

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสบู่เลือด

โชติกา ภู่งศ์^{1*}, จณิสฎารส ศรีน้ำทอง¹, วรพงศ์ ภู่งศ์², พงทิพย์ ภู่งษ์³ และ วรางคณา จุ่งลก³¹สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100²สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161³สำนักวิชาสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

*phooying@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากหัวสบู่เลือดโดยการสกัดด้วยวิธีการแช่แบบลำดับขั้นด้วยไดคลอโรมีเทนและเอทานอล พบว่า สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (SVD) มีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (IC₅₀ เท่ากับ 78.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สูงกว่าสารสกัดหยาบเอทานอล (SVE) (IC₅₀ เท่ากับ 231.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนฤทธิ์ต้านการอักเสบสารสกัด SVD มีฤทธิ์ที่ดี (IC₅₀ of NO เท่ากับ 50.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ SI เท่ากับ 2.40) ส่วนสารสกัด SVE (มากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีฤทธิ์ที่ไม่ดี

การทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่า สารสกัด SVD สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ได้ดีที่สุด (MIC และ MBC เท่ากับ 0.31 และ 0.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) รองลงมาคือ *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* ส่วนสารสกัด SVE สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อ *A. baumannii* ได้ดีที่สุดเช่นกัน (MIC และ MBC เท่ากับ 0.625 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) รองลงมาโดยภาพรวมคือ *E. faecalis*, *C. albicans*, *K. pneumoniae*, และ *P. aeruginosa* ตามลำดับ

คำสำคัญ: สบู่เลือด, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากของสบู่เลือด, ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสบู่เลือด, ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสบู่เลือด

บทนำ

แถบเอเชียเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชสมุนไพรนั้นมีอยู่มากมายหลายชนิด ซึ่งการแพทย์แผนโบราณของไทยนั้นได้มีการใช้พืชหลายชนิดเป็นสมุนไพรในการรักษาโรค ซึ่งสมุนไพรบางชนิดก็จะมีผลข้างเคียงหรือมีพิษหากรับประทานเข้าไปในปริมาณมากเกินไป ส่วนยาแผนปัจจุบันมีทั้งยาที่รักษาได้ผลดีแต่ก็มีผลข้างเคียงและยาบางตัวจากที่เคยรักษาได้ผลที่ดีก็กลายเป็นรักษาไม่ได้เนื่องจากเชื้อเกิดการดื้อยา ดังนั้นการหาตัวยาใหม่ๆ ที่มีผลการรักษาที่ดีและไม่ให้เกิดผลข้างเคียงยังคงต้องศึกษาค้นคว้ากันอย่างต่อเนื่อง รวมถึงการหาตัวยาใหม่ๆ มาทดแทนยาตัวเก่าที่เกิดการดื้อยาไปแล้วด้วยเช่นกัน

สบู่เลือด (*Stephania venosa*) จัดอยู่ในวงศ์บอร์เพ็ด (Menispermaceae) (Semwal et al. 2010) เป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักกันมาช้านาน ซึ่งการแพทย์แผนโบราณมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ (Le et al. 2017; Makarasen et al. 2011) เช่น จีน อินเดีย เวียดนามและ พม่า เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่ใช้เป็นยาบำรุงร่างกาย บำรุงเลือด บำรุงกำหนด เป็นยารักษา มะเร็ง และรักษาแผลเรื้อรัง (Kongkiatpaiboon et al. 2017; Le et al. 2017; Mon et al. 2018; Rattanamanee, 2014) เป็นต้น สารสำคัญในสบู่เลือดน่าสนใจหลายสารเช่น สาร corydalmine (Ingkaninan, Phengpa, Yuenyongsawad, & Khorana, 2006) แยกได้จากหัวสบู่เลือดจากจังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่ดี (IC₅₀ เท่ากับ 9.23 ไมโครโมลาร์) สาร thailandine (Makarasen et al. 2011) แยกได้จากหัวสบู่เลือดจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ประเทศไทย สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Plasmodium falciparum* K1 (IC₅₀ เท่ากับ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดที่ดีที่สุด (IC₅₀

