

## บทคัดย่อ

การดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ได้การคัดเลือกพืชสมุนไพรท้องถิ่นบนพื้นที่สูงที่มีการใช้ประโยชน์ทั้งเป็นพืชสมุนไพรและพืชน้ำมัน จากพื้นที่สูงในพื้นที่ขยายผลของโครงการหลวง จำนวน 17 ชนิด ได้แก่ 1) สามเณร 2) พุดคอย 3) กำลิ่งเสื่อโคร่ง 4) หนุ่ยตั่งสูง 5) เปล้าเลือด 6) สะพานกัน 7) สურพิษคำ 8) ม้าแดง 9) ผักฮาก 10) ม้าเขียว 11) ว่านสาวหลง 12) มะขม 13) ม้าสามต้น 14) มะแตก 15) มะเขานิน 16) งาช้างม้วน 17) ผ่าง จากผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของพืชตัวอย่าง ประกอบด้วย การวิเคราะห์โปรตีนโดยรวม ไขมันโดยรวม เยื่อใยโดยรวม เถ้า แร่ธาตุ ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ม้าแดง สะพานกัน หนุ่ยตั่งสูง กำลิ่งเสื่อโคร่ง ผักฮาก สามเณร เปล้าเลือด สურพิษคำ โดยแยกส่วนต่างๆของพืชที่สามารถแยกได้ชัดเจน และมีข้อมูลของการใช้ในการใช้ประโยชน์เป็นส่วนประกอบในการวิเคราะห์ซึ่งจะแตกต่างกันออกไปแล้วแต่ละชนิดของสมุนไพร ได้แก่ ส่วนกิ่ง ใบ ดอก เปลือก และราก จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ พบว่า ปริมาณเถ้าของรากสურพิษคำ มีค่าสูงสุด ที่ 26.35 % รองลงมาได้แก่ กิ่งของสามเณร และรากของเปล้าเลือด ส่วนปริมาณไขมันรวม พบว่า ดอกและผลของผักฮากมีปริมาณสูงสุดถึง 24.28 % รองลงมา ได้แก่ รากของสურพิษคำ และใบของม้าแดง ปริมาณของเยื่อใยรวม พบว่า ในส่วนของลำต้นและกิ่งของพืชตัวอย่างทุกชนิดจะมีปริมาณเยื่อใยสูงรวมถึงเปลือกของกำลิ่งเสื่อโคร่ง โปรตีนรวมพบว่าสะพานกันมีปริมาณโปรตีนรวมสูงกว่าพืชตัวอย่างแต่ละชนิด

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลโดยรวมของพืชตัวอย่าง พบว่าสารสกัดหยาบของไคโครโรมีเทนของพืชมีปริมาณฟีนอลโดยรวมน้อยกว่าสารสกัดหยาบเมทานอล พบว่าสารสกัดหยาบไคโครโรมีเทนของ ม้าแดง ส่วนลำต้น(กิ่ง) และราก มีปริมาณฟีนอลโดยรวมสูงสุด แต่กลับพบน้อยในส่วนใบ นอกจากนี้ยังมีหนุ่ยตั่งสูงส่วนลำต้นที่ให้ค่าสูง ส่วนสารสกัดหยาบเมทานอลพบว่า เปล้าเลือดมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลมากที่สุด 279.0 มิลลิกรัมสมมูล Gallic acid ส่วนเปลือกกำลิ่งเสื่อโคร่ง 230.1 มิลลิกรัมสมมูล Gallic acid และม้าเขียว ส่วนรากและลำต้นให้ค่าเท่ากับ 214.0 มิลลิกรัมสมมูล Gallic acid ส่วนม้าแดงและสურพิษคำให้ปริมาณฟีนอลโดยรวมมีค่าใกล้เคียงกัน

จากนั้นได้นำสารสกัดหยาบไคโครโรมีเทนและเมทานอลจากพืชมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลจากพืชเดียวกันมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าสารสกัดด้วยไคโครโรมีเทน สารสกัดหยาบไคโครมีเทนจาก เปลือกกำลิ่งเสื่อโคร่ง และรากของม้าเขียวให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระ ดีที่สุด เท่ากับ 254.12 และ 250.29  $\mu\text{mol Trolox equivalent/g extract}$  ส่วนฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด

หายาจากเมทานอล พบว่า ม้าแดงทั้งส่วนราก และส่วนกิ่ง เปลือกกำลังเสือโคร่งและมะขามให้ฤทธิ์ในการต้านทานสูง

