene glycoside

5.2.8 ได้ศึกษา 1H-NMR และ 13C-NMR ของ fraction 03A02 ดังแสดงในรูป 3 และ 4 spectra ที่ได้แสดงว่าของผสมใน fraction 03A02 ให้สัญญาณของ aliphatic proton และ proton ที่ต่อกับ hydroxyl

5.2.9 ได้ทำการศึกษาแยก fraction 03A02 ให้ได้สารบริสุทธ์มากขึ้น จนสามารถเห็น spot ใน TLC เพียงจุดเดียว และนำสารที่ได้ไปศึกษา spectroscopic method เช่น IR (รูป 7) 1H-NMR (รูป 8), 13C-NMR (รูป 9), DEPT (รูป 10), HH-Cosy (รูป 11), HMQC (รูป 12) จากข้อมูลทาง spectroscopy สามารถสรุปได้ว่า **สารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านซักในสมุนไพรบัวบก เป็น** very long chain fatty acid (VLFA) **ซึ่งคาดว่าเป็นสารผสมของ** VLFA **ที่ประกอบด้วยสายโซ่ยาวขนาดต่างๆกัน**

5.2.10 ได้ทำการสังเคราะห์สาร methyl ester ของ VLFA ที่ได้ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ส่วนผสมของ VLFA ด้วยวิธี GC-MS โดยได้ว่าจ้างให้ห้องปฏิบัติการของเอกชน วิเคราะห์หาส่วนผสมของ methyl ester VLFA (อยู่ระหว่างรอผลวิเคราะห์)

5.2.11 ได้ทำการแยกสารสกัดส่วน 02A03 ด้วย high performance liquid chromatography โดยใช้ condition ต่างๆดังต่อไปนี้

Column ที่นำมาทดสอบ

1. C18 สั้น : Alltima C18 5u Dim.(mm.) 150 x 4.6
2. C18 ยาว : Thermo Hypersil-Keystone 5u Dim.(mm.) 250 x 4.6
3. Phenyl ยาว : Water micro Bondapak Dim.(mm.) 300 x 3.9
4. Phenyl สั้น : Prevail Phenyl 5u Dim.(mm.) 150 x 4.6

ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่า column C18 ไม่เหมาะสมสำหรับการแยก fraction 03A02 เนื่องจากสาร retain ใน column นานเกินไป จึงได้เลือก column phenyl ซึ่ง polar กว่า ทำให้การ retain ใน column เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามลักษณะของ peak ยัง broad มาก จึงได้ปรับเปลี่ยน mobile phase ด้วยการเปลี่ยนแปลง organic modifier และ pH ของ mobile phase ขณะนี้ได้ chromatogram ที่ยังไม่ดีพอสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ จึงต้องพัฒนาระบบของ HPLC และ TLC สำหรับงานควบคุมคุณภาพต่อไป ดังแสดง chromatogram รูปที่ 5 และ 6

5.2.12 ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของ VLFA โดยวิธี TLC-Densitometry แทนวิธี HPLC ที่ไม่เหมาะสม (เนื่องมาจากการขาด chromophoric property ที่เหมาะสมของ analyte) และพัฒนาการตรวจวัด (detection) โดยใช้หลักการ colorimetric method ด้วย phosphomolybdic เป็น derivatizing agent. สรุปสภาวะที่เหมาะสมของวิธี TLC-Densitometry เป็นดังต่อไปนี้

Mobile phase :	Hexane : Ethyl acetate (8:2)
Detection	spray with 3% phosphomolybdic acid in methanol อบที่ 110 ^{0}C 10 นาที

รูป 13 แสดง UV spectrum of VLFA และ รูป 14 แสดง TLC ของวิธี

ขณะนี้อยู่ในระหว่างการทำ validation ตามหัวข้อต่างๆตามมาตรฐานที่กำหนด

5.3 รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว โดยให้แนบบทความผลงานความก้าวหน้าทางวิชาการของแผนงานวิจัยระหว่างดำเนินการ ที่เคยพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้ว หรือบทความที่จะนำเผยแพร่ทางสื่อมวลชนได้ (ถ้ามี)

ไม่มี

5.4 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มดำเนินการเป็นเงินทั้งสิ้น 651,200 บาท

กำลังดำเนินการรวบรวมอยู่

5.5 งานตามแผนงานโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ทุกขั้นตอนตามที่เสนอในโครงการ

5.6 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา และหรืออุปสรรค (ถ้ามี)

1. การดำเนินงานต้องประสานงานกับฝ่ายทดสอบฤทธิ์ ซึ่งมีปัญหาในการสั่งซื้อสัตว์ทดลองเช่นกัน ทำให้ต่างฝ่ายต่างรอซึ่งกันและกัน
2. ปริมาณสาร VLFA ที่ได้มีน้อยมาก จึงต้องกลับไปผลิตสารดังกล่าวให้บริสุทธิ์ (เพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์) และพัฒนาเป็น biomarker ต่อไป
3. validate วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้น และตรวจวัดปริมาณสาร VLFA ที่มีในตัวอย่างพืชบัวบก

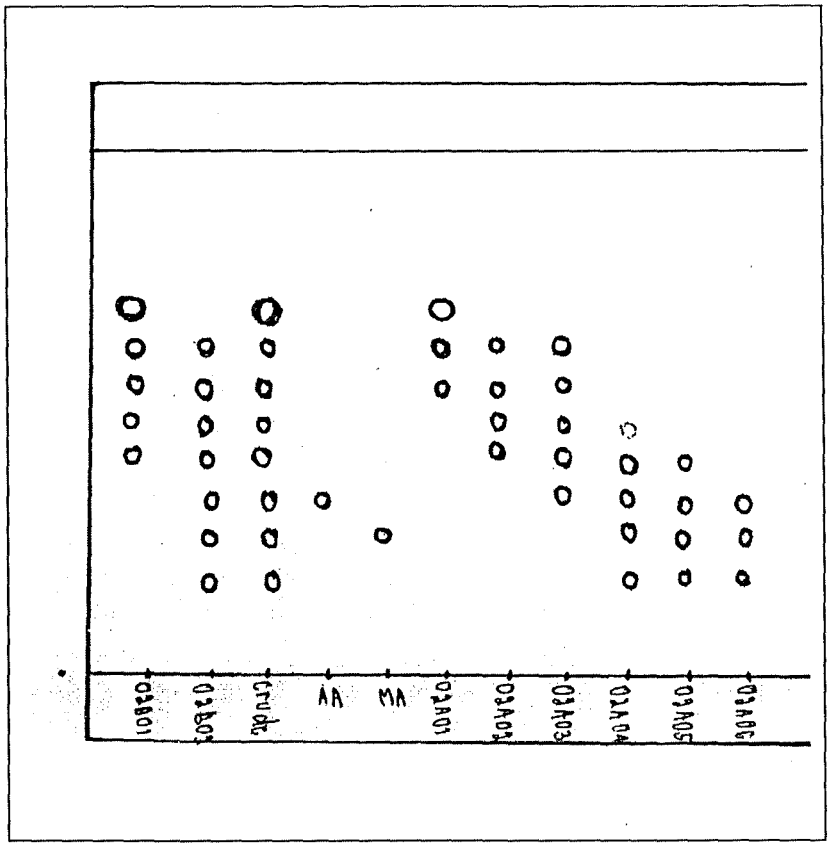
(ลายเซ็น)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช)

หัวหน้าโครงการวิจัย

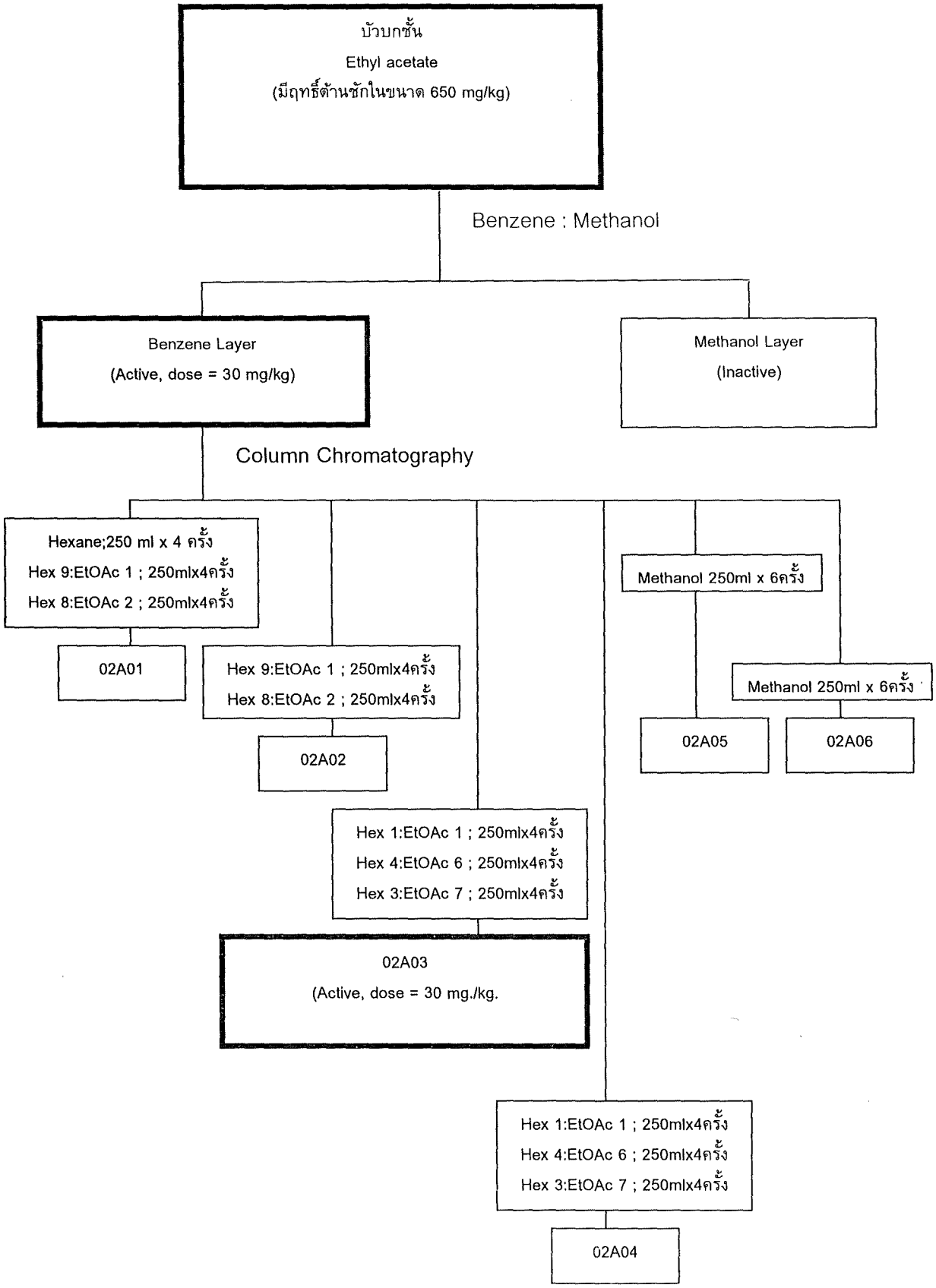
วันที่...24...เดือน...สิงหาคม..พ.ศ. 2550

รูปที่ 1 TLC ของส่วนที่แยกได้

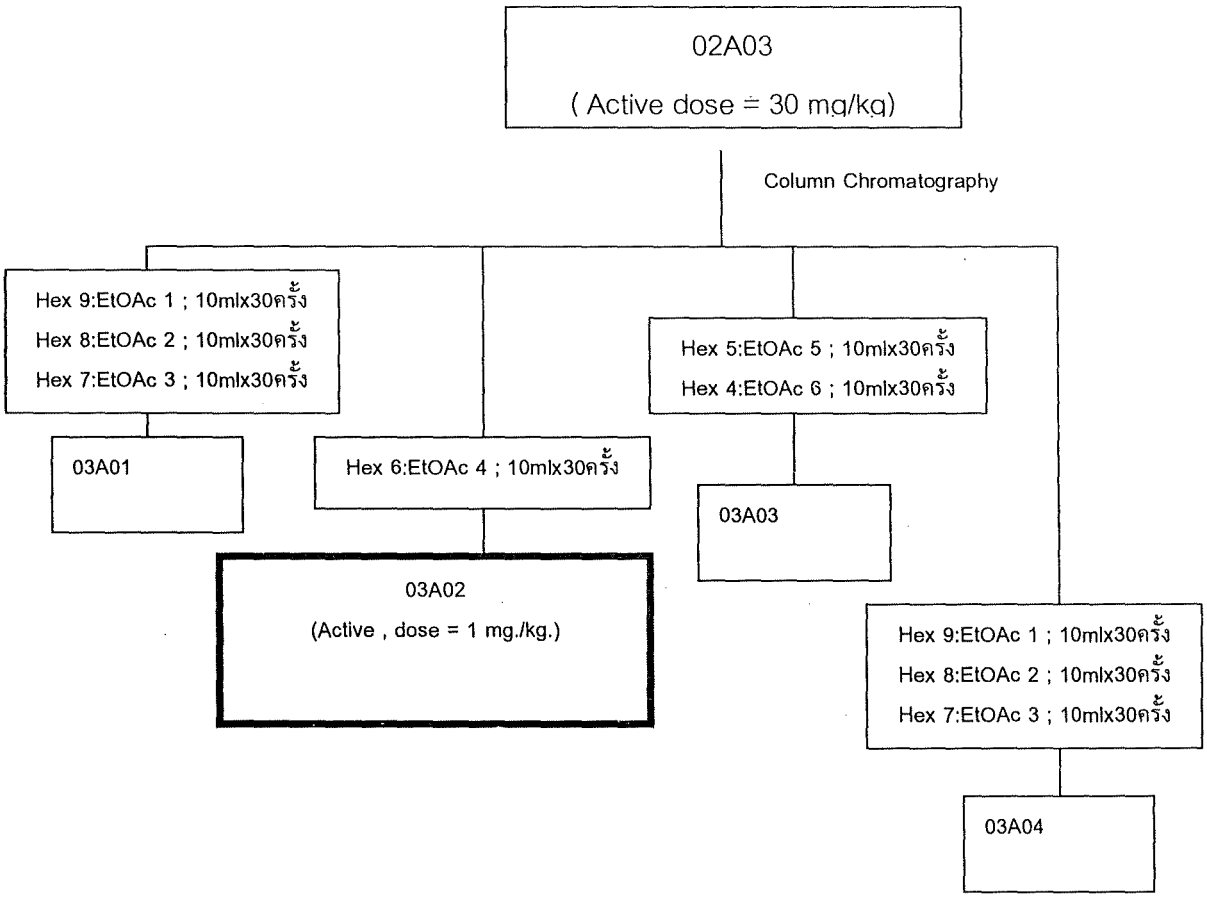


1 = 02B01
2 = 02B02
3 = crude
4 = Asiatic acid
5 = Madecassic acid
6 = 02A01
7 = 02A02
8 = 02A03
9 = 02A04
10 = 02A05
11 = 02A06

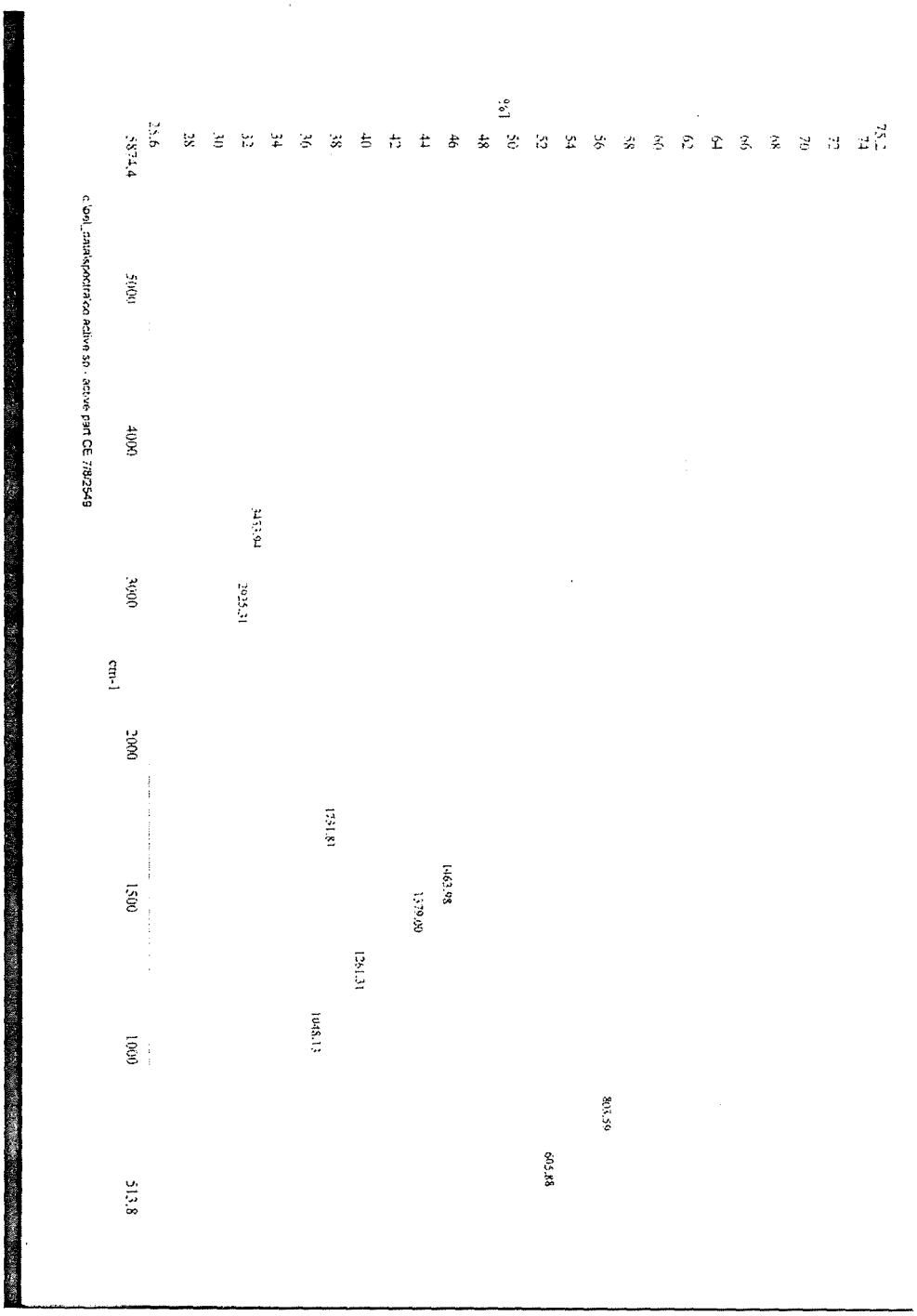
Scheme ที่ 1 แสดงผังการสกัด และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านชัก



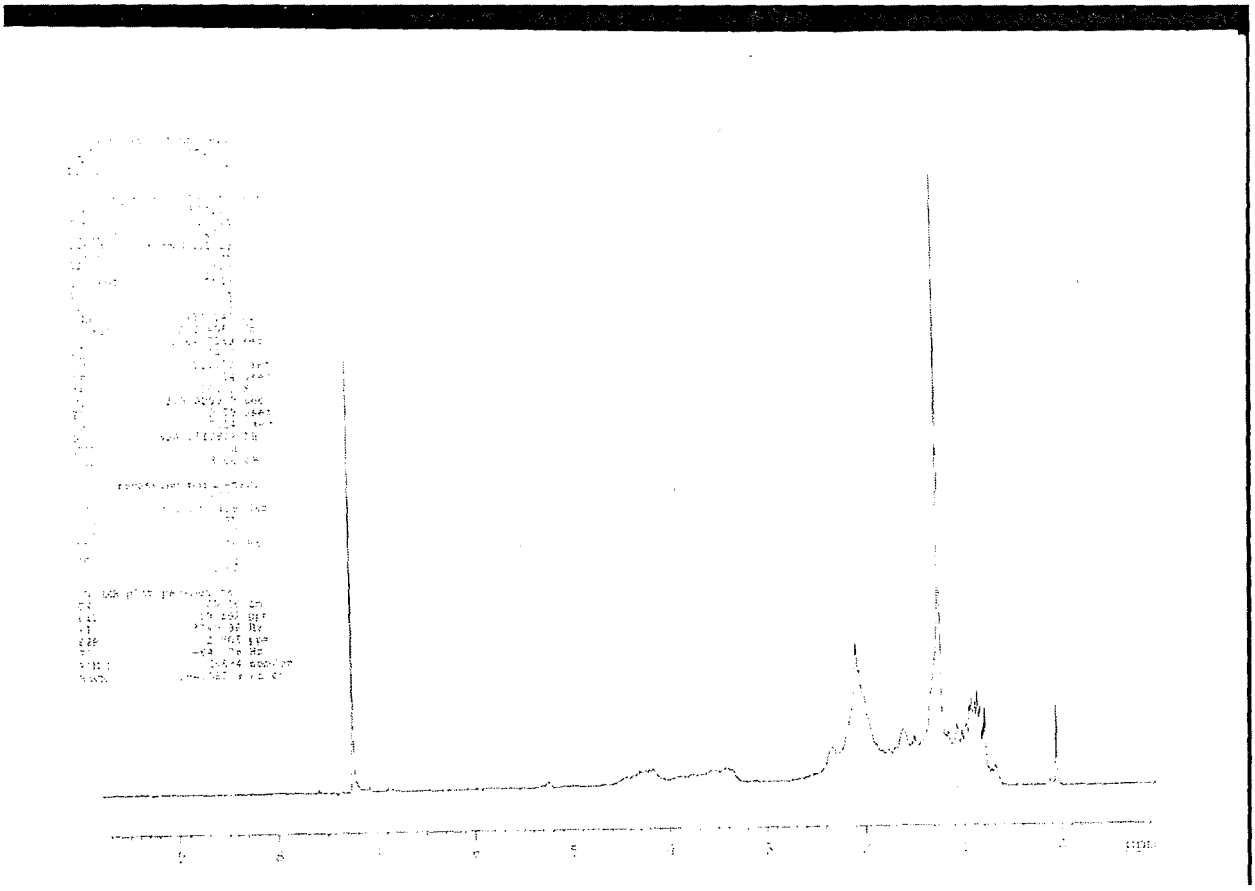
scheme ที่ 2 แสดงผังการแยก column chromatography และ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านชักของ fraction 02A03



