รายงานการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลและผลต่อการเรียนรู้และความจำของสารสกัดมาตรฐานบัวบกในโมเดลของสัตว์ทดลอง

Study of wound healing activity and effects on learning and memory exhibited by standard extracts of *Centella asiatica* in animal models

รองศาสตราจารย์ ดร. มยุรี ตันติสิระ
หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. บุญยงค์ ตันติสิระ
รองศาสตราจารย์ พญ. จุไรพร สมบุญวงศ์
ผู้วิจัย

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการ การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางที่มีมาตรฐานจากสมุนไพรบัวบกสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
ปีงบประมาณ 2546-2548

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานและผู้เกี่ยวข้องต่างๆดังนี้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณในการวิจัย

สำนักวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ฝ่ายวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ ที่ได้ให้คำแนะนำและสนับสนุนการเขียนโครงการบูรณาการ รวมทั้งติดตามประเมินผลการวิจัยอย่างสม่ำเสมอ

นางสาวอารี วนสุนทรวงศ์ นางสาวมัฑนา กานต์ไกรศรี นางสาวเสาวลักษณ์ ดอกนาค นายกิตติพงศ์ คุ้มดี นายสันติ ห่านศรีวิจิตร อาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนร่วมให้งานวิจัยในครั้งนี้ลุล่วงไปด้วยดี

ภาควิชาสรีรวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลและผลต่อการเรียนรู้และความจำของสารสกัดมาตรฐานบัวบกในโมเดลสัตว์ทดลอง

Study of Wound Healing Effect and Effects on Learning and Memory Exhibited by Standard Extract of *Centella asiatica* in Animal Models

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2546

ชื่อผู้วิจัย

1. รศ. ดร. มยุรี ตันติสิระ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ โทร 02-2188325
2. รศ. ดร. บุญยงค์ ตันติสิระ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ โทร 02-2188339
3. รศ. พญ.จุไรพร สมบุญวงศ์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โทร 02-2527850

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการ " การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางที่มรมาตรฐานจากสมุนไพรบัวบกสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม" ซึ่งมีวัตถุประสงค์หลักที่มุ่งจะเตรียมสารสกัดมาตรฐานที่มีฤทธิ์แก้ไขสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ และสารสกัดมาตรฐานที่มีฤทธิ์สมานแผล โดยใช้วิธี activity-guided isolation แยกสารทดสอบไปทีละขั้นตอนเพื่อกำหนดสารที่เป็น bioactive markers ในสารสกัดมาตรฐาน โมเดลของสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ใช้คือการปิดกั้นหลอดเลือดคาโรติดชั่วคราว (2VO) และการฉีดสารสโคโปลามีน ส่วนโมเดลที่ใช้ในการทดสอบการสมานแผลก็คือแผลที่เกิดจากการกรีดและแผลที่เกิดจากความร้อน โดยทำการทดลองทั้งหมดในหนูขาว

จากการทดสอบด้วยวิธี Morris Water Maze test และ Step-down test พบว่าการปิดกั้นหลอดเลือดคาโรติดชั่วคราว (2VO) หรือการฉีดสารสโคโปลามีนจะทำให้เกิดสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในหนูขาว สารสกัดรวมของบัวบกที่ให้โดยการป้อนทางปากสามารถจะแก้ไขสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำได้เฉพาะในโมเดลของ การปิดกั้นหลอดเลือดคาโรติดชั่วคราว (2VO) แต่ไม่มีผลในการแก้ฤทธิ์ของสารสโคโปลามีน ดังนั้นจึงใช้โมเดล 2VO ทำการทดสอบสารทดสอบที่ได้จากสกัดแยกส่วนทีละขั้นตอนต่อไป จากการทดสอบสารทดสอบทั้งหมด 12 สารทดสอบ พบว่ามีสารสำคัญที่สามารถนำมาใช้กำหนดเป็น bioactive marker ของสารสกัดมาตรฐานอยู่สองชนิด (เอและบี) เมื่อพิจารณาประกอบกับผลการทดสอบฤทธิ์ในการสมานแผล ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบทั้ง 4 ชนิด สามารถทำให้แผลที่เกิดจากการใช้ความร้อน (Burn wound) และจากการกรีด (Incision wound) หายเร็วขึ้นได้ใกล้เคียงกัน ดังนั้นคณะผู้วิจัยวิธีการสกัดจึงได้พัฒนาวิธีสกัดเพื่อให้ได้สารสกัดมาตรฐานที่มีคุณสมบัติเหมาะแก่การนำมาใช้เป็นยาเตรียมภายนอกเพื่อรักษาแผลนั่นคือ ปราศจากสีและในขณะเดียวกันก็มี

ปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านการลืมในปริมาณที่สูง ทำให้ได้สารสกัดมาตรฐานที่มีชื่อว่า ECa 233ซึ่งเป็นสารสกัดบัวบกที่ปราศจากสี มีปริมาณสาร A และ B รวมกันแล้วไม่ต่ำกว่า 80%

อาจกล่าวได้ว่างานวิจัยอย่างเป็นระบบในครั้งนี้นำไปสู่ความสำเร็จในการเตรียมสารสกัดมาตรฐานบัวบกที่มีความแน่นอนในด้านปริมาณของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ และสามารถยืนยันการออกฤทธิ์ได้โดยข้อมูลในโมเดลมาตรฐานในสัตว์ทดลอง ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งในการผลิตสารสกัดสมุนไพรคุณภาพสูงเพื่อจำหน่ายเป็นวัตถุดิบในการเตรียมเป็นสารเสริมอาหารหรือยาสำหรับใช้ในคน

Abstract

The present study is a part of integrated project entitled "Research and Development of Standardized Pharmaceutical and Cosmetic Products from Medicinal Plants *Centella asiatica* for Industrial Production Scale " aiming to prepare a standard extract *of Centella asiatica* with wound healing and memory enhancing effects to be used as raw material for pharmaceutical or cosmetic products. Activity –guided isolation was used to identify bioactive compounds as markers in the standard extract. Two common carotid occlusion (2VO) or injection of scopolamine was used to induce memory impairment in rats. Wound healing was assessed in an incision as well as burn wound.

Two common carotid occlusion (2VO) or injection of scopolamine was found to induce memory deficit seen as poor performances in Morris Water Maze test and Step-down test. Total extract of *centella asiatica* was found to improve learning and memory deficit induced by (2VO) but not scopolamine. Therefore 2VO was further used to evaluate the effects of sequentially fractionated test substances. Among 12 fractions tested there were two substances (A and B) which can be used as bioactive markers of the standard extract. Together with the results that wound healing activity was demonstrated by 4 fractional extract of CA. All attempts were made to establish the extraction procedure which could produce a colorless standard extract suitable for topical preparation for wound healing and at the same time contain high amount of substances A and B. ECa 233 is our colorless standard extract containing total amount of substances A and B not less than 80 %.

In conclusion systematic activity-guided isolation used in the present studies have lead to a success in the preparation of standard extract of *Centella asiatica* with appropriate appearance, definite amount of bioactive constituents as well as reliable activity in standard animal models. Information obtained is vital for the production of high quality herbal extract to be used as raw material for food supplement or medication for human.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	v
สารบัญ	vi
สารบัญภาพ	vii
บทนำ	1
วัสดุและวิธีวิจัย	7
ผลการวิจัย	14
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	32
บรรณานุกรม	35

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

1. ผลของสารสกัดบัวบกรวม (total extract)ในขนาด 100, 300, 1000 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 8 ตัว 14
2. ผลของสารสกัดบัวบกรวม (total extract)ในขนาด 100, 300, 1000 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมในStep-down Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 8 ตัว 15
3. ผลของสารสกัดบัวบกรวม (total extract)ในขนาด 100, 300, 1000 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อระดับของ malondialdehyde (MDA) ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 8 ตัว 16
4. ผลของสารสกัดบัวบกรวม (total extract)ในขนาด 100, 300, 1000 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (Scopolamine) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 8 ตัว 17
5. ผลของสารสกัดบัวบกรวม (total extract)ในขนาด 100, 300, 1000 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่ออัตราการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (Scopolamine) ภายในเวลา 5 นาที โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 8 ตัว 17
6. ผลของสารสกัดบัวบก F1ในขนาด 20, 100 และ 500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียน รู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6 ตัว 18
7. ผลของสารสกัดบัวบก F2 ในขนาด 20, 100 และ 500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6 ตัว 19
8. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (Fractional extracts) ในขนาด 20, 100, 500 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน Step-down Test

รูปที่ หน้า

ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 19

9. ผลของสารสกัดบัวบก F3 ในขนาด 100, 500 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 20

10. ผลของสารสกัดบัวบก F4 ในขนาด 100, 500 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 20

11. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (Fractional extracts)ในขนาด 20, 100, 500 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อระดับของ malondialdehyde (MDA) ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 21

12. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (subfraction extract)ในขนาด 100 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 22

13. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (subfraction extract)ในขนาด 100 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อระดับของ malondialdehyde (MDA) ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 22

14. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (subfraction extract)ในขนาด 100 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน Step-down Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 23

15. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (subfraction extract)ในขนาด 100 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่ออัตราการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) ภายในเวลา 5 นาที โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน6-8 ตัว 24

รูปที่ หน้า

16. สารสกัดบัวบกที่มีความบริสุทธิ์สูง (Purified extract) ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) 25

17. สารสกัดบัวบกที่มีความบริสุทธิ์สูง (Purified extract) ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน Step-down Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้ และความจำ (2VO) 25

18. สารสกัดบัวบกที่มีความบริสุทธิ์สูง (Purified extract) ที่ให้โดยการป้อน ต่อการทดสอบพฤติกรรมใน Step-down Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของ การเรียนรู้และความจำ (2VO) 26

19. สารสกัดบัวบกที่มีความบริสุทธิ์สูง (Purified extract) ที่ให้โดยการป้อนต่ออัตราการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) ภายใน เวลา 5 นาที 27

20. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ในขนาด 10 และ 30 mg/kg BW. ที่ให้ โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 28

21. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ในขนาด 10 และ 30 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อระดับ MDA ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่อง ของการเรียนรู้และความจำ (2VO) ภายใน เวลา 5 นาที โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 29

22. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ในขนาด 10 และ 30 mg/kg BW. ที่ให้ โดยการป้อนต่อระดับของ malondialdehyde(MDA)ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้ และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 29

23. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ในขนาด 10 และ 30 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่ออัตราการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่อง ของการเรียนรู้และความจำ (2VO) ภายใน เวลา 5 นาทีโดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 30

24. ผลของสารสกัดหยาบบัวบก ทั้ง 4 fraction ต่อ Burn Wound โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 31

24 ผลของสารสกัดหยาบบัวบก ต่อการสมานแผลใน Incision Woundโดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว 31

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สมุนไพรเป็นทรัพยากรที่ถูกละเลยทอดทิ้งมานาน นับแต่วิทยาการแผนใหม่เข้ามามีอิทธิพลต่อชีวิตความเป็นอยู่ของคนไทย และนับวันจะมากขึ้นเรื่อย ๆ โดยสมุนไพรถูกมองว่าเป็นศาสตร์ที่ล้าสมัย คนจำนวนมากไม่รู้หรือเคลือบแคลงในสรรพคุณรักษา เมื่อไม่มีผู้เห็นคุณค่า นับวันก็มีแต่จะร่อยหรอ สูญพันธุ์ทั้ง ๆ ที่เป็นสิ่งที่ง่ายต่อการทำนุบำรุงและขยายพันธุ์ เนื่องจากเป็นพืชที่ปลูกได้ง่ายหรือไม่ก็ขึ้น เองตามธรรมชาติ

บัดนี้สมุนไพรเริ่มได้รับการยอมรับว่ามีประโยชน์นานัปการต่อโลกและมนุษย์ (นิจศิริ เรืองรังษี และพยอม ตันติวัฒน์, 2534) ประกอบกับการที่คนไทยได้หันมานิยมผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติด้วยเชื่อว่าไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายดังเช่นยาแผนปัจจุบันแม้แต่ในต่างประเทศก็มี ความนิยมใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติเช่นเดียวกัน

ประเทศไทยมีสมุนไพรเป็นจำนวนมาก และมีการใช้ในการรักษาโรคมาตั้งแต่โบราณกาลจากรายงานการศึกษาพบว่าในสมัยก่อน มีการนำบัวบก (*Centella asiatica* Linn. Urban) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาบาดแผลได้ โดยนำต้นสดของบัวบกมาโขลกให้ละเอียด แล้วพอกปิดบาดแผลที่มีลักษณะบวม อักเสบ และมีหนอง (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, 2523 : เชษฐา พยากรณ์, 2525) แผลเน่าเปื่อย แผลมีดบาด (สำลี ใจดี, 2525) แผลหกล้ม ฟกช้ำ หรือมีเลือดออก (ลินจง ศิวรังสรรค์ม 2523) พบว่าได้ผลดี ต่อมาได้มีการศึกษาถึงสารประกอบที่สกัดจากบัวบก (Centella asiatica) พบว่ามี สาร glycoside หรือ asiaticoside และสารประกอบอื่น ๆ อีกมากมาย ตามรายงานพบว่า สาร asiaticoside ช่วยทำให้แผลหายเร็วขึ้นจากการนำมาใช้ในการรักษาบาดแผลจากการผ่าตัด แผลเรื้อรัง และแผลปริเวณฝีเย็บ เป็นต้น (Laerum and Iversen, 1972 : Lawrence, 1967) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Shukla et.al. (1999) โดยพบว่า asiaticoside สามารถทำให้แผลหายเร็วขึ้นได้โดยเพิ่ม tensile strength, collagen content และเพิ่ม epithelialization ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน

จากรายงานการศึกษาของศิริรัตน์ โกศัลวัฒน์ (2528) พบว่าครีมบัวบก 1 % สามารถลดขนาดของแผลเรื้อรังในผู้ป่วยทั้งด้านกว้าง ด้านยาว และด้านลึก นอกจากนี้ยังสามารถลดการติดเชื้อของแผลได้ด้วย ต่อมา Rao Gv et. Al (1996) ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากบัวบกในตัวทำละลายทุกชนิด สามารถลดขนาดของแผลเปิดที่ผิวหนัง (excision-type wound) ได้ โดยที่สารสกัดบัวบกใน 5% propylene glycol มีประสิทธิภาพในการลดขนาดแผลดีที่สุด และสารสกัดบัวบกใน aqueous extract สามารถเพิ่มปริมาณคอลลาเจน (collagen content) เพิ่มการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) และเร่งกระบวนการ epithelialization

นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรบัวบกต่อกระบวนการเรียนรู้และความเข้าใจของหนู พบว่าการได้รับสารสกัดด้วยน้ำขนาด 200 มก./กก. เป็นระยะเวลานาน 14 วัน ทำให้การเรียนรู้และความจำของหนูดีขึ้น อีกทั้งการได้รับสารสกัดขนาด 200 และ 300 มก./กก.

