3. บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

บทคัดย่อ

มะรุมเป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Moringaceae มีการปลูกกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย มะรุมมีสรรพคุณหลายประการ มีคุณค่าทางอาหารสูง และเป็นพืชที่มีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือเป็นยาได้ อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลด้านชนิดและปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ข้อมูลของมาตรฐานวัตถุดิบสมุนไพร ข้อมูลด้านคุณค่าทางอาหารของใบมะรุมที่ปลูกในประเทศไทย และข้อมูลที่สนับสนุนในเรื่องของความปลอดภัยสำหรับการบริโภคใบมะรุม รวมทั้งยังไม่มีรายงานข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต่อเซลล์ตับมนุษย์ ฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อ (1) ศึกษาด้านพฤกษเคมี วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากใบมะรุม ประเมินคุณค่าทางอาหารและจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานทางเภสัชเวทของใบมะรุมที่ปลูกในประเทศไทย (2) ศึกษาความปลอดภัยและความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุม โดยใช้รูปแบบการทดลองต่างๆ (3) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลอง ได้แก่ ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะรุมต่อเซลล์ตับมนุษย์ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน

ผลการศึกษาด้านพฤกษเคมีพบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารสกัดหยาบ (% Yield) ของตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่างที่เก็บจากทุกภาคของประเทศไทย มีค่าประมาณ 40% ของน้ำหนักผงใบแห้ง ส่วนปริมาณ total phenolic compounds และ total flavonoid compoundsในสารสกัด 100 กรัมและในผงใบแห้ง 100 กรัม พบว่าตัวอย่างจากเชียงใหม่ให้ค่าสูงสุด คือค่า total phenolics 8.73±0.48 กรัม gallic acid equivalent/ 100 g **extract** หรือเท่ากับ 3.40±0.14 กรัม gallic acid equivalent/ 100 g **ผงใบแห้ง** และ total flavonoids 8.96±0.11 กรัม quercetin equivalent/ 100 g **extract** หรือเท่ากับ3.50±0.09 กรัม quercetin equivalent/ 100 g **ผงใบแห้ง** เช่นเดียวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันซึ่งพบว่าตัวอย่างจากเชียงใหม่แสดงฤทธิ์ดีที่สุด โดยแสดงค่า IC_{50}ที่ 39.73±0.64 µg/ml เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี DPPH scavenging assay และให้ค่า FRAP value สูงที่สุดที่ 8.43±0.04 กรัม$FeSO_4$ equivalent / 100 g extract เมื่อประเมินโดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power assay (*FRAP assay)* จึงเลือกสารสกัดใบมะรุมจากเชียงใหม่นำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ต่อไป ส่วนผลการศึกษาลายพิมพ์ TLC (TLC fingerprints) ของสารสกัดหยาบจากตัวอย่างแต่ละแหล่ง พบว่ามีลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือประกอบด้วยแถบสีขององค์ประกอบหลัก 2 ชนิดซึ่งมีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน **chlorogenic acid และ isoquercetin**

จากการศึกษาทางเภสัชเวทพบว่าเนื้อเยื่อใบมะรุมประกอบด้วยลักษณะเฉพาะของปากใบชนิด anomocytic และมีเนื้อเยื่อ parenchyma ที่มีผลึกของ calcium oxalate สะสมอยู่ด้วย รวมทั้งมี vessels ชนิด annular, reticulated และ bordered pitted และผลการประเมินคุณค่าทางอาหารของใบมะรุมพบว่าค่าเฉลี่ยของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีนและเส้นใย เท่ากับ ร้อยละ 41.79, 3.71, 19.19 และ7.92 ของน้ำหนักใบแห้งตามลำดับ ส่วนปริมาณเฉลี่ยของแร่ธาตุซึ่งได้แก่ แคลเซียม โซเดียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม เหล็ก

และสังกะสี เท่ากับ 1975.92, 49.49, 1362.79, 387.99, 23.44 และ 1.90 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมใบแห้ง ตามลำดับ สำหรับค่าเฉลี่ยปริมาณวิตามินบี 1, บี 2 และ บี6 เท่ากับร้อยละ 3.80, 15.54, และ 13.58 มิลลิกรัม ตามลำดับ

