

การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบมะรุมต่อเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ในหลอดทดลอง Biological Effects of *Moringa oleifera* Leaves on G6PD-Deficient Erythrocytes *In Vitro*

ดวงมณี แสนมัน¹, ชลลิตดา ทาศรีภู¹, วรรณวิไล แสงทรัพย์¹, ปติวรีดา อำพันทอง¹

¹กลุ่มวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

18/18 ถ.บางนา-ตราด ต.บางโหลง อ. บางพลี จ.สมุทรปราการ 10540 โทรศัพท์: 081 327045 E-mail: dsanmun@yahoo.com

บทคัดย่อ

สารเคมีหรือยาบางชนิดอาจทำให้เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยที่พร่องเอนไซม์ Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) แตกได้ง่าย เมื่ออยู่ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระมากเกินไป การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการเกิดออกซิเดชันสูง (Oxidative stress) ในเม็ดเลือดแดง โดยศึกษาในกลุ่มตัวอย่างเลือดของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD จำนวน 14 ราย และกลุ่มตัวอย่างเลือดคนปกติจำนวน 16 ราย แล้ววิเคราะห์การแตกของเม็ดเลือดแดง ระดับการเกิดเมทฮีโมโกลบิน (Methemoglobin) และระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอน (Reduced glutathione) โดยวิธีทางชีวเคมี เพื่อวัดปริมาณเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคนปกติกับผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD จากผลการศึกษา พบว่าสารสกัดหยาบจากใบมะรุมไม่มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงในคนปกติ แต่ในภาวะแวดล้อมที่มีออกซิเดชันสูง สารสกัดจากใบมะรุมมีผลให้การแตกของเม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่พร่องเอนไซม์ G6PD มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อประเมินระดับของเมทฮีโมโกลบินและรีดิวซ์กลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากได้รับการทดสอบกับสารสกัดใบมะรุม ปรากฏว่าปริมาณของเมทฮีโมโกลบินลดลงและปริมาณของรีดิวซ์กลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น ทั้งในกลุ่มที่พร่องเอนไซม์ G6PD และกลุ่มคนปกติ นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของรีดิวซ์กลูตาไธโอนระหว่างกลุ่มที่พร่องเอนไซม์ G6PD กับกลุ่มคนปกติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่าใบมะรุมไม่ก่อให้เกิดฤทธิ์ข้างเคียงต่อผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ดังนั้นการรับประทานผลิตภัณฑ์จากใบมะรุมในปริมาณที่เหมาะสมและในช่วงเวลาที่ไม่นานจนเกินไปน่าจะปลอดภัยต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ: ภาวะพร่องเอนไซม์ G6PD, มะรุม, เมทฮีโมโกลบิน, รีดิวซ์กลูตาไธโอน, ออกซิเดชันสูง

Abstract

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes are more sensitive to hemolysis if exposed to chemicals or oxidizing agents. This study was aimed at investigating biological effects of drumstick tree (*Moringa oleifera*) leaf extracts on G6PD-deficient erythrocytes (n=16) and normal erythrocytes (n=14). Blood samples were tested with alcohol extracts of drumstick tree leaves, in order to infer whether the crude extracts have oxidative

effects on G6PD-deficient erythrocytes. Hemolytic effects, methemoglobin and reduced glutathione levels were determined by biochemical assays. The results showed that without H₂O₂ induction, drumstick tree leaf extracts had no hemolytic effects on either group of blood samples. When exposed to H₂O₂, the hemolysis of treated erythrocytes was significantly increased in G6PD-deficient samples but not in the normal blood samples. The drumstick tree leaf extracts were found to reduce methemoglobin and increase glutathione levels in both the G6PD-deficient and the normal control group. In addition, upon treatment with drumstick tree leaf extracts, the level of reduced glutathione in normal erythrocytes was not different than that of G6PD-deficient erythrocytes. The *in vitro* study demonstrated that these crude extracts have no strong oxidative effects on erythrocytes. Therefore, drumstick tree herbal products, when consumed in appropriate quantities and in a short term, are effective and safe for G6PD-deficient patients.

