รายงานการวิจัย

เรื่อง

การวิเคราะห์พันธุกรรม สารเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ ความเป็นพิษในระดับเซลล์และโมเลกุลของพืชสกุล *Mucuna*

Analysis of genetics, chemicals, biological activity, cytotoxicity and genotoxicity of the genus *Mucuna*

พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์

อรุณรัตน์ ฉวีราช

รุ่งลาวัลย์ สุดมูล

และคณะ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2561)

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

จากพื้นฐานที่ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง จึงทำให้มีความหลากชนิดของสารเคมีจากพืชซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถใช้เพื่อการดำรงชีวิตของมนุษย์มาตั้งแต่สมัยโบราณ จึงมีการนำพืชมาเป็นอาหาร ยาสมุนไพร สกัดสารบริสุทธิ์ ศึกษาโครงสร้างและการทำหน้าที่ของสารนั้น จนกระทั่งช่วงเวลาที่มีความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีสูงและเมื่อได้ศึกษาแล้วว่าพบสารใด มีประโยชน์อย่างไรและทำหน้าที่สำคัญอย่างไรในร่างกายมนุษย์ จึงศึกษาว่าพืชนั้นมีพิษต่อมนุษย์ในระดับเซลล์และโมเลกุลหรือไม่ แล้วจึงผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ต้องการการทดสอบในอาสาสมัครเพื่อทราบฤทธิ์ทางชีวภาพและผลข้างเคียง ในแนวทางนี้ก็จะได้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่อาจจดทะเบียนเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือ ทะเบียนยาได้ขึ้นกับฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์นั้นๆ ซึ่งเป็นแนวทางที่ดีกับสุขภาพเทียบเท่ากับการรับประทานผัก หรือได้สารจากธรรมชาติมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ใหม่ที่น่าจะปลอดภัยกับร่างกายมนุษย์ หรืออีกแนวทางหนึ่งคือเมื่อพบสารสำคัญในปริมาณสูง สามารถสกัดสารที่ต้องการนั้นให้บริสุทธิ์แล้วนำมาใช้ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ หรือยา ในรูปแบบต่างๆดังที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ทั้งวิธีการฉีด ทา และบริโภค นอกจากนี้หากมีสารชนิดใดจากพืชที่มีปริมาณน้อยทำให้มีราคาแพง วิธีการทางวิทยาศาสตร์อาจช่วยให้มีการสังเคราะห์สารประกอบนั้น หรือสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงและมีคุณสมบัติเช่นเดียวกันขึ้นมาเพื่อใช้ประโยชน์ในมนุษย์ได้มากและอย่างพอเพียงและทั่วถึง ลดการนำเข้ายา/สารเคมีจากต่างประเทศที่มีราคาแพง โดยเฉพาะประเทศไทยสามารถทำได้ง่ายกว่าเนื่องจากสามารถศึกษาการใช้ประโยชน์พืชสมุนไพรจากภูมิปัญญาท้องถิ่น แล้วจึงนำไปสู่กระบวนการวิทยาศาสตร์ที่ต้องศึกษาทั้งประโยชน์และโทษต่อมนุษย์ สารเคมีจากพืชที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิตได้มีมากมายดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เช่น เบต้าซิโตสเตอรอล (β-sitosterol) ลดไขมันในเลือด บรรเทาอาการต่อมลูกหมากโต หยุดผมร่วงและกระตุ้นการเจริญของผม แกมม่าซิโตสเตอรอล (γ-sitosterol) ลดน้ำตาลในเลือดต้านโรคเบาหวาน โอลีเอไมด์ (oleamide) ต้านอัลไซเมอร์ ชักนำให้หลับและอยากอาหารในผู้สูงวัย อาร์บูทิน (arbutin) ใช้ผสมในเครื่องสำอางที่ทำให้ผิวขาวและใช้ในการเก็บรักษาผลไม้ไม่ให้เกิดสีน้ำตาลหลังจากเก็บเกี่ยว แอลโดปา (L-dopa) รักษาโรคพาร์คินสัน และสารอื่นๆอีกมากมาย เช่น ยูจีนอล (eugenol) คาวิคอล (chavicol) คารีโอฟีลลีน (caryophyllene) ซาร์บินีน (sabinene) และอีกมากมายที่ไม่ได้กล่าวในที่นี้

พืชเป้าหมายที่ต้องการศึกษาในครั้งนี้คือใบพืชสกุลหมามุ่ย : *Mucuna* ทั้งนี้เนื่องจากใบพืชเป็นแหล่งสร้างสารสำคัญมากมาย และเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างคุ้มค่าและยั่งยืนเนื่องจากใบ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สามารถเจริญเติบโตใหม่ได้เสมอ นอกจากนี้ยังมีผลการวิจัยยืนยันว่า แหล่งของแอลโดปาจากพืชให้ผลการรักษาโรคพาร์คินสันได้ดีกว่าสารแอลโดปาบริสุทธิ์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (Katzenschlageet al., 2004) พืชสกุลนี้ในประเทศไทยมี 13 ชนิด (Wilmot-Dear, 2008) แต่ชนิดที่รู้จักใช้ประโยชน์เป็นยาสมุนไพรมากมีชนิดเดียวคือหมามุ่ย (*M. pruriens*) โดยใช้เมล็ดที่มีสารแอลโดปา แต่ชนิดอื่นๆโดยเฉพาะชนิดที่มีในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาและยังไม่มีการศึกษาในใบเลยในทุกชนิด ดังนั้นกระบวนการศึกษาจึงต้องครอบคลุมทุกๆด้าน ได้แก่ การศึกษาจำนวนชนิด ศึกษาพันธุกรรมในกลุ่มพืชนั้น ศึกษาปริมาณและชนิดสารเคมีที่มีโดยวิธีการ gas chromatography mass-spectrometry (GC-MS) และ high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งอาจมีชนิดของสารหลากหลาย สารการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ การทดสอบความเป็นพิษด้วยทั้งระดับเซลล์และโมเลกุล หากมีสารสำคัญในปริมาณที่ใช้ประโยชน์ได้ ก็จะนำไปสู่การผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต่อไป แล้วจึงสร้างเครื่องหมายโมเลกุลประจำชนิดพืชเพื่อแสดงความเป็นชนิดของพืชในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางยาสมุนไพรจากใบของพืชสกุล *Mucuna* จากชุมชนที่เก็บตัวอย่างพืช สารเคมี และทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์และโมเลกุลด้วย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction (MTT) และ comet assaysในพืช

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาประวัติการใช้เป็นยาสมุนไพร ศึกษาสารในพืชสกุล *Mucuna*ด้วยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometryทดสอบหาสารสารแอล-โดปาด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และทดสอบความเป็นพิษของพืชในระดับเซลล์และดีเอ็นเอในเซลล์เม็ดเลือดขาวคน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เกิดความรู้ได้แก่ คุณสมบัติทางยาสมุนไพรของพืชแต่ละชนิดจากชาวบ้าน ชนิดของสารพร้อมหน้าที่และคุณสมบัติของสาร เพื่อเป็นแนวทางการนำพืชไปใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพรได้ตรงกับ พร้อมทั้งทราบความเป็นพิษในระดับเซลล์และโมเลกุลของพืชสกุล *Mucuna*ที่เก็บตัวอย่างได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่างานวิจัยในต่างประเทศและในประเทศไทยได้ศึกษากับเมล็ดของหมามุ่ย (*M. pruriens*) เท่านั้น

พืชสกุล *Mucuna* อยู่ในวงศ์ Leguminosae มีการทบทวนจำนวนชนิดโดย Wilmot-Dear, 2008 และรายงานไว้ได้แก่ 1. สะบ้าลิง (*M. macrocarpa* Wall.) 2. พวงมรกต (*M. thailandica* Niyomdham & Wilmot-Dear) 3. หมามุ่ยช้าง หรือสะบ้าลิงลาย (*M. gigantea* (Willd.) DC.) 4. *M. oligoplax* Niyomdham & Wilmot-Dear 5. หมามุ่ยใหญ่ หรือ ตำแยใหญ่ หรือ สะบ้าลิงลาย (*M. monosperma* DC.) 6. *M. stenoplax* Wilmot-Dear 7. กล๊ะอี๊อซา (*M. hainanensis* Hayata) 8. สะบ้าลาย (*M. revoluta* Wilmot-Dear) 9. สะบ้าลาย (*M. interrupta* Gagnep.) 10. *M. gracilipase* Craib. 11. หมามุ่ย (*M. pruriens* (L.) DC.) 12. หมาเยื่อง (*M. bracteata* DC.) 13. พวงโกเมน (*M. warburgii* K. Schum.)

ส่วน เต็ม สมิตินันท์, 2557 ได้รายงานไว้ 13 ชนิดเช่นเดียวกัน แต่มี 1 ชนิดที่มี 3 สายพันธุ์ คือ *M. pruriens* var. *pruriens*, *M. pruriens* var. *hirsuta*และ *M. pruriens* var. *utilis*

มีรายงานการสกัดสารแอลโดปาในเมล็ดของพืชสกุล *Mucuna*เพื่อใช้ในการรักษาโรคพาร์คินสัน ได้แก่ *M. cochinchinensis*, *M. deeringiana*, *M. gigantea*, *M. monosperma*, *M. pruriens* and *M. utilis* (Ingle, 2003)

ผงเมล็ดของหมามุ่ยใช้เพื่อการรักษาโรคพาร์คินสันมานานแล้ว Katzenschlageet al. (2004) จึงได้ศึกษาเปรียบเทียบการให้ mucuna preparation(seed) และ standard L-dopa/carbidopa (LD/CD) กับคนไข้โรคพาร์คินสัน 8 คนโดยให้แบบสุ่ม และให้ยาหลอก (ในคนไข้ทั้ง 8 คนนี้) คนไข้จะได้รับยาแบบสุ่มเป็นระยะภายในสัปดาห์ ความเข้มข้นเดียวคือ 200/50 mg LD/CD และ 15/30 g mucuna preparation ผลการทดสอบสรุปได้ว่าแอลโดปาจากแหล่งธรรมชาติคือ mucuna preparation อาจให้ประโยชน์ในการรักษาโรคพาร์คินสันในระยะยาวมากกว่าวิธีการให้ยา

Suresh and Prakash (2012) ได้ศึกษาเมล็ดของหมามุ่ยกับพฤติกรรมความเป็นเพศหญิง และปริมาณอสุจิ ในระยะยาวกับหนูตัวผู้ที่มีปริมาณน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่มหนูที่ชักนำให้เกิดโรคเบาหวานมีพฤติกรรมทางเพศและอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่ามีระดับของฮอร์โมนเพศได้แก่ follicular stimulating hormone, luteinizing hormone และ testosterone ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ในขณะที่หนู

ที่เป็นโรคเบาหวานและได้รับสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยด้วยเอทานอลโดยให้ 200 mg/kg น้ำหนักตัว พบว่าพฤติกรรมทางเพศ สมรรถภาพทางเพศ ปริมาณอสุจิ การสร้างสเปิร์มต่อวัน และระดับฮอร์โมนเพศทั้งสามชนิดดีขึ้น/เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สรุปได้ว่าสารสกัดเมล็ดหมามุ่ยด้วยเอทานอลทำให้พฤติกรรมทางเพศดีขึ้นโดยมีผลกับลักษณะของความเป็นเพศผู้และต้านเบาหวานแบบที่ชักนำให้เกิดขึ้น การศึกษาครั้งนี้สนับสนุนการใช้ประโยชน์ของหมามุ่ยในสรรพคุณทางยาด้านที่ทำให้ความเป็นเพศชายดีขึ้นในชายที่เป็นโรคเบาหวาน

