

ผลการวิจัย

1. สารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ

สารสกัดสมุนไพร 6 ชนิด จากพืชใน 5 วงศ์ คือ จีวป่าดอกขาว (ลำต้น), หนามแท่ง (ลำต้น), ดากดำ (ลำต้น กิ่ง), ดากดำ (ใบ), กอกก้น (ลำต้น) และ พันชาด (ลำต้น) พบว่ามี %yield เท่ากับ 5.96-8.94 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ข้อมูลของสารสกัดสมุนไพร

Botanical name (Thai name)	วงศ์	Voucher specimen no.	ส่วนที่เก็บ	%yield
1. <i>Bombax anceps</i> Pierre var. <i>anceps</i> (จีวป่าดอกขาว)	Bombacaceae	TT-OC-SK-1074	ลำต้น	5.96
2. <i>Catunaregam tomentosa</i> (Blume ex DC.) Tirveng. (หนามแท่ง)	Rubiaceae	TT-OC-SK-1015	ลำต้น	6.88
3. <i>Diospyros castanea</i> Fletcher (ดากดำ)	Ebenaceae	TT-OC-SK-1030	ลำต้น กิ่ง	8.74
4. <i>Diospyros castanea</i> Fletcher (ดากดำ)	Ebenaceae	TT-OC-SK-1030	ใบ	7.23
5. <i>Lannea cormandelica</i> (Houtt). Merrr (กอกก้น)	Anacardiaceae	TT-OC-SK-993	ลำต้น	6.01
6. <i>Erythrophleum succirubrum</i> Gagnep. (พันชาด)	Leguminosae- Caesalpinioideae	TT-OC-SK-1082	ลำต้น	8.94

2. การทดสอบฤทธิ์กลายพันธุ์

จากการทดสอบฤทธิ์กลายพันธุ์ของสารสกัด 6 ชนิด คือ จีวป่าดอกขาว (ลำต้น), หนามแท่ง (ลำต้น), ดากดำ (ลำต้น กิ่ง), ดากดำ (ใบ), กอกก้น (ลำต้น) และ พันชาด (ลำต้น) โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *S. typhimurium* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ในสถานะที่มีและไม่มี S-9 mix พบว่า สารสกัดทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ ทั้งในสถานะที่มีและไม่มี S-9 mix (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวน revertant colonies ของ TA98 และ TA100 ในภาวะที่มีสารสกัดสมุนไพร

		-S9		+S9	
		TA98	TA100	TA98	TA100
1. สารสกัดจื๋วป่าดอกขาว (mg/plate)					
0	15	106	25	121	
1	22	110	18	96	
2.5	17	96	22	68	
5	16	81	16	76	
10	11	98	18	58	
2. สารสกัดหนามแท้ง (mg/plate)					
0	14	111	36	121	
1	27	121	17	129	
2.5	20	113	15	137	
5	20	117	21	100	
10	13	123	17	119	
3. สารสกัดลำต้นและกิ่งดอกดำ (mg/plate)					
0	22	127	38	138	
1	20	127	36	133	
2.5	21	119	38	130	
5	19	119	25	108	
10	12	137	16	102	
4. สารสกัดใบดอกดำ (mg/plate)					
0	29	117	33	135	
1	39	150	32	130	
2.5	43	118	39	125	
5	19	111	34	106	
10	18	130	31	103	
5. สารสกัดกอกกั๊ก (mg/plate)					
0	14	104	22	114	
1	14	115	9	110	
2.5	11	131	14	94	
5	13	151	11	116	
10	8	187	11	113	
6. สารสกัดพันชาด (mg/plate)					
0	17	121	24	132	
1	14	131	24	140	
2.5	20	140	30	150	
5	20	142	32	163	
10	17	138	19	126	

หมายเหตุ ค่าตัวเลขที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก triplicate

3. การทดสอบฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์

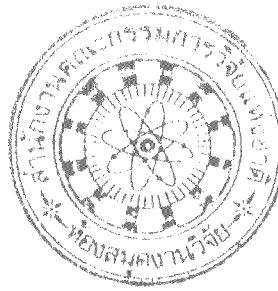
สำหรับฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของตัวอย่างสารสกัด 6 ชนิด ต่อสารมาตรฐาน mutagen 3 ชนิด คือ AF2 และ 4-NQO ในภาวะที่ไม่มี S-9 mix และ 2AA ในภาวะที่มี S-9 mix พบว่า สารสกัดพืชชนิด มีฤทธิ์ในการด้านการกลายพันธุ์ได้ดีทั้งในภาวะที่มีและไม่มี S9 mix และเป็นแบบ Dose dependent manner ดังแสดงในตารางที่ 3 และรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดพืชชนิดทั้งที่เป็น metabolic form และ form ปกติสามารถลดฤทธิ์ในการก่อกลายพันธุ์ของสารมาตรฐานที่ทดสอบได้ดี

ในภาวะที่มี S9 mix สารสกัดหนามแท่ง (ตารางที่ 3 และรูปที่ 4) สารสกัดจี่วป่าดอกขาว (ตารางที่ 3 และรูปที่ 5) สารสกัดกอกก้น (ตารางที่ 3 และรูปที่ 6) สารสกัดลำต้นและกิ่งดอกคำ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 7) และสารสกัดใบดอกคำ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 8) ซึ่งสารสำคัญในสารสกัดเหล่านี้อยู่ในรูปแบบที่ถูกเมทาโบไลซ์ สามารถลดฤทธิ์ในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของสารมาตรฐานที่มีต่อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ดีกว่าในภาวะที่ไม่มี S9 mix ซึ่งสารสกัดดังกล่าวจะอยู่ในรูปแบบปกติ และการลดฤทธิ์นี้เป็นแบบ dose dependent manner

ในภาวะที่มี S9 mix สารสกัดทุกชนิดที่ทดสอบมีฤทธิ์ในการด้านการกลายพันธุ์ได้ดีซึ่งเด่นชัดกว่าในภาวะที่ไม่มี S9 mix โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.63-3.88 mg/plate โดยสารสกัดพืชชนิดมีฤทธิ์ในการด้านการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดกอกก้น ลำต้นและกิ่งดอกคำ ใบดอกคำ จี่วป่าดอกขาวและหนามแท่ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และรูปที่ 9-14) ดังนั้น สารสกัดทุกชนิดที่ทดสอบ เมื่ออยู่ใน metabolic forms จะมีฤทธิ์ในการด้านการกลายพันธุ์ได้ดี