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหายา ไคโรโรมีเทนจากพืช พบว่า สารสกัดหายา ไคโรโรมีเทนของดอกผักฮากให้ค่าการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสเพียง 20 % รองลงมาได้แก่ ตังสุรังส่วนลำต้นที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ยับยั้งได้ 34.0 % ส่วนเปลือกกำลังเสือโคร่งให้ผลดีเช่นเดียวกัน มีค่าการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ตามความเข้มข้นอย่างชัดเจน และสามเ็นทุกส่วนให้ผลดีเช่นกัน ส่วนสารสกัดหายาเมทานอล พบว่า สารสกัดจาก ม้าเขียวให้ผลดีต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ยับยั้งได้เหลือเพียง 44.29 % รองลงมาได้แก่ กำลังเสือโคร่ง ยับยั้งได้เหลือเพียง 58.34 % ต่อมาได้แก่ เปล้าเลือด ยับยั้งได้เหลือ 73.9% ม้าแดงส่วนรากยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ยับยั้งได้เหลือ 65.6 %

สารสกัดหายาเมทานอลจากมะขาม สารสกัดหายาเมทานอลจากม้าสามต่อน น้ำมันมะแตก น้ำมันมะเขายหิน และสารสกัดเมทานอลจากเปลือกกำลังเสือโคร่ง ซึ่งสารสกัดหายา คิงกล่าวข้างต้นให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี เมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งผิวหนัง ชนิด Mouse B16 melanoma หลังจากเซลล์ได้รับสารสกัดในแต่ละชนิด ในความเข้มข้น 200 และ 20  $\mu\text{g/ml}$  พบว่าน้ำมันมะแตกและน้ำมันมะเขายหิน ยับยั้งการสร้างเมลานินเป็นอย่างดี สร้างเมลานินเพียง 70.0 และ 68.6 % เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งสร้างเมลานินได้ 100 % ส่วนสารสกัดจากมะขาม ม้าสามต่อนและกำลังเสือโคร่งให้ผลใกล้เคียงกัน

จากนั้นนำสารสกัดทั้ง 5 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์กับฤทธิ์ลดการสะสมไขมันในสัตว์ทดลอง โดยใช้เซลล์ MC3T3-G2/PA6 เป็นแบบทดสอบ *in vitro* ได้แบ่งการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการสะสมไขมันในเซลล์ไขมันได้เป็นสองขั้นตอน คือ การให้สารสกัดในระยะเวลาการแบ่งตัวและการเจริญเติบโต (Differentiation) ของเซลล์และขั้นตอนการสะสมไขมันของเซลล์ (Lipogenesis) พบว่า สารสกัดที่ยับยั้งการ Differentiation ได้ดี ได้แก่ สารสกัดจากม้าสามต่อนที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{g/ml}$  ที่ 76.92 % นอกจากนั้นไม่มีผล ส่วนสารสกัดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งขั้นตอนการสร้างไขมัน ได้แก่ น้ำมันมะแตก และกำลังเสือโคร่ง ที่ความเข้มข้น 20  $\mu\text{g/ml}$  เท่ากับ 67.3 และ 72.6 % แต่ค่าการยับยั้งการสะสมไขมันยังไม่เป็นไปตามความเข้มข้น อาจจะเนื่องจากละลายของสารสกัดส่วนที่เป็นน้ำมันอาจจะยังไม่ถึงเซลล์เนื่องจากเห็นคราบน้ำมันลอยอยู่ด้านบน ดังนั้นต้องมีการพัฒนาวิธีการในการละลายน้ำมันกับมีเดียที่ใช้เลี้ยงเซลล์ต่อไป จากนั้นทำการทดสอบต่อในทั้งสารสกัดทั้ง 5 ชนิด ในการทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันใน การสร้างปริมาณ IL-2 และ TNF- $\alpha$  พบว่าสารสกัดจากพืชทั้ง 5 ชนิด ปริมาณ 0.2 และ 2 mg/ml ที่ 48 ชั่วโมง มะเขายหินที่ความเข้มข้น 200  $\mu\text{g/ml}$  สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ถึง 60.0 % รองลงมา ได้แก่ ม้าสามต่อน และ

กำลังเชื้อโคร่ง จากนั้นทำการวัดปริมาณ IL-2 และ TNF- $\alpha$  พบว่า มะแตกกระตุ้นการสร้าง TNF- $\alpha$  ได้สูงมากถึง 1,405.10 pg/ml ที่ความเข้มข้น 200  $\mu$ g/ml รองลงมาได้แก่ ม้าสามต้อน ที่ความเข้มข้น 20  $\mu$ g/ml สร้าง TNF- $\alpha$  ได้ 41.06 pg/ml ส่วนม้าสามต้อนที่ความเข้มข้น 200  $\mu$ g/ml สร้าง IL-2 ได้ 322.3 pg/ml รองลงมาได้แก่ มะขม

