

รายงานการศึกษาพิษเฉียบพลันและ กึ่งเฉียบพลัน ของสารสกัดเมล็ดคำแสด ในสัตว์ทดลอง

ทรงพล ชีวะพัฒน์
เอมมนัส อัครวิชัย
สมเกียรติ ปัญญามัง
มาลี บรรจบ
ทรงพล ผดุงพัฒน์
สสี ปันยารชุน
รัตน์ อินศวร

บทนำ

คำแสด (*Bixa orellana* Linn.) เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ ใบเดี่ยวรูปร่างคล้ายใบโพธิ์ ดอกสีชมพูออกเป็นช่อที่ยอด ผลมีสีแดง คล้ายลูกเงาะภายในกลวง มีเมล็ดสีแดง สีจากเมล็ดใช้แต่งสีอาหารให้มีสีแดงส้ม เช่น แต่งสี ขนม ไอศกรีม เนย น้ำมัน และใช้ย้อมผ้าฝ้ายให้มีสีแดงส้มได้ด้วย⁽¹⁾ สารสีที่มีอยู่ในเมล็ดคำแสดถูกเรียกว่า แอนแนตโต (Annatto) ซึ่ง มีการใช้ตั้งแต่ยุคโบราณในอเมริกาใต้และในยุโรปกว่าหนึ่งร้อยปี⁽²⁾ ปัจจุบัน ประเทศอังกฤษ ฝรั่งเศส เยอรมัน มีการใช้สีแอนแนตโตอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ขนมอบ เนยแข็ง มาการีน ผลิตภัณฑ์จากไข่ เจลาติน พุดดิ้ง ซอสหวาน เครื่องดื่มที่มี แอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์นม และของขบเคี้ยวต่าง เป็นต้น⁽³⁾

การสกัดแอนแนตโตจากเมล็ดคำแสดนั้นสามารถทำได้โดยใช้ตัวทำละลายหรือน้ำมันพืชก็ได้ สารสกัดแอนแนตโตแบ่งออกเป็น 6 ชนิด คือ Annatto B, C, D, E, F, และ G ตามการใช้ตัวทำละลายและปริมาณของสารสี (pigment) สองชนิดคือ bixin และ norbixin ตัวอย่าง เช่น Annatto B มาจากการสกัดเมล็ดคำแสดด้วยตัวทำละลาย โดยมีสารสีร้อยละ 92 โดยประกอบด้วย bixin และ norbixin 97% และ 1.7% ตามลำดับ Annatto D สกัดโดยใช้น้ำมันพืช ประกอบด้วยสารสี 10.8% โดยเป็น bixin 94% เป็นต้น⁽³⁾

เนื่องจากต้นคำสดพบได้ตามป่าดิบแล้งมีมากทางภาคเหนือ⁽⁴⁾ และปลูกได้ทุกภาคทั่วไป⁽⁵⁾ ทำให้สามารถหาวัตถุดิบในการสกัดได้ง่าย ดังนั้นกลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ สถาบันวิจัยสมุนไพร จึงได้เตรียมสารสกัดเมล็ดคำสดโดยวิธีที่พัฒนาขึ้น เพื่อใช้เป็น feed additive แต่งสีในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งจะช่วยลดการนำเข้าสี annatto จากต่างประเทศได้ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดที่เตรียมจากเมล็ดคำสด ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดเมล็ดคำสดเพื่อให้ได้ข้อมูลทางพิษวิทยาเบื้องต้นก่อนนำไปแต่งสีอาหารและผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ ต่อไป

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดคำสดที่เตรียมขึ้นโดยกลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร พบว่า เมื่อให้สารสกัดเมล็ดคำสดแก่หนูถีบจักรทางปากขนาดสูงสุดคือ 16.0 ก./กก. ไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันและหนูไม่ตาย จากการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันระยะเวลา 28 วัน ในหนูแรทวิสตา จำนวน 150 ตัวแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 15 ตัวต่อเพศ ประกอบด้วยกลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่น และกลุ่มทดลองได้รับสารสกัดเมล็ดคำสดทางปากในขนาด 0.24, 2.4, 12.0, และ 60.0 มก./กก./วัน ไทย่งให้เห็นว่า สารสกัดไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ค่าทางเคมีคลินิกและไม่ทำให้เกิดอาการพิษสะสม ส่วนการเพิ่มขึ้นของนิ่วโตรฟิไลในหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 12.0 และ 60.0 มก./กก./วัน ยังอยู่ในช่วงค่าปกติและจัดเป็น minor change ผลการผ่าซากชันสูตรไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางมหพยาธิวิทยา (gross pathological lesions) ของอวัยวะภายใน จากการตรวจชิ้นเนื้ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาแสดงให้เห็นว่า หนูที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำสดไม่มีความผิดปกติของอวัยวะภายในต่างๆ ยกเว้นหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาดสูงสุดมีอุบัติการณ์ของเซลล์ตับเสื่อมแบบไขมันสูงขึ้นแต่การเปลี่ยนแปลงนี้เป็นระดับ mild fatty change เท่านั้น ดังนั้นการใช้สารสกัดเมล็ดคำสดที่เตรียมขึ้นเป็นสารแต่งสีไม่ควรใช้ปริมาณสูงหรือเข้มข้นมากเกินไป และควรพิจารณาถึงปริมาณสารสำคัญที่มีอยู่ในสารสกัดได้แก่ bixin และ norbixin ด้วยเพื่อปรับขนาดให้เหมาะสมกับอาหารแต่ละประเภทดังรายงานการใช้สารสกัดแอนแทนตของประเทศอื่นๆ ด้วย

