

แบบสรุปผู้บริหาร
[Executive Summary]

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

มาตรฐาน การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพและพิษวิทยาของสารสกัดจากใบมะรุม
Specification of leaves and standardization, biological and toxicological activities of extract from the leaves of *Moringa oleifera*

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

หัวหน้าชุดโครงการ

รศ. ดร. สุจิตรา ทองประดิษฐ์โชติ	คณะเภสัชศาสตร์ ม.มหิดล	โทร 026448677-91 ต่อ 5608
ผู้ร่วมวิจัย		

- | | | |
|--------------------------------------|--|---------------------------|
| 1. รศ. ดร.วันดี กุญชรพันธ์ | คณะเภสัชศาสตร์ ม.มหิดล | โทร 026448677-91 ต่อ 5601 |
| 2. รศ. ยุติ วงษ์กระจ่าง | คณะเภสัชศาสตร์ ม.มหิดล | โทร 026448677-91 ต่อ 5601 |
| 3. ดร. ปองทิพย์ สิทธิสาร | คณะเภสัชศาสตร์ ม.มหิดล | โทร 026448677-91 ต่อ 5521 |
| 4. ผศ. ดร. ธนภัทร ทรงศักดิ์ | คณะเภสัชศาสตร์ ม.รังสิต | โทร 029972222 ต่อ 1421 |
| 5. ผศ. ดร. ปิยนุช ทองผาสุก | คณะเภสัชศาสตร์ ม.รังสิต | โทร 029972222 ต่อ 1422 |
| 6. ดร. สุภวรณ์ บุญระเทพ | คณะเภสัชศาสตร์ ม.รังสิต | โทร 029972222 ต่อ 1422 |
| 7. ดร. สุชาดา จรุงเรืองโชค | คณะเภสัชศาสตร์ ม.รังสิต | โทร 029972222 ต่อ 3841 |
| 8. ผศ. ดร. สุรางค์ ลีละวัฒน์ | คณะเภสัชศาสตร์ ม. รังสิต | โทร 02-9972222 ต่อ 1422 |
| 9. ญ. ชมนกัศ ชูโชติ | คณะเภสัชศาสตร์ ม. รังสิต | โทร 029972222 ต่อ 1422 |
| 10. ผศ. ดร.นพ. กวิญ ลีละวัฒน์ | แผนกศัลยกรรมทั่วไป รพ. ราชวิถี โทร 02-354-8080 | |
| 11. รศ. แม้นสรวง วุฒิจุลมิลิต | คณะเภสัชศาสตร์ ม. มหิดล | โทร 026448677-91 ต่อ 1133 |
| 12. ดร. แคทรียา สุทธานุช | คณะเภสัชศาสตร์ ม.ขอนแก่น | โทร 0-4320-2378 |
| 13. รศ.ดร.บังอร ศรีพานิชกุลชัย | คณะเภสัชศาสตร์ ม.ขอนแก่น | โทร 0-4320-2379 |
| 14. รศ.ดร.กิตติศักดิ์ ศรีพานิชกุลชัย | คณะแพทยศาสตร์ ม.ขอนแก่น | โทร 0-4334-8381 |
| 15. นายพีระ ทับบุญ | คณะเภสัชศาสตร์ ม.ขอนแก่น | โทร 0-4320-2378 |
| 16. รศ.ดร.จอมใจ firพัฒนา | คณะเภสัชศาสตร์ ม. ขอนแก่น | โทร 0-4320-2378 |
| 17. นางสาวจินตนา จุลทรธรรณ | คณะเภสัชศาสตร์ ม. ขอนแก่น | โทร 0-4320-3149 |
| 18. นางนิรามัย ฝางกระโทก | คณะเภสัชศาสตร์ ม. ขอนแก่น | โทร 0-4320-3149 |
| 19. ญ. รุ่งศิริ ชัยอิทธิอนันต์ | คณะเภสัชศาสตร์ ม. ขอนแก่น | โทร 0-4320-3149 |

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. .. 2553..... งบประมาณที่ได้รับ.... 5,175,000.....บาท
ระยะเวลาทำวิจัย ตั้งแต่.....ตุลาคม 2553.....ถึง.....กันยายน 2554.....