Patil et al. (2013) ได้กล่าวว่าแอลโดปาใช้สำหรับรักษาโรคพาร์คินสัน โดยแต่ละปีมีความต้องการใช้ถึง 250 ตัน คิดเป็นมูลค่า 101 พันล้านเหรียญดอลลาร์ มีแหล่งที่มาของสารเพื่อการผลิตแอลโดปาหลากหลายต่างกัน ในหลายๆกระบวนการผลิตเหล่านี้กระบวนการผลิตแอลโดปาทางชีวภาพให้ประโยชน์เหนือกว่าวิธีการทางเคมีคือการสังเคราะห์และทำให้บริสุทธิ์ใช้เวลาน้อยกว่า และราคาไม่แพง สารแอลโดปา พบในพืชอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกถั่ว (broad bean) ซึ่งพบว่าการบริโภคพืชกลุ่มนี้จะให้แอลโดปากับสมองได้เร็วกว่าและเป็นช่วงเวลาที่ยาวนานกว่าวิธีการให้ยา พืชที่มีสาระสำคัญนี้คือเมล็ดของหมามุ่ย, *M. holtonii*และ*M. monosperma*

แอลโดปาซึ่งพบว่ามีในเมล็ดของหมามุ่ยและใช้ในการรักษาโรคพาร์คินสันนั้น ยังพบว่าสารนี้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์อัลคาลอยด์อื่นหลายชนิดเช่น catecholamine และ melanin และสารเหล่านี้ที่อยู่ในดิน (พืชนั้นตายและเน่าสลาย) จะไปห้ามการเจริญของพืชที่เจริญอยู่บริเวณรอบ ๆ (Soares et al., 2014)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กรอบแนวคิดในการวิจัย

การศึกษาสารเคมีในพืชเป็นวิธีการที่จะทำให้ทราบว่าควรนำพืชนั้นไปใช้เป็นยารักษาโรคใดที่ตรงกับคุณสมบัติของสารที่พบในพืชนั้นๆ พร้อมทั้งศึกษาถึงความปลอดภัยต่อคนทั้งในระดับเซลล์และดีเอ็นเอ เพื่อการใช้ประโยชน์จากพืชอย่างปลอดภัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1.ประชากรกลุ่มตัวอย่าง และการเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บพืชสกุล *Mucuna* ระบุชนิดให้ถูกต้องโดยใช้เอกสาร Thai Forest Bulletin โดย Wilmot-Dear, 2008 แล้วนำใบที่เจริญเต็มที่นำมาล้างให้สะอาด ผึ่งลมให้แห้ง บดเป็นผงด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าเพื่อที่จะใช้ในการสกัดสารนำไปทดสอบหาชนิดและปริมาณสารที่น่าสนใจและใช้เพื่อการทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์และดีเอ็นเอ

2. เตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาหาปริมาณและชนิดของสารด้วยวิธีGas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS)

นำผงพืชตัวอย่างมาสกัดด้วยตัวทำละลายสองชนิดคือ เอทานอล และเฮกเซน อัตราส่วนระหว่างผงใบไม้ต่อตัวทำละลาย 1 กรัมต่อ 5 มิลลิลิตร หมักในขวดดูเรนในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองวัตแมน(whatman no.1) นำสารสกัดที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ชนิดของสารด้วยวิธี GC-MS

3. เตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาปริมาณสาร L-dopaด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

นำผงพืชตัวอย่างทำให้เป็นสารละลายและสกัดสารด้วยเฮกเซน อัตราส่วนของสารละลายและเฮกเซน 1:1 มล. เก็บห้องอุณหภูมิปกติ ในที่มืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปละเหยเฮกเซนด้วย rotary evaporator แล้วละลายกลับด้วย 100% DMSO ปริมาตรเท่าเดิม จากนั้นเจือจางสารสกัดให้มี DMSO เป็น 10% ด้วยน้ำดีไอ (DI: deionized water)เพื่อนำไปหาปริมาณสาร สารแอล-โดปาด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

4. การเตรียมสารสกัด และการทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์และดีเอ็นเอ

4.1 การเตรียมสารสกัด

นำสารละลายส่วนที่เหลือจากข้อ 2 ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องเครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศ (rotary evaporator) จากนั้นละลายกลับด้วยไดเมทิลซัล-ฟอกไซด์ (DMSO: dimethyl sulfoxide) ในปริมาตรเท่ากับตัวทำละลายที่ละเหยออกไป ทำการเจือจางสารเป็น 5 ความเข้มข้น 0.00001x 0.0001x 0.001x 0.01x และ 0.1x จากความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดเพื่อใช้ในการทดสอบพิษในระดับเซลล์

4.2 การเตรียมอาหาร

1. เติมยาปฏิชีวนะในอาหารสูตร RPMI-1640 อัตราส่วน 1 ต่อ 100 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2. เติม FBS (fetal brovin serum) 1 มิลลิลิตรต่อ RPMI-1640 9 มิลลิลิตรหรือร้อยละ 10 เตรียมใหม่ทุกครั้งในวันที่ทำการทดลอง

4.3 การแยกเม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ของคน

1. เติมไฟคอลล์ (ficoll) และเลือดลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนของไฟคอลล์: เลือด 3: 4 แล้วนำนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที ในหลอดจะแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ชั้นล่างสุดจะเป็นเม็ดเลือดแดง ชั้นกลางเม็ดเลือดขาว ชั้นบนสุดเป็นพลาสมา ดูดเอาชั้นกลางไปใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร

2. เติมฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) 2 เท่าของปริมาตรของชั้นกลางที่ได้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการนับเซลล์โดยใช้ Hemocytometer โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีลักษณะที่เป็นวงกลม ใสไม่มีสี

3. แล้วเตรียมอาหารที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาว 1 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร

4.4 การทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์

1. นำถาด 96 หลุมมาเติมอาหารที่ไม่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวปริมาตร 125 ไมโครลิตรในช่อง A1-12และ H 1-12(ภาพที่ 4.3 .2 .1)

2. เติมอาหารที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวปริมาตร 125 ไมโครลิตรในช่อง B 1-12 จนถึง G 1-12

3. เติมสารสารสกัดที่ทำการเจือจางแล้ว 5 ความเข้มข้นปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยเติมสารสกัดจากเฮกเซนในช่อง A2-H2 ถึง A6-H6 โดยช่อง A2 ถึง H2 เติมสารสกัดเข้มข้น 0.00001x ช่อง A3 ถึง H3 เติมสารสกัดเข้มข้น 0.0001x ช่อง A4 ถึง H4 เติมสารสกัดเข้มข้น 0.001x ช่อง A5 ถึง H5 เติมสารสกัดเข้มข้น 0.01x และช่อง A6 ถึง H6 เติมสารสกัดเข้มข้น 0.1x

4. เติมสารสกัดจากเอทานอลในช่อง A7-H7 ถึง A11-H11 โดยช่อง A7 ถึง H7 เติมสารสกัดเข้มข้น 0.00001x ช่อง A8 ถึง H8 เติมสารสกัดเข้มข้น 0.0001x ช่อง A9 ถึง H9 เติมสารสกัดเข้มข้น 0.001x ช่อง A10 ถึง H10 เติมสารสกัดเข้มข้น 0.01x และช่อง A11 ถึง H11 เติมสารสกัดเข้มข้น 0.1x

5. นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บานไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

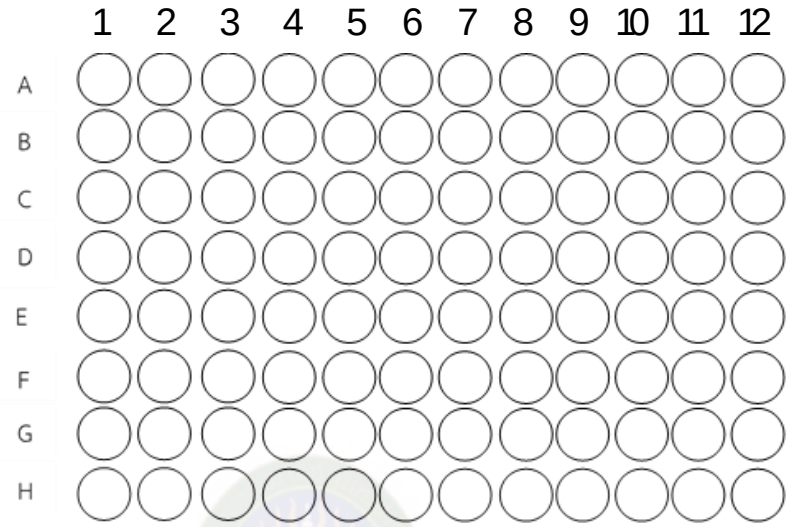
6. นำไปปั่นหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 รอบต่อนาที แล้วทำการดูดอาหารออกปริมาตร 130 ไมโครลิตร

7. เติม MTT ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อช่อง นำไปบ่มต่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

8. เติม DMSO ช่องละ 100 ไมโครลิตรเพื่อละลายผลึกฟอร์มาเซน (formazan cystal)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

9. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Fluorescence Microplate Reader



ภาพที่ 3.1 ถาด 96 หลุมในการทดสอบความเป็นพิษระดับเซลล์

4.5 การตรวจสอบผลความเป็นพิษระดับเซลล์

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของสารสกัดเทียบกับ negative control (หลุมที่ไม่มีการเติมสารใดๆ) เป็นร้อยละ 100 โดยนำค่าร้อยละที่ได้ไปสร้างกราฟอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่อความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ เพื่อหาค่าการรอดชีวิตของเซลล์ร้อยละ 50 (inhibition concentration, IC_{50}) จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \{ \frac{\text{OD. sample}}{\text{OD.control}} \} \text{ X } 100$$

เมื่อ OD. Control คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่วัดได้ของ negative control ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรOD. Sample คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่วัดได้ของสารสกัดตัวอย่างพืชที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

4.6 การทดสอบความเป็นพิษระดับดีเอ็นเอ

1. เตรียมเจล (low melting agarose, LMA) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

2. ดูดอาหารที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวความเข้มข้น 5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากับ LMA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:1)

3. หยดส่วนผสมในข้อ 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงให้ทั่วแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้ จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. นำกระจกปิดสไลด์ออก และแช่สไลด์ในสารละลาย lysis solution buffer ค่าพีเอช 10 ให้ท่วมสไลด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. ย้ายสไลด์ลงในสารละลาย phoresis buffer เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. นำแผ่นสไลด์วางบน electrophoresis chamber แล้วค่อยๆ เติมสารละลาย phoresis buffer ให้ท่วมทั้งแผ่นสไลด์ ให้กระแสไฟฟ้า 300 มิลลิแอมแปร์ 26 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที

7. นำแผ่นสไลด์มาแช่ในสารละลาย 0.4 M tris solution เพื่อทำความสะอาด เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง8) หลังจากนั้นย้อมสีสไลด์ด้วย ethidium bromide (EtBr) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ให้ทั่วทั้งแผ่นสไลด์ ปิดกระจกสไลด์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.7 การตรวจสอบผลความเป็นพิษระดับดีเอ็นเอ

1. นำแผ่นสไลด์ไปตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ ที่กำลังขยาย 200 เท่า โดยตรวจสอบจำนวนเซลล์ 150 เซลล์ต่อการทดลอง

2. ถ่ายรูปผลการทดลองด้วยโปรแกรม LUCIA จำนวน 150 เซลล์ต่อการทดลอง โดยผลความเป็นพิษ ประเมินจากความยาวของหาง ซึ่งคือดีเอ็นเอที่แตกหักเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอที่ไม่มีการแตกหัก ซึ่งคือส่วนหัว ด้วยโปรแกรม CASP และวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม GraphPad Prism

5. การวิเคราะห์ชนิดสาร และหาปริมาณสาร

5.1 การวิเคราะห์ชนิดสารด้วย gas chromatography – mass chromatography (GC-MS)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

