

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การศึกษาผลการให้บาราคอลอย่างต่อเนื่องต่อการสังเคราะห์เอ็นไซม์ในตับของหนูขาว
Hepatic effects of sub-acute treatment of barakol in rats

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

ผศ.ดร. วัชรวิวรรณ ทองสะอาด

ผศ.ดร. จัตุรศรี เดชะปัญญา

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

หน่วยงานที่รับผิดชอบ

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

615.321
ว388ร

แหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัย

งบประมาณประจำปี 2543 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การศึกษาผลการให้บาราคอลอย่างต่อเนื่องต่อการสังเคราะห์เอ็นไซม์ในตับของหนูขาว

Hepatic effects of sub-acute treatment of barakol in rats

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

ผศ.ดร. วัชรวิรรณ ทองสะอาด

ผศ.ดร. จัตรศรี เดชะปัญญา

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

หน่วยงานที่รับผิดชอบ

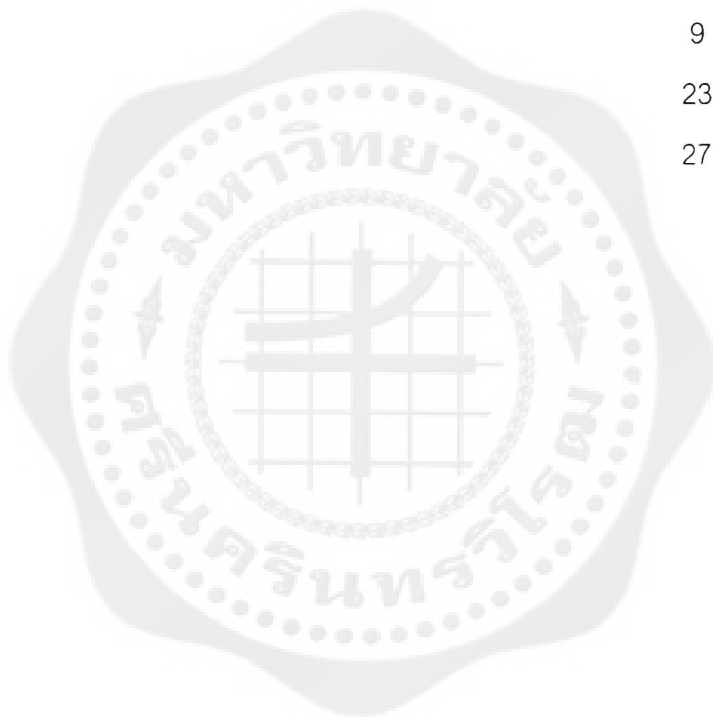
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

แหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัย

งบประมาณประจำปี 2543 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
บทนำ	3
วัตถุประสงค์	6
วัสดุอุปกรณ์	6
วิธีการศึกษา	6
ผลการทดลอง	9
อภิปรายผล	23
เอกสารอ้างอิง	27



บทคัดย่อ

ซีเหล็ก (*Cassia siamea*) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่รู้จักกันค่อนข้างแพร่หลายในประเทศไทย มีสรรพคุณต่าง ๆ เช่น เป็นยาระบาย ใช้ลดไข้ รักษาโรคผิวหนังบางชนิด รักษาโรคเบาหวาน และรักษาอาการนอนไม่หลับเป็นต้น สารสำคัญที่สกัดจากใบและดอกซีเหล็กได้แก่ สารบาราคอล (Barakol) โดยมีชื่อทางเคมีว่า 3a,4-dihydro-3a,8-dihydroxy-2,5-dimethyl-1,4-dioxaphenalene ($C_{13}H_{12}O_4$) จากการรายงานผลของสารบาราคอลต่อการทำงานของระบบไหลเวียนโลหิต ในการช่วยลดความดันโลหิต และผลต่อระบบประสาท โดยช่วยในการนอนหลับและคลายเครียด เป็นต้น ทำให้มีการผลิตยาเม็ดซีเหล็กออกขายสู่ท้องตลาดโดยอ้างสรรพคุณทางยาตามที่พบในสารสกัดบริสุทธิ์ หลังจากยานี้ออกสู่ตลาดได้ไม่นานก็มีรายงานถึงผลเสียของยานี้ต่อดับ โดยพบว่าผู้ที่รับประทานยานี้มีอาการตับอักเสบเฉียบพลัน และมีระดับเอนไซม์ในตับผิดปกติ ทำให้ต้องมีการทบทวนการนำยาสมุนไพรซีเหล็กมาใช้ในคน

คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาว่าความเป็นพิษที่พบในคนนั้นจะเป็นเนื่องมาจากสารบาราคอลหรือไม่ จึงได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดบาราคอลต่อดับ โดยวัดระดับเอนไซม์ Alanine aminotransaminase (ALT) และ Aspartate aminotransaminase (AST) ในซีรัม ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเป็นพารามิเตอร์ที่สามารถบ่งบอกการทำงานของตับได้ โดยทำการทดลองในหนูขาวที่ได้รับการป้อนสารสกัดบาราคอลที่ความเข้มข้นในช่วงระหว่าง 10 - 100 mg/kg เป็นเวลา 30 วัน ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวเป็นช่วงความเข้มข้นที่มีรายงานว่ามียาในการลดความดันโลหิต ช่วยในการนอนหลับ และคลายเครียด นอกจากนี้ยังตรวจวัดระดับ Creatinine ในซีรัม ซึ่งเป็นพารามิเตอร์ที่สามารถบ่งบอกการทำงานของไตได้ จากนั้นก็จะเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อของตับและไตเพื่อนำไปตรวจวินิจฉัยทางจุลกายวิภาคศาสตร์เพื่อประกอบการวิเคราะห์ผลด้วย

จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดบาราคอลทุกความเข้มข้นที่ใช้ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าระดับ Alanine aminotransaminase (ALT), Aspartate aminotransaminase (AST) และ Creatinine ในซีรัมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และผลการตรวจชิ้นเนื้อก็ไม่พบความผิดปกติใด ๆ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าการป้อนสารบาราคอลในความเข้มข้น 10 - 100 mg/kg ติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน ไม่มีผลต่อความเป็นพิษของตับและไตของหนูขาว จากผลการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นไปได้ว่าภาวะตับอักเสบเฉียบพลันที่พบในผู้ป่วยอาจไม่ได้เป็นสาเหตุเนื่องมาจากสารบาราคอลในยาสมุนไพรซีเหล็กนั้น ทั้งนี้ควรจะต้องมีการศึกษาต่อไปว่าความเป็นพิษที่พบในคนที่รับประทานยาสมุนไพรซีเหล็กนั้น เกิดจากสารเคมีชนิดใดในยาซีเหล็ก และหากใช้สารบาราคอลในปริมาณที่สูงมาก ๆ จะพบความเป็นพิษได้หรือไม่ เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์และพัฒนาใช้สารบาราคอลในทางคลินิกต่อไป

Abstract

Cassia siamea is a plant that widely known in Thailand and have been used in traditional medicine especially leaves and flowers to treat constipation and insomnia. An active compound, barakol; 3a,4-dihydro-3a,8-dihydroxy-2,5-dimethyl-1,4-dioxaphenalene (C₁₃H₁₂O₄), extracted from *C. siamea* has been tested in animals and shown to have hypotensive, sedative and anti-anxiotic effects. Recently, there was a herbal medicine made of dried leaves of *C. siamea* out to the market and claim to have the same effects as found in the pure compound, barakol. Not long after that, there was a report of acute liver toxicity found in human consumers.

The aim of this study was to investigate the sub-acute toxic effect of barakol on the levels of Alanine aminotransminase (ALT) and Aspartate aminotransaminase (AST). These enzymes were used as indicators of hepatic injuries. The level of Creatinine in the serum was also measured to indicate primarily the impaired kidney function. In addition, the microscopic examination of livers and kidneys tissues was also performed to determine the abnormal histologically. The rats were given barakol orally at the doses range of 10 – 100 mg/kg for 30 days. These doses were in the range of effective doses for treating hypertension, insomnia and anxiety.

The results indicate no alterations of these enzymes in the serum when compared to control levels. From histopathological examination, there were no sign of abnormalities found in the liver and kidney tissues. It can be concluded that all doses of barakol used in this study did not have any toxic effects on liver and kidney. These findings suggested that the hepatotoxicity of *C. siamea* may not resulted from the pure compound, barakol. Further studies should be performed to investigate which compounds in *C. siamea* cause the hepatotoxic effect and does barakol causing any toxic effect if used in very high doses.