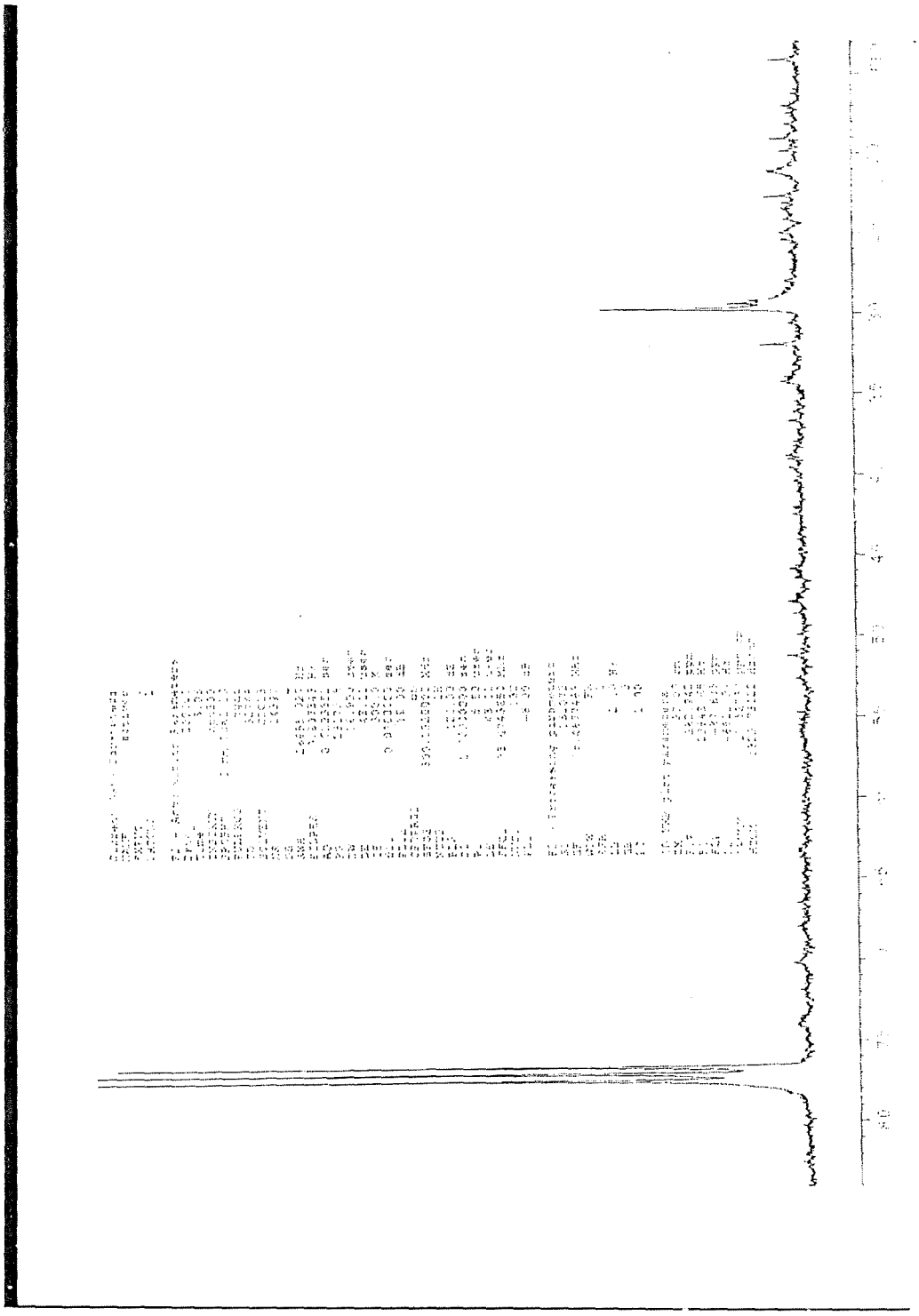
รูปที่ 2 แสดง infrared spectrum ของ fraction 03A02



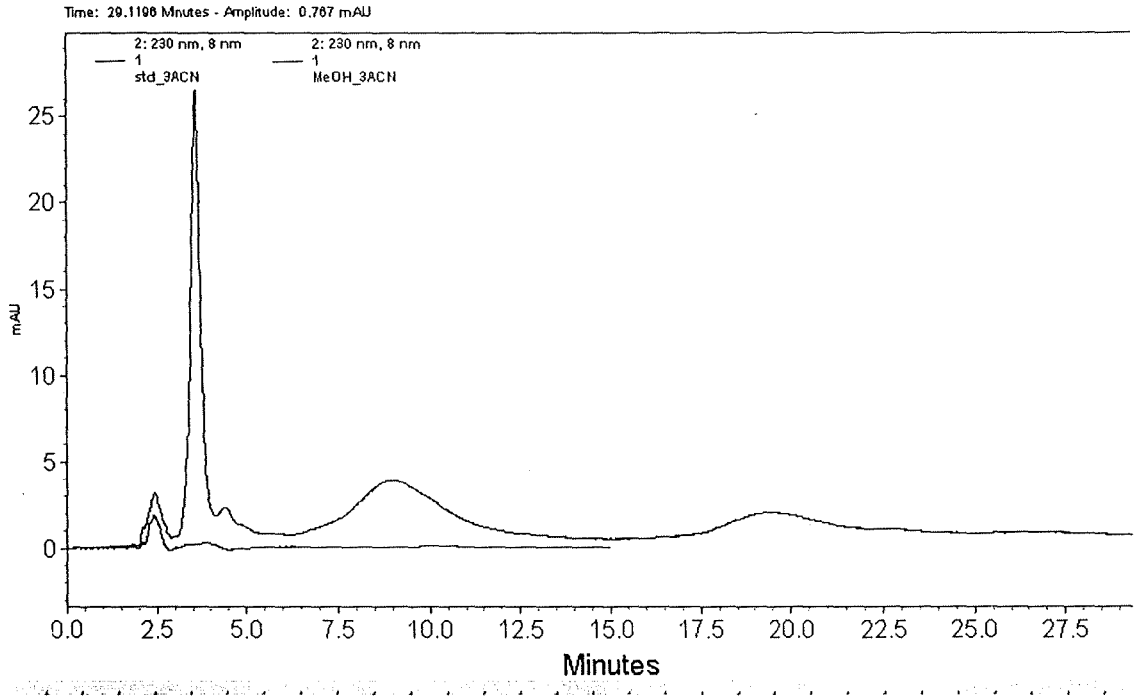
รูปที่ 3 แสดง 1H NMR ของ fraction 03A02



รูปที่ 4 แสดง 13C-NMR ของ fraction 03A02

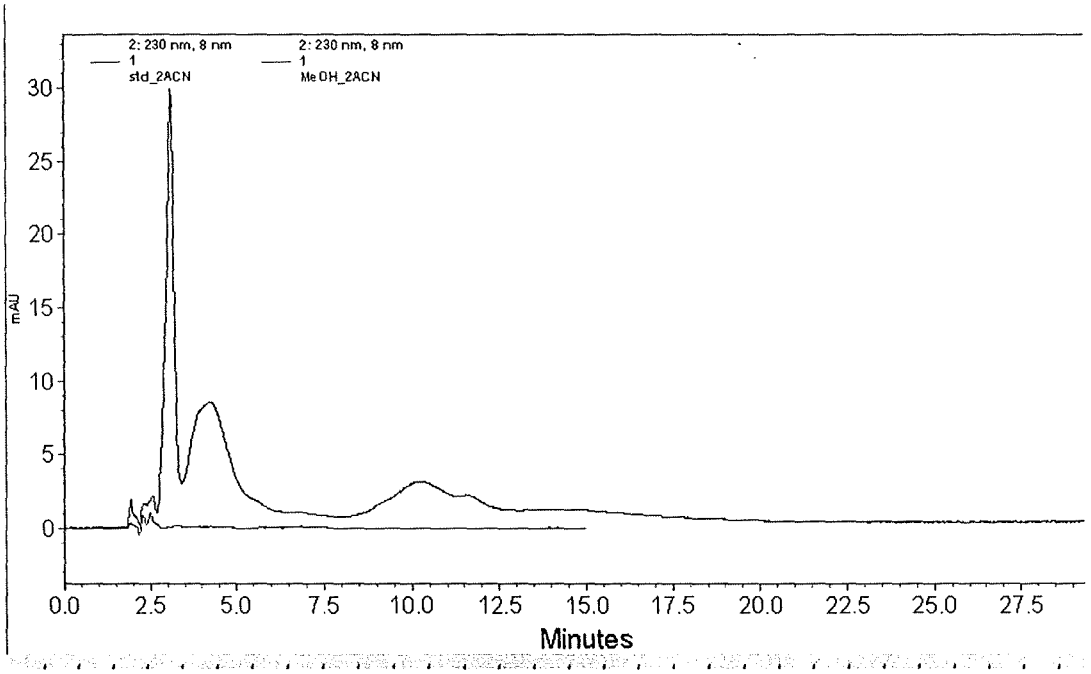


รูปที่ 5 แสดง chromatogram ของ HPLC เพื่อแยก fraction 03A02



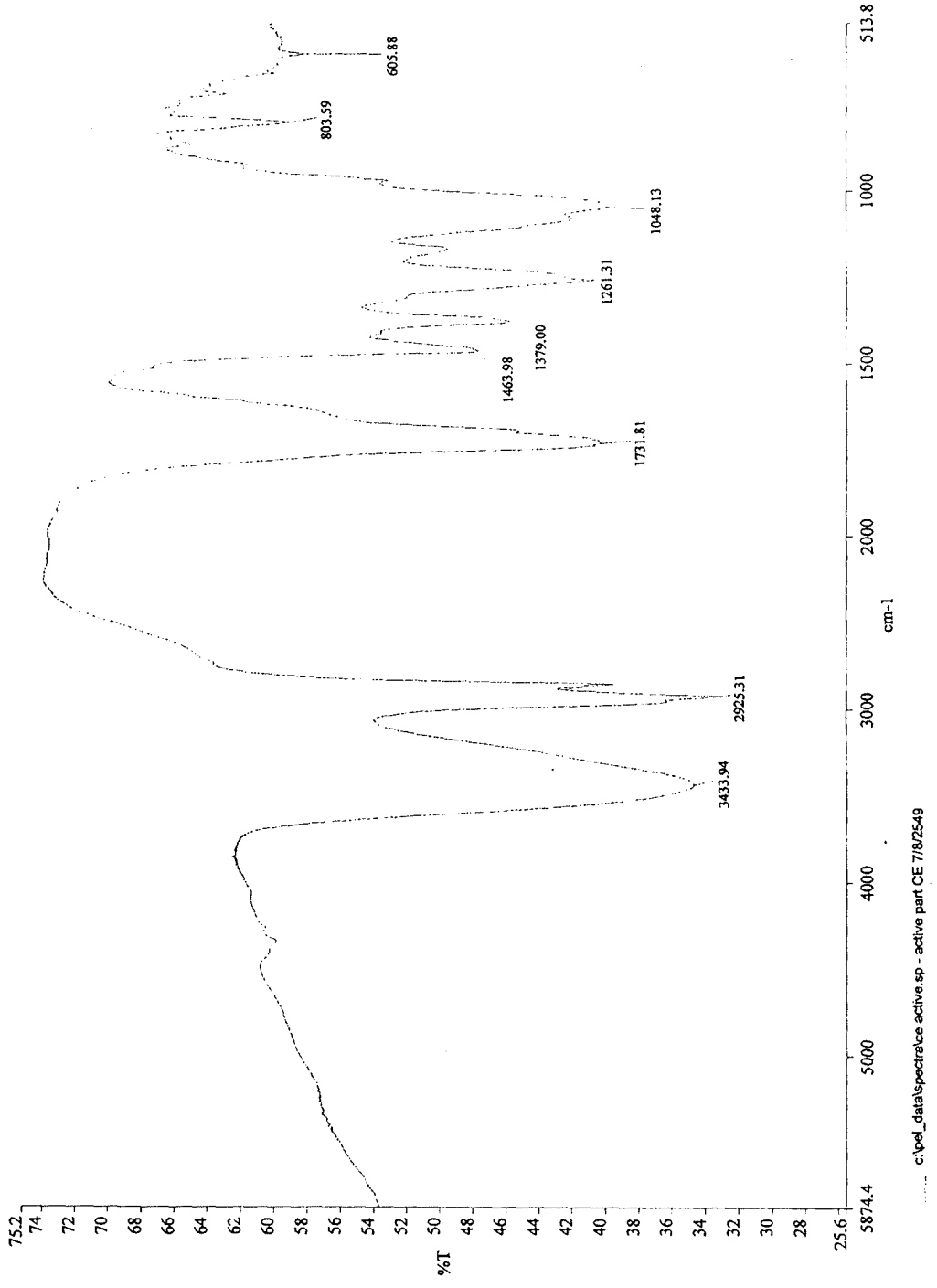
3%ACN+97% ของ phosphate buffer pH3.41 30 นาที Column phenyl สั้น เทียบกับ MeOH detect ที่ 230 nm.

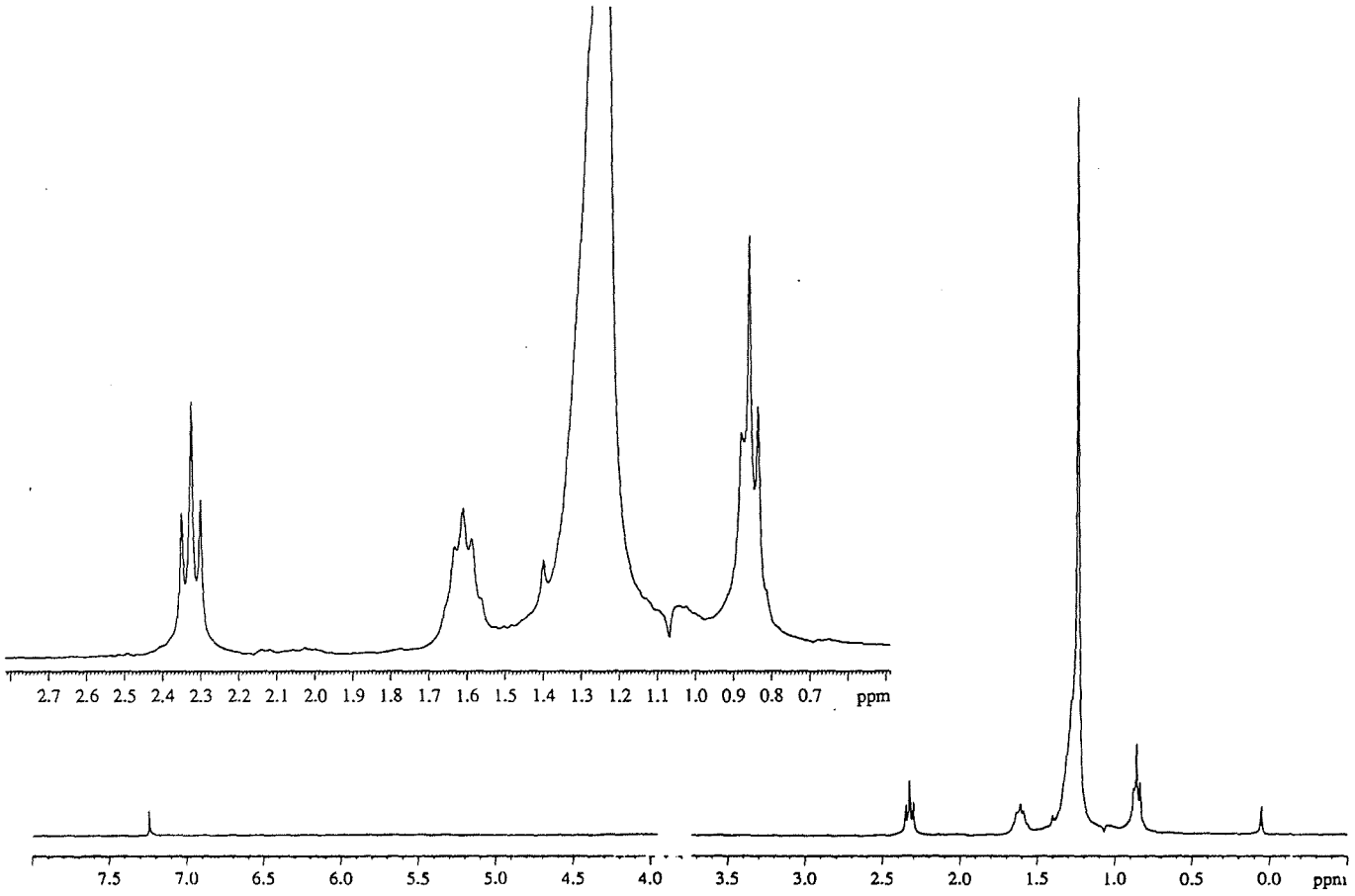
รูปที่ 6 แสดง chromatogram ของ HPLC เพื่อแยก fraction 03A02



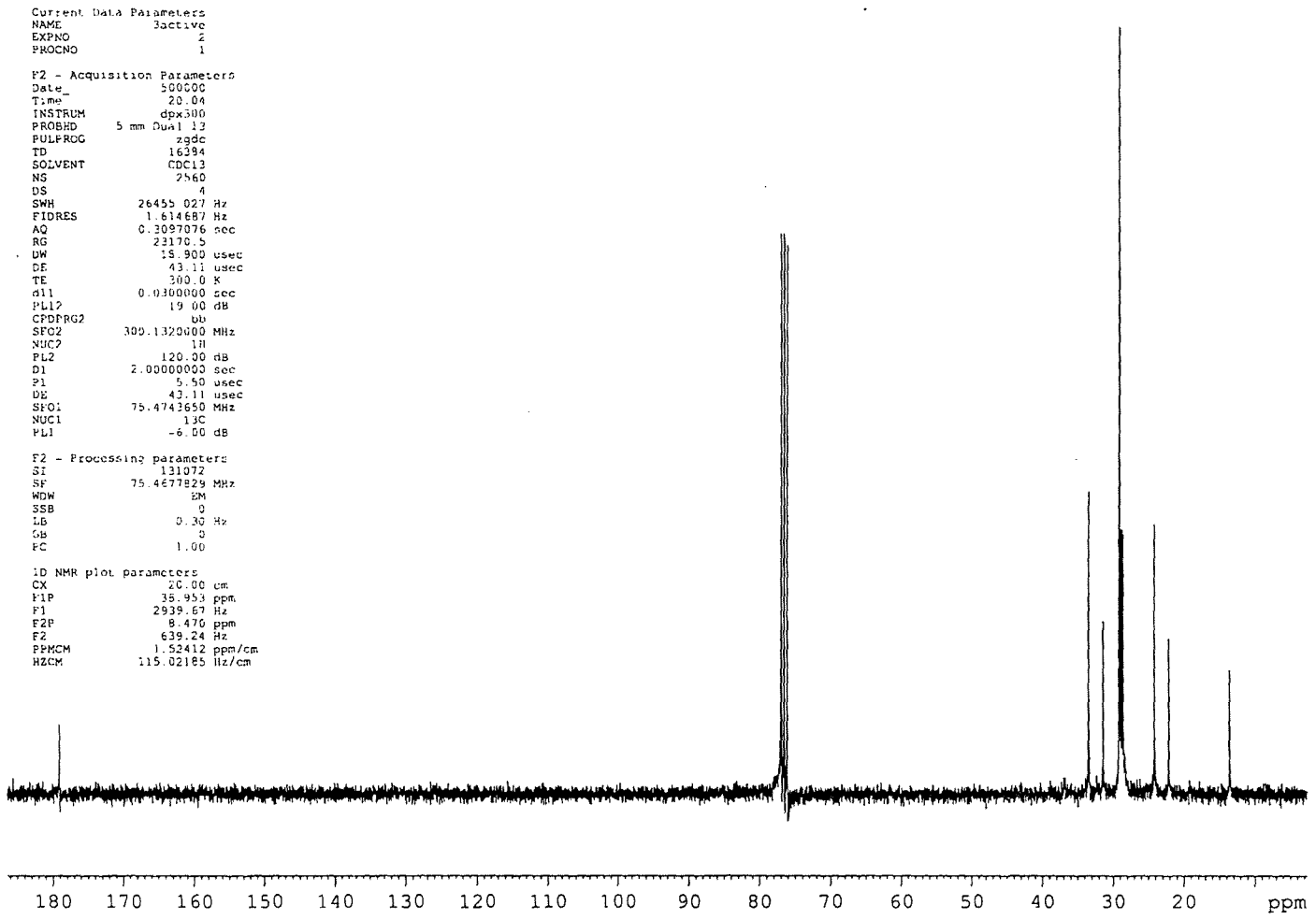
2%ACN+98% ของ phosphate buffer pH 4.01 30 นาที Column phenyl สั้น เทียบกับ MeOH detect ที่ 230 nm.