น้ำหนักตัว ทำให้ระดับ malodialdehyde (MDA) ลดลงและเพิ่มระดับของ glutathione ในสมองหนูอย่างมีนัยสำคัญ (Veerendra and Gupta, 2002)

ทบทวนวรรณกรรม

การสมานของแผล คือ การกลับคืนสู่สภาพปกติของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายจากสาเหตุใด ๆ ก็ตาม ซึ่งอาจเป็นไปตามธรรมชาติหรือจากการรักษา (ชัชรินทร์ อังศุภากร, 2526) โดยมีขั้นตอนในการสมานแผลดังต่อไปนี้

<u>กระบวนการสมานแผล</u> (Healing process) แบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ (Chaiyaphruk S, 2003)

1. Hemostasis phase : เกิดขึ้นทันทีที่เกิดแผล เมื่อมีการฉีกขาดของหลอดเลือด จะเกิดการกระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัว และเกิดการรวมกลุ่มของเกร็ดเลือด ไปอุดรอยฉีกขาดของหลอดเลือด
2. Inflammatory Phase : เป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและเซลล์บริเวณแผล เพื่อปกป้องร่างกาย กำจัดสิ่งแปลกปลอมและเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว เกิดขึ้นภายหลังเกิดแผล 2-3 ชั่วโมง เริ่มมีเม็ดเลือดขาวเข้ามาจับกินเชื้อโรค เนื้อตาย และสิ่งแปลกปลอม
3. proliferative phase : เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ มีการหดตัวของแผลและการงอกของหนังกำพร้าโดย fibroblast มีบทบาทสำคัญในการสร้างคอลลาเจน ระยะนี้จะมีหลอดเลือดบริเวณใกล้เคียงแตกแขนงเข้ามาเลี้ยงบริเวณแผลมากขึ้น
4. Remodeling phase : เป็นระยะที่มีการปรับรูปร่างและเพิ่มความแข็งแรงแก่แผล โดยมีการไขว้กันของคอลลาเจน

<u>บัวบก</u>

ลักษณะทางพฤกศาสตร์

บัวบกเป็นพืชในวงศ์ Unbelliferae มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (Linn.) Urban ส่วนชื่อพื้นเมืองนั้นมีหลายชื่อ คือ ผักแว่น (ใต้) ผักหนอก (เหนือ) ปะหนะเอขาเต๊าะ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) มีลักษณะที่สำคัญ คือ เป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี เลื้อยยาวไปตามพื้นดิน แตกรากและใบตามข้อ ใบเดี่ยวรูปไต ขอบใบหยักมน ดอกออกเป็นช่อเดี่ยวคล้ายร่ม กลีบดอกสีม่วงอมแดงเกสรผู้สั้น ผลแบน เป็นวัชพืชเขตร้อน สามารถขยายพันธุ์ได้ตลอดโดยการเพาะเมล็ดหรือตัดแยกไหลที่มีต้นอ่อนและรากนำไปปลูกในที่ชื้นแฉะซึ่งได้รับแสงแดดพอควรจะเจริญเติบโตได้ดี (วีรพล คู่คงวิริยะพันธุ์ม 2544)

ตามข้อมูลความรู้เดิม มีการระบุถึงสรรพคุณของบัวบก ดังนี้ (วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์ม 2544)

ต้น แก้ช้ำใน เป็นยาบำรุง รักษาโรคผิวหนัง โรคเส้นประสาท ขับปัสสาวะ บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย แก้ท้องเสีย แก้อาการเริ่มเป็นบิด แก้ร้อนใน แก้นิ่ว แก้โรคเรื้อน รักษาแผลสด

ใบ เป็นยาบำรุง รักษาโรคผิวหนัง แก้โรคประสาท ขับปัสสาวะ บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย แก้ท้องเสีย แก้ร้อนใน แก้ช้ำใน แก้ฟกช้ำ แก้อาการเริ่มเป็นบิด แก้ปวดประจำเดือน รักษาตาปลา รักษาหูด แก้น้ำร้อนลวก ไฟลวก แก้ไข้ร้อนใน กระหายน้ำ

เมล็ด แก้บิด แก้ไข้ แก้ปวดศีรษะ

ทั้งต้น นำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลียเมื่อยล้า ขับปัสสาวะ ขับระดู แก้ตกเลือด แก้อาเจียนเป็นเลือด แก้ไอ แก้เลือดกำเดาออก แก้ตาแดง แก้เจ็บคอ แก้ไอ แก้ท้องเสีย แก้อาการเริ่มเป็นบิด แก้หกช้ำ รักษาบาดแผล แก้อาการอักเสบ รักษาโรคผิวหนัง เป็นยาเจริญอาหาร ลดความดัน รักษาวัณโรค แก้ร้อนใน ลดไข้

สำหรับข้อมูล ในการศึกษาวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์นั้น ได้มีรายงานไว้หลายการศึกษา ทั้งการศึกษาทางเคมี ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และด้านพิษวิทยา ดังนี้ (อรนุช โชคชัยเจริญพร, 2540)

การศึกษาทางเคมี

ได้มีผู้ทำการศึกษาค้นคว้า และได้พบสารเคมีในส่วนต่างๆ ของพืช ดังต่อไปนี้ (Norman RF : Bunyapraphatsara N, 1992)

ใบ : asiaticoside, bicycloclemene, borneol acetate, campesterol, β-caryophyliene, α- copaene, β- elemene, germacrene, kaempferol, kaempferol-3-0-β-D-glucoside, kaempferol-1-7-0-β-D-glucoside, linamarase, myrecene, α-pinene, β-pinene, quercetin-3-0-β-D-glucoside, β-sitosterol, stigmasterol, γ-terpinene, β-trans-farnesene

ทั้งต้น : Asiatic acid, asiaticoside, betulinic acid, brahmic acid, brahminoside, brahmoside, centella asiatica compound BK, centellic acid, centellose, glucose, hydrocotyline, indocentelloside, indocentoic, isobrahmic acid, isothankunic acids, isothankuniside, medacassic acid, madasiatic acid, madecassoside, mesoinositol, methyl-5-hydroxy-3,6-diketo-23-norurs-12-en-28-oate, phellandrene

ก้านใบ : Asiatic and madacassic acids, asiaticoside

ก้านดอก : Asiatic and madacassic acids, asiaticoside

<u>ข้อมูลการศึกษาทางเภสัชวิทยา</u>

1. ฤทธิ์ในการรักษาแผล

1.1 Shukla A และ Dhawan RN (1999) ใช้ asiaticoside ความเข้มข้น 0.2% ทาเช้า-เย็น บนแผลเปิดที่ผิวหนัง (excision-type wounds) ของหนูเป็นเวลา 7 วันและวัดระดับ antioxidants

ทั้งชนิดเอนไซม์และชนิดที่ไม่ใช่เอนไซม์ซึ่งสร้างขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อใหม่ของบาดแผล พบว่า ระดับของ antioxidants เพิ่มขึ้น ดังนี้ superoxide dismutase เพิ่ม 35%, catalase เพิ่ม 67% , glutathione peroxidase เพิ่ม 49%, vitamin E เพิ่ม 77% และ ascorbic acid เพิ่ม 36% นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ lipid peroxidation ลดลงถึง 69% และเมื่อทา asiaticoside ที่แผลต่อจนครบ 14 วันในหนูกลุ่มเดิมไม่พบความแตกต่างของการเพิ่มขึ้น

ของระดับ antioxidants ดังนั้นสรุปได้ว่า asiaticoside มีผลในระยะแรก ๆ ของ healing process

1.2 Sunilumar และคณะ (1998) ทำการศึกษา aqueous extract จากต้นบัวบก ในรูปของ ointment, cream และ gel โดยทาสารสกัดบัวบกทั้งสามรูปแบบที่แผลเปิด (excision type wound) บริเวณผิวหนังของหนูทดลอง 3 ครั้งต่อวัน นาน 24 วัน ผลการรักษาพบว่าสารสกัดบัวบกให้ผลรักษาแผลได้ดี โดยเฉพาะในรูป gelโดยเซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น และมีการสร้างคอลลาเจนที่แผลมากขึ้น

1.3 จากการศึกษาของ Maquart FX และคณะ (1999) ใช้ titrated extract จากต้นบัวบกที่ประกอบด้วย triterpines 3 ชนิด คือ asiatic acid, madecassic acid และ asiaticoside ฉีดลงบนแผลของหนูทดลอง ซึ่งทำการผ่าตัดฝัง stainless steel ไว้ใต้นผิวหนัง จากนั้นนำ wound chambers ของ หนูทดลองมาทำการวิเคราะห์ทางชีวเคมีและตรวจทางวิทยาฮิสโต พบว่ามีการ remodeling ของ collagen matrix และยังเพิ่มการสร้าง glycosaminoglycan มากขึ้น โดย asiatic acid และ asiaticoside ให้ผลดีที่สุด

2. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

อารีรัตน์ ลออปักษา และคณะ (2531) ทำการศึกษาโดยใช้สารสกัดจากบัวบก ความเข้มข้น 200 mg/ml ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดจากบัวบก มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ staphylococcus aureus, β-Streptococcus group A, Pseudomonas aeruginosa ซึ่งเป็นเชื้อที่พบบ่อยในการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ

3. ฤทธิ์ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

3.1 Dhorranintra B และ Sangsirinavin C (1982) ได้ทำการศึกษา สารสกัด glycosideจากต้นบัวบก โดยฉีดสารละลาย glycoside ขนาด 5, 10, 15 และ 20 mg/kg เข้าทางหลอด เลือดดำที่โคนขา (femoral vein) ของสุนัข พบว่า ทำให้ความดันเลือดต่ำลง หัวใจเต้นช้าลง ผลดังกล่าวจะกลับสู่ภาวะปกติในเวลาประมาณ 2-3 นาทีหลังฉีด และฤทธิ์ต่อระบบไหลเวียนเลือดนี้จะแปรตามปริมาณสารที่ฉีด นอกจากนี้สาร glycoside ยังมีผลทำให้หลอดเลือดแดงของหูกระต่ายที่ตัดแยกออกจากการขยายตัวเพิ่มขึ้น และทำให้กล้ามเนื้อหัวใจกระต่ายที่ตัดแยกออกจากกาย มีอัตราการเต้นและความแรงของการหดตัวลดลง ฤทธิ์ของ glycoside ที่สกัดได้จากต้นบัวบกนี้ ไม่สามารถถูกยับยั้งได้โดย atropine, hexamethonium, propranolol หรือ antihistamine

3.2 นภดล เลือดนับรบ (2542) ใช้สารสกัดแห้งจากบัวบกซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล 95% ทดลองในหนูที่ชักนำให้เกิดความดันเลือดสูงโดยการหนีบหลอดเลือดไต (2 kidney-clip renovascular hypertension) โดยการ

ป้อนสารสกัดในขนาด 1 g/kg/day เป็นเวลา 7 วัน พบว่าทำให้ความดันโลหิตในหนูทดลองต่ำลง

4. ฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร

Cheng CL และKoo MW (2000) ทำการศึกษาโดยป้อนน้ำยาสกัดบัวบกขนาด 0.05, 0.25 และ 0.5 g/kg ให้แก่หนูทดลอง ก่อนที่จะทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร พบว่าสารสกัดบัวบกลดอัตราการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูทดลอง 58-82 % และลดการทำงานของเอนไซม์ mucosa myeloperoxidaseได้ตามขนาดของสารสกัดที่ให้(dose dependent manner) ซึ่งเชื่อว่าสารสกัดบัวบกอาจช่วยเพิ่มความแข็งแรงของ mucosal barrier และยับยั้งอนุมูลอิสระที่จะทำลายกระเพาะอาหารด้วย

5. ฤทธิ์ต่ออาการแพ้

Hausen BM (1993) ใช้สารสกัดหยาบบัวบก และสารสกัดในส่วน triterpenoids ซึ่งประกอบด้วย asiaticoside, Asiatic acid และ madecassic acid ทำการศึกษาในหนูตะเภา เพื่อตรวจสอบ sensitizing capacity พบว่า ทำให้เกิดอาการแพ้ได้น้อยมาก (weak sensitizers) แม้จะทาบริเวณผิวหนังที่รักษาบ่อย ๆ

6. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง

Babu TD และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษา สารสกัดหยาบและสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์จากต้นบัวบกใน *in vitro* short term และ long term chemosensitivity และ *in vivo* tumour model test systems พบว่าสารสกัดบัวบกกึ่งบริสุทธิ์ให้ผลยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าสารสกัดแบบหยาบ และเมื่อให้สารสกัดบัวบกทั้งแบบหยาบและกึ่งบริสุทธิ์โดยการป้อน พบวาสามารถชะลอการเจริญของ solid และ ascites tumours และเพิ่ม life span ของหนูถีบจักรด้วย สำหรับกลไกการออกฤทธิ์เชื่อว่ามีผลโดยตรงต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

7. ผลต่อการเรียนรู้และความเข้าใจและ oxidative stress ของสมอง

นักวิจัยจากอินเดียกลุ่มหนึ่งได้วิจัยฤทธิ์ของสารสกัดต่าง ๆ ของบัวบกต่อการะบวนการเรียนรู้ (cognition = กระบวนการทางจิตที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้ ได้แก่ การรับรู้ การใช้เหตุผล และ การตัดสินใจ) ของหนู พบว่ากรได้รับสารสกัดด้วยน้ำขนาด 200 มก./กก. เป็นระยะเวลานาน 14 วัน ทำให้การเรียนรู้และความจำของหนูดีขึ้น อีกทั้ง การได้สารสกัดขนาด 200 และ300 มก./กก. ทำให้ระดับmalodialdyhyde (MDA) ลดลงและเพิ่มระดับของ glutathione ในสมองหนูอย่างมีนัยสำคัญ (Veerendra K and Gupta YK, 2002)

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาผลของสารสกัดบัวบกด้วยน้ำในหนูที่ได้รับสาร Pentylenetetrazole (PTZ) เพื่อกระตุ้นให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของสมองแบบโรคลมชัก ซึ่งมีผลรบกวนต่อการเรียนรู้ของหนู พบว่าการได้รับสารสกัดด้วยน้ำของบัวบกขนาด 300 มก./กก. เมื่อให้ทางปากสามารถลดอาการชัก และช่วยทำให้การเรียนรู้ของหนูที่ได้รับ PTZ ดีขึ้น (Gupta YK, et al., 2003)

ต่อมานักวิจัยกลุ่มนี้ได้ศึกษาผลของสารสกัดด้วยน้ำของบัวบกต่อการเรียนรู้ของหนูที่ได้รับสาร streptozotocin (STZ)เข้าทาง intracerebrovascular เพื่อทำให้มีอาการคล้ายโรค Alzheimer และมีความผิด

ปกติของการเรียนรู้เนื่องจากมีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมาก พบว่าการได้รับสารสกัดด้วยน้ำของบัวบก ขนาด 100, 200 และ 300 มก./กก. ช่วยเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้ของหนูโดยมีความสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้ และสารสกัดขอนาด 200 และ 300 มก./กก ทำให้ระดับ MDA ในสมองลงลงขณะที่ระดับของ glutathione และ catalase เพิ่มขึ้น(Veerendra K and Gupta YK, 2003)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อความสามารถในการเรียนรู้และความจำในโมเดลของหนูถีบจักร
2. ศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกในหนูขาว

ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

1. สารสกัดมาตรฐานบัวบก น่าจะสามารถแก้ไขสภาวะความบกพร่องในการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นในหนูถีบจักร โดยวิธี Step-down test (Brioni JD. et al, 1997) และ Morris's water maze test (Morris R, 1984 : Murakami Y. et al, 2000)

2. สารสกัดมาตรฐานบัวบก น่าจะมีผลในการสมานแผลของหนูขาวทั้งในบาดแผลที่เกิดจากการกรีดและบาดแผลไฟไหม้ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบก มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการเสริมความจำหรือแก้ไขความบกพร่องในการเรียนรู้ได้หรือไม่
2. ทราบถึงฤทธิ์ในการสมานแผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อันจะเป็นประโยชน์ในการกำหนดปริมาณของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ในเภสัชภัณฑ์ที่ใช้ในการสมานแผล
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานที่อาจนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากบัวบก ที่สามารถใช้ได้ในผู้สูงอายุ

วัสดุและวิธีวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง หนูถีบจักร ICR เพศผู้ น้ำหนัก 25-30 กรัม สำหรับการศึกษาผลของสารทดสอบต่อความบกพร่องในการเรียนรู้และความจำ สำหรับการศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลจะใช้หนูขาวพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ น้ำหนัก 250-300 กรัม หนูทั้งหมดได้รับจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม โดยหนูทุกตัวจะถูกนำมาเลี้ยงอย่างน้อยเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมอุณหภูมิห้องให้อยู่ระหว่าง 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$C มีแสงสว่างพอเหมาะ มีระบบระบายอากาศ และเลี้ยงสัตว์ทดลองในกรงที่มีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด การทดลองทั้งหมดดำเนินการระหว่างเวลา 8.00-18.00 น. และสัตว์ทดลองทุกตัวจะนำมาใช้เพียงครั้งเดียว

2. สารเคมี

2.1 สารสกัดมาตรฐานบัวบก ได้รับจากโครงการย่อยที่ 1 และ 2

2.2 ยาหรือสารเคมีอื่น ๆ

- Normal saline solution (Thai Nakron Patana Co., Ltd., Thailand)
- Ethanol 95% (GPO, Thailand)
- Tween 20 (The East Asiatic Co., Ltd., U.S.A.)
- Pentobarbital sodium (Nembutal ®, Sanofi, France)
- Scopolamine hydrobromide (Sigma, U.S.A.)
- Sodium hydrogen phosphate-2-hydrate (Sigma, U.S.A.)
- Sodium dihydrogen phosphate-2-hydrate (Sigma, U.S.A.)
- Acetic acid (Sigma, U.S.A.)
- Sodium dodecyl sulfate (sigma, U.S.A.)
- Thiobarbituric acid (Sigma, U.S.A.)
- N-butanol (Sigma, U.S.A.)
- Pyridine (Sigma, U.S.A.)
- 1,1,3,3-tetraethoxy-propane (Malondiadehyde) (Sigma, U.S.A.)
- 10% Formalin (E Merck, Germany)

3. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- Locomotor activity set (UGO Basile, Comerico, Italy)
- Morris water maze set (Home made, Thailand)

- Stop watch (Citizen, Swisserland)
- Step-down set (Home made, Thailand)
- PH meter (Beckman, U.K.)
- Automatic micropipette (Pipet-Lite ™, U.S.A.)
- Automatic mixer (Vertex, U.S.A.)
- Homogenizer (Glas-Col, Terre Haute, U.S.A)
- Centrifugater (Sorvll, GLC-2B, U.S.A.)
- Spectophotometer (Shimadzu, UV1201, Japan)
- Conical centrifuge tube (Nunc, Denmark)
- Hot plate
- เทอร์โมมิเตอร์
- Battalian
- Surgical blade no. 23
- Transparent polythene paper (graph paper)
- Tensiometer EZ-TEST (Shimadzu, Japan)
- Black Silk no. 3-0

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมสารทดสอบและการให้สารทดสอบ

ผู้วิจัยใช้สารละลาย 5 % ของ tween 20 ในน้ำเป็นตัวทำละลายสารสกัดสมุนไพรบัวบก และใช้ NSS เป็นตัวทำละลาย pentobarbital sodium สำหรับการศึกษาในส่วนของการเรียนรู้และความจำผู้วิจัยจะให้สารสกัดสมุนไพรบัวบกโดยผ่านทาง gavage tube เข้าสู่กระเพาะอาหารส่วนการศึกษาผลต่อการหายของบาดแผล จะทาสารสกัดสมุนไพรบัวบก 5% บริเวณผิวหนังที่เกิดบาดแผล และการใช้ยาสลบ pentobarbital sodium จะให้โดยการฉีดเข้าในช่องท้องของสัตว์ทดลอง ปริมาณสารต่าง ๆ ที่สัตว์ทดลองได้รับจะอยู่ระหว่าง 0.1-0.2 ml. ทางช่องท้อง และ 0.2-0.4 ml. ทางกระเพาะอาหาร

2. การทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการเรียนรู้และความจำ

โดยใช้วิธีการทดสอบเพื่อทำให้เกิดภาวะบกพร่องของความจำและการเรียนรู้ซึ่งจะทดสอบโดยวิธีการดังนี้

2.1. Cerebral ischemia-induced learning and memory impairment

เป็นการทำให้หนูถีบจักรมีความบกพร่องในการเรียนรู้และความจำโดยการทำ bilateral occlusion of common carotic arteries หรือ 2 vessels occlusion (2VO)

<u>วิธีการผ่าตัด</u>

ทำให้หนูหมดความรู้สึกโดยใช้ Pentobarbital ในขนาด 45 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยใช้ normal saline เป็นตัวทำละลาย ฉีดยาสลบเข้าทางช่องท้อง (i.p.) ทำการผ่าตัดโดยเปิดเข้าทางคอด้านหน้า (ventral mid-line) แยก common carotid arteries เส้นประสาทเวกัส (vagus nerve) และเนื้อเยื่อรอบๆ ออก นำด้ายขนาดยาว 8 เซนติเมตร คล้องใต้หลอดเลือดทั้ง 2 เส้น หมุนด้ายรัดหลอดเลือด และนำ clip มาหนีบเส้นด้าย ทำการ clamp เป็นเวลา 20 นาที ตัดปลายหางหนูแล้วบีบเลือดออกจากหางปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร เพื่อสร้างภาวะความดันต่ำ จากนั้นปิดบาดแผลที่หางด้วยกาวชนิดแห้งเร็ว เมื่ออุดกั้นหลอดเลือดครบเวลา 20 นาที คลายเส้นด้ายออก (ทุกขั้นตอนผ่าตัดทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ) และทำการปิดแผลผ่าตัดด้วยกาวชนิดแห้งเร็ว (extra superglue) (Xu *et al.*, 2000) โดยให้หนูพักอยู่ภายใน อุณหภูมิห้อง จนกว่ายาสลบจะหมดฤทธิ์ สำหรับหนูกลุ่ม Sham จะดำเนินการผ่าตัด ด้วยวิธีเดียวกับที่กล่าวข้างต้นทุกประการ ยกเว้นแต่ไม่มีการปิดกั้นการไหลของเลือดและไม่ให้เลือดไหลออกจากตัวเท่านั้น

แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ กลุ่มละ 8 ตัว กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่ม sham ได้รับ vehicle (5% tween20) กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่ม 2-VO ได้รับ vehicle กลุ่มที่ 3-6 เป็นกลุ่ม 2-VO ได้รับสารสกัดสมุนไพรบัวบก (ละลายในvehicle) ในการสกัดที่แตกต่างกันออกไป คือ hexane, Ethylacetate, Methanol และ น้ำ ในแต่ละการสกัดจะแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นกลุ่มย่อย 2-3 กลุ่ม ซึ่งจะใช้สารสกัดที่ขนาดต่าง ๆ กันไป โดยให้สารทดสอบทางปาก (p.o.) ภายหลังจากการผ่าตัดจะทดสอบพฤติกรรมใน Morris water maze 5 วัน (Bejar, Wang and Weinstock, 1999) ทดสอบพฤติกรรมใน Step down test ต่อจากนั้นอีก 2 วัน และเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ เมื่อทดสอบทางพฤติกรรมไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลง locomotor activity ดังนั้นจึงต้องนำหนูไป ทดสอบ Locomotor activity test ในวันสุดท้าย ซึ่งสัตว์ทดลองจะได้รับสารต่อเนื่องกัน 8 วันภายหลังจากการผ่าตัด หลังจากนั้นทำการการศึกษาผลของสารทดสอบต่อภาวะ oxidative stress ซึ่งเกิดขึ้นใน 2VO โดยนำสมองของสัตว์ทดลองไปทำ Lipid peroxidation assay

2.2 Memory Impairment induced by scopolamine

เป็นการทำให้หนูถีบจักรเกิดความบกพร่องในการเรียนรู้และความจำ โดยการฉีดสาร Scopolamine ในขนาด 0.5-1.0 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้องก่อนการทดสอบทางพฤติกรรมโดยวิธี Morris Water Maze Test (MWM) และ Stepdown Test แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 6 กลุ่มเหมือนกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำโดย 2VO การเหนี่ยวนำสัตว์ทดลองโดย scopolamine ทำโดยป้อนสารทดสอบต่อเนื่องกัน 8 วัน โดยป้อนสารทดสอบทางปาก (p.o.) หลังจากนั้น 30 นาที จึงให้สาร scopolamine ในขนาด 1 มก./กก. เข้าทางช่องท้อง (i.p.) ในสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม ยกเว้นใน กลุ่มควบคุมให้ normal saline 0.1 มิลลิลิตร และทิ้งไว้ 30 นาที (Bejar, Wang and Weinstock, 1999) จึงนำหนูไปทำการทดสอบทางพฤติกรรมต่อไป

3. การทดสอบทางพฤติกรรม (Behavior tests)

3.1 Morris water maze (MWM)

การทดสอบพฤติกรรมใน MWM เริ่มต้นขึ้นในปี 1984 โดย Morris เป็นการวัด spatial memory (D' Hooge and De Deyn, 2001) การทดลองนี้ใช้อุปกรณ์ที่ประกอบด้วยอ่างสีดำในอ่างบรรจุน้ำมีความลึก 13 เซนติเมตร กว้าง 70 เซนติเมตร ควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ 25±1 องศาเซลเซียส ภายในอ่างมีแท่น (hidden platform) เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร อยู่ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ 1 เซนติเมตร แบ่งอ่างออกเป็น 4 ส่วน เท่าๆ กัน วาง hidden platform ที่กึ่งกลางของส่วนใดส่วนหนึ่ง (อยู่คงที่ตลอดการทดลอง) การทดสอบจะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ training trials และ trials วิธีการทดสอบ training trials วันแรกของการทดสอบ ปล่อยหนูลงที่จุดกึ่งกลางของขอบอ่างน้ำที่แบ่งออกเป็น 4 ส่วน จับเวลาที่หนูใช้ในการว่ายน้ำจนขึ้นไปยืนบน hidden platform บันทึกเวลา โดยปล่อยให้หนูยืนค้างบน hidden platform เป็นเวลา 10 วินาที แล้วจึงนำมาพัก 30 วินาที โดยให้หนูใช้เวลาในการว่ายน้ำหา hidden platform มากที่สุด 60 วินาที (Watanabe H. et al, 2003) ถ้าครบ 60 วินาที แล้วหนูยังไม่สามารถขึ้นไปยืนบน hidden platform ให้จับหนูไปยืนบน hidden platform เป็นเวลา 10 วินาที ทำการทดลองซ้ำในส่วนอื่น ๆ ต่อไปจนครบทั้ง 4 ส่วน ส่วนวิธีการทดสอบแบบ trials ซึ่งมีวิธีเหมือนกับ training trials โดยทำต่อเนื่องไปอีก 5 วัน (Xu *et al.*, 2000) หลังจากการทำให้หนูถีบจักรเกิดความบกพร่องในเรื่องการเรียนรู้และความจำ เปรียบเทียบระยะเวลาที่หนูกลุ่มต่าง ๆ ใช้ในการค้นหาตำแหน่ง Platform ในการทดลองนี้ จะแบ่งหนูออกเป็นกลุ่ม ๆ ละ 8 ตัว โดยมีกลุ่มควบคุม 4 กลุ่ม คือ Sham และ 2VO ซึ่งได้รับและไม่ได้รับตัวทำละลาย และได้รับสารทดสอบในขนาดต่าง ๆ กัน 3 กลุ่ม

3.2 Step-down test

การทดสอบพฤติกรรมใน step down เป็นการทดสอบ passive avoidance การทดลองนี้ใช้อุปกรณ์ที่ประกอบด้วย กล่องขนาด ยาว 30 เซนติเมตร กว้าง 20 เซนติเมตร และ สูง 30 เซนติเมตร พื้นของกล่องเป็นแท่งสเตนเลสซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร วางในแนวนอน แต่ละแท่งห่างกัน 8 มิลลิเมตร สำหรับทำ electrical footshock โดยมีแท่นไม้วงกลม (platform) มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 4 เซนติเมตร สูง 4 เซนติเมตร วางที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งของกล่องตลอดการทดลอง การทดสอบจะแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ acquisition trial และ retention trial วิธีการทำ acquisition trial โดยวางหนูลงบน platform ปล่อยให้เดินอย่างอิสระ 3 นาที แล้วจึงนำหนูไปวางบน platform พร้อมกับปล่อยกระแสไฟฟ้าขนาด 0.4 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 300 วินาที ถ้าหนูลงจาก platform จะถูกกระแสไฟฟ้าช็อคจับเวลาตั้งแต่เริ่มวางหนูจนถึงหนูก้าวลงจาก platform แล้วบันทึกเวลา (step down latency) ถ้าหนูอยู่บน platform จนถึงเวลา 300 วินาที นำหนูออกจากการทดลองแล้วบันทึกเวลาเป็น 300 วินาที และนับจำนวนครั้งที่หนูก้าวลงจาก platform (step down errors) ภายในช่วงเวลา 300 วินาที หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบวิธี retention trial โดยนำหนูวางลงบน platform บันทึก step down latency และ step down errors (Xu *et al.*, 2000)

3.3 Locomotor activity

เป็นการทดสอบว่า การทำ 2VO มีผลต่อการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองหรือไม่ โดยดูผลจากการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารทดสอบ การทดลองใช้เครื่อง UGO Basile 7430 Activity Cage ซึ่งเป็น เครื่องมือที่ประกอบด้วยกล่องพลาสติกใส่สัตว์ทดลองขนาด 35x23x20 cm ข้างกล่อง จะมีตัวส่งและ ตัวรับแสง infra-red วางเป็นแถวรอบกล่อง การเคลื่อนไหวใด ๆ ของสัตว์ทดลองจะไปตัดสำแสง infra-red แล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงให้กลายเป็นสัญญาณไฟฟ้า สัญญาณไฟฟ้า นี้จะถูกนำไปวิเคราะห์การเคลื่อนไหว ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ ซึ่งจะทำการทดลองเป็นเวลา 5 นาที และนับจำนวนการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองเป็น horizontal counts

3.4 Lipid peroxidation assay

ทำการตัดหัวหนู (decapitate) แยกสมองออก ทำความสะอาดโดยใช้ ice-cold saline เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80 °C จากนั้นนำสมองหนูใส่ลงใน ice-cold phosphate buffer (pH 7.4) 0.1 โมลาร์ ในปริมาณ 10 เท่า ของสมองหนู (น้ำหนักต่อปริมาตร) และทำให้เป็นส่วนประกอบเดียวกัน (homogenized) แล้วแบ่งส่วนของของเหลวที่ได้จากการปั่นมาวัด lipid peroxide โดยการวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) จากนั้นนำสารละลายที่ประกอบด้วย acetic acid 1.5 มิลลิลิตร (20%) pH 3.5 thiobarbituric acid 1.5 มิลลิลิตร (0.8%) และ sodium dodecyl sulphate 0.2 มิลลิลิตร (8.1%) มาผสมกับเนื้อเยื่อของสมองหนูที่ผ่านการเตรียมดังกล่าวข้างต้น ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ทำให้ร้อนที่ 100 °C เป็นเวลา 60 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น นำมาผสมลงในส่วนผสมที่ประกอบด้วย *n*-butanol/pyridine 5 มิลลิลิตร (15:1) และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex หลังจากนั้นนำไป centrifugation ที่ 4000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เมื่อส่วนผสมแยกออกเป็นชั้น จึงนำมาวัด absorbance โดยใช้ spectrophotometer ที่ 532 นาโนเมตร (Gupta *et al.*, 2003)

4. ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรบัวบกต่อการหายของบาดแผล

4.1. ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรบัวบกต่อการหายของบาดแผลไหม้

โดยใช้วิธีของ Somboonwong et.al. (2000) ซึ่งดัดแปลงมาจาก model ของ Zawacki (1974) ทำการศึกษา โดยสัตว์ทดลองทุกตัวจะต้องทำให้เกิดแผลไหม้ แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา, กลุ่มที่ได้รับ vehicle, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรบัวบกที่สกัดโดย Hexane, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรบัวบกที่สกัดโดย Ethylacetate, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรบัวบกที่สกัดโดย methanol และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดสมุนไพรบัวบกที่สกัดโดยน้ำ

<u>วิธีผ่าตัด</u>

ทำให้สัตว์ทดลองสลบโดยฉีด pentobarbital sodium ขนาด 60 มก./กก.น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้อง เมื่อสัตว์ทดลองสลบ ทำการโกนขนบริเวณหลังของหนูให้สะอาด เตรียมอุปกรณ์ที่ทำให้เกิดแผลไหม้บนกายหนู (hot plate) ให้ได้อุณหภูมิ 75°C เมื่อได้อุณหภูมิดังกล่าว นำ hot plate วางทาบ

ลงบนผิวหนังที่เตรียมไว้บริเวณระหว่างกระดูกสะบัก (intra-scapula region) ของสัตว์ทดลอง นาน ประมาณ 10 วินาที จะได้ second degree burn wound ซึ่งคิดเป็น 10% ของ พื้นที่ผิวกายหนูทั้งหมด (total body surface area) หลังจากนั้นให้ทาสารทดสอบลงบริเวณที่เกิดแผลไหม้ ทันทีหลังเอา plate ออก ทาแผลวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงของแผลหนู และ บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นโดยสังเกตจากลักษณะทั่วไปและการเปลี่ยนแปลงขนาดของแผลทำ การวัดขนาดของแผล ซึ่งจะใช้ transparent polythene paper (graph paper) แล้วใช้สูตรในการคำนวณ ระดับการหายของแผล (Reddy, 2002)

$$\text{ระดับการหายของแผล} = 1 - \frac{\text{ขนาดของแผลในวันที่ทำการวัด } (mm^2)}{\text{ขนาดของแผลเริ่มต้น } (mm^2)} \times 100$$

เมื่อถึงวันที่ 14 ทำการฆ่าสัตว์ทดลอง (sacrifice) ด้วย pentobarbital sodium 100 มก./กก. น้ำหนักตัว

4.2 ศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรบัวบกต่ออัตราการหายของบาดแผลซึ่งเกิดจากการ กรีด (Incision wound)

ทำการทดลองโดยประยุกต์จาก model ของ Baie and Sheikh (2000)

<u>วิธีการผ่าตัด</u>

ทำให้สัตว์ทดลองสลบโดยฉีด pentobarbital sodium ขนาด 60 มก./กก.น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้อง เมื่อสัตว์ทดลองสลบ ทำการโกนขนบริเวณหลังด้านขาวของหนูให้สะอาด ใช้มีดปลายแหลม (surgical blade no. 23) กรีดลงบนผิวหนังของหนูซึ่งได้ทำการโกนขนไว้ เป็นเส้นตรงขนานกับแนวกระดูกสันหลัง (midline incision) ให้มีความยาวประมาณ 3 ซม โดยกรีดให้ลึกตลอดความหนาของชั้นผิวหนัง จากนั้นทำการเย็บของแผล 2 ด้าน ให้ติดกัน ด้วย black silk no. 3-0 ให้มีระยะห่าง 0.5 cm/stitch (Saha et al, 1997) ทาบริเวณแผลด้วยสารทดสอบเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการฆ่าสัตว์ทดลองด้วย pentobarbital sodium 100 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้อง จากนั้นตัดชิ้นเนื้อบริเวณแผลมาวัด tensile strength โดยใช้ tensiometer ทั้งนี้เนื่องจากผลการศึกษาของ Baie and sheikh (2000) พบว่า เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการวัดการเปลี่ยนแปลงของ tensile strength ซึ่งเกิดจากการรักษา ทำการคำรวณ Tensile strength โดยใช้สูตร (Saringat and Wasim, 1995)

Tensile strength (N/cm^2) = Breaking load (force) (N) / Area (cm^2)

Area (cm^2) = Thickness(cm) x Width (cm)

ซึ่งค่า Tensile strength ที่เพิ่มขึ้น แสดงถึงระดับการหายของแผลนั่นเอง

การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

Morris Water maze test

รวบรวมข้อมูลจากเวลาที่หนูแต่ละกลุ่มว่ายน้ำเข้าหาแท่น โดยจับเวลาตั้งแต่ปล่อยหนูลงน้ำ จนกระทั่งหนูขึ้นไปยืนบน hidden platform นำค่าที่ได้จากการว่ายน้ำทั้ง 4 รอบ มาหาค่าเฉลี่ย นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ

Step down test

รวบรวมข้อมูลจากเวลาที่หนูยืนบนแท่นจนถึงเวลาที่หนูลงจากแท่นใน acquisition trial และ retention trial (step-down latency) และจำนวนครั้งที่หนูก้าวลงจาก platform (step-down errors) ในช่วงเวลา 5 นาที นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ

Locomotor activity test

รวบรวมข้อมูลจากจำนวนครั้งที่หนูเดินในช่วงเวลา 5 นาที นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ

Lipid peroxidation assay

วัดปริมาณความเข้มข้นของMDAมีหน่วยเป็นนาโนโมลต่อกรัมเนื้อเยื่อ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ

Burn wound

วัดขนาดของแผลในแต่ละวัน แล้วนำมาคำนวณระดับการหายของแผล นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ

Incision wound

วัดการเปลี่ยนแปลงของ tensile strength ค่าที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงระดับการหายของแผล นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

แสดงผลการศึกษาข้อมูลการทดสอบพฤติกรรม การทดสอบ lipid peroxidation และระดับการหายของบาดแผล ด้วย mean $\pm$ SEM เป็นพารามิเตอร์ที่ใช้ศึกษา เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มด้วย One-way analysis of variance (ANOVA) และจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติถ้าค่า P น้อยกว่า 0.05

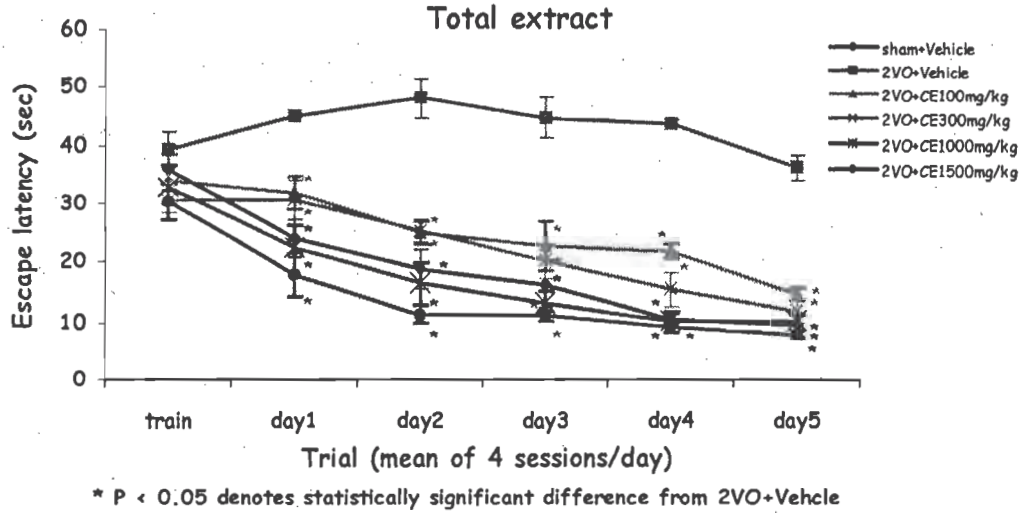
ผลการวิจัย

1.ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกต่อการเรียนรู้และความจำ

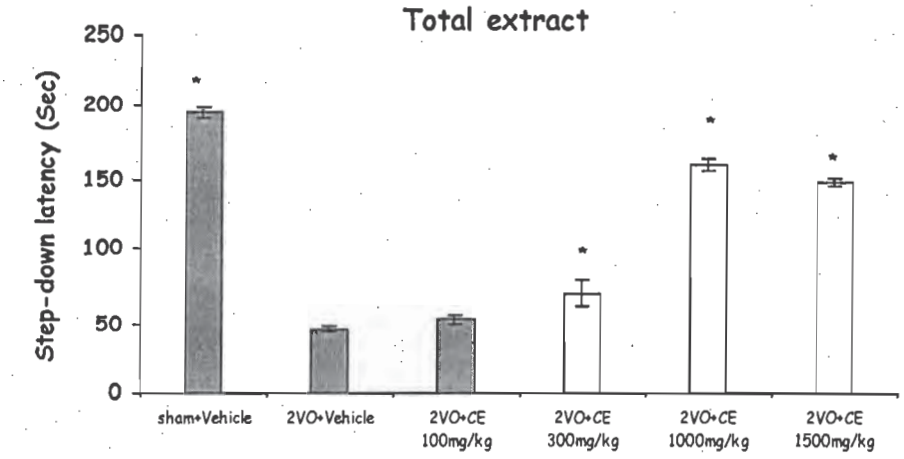
ในการดำเนินการเพื่อ เตรียมสารสกัดมาตรฐานบัวบกนั้น ผู้วิจัยจะต้องทำการทดสอบในสัตว์ทดลองเพื่อระบุให้ได้ว่า สารชนิดใดที่มีฤทธิ์แก้ไขภาวะบกพร่องในการเรียนรู้และความจำ โดยทำการทดสอบสารสกัดหยาบ สารสกัดแยกส่วน จนถึงสารสกัดที่มีความบริสุทธิ์สูง ตามลำดับขั้นที่คณะผู้วิจัยซึ่งทำหน้าที่แยกสกัดส่งมาให้ทดสอบเป็นระยะๆ ตามลำดับขั้น ดังนี้

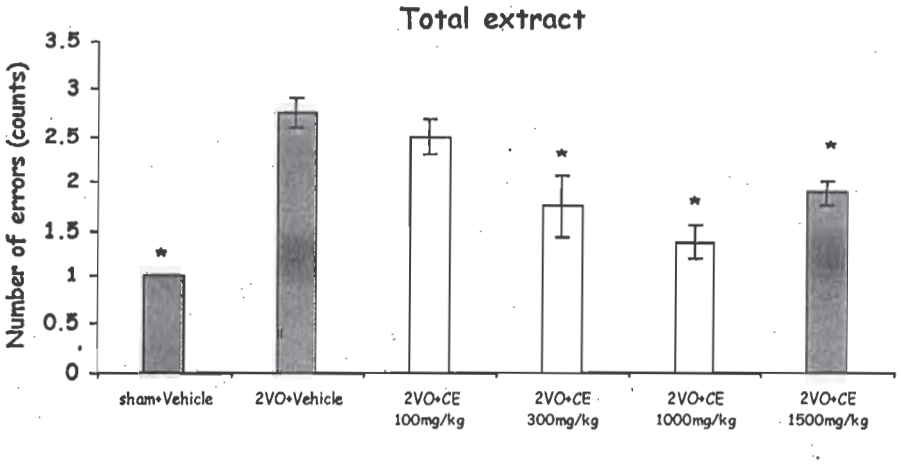
1.1 สารสกัดรวม (Total extract) ซึ่งใช้เอทธานอลเป็นสารสกัด 1 ตัวอย่าง

ผล: บัวบกในลักษณะของสารสกัดรวมในขนาด 300, 1000, 1500 มก./กก. น้ำหนักตัว ที่ให้โดยการป้อนมีฤทธิ์แก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำอย่างมีนัยสำคัญต่างจากกลุ่มของหนูถีบจักร (2VO) ที่ได้รับแต่ vehicle (5%carboxymethyl cellulose) เมื่อทดสอบด้วย MWM test (รูปที่ 1) และ Step-down test (รูปที่ 2) นอกจากนั้นยังพบว่าบัวบกสามารถลดระดับของ malondialdehyde (MDA) ที่เพิ่มสูงขึ้นจากการทำ 2VO ได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (รูปที่ 3)

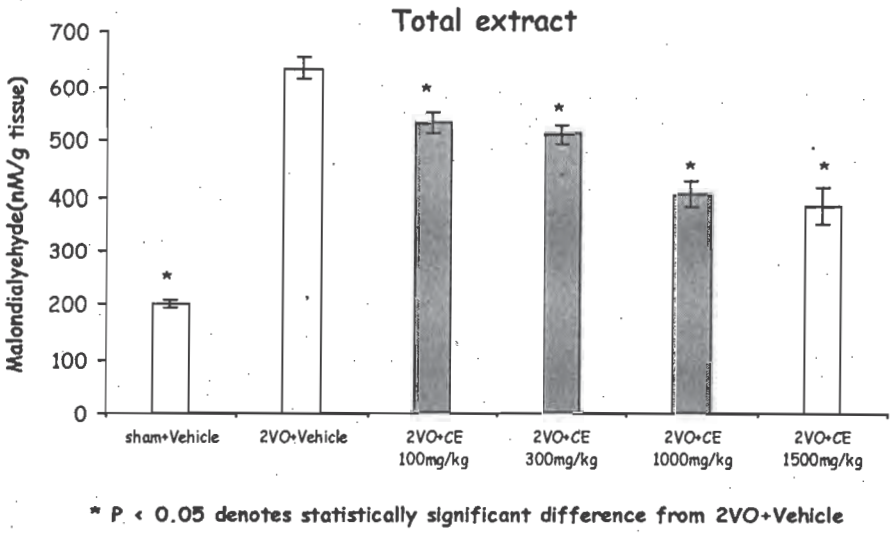


รูปที่ 1. ผลของสารสกัดบัวบกรวม (total extract)ในขนาด 100, 300, 1000 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 8 ตัว





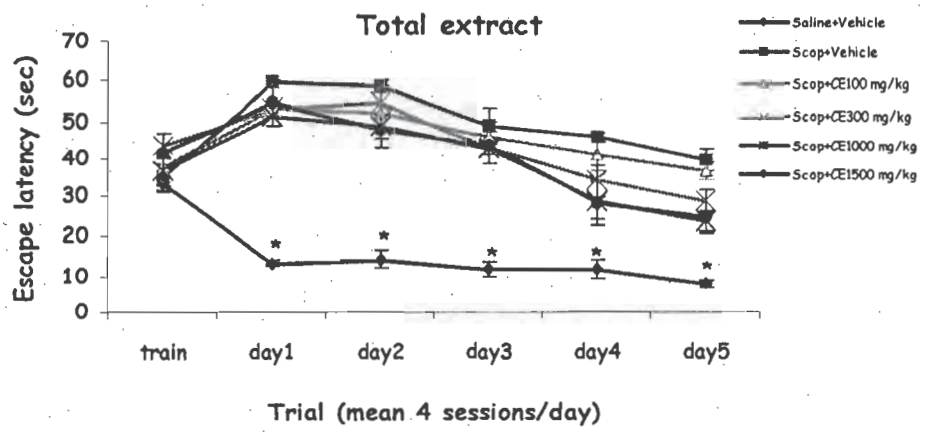
รูปที่ 2. ผลของสารสกัดบัวบกรวม (total extract)ในขนาด 100, 300, 1000 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน Step-down Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 8 ตัว