ABSTRACT

Toxicity study of *Bixa orellana* Linn. extract, produced by Medicinal Plant Research Institute was investigated. The maximum dose of 16.0 g/kg extract was orally administered to mice and it was shown that the extract cause no acute toxic signs and no death. Oral subacute toxicity study in five group of Wistar rats consisting of water control and four extract-treated groups at the doses of 0.24, 2.4, 12.0 and 60.0 mg/kg/day revealed that the extract did not cause any toxic sign and there was no alteration on body

weight, food consumption, relative organ weight and blood chemistry values. The increases of neutrophil in male rats receiving the extract at the dose 12.0 and 60.0 mg/kg/day were minor change and still within normal range. Necropsy results showed no gross pathological changes of visceral organs. Histopathology revealed no abnormalities in any organs except male rats receiving the highest dose of extract had higher incidence of mild fatty change. Therefore, application of the extract for coloring agent at high concentration or overdose should be avoided and the amount of active ingredients (bixin and norbixin) in the extract should be taken into account for appropriate concentration in each food stuff as reported in other countries.

Key words : *Bixa orellina*, Toxicity

วัสดุและวิธีการ สารสกัดเมล็ดคำแสด

สารสกัดเมล็ดคำแสดที่มีปริมาณสารสีสำคัญ bixin ร้อยละ 14.17 เตรียมโดยกลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร

สัตว์ทดลอง

หนูถีบจักรพันธุ์ ICR จำนวน 20 ตัว (เพศละ 10 ตัว) น้ำหนักตัว 18-22 กรัม หนูแรทวิสตาจำนวน 150 ตัว (เพศละ 75 ตัว) เพศผู้ น้ำหนัก 200-220 กรัม และเพศเมีย 180-200 กรัม ซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลา 4 มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงไว้ในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อม (hygienic conventional room) ของศูนย์สัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยมีอุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60 ให้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง ใช้อาหารสำเร็จรูปของ บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด และน้ำกรองที่สะอาดโดยไม่จำกัดปริมาณ (ad libitum)

วิธีการศึกษา

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

สุมแบ่งหนูถีบจักรออกเป็นสองกลุ่มๆ ละ 10 ตัว เพศละ 5 ตัว ประกอบด้วย กลุ่มทดลองได้รับน้ำยาแขวนตะกอนของสารสกัดเมล็ดคำแสดขนาด 8 ก./กก. ทางปาก ซึ่งเป็นขนาดสูงสุดที่สามารถเตรียมและให้ได้ โดยป้อน 2 ครั้ง ห่างกัน 6 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นทางปากในปริมาณ 20 มล./กก. 2 ครั้ง เช่นกัน จากนั้นสังเกตอาการอย่างใกล้ชิด พร้อมบันทึกจำนวนหนูตาย

ทุกวัน จนครบ 14 วัน จากนั้นดมสลบหนูด้วยอีเธอร์แล้วผ่าซากชันสูตรตรวจหาความผิดปกติทางมหพยาธิวิทยา (gross pathology) ของอวัยวะภายในต่างๆ

การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

สุ่มแบ่งหนูแรทออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัวและเพศเมีย 15 ตัว) ประกอบด้วยกลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำกลั่นโดยวิธีป้อนทางปากปริมาณ 10 มล./กก./วัน เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 ถึง 5 เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับน้ำยาแขวนตะกอนของสารสกัดเมล็ดคำแสดทางปากในขนาด 0.24, 2.4, 12 และ 60 มก./กก./วัน ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลา 28 วัน ระหว่างการทดลองสังเกตพฤติกรรม อาการผิดปกติของหนูทุกวัน บันทึกน้ำหนักตัวและน้ำหนักอาหารที่หนูกิน ทุกสองสัปดาห์ เมื่อครบกำหนด 28 วันอดอาหารหนูเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นดมสลบหนูด้วยอีเธอร์ เปิดผ่าช่องท้อง เจาะเลือดจาก posterior vena cava เพื่อนำไปตรวจหาค่าทางโลหิตวิทยาโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cell-Dyn 3500[®] ปั่นแยกซีรัมเพื่อนำไปตรวจหาค่าเคมีคลินิกโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Hitachi[®] รุ่น 912 จากนั้นผ่าซากชันสูตรตรวจอวัยวะภายในต่างๆ เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงทางมหพยาธิวิทยา ได้แก่ สมอง หัวใจ ปอด หลอดลม หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ส่วนต่างๆ ตับ ไต ม้าม ตับอ่อน ต่อมน้ำลาย ต่อมน้ำตา ต่อมธัยรอยด์ ต่อมหมวกไต อวัยวะระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ อัณฑะ ต่อมลูกหมาก seminal vesicle รังไข่ ท่อนำไข่และมดลูก ชั่งน้ำหนักอวัยวะที่ชั่งได้ด้วยเครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง Mettler Toledo[®] รุ่น PB 153 แล้วคำนวณเป็นค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะ (กรัม/น้ำหนักตัว 1000 กรัม) เก็บอวัยวะต่างๆ ในน้ำยาบัพเฟอร์ฟอรัลลินความเข้มข้น 10% แล้วนำชิ้นเนื้ออวัยวะไปผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อที่มีความหนา 4 ไมครอน ย้อมด้วยสี H&E เพื่อตรวจหาความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาโดยพยาธิสัตวแพทย์

การวิเคราะห์ข้อมูลน้ำหนักตัว น้ำหนักอาหารที่กิน น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ ค่าทางโลหิตวิทยา และค่าเคมีคลินิก ใช้ one-way ANOVA แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วย Dunnett's test ส่วนผลการตรวจสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาใช้ Fisher exact test ที่ $p < 0.05$

ผลการทดลอง

การศึกษาพิษเฉียบพลัน

จากการป้อนสารสกัดเมล็ดคำแสดทางปากแก่หนูถีบจักรในขนาด 8 กรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (ก./กก.) 2 ครั้งห่างกัน 6 ชั่วโมง พบว่า ภายหลังได้สารสกัดครั้งที่ 1 และ 2 หนูทุกตัวมีอาการและพฤติกรรมต่างๆ เป็นปกติไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม และเมื่อครบกำหนด 14 วัน ไม่มีหนูตาย ผลการผ่าซากชันสูตรไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในทางมหพยาธิวิทยา ดังนั้นขนาดที่ทำให้หนูตายร้อยละ 50 ควรมีค่ามากกว่า 16.0 ก./กก.

การศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลัน

ผลต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ สุขภาพทั่วไปและการเปลี่ยนแปลงทางมพยาธิวิทยา

หนูที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัว น้ำหนักอาหารที่กิน และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 1 และ 2, ตารางที่ 1 และ 2) นอกจากนี้ไม่พบอาการผิดปกติหรือพฤติกรรมใดๆที่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม จากการผ่าซากชันสูตรไม่พบความผิดปกติทางพยาธิวิทยาของอวัยวะต่างๆ

ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดขนาด 12 มก./กก. มีค่าฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดแดง และปริมาณฮีโมโกลบิน ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เปอร์เซนต์ของนิวโทรฟิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดขนาด 12 และ 60 มก./กก. ในขณะที่ลิมโฟไซต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 60 มก./กก. (ตารางที่ 3) ในหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดทุกขนาดนั้นค่าพารามิเตอร์ทางโลหิตวิทยาไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4)

ผลต่อค่าทางเคมีคลินิก

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดขนาด 0.24 ก./กก./วัน มีค่าเอนไซม์ ALT ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.24 และ 12.0 ก./กก. มีระดับกลูโคสต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้พบวาระดับกรดยูริกลดลงในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 0.24, 2.4 และ 12.0 ก./กก./วัน (ตารางที่ 5) ในเพศเมียพบวาค่าทางเคมีคลินิกทุกพารามิเตอร์ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 6)

ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยา

หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดคำแสดขนาด 60 มก./กก./วัน มีอุบัติการณ์ของการเกิด mild fatty degeneration (5/10) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอื่นๆที่พบในบางอวัยวะมีอุบัติการณ์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 7 และ 8)

วิจารณ์

การศึกษาพิษเฉียบพลันในหนูถีบจักรโดยกรอกสารสกัดเมล็ดคำแสดขนาด 8.0 ก./กก. เป็นเวลา 2 ครั้งห่างกัน 6 ชั่วโมง ไม่ทำให้เกิดอาการพิษใดๆ และไม่มีหนูตาย ดังนั้นขนาดที่ทำให้หนูถีบจักรตายร้อยละ 50 (LD_{50}) ควรมีค่ามากกว่า 16.0 ก./กก. และอาจจัดว่าสารสกัดเมล็ดคำแสดอยู่

ในกลุ่มสารที่ไม่เป็นพิษ (practically non toxic) เมื่อใช้ Hodge and Sterner Scale ⁽⁶⁾

