2 5 APR 1991
ศูนย์บริการเอกสารการวิจัยฯ
RP1990/859
Screening of Azadirachta
ศูนย์บริการเอกสารการวิจัย ๆ ห้องสมุด วท

ภ. 30–22/ย. 4/รายงานฉบับที่ 1

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

การศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อมาลาเรียเบื้องต้นของสารสกัดจากสะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica* A. Juss) และราชดัด (*Brucea amarissima* Desv.) ในหนูเมาส์

โดย
จักรพงษ์ ลิมปนุสสรณ์
ศศิธร วสุวัต
บัทมา สุนทรศารทูล
สายพิณ แสงหิรัญ
ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล
จุฬารัตน์ จันทรชนะ
ณัฐมาศ พุฒศรี
ทวีศักดิ์ สุนทรธนศาสตร์
ฉันทรา พูนศิริ
กัลยาณี เอกบัญญากุล
สมเนตร บุญพรรคนาวิก
วิไลพร แช่มช้าง

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย

ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(ดร.สันทัด โรจนสุนทร)

ผู้ว่าการ

25 APR 1991

สำนักบริการเอกสารการวิจัย ห้องสมุด

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย วท

โครงการวิจัยที่ ภ.30-22
โครงการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมยาจากสมุนไพร ระยะที่ 2

โครงการย่อยที่ 4
สมุนไพรจากสะเดาอินเดียและราชดัด

รายงานฉบับที่ 1
การศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อมาลาเรียเบื้องต้นของสารสกัดจากสะเดาอินเดีย (Azadirachta indica A. Juss) และราชดัด (Brucea amarissima Desv.) ในหนูเมาส์

โดย
จักรพงษ์ ลิมปนุสสรณ์
ศศิธร วสุวัต
ปัทมา สุนทรศารทูล
สายพิณ แสงหิรัญ
ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล
จุฬารัตน์ จันทรชนะ
ณัฐมาศ พุฒศรี
ทวีศักดิ์ สุนทรธนศาสตร์
ฉันทรา พูนศิริ
กัลยาณี เอกปัญญากุล
สมเนตร บุญพรรคนาวิก
วิไลพร แซ่มช้าง

บรรณาธิการ
วัลย์ลดา หงส์ทอง
นฤมล รื่นไวย์

วท., กรุงเทพฯ 2533
สงวนลิขสิทธิ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.น.พ.สมพงศ์ สหพงศ์ ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อให้ใช้ห้องปฏิบัติการของภาควิชาพยาธิชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการทดลองในบางส่วนของการศึกษาครั้งนี้. และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก, สาขาวิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ, วท. กรุณาเอื้อเฟื้อให้ใช้ตู้แช่แข็ง-70°ซ. สำหรับเก็บเชื้อมาลาเรีย.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
บทนำ	3
อุปกรณ์และวิธีทดลอง	4
ผลการทดลอง	6
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	9
เอกสารอ้างอิง	10
ภาคผนวก	12

SCREENING OF *Azadirachta indica* A. Juss AND *Brucea amarissima* Desv. FOR ANTIMALARIAL ACTIVITIES IN MOUSE

By Jakkrapong Limpanussorn, Sasithorn Wasuwat, Pattama Soontornsaratune, Saipin Sanghirun, Chuleratana Banchonglikitkul, Chularat Chanchana, Nathamas Phutsri, Taweesak Suntorntanasat, Chantara Phoonsiri, Galayanee Ekpanyakul, Somnate Boonpucknavig and Wilaiporn Chamchaang

ABSTRACT

Solvent-free extracts obtained from the bark of stem and leaves of *Azadirachta indica* A. Juss. and the fruit of *Brucea amarissima* Desv. were screened for antimalarial action using *Plasmodium berghei* in outbred Swiss albino mice. The plant extracts were administered at the maximum tolerated dose level at $\frac{1}{10}$ to $\frac{1}{5}$ of LD_{50} dose for four days (from day 0 to day 3) by oral, by intraperitoneal or by intravenous route. The *A. indica* extracts showed the parasite suppression from 0 - 47.6% and 64.1 - 90.9% for *B. amarissima* extracts by oral route, whereas the intraperitoneal and intravenous injection of some extracts of both plants showed low activity and some extracts no activity.

การศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อมาลาเรียเบื้องต้น ของสารสกัดจากสะเดาอินเดีย (Azadirachta indica A. Juss) และราชดัด (Brucea amarissima Desv.) ในหนูเมาส์

โดย จักรพงษ์ ลิมปนุสสรณ์*, ศศิธร วสุวัต*, ปัทมา สุนทรศารทูล*, สายพิณ แสงหิรัญ*, ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล*, จุฬารัตน์ จันทรชนะ*, ณัฐมาศ พุฒศรี*, ทวีศักดิ์ สุนทรธนศาสตร์*, ฉันทรา พูนศิริ*, กัลยาณี เอกปัญญากุล*, สมเนตร บุญพรรคนาวิก* และ วิไลพร แซ่มช้าง*

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อมาลาเรียเบื้องต้นของสารสกัดจากเปลือกลำต้นและใบของสะเดาอินเดีย (Azadirachta indica A.Juss) และผลของราชดัด (Brucea amarissima Desv.) ต่อเชื้อมาลาเรีย Plasmodium berghei ในหนูเมาส์พันธุ์ Swiss albino. ขนาดของสารสกัดที่ให้ประมาณ $\frac{1}{10}$ ถึง $\frac{1}{5}$ เท่าของ LD_{50} โดยการกรอกปาก, และบางสารสกัดจะให้โดยการฉีดเข้าช่องท้อง และฉีดเข้าเส้นเลือดดำ. จากการให้สารสกัดของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ในหนูเมาส์ทุกวันติดต่อกัน 4 วัน หลังติดเชื้อมาลาเรีย พบว่า สารสกัดต่าง ๆ จากกระบวนการสกัดเปลือก และใบสะเดาอินเดียมีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อมาลาเรีย โดยมีเปอร์-เซ็นต์การกดเชื้อมาลาเรีย (% suppression) ตั้งแต่ 0 - 47.6%. ส่วนสารสกัดต่าง ๆ จากผลราชดัดมีเปอร์เซ็นต์การกดเชื้อมาลาเรีย ตั้งแต่ 64.1 - 90.9% เมื่อให้โดยการกรอกปาก. สารสกัดบางส่วนของสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด เมื่อให้โดยการฉีดเข้าช่องท้องและฉีดเข้าเส้นเลือดดำ สามารถต้านเชื้อมาลาเรียได้ในระดับต่ำมาก และบางส่วนไม่ได้ผล.

---

* สาขาวิจัยอุตสาหกรรมเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี-แห่งประเทศไทย

** ภาควิชาพยาธิชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล

บทนำ

มาลาเรียยังคงเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญของโลกและของประเทศไทย ซึ่งอยู่ในเขตที่มีการระบาดของโรคมาลาเรีย. ในปีหนึ่ง ๆ มีผู้ป่วยด้วยโรคมาลาเรีย และเสียชีวิตลงเป็นจำนวนมาก. ยารักษาโรคมาลาเรียที่เคยมีประสิทธิภาพให้ผลการรักษาหายขาดนั้นด้อยประสิทธิภาพลง เนื่องจากเกิดการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย Plasmodium falciparum ซึ่งเป็นเชื้อที่พบบ่อย (ประมาณร้อยละ 60) (หะริณสุต 2530). ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าหาตัวยาใหม่ ๆ ที่มีประสิทธิภาพดีในการรักษามาลาเรียทั้งจากสารเคมีสังเคราะห์ และสารธรรมชาติที่แยกได้จากสมุนไพร.

การทดสอบหาประสิทธิภาพของสมุนไพรที่ใช้รักษามาลาเรีย Spencer และคณะ (1947) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสมุนไพรกว่า 600 ชนิด ในสัตว์ปีก (avian). พบว่าสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมาลาเรียของสัตว์ปีกอยู่ในวงศ์ Amaryllidaceae และ Simaroubaceae. Pavanand และคณะ (1986) ได้รายงานผลการทดลองสารสกัดจาก Brucea javanica (L.) Merr. (Simaroubaceae) พบว่า Bruceine A, B, C เป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ P. falciparum. Chan และคณะ (1986) รายงานผลของฤทธิ์การต้านเชื้อมาลาเรียของสารสกัดหยาบและสารเคมีบริสุทธิ์ต่าง ๆ ที่ได้จากรากปลาไหลเผือก Eurycoma lengifolia Jack, Simaroubaceae. รายงานดังกล่าวข้างต้นเป็นการทดสอบในหลอดทดลอง ยังไม่ได้ทดสอบในสัตว์ทดลอง. Fandeur และคณะ (1985) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรียของ Sergeolide ซึ่งเป็นสารพวก Quassinoid ได้จาก Picrolemma pseudocoffee, Simaroubaceae, พบว่าสารนี้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ P. falciparum ในหลอดทดลองและ P. berghei ในหนูเมาส์ในขนาดยาที่ค่อนข้างต่ำ, แต่ความเป็นพิษของสารนี้ค่อนข้างสูงทำให้ผู้วิจัยสรุปว่า Sergeolide ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการรักษามาลาเรียในคน. Abatan และ Makinde (1986) รายงานว่าสารสกัดจาก Azadirachta indica A. Juss (Meliaceae) และ Pisum sativum Sansome (Leguminosae) มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ P. berghei ในหนูเมาส์.