2. สรุปโครงการวิจัย

มะรุม (*Moringa oleifera*) เป็นพืชที่ปลูกกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย ใช้เป็นอาหารและมีการนำมาใช้ในการรักษาโรคตามภูมิปัญญาพื้นบ้าน จึงมีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือเป็นยาได้ ปัจจุบันมีการนิยมนบริโภคและใช้ผลิตภัณฑ์ต่างๆจากมะรุมกันอย่างแพร่หลาย สามารถหาซื้อได้ง่าย โดยผลิตภัณฑ์ต่างๆหลายประเภทยังไม่ได้มีการรับรองจากจากสำนักงานอาหารและยา ซึ่งอาจไม่ปลอดภัยและไม่ได้มาตรฐาน มีการจำหน่ายใบมะรุมในรูปของแคปซูลบรรจุทั้งใบสดและผงแห้ง ใช้โดยการรับประทาน โดยเชื่อว่าสามารถรักษาโรคได้หลายอย่าง แต่ยังคงขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์มาสนับสนุน

คณะผู้วิจัยมุ่งศึกษาด้านพฤกษเคมีโดยการสกัดสารจากใบมะรุมด้วย 70% เอทานอล จากแหล่งต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย และทำ TLC fingerprint รวมทั้งคำนวณหาปริมาณสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักใบแห้ง และวิเคราะห์ปริมาณ total phenolics และ total flavonoids ในสารสกัดใบมะรุม ตลอดจนจัดทำข้อกำหนดทางเภสัชเวทโดยเก็บใบมะรุมจากแหล่งปลูกต่างๆของประเทศไทยนำมาจัดทำมาตรฐานตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย และประเมินคุณค่าทางอาหารของใบมะรุมที่เพาะปลูกในประเทศไทย นอกจากนี้ศึกษาความปลอดภัยและความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุม โดยทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว ฤทธิ์ต่อการก่อกลายพันธุ์และด้านการก่อกลายพันธุ์ในหลอดทดลอง และทดสอบพิษเฉียบพลันและเรื้อรังในสัตว์ทดลอง รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบมะรุมได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน และฤทธิ์ต่อต้าน

ผลจากการศึกษาทางด้านพฤกษเคมีพบว่า ปริมาณสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลของตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่างที่เก็บจากทุกภาคของประเทศไทย มีค่าประมาณ 40% ของน้ำหนักผงใบแห้ง และพบว่าตัวอย่างจากเชียงใหม่ มีปริมาณ total phenolic compounds และ total flavonoid compounds สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยพบว่าตัวอย่างจากเชียงใหม่แสดงฤทธิ์ดีที่สุด จึงเลือกสารสกัดใบมะรุมของตัวอย่างจากเชียงใหม่ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ต่อไป ส่วนผลการศึกษาลายพิมพ์ TLC (TLC fingerprints) ของสารสกัดหยาบจากตัวอย่างแต่ละแหล่ง พบว่ามีลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือประกอบด้วยแถบสีขององค์ประกอบหลัก 2 ชนิดซึ่งมีค่า R_f ตรงกับสารมาตรฐาน chlorogenic acid และ isoquercetin ส่วนผลการศึกษาลักษณะต่างๆทางเภสัชเวท ได้ข้อมูลในการจัดทำมาตรฐานสมุนไพรใบมะรุมในประเทศไทย และการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของใบมะรุมพบว่าค่าเฉลี่ยของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีนและเส้นใย เท่ากับ ร้อยละ 41.79, 3.71, 19.19 และ 7.92 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