รูปที่ 7 IR of VLFA



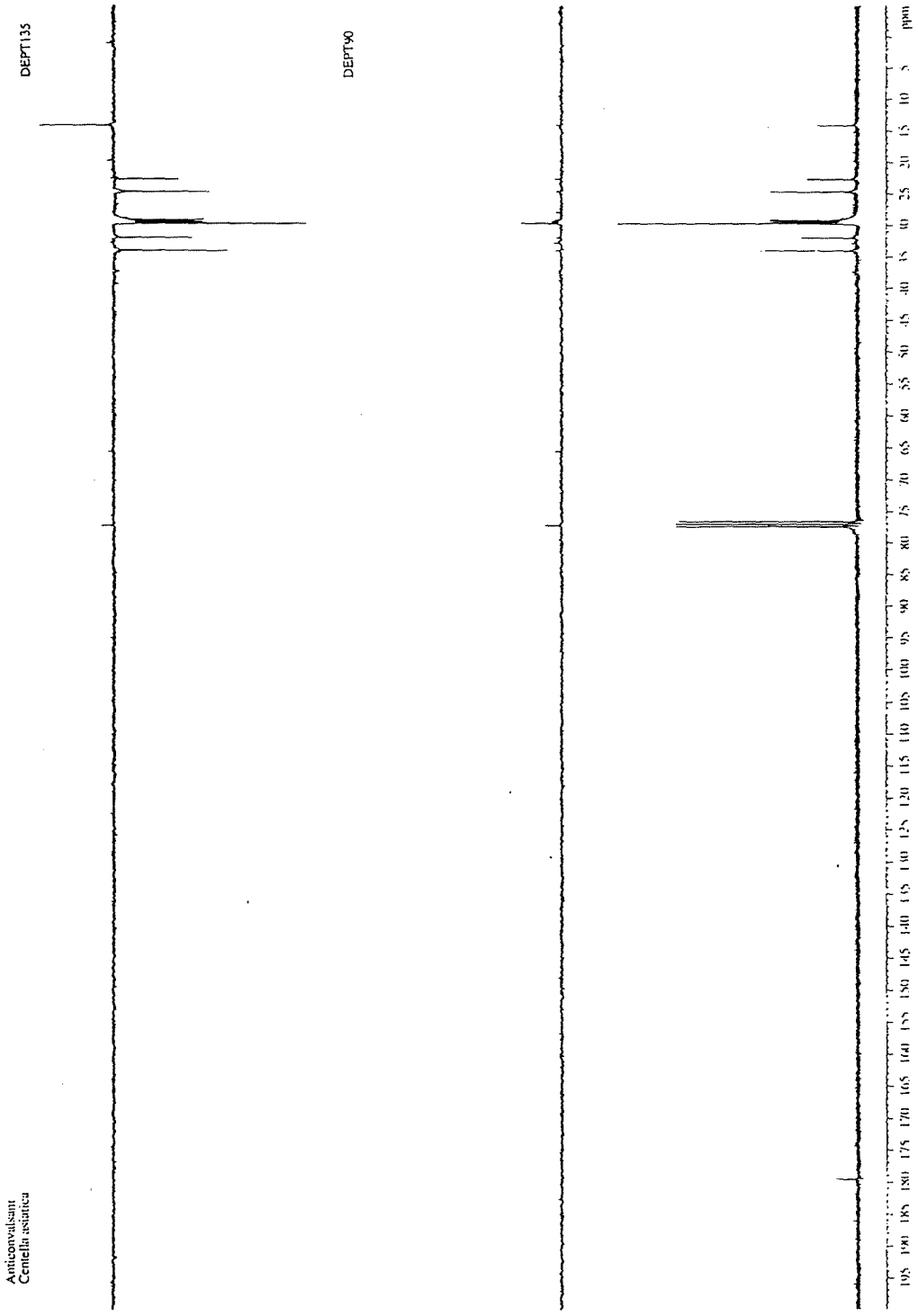


รูปที่ 8 1H-NMR of VLFA

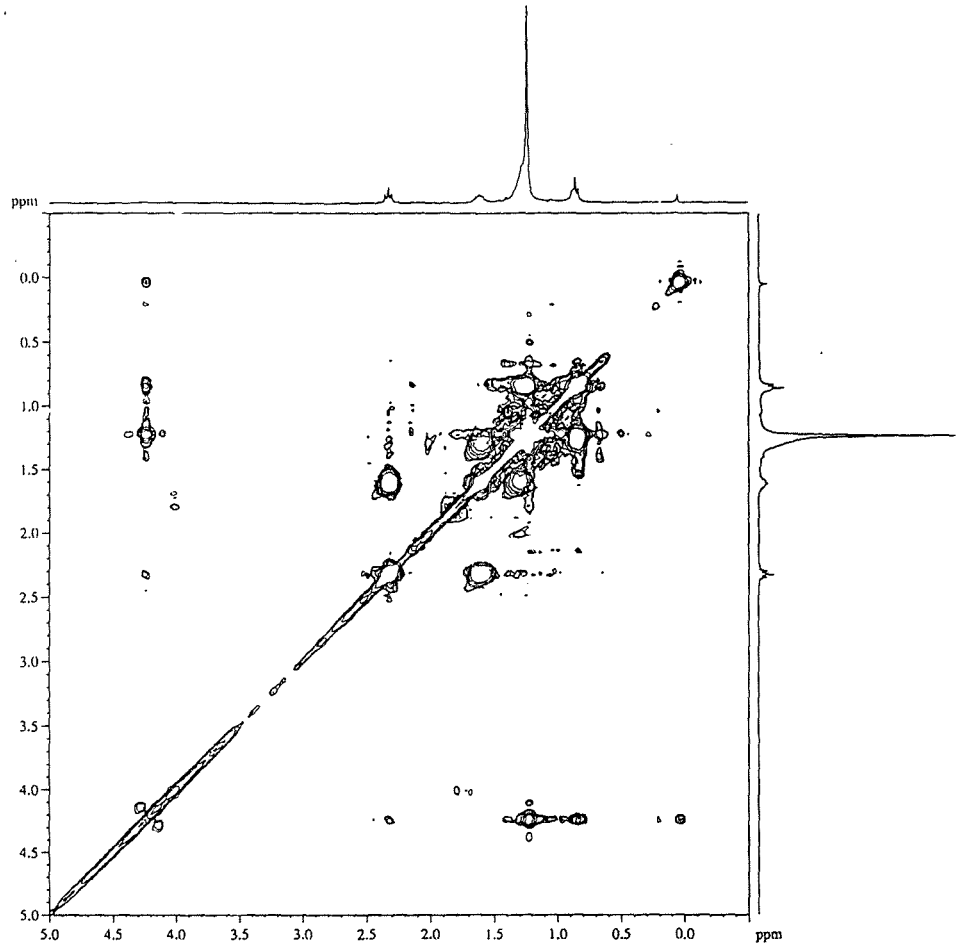


รูปที่ 9 13C-NMR of VLFA

รูปที่ 10 DEPT-13C-NMR of VLFA



รูปที่ 11 HH Cosy of VLFA



anticonvalsant
Centella asiatica

Current Data Parameters
NAME 3active
EXPNO 3
PROCNO 1

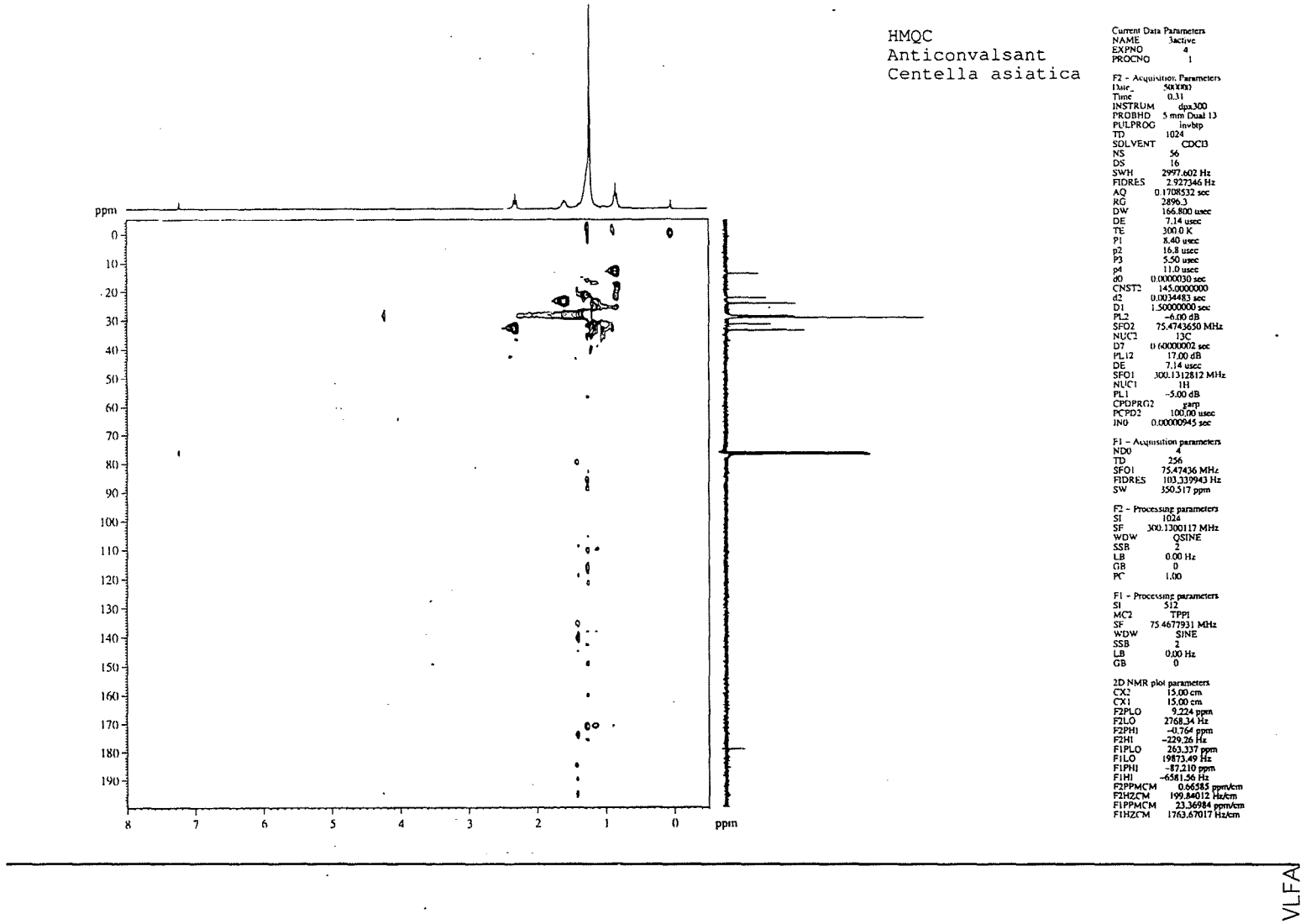
F2 – Acquisition Parameters
Date_ 500000
Time 21.44
INSTRUM dpx300
PROBHD 5 mm Dual 13
PULPROG cosy45
TD 1024
SOLVENT CDCl3
NS 12
DS 16
SWH 2997.602 Hz
FIDRES 2.927346 Hz
AQ 0.1708532 sec
RG 161.3
DW 166.800 usec
DE 7.14 usec
TE 300.0 K
d0 0.00000030 sec
D1 3.00000000 sec
P1 9.50 usec
DE 7.14 usec
SFO1 300.1312812 MHz
NUC1 1H
PL1 -3.00 dB
IN0 0.00033360 sec

F1 – Acquisition parameters
ND0 1
TD 256
SFO1 300.1313 MHz
FIDRES 11.709352 Hz
SW 9.988 ppm

F2 – Processing parameters
SI 512
SF 300.1300117 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00

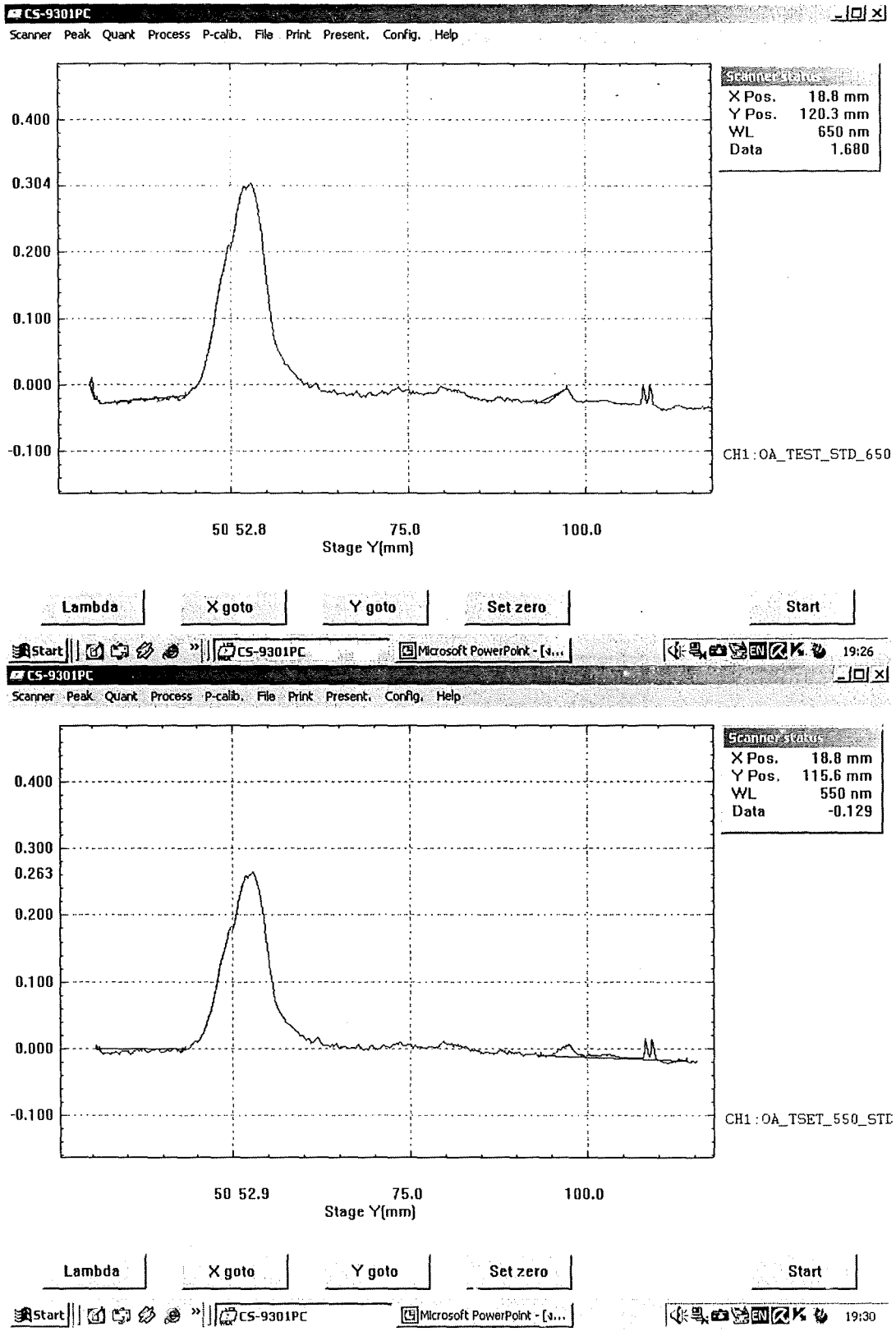
F1 – Processing parameters
SI 512
MC2 QF
SF 300.1300117 MHz
WDW SINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0

2D NMR plot parameters
CX2 15.00 cm
CX1 15.00 cm
F2PLO 9.224 ppm
F2LO 2768.34 Hz
F2PH1 -0.764 ppm
F2H1 -229.26 Hz
F1PLO 9.224 ppm
F1LO 2768.34 Hz
F1PH1 -0.764 ppm
F1H1 -229.26 Hz
F2PPMCM 0.66585 ppm/cm
F2HZCM 199.84012 Hz/cm
F1PPMCM 0.66584 ppm/cm
F1HZCM 199.83961 Hz/cm

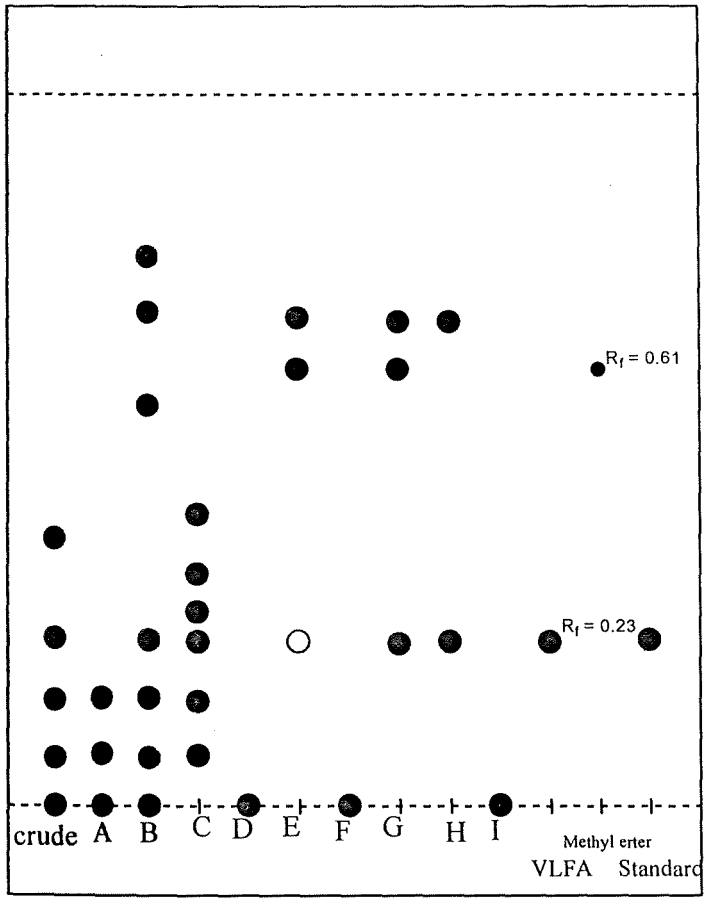


รูปที่ 12 HMQC of VLFA

รูปที่ 13 TLC-densitometry



รูปที่ 14 TLC of VLFA



แบบรายงานความก้าวหน้าของโครงงานวิจัย (Research Project)

.....

1. ชื่อโครงงานวิจัย (โครงการย่อยที่ 3)

(ภาษาไทย) การประเมินฤทธิ์ต้านชักและพิษเฉียบพลันของสารสกัดมาตรฐานบัวบก

(ภาษาอังกฤษ) Evaluation of anticonvulsant activity and acute toxicity of standard extract *of Centella asiatica*

2. รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และEmail

2.1 รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติสิระ
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์: 02-2188323-5 โทรสาร: 02-2188326
tmayuree@chula.ac.th

2.2 รองศาสตราจารย์ ดร. บุญยงค์ ตันติสิระ
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์: 02-2188250

2.3 พ.ต. หญิง อนุสรา วัฒนจันทร์
ภาควิชาสรีรวิทยา วิทยาลัยแพทย์พระมงกุฎเกล้า
โทรศัพท์ : 02- 354-7752

2.4 อาจารย์จิตติมา ศรีสมบูรณ์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ : 02-2188341

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2549 จำนวน 254,100 บาท
4. เริ่มทำการวิจัยเมื่อตุลาคม 2548 ถึง มิถุนายน 2549
5. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

5.1 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย (โดยสรุป)

5.1.1 เพื่อประเมินว่าสารสกัดแยกส่วนจากบัวบกด้วยตัวทำละลายต่างกัน ส่วนใดบ้างที่มีฤทธิ์ต้านชักได้ดีที่สุด ในโมเดลหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชัก

5.1.2 ศึกษาผลของสารสกัดบัวบกที่มีฤทธิ์ต้านชักเมื่อให้ควบคู่ไปกับยาต้านชักชนิดอื่น

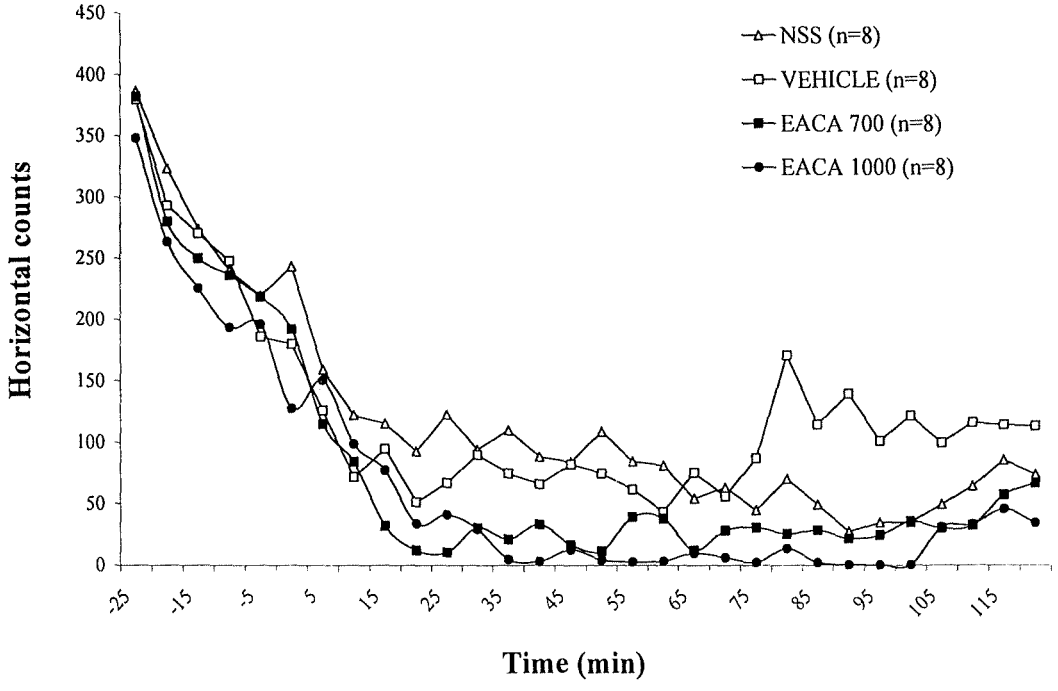
5.1.3 ศึกษาพิษเฉียบพลันและผลของสารสกัดบัวบกต่อระบบประสาทส่วนกลาง