เท่ากับ 0.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) และไม่เป็นพิษกับเซลล์ปกติด้วยซึ่งเป็นที่น่าสนใจมากเนื่องจากยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งส่วนใหญ่เป็นพิษกับเซลล์มะเร็งแล้วยังเป็นพิษกับเซลล์ปกติอีกด้วยซึ่งทำให้เกิดผลข้างเคียงในการรักษาและสาร stephanine (Le et al. 2017) แยกได้จากหัวสมุนไพรเถาวัลย์ตีนงู มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (HeLa, MDA-MB231 และ MCF-7 เท่ากับ 3.33, 5.66 และ 6.49 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) ซึ่งใกล้เคียงกับยา paclitaxel (HeLa, MDA-MB231 และ MCF-7 เท่ากับ 2.29, 2.56 และ 3.99 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) จากข้อมูลข้างต้นเป็นการยืนยันว่าพืชสมุนไพรชนิดเดียวกันหากปลูกคนละพื้นที่ก็มีความแตกต่างของชนิดและปริมาณสารสำคัญ (Montrittigri et al. 2008) และการศึกษาสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรเถาวัลย์ตีนงูยังเป็นที่น่าสนใจและมีการศึกษากันอย่างต่อเนื่อง

พม่าเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมุนไพรคล้าย ๆ กับไทย และสมุนไพรจากพม่าอาจจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีได้เช่นกัน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยชิ้นนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบในการต้านการอักเสบ การเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในช่องปากและการต้านจุลชีพของสมุนไพรเถาวัลย์ตีนงูจากประเทศพม่า

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำหัวสมุนไพรเถาวัลย์ตีนงูจาก ต.มะริด อ.มะริด เขตตะนาวศรี ประเทศพม่า (รูปที่ 1) พิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชโดย ผศ. ดร. จักรชัย กัลยาณพพน จากนั้นนำมาล้างให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็กได้น้ำหนัก 9.3 กิโลกรัม และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ก.



ข.



ค.

รูปที่ 1 แสดงลักษณะต่างๆของสมุนไพรเถาวัลย์ตีนงู ก. ลักษณะหัว ข. ลักษณะใบและดอก ค. ลักษณะเนื้อด้านในของหัว

2. การสกัดตัวอย่าง

นำตัวอย่างสมุนไพรเถาวัลย์ตีนงูที่ผ่านการอบแห้งแล้วมาสกัดด้วยตัวทำละลายแบบลำดับขั้นโดยแช่ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนก่อนและตามด้วยเอทานอล โดยทุกๆ 3 วันของแต่ละตัวทำละลายจะนำตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษกรอง what man No. 1 จากนั้นนำไประเหยแห้งต่อด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ ทำให้ได้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (SVD) 10.24 กรัม และสารสกัดหยาบเอทานอล (SVE) 40.53 กรัมตามลำดับ

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.1 ตรวจสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

3.1.1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7

เลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ในอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin และ 2 มิลลิโมลาร์ glutamine ปริมาณ 1×10^5 cells ใน 96 well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และ ความชื้น 95 % ก่อนที่จะทำการทดสอบกับสารสกัด

3.1.2 ขั้นตอนการเหนี่ยวนำเซลล์ให้หลั่งไนตริกออกไซด์และการทดสอบด้วยสารสกัด

หลังจากครบเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเซลล์ RAW 264.7 ใน 96 well plate ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมสารสกัดหยาบผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

จากนั้นเติมไลโปโพลีแซคคาไรด์ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อกระตุ้นให้เซลล์หลั่งไนตริกออกไซด์และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปปั่นที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดระดับไนไตรท์ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากไนตริกออกไซด์ ทำการทดสอบซ้ำอีก 3 ครั้ง

3.1.3 การวัดไนไตรท์ในน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดโดยวิธี Griess assay

นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้สำหรับวัดระดับไนไตรท์ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากไนตริกออกไซด์ (NO) ทำปฏิกิริยากับน้ำยา Griess reagent โดยใส่น้ำยา Griess reagent ซึ่งประกอบด้วย N-1(naphthyl)ethylenediaminedihydrochloride 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน 95% alcohol และ sulfanilamide 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน 5% phosphoric acid ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงใน 96 well plate จากนั้นเติมตัวอย่างหรือ nitrite standard (10-100 ไมโครโมลาร์ ใช้ 2% DMSO เป็นตัวทำละลาย) ลงไป 150 ไมโครลิตร ตามด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและ nitrite standard ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (น้ำยา Griess reagent ปริมาตร 20 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่นปริมาตร 280 ไมโครลิตร) และคำนวณความเข้มข้นของไนไตรท์แต่ละความเข้มข้นของตัวอย่างโดยเทียบกับค่ากราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนไตรท์ได้ร้อยละ 50 (half-maximal inhibitory concentration, IC₅₀) และ หาค่า Selectivity index ซึ่งค่าที่สูงแสดงถึงความจำเพาะของสารในการยับยั้งไนไตรท์โดยไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยคำนวณจากสัดส่วนของค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (half-maximal inhibitory concentration, CC₅₀) ต่อค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนไตรท์ได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) (Somchit et al. 2018).