สำหรับประเทศไทยการศึกษาค้นคว้านำสมุนไพรมารักษาโรคมาลาเรีย ได้เริ่มในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 โดย ศาสตราจารย์ น.พ. อวย เกตุสิงห์ (2493) ได้ทดลองนำสมุนไพรจำนวน 30 ชนิด มาใช้ในผู้ป่วยโรคมาลาเรีย. สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนั้นยังไม่ได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และศึกษาความเป็นพิษของสมุนไพรนั้น ๆ.

รายงานนี้จะเสนอผลการศึกษาขั้นต้น จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสะเดาอินเดีย (Azadirachta indica A. Juss) และราชดัด (Brucea amarissima Desv.) ต่อเชื้อมาลาเรีย Plasmodium berghei ในสัตว์ทดลอง.

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

- ตัวอย่างทดสอบ สารสกัดจากเปลือกลำต้น และใบสะเดาอินเดีย (Azadirachta indica A. Juss)
  1. สารสกัดหยาบส่วนที่ 1
  2. สารสกัดหยาบส่วนที่ 2
  3. สารสกัดหยาบส่วนที่ 3
  4. สารสกัดหยาบส่วนที่ 4
  5. สารสกัดหยาบส่วนที่ 5
  6. สารสกัดหยาบส่วนที่ 6

สารสกัดจากผลราชดัด (Brucea amarissima Desv.)

1. สารสกัดหยาบส่วนที่ 1
2. สารสกัดหยาบส่วนที่ 2
3. สารสกัดหยาบส่วนที่ 3
4. สารสกัดหยาบส่วนที่ 4
5. สารสกัดหยาบส่วนที่ 5

วิธีการสกัดสมุนไพรแสดงในภาคผนวก.

- ตัวอย่างเปรียบเทียบมาตรฐาน Chloroquin diphosphate ของ Newpharquin.
- หนูเมาส์พันธุ์ Swiss albino (outbred strain). จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ, ม.มหิดล.
- เชื้อมาลาเรียพันธุ์ Plasmodium berghei (chloroquin sensitive strain).

- อาหารเลี้ยงสัตว์ทดลอง, อาหารอัดเม็ด C.P. Mice Feed ของบริษัทกรุงเทพฯ อาหารสัตว์ จำกัด.
- Absolute methanol ของ E. Merk, เยอรมนี.
- Eosin gelblich ของ E. Merk, เยอรมนี.
- Methyleneazur Azur ของ Fluka, สวิตเซอร์แลนด์.
- Sodium sulfate ของ Sigma, สหรัฐอเมริกา.
- Glacial acetic acid ของ E.Merk, เยอรมนี.
- กล้องจุลทรรศน์ของ Nikon รุ่น UFX-II, ญี่ปุ่น.
- Hematocytometer chamber ของ American Optical Corporation, สหรัฐอเมริกา.
- Red cell sahli pipette ของ Boeco, เยอรมนี.
- อื่น ๆ ได้แก่ stomach tube, กรรไกรผ่าตัด, insulin syringe ขนาด 1.0 มล., sterile normal saline, glass slide, ปากคีบ.

วิธีการทดลอง

หนูเมาส์พันธุ์ Swiss albino เพศเมีย อายุ 5 สัปดาห์ น้ำหนักตัวประมาณ 18-20 กรัม, เลี้ยงด้วยอาหารอัดเม็ดของบริษัทกรุงเทพฯ อาหารสัตว์ จำกัด และน้ำดื่มตลอดเวลา. เลี้ยงหนูในห้องปฏิบัติการนานอย่างน้อย 1 สัปดาห์ เพื่อให้ปรับตัวคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม.

การเตรียมเชื้อมาลาเรียสำหรับการทดลอง

เชื้อ Plasmodium berghei, สายพันธุ์ที่ไวต่อ chloroquin (chloroquin sensitive strain) จาก stock ซึ่งอยู่ใน Alsever's medium และเก็บไว้ที่ -70°ซ. นำเชื้อมาลาเรียออกจากตู้เย็นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่ง stock เชื้อมาลาเรียละลาย แล้วคนเบา ๆ. ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1.0 มล. ดูดเชื้อมาลาเรียปริมาตร 0.2 มล. ฉีดเข้าช่องท้องหนู (intraperitoneal injection). ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อมาลาเรียในกระแสเลือด (% parasitemia) โดยการตรวจนับเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย จากการนับเซลล์เม็ดเลือดแดงทั้งหมด 1,000 เซลล์ บนสไลด์ซึ่งเตรียมจากหยดเลือดหนูทางหาง โดยใช้กรรไกรชลิบปลายหาง แล้วปาดหยดเลือดบนสไลด์ให้เป็นแผ่นฟิลม์บาง ๆ ด้วยสไลด์อีกแผ่นหนึ่ง. เมื่อแผ่นฟิลม์เลือดแห้งดีแล้ว แช่สไลด์ใน 95% methanol (นานประมาณ 3 นาที) นำสไลด์ขึ้นผึ่งจนแห้ง แล้วย้อมสี Eosin-methylene blue (dip-quick stain). ตรวจนับเปอร์เซ็นต์ parasitemia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 10 x 100 เท่า เพื่อตรวจนับ parasitemia ได้ประมาณ 20% (ประมาณ 4-5 วันหลังติดเชื้อ).

ตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงหนูโดยเจือจางเลือดด้วย Gower's solution โดยใช้ red cell sahli pipette และนับเลือดที่เจือจางด้วย Hematocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามวิธีของ Wintrobe (1967). คำนวณหาขนาดของการเจือจางเลือด เพื่อให้มีเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย 10^6 เซลล์/0.2 มล. โดยเจือจางเลือดหนูด้วย sterile normal saline แล้วฉีดเข้าช่องท้องหนูอีกเป็นรุ่นที่ 2 (เพื่อให้เชื้อมาลาเรียตื่นตัวก่อนทำการทดลอง) และตรวจนับเปอร์เซ็นต์ parasitemia หลังจากติดเชื้อประมาณ 4-5 วัน เมื่อหนูมี parasitemia ประมาณ 20% จึงเจือจางเลือดหนูด้วย sterile normal saline ให้มีเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรีย จำนวน 10^7 เซลล์/0.2 มล. เพื่อใช้ในการทดลอง.

การทดลองวิธี four-day test (Peters 1970)

การทดลองใช้หนูเมาส์กลุ่มละ 6 ตัว ฉีดเชื้อมาลาเรียที่เตรียมไว้เข้าในช่องท้องหนู ถือเป็น D_0 (วันที่ 0) หลังจากนั้น 1-2 ชั่วโมง เริ่มให้ยาและสารสกัดจากสมุนไพร และให้ติดต่อกันใน D_1, D_2 และ D_3 รวม 4 วัน. ขนาดของยา และวิธีการให้ยาแสดงในตารางรายงานผลการทดลอง. ใน D_4 เจาะเลือดหนูตรวจหาเปอร์เซ็นต์ parasitemia.

ในการทดลองจะมีกลุ่มหนูซึ่งให้ chloroquin diphosphate เป็นกลุ่มควบคุมซึ่งให้ผลบวก (positive control) และกลุ่มหนูซึ่งไม่ได้ให้ยาใด ๆ เลยหลังติดเชื้อมาลาเรียเป็นกลุ่มควบคุมซึ่งให้ผลลบ (negative control).

ในเกณฑ์การตัดสิน ถ้ายาหรือตัวอย่างทดสอบสามารถลดจำนวนเชื้อมาลาเรีย ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การกดเชื้อ (% suppression) ได้ 80-90% โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมให้ผลลบ เมื่อตรวจเลือดหนูใน D_4 ถือว่ามีฤทธิ์ในการกดเชื้อมาลาเรีย (suppressive action) และควรได้รับการศึกษาในรายละเอียดต่อไป (Dhawan and Srimal 1984).

ผลการทดลอง

ผลการทดลองแสดงในตาราง.

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การกดเชื้อมาลาเรีย ในหนูเมาส์ที่ให้ยาหรือสารสกัดจากสมุนไพรเมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม ซึ่งให้ผลลบ (negative control). ตรวจผลเมื่อ D_4 ของการศึกษาฤทธิ์ยาหรือสารสกัดจากสมุนไพรในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย P. berghei (สายพันธุ์ซึ่งไวต่อ chloroquin) โดยใช้วิธี four-day test

ยาหรือสารสกัดจากสมุนไพร	วิธีการให้ยา	ขนาดของยาต่อวัน	เปอร์เซ็นต์การกดเชื้อ
1. สารสกัดจากสะเดาอินเดีย (Azadirachta indica A.Juss)			
1.1 สารสกัดจากเปลือกลำต้นสะเดาอินเดีย			
1.1.1 สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 1	ป้อน	1 ก./กก.	47.6
	ป้อน	2 ก./กก.	1.6
	ป้อน	2x1 ก./กก*.	36.8
1.1.2 สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 2	ป้อน	1 ก./กก.	0
	ป้อน	2 ก./กก.	0
1.1.3 สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 3	ป้อน	1 ก./กก.	0
1.1.4 สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 4	ป้อน	625 มก./กก.	0
1.1.5 สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 5	ฉีดเข้าเส้นเลือด (iv)	10 มก./กก.	0
	ฉีดเข้าช่องท้อง (ip)	15 มก./กก.	8.4
	ป้อน	2x1 ก./กก.*	1.5
1.2 สารสกัดจากใบสะเดาอินเดีย			
สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 6	ป้อน	5 ก./กก.	11.9
	ป้อน	2x5 ก./กก.*	16.1
	ป้อน	3x5 ก./กก.**	0
สารสกัดหยาบจาก methanol-water	ฉีดเข้าช่องท้อง (ip)	2 ก./กก.	0
			0