บทนำ

ขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) เป็นพืชพื้นบ้านที่ปลูกมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทั้งในประเทศไทย พม่า อินเดีย และมาเลเซีย ส่วนต่าง ๆ ของต้นขี้เหล็กได้ถูกนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านเพื่อรักษาโรคและอาการต่าง ๆ เช่น ราก นำมาใช้ลดไข้ เปลือกนำมาใช้รักษาโรคผิวหนังบางชนิด เมล็ดใช้รักษาโรคเบาหวาน ผลใช้รักษาโรคเบาหวานและใช้เป็นยาระบาย ส่วนใบอ่อนและดอกนำมาใช้เป็น ยารักษาโรคเบาหวาน ยาระบายรักษาโรคความดันโลหิตสูง และที่ใช้กันแพร่หลายที่สุด คือใช้เป็น ยาแก้อาการนอนไม่หลับ ในประเทศไทยยังใช้ใบอ่อนและดอกมาปรุงอาหารด้วยการศึกษาผลทางเภสัชวิทยา ของใบและดอกขี้เหล็กเริ่มมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1949 โดย ศ.พญ. อุไรอรุณลักษณ์ ได้นำใบขี้เหล็กมาสกัดด้วยเอธานอลและป้อนแก่สัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดเอธานอลจากใบขี้เหล็กมีผลลดการทำงานของ ระบบประสาท ลดความรุนแรงของการชักที่กระตุ้นโดยยาstrykine และเพิ่มแรงตึงตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ และหัวใจ

ในปลายปี ค.ศ. 1969 ได้มีรายงานการพบสารออกฤทธิ์สำคัญที่สกัดได้จากใบและดอกขี้เหล็ก (Hassanali - walji et al., 1996) โดยได้ตั้งชื่อสารสำคัญนี้ว่า “บาราคอล (barakol)” และในปี ค.ศ. 1970 ก็ได้มีการเสนอโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของบาราคอล (Bycroft et al., 1970) โดยมีชื่อทางเคมี 3a,4-dihydro-3a,8-dihydroxy-2,5-dimethyl-1,4-dioxaphenalene ($C_{13}H_{12}O_4$) จากนั้นมาได้มีรายงานการวิจัยถึงผลของบาราคอลต่อระบบต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง ดังนี้

1. ผลต่อต้านแบคทีเรีย (Anti-microbial effects)

บาราคอลมีผลด้านการเจริญของแบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบเพียงเล็กน้อย (Gritsanapan et al. 1989)

2. ผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต (Effect on cardiovascular system)

บาราคอล (0.5 - 15 mg/kg, i.v.) มีผลในการลดความดันโลหิตในหนูและกระต่าย (Suwan et al, 1992)

3. ผลต่อเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Effects on isolated tissue preparations)

3.1 บาราคอล (1-32 μ g/ml และ 0.5 - 16 mg/ml) ไม่มีผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็ก ส่วนอวัยวะของหนูกึ่งนิพิต (Gritsanapan et al. 1989)

3.2 บาราคอล (10 μ m - 1mM) มีผลลดการหดตัวของเส้นเลือดทอแรคซิกที่ถูกกระตุ้น โดยสารเพนนิลเอพฟริน (Suwan et al, 1992)

3.3 บาราคอล (1 - 300 μ m) ไม่มีผลต่อการหดตัวของเส้นเลือดหางหมู (porcine tail artery) วาส เดเฟอเรน (vas deferens) ของหนู และลำไส้เล็กส่วนอิลีียมของหนูกินีพิก (guinea pig ileum) ที่ถูกกระตุ้นโดยกระแสไฟฟ้า (Thongsaard et al, 1997a)

4. ผลต่อระบบประสาท (Effects on the central nervous system)

4.1 บาราคอล (10-100 mg/kg, i.p) มีผลในการลดพฤติกรรมการเคลื่อนไหว ในหนูถีบจักร (Jantarayota, 1987 ; Kaokeaw, 1992) แต่เมื่อให้บาราคอลในปริมาณสูงขึ้นกลับมีผล กระตุ้นการทำงานของระบบประสาท และทำให้ชักตายในที่สุด

4.2 บาราคอล (100-200 mg/kg,i.p) มีผลในการลดความเจ็บปวดในหนูถีบจักร โดยใช้การทดสอบบนแผ่นความร้อน (hot-plate test) (Jantarayota, 1987, Tongroach et al, 1992)

4.3 บาราคอล (75-150 mg/kg, i.p) มีผลเพิ่มพฤติกรรมการหมุนตัว (rotation behaviour) ที่กระตุ้นโดยสารอะโปมอร์ฟิน ในหนูที่ถูกทำลายสมองในส่วนสไตราตัม (striatal lesion) (Jantarayota, 1987 ; Tongroach et al, 1992)

4.4 บาราคอล (25-100 mg/kg, i.p.) มีผลลดการทำงานของสาร 5-hydroxytryptophan ที่กระตุ้นให้เกิดพฤติกรรมสบัดหัว (head shake behaviour) (Jantarayota, 1987 ; Tongroach et al, 1992)

4.5 บาราคอล (10 mg/kg, i.p) มีผลลดความเครียดในหนูเมื่อทดสอบด้วย elevated plus maze คล้ายกับยาไดอะซีแพม (diazepam) แต่ไม่ทำให้เกิดอาการง่วงซึม กลับมีผลเพิ่มพฤติกรรม การเคลื่อนไหวที่และตื่นตัว (Thongsaard et al, 1996a)

4.6 บาราคอล (1 - 100 μ M) มีผลลดการหลั่งโดปามีนจากเนื้อเยื่อสมองในส่วน สไตราตัม (striatum) ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยไม่ได้มีการเพิ่มการดูดกลับ (re - uptake) ของโดปามีนจากปลายประสาท (Thongsaard et. al.,1997b)

4.7 บาราคอล (10 และ 100 mg/kg, i.p.) มีผลลดระดับโดปามีนในสารละลาย ภายนอกเซลล์ (extracellular dopamine) ในหนูเมื่อวัดโดยใช้เทคนิคไมโครไดอะไลซิส (microdialysis technique) (Thongsaard et al,1996b)

5.ผลทางพิษวิทยา (Toxicity of barakol)

ความเข้มข้นของบาราคอลที่ทำให้หนูถีบจักรตายไปครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมด (LD_{50})เมื่อให้ยาโดยฉีดเข้าช่องท้อง เท่ากับ 302-347 mg/kg (Jantarayota, 1987)

จากรายงานการวิจัยดังกล่าว จะเห็นว่าสารบาราคอลมีศักยภาพในการจะนำมาพัฒนาเป็นยาเพื่อใช้รักษาอาการเครียดได้ ดังนั้นการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นด้านพิษวิทยาของสารนี้จึงมีความสำคัญเมื่อจะมีการพัฒนาสารบาราคอลมาใช้ในอนาคต เพื่อประเมินความปลอดภัยในการนำมาใช้ในมนุษย์ แต่ปัจจุบันกลับมีการศึกษาด้านนี้น้อยมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งศึกษารายละเอียดของพิษแบบกึ่งเฉียบพลันของบาราคอล เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพิษแบบเรื้อรังต่อไป

จากความหลากหลายของผลทางเภสัชและสรีรวิทยาของบาราคอล ผลต่อระบบประสาทส่วนกลางเป็นที่น่าสนใจและมีความพยายามจะนำมาใช้ในการแก้ไขอาการนอนไม่หลับในผู้ป่วย และในปี พ.ศ. 2540 ทางองค์การเภสัชกรรมจึงได้ผลิตยาชนิดนี้ออกวางจำหน่ายในรูปแบบงูโบซ์เล็กแห่งอัดเม็ดแล้วใช้ชื่อทางการค้าว่า "บาราคอล (Baracol®)" และระบุตัวยาสำคัญเป็นสารบาราคอล โดยมีสรรพคุณเขียนกำกับไว้ว่าช่วยระบายท้อง ทำให้นอนหลับ และเจริญอาหาร รวมทั้งคลายเครียด 2ปีหลังจากยานี้วางจำหน่ายมีรายงานว่ามีการพบผู้ป่วยที่มีอาการตับอักเสบเฉียบพลันสัมพันธ์กับการใช้ยาขี้เหล็กดังกล่าว จำนวน 9 ราย และจากการประเมินความสัมพันธ์ของภาวะตับอักเสบจากยากับยาขี้เหล็ก พบว่ายาขี้เหล็กจัดอยู่ในระดับความสัมพันธ์ตั้งแต่ probable จนถึงขั้น definite ตามเกณฑ์มาตรฐานการวินิจฉัย หรือ DILT (drug induced liver injury scale) นอกจากนั้นยังมีผู้ป่วย 2 ราย ได้ทดลองทานยาขี้เหล็กซ้ำใหม่หลังภาวะตับอักเสบเฉียบพลันดีขึ้นแล้วก็พบว่าเกิดอาการตับอักเสบซ้ำอีก (สมบัติ ตรีประเสริฐสุข และคณะ , 2542)

เนื่องจากผลของงูโบซ์เล็กอัดเม็ดต่อภาวะตับอักเสบนี้เอง จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาความเป็นพิษของยาดังนี้ เนื่องจากยาที่จำหน่ายเป็นยาในรูปแบบงูโบซ์เล็กแห่งที่อ้างอิงตัวยาสำคัญเป็นสารบาราคอล มิใช่สารบาราคอลในรูปบริสุทธิ์จึงยังไม่สามารถสรุปได้ในตอนนี้ว่าอาการตับอักเสบเกิดจากสารบาราคอลหรือไม่ และจากการศึกษาทางพิษวิทยาของบาราคอลในรูปสารสกัดบาราคอลมีเพียงการศึกษาระดับความเข้มข้นของบาราคอลที่ทำให้หนูถีบจักรตายลงครึ่งหนึ่ง (LD₅₀) (Jantarayota, 1987) จึงควรมีการศึกษาเพื่อตรวจสอบว่าความเป็นพิษจากการบริโภคสมุนไพรขี้เหล็กมีสาเหตุเนื่องมาจากสารบาราคอลหรือไม่ เพื่อไม่ให้เสียโอกาสในการนำสารบาราคอลในรูปบริสุทธิ์มาพัฒนาเป็นยา การศึกษาในครั้งนี้จึงทำการศึกษาทางพิษวิทยาถึงผลกึ่งแบบเฉียบพลันของบาราคอลกับความเป็นพิษต่อตับเบื้องต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลแบบกึ่งเฉียบพลัน (Sub-acute) ของบาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ Alanine aminotransminase (ALT) ในซีรัมของสัตว์ทดลอง
2. เพื่อศึกษาผลแบบกึ่งเฉียบพลัน (Sub-acute) ของบาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ Aspartate aminotransaminase (AST) ในซีรัมของสัตว์ทดลอง
3. เพื่อศึกษาผลแบบกึ่งเฉียบพลัน (Sub-acute) ของบาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ Creatinine ในซีรัมของสัตว์ทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. หนูขาวเพศผู้น้ำหนักประมาณ 180 - 200 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ
2. เครื่องชั่งสัตว์ทดลอง
3. เครื่องชั่งสารเคมีอย่างละเอียด
4. เครื่องผสมสารเคมี
5. สารบาราคอล
6. สารเฮพาริน
7. ขวดเก็บเลือดขนาดเล็ก
8. เครื่องปั่นแยกพลาสมา
9. เครื่องคอมพิวเตอร์บันทึกและประมวลผล
10. Syringe พร้อมเข็มสำหรับดูดเลือดสัตว์ทดลอง

