

บทคัดย่อ

มะกั้งเป็นพืชในวงศ์แตง ซึ่งเป็นพืชหายากที่ใกล้สูญพันธุ์ มีสรรพคุณทางยา มีการใช้ใบในการรักษาโรคทางเดินหายใจ และลดไข้ ในส่วนของเนื้อผลใช้ลดการติดเชื้อแบคทีเรียที่เท้า ในบางชุมชนใช้สำหรับไล่แมลง ไร น้ำมันจากผลใช้เป็นส่วประกอบทางยา และใช้ชโลมผิวหนังสำหรับหญิงหลังคลอดบุตร การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดมะกั้ง นำส่วนของใบ เถา เนื้อผล มาสกัดด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องด้วย Soxhlet's apparatus โดยใช้ 95 % เอทานอล เป็นตัวทำละลาย และเนื้อในเมล็ดส่วนหนึ่งนำไปสกัดต่อเนื่องด้วย Soxhlet's apparatus โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์อีเทอร์ และคลอโรฟอร์มเป็นตัวทำละลาย และอีกส่วนนำไปบีบน้ำมันโดยใช้วิธีการบีบเย็นเครื่องชนิดอัดเกลียว ปริมาณผลผลิตของสารสกัดแอลกอฮอล์จากส่วนใบ, เถา และเนื้อผล มีปริมาณดังนี้ 9.85 ± 1.61 , 6.24 ± 3.12 and 10.75 ± 4.35 % w/w ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จาก ใบ เถา เนื้อผลพบสารพวกกลุ่มฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน สเตอรอล และแทนนิน สำหรับน้ำมันมะกั้ง พบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันมะกั้ง ส่วนใหญ่เป็น Linoleic acid 47.01 g/100g และ Oleic acid 14.92 g/100g สารสกัดแต่ละส่วนที่ได้ นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ก่อมะเร็งและต้านมะเร็งในแบคทีเรียด้วยการทดสอบเอมส์ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ผลพบว่าสารสกัดทุกส่วนของมะกั้งไม่จัดว่าสารสกัดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Candida albican* ในการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกั้ง รวมถึงความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ฆ่าและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะกั้งส่วนต่าง ๆ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดมะกั้งไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา อัยพีมิวเรียมสายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในสถานะที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น และพบว่าในสถานะที่มีเอนไซม์กระตุ้นสารสกัดมะกั้งมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ MeIQ และ AFB₁ ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา อัยพีมิวเรียม โดยเถาที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วย MeIQ ได้สูงสุด ส่วนผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วย AFB₁ ได้สูงสุด แต่ในสถานะที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้นสารสกัดมะกั้งส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ AF-2 และ NaN₃ ยกเว้นสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลเท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์อย่างอ่อนจากการเหนี่ยวนำด้วย AF-2 ได้ ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดมะกั้งทุกส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งโดยออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดได้ต่างกัน โดยสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดได้ดีที่สุด ส่วนสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์อีเทอร์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับได้ดีที่สุด แต่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่พบว่าทั้งสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดมะกั้งส่วนต่างๆ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดเถาที่สกัดด้วยเอทานอล

มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลได้สูงที่สุด ส่วนสารสกัดใบที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และมีความสามารถในการกำจัดเหล็กได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามสารสกัดมะกั้งไม่สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านมะเร็ง quinone reductase ได้

Abstract

Making (*Hodgsonia heteroclita* subsp. *indochinensis*); a rare and endangers species, member in a family Cucurbitaceae. Leaves in Indigenous wisdom have been used as medicine for respiratory tract ailments and antipyretic. Flesh fruit of Making used for antibacterial or in some area used as insect repellent while fixed oil used as an ingredient in recipe and skin nourishing for women after childbirth. Chemical constituents and biological activities of *H. heteroclita* subsp. *Indochinensis* were studied. Each part of leaves, stem and flesh fruit was separately extracted with Soxhlet's apparatus using 95 % ethanol as solvent. The oil-rich cotyledons were divided into 2 parts; one was extracted with Soxhlet's apparatus using petroleum ether and chloroform as solvents and another one was prepared by using screw press. The percentage yield of alcoholic extracts from leaves, stem and flesh fruit were 9.85 ± 1.61 , 6.24 ± 3.12 and 10.75 ± 4.35 % w/w, respectively. The result of phytochemical screening of all extracts found that flavonoids, anthraquinones, sterols and tannins were major phytochemical groups. Linoleic acid (47.01 g/100 g) and oleic acid (14.92 g/100 g) were major fatty acid found in Making oil. Each fractions of alcoholic extracts was evaluated their antioxidant activities, antimutagenicity and mutagenicity by aims test, cytotoxicity test and antimicrobial activities. As results, all fractions did not showed significant results in antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albican*. Anti-mutagenicity and mutagenicity by aims test, cytotoxicity test and also capacity of quinone reductase inducer were studied in each extracts. The results revealed that the extracts of Making had no mutagenesis to *Salmonella typhimurium* strain TA 98 and TA100 in condition with and without enzymatic activation. Interestingly, in the condition with enzymatic activation the Making extracts showed anti-mutagenesis to *S. typhimurium* using MeIQ and AFB₁ as mutagens. The most potent was found in the extracts from stem (mutated with MeIQ) and flesh fruit (mutated with AFB₁). However, in the absence of enzymatic activation, almost of the extracts had no anti-mutagenesis to *S. typhimurium* strain mutated with AF-2 and NaN₃ except the extract of flesh fruit. Moreover, all of the extracts demonstrated of cytotoxicity with different potency. The extract of flesh fruit showed cytotoxicity in lung cancer cell line while petroleum ether extract of the oil-rich cotyledons gave high cytotoxicity in hepatic cancer cell line. Cytotoxicity of colon cancer cell line was found that the extract of flesh fruit and the oil-rich cotyledons gave

high cytotoxicity. In addition, all fractions of the Making extracts gave antioxidant activities with different potency. The extract of stem revealed the most potent in hydroxyl free radical scavenging activity while the leaves extract gave potent activity in DPPH assay and FRAP assay. But all fractions did not induce quinone reductase.

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พืชสกุล *Hodgsonia* จัดอยู่ในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) เป็นไม้เถา มีเนื้อไม้สกุล *Hodgsonia* มีสมาชิกเพียง 2 ชนิดทั่วโลก มีเขตการกระจายพันธุ์กว้างตั้งแต่ภูฏาน สิบิม อินเดีย จีนตอนใต้ พม่า ภูมิภาคอินโดจีน บอร์เนียว และชวา ในไทยพบทั้งสองชนิด คือ มะกั้ง (*Hodgsonia heteroclita* subsp. *Indochinensis*) และ น้ำเต้าผี หรือ มันทู (*H. macrocarpa* หรือ *H. heteroclita* subsp. *Heteroclita*)

มะกั้ง (*Hodgsonia heteroclita* subsp. *Indochinensis*) เป็นไม้เถา ยาวได้ประมาณ 30 ม. ใบรูปฝ่ามือ ส่วนมากมี 5 แฉก ขอบเรียบ บางครั้งจักฟันเลื่อยห่างๆ แผ่นใบเกลี้ยง มีต่อมขนาดเล็กประปราย มี nectar glands สีเขียวบนเกล็ดประดับดอกแยกเพศ ในดอกเพศเมีย ออวูลมี 10 – 15 เม็ด ผลกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 – 20 ซม. ผิวเกลี้ยง สีเขียวอมน้ำตาลหรือสีเขียวอ่อนด้าน ไพรินยาว 3 – 7 ซม. แต่ละไพรินมี 1 – 3 เมล็ด การกระจายตัวของพืชทั้งสองชนิดแตกต่างกันคือ มะกั้งมีเขตการกระจายพันธุ์กว้าง ในไทยพบกระจายห่างๆ ทั่วทุกภาค ยกเว้นภาคใต้ ขึ้นในป่าดิบแล้ง และป่าดิบเขา ระดับความสูง 800 – 1000 เมตร ในขณะที่น้ำเต้าผีมีเขตการกระจายพันธุ์เฉพาะคาบสมุทรมลายู บอร์เนียว สุมาตรา และชวา ในไทยพบเฉพาะทางภาคใต้ ขึ้นกระจายห่างๆ ในป่าดิบชื้น ระดับความสูงจนถึงประมาณ 1000 เมตร

พืชสกุลมะกั้ง มีเมล็ดขนาดใหญ่สีเหลืองฟาง มีน้ำมันถึง 50 – 60 % สามารถรับประทานหรือใช้ประกอบอาหารได้ เมล็ดนำไปเผาไฟให้สุก รับประทานมีรสหวานมัน เมื่อนำไปปิ้งจะมีรสชาติดี คล้ายกับเนื้อหมู จึงมีชื่อเรียกว่า pork fat nut มีการศึกษาโดยทีมนักวิจัยและได้แนะนำว่าน่าจะพัฒนาให้เป็นพืชเศรษฐกิจต่อไป เนื่องจากมะกั้งมีศักยภาพในแง่ของพืชน้ำมันสำหรับอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น น้ำมันสำหรับบริโภค หรือใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง นอกจากนี้มะกั้งมีสรรพคุณทางยา มีการใช้ใบในการรักษาโรคทางเดินหายใจ และลดไข้ ในส่วนของเนื้อผลใช้ลดการติดเชื้อแบคทีเรียที่เท้า ในบางชุมชนใช้สำหรับไล่แมลง ไร น้ำมันจากผลใช้เป็นส่วประกอบทางยา และใช้ชโลมผิวหนังสำหรับหญิงหลังคลอดบุตร ในประเทศอินเดีย พบว่าน้ำต้มจากเมล็ด *H. heteroclita* (Roxb.) Hk.f. et T. ใช้รักษาอาการไม่ปกติในระบบทางเดินปัสสาวะ

มีรายงานว่า มะกั้ง 1 ต้น มีศักยภาพในการให้ปริมาณน้ำมัน 2.5 – 10 ลิตร/ต้น/ปี ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและการดูแลรักษา แต่มะกั้งยังเป็นพืชที่มีข้อมูลรายงานการศึกษาทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพไม่มากนัก โดยเฉพาะในส่วนต่าง ๆ เช่น ใบ ลำต้น เนื้อผล จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาข้อมูลเหล่านี้เพิ่มเติม เนื่องจากมะกั้งเป็นพืชที่หายากที่มีแนวโน้มที่จะสูญพันธุ์ หากมีข้อมูลสนับสนุนในการใช้ประโยชน์

ในส่วนน้ำมันและส่วนอื่นๆ ของพืชชนิดนี้จะก่อให้เกิดกระแสการอนุรักษ์ การตื่นตัวในการขยายพันธุ์พืช ซึ่งจะส่งผลถึงการอนุรักษ์อย่างยั่งยืนสืบไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันมะกั้งและสารสกัดส่วนต่าง ๆ
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ก่อมะเร็ง ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของน้ำมันมะกั้งและสารสกัดส่วนต่าง ๆ
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันมะกั้งและสารสกัดส่วนต่าง ๆ
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของน้ำมันมะกั้งและสารสกัดส่วนต่าง ๆ

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 มะกิ้ง

พืชสกุล *Hodgsonia* จัดอยู่ในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) เป็นไม้เถา มีเนื้อไม้ สกุน *Hodgsonia* มีสมาชิกเพียง 2 ชนิดทั่วโลก มีเขตการกระจายพันธุ์กว้างตั้งแต่ ภูฏาน สิบิม อินเดีย จีนตอนใต้ พม่า ภูมิภาคอินโดจีน บอร์เนียว และชวา ในไทยพบทั้งสองชนิด คือ มะกิ้ง (*Hodgsonia heteroclita* subsp. *indochinensis*) และ น้ำเต้าผี หรือ มันทู (*H. macrocarpa* หรือ *H. heteroclita* subsp. *heteroclita*) (เต็ม 2001; Wilde and Duyfjes 2001; Wilde and Duyfjes 2008)

มะกิ้ง (*Hodgsonia heteroclita* subsp. *indochinensis*) เป็นไม้เถา ยาวได้ประมาณ 30 ม. ใบรูปฝ่ามือ ส่วนมากมี 5 แฉก ขอบเรียบ บางครั้งจักฟันเลื่อยห่าง ๆ แผ่นใบเกลี้ยง มีต่อมขนาดเล็กประปราย มี nectar glands สีเขียวบนเกล็ดประดับ ดอกแยกเพศ ในดอกเพศเมีย ออกลูมี 10-15 เม็ด ผลกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 15-20 ซม. ผิวเกลี้ยง สีเขียวอมน้ำตาลหรือสีเขียวอ่อนด้าน ไพรินยาว 3-7 ซม. แต่ละไพรินมี 1-3 เมล็ด (Wilde and Duyfjes 2001; Wilde and Duyfjes 2008)

การกระจายตัวของพืชทั้งสองชนิดแตกต่างกันคือ มะกิ้งมีเขตการกระจายพันธุ์กว้าง ในไทยพบกระจายห่าง ๆ ทั่วทุกภาค ยกเว้นภาคใต้ ขึ้นในป่าดิบแล้ง และป่าดิบเขา ระดับความสูง 800-1000 เมตร ในขณะที่น้ำเต้าผีมีเขตการกระจายพันธุ์เฉพาะคาบสมุทรมลายู บอร์เนียว สุมาตรา และชวา ในไทยพบเฉพาะทางภาคใต้ ขึ้นกระจายห่าง ๆ ในป่าดิบชื้น ระดับความสูงจนถึงประมาณ 1,000 เมตร

พืชสกุลมะกิ้ง มีเมล็ดขนาดใหญ่สีเหลืองฟาง มีน้ำมันถึง 50-60 % สามารถรับประทานหรือใช้ประกอบอาหารได้ เมล็ดนำไปเผาไฟให้สุกรับประทานมีรสหวานมัน (ศูนย์ข้อมูลพืช สำนักวิชาการ-วิจัย องค์การสวนพฤกษศาสตร์ 2547) มะกิ้งมีสรรพคุณทางยา มีการใช้ใบในการรักษาโรคทางเดินหายใจ และลดไข้ ในส่วนของเนื้อผลใช้ลดการติดเชื้อแบคทีเรียที่เท้า ในบางชุมชนใช้สำหรับไล่แมลง ไร น้ำมันจากผลใช้เป็น ส่วนประกอบทางยา และใช้ชโลมผิวหนังสำหรับหญิงหลังคลอดบุตร ในประเทศอินเดีย พบว่าน้ำต้มจากเมล็ด *H. heteroclita* (Roxb.) Hk.f. et T. ใช้รักษาอาการไม่ปกติในระบบทางเดินปัสสาวะ (Sharma H.K. et al. 2001)

2.2 ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ก่อมะเร็ง และฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

เป็นที่ทราบกันดีว่ากลไกการเกิดมะเร็งประกอบด้วยหลายตอน ได้แก่ ขึ้นเริ่มต้น ขึ้นส่งเสริม และขึ้นลุกลาม ทำให้การป้องกันและรักษามะเร็งมีได้หลากหลายรูปแบบ การป้องกันมะเร็งโดยใช้สารเคมีที่พบในผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ มีจุดประสงค์หลักคือ หยุดยั้งขบวนการเกิดมะเร็งหรือทำให้ขบวนการเกิดมะเร็งนั้นถดถอยกลับ โดยการออกฤทธิ์ของสารป้องกันมะเร็งประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่ยับยั้งการก่อ

หรือกระตุ้นให้สารก่อมะเร็งทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมในเซลล์ (blocking agents) และกลุ่มที่ยับยั้งการพัฒนาเซลล์มะเร็ง (suppressing agents)

การออกฤทธิ์ของ blocking agents นั้นจะเป็นการยับยั้งการสร้างหรือเปลี่ยนแปลงสารก่อมะเร็งไม่ให้ออกฤทธิ์ก่อมะเร็งด้วยการยับยั้งเอนไซม์กำจัดสารแปลกปลอม (xenobiotic-metabolizing enzymes) โดยเฉพาะกลุ่มเอนไซม์ cytochrome P450 หรือการเหนี่ยวนำการทำลายฤทธิ์หรือลดความว่องไวต่อปฏิกิริยาของสารก่อมะเร็งลงโดยการรวมกับโมเลกุลมีขั้ว เช่น glucuronide หรือ glutathione รวมถึงการกำจัดอนุมูลอิสระที่มาจากการกระตุ้นสารก่อมะเร็ง เช่น เอนไซม์ Quinone reductase ดังนั้นการเหนี่ยวนำเอนไซม์เหล่านี้ จึงช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งอีกทางหนึ่ง

ในทางตรงกันข้าม suppressing agents จะออกฤทธิ์ยับยั้งการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง กล่าวคือสารในกลุ่มนี้จะยับยั้งกระบวนการพัฒนาและลูกหลานของเซลล์มะเร็ง โดยยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยมีผลต่อการดำเนินไปของวัฏจักรเซลล์ เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบ อะพอพโตซิส รวมถึงชะลอกระบวนการลูกหลานของเซลล์มะเร็ง เช่น การยับยั้งการแพร่กระจาย หรือการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ การประเมินฤทธิ์ก่อมะเร็งและฤทธิ์ต้านมะเร็งมีความสำคัญในการบ่งบอกว่าสารเคมีในสิ่งแวดล้อมเหล่านั้นมีอันตรายหรือปลอดภัยต่อสุขภาพ และสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติสามารถป้องกันและ/หรือรักษามะเร็งได้หรือไม่

การทดสอบการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา อัยพิมิวเรียม (Ames' test) เป็นวิธีทดสอบมาตรฐานที่นิยมใช้กันมากในการวิเคราะห์หาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (mutagenicity) ของสารเคมี เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว ได้ผลการทดลองออกมาในเวลาเพียง 3 วัน ซึ่งรวดเร็วเมื่อเทียบกับการทดสอบการกลายพันธุ์โดยเทคนิคอื่นๆ วิธีการนี้จึงเหมาะสมในการประเมินฤทธิ์ก่อมะเร็งจากสารเคมีในระยะสั้น และใช้เป็นแนวทางการทดลองฤทธิ์การก่อมะเร็งโดยการทดสอบระยะยาว (long-term carcinogenicity test) ในปัจจุบันการทดสอบเอมส์ยังใช้ประยุกต์ในการคัดกรองหาสารต้านมะเร็งจากสมุนไพรไทยโดยการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดการกลายพันธุ์จากสารก่อกลายพันธุ์ที่เหนี่ยวนำให้แบคทีเรียกลายพันธุ์

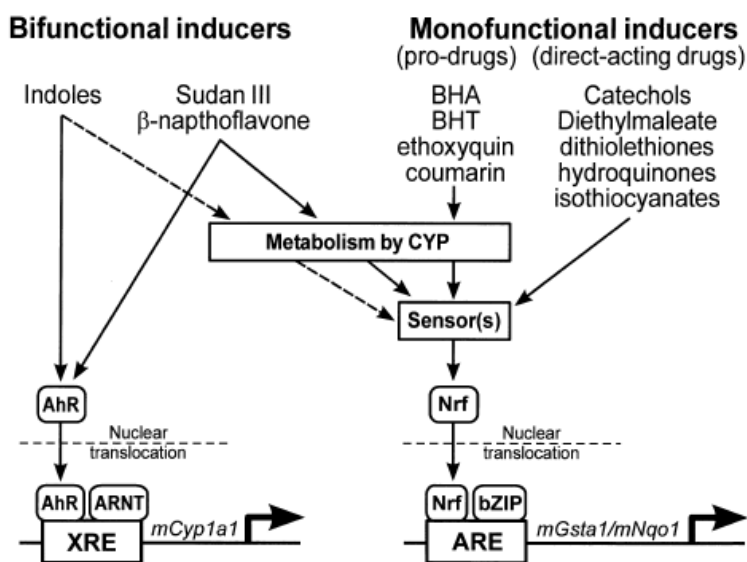
2.3 การเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอไลต์สารพิษ

ตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอไลต์สารพิษ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- 1) Bifunctional inducer เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ทั้ง phase 1 และ 2 ของกระบวนการกำจัดสารพิษในร่างกาย โดยตัวเหนี่ยวนำกลุ่มนี้จะจับกับ aromatic hydrocarbon receptor (AhR) แล้วเคลื่อนที่ไปยังนิวเคลียสเพื่อจับกับส่วน xenobiotic responsive element (XRE) ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ใน phase 1 เช่น เอนไซม์ cytochrome P450 ทำให้เกิดการกระตุ้นยีนดังกล่าวทำให้ตัวเหนี่ยวนำมีความว่องไวต่อการทำปฏิกิริยามากขึ้น ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ

เอนไซม์ใน phase 2 แสดงดังภาพ 2.1 ซึ่งสารที่เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสารก่อมะเร็ง และส่งเสริมการเกิดมะเร็ง เช่น phenobarbital, β -naphthoflavone และสารประกอบกลุ่ม polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Prochaska H.J., 1988 และ Favreau L.V., 1991)