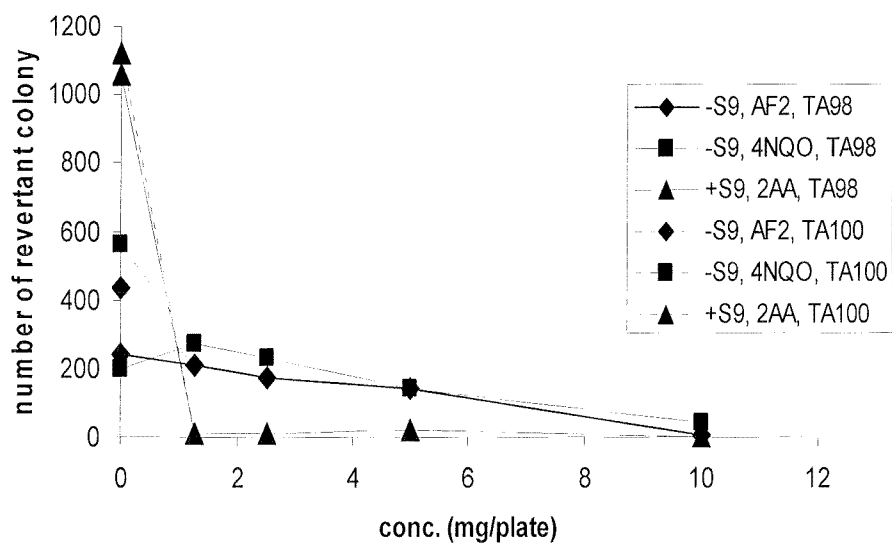
ตารางที่ 3 จำนวน revertants ของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดสมุนไพร

	-S9				+S9	
	AF2		4NQO		2AA	
	TA98	TA100	TA98	TA100	TA98	TA100
1. สารสกัดจี่วป่าดอกขาว (mg/plate)						
0	326	352	252	281	1061	1529
1	275	399	197	215	1027	1021
2.5	329	377	229	303	382	410
5	286	286	261	286	109	163
10	224	320	167	311	18	101
2. สารสกัดหนามแท่ง (mg/plate)						
0	236	651	241	601	961	1526
1	259	636	299	589	963	1104
2.5	208	579	325	653	672	719
5	145	524	301	687	324	306
10	181	474	316	651	32	142

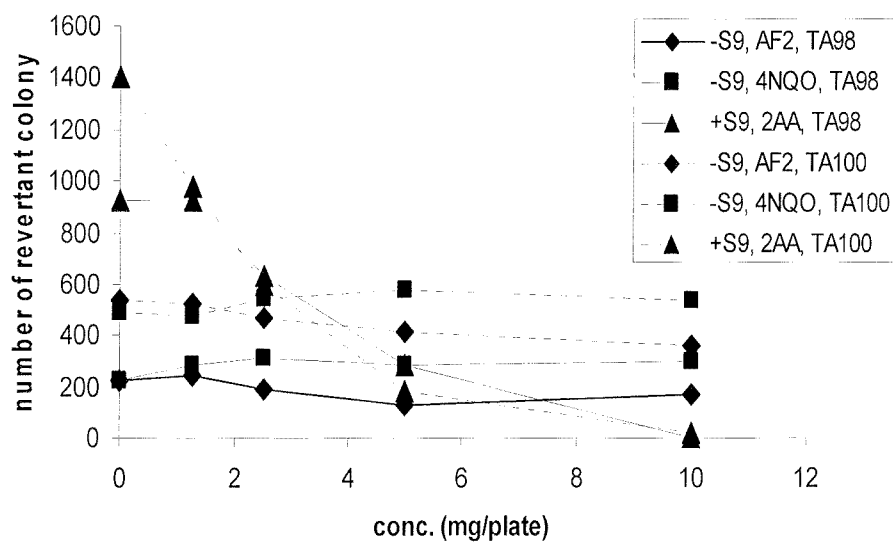


		-S9		+S9			
		AF2		4NQO		2AA	
	TA98	TA100	TA98	TA100	TA98	TA100	
3. สารสกัดลำต้นและกิ่งดอกดำ (mg/plate)							
0	276	477	239	605	971	1384	
1	282	379	194	584	208	271	
2.5	187	426	244	515	108	172	
5	169	423	227	635	55	115	
10	100	399	28	497	35	120	
4. สารสกัดใบดอกดำ (mg/plate)							
0	253	555	272	665	790	1304	
1	199	455	305	539	196	256	
2.5	139	579	259	631	72	105	
5	110	486	317	602	43	120	
10	91	446	172	408	25	118	
5. สารสกัดดอกก้น (mg/plate)							
0	283	489	249	519	1149	1220	
1	320	549	313	700	99	153	
2.5	262	523	176	746	22	131	
5	251	523	84	617	12	107	
10	213	395	8	529	11	106	
6. สารสกัดพืษชาติ (mg/plate)							
0	256	554	214	679	1080	1252	
1	228	552	288	894	34	135	
2.5	191	513	247	771	33	134	
5	161	437	158	509	48	165	
10	24	395	60	370	19	121	

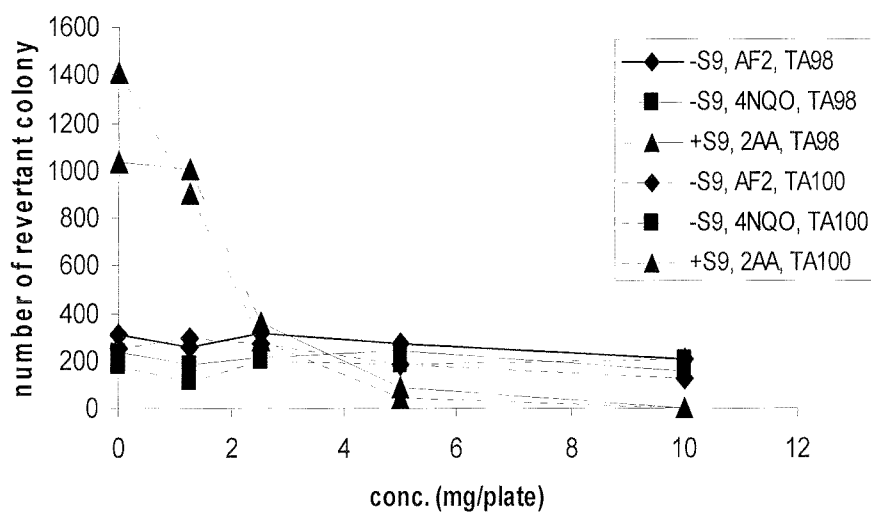
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 ห้องสมุดงานวิจัย
 วันที่..... 1.1. ๒๕๕๕.....
 เลขทะเบียน..... 243131.....
 เลขเรียกหนังสือ.....