ผลการศึกษาความเป็นพิษทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดใบมะรุมด้วย 70% เอทานอล มีความปลอดภัยสูง ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ ไม่มีผลกระตุ้นการกลายพันธุ์ แต่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ชนิด TA98 และ TA100 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน ในสภาวะที่มีการทำงานของเอนไซม์ต่ำร่วมด้วย พบว่าสารสกัดใบมะรุมมีความปลอดภัยต่อสัตว์ทดลองทั้งเพศผู้และเพศเมีย การป้อนสารสกัดทางปากทั้งในระยะสั้น 14 วันและระยะยาวถึง 6 เดือน ขนาดสูงถึง 1500 และ 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ตามลำดับ ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย และไม่พบความเป็นพิษหรือผลกระทบที่รุนแรงใดต่อ พฤติกรรม น้ำหนักตัว อวัยวะสำคัญต่างๆ ถึงแม้ว่าจะพบแนวโน้มเพิ่มขึ้นและลดลงของค่าชีวเคมีและโลหิตวิทยาของตัวอย่างเลือดหนูบางกลุ่มทั้งในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบมะรุมหรือได้รับน้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นกระสายยา เช่น การเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ AST และ ALP ปริมาณเกล็ดเลือดไซโตซึม และกลอไรด์ รวมทั้งปริมาณฮอร์โมนไทรอยด์ T3 และ T4 และการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด eosinophil และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับเพศของหนูทดลองหรือปริมาณของสารสกัดใบมะรุมที่หนูได้รับ และไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อของอวัยวะสำคัญที่เกี่ยวข้อง

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดใบมะรุมด้วย 70% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด ตัวอย่างเชื้อที่ไวต่อสารสกัดใบมะรุมในการทดลองนี้ คือ *Haemophilus influenza* และ *Streptococcus mutans* ซึ่งแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย เท่ากับ 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *Helicobacter pylori* ใช้ความเข้มข้น 3.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบฤทธิ์ต้านเชื้อราเซลล์เดียวและราเส้นใย (*Candida albicans* และ *Trichophyton mentagrophytes*) ใช้ความเข้มข้น 1.6 และ 1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ด้านการอักเสบพบว่า สารสกัดใบมะรุมที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ คือ IL-6, COX-2, TNF- α , iNOS และ COX-1 เท่ากับ 79.75%, 73.08%, 50.89%, 27.81% และ 6.93% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีเซลล์ (T cell lymphocyte) และบีเซลล์ที่ขึ้นกับทีเซลล์ (T-cell dependent B cell lymphocyte) ด้วย นอกจากนี้ พบว่าสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอล มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับมนุษย์ชนิด Chang liver cell

ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

สรุปผลการวิจัยนี้ ได้ข้อมูลสำคัญที่อ้างอิงทางวิทยาศาสตร์และสามารถเผยแพร่โดยการนำเสนอ/ตีพิมพ์ในวิชาการ ถ่ายทอดความรู้แก่นักวิจัย นักศึกษาระดับโท-เอก เพื่อส่งเสริมงานวิจัยเชิงลึกต่อไป สนับสนุนการใช้ประโยชน์จากใบมะรุม สามารถส่งเสริมเกษตรกรในการปลูกมะรุมในแหล่งปลูกที่ให้คุณภาพดี ข้อมูลของมาตรฐานของใบมะรุมในประเทศไทยเพื่อคัดเลือกว่าวัตถุดิบในการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์

อื่นๆ ใช้เป็นประโยชน์ต่อทั้งผู้ผลิต และข้อมูลด้านคุณค่าทางอาหาร ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารสูงแต่ควรระวังเกลือแร่โพแทสเซียมที่มีปริมาณสูงด้วย ซึ่งสามารถเผยแพร่ข้อมูลสู่ผู้บริโภค ให้ระมัดระวัง ข้อมูลด้านพิษวิทยา ซึ่งสรุปว่า สารสกัดใบมะรุมด้วย 70% เอทานอล มีความปลอดภัยค่อนข้างสูง จะสนับสนุนให้มีใช้ประโยชน์และการบริโภคใบมะรุมและผลิตภัณฑ์ ในกลุ่มผู้บริโภคได้อย่างปลอดภัยและเหมาะสม แต่ต้องระวังในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดพิษและมีสภาวะการทำงานของตับและไตบกพร่อง และอาจมีผลต่อระดับฮอร์โมนไทรอยด์ และข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพแสดงถึงศักยภาพ และประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะรุม พบว่ามีฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์กระตุ้นเซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน แต่ต้องระวังพิษต่อเซลล์ตับมนุษย์ด้วย อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในสัตว์ทดลองและในทางคลินิกต่อไป