Keywords: *Moringa oleifera*, G6PD deficiency, Methemoglobin, Reduced glutathione, Oxidative stress

1. บทนำ

ปัจจุบันมีโรงพยาบาลชุมชนหลายแห่งได้ทำการวิจัยประสิทธิภาพของยาสมุนไพร (Herbal medicine) เพื่อผลักดันสู่บัญชียาหลักแห่งชาติ ตัวอย่างกรณีศึกษาวิจัยของโรงพยาบาลบางกระพุ่ม จังหวัดพิษณุโลก พบว่า มีแคชมันชัน (Curcumin) และชุมเห็ดเทศ (Ringworm bush) เท่านั้น ที่ประสบความสำเร็จและสามารถนำมาใช้บรรเทาอาการของโรค [1] นอกจากนี้ยังมีพืชสมุนไพรไทยอื่นๆ ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะมะรุม (Drumstick tree) ซึ่งเป็นหนึ่งในพืชสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์แผนโบราณในหลายประเทศโดยเฉพาะแถบทวีปแอฟริกา เอเชีย และลาตินอเมริกา มะรุมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moringa oleifera* Lam. วงศ์ Moringaceae พืชชนิดนี้เจริญและพบได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย เป็นไม้ยืนต้นปลูกเพื่อรับประทานเป็นอาหาร จากผลการค้นคว้าข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พบสารสำคัญในเปลือกต้นมะรุม เรียกว่า Alkaloid ในยางมีสาร Arabinose, Galactose, Glucuronic และ Traces of rhamnose ส่วนในเมล็ดมีสาร Benoid เป็นตัวยาสกัด ดอกใช้ต้มน้ำเพื่อเจริญ

อาหารและบำรุงโลหิต รากทำเป็นยาขงต้มขับปัสสาวะหรือใช้พอกเพื่อลดการอักเสบของบาดแผล ยาใช้ผสมกับนมต้มแก้ปวดศีรษะ เปลือกต้นมีฤทธิ์ทำให้ครรภ์แท้งได้ [2, 3] ใบพบว่ามียาวิตามินซีสูง ใช้ทานแก้เลือดออกตามไรฟันและชะลอความแก่ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในใบมีสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ช่วยลดน้ำตาลและลดคอเลสเตอรอลในเลือด จึงมีการนำสารสกัดจากใบมะรุมไปใช้ในสัตว์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง โรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือดหัวใจ [4, 5] ประโยชน์ของมะรุมมีมากมายแต่ยังมีข้อควรระวังอยู่บ้างในการใช้ยาแคปซูลใบมะรุมกับผู้บริโภคที่เป็นเด็กเล็ก หญิงมีครรภ์ หรือผู้ป่วยที่มีโรคแฝงบางชนิด เช่น ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องเอนไซม์ Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) ซึ่งเชื่อกันว่าไม่ควรรับประทานมะรุมเพราะมีสารบางชนิดที่มีคล้ายกับที่พบในถั่วปากอ้า (Fava bean) ซึ่งอาจทำให้ผู้บริโภคเสี่ยงต่อการเกิดเม็ดเลือดแดงแตกเฉียบพลันได้ (Acute hemolysis) [6, 7]

โรคพร่องเอนไซม์ G6PD เป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีการถ่ายทอดผ่านโครโมโซม X จากผลการศึกษากว่าพร่องเอนไซม์ G6PD ในประชากรไทยทั่วประเทศ พบความชุกเฉลี่ยร้อยละ 12 เด็กที่ป่วยเป็นโรคนี้จะไม่แสดงอาการผิดปกติจากตัวเหลืองตอนแรกเกิด และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง โรคนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีนสร้างเอนไซม์ G6PD ซึ่งมีหน้าที่รักษาเสถียรภาพของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวแก่ และอยู่ในปฏิกิริยาที่สร้าง Nicotinamide dinucleotide phosphate (NADPH) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายกลูตาไธโอน (Glutathione) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากออกซิเดชันสูง (Oxidative stress) ที่เกิดขึ้น ถ้าร่างกายได้รับสารเคมี ยา หรืออาหารบางอย่างที่เป็นพิษ จะทำให้ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD ถูกออกซิไดส์กลายเป็นเมทฮีโมโกลบิน (Methemoglobin) ที่ตกตะกอนอยู่บนผิวเม็ดเลือดแดง ถ้ารุนแรงมากจะทำให้เม็ดเลือดแดงแตก และทำให้เกิดภาวะโลหิตจางตามมาได้ ยาหรืออาหารที่มีรายงานว่าเหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD มีหลายอย่าง เช่น ยารักษามาลาเรีย ยาปฏิชีวนะ และยาซัลฟา [8] เป็นต้น อย่างไรก็ตามสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD อาจเกิดจากปัจจัยอื่นนอกเหนือจากที่กล่าวมา การตั้งข้อสรุปว่ายาหรือสมุนไพรตัวใดเป็นสาเหตุทำให้เกิดพิษต่อเม็ดเลือดแดงในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD นั้นเป็นเรื่องที่ต้องมีการศึกษาอย่างมีระบบเพื่อยืนยันผลการทดลองว่าสาเหตุการเกิดภาวะโลหิตจางในผู้ป่วย ที่แท้จริงมาจากตัวเชื้อโรคที่ผู้ป่วยรับเข้ามา หรือเกิดจากกระบวนการสร้างหรือสลายของตัวยาเหล่านั้น