วิธีการศึกษา

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 180 - 200 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ตำบลศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล โดยนำมาเลี้ยงรวมกัน 5 ตัวต่อกรง ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25°C และให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยให้อาหารสำเร็จรูป (จากบริษัท เจริญโภคภัณฑ์) และน้ำ อย่างเกินพอ (*ad libitum*)

2. การเตรียมสารสกัดบาราคอล

สารบาราคอลสกัดจากใบอ่อนและดอกของขี้เหล็ก โดยตัดใบและดอกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำไปต้มด้วย 0.5 % กรดซัลฟูริกแล้วทำให้เป็นด่าง จากนั้นนำไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและเติมกรด 5 % กรดอะซิติก และทำให้เป็นกลาง ทิ้งไว้ให้เย็นจะได้ผลึกสีเหลืองเขียว เติมกรดไฮโดรคลอริกจะได้สารบาราคอลในรูปของเกลือ จากนั้นตรวจสอบคุณสมบัติขั้นต้นด้วย Thin layer chromatography (TLC) บน Silica gel ก่อนนำไปตรวจสอบโครงสร้างด้วยเครื่อง Nuclear magnetic resonance (NMR)

3. วิธีวิจัย

การวิจัยนี้แต่เดิมเสนอไว้ว่าเป็นการวัดความผิดปกติของตับโดยการวัดพารามิเตอร์ต่าง ๆ คือ Microsomal protein content, Total protein content, Liver microsomal cytochrome P-450 content, Total liver catalase และ Fatty acyl CoA oxidase แต่เนื่องจากมีปัญหาในเรื่องเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ จึงมีความจำเป็นต้องเปลี่ยนวิธีการตรวจวิเคราะห์เป็นการตรวจหาปริมาณเอนไซม์ Aspartate aminotransaminase (AST) และ Alanine aminotransaminase (ALT) ในซีรัมแทน ซึ่งระดับของเอนไซม์ดังกล่าวในซีรัมบ่งบอกถึงความผิดปกติของการทำงานของตับที่ใช้อย่างแพร่หลายในทางคลินิก นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้คำนึงถึงพยาธิสภาพที่อาจเกิดขึ้นต่ออวัยวะอื่น ได้แก่ ไต จึงได้ทำการตรวจเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณ Creatinine ในเลือดซึ่งเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่สามารถบอกความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นกับการกรองสารผ่านไต (Glomerular filtration rate) ได้ นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจหาความผิดปกติทางกายภาพ (Histopathology) โดยการตัดชิ้นเนื้อของตับ และ ไต เพื่อตรวจหาพยาธิสภาพทางจุลกายวิภาคศาสตร์ที่อาจเกิดขึ้นภายหลังได้รับสารบาราคอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน เพื่อประกอบผลการวิจัย

การวิจัยนี้จะแบ่งสัตว์ทดลองเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ดังนี้

1. หนูกลุ่มควบคุมจะป้อนน้ำในปริมาณ 0.5 ml
2. หนูกลุ่มทดลองที่ป้อนบาราคอล 10 mg/kg
3. หนูกลุ่มทดลองที่ป้อนบาราคอล 30 mg/kg
4. หนูกลุ่มทดลองที่ป้อนบาราคอล 100 mg/kg

สัตว์ทดลองทุกตัวจะได้รับการป้อนสารต่อเนื่องกันเป็นเวลา 31 วัน โดยจะทำการป้อนในช่วงเวลา 8.00 – 9.00 น. และสารบาราคอลที่ใช้จะถูกเตรียมใหม่ทุกวันตามความเข้มข้นที่ต้องการ โดยให้ปริมาตรที่ป้อนในแต่ละวันเท่ากับ 0.5 ml

ชั่งน้ำหนักของหนูทุกตัวทุกวันก่อนป้อนสารทดสอบ แล้วหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักหนูแต่ละกลุ่มในแต่ละวัน

หลังการป้อนในวันที่ 31 ของการทดลอง นำสัตว์ทดลองมาทำให้สลบด้วยอีเธอร์ จากนั้นทำการเก็บเลือดจากหัวใจปริมาณ 5 ml ใส่ในขวดเก็บเลือดแช่น้ำแข็ง

นำเลือดที่ได้มาตรวจหาปริมาณ Alanine aminotransminase (ALT), Aspartate aminotransaminase (AST) และ Creatinine ในซีรัม ตามวิธีการดังนี้

Alanine aminotransferase test

1. นำสาร GPT ซึ่งประกอบด้วย Alanine 200 mM และ α -Ketoglutarate 2 mM ปริมาณ 1 ml ผสมกับซีรัม 0.2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที
2. เติมสาร Phenylhydrazine 1.0 ml รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
3. เติม 0.4 N NaOH จำนวน 10 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง OD ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm

Aspartate aminotransferase test

1. นำสาร GOT ซึ่งประกอบด้วย Aspartate 200 mM และ α -Ketoglutarate 2 mM ปริมาณ 1 ml ผสมกับซีรัม 0.2 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที
2. เติมสาร Phenylhydrazine 1.0 ml รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที
3. เติม 0.4 N NaOH จำนวน 10 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง OD ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 nm

Creatinine test

1. ใช้สาร reagent 2 ชนิดคือ Picric acid 25 mmol/l และ Sodium hydroxide 0.2 mol/l และสารมาตรฐาน Creatinine 2 mg/dl ที่ปรับให้อยู่ที่อุณหภูมิ 37 °C
2. นำสาร reagents สารมาตรฐาน และซีรัมที่ต้องการทดสอบผสมกันในอัตราส่วน reagent 1 ml และ สารมาตรฐานหรือสารทดสอบ 0.1 ml วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 500 nm ที่เวลา 30 (เป็นค่า A1) และ 90 วินาที (เป็นค่า A2) แล้วนำมาคำนวณดังสมการ

$$\{(A2-A1) S / (A2 - A1) ST\} \times 2 = \text{ค่า Creatinine ในหน่วย mg/dl}$$

เมื่อ S = Sample และ ST = Standard

นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองต่าง ๆ แล้วเสนอผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM (standard error of mean) การเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ยาในขนาดต่าง ๆ ใช้ Analysis of Variance (ANOVA) โดยถือค่า $P < 0.05$ ว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathology)

ทำการตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อจากตับขนาดประมาณ 2×1 ซม. และโตมา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำเกลือ แช่ในสารละลาย Bouin's solution แช่ตัวอย่างชิ้นเนื้อทิ้งไว้ข้ามคืนก่อนนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการตรวจวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ต่อไป ตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อในกลุ่มต่าง ๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อตรวจหาความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลอง

น้ำหนักตัวหนูทดลองในแต่ละวันของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสาร Barakol (10, 30 100 mg/kg) ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน แสดงไว้ในตารางที่ 1, 2, 3, และ 4 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าในช่วงเวลา 30 วันของการป้อนสารทดสอบ น้ำหนักเฉลี่ยของหนูในแต่ละกลุ่มเพิ่มขึ้นในอัตราเดียวกัน ดังแสดงในกราฟรูปที่ 1

ผลการวัดระดับของ Aspartate transaminase (AST), Alanine transaminase (ALT) และ Creatinine ในซีรัมของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดบาราคอลที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 100 mg/kg อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 31 วัน โดยทำการวัดระดับของสารดังกล่าวในซีรัมของสัตว์ทดลองในวันที่ 31 ของการทดลอง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ

ระดับของ AST ในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารบาราคอล 10, 30 และ 100 mg/kg มีค่าเท่ากับ 67.80 ± 6.13 , 78.10 ± 5.97 , 61.33 ± 6.54 และ 54.50 ± 4.37 U/ml ตามลำดับ

ระดับของ ALT ในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารบาราคอล 10, 30 และ 100 mg/kg มีค่าเท่ากับ 15.20 ± 1.00 , 18.60 ± 5.69 , 17.56 ± 2.19 และ 16.40 ± 1.58 mg/dl ตามลำดับ

ระดับของ Creatinine ในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารบาราคอล 10, 30 และ 100 mg/kg มีค่าเท่ากับ 0.55 ± 0.02 , 0.62 ± 0.02 , 0.58 ± 0.02 และ 0.56 ± 0.02 mg/dl ตามลำดับ

กราฟแสดงค่า Aspartate transaminase, Alanine transaminase และ Creatinine ของกลุ่มทดลองต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในกราฟรูปที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าระดับ Aspartate transaminase (AST), Alanine transaminase (ALT) และ Creatinine ในซีรัมของสัตว์ทดลอง ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดบาราคอล ทุกความเข้มข้นที่ใช้ไม่แตกต่างจากค่าดังกล่าวของกลุ่มควบคุม

จากผลการตรวจชิ้นเนื้อของตับ และ ไต ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ ไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อใด ๆ ในทุกกลุ่มการทดลอง ไม่ว่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงของไขมันในตับ (Fatty change), Necrosis, Cirrhosis, Hyperplastic nodules หรือ Neoplasia



ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักตัวของหนู (g) กลุ่มควบคุมที่ได้รับการป้อนน้ำกลั่นในช่วงเวลา 30 วัน

DAY/No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEAN	SD	SEM
1	199.00	178.50	168.50	157.50	152.50	223.50	184.50	194.00	203.00	213.00	187.40	23.42	7.03
2	223.00	202.50	197.50	185.00	181.00	213.50	192.50	200.50	223.00	219.50	203.80	15.39	4.62
3	214.50	195.00	193.50	184.00	183.00	211.50	190.50	202.50	221.00	217.00	201.25	14.01	4.21
4	232.50	218.50	213.00	202.50	201.00	222.50	203.00	216.00	228.00	225.50	216.25	11.25	3.38
5	228.50	218.50	207.00	196.50	203.00	223.00	200.50	214.00	228.50	227.00	214.65	12.22	3.67
6	235.50	218.50	218.50	204.50	206.00	227.50	206.50	220.00	234.50	235.50	220.70	12.32	3.70
7	242.00	225.30	232.50	212.40	217.20	233.00	214.00	227.00	238.50	243.00	228.49	11.25	3.38
8	248.50	240.50	246.30	225.90	225.90	228.00	207.00	223.50	235.50	234.50	231.56	12.26	3.68
9	249.00	237.00	237.50	225.00	231.00	234.50	242.50	231.00	241.00	242.00	237.05	6.97	2.09
10	261.90	250.00	257.60	240.50	244.50	235.00	218.50	233.00	244.00	245.00	243.00	12.46	3.74
11	272.50	259.70	268.70	250.00	256.00	231.50	220.00	235.00	246.50	244.00	248.39	16.59	4.98
12	277.40	264.00	274.30	258.00	258.60	239.00	224.50	239.50	250.00	250.00	253.53	16.44	4.94
13	287.30	270.00	284.00	263.00	268.50	252.00	236.50	252.00	259.00	259.00	263.13	15.23	4.57
14	294.20	278.00	290.10	276.70	277.50	248.00	232.00	245.00	258.00	256.00	265.55	20.68	6.21
15	299.50	285.50	302.50	283.00	282.00	257.50	243.50	260.00	270.00	268.50	275.20	18.77	5.64
16	293.00	278.00	293.50	278.50	271.00	278.00	260.50	277.50	289.50	288.00	280.75	10.42	3.13
17	290.00	274.50	292.50	278.80	274.00	278.50	264.00	276.00	285.00	286.00	279.93	8.56	2.57
18	299.00	276.90	298.00	286.90	273.50	273.50	255.00	272.00	281.00	286.00	280.18	13.13	3.94
19	290.00	270.50	291.00	279.50	269.50	278.50	262.00	275.00	289.00	293.00	279.80	10.66	3.20
20	296.60	271.20	295.50	283.10	272.90	288.00	269.00	282.50	296.00	301.50	285.63	11.77	3.53
21	300.80	270.80	298.60	288.60	272.10	281.00	262.00	274.00	292.00	294.50	283.44	13.32	4.00
22	292.60	262.60	296.20	281.50	268.60	283.00	264.00	278.50	293.00	297.00	281.70	13.13	3.94
23	307.50	272.50	309.50	289.50	278.50	275.00	265.00	277.00	295.00	302.00	287.15	15.75	4.73
24	316.00	282.00	326.50	303.00	293.00	301.00	290.00	294.00	310.00	314.00	302.95	13.69	4.11
25	320.00	284.50	331.00	306.50	299.00	294.50	278.50	291.00	309.00	314.00	302.80	16.39	4.92
26	316.00	282.00	321.00	305.00	292.00	301.00	282.00	305.00	310.50	303.00	301.75	13.12	3.94
27	317.00	277.00	321.50	300.00	286.00	315.00	298.00	305.50	332.50	335.00	308.75	19.01	5.71
28	311.00	274.00	316.00	299.00	282.00	306.00	285.00	297.00	315.00	320.00	300.50	15.88	4.77
29	329.50	283.00	336.00	312.00	299.00	308.00	290.00	296.00	318.50	323.00	309.50	17.48	5.25
30	326.00	286.00	333.00	309.50	306.00	345.00	286.00	296.00	316.50	323.00	312.70	19.76	5.93

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักตัวหนู (g) กลุ่มที่ได้รับ Barakol (10 mg/kg, orally) ในช่วงเวลา 30 วัน

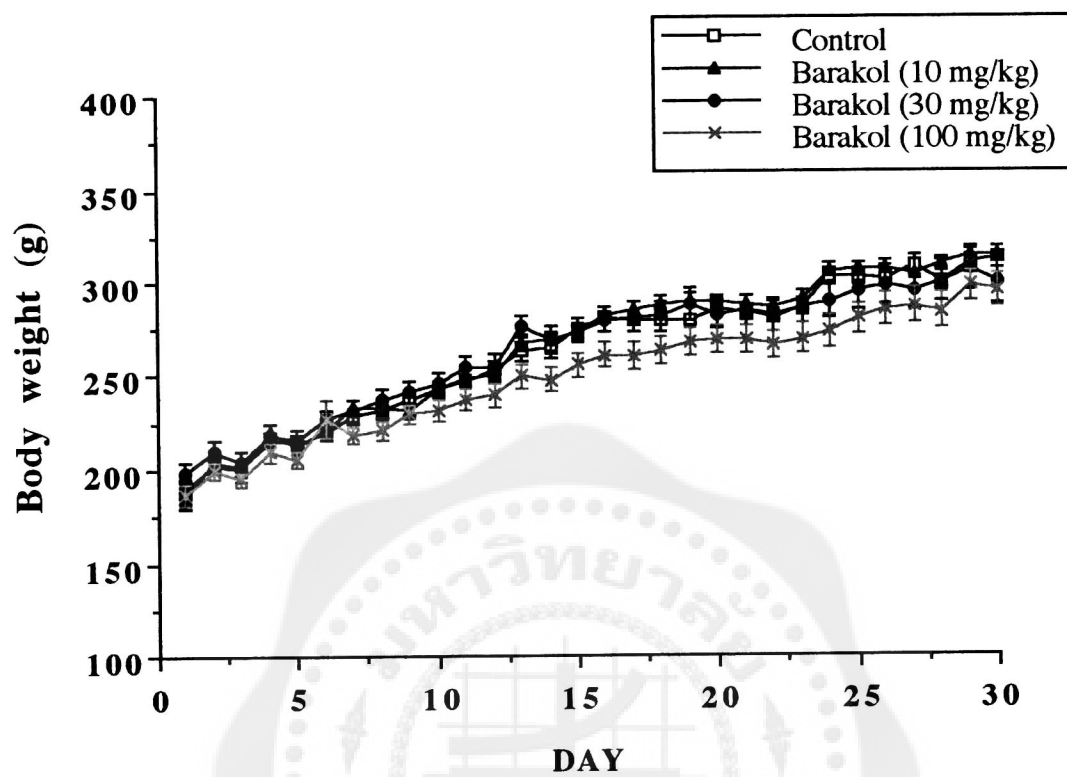
DAY/No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEAN	SD	SEM
1	201.00	185.00	173.50	158.50	157.00	227.50	205.00	178.00	216.00	190.50	189.20	23.44	7.04
2	217.50	206.00	190.50	190.50	179.00	227.00	206.00	188.00	221.50	201.00	202.70	15.86	4.76
3	216.00	200.50	187.00	178.50	174.00	226.00	205.00	190.00	222.50	198.50	199.80	17.87	5.37
4	237.00	218.50	200.00	208.00	197.00	230.00	221.00	219.00	245.00	222.00	219.75	15.26	4.58
5	229.00	210.00	200.00	197.00	191.00	238.00	216.00	203.00	235.00	210.00	212.90	16.33	4.90
6	242.00	222.00	209.50	214.50	199.00	242.00	218.00	207.00	239.00	217.50	221.05	15.21	4.57
7	252.50	242.80	221.50	227.10	214.40	254.00	224.50	221.50	251.00	224.00	233.33	15.05	4.52
8	262.50	242.00	226.50	240.50	221.80	244.00	221.00	215.50	244.00	219.00	233.68	15.12	4.54
9	252.50	235.50	223.50	228.00	216.50	232.00	226.00	224.00	249.50	225.00	231.25	11.60	3.48
10	266.50	253.50	240.00	247.50	241.00	254.00	225.00	229.00	252.00	228.50	243.70	13.43	4.03
11	272.50	268.90	251.60	266.10	246.50	255.00	227.50	226.50	251.00	230.00	249.56	17.06	5.12
12	275.90	265.00	247.70	261.00	248.20	259.00	230.00	234.00	257.50	235.50	251.38	14.94	4.49
13	290.00	275.00	268.40	282.10	263.40	276.00	245.50	255.00	278.00	253.00	268.64	14.19	4.26
14	292.00	284.50	269.00	287.10	263.50	273.50	246.50	249.50	271.50	251.50	268.86	16.15	4.85
15	291.00	286.00	266.50	288.00	263.00	286.50	253.00	268.50	281.00	260.00	274.35	13.65	4.10
16	286.00	286.00	265.50	285.00	265.50	301.50	272.50	281.50	302.50	282.00	282.80	12.78	3.84
17	291.50	294.00	270.00	300.00	273.00	303.00	270.00	282.00	298.00	280.00	286.15	12.72	3.82
18	300.50	303.40	280.50	305.00	279.30	298.50	268.00	276.50	296.50	271.00	287.92	14.21	4.27
19	292.50	297.50	277.00	296.00	281.00	308.00	275.00	291.00	305.50	278.50	290.20	11.88	3.57
20	289.00	298.50	274.50	293.00	277.60	309.50	278.00	292.00	305.00	280.50	289.76	12.11	3.64
21	287.00	303.50	274.50	294.80	283.00	307.00	275.50	290.00	299.50	276.00	289.08	11.93	3.58
22	285.60	303.10	272.00	291.50	279.70	306.00	275.00	287.50	293.00	277.00	287.04	11.55	3.47
23	300.00	312.00	279.50	300.00	287.50	308.00	275.00	287.00	296.00	275.00	292.00	13.25	3.98
24	298.50	317.50	287.00	306.00	290.50	322.50	296.00	321.50	321.50	303.00	306.40	13.54	4.07
25	306.50	327.00	296.50	315.00	302.50	318.50	292.00	306.00	314.50	291.00	306.95	11.86	3.56
26	302.00	323.00	293.00	310.00	299.00	326.00	296.50	313.00	320.00	294.00	307.65	12.43	3.73
27	303.00	323.50	293.50	310.00	298.00	339.00	307.00	225.00	339.00	312.00	305.00	32.18	9.66
28	304.00	326.00	297.00	312.00	304.00	326.00	297.50	315.00	324.00	295.00	310.05	12.29	3.69
29	305.00	331.00	302.50	314.50	306.50	333.50	303.00	319.50	331.50	303.50	315.05	12.89	3.87
30	305.00	335.50	303.50	317.00	308.00	333.00	303.50	316.00	326.50	301.50	314.95	12.81	3.85