นำสารสกัดที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำส่งวิเคราะห์ชนิดของสารด้วย GC-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ดังสภาวะต่อไปนี้ คอลัมน์ Agilent 122-5532 DB-5ms capillary column (ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 250 ไมโครเมตร ความหนาฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร) กับโปรแกรมอุณหภูมิเตาอบเริ่มจาก 80 องศาเซลเซียส 3 นาที หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 240 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเพิ่มเป็น 280 องศาเซลเซียส โดยอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ 20 องศาต่อนาที เวลาทั้งหมดที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของสารทั้งหมด 55.83 นาที โหมดเครื่องฉีดสาร : ไม่แยก เมื่ออุณหภูมิอยู่ที่ 290 องศาเซลเซียส ฉีดสารปริมาตร 2 มิลลิลิตร สภาวะของ MS ประกอบด้วยส่วนของการเคลื่อนที่ของความร้อน 290 องศาเซลเซียส MS quad : 15 องศาเซลเซียส แหล่ง MS : 230 องศาเซลเซียส โหมดเพิ่มเติม การตรวจรายละเอียด สารละลายช้า 3 นาที ค่าแรงดันไฟฟ้า 1318 โวลต์

5.2 การหาปริมาณสารแอล-โดปา(L-Dopa) ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC: High Performance Liquid Chromatography)

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานแอล-โดปา

ละลายสารมาตรฐานแอล-โดปา1 มิลลิกรัม ด้วยน้ำ DI 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางเป็น 3 ความเข้มข้น 0.0005 0.01 0.00005 และ 0.000005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ฉีดปริมาตร 100 ไมโครลิตร

2.ขั้นตอนการตรวจสอบหาปริมาณสารแอล-โดปา

สารสกัดหยาบจากตัวอย่างจะถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ใช้เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-20AD (Japan) พร้อมกับปั๊มสำหรับสารละลายตัวพารุ่น SPD-M20Aคอลัมน์วิเคราะห์คือ Inertsil ODS-3, 5 ไมโครลิตร (4.6 มล. x 250 มล.) ฉีดสารสกัดพืช 100 ไมโครลิตร ตรวจจับที่ความยาวคลื่น 280, 8 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่เป็นสารผสมประกอบด้วย 0.1 mM formic acid และ 0.2 mM EDTA pH 3.1 ที่อัตราการไหล 1 มล. ต่อนาที ผลที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับกราฟจากสารมาตรฐาน

5.3 การวิเคราะห์สารมาตรฐาน และสร้างกราฟมาตรฐาน

ฉีดสาร standardL-dopa ความเข้มข้น 0.0005 0.00005 และ 0.000005 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตรปริมาตร100 ไมโครลิตรโดยการฉีดความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) พบว่า ได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์(R^2) เท่ากับ 0.9991 แสดงในภาพที่ 1 จากกราฟดังกล่าวคำนวณหาความเข้มข้นของสาร L-dopa ในสารสกัดพืชที่ฉีดปริมาตร100 ไมโครลิตร

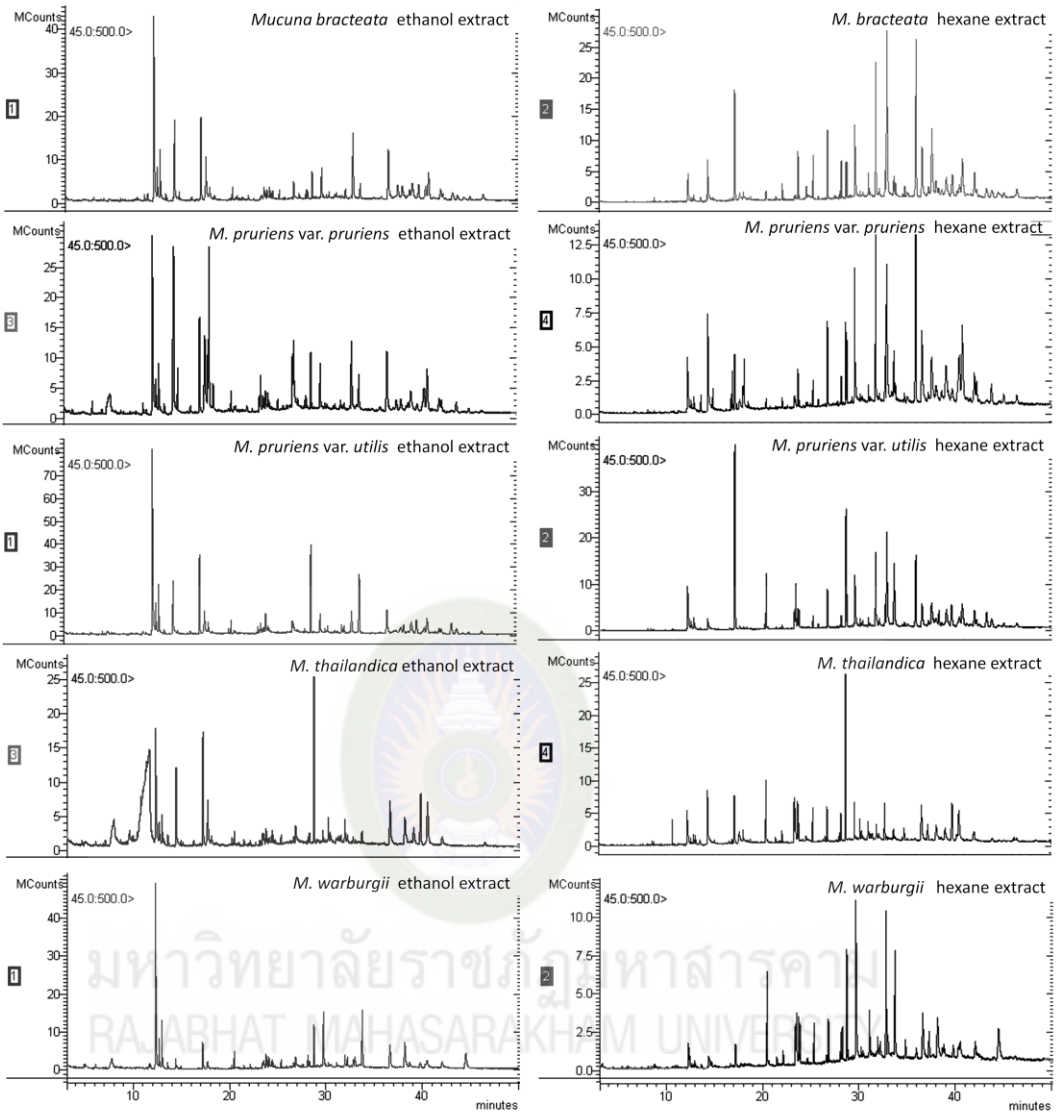
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ในการเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Mucuna* เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่างๆต่อไปนั้น ได้ศึกษาคุณสมบัติของประวัติของการใช้เป็นยาสมุนไพรตามชุมชนที่เก็บตัวอย่างพืชที่ศึกษาได้แก่ อ. โนนสะอาด อ. หนองวัวซอ จ. อุดรธานี อ. โกสุมพิสัย จ. มหาสารคาม อ. เมือง จ. เลย พบว่าไม่มีประวัติการนำใบมาใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาโรคใดๆ ใช้เฉพาะเมล็ดมาประกอบอาหารเมื่อแก่ (แต่ยังไม่แห้ง) เท่านั้น ได้แก่เมล็ดของถั่วขอ (*M. pruriens* var. *pruriens*) อย่างไรก็ตามเมล็ดของถั่วขอ และหมามุ่ยนั้นได้มีการศึกษาทั้งวิชาการและการใช้เป็นยาสมุนไพรไทยในการช่วยส่งเสริมสมรรถภาพทางเพศของชายไทยมาแต่สมัยโบราณ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Mucuna*ในพื้นที่อำเภอและจังหวัดต่างๆดังกล่าวมา ได้จำนวน 20 ตัวอย่าง แต่ตรวจสอบชนิดแล้วได้ทั้งหมด 4 ชนิด 2 สายพันธุ์ได้แก่หมามุ่ย 2 สายพันธุ์คือ *M. pruriens* var. *pruriens*และถั่วขอ *M. pruriens* var. *utilis*พวงหยก (*M. thailandica*) พวงโกเมน (*M. warburgii*) และหมามุ่ยน้อย (*M. bracteata*) ใบของพืชทั้ง 4 ชนิด และ 2 สายพันธุ์นี้นำไปศึกษาตามกระบวนการต่อไปคือ การศึกษาสารเคมีในพืชด้วยวิธีการ GC-MS และศึกษาปริมาณของสาร L-dopa ด้วยวิธี HPLC และการทดสอบความเป็นพิษของพืชทั้งระดับเซลล์และโมเลกุลได้ผลการวิจัยดังต่อไปนี้

การศึกษาสารเคมีในพืชด้วยวิธี GC-MS นั้นแสดงโครมาโทแกรม (chromatogram)ชนิดของสารด้วย ดังภาพที่ 4.1 พบสารจำนวนมากและสามารถจัดแบ่งสารที่พบออกเป็น 2 กลุ่มตามปริมาณเปอร์เซ็นต์สารสัมพัทธ์ (คือปริมาณสารที่พบเป็นเปอร์เซ็นต์จากปริมาณสารทั้งหมด) ที่พบคือกลุ่มที่พบให้ปริมาณสูงตั้งแต่ 10% ขึ้นไปได้แก่53.04% mome inositolในสารสกัดเอทานอลพวงมรกต16.96%, 10.66%, 20.41% และ 22.03% phytol acetate ในสารสกัดเอทานอลหมามุ่ยน้อย หมามุ่ย ถั่วขอ และพวงโกเมน 16.86%, 20.89% และ 15.46% headecanal ในสารสกัดเฮกเซน หมามุ่ยน้อย หมามุ่ย และถั่วขอ 17.25% n-hexadeanoic acid ในสารสกัดเอทานอลหมามุ่ย 15.63%, 11.23% และ 11.69% 1-hexacosanol ในสารสกัดเฮกเซนของหมามุ่ยน้อย หมามุ่ย และถั่วขอ 15.25% squalene จากสารสกัดเฮกเซนพวงมรกต 14.71% phytol ในสารสกัดเฮกเซนถั่วขอ 13.51% hentriacontane 10.19%, 10.50% และ 10.60% dl-α -tocopherol ในสารสกัดเอทานอลถั่วขอ และสารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของพวงโกเมน ส่วนสารที่พบในปริมาณต่ำกว่า 10% มีเป็นจำนวนมากดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 โครมาโทแกรมจากวิธีการ GC-MS ของสารสกัดใบหมามุ่ยน้อย (*M. bracteata*) หมามุ่ย (*M. pruriens var. pruriens*) ถั่วขอ (*M. pruriens var. utilis*)พวงมรกต (*M. thailandica*)และพวงโกเมน (*M. warburgii*) ที่ใช้เอทานอล (ethanol) และ เฮกเซน (hexane) เป็นตัวทำละลาย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.1สารองค์ประกอบจากสารสกัดด้วยเอทานอล (ethanol) และเฮกเซน (hexane)จากใบพืชหมามุ่ยน้อย (*Mucuna bracteata*)หมามุ่ย(*M. pruriens* var. *pruriens*)ถั่วขอ (*M. pruriens* var. *utilis*)พวงมรกต (M. *thailandica*)และพวงโกเมน(*M. warburgii*)

Compound	Formula	Relative content (%)									
		หมามุ่ยน้อย *M. bracteata*		หมามุ่ย *M. pruriens* var. *pruriens*		ถั่วขอ *M. pruriens* var. *utilis*		พวงมรกต *M. thailandica*		พวงโกเมน *M. warburgii*	
		Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol
Mome inositol	$C_7H_{14}O_6$	-	-	-	-	-	-	-	53.04	-	-
Phytol acetate	$C_{22}H_{42}O_2$	1.12	16.96	2.62	10.66	3.77	20.41	3.57	-	1.76	22.03
Hexadecanal	$C_{16}H_{32}O$	16.86	-	20.89	-	15.46	-	1.46	-	-	-
n-Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	2.85	9.89	5.36	17.25	1.00	8.46	6.14	3.85	0.70	1.20
1-Hexacosanol	$C_{26}H_{54}O$	15.63	9.93	11.23	5.97	11.69	4.23	-	-	-	2.01
Squalene	$C_{30}H_{50}$	1.62	1.94	3.14	2.56	7.84	8.25	15.25	6.83	6.69	4.36
Phytol	$C_{20}H_{40}O$	6.67	8.69	3.21	5.46	14.71	9.27	5.73	5.75	1.89	3.89
Hentriacontane	$C_{31}H_{64}$	2.14	-	2.56	-	1.94	-	4.29	-	13.51	-
Nonacosane	$C_{29}H_{60}$	3.50	3.39	5.37	2.55	3.52	2.61	2.80	-	12.21	7.25
dl-α -Tocopherol	$C_{31}H_{52}O_3$	1.51	1.98	3.03	2.34	7.27	10.19	1.14	0.63	10.50	10.60
Simiarenol	$C_{30}H_{50}O$	5.01	5.07	9.89	5.72	3.96	3.82	-	-	-	-
3,7,11,15-Tetramethyl-2-	$C_{20}H_{40}O$	-	7.99	0.62	4.71	1.48	8.55	0.94	2.10	-	8.96