การศึกษาวิจัยต่อไป

1. ในการกำหนดมาตรฐานของสารสกัดจากใบมะรุม จากโครงการนี้ได้ข้อมูลเบื้องต้น ซึ่งควรศึกษาเพิ่มเติม โดยวิเคราะห์สารสำคัญด้วย HPLC ส่วนการประเมินคุณค่าทางอาหารควรหาปริมาณวิตามินเอ วิตามินอี และข้อมูลด้านการปนเปื้อนจากโลหะหนัก
2. สารสกัดจากใบมะรุมมีฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน และมีพิษต่อเซลล์ตับมนุษย์ รวมทั้งมีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของตับในหลอดทดลอง และพบการเพิ่มเอนไซม์ตับในสัตว์ทดลองบางกลุ่ม แม้ว่าจะไม่สัมพันธ์กับเพศและขนาดของสารสกัด อย่างไรก็ตาม ควรศึกษากลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของสารสกัดจากใบมะรุมในการยับยั้ง oxidative stress จะได้องค์ความรู้ใหม่เพิ่มขึ้น รวมทั้งผลของสารสกัดต่อเซลล์ไทรอยด์เซลล์ โดยวัดระดับของ mRNA และ โปรตีนของยีนด้านออกซิเดชัน
3. การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุม ควรทดสอบเพิ่มเติม โดยศึกษาในระดับลึก ดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส เพื่อยืนยันความปลอดภัยมากขึ้น
4. การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ ควรทดสอบเพิ่มเติมโดยพิสูจน์ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ เช่น TNF alpha
5. ควรศึกษาผลของสารสกัดต่อฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น เช่น ผลต่อการลดระดับไขมันในเลือด ผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ลดความดันโลหิต และฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร

3. บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

บทคัดย่อ

มะรุมเป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Moringaceae มีการปลูกกระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย มะรุมมีสรรพคุณหลายประการ มีคุณค่าทางอาหารสูง และเป็นพืชที่มีแนวโน้มที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือเป็นยาได้ อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลด้านชนิดและปริมาณสารสำคัญที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ข้อมูลของมาตรฐานวัตถุพิษสมุนไพร ข้อมูลด้านคุณค่าทางอาหารของใบมะรุมที่ปลูกในประเทศไทย และข้อมูลที่สนับสนุนในเรื่องของความปลอดภัยสำหรับการบริโภคใบมะรุม รวมทั้งยังไม่มีรายงานข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต่อเซลล์ตับมนุษย์ ฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อ (1) ศึกษาด้านพฤกษเคมี วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากใบมะรุม ประเมินคุณค่าทางอาหารและจัดทำข้อกำหนดมาตรฐานทางเภสัชเวชของใบมะรุมที่ปลูกในประเทศไทย (2) ศึกษาความปลอดภัยและความเป็นพิษของสารสกัดจากใบมะรุม โดยใช้รูปแบบการทดลองต่างๆ (3) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลอง ได้แก่ ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะรุมต่อเซลล์ตับมนุษย์ ฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ และฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน

ผลการศึกษาด้านพฤกษเคมีพบว่า ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารสกัดหยาบ (% Yield) ของตัวอย่างจำนวน 11 ตัวอย่างที่เก็บจากทุกภาคของประเทศไทย มีค่าประมาณ 40% ของน้ำหนักผงใบแห้ง ส่วนปริมาณ total phenolic compounds และ total flavonoid compounds ในสารสกัด 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** หรือเท่ากับ 3.50 ± 0.09 กรัม quercetin equivalent/ 100 g **ผงใบแห้ง** เช่นเดียวกับฤทธิ์ด้านออกซิเดชันซึ่งพบว่าตัวอย่างจากเชียงใหม่แสดงฤทธิ์ดีที่สุด โดยแสดงค่า IC_{50} ที่ 39.73 ± 0.64 $\mu\text{g/ml}$ 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) จึงเลือกสารสกัดใบมะรุมจากเชียงใหม่ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ต่อไป ส่วนผลการศึกษาลายพิมพ์ TLC (TLC fingerprints) ของสารสกัดหยาบจากตัวอย่างแต่ละแหล่ง พบว่ามีลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือประกอบด้วยแถบสีขององค์ประกอบหลัก 2 ชนิดซึ่งมีค่า Rf ตรงกับสารมาตรฐาน **chlorogenic acid** และ **isoquercetin**