อย่างไรก็ตามมะรุมยังมีปัญหาและอุปสรรคเพื่อใช้ผลิตยาสมุนไพรคุณภาพ เนื่องจากยังขาดองค์ความรู้หลายด้าน ตั้งแต่การควบคุมวัตถุดิบที่ปราศจากสารปนเปื้อน กรรมวิธีการสกัด กลไกการออกฤทธิ์ และผลข้างเคียงอันเนื่องมาจากการใช้ยาสมุนไพรไม่ถูกวิธี ทำให้ความเชื่อมั่นของผู้บริโภคยาสมุนไพรลดลง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบมะรุมในหลอดทดลอง โดยทดสอบในเลือดของกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD เปรียบเทียบกับเลือดของกลุ่มคนปกติ แล้วดูผลการแตกของเม็ดเลือดแดง ระดับเมท

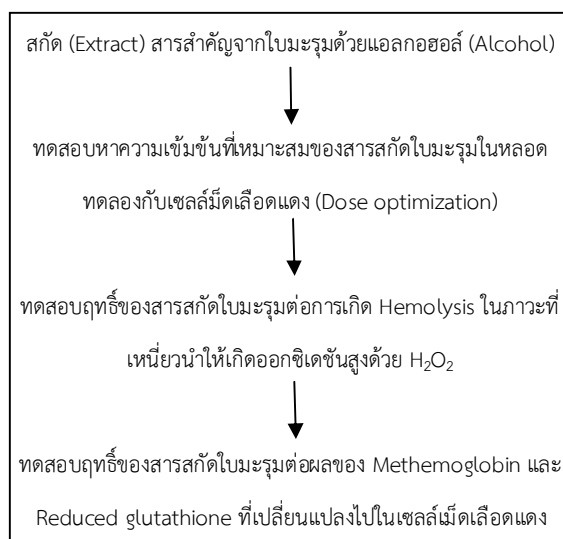
ฮีโมโกลบิน และระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอน ที่เปลี่ยนแปลงไปในเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งการวิจัยสมุนไพรครั้งนี้ได้มุ่งเน้นการทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์ เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ทางพฤกษศาสตร์ที่ถูกต้อง ให้ผู้บริโภคเชื่อมั่นว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด มีประสิทธิภาพต่อการรักษาโรคและปลอดภัยต่อร่างกาย

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อระดับออกซิเดชัน (Oxidative status) ในเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD

2.2 เพื่อนำเสนอคุณสมบัติของสารสกัดใบมะรุมสำหรับแพทย์บุคลากรสาธารณสุข ประชาชน รวมถึงหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในการผลิตยาสมุนไพรที่ปลอดภัย

3. กรอบแนวคิดการวิจัย



4. วิธีดำเนินงาน

4.1 การสกัดหยาบสารสำคัญจากสมุนไพรอบแห้ง (Crude sample extraction)

เก็บตัวอย่างใบมะรุมสดจากที่ปลูกในเขตกรุงเทพฯ และเขตปริมณฑล มาใช้ในการศึกษาโดยอ้างอิงสัณฐานวิทยา (Morphology) จาก Iwu, 1993 [9] จากนั้นนำใบมะรุมมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส (°C) เป็นระยะเวลาประมาณ 10 ชั่วโมง (ชม.) จากนั้นนำไปบดละเอียดแล้วร่อนด้วยตระแกรง ตวงผงมะรุมให้ได้ปริมาณ 5 กรัม (ก.) แล้วหมักด้วยแอลกอฮอล์ 70% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (มล.) อย่างน้อย 6 ชม. จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำน้ำยาที่แยกได้ไประเหยให้แห้งเพื่อเตรียมเป็นสารสกัดหยาบต่อไป [10]

4.2 การเตรียมสารสกัดใบมะรุมให้เข้มข้น (Concentration of drumstick tree leaf extracts)

ซังสารสกัดหยาบ 0.1 ก. แล้วละลายด้วยอะซีโตน 80% ปริมาตร 1 มล. เมื่อสารสกัดละลายแล้วนำไปปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บเอาส่วนใส (Supernatant) จะได้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดตั้งต้นที่ 100 มก.ต่อมล.