ส่วนการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันในหนูแรทวิสตาเป็นเวลา 28 วัน โดยป้อนสารสกัดเมล็ดคำแสดขนาด 0.24, 2.4, 12 และ 60 มก./กก./วัน พบว่า สารสกัดเมล็ดคำแสดไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ย น้ำหนักอาหารที่หนูกิน และไม่ก่อให้เกิดอาการแสดงออกที่ผิดปกติใดๆ น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ของตับที่ลดลงในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 2.4 ก./กก./วันเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดที่ให้จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากสารสกัดเมล็ดคำแสด ค่าของฮีมาโตคริต จำนวนเม็ดเลือดแดง และฮีโมโกลบินที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 12.0 ก./กก./วัน จัดว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยโดยจำนวนเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบินยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติ⁽⁷⁾ และการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่เป็น dose-response relationship การเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลในหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัด 12.0 และ 60.0 มก./กก. รวมทั้งเปอร์เซ็นต์ของลิมโฟไซต์ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 60 มก./กก./วัน ยังคงอยู่ในช่วงค่าปกติเช่นเดียวกันจัดว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เล็กน้อยไม่มีความสำคัญ และไม่สัมพันธ์กับพยาธิสภาพของบางอวัยวะที่พบ ระดับกลูโคสที่ลดลงในหนูเพศผู้บางกลุ่มไม่อาจกล่าวได้ว่าเกิดจากสารสกัดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงไม่สัมพันธ์กับขนาดที่ให้ ส่วนกรดยูริกที่ลดลงในหนูเพศผู้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 0.24, 2.4 และ 12.0 มก./กก.นั้นยังอยู่ในช่วงค่าปกติ⁽⁷⁾ และไม่ลดลงอย่างสัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดเมล็ดคำแสด

จากผลการตรวจชิ้นเนื้อของอวัยวะต่างๆทางจุลพยาธิวิทยา แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเมล็ดคำแสดไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะภายในของหนูแรท ยกเว้นหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดขนาด 60 มก./กก./วัน มีอุบัติการณ์พบเซลล์ตับเสื่อมแบบไขมันสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เป็นการเปลี่ยนแปลงเพียง ระดับ mild fatty change เท่านั้น ส่วนในหนูเพศเมียนั้นมีอุบัติการณ์ของการเปลี่ยนแปลงที่ตับไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งอาจเป็นการตอบสนองที่แตกต่างระหว่างเพศ (gender difference) การเปลี่ยนแปลงที่พบได้ในอวัยวะอื่นนั้น ไม่อาจกล่าวได้ว่า เกิดจากสารสกัดเมล็ดคำแสดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สัมพันธ์กับขนาดของสารสกัดและไม่มีความจำเพาะใดๆ ที่บ่งชี้ว่าเกิดจากพิษของสารสกัดเมล็ดคำแสด