3.2 ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด (CLS-354/DX) เหมือนกับข้อ 3.1.1

3.2.2 ขั้นตอนการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดโดยวิธี MTT assay (Utaipant et al. 2017)

หลังจากครบเวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเซลล์มะเร็งใน 96 well plate ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และเติมสารสกัดหยาบผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 80 และ 160 ไมโครโมลาร์ (2% DMSO เป็นตัวทำละลาย) ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดหยาบออก และเติม 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร MTT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงแต่ละหลุม นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซ CO₂ 5% และความชื้น 95% เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง เพื่อที่จะให้ MTT ถูกเมทาบอลไลต์ เมื่อครบเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี MTT ออก และคว่ำ plate ชั้บให้แห้ง เติม DMSO ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อไปละลาย formazan crystal (MTT metabolic product) และผสมตะกอน formazan ให้เข้ากับ DMSO นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร แล้วหักลบค่าที่ได้ออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 670 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader ทำการทดสอบซ้ำอีก 3 ครั้ง

หาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability) ในแต่ละความเข้มข้นของสารที่ทดสอบและนำมาสร้างกราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ร้อยละ 50 และเปรียบเทียบร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ เมื่อทดสอบด้วยสารในแต่ละความเข้มข้นโดยใช้สถิติ One-Way ANOVA และ Mann-Whitney U test โดย p value ที่น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.3. การทดสอบฤทธิ์ของสารทดสอบในการต้านเชื้อจุลชีพ

3.3.1. เชื้อจุลชีพทดสอบ

เชื้อทดสอบที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Candida albicans* เชื้อเหล่านี้แยกได้จากผู้ป่วยและเก็บไว้ในคลังเชื้อที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.3.2. การเตรียมเชื้อจุลชีพทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบมาเพาะเลี้ยงในอาหาร trypticase soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน สำหรับยีสต์เพาะเลี้ยงบนอาหาร sabouraud dextrose agar (SDA) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ปรับปริมาณเชื้อโดยใช้ 0.85 % NaCl ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland (Densimat, Biomeriueux)

3.3.3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี broth microdilution (Navarro García et al. 2006)

เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ mueller hinton broth (MHB) ลงใน 96-well microtiter plate เติมน้ำสกัดความเข้มข้นเริ่มต้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำเจือจางแบบ 2-fold serial dilution สารสกัดมีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0.071 - 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 2% DMSO เป็นตัวทำละลาย เติมน้ำเชื้อทดสอบประมาณ 10^5 CFUต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้เติม resazurin ทุกหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อ่านค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) โดยอ่านหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ resazurin ไม่มีการเปลี่ยนสี จากนั้นหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ (minimum bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัด โดยดูการแขวนลอยเชื้อในหลุมที่ไม่มีเชื้อเจริญประมาณ 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนจานอาหาร MHA นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านค่า MBC ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ไม่มีเชื้อเจริญ

ผลและอภิปรายผล

การสกัดสารจากสมุนไพรได้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (SVD) 10.24 กรัม และสารสกัดหยาบเอทานอล (SVE) 40.53 กรัม คิดเป็น 0.11 และ 0.44 % ตามลำดับ แสดงว่าสารสกัดจากสมุนไพรส่วนใหญ่มีขั้วสูงและเมื่อนำสารสกัดหยาบไปทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ (ตารางที่ 1) พบว่า SVD มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งในไตรท์ได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 50.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า selectivity index เท่ากับ 2.40 ซึ่งสารสกัด SVD มีฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดี เพราะมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งในไตรท์ได้ร้อยละ 50 ต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า selectivity index มากกว่า 2 ส่วนสารสกัด SVE มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งในไตรท์ได้ร้อยละ 50 มากกว่า 400.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลได้ไม่ดีและไม่สามารถคำนวณค่า selectivity index ได้เนื่องจากให้ค่าการยับยั้งในไตรท์ออกไซด์ได้ร้อยละ 50 ที่มากกว่า 400.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Code	Stock conc. (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ CC ₅₀ of MTT (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การทดสอบการอักเสบ IC ₅₀ of NO (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	SI (CC ₅₀ of MTT/ IC ₅₀ of NO)
SVD	30.00	120.20 ± 0.49	50.09 ± 1.44	2.40
SVE	30.00	407.40 ± 3.91	>400.00	N/A