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักตัวหนู (g) กลุ่มที่ได้รับ Barakol (30 mg/kg, orally) ในช่วงเวลา 30 วัน

DAY/No.	1	2	3	4	5	6	7	9	8	10	MEAN	SD	SEM
1	197.00	199.50	192.50	178.50	170.50	232.20	191.00	222.20	200.50	200.00	198.39	18.21	5.47
2	221.50	222.00	217.00	199.50	197.50	222.00	184.50	229.00	200.00	209.90	210.29	14.32	4.30
3	211.00	216.50	203.50	188.00	186.00	221.00	186.00	228.00	199.50	204.50	204.40	14.88	4.47
4	229.50	232.50	220.00	203.50	204.50	230.00	201.00	244.00	208.00	211.50	218.45	14.86	4.46
5	225.00	227.50	218.50	200.00	203.50	227.50	193.00	240.00	210.00	215.20	216.02	14.55	4.37
6	232.50	240.50	229.00	209.20	213.90	243.50	209.00	251.50	216.00	220.30	226.54	15.15	4.55
7	236.00	250.50	236.50	215.60	224.30	244.50	208.50	254.00	216.50	218.50	230.49	15.98	4.80
8	251.50	259.00	250.50	225.00	236.00	242.00	207.50	252.00	218.00	220.20	236.17	17.57	5.28
9	249.50	260.50	251.50	222.50	240.00	248.50	213.50	263.00	228.00	230.00	240.70	16.64	5.00
10	257.00	264.00	263.00	227.00	246.50	256.00	221.00	258.00	230.00	232.20	245.47	16.36	4.91
11	270.00	279.00	275.50	235.70	259.80	253.50	221.50	262.50	233.50	234.20	252.52	20.09	6.03
12	270.00	279.40	277.70	234.00	263.20	257.50	226.50	258.50	233.50	235.00	253.53	19.76	5.93
13	280.00	286.50	283.50	242.10	273.20	284.00	252.50	300.00	285.00	288.50	277.53	17.47	5.25
14	291.10	292.60	291.50	248.00	283.90	269.50	234.50	269.00	243.00	244.50	266.76	22.68	6.81
15	294.00	294.00	295.50	247.50	285.50	278.50	245.00	278.50	253.00	253.60	272.51	20.58	6.18
16	283.00	290.50	290.50	239.00	279.00	296.50	264.50	310.00	269.00	270.10	279.21	19.82	5.95
17	278.90	288.80	287.00	232.40	278.90	303.50	261.50	322.50	281.50	282.00	281.70	23.74	7.13
18	293.40	297.00	298.90	238.80	285.50	295.50	262.00	302.50	263.50	264.00	280.11	21.48	6.45
19	287.50	297.00	296.50	237.50	285.00	315.00	271.50	328.00	278.50	279.00	287.55	24.68	7.41
20	282.50	293.50	291.50	230.00	284.00	305.50	276.00	313.00	271.50	272.00	281.95	22.83	6.86
21	294.50	304.20	297.10	237.10	279.00	303.00	270.00	313.00	268.00	270.00	283.59	23.00	6.91
22	290.00	302.50	295.10	231.00	271.50	302.50	270.50	314.00	268.50	269.20	281.48	24.24	7.28
23	297.00	310.00	301.50	236.50	274.50	303.00	272.00	321.00	270.00	271.00	285.65	25.19	7.56
24	304.00	319.00	309.50	242.00	262.50	303.00	272.00	320.00	276.00	277.20	288.52	26.26	7.89
25	306.50	322.00	311.00	246.00	267.50	312.00	278.00	334.00	278.50	279.00	293.45	27.64	8.30
26	305.00	322.50	311.50	244.00	264.00	320.00	286.00	342.50	292.00	293.00	298.05	29.01	8.71
27	304.50	320.00	310.00	240.00	263.00	315.50	281.00	343.00	281.50	282.20	294.07	30.27	9.09
28	302.50	323.00	312.00	240.00	262.50	330.50	292.50	346.50	293.00	293.50	299.60	31.49	9.46
29	320.50	337.00	325.00	250.00	276.00	328.50	291.00	344.50	289.50	290.00	305.20	30.37	9.12
30	310.00	328.00	314.00	228.50	268.00	328.50	291.00	344.50	289.50	290.00	299.20	33.82	10.16

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักตัวหนู (g) กลุ่มที่ได้รับ Barakol (100 mg/kg, orally) ในช่วงเวลา 30 วัน

DAY/No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MEAN	SD	SEM
1	192.50	191.00	183.50	164.00	144.50	194.00	207.50	190.00	192.00	205.00	186.40	18.91	5.68
2	214.00	216.00	204.50	187.50	168.50	198.00	211.50	192.50	202.00	204.50	199.90	14.29	4.29
3	210.00	205.00	195.00	187.00	168.00	194.00	206.00	184.00	203.00	200.00	195.20	12.69	3.81
4	225.50	222.50	209.00	193.50	176.00	210.00	226.00	199.50	219.00	215.00	209.60	15.97	4.80
5	217.50	219.00	201.00	189.50	177.00	213.00	226.50	197.50	201.00	216.00	205.80	15.30	4.59
6	230.00	228.40	217.40	200.50	186.50	219.50	228.00	312.00	216.50	232.00	227.08	33.10	9.94
7	237.60	235.00	218.50	207.10	190.50	220.00	223.00	212.00	216.00	233.00	219.27	14.25	4.28
8	248.00	244.50	224.00	212.50	199.50	213.00	233.00	205.00	212.00	221.00	221.25	16.22	4.87
9	258.00	258.00	233.00	221.00	206.50	228.00	239.00	209.50	222.00	225.50	230.05	17.64	5.30
10	261.00	263.00	232.50	222.50	211.00	225.00	240.00	209.00	224.00	231.00	231.90	18.38	5.52
11	270.50	273.00	239.80	220.50	216.00	234.00	241.50	216.50	226.00	237.50	237.53	20.30	6.09
12	274.00	276.50	242.00	238.00	216.50	230.50	245.50	214.50	230.50	233.00	240.10	20.97	6.30
13	278.00	278.60	240.00	240.00	218.00	247.50	265.00	231.00	250.00	252.50	250.06	19.51	5.86
14	283.90	286.20	245.50	247.40	224.60	238.50	254.50	221.00	238.00	243.50	248.31	21.81	6.55
15	292.50	291.00	249.00	254.00	226.50	250.00	262.50	233.00	249.50	252.00	256.00	21.46	6.45
16	289.00	289.00	246.00	249.00	221.00	258.00	283.50	241.50	268.00	268.00	261.30	22.43	6.74
17	286.40	287.00	243.80	247.00	215.10	264.00	281.50	245.00	267.50	275.00	261.23	23.20	6.97
18	300.10	298.00	253.00	260.00	226.30	259.50	273.50	243.00	260.50	265.50	263.94	22.57	6.78
19	301.50	298.50	252.50	251.00	224.50	272.50	284.50	251.00	274.00	276.50	268.65	23.94	7.19
20	299.00	298.00	254.50	260.50	222.50	270.00	286.50	253.00	277.50	274.00	269.55	23.20	6.97
21	304.00	302.00	260.50	262.00	222.20	264.00	286.50	250.00	274.00	270.00	269.52	24.36	7.32
22	296.00	295.50	254.50	258.10	215.50	263.50	286.00	250.00	274.00	272.00	266.51	24.21	7.27
23	305.00	304.00	259.70	265.50	220.50	266.00	287.00	249.00	276.00	268.00	270.07	25.26	7.59
24	299.00	297.60	254.30	259.00	211.50	276.00	299.00	261.00	293.50	287.00	273.79	27.98	8.40
25	312.00	310.00	260.00	273.00	222.50	285.00	300.00	264.00	294.00	289.00	280.95	27.14	8.15
26	315.00	310.00	260.00	274.00	223.00	292.50	312.00	271.00	303.50	297.50	285.85	29.04	8.72
27	316.50	308.00	258.00	269.00	220.00	294.50	316.00	276.00	312.00	304.00	287.40	31.44	9.44
28	312.00	308.50	261.00	269.50	217.00	290.00	309.00	275.00	308.00	297.00	284.70	29.99	9.01
29	327.50	328.00	283.50	297.50	241.50	293.50	310.00	279.50	314.00	305.50	298.05	25.80	7.75
30	325.00	324.00	274.50	281.00	228.50	295.50	321.50	285.50	314.00	310.50	296.00	30.12	9.04