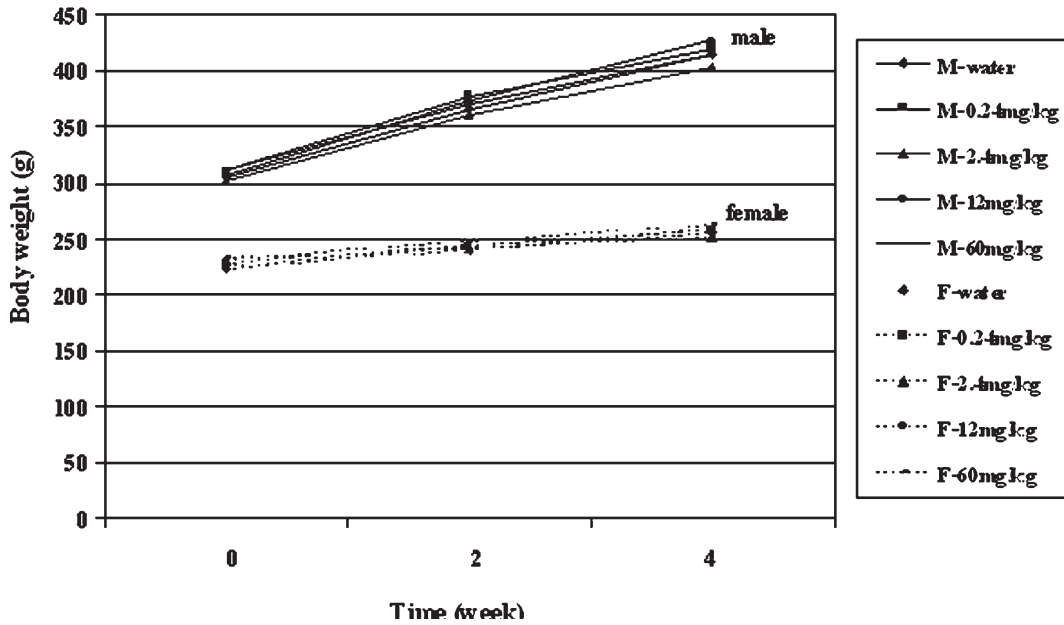
สรุป

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเมล็ดคำแสดที่เตรียมโดยกลุ่มวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สถาบันวิจัยสมุนไพร สรุปได้ว่า เมื่อให้สารสกัดเมล็ดคำแสดทางปากแก่หนูถีบจักรในขนาด 16.0 ก./กก โดยแบ่งให้ 2 ครั้งๆละ 8 ก./กก. พบว่า ไม่ทำให้เกิดอาการพิษเฉียบพลันใดๆ และจัดอยู่ในกลุ่มสารที่ไม่มีพิษ ส่วนผลการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันระยะเวลา 28 วัน โดยป้อนให้หนูวิสตาในขนาด 0.24, 2.4, 12.0, 60.0 มก./กก./วัน ไทยงให้เห็นว่า สารสกัดแอนแนดโตที่เตรียมขึ้นนี้ ไม่มีผลกระทบต่อน้ำหนักตัว การกินอาหาร น้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ ไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติหรือ

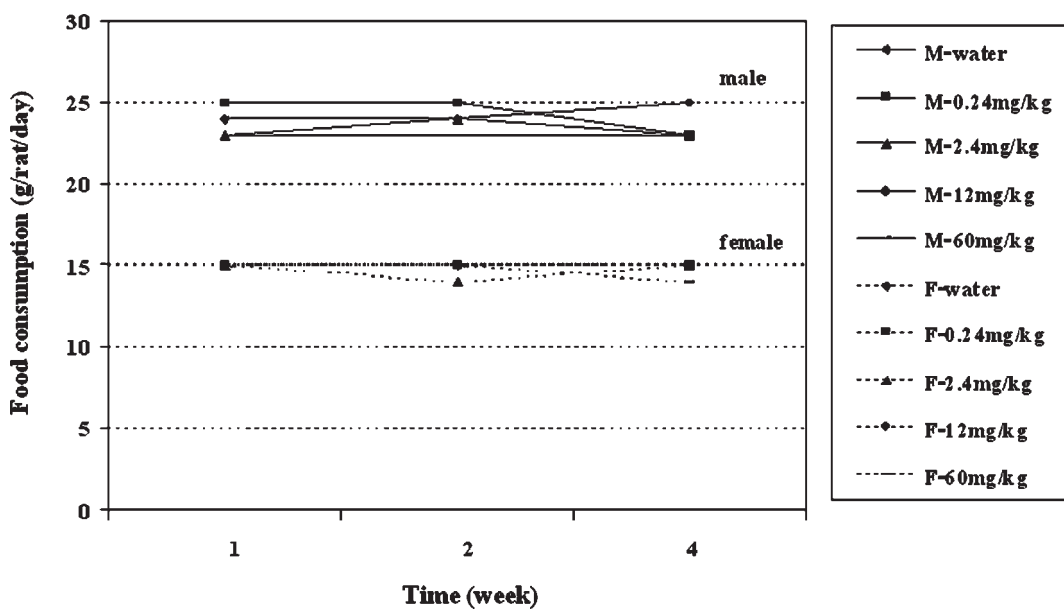
พฤติกรรมของหนูเปลี่ยนไป นอกจากนี้ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของค่าโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิก ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาบ่งชี้ว่า สารสกัดเมล็ดคำแสดไม่มีผลทำให้เกิดความผิดปกติใดๆต่ออวัยวะภายในของหนูแรท ยกเว้นเมื่อให้ขนาดสูง 60.0 มก./กก./วันแก่หนูเพศผู้ หรือเท่ากับหนูได้รับ bixin 8.5 มก./กก./วัน ซึ่งสูงกว่า ADI ของสารสกัดแอนแนตโตในรูป bixin ถึง 131 เท่า พบว่า จำนวนของหนูที่มีเซลล์ตับเสื่อมแบบไขมันเพิ่มขึ้น (5/15) แต่การเปลี่ยนแปลงนี้อยู่ในระดับเล็กน้อย (mild fatty change) และไม่มีผลต่อค่า liver enzymes เนื่องจากค่า ADI ของสารสกัด annatto ที่ WHO กำหนดไว้ในรูปของสาร bixin คือ 0-0.065 มก./กก./วัน^(๖) ดังนั้นหากใช้สารสกัดเมล็ดคำแสดเป็น feed additive ควรใช้ในปริมาณที่พอเหมาะไม่สูงมากเกินไปและควรมีการตรวจ chemical contents อื่นๆที่สำคัญ เช่น norbixin เพื่อปรับใช้ในขนาดที่เหมาะสมสำหรับผสมอาหารแต่ละประเภทต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- 1) วันดี กฤษณพันธ์ 2538. สมุนไพรสารพัดประโยชน์ ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 186-7.
- 2) Evans WC Annatto: a natural choice. Biologist 2000;47(4): 181-4.
- 3) Kroes R. and Verger P. Annatto Extracts. Available from [http://www. whqlibdoc.who.int/publications /2004/924a66052x.pdf](http://www.whqlibdoc.who.int/publications /2004/924a66052x.pdf).
- 4) วุฒิ วุฒิธรรมเวช. สารานุกรมสมุนไพร รวมหลักเภสัชกรรมไทย โอ เอส พรีนติ้ง เฮ้าส์ กรุงเทพมหานคร 2540 : 153.
- 5) โครงการพัฒนาเทคนิคทำยาสมุนไพร การใช้สมุนไพร บริษัทสารมวลชน จำกัด กรุงเทพฯ 2524 : 47-48.
- 6) Canadian center for occupational health and safety. What is and LD50 and LC 50.2005. Available from <http:// www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html> 2005.
- 7) Gad SC. The RAT: Pathology. In: Gad SC and Chengelis CP, ed. Animal Model in Toxicology. New York: Marcel Dekker 1992; 78-81,95.
- 8) WHO 1982. Evaluation of certain food additives and contaminants. Technical Report Series 683 p.42.