5.2 การดำเนินการวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการวิจัย

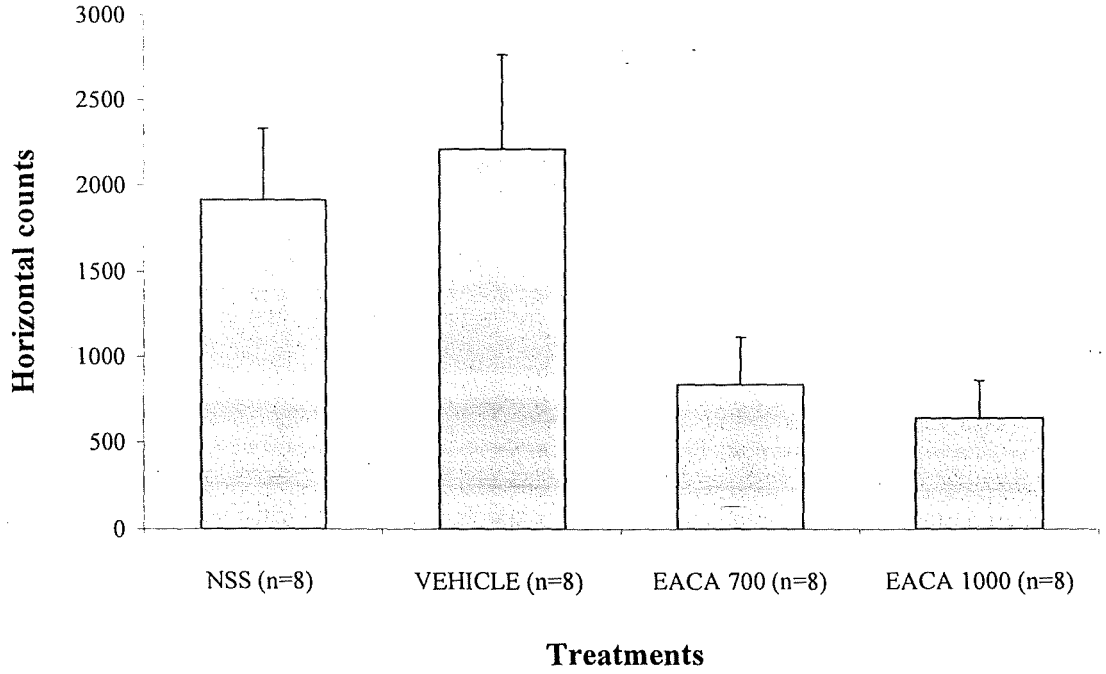
การศึกษาฤทธิ์ข้างเคียงผลสารสกัดบัวบก (EACA) ต่อระบบประสาทส่วนกลาง

5.2.1 ผลของผลสารสกัดบัวบก (EACA) ต่อ Locomotor activity

ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 Locomotor activity ในเวลา 120 นาที ของหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับการป้อนด้วยน้ำกระสายยา (vehicle) ซึ่งก็คือ Tween20/water; 2:5 ที่ใช้เตรียมสารสกัดบัวบกไม่มีความแตกต่างจาก Locomotor activity ของหนูที่ได้รับ Normal saline solution (NSS, 0.9 % NaCl)แต่อย่างใด ในขณะที่สารสกัดบัวบก (EACA) ทั้งในขนาด 700 และ 1,000 มก/กก ที่ให้โดยการป้อนแก่หนูถีบจักร มีผลกดการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองแตกต่างจากหนูถีบจักรกลุ่มที่ได้รับ vehicle ดังจะเห็นได้จากผลรวมของ Horizontal counts ของ EACA ในขนาด 700 และ 1,000 มก/กกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มที่ได้รับ vehicle (รูปที่ 2)



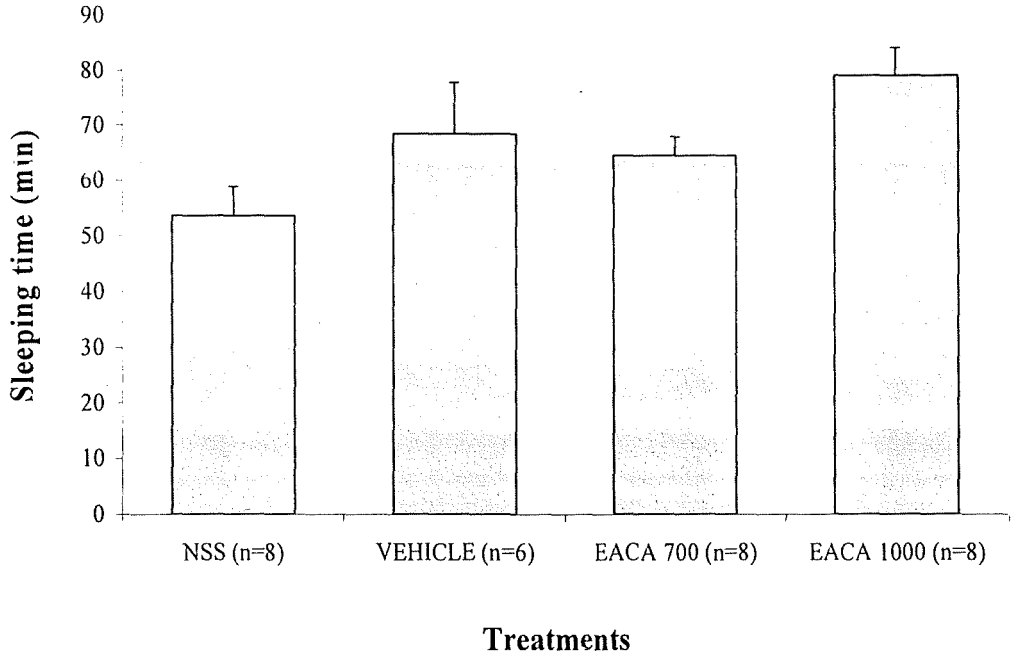
รูปที่ 1 ผลของสารสกัดบัวบก (EACA) ในขนาด 700 และ 1,000 มก/กก ที่ให้โดยการป้อนแก่หนูถีบจักรต่อ locomotor activity ในเวลา 120 นาที



รูปที่ 2 ผลของสารสกัดบัวบก (EACA) ในขนาด 700 และ 1,000 มก/กก ที่ให้โดยการป้อนแก่หนูถีบจักรต่อ Horizontal counts ในเวลา 120 นาที

5.2.2 ผลของผลสารสกัดบัวบก (EACA) ต่อ Barbiturate Sleeping Time

ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3 vehicle หรือสารสกัดบัวบก (EACA) ในขนาด 700 และ 1,000 มก/กก ที่ให้แก่หนูถีบจักรโดยการป้อน ไม่มีผลทำให้ระยะเวลาการนอนหลับจาก Sodium pentobarbital (50 มก/กก) ที่ให้โดยการฉีดเข้าช่องท้องเปลี่ยนแปลงไปแต่อย่างใด ดังนั้น ฤทธิ์ในการกด Locomotor activity ที่พบในการทดสอบข้างต้นอาจเป็นผลจากการออกฤทธิ์ของสารสกัดบัวบกต่อ Neuromuscular junction ก็ได้



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดบัวบก (EACA) ในขนาด 700 และ 1,000 มก/กก ที่ให้แก่หนูถีบจักร โดยการป้อนต่อระยะเวลาการนอนหลับจากSodium pentobarbital (50 มก/กก) ที่ให้โดยการฉีดเข้าช่องท้อง

5.2.3 Lethality

จากการทดสอบป้อนสารสกัดบัวบก (EACA) ในขนาด 30, 100, 300, 600, 1,000 และ 5,000 มก/กก แก่หนูถีบจักร ถึงแม้ว่าจะพบอาการเดินเซหรือนอนหลับในหนูที่ได้รับสารสกัดบัวบกในขนาดสูง (ตั้งแต่ 600 มก/กก ขึ้นไป) อยู่บ้าง แต่ก็ไม่พบว่ามีการตายเกิดขึ้นในเวลา 72 ชั่วโมง ไม่ว่าจะเป็นในหนูกลุ่มใด ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดบัวบกที่ให้โดยทางปากมีความปลอดภัยสูงและน่าจะมีขนาด LD50 ที่สูงเกิน 5,000 มก/กก และไม่สามารถจะป้อนสารสกัดบัวบกในขนาดสูงกว่านี้ได้ เนื่องจากมีความเข้มข้นสูงมาก

ตารางที่ 1 Lethality ของสารสกัดบัวบก (EACA) ในขนาดต่างๆ (30 – 5,000 มก/กก) ที่ให้โดยการป้อนแก่หนูถีบจักร

EACA (mg/kg BW)	% Survival in 72 h
30 (n=8)	100
100 (n=8)	100
300 (n=8)	100
600 (n=8)	100
1,000 (n=8)	100
5,000 (n=4)	100

5.2.4 ฤทธิ์ต้านชักของ Subfractions จากโครงการย่อยที่ 1

5.2.4.1 จากการทดสอบใน PTZ model ในหนูถีบจักร 24 กลุ่ม ซึ่ง แต่ละกลุ่มมีหนู 6-10 ตัว พบว่าจาก subfraction ที่แยกจากEACA ทั้งหมด 8 fractions ที่ให้โดยการป้อนทางปากแก่สัตว์ทดลองเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดการชักโดยการฉีดสาร pentylenetetrazol ในขนาด 70 mg/kg เข้าใต้ผิวหนัง มีส่วนที่มีฤทธิ์ต้านชักอยู่ ทุกsubfractions ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 แต่เนื่องจากฤทธิ์ต้านชักที่พบไม่ว่าจะเป็นจากfractionใดไม่แสดงลักษณะprofile ของการตอบสนองที่เป็น dose dependent แม้จะเพิ่มจำนวนสัตว์ทดลองมากขึ้นถึง 10 ตัว

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านชักของ subfractions (1-8)ในขนาด 10,30 100และ300 mg/kg B.W ที่ให้โดยการป้อนทางปากแก่หนูถีบจักรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการชักโดยการฉีดสาร pentylenetetrazol ในขนาด 70 mg/kg เข้าใต้ผิวหนัง (แสดงผลเป็นอัตราส่วนของจำนวนหนูที่ไม่ชัก/จำนวนหนูที่ใช้ทดสอบ)

Dose(mg/kg B.W.)	1	2	3	4	5	6	7	8
10	-	0/6	0/6	0/6	0/6	2/6	0/6	1/6
30	1/6	0/6	3/10	0/10	1/10	2/10	0/6	0/6
100	1/6	2/6	1/6	1/6	0/6	1/6	1/6	0/6
300	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	1/6	1/6

5.2.4.2 ดังนั้นจึงได้ทดลองเปลี่ยนเวลาของการ pretreatment เป็น 3 ชั่วโมงก่อนที่จะเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองชักด้วยโดยการฉีดสาร pentylenetetrazol ในขนาด 70 mg/kg เข้าใต้ผิวหนัง แต่ก็ไม่พบว่าการเพิ่มเวลาของ pretreatment จะช่วยให้สามารถชี้ชัดได้ว่าfraction ใดน่าจะเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านชัก (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านชักของ subfractions (1-8)ในขนาด 30 100และ300 mg/kg B.W ที่ให้โดยการป้อนทางปากแก่หนูถีบจักรเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนการถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการชักโดยการฉีดสาร pentylenetetrazol ในขนาด 70 mg/kg เข้าใต้ผิวหนัง (แสดงผลเป็นอัตราส่วนของจำนวนหนูที่ไม่ชัก/จำนวนหนูที่ใช้ทดสอบ)

Dose	**Ethyl acetate (3 ชม)**							
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
30 mg/kg	-	-	0/6	-	-	0/6	-	-
100 mg/kg	0/6	-	-	-	-	-	-	1/6
300 mg/kg	1/6	2/6	2/6	-	-	1/6	0/6	1/6

5.2.4.3 สืบเนื่องจากฤทธิ์ต้านชักในข้อ 5.2.4.1 และ 5.2.4.2 ไม่มี profile ของการต้านชักที่เป็น dose-responseอย่างชัดเจน จึงได้ทดลองนำเอาสารสกัดใน fraction และ 3 ในขนาด 100 และ 300 mg/kg มาป้อนให้แก่หนูถีบจักรเป็นเวลา 5 วัน ก่อนจะเหนี่ยวนำให้หนูชักด้วยการฉีดสาร pentylenetetrazol ในขนาด 70 mg/kg เข้าใต้ผิวหนัง จากผลการทดลองที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 ไม่พบว่าการ pretreatment สัตว์ทดลองด้วยสารสกัดส่วนต่างๆในเวลาดังกล่าวก็ไม่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านชักที่เป็น dose dependent แต่อย่างใด นอกจากนั้นยังมีแนวโน้มที่จะมีลักษณะของการตอบสนองที่เป็นรูป belled shape สำหรับ fraction ที่ 2 ในขณะที่ fraction ที่ 3 ไม่แสดงฤทธิ์ต้านชักเลย

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านชักของ subfractions (2 และ 3)ในขนาด 100และ 300 mg/kg B.W ที่ให้โดยการป้อนทางปากแก่หนูถีบจักรเป็นเวลา 5 วัน ก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดการชักโดยการฉีดสาร pentylenetetrazol ในขนาด 70 mg/kg เข้าใต้ผิวหนัง (แสดงผลเป็นอัตราส่วนของ จำนวนหนูที่ไม่ชัก/จำนวนหนูที่ใช้ทดสอบ)

	สารสกัดบัวบก 5 วัน	
	2	3
100 mg/kg	2/6	0/6
300 mg/kg	1/6	0/6

5.2.5 ฤทธิ์ต้านชักของ Subfractions จากโครงการย่อยที่ 2

5.2.5.1 เมื่อทดลองแยกสารสกัดอีกวิธีหนึ่งแล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านชักใน PTZ model พบว่าจาก subfraction ทั้งหมด 5 subfractions มี subfractions ที่แสดงฤทธิ์ต้านชักเมื่อให้โดยการป้อนทางปาก 2 subfractions คือ C และ D ซึ่งสามารถป้องกันการชักในหนูถีบจักรได้ 2 จาก 6 ตัว และ 1 จาก 5 ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เป็นที่น่าสังเกตุว่าฤทธิ์ในการต้านชักของ subfraction C และ D ไม่แสดงลักษณะของการแปรตามขนาดซึ่งเป็นลักษณะที่มักพบในยากันชักทั่วๆไป ทั้งนี้อาจเนื่องจาก subfraction เหล่านี้ยังไม่ใช่สารบริสุทธิ์แต่เป็นสารประกอบที่มีสารหลายชนิดที่มี profile ของการออกฤทธิ์แตกต่างกัน รวมทั้งอาจมีสารซึ่งมีฤทธิ์ต้านกันจำเป็นที่จะต้องใช้วิธี activity-guided isolation แยกต่อไปอีกระดับหนึ่ง

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านชักของ subfractions (A, B, C, D และ E) ในขนาด 10,30 และ 100 mg/kg B.W ที่ให้โดยการป้อนทางปากแก่หนูถีบจักรเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดการชักโดยการฉีดสาร pentylenetetrazol ในขนาด 70 mg/kg เข้าใต้ผิวหนัง

Dose (mg/kg B.W)	A	B	C	D	E
10	-	-	2/6	-	0/5
30	-	-	4/6	-	2/5
100	0/4	0/4	2/6	0/4	1/5

5.2.5.2 ถึงแม้ว่าสารสกัด fraction C จะมีฤทธิ์ต้านชักที่ไม่เป็น dose dependent แต่เนื่องจากเป็น fraction เดียวที่มีฤทธิ์ ผู้วิจัยในโครงการย่อยที่ 2 จึงได้แยก fraction C ต่อไปด้วย column chromatography ได้ subfraction อีก 4 fraction พบว่ามี 2 subfractions ที่แสดงฤทธิ์ต้านชัก (ตารางที่ 6) เมื่อป้อนให้แก่สัตว์ทดลองในขนาด 1 mg/kg เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดการชักโดยการฉีดสาร pentylenetetrazol ในขนาด 70 mg/kg เข้าใต้ผิวหนัง แต่มีข้อที่น่าสังเกตุ คือในสัตว์ทดลองที่สารทดสอบป้องกันการชักไม่ได้นั้น สัตว์ทดลองจะมีอาการชักอย่างรุนแรงจนเสียชีวิตทั้งใน fraction C-2 และ C-4

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ต้านชักของ subfractions C และ D ที่ให้โดยการป้อนทางปากแก่หนูถีบจักรเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดการชักโดยการฉีดสาร pentylenetetrazol ในขนาด 70 mg/kg เข้าใต้ผิวหนัง

Dose (mg/kg B.W)	C-2 (protect/total)	C-2 (death/total)	C-3 (protect/total)	C-3 (death/total)
1	3/7	3/7	1/7	2/7

5.2.5.3 จากการตรวจวิเคราะห์โดยผู้วิจัยในโครงการที่ 2 พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านชักซึ่งมีอยู่จำนวนน้อยมากในบัวบกน่าจะเป็น fatty acid ลักษณะเดียวกับที่มีผู้รายงานจากเปลือกอ้อย ผู้วิจัยจึงได้ทดลองทำการสกัดสารทดสอบจากอ้อยเพื่อให้ได้สารทดสอบในปริมาณที่มากขึ้น และส่งมาตรวจสอบฤทธิ์ต้านชักอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งก็พบว่าไม่มีสารทดสอบทดสอบชนิดใดที่มีฤทธิ์ต้านชักเป็นแบบ dose dependent (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ฤทธิ์ต้านชักของ subfractions C และ D ที่ให้โดยการป้อนทางปากแก่หนูถีบจักร เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดการชักโดยการฉีดสาร pentylenetetrazol ในขนาด 70 mg/kg เข้าใต้ผิวหนัง

Pretreated time	สารสกัดจากอ้อย			
	1 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg
1 ชม	0/5	1/5	2/5	1/5
2 ชม	-	1/5	0/5	-
3 ชม	-	0/5	0/5	-

5.3 รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว โดยให้แนบบทความผลงาน ความก้าวหน้าทางวิชาการของแผนงานวิจัยระหว่างดำเนินการ ที่เคยพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้ว หรือบทความที่จะนำเผยแพร่ทางสื่อมวลชนได้ (ถ้ามี)

5.3.1 Vattanajun A., Watanabe,H., Tantisira M.H. and Tantisira B. Isobolographically Additive Anticonvulsant Activity between Centella asiatica's ethyl Acetate Fraction and Some Antiepileptic Drugs. J Med Assoc Thai 2005; 88(Suppl 3): S131 – 40

5.3.2 อนุสรา วัฒนจันทร์ มยุรี ตันติสิระ บุญยงค์ ตันติสิระ และ Hiroshi Watanabe ฤทธิ์กันชักและพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของสารสกัดบัวบก (*Centella asiatica*) ในหนูถีบจักร Oral Presentation ในการประชุมวิชาการประจำปีการแพทย์แผนไทย การแพทย์พื้นบ้าน การแพทย์ทางเลือกแห่งชาติ ครั้งที่ 4 วันที่ 29-31 สิงหาคม 2550 ณ ห้องประชุมฟีนิกซ์ 1-6 ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพ็ค เมืองทองธานี

5.3.3 Anusara Vattanajun Mayuree H. Tantisira Boonyong Tantisira and Hiroshi Watanabe. Anticonvulsant activity of *Centella asiatica*'s ethyl acetate fraction in animal model of epilepsy จะนำเสนอเป็น Poster presentation ในการประชุมวิชาการพระมงกุฎเกล้าครั้งที่ 35 พฤศจิกายน 2550

5.4 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มดำเนินการเป็นเงินทั้งสิ้น 254,100บาท

5.5 งานตามแผนงานโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ทุกขั้นตอนตามที่เสนอในโครงการ

5.6 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา และหรืออุปสรรค (ถ้ามี)

5.6.1 ถึงแม้จะพบว่าสารสกัดบัวบกที่มีฤทธิ์ต้านชักจะมีความปลอดภัยในการใช้สูง (ในขนาดที่สูงถึง 5,000 มก/กก ไม่พบว่าทำให้สัตว์ทดลองตาย) แต่จากผลการ

ทดลองที่พบว่าสารสกัดบัวบกที่มีฤทธิ์ต้านชักมีฤทธิ์กดการเคลื่อนไหวในหนูถีบจักรอย่างชัดเจน (ผลการทดลองในข้อ 5.2.1) และมีฤทธิ์ทำให้เกิดความบกพร่องของ motor co-ordination (รายงานฉบับสมบูรณ์ของปี งบประมาณ 2548) อาจเป็นปัญหาในการนำเอาสารสกัดมาใช้ในคนหากสารที่แสดงฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์ดังกล่าวเป็นสารเดียวกันกับสารซึ่งออกฤทธิ์ต้านชัก ดังนั้นจึงต้องพยายามแยก Subfractions ของสารสกัดดังกล่าวหลายๆวิธีเพื่อแยกฤทธิ์ต้านชักออกจากฤทธิ์อันไม่พึงประสงค์อื่นๆ

5.6.2 จากการทดสอบฤทธิ์ต้านชักของ subfractions ซึ่งแยกมาโดยวิธีต่างๆ 17 fractions ยังไม่มีความชัดเจนว่า subfractions ใดน่าจะเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านชักที่มี profile ของการ ออกฤทธิ์ที่สัมพันธ์กับขนาดที่ใช้ สามารถนำมากำหนดเป็น marker ของสารสกัดมาตรฐาน ไม่ว่าจะทดลองเปลี่ยน pretreatment time เป็น 3 ชั่วโมงหรือให้ก่อนการเหนี่ยวนำให้ชักถึง 5 วัน

5.6.3 จากการทดสอบ สารทดสอบ ถึง 17 frction ด้วยวิธีสกัดที่แตกต่างกัน ไม่พบว่ามีสารใดที่แสดงฤทธิ์ต้านชักที่เป็น dose dependent และสารแต่ละชนิดที่มีฤทธิ์ต้านชักอยู่บ้างก็มีปริมาณน้อยมากและมีแนวโน้มว่าจะมีฤทธิ์ลดลงหรือแม้แต่เป็น proconvulsant ซึ่งเป็นอันตรายในการนำไปใช้

(ลายเซ็น)

(รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติสิระ)
หัวหน้าโครงการวิจัย
วันที่ 29 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2550

Isobolographically Additive Anticonvulsant Activity between *Centella asiatica's* Ethyl Acetate Fraction and some Antiepileptic Drugs

Anusara Vattanajun MSc*, ** Hiroshi Watanabe PhD***,
Mayuree H Tantisira PhD****, Boonyong Tantisira PhD****

* *PhD Program of Inter-department of Physiology, Graduate School, Chulalongkorn University*
** *Department of Physiology, Phramongkutklao College of Medicine*
*** *Department of Pharmacology, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama Japan*
**** *Research Unit of Neurophysiology and Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University*

Objective: *To investigate interaction between orally given Centella asiatica's ethyl acetate fraction (EACA) and intraperitoneally administered antiepileptic drugs (AEDs), namely, phenytoin, valproate and gabapentin.*
Material and Method: *Isobolographic analysis was used to evaluate the interaction between EACA and AEDs in terms of protection of mice in the pentylenetetrazole test. Rotarod test was used to evaluate neurotoxicity.*
Results: *When given alone, the median effective dose of phenytoin, valproate and gabapentin were found to be 13, 104, and 310 mg/kg BW, respectively, whereas the corresponding values in the presence of EACA were 5, 29 and 79 mg/kg BW. Together with isobolographic analysis, the results obtained indicated an additive effect among all combinations tested. In relation to neurotoxicity, combination of gabapentin and EACA demonstrated a broader margin between the effective dose and the neurotoxic dose while the other two combinations did not.*
Conclusion: *The present finding suggested a potential of Centella asiatica to be developed as an adjunctive medication for epileptic patients.*

Keywords: *Centella asiatica, Anticonvulsant activity, Isobologram*

J Med Assoc Thai 2005; 88(Suppl 3): S131-40
Full text. e-Journal: *http://www.medassocthai.org/journal*

Worldwide, approximately 1-3% of the population suffers from epilepsy. For most of the patient population, monotherapy with conventional antiepileptic drugs (AEDs) represents the mainstay of treatment[1]. In spite of optimal choice and application of currently available AEDs, about 30% of patients are resistant to the standard medication. In such cases, the addition of a second drug to the established monotherapy seems to be the most adequate treatment regimen. The adequate combination of two antiepileptics might be

Correspondence to: Tantisira B, Research Unit of Neurophysiology and Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. Phone: 0-2218-8250, Fax: 0-2255-8227, E-mail address: tboonyon@chula.ac.th

advantageous if it fully controls the seizures and simultaneously, if there are no or inconspicuous adverse effects related with antiepileptics in polytherapy[2].