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Compound	Formula	Relative content (%)									
		หมามุ่ยน้อย *M. bracteata*		หมามุ่ย *M. pruriens* var. *pruriens*		ถั่วขอ *M. pruriens* var. *utilis*		พวงมรกต *M. thailandica*		พวงโกเมน *M. warburgii*	
		Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol
hexadecen-1-ol											
Stigmasterol	$C_{29}H_{48}O$	5.42	8.86	6.96	6.59	3.84	5.15	7.28	3.92	6.17	5.63
1-Dotriacontanol	$C_{32}H_{66}O$	8.20	-	4.49	-	3.27	-	-	-	-	-
Octadecanal	$C_{18}H_{36}O$	8.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lupenone	$C_{30}H_{48}O$	2.00	2.06	-	-	-	-	7.72	4.63	-	-
α-Amyrin	$C_{30}H_{50}O$	-	-	7.24	3.43	-	-	-	-	-	-
Linoleic acid, ethyl ester	$C_{20}H_{36}O2$	-	-	1.94	7.17	-	-	-	-	-	-
Oleic Acid	$C_{18}H_{34}O_2$	-	4.52	-	7.14	-	3.06	0.87	1.72	-	1.12
γ -Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	-	-	-	-	-	-	2.67	2.90	6.52	6.91
Lupeol	$C_{30}H_{50}O$	0.68	2.33	-	-	-	-	6.53	4.49	3.06	2.25
Glycerol 1,3-dipalmitate	$C_{35}H_{68}O_5$	-	1.07	0.38	0.85	3.73	1.26	5.88	0.44	6.46	1.85
Lanost-7-en-3-one	$C_{30}H_{50}O$	-	-	-	-	-	-	-	-	5.89	5.60
2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	$C_{18}H_{36}$	1.24	4.00	-	-	1.33	-	1.57	4.83	1.26	3.05
cis,cis,cis-7,10,13-	$C_{16}H_{26}O$	-	-	-	4.12	-	1.26	-	-	-	-

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Compound	Formula	Relative content (%)									
		หมามุ่ยน้อย *M. bracteata*		หมามุ่ย *M. pruriens* var. *pruriens*		ถั่วขอ *M. pruriens* var. *utilis*		พวงมรกต *M. thailandica*		พวงโกเมน *M. warburgii*	
		Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol
Hexadecatrienal											
9,12-Octadecadienal	$C_{18}H_{32}O$	-	-	-	0.77	1.18	-	3.92	0.49	2.62	0.59
9,12,15-Octadecatrienal	$C_{18}H_{30}O$	-	-	-	1.67	3.29	1.27	3.36	0.63	3.62	1.26
9-Octadecenal	$C_{18}H_{34}O$	-	-	-	3.51	-	1.23	-	-	-	-
Heptacosane	$C_{27}H_{56}$	3.17	1.29	3.36	-	2.49	-	3.05	-	2.74	0.89
Pentacosane	$C_{25}H_{52}$	2.17	0.76	1.44	-	1.20	-	3.23	-	3.17	1.73
1-Tetracosanol	$C_{24}H_{50}O$	3.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexacosane	$C_{26}H_{54}$	2.00	0.69	1.04	0.50	0.75	-	2.80	-	2.67	-
9,19-Cycloergost-24(28)-en-3-ol,4,14-dimethyl-, acetate,	$C_{32}H_{52}O_2$	-	-	-	-	2.53	2.78	-	-	-	-
Octacosane	$C_{28}H_{58}$	1.71	0.71	0.91	-	0.66	-	2.30	-	2.05	-
Glycerol β-palmitate	$C_{19}H_{38}O_4$	-	0.60	-	0.93	-	2.26	-	-	-	1.63
Vitamin E	$C_{29}H_{50}O_2$	-	2.22	-	1.76	-	1.43	1.89	0.90	2.08	1.48
9-Octadecenamide	$C_{18}H_{35}N$	0.42	0.83	-	-	-	-	0.80	-	2.08	1.40

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Compound	Formula	Relative content (%)									
		หมามุ่ยน้อย *M. bracteata*		หมามุ่ย *M. pruriens* var. *pruriens*		ถั่วขอ *M. pruriens* var. *utilis*		พวงมรกต *M. thailandica*		พวงโกเมน *M. warburgii*	
		Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol
	O										
Hexadecanoic acid, ethyl ester	$C_{18}H_{36}O_2$	-	0.55	0.70	1.86	-	-	-	-	-	0.27
Olean-12-ene	$C_{30}H_50$	-	-	-	-	1.77	1.46	-	-	-	-
β -Tocopherol	$C_{28}H_{48}O_2$	-	-	-	-	0.88	1.09	1.16	1.00	1.46	1.76
Linolenic acid, methyl ester	$C_{19}H_{32}O_2$	-	-	1.67	-	-	-	-	-	-	-
Dotriacontane	$C_{32}H_{66}$	0.88	-	-	-	-	-	1.56	-	-	-
γ -Tocopherol	$C_{29}H_{50}O_2$	0.31	0.77	-	-	0.46	0.79	0.35	0.31	0.95	1.50
Triacontane	$C_{30}H_{62}$	1.21	-	0.71	-	-	-	-	-	-	-
Octadecanoic acid, ethyl ester	$C_{20}H_{40}O_2$	-	-	-	0.97	-	-	-	-	-	-
Octadecanoic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	0.37	0.86	-	-	-	0.87	0.93	-	-	-
Tetracosane	$C_{24}H_{50}$	0.77	-	-	-	-	-	0.85	-	-	-
α -Tocopherolquinone	$C_{29}H_{50}O_3$	0.81	-	-	-	-	-	-	-	-	-

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Compound	Formula	Relative content (%)									
		หมามุ่ยน้อย *M. bracteata*		หมามุ่ย *M. pruriens* var. *pruriens*		ถั่วขอ *M. pruriens* var. *utilis*		พวงมรกต *M. thailandica*		พวงโกเมน *M. warburgii*	
		Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol	Hexane	Ethanol
Tetradecanoic acid	$C_{14}H_{28}O2$	-	0.68	-	0.73	-	-	-	-	-	-
Linoleic acid, methyl ester	$C_{19}H_{34}O_2$	-	-	0.66	-	-	-	-	-	-	-
δ-Tocopherol	$C_{27}H_{46}O_2$	-	0.46	-	-	-	0.58	-	-	-	-
Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	$C_{17}H_{34}O_2$	-	-	0.53	-	-	-	-	-	-	-
2-Methoxy-5-vinylphenol	$C_9H_{10}O_2$	-	-	-	0.51	-	-	-	-	-	-
1,2-Benzenedicarboxylic acid	$C_8H_6O_4$	0.48	0.49	-	-	-	-	-	-	-	-
Loliolide	$C_{11}H_{16}O_3$	-	0.44	-	-	-	-	-	-	-	-
Heptadecanoic acid	$C_{17}H_{34}O_2$	-	-	-	0.31	-	-	-	-	-	-
Unknown	-	-	-	-	-	-	-	-	1.23	-	0.84

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

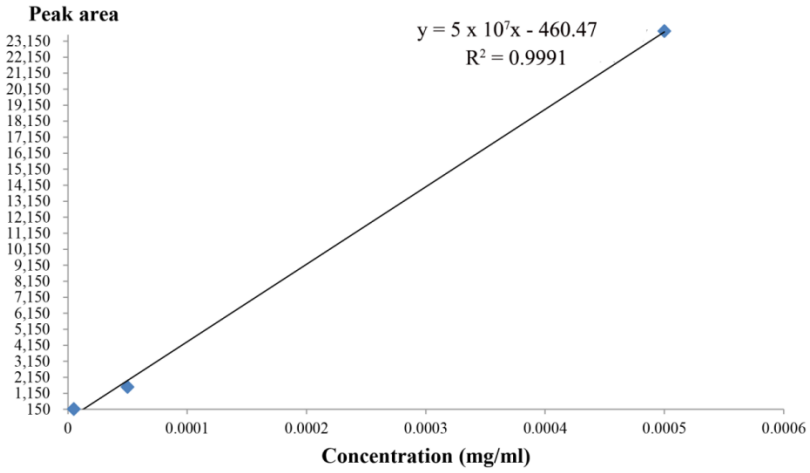
การศึกษาสาร L-dopa จากใบของถั่วขอ และหมามุ่ยต้องเริ่มด้วยการฉีดสารละลายมาตรฐานสารแอล-โดปาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) พบว่าได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient values:R^2)มีค่าเท่ากับ0.9991 ดังแสดงในภาพที่4.2และได้สมการเส้นตรง y = 5x107x-460.47 เมื่อสมการมาตรฐาน (calibration equation) คือ y= mx+c, ซึ่ง y คือพื้นที่ใต้กราฟ m คือความลาดเอียง และ c คืออินเทอเซปท์ (intercept) ของกราฟเส้นตรงแล้วคำนวณหาปริมาณสารด้วยการแทนค่าในสมการ y = 5x107x-460.47 นี้โดยใช้พื้นที่ใต้กราฟที่ได้มาแทนค่าในสมการ

ต่อมาจึงได้ผลจากการฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการศึกษาและได้กราฟของสารละลายควบคุม 10% DMSO สารละลายมาตรฐานสารแอล-โดปาและสารสกัดพืชตัวอย่างดังภาพที่ 4.3 และ 4.4 โดยแสดงเป็นเส้นกราฟสีต่างๆได้แก่ เส้นกราฟสีดำ คือ สารสกัดจากพืชตัวอย่าง สีแดงคือ สาร DMSO 10%และสีน้ำเงินคือ สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.0005 mg/ml

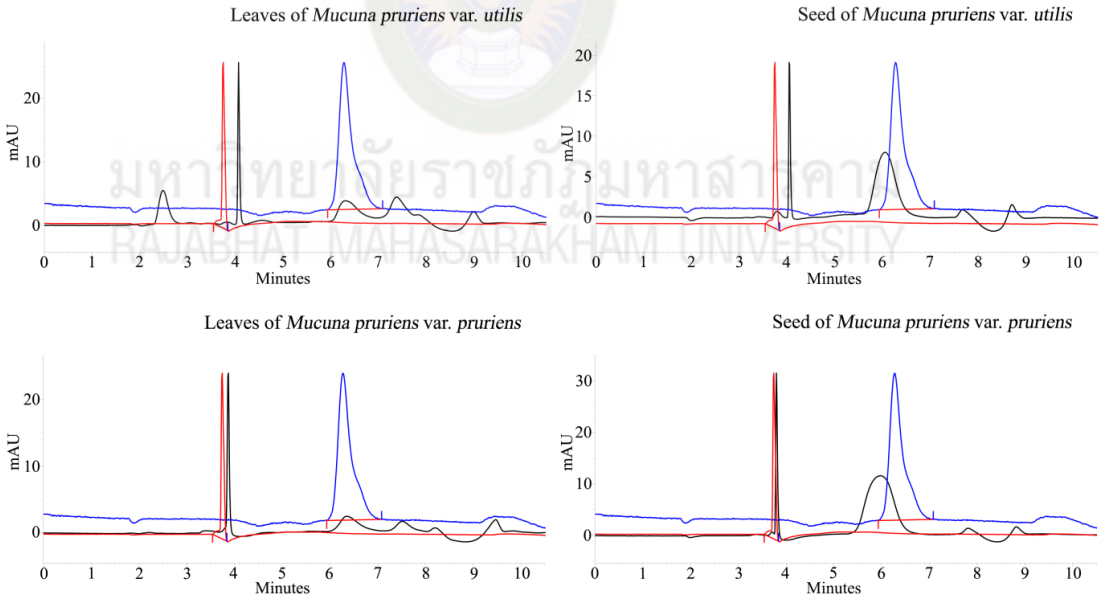
นำพื้นที่ใต้กราฟจากภาพที่ 4.4ของสารสกัดจากพืชตัวอย่างมาคำนวณโดยแทนค่าในสมการ y = 5x107x-460.47 พบปริมาณสารในพืชตัวอย่างดังต่อไปนี้คือ ใบถั่วขอ เมล็ดถั่วขอ ใบหมามุ่ย เมล็ด หมามุ่ย มีปริมาณสารแอล-โดปา 4.53,9.47, 2.68, และ 15.54 มก. จากใบพืช 100 ก. ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นได้ 0.1450.3600.040.202มก./มล. ตามลำดับดังตารางที่ 4.2

