ผลกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี450 ในตับและค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาว

นางสาวพรหมพร พรหมเมตตา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6911-3

SUBACUTE EFFECTS OF *HIBISCUS SABDARIFFA* AQUEOUS EXTRACT ON HEPATIC CYTOCHROME P450 AND CLINICAL BLOOD CHEMISTRY IN RATS

Miss Promphorn Prommetta

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

Department of Pharmacology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6911-3

Thesis Title	Subacute effects of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract on hepatic cytochrome P450 and clinical blood chemistry in rats
By	Promphorn Prommetta
Field of study	Pharmacology
Thesis Advisor	Associate Professor Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Laddawal Phivthong-ngam, Ph.D

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Boonyong Tantisira ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Mayuree Tantisira ..... Chairman

(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert, Ph.D.)

L. Phivthongngam ..... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Laddawal Phivthong-ngam, Ph.D.)

Chaiyo Chaichantipyuth ..... Member

(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, Ph.D.)

N. Niwattisaiwong ..... Member

(Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong, M.Sc.)

พรหมพร พรหมเมตตา : ผลกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำต่อเอนไซม์ไซโตโครม พี450 ในตับ และค่าเคมีคลินิกในเลือดของหนูขาว. (SUBACUTE EFFECTS OF *HIBISCUS SABDARIFFA* AQUEOUS EXTRACT ON HEPATIC CYTOCHROME P450 AND CLINICAL BLOOD CHEMISTRY IN RATS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. พ.ต.ท.หญิง สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม 122 หน้า. ISBN 974-17-6911-3.

กระเจี๊ยบแดง มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* Linn. เป็นสมุนไพรที่มีรายงานว่ามีสรรพคุณในการรักษาโรคหลายชนิด การศึกษานี้มุ่งศึกษาผลกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี450 (cytochrome P450, CYP) ที่เกี่ยวข้องกับการเมแทบอลิซึมของยาและการกระตุ้นฤทธิ์ของสารก่อมะเร็ง/สารก่อการกลายพันธุ์ ได้แก่ CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 และ 3A นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของสารสกัดนี้ต่อค่าเคมีคลินิกและโลหิตวิทยาในเลือดของหนูขาวด้วย การทดลองใช้หนูขาวเพศผู้พันธุ์วิสตาร์ จำนวน 30 ตัว โดยแบ่งหนูขาวแบบสุ่มเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุม ได้รับน้ำกลั่น ขนาด 1 มิลลิลิตร/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 30 วัน กลุ่มที่สองและสามเป็นกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในขนาด 250 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ตามลำดับ เป็นเวลา 30 วัน เมื่อครบระยะเวลา ทำให้หนูหมดความรู้สึก เก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจเพื่อตรวจค่าโลหิตวิทยาและแยกซีรัมเพื่อตรวจค่าเคมีคลินิก นำตับมาเตรียมไมโครโซมเพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของ total CYP, สมรรถนะของ CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 และ 3A ผลการทดลองพบว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำทั้งสองขนาดไม่มีผลต่อปริมาณของ total CYP และสมรรถนะของ CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 และ 3A สารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำทั้งสองขนาดไม่มีผลต่อค่าเคมีคลินิก และโลหิตวิทยาต่างๆ ต่อไปนี้ คือ ALT, AST, ALP, total bilirubin, direct bilirubin, total protein, albumin, globulin, BUN, SCr, total cholesterol, TG, LDL-C, HDL-C, glucose, uric acid, calcium, sodium, potassium, chloride, hemoglobin, hematocrit, RBC count, RBC indices (mean corpuscular volume, MCV; mean corpuscular hemoglobin, MCH; mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), RBC morphology, platelet count, white blood cell (WBC) count และ % differential WBCs จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำไม่มีผลเปลี่ยนแปลงสมรรถนะของเอนไซม์ส่วนใหญ่ในเฟสหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการเมแทบอลิซึมของยาและการกระตุ้นฤทธิ์ของสารก่อมะเร็ง/สารก่อกลายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำไม่มีผลพิษต่อการทำงานของอวัยวะหรือระบบของร่างกายที่สำคัญหลายอย่าง เช่น ตับ ไต ระบบเลือด อิเล็กโตรไลต์ รวมทั้งเมแทบอลิซึมของไขมันและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความปลอดภัยของการใช้สารสกัดดังกล่าว

ภาควิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4676577033 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: *HIBISCUS SABDARIFFA* / HEPATIC CYTOCHROME P450 / CLINICAL BLOOD CHEMISTRY / SUBACUTE TOXICITY

PROMPHORN PROMMETTA : SUBACUTE EFFECTS OF *HIBISCUS SABDARIFFA* AQUEOUS EXTRACT ON HEPATIC CYTOCHROME P450 AND CLINICAL BLOOD CHEMISTRY IN RATS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. POL. LT. COL. DR. SOMSONG LAWANPRASERT, THESIS COADVISOR : ASST. PROF. DR. LADDAWAL PHIVTHONG-NGAM, 122 pp. ISBN 974-17-6911-3.

Hibiscus sabdariffa Linn. is commonly called in Thai as " Krachiap-daeng ". *H. sabdariffa* has been reported to have a broad range of therapeutic effects. This study examined subacute effects of *H. sabdariffa* aqueous extract on the activities of cytochrome P450 (CYP), involving in drug metabolism and carcinogenic/mutagenic bioactivation, such as CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 and 3A in rats. In addition, effects of this extract on clinical blood chemistry and hematology were also determined. Thirty male Wistar rats were randomly divided into 3 groups, each group comprised 10 rats. Rats in the first group were given distilled water 1 ml/kg/day orally for 30 days, serving as a control group. The other two groups of rats were given *H. sabdariffa* aqueous extract orally at dosages of 250 and 1,000 mg/kg/day for 30 days. At the end of the treatment, rats were anesthesized. Blood samples were collected by heart puncture and serum was prepared for measuring hematology and clinical blood chemistry. Microsomes were prepared from livers and being used for determining of total CYP contents as well as the activities of CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 and 3A. The results showed that *H. sabdariffa* aqueous extract at both doses did not affect hepatic total CYP contents and the activities of CYP 1A1, 1A2, 2B1/2, 2E1 and 3A. Both dosage regimens of *H. sabdariffa* did not cause any significant changes of these following clinical blood chemistry and hematology in rats: ALT, AST, ALP, total bilirubin, direct bilirubin, total protein, albumin, globulin, BUN, SCr, total cholesterol, TG, LDL-C, HDL-C, glucose, uric acid, calcium, sodium, potassium, chloride, hemoglobin, hematocrit, RBC count, RBC indices (mean corpuscular volume, MCV; mean corpuscular hemoglobin, MCH; mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), RBC morphology, platelet count, white blood cell (WBC) count and % differential WBCs. These results suggested that *H. sabdariffa* aqueous extract at both doses used in this study did not modulate the activities of most phase I hepatic CYPs involving in drug metabolism and carcinogenic/mutagenic bioactivation. In addition, this extract did not exhibit harmful effects on several important organs/systems such as liver, kidney, blood system, electrolytes as well as lipid and carbohydrate metabolism.

Department Pharmacology — Student's signature... Promphorn Prommetta

Field of study Pharmacology — Advisor's signature... Pol. Lt. Col. Somsong Lawanprasert

Academic year 2004 — Co-advisor's signature... L. Phivthongngam

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest appreciation and sincere gratitude to my advisor, Associate Professor Pol. Lt. Col. Dr. Somsong Lawanprasert and my thesis co-advisor, Assistant Professor Dr. Laddawal Phivthong-ngam for their helpful advise, guidance, encouragement and constructive criticism throughout my research study which enable me to accomplish this thesis.