4.3 การเตรียมเลือดครบส่วนจากกลุ่มอาสาสมัครคนปกติ (Normal donors) และกลุ่มอาสาสมัครผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD (G6PD deficient donors)

งานวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาเห็นชอบ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติเรียบร้อยแล้ว เมื่ออาสาสมัครทราบและเข้าใจรายละเอียดของงานวิจัย คณะผู้วิจัยได้ให้อาสาสมัครลงนามเข้าร่วมโครงการวิจัย ก่อนทำการเก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 5 มล. ในสารกันเลือดแข็งชนิด CPDA ทั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD จำนวนทั้งสิ้น 14 ราย เป็นเพศหญิงจำนวน 8 ราย อายุระหว่าง 20-45 ปี เป็นเพศชายจำนวน 6 ราย อายุระหว่าง 1-35 ปี จากโรงพยาบาลประจำอำเภอสังขะ จังหวัดสุรินทร์ และทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครปกติ จำนวนทั้งสิ้น 16 ราย เป็นเพศหญิงจำนวน 10 ราย เป็นเพศชายจำนวน 6 ราย อายุระหว่าง 20-40 ปี จากนักศึกษาคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

4.4 ทดสอบเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนปกติกับสารสกัดใบมะรุมน เพื่อเลือกขนาดยาและเวลาที่เหมาะสมในการทดลอง (Dose and time optimization)

ทำการแยกเม็ดเลือดแดงที่ปั่นตกตะกอนแล้ว (Packed red cell) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (มคล.) เจือจางลงใน PBS บัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มล. ที่มีสารสกัดใบมะรุมนผสมอยู่ที่ระดับความเข้มข้น จาก 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัม (มคก.) ต่อมล. ตามลำดับ อุณหภูมิ (incubate) เม็ดเลือดแดงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1, 2, และ 4 ชม. เมื่อครบเวลา ประเมินความเสียหายของเซลล์โดยคิดเป็นร้อยละ (% cell damage) ด้วยการย้อมสี Trypan blue ที่ความเข้มข้น 0.1 % ตรวจสอบ Morphology ของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายสูง (40x) โดยเซลล์ที่มีลักษณะผิดปกติ เทียบ หรือติดสีน้ำเงิน จะนับเป็นเซลล์ชนิดที่ได้รับความเสียหายจากยา (ทุกการทดสอบจะใช้สาร α -Naphthol ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 100 มคก.ต่อมล. เป็นหลอดควบคุม)

4.5 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมนต่อการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกในภาวะที่มีออกซิเดชันสูง (Effects of drumstick tree leaf extracts: H_2O_2 -induced oxidative stress)

เมื่อได้ขนาดยาและเวลาการทดสอบที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 4.4 แล้ว ทำการทดสอบต่อโดยแยกเป็น 2 ภาวะ (Condition) ภาวะที่ 1 เป็นการทดสอบเม็ดเลือดแดงกับสารสกัดใบมะรุมนในหลอดทดลองที่ปราศจากสารกระตุ้น H_2O_2 (Without H_2O_2) ส่วนภาวะ ที่ 2 เป็นการทดสอบเม็ดเลือดแดงกับสารสกัดใบมะรุมนก่อน (Pretreatment) แล้วจึงเติมสารกระตุ้น H_2O_2 เข้มข้น 0.5% (With H_2O_2) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิด Oxidative stress เมื่อครบเวลา 2 ชม. นำเซลล์ไปปั่นตกเพื่อแยกเอาน้ำในมาตรวจหาปริมาณของ released Hb ที่เพิ่มขึ้นจากการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยวัด Optical

density (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 nm จากนั้นประเมิน % Hemolysis

4.6 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมนต่อระดับของเมทฮีโมโกลบินและรีดิวซ์กลูตาไธโอน (Effects of drumstick tree leaf extracts on methemoglobin and reduced glutathione levels)

ทดสอบเซลล์เม็ดเลือดแดงกับสารสกัดใบมะรุมนที่ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมตามที่ได้จากการทดลองที่ 4.4 เมื่อครบกำหนดเวลา นำหลอดไปปั่นตกที่ความเร็วรอบ 3,000 g นาน 10 นาที จากนั้นแยกเอาเฉพาะ Packed red cells ปริมาตร 300 มคล. ไปเจือจางในน้ำกลั่นปริมาตร 2.7 มล. แล้วแบ่งเลือดที่เจือจางเป็น 3 หลอดเท่าๆกัน จะได้เป็นสารละลาย Hemolysate หลอด ก. หลอด ข. และหลอด ค. อย่างละ 1 มล. [11, 12]