- 2) Monofunctional inducer เป็นตัวเหนี่ยวนำที่มีคุณสมบัติเป็น electrophile หรือเปลี่ยนเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น electrophile โดยเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์เฉพาะใน phase 2 เท่านั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ glutathione S-transferase และ quinone reductase (DT-diaphorase) สารที่เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ในกลุ่มนี้มักจะพบในสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารประกอบ polyphenol, isothiocyanates และ hydroquinones (Kensler TW., 1997)



ภาพ 2.1 กลไกการเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอไลต์สารพิษ (Heyes *et al.*, 2001)

2.4 Quinone reductase

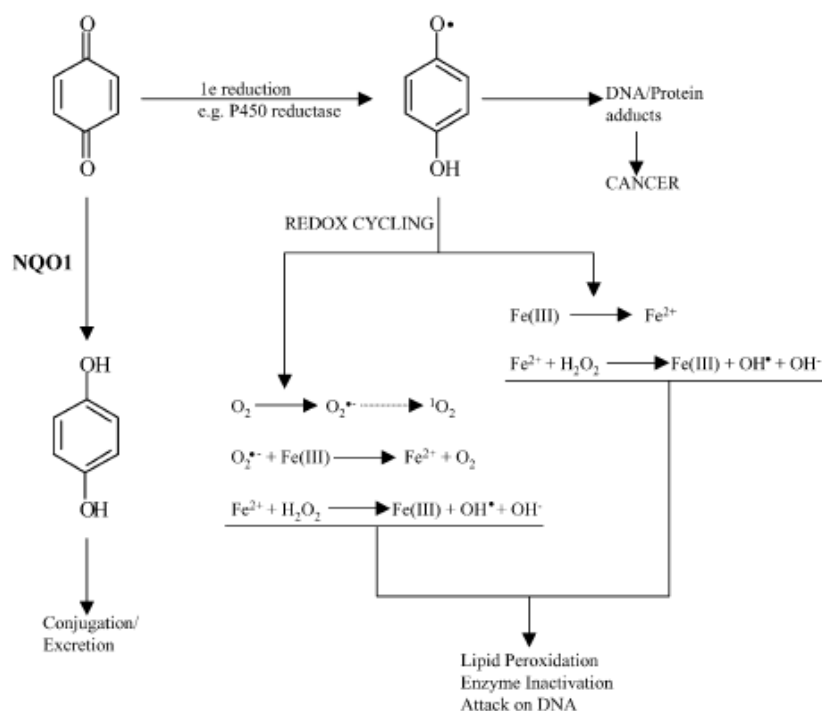
การทำงานของเอนไซม์ใน phase 2 ในการกำจัดสารพิษเป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันการเกิดมะเร็งได้ โดยเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ glutathione S-transferase, epoxide hydrolase, UDP-glucuronosyl transferase และ quinone reductase ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์หลักที่มีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็ง

เอนไซม์ quinone reductase หรือ DT-diaphorase หรือ NAD(P)H: quinone oxidoreductase (EC 1.6.99.2) เป็นฟลาโวเอนไซม์ (Flavoenzyme) ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 55,000 ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยที่เหมือนกัน และมี FAD เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ทั่วไปในยูคาริโอต (Eukaryote) และแต่ละเนื้อเยื่อมีปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน พบมากในส่วนของไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับมากที่สุด

นอกจากนี้ยังพบได้ทั้งที่กระเพาะอาหาร กระเพาะปัสสาวะ และลำไส้ เป็นต้น แต่จะพบได้น้อยในเซลล์เม็ดเลือด โดยทั่วไปเซลล์มะเร็งจะมีกัมมันตภาพของเอนไซม์ชนิดนี้ (Enzyme activity) สูงกว่าเซลล์ปกติเมื่อเทียบจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน และมีปริมาณแตกต่างกันในเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด (Riley R.J., 1992 และ Miranda C.L., 2000)

เอนไซม์ quinone reductase จัดเป็นเอนไซม์ต้านมะเร็งที่มีหน้าที่กำจัดความเป็นพิษของสารพิษ โดยมีหน้าที่ลดการเกิด oxidative damage จากอนุมูลอิสระที่เกิดในปฏิกิริยา reduction อิเล็กตรอน 1 ตัวของสารประกอบ quinone แสดงดังภาพ 2.2 เมื่อสารประกอบ quinone รับอิเล็กตรอนจาก NADPH โดยอาศัยเอนไซม์ NADPH-Cytochrome P450 reductase ได้เป็น semiquinone ซึ่งแสดงฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (Mutagenicity) เมื่อทำการทดสอบ Ames' test โดย semiquinone ที่เกิดจากการรีดิวส์ quinone จะถูก reoxidize โดยออกซิเจนได้เป็นซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง จากนั้นเอนไซม์ superoxide dismutase และ ferrous ion จะเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และอนุมูลไฮดรอกซิล ($OH^\bullet$) ตามลำดับ ซึ่งสามารถทำลายเมมเบรน และเอนไซม์ภายในเซลล์ ดังนั้น semiquinone จึงมีคุณสมบัติเป็นทั้ง mutagen และ carcinogen และยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์อีกด้วย อย่างไรก็ตามเอนไซม์ quinone reductase มีหน้าที่รีดิวส์อิเล็กตรอน 2 ตัวในสารประกอบ quinone ได้เป็น hydroquinone ซึ่งสามารถจับกับสารโมเลกุลใหญ่ที่ละลายน้ำได้ เช่น กลูตาไธโอน (Glutathione) และ glucuronic acid ทำให้ขับออกจากร่างกายได้ (Nioi P., 2004)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ quinone reductase ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสัตว์ทดลองทำให้ลดการเกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองที่ได้รับสารก่อมะเร็งได้ และพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งในหนูขาวได้เนื่องจากไปกระตุ้นเอนไซม์ quinone reductase (Prochaska H., 1987) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการกำจัดสารพิษจึงเป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันการเกิดมะเร็งได้ การศึกษาการเหนี่ยวนำของเอนไซม์ quinone reductase สามารถทดลองได้ทั้งในสัตว์ทดลองและการเพาะเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง ซึ่งเซลล์ที่เป็นที่นิยม ได้แก่ เซลล์มะเร็งตับหนู hepa1c1c7 โดยมีการศึกษาพบว่าสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เช่น quercetin, genistin และ resveratrol ที่ได้จากสารสกัดอุนสามารถเหนี่ยวนำกัมมันตภาพเอนไซม์ quinone reductase ในเซลล์มะเร็งตับหนู hepa1c1c7 ได้เพิ่มมากขึ้น (Yang J., 2009)



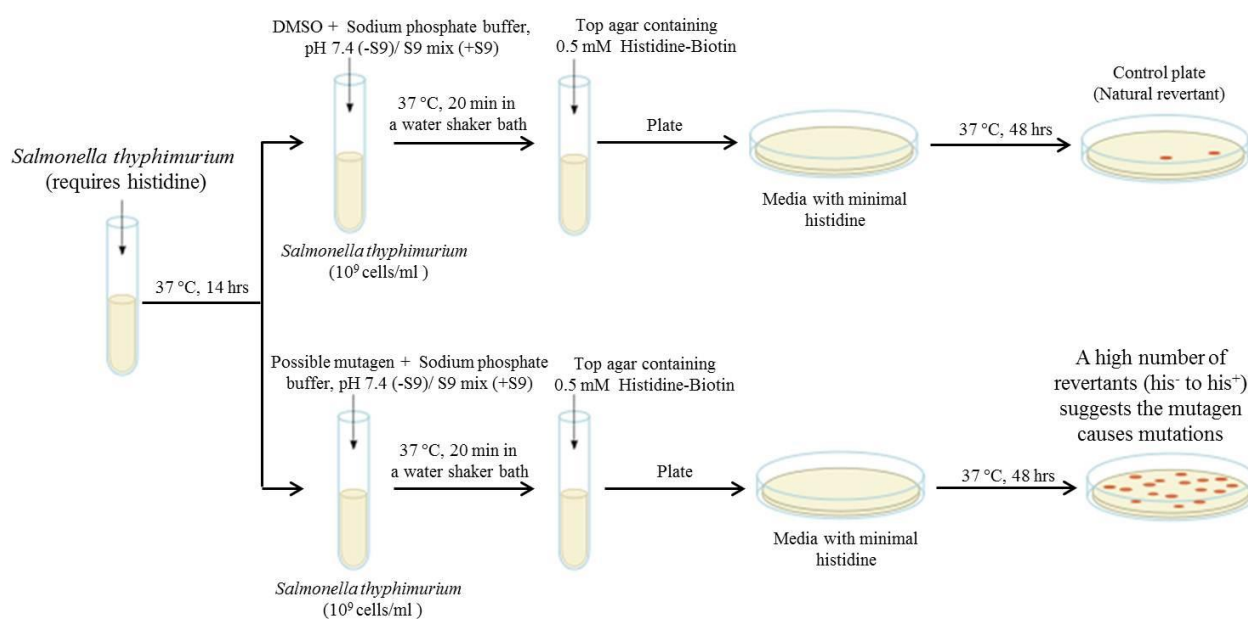
ภาพ 2.2 เมตาบอลิซึมของสารประกอบ quinone และบทบาทของเอนไซม์ quinone reductase (Nioi *et al.*, 2004)

2.5 การประเมินฤทธิ์ก่อมะเร็งจากสารเคมี

การทดสอบการเกิดมะเร็งจากสารเคมีเป็นวิธีการที่ใช้ศึกษาความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกิดมะเร็งของสารเคมีรวมทั้งกลไกของการเกิดมะเร็ง สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 วิธี ได้แก่ การทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งระยะสั้น (Short-term carcinogenicity test) การทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งแบบระยะกลาง (Medium-term carcinogenicity Test) และการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งแบบระยะยาว (Long-term Carcinogenicity Test) โดยพบว่าการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งแบบระยะยาว เป็นวิธีการทดสอบที่ให้ผลน่าเชื่อถือมากที่สุดแต่ใช้ระยะเวลาในการทดลองประมาณ 2 ปี ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง รวมทั้งใช้ปริมาณสารทดสอบและสัตว์ทดลองจำนวนมากจึงทำให้ในปัจจุบันมีการใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งในระยะสั้นและระยะกลางแทน (Jena B., 2005)

การทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งระยะสั้น (Short-term carcinogenicity test) เป็นการศึกษาฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ของสารเคมี ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่เกิดขึ้นในระยะก่อตัว (Initiation stage) ของการเกิดมะเร็ง การทดสอบดังกล่าวที่นิยมใช้กันในปัจจุบันเป็นเกณฑ์มาตรฐาน ได้แก่ Bacterial mutation assay (Ames test), Chromosomal aberration test และ Micronucleus test (Milman H.A., 1983) เป็นต้น การทดสอบเหล่านี้มีข้อดีคือ ใช้ระยะเวลาในการทดสอบสั้นและค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก อีกทั้งผลการทดลองค่อนข้างสอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งระยะยาวจึงใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อเป็นแนวทางการทดลองฤทธิ์ก่อมะเร็งแบบระยะยาวได้อีกด้วย

Bacterial mutation assay (Ames test) เป็นการทดสอบที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้คัดกรองหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารเคมีหรือสารสกัดสมุนไพร ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธัยฟิมูเรียม (*Salmonella typhimurium*) ซึ่งเป็นการทดสอบการกลายพันธุ์แบบย้อนกลับ (Reverse mutation) เนื่องจากแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้ถูกทำให้กลายพันธุ์ไปจนไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน histidine ได้ ทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารที่ไม่มีกรดอะมิโนชนิดนี้ได้ เรียกว่า "Histidine dependent" (His-) สารทดสอบที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์จะทำให้แบคทีเรียชนิดนี้เกิดการกลายพันธุ์ย้อนกลับ สามารถสร้าง histidine ได้เองเป็น "Histidine independent" (His+) (Flamand N, 2001) นอกจากนี้สารบางตัวมีคุณสมบัติเป็น pro-mutagen เมื่อเข้าไปสู่ร่างกายจะต้องอาศัยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารโดย เอนไซม์ที่ตับเปลี่ยนให้เป็น active metabolite ที่มีฤทธิ์เป็น mutagen ดังนั้นในการทดสอบแอมส์ได้เพิ่มการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ได้จากตับหนู (S_9) เพื่อเป็นการจำลองการเกิด metabolism ในร่างกายเพื่อเปลี่ยน pro-mutagen ให้เป็น mutagen ทำให้การทดสอบแอมส์สามารถที่จะคัดกรองหาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในสารพวก pro-mutagen ได้อีกด้วย ข้อดีของการทดสอบด้วยวิธีนี้คือสามารถทำได้ง่าย สะดวก ราคาถูก และให้ผลเร็วกว่าการทดลองในสัตว์ทดลอง (Mortelmans K., 2000) โดยสามารถรู้ผลอย่างคร่าวๆ ได้ใน 2-3 วัน และนิยมใช้เป็นวิธีการทดสอบวิธีแรกที่ต้องทำในการศึกษาสารก่อกลายพันธุ์หรือสารก่อมะเร็ง เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการตัดสินใจศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากถ้าสารใดที่สามารถ ทำให้เกิด DNA damage และเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ใน แบคทีเรีย อาจส่งผลให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ใน mammalian cells ได้เช่นเดียวกัน ขั้นตอนและวิธีการทดสอบ แสดงดังภาพ 2.3



ภาพ 2.3 ขั้นตอนการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในการทดสอบแอมส์

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การสกัดสารองค์ประกอบสำคัญจากมะกั้ง

1. ตัวอย่างมะกั้ง เก็บจากจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน ซึ่งนำมาแยกส่วน ได้แก่ เปลือก-เนื้อผล เนื้อในเมล็ด เถา และใบ
2. แต่ละส่วนของตัวอย่างมะกั้งนำมาสกัดด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องด้วย Soxhlet's apparatus โดยใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน ดังนี้
 - ชุดที่ 1 เนื้อเมล็ดสกัดด้วยตัวทำละลายตามลำดับ ดังนี้ petroleum ether, chloroform และ 95 % Ethanol
 - ชุดที่ 2 ส่วนใบ เถา เปลือก-เนื้อผล สกัดด้วย 95 % Ethanol
3. แต่ละตัวอย่างใช้เวลาสกัด รอบละ 6 ชม. จำนวน 2 รอบ สารสกัดที่ได้นำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยชนิดลดความดัน

3.2 การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกั้งในแบคทีเรีย

การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกั้ง ได้แก่ ใบ เถา ผลเนื้อ และเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์ และเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม โดยใช้วิธีการทดสอบเอมส์ แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบคือ ซัลโมเนลลา ติฟิมูริยม (*Salmonella typhimurium*) สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งใช้ทดสอบการกลายพันธุ์แบบ frame shift และ base-pair substitution ตามลำดับ ทั้งในสภาวะที่เติมและไม่เติมเอนไซม์จากตับหนู (S9 mix) เพื่อทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น โดยใช้ DMSO เป็น negative control และสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน 2-aminoanthracene (2-AA) และ 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) เป็น positive control ในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้นตามลำดับ โดยผสมแบคทีเรีย, สารทดสอบ (DMSO หรือสารสกัดมะกั้งที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน) และบัพเฟอร์ (กรณีที่ไม่เอนไซม์กระตุ้น) หรือ S9 mix (กรณีที่มีเอนไซม์กระตุ้น) แล้ว incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่กลายพันธุ์เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เป็น negative control เพื่อนำมาหาค่า mutagenicity index (MI) ของสารสกัด ถ้าค่า MI มากกว่า 2 แสดงว่าสารทดสอบมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์

การศึกษาฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกั้ง โดยเหินยวนำให้แบคทีเรียซัลโมเนลลา ติฟิมูริยมสายพันธุ์ TA98 เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ 3-methyl-and 3,4-dimethyl-3H-imidazo (4,5-f) quinolin-2-amine (MeIQ) และ 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) ส่วน Aflatoxin B₁ (AFB₁) และ Sodium azide (NaN₃) เหินยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ติฟิมูริยมสายพันธุ์ TA100 ในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ตามลำดับ โดยผสมแบคทีเรีย สารสกัด

มะกึ่งที่ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ สารก่อกลายพันธุ์ในความเข้มข้นที่เหมาะสม และบัพเฟอร์ (กรณีที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น) หรือ S9 mix (กรณีที่มีเอนไซม์กระตุ้น) แล้ว incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงบนอาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่กลายพันธุ์เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีเฉพาะสารก่อกลายพันธุ์อย่างเดียว เพื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) การกลายพันธุ์ของสารสกัด จากนั้นหา antimutagenic score ดังตาราง 3.1 เพื่อบ่งชี้ว่าสารสกัดชนิดใดมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ได้มากที่สุด

ตาราง 3.1 Antimutagenic score

% Inhibition	Antimutagenic score	Antimutagenicity
มากกว่า 90	+4	Very strong antimutagenicity
71 – 90	+3	Strong antimutagenicity
51 – 70	+2	Moderate antimutagenicity
31 – 50	+1	Mild antimutagenicity
0 – 30	0	No antimutagenicity
-30 - 0	0	No antimutagenicity
น้อยกว่า -30	-0	Co-mutagenicity

3.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากมะกึ่ง

นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน และสายพันธุ์ดื้อยา ทั้งนี้ได้วิเคราะห์หาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อด้วยวิธี agar diffusion method ซึ่งแสดงออกในรูปของค่าเฉลี่ยของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมผลบวกและลบคือ สารสกัดที่ไม่เจือจางและตัวทำละลายตามลำดับ และด้วยวิธี agar dilution method ซึ่งแสดงออกในรูปของค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ หน่วยเป็นมิลลิกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยมีขั้นตอนดังนี้

- เลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเหลว tryptic soy broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - ค่อยๆ หยดสารแขวนลอยของเชื้อทดสอบลงใน Mueller Hinton broth ที่ปราศจากเชื้อ จนปรับเทียบความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับสารละลาย McFarland No. 0.5 โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น (Densitometer) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
 - ป้ายเชื้อทดสอบที่ปรับความขุ่นแล้วลงบนผิวของอาหาร Mueller Hinton agar รอจนผิวหน้าแห้งแล้ววาง stainless steel cup เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลงบนผิวหน้าอาหาร

2. เติมสารสกัดที่ปรับความเข้มข้นแล้วลงใน cup ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
3. Cup ที่เติมตัวควบคุมผลบวกคือเติมสารละลายยาที่ยับยั้งเชื้อทดสอบแต่ละชนิดได้ และ Cup ที่เติมตัวควบคุมผลลบคือเติมเฉพาะ Mueller Hinton broth
4. เมื่อครบเวลานำมาทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร
5. สารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อทดสอบดีที่สุดที่สุดในข้อ 3 ของแต่ละเชื้อทดสอบจะถูกคัดเลือกมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อทดสอบ โดยนำสารสกัดที่ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นแล้ว 50 ไมโครลิตรมาเติมลงในอาหารเหลว Mueller Hinton broth 50 ไมโครลิตรที่เติมไว้ก่อนแล้วในหลุมที่ 1 ของจานทดสอบ 96 หลุม (96 well plate)
6. เจือจางสารละลายทดสอบดังกล่าวแบบลดลงครึ่งละ 2 เท่าในแต่ละหลุมของจานทดสอบ 96 หลุม
7. เติมเชื้อทดสอบที่ปรับความเข้มข้นแล้วเทียบเท่า 10^5 colony forming unit ต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมที่เตรียมไว้ในข้อ 5
8. ใน 2 แถวสุดท้ายเป็นหลุมควบคุมผลบวกคือเติมเฉพาะเชื้อทดสอบอย่างเดียว และหลุมควบคุมผลลบคือไม่มีการเติมเชื้อทดสอบลงไป
9. นำไปบ่มเพาะในตู้บ่มเชื้อ ณ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
10. อ่านผลการยับยั้งเชื้อในหลุมที่ไม่เห็นเชื้อทดสอบเจริญ แล้วนำเชื้อ 20 ไมโครลิตรมากระจายเชื้อลงบน Mueller Hinton Agar plate ก่อนนำไปบ่มเพาะในตู้บ่มเชื้อ ณ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
11. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อทดสอบร้อยละ 99 สามารถหาได้จากปริมาณโคโลนีเชื้อทดสอบที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยความเข้มข้นนี้จะต้องยอมให้เชื้อเจริญได้ไม่เกิน 10 โคโลนีต่อ plate