กราฟรูปที่ 1 แสดงน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนู (g) ในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารบาราคอลที่ความเข้มข้น 10, 30 และ 100 mg/kg ในวันที่ 1 – 30 ของการทดลอง ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวแสดงค่าเป็น Mean $\pm$ SEM (จำนวนหนูในแต่ละกลุ่ม = 10 ตัว)

ตารางที่ 5 แสดงค่า Creatinine (mg/dl), Aspartate transaminase (AST; U/ml) และ Alanine transaminase (ALT; mg/dl) ในเลือดของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม

No.	Creatinine (mg/dl)	Aspartate transaminase (AST; U/ml)	Alanine transaminase (ALT; mg/dl)
1	0.5	68	15
2	0.5	52	17
3	0.5	90	15
4	0.6	97	23
5	0.5	90	15
6	0.5	52	12
7	0.6	57	12
8	0.6	36	12
9	0.6	56	17
10	0.6	80	14
Mean	0.55	67.80	15.20
SD	0.05	20.42	3.33
SEM	0.02	6.13	1.00

ตารางที่ 6 แสดงค่า Creatinine (mg/dl), Aspartate transaminase (AST; U/ml) และ Alanine transaminase (ALT; mg/dl) ในเลือดของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับ Barakol (10 mg/kg, orally) เป็นเวลา 30 วัน

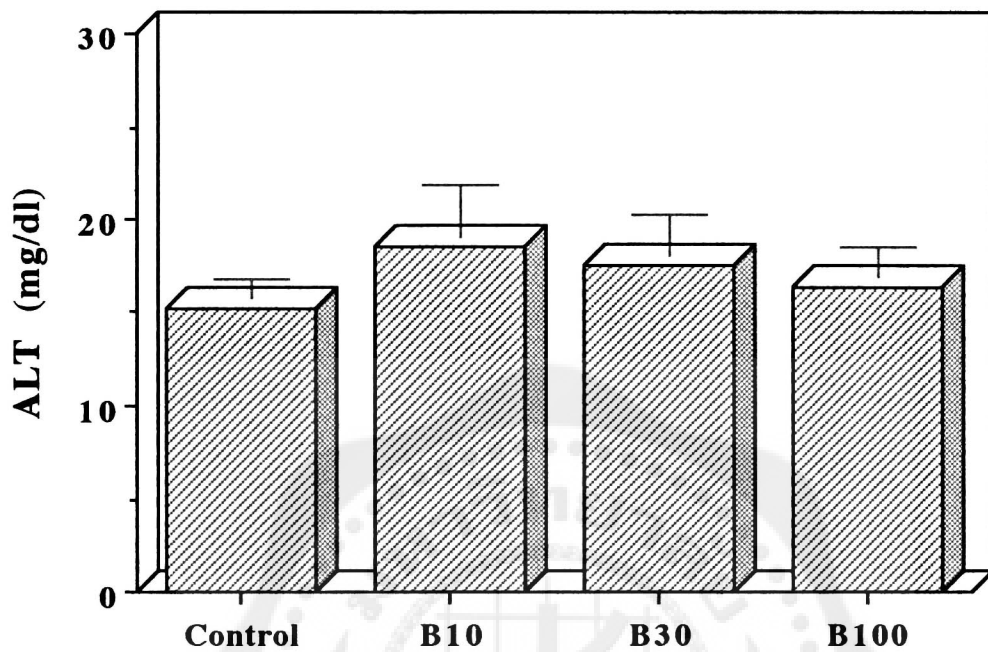
No.	Creatinine (mg/dl)	Aspartate transaminase (AST; U/ml)	Alanine transaminase (ALT; mg/dl)
1	0.5	74	12
2	0.6	97	23
3	0.8	117	42
4	0.7	97	17
5	0.6	61	12
6	0.6	74	20
7	0.6	61	17
8	0.6	74	15
9	0.6	74	12
10	0.6	52	16
Mean	0.62	78.10	18.60
SD	0.08	19.89	8.97
SEM	0.02	5.97	2.69

ตารางที่ 7 แสดงค่า Creatinine (mg/dl), Aspartate transaminase (AST; U/ml) และ Alanine transaminase (ALT; mg/dl) ในเลือดของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับ Barakol (30 mg/kg, orally) เป็นเวลา 30 วัน

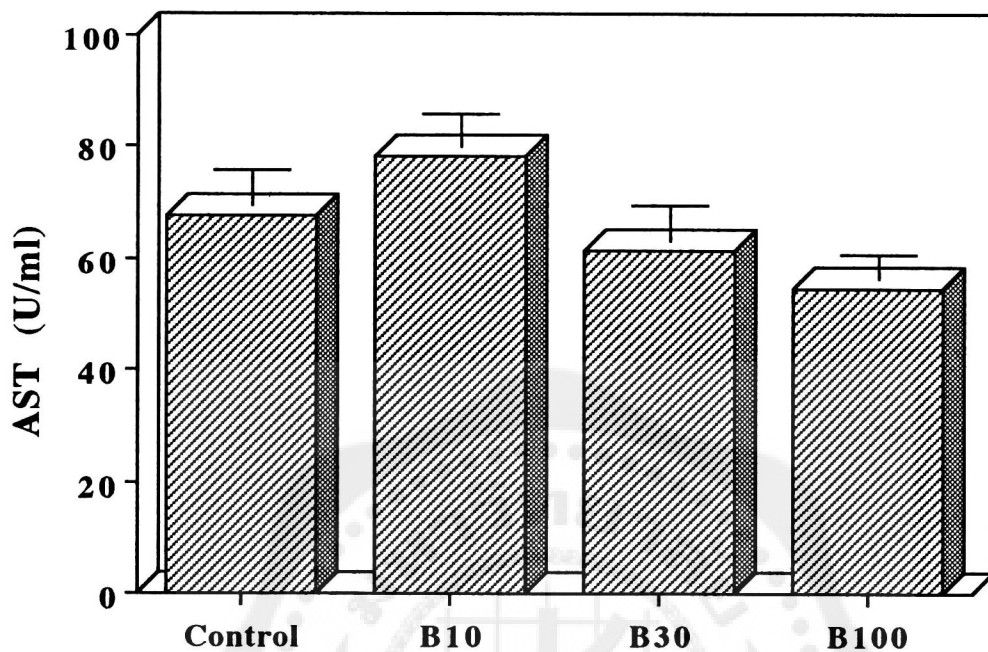
No.	Creatinine (mg/dl)	Aspartate transaminase (AST; U/ml)	Alanine transaminase (ALT; mg/dl)
1	0.6	57	26
2	0.5	43	26
3	0.6	57	17
4	0.7	111	26
5	0.6	61	15
6	0.6	52	12
7	0.6	61	12
8	0.5	49	12
9	0.5	61	12
Mean	0.58	61.33	17.56
SD	0.07	19.62	6.56
SEM	0.02	6.54	2.19

ตารางที่ 8 แสดงค่า Creatinine (mg/dl), Aspartate transaminase (AST; U/ml) และ Alanine transaminase (ALT; mg/dl) ในเลือดของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ได้รับ Barakol (100 mg/kg, orally) เป็นเวลา 30 วัน

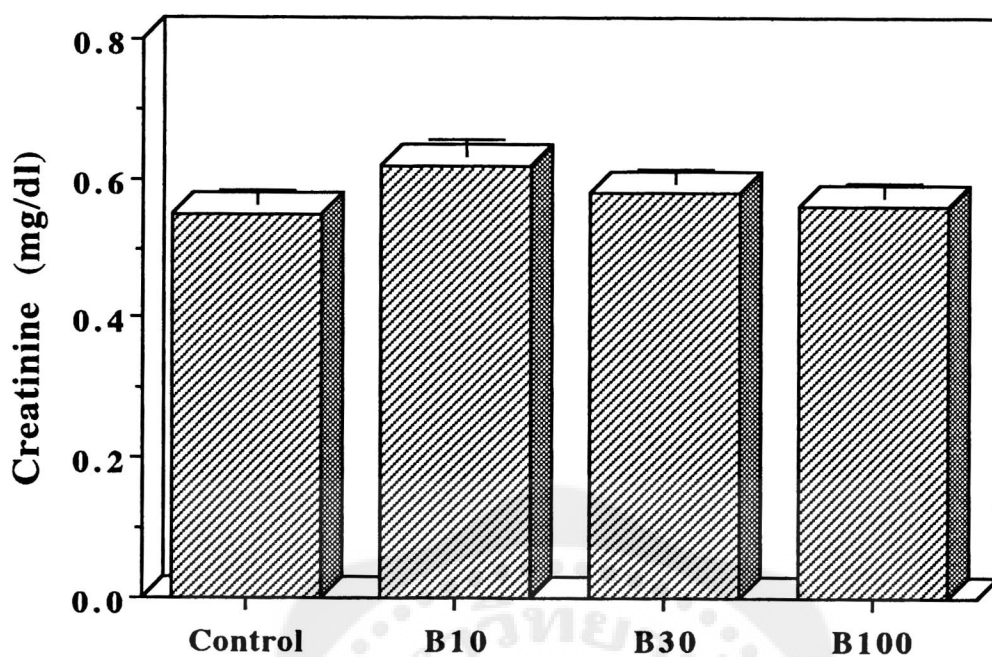
No.	Creatinine (mg/dl)	Aspartate transaminase (AST; U/ml)	Alanine transaminase (ALT; mg/dl)
1	0.6	46	23
2	0.7	74	26
3	0.5	74	17
4	0.5	57	15
5	0.5	61	17
6	0.6	36	17
7	0.6	49	15
8	0.5	30	7
9	0.5	61	12
10	0.6	57	15
Mean	0.56	54.50	16.40
SD	0.07	14.54	5.27
SEM	0.02	4.37	1.58