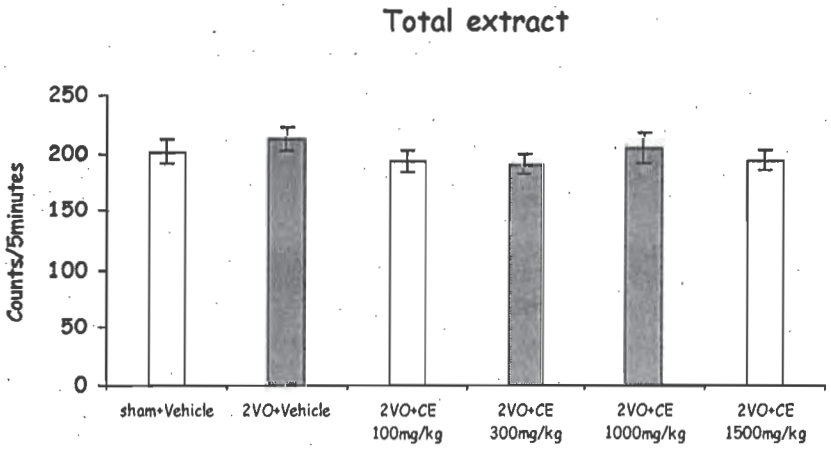
รูปที่ 3. ผลของสารสกัดบัวบกรวม (total extract)ในขนาด 100, 300, 1000 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อระดับของ malondialdehyde (MDA) ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ บกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 8 ตัว

อย่างไรก็ตามไม่พบว่า total extract ของบักบก มีฤทธิ์แก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการให้สารสโคโปลามีนแต่อย่างใด (รูปที่ 4) ดังนั้นจึงจะใช้โมเดล 2VO ซึ่งก็คือโมเดลของ bilateral common carotid occlusion ในการตรวจสอบสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบแยกส่วน และสารสกัดที่มีความบริสุทธิ์สูง เป็นลำดับขั้นต่อไป

และไม่พบว่าสารสกัดรวมบัวบกในขนาดดังกล่าวข้างต้น มีผลเปลี่ยนแปลง Locomotor activity ของหนูถีบจักรแต่อย่างใด (รูปที่ 5)



รูปที่ 4. ผลของสารสกัดบัวบกรวม (total extract)ในขนาด 100, 300, 1000 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (Scopolamine) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 8 ตัว



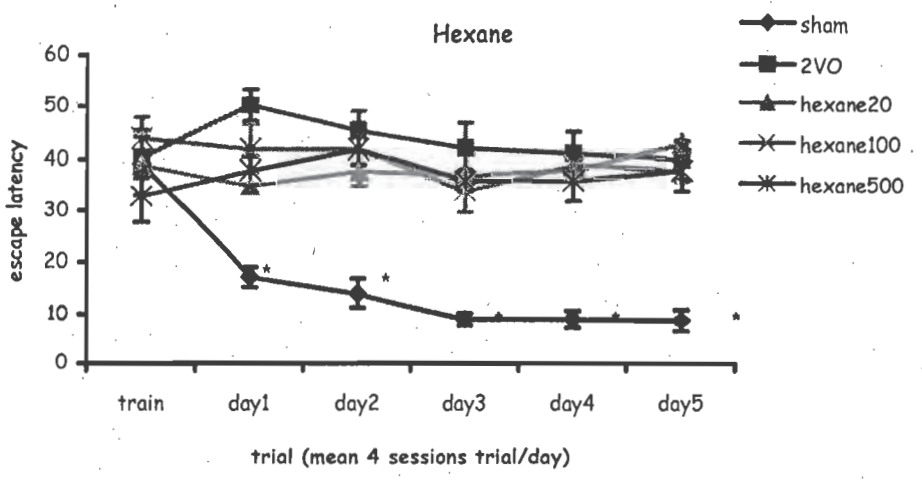
รูปที่ 5. ผลของสารสกัดบัวบกรวม (total extract)ในขนาด 100, 300, 1000 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่ออัตราการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (Scopolamine) ภายในเวลา 5 นาที โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 8 ตัว

1.2 สารสกัดหยาบบัวบกแยกส่วน (Fractional extracts)

ซึ่งเป็นสารสกัดบัวบกที่ได้จากตัวทำละลายที่ใช้สกัดแตกต่างกัน มีจำนวนทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ได้แก่ F1(Hexane), F2 (Ethyl acetate), F3 (Methanol) และ F4 (Water)

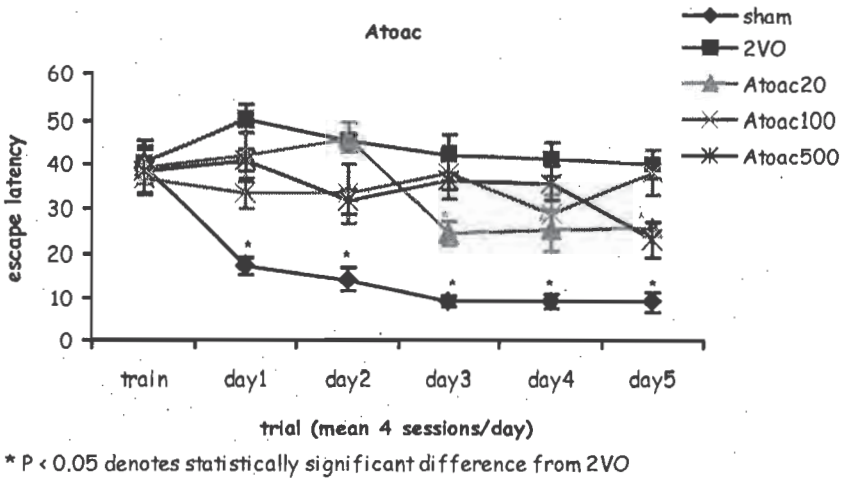
ผล: พบว่าสารสกัดบัวบกส่วน F1 และ F2 ในขนาด 20, 100 และ 500 มก/กก น้ำหนักตัว ไม่แสดงฤทธิ์ในการแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในโมเดลของ 2VO ในการทดสอบด้วย MWM (รูปที่ 6, 7) และ Step-down test (รูปที่ 8) แต่อย่างใด ในขณะที่พบฤทธิ์ดังกล่าวอย่างชัดเจนจากสารสกัดบัวบกในส่วนของ F3 (ขนาด 100, 500 และ 1500 มก/กก น้ำหนักตัว) และ F4 (100 และ 500 มก/กก น้ำหนักตัว) ทั้งในการทดสอบด้วย MWM (รูปที่ 9,10) และ Step-down test (รูปที่ 8) รวมทั้งให้ผลที่สอดคล้องกันต่อ MDA (รูปที่ 11) ดังนั้นจึงจะต้องมีการนำเอาสารสกัดบัวบกส่วน F3 และ F4 ไปแยกต่อ ผู้วิจัยในด้านการสกัดได้เลือกเอาสารสกัดหยาบแยกส่วนเฉพาะส่วน F3 ไปแยกต่อ เนื่องจากในขณะนี้ คณะเภสัชศาสตร์ยังไม่มี facility ที่จะแยกสารสำคัญที่ละลายได้ดีในน้ำ

และไม่พบว่าสารสกัดหยาบบัวบกแยกส่วน F1, F2, F3 และ F4 มีผลเปลี่ยนแปลง Locomotor activityของหนูถีบจักรแต่อย่างใด

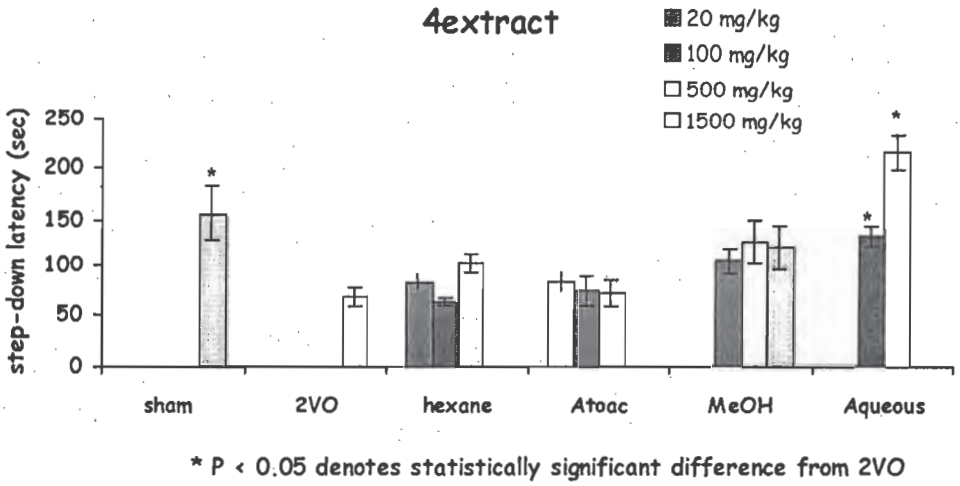


* P < 0.05 denotes statistically significant difference from 2VO

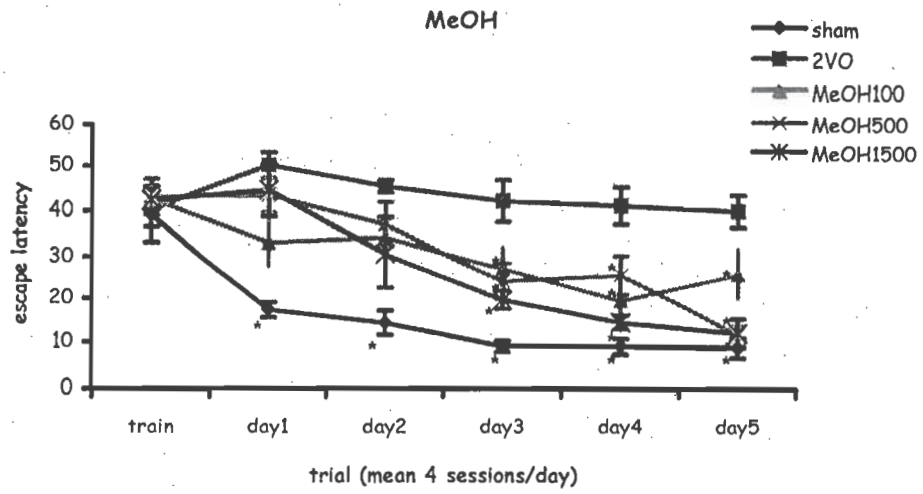
รูปที่ 6. ผลของสารสกัดบัวบก F1ในขนาด 20, 100 และ 500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6 ตัว



รูปที่ 7. ผลของสารสกัดบัวบก F2 ในขนาด 20, 100 และ 500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test (escape latency)ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่อง ของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6 ตัว

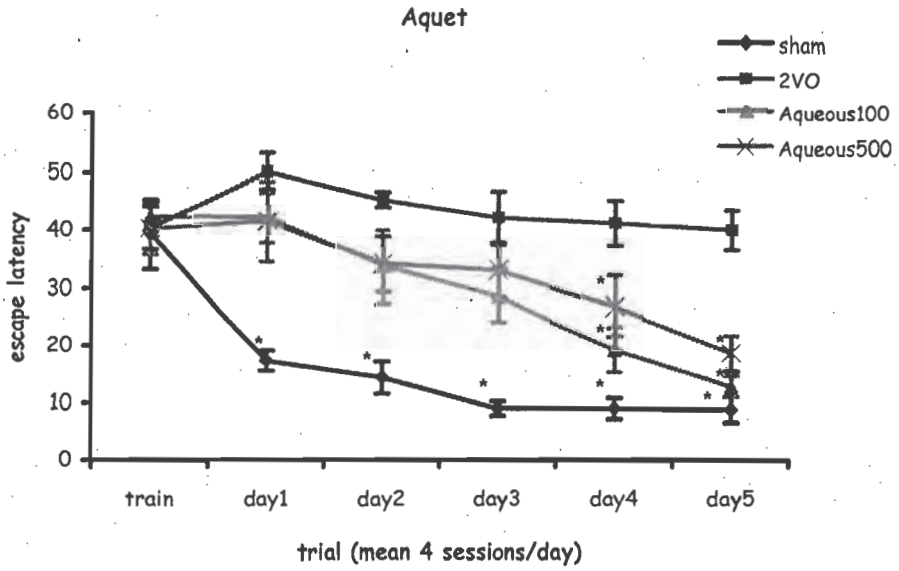


รูปที่ 8. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (Fractional extracts) ในขนาด 20, 100, 500 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน Step-down Test(number of error) ของสัตว์ทดลองที่ถูก เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO)โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม จำนวน 6-8 ตัว



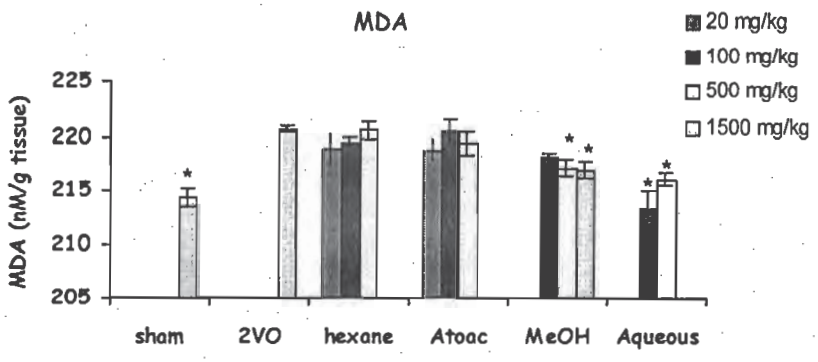
* P < 0.05 denotes statistically significant difference from 2VO

รูปที่ 9. ผลของสารสกัดบัวบก F3 ในขนาด 100, 500 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว



* P < 0.05 denotes statistically significant difference from 2VO

รูปที่ 10. ผลของสารสกัดบัวบก F4 ในขนาด 100, 500 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว

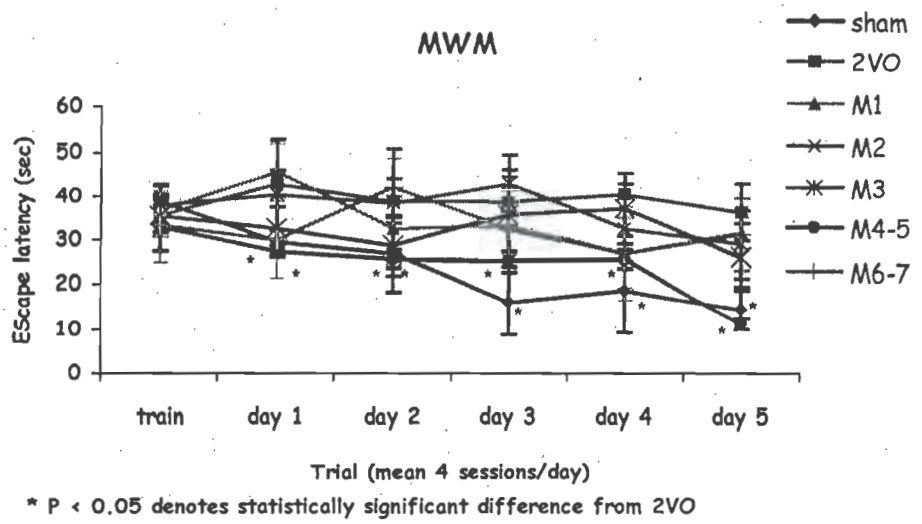


รูปที่ 11. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (Fractional extracts)ในขนาด 20, 100, 500 และ 1500 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อระดับของ malondialdehyde (MDA) ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว