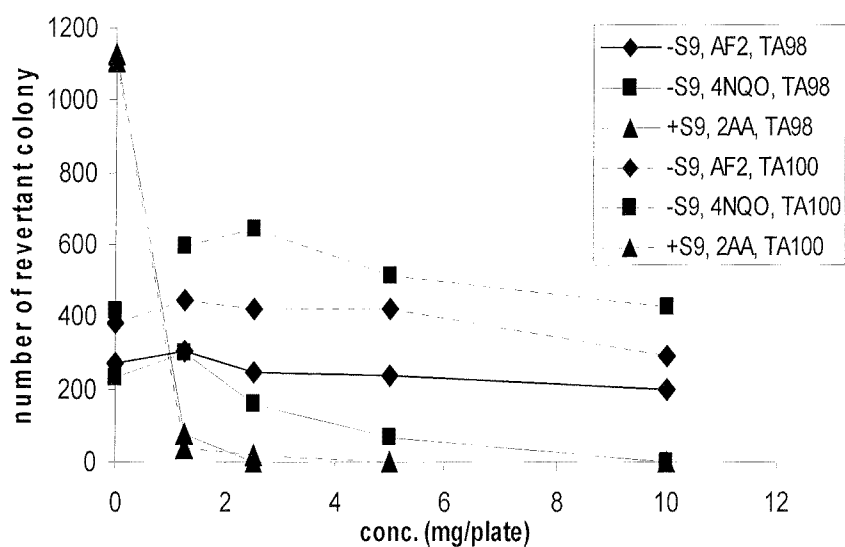
รูปที่ 3 แสดงฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดพืช ที่มีต่อเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วยสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน



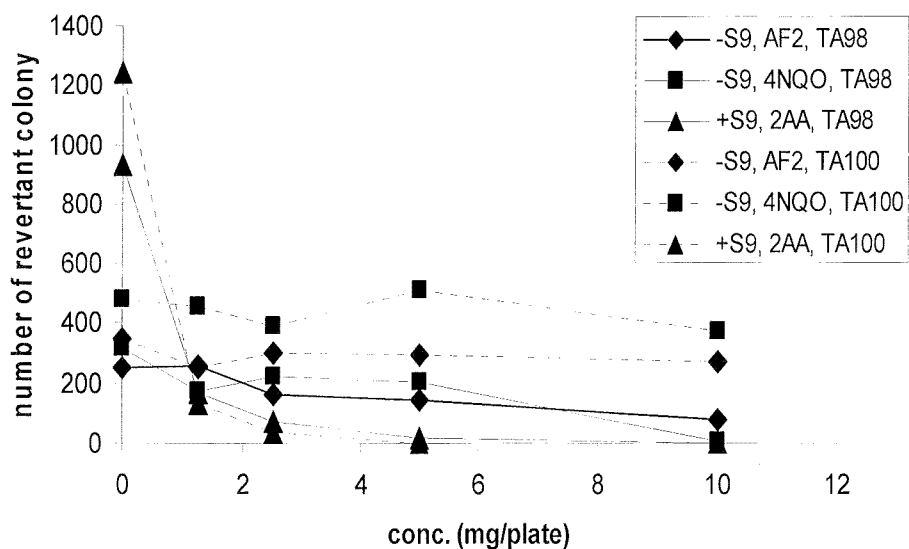
รูปที่ 4 แสดงฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดหนามแท่ง ที่มีต่อเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วยสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน



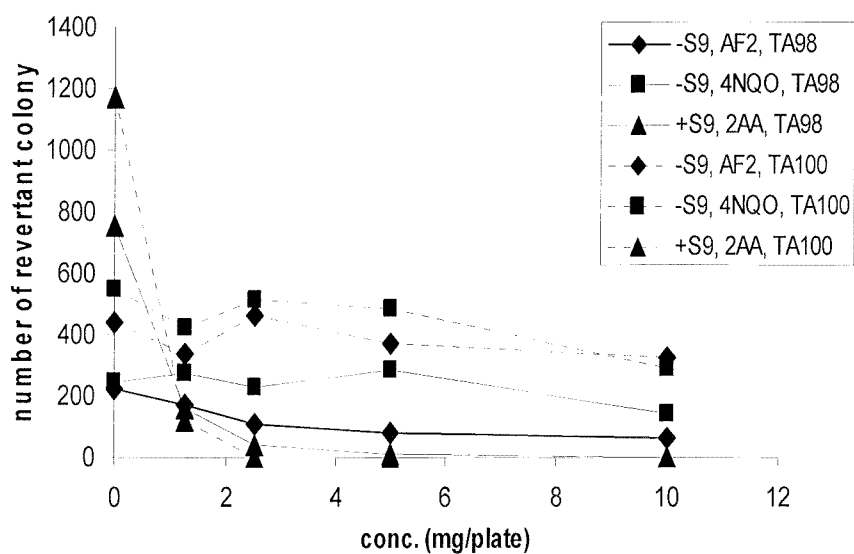
รูปที่ 5 แสดงฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดจืวป่าดอกขาว ที่มีต่อเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วยสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน



รูปที่ 6 แสดงฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดดอกก้น ที่มีต่อเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วยสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน



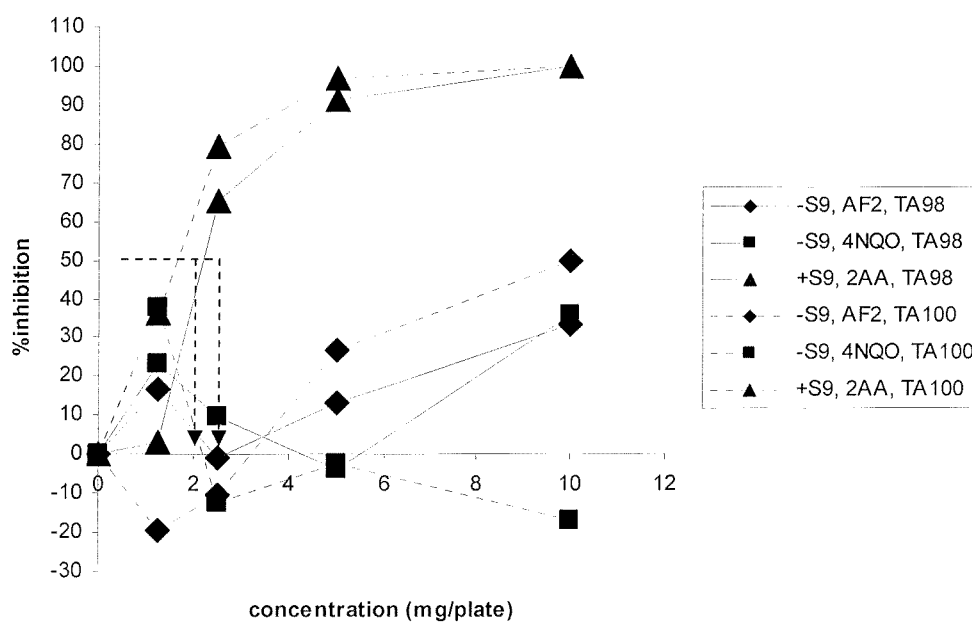
รูปที่ 7 แสดงฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดลำต้นและกิ่งดอกคำ ที่มีต่อเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วยสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน



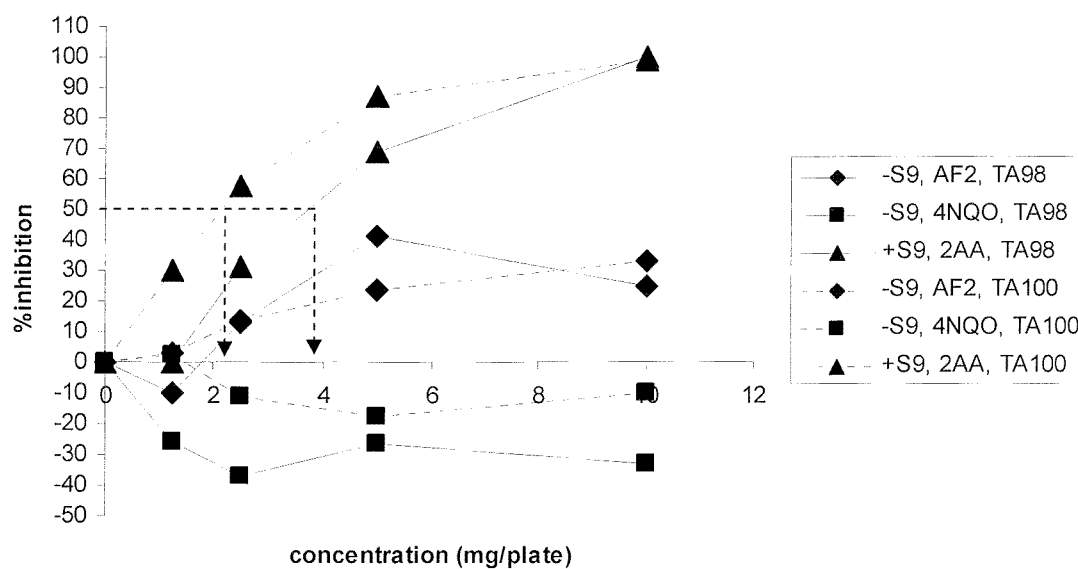
รูปที่ 8 แสดงฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดใบดอกคำ ที่มีต่อเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งได้รับการกระตุ้นด้วยสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน

ตารางที่ 4 ค่า IC_{50} ของการต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดสมุนไพร

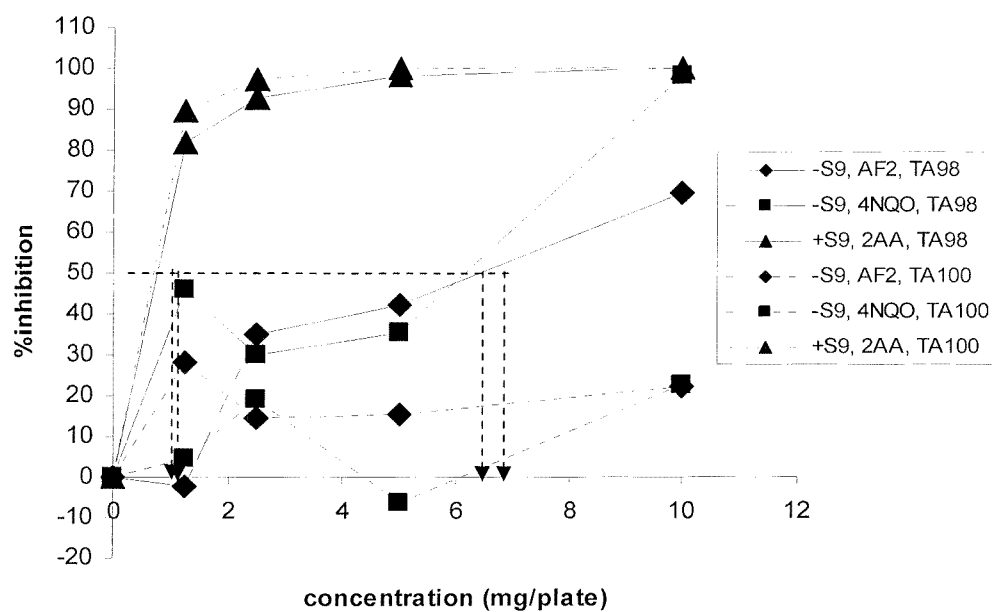
สารสกัด	IC50 (mg/plate)					
	AF2		4NQO		2AA	
	TA98	TA100	TA98	TA100	TA98	TA100
จิวป่าดอกขาว	>10	9.93	>10	>10	2.32	1.60
หนามแท่ง	>10	>10	>10	>10	3.88	2.67
ลำต้นและกิ่งดาดำ	6.61	5.32	>10	>10	0.76	0.70
ใบดาดำ	2.94	>10	>10	>10	0.80	0.70
กอกัน	>10	>10	4.59	>10	0.65	0.67
พื้ชาด	5.30	4.74	6.76	4.55	0.63	0.63