กราฟรูปที่ 2 แสดงระดับของ Alanine transaminase (ALT) ในซีรัมของหนูขาว ในกลุ่มควบคุม (Control), กลุ่มที่ได้รับการป้อนสารบาราคอล 10 mg/kg (B10), สารบาราคอล 30 mg/kg (B30) และ สารบาราคอล 100 mg/kg (B100) สัตว์ทดลองได้รับสารทดสอบอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 31 วัน และทำการวัดระดับ ALT ในซีรัมหลังการป้อนในวันสุดท้าย ค่า ALT แสดงในรูปของ Mean $\pm$ SEM (จำนวนหนูในแต่ละกลุ่ม = 10 ตัว)



กราฟรูปที่ 3 แสดงระดับของ Aspartate transaminase (AST) ในซีรัมของหนูขาว ในกลุ่มควบคุม (Control), กลุ่มที่ได้รับการป้อนสารบาราคอล 10 mg/kg (B10), สารบาราคอล 30 mg/kg (B30) และ สารบาราคอล 100 mg/kg (B100) สัตว์ทดลองได้รับสารทดสอบอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 31 วัน และทำการวัดระดับ AST ในซีรัมหลังการป้อนในวันสุดท้าย ค่า AST แสดงในรูปของ Mean $\pm$ SEM (จำนวนหนูในแต่ละกลุ่ม = 10 ตัว)



กราฟรูปที่ 4 แสดงระดับของ Creatinine ในซีรัมของหนูขาว ในกลุ่มควบคุม (Control), กลุ่มที่ได้รับการป้อนสารบาราคอล 10 mg/kg (B10), สารบาราคอล 30 mg/kg (B30) และสารบาราคอล 100 mg/kg (B100) สัตว์ทดลองได้รับสารทดสอบอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 31 วัน และทำการวัดระดับ Creatinine ในซีรัมหลังการป้อนในวันสุดท้าย ค่า Creatinine แสดงในรูปของ Mean $\pm$ SEM (จำนวนหนูในแต่ละกลุ่ม = 10 ตัว)

อภิปรายผล

ตับมักจะเป็นอวัยวะเป้าหมายสำหรับสารพิษ เนื่องจากว่าเมื่อสารพิษเข้าสู่ร่างกายทางระบบทางเดินอาหารแล้วจะถูกดูดซึมผ่านผนังทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือดทางเส้นเลือดดำ Hepatic portal vein เข้าสู่ตับ ซึ่งภายในตับมีตัวรับ (Binding sites) สำหรับสารต่างๆ อยู่มากมาย และยังมีปริมาณ Xenobiotic-metabolizing enzymes ได้แก่ Cytochrome P-450 อยู่ในความเข้มข้นที่สูง ซึ่งสารนี้จะคอยทำลายสารพิษที่เข้ามาทางกระแสเลือดสู่ตับ แต่ต้องเป็นสารพิษที่มีระดับความเป็นพิษไม่มากนัก และสารพิษที่สามารถละลายน้ำได้ แต่สารพิษบางอย่างที่มีความรุนแรงกว่าจะไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ชนิดนี้ และจะทำให้เกิดรอยโรค (Lesions) ที่เนื้อเยื่อของตับได้

สารพิษสามารถทำให้เกิดความเป็นพิษต่อองค์ประกอบภายในเซลล์ (Cell organelles) ของตับได้หลายส่วน และทำให้เกิดการบาดเจ็บของตับชนิดต่างๆ ได้ ตัวอย่างเช่น หากมีความเป็นพิษต่อผนังเซลล์ (Plasma membrane) ก็จะทำให้เกิดการรั่วของเอนไซม์ภายในเซลล์ตับออกมา (Enzyme leakage) ถ้าเกิดความเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย ก็จะทำให้เกิดไมโทคอนเดรียเสียโครงสร้าง (Neoplasia) ถ้าเกิดความเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย ก็จะทำให้เกิดการบวม (Swelling) ของไมโทคอนเดรีย เป็นต้น การบาดเจ็บของตับเกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาทางชีวเคมีหลายอย่าง ได้แก่ การเกิด Lipid peroxidation, Covalent binding, การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Inhibition of protein synthesis), เกิดความผิดปกติในการสร้างและการหลั่งน้ำดี (Disturbance of biliary production and/or flow), และเกิดปฏิกิริยาทางระบบภูมิคุ้มกัน (Immunologic reaction) เป็นต้น (Lu, FC, 1996)

เอนไซม์ในตับหลายชนิดสามารถใช้เป็นตัวบ่งบอกการบาดเจ็บของตับ (Hepatic injury) ได้ เอนไซม์เหล่านี้จะถูกสร้างจากส่วนของ Cytosol และ Subcellular organelles ของตับและหลั่งเข้าสู่กระแสเลือด การวัดค่าเอนไซม์ Alanine transaminase (ALT) และ Aspartate transaminase (AST) ในซีรัมเป็นการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อเป็นการบ่งบอกภาวะทางพยาธิสภาพของตับ โดยปริมาณเอนไซม์นี้จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนเดียวกับความรุนแรงของการเกิดพยาธิสภาพของตับ (Leonard et al., 1986)

นอกจากนี้การวัดระดับ Creatinine ในซีรัมยังเป็นอีกพารามิเตอร์หนึ่งที่นิยมวัดเพื่อตรวจหาความผิดปกติเบื้องต้นต่อไต Creatinine เป็นสารเมตาโบไลต์ของ Creatine และจะถูกขับออกทางปัสสาวะโดยผ่านขบวนการกรองสารที่ไต (Glomerular filtration) การเพิ่มของระดับ Creatinine ในเลือดแสดงถึงการทำงานที่ผิดปกติของไต

ในการศึกษานี้ได้ทำการป้อนสารสกัดบริสุทธิ์บาราคอลในความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 10, 30 หรือ 100 mg/kg ในแก่งหนูขาวติดต่อกันเป็นระยะเวลา 31 วัน ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวอยู่ในช่วงของความเข้มข้นที่มีรายงานผลของสารบาราคอลในการลดความดันโลหิต (Hypotensive effect) (Suwan et al., 1992) ผลในการช่วยให้นอนหลับ (Sedative effect) (Jantarayota, 1987) และผลในการช่วยคลายเครียด (Anti-anxiotic effect) (Thongsaard et al., 1996a) หลังการป้อนในวันที่ 31 ของการทดลอง ทำการเก็บเลือดและตัวอย่างชิ้นเนื้อของตับ และ ไต เพื่อนำไปตรวจหาปริมาณของเอนไซม์ Alanine transaminase (ALT) และ Aspartate transaminase (AST) ในซีรัม พร้อมทั้งตรวจวิเคราะห์ทางจุลกายวิภาคศาสตร์ เพื่อตรวจหาความผิดปกติที่อาจเกิดขึ้นกับเนื้อเยื่อ จากผลการศึกษาดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าพารามิเตอร์ที่วัดไม่ว่าจะเป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับสารบาราคอลที่ความเข้มข้น 10, 30 หรือ 100 mg/kg

โดยปกติแล้วปริมาณ Alanine transaminase (ALT), Aspartate transaminase (AST) และ Creatinine ในซีรัมของหนูขาวจะมีค่าแตกต่างกันแล้วแต่สายพันธุ์ และแหล่งผลิต ทั้งนี้สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ไม่มีรายงานค่าดังกล่าว แต่จากการค้นคว้าพบว่าปริมาณสารดังกล่าวในหนูขาวอยู่ในช่วงต่าง ๆ ดังนี้

ALT มีค่าระหว่าง 35.1 ± 13.3 IU/L (Kaneko, et al., 1997)

AST มีค่าระหว่าง 42.9 ± 10.1 IU/L (Kaneko, et al., 1997) หรือ 82 IU/L (Waynforth and Flecknel, 1992)

Creatinine มีค่าระหว่าง 0.5 – 1.4 หรือ 0.84 ± 0.19 mg/dl (Kaneko, et al., 1997)

จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังกล่าวอยู่ในช่วงปกติทั้งหมด จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดบริสุทธิ์บาราคอลในความเข้มข้นที่ใช้ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ ไต และ สมอง หากได้รับเป็นเวลา 30 วันต่อเนื่องกัน โดยเฉพาะเมื่อวัดจากปริมาณของเอนไซม์ Alanine transaminase (ALT), Aspartate transaminase (AST) และ Creatinine ในซีรัม และการตรวจเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ ดังนั้นจากที่มีรายงานว่า การรับประทานยาสมุนไพรขี้เหล็กแล้วพบว่าผู้ป่วยเกิดภาวะตับอักเสบเฉียบพลัน และเกิดความผิดปกติของระดับเอนไซม์เหล่านี้ในเลือด (สมบัติ ตริประเสริฐสุข และคณะ, 2542) อาจไม่ได้มีสาเหตุมาจากสารบาราคอลในยาเม็ดสมุนไพรขี้เหล็ก จากการที่คณะผู้วิจัยทำการสกัดสารบาราคอลเองพบว่าปริมาณสารบาราคอลที่สกัดได้มีเพียง ประมาณ 0.1 % ต่อน้ำหนักเปียกของขี้เหล็ก ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อย ดังนั้นผลทางยาของสารบาราคอลที่เคยมีผู้รายงานไว้ อาจไม่พบผลดังกล่าวหากรับประทานในรูปของยาสมุนไพรขี้เหล็กเนื่องจากมีปริมาณของสารบาราคอลน้อยเกินไป นอกจากนี้มีรายงานว่ามีการ