ด้านการแยกองค์ประกอบทางเคมีด้วย TLC ได้แยกสารสกัดทั้ง 5 ชนิด ซึ่งพบว่าสารสกัดทั้ง 5 ชนิดมีสารที่เป็นองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในหลาย fraction ซึ่งต้องทำการศึกษาอย่างละเอียดในครั้งต่อไป ในงานวิจัยในครั้งนี้ได้มีการยืนยันโครงสร้างของสารออกฤทธิ์สำคัญด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry; MS) จำนวน 2 สารสกัด ได้แก่ น้ำมันจากมะแตก และน้ำมันจากมะเขายาหิน ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS น้ำมันจากมะแตกพบว่าองค์ประกอบของน้ำมันหลัก ได้แก่ Palmitic acid (42.77%), Oleic acid (10.63%), 4-methyl 1H-indole (7.05%) ซึ่งสามารถยืนยันโครงสร้างของสารหลักที่พบ ด้วย GC-MS นอกจากนี้ ยังพบสารสำคัญหลักอื่นๆอีก ได้แก่ Squalene, Testosterone, Benzothiazole, 3-Acetoxypyridine ส่วนการวิเคราะห์น้ำมันมะเขายาหินพบสารองค์ประกอบหลัก ได้แก่ Methyl salicylate (32.98%), Palmitic acid (16.28%), Oleic acid (5.98%) ส่วนสารองค์ประกอบที่มีปริมาณน้อย ได้แก่ Nerolidol, 2,2'-Methylenebis(6-*tert*-butyl-4-methylphenol), Decanedioic acid ในการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน เมื่อให้สารทดสอบทางปาก (acute oral toxicity) ได้ใช้วิธีการ ตาม guideline ของ OECD (guideline 425, OECD, Adopt March 2006) พบว่าผลการทดสอบดังกล่าวชี้ว่า สารสกัดเมทาบอลจากฝาง และน้ำมันงาขี้ม้อน จัดได้ว่ามีความปลอดภัยในระดับสูง โดยขนาดที่ทำให้หนูขาวตายครั้งหนึ่ง ( $LD_{50}$ ) มากกว่า 2 กรัม/กก.น้ำหนักตัว

## Abstract

This research focus to screening of the local plants on the high land that they have the efficiency to produce the active compounds for pharmaceutical activity. The sixteen varieties of local plants on high land, which collected from several areas in the royal project is 1) Sarm-ann 2) Putdoi 3) Kamluangshousong 4) Thung-hung 5) *Stephania venosa* (Bl.) Spreng. 6) Saphangone (*Sambucus javanica* Reinw. Ex Blume) 7) Surapitkam 8) Marr-dang (*Leea sp.*) 9) Phung HaK (*Erythralium scandens* Blume) 10) Marr-Khaew (*Leea sp.*) 11) *Amomum biflorum* Jack 12) Makom (*Pittosporopsis kerrii* Craib ) 13) Ma samton (*Asparagus racemosus* Willd.) 14) Ma-taak (*Celastrus paniculatus*) 15) *Vernicia montana* Lour 16) *Perilla frutescens* 17) *Caesalpinia sappan* L. They were analyzed proximate analysis consist of crude protein, crude fat, crude fiber, energy and mineral contents (phosphorus, calcium, potassium, iron, manganese, copper, zinc and sodium). Moreover, the plant materials were extracted with methanol. Then, the biological activity determined by total phenol content, DPPH radical scavenging activity, melanogenesis inhibitor and anticancer.

The results showed *Sambucus javanica* Reinw. Ex Blume contained high level of crude protein. In contrast, the other kind of plant shown small amount of crude protein but high crude fiber. We consider for the herb that contained high amount of protein relative with high amount of total phenol and efficiency for antioxidant. In branch of *Marr-dang* was high level of total phenol (298.75 GAE mg/g) and high efficiency of antioxidant (DPPH radical scavenging activity 924.10 TE umol/g).

For acute oral toxicity of methanol extracts from *Perilla frutescens* and *Caesalpinia sappan* L. . Followed with guideline of OECD (guideline 425, OECD, Adopt March 2006), the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) was higher than 2 g/kg body weight. The LD<sub>50</sub> valve showed the high level safety of methanol extracts from *Perilla frutescens* and *Caesalpinia sappan* L. .