

อภิปรายผลการวิจัย

ในการทำการทดลองสกัดเมล็ดมันแกว ซึ่งเชื่อว่ามีสารที่เป็นพิษ โดยการใช้น้ำที่ละลายหลายชนิดรวมทั้งการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เพื่อเปรียบเทียบการละลายของสารที่เป็นพิษจากเมล็ดมันแกวในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ สิ่งสกัดที่ได้โดยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ นี้ นำมาทดลองกับสัตว์ทดลอง การสกัดทำเป็น 3 วิธี คือ วิธีที่หนึ่ง ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิธีที่ 2 ทำการสกัดโดยตรงด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ สกัดเมล็ดมันแกวจำนวน 15 กรัม เท่า ๆ กัน ใช้น้ำที่ละลายแต่ละชนิด คือ petroleum ether, ethyl acetate และ ether พวกที่ 3 โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ภายหลังการสกัดเอาไขมันออกด้วย petroleum ether ตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่ chloroform methyl alcohol, ethyl alcohol, methylene chloride และ acetone ใช้น้ำที่ละลายแต่ละชนิดสกัดเมล็ดมันแกวจำนวน 30 กรัม เท่า ๆ กัน

การใช้น้ำเป็นตัวทำละลายโดยใช้น้ำเมล็ดมันแกวมานกบน้ำ จะได้น้ำที่ละลาย สีเหลืองนวลขุ่น สิ่งสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายมีผลต่อสัตว์ทดลอง (หนูขาวและปลาทอง) ทำให้เกิดอาการเป็นพิษถึงตายภายในเวลาอันรวดเร็ว ในสิ่งสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายมีสารที่เป็นพิษและทำให้หนูตายได้ และเมื่อให้สิ่งสกัดดังกล่าวกับปลาทอง ในน้ำทำให้ปลาตายเช่นกัน

ในสิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดโดยตรงด้วย petroleum ether หรือ ethyl acetate หรือ ether ได้แก่น้ำหนักประมาณ 26 - 33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาให้กับสัตว์ทดลองปรากฏว่าในหนูมีอาการถ่ายเหลว มีอาการหายใจเร็วกว่าปกติเล็กน้อย หนูทุกตัวไม่มีอาการชักและไม่ตาย อาการของหนูที่ปรากฏอธิบายได้ว่า ในสิ่งสกัดที่เป็นน้ำที่อาจมีสารที่เป็นพิษปะปนออกมามาก จึงทำให้ปรากฏอาการให้เห็นแต่ไม่มากพอที่จะทำให้หนูตาย สำหรับปลาทองเมื่อให้สิ่งสกัดที่เป็นน้ำนั้น พบอาการที่แสดงว่าเป็นพิษ คือ มีอาการกระวนกระวาย ผุดผายใจเห็นอ้วก ลอยตัวนิ่ง ต่อมาอาการหายใจลำบากและหงายท้อง ปลาทุกตัวตายหมด ในการที่ปลาทองเกิดอาการเป็นพิษและตายน่าจะเป็นเนื่องจากมีสารที่เป็นพิษต่อ

ปลา ถูกสกัดออกมาบางส่วนที่เป็นน้ำมัน และีความเป็นพิษต่อปลาสูง จึงทำให้ปลาตายได้แม้จะถูกสกัดออกมาเพียงเล็กน้อย

การทดลองให้สิ่งสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ตามวิธีที่ 3 มาให้กับหนูขาว อาการที่ปรากฏในหนูที่ขมีการเปลี่ยนแปลงต่อระบบการหายใจอย่างชัดเจน โดยในระยะแรกหนูมีอาการหายใจเร็วขึ้น มีอาการระวนกระวายเล็กน้อย มีซึม ต่อมาเมื่อมีการหายใจจะเริ่มช้า และสั้น ในที่สุดหนูตายเนื่องจากการหยุดหายใจ บางตัวจะมีอาการชักเกิดขึ้นด้วย ซึ่งสิ่งสกัดที่ได้จากตัวทำละลายบางชนิดเกิดอาการเป็นพิษขึ้นแต่ไม่ถึงตาย