3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดจากมะกิ้ง

นำสารสกัดมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ทั้งสายพันธุ์อ้างอิงและสายพันธุ์ก่อโรค ทั้งนี้ได้วิเคราะห์หาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อด้วยวิธี agar diffusion method ซึ่งแสดงออกในรูปของค่าเฉลี่ยของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมผลบวกและลบคือ สารสกัดที่ไม่เจือจางและตัวทำละลายตามลำดับ และด้วยวิธี agar dilution method ซึ่งแสดงออกในรูปของค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเหลว Sabouraud dextrose broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - ค่อยๆ หยดสารแขวนลอยของเชื้อทดสอบลงใน Sabouraud dextrose broth ที่ปราศจากเชื้อ จนปรับเทียบความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับสารละลาย McFarland No. 0.5 โดยใช้เครื่องวัดความขุ่น (Densitometer) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
 - ป้ายเชื้อทดสอบที่ปรับความขุ่นแล้วลงบนผิวของอาหาร Sabouraud dextrose agar รอจนผิวหน้าแห้งแล้ววาง stainless steel cup เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ลงบนผิวหน้าอาหาร
2. เติมสารสกัดที่ปรับความเข้มข้นแล้วลงใน cup ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
3. Cup ที่เติมตัวควบคุมผลบวกคือเติมสารละลายยาที่ยับยั้งเชื้อทดสอบแต่ละชนิดได้ และ Cup ที่เติมตัวควบคุมผลลบคือเติมเฉพาะ Sabouraud dextrose broth
4. เมื่อครบเวลานำมาทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางในการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร
5. สารสกัดที่แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อทดสอบดีที่สุด ในข้อ 3 ของแต่ละเชื้อทดสอบจะถูกคัดเลือกมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อทดสอบ โดยนำสารสกัดที่ปรับความเข้มข้นเริ่มต้นแล้ว 50 ไมโครลิตรมาเติมลงในอาหารเหลว Sabouraud dextrose broth 50 ไมโครลิตรที่เติมไว้ก่อนแล้วในหลุมที่ 1 ของจานทดสอบ 96 หลุม (96 well plate)
6. เจือจางสารละลายทดสอบดังกล่าวแบบลดลงครึ่งละ 2 เท่าในแต่ละหลุมของจานทดสอบ 96 หลุม
7. เติมเชื้อทดสอบที่ปรับความขุ่นแล้ว 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุมที่เตรียมไว้ในข้อ 5
8. ใน 2 แถวสุดท้ายเป็นหลุมควบคุมผลบวกคือเติมเฉพาะเชื้อทดสอบอย่างเดียว และหลุมควบคุมผลลบคือไม่มีการเติมเชื้อทดสอบลงไป
9. นำไปบ่มเพาะในตู้บ่มเชื้อ ณ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
10. อ่านผลการยับยั้งเชื้อในหลุมที่ไม่เห็นเชื้อทดสอบเจริญ เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อทดสอบ

3.5 การศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงหุติยภูมิในหลอดทดลองของสารสกัดจากมะกั้ง

นำสารสกัดมาศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงหุติยภูมิในหลอดทดลอง ได้แก่เซลล์ P388 โดยประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี dye exclusion method และคำนวณค่า ED50 (median effective dose)

ทดสอบเซลล์ทดสอบได้แก่เซลล์ P388 ด้วยวิธี dye exclusion method ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 บ่มเพาะที่ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ หล่อเลี้ยง

ทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง P388 ของสารสกัดมะกั้งที่ความเข้มข้นต่างๆ เจือจางแบบเดียวกัน กับของสารสกัดที่ใช้ทดสอบใน agar dilution assay โดยมีสารสกัด ณ ความเข้มข้น 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นตัวควบคุมผลบวก (เมื่อนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วจะมีค่าความเข้มข้นอยู่ที่ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ 1% DMSO เป็นตัวควบคุมผลลบ

3.6 การศึกษาฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านมะเร็ง

การศึกษาผลของสารสกัดมะกั้งต่อการเหนี่ยวนำเอนไซม์ quinone reductase ในเซลล์มะเร็งตับหนู hepa1c1c7 ประยุกต์วิธีการของ Prochaska และคณะ (Prochaska H.J., 1988) โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดแรกเพาะเลี้ยงเซลล์ hepa1c1c7 ใน 96-well plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อเซลล์ยึดติดกับเพลตแล้ว ทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารทดสอบ และเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการแตกเซลล์แล้วเติมสารละลายผสมที่มี nitroblue tetrazolium dye ลงไป เมื่อปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์แล้วนำเพลตไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรโดย 1 unit ของการเหนี่ยวนำจะเท่ากับค่ากัมมันตภาพของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นสองเท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

สำหรับการทดลองชุดที่ 2 เป็นการหาความหนาแน่นของเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เหมือนกับการทดลองชุดแรกแต่เติมสารละลาย crystal violet ลงไป เมื่อ crystal violet ย้อมติดเซลล์สมบูรณ์แล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

3.7 การทดสอบฤทธิ์ฆ่าและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ เซลล์มะเร็งปอด, มะเร็งตับ และ มะเร็งลำไส้ เทียบกับเซลล์ปกติ (ตาราง 3.2) ด้วยน้ำยาเลี้ยง DMEM ลงในถาดเพาะเลี้ยง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5 % CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนเริ่มทำการทดสอบเตรียมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 10% TCA และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ล้างสารละลาย TCA ด้วยน้ำ แล้วย้อมด้วยน้ำยา 0.4% SRB ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากล้างน้ำยา SRB ออก ทำการละลายด้วยสารละลาย 10 mM Tris base แล้วนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาค่า GI50 และ

TG50 ของสารทดสอบ โดย GI50 คือ ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิด growth inhibition เท่ากับ 50% ส่วน TGI คือ ความเข้มข้นของสารที่ทำค่า T เท่ากับ T₀ (cytostatic) ซึ่งทำให้ได้ผลลัพธ์ 0 %

ตาราง 3.2 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะกิง

เซลล์	ชื่อเซลล์	แหล่งที่มา	จำนวนเซลล์ต่อหลุม
Normal cell	MRC5	Human normal lung fibroblast	10,000
Lung cancer	A549	Human lung carcinoma	7,500
Liver cancer	HepG-2	Human hepatocellular carcinoma	7,000
Colon cancer	SW620	Human colorectal adenocarcinoma	10,000

3.8 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของสารสกัดมะกิง

3.8.1 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) scavenging assay

วิธีนี้เป็นการตรวจสอบว่าสารสกัดชนิดต่างๆ นั้นมีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้โดยตรงหรือไม่ ซึ่งอนุมูลอิสระในที่นี้คือ 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) โดยทำการเติม acetate buffer จากนั้นเติม absolute ethanol, สารสกัดมะกิง และ DPPH ตามลำดับ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

3.8.2 Deoxyribose assay

วิธีนี้เป็นการตรวจสอบว่าสารสกัดมะกิงมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Scavenger) ด้วยตัวเอง หรือมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากการจับเหล็ก (Iron chelator) ซึ่งเป็นโลหะสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระผ่าน Fenton-reaction

3.8.2.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล

ทำการทดสอบโดยนำเอาสารสกัดมาทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมของ KH_2PO_4 -KOH buffer, deoxyribose, ferric chloride – EDTA และ hydrogen peroxide หลังจากนั้นเติม ascorbic acid เพื่อเริ่มปฏิกิริยาแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พอครบเวลาเติม trichloroacetic acid และ thiobarbituric acid นำไปต้มในน้ำเดือด แช่น้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร

3.8.2.2 การศึกษาความสามารถในการจับเหล็ก

ทำการทดสอบโดยนำเอาสารสกัดมาทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมของ KH_2PO_4 -KOH buffer, deoxyribose, hydrogen peroxide และเติม ascorbic acid เพื่อเริ่มปฏิกิริยาแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พอครบเวลาเติม trichloroacetic acid และ thiobarbituric acid นำไปต้มในน้ำเดือด แช่น้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร เทียบกับ blank ที่มีการเติม ferric chloride

3.9 การทดสอบประสิทธิภาพของมะกิ้งต่อแมลงศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ

3.9.1 การเตรียมหนอนกระทุ้ผัก

นำหนอนที่นำมาจากกรมส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์มาทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยเพาะเลี้ยงหนอนกระทุ้ผักให้อยู่ในระยะวัย 3

3.9.2 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด ในการป้องกันกำจัดหนอนกระทุ้ผักด้วยวิธี leaf disk choice (Brem, *et al.*, 2002)

- 1) ตัดผักคะน้าเป็นรูปวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตร วางลงใน Petri dish โดย 1 petri dish สามารถวางแผ่นคะน้าได้ 4 ใบ
- 2) เตรียมสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ 5 ระดับ ได้แก่ 100, 500, 1,000, 5,000 และ 10,000 ppm ตามลำดับ
- 3) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายสารสกัดปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในแต่ละความเข้มข้น หยดสารทดสอบลงบนใบคะน้า 2 ใบ ใบที่วางในลักษณะตรงกันข้าม ส่วนด้านที่เหลือหยดตัวทำละลายที่ใช้ในการละลายสารสกัดคือ 95% เอทานอล เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม แล้วปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนหมด
- 4) นำหนอนกระทุ้ผักปล่อยลงตรงกลาง Petri dish ละ 2 ตัว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละ treatment
- 5) เริ่มบันทึกผลการทดลองเมื่อใบคะน้าในกลุ่มควบคุมถูกหนอนกินไป 50 เปอร์เซ็นต์ โดยบันทึกลักษณะการออกฤทธิ์ของสารดังนี้

Repellent activity (R)	=	ไม่มีการกินใบคะน้าเกิดขึ้นเลย
Strong antifeedant activity (S)	=	พื้นที่โดยรวมของใบคะน้าถูกกินน้อยกว่า 5%
Antifeedent activity (A)	=	พื้นที่โดยรวมของใบคะน้าถูกกิน 5-20%
Inactive (I)	=	พื้นที่โดยรวมของใบคะน้าที่ถูกกินมากกว่า 20%

3.10 การทดสอบทางพิษเคมีเบื้องต้น

ใช้วิธีการตามรายละเอียดใน Aiyelaagbe, O.O. and Osamudiamen, P. M. 2009 และ อ้อมบุญ ล้วนรัตน์, 2536

บทที่ 4

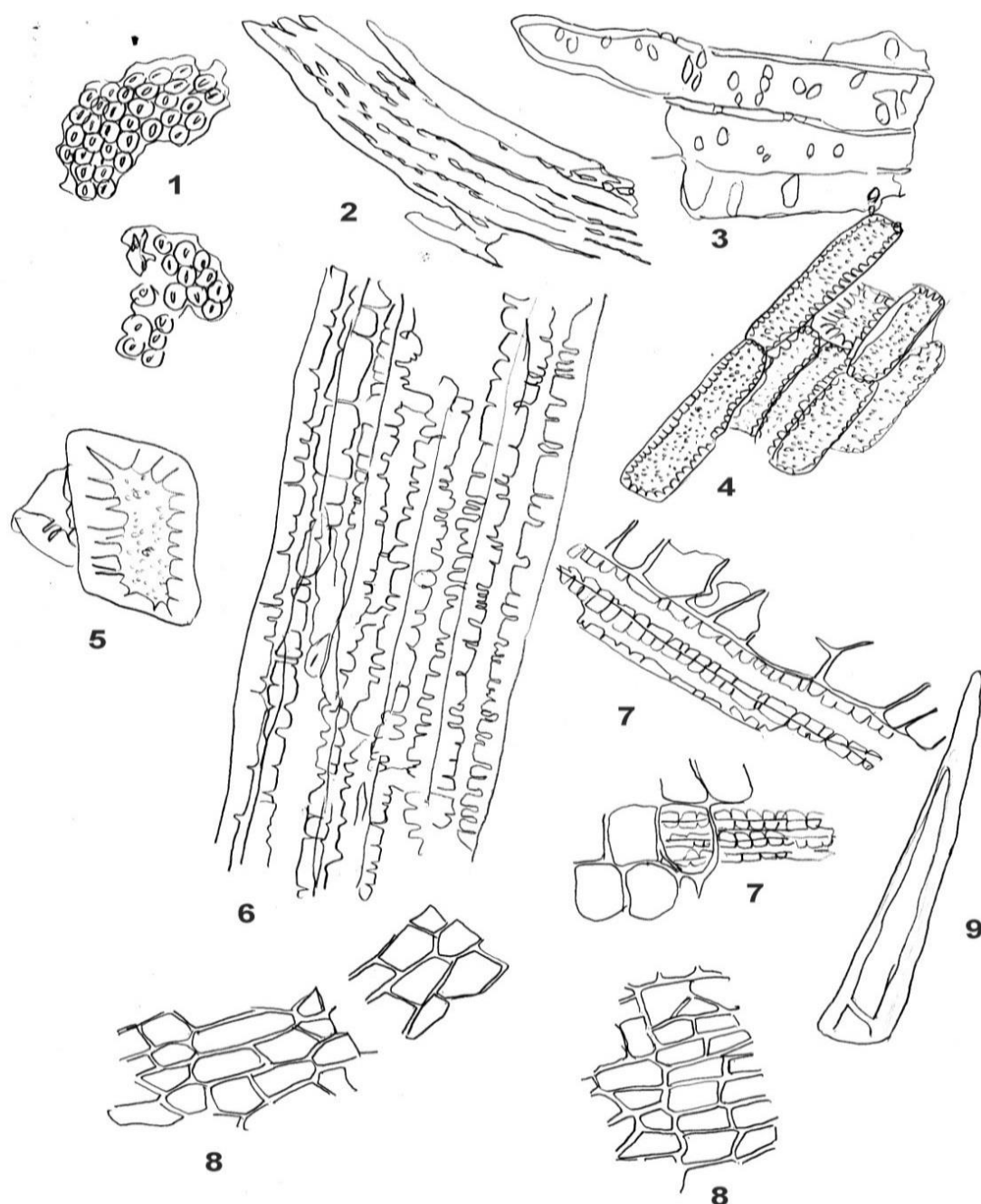
ผลการวิจัย

ตัวอย่างวัตถุดิบมะกิ้งในโครงการปี 2556 ได้รับตัวอย่างมาจากโครงการย่อยที่ 1 (การกระจายตัวนิเวศวิทยา และการใช้ประโยชน์ของพืชสกุลมะกิ้ง) และ โครงการย่อยที่ 2 (การศึกษาการขยายพันธุ์ และ สันฐานวิทยาของมะกิ้ง) ซึ่งเก็บตัวอย่างมาได้ในปริมาณไม่มาก และส่วนหนึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากทางโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ดังนั้นตัวอย่างในปีที่ 1 จึงมาจากหลาย ๆ แหล่ง ในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และน่าน ด้วยปริมาณที่ไม่มากพอที่จะทำการแยกเป็นแหล่ง ในโครงการวิจัยนี้จึงนำมารวม โดยเลือกพืชที่มีความแก่อ่อนใกล้เคียงกันไว้ด้วยกัน เพื่อสกัดให้ได้ปริมาณมากพอที่จะนำไปทำการศึกษาคัดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป และพืชที่เก็บมาในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน ก่อนทำการสกัด พืชส่วนหนึ่งแบ่งไว้เพื่อจัดทำข้อกำหนดเฉพาะเนื่องจากมะกิ้งยังไม่มีมาตรฐานวัตถุดิบ ในการนำสมุนไพรไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์นั้นความแปรปรวนของคุณภาพมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น อายุพืช สายพันธุ์ แหล่งที่มา การแปรรูป ดังนั้นการจัดทำข้อกำหนดเฉพาะ (specification) ของวัตถุดิบจึงสำคัญยิ่ง ในการศึกษานี้ได้อ้างอิงวิธีการที่ระบุในเภสัชตำรับสมุนไพรไทย แต่เนื่องจากในปีนี้วัตถุดิบมีไม่มากพอ จึงทำการตรวจเอกลักษณ์ของผงยาเป็นข้อมูลเบื้องต้นไว้ก่อน สำหรับค่าคงที่อื่นจะดำเนินการในปีต่อไปที่สามารถจัดหาวัตถุดิบในปริมาณที่มากพอ และเป็นตัวอย่างวัตถุดิบที่จะนำไปเตรียมผลิตภัณฑ์ ผลการศึกษามีรายละเอียด ดังนี้

4.1 ผลการศึกษาในการตรวจสอบจุลทรรศน์ลักษณะ

นำตัวอย่างมะกิ้งมาแยกส่วน ได้แก่ ใบ เถา เนื้อผล เนื้อในเมล็ด จากนั้นแต่ละส่วนนำมาบดด้วยเครื่องบดสมุนไพร จากนั้นนำผงยาสมุนไพรไปผ่านร่อนเบอร์ 60 จากนั้นนำผงยาแต่ละส่วนไปตรวจสอบจุลทรรศน์ลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์ ผลดังแสดงในภาพ 4.1 – 4.7