ตารางแสดงเปอร์เซ็นต์การกดเชื้อมาลาเรีย (ต่อ)

ยาหรือสารสกัดจากสมุนไพร	วิธีการให้ยา	ขนาดของยาต่อวัน	เปอร์เซ็นต์การกดเชื้อ
2. สารสกัดจากผลราชดัด (Brucea amarissima Desv.) วิธีการสกัดแสดงไว้ในภาคผนวก			
2.1 สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 1	ป้อน	0.2 ก./กก.	78.4
2.2 สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 2	ป้อน	0.4 ก./กก.	79.8
	ป้อน	0.6 ก./กก.	90.9
2.3 สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 3	ป้อน	0.2 ก./กก.	81.3
2.4 สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 4	ป้อน	1.0 ก./กก.	64.1
2.5 สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 5	ฉีดเข้าช่องท้อง (ip)	20 มก./กก.	5.99
	ฉีดเข้าเส้นเลือด (iv)	5 มก./กก.	0
3. ยามาตรฐาน chloroquin diphosphate	ป้อน	20 มก./กก.	100
	ฉีดเข้าช่องท้อง (ip)	4 มก./กก.	99.4
	ฉีดเข้าเส้นเลือด (iv)	4 มก./กก.	100

ip = intraperitoneel injection

iv = intravenous injection

* ให้สารสกัดจากสมุนไพรวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น

** ให้สารสกัดจากสมุนไพรวันละ 3 ครั้ง เช้า, กลางวัน และเย็น

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย P. berghei ในหนูเมาส์ของสารสกัดหยาบในส่วนต่าง ๆ จากการสกัดเปลือกลำต้น และใบของสะเดาอินเดีย และจากผลราชดัด โดยให้สารสกัดของสมุนไพรในขนาดสูง (high dose) ซึ่งพัฒนามาจาก LD_{50} ซึ่งแสดงในภาคผนวก, และพิจารณาร่วมกับขนาดที่มีผลแสดงอาการพิษแต่หนูไม่ตายด้วย โดยลดขนาดของสารสกัดลงจาก LD_{50} ประมาณ $\frac{1}{10}$ ถึง $\frac{1}{5}$ เท่า.

จากการศึกษาพบว่า บางส่วนของสารสกัดหยาบจากสะเดาอินเดียทั้งส่วนเปลือกลำต้น และใบไม่มีคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย P. berghei, และบางส่วนสามารถต่อต้านเชื้อมาลาเรียได้ แต่มีเปอร์เซ็นต์การกดเชื้อมาลาเรีย (% suppression) ต่ำ จึงไม่น่าสนใจที่จะศึกษาในขั้นต่อไป.

สารสกัดหยาบจากผลราชดัดในส่วนที่ 1, 2 และ 3 สามารถกดเชื้อมาลาเรียได้ในระดับที่น่าสนใจ คือ 78.4%, 79.8% และ 81.3% ตามลำดับ. แต่เนื่องจากสารสกัดจากผลราชดัดมีความเป็นพิษค่อนข้างสูง (ขนาดของสารสกัดที่มีผลให้หนูตาย หรือแสดงอาการพิษ แสดงในภาคผนวก), ดังนั้น การพัฒนายาจากผลราชดัดจะต้องพิจารณาความเป็นพิษเป็นสำคัญด้วย.

เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน chloroquin diphospate สามารถกดเชื้อมาลาเรียได้ 100% เมื่อให้ในขนาด 20 มก./กก. และ 4 มก./กก. โดยการป้อนและฉีดเข้าเส้นเลือดตามลำดับ, และ 99.4% ในขนาด 4 มก./กก. โดยการฉีดเข้าช่องท้อง.

เอกสารอ้างอิง

เกตุสิงห์, อวย. 2493 รายงานการทดลองรักษามาลาเรียด้วยสมุนไพร. สมุดรวมเรื่องวิชาการ แสดงในงานฉลองหกสิบปีติริราช. กรุงเทพฯ.

ทะริณสุต, ตระหนักจิตร. 2530. สภาวะมาลาเรียและการรักษามาลาเรียในประเทศไทย. การสัมมนาเนื่องในวันสถาปนามหาวิทยาลัยมหิดล, สมุนไพรที่มีศักยภาพรักษามาลาเรีย. 3-4 มีนาคม 2530. งานส่งเสริมการวิจัยและตำรากองบริการการศึกษา, มหาวิทยาลัยมหิดล.

Abatan, M.O. and Makinde, M.J. 1986. Screening Azadirachta indica and Pisum sativum for possible antimalarial activities. Journal of Ethnopharmacology. 17 : 85-93.