หลอด ก. วัดค่า OD₆₃₀ ก่อนเติม 1% KCN ปริมาตร 20 มคล. (OD₁) แล้ววัดค่า OD₆₃₀ หลังเติม 1% KCN ปริมาตร 20 มคล. (OD₂) หลอด ข. วัดค่า OD₆₃₀ หลังเติม 10% K₃[Fe(CN)₆] ปริมาตร 20 มคล. (OD₃) แล้ววัดค่า OD₆₃₀ หลังเติม 10% K₃[Fe(CN)₆] ปริมาตร 20 มคล. และ 1% KCN ปริมาตร 20 มคล. (OD₄)

ดังนั้น ค่าของ %Methemoglobin คำนวณได้จากสมการที่ (1)
$$\%MetHb = (OD_1 - OD_2) \times 100 / (OD_3 - OD_4) \quad (1)$$

หลอด ค. เติม 1.67% Metaphosphoric acid จำนวน 3 มล. แล้วอุ่นที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นนำสารละลาย Hemolysate มากรองด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายที่กรองได้ 300 มคล. มาผสมกับ 0.3 M Na₂HPO₄ ปริมาตร 600 มคล. แล้วเติม 0.2% 2-Nitrobenzoic acid ปริมาตร 75 มคล. ผสมให้เข้ากันดีจึงนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 412 nm แล้วคำนวณปริมาณ Reduced glutathione จากสมการที่ (2)

$$GSH \text{ (mg/dL)} = \frac{(OD_{412} \text{ of GSH} \times 12.5 \times 307.3)}{\%Hematocrit} \quad (2)$$

4.7 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิจัยนี้วิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Minitab version 15 เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองของเลือดกลุ่มคนปกติกับเลือดกลุ่มคนที่พร่องเอนไซม์ G6PD โดยใช้การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วย Independent t-test ซึ่งการวิจัยครั้งนี้กำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

5. ผลการศึกษา

5.1 ผลการทดสอบฤทธิ์สารสกัดใบมะรุมนที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนปกติ

จากผลการทดสอบสารสกัดใบมะรุมนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาการ Incubate ต่างๆกัน ในเม็ดเลือดแดงของคนปกติ ที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่า ขนาดยาที่ใช้ในการทดสอบแล้วส่งผลต่อการตอบสนองของเซลล์และก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 30 มีความเข้มข้นระหว่าง 100-1,000 มคก.ต่อมล. ที่

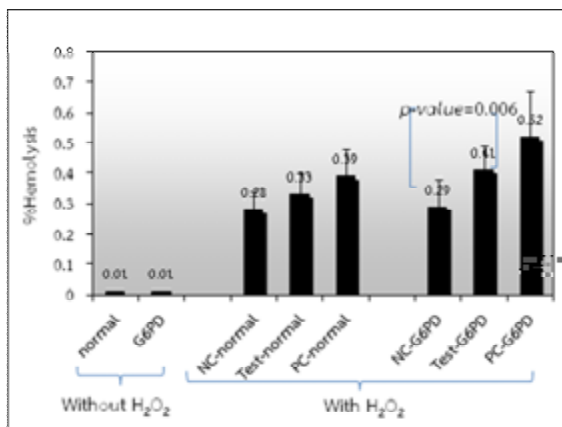
ระยะเวลาการทดสอบ 2 ชม. ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกสารสกัดใบมะรุมที่มีความเข้มข้น 1,000 มก.ต่อมล. มาใช้ในการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการทดลองดังกล่าว

5.2 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแตกของเม็ดเลือดแดง ในภาวะแวดล้อมมีออกซิเดชันสูง

ภาวะที่ 1 หยอดทดลองที่ปราศจากสารกระตุ้น H_2O_2 พบว่า สารสกัดใบมะรุมไม่มีผลกระทบต่อการแตกเม็ดเลือดแดงทั้งในกลุ่มคนปกติและกลุ่มที่พร่องเอนไซม์ G-6-PD