การทดสอบความเป็นพิษระดับเซลล์ของสารสกัดด้วยเฮกเซน(hexane) ของเมล็ดและใบของถั่วขอหมามุ่ยและด้วยวิธี MTT พบว่าสารสกัดมีความเข้มข้นสูงสุด 20 มก./มล. เมล็ดถั่วขอ, 23 มก./มล.เมล็ดหมามุ่ย, 21 มก./มล. ใบหมามุ่ย, 0.07 มก./มล. ใบถั่วขอ จากนั้นนำมาเจือจาง 10 เท่าเป็น 5ความเข้มข้น โดยความเข้มข้นเริ่มแรกจนถึงสุดท้ายให้มีสาร DMSO เป็น 10% ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ได้ความเข้มข้นของสารสกัด0.1x, 0.01x, 0.001x,0.0001% และ 0.00001x ตามลำดับ ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดพืชทุกชนิดไม่มีค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการตายหรือการรอดชีวิตของเซลล์ 50%)และมีค่าการรอดชีวิตสูงตั้งแต่ 57.63±0.26-73.92±0.33% ในใบถั่วขอ ถึง 75.99±0.14-83.87±0.22 ในเมล็ดถั่วขอ และ 76.41±0.14-81.73±0.24 ดังผลในตารางที่ 4.3ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่มีค่า IC_{50}และมีค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต (% cell viability)สูงจากการสร้างกราฟด้วยค่าความเข้มข้นของสาร (concentration: mg/ml) ดังภาพที่ 4.5

การทดสอบความเป็นพิษระดับโมเลกุลของพืช3 ตัวอย่างด้วย come assay พบว่าสารสกัดเฮกเซนเมล็ดถั่วขอเมล็ดหมามุ่ย และ ใบถั่วขอมีพิษต่อสารพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ(P< 0.05) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%แสดงให้เห็นด้วยมีค่าเฉลี่ยolive tail moment สูงคือเท่ากับ 0.0070±0.0315 ในใบถั่วขอ ถึง 0.60±0.43 ในเมล็ดหมามุ่ย ส่วนใบหมามุ่ย ไม่มีพิษต่อสารพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญมีค่าเท่ากับ 0.2136 หรือ (P> 0.05) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%คือมีค่า olive tail moment เท่ากับ 0.18±0.17ดังตารางที่ 4.4และภาพที่ 4.6

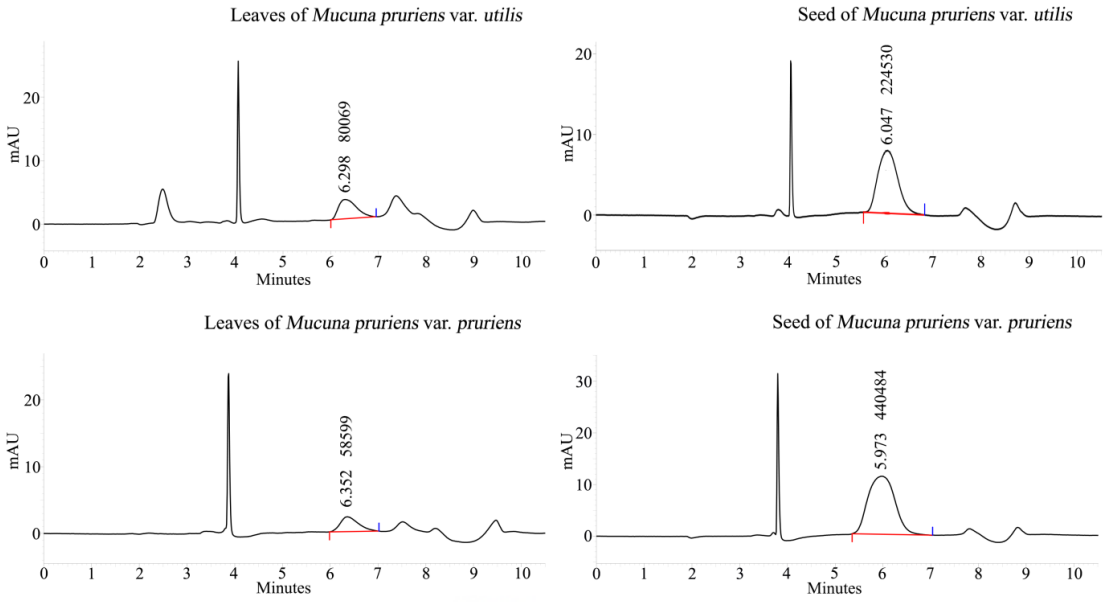


ภาพที่ 4.2 กราฟเส้นตรงสร้างจากความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟ แสดงสมการของกราฟเส้นตรงและ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient values:R^2) ของสารละลายมาตรฐาน L-dopa



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.3 โครมาโตแกรมของสารต่างๆที่นำมาศึกษาเพื่อหาสาร L-dopa ในสารสกัดจากใบและเมล็ดถั่วขอ (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) ใบ และเมล็ดหมามุ่ย (*M. pruriens* var. *pruriens*)ด้วยเครื่อง HPLC โดยเส้นกราฟสีดำ คือ สารสกัดจากพืชตัวอย่าง สีแดง คือ สาร DMSO 10%และสีน้ำเงิน คือ สาร standard L-dopa ความเข้มข้น 0.0005 mg/ml



ภาพที่ 4.4 โครมาโตแกรมแสดงพื้นที่ใต้กราฟของสาร L-dopa ในสารสกัดจากใบและเมล็ดถั่วขอ (*Mucuna pruriens* var. *utilis*) ใบและเมล็ดหมามุ่ย (*M. pruriens* var. *pruriens*)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณ(กรัม) และความเข้มข้น (มก./มล.) ของสาร L-dopaจากปริมาณพืชที่ใช้ในการสกัด และปริมาตรที่กรองได้หลังจากสกัด รวมทั้งแสดงพื้นที่ใต้กราฟเมื่อศึกษาด้วย HPLC

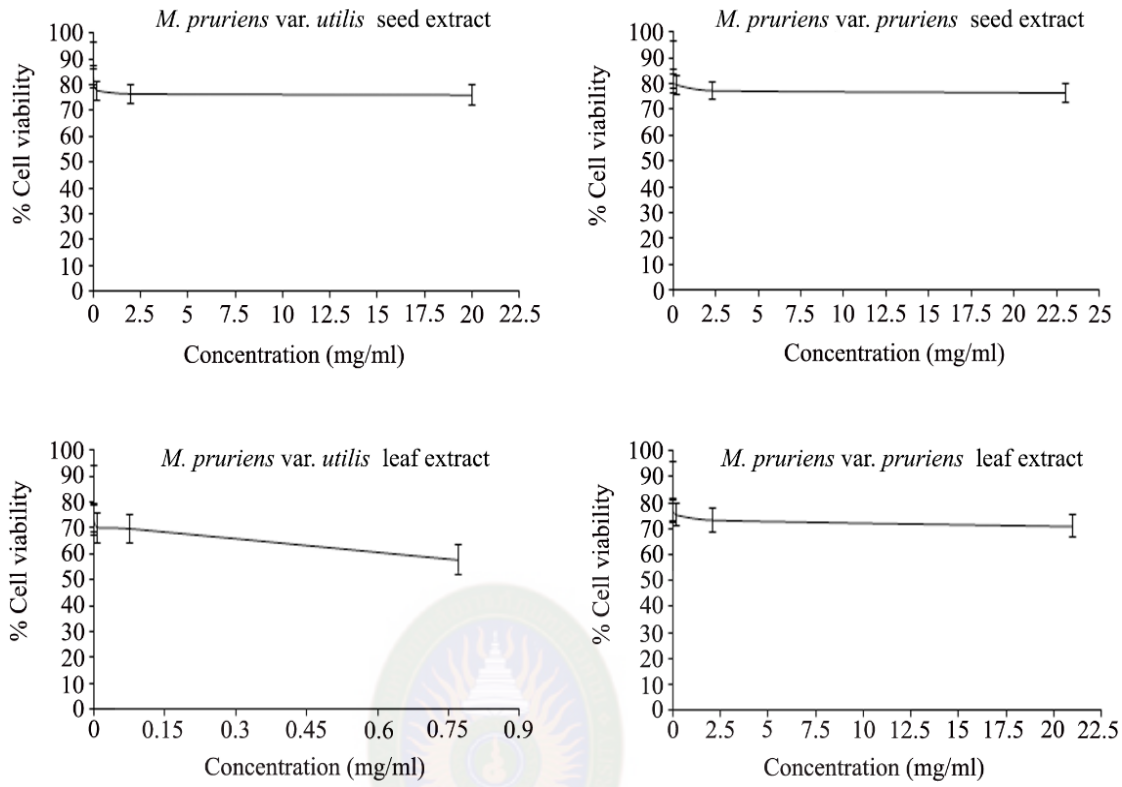
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

พืช	นน. พืช (กรัม)	ปริมาตรที่กรองได้ (มล.)	พื้นที่ใต้กราฟ	ความเข้มข้น (มก./มล.)	สารL-dopa (มก.) จาก 100 กรัมพืช
ใบถั่วขอ (*Mucuna pruriens* var. *utilis*)	32	90	80069	0.145	4.53
เมล็ดถั่วขอ (*M. pruriens* var. *utilis*)	38	80	224530	0.360	9.47
ใบหมามุ่ย (*M. pruriens* var. *pruriens*)	15	34	58599	0.04	2.68
เมล็ดหมามุ่ย (*M. pruriens* var. *pruriens*)	13	23	440484	0.202	15.54

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารสกัดเฮกเซนเมล็ดถั่วขอเมล็ดหมามุ่ย ใบหมามุ่ย และใบถั่วขอ ที่มีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตสูง

พืช	สารสกัด	ความเข้มข้นแรกของสารสกัด (มก./มล.)	เปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิต
เมล็ดถั่วขอ (*Mucunapruriens* var. *utilis*)	เฮกเซน	2.0	75.99±0.14 - 83.87±0.22
เมล็ดหมามุ่ย (*M. pruriens* var. *pruriens*)	เฮกเซน	2.3	76.41±0.14 - 81.73±0.24
ใบหมามุ่ย (*M. pruriens* var.*pruriens*)	เฮกเซน	2.1	70.81±0.18 - 77.49±0.21
ใบถั่วขอ (*M. pruriens* var. *utilis*)	เฮกเซน	0.077	57.63±0.26 - 73.92±0.33