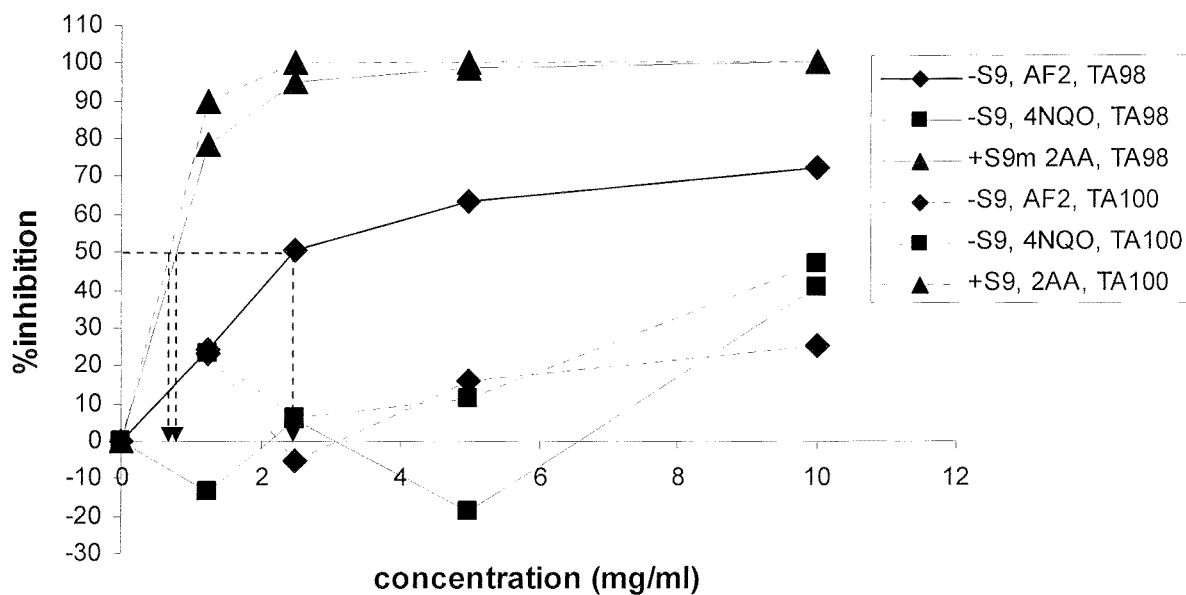
รูปที่ 9 กราฟแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการกลายพันธุ์ของสารสกัดจิวป่าดอกขาว ที่มีต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA98 และ TA100



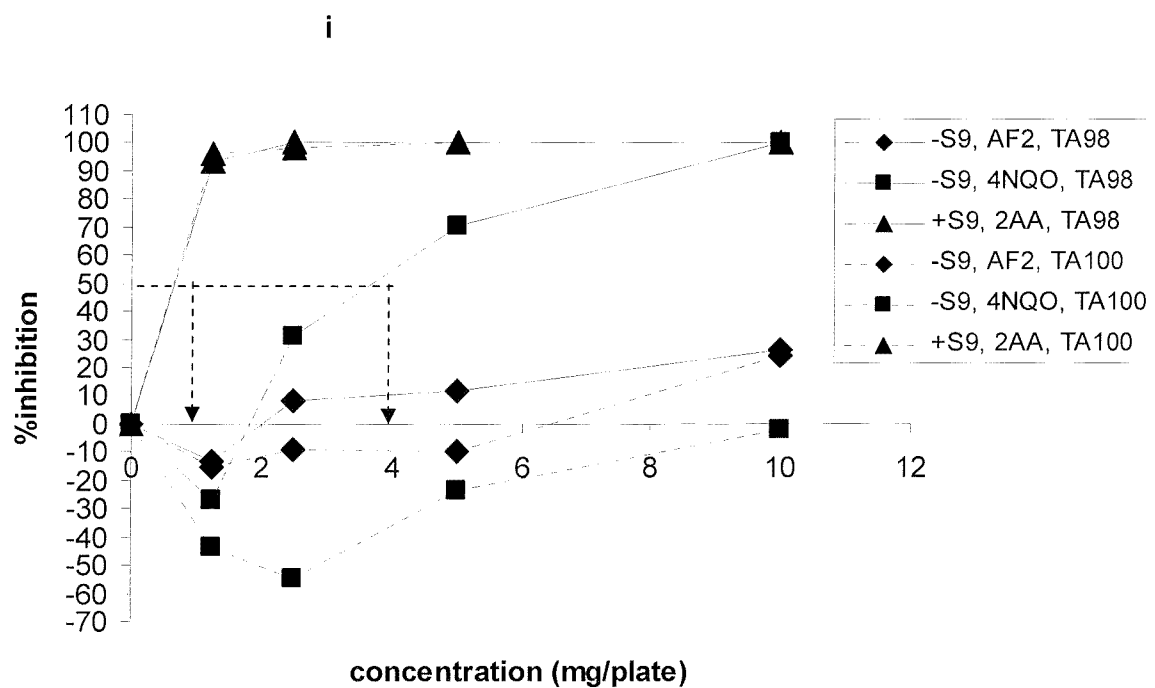
รูปที่ 10 กราฟแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการกลายพันธุ์ของสารสกัดหนามแท่ง ที่มีต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA98 และ TA100



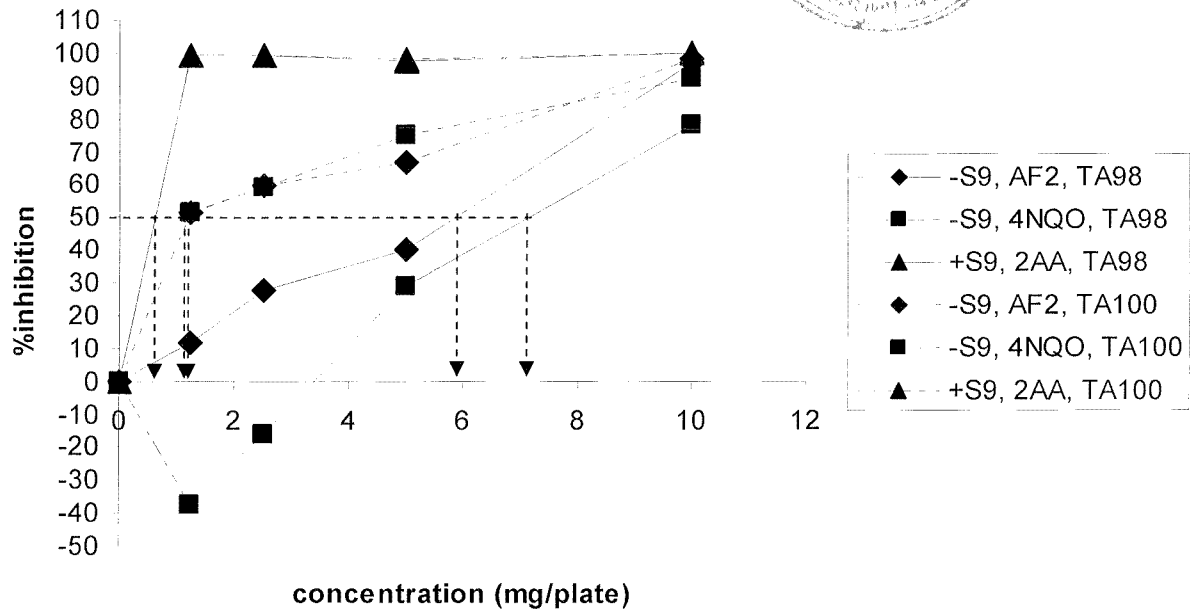
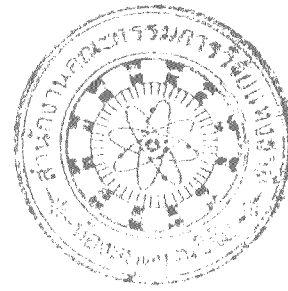
รูปที่ 11 กราฟแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการกลายพันธุ์ของสารสกัดลำต้นและกิ่งดอกคำ ที่มีต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA98 และ TA100