ภาวะที่ 2 หยอดทดลองที่เติมสารกระตุ้น H_2O_2 ลงใน Treated cells ผลกระทบของสารสกัดใบมะรุมต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงในกลุ่มคนปกติ ที่กระตุ้นด้วย 0.5% H_2O_2 อย่างเดียว (หอด Negative control) มีค่าเฉลี่ยการแตกของเม็ดเลือดแดง ร้อยละ 0.28 เมื่อ Pretreatment ด้วยสารสกัดใบมะรุม 1,000 มก.ต่อมล. ร่วมกับ 0.5% H_2O_2 (หอด Test) มีค่าเฉลี่ยการแตกของเม็ดเลือดแดง ร้อยละ 0.33 และเมื่อ Pretreatment ด้วย α -Naphthol ร่วมกับ 0.5% H_2O_2 (หอด Positive control) มีค่าเฉลี่ยการแตกของเม็ดเลือดแดง ร้อยละ 0.39 สำหรับผลของสารสกัดใบมะรุมต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่พร่องเอนไซม์ G-6-PD ที่กระตุ้นด้วย 0.5 % H_2O_2 อย่างเดียว มีค่าเฉลี่ยการแตกของเม็ดเลือดแดง ร้อยละ 0.29 เมื่อ Pretreatment ด้วยสารสกัดใบมะรุม 1,000 มก.ต่อมล. ร่วมกับ 0.5% H_2O_2 มีค่าเฉลี่ยการแตกของเม็ดเลือดแดง ร้อยละ 0.41 และเมื่อ Pretreatment ด้วย α -Naphthol ร่วมกับ 0.5% H_2O_2 มีค่าเฉลี่ยการแตกของเม็ดเลือดแดง ร้อยละ 0.52

จากการศึกษาผลกระทบของสารสกัดใบมะรุมต่อการแตกของเม็ดเลือดแดง พบว่า ในภาวะที่มี H_2O_2 เป็นสารอนุมูลอิสระที่ก่อให้เกิดออกซิเดชันสูง สารสกัดจากใบมะรุมสามารถกระตุ้นให้การแตกของเม็ดเลือดแดงในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P=0.006$) แต่ไม่มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงในคนปกติ ดังใน รูปที่ 1

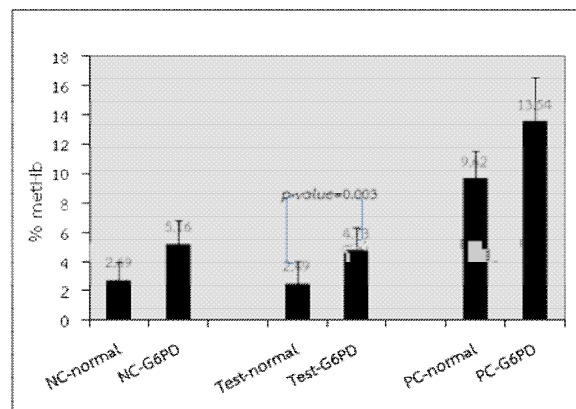


รูปที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงในภาวะที่มีการกระตุ้นด้วยสาร H_2O_2

5.3 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อระดับของเมทฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง

ระดับเมทฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงของคนปกติ ในหอด Negative control มีค่าเฉลี่ยเมทฮีโมโกลบิน ร้อยละ 2.69 ในหอด Test ที่กระตุ้นด้วยสารสกัดใบมะรุม 1,000 มก.ต่อมล. ที่เวลา 2 ชม. มีค่าเฉลี่ยเมทฮีโมโกลบิน ร้อยละ 2.49 และในหอด Positive control ที่กระตุ้นด้วย α -Naphthol มีค่าเฉลี่ยเมทฮีโมโกลบิน ร้อยละ 9.62 สำหรับระดับเมทฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G-6-PD ในหอด Negative control มีค่าเฉลี่ยเมทฮีโมโกลบิน ร้อยละ 5.16 ในหอด Test ที่กระตุ้นด้วยสารสกัดใบมะรุม 1,000 มก.ต่อมล. ที่เวลา 2 ชม. มีค่าเฉลี่ยเมทฮีโมโกลบิน ร้อยละ 4.73 และในหอด Positive control ที่กระตุ้นด้วย α -Naphthol มีค่าเฉลี่ยเมทฮีโมโกลบิน ร้อยละ 13.54

จากการศึกษาผลของสารสกัดใบมะรุมต่อค่าเมทฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง พบว่า ทั้งเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD และเม็ดเลือดแดงของคนปกติก่อนการทดสอบกับสารสกัดใบมะรุมมีระดับค่าเฉลี่ยเมทฮีโมโกลบินแตกต่างกันเล็กน้อย เมื่อพิจารณาผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับเมทฮีโมโกลบิน ระหว่างกลุ่มที่พร่องเอนไซม์ G6PD กับกลุ่มคนปกติ ปรากฏว่า มีปริมาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P=0.003$) อย่างไรก็ตาม ปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่ลดลงหลังจากได้รับการทดสอบกับสารสกัดใบมะรุมนั้น กลับพบว่า ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังใน รูปที่ 2