4.1.1 จุลทรรศน์ลักษณะของเถามะกิ้ง

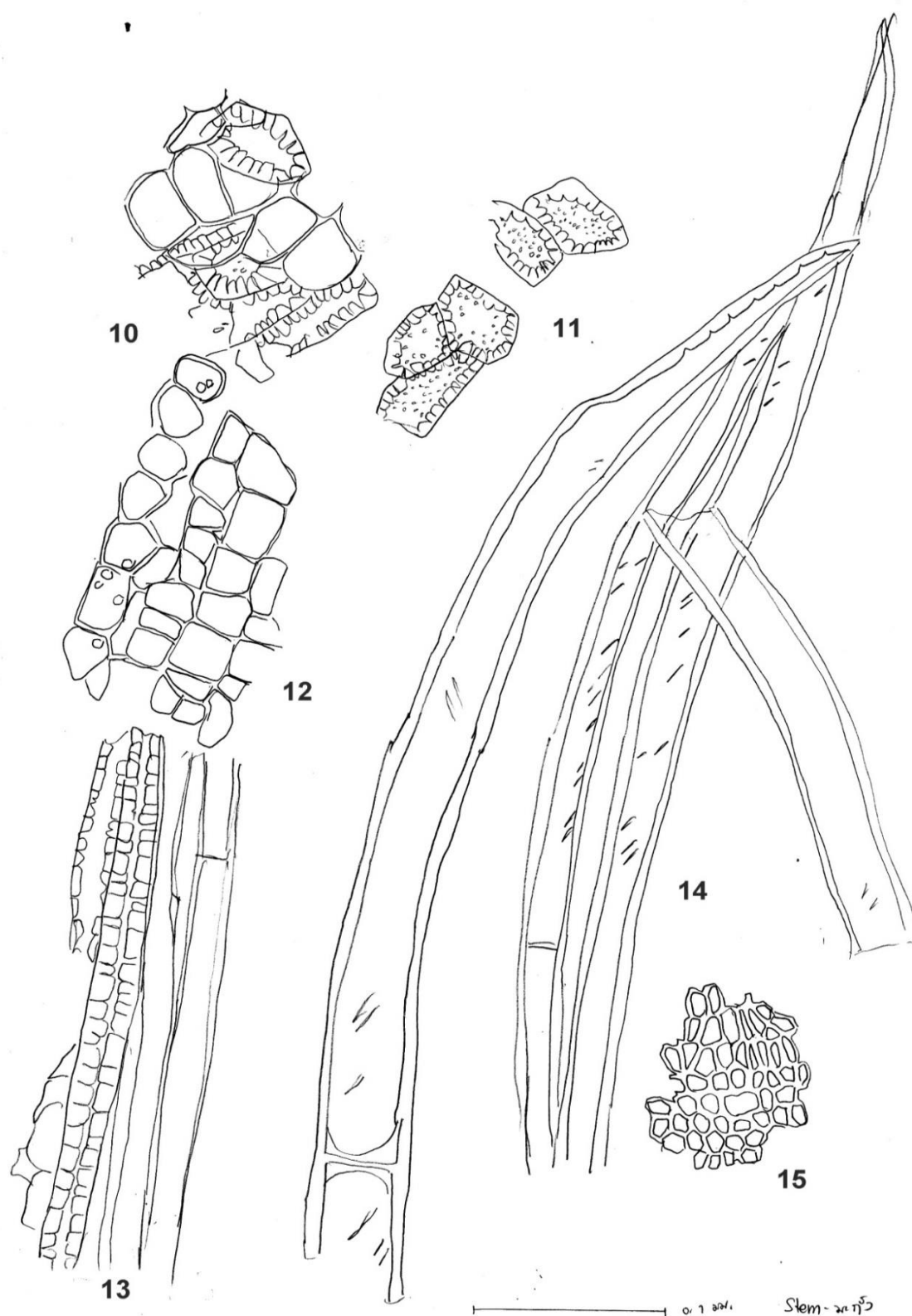


Stem - มะกิ้ง

0.1 cm

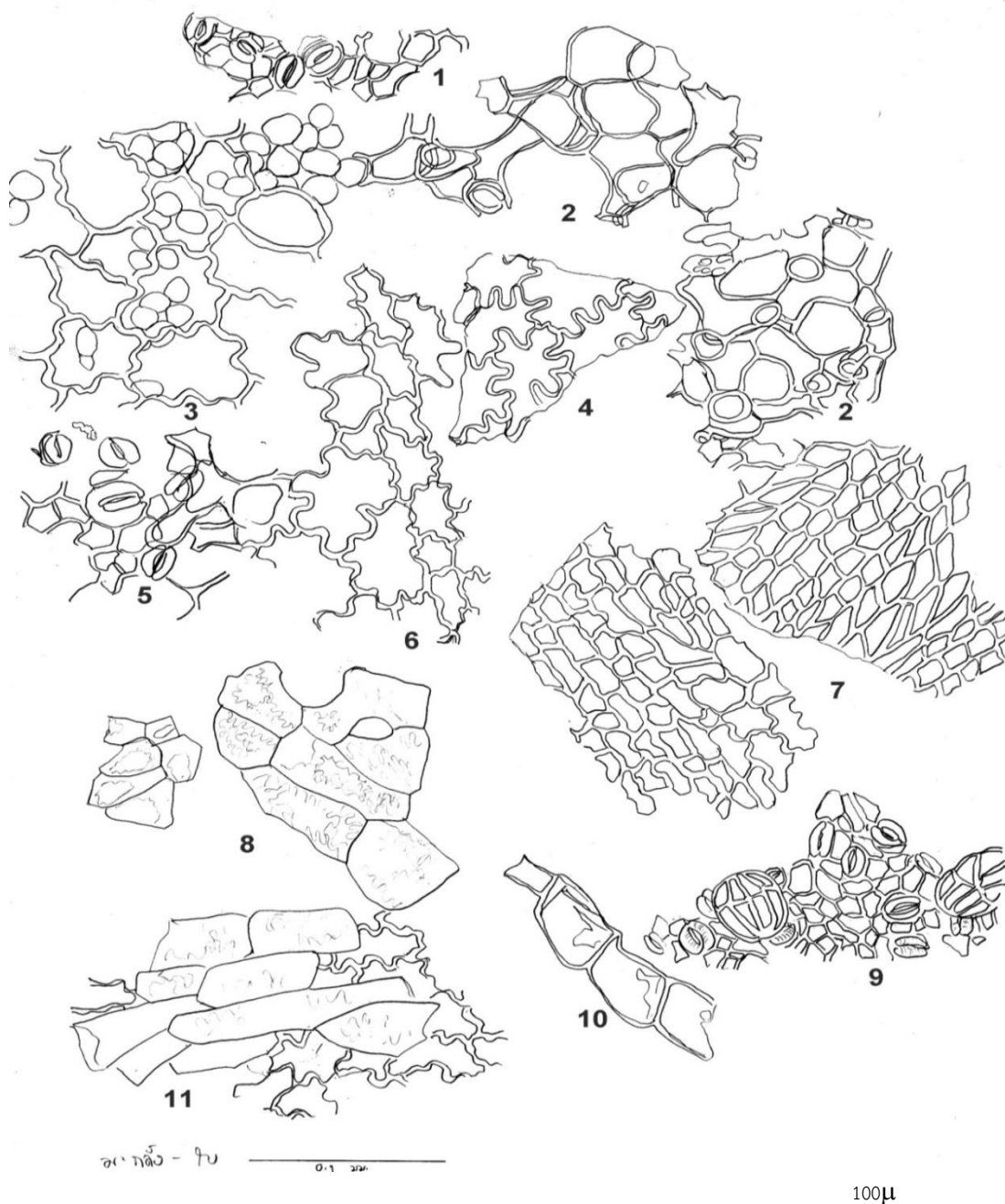
100μ

ภาพ 4.1 Microscopic character of stem (1) : (1) bordered pitted vessels; (2) pitted vessel; (3) porous parenchyma; (4) pitted parenchyma; (5) macrosclereid; (6) sclereids ; (7) sclereid and medullary ray; (8) thin walled parenchyma; (9) trichome

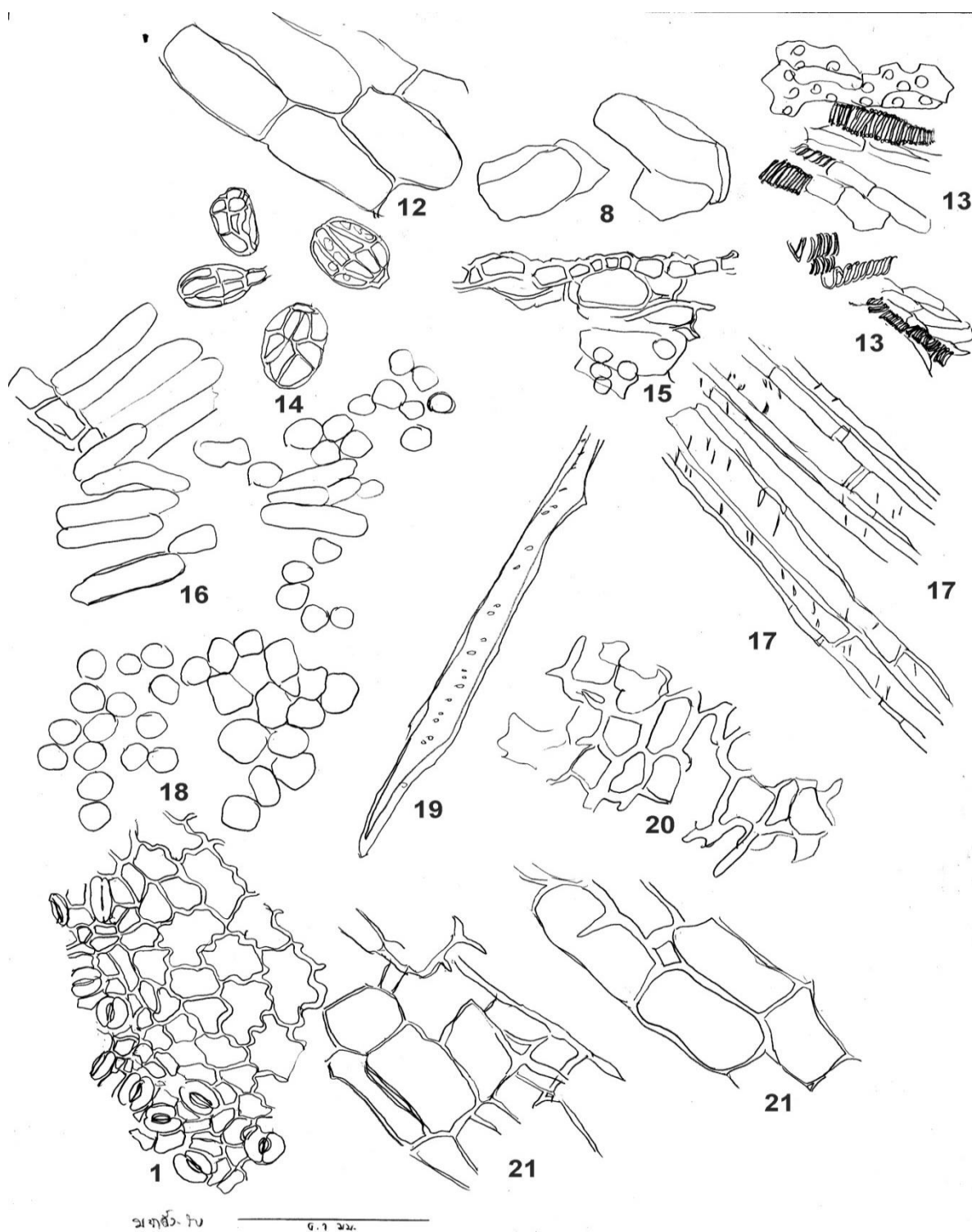


ภาพ 4.2 Microscopic character of stem (2) : (10) stone cells and parenchyma; (11) group of stone cells; (12) parenchyma; (13) sclereids and parenchyma; (14) septate fiber; (15) epidermis

4.1.2 จุลทรรศน์ลักษณะของใบมะกั้ง

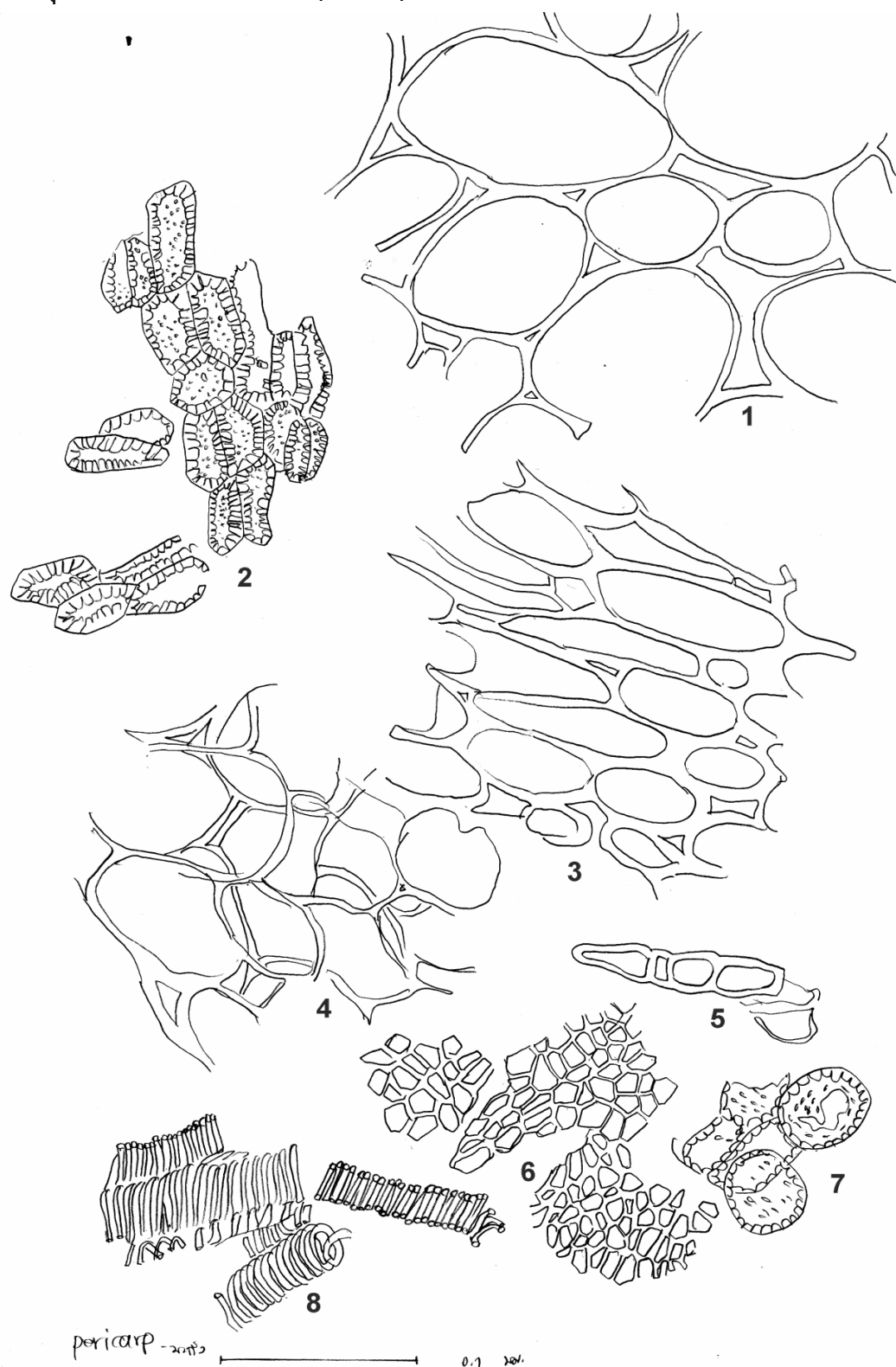


ภาพ 4.3 Microscopic character of leaf (1) : (1) stomat; (2) spongy mesophyll; (3) upper epidermis with palisade cells underneath ; (4) upper epidermis; (5) lower epidermis showing stomata and spongy mesophyll underneath; (6) upper epidermis over vein ; (7) epidermis of petiole; (8) colorless mass matter; (9) lower epidermis showing stomata and glandular trichomes; (10) trichome; (11) colorless mass matter with upper epidermis beneath



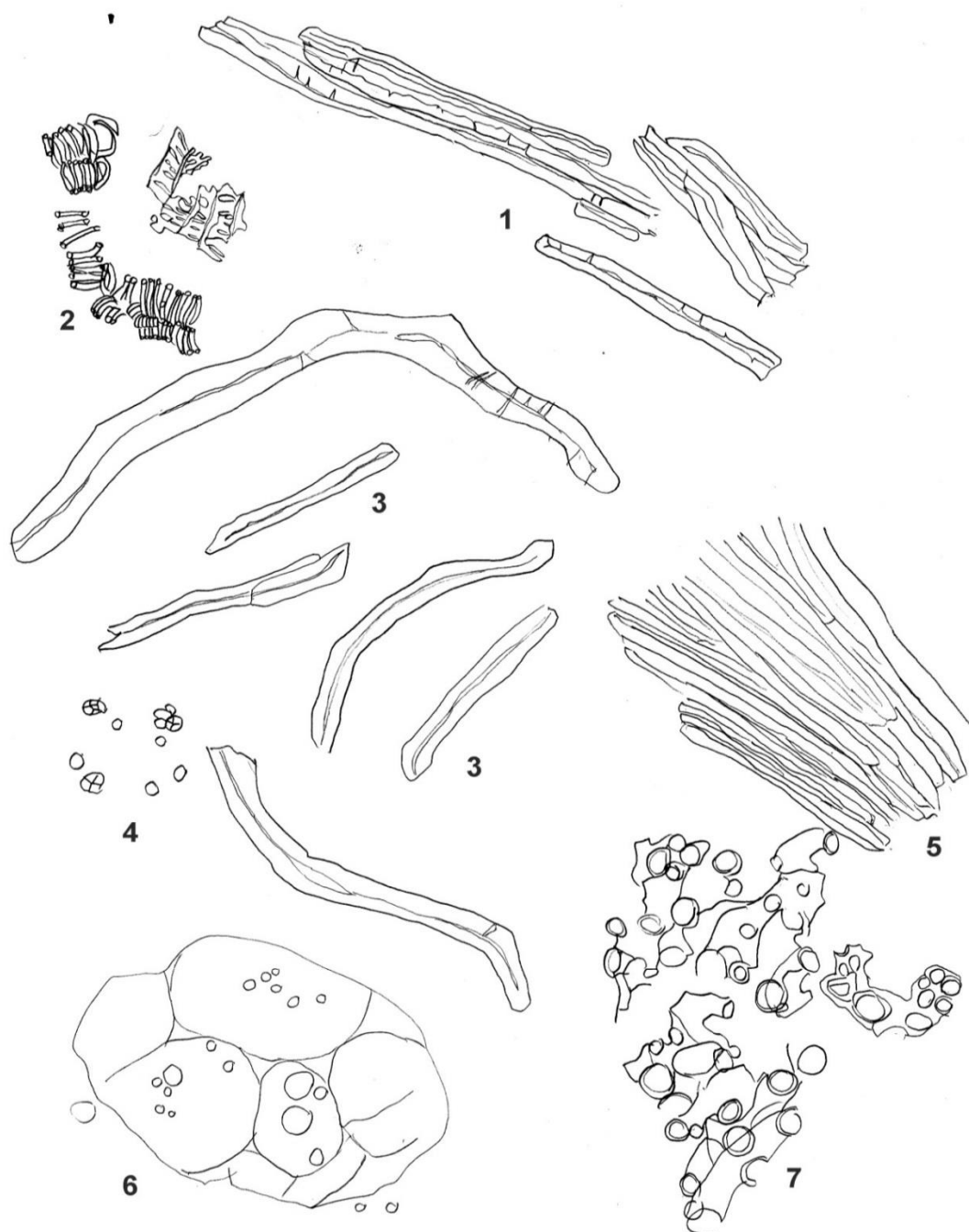
ภาพ 4.4 Microscopic character of leaf (2) : (12) parenchyma; (13) vascular bundle; (14) glandular trichomes; (15) lower epidermis in sectional view attach to spongy mesophyll; (16) palisade cells in sectional view ; (17) tracheids; (18) palisade cells in surface view; (19) fiber cell; (20) collenchyma in cross sectional view; (21) collenchyma in longitudinal sectional view

4.1.3 จุลทรรศน์ลักษณะของส่วน pericarp



ภาพ 4.5 Microscopic character of pericarp : (1) thickening walled parenchyma; (2) stone cells; (3) collenchyma; (4) thin walled parenchyma; (5) trichome; (6) epidermis; (7) macrosclereid; (8) vessels

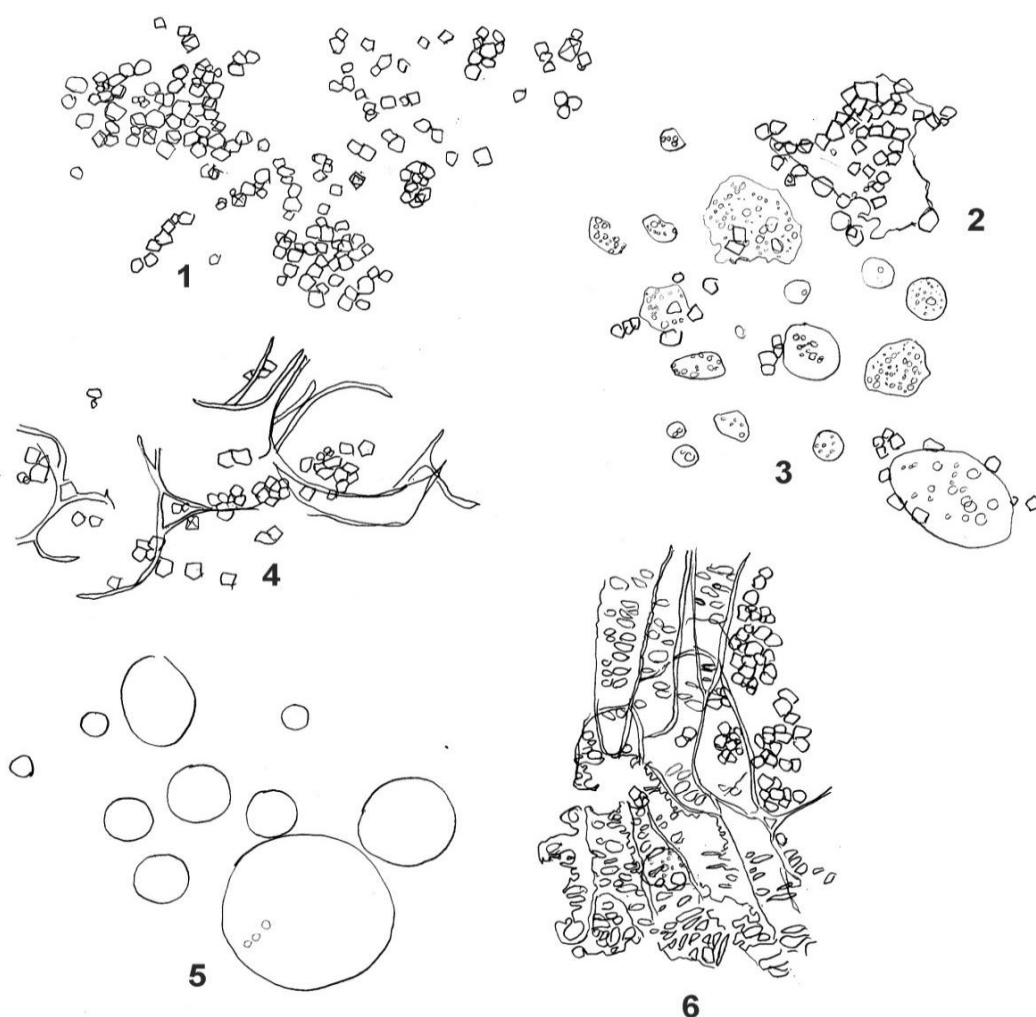
4.1.4 จุลทรรศน์ลักษณะของ seed coat



Seed Coat - กล้วย - 0.1 มม.