Chan, K.L., O'Neill, M.J., Phillipson, J.D. and Warhurst, D.C. 1986. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 3 Eurycoma longifolia. Planta Medica : 105-107.

Dhawan, B. N. and Srimal, R.C. 1984. The use of pharmacological techniques for the evaluation of natural products. Division of Pharmacology, Central Drug Research Institute, Lucknow, India, pp. 84-86.

Fandeur, T., Moretti, C. and Polonsky, J. 1985. In vitro and in vivo assessment of the antimalarial activity of sergeolide. Planta Medica : 20-23.

Pavanand, K. et al. 1986. In vitro antimalarial activity of Brucea javanica against multi-drug resistant Plasmodium falciparum. Planta Medica. : 108-111

Peters, W. 1970. The chemotherapy of rodent malaria, XII. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 64 (2) : 189-202.

Spencer, C.F. et al. 1947. Survey of plants for antimalarial activity. Lloydia. 10 : 145-174.

Wintrobe, M.M. 1967. Clinical Hematology. 6 Ed.Igku Shoin : Lea & Febiger.

ภาคผนวก

วิธีการสกัดสมุนไพรเพื่อทดสอบคุณสมบัติในการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย *P. berghei* ในหนูเมาส์.

1. วิธีการสกัดสมุนไพรสะเดาอินเดีย (*Azadirachta indica* A. Juss) สะเดาอินเดียจาก บางแสน, ชลบุรี.

   1.1 วิธีการสกัดสะเดาอินเดียจากส่วนเปลือกลำต้น

I. เปลือกลำต้นสะเดาอินเดียตากแห้ง

บดละเอียด

↓ 70% ethanol

ทำให้แห้งโดยการกลั่นแบบลดความดัน

ละลายด้วยตัวทำละลาย :

1. benzene ——> สารสกัดหยาบส่วนที่ 1
2. diethyl ether ——> สารสกัดหยาบส่วนที่ 2
3. ethyl acetate ——> สารสกัดหยาบส่วนที่ 3