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



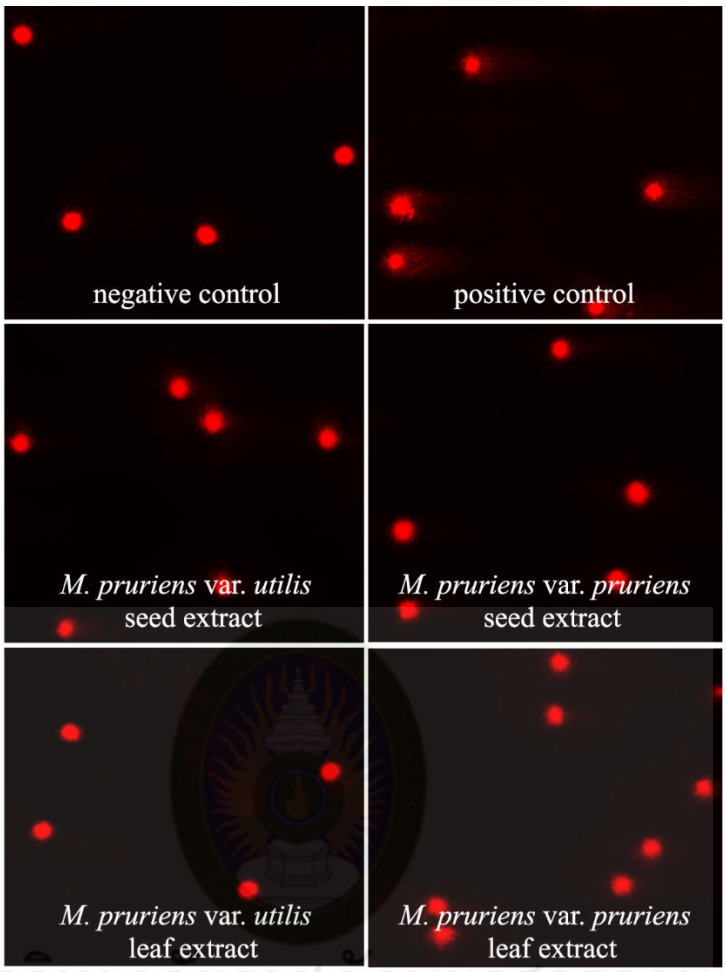
ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษระดับเซลล์ด้วย MTT assay ของสารสกัดเฮกเซน
เมล็ดถั่วขอ (*M. pruriens* var. *utilis*), เมล็ดหมามุ่ย (*M. pruriens* var. *pruriens*), ใบหมามุ่ย (*M. pruriens* var. *pruriens*)และใบถั่วขอ (*M. pruriens* var. *utilis*) ไม่มีค่า IC_{50}และมีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตสูง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย Olive tail moment และข้อมูลทางสถิติความเป็นพิษระดับโมเลกุลของสารสกัดเฮกเซนเมล็ดถั่วขอ เมล็ดหมามุ่ย ใบหมามุ่ย และใบถั่วขอ

พืช	สารสกัด	ความเข้มข้นสารสกัดแรก (มก./มล.)	ตัวควบคุมลบ (negative control)	Olive tail moment	ค่าความเชื่อมั่น (*p* value)
เมล็ดถั่วขอ *Mucuna pruriens* var. *utilis*	เฮกเซน	2.0	0.16±0.15	0.32±0.27	<0.05
เมล็ดหมามุ่ย *M. pruriens* var. *pruriens*	เฮกเซน	2.3	0.16±0.15	0.60±0.43	<0.05
ใบหมามุ่ย *M. pruriens* var. *pruriens*	เฮกเซน	2.1	0.16±0.15	0.18±0.17	>0.05
ใบถั่วขอ *M. pruriens* var. *utilis*	เฮกเซน	0.077	0.0013±0.0002	0.0070±0.0315	<0.05

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับโมเลกุลของแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับโมเลกุลกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cells (PBMCs, 200x) ของสารสกัดเมล็ดถั่วขอ (*M. pruriens* var. *utilis* seed extract) สารสกัดเมล็ดหมามุ่ย (*M. pruriens* var. *pruriens* seed extract) สารสกัดใบหมามุ่ย (*M. pruriens* var. *pruriens* leaf extract) สารสกัดใบถั่วขอ (*M. pruriens* var. *utilis* extract) พร้อมด้วย negative controlและ positive control

การทดสอบพิษระดับเซลล์ของหมามุ่ยน้อย พวงมรกต และพวงโกเมน พบว่าความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดเฮกเซนและเอทานอลคือ 51.40 และ 36.50 มก./มล. ในพวงมรกต 36.50 และ67.50 มก./มล. ในพวงโกเมน 47.50 และ 29.20 มก./มล. ในหมามุ่ยน้อย จากนั้นนำมาเจือจาง 10 เท่าให้ได้ 5 ความเข้มขึ้นของสารสกัดคือ 0.1x, 0.01x, 0.001x, 0.0001x, 0.00001x โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มแรกที่ใช้เป็น 0.1x เพื่อให้มีความเข้มข้นของ DMSO เป็น 10%ที่ไม่มีพิษต่อเซลล์ ผลการทดสอบพบว่าพืชจากทุกสารสกัดไม่มีค่า IC_{50}และมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์สูง คือตั้งแต่

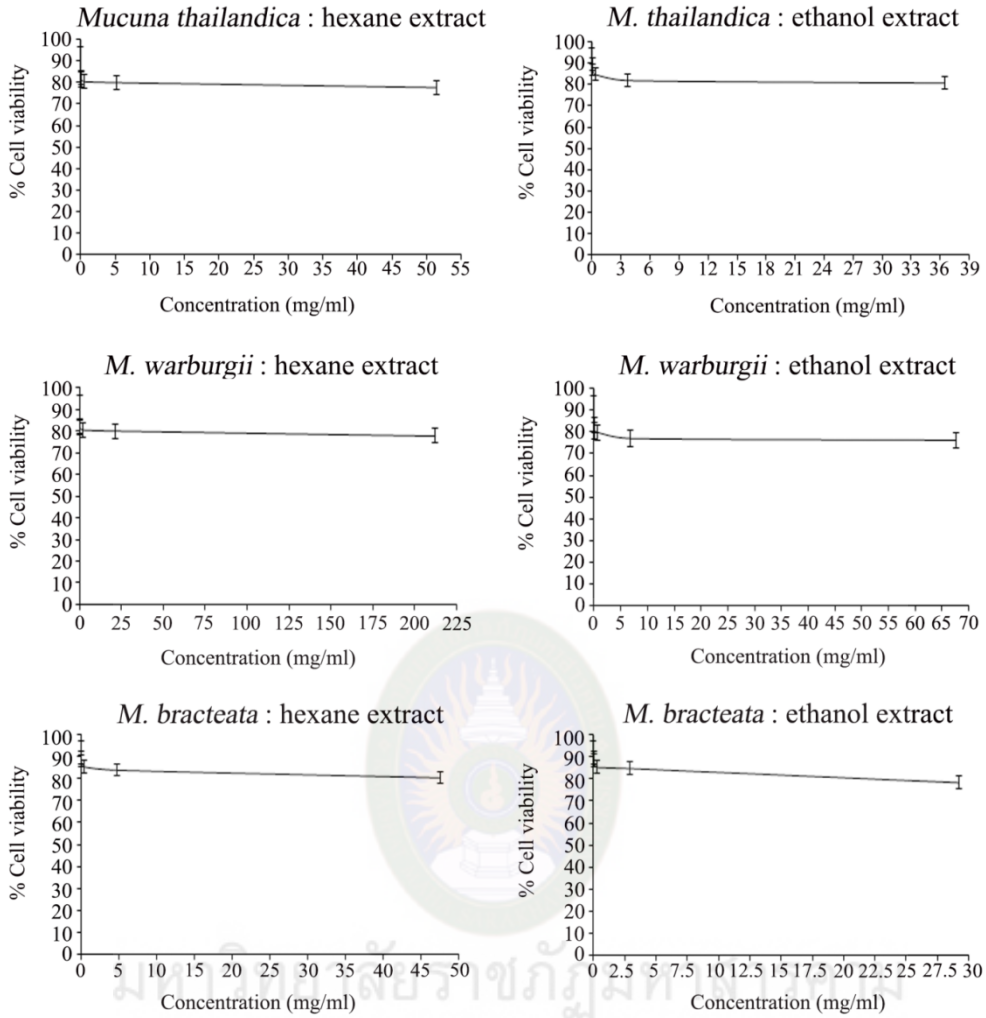
75.55±0.25 - 83.27±0.27 ในสารสกัดเฮกเซนพวงโกเมน ถึง 80.75±0.26 - 89.53±0.27 ในสารสกัดเอทานอลพวงมรกต ดังตารางที่ 4.5 และกราฟภาพที่ 4.7

ทดสอบหาความเป็นพิษในระดับโมเลกุลของสารสกัดใบพืชจากตัวทำละลายเฮกเซนและเอทานอล(เอทานอล) ด้วยวิธี comet assay โดยใช้ความเข้มข้นที่เจือจางให้สาร DMSO เป็น 10%เมื่อนำสารต่างๆ มาทดสอบ พบว่า สารสกัดเอทานอลของพวงหยก สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของพวงโกเมน สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของหมาหมามุ่ยน้อยมีพิษต่อสารพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ($P< 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%ส่วนสารสกัดเฮกเซนของพวงหยก ไม่มีพิษต่อสารพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญมีค่าเท่ากับ 0.1811 หรือ ($P> 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังตารางที่ 4.6และภาพที่ 4.8

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารสกัดใบพืชจากตัวทำละลายเฮกเซนและเอทานอลพวงมรกต (*Mucuna thailandica*) พวงโกเมน (*M. warburgii*) และหมามุ่ยน้อย (*M. bracteata*)ไม่มีค่า IC_{50}และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง

พืช	สารสกัด	ความเข้มข้นแรกที่ใช้ (มี 10% DMSO)(มก./มล.)	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต
พวงมรกต	เฮกเซน	51.40	77.70±0.24 - 82.39±0.24
Mucuna thailandica	เอทานอล	36.50	80.75±0.26 - 89.53±0.27
พวงโกเมน	เฮกเซน	21.25	75.55±0.25 - 83.27±0.27
M. warburgii	เอทานอล	67.70	76.23±0.24 - 83.23±0.25
หมามุ่ยน้อย	เฮกเซน	47.50	80.40±0.20 - 89.56±0.21
M. bracteata	เอทานอล	29.20	78.34±0.19 - 89.52±0.27

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



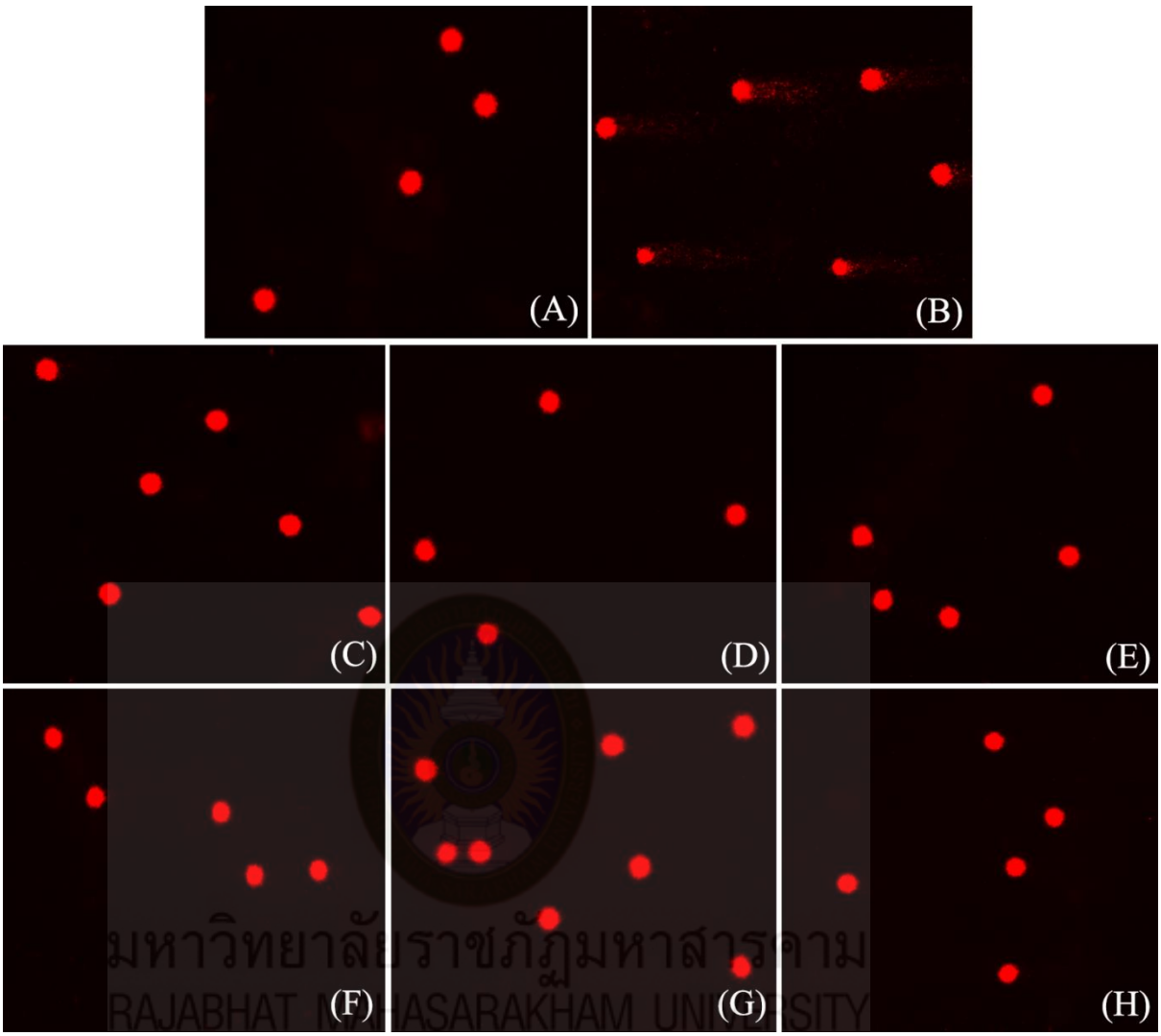
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.7 กราฟแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารสกัดใบพืชจากตัวทำละลาย
เฮกเซนและเอทานอลของพวงหยก (*Mucuna thailandica*) พวงโกเมน (*M. warburgii*) และหมามุ่ยน้อย(*M. bracteata*)ที่ไม่มีค่า IC_{50}