ภาพ 4.6 Microscopic character of seed coat : (1) filiform sclereid; (2) vessels; (3) fragments of filiform sclereid; (4) starch grains; (5) group of filiform sclereid; (6) parenchyma; (7) spongy parenchyma

4.1.5 จุลทรรศน์ลักษณะของ embryo



Cotyledon - ขาถั่ว
|
|
0.1 มม

ภาพ 4.7 Microscopic character of embryo : (1) aleurone grains; (2) parenchymatous tissue and aleurone grains; (3) fixed oil and aleurone grains; (4) parenchyma and aleurone grains; (5) fixed oil droplets; (6) porous parenchyma containing aleurone grains

4.2 ผลการสกัดในชุดทดลองเบื้องต้น ให้ผลดังรายละเอียดในตาราง 4.1-4.2

ตาราง 4.1 ผลการสกัดสารสำคัญจากเนื้อในเมล็ดมะกั้ง

ครั้งที่	น้ำหนัก สด (g)	น้ำหนัก แห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้แต่ละ fraction (g)					
			Petroleum ether	% yield (w/w)	Chloroform	% yield (w/w)	95% Ethanol	% yield (w/w)
1	98.00	41.40	20.00	48.31	1.66	4.01	0.51	1.23
2*	220.00	76.74 (เมล็ด สมบูรณ์)	43.40	56.55	1.99	2.59	2.16	2.81
		13.00	0.30	2.31	0.27	2.08	3.02	23.23
3**	564.69	44.88	0.35	0.77	0.50	1.11	11.64	25.94
4	753.27	644.35	349.78	54.28	20.27	3.15	13.57	2.11

* ตัวอย่างที่ได้จะมีเมล็ดฝ่อปนมาด้วย ซึ่งได้ทำการคัดเลือกเฉพาะส่วนเมล็ดที่สมบูรณ์เท่านั้นมาสกัด

** ตัวอย่างที่ได้รับเป็นตัวอย่างที่ยังโต แต่ยังไม่สุก ทำให้ได้เมล็ดอ่อน

หมายเหตุ ส่วนเนื้อในเมล็ดที่ไม่สมบูรณ์ หรืออายุอ่อน จะไม่นำมารวมเพื่อทดสอบฤทธิ์ แต่ทำการสกัด เพื่อจะนำมาศึกษาารูปแบบขององค์ประกอบทางเคมีที่พบ



ก



ข

ภาพ 4.8 (ก) เมล็ดและเนื้อในเมล็ดของมะกั้ง

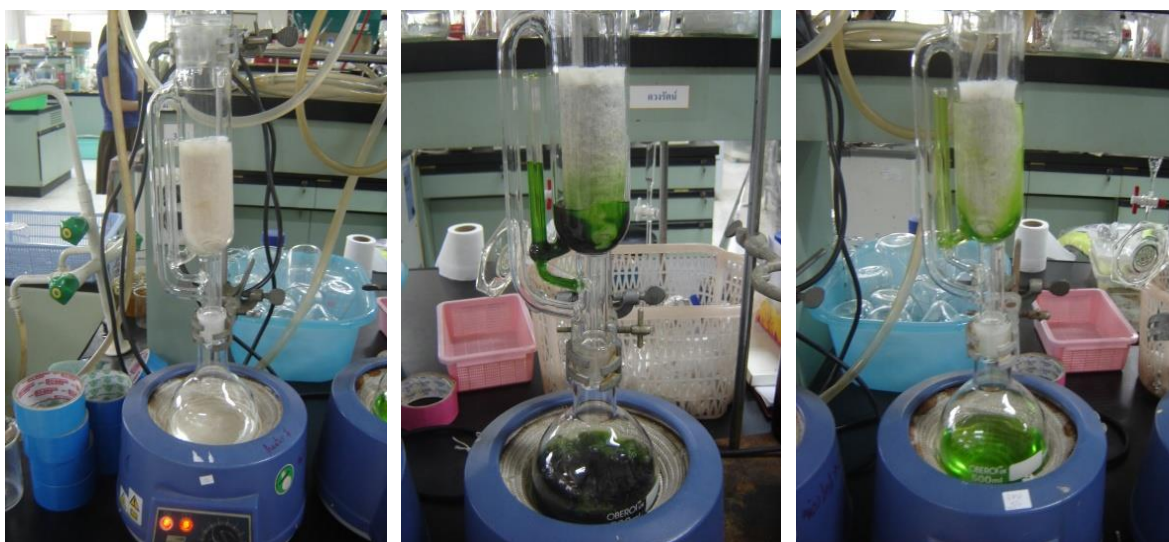
(ข) ตัวอย่างสารสกัดของส่วนเนื้อในเมล็ด

ตาราง 4.2 ผลการสกัดสารสำคัญจาก ใบ เถา และเนื้อผลมะกั้ง

ส่วนที่ใช้	ครั้งที่	น้ำหนักสด (g)	น้ำหนักแห้ง (g)	น้ำหนักสารสกัด (g)	% yield (w/w)
ใบ	1	300.00	263.00	25.66	9.75
	2	190.00	116.75	13.46	11.52
	3	67.10	45.17	3.75	8.30
	ค่าเฉลี่ย				9.85±1.61
เถา	1	425.00	219.53	9.78	4.45
	2	290.00	100.83	6.54	9.85
	3	238.61	71.41	3.16	4.42
	ค่าเฉลี่ย				6.24±3.12
เนื้อผล	1	138.00	94.00	9.96	10.59
	2	1,560.00	155.72	15.35	6.48
	3	3,000.00	256.10	83.86	15.17
	ค่าเฉลี่ย				10.75±4.35



ภาพ 4.9 ลักษณะส่วนต่าง ๆ ของตัวอย่างมะกั้ง



ภาพ 4.10 แสดงวิธีการสกัดตัวอย่างมะกั้งด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องด้วย Soxhlet's apparatus



ภาพ 4.11 ลักษณะสารสกัดจากส่วนใบ เถา และเนื้อผล

ในการสกัด ส่วนของเนื้อในเมล็ดมีส่วนประกอบของน้ำมันในปริมาณที่สูง จึงทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว และเพิ่มขั้วของตัวทำละลายเพื่อให้สกัดสารอื่น ที่มีในเนื้อในเมล็ดออกมาจนสมบูรณ์ แต่ในส่วนอื่น ๆ นั้น ทำการสกัดด้วย 95 % ethanol เพื่อให้ได้สารสกัดทุกชนิดที่มีอยู่ในตัวอย่างพืช

สารสกัดแต่ละส่วนที่ได้ นำไปทดสอบฤทธิ์ต่าง ๆ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ก่อมะเร็งและต้านมะเร็งในแบบที่เรียกว่าการทดสอบเอมส์ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส

4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดมะกั้ง

4.3.1 ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ผลการทดสอบความไวต่อยาสามารถจำแนกเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน และเชื้อสายพันธุ์ก่อโรคอีก 5 ไอโซเลท ได้ มีรูปแบบของ antibiogram ดังตาราง 4.3

ตาราง 4.3 รูปแบบของไอโซเลททดสอบของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

Antibiograms	จำนวนไอโซเลท
MSSA (FOX ^S VAN ^S E ^S CL ^S)	1 (เชื้อ <i>S. aureus</i> ATCC 25923)
MRSA (FOX ^R VAN ^S E ^R CL ^R)	5 (เชื้อ MRSA)

หมายเหตุ : MSSA, Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*

MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

FOX, Cefoxitin; VAN, Vancomycin; E, Erythromycin, CL, Clindamycin

ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดมะกั้งด้วยวิธี agar-cup diffusion เทียบกับตัวควบคุมผลบวกคือสารละลายยาแวนโคไมซิน ซึ่งทดสอบจากตารางข้างบนแล้วว่าเชื้อทุกตัวไวต่อยา และตัวควบคุมผลลบคือสารละลาย 5% DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดผสมลงใน Mueller Hinton Broth ผลการทดสอบแสดงในตาราง 4.4

ตาราง 4.4 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ทดสอบของสารสกัดมะกั้ง แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ หน่วยเป็นมิลลิเมตร

เชื้อทดสอบ	สารสกัดมะกั้งตัวอย่างที่						ยาแวนโคไมซิน 8 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร	DMSO 5%
	1 ใบ	2 เถา	3 เนื้อ	4 เมล็ด	5 เมล็ด	6 เมล็ด		
ATCC 25923	13	11	11	13	11	12	28	9
MRSA 01	8	6	6	7	6	8	19	7
MRSA 02	7	6	6	8	6	8	18	6
MRSA 03	8	6	6	8	6	8	21	7
MRSA 04	8	6	6	8	6	7	19	6
MRSA 05	7	6	6	8	6	7	20	6

*ความเข้มข้นทดสอบของสารสกัดเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดสอบไม่พบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั้งสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐานและสายพันธุ์ก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน อย่างไรก็ตามทางผู้วิจัยจะทำการยืนยันฤทธิ์อีกครั้งด้วยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration หรือ MBC) ของสารสกัดมะกิ้งตัวอย่างที่ 4 ในส่วนของเมล็ดมะกิ้งที่สกัดด้วยตัวทำละลาย petroleum ether

โดยสารสกัดทั้งหมดแสดงฤทธิ์ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะค้นหาฤทธิ์ของพืชที่ยังเป็นที่รู้จักกัน เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านจุลชีพที่มีต่อเชื้อดื้อยาที่เป็นปัญหาสำคัญในโรงพยาบาล สารสกัดที่มีแนวโน้มที่จะต้านจุลชีพดีที่สุด น่าจะมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อไป แต่จากฤทธิ์ที่ทดสอบมาทางผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงฤทธิ์ต้านจุลชีพกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบเพิ่มเติมซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดมีฤทธิ์เฉพาะต่อกลุ่มเชื้อทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารสกัดเมล็ดมะกิ้งตัวอย่างที่ 4 ด้วยวิธี agar dilution เทียบความเข้มข้นสุดท้ายตั้งแต่ 15.625-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบแสดงเป็นโคโลนีที่เชื้อ *Staphylococcus aureus* ทั้ง 6 ไอโซเลททดสอบที่เจริญ ณ ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดเมล็ดมะกิ้งหมายเลข 4 ดังตาราง 4.5

ตาราง 4.5 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ไอโซเลททดสอบของสารสกัดเมล็ดมะกิ้งหมายเลข 4 แสดงค่าในรูปของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Mueller Hinton Agar

เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดมะกิ้งหมายเลข 4 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	15.625	31.25	62.50	125.0	250.0	500.0
ATCC 25923	Many	Many	Many	62	39	9*
MRSA 01	Many	Many	Many	145	88	32
MRSA 02	Many	Many	Many	140	67	18
MRSA 03	Many	Many	Many	212	102	37
MRSA 04	Many	Many	Many	109	87	26
MRSA 05	Many	Many	Many	Many	112	40

Many : นับโคโลนีไม่ได้เนื่องจากมีจำนวนมากกว่า 300 โคโลนีต่อเพลท หรือมีเชื้อหนาแน่นจนไม่สามารถนับเป็นโคโลนีได้

*แสดงถึงจำนวนโคโลนีที่เป็นไปตามต้องการเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

จากผลการทดสอบมีเพียงเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐานเท่านั้นที่สามารถหาค่า MBC ของสารสกัดเมล็ดมะกิ้งได้เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งถือว่าเป็นค่าที่สูง และไม่จัดว่าสารสกัดดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* แต่อย่างใด

4.3.2 ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis*

ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่าเชื้อ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน และไอโซเลตที่ดื้อต่อยาอีก 5 ไอโซเลต มีรูปแบบของ antibiogram ดังตาราง 4.6

ตาราง 4.6 รูปแบบของไอโซเลตทดสอบของเชื้อ *Enterococcus faecalis*

Antibiograms	จำนวนไอโซเลต
EF (P ^S VAN ^S LEV ^S CL ^S)	1 (เชื้อ <i>E. faecalis</i> ATCC 29212)
EF M (P ^R VAN ^S LEV ^R CL ^R)	5 (เชื้อ <i>E. faecalis</i> ก่อโรค)

หมายเหตุ : EF, *Enterococcus faecalis* susceptible strain

EF M, *Enterococcus faecalis* multidrug resistant strain

P, Penicillin; VAN, Vancomycin; LEV, Levofloxacin, CL, Clindamycin

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน และเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายขนาน ของสารสกัดมะกัสด้วยวิธี agar-cup diffusion เทียบกับตัวควบคุมผลบวกคือสารละลายยาแวนโคไมซิน ซึ่งทดสอบจากตารางข้างบนแล้วว่าเชื้อทุกตัวไวต่อยานี้ และตัวควบคุมผลลบคือสารละลาย 5% DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดผสมลงใน Mueller Hinton Broth ผลการทดสอบแสดงในตาราง 4.7

ตาราง 4.7 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์ทดสอบของสารสกัดมะกัสด้วยวิธี แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ หน่วยเป็นมิลลิเมตร

เชื้อทดสอบ	สารสกัดมะกัสด้วยวิธี						ยาแวนโคไมซิน 8 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร	DMSO 5%
	1 ใบ	2 เถา	3 เนื้อ	4 เมล็ด	5 เมล็ด	6 เมล็ด		
ATCC 29212	8	9	9	10	8	8	34	7
EF M 01	6	6	6	7	6	6	23	6
EF M 02	6	6	6	8	6	8	20	6
EF M 03	6	6	6	6	6	6	19	6
EF M 04	6	6	6	8	6	7	21	6
EF M 05	7	6	6	6	6	6	24	6

*ความเข้มข้นทดสอบของสารสกัดเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดสอบไม่พบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Enterococcus faecalis* ทั้งสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐานและสายพันธุ์ก่อโรคที่ดื้อยาปฏิชีวนะหลายขนาน ทางผู้วิจัยไม่สามารถคัดเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ต่างจากสารสกัดอื่นได้อย่างมีนัยสำคัญ จึงไม่ได้ทำการทดสอบหาค่า MBC ของสารสกัดมะกัสด้วยวิธี

4.3.3 ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Escherichia coli*

ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่าเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา (EC) และสายพันธุ์ที่ดื้อยาจากการสร้าง beta lactamase ชนิดออกฤทธิ์ขยาย (EC ESBL) มีรูปแบบ antibiogram ดังตาราง 4.8

ตาราง 4.8 รูปแบบของไอโซเลททดสอบของเชื้อ *Escherichia coli*

Antibiograms	จำนวนไอโซเลท
EC (AMC ^S CTX ^S CAZ ^S IMP ^S)	1 (เชื้อ <i>E. coli</i> ATCC 25922)
EC ESBL (AMC ^S CTX ^R CAZ ^R IMP ^S)	5 (เชื้อ <i>E. coli</i> ก่อโรค)

หมายเหตุ : EC, *Escherichia coli* susceptible strain

EC ESBL, *Escherichia coli* ESBL-producing strain

AMC, Amoxycillin/clavulanic acid; CTX, Cefotaxime; CAZ, Ceftazidime, IMP, Imipenem

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐาน และเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยาที่มีการสร้าง beta lactamase ชนิดออกฤทธิ์ขยาย ของสารสกัดมะกั้งด้วยวิธี agar-cup diffusion เทียบกับตัวควบคุมผลบวกคือสารละลายยาอิมิพีเนม ซึ่งทดสอบจากตารางข้างบนแล้วว่าเชื้อทุกตัวไวต่อยานี้ และตัวควบคุมผลลบคือสารละลาย 5% DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดผสมลงใน Mueller Hinton Broth ผลการทดสอบแสดงในตาราง 4.9

ตาราง 4.9 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ทดสอบของสารสกัดมะกั้ง แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ หน่วยเป็นมิลลิเมตร

เชื้อทดสอบ	สารสกัดมะกั้งตัวอย่างที่						ยาอิมิพีเนม 16 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร	DMSO 5%
	1 ใบ	2 เถา	3 เนื้อ	4 เมล็ด	5 เมล็ด	6 เมล็ด		
ATCC 25922	16	12	10	15	16	13	29	8
EC ESBL 01	9	10	6	11	11	12	23	6
EC ESBL 02	8	9	6	10	11	13	22	6
EC ESBL 03	11	10	6	11	12	12	21	6
EC ESBL 04	9	8	6	12	11	11	24	6
EC ESBL 05	6	9	6	12	10	11	23	6

*ความเข้มข้นทดสอบของสารสกัดเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* ของสารสกัดเมล็ดมะกั้งตัวอย่างที่ 4-6 ด้วยวิธี agar dilution เทียบความเข้มข้นสุดท้ายตั้งแต่ 15.625-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบแสดงเป็นโคโลนีที่เชื้อ *Escherichia coli* ทั้ง 6 ไอโซเลททดสอบที่เจริญ ณ ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดเมล็ดมะกั้ง หมายเลข 4-6 ดังตาราง 4.10

ตาราง 4.10 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* ไอโซเลททดสอบของสารสกัดเมล็ดมะกอกหมายเลข 4-6 แสดงค่าในรูปของโคโลนีที่เจริญบนอาหาร Mueller Hinton Agar

เชื้อทดสอบ	ตัวอย่างมะกอก	ความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดมะกอก (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)					
		15.625	31.25	62.50	125.0	250.0	500.0
ATCC 25922	4	Many	Many	62	21	5*	NG
	5	Many	Many	39	12	5*	NG
	6	Many	Many	50	17	9*	NG
EC ESBL 01	4	Many	Many	Many	22	7*	NG
	5	Many	Many	Many	41	9*	NG
	6	Many	Many	Many	28	5*	NG
EC ESBL 02	4	Many	Many	Many	45	7*	NG
	5	Many	Many	Many	22	9*	NG
	6	Many	Many	Many	36	6*	NG
EC ESBL 03	4	Many	Many	Many	102	15	4*
	5	Many	Many	Many	75	9*	NG
	6	Many	Many	Many	87	9*	NG
EC ESBL 04	4	Many	Many	Many	54	6*	NG
	5	Many	Many	Many	27	5*	NG
	6	Many	Many	Many	29	6*	NG
EC ESBL 05	4	Many	Many	Many	88	14	8*
	5	Many	Many	Many	54	5*	NG
	6	Many	Many	Many	76	5*	NG

Many : นับโคโลนีไม่ได้เนื่องจากมีจำนวนมากกว่า 300 โคโลนีต่อเพลท หรือมีเชื้อหนาแน่นจนไม่สามารถ

นับเป็นโคโลนีได้

NG : ไม่มีเชื้อทดสอบเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

*แสดงถึงจำนวนโคโลนีที่เป็นไปตามต้องการเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

จากผลการทดสอบสามารถหาค่า MBC ของสารสกัดเมล็ดมะกอกหมายเลข 4-6 ต่อเชื้อสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐานและสายพันธุ์สร้างเอ็นไซม์ ESBL ได้ อยู่ในช่วงประมาณ 250-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งถือว่ายังเป็นค่าที่สูง และไม่จัดว่าสารสกัดดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพต่อเชื้อ *Escherichia coli* แต่อย่างใด

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดมะกิ้ง

4.4.1 ฤทธิ์ต่อเชื้อ *Candida albicans*

ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* ของสารสกัดมะกิ้งด้วยวิธี agar-cup diffusion เทียบกับตัวควบคุมผลบวกคือสารละลายยาโคไทรมาโซล และตัวควบคุมผลลบคือสารละลาย 5% DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัดผสมลงใน Sabouraud Dextrose Broth ผลการทดสอบแสดงในตาราง 4.11

ตาราง 4.11 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* สายพันธุ์ทดสอบของสารสกัดมะกิ้ง แสดงค่าในรูปของขอบเขตการยับยั้งเชื้อ หน่วยเป็นมิลลิเมตร

เชื้อทดสอบ	สารสกัดมะกิ้งตัวอย่างที่						ยาโคไทรมาโซล 16 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร	DMSO 5%
	1 ใบ	2 เถา	3 เนื้อ	4 เมล็ด	5 เมล็ด	6 เมล็ด		
ATCC 90028	8	10	8	8	8	8	21	8
CA 01	6	6	6	7	6	6	20	7
CA 02	6	6	6	6	6	6	18	7
CA 03	6	6	6	6	6	6	18	7
CA 04	6	6	6	6	6	7	19	7
CA 05	7	6	6	6	6	7	18	7

*ความเข้มข้นทดสอบของสารสกัดเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดสอบไม่พบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* ทั้งสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐานและสายพันธุ์ก่อโรคที่ ผู้วิจัยได้ทำการยืนยันฤทธิ์อีกครั้งด้วยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้ (Minimal Fungicidal Concentration หรือ MFC) ของสารสกัดมะกิ้งทุกตัวอย่างก็ไม่สามารถหาค่า MFC ได้ ณ ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ

4.5 การทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองของสารสกัดมะกั้ง

4.5.1 ฤทธิ์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงทุติยภูมิ

ผลการทดสอบพบว่า ณ ความเข้มข้นที่สารสกัดสามารถฆ่าเซลล์ทดสอบได้ มีเพียงความเข้มข้นสุดท้ายในจานเพาะเลี้ยงที่ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร หรือเท่ากับ 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรในการเจือจางสารสกัดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ นั่นคือสารสกัดมะกั้งมีความเป็นพิษน้อยต้องใช้ปริมาณที่มากกว่าที่ใช้ฆ่าเซลล์จึงจะพบการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงได้ แสดงในตาราง 4.12