ละลายด้วย 10% กรดแอซีติก

↓

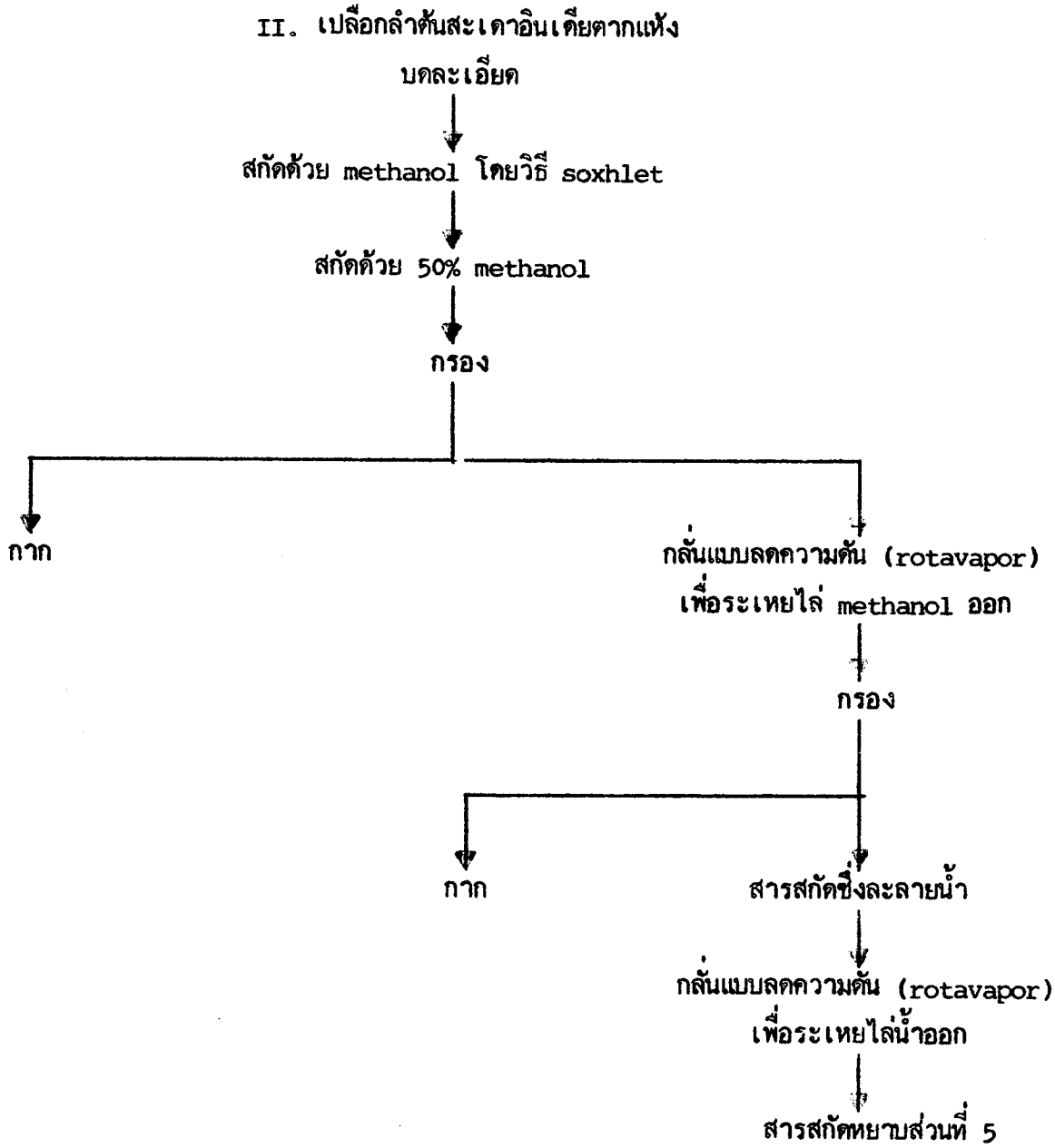
ทำให้เป็นกลางด้วย NH_4OH pH 7.0-7.5

↓

สกัดต่อด้วย benzene

↓

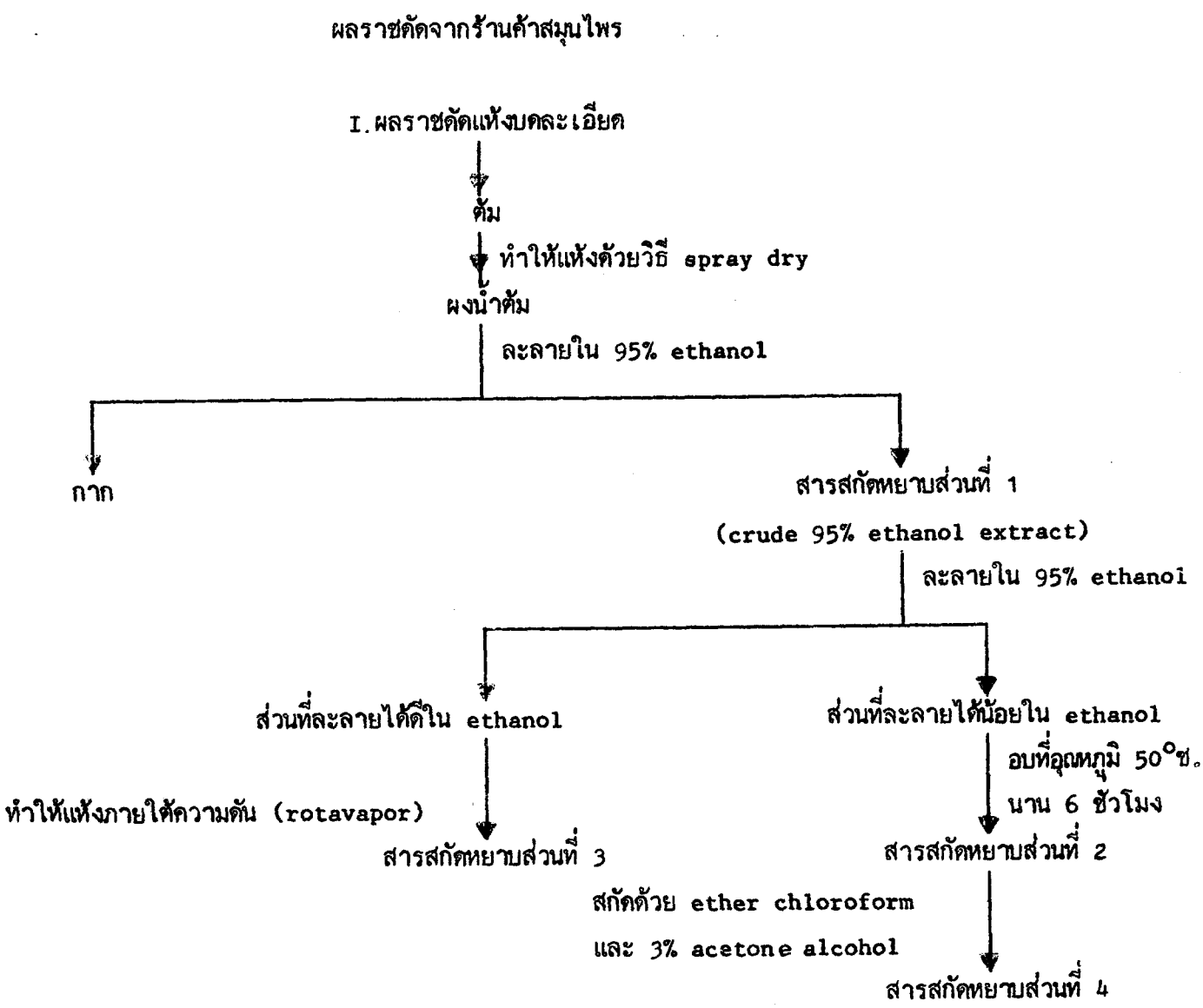
สารสกัดหยาบส่วนที่ 4

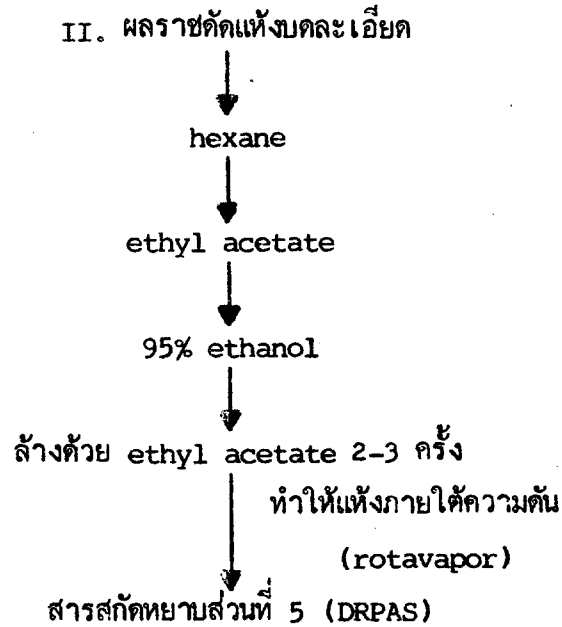


1.2 วิธีการสกัดสะเดาอินเดียจากส่วนใบ

ใบสะเดาอินเดียตากแห้งบดละเอียดผ่านกระบวนการสกัดเช่นเดียวกับ วิธี 1.1 ใน II จะได้สารสกัดในส่วนสุดท้ายเช่นเดียวกับสารสกัดหยาบส่วนที่ 5 ได้เป็นสารสกัดหยาบส่วนที่ 6.

2. วิธีการสกัดสมุนไพรผลราชดัด (*Brucea amarissima* Desv.)




II. ผลราชดัดแห้งบดละเอียด
hexane
ethyl acetate
95% ethanol
ล้างด้วย ethyl acetate 2-3 ครั้ง
ทำให้แห้งภายใต้ความดัน
(rotavapor)
สารสกัดหยาบส่วนที่ 5 (DRPAS)

การเตรียมสารละลายของสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติการต่อต้านเชื้อมาลาเรีย P. berghei ในหนูเมาส์ และค่าประมาณของ LD_{50}

สารทดสอบ	LD_{50}		
	ป้อน	ฉีดเข้าช่องท้อง	ฉีดเข้าเส้นเลือด
1. สารสกัดจากสะเดาอินเดีย			
1.1 สารสกัดจากเปลือกลำต้นสะเดาอินเดีย			
สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 1-4	> 5 ก./กก.	-	-
สารสกัด 8%			
gum acacia 10%			
น้ำมันถั่วลิสง 32%			
น้ำกลั่น 50%			
สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 5	> 5 ก./กก.	120 มก./กก.	80 มก./กก.
ละลายใน normal saline			
1.2 สารสกัดจากใบสะเดาอินเดีย			
สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 6	> 10 ก./กก.	-	3.2 ก./กก.
ละลายใน normal saline			
2. สารสกัดจากผลราชดัด			
สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 1			
ละลายใน 3% gum acacia	2.1 ก/กก.	-	-
สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 2*	-	-	-
ละลายในน้ำกลั่น			
สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 3*	-	-	-
ละลายใน 3% gum acacia			
สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 4	> 2 ก./กก.	-	-
ละลายใน 3% gum acacia			

การเตรียมสารละลายของสารสกัดจากสมุนไพร (ต่อ)

สารทดสอบ	LD_{50}		
	ป้อน	ฉีดเข้าช่องท้อง	ฉีดเข้าเส้นเลือด
สารสกัดหยาบจากส่วนที่ 5 ละลายใน normal saline	-	180 มก./กก.	55 มก./กก.
3. ยามาตรฐาน chloroquin diphosphate ละลายใน normal saline (มิได้ทดลองหาค่า LD_{50})	-	-	-

* มิได้ทดลองหาค่าประมาณ LD_{50} แต่พบว่าสารสกัดหยาบจากผลราชดัดของส่วนที่ 2 และ 3 ในขนาดที่ใช้ทดลองมีผลให้เกิดอาการพิษ ได้แก่ ท้องอืด, ขนพอง และซึมไม่เคลื่อนไหว

ศูนย์บริการเอกสารการวิจัย ห้องสมุด

วท