ภาพที่ 1 น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดเป็นเวลา 28 วัน



ภาพที่ 2 การกินอาหารของหนูแรทเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดเป็นเวลา 28 วัน

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว (กรัม) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 1000 กรัม) ของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสด เป็นเวลา 28 วัน

Organs	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg /day)				
	control	0.24	2.4	12	๕๐
	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15
Initial body weight	256±12	261±12	256±11	257±10	259±10
Final body weight	393±33	407±27	381±33	400±29	397±25
Brain	5.02±0.31	4.91±0.26	5.11±0.37	4.99±0.41	4.96±0.33
Heart	2.88±0.18	2.87±0.18	2.85±0.20	2.89±0.19	2.98±0.21
Lung	3.81±0.37	3.62±0.27	3.78±0.35	3.72±0.36	3.77±0.29
Liver	30.78±2.56	29.03±1.68	28.84±2.01*	29.31±2.07	29.53±2.15
Stomach	4.46±0.53	4.14±0.41	4.44±0.40	4.19±0.37	4.18±0.32
Spleen	2.00±0.30	2.00±0.24	1.82±0.16	2.04±0.19	1.99±0.36
Right Kidney	2.92±0.19	2.81±0.16	2.86±0.23	2.81±0.20	2.85±0.21
Left Kidney	2.80±0.19	2.67±0.11	2.78±0.28	2.69±0.20	2.71±0.15
Right Testis	7.40±1.03	7.16±0.97	7.55±0.94	7.44±0.91	7.34±1.01
Left Testis	7.33±0.91	7.19±0.89	7.55±1.07	7.18±0.73	7.27±0.61
Right Adrenal	0.080±0.012	0.086±0.013	0.084±0.018	0.084± 0.012	0.085±0.012
Left Adrenal	0.088±0.013	0.096±0.011	0.097±0.016	0.095±0.012	0.091±0.011
Bladder	0.279±0.041	0.351±0.081	0.338±0.092	0.327±0.054	0.428±0.050

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ค่าในตารางแสดงในรูป mean ± SD.

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัว (กรัม) และน้ำหนักอวัยวะสัมพันธ์ (กรัม/น้ำหนักตัว 1000 กรัม) ของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดเป็นเวลา 28 วัน

Organs	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg /day)				
	control	0.24	2.4	12	60
	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15
Initial body weight	212±8	211±10	216±8	212±8	214±8
Final body weight	243±15	243±12	241±11	245±13	249±16
Brain	7.55±0.46	7.47±0.38	7.66±0.54	7.55±0.39	7.28±0.42
Heart	3.21±0.19	3.23±0.26	3.17±0.19	3.09±0.20	2.95±0.76
Lung	4.66±0.27	4.78±0.28	4.70±0.38	4.66±0.34	4.67±0.41
Liver	28.23±2.06	28.00±2.62	27.47±2.38	27.18±2.77	27.08±2.50
Stomach	5.27±0.55	5.48±1.01	5.40±0.55	5.12±0.70	5.12±0.55
Spleen	2.33±0.25	2.41±0.43	2.25±0.26	2.30±0.32	2.30±0.21
Right Kidney	3.04±0.21	3.05±0.19	3.04±0.24	2.99±0.20	2.93±0.28
Left Kidney	2.89±0.19	2.89±0.19	2.89±0.22	2.86±0.20	2.81±0.24
Right Adrenal	0.153±0.026	0.160±0.024	0.148±0.019	0.154±0.017	0.152±0.028
Left Adrenal	0.172±0.03	0.183±0.033	0.161±0.024	0.171±0.021	0.162±0.021
Right Ovary	0.289±0.009	0.325±0.011	0.305±0.011	0.227±0.066	0.257±0.076
Left Ovary	0.299±0.011	0.348±0.012	0.329±0.014	0.268±0.013	0.250±0.064
Uterus	2.11±0.50	2.42±0.57	2.17±0.82	2.34±0.65	1.99±0.42
Bladder	0.315±0.099	0.293±0.034	0.289±0.059	0.288±0.051	0.296±0.040