ตาราง 4.12 ฤทธิ์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงทุติยภูมิ P388 ของสารสกัดมะกั้ง ณ ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับสารสกัดที่ความเข้มข้นสุดท้ายในจานเพาะเลี้ยงเท่ากับ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร) และ DMSO แสดงค่าในรูปร้อยละของเซลล์เพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น หน่วยเป็นร้อยละ

ความเข้มข้น ของสารสกัด (มคก./มล.)	สารสกัดมะกั้งตัวอย่างที่					
	1 ใบ	2 เถา	3 เนื้อ	4 เมล็ด	5 เมล็ด	6 เมล็ด
800	77.0	75.5	90.0	65.5**	66.0**	67.5**
400	91.7	86.4	97.6	88.3	89.0	88.5
200	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
100	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
50	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
25	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

*ความเข้มข้นทดสอบของสารสกัดเท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร

**ความเข้มข้นของสารสกัดมะกั้งที่ตรวจพบการเจริญของเซลล์ได้บางส่วน

ยาไซโคลฟอสฟาไมด์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรพบว่ายับยั้งการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงได้ทั้งหมด 1 % DMSO ที่ใช้เป็นตัวควบคุมผลลบ พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยงได้

4.6 การทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกิ้งในแบคทีเรีย

4.6.1 การศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกิ้งในแบคทีเรีย

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกิ้ง ได้แก่ ใบ เถา ผลเนื้อ และเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์ และเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ทำการทดสอบโดยใช้แบคทีเรียซัลโมเนลลา ธิฟิมูเรียม (*Salmonella typhimurium*) สายพันธุ์ TA98 และ TA100 ซึ่งเป็นการทดสอบการกลายพันธุ์แบบ frame shift และ base-pair substitution ตามลำดับ ทั้งในสถานะที่มีและไม่มีเอนไซม์ (S9 mix) กระตุ้น พบว่าสารสกัดมะกิ้งที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1.0 และ 5.0 mg/plate ไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธิฟิมูเรียม สายพันธุ์ TA98 ในสถานะที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ส่วนในสถานะที่มีเอนไซม์กระตุ้น สารสกัดใบ ผลเนื้อ และเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล รวมถึงเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1.0 และ 5.0 mg/plate ไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธิฟิมูเรียม สายพันธุ์ TA98 ส่วนสารสกัดเถาที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 5 mg/plate มีความเป็นไปได้ที่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ (Possible mutagenicity) โดยมีค่า mutagenicity index (MI) เท่ากับ 1.9 และนอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 5 mg/plate มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย (Killing effect) แต่เมื่อลดความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 0.01, 0.1 และ 1.0 mg/plate พบว่าสารสกัดทั้งสองส่วนไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธิฟิมูเรียม สายพันธุ์ TA98 แสดงดังตาราง 4.13

ผลการทดสอบฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกิ้งในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธิฟิมูเรียม สายพันธุ์ TA100 แสดงดังตาราง 4.14 พบว่าในสถานะที่มีเอนไซม์กระตุ้น สารสกัดมะกิ้งไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธิฟิมูเรียม สายพันธุ์ TA100 ส่วนในสถานะที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น สารสกัดใบ เถา และเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล รวมถึงเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1.0 และ 5.0 mg/plate ไม่มีฤทธิ์ก่อการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธิฟิมูเรียม สายพันธุ์ TA100 ส่วนสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล และเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้น 5 mg/plate มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย แต่เมื่อลดความเข้มข้นเป็น 0.01, 0.1 และ 1.0 mg/plate สารสกัดทั้งสองส่วนไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธิฟิมูเรียม สายพันธุ์ TA100

4.6.2 การศึกษาฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกิ้งในแบคทีเรีย

ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกิ้งโดยการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียซัลโมเนลลา ธิฟิมูเรียมสายพันธุ์ TA98 เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ 3-methyl-and 3,4-dimethyl-3H-imidazo (4,5-f) quinolin-2-amine (MeIQ) และ 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF-2) ในสถานะมีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ตามลำดับ พบว่าในสถานะที่มีเอนไซม์กระตุ้นสารสกัดมะกิ้งที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 mg/plate ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่มีพิษและไม่มีการก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วย MeIQ ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธิฟิมูเรียมสายพันธุ์ TA98 แสดงดังตาราง 5 โดยสารสกัดเถาที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ได้สูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดใบ ผล

เนื้อ และเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล ส่วนเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์และคลอโรฟอร์มไม่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ MelQ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น พบว่าสารสกัดผลเนื้อมะกึ่งที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 5 mg/plate มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์อย่างอ่อน (Mild antimutagenicity) จากการเหนี่ยวนำด้วย AF-2 ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธัยฟิมาเรียม สายพันธุ์ TA98 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการกลายพันธุ์ (% inhibition) เท่ากับ 34.5 ± 6.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารสกัดมะกึ่งส่วนอื่นไม่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ AF-2

ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกึ่งโดยการเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียซัลโมเนลลา ธัยฟิมาเรียมสายพันธุ์ TA100 เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ Aflatoxin B₁ (AFB₁) และ Sodium azide (NaN₃) ในสภาวะมีและไม่มีเอนไซม์กระตุ้น ตามลำดับ พบว่าสภาวะที่มีเอนไซม์กระตุ้นสารสกัดมะกึ่งที่ความเข้มข้น 0.1 และ 1.0 mg/plate ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่มีพิษและไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วย AFB₁ ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ธัยฟิมาเรียมสายพันธุ์ TA100 แสดงดังตาราง 4.16 โดยสารสกัดผลเนื้อมะกึ่งที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ได้สูงสุด รองลงมาคือ สารสกัดเถา เมล็ด และใบที่สกัดด้วยเอทานอล เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์และคลอโรฟอร์ม ส่วนในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์กระตุ้น พบว่าสารสกัดมะกึ่งไม่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ NaN₃

ตาราง 4.13ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกั้งในแบคทีเรียชัลโมเนลลา ฮัยฟิมิวเรียม สายพันธุ์ TA98 ในสภาวะที่ไม่มี (-S9 mix) และมีเอนไซม์กระตุ้น (+S9 mix)

Treatment	Dose	Average of His+ revertant colonies (MI)			
		TA98			
		-S9		+S9	
DMSO	50 µl/plate	25.1 ± 2.4	(1.0)	31.6 ± 2.8	(1.0)
AF-2	0.1 µg/plate	603.5 ± 26.7	(19.9)	N.A.	-
2-AA	0.5 µg/plate	N.A.	-	492.3 ± 30.2	(16.3)
ใบที่สกัดด้วยเอทานอล	0.01 mg/plate	28.2 ± 2.0	(1.2)	31.4 ± 2.8	(1.0)
	0.1 mg/plate	29.3 ± 3.0	(1.2)	29.3 ± 2.1	(1.0)
	1.0 mg/plate	28.2 ± 3.6	(1.2)	35.4 ± 3.3	(1.2)
	5.0 mg/plate	23.6 ± 2.3	(0.9)	38.3 ± 3.6	(1.2)
ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล	0.01 mg/plate	32.2 ± 4.9	(1.3)	31.8 ± 2.0	(1.0)
	0.1 mg/plate	28.1 ± 2.0	(1.2)	30.3 ± 3.7	(1.0)
	1.0 mg/plate	25.0 ± 1.8	(1.1)	33.5 ± 2.7	(1.1)
	5.0 mg/plate	22.6 ± 1.5	(0.9)	31.3 ± 3.1	(1.0)
เถาที่สกัดด้วยเอทานอล	0.01 mg/plate	35.1 ± 3.2	(1.5)	28.0 ± 2.6	(0.9)
	0.1 mg/plate	28.2 ± 2.5	(1.1)	30.3 ± 2.6	(1.0)
	1.0 mg/plate	30.4 ± 5.6	(1.2)	43.0 ± 5.7	(1.4)
	5.0 mg/plate	33.8 ± 2.9	(1.3)	59.5 ± 6.6	(1.9)
เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล	0.01 mg/plate	24.6 ± 2.6	(1.0)	28.0 ± 3.9	(0.9)
	0.1 mg/plate	25.5 ± 2.4	(1.1)	34.1 ± 5.6	(1.1)
	1.0 mg/plate	25.4 ± 2.6	(1.1)	29.9 ± 1.9	(1.0)
	5.0 mg/plate	27.4 ± 1.7	(0.9)	24.6 ± 4.3	(0.8)
เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์	0.01 mg/plate	26.7 ± 2.4	(1.1)	26.0 ± 2.4	(0.8)
	0.1 mg/plate	23.6 ± 3.2	(1.0)	30.6 ± 1.9	(1.0)
	1.0 mg/plate	26.3 ± 1.7	(1.1)	26.8 ± 2.7	(0.9)
	5.0 mg/plate	20.8 ± 1.0	(0.9)	34.1 ± 6.7	(1.0)
เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	0.01 mg/plate	22.4 ± 0.9	(1.0)	26.3 ± 1.2	(0.9)
	0.1 mg/plate	25.0 ± 1.5	(1.1)	27.4 ± 2.4	(0.9)
	1.0 mg/plate	25.0 ± 2.5	(1.0)	26.8 ± 2.2	(0.9)
	5.0 mg/plate	25.2 ± 2.8	(0.9)	29.5 ± 2.3 (K)	(0.9)

หมายเหตุ; แสดงค่าในรูป Mean ± SEM, AF-2; 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 2-AA; 2-aminoanthracene

K; Killing effect, S9; S9 mix, MI; Mutagenicity Index, N.A.; Not analyzed

ตาราง 4.14 ฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ของสารสัณฐานกึ่งในแบคทีเรียซัลโมเนลลา รัยฟิมิวเรียม สายพันธุ์ TA100 ในสภาวะที่ไม่มี (-S9 mix) และมีเอนไซม์กระตุ้น (+S9 mix)

Treatment	Dose	Average of His+ revertant colonies (MI)			
		TA100			
		-S9		+S9	
DMSO	50 µl/plate	131.8 ± 3.3	(1.0)	152.8 ± 5.2	(1.0)
AF-2	0.01 µg/plate	434.2 ± 9.0	(3.3)	N.A.	-
2-AA	0.5 µg/plate	N.A.	-	394.0 ± 50.3	(2.6)
ใบที่สกัดด้วยเอทานอล	0.01 mg/plate	139.8 ± 4.9	(1.1)	135.3 ± 4.4	(0.9)
	0.1 mg/plate	134.0 ± 4.8	(1.0)	147.8 ± 4.1	(0.9)
	1.0 mg/plate	133.0 ± 2.2	(1.0)	154.0 ± 4.5	(1.0)
	5.0 mg/plate	184.0 ± 13.0	(1.0)	161.3 ± 4.0	(1.1)
ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล	0.01 mg/plate	137.7 ± 6.4	(1.0)	139.3 ± 5.1	(0.9)
	0.1 mg/plate	132.0 ± 4.3	(1.0)	135.3 ± 6.2	(0.9)
	1.0 mg/plate	125.5 ± 3.5	(1.0)	171.4 ± 5.4	(1.1)
	5.0 mg/plate	78.8 ± 8.1 (K)	(0.4)	159.4 ± 6.5	(1.0)
เถาที่สกัดด้วยเอทานอล	0.01 mg/plate	137.7 ± 4.8	(1.0)	157.1 ± 6.9	(1.1)
	0.1 mg/plate	134.8 ± 2.8	(1.0)	151.9 ± 6.7	(1.0)
	1.0 mg/plate	147.0 ± 2.7	(1.1)	167.8 ± 10.4	(1.1)
	5.0 mg/plate	131.8 ± 8.2	(0.7)	151.4 ± 4.4	(1.0)
เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล	0.01 mg/plate	137.7 ± 4.3	(1.0)	146.8 ± 7.5	(1.0)
	0.1 mg/plate	139.8 ± 4.9	(1.1)	144.8 ± 10.7	(0.9)
	1.0 mg/plate	134.7 ± 4.9	(1.0)	170.3 ± 6.7	(1.1)
	5.0 mg/plate	194.8 ± 9.1	(1.0)	160.0 ± 9.3	(1.0)
เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์	0.01 mg/plate	135.8 ± 4.0	(1.0)	130.1 ± 7.8	(0.8)
	0.1 mg/plate	135.5 ± 3.4	(1.0)	175.8 ± 14.3	(1.2)
	1.0 mg/plate	134.3 ± 3.0	(1.0)	184.6 ± 28.2	(1.2)
	5.0 mg/plate	129.8 ± 5.9	(0.7)	168.9 ± 9.2	(1.1)
เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	0.01 mg/plate	130.3 ± 1.5	(1.0)	142.7 ± 7.5	(0.9)
	0.1 mg/plate	143.5 ± 2.1	(1.1)	173.4 ± 14.9	(1.2)
	1.0 mg/plate	127.7 ± 2.9	(1.0)	176.3 ± 8.8	(1.1)
	5.0 mg/plate	170.3 ± 14.2 (K)	(0.9)	180.8 ± 11.2	(1.1)

หมายเหตุ; แสดงค่าในรูป Mean ± SEM, AF-2; 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, 2-AA; 2-aminoanthracene

K; Killing effect, S9; S9 mix, MI; Mutagenicity Index, N.A.; Not analyzed

ตาราง 4.15ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกั้งในแบคทีเรียชัลโมเนลลา อัยฟิมิวเรียม สายพันธุ์ TA98 ในสภาวะที่ไม่มี (-S9 mix) และมีเอนไซม์กระตุ้น (+S9 mix)

Treatment	Dose	Mutagens					
		AF-2 (0.1 µg/plate)			MeIQ (2 ng/plate)		
		Average of His+ revertant colonies	% inhibition	Antimutagenic score	Average of His+ revertant colonies	% inhibition	Antimutagenic score
DMSO	100 µl/plate	18.1 ± 2.0	-	-	50.3 ± 3.8	-	-
AF-2	0.1 µg/plate	341.3 ± 3.0	-	-	N.A.	-	-
MeIQ	2 ng/plate	N.A.	-	-	937.7 ± 22.8	-	-
ใบที่สกัดด้วยเอทานอล	0.1 mg/plate	309.7 ± 35.1	10.2 ± 9.0	0	951.0 ± 35.0	-2.0 ± 4.7	0
	1.0 mg/plate	316.2 ± 29.4	8.0 ± 7.0	0	461.2 ± 22.6	53.9 ± 2.1	+2
	5.0 mg/plate	367.7 ± 38.5	-7.4 ± 9.5	0	N.A.	-	-
ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล	0.1 mg/plate	267.3 ± 31.7	23.7 ± 8.1	0	874.3 ± 60.6	7.8 ± 5.4	0
	1.0 mg/plate	335.4 ± 28.8	0.2 ± 10.1	0	510.7 ± 53.6	49.1 ± 5.1	+1
	5.0 mg/plate	232.4 ± 27.8	34.5 ± 6.9	+1	N.A.	-	-
เถาที่สกัดด้วยเอทานอล	0.1 mg/plate	267.9 ± 25.6	23.4 ± 5.8	0	902.7 ± 55.4	4.4 ± 4.6	0
	1.0 mg/plate	318.4 ± 38.8	8.8 ± 9.5	0	360.7 ± 30.8	65.4 ± 3.2	+2
	5.0 mg/plate	331.7 ± 37.3	4.0 ± 9.4	0	N.A.	-	-
เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล	0.1 mg/plate	255.3 ± 26.0	27.1 ± 6.0	0	884.9 ± 45.5	6.3 ± 4.0	0
	1.0 mg/plate	374.2 ± 32.5	-10.3 ± 8.5	0	613.6 ± 52.3	37.0 ± 5.1	+1
	5.0 mg/plate	307.4 ± 28.1	11.1 ± 6.2	0	N.A.	-	-
เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์	0.1 mg/plate	285.9 ± 29.3	17.5 ± 7.5	0	880.8 ± 31.2	6.3 ± 3.2	0
	1.0 mg/plate	269.1 ± 20.8	22.0 ± 5.3	0	707.2 ± 46.2	25.8 ± 5.3	0
	5.0 mg/plate	262.6 ± 27.1	24.8 ± 6.5	0	N.A.	-	-
เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	0.1 mg/plate	257.1 ± 17.1	26.0 ± 3.1	0	933.7 ± 24.0	0.0 ± 3.2	0
	1.0 mg/plate	256.7 ± 24.4	26.7 ± 5.3	0	889.3 ± 61.0	5.8 ± 5.5	0
	5.0 mg/plate	340.0 ± 33.0	0.5 ± 7.9	0	N.A.	-	-

หมายเหตุ: แสดงค่าในรูป Mean ± SEM, AF-2; 2-(2-furyl-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, MeIQ; 3-methyl-and 3,4-dimethyl-3H-imidazo (4,5-f) quinolin-2-amine, N.A.; Not analyzed

ตาราง 4.16 ฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกั้งในแบคทีเรียซัลโมเนลลา รัยพิมิวเรียม สายพันธุ์ TA100 ในสภาวะที่ไม่มี (-S9 mix) และมีเอนไซม์กระตุ้น (+S9 mix)

Treatment	Dose	Mutagens					
		NaN ₃ (0.75 µg/plate)			AFB ₁ (4 ng/plate)		
		Average of His+ revertant colonies	% inhibition	Antimutagenic score	Average of His+ revertant colonies	% inhibition	Antimutagenic score
DMSO	100 µl/plate	139.8 ± 10.6	-	-	136.8 ± 6.9	-	-
NaN ₃	0.75 µg/plate	421.4 ± 6.3	-	-	N.A.	-	-
AFB ₁	4 ng/plate	N.A.	-	-	712.6 ± 23.7	-	-
ใบที่สกัดด้วยเอทานอล	0.1 mg/plate	405.3 ± 10.6	3.6 ± 5.3	0	657.0 ± 49.3	10.3 ± 6.7	0
	1.0 mg/plate	403.4 ± 11.5	6.6 ± 4.2	0	228.1 ± 12.9	84.2 ± 1.7	+3
ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล	0.1 mg/plate	440.4 ± 16.0	1.5 ± 7.6	0	580.4 ± 43.0	24.8 ± 5.6	0
	1.0 mg/plate	364.3 ± 15.8	20.8 ± 7.2	0	115.1 ± 6.4	104.0 ± 1.0	+4
เถาที่สกัดด้วยเอทานอล	0.1 mg/plate	432.3 ± 12.9	-4.2 ± 5.3	0	591.6 ± 32.2	21.3 ± 4.3	0
	1.0 mg/plate	344.7 ± 10.7	27.4 ± 5.3	0	174.8 ± 11.3	93.7 ± 2.0	+4
เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล	0.1 mg/plate	403.7 ± 13.8	6.5 ± 5.4	0	556.7 ± 34.1	27.0 ± 5.8	0
	1.0 mg/plate	439.5 ± 11.7	-7.0 ± 4.0	0	228.1 ± 15.7	84.5 ± 1.8	+3
เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์	0.1 mg/plate	425.7 ± 11.3	-2.0 ± 4.3	0	613.6 ± 28.5	16.1 ± 6.2	0
	1.0 mg/plate	393.1 ± 17.2	9.4 ± 7.6	0	285.2 ± 27.3	74.8 ± 3.7	+3
เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	0.1 mg/plate	386.1 ± 18.9	12.8 ± 6.4	0	595.3 ± 46.2	20.4 ± 7.7	0
	1.0 mg/plate	345.9 ± 10.8	27.9 ± 4.9	0	352.4 ± 18.5	62.2 ± 3.5	+2

หมายเหตุ; แสดงค่าในรูป Mean ± SEM, NaN₃; Sodium azide, AFB₁; Aflatoxin B₁, N.A.; Not analyzed

4.7 การทดสอบฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านมะเร็งในหลอดทดลอง

การทดสอบฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านมะเร็ง quinone reductase ในเซลล์มะเร็งตับ hepa1c1c7 ด้วยสารสกัดมะกิ้ง ได้แก่ ใบ เถา ผลเนื้อ และเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์ และเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม แสดงดังตาราง 4. 17 พบว่าสารสกัดมะกิ้งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับหนู hepa1c1c7 และไม่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำกัมมันตภาพเอนไซม์ quainone reductase ได้ ในขณะที่ β -naphthoflavone ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/ml ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวกไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับหนู hepa1c1c7 และสามารถเหนี่ยวนำกัมมันตภาพเอนไซม์ quinone reductase ได้มากกว่ากลุ่มควบคุมลบ 2.4 เท่า

ตาราง 4.17 ผลของสารสกัดมะกิ้งในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านมะเร็ง quinone reductase