รูปที่ 12 กราฟแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการกลายพันธุ์ของสารสกัดใบคาถา ที่มีต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA98 และ TA100



รูปที่ 13 กราฟแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการกลายพันธุ์ของสารสกัดดอกกัน ที่มีต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA98 และ TA100



รูปที่ 14 กราฟแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการกลายพันธุ์ของสารสกัดพืชชนิด ที่มีต่อเชื้อ *S. typhimurium* TA98 และ TA100

4. ฤทธิ์ immunomodulatory ของสารสกัด

4.1 การหา % cytotoxicity ของสารสกัด

ก่อนการทดสอบฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้ทำการหา % ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ ม้าม พบว่า สารสกัดพืชชนิดให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุด ส่วนสารสกัดหนามแท่งและจ๊วป่าดอกขาว ให้ค่า IC_{50} สูงที่สุด (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่า IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์ม้ามหนู

สารสกัด	IC_{50} (μ g/ml)		
	1 st	2 nd	mean $\pm$ SD
จ๊วป่าดอกขาว	>400	>400	>400
หนามแท่ง	>400	>400	>400
ลำต้นและกิ่งคากดำ	103.1	138.2	120.65 $\pm$ 24.82
ใบคากดำ	121.2	113.7	117.45 $\pm$ 5.30
กอกก้น	51.4	74.2	62.79 $\pm$ 16.16
พืชชนิด	14.0	17.3	15.64 $\pm$ 2.33

4.2 ฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

การทดสอบผลของสารสกัดต่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน พบว่า สารสกัดที่ใช้ทดสอบทุกชนิด ไม่มีผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยตรง แต่ในภาวะที่มี PHA เป็นตัวชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบว่า เมื่อเติมสารสกัดที่ทดสอบเข้าไปด้วย จะทำให้เซลล์มีจำนวนได้มากกว่าการชักนำด้วย PHA เพียงอย่างเดียว ยกเว้น สารสกัดจากลำต้นและกิ่งดอกคำและจากใบดอกคำ ส่วนในภาวะที่มี PWM เป็นตัวชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบว่า การเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากเมื่อเติมสารสกัดแต่ละชนิดผสมกับการชักนำด้วย PWM ไม่แตกต่างจากการชักนำด้วย PWM เพียงอย่างเดียว

สารสกัดจี่วป่าดอกขาว สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากได้อย่างมีนัยสำคัญในภาวะที่มี PHA ในช่วงความเข้มข้น 25-400 $\mu\text{g/ml}$ แต่ในภาวะที่มี PWM สารสกัดไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมาก (รูปที่ 15)

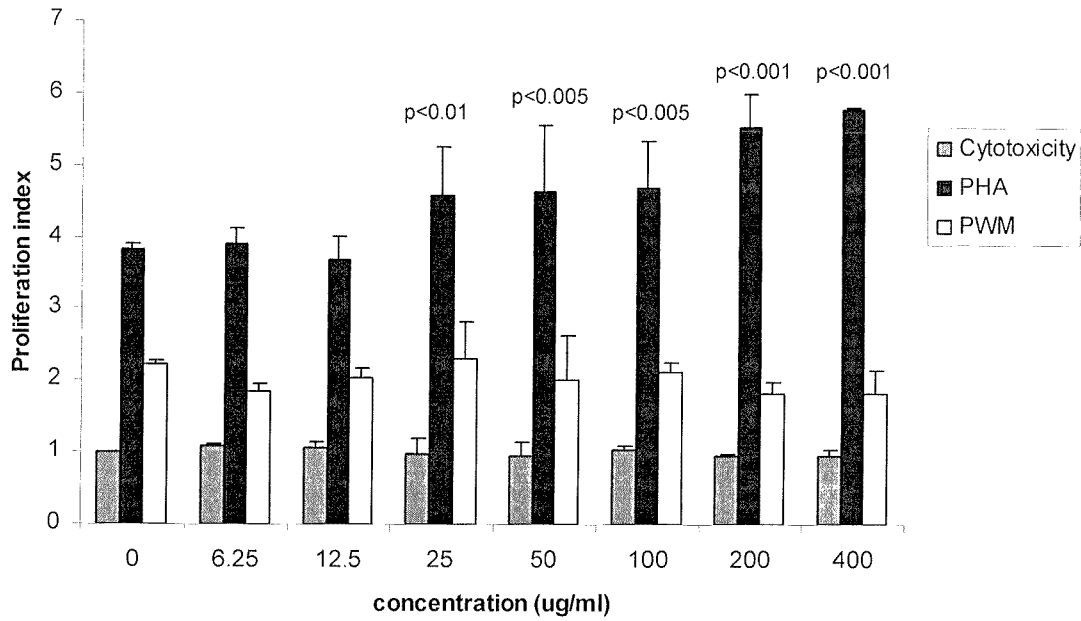
สารสกัดหนามแท่ง สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากได้อย่างมีนัยสำคัญในภาวะที่มี PHA ในช่วงความเข้มข้น 6.25-400 $\mu\text{g/ml}$ แต่ในภาวะที่มี PWM สารสกัดไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมาก (รูปที่ 16)

สารสกัดลำต้นและกิ่งดอกคำ ไม่สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากได้อย่างมีนัยสำคัญในภาวะที่มี PHA ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ และในภาวะที่มี PWM สารสกัดไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากเช่นกัน (รูปที่ 17)