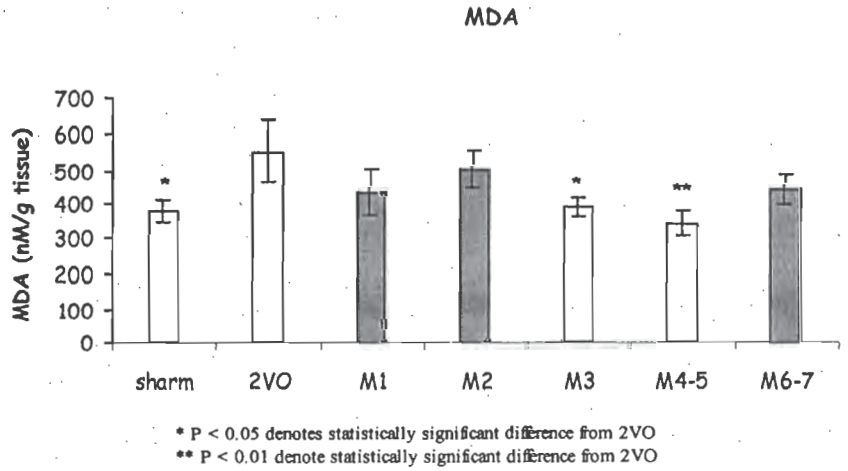
1.3 สารสกัดบัวบกแยกส่วน (Subfraction extracts) ซึ่งได้จากการนำเอาสารสกัดหยาบแยกส่วนF3 ไปผ่าน Column Chromatography แล้วจึง elute เอา subfractions เหล่านั้นมาทดสอบในสัตว์ทดลอง ได้สารทดสอบ subfractionsมาทดสอบทั้งหมด 5 ตัวอย่าง คือ Subfraction F3-1, F3-2, F3-3, F3-4/5, F3-6/7

ผล: จากการทดสอบด้วยวิธี MWM test พบว่า Subfraction F3-4/5ในขนาด 100 มก/กก น้ำหนักตัว แสดงฤทธิ์ในการแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในโมเดลของ 2VO (รูปที่ 12) ในขณะที่ไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวเมื่อนำเอา F3-1, F3-2, F3-3, , F3-6/7 ในขนาดเดียวกันไปทดสอบ อย่างไรก็ตามผลจากการทดสอบด้วยวิธี Step-down แสดงให้เห็นว่านอกจาก Subfraction F3-4/5 แล้วยังมี Subfraction F 3-3 ที่สามารถออกฤทธิ์ลด numbers of error ใน Step-down test ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 14) และสอดคล้องกับผลต่อ MDA (รูปที่ 13)

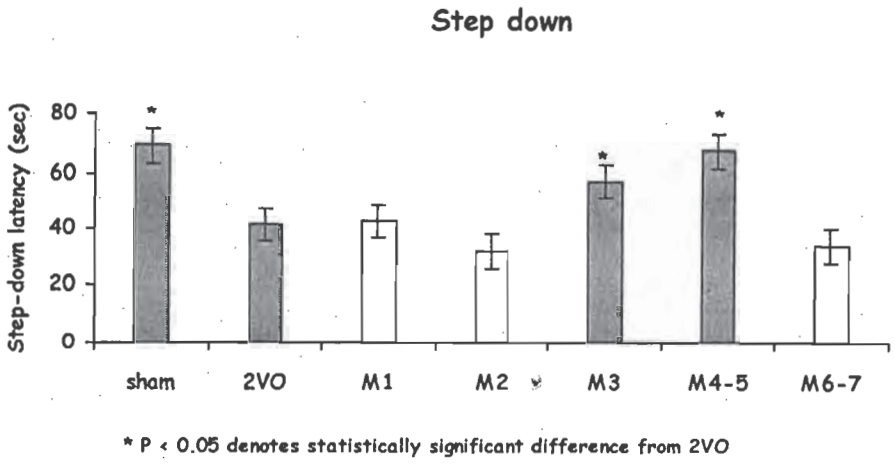
และไม่พบว่าสารสกัดหยาบบัวบกแยกส่วน Subfraction F3-1, F3-2, F3-3, F3-4/5, รวมทั้ง F3-6/7 มีผลเปลี่ยนแปลง Locomotor activityของหนูถีบจักรแต่อย่างใด (รูปที่ 15)

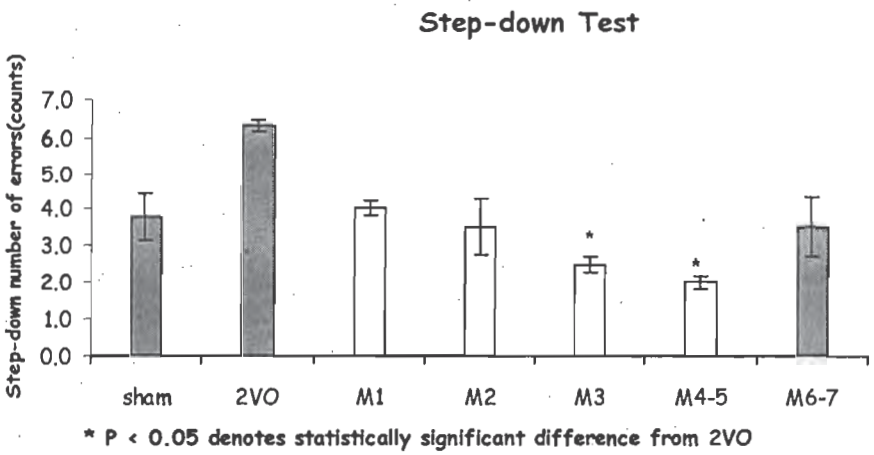


รูปที่ 12. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (subfraction extract)ในขนาด 100 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว

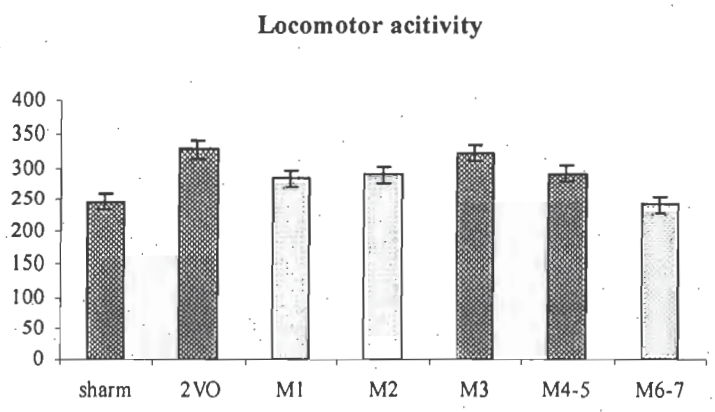


รูปที่ 13. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (subfraction extract)ในขนาด 100 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อระดับของ malondialdehyde (MDA) ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว





รูปที่ 14. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (subfraction extract)ในขนาด 100 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน Step-down Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว

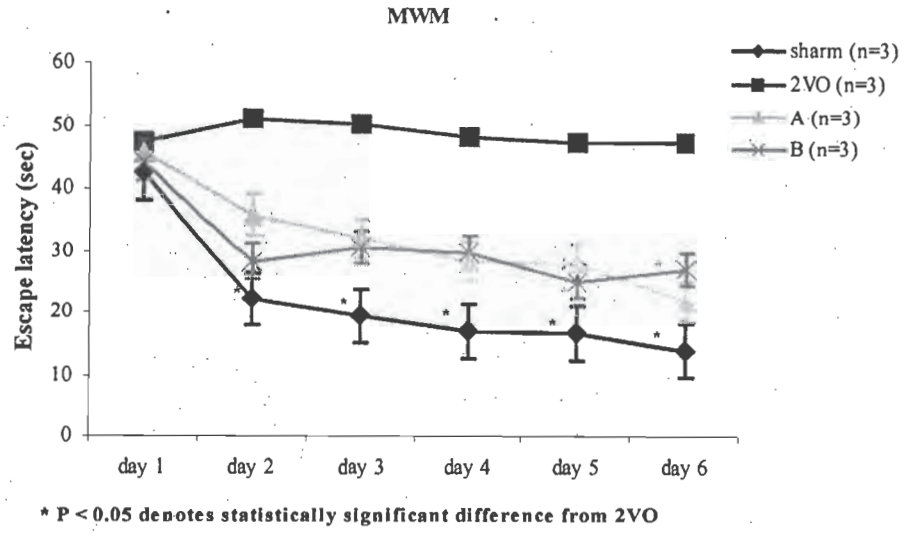


รูปที่ 15. ผลของสารสกัดบัวบกแยกส่วน (subfraction extract)ในขนาด 100 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่ออัตราการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) ภายในเวลา 5 นาที โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน6-8 ตัว

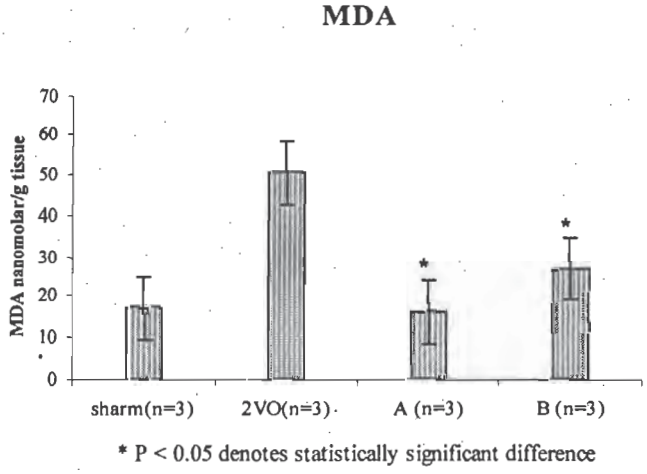
1.4 สารสกัดบัวบกที่มีความบริสุทธิ์สูง (Purified extract) ในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยฝ่ายแยกสกัดได้แยกสกัดสารที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูงและคาดว่าน่าจะเป็นสารออกฤทธิ์ส่งมาตรวจสอบผลในสัตว์ทดลอง

ผล: จากการทดสอบพบว่ามีสารสกัดบัวบกที่มีความบริสุทธิ์สูง สองชนิดคือ สาร A และสาร B ในขนาด 40 มก./กก.น้ำหนักตัว (รูปที่ 16, 17, 18) ที่แสดงฤทธิ์ในการแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในโมเดลของ 2VO ทั้งเมื่อทดสอบด้วยวิธี MWM test หรือ Step-down test รวมทั้งออกฤทธิ์ลดการเกิด MDA

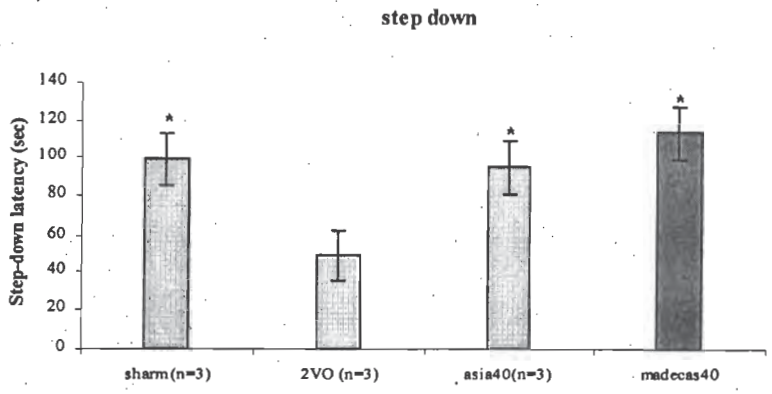
ไม่พบว่าสาร A หรือสาร B ในขนาดที่มีฤทธิ์แก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำมีผลต่อ Locomotor activity ของหนูถีบจักรแต่อย่างใด (รูปที่ 19)

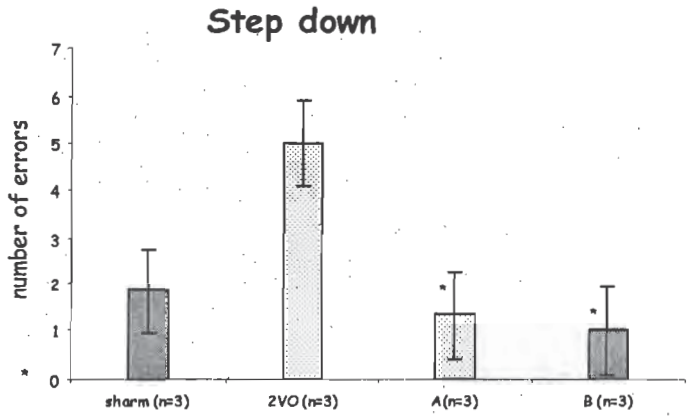


รูปที่ 16. สารสกัดบัวบกที่มีความบริสุทธิ์สูง (Purified extract) ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO)

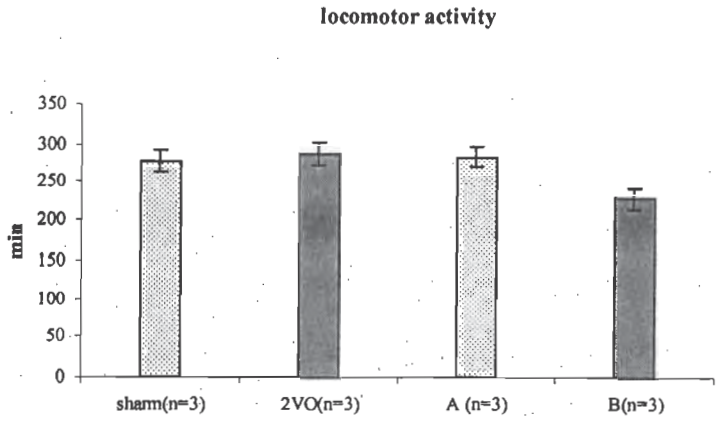


รูปที่ 17. สารสกัดบัวบกที่มีความบริสุทธิ์สูง (Purified extract) ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน Step-down Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO)





รูปที่ 18. สารสกัดบัวบกที่มีความบริสุทธิ์สูง (Purified extract) ที่ให้โดยการป้อน ต่อการทดสอบพฤติกรรมใน Step-down Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ บกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO)



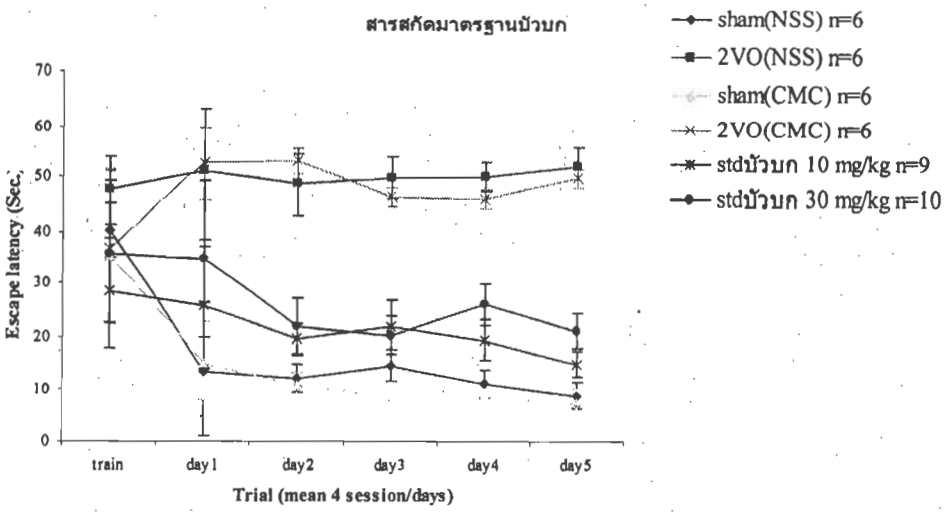
รูปที่ 19. สารสกัดบัวบกที่มีความบริสุทธิ์สูง (Purified extract) ที่ให้โดยการป้อนต่ออัตราการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) ภายในเวลา 5 นาที