ค่าในตารางแสดงในรูป mean±SD

ตารางที่ 3 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูแรพเพตผู้ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดเป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg /day)				
	control	0.24	2.4	12	60
	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15
Hematocrit (%)	52.17±2.63	50.47±3.68	50.01±2.67	48.98±2.60*	49.71±3.75
RBC (X10 ⁶ cells/mm ³)	9.24±0.50	8.83±0.42	8.87±0.39	8.69±0.52*	8.90±0.63
Hemoglobin(g/dl)	16.95±0.67	16.33±0.58	16.32±0.67	16.13±0.69*	16.30±0.99
MCV (μm ³ /red cell)	56.46±1.18	56.16±1.72	56.39±1.59	56.36±1.08	55.85±1.26
MCH (pg/red cell)	18.35±0.42	18.51±0.56	18.41±0.46	18.58±0.49	18.34±0.46
MCHC (g/dl RBC)	31.93±2.30	32.97±0.49*	32.65±0.45	32.95±0.53	32.84±0.62
WBC (X10 ³ cells/mm ³)	5.15±1.28	4.81±1.29	4.38±1.03	4.57±0.73	4.74±1.02
Neutrophil (%)	13.58±2.19	15.58±3.81	15.42±3.60	18.67±5.23*	20.43±7.94*
Eosinophil (%)	1.01±0.37	0.98±0.29	0.96±0.42	0.89±0.32	1.13±0.45
Lymphocyte(%)	75.61±5.09	76.16±6.62	77.14±5.60	72.57±7.68	68.63±9.54*
Monocyte(%)	6.37±3.81	4.44±3.85	4.40±2.42	5.61±2.84	6.83±4.38
Basophil(%)	3.42±1.56	2.93±1.70	2.08±0.99	2.26±0.94	2.97±2.59
Platelet (X10 ³ cells/mm ³)	1102±98	1078±128	1072±96	1039±110	1099±120

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงในรูปของ mean±SD.

ตารางที่ 4 ค่าทางโลหิตวิทยาของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดเป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg /day)				
	control	0.24	2.4	12	60
	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15
Hematocrit (%)	48.24±2.90	47.42±2.75	47.95±2.48	46.76±2.61	48.99±3.54
RBC (X10 ⁶ cells/mm ³)	8.29±0.53	8.20±0.49	8.46±0.61	8.17±0.43	8.57±0.66
Hemoglobin(g/dl)	15.65±0.81	15.47±0.79	15.60±0.77	15.47±0.44	16.02±1.05
MCV (μm ³ /red cell)	58.19±1.65	57.83±1.44	56.77±1.44	57.18±1.74	57.18±1.54
MCH (pg/red cell)	18.89±0.60	18.89±0.60	18.48±0.58	18.97±0.92	18.71±0.49
MCHC (g/dl RBC)	32.46±0.54	32.64±0.63	32.55±0.37	33.23±1.96	32.73±0.49
WBC (X10 ³ cells/mm ³)	2.84±0.66	3.00±0.83	3.04±0.96	3.06±0.71	3.23±1.19
Neutrophil (%)	15.80±3.02	18.32±5.01	18.57±4.29	18.17±7.77	17.14±4.21
Eosinophil (%)	1.02±0.45	1.11±0.45	1.06±0.34	1.21±0.46	0.92±0.42
Lymphocyte(%)	77.59±5.71	74.60±5.92	74.41±5.43	74.64±7.32	75.91±5.44
Monocyte(%)	4.25±3.47	4.48±2.16	4.56±2.92	4.46±2.25	4.64±2.18
Basophil(%)	1.32±0.75	1.47±0.53	1.40±0.83	1.52±0.82	1.39±0.67
Platelet (X10 ³ cells/mm ³)	1049±110	1042±130	1079±109	1082±95	1103±84