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ย Olive tail moment และข้อมูลทางสถิติความเป็นพิษระดับโมเลกุลของสารสกัดใบพวงมรกต (*Mucuna thailandica*) พวงโกเมน (*M. warburgii*) และหมามุ่ยน้อย (*M. bracteata*)จากตัวทำละลายเฮกเซน และเอทานอล

พืช	สารสกัด	ความเข้มข้นของสารทดสอบ (มก./มล.)	ตัวควบคุมลบ (negative control)	Olive tail moment	ค่าความเชื่อมั่น (*p* value)
พวงมรกต *Mucuna thailandica*	เฮกเซน	51.40	0.0012±0.0009	0.0014±0.0013	0.1811
	เอทานอล	36.50	0.0012±0.0009	0.0185±0.0179	<0.0001
พวงโกเมน *M. warburgii*	เฮกเซน	21.25	0.0012±0.0009	0.0012±0.0003	0.0196
	เอทานอล	67.70	0.0012±0.0009	0.0271±0.0268	<0.0001
หมามุ่ยน้อย *M. bracteata*	เฮกเซน	47.50	0.0003±0.0002	0.0010±0.0003	<0.0001
	เอทานอล	29.20	0.0003±0.0002	0.1693±0.1048	<0.0001

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 4.8 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับโมเลกุลกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cells (PBMCs, 200x) ของสารสกัดใบพืช สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของพวงหยก (*Mucuna thailandica*,C และ D) สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของพวงโกเมน (*M. warburgii*,Eและ F) สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของหมามุ่ยน้อย(*M. bracteata*, Gและ H)พร้อมด้วยnegative control(A), และ positive control(B)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย และ อภิปรายผล

สารสำคัญจากการศึกษาด้วยวิธี GC-MS คือ mome inositol ปริมาณสูงถึง 53.04%ในสารสกัดเอทานอลของใบพวงมรกต ซึ่งกลุ่มสาร inositol นี้เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายวิตามิน พบได้ในพืชและสัตว์ และร่างกายคนสามารถสร้างได้ สารinositolมีหลายฟอร์ม ฟอร์มที่พบได้ง่ายทั่วไปคือ myo-inositol และ D-chiro-inisitol มีประโยชน์สำหรับคนที่มีปัญหาโรคเบาหวาน เกี่ยวกับเส้นประสาทที่มีสาเหตุจากโรคเบาหวาน เบาหวานสำหรับคนที่ตั้งครรภ์ โรคซึมเศร้า อัลไซเมอร์ และโรคอื่น ๆ อีก หลายโรค

อย่างไรก็ตามในพืชกลุ่มสกุล *Mucuna* นี้มีรายงานสารสำคัญที่ใช้เพื่อเสริมสร้างสมรรถภาพทางเพศคือ l-dopa ในเมล็ดหมามุ่ย (Both et al., 2005; Suresh et al., 2012) การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ศึกษาสารนี้ด้วย จะเห็นว่าจากการศึกษาปริมาณสาร L-dopa เมล็ดหมามุ่ยมีปริมาณสูงที่สุดถึง15.54 มก. จาก100 กรัมเมล็ดพืช แต่ปัญหาของการนำมาใช้คือผลของหมามุ่ยมีขนชนิดที่คันมากเมื่อสัมผัสกับผิวหนัง ดังนั้นอาจใช้ประโยชน์ได้จากเมล็ดถั่วขอที่มีปริมาณสาร L-dopa รองลงมาคือ 9.47มก. จาก100 กรัมเมล็ดพืช ส่วนใบนั้นมีปริมาณต่ำมาก ดังตารางที่ 2

ก่อนนำพืชไปใช้ในคนควรมีการทดสอบในระดับ preclinical trial ที่ใช้ได้แทนสัตว์ทดลอง ซึ่งมีอยู่หลายวิธีที่เป็นที่ยอมรับ ได้แก่ epidemiology, computer-based methods models, *in vitro* and human cell and tissue cultures และอีกหลายๆวิธีดังที่ Rollin, 2003; Doke and Dhawale, 2015; Physicians Committee for Responsible Medicine, 2013ได้กล่าวไว้ และวิธีที่ทีมวิจัยเลือกมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ *in vitro* and human cell and tissue culturesจากการทดสอบความเป็นพิษจากสารสกัดในระดับเซลล์ของทั้งเมล็ดและใบของพืชทั้ง 2 ชนิดคือหมามุ่ยและถั่วขอ โดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวของคนพบว่าสารสกัดเฮกเซนของเมล็ดและใบถั่วขอและเมล็ดและใบหมามุ่ยไม่มีพิษต่อเซลล์เพราะไม่พบค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวของคนตาย 50% แต่ในการทดสอบความเป็นพิษระดับโมเลกุลพบว่าสารสกัดเฮกเซนเมล็ดถั่วขอ เมล็ดหมามุ่ย และใบถั่วขอมีพิษต่อดีเอ็นเออย่างมีนัยสำคัญในความเข้มข้น 2.0, 2.3 และ 0.77 มก./มล. ส่วนใบหมามุ่ยไม่มีพิษต่อดีเอ็นเอในความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 2.1 มก./มล. ดังนั้นในการนำไปใช้ประโยชน์ในส่วนของเมล็ดพืชถั่วขอและหมามุ่ยต้องใช้ในความเข้มข้นต่ำกว่า 2.0 และ 2.3 มก./มล. ส่วนใบของถั่วขอนั้นแม้ความเข้มข้นต่ำเพียง 0.77 มก./มล. ก็ยังมีพิษต่อดีเอ็นเอ จึงไม่ควรนำมาใช้ และในกรณีนี้การสกัดพืชทั้ง 4

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตัวอย่างใช้เฉพาะตัวทำละลายเฮกเซนอย่างเดียวเพราะมุ่งไปที่การศึกษาปริมาณสาร l-dopa ที่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วคือเฮกเซน

ต่อมาได้ทำการทดสอบพิษทั้งระดับเซลล์และดีเอ็นเอในสารสกัดใบของพืชสกุล *Mucuna* อีก 3 ชนิดได้แก่ พวงมรกต พวงโกเมน และหมามุ่ยน้อยโดยใช้ตัวทำละลายทั้งชนิดมีขั้วคือเอทานอลและตัวทำละลายไม่มีขั้วคือเฮกเซน พบว่าในการทดสอบพิษระดับเซลล์ของสารสกัดทุกชนิดพืชไม่มีพิษต่อเซลล์ คือไม่พบค่า IC_{50} ส่วนการทดสอบพิษระดับดีเอ็นเอพบว่าสารสกัดเอทานอลพวงมรกต สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของพวงโกเมนและหมามุ่ยน้อยมีพิษต่อดีเอ็นเออย่างมีนัยสำคัญด้วยความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบคือ 36.50 มก./มล.;21.25 และ 67.70 มก./มล.; และ 47.50 และ 29.20 มก./มล. ส่วนสารสกัดเฮกเซนพวงมรกตไม่มีพิษต่อดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้น 51.40 มก./มล.

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

ควรระวังเรื่องความเข้มข้น หรือปริมาณที่ใช้ในแต่ละครั้ง

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรม

เต็ม สมิตินันท์. 2557. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม). ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้.

Both, S., Everaerd, W., Laan, E. and Gooren, L. 2005. Effect of a single dose of levodopa on sexual response in men and women. Neuropsychopharmacology. 30: 173-183.

Doke, S.K. and Dhawale, S.C. 2015. Alternatives to animal testing: A review. Saudi Pharmaceutical Journal. 23: 223-229.

Ingle, P.K. 2003. L-DOPA bearing plants. Natural Product Radiance 2(3): 126-133.

Katzenschlager, R., Evans, A., Manson, A., Patsalos, P.N., Ratnaraj, N., Watt, H., Timmermann, L., Giessen, R.V., and Lees, A.J. 2004. *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry75: 1672–1677.

Patil, S.A., Apine, O.A., Surwase, S.N. and Jadhav, J.P. 2013. Biological sources of L-DOPA: an alternative approach. Advances in Pakinson's Disease 2(3): 81-87.

Physicians Committee for Responsible Medicine. 2013. Wisconsin, Washington DC. http://www.pcrm.org/sites/default/files/pdfs/research/research/Problems-Associated-with-Animal-Experimentation.pdf (10 November 2016).

Rollin, B.E. 2003. Toxicology and new social ethics for animals. Toxicologic Pathology. 31: 128-131.

Soares, A.R., Marchiosi, R. and Siqueira-Soares, R. de C. 2014. The role of L-DOPA in plants. Plant Signalling & Behavior 9: e28275-1-e28275-7.

Suresh, S. and Prakash, S.2012. Sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rat. The Journal of Sexual Medicine 9(12): 3066-3078.