N/A: ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

CC₅₀: ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์ได้ร้อยละ 50

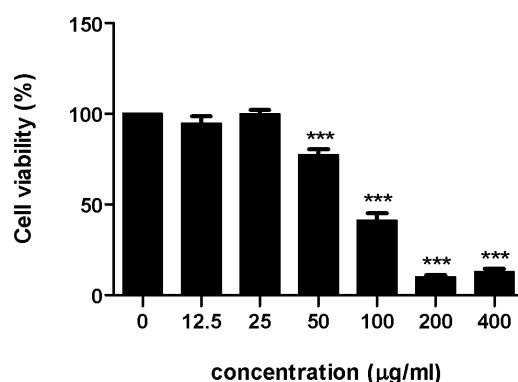
IC₅₀: ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งไนโตรที่ร้อยละ 50

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (ตารางที่ 2) สารสกัด SVD มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) เท่ากับ 78.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน SVE มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50 เท่ากับ 231.60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารสกัด SVD มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่า สารสกัด SVE

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก

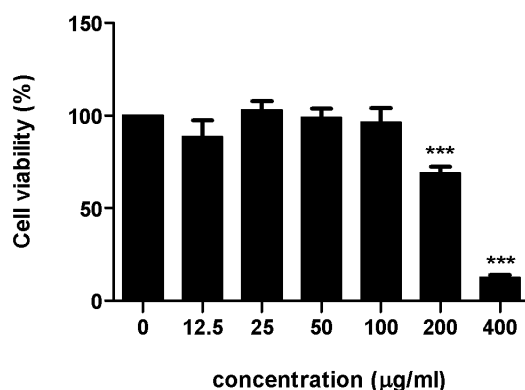
Code	Stock concentration (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	IC ₅₀ of MTT
SVD	30.00	78.62 ± 0.20
SVE	30.00	231.60 ± 1.26

IC₅₀: ค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 50



***, p<0.001 เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัด

รูปที่ 2 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งของสารสกัดไคคอลโรมีเทน (SVD)



***, $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัด

รูปที่ 3 ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งของสารสกัดเอทานอล (SVE)

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* และ *C. albicans* พบว่าสารสกัด SVD สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. baumannii* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* และ *P. aeruginosa* มีค่า MIC เท่ากับ 0.62, 1.25, 2.50 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่า (Minimum bactericidal concentration: MBC) เชื้อ *A. baumannii* ได้ดีที่สุดที่ MBC เท่ากับ 0.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ *E. faecalis* และ *C. albicans* ที่ MBC เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วย *P. aeruginosa* และ *K. pneumoniae* เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ส่วนสารสกัด SVE สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *A. baumannii* ได้ดีที่สุดที่ MIC เท่ากับ 0.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ *E. faecalis* และ *C. albicans* ที่ MIC เท่ากับ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วย *K. pneumoniae*, และ *P. aeruginosa* ที่ MIC เท่ากับ 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถฆ่าเชื้อ *A. baumannii* ได้ดีที่สุดที่ MBC เท่ากับ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ *E. faecalis* และ *C. albicans* ที่ MBC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วย *P. aeruginosa* และ *K. pneumoniae* ที่ MBC มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3 ค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (ทุกค่าแสดงในหน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

Code	<i>A. baumannii</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>C. albicans</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
SVD	0.31	0.62	10.00	10.00	0.62	5.00	2.50	>10.00	1.25	5.00
SVE	0.62	1.25	10.00	>10.00	1.25	10.00	5.00	>10.00	1.25	10.00