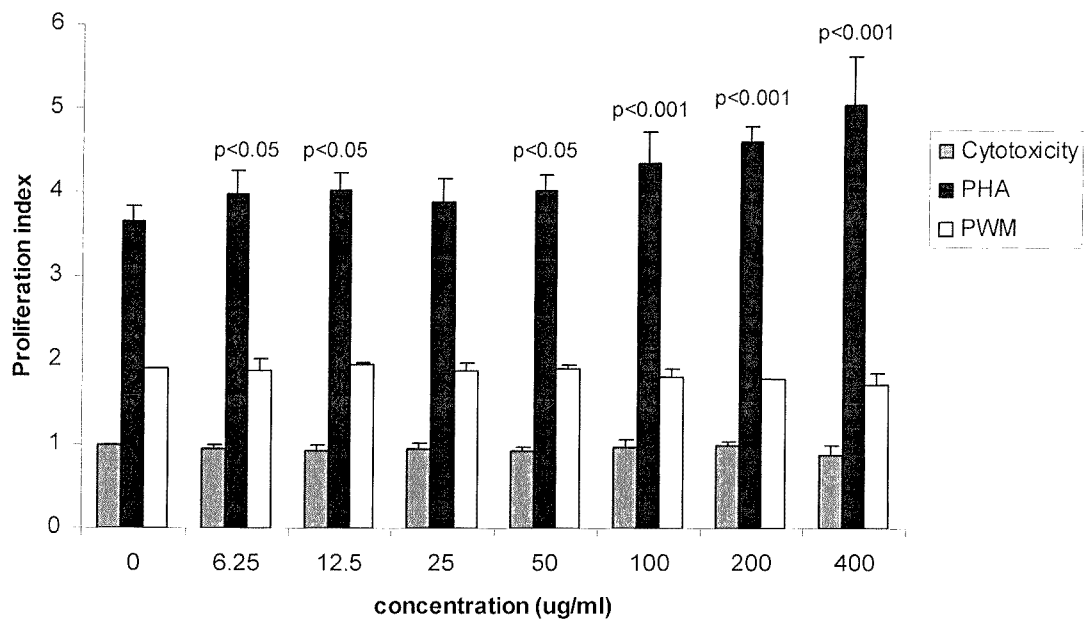
สารสกัดใบดอกคำ ไม่สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากได้อย่างมีนัยสำคัญในภาวะที่มี PHA ในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบ และในภาวะที่มี PWM สารสกัดไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากเช่นกัน (รูปที่ 18)

สารสกัดดอกกัน สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากได้อย่างมีนัยสำคัญในภาวะที่มี PHA โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ แต่ในภาวะที่มี PWM สารสกัดไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากเช่นกัน (รูปที่ 19)

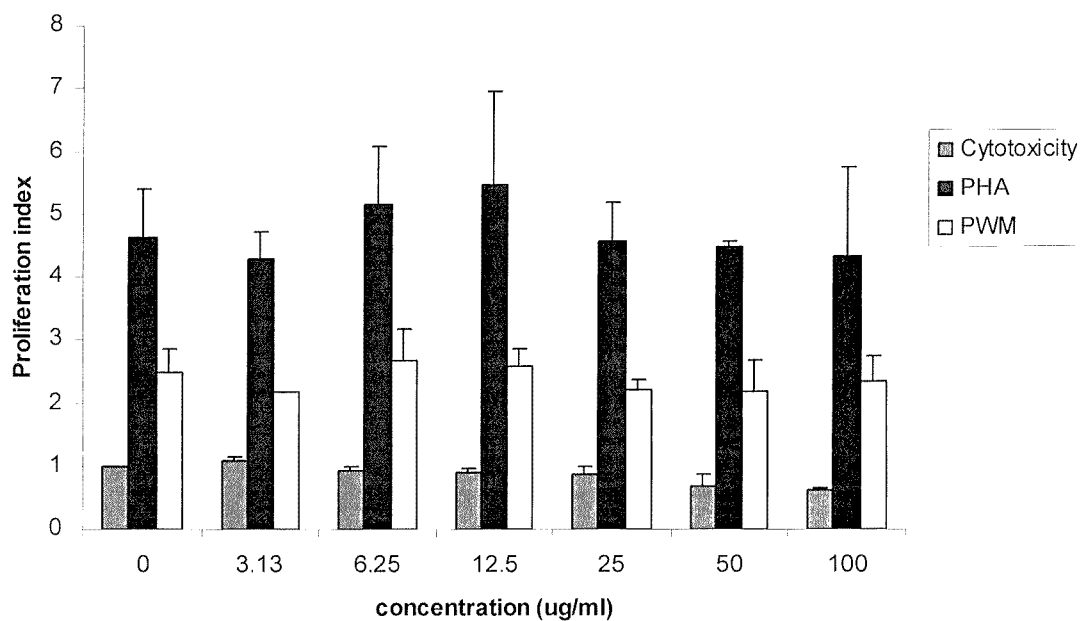
สารสกัดพันชาด สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากได้อย่างมีนัยสำคัญในภาวะที่มี PHA โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 3.13-25 $\mu\text{g/ml}$ แต่ในภาวะที่มี PWM สารสกัดไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์มีมากเช่นกัน (รูปที่ 20)



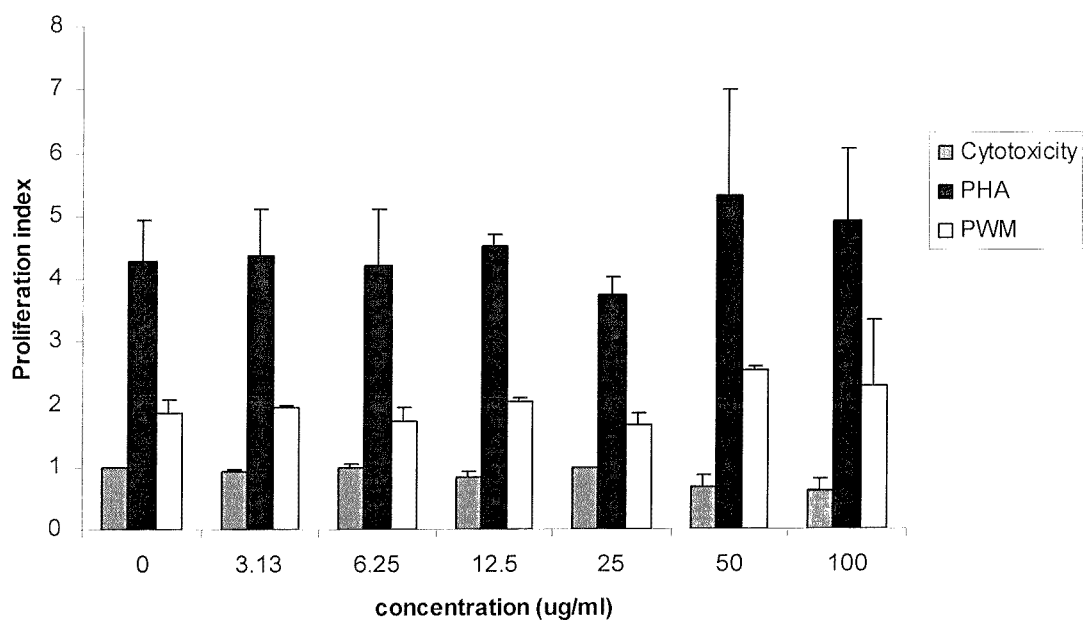
รูปที่ 15 การทดสอบสารสกัดจี้วป่าดอกขาว ในการกระตุ้นเซลล์ม้ามเปรียบเทียบกับการใช้ PHA และ PWM (n=6)