Centella asiatica (CA) is a plant in Family Umbelliferae, Subfamily Hydrocolyte. Its synonyms are Indian Pennywort (English), Hydrocolyte asiatique (French), Tsubo-kusa (Japanese), Luei Gong Gen (Chinese) etc.[3]. This plant is known in Thai as Bua Bok (บัวบก).

A recent study reported that the aqueous extract of CA decreased the pentylenetetrazole (PTZ)-kindled seizures as evident by decreased seizure score[4]. In addition, it was shown that the alcoholic extract of CA increased the level of GABA, which is a key function of antiepileptic agent, in the central nervous system (CNS) in rats in a dose-dependent manner[3]. From these results, it is likely that CA may be beneficial as adjuvant to AED. Therefore, the present study aimed to investigate an interaction between extract of CA, and some currently available antiepileptic drugs in animal models.

Material and Method

Plant material and preparation of the extracts

CA was purchased from Nakornpathom Province which provides pesticide-free CA, Thailand. The aerial parts were washed with running tap water, dried and coarsely ground. The coarse powder of the plant was macerated with hexane for 7-10 days and filtered. The marc was then remacerated with another portion of hexane until the filtrate was nearly clear. The combined filtrate was concentrated under reduced pressure by rotary evaporator to syrupy mass and then evaporated with water bath until no traces of hexane were left to yield a syrupy crude of hexane fraction. After hexane extraction, the marc was remacerated again and again (totally 3 times) with ethyl acetate, methanol and boiling with water to yield ethyl acetate, methanol and aqueous fraction, respectively, by the same procedure.

Animals

Experiments were performed on male ICR mice weighing 18-25 g. They were obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakornpathom, Thailand. They are acclimatized in the ventilated room of the laboratory at the ambient temperature of 25°C on a natural light/dark cycle for at least one week prior to the experiments. Standard food (C.P. mice food) and tap water are provided *ad libitum*.

All animal care and handling were conducted with the approval of the Ethical Committee of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand.

Administration of the tested substance

Each fraction of CA extract was dissolved in a vehicle (Tween 20:water; 2:5) and given to the animals one hour prior to the injection of PTZ. A gavage tube was used to deliver the substance by the oral route which is the clinically expected route of administration of CA. The volume of administration was kept at 0.2-0.3 ml / 25 g BW of the animal.

Route of administration and pretreated time of AEDs were selected according to their respective time to peak effect previously reported. Phenytoin[5], valproate[6], and gabapentin[7] were given intraperitoneally at 90, 60 and 120 min, respectively, prior to the injection of PTZ.

Determination of the median effective dose (ED_{50}) of *Centella asiatica's* ethyl acetate fraction (EACA) and AEDs against PTZ - induced seizure test (PTZ test)

Seizures were induced by a subcutaneous (sc) injection of PTZ (70 mg/kg BW) in 0.9% sodium chloride. The volumes of injection were

kept at 0.1-0.2 ml / 25 g BW of the animal. The end point was a generalized clonic seizure with loss of righting reflex within 60 minutes after injection of PTZ[6]. Eight mice per dose and five doses were used to establish ED_{50} of the EACA and AEDs to protect against PTZ by the method of Litchfield and Wilcoxon[8].

Determination of the median neurotoxic dose (TD_{50}) of EACA and AEDs (rotarod test)

The rotarod test was modified from the one previously described by Cuadrado et al carried out with a rod of 3.5 cm diameter, rotating at 18 rpm[9]. The end-point to evaluate the minimal neurotoxicity was the inability of the animal to maintain its equilibrium for at least 1 min on the rotating rod in each of three successive trials. Before the experiment, mice were placed on the rotating rod in a training session for 5 minutes. Untreated mice were able to maintain their balance on the rod for several minutes. The EACA, AEDs or combination were administered to each group of mice and they were tested again after a specific period of time. Eight mice per dose and five doses were used to determine the TD_{50} by the method of Litchfield and Wilcoxon[8].

Isobolographic analysis

Isobolographic analysis, the principal method applicable for understanding the real nature of drug interaction, was used to analyse the interactions between EACA and conventional AEDs (phenytoin, valproate, and gabapentin) in the PTZ test in mice. The ED_{50} value (with their 95% confidence limits) for each substance administered alone in the PTZ test was denoted directly from the respective drug-dose effect curve according to Litchfield and Wilcoxon[8]. The ED_{50} of each AEDs in the presence of EACA was also calculated in the same manner using three different dose pairs of equi-effective dose of EACA and respective AEDs[10]. In the present study, the mixtures of EACA with an AED were co-administered in a fixed-ratio combination of 1:1. This means that a combination was composed of $^1/_2$ of the ED_{50} of EACA and $^1/_2$ of the ED_{50} of AED resulting finally in the full ED_{50} of an EACA-AED combination[2]. Substances were delivered in such a way that they were at their time to peak effect during the assessment of effects on the dependent measure.

Isobologram was then constructed from the ED_{50} values of EACA and AEDs when each of them was given alone[11]. Straight line connecting between two ED_{50} values is the theoretical additive line representing dose pairs of EACA and AEDs that are additives in protecting 50 percent of the animals. Theoretical ED_{50} at the fix-ratio of 1:1 was then compared to the observed experimentally combined ED_{50} to estimate the nature of interaction. If the observed experimentally combined ED_{50} lies on the additivity line, then the dose pair having these coordinates is simply additive. On the other hand, the points lying below the line suggests synergistic interaction while the ones above the line would then suggest antagonistic nature of the combination[11,12].

In addition, various combinations of EACA and AEDs used to determine the observed experimentally combined ED_{50} mentioned above were subsequently used for the determination of TD_{50} by rotarod test.

Protective index (PI)

PI, a quantitative measure of the margin between doses producing anticonvulsant (protective) effect and motor toxicity, was calculated by dividing the TD_{50} value by the ED_{50} value. PI of EACA and AEDs in monotherapy and in combination were also calculated.

Data and statistical analysis

For the determination of the ED_{50} and TD_{50}, the dose response curve was plotted between doses (log scale) and probits, which were transformed from percentage of protection. Three to five different doses of each substance were used to construct the dose response curve. The linear regression method was used to fit the curve and the value with confidence limits for 95% probability was then calculated by the method of Litchfield and Wilcoxon[8].

In conjunction with isobolographic analysis which was used to estimate the nature of interaction between EACA and AEDs visually as mentioned above, Student's unpaired *t* test was used to determine statistical significant difference ($p < 0.05$) between the ED_{50} of AEDs in the presence and in the absence of EACA.

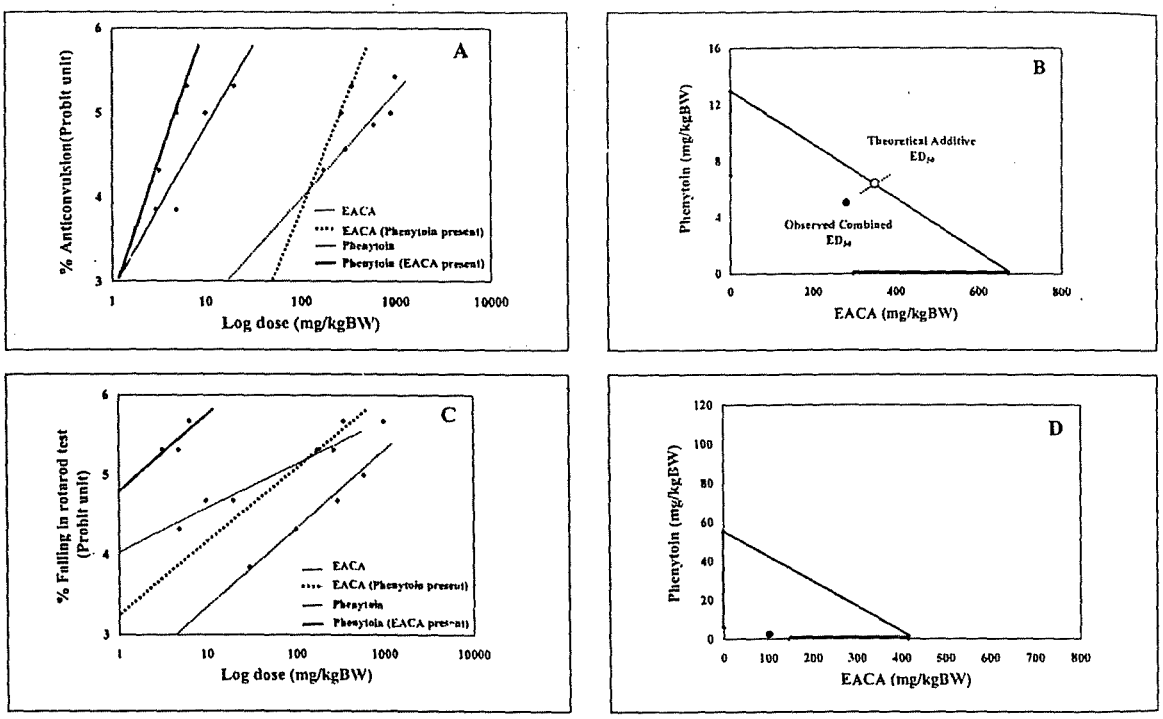


Fig. 1 Dose-response curves and isobolographic representation of EACA and phenytoin on ED_{50} and TD_{50} in the pentylenetetrazole model in mice. A, dose-response curves of anticonvulsant effect of EACA [ED_{50} = 673(299-1515);....], phenytoin [ED_{50} = 13(7-25);—], EACA in the presence of phenytoin [ED_{50} = 277(187-409);....] and phenytoin in the presence of EACA [ED_{50} = 5(3-8);—]. B, isobolographic representation of the interaction between EACA and phenytoin. In this graph the ED_{50} values of EACA and phenytoin are plotted as the x- and y-axis intercepts, respectively. The thicker lines directed from each ED_{50} value toward zero represent the lower 95% confidence limit of each ED_{50} value. The straight line connecting these two points is the theoretical additive line. The open circle that lies on the theoretical additive line represents the calculated theoretical ED_{50} value of the combination, were the interaction additive. The closed circle represents the experimentally observed ED_{50} value of the combination of EACA-phenytoin. In this experiment, the ED_{50} value of the combination of EACA-phenytoin fall below and inside the lower confidence limits of the theoretical additive, suggesting the interaction was synergy. Consistent with this, the experimental ED_{50} value was not significantly different from the theoretical additive ED_{50} value (Student's *t* test, p = 0.7015), indicating that the interaction was additive. C, dose-response curves of minimal neurotoxic effect of EACA [TD_{50} = 415(147-1169);....], phenytoin [TD_{50} = 55(6-491);—], EACA in the presence of phenytoin [TD_{50} = 99(11-854);....] and phenytoin in the presence of EACA [TD_{50} = 2(1-6);—]. D, isobolographic representation of the interaction between EACA and phenytoin. The experimental TD_{50} value was not significantly different from the theoretical additive TD_{50} value (Student's *t* test, p = 0.9203), indicating that the interaction was additive

Results

Anticonvulsant activity and neurotoxicity of CA extract

When four fractions (hexane, ethyl acetate, methanol and aqueous fraction) obtained from sequential extraction of CA were tested, only EACA (but not the other extract) demonstrated anticonvulsant activity. EACA (300, 600, 900 and 1000 mg/kg BW) given orally were able to protect the animals against PTZ-induced convulsion in a dose dependent manner exhibiting the ED_{50} of 673(299-1515) mg/kg BW at the pretreated time of 1 hour. Respective TD_{50} of EACA (30, 100, 300, 600 and 1000 mg/kg BW) assessed by rotarod test was found to be 415(147-1169) mg/kg BW. Subsequently, the EACA was further investigated for its interaction with currently available AEDs, namely phenytoin, valproate and gabapentin.

Isobolographic analysis of interaction between EACA and AEDs

• EACA and phenytoin

ED_{50} of intraperitoneally given phenytoin (3, 5, 10 and 20 mg/kg BW) was found to be 13(7-25) mg/kg BW when given alone and it was decreased to 5(3-8) mg/kg BW in the presence of orally given EACA (Fig. 1A and Table 1). The combination also decreased ED_{50} of EACA from 673(299-1515), when given alone, to 277(187-409) mg/kg BW (Fig.1A). The isobolographic representation of the interaction between EACA and phenytoin (Fig. 1B) illustrated that the observed combined ED_{50} value, constructed from the experimentally calculated ED_{50} of EACA (X axis) and phenytoin(Y axis), lay below the additive line. Thus, synergistic interaction of the combination was suggested. However, no statistical difference was noted between the ED_{50} values of phenytoin in the presence and in the absence of EACA (p= 0.7015). Therefore, the interaction of phenytoin and EACA was simply additive.

As illustrated in Fig. 1C, the combination also decreased TD_{50} of EACA from 415(147-1169), when given alone, to 99(11-854) mg/kg BW. The TD_{50} of phenytoin in the absence of EACA, 55(6-491) mg/kg BW, was not statistically different (p= 0.9203) from its corresponding value in the presence of EACA, 2(1-6) mg/kg BW. Taken together with the visual assessment of isobologram in Fig. 1D, the neurotoxicity of EACA and phenytoin was also additive in nature resulting in the PI of 0.4 for the combination (Table 1).

• EACA and valproate

Similarly, ED_{50} of intraperitoneally given valproate (70, 85, 100 and 150 mg/kg BW) was found to be 104(88-121) mg/kg BW when given alone and it was decreased to 29(21-40) mg/kg BW in the presence of orally given EACA (Fig. 2A and Table 1). The combination also decreased ED_{50} of EACA from 673(299-1515), when given alone, to 201(144-282) mg/kg BW (Fig. 2A). The isobolographic representation of the interaction between EACA and valproate (Fig. 2B) illustrated that the observed combined ED_{50} value lay below the additive line. Thus, synergistic interaction of the combination was likely. However, no statistical difference was noted between the ED_{50} values of valproate in the presence and in the

Table 1. The median effective doses (ED_{50}), median neurotoxic doses (TD_{50}) and protective indices (PI) of phenytoin, valproate and gabapentin given intraperitoneally either alone or in combination with ethyl acetate extract of *Centella asiatica* in mice

Groups	ED_{50} (mg/kg)	TD_{50} (mg/kg)	PI (TD_{50}/ED_{50})
EACA	673(299-1515)	415(147-1169)	0.62
Phenytoin	13(7-25)	55(6-491)	4.23
Phenytoin (with EACA)	5(3-8)	2(1-6)	0.4
Valproate	104(88-121)	247(107-568)	2.38
Valproate (with EACA)	29(21-40)	33(20-54)	1.14
Gabapentin	310(150-638)	719(141-3660)	2.32
Gabapentin (with EACA)	79(41-153)	622(89-4345)	7.87

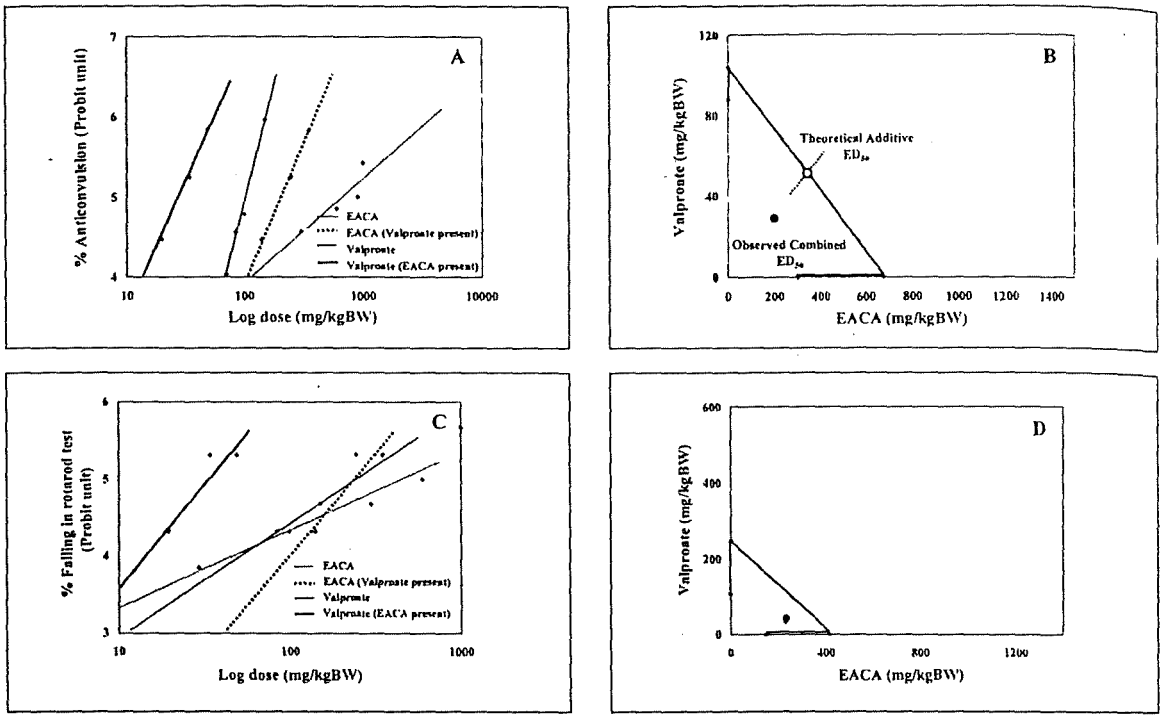


Fig. 2 Dose-response curves and isobolographic representation of EACA and valproate on ED_{50} and TD_{50} in the pentylenetetrazole model in mice. A, dose-response curves of anticonvulsant effect of EACA [ED_{50} = 673(299-1515);....], valproate [ED_{50} = 104(88-121);—], EACA in the presence of valproate [ED_{50} = 201(144-282);....] and valproate in the presence of EACA [ED_{50} = 29(21-40);—]. B, isobolographic representation of the interaction between EACA and valproate. The experimental ED_{50} value was not significantly different from the theoretical additive ED_{50} value (Student's *t* test, p = 0.3399), indicating that the interaction was additive. C, dose-response curves of minimal neurotoxic effect of EACA [TD_{50} = 415(147-1169);....], valproate [TD_{50} = 247(107-568);—], EACA in the presence of valproate [TD_{50} = 231(142-378);....] and valproate in the presence of EACA [TD_{50} = 33(20-54);—]. D, isobolographic representation of the interaction between EACA and valproate. The experimental TD_{50} value was not significantly different from the theoretical additive TD_{50} value (Student's *t* test, p = 0.5524), indicating that the interaction was additive

absence of EACA (p= 0.3399). Therefore, like the results of EACA and phenytoin previously mentioned, the interaction of valproate and EACA was also additive.

In the presence of valproate, the TD_{50} of EACA was decreased from 415(147-1169), when given alone, to 231(142-378) mg/kg BW (Fig. 2C). The TD_{50} of valproate in the absence of EACA, 247(107-568) mg/kg BW, was not statistically different (p= 0.5524) from its corresponding value in the presence of EACA, 33(20-54) mg/kg BW. Taken together with the visual assessment of isobologram in Fig. 2D, the neurotoxicity of EACA and valproate was also additive in nature resulting in the PI of 1.14 for the combination (Table 1).