ค่าในตารางแสดงในรูปของ mean±SD

ตารางที่ 5 ค่าเคมีคลินิกของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดเมล็ดตำแสดงเป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg /day)				
	control	0.24	2.4	12	60
	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15
ALP (U/L)	81.53±17.65	75.93±8.57	78.00±9.06	81.20±10.54	73.67±9.38
ALT (U/L)	31.13±7.06	24.80±3.30*	29.67±6.64	29.93±4.49	27.73±4.48
AST (U/L)	93.47±8.90	91.80±8.86	96.33±12.13	96.27±9.28	95.73±8.48
Total protein (g/dl)	6.81±0.18	6.65±0.15	6.67±0.20	6.66±0.18	6.74±0.18
Albumin (g/dl)	4.66±0.14	4.55±0.12	4.62±0.12	4.60±0.11	4.62±0.09
Bilirubin (mg/dl)	0.09±0.03	0.07±0.03	0.07±0.02	0.08±0.02	0.06±0.03
BUN (mg/dl)	17.37±1.69	18.35±2.48	18.15±2.07	17.68±1.80	18.39±1.95
Creatinine (mg/dl)	0.56±0.04	0.53±0.05	0.53±0.08	0.51±0.05	0.55±0.07
Glucose (mg/dl)	227.23±31.75	194.99±25.21*	211.97±45.88	189.64±34.02*	193.03±30.36*
Uric acid (mg/dl)	4.45±1.48	2.28±1.15*	2.61±1.66*	2.17±1.64*	2.81±1.61*
Triglyceride (mg/dl)	99.81±21.60	120.35±21.36	100.59±30.36	105.15±23.96	113.12±37.21
Cholesterol (mg/dl)	51.57±9.96	60.59±10.83	54.73±10.45	59.24±9.17	59.58±14.50

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ค่าในตารางแสดงในรูปของ mean±SD.

ตารางที่ 6 ค่าเคมีคลินิกของหนูแรทที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดเป็นเวลา 28 วัน

Parameters	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg /day)				
	control	0.24	2.4	12	60
	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15
ALP (U/L)	36.87±5.55	38.93±5.31	38.33±8.85	37.27±3.99	36.80±6.76
ALT (U/L)	19.87±2.72	24.00±14.89	21.93±7.25	19.73±4.79	19.80±3.36
AST (U/L)	80.47±7.87	87.67±18.60	82.73±15.32	84.40±7.22	81.07±3.69
Total protein (g/dl)	6.77±0.27	6.87±0.25	6.87±0.23	6.91±0.24	6.93±0.17
Albumin (g/dl)	4.80±0.18	4.84±0.18	4.89±0.17	4.91±0.16	4.98±0.16*
Bilirubin (mg/dl)	0.09±0.03	0.08±0.04	0.10±0.03	0.09±0.04	0.09±0.03
BUN (mg/dl)	21.93±3.94	22.75±3.47	22.09±3.61	21.44±4.47	21.50±4.13
Creatinine (mg/dl)	0.59±0.08	0.62±0.08	0.60±0.09	0.56±0.07	0.62±0.07
Glucose (mg/dl)	163.98±36.85	153.07±20.82	166.81±38.20	145.98±15.42	147.15±20.39
Uric acid (mg/dl)	2.20±1.15	1.97±0.97	2.39±1.47	1.95±0.84	2.83±1.20
Triglyceride (mg/dl)	44.05±7.81	40.21±5.74	44.47±8.77	39.63±5.95	40.91±6.15
Cholesterol (mg/dl)	50.64±14.56	53.32±11.58	53.58±9.98	54.11±8.93	49.44±11.04

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ค่าในตารางแสดงในรูปของ mean±SD.

ตารางที่ 7 ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดเป็นเวลา 28 วัน

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg /day)				
		control	0.24	2.4	12	60
		n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15
Lung	Lymphoid proliferated bronchiole	7/15	9/15	5/15	10/15	13/15
Heart	Myocardiosis	0/15	1/15	0/15	1/15	1/15
Liver	Hepatocyte Fatty degeneration	0/15	0/15	3/15	2/15	5/15*
Pancreas	Acinar hyperplasia	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15
Small intestine	GALT proliferation	2/15	2/15	0/15	3/15	1/15
Large intestine	GALT proliferation	3/15	2/15	5/15	4/15	4/15
Adrenal gland	Cortex fatty degeneration	0/15	0/15	0/15	3/15	0/15

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการตรวจแสดงในรูปของ จำนวนหนูที่พบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูที่ตรวจ

GALT=Gut associated lymphoid tissue

ตารางที่ 8 ผลการตรวจอวัยวะทางจุลพยาธิวิทยาของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคำแสดเป็นเวลา 28 วัน

Organs	Microscopic findings	Dose of <i>Bixa orellana</i> extract (mg/kg /day)				
		control	0.24	2.4	12	60
		n = 15	n = 15	n = 15	n = 15	n = 15
Lung	Lymphoid proliferated bronchioles	3/15	6/15	5/15	11/15	10/15
Liver	Hepatocyte fatty degeneration	0/15	0/15	1/15	0/15	2/15
Kidney	Congestion (mild)	0/15	0/15	7/15*	1/15	0/15
Spleen	NRL					
Pancreas	Acinar hyperplasia	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15
Small intestine	GALT proliferation	1/15	1/15	2/15	4/15	1/15
Large intestine	GALT proliferation	3/15	2/15	3/15	1/15	3/15

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการตรวจแสดงในรูปของ จำนวนหนูที่พบการเปลี่ยนแปลง/จำนวนหนูที่ตรวจ.

GALT=Gut associated lymphoid tissue