I would like to thank Associate Professor Dr. Chaiyo Chaichantipyuth and Associate Professor Nuansri Niwattisaiwong for their valuable advice, guidance, comments on the preparation and identification of *H. sabdariffa* aqueous extract used in this study and being a committee member. Thank are also extended to Associate Professor Dr. Mayuree Tantisira, the committee member, for useful comments and kind assistance.

My appreciation is also expressed to Associate Professor Dr. Supatra Srichairat for kind assistance.

This study was supported partly by the Graduate School, Chulalongkorn University.

I wish to thank all staff members of the Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University as well as all staff members of the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for their helps.

I wish to thank Professional Laboratory Management Corp Co., Ltd. for the assistance on determining of clinical blood chemistry and hematology.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my family and my friends for their helps, encouragement and morale that have made me to complete this work.

CONTENTS

CONTENTS *(continued)*

CONTENTS *(continued)*

page

LIST OF TABLES

Table page

LIST OF FIGURES

Figure page

Figure page

LIST OF ABBREVIATIONS

ALP	=	alkaline phosphatase
ALT	=	alkaline aminotransferase
ANOVA	=	analysis of variance
AOM	=	azoxymethane
AST	=	aspartate aminotransferase
B(a)P	=	benzo(a)pyrene
BR	=	benzyloxyresorufin
BROD	=	benzyloxyresorufin O-dealkylase
BSA	=	bovine serum albumin
BUN	=	blood urea nitrogen
BW	=	body weight
CD	=	cluster of differentiation
cm	=	centimeter
CYP	=	cytochrome P450
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
ED_{50}	=	median effective dose
e.g.	=	exampli gratia
ER	=	ethoxyresorufin
EROD	=	ethoxyresorufin O-dealkylase
et al.	=	et alii (and other)
etc.	=	and so on
fL	=	femtoliter
g	=	gram
G6P	=	glucose 6-phosphate
G6PD	=	glucose 6-phosphate dehydrogenase
GSH	=	glutathione
GST	=	glutathione S-transferase
HAs	=	*Hibiscus* anthocyanins

LIST OF ABBREVIATIONS *(continued)*

Hb	=	hemoglobin
Hct	=	hematocrit
HDL-C	=	high density lipoprotein cholesterol
i.p.	=	intraperitoneal
kg	=	kilogram
L	=	liter
LD_{50}	=	median lethal dose
LDL-C	=	low density lipoprotein cholesterol
LDH	=	lactate dehydrogenase
LPS	=	lipopolysaccharide
M	=	molar (mole per liter)
MCH	=	mean corpuscular hemoglobin
MCHC	=	mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	=	mean corpuscular volume
MDA	=	malondialdehyde
mEq	=	milliequivalent
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mM	=	millimolar (millimole per liter)
mmol	=	millimole
MR	=	methoxyresorufin
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
MROD	=	methoxyresorufin O-dealkylase
MW	=	molecular weight
NADP	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
nm	=	nanometer
nmol	=	nanomole
PAH	=	polycyclic aromatic hydrocarbon

LIST OF ABBREVIATIONS *(continued)*

PCA	=	*Hibiscus* protocatechuic acid
pg	=	picogram
PhIP	=	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine
pmol	=	picomole
PR	=	pentoxyresorufin
PROD	=	pentoxyresorufin O-dealkylase
RBC	=	red blood cell
rpm	=	revolutions per minute
SCr	=	serum creatinine
SD	=	Sprague-Dawley
SEM	=	standard error of mean
SER	=	smooth endoplasmic reticulum
sec	=	second
t-BHP	=	*tert*-butyl hydroperoxide
TCA	=	trichloroacetic acid
TG	=	triglyceride
TPA	=	12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
vs	=	versus
v/v	=	volume by volume
WBC	=	white blood cell
w/v	=	weight by volume
w/w	=	weight by weight
°C	=	degree celsius
β	=	beta
γ	=	gamma
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar (micromole per liter)