• **EACA and gabapentin**

In line with the results of phenytoin and valproate, ED_{50} of intraperitoneally given gabapentin (100, 300, 700 and 1000 mg/kg BW) was found to be 310(150-638) mg/kg BW when given alone and it was decreased to 79(41-153) mg/kg BW in the presence of orally given EACA (Fig. 3A and Table 1). The combination also decreased ED_{50} of EACA from 673(299-1515), when given alone, to 183(94-354) mg/kg BW (Fig. 3A). The isobolographic representation of the interaction between EACA and gabapentin (Fig. 3B) illustrated that the observed combined ED_{50} value lay below the additive line. Thus, synergistic interaction of the combination was

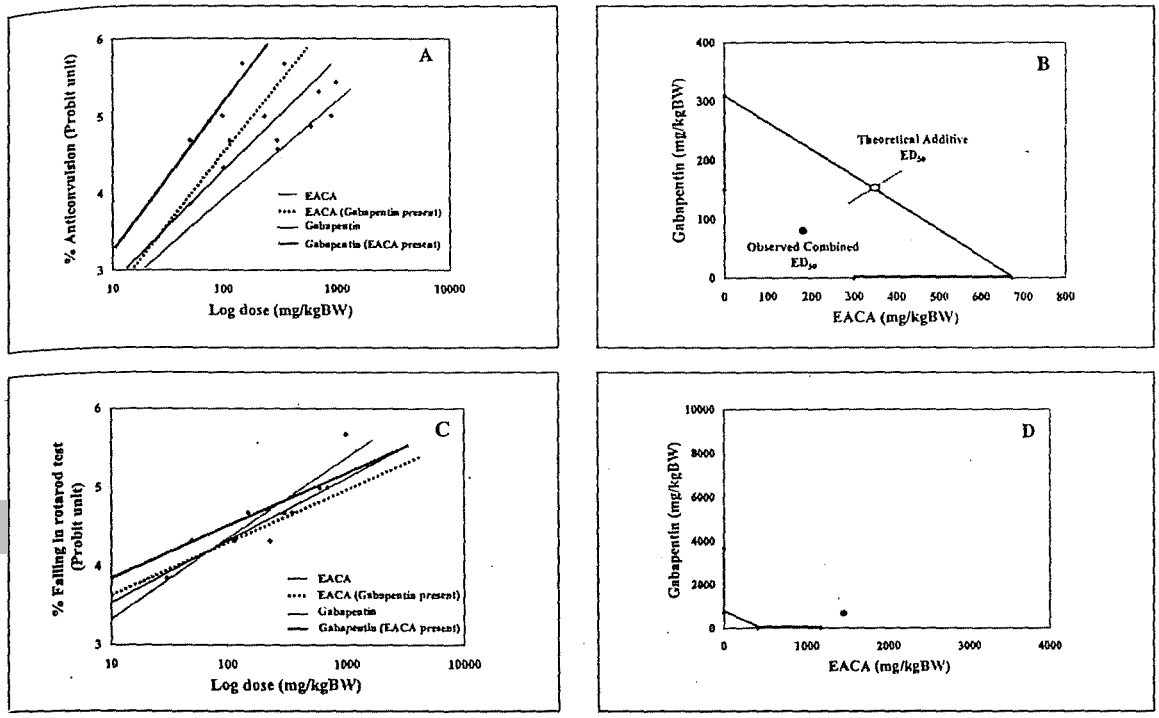


Fig. 3 Dose-response curves and isobolographic representation of EACA and gabapentin on ED_{50} and TD_{50} in the pentylenetetrazole model in *mice*. A, dose-response curves of anticonvulsant effect of EACA [ED_{50} = 673(299-1515);....], gabapentin [ED_{50} = 310(150-638);—], EACA in the presence of gabapentin [ED_{50} = 183(94-354);....] and gabapentin in the presence of EACA [ED_{50} = 79(41-153);—]. B, isobolographic representation of the interaction between EACA and gabapentin. The experimental ED_{50} value was not significantly different from the theoretical additive ED_{50} value (Student's *t* test, p = 0.6846), indicating that the interaction was additive. C, dose-response curves of minimal neurotoxic effect of EACA [TD_{50} = 415(147-1169);....], gabapentin [TD_{50} = 719(141-3660);—], EACA in the presence of gabapentin [TD_{50} = 1449(205-10198);....] and gabapentin in the presence of EACA [TD_{50} = 622(89-4345);—]. D, isobolographic representation of the interaction between EACA and gabapentin. The experimental TD_{50} value was not significantly different from the theoretical additive TD_{50} value (Student's *t* test, p = 0.9952), indicating that the interaction was additive

suggested. However, no statistical difference was noted between the ED_{50} values of gabapentin in the presence and in the absence of EACA (p= 0.6846). Therefore, the additive interaction between gabapentin and EACA was indicated.

In contrast to a decrease of TD_{50} of EACA when it was given in a combination with phenytoin or valproate, the combination between EACA and gabapentin increased TD_{50} of EACA from 415(147-1169), when given alone, to 1449 (205-10198) mg/kg BW (Fig. 3C). The TD_{50} of gabapentin in the absence of EACA, 719(141-3660) mg/kg BW, was not statistically different (p= 0.9952) from its corresponding value in the presence of EACA, 622(89-4345) mg/kg BW. Therefore, the antagonistic interaction of neurotoxicity between gabapentin and EACA which was visually suggested from isobologram in Fig. 3D was not accepted. The neurotoxicity of EACA and gabapentin could be just as additive as the other's. However, in contrast to the results of previously described combination, the combination between gabapentin and EACA increased protective index of gabapentin about 3 times from 2.32 in monotherapy to 7.87 in combination.

Discussion

Clinically combination of AEDs to control refractory epilepsy is advantageous if it fully controls the seizure and simultaneously causing no synergy

of adverse effects. There is increasing evidence suggesting that in addition to a consideration of mechanism of AED, animal experiments using isobolographic analysis could also be beneficial to predict clinical outcome[2].

Isobolographic analysis in the present study indicates that the combination of a herbal extract from CA can enhance anticonvulsant effect of all AEDs tested. A distinct additive effect was observed in all combinations; ED_{50} of phenytoin, valproate and gabapentin in combination with EACA were approximately 38%, 28% and 25% of their corresponding value, when being given alone.

The adverse effects of respective combination on motor coordination, estimated by rotarod test, were also increased as all the combined TD_{50} values were decreasing. However, interestingly, the protective index (PI) which is the ratio between the neurotoxic dose and effective dose of gabapentin in combination with EACA was markedly increased (7.87 vs 2.32), whereas respective values for phenytoin and valproate were decreased. Thus, a combination of gabapentin and EACA seemed to offer not only a higher protection of animals against PTZ induced convulsion but also a broader margin between anticonvulsant dose and neurotoxic dose as well. Though in the present study, gabapentin was given intraperitoneally, it can be anticipated that an addition of EACA into patients taking clinically available gabapentin tablets would result in better control of the seizure in parallel with a lesser degree of motor impairment than those exhibited by gabapentin alone. Additive effect of EACA was also demonstrated when it was combined with phenytoin or valproate. However, the advantage in these cases seemed to be offset by the finding that their respective protective indices were also decreased.

It is difficult to explain the underlying mechanism of the interaction observed. Firstly, this is the first evidence to demonstrate the additive anticonvulsant effect of currently available AEDs with CA's extract in which the active principles accounted for its anticonvulsant were not yet identified. Secondly, drug interaction of concurrently administered AEDs can occur by pharmacodynamic as well as pharmacokinetic mechanisms[13] and none of them could be ruled out by isobolographic analysis[11]. Though, different routes of administration of EACA and AEDs used in the present study make the interaction by enhancing absorption of AEDs unlikely, some other pharmacokinetic interaction should be further investigated. Furthermore, the fact that additivity of EACA was observed on phenytoin, valproate and gabapentin which are AEDs of different mechanisms of action and different pharmacokinetic profiles[14], thus, no clues on the possible mechanism of interaction can be anticipated.

Considering that CA is a traditional herbal medicine which is safe and easy to cultivate[3], results obtained in the present studies strongly support further investigation aiming to develop CA as an adjunctive medication in epileptic patients.

Acknowledgements

The authors wish like to thank the Graduate School, Chulalongkorn University and the Research Council of Thailand for providing the research fund and the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for providing facilities for this project. The scholarships from the Thai Government and the Phramongkutklao Hospital Foundation, Thailand are also greatly appreciated.

References

1. White HS. Animal models of epileptogenesis. Neurology 2002; 59: S7-S14.
2. Luszczki JJ, Czuczwar SJ. Isobolographic and subthreshold methods in the detection

of interactions between oxcarbazepine and conventional antiepileptics-a comparative study. Epilepsy Res 2003; 56: 27-42.
3. Brinkhaus B, Lindner M, Schuppan D, Hahn EG. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. Phytomedicine 2000; 7: 427-48.
4. Gupta YK, Veerendra Kumar MH, Srivastava AK. Effect of *Centella asiatica* on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. Pharmacol Biochem Behav 2003; 74: 579-85.
5. Masereel B, Wouters J, Pochet L, Lambert D. Design, synthesis, and anticonvulsant activity of 1-(pyrid-3-ylsulfonamido)-2-nitroethylenes. J Med Chem 1998; 41: 3239-44.
6. Tantisira B, Tantisira MH, Patarapanich C, Sooksawate T, Chunngam T. Preliminary evaluation of the anticonvulsant activity of a valproic acid analog: N-(2-propylpentanoyl) urea. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 1997; 97: 151-64.
7. TM Warner-Lambert Company Pfizer Canada Inc. Antiepileptic agent: neurontin (gabapentin) Product Monograph 2001; 1-24.
8. Litchfield JT, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J Pharmacol Exp Ther 1949; 96: 99-113.
9. Cuadrado A, Cuevas IL, Valdizan EM, Armijo JA. Synergistic interaction between valproate and lamotrigine against seizures induced by 4-aminopyridine and pentylenetetrazole in mice. Eur J Pharmacol 2002; 453: 43-52.
10. Fairbanks CA, Stone LS, Kitto KF, Nguyen HO, Posthumus IJ, Wilcox GL. $\propto 2C^{-}$ adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. J Pharmacol Exp Ther 2002; 300: 282-90.
11. Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. J Pharmacol Exp Ther 2001; 298: 865-72.
12. Tallarida RJ. Statistical analysis of drug combinations for synergism. Pain 1992; 49: 93-7.
13. Anderson GD. A mechanistic approach to antiepileptic drug interactions. Ann Pharmacother 1998; 32: 554-63.
14. Jacob MP, Fischbach GD, Davis MR, Dichter MA, Dingledine R, Lowenstein DH, et al. Future directions for epilepsy research. Neurology 2001; 57: 1536-42.

ฤทธิ์กันชักและพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของสารสกัดบัวบก (*Centella asiatica*) ในหนูถีบจักร

อนุสรา วัฒนจันทร์ PhD[1], มยุรี ตันติสิระ PhD[2], บุญยงค์ ตันติสิระ PhD[2] และ Hiroshi Watanabe PhD[3]

[1]ภาควิชาสรีรวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า กรุงเทพ 10400, [2]หน่วยปฏิบัติการวิจัยทางประสาทสรีรวิทยา และประสาทเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพ 10330, [3]Department of Pharmacology, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, 930-0194, Japan.

หลักการและเหตุผล : โรคลมชักพบได้ประมาณ 1% ของประชากรไทย ในผู้ป่วยที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้โดยวิธีการผ่าตัด การให้ยากันชักนับเป็นวิธีหลักในการให้การรักษา แต่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ต้องได้รับยาติดต่อกันเป็นระยะเวลานานซึ่งอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ มีรายงานพบว่าในหนูขาว สารสกัดแอลกอฮอล์ของบัวบก สมุนไพรพื้นบ้านของไทย มีฤทธิ์ในการเพิ่มการหลั่งสารสื่อประสาทกาบ้า ซึ่งถือเป็นกลไกสำคัญในการต้านการชัก

วัตถุประสงค์ : เพื่อศึกษาฤทธิ์กันชักและความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางของสารสกัดหยาบและสารสกัดบัวบกซึ่งได้จากการสกัดสารสกัดหยาบบัวบกด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วต่างกันโดยลำดับ

วิธีการศึกษา : ศึกษาฤทธิ์กันชักของสารสกัดชนิดต่างๆในหนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการชักด้วยกระแสไฟฟ้าสูงสุด (MES; 50mA, 50Hz, 0.2 วินาที) หรือสารเพนทีลีนเตตราซอล (PTZ 70 มก/กก น้ำหนักตัว; sc) และศึกษาความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางด้วยวิธี rotarod การเสริมฤทธิ์ยานอนหลับ ผลต่อการเคลื่อนไหว และขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิต โดยการให้สารทดสอบขนาดต่างๆแก่สัตว์ทดลองด้วยการฉีดเข้าช่องท้องหรือการป้อนทางปากในเวลาต่างๆ ก่อนการทดสอบฤทธิ์หรือความเป็นพิษ

ผลการศึกษา : สารสกัดหยาบเอธานอลสามารถกันชักได้เฉพาะการชักที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารเคมี และเมื่อให้โดยการป้อนเท่านั้น โดยจะออกฤทธิ์ได้สูงสุดเมื่อให้สารสกัดก่อนการฉีด PTZ เข้าใต้ชั้นผิวหนังเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อสกัดแยกสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ จะพบฤทธิ์กันชักเฉพาะในส่วนที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตท (EACA) ซึ่งจะมีค่ากันชักในสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (ED50) เท่ากับ 673 มก/กก น้ำหนักตัว และมีขนาดความเป็นพิษต่อหนูถีบจักรจำนวนครึ่งหนึ่ง (TD50) เมื่อประเมินด้วยวิธี Rotarod เท่ากับ 415 มก/กก น้ำหนักตัว ส่งผลให้ค่า protective index (TD50/ED50) เท่ากับ 0.62 อย่างไรก็ตามสารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทนี้มีความปลอดภัยในการใช้สูงมาก เนื่องจากพบว่าขนาดของสารสกัด EACA ที่จะทำให้สัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่งเสียชีวิต (LD50) นั้นสูงกว่า 5,000 มก/กก น้ำหนักตัว ดังนั้นค่า relative safety margin (LD50/ED50) จึงมีค่ามากกว่า 7.43 ไม่พบว่าสารสกัด EACA สามารถเสริมฤทธิ์กับยานอนหลับในกลุ่มบาร์บิตูเรท แต่ในขนาด 700 หรือ 1,000 มก/กก น้ำหนักตัว จะกดการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรเมื่อทดสอบด้วย locomotor activity Test.

สรุป : จากการที่พบว่าสารสกัด EACA ที่ให้โดยการป้อนมีฤทธิ์กันการชักที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารเพนทีลีนเตตราซอล และมีความปลอดภัยในการใช้สูง จึงควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อแยกสารสำคัญที่มีฤทธิ์กันชักออกจากสารที่มีพิษต่อระบบประสาทส่วนกลาง เพื่อพัฒนาสารสกัดบัวบกไปใช้เป็นสารเสริมฤทธิ์ (adjunctive agent) กับยากันชักต่อไป

Anticonvulsant activity of *Centella asiatica*'s ethyl acetate fraction in animal model of epilepsy

Anusara Vattanajun PhD[1], Mayuree H. Tantisira PhD[2], Boonyong Tantisira PhD[2] and Hiroshi Watanabe PhD[3]

[1]Department of Physiology, Phramongkutklao College of Medicine, Bangkok 10400, Thailand. [2]Research Unit of Neurophysiology and Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
[3]Department of Pharmacology, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, 930-0194, Japan.

Purpose: The anticonvulsant activity of *Centella asiatica*'s ethyl acetate fraction (EACA) against pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizure, neurotoxicity studies as well as its possible mechanisms on electrophysiological changes were investigated.

Methods: The median effective dose, lethality, rotarod test, locomotor activity and barbiturate potentiation test in ICR mice were used to evaluate toxicity of EACA. Kinetic study of $GABA_A$ receptor-mediated currents of hippocampal pyramidal neuron using whole cell patch-clamp technique was also carried out.

Results: Orally given EACA, produced anticonvulsant activity against PTZ test in mice exhibiting the median effective dose (ED_{50}) of 673(299-1575) mg/kg BW, whereas the median lethal dose (LD50) was found to be higher than 5,000 mg/kg BW. Based on the results observed, the relative safety margin (LD50/ED50) was, therefore, more than 7.43. The median neurotoxic dose (TD50), as established by the rotarod test, was found to be 415(147-1169) mg/kg BW. Thus, the protective index (TD50/ED50) of EACA was 0.62. The depressant effect of EACA, in the doses of 700 and 1,000 mg/kg BW, on locomotor activity was significantly different from those of vehicle and NaCl. However, its effect on prolongation of barbiturate sleeping time was not significantly different from the effect of vehicle. By an electrophysiological study on $GABA_A$ receptor current, a slight potentiation of the GABA-induced current was noted when EACA at low concentration of 0.1 – 3 µg/ml were co-applied with GABA. However, the GABA-induced current was partially blocked at higher concentration of EACA (50 µg/ml).

Conclusion: Anticonvulsant dose of EACA produced some neurotoxicity on motor coordination and depression of the central nervous system as those exhibited by most antiepileptic drugs. However, in terms of the relative safety margin, it seemed to be safer. Its anticonvulsant activity might be partly related to a potentiation of GABA-induced current. Our findings suggest the potential of EACA to be further developed as adjunctive medication for epileptic patients providing that active substances which seem to be numerous and exhibiting different pharmacological profiles are separated and identified.

Keywords: *Centella asiatica*, anticonvulsant activity

แบบรายงานความก้าวหน้าของโครงงานวิจัย (Research Project)

.....

1. ชื่อโครงงานวิจัย (โครงการย่อยที่ 4)

(ภาษาไทย) ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่อประสาทกรดอะมิโนในหนูขาว

(ภาษาอังกฤษ) Effects of standard extract of *Centella asiatica* on cortical amino acid neurotransmitters

2. รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และEmail

2.1 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทร. 02-2188324

2.2 รองศาสตราจารย์ ดร. บุญยงค์ ตันติสิระ
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์: 02-2188250

2.2 พ.ต. หญิงอนุสรา วัฒนจันทร์ วิทยาลัยแพทย์พระมงกุฎเกล้า
ภาควิชาสรีรวิทยา วิทยาลัยแพทย์พระมงกุฎเกล้า
โทรศัพท์ : 02- 354-7752

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2549 จำนวน 779,700 บาท
4. เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2548 ถึง มิถุนายน 2549
5. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

5.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยโดยสรุป

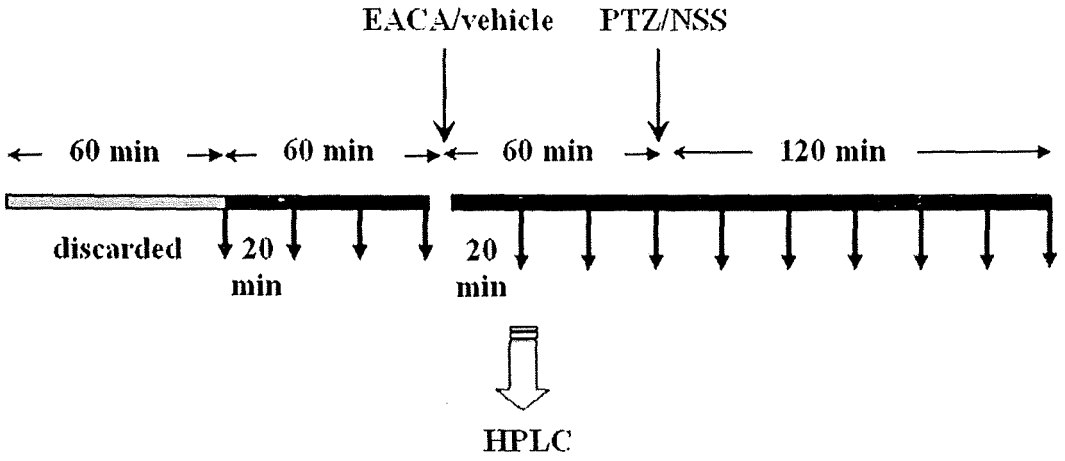
เพื่อศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อปริมาณสารสื่อประสาท amino acid ในสมองทั้งชนิดกระตุ้น และยับยั้ง โดยวิธี microdialysis ในหนูขาวที่เคลื่อนไหวได้โดยอิสระ เพื่อเป็นข้อมูลอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ต้านชักของสารสกัดบัวบก

5.2 การดำเนินการวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการวิจัย

จากผลการทดสอบในหนูปกติ (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีพ.ศ. 2548) ที่พบว่าสารสกัดบัวบก (EACA) ในขนาด 700 มก/กกที่ให้โดยการป้อนทางปาก ไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ GABA แต่จะลดระดับของ glutamate, aspartate และ glycine ในสมองส่วนhippocampus ของ freely moving rats แต่เมื่อเพิ่มขนาดของสารสกัดขึ้นเป็น 1, 000 มก/กก กลับพบว่า amino acid neurotransmitter ชนิด

เดียวที่เพิ่มขึ้น คือ aspartate (excitetatory neurotransmitter) ในขณะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆกับ amino acid neurotransmitters ชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงได้เลือก EACA ในขนาด 700 มก/กกมาทำการทดสอบการต้านฤทธิ์ของ Pentylenetettrazol (PTZ) ซึ่งใช้เหนี่ยวนำการชักสัตว์ทดลอง

จากการทดสอบผลสารสกัดEACA ที่ให้แก่ Freely moving rats โดยการป้อนทางปากก่อนที่จะได้รับสาร Pentylenetetrazole ในขนาด 60 มก/กก โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังตามแผนการทดลองในรูปที่ 1โดยแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองออกเป็น 4 กลุ่มซึ่งได้รับการ pretreatment และ pentylenetetrazole ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1



รูปที่ 1 แผนผังแสดงลำดับการทดสอบฤทธิ์ต้านชักและผลการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทชนิดกรดอมิโนของสมองส่วน hippocampus ของสารสกัดบัวบกใน freely moving rats ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ชักโดยสาร Pentylenetetrazole (60 มก/กก Sc.)