1.5 *สารสกัดมาตรฐานบัวบก* (ECa 233)

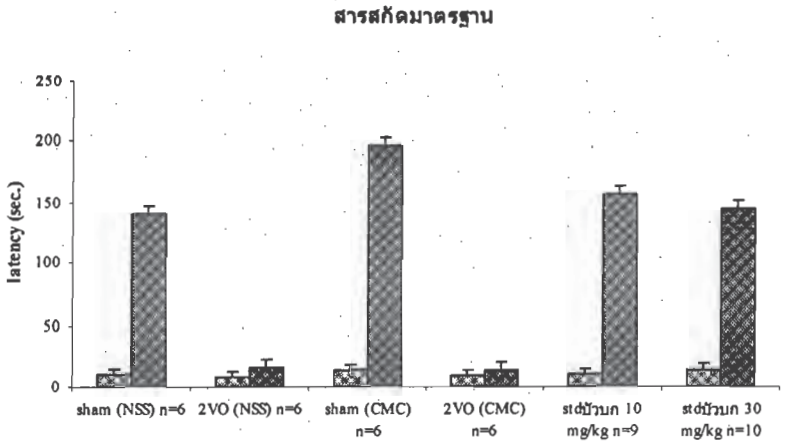
ผู้วิจัยฝ่ายแยกสกัดและกำหนดมาตรฐานได้นำข้อมูลจากสัตว์ทดลองในข้อ 1-4 ดังกล่าวมาแล้วข้างต้นไปกำหนดปริมาณสารสำคัญในสารสกัดมาตรฐานบัวบกและพัฒนาวิธีการสกัดให้ได้สารมาตรฐานที่มีลักษณะทางกายภาพที่ดี และส่งสารมาตรฐานดังกล่าวมาทดสอบฤทธิ์ในการแก้ไขแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ ในสัตว์ทดลองอีกครั้งหนึ่ง

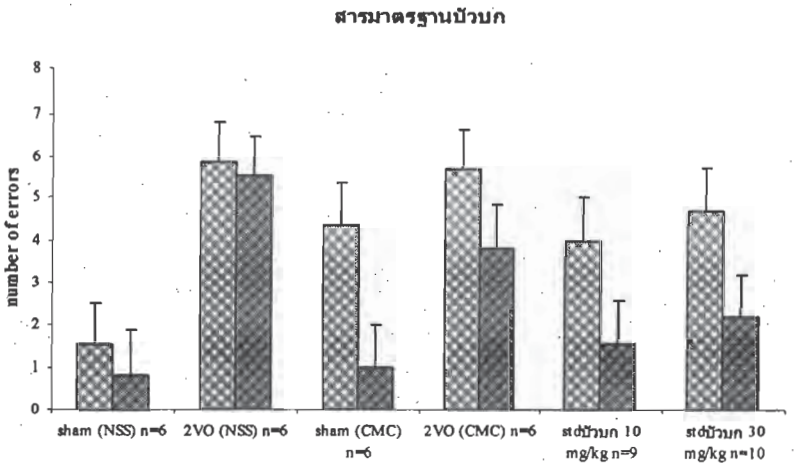
ผล: สารสกัดมาตรฐานบัวบกที่ได้มีสีขาวนวลถึงเหลืองนวล และมีการควบคุมการสกัดให้ได้สารสำคัญตามเกณฑ์กำหนด เมื่อนำเอาสารดังกล่าวมาทดสอบผลต่อการเรียนรู้และความจำอีกครั้งหนึ่ง พบว่าสารมาตรฐานดังกล่าวยังคงแสดงฤทธิ์ในการแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในโมเดลของ 2VOได้ในขนาด 10 และ 30 mg/kg B.W. ทั้งใน MWM test (รูปที่ 20) และ step-down test(รูปที่ 21) รวมทั้งมีฤทธิ์ลดปริมาณ MDA ของสมอง (รูปที่ 22) โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลง locomotor activity (รูปที่ 23) ดังนั้นจึงเป็นที่แน่ชัดว่าสารสกัดมาตรฐานที่มีคุณลักษณะที่ชัดเจนในด้านกายภาพและเคมีของสารสำคัญเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์แก้ไขสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำได้ในโมเดลมาตรฐานของสัตว์ทดลอง

หมายเหตุ: ในการทดสอบฤทธิ์สารสกัดมาตรฐานบัวบกในครั้งสุดท้ายนี้ได้ใช้ 0.5 % carboxymethylcellulose (5%CMC) ซึ่งเป็น vehicle ที่จะใช้ในการทดสอบทางพิษวิทยา เป็น vehicleในการทดสอบฤทธิ์ในการแก้ไขสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำของสารสกัดบัวบก เนื่องจากพบว่า 5% ของ Tween 20 ทำให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อตับในหนูที่ได้รับสารละลายนี้

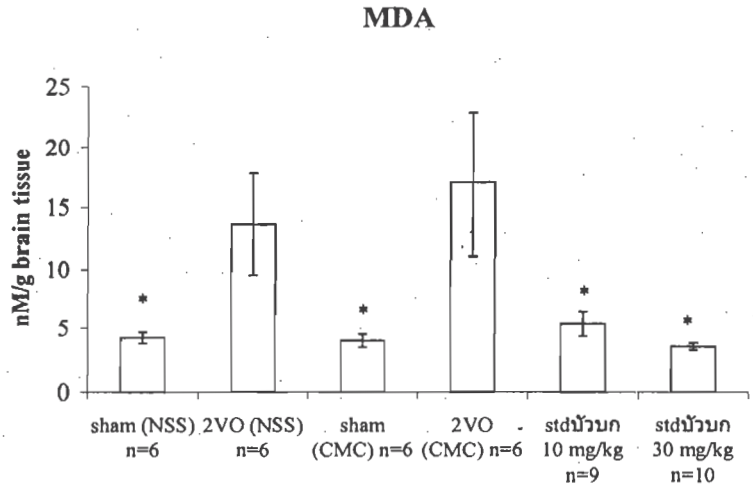


รูปที่ 20 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ในขนาด 10 และ 30 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อการทดสอบพฤติกรรมใน MWM Test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว



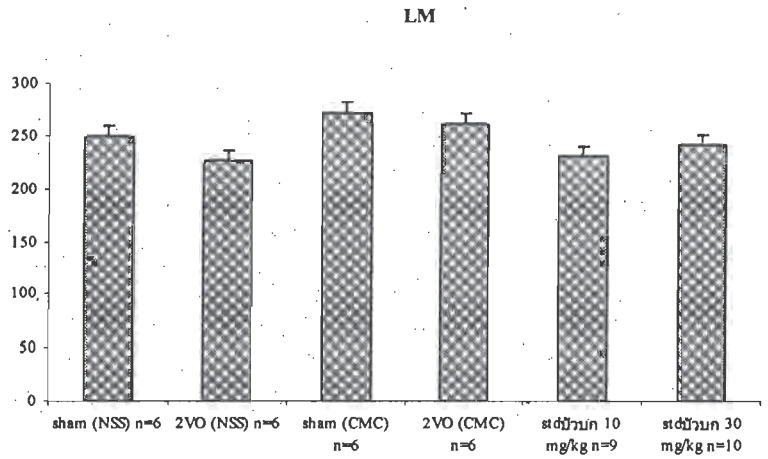


รูปที่ 21 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ในขนาด 10 และ 30 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่อstep-down test ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) ภายใน เวลา 5 นาที



* P < 0.05 denotes statistically significant difference from 2VO (NSS) and 2VO (CMC)

รูปที่ 22 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ในขนาด 10 และ 30 mg/kg BW. ที่ให้ โดยการป้อน ต่อระดับของ malondialdehyde (MDA)ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) โดยใช้สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 6-8 ตัว

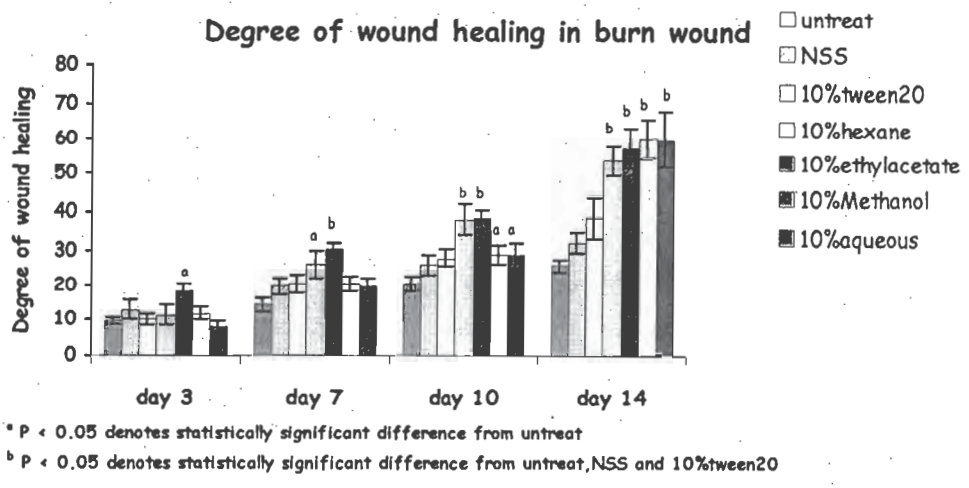


รูปที่ 23 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ในขนาด 10 และ 30 mg/kg BW. ที่ให้โดยการป้อนต่ออัตราการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ (2VO) ภายใน เวลา 5 นาที

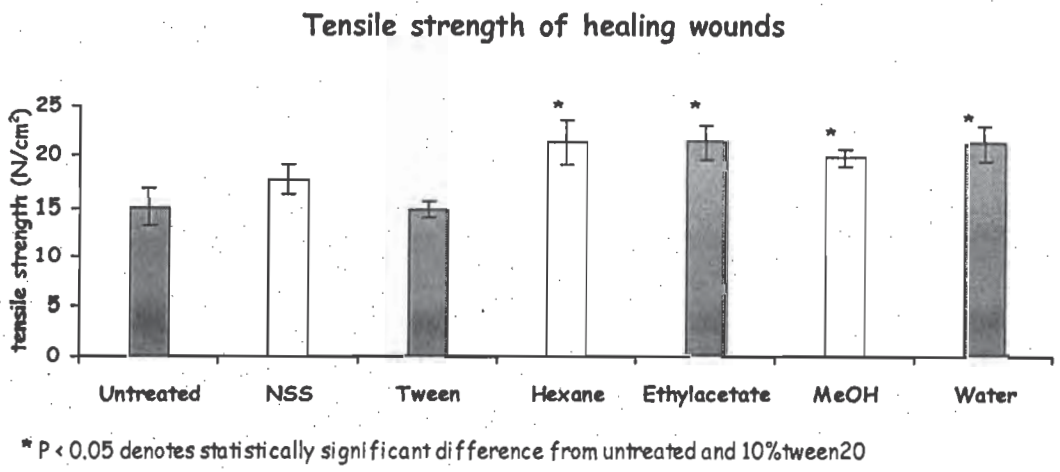
2. ฤทธิ์ในการสมานแผลของบัวบก

2.1 สารสกัดหยาบบัวบกแยกส่วน (Fractional extracts) ซึ่งเป็นสารสกัดบัวบกที่ได้จากตัวทำละลายที่ใช้สกัดแตกต่างกัน มีจำนวนทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ได้แก่ F1(Hexane), F2 (Ethyl acetate), F3 (Methanol) และ F4 (Water)

ผล: เมื่อนำเอา สารสกัดหยาบบัวบกทั้ง 4 fractions ในขนาดความเข้มข้นเท่ากันคือ 10% ใน vehicle (10%tween20) มาทาบนแผลสองชนิด คือBurn wound เป็นเวลา 3-14 วัน (รูปที่ 24) และ Incision wound. เป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 25) พบว่าสารสกัดหยาบบัวบกแยกส่วนทั้ง 4 fractions ทำให้แผลใน Burn wound มีขนาดเล็กลง และทำให้ Tensile strength ของ Incision wound มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 24. ผลของสารสกัดหยาบบัวบก ทั้ง 4 fraction ต่อ Burn Wound จำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มคือ 6-8 ตัว



รูปที่ 25. ผลของสารสกัดหยาบบัวบก ต่อการสมานแผลใน Incision Wound จำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มคือ 6-8 ตัว

จากการที่พบว่าสารสกัดทุก fraction ของบัวบกมีฤทธิ์สมานแผล ดังนั้นจึงสามารถนำเอาสารสกัดมาตรฐานที่มีฤทธิ์แก้ไขสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำซึ่งมีคุณลักษณะที่เหมาะสม คือไม่มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ซึ่งจะเป็นปัญหาในการทำยาเตรียมสำหรับผิวหนังไปใช้เป็นสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์สมานแผลได้เช่นกัน

วิจารณ์และสรุปผลงานวิจัย

บัวบกเป็นพืชที่มีการกล่าวอ้างมาช้านานว่าเป็นสมุนไพรที่สามารถแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ ในหลาย ๆ ประเทศรวมทั้งประเทศอินเดียได้มีผลิตภัณฑ์ของบัวบกทั้งในรูปของยาเดี่ยวและยาผสมกับสมุนไพรชนิดอื่นอยู่หลายชนิด (Gupta, Veerendra and Srivastava: 2003) แต่ก็ยังไม่มีรายงานทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถยืนยันว่าผลิตภัณฑ์เหล่านั้นมีฤทธิ์จริงดังกล่าวอ้างหรือไม่ ถึงแม้ว่ามีรายงานว่า asiaticoside ซึ่งเป็นสารชนิดหนึ่งที่ที่พบในบัวบกมีฤทธิ์ในการแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ แต่ก็ยังอาจมีสารอื่น ๆ อีกมากมายในบัวบกที่อาจจะมีฤทธิ์ภาวะบกพร่องของการเรียนรู้ และความจำ(Veerendra and Gupta: 2002) งานวิจัยนี้ได้เลือกเอาโมเดลของการทำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำโดยวิธี bilateral occlusion ซึ่งจะทำให้เกิด oxidative stress ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำตามมาในภายหลัง (D' Hooge R. and De Deyn P.P,: 2001) และการใช้สารสโคโปลามีนซึ่งจะปิดกั้น cholinergic muscarinic receptor ทำให้เกิด amnesia (Bejar C., Wang RH. And Weinstock M: 1999) ซึ่งเป็นโมเดลที่เป็นที่ยอมรับและใช้กันโดยทั่วไป พบว่า Tacrine ซึ่งเป็นยาที่ใช้สำหรับรักษา โรคอัลไซเมอร์จะสามารถแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในโมเดลของสัตว์ทดลองดังกล่าวมาข้างต้นนี้(Bejar C., Wang RH. And Weinstock M: 1999) เมื่อวัดผลด้วย Morris Water Maze test ซึ่งเป็นการวัด Spatial memory (Morris, R :1984) และ Step-down test ซึ่งเป็น passive avoidance test (Luo, J. Yin, J.H. and Wei, Q, 2003)