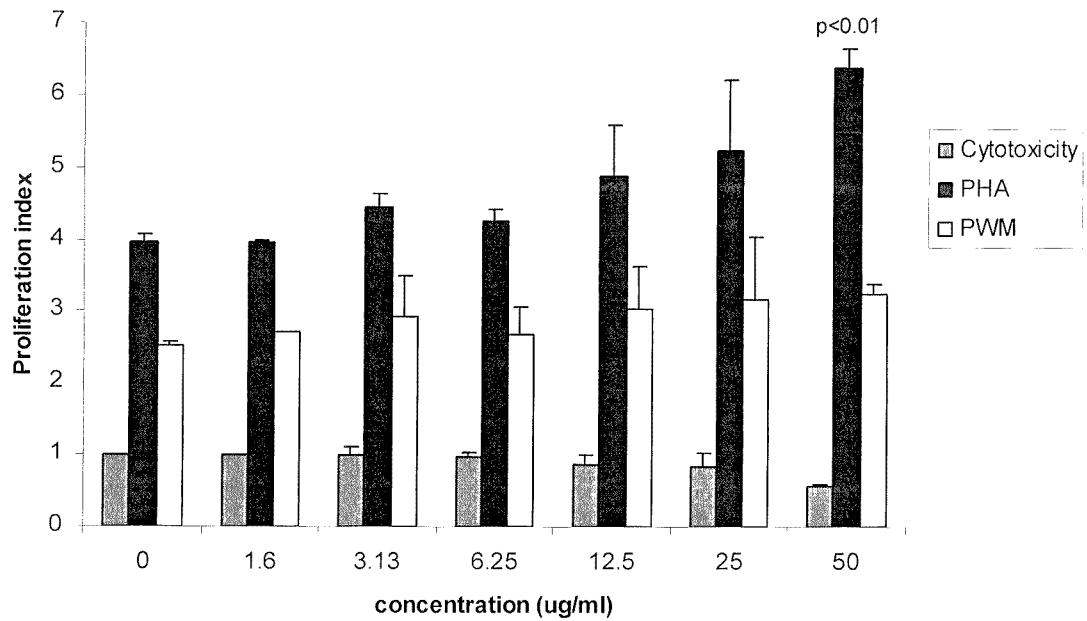
รูปที่ 16 การทดสอบสารสกัดหนามแท่ง ในการกระตุ้นเซลล์ม้ามเปรียบเทียบกับการใช้ PHA และ PWM (n=6)



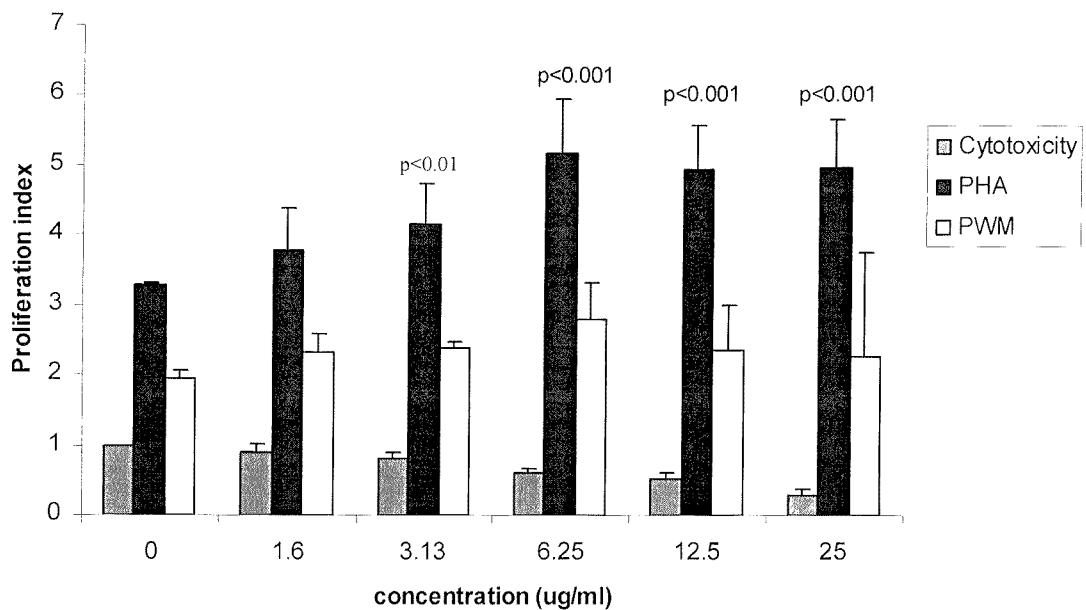
รูปที่ 17 การทดสอบสารสกัดลำต้นและกิ่งดอกดำ ในการกระตุ้นเซลล์ม้ามเปรียบเทียบกับการใช้ PHA และ PWM (n=6)



รูปที่ 18 การทดสอบสารสกัดใบดอกดำ ในการกระตุ้นเซลล์ม้ามเปรียบเทียบกับการใช้ PHA และ PWM (n=6)



รูปที่ 19 การทดสอบสารสกัดกอกก้น ในการกระตุ้นเซลล์ม้ามเปรียบเทียบกับการใช้ PHA และ PWM (n=6)



รูปที่ 20 การทดสอบสารสกัดพันชาด ในการกระตุ้นเซลล์ม้ามเปรียบเทียบกับการใช้ PHA และ PWM (n=6)