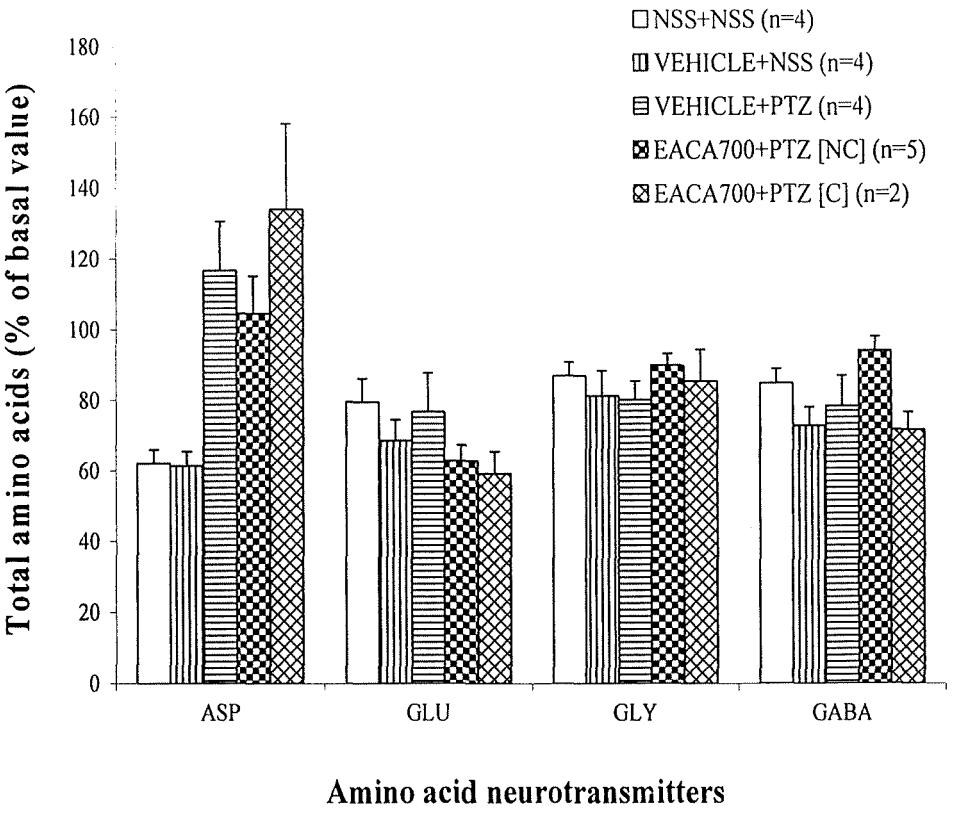
กลุ่มที่	Pretreatment (p.o)	PTZ/NSS (Sc.)
1	NSS	NSS
2	Vehicle(Tween20/water; 2:5)	NSS
3	Vehicle(Tween20/water; 2:5)	PTZ 60 มก/กก
4	EACA 700 มก/กก	PTZ 60 มก/กก

ตารางที่ 1 การแบ่งกลุ่มหนูขาวใน Microdialysis experiments เพื่อทดสอบผลของสารสกัดบัวบก (EACA)ใน vehicle (Tween20/water; 2:5) ต่อสารสื่อประสาทชนิดกรดอมิโนของสมองส่วน Hippocampus ใน freely moving rats ที่ได้รับสาร pentylenetetrazole

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสื่อประสาททั้ง 4 ชนิด (glutamate,aspartate, glutamate และ GABA) จาก microdialysis probe ที่ฝังไว้ที่สมองส่วน hippocampus ด้วย HPLC พบว่า ในขณะที่ระดับของสารสื่อประสาททั้ง 4 ชนิดในหนูกลุ่มที่ 2 (vehicle + NSS) ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ 1 (NSS + NSS) อย่างมีนัยสำคัญ หนูกลุ่มที่ 3 (vehicle + PTZ) จะมีอาการชักเกิดขึ้นทุกตัวและมีระดับของ aspartate สูงกว่าหนูกลุ่มที่ 2 (vehicle + NSS) อย่างมีนัยสำคัญ การได้รับสารสกัดบัวบก (EACA 700 มก/กก) ก่อนจะได้รับ PTZ จะช่วยป้องกันการชักในหนูกลุ่มที่ 3 (EACA + PTZ) ได้ 5 ตัวแต่ไม่สามารถป้องกันได้ในหนู 2 ตัว

ในหนูกลุ่มที่ EACA สามารถ protect ฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้ชักจาก PTZ (ไม่แสดงการชัก)ได้นั้น ระดับของ excitatory amino acid transmitters สองชนิด คือ glutamate (ไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างจากกลุ่ม vehicleเมื่อได้รับ PTZ) และ aspartate (เพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่ม vehicleเมื่อได้รับ PTZ) จะลดลงในขณะที่ inhibitory amino acid neurotransmitter (glycine และ GABA) จะเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ PTZ (กลุ่มที่ 3) ถึงแม้การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็มีความเป็นไปได้ที่การเปลี่ยนแปลงโดยรวมของสารสื่อประสาทชนิดกรดอมิโนทั้ง 4 ชนิดจะเป็นกลไกอย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการปกป้องการชักจาก PTZ ในหนูทั้ง 5 ตัวนี้ และจะพบการเปลี่ยนแปลงของ glutamateในลักษณะเดียวกันนี้ ในหนูอีก 2 ตัวที่ EACA ไม่สามารถปกป้องฤทธิ์เหนี่ยวนำการชักจาก PTZ ได้ แต่สิ่งที่แตกต่างคือระดับ aspartate ในหนูกลุ่มนี้จะไม่ลดลงแต่กลับจะเพิ่มขึ้นมากกว่าที่พบในหนูกลุ่มที่ 3 ในและไม่พบการเพิ่มขึ้นของ inhibitory neurotransmitters ทั้ง glycine และ GABA แต่อย่างใด เช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงในหนูกลุ่มที่ EACA สามารถป้องกันการชักได้ อาจอธิบายได้ว่าฤทธิ์ต้านชัก

ของสารสกัดบัวบก (EACA)ที่พบใน whole animal modelน่าจะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงโดยรวมของสารสื่อประสาทที่มีฤทธิ์ตรงข้ามกันมากกว่าการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทเพียงตัวใดตัวหนึ่ง (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ผลของสารสกัดบัวบก (EACA 700 มก/กก, p.o.) ต่อสารสื่อประสาทชนิดกรดอมิโนของสมองส่วน hippocampus ของ freely moving rats ที่ได้รับสาร Pentylenetetrazole (60 มก/กก, Sc.)

5.3 รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับงานวิจัยที่ดำเนินการไปแล้ว โดยให้แนบบทความผลงานที่มีการเผยแพร่ (1 เรื่อง)

Ausara Vattanajun, Mayuree H. Tantisira, Boonyong Tantisira and Hiroshi Watanabe : Effects of CEntella Asiatica's Ethyl Acetate Fraction on Some Hippocampal Amino Acid Neurotransmitter Levels in Pentylenetetrazole Treated Freely Moving Rats . เวชสารแพทย์ทหารบกปีที่ 59 ฉบับพิเศษ (1) พฤศจิกายน 2549

(ได้รางวัลที่ 1 ในการประกวดผลงานวิจัยเป็นภาษาอังกฤษ (Oral presentation)ในการประชุมวิชาการพระมงกุฎเกล้าครั้งที่ 34 วันที่ 22-24 พฤศจิกายน 2549 ณ ห้องประชุมใหญ่ อาคารพระมงกุฎเกล้าเวชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า)

5.4. งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มดำเนินการเป็นเงินทั้งสิ้น779,700บาท

5.5. งานตามแผนงานโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ทุกขั้นตอนตามที่เสนอในโครงการ

5.6 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา และหรืออุปสรรค (ถ้ามี)

ได้เปลี่ยน convulsant จาก pilocarpine มาเป็น pentylenetetrazol เพื่อให้สอดคล้องกับฤทธิ์ต้านชักในโมเดลของ PTZ พบว่าผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี Microdialysis ให้ผลที่สอดคล้องและอาจอธิบายผลที่พบใน whole animal ว่าไม่พบฤทธิ์ที่ต้านชักที่ชัดเจนในfraction ที่แยกออกมาได้ 17 fractions เนื่องจากสารสกัดมีการออกฤทธิ์ต่อทั้ง excitatory และ inhibitory neurotransmitters

(ลายเซ็น)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ เจียรณ์มงคล)

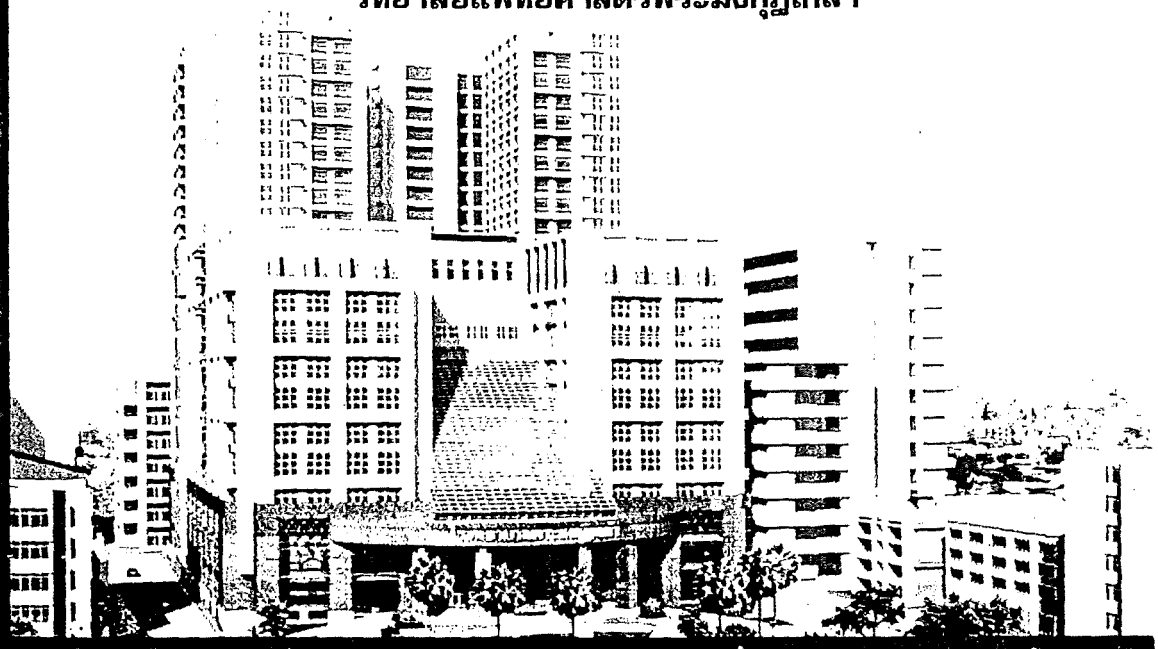
หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 29 สิงหาคม พ.ศ. 2550

การประชุมวิชาการเฉลิมพระเกียรติ
ในโอกาสฉลองสิริราชสมบัติครบ ๖๐ ปี
ของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ
ภูมิพลอดุลยเดชมหาราช

การประชุมวิชาการพระมงกุฎเกล้า ครั้งที่ ๓๔
Medicine in 2007 : เวชศาสตร์ก้าวหน้า

๒๒-๒๔ พฤศจิกายน ๒๕๔๙
ณ ห้องประชุมใหญ่ อาคารพระมงกุฎเกล้าเวชวิทยา
วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า



ISSN 0125-7

เวชสาร
แพทย์ทหารบก
Royal Thai Army Journal

พิมพ์ระหว่าง พ.ศ. 2491-2530 ในนาม "วิทยาสารเสนารักษ์"
ปีที่ 59 ฉบับพิเศษ (1) พฤศจิกายน 2549

บทคัดย่อที่ 26

Effects of Centella Asiatica's Ethyl Acetate Fraction on Some Hippocampal Amino Acid Neurotransmitter Levels in Pentylenetetrazole Treated Freely Moving Rats

Anusara Vattanajun, Mayuree H. Tantisira*, Boonyong Tantisira* and Hiroshi Watanabe**

*Department of Physiology, Phramongkutklao College of Medicine; *Research Unit of Neurophysiology and Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University; **Department of Pharmacology, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University*

Purpose: In vivo microdialysis experiments on pentylenetetrazole (PTZ) treated freely moving rats were performed to search for the possible effects of the ethyl acetate fraction of Centella asiatica (EACA) on hippocampal amino acid neurotransmitter levels that may underlie its anticonvulsant activity.

Methods: The stereotaxic surgical procedures were used for the transverse implantation of microdialysis probe onto the hippocampus of male Wistar rats. On the day of microdialysis, the probe was perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF). The dialysate collected during the equilibrium period of 60 minutes was discarded before the first sample was collected. The dialysate was collected at 20 minutes interval, 60 minutes before and after the administration of vehicle or EACA. Then PTZ or saline was injected and the dialysate was collected for 2 hours. Amino acid levels were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) technique.

Results: The administration of PTZ 60 mg/kg BW that demonstrated convulsion in all of the animal in vehicle+PTZ treated group showed significant increment of amino acid level that of aspartate in the dialysate ($p < 0.05$), while the other amino acids were not affected. Pretreatment of EACA 700 mg/kg BW by oral route could protect most of the animal against PTZ. In this group, the excitatory amino acid neurotransmitters (both aspartate and glutamate) were gradually decreased while the inhibitory amino acid neurotransmitters (glycine and GABA) tended to increase when compared to vehicle+PTZ treated group, however, none of them was statistical significance.

Conclusion: The present studies demonstrated that anticonvulsant activity of EACA against PTZ might result from a small decrease of hippocampal excitatory amino acid neurotransmitters (both aspartate and glutamate), in conjunction with a slight increase of inhibitory amino acid neurotransmitters (glycine and GABA). However, some other anticonvulsive mechanism of EACA than those observed herein remain to be further investigated.

Key words: ● *Centella* ● *Pentylenetetrazole*

แบบรายงานความก้าวหน้าของโครงงานวิจัย (Research Project)

.....

1. ชื่อโครงงานวิจัย (โครงการย่อยที่ 5)

   ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อตัวรับสารสื่อประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้นบนผนังเซลล์ไข่กบ (Xenopus oocytes)

   Effects of Standard Extract of *Centella asiatica* on Neurotransmitter Receptors expressed on Xenopus *laevis* oocytes

2. รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และEmail

   2.1 รองศาสตราจารย์ ดร. บุญยงค์ ตันติสิระ
   ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   โทรศัพท์: 02-2188341

   2.4 อาจารย์ เพ็ญพิมล พงศ์พันธุ์ภาณี
   ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   โทรศัพท์: 02-2188341

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2549 จำนวน 609,500 บาท
4. เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2548 ถึง กันยายน 2549
5. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

   5.1 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย (โดยสรุป)

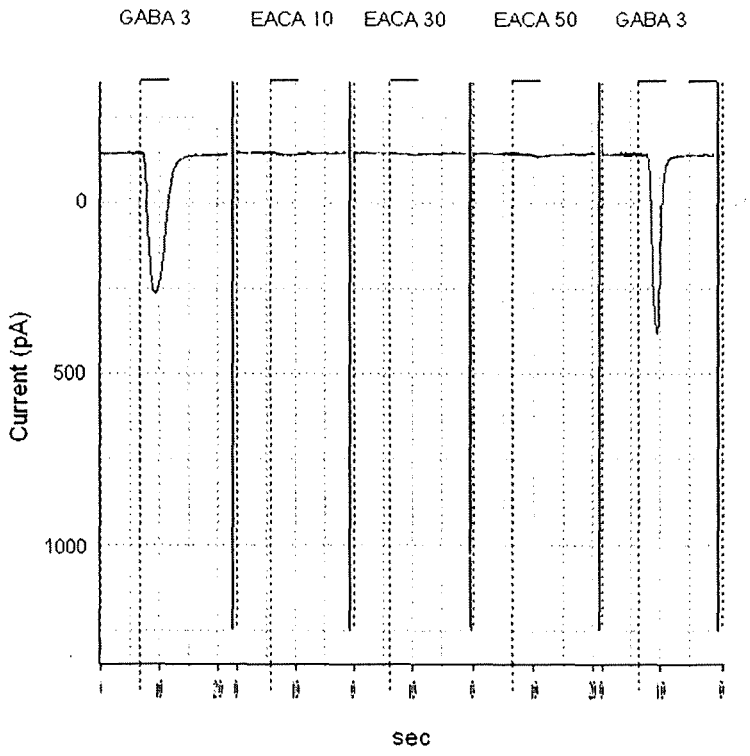
   เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ของสารสกัดบัวบก ต่อตัวรับ เอ็นเอ็มดีเอ และตัวรับกาบา$_{เอ}$ ที่แสดงออกบนเซลล์ไข่กบ (*Xenopus laevis*)

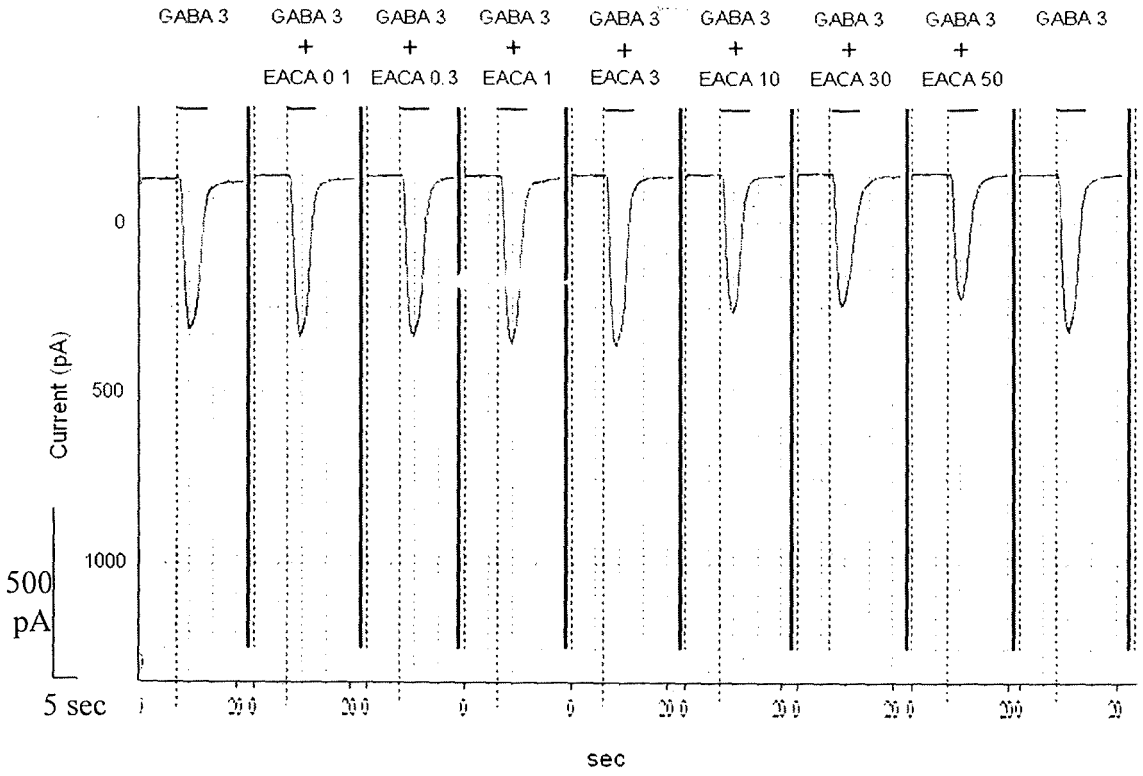
   5.2 การดำเนินการวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการวิจัยเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

   ผลของสารสกัดบัวบก (EACA)ต่อตัวรับ GABA

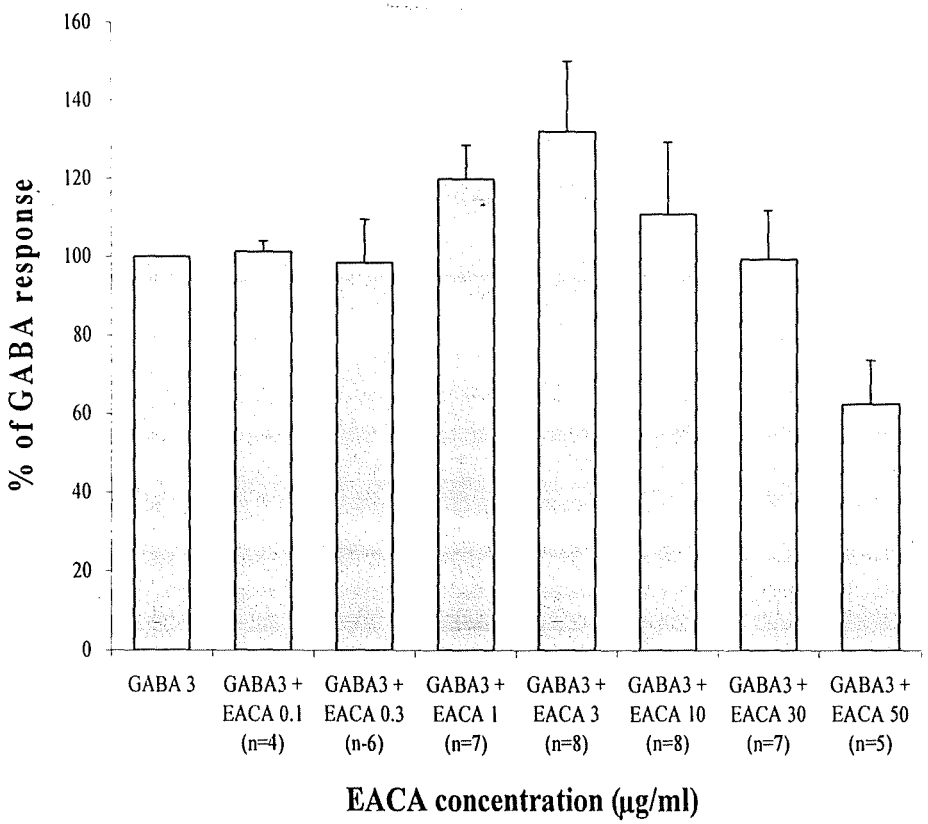
   สารสกัดบัวบก (EACA) ในขนาด 10, 30 and 50 μg/ml แต่เพียงอย่างเดียว ไม่มีผลทำให้ hippocampal membrane current เกิดการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด(รูปที่ 1) แต่ถ้าให้ร่วมกับ GABA (3 μM) พบว่า สารสกัดบัวบกในขนาด 0.1 – 3 μg/ml จะเสริมฤทธิ์กับ GABA current โดยมี maximal potentiation ที่ 3 μg/ml (รูปที่ 2) ในขณะที่ สารสกัดบัวบกในขนาดที่สูงขึ้น (EACA 10, 30 and 50 μg/ml) จะยับยั้งการเกิด GABA current ในลักษณะที่แปรตามความเข้มข้น โดยแสดงการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้นของสารสกัดบัวบก= 50 μg/ml(รูปที่ 3)

รูปที่ 1 Tracing แสดงผลของ GABA(3 μM)และ สารสกัดบัวบก (EACA10, 30 and 50 μg/ml) ต่อ hippocampal membrane current เส้น horizontal bar แสดงเวลาที่ให้สารทดสอบ (~5 sec).