สารสกัด	ความเข้มข้น	Fold of induction (ratio)	Cell viability (%)
β -naphthoflavone	0.25 mg/ml	2.40 ± 0.59	74 ± 4.6
ใบที่สกัดด้วยเอทานอล	25 ug/ml	1.40 ± 0.34	103.2 ± 11.3
	50 ug/ml	1.59 ± 0.39	100.4 ± 16.4
	100 ug/ml	1.93 ± 0.30	86.5 ± 6.3
ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล	2.5 ug/ml	1.33 ± 0.04	99.1 ± 2.0
	5 ug/ml	1.21 ± 0.12	102.0 ± 7.4
	10 ug/ml	1.28 ± 0.14	81.7 ± 9.3
เถาที่สกัดด้วยเอทานอล	2.5 ug/ml	1.17 ± 0.08	99.6 ± 2.2
	5 ug/ml	1.21 ± 0.11	96.8 ± 2.2
	10 ug/ml	1.21 ± 0.20	98.0 ± 12.6
เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล	25 ug/ml	1.34 ± 0.31	99.2 ± 12.6
	50 ug/ml	1.51 ± 0.41	83.3 ± 7.2
	100 ug/ml	1.69 ± 0.20	85.2 ± 13.9
เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์	25 ug/ml	1.11 ± 0.28	107.7 ± 2.2
	50 ug/ml	1.16 ± 0.21	107.7 ± 13.5
	100 ug/ml	1.19 ± 0.21	95.4 ± 8.8
เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	25 ug/ml	1.18 ± 0.24	109.6 ± 11.0
	50 ug/ml	1.39 ± 0.32	91.2 ± 15.5
	100 ug/ml	1.45 ± 0.24	90.5 ± 16.5

4.8 การทดสอบฤทธิ์ฆ่าและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะกิง ได้แก่ ใบ เถา ผลเนื้อ และเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์ และเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ต่อการเจริญของเซลล์ 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งปอด (A549), มะเร็งตับ (HepG2) และ มะเร็งลำไส้ (SW620) เทียบกับเซลล์ปกติ (MRC5) ทำการทดสอบโดยใช้หลักการ Sulforhodamine B assay

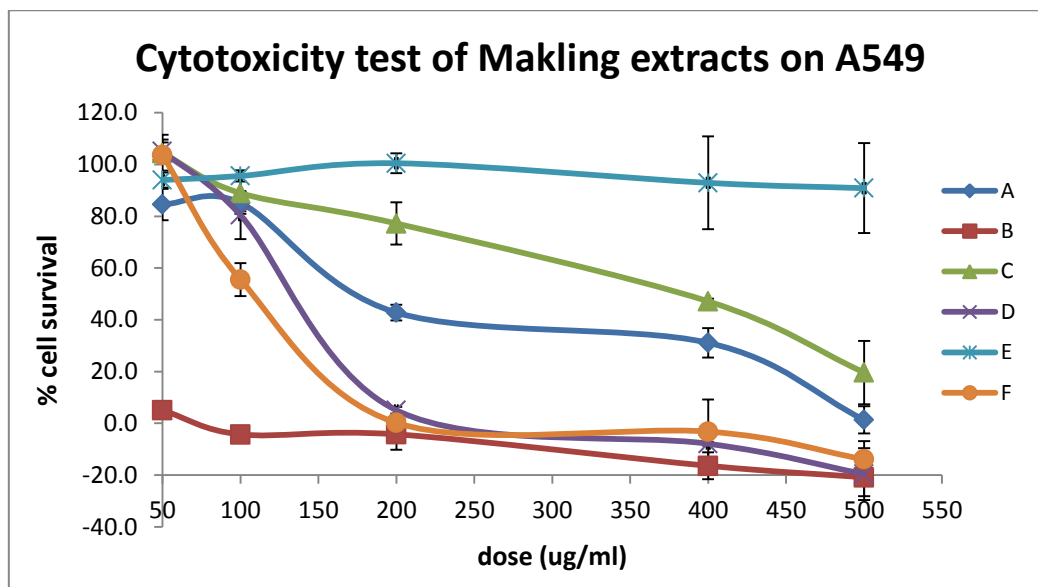
ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะกิงต่อการเจริญของเซลล์ต่างๆทั้ง 4 ชนิดแสดงในภาพ 4.5-4.8 และความเข้มข้นของสารสกัดมะกิงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต 50 เปอร์เซ็นต์ (Growth inhibition 50, GI50) และการยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งหมด (Total growth inhibition, TGI) ของเซลล์ต่างๆ แสดงในตาราง 18 และ 19 พบว่าสารสกัดมะกิงส่วนต่างๆ จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ต่างกัน โดยฤทธิ์ของสารสกัดมะกิงต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (A549) พบว่าสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดได้ดีที่สุด ตามด้วยสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม, สารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล, สารสกัดใบที่สกัดด้วยเอทานอล, สารสกัดเถาที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดเมล็ดมะกิงที่สกัดด้วยอีเทอร์ ตามลำดับ โดยสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 50 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด 50% และที่ความเข้มข้น 75.35 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดได้อย่างสมบูรณ์

สำหรับฤทธิ์ของสารสกัดมะกิงต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) พบว่าสารสกัดเมล็ดมะกิงที่สกัดด้วยอีเทอร์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ดีที่สุด ตามด้วยสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล, สารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล, สารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม, สารสกัดใบที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดเถาที่สกัดด้วยเอทานอล ตามลำดับ โดยสารสกัดเมล็ดมะกิงที่สกัดด้วยอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 81.90 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้ 50% และที่ความเข้มข้น 260.26 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับได้อย่างสมบูรณ์

ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดมะกิงต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620) พบว่าสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดีที่สุด ตามด้วยสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์, สารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม, สารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล, สารสกัดเถาที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดใบที่สกัดด้วยเอทานอล ตามลำดับ โดยสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 83.68 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ 50% และสารสกัดเมล็ดมะกิงที่สกัดด้วยอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 180.94 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อย่างสมบูรณ์

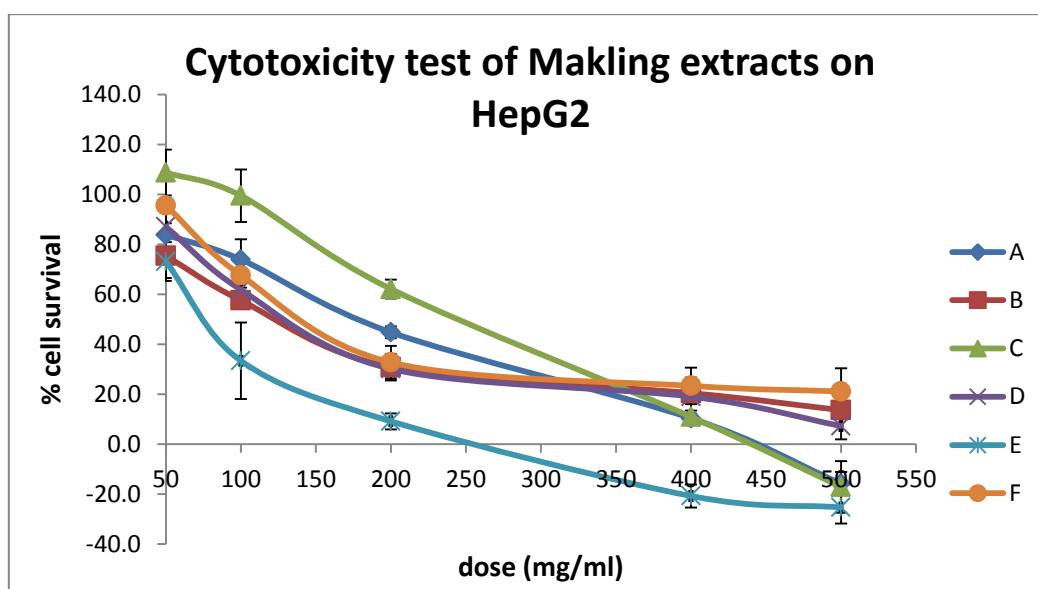
นอกจากนี้ฤทธิ์ของสารสกัดมะกิงต่อการเจริญของเซลล์ปกติ (MRC5) พบว่าสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติได้ดีที่สุด ตามด้วยสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม, สารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล, สารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์, สารสกัดใบที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดเถาที่สกัดด้วยเอทานอล ตามลำดับ โดยสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 50

$\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติ 50% และที่ความเข้มข้น 336.41 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติได้อย่างสมบูรณ์



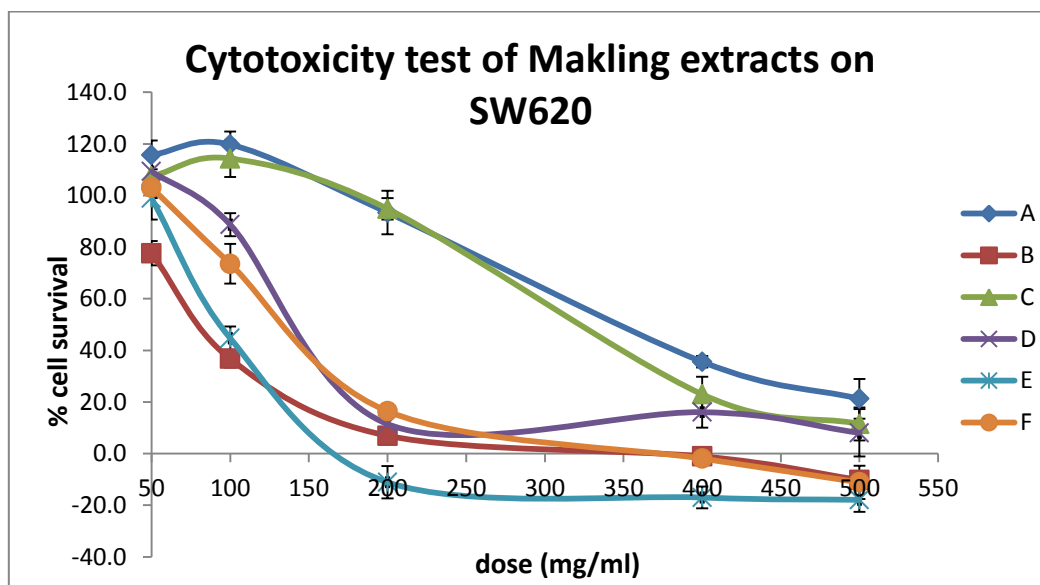
ภาพ 4.12 ฤทธิ์ของสารสกัดมะกิงต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งปอด (A549)

หมายเหตุ: A; ใบที่สกัดด้วยเอทานอล, B; ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล, C; เถาที่สกัดด้วยเอทานอล, D; เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล, E; เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์, F; เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม



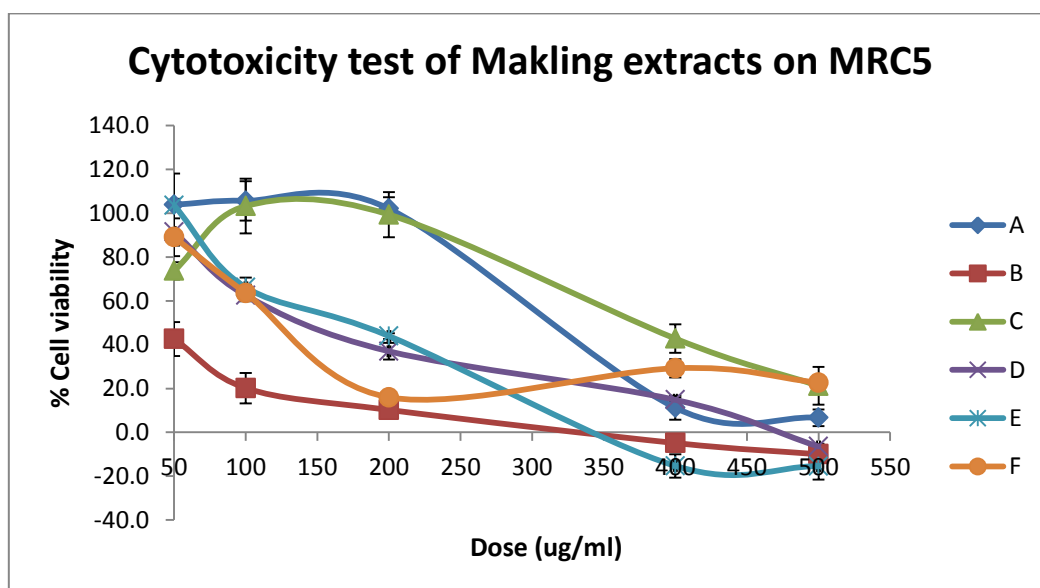
ภาพ 4.13 ฤทธิ์ของสารสกัดมะกิงต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2)

หมายเหตุ: A; ใบที่สกัดด้วยเอทานอล, B; ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล, C; เถาที่สกัดด้วยเอทานอล, D; เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล, E; เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์, F; เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม



ภาพ 4.14ฤทธิ์ของสารสกัดมะกิงต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW620)

หมายเหตุ: A; ใบที่สกัดด้วยเอทานอล, B; ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล, C; เถาที่สกัดด้วยเอทานอล, D; เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล, E; เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์, F; เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม



ภาพ 4.15ฤทธิ์ของสารสกัดมะกิงต่อการเจริญของเซลล์ปกติ (MRC5)

หมายเหตุ: A; ใบที่สกัดด้วยเอทานอล, B; ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล, C; เถาที่สกัดด้วยเอทานอล, D; เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล, E; เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์, F; เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

ตาราง 4.18 ความเข้มข้นของสารสกัดมะกั้งต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต 50 เปอร์เซ็นต์ (Growth inhibition 50, GI50) ของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติในหลอดทดลอง

สารสกัด	GI50 ± SD (µg/ml)			
	MRC5	A549	HepG-2	SW620
ใบที่สกัดด้วยเอทานอล	314.61 ± 11.14	182.90 ± 6.45	182.40 ± 3.08	349.31 ± 12.42
ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล	< 50	< 50	120.86 ± 3.74	83.68 ± 4.33
เถาที่สกัดด้วยเอทานอล	377.52 ± 15.89	380.33 ± 8.65	254.17 ± 15.98	325.15 ± 15.62
เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล	149.57 ± 4.92	140.84 ± 6.71	137.13 ± 12.07	150.01 ± 4.37
เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์	171.92 ± 9.61	> 500	81.90 ± 9.19	95.64 ± 3.54
เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	128.35 ± 6.95	103.91 ± 5.69	151.17 ± 14.17	140.51 ± 6.58

ตาราง 4.19 ความเข้มข้นของสารสกัดมะกั้งต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตทั้งหมด (Total growth inhibition, TGI) ของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติในหลอดทดลอง

สารสกัด	TGI ± SD (µg/ml)			
	MRC5	A549	HepG-2	SW620
ใบที่สกัดด้วยเอทานอล	> 500	> 500	440.43 ± 10.93	> 500
ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล	336.41 ± 12.26	75.35 ± 7.87	> 500	375.15 ± 7.30
เถาที่สกัดด้วยเอทานอล	> 500	> 500	441.78 ± 9.97	> 500
เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล	469.60 ± 5.71	277.75 ± 10.69	> 500	> 500
เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์	349.26 ± 11.84	> 500	260.26 ± 6.72	180.94 ± 7.78
เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	> 500	194.69 ± 7.24	> 500	378.37 ± 8.99

4.9 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองของสารสกัดมะกั้ง

4.9.1 DPPH scavenging assay

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging activity ของสารสกัดมะกั้งส่วนต่างๆ แสดงดังตาราง 4.20 พบว่าสารสกัดมะกั้งส่วนใบที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 6.46 ± 3.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามมาด้วย เถาที่สกัดด้วยเอทานอล, เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 9.16 ± 1.44 , 63.96 ± 0.40 และ 81.78 ± 5.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล และเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์นั้นมีค่า IC₅₀ มากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง 4.20 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะกั้งในส่วนต่างๆ ด้วยวิธี DPPH scavenging assay

สารสกัดมะกั้ง	IC ₅₀ (mg/ml)
Ascorbic acid	0.20 ± 0.05
ใบที่สกัดด้วยเอทานอล	6.46 ± 3.03
เถาที่สกัดด้วยเอทานอล	9.16 ± 1.44
เมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม	63.96 ± 0.40
ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล	81.78 ± 5.93
เมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล	> 100
เมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์	> 100

4.10 Deoxyribose assay

4.10.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Deoxyribose assay โดยทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical scavenging activity) พบว่าสารสกัดมะกั้งส่วนใบ ผลเนื้อ เถา และเมล็ดมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (OH[•]) ได้แตกต่างกัน โดยพบว่าสารสกัดส่วนใบ ผลเนื้อ เถา และเมล็ดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงเปอร์เซ็นต์ยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ดังนี้ 22.73 ± 4.80 , 20.67 ± 1.62 , 31.30 ± 9.01 และ 7.31 ± 0.95 ตามลำดับ โดยสารสกัดเถามีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด แสดงดังตาราง 4.21

4.10.2 การศึกษาความสามารถในการจับเหล็ก

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Deoxyribose assay โดยทดสอบความสามารถในการจับเหล็ก (Iron chelating activity) นั้นเป็นการทดสอบฤทธิ์ในการจับเหล็กซึ่งเป็นตัวการทำให้เกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา Fenton พบว่าสารสกัดมะกั้งส่วนใบ ผลเนื้อ เถา และเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอลมีความสามารถในการกำจัดเหล็กได้แตกต่างกัน โดยพบว่าสารสกัดส่วนใบ ผลเนื้อ เถา และเมล็ดที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการจับเหล็ก ดังนี้ 65.13 ± 0.98 , 27.53 ± 12.95 , 64.43 ± 5.82 และ 19.67 ± 8.63 ตามลำดับ โดยสารสกัดใบมีฤทธิ์กำจัดเหล็กได้สูงที่สุด แสดงดังตาราง 4.22

ตาราง 4.21 ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลของสารสกัดมะกั้ง (Hydroxyl scavenging activity)

สารสกัด	ความเข้มข้น (mg/ml)	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล
น้ำกลั่น	-	0.00
Gallic acid	1.0	5.47 ± 1.19
	5.0	22.27 ± 6.06
	10.0	47.00 ± 6.23
ใบที่สกัดด้วยเอทานอล	1.0	8.67 ± 1.46
	5.0	12.33 ± 3.59
	10.0	22.73 ± 4.80
ผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล	1.0	6.33 ± 1.06
	5.0	13.67 ± 3.39
	10.0	20.67 ± 1.62
เถาสกัดด้วยเอทานอล	1.0	10.00 ± 0.72
	5.0	17.23 ± 2.12
	10.0	31.30 ± 9.01
เมล็ดสกัดด้วยเอทานอล	1.0	6.97 ± 1.74
	5.0	7.37 ± 0.95
	10.0	7.31 ± 0.95

ตาราง 4.22 ความสามารถในการจับเหล็กของสารสกัดมะกั้ง (Iron chelating activity)

สารสกัด	ความเข้มข้น (mg/ml)	เปอร์เซ็นต์การกำจัดเหล็ก
น้ำกลั่น	-	0.00
Gallic acid	1.0	69.20±4.29
	5.0	80.33±2.77
	10.0	82.93±1.38
ใบที่สกัดด้วยเอทานอล	1.0	35.03±9.36
	5.0	63.67±1.07
	10.0	65.13±0.98
ผลเนื้อสกัดด้วยเอทานอล	1.0	14.70±7.92
	5.0	27.53±12.95
	10.0	44.23±9.49
เถาสกัดด้วยเอทานอล	1.0	30.50±10.35
	5.0	50.90±8.94
	10.0	64.43±5.82
เมล็ดสกัดด้วยเอทานอล	1.0	23.30±7.01
	5.0	20.17±6.79
	10.0	19.67±8.63

4.11 ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด ในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผักด้วยวิธี leaf disk choice (Brem, *et al.*, 2002)

ตาราง 4.23 แสดงลักษณะการออกฤทธิ์ของสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

สารทดสอบ	ความเข้มข้น (ppm)				
	100	500	1,000	5,000	10,000
ใบมะก้างสกัดด้วย 95% EtOH	I	I	I	A	A
เถามะก้างสกัดด้วย 95% EtOH	I	I	I	I	I
เนื้อผลมะก้างสกัดด้วย 95% EtOH	I	I	I	I	I
เมล็ดมะก้างสกัดด้วย Petroleum ether	I	I	I	I	I
เมล็ดมะก้างสกัดด้วย Chloroform	I	I	I	I	I
เมล็ดมะก้างสกัดด้วย 95% EtOH	I	I	I	I	A
Methomyl	I	A	S	R	R
Control (น้ำ + เอทานอล)	-	-	-	-	I