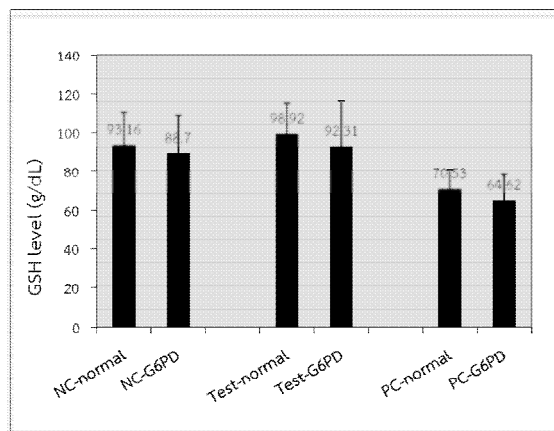
รูปที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการเกิดเมทฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง

5.4 ผลของสารสกัดใบมะรุมต่อระดับของรีดิวซ์กลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดง

ระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงคนปกติ ในหอด Negative control มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 93.16 มก.ต่อดช. ในหอด Test ที่กระตุ้นด้วยสารสกัดใบมะรุม 1,000 มก.ต่อมล. ที่เวลา 2 ชม. มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.92 มก.ต่อดช. และในหอด Positive control ที่กระตุ้นด้วย α -Naphthol ที่เวลา 2 ชม. มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 70.53 มก.ต่อดช. สำหรับระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่อง

เอนไซม์ G6PD ในหลอด Negative control มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 88.70 มก.ต่อดซ. ในหลอด Test ที่กระตุ้นด้วยสารสกัดใบมะรุม 1,000 มก.ต่อดซ. ที่เวลา 2 ชม. มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 92.31 มก.ต่อดซ. และในหลอด Positive control ที่กระตุ้นด้วย α -Naphthol มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 64.62 มก.ต่อดซ.

จากการศึกษาผลของสารสกัดใบมะรุมต่อระดับของรีดิวซ์กลูตาไธโอนในเม็ดเลือดแดง พบว่า ทั้งเม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD และเม็ดเลือดแดงของคนปกติก่อนการทดสอบกับสารสกัดใบมะรุมมีระดับค่าเฉลี่ยรีดิวซ์กลูตาไธโอนที่ใกล้เคียงกัน ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนหลังจากได้รับการทดสอบกับสารสกัดใบมะรุม ปรากฏว่า ปริมาณของรีดิวซ์กลูตาไธโอนเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญ ดังใน รูปที่ 3



รูปที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอน

6. การอภิปรายผล

งานวิจัยที่ผ่านมาเป็นที่ประจักษ์ว่า มะรุมมีสารต่าง ๆ มากมายที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค เช่น โปตีน วิตามิน แคลเซียม เหล็ก และสังกะสี เป็นต้น [13] นอกจากนี้ยังพบว่าเกือบทุกส่วนของมะรุมมีการนำไปใช้ประโยชน์ทางยาอย่างแพร่หลาย แต่ส่วนใหญ่เป็นการนำไปทดสอบในสัตว์ทดลอง ดังที่มีรายงานว่า สารสกัดใบมะรุมมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูโรคเบาหวาน มีฤทธิ์ป้องกันตับอักเสบในหนูที่ได้รับยา Acetaminophen และยังต้านออกซิเดชันที่เกิดภายในเซลล์ได้เป็นอย่างดี [14, 15] ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า สารสกัดใบมะรุมไม่ผลต่อการออกซิไดส์ของฮีโมโกลบินในเซลล์เม็ดเลือดแดง

สำหรับการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ในหนูถีบจักร พบว่า เมื่อให้ผงมะรุมทางปากขนาด 5.0 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ หนูไม่แสดงอาการผิดปกติแต่อย่างใดเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า คนปกติทั่วไป เมื่อรับประทานผงใบมะรุมขนาด 0.04 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลานานๆ น่าจะปลอดภัยต่อร่างกาย [16] ส่วนการทดสอบพิษเรื้อรัง (Chronic

toxicity) ขณะนี้ยังอยู่ในขั้นทดลอง และการศึกษาการก่อการออกฤทธิ์ภายในคน ก็ยังไม่มีผลงานวิจัยออกมายืนยัน ในอนาคตจึงจำเป็นต้องมีการศึกษามาตรฐานทางเคมีและผลข้างเคียงจากการใช้ผงใบมะรุมในระยะยาวต่อไป เพื่อให้สมุนไพรมะรุมมีความน่าเชื่อถือทางการแพทย์มากขึ้น

7. สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า สารสกัดยาจากใบมะรุมมีฤทธิ์กระตุ้นให้เม็ดเลือดแดงของผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD มีการแตกเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยจะเกิดขึ้นเฉพาะภาวะที่มีออกซิเดชันสูงเท่านั้น แต่ไม่มีผลต่อการแตกของเม็ดเลือดแดงของคนปกติ สำหรับฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อระดับของเมทฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง พบว่าส่งผลให้ปริมาณของเมทฮีโมโกลบินทั้งในผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD และคนปกติลดลงเล็กน้อย นอกจากนี้สารสกัดจากใบมะรุมยังส่งผลให้ปริมาณของรีดิวซ์กลูตาไธโอนเพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระดับรีดิวซ์กลูตาไธโอนที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างกลุ่มที่พร่องเอนไซม์ G6PD กับกลุ่มคนปกติ ปรากฏว่า ไม่แตกต่างกัน

ดังนั้น เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นในผู้ที่มีความเสี่ยงสูง การรับประทานผลิตภัณฑ์จากมะรุมในปริมาณที่เหมาะสมและไม่ทานติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจนเกินไป น่าจะปลอดภัยต่อผู้บริโภคที่เป็นโรคตับ โรคไต เด็กเล็ก สตรีมีครรภ์ หรือผู้ที่พร่องเอนไซม์ G6PD

8. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โรงพยาบาลประจำอำเภอสังขะ จังหวัดสุรินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเลือดจากคนไข้ และมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ให้การสนับสนุนการวิจัย และอำนวยความสะดวกตลอดการวิจัยนี้

9. เอกสารอ้างอิง

- [1] จิราพร ลัมปานานท์, รัชนิ จันทรเกษ, สุรธนา อำนาจผล. การจัดการความรู้ไทยและยาจากสมุนไพรในโรงพยาบาลชุมชน. นนทบุรี: อูษาการพิมพ์; 2552.
- [2] ก่องกานดา ชยามฤต, สีน่า ผู้พัฒนพงศ์. สมุนไพรไทย ตอนที่ 7 กรุงเทพมหานคร: ประชาชน; 2545.
- [3] จุฬารัตน์ เกิดดอนแฝก. สมุนไพรลดความดันโลหิตสูง. กรุงเทพมหานคร: เซเว่น พรินติ้ง กรุ๊ป. 2552.
- [4] P. Sudha, et al., "Immunomodulatory activity of methanolic leaf extract of *Moringa oleifera* in animals," *Indian J Physiol Pharmacol*, vol. 54, pp. 133-40, 2010.
- [5] P. Chumark, et al., "The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves," *J Ethnopharmacol*, vol. 116, pp. 439-46, 2008.
- [6] มะรุม พืชมหัศจรรย์. [อินเทอร์เน็ต] [วันที่อ้างถึง 6 เมษายน 2554]. ที่มา: <http://thaiherbclinic.com/node/141>

- [7] สุรชาติภย์ ภมรประวดี. มะรุม [อินเทอร์เน็ต]. ไทย เฮอร์บ บิวตี้, c2005-2010 [วันที่อ้างถึง 22 กุมภาพันธ์ 2554]. ที่มา: <http://thaiherbsbeauty.igetweb.com/index.php?mo=3&art=312589>
- [8] อิศรางค์ นชประยูร. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: Molecular and Clinical Aspects. กรุงเทพมหานคร: จรัสสินทวงศ์การพิมพ์. 2553.
- [9] M. M. Iwu. Handbook of African medicinal plants. Boca raton: CRC Press. 1993.
- [10] P. Siddhuraju and K. Becker, "Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves," *J Agric Food Chem*, vol. 51, pp. 2144-55, 2003.
- [11] E. Beutler and M. C. Baluda, "Methemoglobin Reduction. Studies of the Interaction between Cell Populations and of the Role of Methylene Blue," *Blood*, vol. 22, pp. 323-33, 1963.
- [12] E. Beutler and M. K. Yeh, "Erythrocyte glutathione reductase," *Blood*, vol. 21, pp. 573-85, 1963.
- [13] F. Anwar, *et al.*, "*Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses," *Phytother Res*, vol. 21, pp. 17-25, 2007.
- [14] D. Jaiswal, *et al.*, "Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats," *J Ethnopharmacol*, vol. 123, pp. 392-6, 2009.
- [15] S. Fakurazi, *et al.*, "*Moringa oleifera* Lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level," *Food Chem Toxicol*, vol. 46, pp. 2611-5, 2008.
- [16] ทรงพล ชีวะพัฒน์ และ คณะ. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของใบมะรุม. [อินเทอร์เน็ต]. นนทบุรี:สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, [วันที่อ้างถึง 22 กุมภาพันธ์ 2554]. ที่มา:http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_herbal/research_poison/search_research.asp