ความสามารถในการเรียนรู้และความจำในการทดลองนี้ สามารถวัดได้จากการที่หนูสามารถว่าย**น้ำค้นหาแท่นพักที่ซ่อนอยู่ใต้น้ำในเวลาที่สั้นลงไปเรื่อยๆในหนูกลุ่ม sham และกลุ่ม 2VOที่ได้รับได้รับ**สารสกัดบัวบก เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม 2VOที่ได้รับ vehicle ซึ่งสูญสิ้นความสามารถด้านนี้ไปจึงใช้เวลาในวันต่อๆไปใกล้เคียงกับเวลาที่ใช้ในวันแรก ซึ่งผลในการแก้ไขสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำดังกล่าวได้รับการยืนยันจากการทดสอบใน Step-down test ซึ่งหนูจะเรียนรู้ที่จะหลบหลีกจากการถูกช๊อคด้วยไฟฟ้าด้วยการนั่งอยู่บนแท่นพักในกรงนานขึ้น จากการในการว่ายน้ำหรือเคลื่อนไหวต่างๆดังกล่าวมาแล้ว หนูจะต้องอาศัย motor activity ซึ่งก็เป็นที่แน่ชัดว่าสารสกัดบัวบกไม่มีผลต่อ motor activity เมื่อทดสอบด้วย activity cage ดังนั้นผลของสารสกัดบัวบกในการทดลองใน MWM และ Step-down tests จึงควรเป็นผลมาจากการเรียนรู้และความจำ

จากการทดลองนี้พบว่า สารสกัดบัวบกมีสารที่สามารถออกฤทธิ์แก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำสัตว์ทดลองได้เฉพาะในโมเดลของ 2VO ซึ่งเป็นการทำให้สมองขาดเลือดชั่วคราว แต่ไม่สามารถแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่เกิดจากการการฉีดสารสโคโปลามีนซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งฤทธิ์ของ acetylcholine ที่ cholinergic muscarinic receptor แสดงว่า กลไกการ

ออกฤทธิ์ของบัวบกในการแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำสัตว์ทดลองน่าจะเป็นกลไกอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับ cholinergic muscarinic receptor กลไกที่อาจเป็นไปได้อย่างหนึ่งก็คือ การที่สารสกัดบัวบกมีฤทธิ์เป็น antioxidant ดังจะเห็นได้จากการที่สารสกัดสามารถลดปริมาณของ malondialdehyde ซึ่งจะเพิ่มสูงขึ้นในหนูที่ถูกปิดกั้นหลอดเลือด carotid ทั้งสองข้าง

เนื่องจากการใช้บัวบกโดยทั่วไปจะเป็นโดยการรับประทานสมุนไพรสดหรือเม็ดยาที่มีผงบัวบก ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยจึงได้เลือกวิธีให้สารสกัดบัวบกที่นำมาทดสอบทุกขั้นตอนไม่ว่าจะเป็นสารสกัดหยาบ หรือสารที่มีความบริสุทธิ์สูง เช่น สาร A และสาร B ด้วยการป้อนด้วย gavage tube ซึ่งก็พบว่าสารสกัดเหล่านั้นมีทั้งส่วนที่ออกฤทธิ์และไม่ออกฤทธิ์ทั้ง ๆ ที่ให้โดยวิธีการเดียวกันและทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน ดังนั้นในการที่จะพัฒนาสมุนไพรซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีความแปรปรวนของสารออกฤทธิ์ได้สูงมาก (Inamdar,PK., Yeole, RD.,Ghogare, AB., and deSouza, NJ.,1996) จึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาอย่างจริงจังเพื่อกำหนดคุณสมบัติของสารสกัดมาตรฐานที่เราสามารถยืนยันความสม่ำเสมอในด้านปริมาณและคุณภาพของสารที่ออกฤทธิ์ จากการทดสอบฤทธิ์ควบคู่ไปกับการสกัดแยกในทุกขั้นตอน (activity guided fractionation) ที่ผู้วิจัยต้องทดสอบสารทดสอบที่สกัดหรือแยกมาจากบัวบกด้วยวิธีต่าง ๆ ถึง 12 สารทดสอบ จนกระทั่งสามารถ identify ได้ว่าสาร A และ สาร B เป็นสารที่มีฤทธิ์แก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ ที่จะต้องนำไปกำหนดเป็นมาตรฐานของสารสกัดที่คาดว่าจะนำไปใช้กับภาวะหลงลืมในคนซึ่งกลุ่มนักวิจัยในด้านสกัดแยกและกำหนดมาตรฐานและได้พัฒนาวิธีการเตรียมสารมาตรฐานดังกล่าวในปริมาณสูงๆและเมื่อนำสารมาตรฐานดังกล่าวมาทดสอบฤทธิ์ในสัตว์ทดลองพบว่าสารมาตรฐานสามารถแก้ไขสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในโมเดลของ 2VO ได้เป็นการยืนยันว่าสารสกัดมาตรฐานดังกล่าวเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์ได้แล้ว จึงนำสารมาตรฐานดังกล่าวไปทดสอบความเป็นพิษ โดยการป้อนให้หนูขาวเป็นเวลาติดต่อกัน 3 เดือน (Subacute toxicity testing) หากพบว่าสารมาตรฐานดังกล่าวมีความปลอดภัย จึงจะสามารถนำสารมาตรฐานนี้ไปทดสอบฤทธิ์ในการแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในคน

ส่วนฤทธิ์ในการสมานแผลซึ่งมีการนำเอาสารสกัดบัวบกมาใช้ในผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับผิวหนังอยู่มากมาย (Sunikumar, Parameshwaraiah S and shivakumar HG: 1998) แต่ก็ไม่มีข้อมูลที่จะบอกถึงรายละเอียดของสารสกัดที่มีฤทธิ์ดังกล่าว ดังนั้นจึงเป็นความจำเป็นของประเทศไทยเช่นกัน ที่จะต้องทำการวิจัยจนสามารถ กำหนดสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์สมานแผล จากการทดสอบด้วยการทำ Burn wound ซึ่งเป็นแผลจากความร้อนและ Incision wound ซึ่งเป็นแผลจากการกรีด ก็พบว่า สารที่ออกฤทธิ์สมานแผลนั้นมีอยู่ในทุกfraction ดังนั้นจึงสามารถใช้สารมาตรฐานชนิดเดียวกันกับสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์แก้ไขสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำซึ่งมีคุณสมบัติที่จำเป็นอย่างยิ่งสำหรับสารที่นำมาใช้เป็น

ยาสำหรับผิวหนังคือมีสีขาวนวล ปราศจากสีเขียวของคลอโรฟิล ดังนั้นจึงสามารถนำเอาสารสกัดมาตรฐานดังกล่าวไปใช้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการเตรียมยาเตรียมที่มีฤทธิ์สมานแผลได้โดยตรง

จากผลการวิจัยดังกล่าวมาแล้ว อาจสรุปได้ว่าคณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการเตรียมสารสกัดมาตรฐานของบัวบก ที่มีคุณลักษณะที่เหมาะสม มีความชัดเจนแน่นอนในด้านปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ สามารถยืนยันการออกฤทธิ์ในการแก้ไขสภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ รวมทั้งฤทธิ์ในการสมานแผลในโมเดลมาตรฐานของสัตว์ทดลอง ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการผลิตสารสกัดบัวบกมาตรฐานดังกล่าวในเชิงพาณิชย์ เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเสริมอาหารสำหรับผู้สูงอายุ หรือผลิตภัณฑ์สำหรับการสมานแผล อย่างไรก็ตามควรจะมีการทดสอบผลของสารสกัดมาตรฐานดังกล่าวอีกครั้งหนึ่งในคนภายหลังที่ได้ข้อมูลทางด้านพิษวิทยาที่สมบูรณ์แล้ว

บรรณานุกรม

ชัชรินทร์ อังศุภากรม .การพยาบาลผู้ป่วยที่มีบาดแผล, วารสารการพยาบาล. ปีที่ 32. ฉบับที่ 4 (ตุลาคม-ธันวาคม, 2526): 314-315.

ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ, "สมุนไพร : บัวบก," หมอชาวบ้าน. ปีที่ 1, ฉบับที่ 11 (มีนาคม, 2523) : 36-40.

เชษฐา พยากรณ์, สมุนไพร (กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เชษฐา., (2525): 7.

นภดล เลือดนักรบ, "ผลของสารสกัดบัวบก (Centella asiatica (L.) Urban.) ในการลดความดันเลือดของหนูขาวที่ทำให้เกิดภาวะความดันเลือดสูง," ในรายงานผลการศึกษา โครงการการประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาสมุนไพร. วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, บรรณาธิการ (นนทบุรี : บริษัท เอส อาร์ พริ้นติ้ง แมสโปรดักส์ จำกัด, 2544)

นิจศิริ เรืองรังษี และ พยอม ตันติวัฒน์. พืชสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2534.

ลินจง ศิวรังสรรค์, "พืชสมุนไพร" วารสารศูนย์บริภัณฑ์เพื่อการศึกษา, ปีที่ 4, ฉบับที่ 4 (ตุลาคม-ธันวาคม, 2523): 12.

วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์ "ข้อมูลการศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาสมุนไพรบัวบก," ในรายงานผลการศึกษา โครงการการประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาสมุนไพร (นนทบุรี: บริษัท เอส อาร์ พริ้นติ้ง แมสโปรดักส์ จำกัด, 2544) : 127-36.

ศิริรัตน์ โกศัลยวัฒน์, จันทรา ชัยพานิช, เกษียร ภังคานนท์, "การใช้ครีมใบบัวบก 1% รักษาแผลเรื้อรัง" สารศิริราช, ปีที่ 40, ฉบับที่ 6 (คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, 2531) : 455-60.

สำลี ใจดี และคณะ, การใช้สมุนไพร เล่ม 1 : โครงการพัฒนาเทคนิคการทำยาสมุนไพร, (กรุงเทพมหานคร : สารมวลชน, 2525): 66-7.

อารีรัตน์ ละออปักษา, สุรัตนา อำนวยผล และวิเชียร จงบุญประเสริฐ, "การศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจ," ใน รายงานผลการศึกษาโครงการการประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาสมุนไพร. วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, บรรณาธิการ (นนทบุรี: บริษัท เอส อาร์ พริ้นติ้ง แมสโปรดักส์ จำกัด, 2544)

อรนุช โชคชัยเจริญพร, "บัวบก," ในจุลสารข้อมูลสมุนไพร. 14(2), (กรุงเทพมหานคร : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2540): 8-14.

Babu TD, Kuttan G and Padikkala J, "Cytotoxic and anti-tumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban," J Ethnopharmacol. 48(1)(1995): 53-7.

Baie SH and Sheikh KA, "The wound healing properties of Channa striatus-cetrimide cream-

tensile strength measurement," J Ethnopharmacol. 71(2000): 93-100.

Bejar C., Wang RH. And Weinstock M. Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rat. European journal of Pharmacology. 383 (1999) : 231-240.

Brioni JD, Hock FJ, Huger FP, et al (1997). Drug effects on learning and memory. Drug Discovery and Evaluation, Wolfgang HG (eds). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. pp 334-335.

Chaiyaphruk S, "New technology in wound managementv (Update wound management in practice)," Thailand Medical Time. (16-30 November 2003) : 5.

Cheng CL and Koo MW, "Effects of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats," Life Sci. 67(21)(2000): 2647-2653.

D' Hooge R. and De Deyn P.P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Research Review. 36 (2001) : 60-90.

Dhorranintra B and Sangsirinavin C, " Cardiovascular effects of *Centella asiatica* glycoside," R.T.A.F.Medical Gazette. 28(2)(1982): 107-15.

Gupta Y.K., Veerendra Kumar M.H., Srivastava A.K. Effect of *Centella asiatica* on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 74 (2003) : 579-585.

Hausen BM, "*Centella asiatica* (Indian penny wort), an effective therapeutic but a weak sensitizer" Contact Dermatitis. 29(4) (1993) : 175-9.

Inamdar, P.K., Yeole, R.D., Ghogare, A.B., and De Souza, N.J. Determination of biologically active constituents in *Centella asiatica*. Journal of Chromatography A. 742(1996): 127-130.

Laerum OD and Iversen OH, "Reticuloses and epidermal tumor in hairless mice after topical skin applications of Cantharidin and *Asiaticoside*," Cancer Research. 32(1972): 1463.

Lawrence JC, "The morphological and pharmacological effects of asiaticoside upon skin *in vitro* and *in vivo*," Eur J Pharmacol. 1(5)(1967) : 414.

Luo, J. Yin, J.H. and Wei, Q. The effect of calcineurin activator, extracted from Chines herbal medicin, on memory andimmunity in mice. Pharmacology. Biochemistry and Behavior. (75)2003: 749-754.

Marquart FX, Chastang F, Simeon A, Birembaut P, Gillery P and Wegrowski Y, "Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds, " Eur J Dermatol. 9(4)(1999): 289-96.

Morris R (1984). Development of water-maze procedure for study spatial learning in the rat. J neurosci Meth 11: 47-60.

Murakami Y, Ikenoya M, Matsumoto K, et al. (2000) Ameliorative effect of tacrine on spatial memory deficit in chronic two-vessel occluded rats is reversible and mediated by muscarinic M receptor stimulation. Behav Brain Res 109: 83-90.

Norman RF and Bunyapraphatsara N, "*Centella asiatica* (Linn.) Urban "Thai medicinal plants. (1992): 111-4.

Rao GV, Shivakumar HG and Parthasarathi G, " Influence of aqueous extract of *Centella asiatica* (Brahmi) on experimental wounds in albino rats," Ind J Pharmacol. 28(1996): 249-53.

Reddy JS, Rao PR and Reddy MS, "Wound healing effects of Heliotropium indicum, Plumbago Zeylanicum and Acalypha indica in rats," J Ethnopharmacol. 79(2002) : 249-51.

Saha K, Mukherjee PK, Das J, Pal M and Saha BP, "Wound healing activity of Leucas lavandulaefolia Rees," J Ethnopharmacol. 56(1997) : 139-44.

Saringat HB and Wasim S, "Tensile strength of chitosan membrane at different relative humidity, prepared in different solvents," Acta Science. 5(2)(1995): 179-186.

Shukla A, Rasik Am and Dhawan BN, "Asiaticoside-induced elevation of antioxidant levels in healing wounds," Phytother Res. 13(1)(1999): 50-4.

Shukla A, Rasik Am, Jain GK, Shankar R, Kulshrestha DK and Dhawan BN, "*In vitro* and *in vivo* wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*," J Ethnopharmacol. 65(1999): 1-11.

Somboonwong J, Thanamittramanee S, Jariyapongskul A and Patumraj S, "Therapeutic effects of *Aloe vera* on cutaneous microcirculation and wound healing in second degree burn model in rats," J Med Assoc Thai. 83(2000): 417-25.

Sunikumar, Parameshwaraiah S and shivakumar HG, "Evaluation of topical formulations of aqueous extract of *Centella asiatica* on open wound in rats," Ind J Exp Biol. 36(6)(1998): 569-72.

Veerendra Kumar MH, Gupta YK. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on congnition and markers of oxidative strews in rats. J Ethanopharmacol 2002; 79(2): 253-60.

Veerendra Kumar MH, Gupta YK. Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2003; 30(5-6): 336-42.

Watanabe, H., Zhao, W., Matsumoto, K., Tohda, M., Murakami, Y.,Zhang,S.H., Kang.T.H.,

Mahakunakorn,P.,Muruyama,Y.,Sakakibara,I.,Aimi,N.and Takayama, H.Pharmacological evidence fore antidementia effect of *Choto-san (Gouteng-san)*, a traditional Kampo medicine. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. (73)2003: 635-643.

Xu J, Murakami Y, Matsumoto K, Tohda M, Watanabe H, Zhang S, Yu Q, Shen J. Protective effect of *Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang)* against impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia in mice. Journal of Ethnopharmacology. 73 (2000) : 405-413.

Zawacki BE, "Reversal of capillaries and prevention of necrosis in burns," Ann Surg. 180(1974) ; 98-102.