หมายเหตุ - = ไม่ได้ทำการทดลอง

จากตาราง 4.23 พบว่าสารสกัดจากใบมะก้างที่สกัดด้วย 95% EtOH ที่ความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ppm และเมล็ดมะก้างที่สกัดด้วย 95% EtOH ที่ความเข้มข้น 10,000 ppm มีฤทธิ์ในการยับยั้งการกิน (antifeedant) ของหนอนกระทู้ผัก ส่วนสารทดสอบอื่นๆและกลุ่มควบคุมจะไม่มีฤทธิ์ต่อหนอนกระทู้ผัก แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารเคมี ได้แก่ Methomyl มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผักดีที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้น 5,000 และ 10,000 ppm พบว่าไม่มีการกินใบคะน้าเกิดขึ้นเลยในสารที่ทดสอบ จึงมีฤทธิ์ไล่หนอนกระทู้ผัก (Repellent activity) ขณะที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm จะแสดงฤทธิ์ Strong antifeedant activity และที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการกิน (antifeedant) ของหนอนกระทู้ผัก

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

ในการศึกษาทำการสกัดส่วนต่าง ๆ ของมะกั้ง โดยแบ่งส่วน ดังนี้ เปลือก-เนื้อผล ใบ เถา และเนื้อในเมล็ด นำมาสกัดด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่อง ด้วย Soxhlet's apparatus ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ สารสกัดที่สกัดได้ พบว่า ในส่วนของเนื้อในเมล็ดและส่วนอื่น ๆ มี % yield ดังนี้

ตาราง 5.1 แสดง % yield ของมะกั้ง ที่สกัดด้วยวิธีการสกัดต่อเนื่องด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ในส่วนของเนื้อในเมล็ดและส่วนอื่น ๆ

ส่วนที่ใช้	ตัวทำละลาย	% Yield (w/w)
เนื้อในเมล็ด*	Petroleum ether	48.31-56.55
	Chloroform	2.59-4.01
	95 % Ethanol	1.23-2.81
ใบ	95 % Ethanol	8.30-11.52
เถา	95 % Ethanol	4.42-9.85
เปลือก-เนื้อผล	95 % Ethanol	6.48-15.17

* เฉพาะเมล็ดที่สมบูรณ์และมาจากผลสุก

ในการสกัดนั้น เนื่องจากมีความแตกต่างของแหล่งที่มา จึงแยกสกัดแต่ละชุดของวัตถุดิบที่ส่งมาในช่วงเวลาที่ต่างกัน เมื่อสกัดแล้วจึงรวบรวมแหล่งเดียวกันในการส่งทดสอบฤทธิ์ในแต่ละฤทธิ์ เพื่อให้ไม่มีความแตกต่างในการทดสอบในแต่ละวิธีการในฤทธิ์นั้น ๆ จากผลการสกัดจะพบว่าปริมาณของสารสกัดในตัวอย่างที่สกัดในส่วนเดียวกันและใช้สภาวะเดียวกันมีความผันแปรของปริมาณค่อนข้างสูง (ตาราง 4.2 และ 5.1) ทั้งนี้ อาจมาจากปัจจัยในเรื่องของอายุพืช ช่วงเวลาที่เก็บ ภูมิประเทศที่แตกต่างกัน ซึ่งหากพืชชนิดนี้มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ น่าจะมีการศึกษาในด้านปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของวัตถุดิบต่อไป เพื่อที่จะได้มาซึ่งวัตถุดิบที่มีคุณภาพสม่ำเสมอในการนำไปใช้เพื่อเตรียมผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ผลพบว่าสารสกัดทุกส่วนของมะกั้งไม่จัดว่าสารสกัดที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลชีพต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Candida albican*

การทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองของสารสกัดมะกั้ง ผลการทดสอบพบว่า ณ ความเข้มข้นที่สารสกัดสามารถฆ่าเซลล์ทดสอบได้ มีเพียงความเข้มข้นสุดท้ายในงานเพาะเลี้ยงที่ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือเท่ากับ 4000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการเจือจางสารสกัดเท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ หมายความว่าสารสกัดมะกั้งมีความเป็นพิษน้อยต้องใช้ปริมาณที่มากกว่าที่ใช้ฆ่าเซลล์จึงจะพบการยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงได้ จากการทดสอบพบว่าไม่มีสารสกัดมะกั้งตัวอย่างใดที่จะสามารถยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงหรือเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจนหาค่า ED50 หรือค่าที่ทำให้เซลล์ถูกยับยั้งได้ร้อยละ 50 ได้ ทั้งนี้อาจสรุปได้ว่าสาร

สัปดาห์ก็ไม่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และด้วยปัจจัยในการสัปดาห์ที่ทำให้สารสัปดาห์มีปริมาณน้อยจึงไม่สามารถศึกษาถึงความเข้มข้นที่สูงไปกว่านี้ได้

จากการศึกษาฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์และด้านการกลายพันธุ์ของสารสัปดาห์ได้แก่ ใบ เถา ผลเนื้อ และเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอล เมล็ดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ และเมล็ดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม พบว่าสารสัปดาห์ก็ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ยัยฟิมิวเรียมสายพันธุ์ TA98 และ TA100 ส่วนผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์มาตรฐาน AFB₁ และ MelQ ซึ่งเป็น indirect mutagen ที่ต้องการเอนไซม์จากตับในการกระตุ้น พบว่าสารสัปดาห์ก็ไม่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วย MelQ และ AFB₁ ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ยัยฟิมิวเรียมสายพันธุ์ TA98 และ TA100 ตามลำดับ โดยสารสัปดาห์ก็มีส่วนเถ้า ใบ ผลเนื้อ และเมล็ดที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ได้ดีกว่าส่วนเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์และคลอโรฟอร์ม ซึ่งความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งหรือเหนี่ยวนำเอนไซม์ cytochrome P450 เป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งของสารที่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ (Bhattacharya S., 2011) สารก่อกลายพันธุ์ AFB₁ และ MelQ จะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 1A2 ทำให้อยู่ในสภาพว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาต่อสารชีวโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง DNA และนอกจากนี้ในขั้นตอนของกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ AFB₁ ด้วยเอนไซม์นั้นยังทำให้เกิดสารตัวกลางที่มีคุณสมบัติเป็น reactive oxygen species ซึ่งสามารถไปทำให้เกิด DNA mutation ได้ (Hammons G.J., 1985 และ Hayder N., 2008) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสัปดาห์ก็ไม่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วย AFB₁ และ MelQ นั้น แสดงว่าสารสัปดาห์ก็อาจมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cytochrome P450 1A2 หรืออาจมีผลในการป้องกัน DNA โดยตรงจาก electrophilic metabolites ของสารก่อกลายพันธุ์ได้ การยับยั้งการกลายพันธุ์เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนสามารถเกิดได้หลายกลไก อย่างไรก็ตามการยับยั้งเอนไซม์ในระบบ cytochrome P450 มีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ที่เหนี่ยวนำด้วย AFB₁ และ MelQ (Zani F., 1993)

ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสัปดาห์ก็จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อกลายพันธุ์ที่เป็น direct mutagen ได้แก่ AF-2 และ NaN₃ ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ยัยฟิมิวเรียม สายพันธุ์ TA 98 และ TA100 ตามลำดับ พบว่าสารสัปดาห์ก็ผลเนื้อเมื่อกึ่งที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 5 mg/plate มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์อย่างอ่อน (Mild antimutagenicity) จากการเหนี่ยวนำด้วย AF-2 ในแบคทีเรียซัลโมเนลลา ยัยฟิมิวเรียม สายพันธุ์ TA98 ส่วนสารสัปดาห์ก็ส่วนอื่นไม่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ AF-2 และพบว่าสารสัปดาห์ก็ไม่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ NaN₃ แสดงให้เห็นถึงกลไกการด้านการกลายพันธุ์ของสารสัปดาห์ก็นั้นจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงสารก่อกลายพันธุ์ให้อยู่ในสภาพมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าการจับกับสารก่อกลายพันธุ์โดยตรง จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสัปดาห์ก็ไม่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ในสถานะที่มีเอนไซม์จากตับหนูกระตุ้นแสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ในสารสัปดาห์ก็อาจต้องถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยเอนไซม์ในตับก่อนจึงสามารถที่จะออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาครั้งนี้

นี้ยังไม่สามารถบอกได้ว่าสารสำคัญที่พบในสารสกัดมะกั้งที่มีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์เป็นสารชนิดใด แต่สารออกฤทธิ์ในสารสกัดมะกั้งน่าจะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยเอนไซม์ในตับก่อนจึงสามารถออกฤทธิ์ได้ โดยสารออกฤทธิ์นี้จะไปมีบทบาทเกี่ยวข้องกับเอนไซม์กำจัดสารพิษที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารก่อกลายพันธุ์ หรือมีผลในการป้องกัน DNA ของแบคทีเรียจาก electrophilic metabolites ของสารก่อกลายพันธุ์โดยตรงจึงทำให้สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย

ความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ใน phase 2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดสารพิษ และเป็นกลไกหนึ่งในการป้องกันการเกิดมะเร็ง เอนไซม์ใน phase 2 ที่สำคัญมีหลายชนิด แต่เอนไซม์ quinone reductase จัดเป็นเอนไซม์หลักที่มีความสำคัญในการป้องกันการเกิดมะเร็ง จากการศึกษาความสามารถในการเหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านมะเร็ง quinone reductase ในเซลล์มะเร็งตับหนู hepa1c1c7 ของสารสกัดมะกั้งพบว่าสารสกัดมะกั้งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ hepa1c1c7 และไม่สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ต้านมะเร็ง quinone reductase ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มีค่าต่ำจึงทำให้ไม่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำกัมมันตภาพของเอนไซม์ quinone reductase ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ เช่น quercetin, genistin และ resveratrol (0-200 μM) ที่ได้จากสารสกัดงุ่นสามารถเหนี่ยวนำกัมมันตภาพเอนไซม์ quinone reductase ได้เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ caffeic acid, (+)-catechin, (+)-epicatechin, ferulic acid, folic acid, ascorbic acid, gallic acid และ rutin ไม่สามารถเหนี่ยวนำกัมมันตภาพเอนไซม์ quinone reductase ได้ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ hepa1c1c7 มีค่าต่ำ จึงทำให้สารดังกล่าวไม่สามารถเหนี่ยวนำเอนไซม์ quinone reductase ได้ และนอกจากนี้ความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นสามารถทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ (Yang J., 2009)

ผลของการทดสอบฤทธิ์ฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดมะกั้งทุกส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง แต่จะออกฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดได้ต่างกัน เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ GI50 (Growth inhibition) พบว่าสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดได้ดีที่สุด ส่วนในเซลล์มะเร็งตับนั้น พบว่าสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีที่สุด แต่ในเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าทั้งสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอล และสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาค่า TGI (Total growth inhibition) ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ทั้งหมด พบว่าสารสกัดผลเนื้อที่สกัดด้วยเอทานอลมีความจำเพาะต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดมากกว่าเซลล์มะเร็งชนิดอื่น ส่วนสารสกัดเมล็ดที่สกัดด้วยอีเทอร์จะมีความจำเพาะต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งตับ และมะเร็งลำไส้ใหญ่ แต่จะมีผลต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มากกว่าเซลล์มะเร็งตับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดแต่ละส่วนมีสารออกฤทธิ์ที่ต่างกันเป็นองค์ประกอบอยู่ หากทำการแยกบริสุทธิ์สารสกัดเหล่านี้ต่อไป อาจทำให้ได้สารออกฤทธิ์ที่สำคัญที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ

เซลล์มะเร็งต่างๆได้ แต่ในขณะที่เดียวกันสารสกัดแต่ละส่วนก็มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ปกติได้เช่นกัน แสดงว่าสารสกัดเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติด้วย ดังนั้นหากใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่เหมาะสมก็อาจจะลดความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ปกติได้

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดมะเร็งได้ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดมะกั้งส่วนต่างๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แตกต่างกัน โดยสารสกัดเถาที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถกำจัดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความรุนแรงต่อเซลล์มากที่สุดได้สูงที่สุด ส่วนสารสกัดใบที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และมีความสามารถในการกำจัดเหล็กซึ่งเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลผ่านปฏิกิริยา Fenton ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์ของสารสกัดมะกั้งจากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ AFB₁ และ MeIQ ในแบคทีเรียที่พบว่าสารสกัดทั้งสองส่วนมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ AFB₁ และ MeIQ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนเถาที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์จากการเหนี่ยวนำด้วย MeIQ ได้สูงที่สุด อย่างไรก็ตามการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล และความสามารถในการกำจัดเหล็กด้วยวิธี Deoxyribose ไม่สามารถนำสารสกัดมะกั้งส่วนที่สกัดด้วยตัวทำละลายไม่มีขั้ว ได้แก่ อีเทอร์ และคลอโรฟอร์มมาทำการทดสอบได้ เนื่องจากสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายไม่มีขั้วไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ

ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จาก ใบ เถา เมื่อผลพบสารพวกกลุ่มฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน สเตอรอล และแทนนิน สำหรับน้ำมันมะกั้ง พบว่ากรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของน้ำมันมะกั้ง ส่วนใหญ่เป็น linoleic acid 47.01 g/100g และ oleic acid 14.92 g/100g (รายละเอียดของผลการวิเคราะห์ชนิดของไขมัน แสดงรายละเอียดในโครงการย่อยที่ 6)

จากผลการศึกษาในโครงการนี้ โดยเฉพาะข้อมูลจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ จะเห็นว่าน้ำมันมะกั้งมีแนวโน้มที่จะเป็นวัตถุดิบที่มีคุณค่าในการใช้ประโยชน์เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและเครื่องสำอางต่อไป สำหรับสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ นั้นน่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป โดยเฉพาะในเนื้อผล แต่ควรมีการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบให้มีอายุ ช่วงเวลาเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม หากแตกต่างกันมาก อาจทำให้ผลการศึกษาที่มีความผันแปรได้ ซึ่งในการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่ององค์ประกอบทางเคมี ความคงตัวของน้ำมัน สารสกัดจากมะกั้งจะดำเนินการต่อไปในปีที่ 2 (2557)

เอกสารอ้างอิง

- Aiyelaagbe, O.O. and Osamudiamen, P. M. 2009. Phytochemical screening for active compounds in *Mangifera indica* Leaves from Ibadan, Oyo State. Plant Sciences Research, 2, 11-13.
- Bhattacharya S. Natural antimutagens: A Review. Res J Med Plant. 2011;5:116-26.
- Cuendet M., Oteham C.P, Moon R.C, Pezzuto J.M. 2006. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. J Nat Prod. 69:460-463.
- Devendra, N. K., L. Rajanna, C. Sheetal and Y. N. Seetharam. 2008. In vitro clonal propagation of *Trichosanthes cucumerina* L. var. cucumerina. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 18(2): 103-111.
- De Flora S. and Ferguson L.R. 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. Mutation Res., 591: 8-15.
- De Wilde, W. J. and B. E. E. Duyfjes. 2001. Taxonomy of *Hodgsonia* (Cucurbitaceae) with a note on the ovules and seeds. *Blumea*. 46: 169-179.
- Favreau L.V., Pickett C.B. Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H:quinone reductase gene. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants. J Biol Chem. 1991;266(7):4556-61.
- Flamand N., Meunier J.R., Meunier P.A., Agapakis-Caussé C. Mini mutagenicity test: a miniaturized version of the Ames test used in a prescreening assay for point mutagenesis assessment. Toxicology in Vitro. 2001;15(2):105-14.
- Fricker S.P., Buckley R.G. 1996. Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an *in vitro* screen for antitumour agents. Anticancer Res.16: 3755-60.
- Hammons GJ, Guengerich FP, Weis CC, Beland FA, Kadlubar FF. Metabolic oxidation of carcinogenic arylamines by rat, dog, and human hepatic microsomes and by purified flavin-containing and cytochrome P-450 monooxygenases. Cancer Res. 1985;45(8):3578-85.
- Hayder N, Skandrani I, Kilani S, Bouhlef I, Abdelwahed A, Ben Ammar R, et al. Antimutagenic activity of *Myrtus communis* L. using the *Salmonella* microsome assay. South African Journal of Botany. 2008;74(1):121-5.

- Horn R. and Ferrão Vargas VM. 2008. Mutagenicity and antimutagenicity of teas used in popular medicine in the *Salmonella*/microsome assay. *Toxicology in Vitro*. 22: 1043-1049.
- Hu and Shiu-ying. 1964. The economic botany of *Hodgsonia*. *Economic Botany*. 18 (2): 167–179.
- Iwamoto Y.A., Kleinman H.K, Martin G.R, Aaronson S.A, Kozłowski J.M, 1987. McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res*. 47: 3239-45.
- Maron M.D., and Ames B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res*. 113: 173-215.
- Jiwajinda, S., Hirai, N., Watanabe, K., Santisopasri, V., Chuengsamarnyart, N., Koshimizu, K. and Ohigashi. H. 2001. Occurrence of the insecticidal 16,17-didehydro-16(E)-stemofoline in *Stemona collinsae*. *Phytochemistry* 56: 693-695.
- Jena B., Kaul L., Ramarao P. Regulatory requirements and ICH guidelines on carcinogenicity testing of pharmaceuticals: A review on current status. *Indian J Pharmacol*. 2005;37(4):209-22.
- Kensler TW. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. *Environ Health Perspect*. 1997;4:965-70.
- Lavekar, G. S. 2008. Research in medicinal plants. *International Conclave on Medicinal Plants for Asean and Bimstec Countries*. P.55- 57.
- Milman H.A., Hurley P.M., Auletta A. An overview of current efforts in short-term carcinogen testing. *Environ Health Perspect*. 1983;50:355-7.
- Miranda C.L., Aponso G.L., Stevens J.F., Deinzer M.L., Buhler D.R. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Lett*. 2000;149(1-2):21-9.
- Mortelmans K., Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*. 2000;455(1-2):29-60.
- Nalawade, S. M. and H. Tsay. 2004. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot.Bull.Acad.Sin*. 44:79 – 98.
- Nioi P., Hayes J.D. Contribution of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutat Res*. 2004;555(1-2):149-71.

- Prochaska H., P P.T., Sies H. Direct protective effect of NAD(P)H: quinone reductase against menadione-induced chemiluminescence of postmitochondria fractions of mouse liver. *J Bio Chem.* 1987;266:1931-4.
- Prochaska H.J., Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.* 1988;48(17):4776-82.
- Prochaska H.J., Santamaria A.B. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Analytical Biochemistry.* 1988;169(2):328-36.
- Riley RJ, Workman P. DT-diaphorase and cancer chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* 1992;43(8):1657-69.
- Schreiter, J., G. Langenberger, J. Heller and Margraft J. 2007. *Hodgsonia heteroclita* (Roxb.) Hook. f. & Thomson (Cucurbitaceae)-a neglected oil plant in Southwest China. Tropentag University of Kassel-Witzenhausen and University of Gottingen, 9-11 October 2007.
- Sherma, B. D., Hore, D.K. and Mandal, S. 1991. *Hodgsonia macrocarpa*-A non-conventional edible fat and protein source. *Indian Journal of Plant Genetics Resources.* 4(2).
- Sharma H.K., Chhangte L. and Dolui A.K. 2001. Traditional medicinal plants in Mizoram, India. *Fitoterapia.* 72: 146-161.
- Thai biodiversity. 2010. *Hodgsonia heteroclita* (Online) Available: <http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=25021> (Dec 12, 2010).
- Yang J., Liu R.H. Induction of phase II enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by grape extracts and selected phytochemicals. *Food Chemistry.* 2009;114(3):898-904.
- Wilde de W. J. J. O. and Duyfjes B. E. E. 2001. Taxonomy of *Hodgsonia* (Cucurbitaceae) with a Note on the Ovules and Seeds. *Blumea* 46: 169-179.
- Wilde de W. J. J. O. and Duyfjes B. E. E.. 2008. Cucurbitaceae. In *Flora of Thailand* Vol. 9 part 4: 416-419, 454-458.
- ศูนย์ข้อมูลพืช สำนักวิชาการ-วิจัย องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2547. ระบบสืบค้นข้อมูลพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์. กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

- ราชันย์ ภูมา. 2548. พืชเฉพาะถิ่นและพืชหายากในประเทศไทยในแง่ของเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณ. รายงานการประชุม ความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้ และสัตว์ป่า “ความก้าวหน้าของผลงานวิจัย และกิจกรรมปี 2548” ณ โรงแรมรีเจนท์ ซะอำ เพชรบุรี วันที่ 21-24 สิงหาคม 2548.
- ราชันย์ ภูมา. 2551. พืชหายากของประเทศไทย (Rare Plants of Thailand). สำนักงานหอพรรณไม้. สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.
- ราชันย์ ภูมา. 2554. สารานุกรมพืชในประเทศไทย. สำนักงานหอพรรณไม้. สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.
- อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. “การสกัดและตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ.” ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2536.