ผลการศึกษาด้านพิษวิทยา พบว่าสารสกัดใบมะรุมด้วย 70% เอทานอล มีความปลอดภัยสูงต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (มีค่า IC_{50} > 400 μg/ml) ไม่พบการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสารสกัดจากการทดสอบโดยวิธี Ames'test แต่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของเชื้อ TA98 และ TA100 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน โดยเฉพาะในสภาวะที่มีการทำงานของเอนไซม์ตับร่วมด้วย โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 5.38 และ 6.89 mg/plate ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใบมะรุมมีความปลอดภัยต่อสัตว์ทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งไม่พบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดทางปากขนาดสูงถึง 1500 และ 1000 mg/kg BW ตามลำดับ และไม่พบความผิดปกติ ตลอดจนไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่รุนแรงใดๆ ของพฤติกรรม น้ำหนักตัว อวัยวะสำคัญต่างๆ ค่าชีวเคมีและโลหิตวิทยาในกลุ่มหนูทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสารสกัดใบมะรุมขนาดต่างๆ อย่างต่อเนื่อง 6 เดือน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ถึงแม้ว่าจะพบแนวโน้มเพิ่มขึ้นและลดลงของค่าชีวเคมีและโลหิตวิทยาของตัวอย่างเลือดหนูบางกลุ่มทั้งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบมะรุมหรือได้รับน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นกระสายยา เช่น การเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ตับ AST และ ALP ปริมาณแกลือแร่โซเดียม และคลอไรด์ รวมทั้งปริมาณฮอร์โมนไทรอยด์ T3 และ T4 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับเพศของหนูทดลอง หรือปริมาณของสารสกัดใบมะรุมที่หนูได้รับ และไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อของอวัยวะสำคัญที่เกี่ยวข้อง

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพ โดยเชื้อที่ไวที่สุดต่อสารสกัดใบมะรุม เมื่อเทียบกับเชื้ออื่นในที่นี้ คือ *Haemophilus influenza* ซึ่งแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (MBC) เพียง 0.1 mg/ml รองลงมาคือ *Streptococcus mutans* (0.2 mg/ml), *Pseudomonas aeruginos*a (0.8 mg/ml), *Staphylococcus epidermidis* (0.8 mg/ml) และ *Enterococcus faecalis* (1.6 mg/ml) สำหรับฤทธิ์ฆ่าเชื้อตัวแทน Gram negative bacilli คือ *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* และ *Klebsiella pneumoniae* แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ สร้างแคพซูล และ pyogenic cocci คือ *Bacillus subtilis, Streptococcus pneumoniae* และ *S. pyogenes* ต้องใช้ปริมาณ 3.2 mg/ml และ 3.9 mg/ml สำหรับเชื้อ *Helicobacter pylori* ในขณะที่เชื้อดื้อยา *Acinetobacter baumannii* และ *Staphylococcus aureus* จะต้องใช้สารสกัด >3.2 mg/ml สำหรับราที่ใช้ทดสอบ จะให้ค่าต่างกันเล็กน้อยระหว่างราเซลล์เดียว คือ *Candida albicans* และ ราเส้นใย คือ *Trichophyton mentagrophytes* ที่ 1.6 mg/ml และ 1.3 mg/ml ตามลำดับ แต่ไม่พบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *Propionibacterium acnes* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบริเวณผิวหนังที่ความเข้มข้น 1 – 10 mg/disc และพบว่าสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน IL-6, COX-2, TNF-α , iNOS และ COX-1 ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบมะรุม 0.5 mg/ml คือ 79.75%, 73.08%, 50.89%, 27.81% และ 6.93% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีเซลล์ (T cell lymphocyte) และบีเซลล์ที่ขึ้นกับทีเซลล์ (T-cell dependent B cell lymphocyte) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดเอทานอลของใบมะรุม มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับมนุษย์ชนิด Chang liver cell

สรุปผลการวิจัยนี้ ได้ข้อมูลที่สามารถอ้างอิงทางวิชาการด้านพฤกษเคมี ข้อมูลด้านคุณค่าทางอาหาร ข้อมูลในการจัดทำมาตรฐานของใบมะรุมในประเทศไทย และข้อมูลเบื้องต้นสำหรับมาตรฐานของสารสกัดใบมะรุมซึ่งการกำหนดมาตรฐานของสารสกัดใบมะรุมต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ส่วนผลการศึกษาด้านพิษวิทยาสรุปว่า สารสกัดใบมะรุมด้วย 70%เอทานอล มีความปลอดภัยค่อนข้างสูง แต่ควรระวังการใช้ในผู้ที่มีการทำงานของตับและไตบกพร่องด้วย นอกจากนี้ พบว่า สารสกัดใบมะรุมมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในสัตว์ทดลองและในทางคลินิก

Abstract

Moringa oleifera **Lam.** is a medicinal plant in the family Moringaceae. It had been widely distributed in Thailand. All parts of this plant have various effects and contain rich nutrients. It shows tendency to be further developed as a food supplement or herbal medicines. However, there is no scientific information concerning active compounds in *M. oleifera* leaves, no nutrition value data and no pharmcognostic specifications of the leaves of *M. oleifera* cultivated in Thailand. The data on their safety is also still limited and unclear. In addition, no evidences show biological activities of *Moringa* extract such as effect on human hepatocyte cells, antioxidant antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulating activities. So, this research aimed to (1) assess phytochemical constituents and determine active contents in the leaf extracts of *M. oleifera* collected from all parts of Thailand. Also, nutritional values and pharmacognostic specifications of the leaves of Moringa cultivated in Thailand were studies. (2) evaluate the safety and toxic effects of *M. oleifera* leaf extract using various study models. (3) study the effects of *M. oleifera* leaf extract on human hepatocyte cells, liver enzymes and certain metabolic genes and investigate various biological activities of this extract such as antioxidant antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulating activities using *in vitro* models.