จากการศึกษาทางเภสัชเวชพบว่าเนื้อเยื่อใบมะรุมประกอบด้วยลักษณะเฉพาะของปากใบชนิด 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 และ 7.92 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 มีความปลอดภัยสูงต่อเซลล์ เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (มีค่า $IC_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$) ไม่พบการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสารสกัดจากการทดสอบโดยวิธี Ames' test แต่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของเชื้อ TA98 และ TA100 ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารก่อการกลายพันธุ์มาตรฐาน โดยเฉพาะในสถานะที่มีการทำงานของเอนไซม์ตัวร่วมด้วย 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 การเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ AST และ ALP ปริมาณเกล็ดเลือดขาว และคลอไรด์ รวมทั้งปริมาณฮอร์โมนไทรอยด์ T3 และ T4 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับเพศของหนูทดลอง หรือปริมาณของสารสกัดใบมะรุมที่หนูได้รับ และไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อของอวัยวะสำคัญที่เกี่ยวข้อง

ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยเชื้อที่ไวที่สุดต่อสารสกัดใบมะรุม เมื่อเทียบกับเชื้ออื่นในที่นี่ คือ *Haemophilus influenza* ซึ่งแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (MBC) เพียง 0.1 mg/ml รองลงมาคือ *Streptococcus mutans* (0.2 mg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (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 สร้างแก๊ซ และ pyogenic cocci คือ *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* และ *S. pyogenes* ต้องใช้ปริมาณ 3.2 mg/ml และ 3.9 mg/ml สำหรับเชื้อ *Helicobacter pylori* ในขณะที่เชื้อคือ *Acinetobacter baumannii* และ *Staphylococcus aureus* จะต้องใช้สารสกัด $>3.2 \text{ mg/ml}$ สำหรับราที่ใช้ทดสอบ จะให้ค่าต่างกันเล็กน้อยระหว่างราเซลล์เดี่ยว คือ *Candida albicans* และ ราเส้นใย คือ *Trichophyton mentagrophytes* ที่ 1.6 mg/ml และ 1.3 mg/ml ตามลำดับ แต่ไม่พบฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียชนิด *Propionibacterium acnes* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบริเวณผิวหนังที่มีความเข้มข้น 1 – 10 mg/disc และพบว่าสารสกัดใบมะรุมด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ 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 โดยมีผลกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซตชนิดทีเซลล์ (T cell lymphocyte) และบีเซลล์ที่ขึ้นกับทีเซลล์ (T-cell dependent B cell lymphocyte) นอกจากนี้พบว่าสารสกัดเอทานอลของใบมะรุม มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับมนุษย์ชนิด Chang liver cell

สรุปผลการวิจัยนี้ ได้ข้อมูลที่สามารถอ้างอิงทางวิชาการด้านพิษเคมี ข้อมูลด้านคุณค่าทางอาหาร ข้อมูลในการจัดทำมาตรฐานของใบมะรุมในประเทศไทย และข้อมูลเบื้องต้นสำหรับมาตรฐานของสารสกัดใบมะรุมซึ่งการกำหนดมาตรฐานของสารสกัดใบมะรุมต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ส่วนผลการศึกษาด้านพิษวิทยาสรุพบว่า สารสกัดใบมะรุมด้วย 70%เอทานอล มีความปลอดภัยค่อนข้างสูง แต่ควรระวังการใช้ในผู้ที่มีการทำงานของตับและไตบกพร่องด้วย นอกจากนี้ พบว่า สารสกัดใบมะรุมมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ 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 pharmacognostic 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 phytochemical 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 Chiangmai were found to be the highest contents (total phenolic 8.73 ± 0.48 g gallic acid equivalent/ 100 g **extract**, and 3.40 ± 0.14 g gallic acid equivalent/ 100 g **dried powder**; total flavonoids 8.96 ± 0.11 g 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 Chiangmai also promoted the highest antioxidant activity with IC_{50} of 39.73 ± 0.64 $\mu\text{g/ml}$ 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 Chiangmai 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 R_f 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 ($IC_{50} > 400$ $\mu\text{g/ml}$). 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 aureus*, 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.