การทดลองในปลา เมื่อให้สิ่งสกัด ตามวิธีที่ 3 โดยให้ในขนาดเท่า ๆ กัน (2 ม.ล. ในน้ำ 1000 ม.ล.) ในระยะแรกทำให้สิ่งสกัดปลาจะหายใจเร็ว หยุดหายใจเหนือน้ำ ลอยตัวนิ่ง เมื่อจับปลาจะไม่มีอาการคืบคลาน บางตัวตะแคงตัว หงายท้อง หงายพุงมาก มีเลือดคั่งที่เหงือก ผลสุดท้ายหยุดหายใจ ปลาที่มีอาการเป็นพิษ จนกระทั่งเสียชีวิต โค้ดทดลองเปลี่ยนน้ำ และให้ออกซิเจนเพิ่ม แต่อาการไม่ดีขึ้น และตายในเวลาต่อมา สำหรับอาการหงายพุงมาก ก่อนตายอาจเนื่องจากสารที่เป็นพิษมีผลทำให้กล้ามเนื้อหย่อนคลายตัวและหยุดการว่างงานในที่สุด

ในการทดลองสิ่งสกัดตามวิธีที่ 3 กับ isolated organ (guinea-pig ileum) โดยเปรียบเทียบกับ acetylcholine พบว่าเมื่อให้ acetylcholine ก่อนกับ ileum จะมีการหดตัวทันทีและต่อมาเมื่อล้างออกและให้สิ่งสกัดและสิ่งสกัดในขนาดที่เท่า ๆ กันพบว่า การหดตัวไม่เกิดขึ้นทันทีที่ทิ้งไว้เวลาประมาณ 1 นาที ซึ่งในแต่สิ่งสกัดที่ให้กับ ileum ผลทำให้การหดตัวของกล้ามเนื้ออ่อนนุ่มต่างกันออกไป เมื่อล้างสิ่งสกัดออกและให้ acetylcholine อีกพบว่า กล้ามเนื้อยังสามารถหดตัวได้ไม่เท่ากับการให้ acetylcholine ในครั้งแรก นอกจากนี้ปรากฏว่า tone ของกล้ามเนื้อหย่อนคลายตัวหลังได้รับสิ่งสกัด ซึ่งอาจสนับสนุนอาการหงายพุงที่เห็นในปลาได้

จากการให้สิ่งสกัดที่ได้กับตัวทดลอง (หนูขาวและปลาทอง) และต่อ isolated organ (guinea-pig ileum) พบว่ามีบางสิ่งสกัดไม่ทำให้หนูตายและจากการหดตัวไม่เท่ากันของ ileum จากการให้สิ่งสกัดบางตัวต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากในตัวทำละลายนั้นสามารถสกัดสารที่เป็นพิษออกมาในปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน ผลการทดลองให้สิ่งสกัดอาการส่วนใหญ่เป็นผลการกระตุ้นต่อระบบการหายใจภายหลังให้สิ่งสกัดไม่นาน ต่อมาการหายใจจะหยุด

จากลักษณะของสิ่งสกัดที่สกัดไขมันออกแล้วได้มีลักษณะคล้าย resin มากจึงทำการทดสอบโดย  
 ทำ TLC. พบว่ามีการแยกเป็น zone ต่าง ๆ หลาย zone ซึ่งมีทั้ง zone สีน้ำตาล ชมภู  
 น้ำตาลเหลือง และ เทา และเมื่อนำไปส่องด้วย U.V. light จะพบ blue fluorescence  
 อยู่ส่วนบน และมีสี bluish-green อยู่ปะปนอยู่กับ zone สีน้ำตาล เมื่อนำมา spray  
 ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ antimony trichloride และ heat 110° เซลเซียส นาน 10 นาที  
 พบว่า zone ต่าง ๆ มีความเข้มขึ้น เมื่อนำสิ่งสกัดนั้นมาทดสอบด้วย spectrophotometer ได้  
 จุดดูดซับแสงสูงที่ 240 nm และที่ 290 nm และสิ่งสกัดที่ได้จาก methylene chloride มีค่า  
 จุดดูดซับแสงสูงที่สุด ที่ 240 nm เมื่อนำยาเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่า specific absorbancy 1533

ได้ทำการทดสอบสิ่งสกัดที่ได้เปรียบเทียบกับ rotenone ทั้งนี้จากการทดลองสิ่งสกัดในปลา  
 ทอง พบอาการมีเมือกอาการคล้ายโรคคัน ซึ่งมีสาร rotenone อยู่ โดยการใช้ TLC. ผลที่ได้  
 มี zone ใกล้เคียงกันกับ zone ของ rotenone ซึ่งในสิ่งสกัดนี้อาจจะมีสารที่คล้าย  
 rotenone อยู่ด้วยก็ได้ แต่จากการทำ TLC. ที่ปรากฏขึ้นนั้น เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งสกัดอื่น ๆ บน  
 chromatogram แล้ว พบว่า zone ที่ให้ Rf. value 0.5 บน TLC. เมื่อเปรียบ  
 เทียบกับสิ่งสกัดในส่วนสกัดอื่น ๆ ไม่พบ ทั้งนี้สิ่งที่ปรากฏบน TLC. ซึ่งมี Rf. เท่ากับ rotenone  
 อาจไม่ใช่ rotenone แต่เป็นส่วนที่ถูกติดตามปรากฏบน TLC. ก็ได้