รูปที่ 2 Tracing แสดงผลของสารสกัดบัวบก (EACA0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 and 50 μg/ml) ต่อ hippocampal GABA current เส้น horizontal bar แสดงเวลาที่ให้สารทดสอบ (~5 sec).



* $P < 0.05$ denotes statistically significant difference from the other group

รูปที่ 3 ผลของสารสกัดบัวบกในการเสริมฤทธิ์(0.1- 3 µg/ml) และต้านฤทธิ์ (10 – 50 µg/ml) ต่อ hippocampal $GABA_A$ receptor current (MEAN ± S.E.M.).

5.3 รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว โดยให้แนบบทความผลงานความก้าวหน้าทางวิชาการของแผนงานวิจัยระหว่างดำเนินการ ที่เคยพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้ว หรือบทความที่จะนำเผยแพร่ทางสื่อมวลชนได้ (ถ้ามี)

5.4 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มดำเนินการเป็นเงินทั้งสิ้น 609,500บาท

5.5 งานตามแผนงานโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ศึกษาผลของสารสกัดบัวบกต่อตัวรับกลูตาเมทและศึกษาผลของ GABA agonist อื่นต่อ hippocampal membrane current

คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา และหรืออุปสรรค (ถ้ามี)

5.5.1 เนื่องจากโครงการนี้ถูกตัดงบประมาณในส่วนชุดบันทึกสัญญาณไฟฟ้าจากไข่กบ ซึ่งภายหลังได้งบประมาณจากเงินอุดหนุนหลักสูตรปริญญาเอกจากสกอ.จัดซื้อ Gene clamp ซึ่งเป็นอุปกรณ์หลักไปแล้วแต่ยังขาดอุปกรณ์เสริมอีกบางส่วน ดังนั้นจึงได้ดำเนินการศึกษาในส่วนนี้ไปก่อนโดยการใช้ Patch clamp เทคนิก ซึ่งสามารถใช้ศึกษาผลของสารทดสอบต่อตัวรับ GABA ได้เช่นกัน

5.5.2 เนื่องจากผลการทดสอบจากโครงการข้างต้นยังไม่สามารถกำหนดสารมาตรฐานได้ จึงยังไม่มีผลการทดสอบของสารมาตรฐาน

(ลายเซ็น)

(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 29 สิงหาคม 2550

แบบรายงานความก้าวหน้าของโครงงานวิจัย (Research Project)

.....

1. ชื่อโครงงานวิจัย (โครงการย่อยที่ 6)

ความเป็นพิษเรื้อรังของสารสกัดมาตรฐานบัวบก

Chronic Toxicity of Standard Extract of *Centella asiatica*

2. รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และEmail

2.1 เภสัชกรหญิง ปราณี ชวลิตธำรง

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ซอย บำราศนราดูร ถนนติวานนท์ จ. นนทบุรี

2.2 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณ์มงคล

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทร: 02-2188325

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2549 จำนวน 537,900 บาท
4. เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2548 ถึง กันยายน 2549
5. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

5.1 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย (โดยสรุป)

เพื่อศึกษาถึงความปลอดภัยของสารสกัดแยกส่วนของบัวบก โดยการประเมินจากความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดดังกล่าว

5.2 การดำเนินการวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการวิจัยเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

5.3 รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

มีความพร้อมที่จะดำเนินการแล้ว แต่จากผลงานวิจัยในโครงการแรกๆไม่สามารถระบุถึง marker ที่มีฤทธิ์กันชักเพื่อกำหนดเป็นสารสกัดมาตรฐาน ดังนั้นจึงยังไม่มีข้อมูลของสารสกัดมาตรฐาน

5.4 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มดำเนินการ เป็นเงินทั้งสิ้น537,900 บาท

5.5 งานตามแผนงานโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ทุกขั้นตอนตามที่เสนอ

5.6 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหาและอุปสรรค

ยังไม่มีสารสกัดมาตรฐานที่มีฤทธิ์กันชัก

ลงชื่อ

(รศ.ดร. มยุรี ตันติสิระ)

ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

แทน หัวหน้าโครงการย่อยที่ 6

แบบรายงานความก้าวหน้าของโครงงานวิจัย (Research Project)

.....

1. ชื่อโครงงานวิจัย (โครงการย่อยที่ 7)

   (ภาษาไทย) ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในหนูขาว

   (ภาษาอังกฤษ) Effects of Standard Extract of *Centella asiatica* on Hepatic Cytochrome P450 in Rats

2. รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และEmail

   2.1 รองศาสตราจารย์ ดร. พตท.(ญ) สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ

   ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   โทรศัพท์: 02-2188323-5 โทรสาร: 02-2188324

   lsomsong@chula.ac.th

   2.2 รองศาสตราจารย์ นวลศรี นิวัติศัยวงศ์

   ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

   โทรศัพท์: 02-2188313

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2549 จำนวน 753,500 บาท

4. เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2548 ถึง กันยายน 2549

5. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

   5.1. วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย (โดยสรุป)

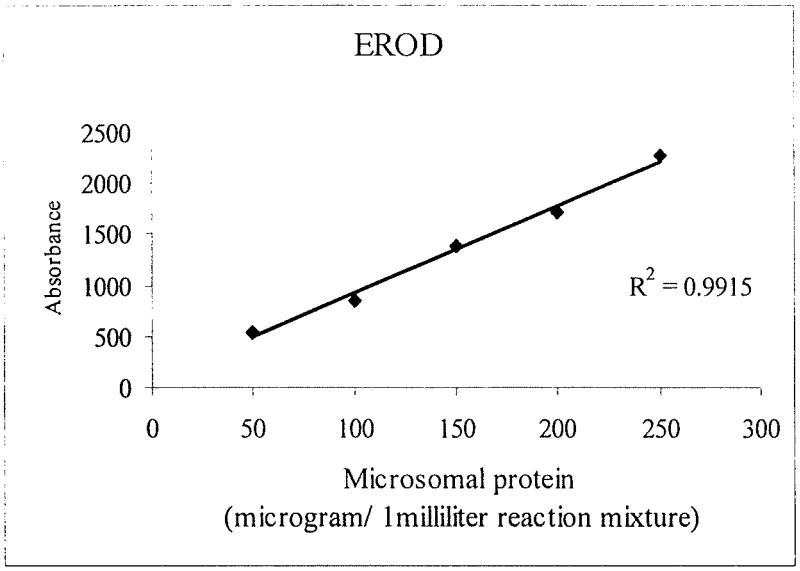
   5.1.1 การศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับหนูขาว

   5.1.2 ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมาตรฐานในหนูขาว

   5.2. การดำเนินการวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการวิจัยเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

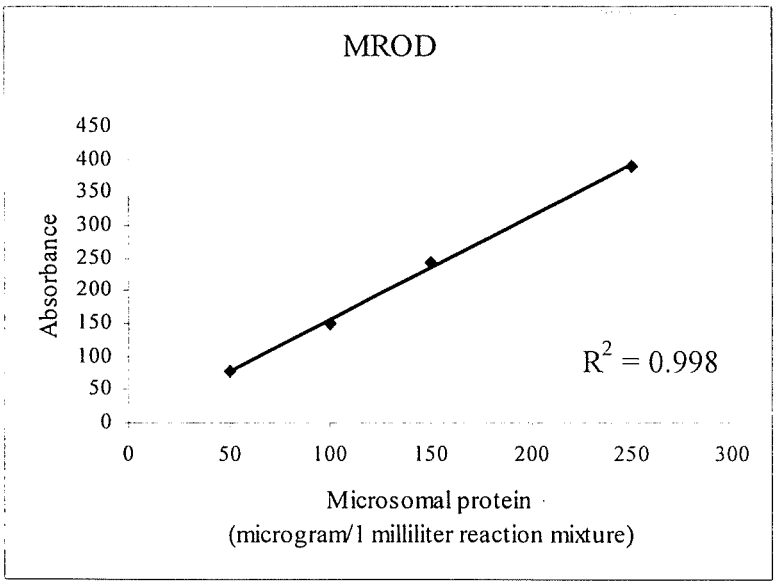
   ได้ทำการทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2B2, CYP2E1 และ CYP3A เพื่อเตรียมพร้อมที่จะนำวิธีวิเคราะห์มาใช้ในการวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ CYP แต่ละ isoform ดังกล่าวในไมโครโซมที่เตรียมจากตับหนูขาวที่ทำการป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อไป ทั้งนี้ในการทดสอบวิธีการตรวจวิเคราะห์นั้น ได้ทำการวิเคราะห์ความเป็นเส้นตรง (Linearity test)

พบว่า วิธีตรวจวิเคราะห์สมรรถนะของเอนไซม์ CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2B2, CYP2E1 และ CYP3A มีความเป็นเส้นตรงสูง โดยมีค่า correlation coefficient (r^2) เท่ากับ 0.9915 (รูปที่ 1), 0.998 (รูปที่ 2), 0.992 (รูปที่ 3), 0.9988 (รูปที่ 4), 0.9981 (รูปที่ 5)



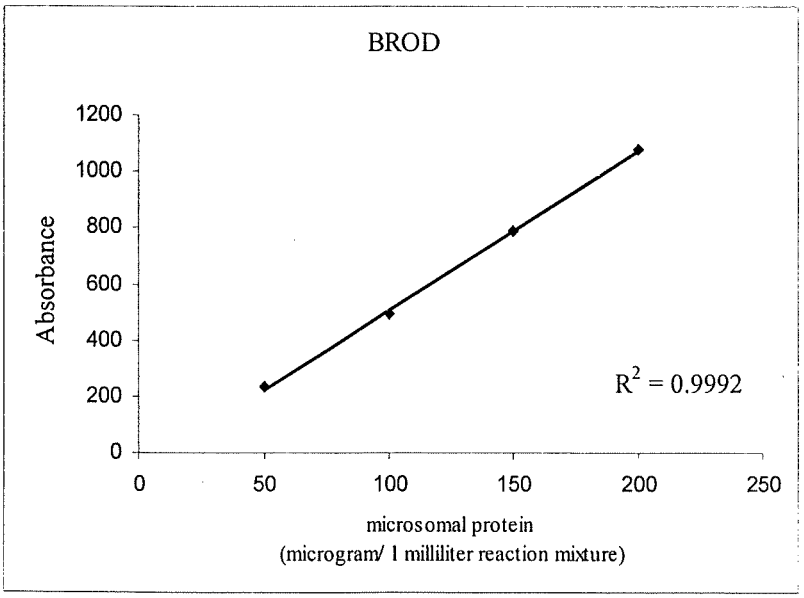
รูปที่ 1 Verification of ethoxyresorufin O-dealkylation.

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ microsomal protein กับ fluorometric absorbances มีค่า correlation coefficient (r^2) = 0.9915. (n = 2 ในแต่ละจุด)



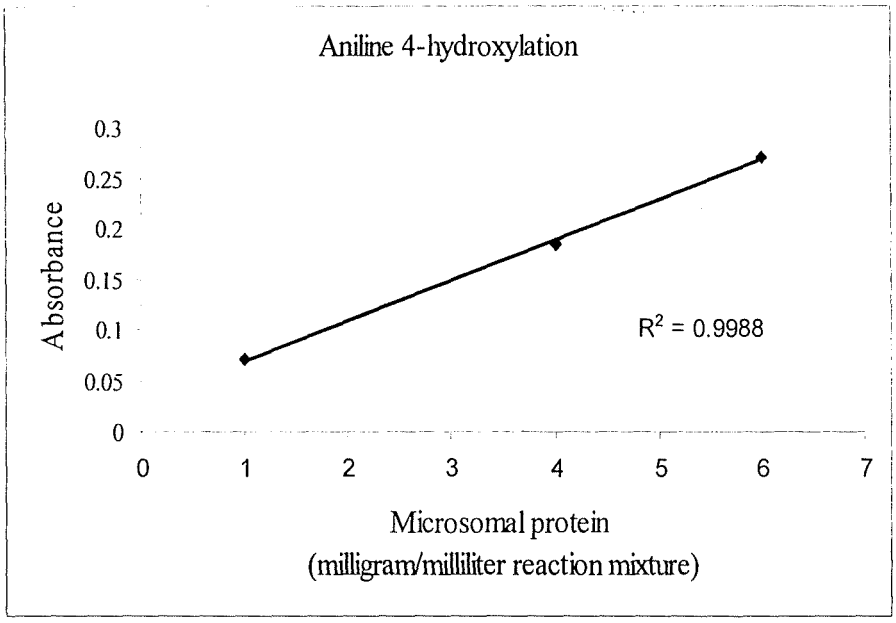
รูปที่ 2 Verification of methoxyresorufin O-dealkylation (MROD).

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ microsomal protein กับ fluorometric absorbances มีค่า correlation coefficient (r^2) = 0.9915. (n = 2 ในแต่ละจุด)



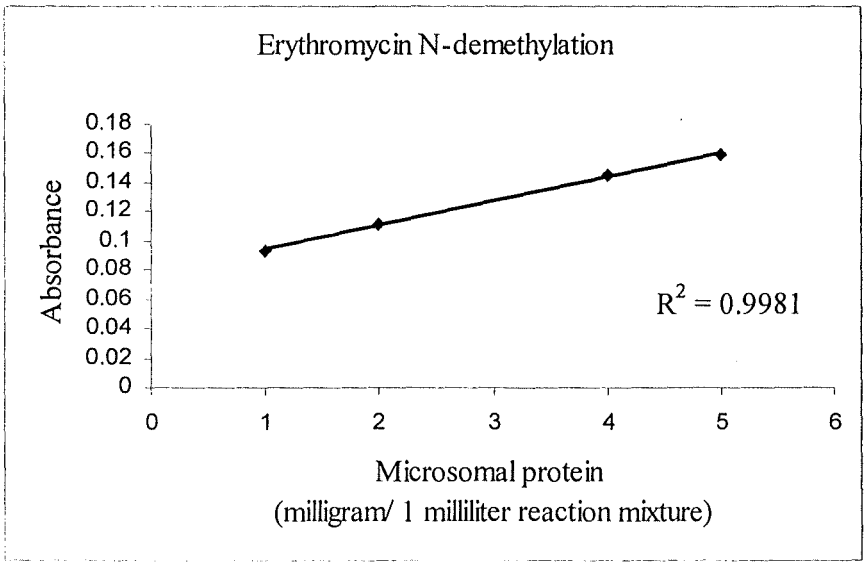
รูปที่ 3 Verification of benzyloxyresorufin O-dealkylation (BROD).

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ microsomal protein กับ fluorometric absorbances มีค่า correlation coefficient (r^2) = 0.9915. (n = 2 ในแต่ละจุด)



รูปที่ 4 Verification of aniline 4-hydroxylation.

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ microsomal protein กับ fluorometric absorbances มีค่า correlation coefficient (r^2) = 0.9988. (n = 2 ในแต่ละจุด)



รูปที่ 5 Verification of erythromycin N-demethylation.

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ microsomal protein กับ fluorometric absorbances มีค่า correlation coefficient (r^2) = 0.9981. (n = 2 ในแต่ละจุด)

5.3. รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว โดยให้แนบบทความผลงานความก้าวหน้าทางวิชาการของแผนงานวิจัยระหว่างดำเนินการ ที่เคยพิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้ว หรือบทความที่จะนำเผยแพร่ทางสื่อมวลชนได้ (ถ้ามี)

5.4. งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มดำเนินการเป็นเงินทั้งสิ้น 753,500 บาท

5.5. งานตามแผนงานโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ทุกขั้นตอนตามที่เสนอในโครงการ

5.6 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา และหรืออุปสรรค (ถ้ามี)

ได้ทดสอบแล้วว่าวิธีที่ใช้มีความเป็น Linearity สามารถใช้ตรวจสมรรถนะของ hepatic cytochrome P 450 ได้ แต่เนื่องจากผลของโครงการวิจัยข้างต้นยังไม่สามารถสร้างสารมาตรฐานได้จึงยังไม่มีข้อมูลของสารมาตรฐาน

(ลายเซ็น)

(รองศาสตราจารย์ ดร.พตท.หญิงสมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 30 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2549

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ **แบบ ต-1ด**

แบบรายงานความก้าวหน้าของโครงงานวิจัย (Research Project)

.....

1. ชื่อโครงงานวิจัย (โครงการย่อยที่ 8)

   (ภาษาไทย) การพัฒนารูปแบบยาเตรียมที่เหมาะสมในการนำเอาสารสกัดมาตรฐานบัวบกไปใช้ทางคลินิก

   (ภาษาอังกฤษ) Development of Appropriate Dosage Form for Clinical Application of Standard Extract of *Centella asiatica*

2. รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และEmail

   2.1 รองศาสตราจารย์ ดร. พจน์ กุลวานิช
   ภาควิชาอุตสาหกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   โทร: 02-2188274

   2.2 อาจารย์ ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์
   ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
   โทร: 02-2188314

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2549 จำนวน 588,500 บาท
4. เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2548 ถึง กันยายน 2550
5. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

   5.1 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย (โดยสรุป)

   5.1.1 พัฒนาผลิตภัณฑ์สารสกัดจากใบบัวบกในรูปแบบยาเม็ด/แคปซูล และกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์

   5.1.2 พัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์นี้ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตขั้นอุตสาหกรรมได้

   5.2 การดำเนินการวิจัยตามที่เสนอไว้ในโครงการวิจัยเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว

   ได้กำหนดสูตรตำรับเบื้องต้นของยาเม็ดสารสกัดจากใบบัวบกดังนี้

	มก./ เม็ด
สารสกัดจากใบบัวบก	200
แลคโตส	246
แป้งข้าวโพด	60
ไมโครคริสตัลลินเซลลูโลส	40
โพลิไวนีลพัยโรลลิโดน เค 90	12
โซเดียมสตาร์ชกลัยโคเลท	18
ทาลค์	18
แมกเนเซียมสเตียเรท	6

ทำการเตรียมจำนวน 300 เม็ดตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลาย 10 % ของโพลิไวนีลพัยโรลลิโดน เค 90ในแอลกอฮอล์
2. ผสม สารสกัดจากใบบัว แลคโตส แป้งข้าวโพด ไมโครคริสตัลลินเซลลูโลส เข้าด้วยกัน
3. เติมสารละลาย 1 ลงใน 2 จนได้ของผสมเปียกที่พอเหมาะ และ ผ่านแล่งเบอร์ 12
4. นำแกรนูลเปียกไปอบแห้งที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส
5. นำแกรนูลแห้งผ่านแล่งเบอร์ 16
6. ผสมแกรนูลแห้งจาก 5 ด้วย โซเดียมสตาร์ชกลัยโคเลท ทาลค์ และแมกเนเซียมสเตียเรท
7. นำส่วนผสมมาตอกเม็ด

ข้อกำหนดของยาเม็ดที่ผลิต

น้ำหนักต่อเม็ด	600 มก.
ความแข็ง	5-6 kp
ความกร่อน	< 1 %
เวลาการแตกตัว	< 30 นาที

5.3 รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับการวิจัยที่ได้ดำเนินการไปแล้ว โดยให้แนบบทความผลงานความก้าวหน้าทางวิชาการของแผนงานวิจัยระหว่างดำเนินการ ที่เคย

พิมพ์ในวารสารทางวิชาการแล้ว หรือบทความที่จะนำเผยแพร่ทางสื่อมวลชนได้ (ถ้ามี)

5.4 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มดำเนินการเป็นเงินทั้งสิ้น 588,500 . บาท

5.5 งานตามแผนงานโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป

ประเมินผลคุณสมบัติของยาเม็ดว่าเป็นไปตามที่กำหนดหรือไม่ ถ้าไม่ก็ต้องทำการปรับสูตรตำรับโดยเปลี่ยนแปลงปริมาณหรือชนิดของสารช่วยที่ใช้

5.6 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา และหรืออุปสรรค (ถ้ามี)

ยังขาดสารสกัดมาตรฐาน จึงยังไม่สามารถตรวจสอบว่าสูตรตำรับเบื้องต้นที่ได้กำหนดไว้ตามนี้จะมีความเหมาะสมกับสารสกัดมาตรฐานหรือไม่

(ลายเซ็น)

(รองศาสตราจารย์ ดร.พจน์ กุลวานิช)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 29 สิงหาคม 2550