From phytochemial studies, average yields of 70% ethanolic extracts from 11 leaf samples was 40 percentage of the weight of dried leaves. Total phenolic compounds and total flavonoids in the extracts and powdered leaves from Chiengmai were found to be the highest contents (total phenolic 8.73±0.48g gallic acid equivalent/ 100 g **extract**, and 3.40±0.14g gallic acid equivalent/ 100 g **dried powder**; total flavonoids 8.96±0.11g quercetin equivalent/ 100 g **extract** and 3.50±0.09 g quercetin equivalent/ 100 g

dried powder). The average contents of total phenolics and total flavonoids in the leaf **extracts** were 6.34 and 5.26% while in the dried powdered samples were 2.30 and 1.86 %w/w, respectively. The samples from Chiengmai also promoted the highest antioxidant activity with IC_{50} of 39.73±0.64 µg/ml determined by DPPH scavenging assay, and 8.43±0.04 g $FeSO_4$ equivalent / 100 g extract determined by Ferric Reducing Antioxidant Power assay. Therefore, the leaf extract of sample from Chiengmai is selected for other biological tests. From TLC fingerprints, all leaf extracts of Moringa showed the similar pattern comprising bands of compounds of which 2 of them showed the same Rf values with standards **chlorogenic acid** and **isoquercetin**.

By pharmacognostic studies, *Moringa oleifera* leaf tissues contain characteristic stomata of anomocytic type, parenchyma tissue containing calcium oxalate crystals, and several annular, reticulated and bordered pitted vessels. From nutrition values assessment, the average content of carbohydrate, fat, protein, and crude fiber were 2786, 3.49, 24.47 and 21.35 %, respectively; meanwhile the average content of mineral, which are calcium, sodium, potassium, magnesium, iron, and zinc were 1975.92, 12.33, 1362.79, 387.99, 17.54, and 1.90 mg/100 gram, respectively, including with the average content of vitamin B1, B2, and B6 were 3.80, 15.54, 13.58 mg/100 gram, respectively.

The results from toxicity studies, *in vitro* and *in vivo* study models, demonstrated the high level safety of 70% ethanolic extract consuming. No cytotoxic to human normal white blood cells (IC_{50} > 400 µg/ml). It had no mutagenic effect with high efficacy of anti-mutagenic effects at concurrency of hepatic enzyme mixture with Ames'test IC_{50} 5.38 and 6.89 mg extract/plate for TA98 and TA100, respectively. This was supported by the results from animal study in both male and female rats. Toxicity or abnormality or obvious changes were not detected from the treated groups at oral administration of 1500 and 1000 mg/kg BW for acute and chronic studies, respectively. After chronic intake of 70% ethanolic extract for 6 – month period with different doses among the rat groups, the safety of the extract was demonstrated by presenting of no abnormality or obvious differences of behaviors, body weights, blood chemistry and hematology parameters, organs and tissue histology among treated groups and control group. Although, the increasing and reducing trends of some parameters were found in some treated groups or vehicle group when compared to untreated group, there were not related to neither received doses nor genders of rats. These parameters are hepatic enzymes (AST and ALP), sodium, chloride, T3 and T4 thyroid hormones.

In biological tests, the results demonstrated that the most susceptible microorganism was *Haemophilus influenza* (MBC = 0.1 mg/ml) followed by *Streptococcus mutans* (MBC = 0.2 mg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (MBC = 0.8 mg/ml), *Staphylococcus epidermidis* (MBC = 0.8 mg/ml) and

Enterococcus faecalis (MBC = 1.6 mg/ml). The MBC at 3.2 mg/ml was against *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pneumoniae* and *S. pyogenes*, while MBC of >3.2 mg/ml was against *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureu, and Helicobacter pylori* (~3.91 mg/ml) . For fungi, the moringa leaf ethanol extract showed the MFC against *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes* at 1.6 mg/ml and 1.3 mg/ml, respectively, while the extract did not show any antimicrobial activity against *P. acnes* with the concentration up to 10 mg/disc. The Moringa leaf ethanolic extract (0.5 mg/ml) has anti-inflammatory potential via reduction of IL-6, COX-2, TNF-α, iNOS and COX-1 gene expression with %inhibition of 79.75%, 73.08%, 50.89%, 27.81% and 6.93%, respectively. Furthermore, the immunomodulating effects of Moringa leaf ethanolic extract were demonstrated by stimulation of T cell lymphocyte and T-cell dependent B cell lymphocyte proliferation. Our findings indicated that *Moringa* leaves ethanol extracts has cytotoxicity to Chang human liver cells.

In conclusion, the present study gave scientific information on phytochemical, nutritional value and pharmacognostic specification the leaves of *M. oleifera* cultivated in Thailand. However, standardization of *Moringa oleifera* leaf extract should be further determined. The results from toxicity tests suggested the high level safety of 70% ethanolic extract. However, the cautions should be done in case of impairment of kidney and liver functions. In addition, the results showed the health benefits and potentials of Moringa extract; antimicrobial, antiinflammation and immunomodulating activity. However, further studies in animals and clinical experiments are necessary.