Wilmot-Dear, C.M. 2008. *Mucuna* Adans (Leguminosae) in Thailand. Thai Forest Bulletin 36: 114-139.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. (ชื่อ - สกุล ไทย) ผศ.ดร.พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์
   (ชื่อ – สกุล อังกฤษ) Assistant Professor Dr. Pornnarong Siripiyasing
2. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
3. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับการศึกษา	วุฒิ	สาขา	ชื่อสถาบันการศึกษา
2558	ปริญญาเอก	ปร.ด.	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2543	ปริญญาโท	วท.ม.	พันธุศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2539	ปริญญาตรี	วท.บ.	เทคโนโลยีชีวภาพ	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล คณะเกษตรศาสตร์ บางพระ ชลบุรี

4. สถานที่ทำงาน

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000
โทรศัพท์: 043-742620 โทรสาร: 043-742620
e-mail: Siripiyasing@thaimail.com
โทรศัพท์มือถือ: 081-6871124

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ชื่อเรื่อง : การวิเคราะห์พันธุกรรม สารเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ ความเป็นพิษในระดับ
เซลล์และโมเลกุลของพืชสกุล *Mucuna*

ผู้วิจัย : พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และคณะ
หน่วยงานคณะ : มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ปีที่ได้รับทุน : 2561
ปีที่เสร็จแล้ว : 2562

บทคัดย่อ

พืชสกุล *Mucuna*หลายชนิดใช้ประโยชน์มาแต่สมัยโบราณ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงได้เก็บพืชสกุลนี้จากหลายจังหวัด ตรวจสอบชนิดได้ทั้งหมด 4 ชนิด 2 สายพันธุ์ได้แก่หมามุ่ย 2 สายพันธุ์คือ *M. pruriens* var. *pruriens*และถั่วขอ *M. pruriens* var. *utilis*พวงหยก (*M. thailandica*) พวงโกเมน (*M. warburgii*) และหมามุ่ยน้อย (*M. bracteata*) นำมาศึกษาสารเคมีด้วยวิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) หาปริมาณสารสารแอล-โดปา(L-dopa)ด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) ทดสอบพิษระดับเซลล์และดีเอ็นเอด้วยวิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction (MTT) และ comet assaysผลการวิจัยพบว่า สารเคมีในพืชที่พบปริมาณสูงสุดคือ 53.04% mome inositolในสารสกัดเอทานอลของใบพวงมรกต ส่วนสารสารแอล-โดปานั้นพบปริมาณสูงสุด15.54 มก. จาก 100 กรัมเมล็ดหมามุ่ย รองลงมาคือ 9.47 มก. จาก100 กรัมเมล็ดถั่วขอ ในการทดสอบพิษระดับเซลล์ด้วยสารสกัดไม่มีขั้วคือเฮกเซนกับใบและเมล็ดหมามุ่ยและถั่วขอ พบว่าสารสกัดเฮกเซนของเมล็ดและใบถั่วขอและเมล็ดและใบหมามุ่ยไม่มีพิษต่อเซลล์แต่สารสกัดเฮกเซนเมล็ดถั่วขอ เมล็ดหมามุ่ย และใบถั่วขอมีพิษต่อดีเอ็นเออย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) ในความเข้มข้น 2.0, 2.3 และ 0.77 มก./มล. ส่วนใบหมามุ่ยไม่มีพิษต่อดีเอ็นเอในความเข้มข้นที่ทดสอบคือ 2.1 มก./มล.ต่อมาได้ทำการทดสอบพิษทั้งระดับเซลล์และดีเอ็นเอในสารสกัดใบของพืชสกุล *Mucuna*อีก 3 ชนิดได้แก่ พวงมรกต พวงโกเมน และหมามุ่ยน้อยโดยใช้ตัวทำละลายเอทานอลและเฮกเซน พบว่าสารสกัดทุกชนิดพืชไม่มีพิษต่อเซลล์ ส่วนสารสกัดเอทานอลพวงมรกต สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของพวงโกเมนและหมามุ่ยน้อยมีพิษต่อดีเอ็นเออย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) ด้วยความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบคือ 36.50 มก./มล.;21.25 และ 67.70 มก./มล.; และ 47.50 และ 29.20 มก./มล. ส่วนสารสกัดเฮกเซนพวงมรกตไม่มีพิษต่อดีเอ็นเอด้วยความเข้มข้น 51.40 มก./มล.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Title : Analysis of genetics, chemicals, biological activity, cytotoxicity andgenotoxicity of the genus *Mucuna*

Author : Siripiyasing et al

Organization : RajabhatMaha Sarakham University

Year 0f Grant : 2018

Research Completed : 2019

ABSTRACT

Mucuna species have been used for aged, therefore many species were collected for researching including four species and two varieties as *M. pruriens* var. *pruriens*, *M. pruriens* var. *utilis*, *M. thailandica*, *M. warburgii* and *M. bracteata*. These plants were further studied in phytochemicals by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), L-dopa quantifying by high performance liquid chromatography (HPLC), toxicity testing both in cytotoxicity and genotoxicity by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction (MTT) and comet assays. The results revealed that the major phytochemical is 53.04% mome inositol in ethanol *M. thailandica* extract. The high amount L-dopa is 15.54 and 9.47 mg in 100 g *M. pruriens* var. *pruriens*and *M. pruriens* var. *utilis* seeds. Cytotoxicity of the hexane seeds and leaves of *M. pruriens* var. *pruriens*and *M. pruriens* var. *utilis*had no IC_{50}values, but the three hexane extracts as *M. pruriens* var. *pruriens*seeds, and *M. pruriens* var. *utilis* seeds and leaves had significant DNA damage ($p< 0.05$) compared to negative control with the concentrations of 2.0 and 0.77 mg/ml, and 2.3 mg/ml while as *M. pruriens* var. *pruriens* leaves did not damage DNA with concentration of 2.1 mg/ml. Toxicity testing was worked on more three species ethanol and hexane extracts naming *M. thailandica*, *M. warburgii* and *M. bracteata*. There were not IC_{50} values of all extracts species. In depth of genotoxicity testing reported that ethanol*M. thailandica* extract, ethanol and hexane*M. warburgii* and *M. bracteata* extracts had significant ($p< 0.05$) DNA damage compared to negative control with concentrations of 36.50 mg/ml,21.25 and67.70mg/ml,and 47.50 and29.20 mg/ml. Hexane*M. thailandica* extract did not damage with concentration of 51.40 mg/ml.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามที่สนับสนุนทุนวิจัยนี้ ขอบคุณสำนักงานที่ประเมินโครงการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ที่เห็นคุณค่าและให้ทุนอุดหนุนการดำเนินงานโครงการวิจัยในครั้งนี้ ขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา ในการติดต่อประสานงานในการดำเนินการวิจัย

ขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ และ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอบคุณทีมวิจัยทุกท่าน ในความเสียสละในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

2562

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญภาพ		ฉ
บทที่ 1	**บทนำ**	**1**
	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตการวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	**แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	**3**
	กรอบแนวคิดในการวิจัย	4
บทที่ 3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	**5**
	1. ประชากรกลุ่มตัวอย่าง และการเก็บรวบรวมข้อมูล	5
	2. เตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาหาปริมาณและชนิดของสารด้วยวิธี Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS)	5
	3. เตรียมสารสกัดเพื่อศึกษาปริมาณสาร L-dopa ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	5
	4.การเตรียมสารสกัด และการทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์และดีเอ็นเอ	5
	5. การวิเคราะห์ชนิดสาร และหาปริมาณสาร	8
บทที่ 4	**ผลการวิจัย**	**10**
บทที่ 5	**สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ**	**29**
	สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล	29
	ข้อเสนอแนะในการนำผลการทดลองไปใช้	30
บรรณานุกรม		**31**

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ประวัติผู้วิจัย 32

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	สารองค์ประกอบจากสารสกัดด้วยเอทานอล (ethanol) และเฮกเซน (hexane) จากใบพืชหมามุ่ยน้อย (Mucuna bracteata) หมามุ่ย (M. pruriens var. pruriens) ถั่วขอ (M. pruriens var. utilis) พวงมรกต (M. thailandica) และพวงโกเมน (M. warburgii)	12
4.2	ปริมาณ (กรัม) และความเข้มข้น (มก./มล.) ของสาร L-dopa จากปริมาณพืชที่ใช้ในการสกัด และปริมาตรที่กรองได้หลังจากสกัด รวมทั้งแสดงพื้นที่ใต้กราฟเมื่อศึกษาด้วย HPLC	20
4.3	ผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารสกัดเฮกเซนเมล็ดถั่วขอ เมล็ดหมามุ่ย ใบหมามุ่ย และใบถั่วขอ ที่มีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตสูง	21
4.4	ค่าเฉลี่ย Olive tail moment และข้อมูลทางสถิติความเป็นพิษระดับโมเลกุลของสารสกัดเฮกเซนเมล็ดถั่วขอ เมล็ดหมามุ่ย ใบหมามุ่ย และใบถั่วขอ	23
4.5	ผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารสกัดใบพืชจากตัวทำละลายเฮกเซนและเอทานอลพวงมรกต (Mucuna thailandica) พวงโกเมน (M. warburgii) และหมามุ่ยน้อย (M. bracteata) ไม่มีค่า IC50 และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง	25
4.6	ค่าเฉลี่ย Olive tail moment และข้อมูลทางสถิติความเป็นพิษระดับโมเลกุลของสารสกัดใบพวงมรกต (Mucuna thailandica) พวงโกเมน (M. warburgii) และหมามุ่ยน้อย (M. bracteata) จากตัวทำละลายเฮกเซน และเอทานอล	27

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่		หน้า
3.1	ถาด 96 หลุมในการทดสอบความเป็นพิษระดับเซลล์	7
4.1	โครมาโทแกรมจากวิธีการ GC-MS ของสารสกัดใบหมามุ่ยน้อย (M. bracteata) หมามุ่ย (M. pruriens var. pruriens) ถั่วขอ (M. pruriens var. utilis) พวงมรกต (M. thailandica) และพวงโกเมน (M. warburgii) ที่ใช้เอทานอล (ethanol) และ เฮกเซน (hexane) เป็นตัวทำละลาย	11
4.2	กราฟเส้นตรงสร้างจากความเข้มข้นและพื้นที่ใต้กราฟ แสดงสมการของกราฟเส้นตรงและ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient values: R2) ของสารละลายมาตรฐาน L-dopa	19
4.3	โครมาโตแกรมของสารต่างๆที่นำมาศึกษาเพื่อหาสาร L-dopa ในสารสกัดจากใบและเมล็ดถั่วขอ (Mucuna pruriens var. utilis) ใบ และเมล็ดหมามุ่ย (M. pruriens var. pruriens) ด้วยเครื่อง HPLC โดยเส้นกราฟสีดำ คือ สารสกัดจากพืชตัวอย่าง สีแดง คือ สาร DMSO 10% และสีน้ำเงิน คือ สาร standard L-dopa ความเข้มข้น 0.0005 mg/ml	19
4.4	โครมาโตแกรมแสดงพื้นที่ใต้กราฟของสาร L-dopa ในสารสกัดจากใบและเมล็ดถั่วขอ (Mucuna pruriens var. utilis) ใบและเมล็ดหมามุ่ย (M. pruriens var. pruriens)	20
4.5	กราฟแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษระดับเซลล์ด้วย MTT assay ของสารสกัดเฮกเซน เมล็ดถั่วขอ (M. pruriens var. utilis), เมล็ดหมามุ่ย (M. pruriens var. pruriens), ใบหมามุ่ย (M. pruriens var. pruriens) และใบถั่วขอ (M. pruriens var. utilis) ไม่มีค่า IC50 และมีเปอร์เซ็นต์เซลล์รอดชีวิตสูง	22
4.6	ผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับโมเลกุลของแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับโมเลกุลกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cells (PBMCs, 200x) ของสารสกัดเมล็ดถั่วขอ (M. pruriens var. utilis seed extract) สารสกัดเมล็ดหมามุ่ย (M. pruriens var. pruriens seed extract) สารสกัดใบหมามุ่ย (M. pruriens var. pruriens leaf extract) สารสกัดใบถั่วขอ (M. pruriens var. utilis extract) พร้อมด้วย negative control และ positive control	24
4.7	กราฟแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารสกัดใบพืชจากตัวทำละลายเฮกเซนและเอทานอลของพวงหยก (Mucuna thailandica) พวงโกเมน	

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

(M. warburgii) และหมามุ่ยน้อย (M. bracteata) ที่ไม่มีค่า IC50 26

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.8 แสดงผลการทดสอบความเป็นพิษในระดับโมเลกุลกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cells (PBMCs, 200x) ของสารสกัดใบพืช สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของพวงหยก (Mucuna thailandica, C และ D) สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของพวงโกเมน (M. warburgii, E และ F) สารสกัดเฮกเซนและเอทานอลของหมามุ่ยน้อย (M. bracteata, G และ H) พร้อมด้วย negative control (A), และ positive control (B) 28

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การวิเคราะห์พันธุกรรม สารเคมี ฤทธิ์ทางชีวภาพ ความเป็นพิษในระดับเซลล์และโมเลกุลของพืชสกุล *Mucuna*

Analysis of genetics, chemicals, biological activity, cytotoxicity and genotoxicity of the genus *Mucuna*

พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์

อรุณรัตน์ ฉวีราช

รุ่งลาวัลย์ สุดมูล

และคณะ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2561)