สรุปผลการวิจัย

การสกัดสารจากหัวสมุนไพรโดยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนและเอทานอล พบว่า ได้ปริมาณสารสกัด SVE มากกว่าสารสกัด SVD และในการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากพบว่า สารสกัด SVD มีฤทธิ์การต้านการอักเสบและความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ดีกว่าสารสกัด SVE ส่วนฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์พบว่า ทั้งสารสกัด SVD และ SVE มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อ *A. baumannii* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเชื้อ *E. faecalis*, *C. albicans*, *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อจะต่ำกว่าความเข้มข้นที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้

การศึกษาดังนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อควรระวังในการบริโภคสมุนไพรเพื่อรักษาโรคมะเร็ง ไทรอยด์ หรือโรคอื่นๆ จากข้อมูลข้างต้นสามารถบริโภคสมุนไพรได้ในระดับ 78.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับการต้านการอักเสบในระดับ 50.09 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิกรัม แต่ไม่ควรเกินความเข้มข้น 120.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เพราะจะทำให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์ตนเองหรือผลข้างเคียงนั่นเอง

ข้อเสนอแนะ

สารสกัดหยาบทั้ง SVD และ SVE มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ดี ส่วนสารสกัด SVD มีฤทธิ์การต้านการอักเสบที่ดี จึงควรศึกษาสารสกัดหยาบทั้ง SVD และ SVE ต่อโดยการแยกสารสำคัญให้สารบริสุทธิ์และโครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยชิ้นนี้ได้รับการเอื้อเฟื้อสถานที่จากหน่วยวิจัยการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ อาคารปฏิบัติเทคโนโลยีและพัฒนานวัตกรรม มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

บรรณานุกรม

- Ingkaninan, K., Phengpa, P., Yuenyongsawad, S., & Khorana, N. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(5), 695-700.
- Kongkiatpaiboon, S., Duangdee, N., Prateetongkum, S., Tayana, N., & Inthakusol, W. (2017). Simultaneous HPLC analysis of crebanine, dicentrine, stephanine and tetrahydropalmatine in *Stephania venosa*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27(6), 691-697.
- Le, P.M., Srivastava, V., Nguyen, T.T., Pradines, B., Madamet, M., Mosnier, J., & Lee, H. (2017). Stephanine from *stephania venosa* (Blume) spreng showed effective antiplasmodial and anticancer activities, the latter by inducing apoptosis through the reverse of mitotic exit. *Phytotherapy Research*, 31(9), 1357-1368.
- Makarsen, A., Sirithana, W., Mogkhuntod, S., Khunnawutmanotham, N., Chimnoi, N., & Techasakul, S. (2011). Cytotoxic and antimicrobial activities of aporphine alkaloids isolated from *stephania venosa* (Blume) spreng. *Planta Medica*, 77(13), 1519-1524.
- Mon, M.T., Yodkeeree, S., Punfa, W., Pompimon, W., & Limtrakul, P. (2018). Alkaloids from *stephania venosa* as chemosensitizers in SKOV3 ovarian cancer cells via Akt/NF-kappaB signaling. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 66(2), 162-169.
- Montririttigri, K., Moongkarndi, P., Joongsomboonkusol, S., & Chitkul, B. (2008). Apoptotic activity of aporphine from *stephania venosa* on human ovarian cancer cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35(662), 52-56.
- Navarro García, V., Rojas, G., Gerardo Zepeda, L., Aviles, M., Fuentes, M., Herrera, A., & Jiménez, E. (2006). Antifungal and antibacterial activity of four selected Mexican medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 44(4), 297-300.
- Rattanamanee, K. (2014). Antiplatelet and antioxidative effects of *stephania venosa* (Blume) spreng. extract. *Thai Journal of Pharmacology*, 36(1), 36-44.
- Semwal, D.K., Badoni, R., Semwal, R., Kothiyal, S.K., Singh, G.J.P., & Rawat, U. (2010). The genus *stephania* (Menispermaceae): Chemical and pharmacological perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(2), 369-383.
- Somchit, N., Kimseng, R., Dhar, R., Hiransai, P., Changtam, C., Suksamrarn, A., & Chunglok, W. (2018). Curcumin pyrazole blocks lipopolysaccharide-induced inflammation via suppression of JNK activation in RAW 264.7 macrophages. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 36(3), 184-190.
- Utaipant, T., Athipornchai, A., Suksamrarn, A., Chunsriviro, S., & Chunglok, W. (2017). Isomahanine induces endoplasmic reticulum stress and simultaneously triggers p38 MAPK-mediated apoptosis and autophagy in multidrug-resistant human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncology Reports*, 37(2), 1243-1252.