เคมีที่พบในใบและดอกซีเหล็กกว่า 40 ชนิด (Wagner et al., 1978, Chaichantipyuth, 1979) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าความเป็นพิษต่อตับของสมุนไพรซีเหล็กที่พบ อาจเกิดขึ้นเนื่องมาจากสารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดรวมกันที่มีอยู่ในใบและดอกแห้ง ทั้งนี้ควรมีการศึกษาอย่างละเอียดต่อไปว่าสารใดน่าจะเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดความเป็นพิษในคน

ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่เคยมีผู้รายงานไว้ว่าสารสกัดจากใบซีเหล็กมีส่วนประกอบของสารที่สามารถยับยั้งเอ็นไซม์ในระบบเมตาโบลิซึมของสารก่อมะเร็งในระดับหนูขาว โดยศึกษาระดับเอ็นไซม์ในกลุ่มที่กระตุ้นสารเคมี (Phase I enzymes) ได้แก่ Cytochrome P-450, aniline hydroxylase และ aminopyrine-N-demethylase และทำให้ระดับเอ็นไซม์ในกลุ่มที่ทำลายพิษหรือกำจัดสารเคมี (Phase II enzymes) ในระดับหนู ได้แก่ เอ็นไซม์ glutathione-S-transferase UDP-glucuronyltransferase เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงว่าสารสกัดจากใบซีเหล็กอาจมีศักยภาพในการป้องกันมะเร็งที่ชักนำด้วยสารเคมีได้ (อนงค์ และ วรณี, 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารบาราคอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ใน Braine shrimp สันนิษฐานว่าสารบาราคอลอาจมีฤทธิ์ในการต้านความเป็นพิษต่อเซลล์ (Subphdhirasakul and Khumfang, 2000) จากรายงานดังกล่าวน่าจะเป็นเหตุผลสนับสนุนได้ว่าสารบาราคอลเองไม่น่าจะเป็นสาเหตุของการเกิดความเป็นพิษต่อตับ แต่กลับน่าจะมีคุณสมบัติในการช่วยลดความเป็นพิษได้

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าสารสกัดบริสุทธิ์บาราคอลจะแสดงให้เห็นในขั้นต้นแล้วว่ามีโอกาสน้อยมากที่จะเป็นสาเหตุให้เกิดความเป็นพิษต่อตับและไต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขนาดความเข้มข้นที่เห็นผลในการรักษาในสัตว์ทดลอง แต่ก็ควรจะต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไปว่า หากใช้ในปริมาณที่สูงขึ้นจะก่อให้เกิดความเป็นพิษได้หรือไม่ โดยการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อหาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับผลที่เกิดขึ้น (Dose response relationship) และทำการทดสอบในสัตว์ทดลองหลายพันธุ์ เพื่อทดสอบหาสายพันธุ์ที่ตอบสนองไวต่อความเป็นพิษ ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวคณะผู้วิจัยกำลังดำเนินการอยู่ คาดว่าผลที่ได้จะสามารถนำมายืนยันผลการทดสอบความเป็นพิษของสารบาราคอลเพื่อประโยชน์ในการพัฒนาสารบาราคอลมาประยุกต์ใช้เป็นยารักษาโรคต่อไป

ตารางที่ 9 แสดงสารเคมีที่พบในใบและดอกของขี้เหล็ก

ส่วนของขี้เหล็ก	สารเคมี
ใบ	5-Acetyl-7-hydroxy-2-methylchromone, Alkaloids, Aloe-emodin, Anhydrobarakol, Apigenin-7-O-galactoside, Barakol, Chrysophanic acid, p-Coumaric acid, 1,2-Dimethyl-5-acetyl-7-hydroxy chromone, Gluco-aloe emodin, Isorhamnetin, Kaempferol, 3-Methyl-6,8-dihydroxyisoquinol-1-one, Physcion, Rhein, Rhein-8-monoglucoside, Apigenin, Cassiachromone, Cassiamine A, Chrysophanic acid anthrone, Chrysophanic acid dianthrone, Chrysophanol, Kaempferin, Siamine, β -Sitosterol, Thalictin
ดอก	5-Acetyl-7-hydroxy-2-methylchromone, Anhydrobarakol hydrochloride, Arabinose, Cholesterol, Cycloartenol, Fructose, Glucose, Lupeol, 24-Methyl-cholesterol, 3-Methyl-6,8-dihydroxyisoquinol-1-one, (+)-Pinitol, Siamine, β -Sitosterol, Stigmasterol, D-Glucose

เอกสารอ้างอิง

สมบัติ ตีระประเสริฐสุข, มงคล หงษ์ศิรินิษฐ, และ อนุชิต จุฑะพุทธิ. (2542) ภาวะตับอักเสบจากสมุนไพร "ขี้เหล็ก" บทเรียนเพื่อการพัฒนาสมุนไพรไทย. คลินิกนานาสาระ, 186 (16), 385 – 390.

อนงค์ เทพสุวรรณ และ วรณี คำราญ. (2540) ผลของใบขี้เหล็ก ใบยอ และใบบัวบก ต่อเอ็นไซม์ในระบบเมตาโบลิซึมของสารก่อมะเร็งในตับหนู. วารสารกรมการแพทย์ 22(10), 425 – 437.

Arunlakshana, O. (1949). Pharmacological study of the leaves of *Cassia siamea*. Siriraj. Hosp. Gaz., 1, 434-444.

Bycroft, B.W., Hassanali - walji, A., Johnson, A.W., & King, T.J. (1970). The structure and synthesis of barakol : a novel dioxaphenylene derivative from *Cassia siamea*. J. Chem. Soc., 12, 1686-1689.

Chaichantipyuth, C. (1979) A phytochemical study of the leaves of *Cassia siamea* and *Cassia spectabilis*. A thesis submitted for the degree of Master of Science in Pharmacy, Chulalongkorn University, Bangkok.

Gritsanapan, W., Mekmanee, R. & Chulasiri, M. (1989). Antimicrobial activity and effect on isolated guinea pig ileum of barakol - J - Pharm. Sci., 16, 27-31.

Hassanali - Walji, A., King, T.J. & Wallwork, S. C. (1969) Barakol, a novel dioxaphenylene derivative from *Cassia siamea*. J. Chem. Soc - Chem. commun., 12, 678.

Jantarayota, P. (1987). Effects of barakol extracted from leaves of *Cassia siamea* on the rat central nervous system. Thesis submitted for the degree of Master of Science in Pharmacy, Chulalongkorn University, Bangkok., Thailand

Kaokeaw, K. (1992). Iodination reaction and evaluation of sedative actie of barakol, the main ingredient extracted from the young leaves of *Cassia siamea* Lamk. A thesis submitted for the degree of Master of Science in Biological Chemistry, srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W. and Bruss, M.I. (1997) Clinical biochemistry of domestic animals 5th ed. Academic Press, Sandiego.

Lu, F.C. (1996) Basic Toxicology : Fundamentals, target organs and risk assessment. 3rd ed. Taylor & Francis, London.

Subhadhirasakul, S and Khumfang, P. (2000) Screening of barakol from *Cassia* plants and some of its biological activities. Songklanakarin J. Sci. Technol., 22(4), 429 – 434.

Suwan, G., Sudsuang, R., Ghumma - Upakorn, D. & Werawong, C. (1992) Hypertensive effects of barakol estracted from leaves of *Cassia siamea* Lam. in rats and cats. Thai J. Physiol. Sci., 5, 53-65.

Thongsaard, W. (1997) Behavioural and Pharmacological properties of barakol: a natural anxiolytic. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy in Physiology and Pharmacology, University of Nottingham, Nottingham, UK.

Thongsaard, W., Ting, K.N., Marsden, C.A. & Wilson, V.G. (1997a). The effect of barakol against electrically-evoked contraction of the isolated porcine tail artery and guinea pig ileum. Br. J. Pharmacol., 122, 141P.

- Thongsaard, W., Deachapunga, C., Pongsakoorn, S. Boyd, E.A., Bennett, C.W. & Marsden, C.A. Barakol : a potential anxiolytic extracted from. *Cassia siamea* (1996a) Pharmacol. Biochem.Behav., 53, 753-758.
- Thongsaard, W., Pongsakorn, S., Sudsuang, R., Bennett, G.W. & Marsden, C.A. (1996b) Effect of barakol on extracellular dopamine and its metabolites in rat striatum in vivo. In Proceeding of the 7th International Conference on *in vivo* Methods. Santa Cruz de Tenerife, Spain, pp. 127-128.
- Thongsaard, W., Pongsakorn, S., Sudsuang, R., Bennett, G.W. & Marsden, C.A (1997b) Barakol, a natural anxiolytic, inhibits striatal dopamine release but not uptake *in vitro* Eur. J. Pharmacol. 319, 157-164.
- Tongroach, P., Jantarayota, P., Tantisira, B., Kunluan, P., Tongroach, C. & Chaichantipyuth, C. (1992). Barakol, a neuroactive compound. from *Cassia siamea*. In Proceeding of the First JSPS - NRCT Joint Seminar in Pharmaceutical Sciences ; Advance in Research on Pharmacologically Active Substances from Natural Sources, Chiangmai, Thailand, OP21.
- Wagner, H., El-Sayyad, A.M. Seligmann, O. & Chari, V.M. (1978) Chemical constituents of *Cassia siamea* Lam., I. 2-methyl-5-acetyl-7-hydroxychromone (Cassiachromone). J. Med. Plant Res., 33, 258 – 261.
- Waynforth, H.B. and Flecknell, P.A. (1992) Experimental and surgical technique in rat. 2nd ed. Academic Press, London.