ในสิ่งสกัดที่สกัดด้วย acetone ภายหลังจากสกัดเอาไขมันออก จะให้สิ่งสกัดมีลักษณะเป็น  
 ผลึก ผสม amorphous ทำผลึกที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยนำส่วนสกัดที่ละลายด้วย acetone จำนวนเล็ก  
 น้อย และล้างด้วยส่วนผสมของ petroleum ether และ ether เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มี  
 ไขมันติดออกมา ผลึกที่ได้มีสีเหลือง นำมาละลายใน boiling methylene chloride จำนวน  
 100 ม.ล. นำมากรอง เอาส่วนที่กรองได้มา percolate ผ่าน neutral alumina และ  
 ล้างด้วย methylene chloride จากการ elute นี้ได้ออกมา 3 fraction ซึ่ง  
 จะมี fraction หนึ่ง ที่ให้สี bluish-green fluorescence เมื่อนำไปทำ  
 ให้แห้ง ๆ ในอุณหภูมิห้อง และอบในตู้สุญญากาศ จะได้ผลึก รูปเข็ม เมื่อนำมาหา melting  
 point ได้ค่าประมาณ 202° - 205° ผลึกนี้ไม่ละลายในน้ำ ละลายได้บ้างใน chloroform

และละลายได้ใน methylene chloride แต่จากการทดสอบสิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดด้วย acetone ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ที่ทดลองกับสัตว์ พบอาการพิษเกิดขึ้นกับสัตว์ทดลอง ดังนั้น ในผลิตภัณฑ์นี้น่าจะมีส่วนทำให้เกิดอาการพิษในสัตว์ทดลอง จากการทดลองสิ่งสกัดด้วย methylene chloride ภายหลังจากสกัดไขมันออกในสัตว์ทดลอง พบอาการพิษเกิดขึ้นในสัตว์ทดลอง ผลทำให้สัตว์ตายในระยะเวลาสั้น สารที่เป็นพิษนี้น่าจะมีการละลายตัวได้ดีใน methylene chloride

ผู้วิจัยได้ทดลองทำการสกัดเมล็ดมันแกว ด้วย petroleum ether ก่อน เพื่อสกัดเอาไขมันออก และสกัดด้วย ethyl alcohol อีกครั้งก่อน การสกัดด้วย methylene chloride เมื่อนำสิ่งสกัดที่ได้จาก methylene chloride มาทำให้แห้งๆ ในอุณหภูมิห้อง และอบให้แห้งในตู้อบสูญญากาศ จะได้ผลึกรูปเข็ม ล้างผลึกที่โคด้วยส่วนผสมของ petroleum ether, และ ether ผลึกที่ได้มีลักษณะคล้ายกับผลึกที่ได้จากการสกัดด้วย acetone มีรูปเข็ม เมื่อถูกด้วย U.V. light จะให้สี bluish-green fluorescence มี melting point  $198^{\circ} - 207^{\circ}$  ผลึกนี้ไม่ละลายในน้ำ ละลายได้บ้างใน chloroform ละลายได้ใน methylene chloride จากลักษณะและ melting point ตลอดจนการละลายตัวของผลึก อาจจะเป็นผลึกตัวเดียวกันกับที่ได้จากการสกัดด้วย acetone

ใน Merck Index <sup>6</sup> รายงานของ Van Sillevoldt ในการสกัดเมล็ดมันแกว (*Pachyrrhizus erosus*, Urb.) ให้ pachyrrhizin เป็นผลึกสีเขียวยาวรูปเข็ม มี melting point  $206.5^{\circ} - 208.5^{\circ}$  ละลายได้ใน chloroform, methylene chloride และ dimethylformamide ไม่ละลายใน common organic solvents และน้ำ

จากลักษณะและคุณสมบัติของผลึกที่ได้จากการสกัดนี้มีลักษณะใกล้เคียงกันกับ pachyrrhizin มาก ซึ่งผลึกที่ได้จากการสกัดนั้นไม่ได้นำมาให้กับสัตว์จึงไม่ทราบการแสดงฤทธิ์ที่แน่นอน ได้ใช้ส่วนที่เป็น crude extract กับสัตว์ทดลองเท่านั้น ซึ่งลักษณะของสิ่งสกัดที่สกัดไขมันออก คล้าย resin เมื่อทำการทดสอบหา alkaloid และ saponin นั้นได้ผลลบ

การทดลองนี้พอทราบการแสดงฤทธิ์ของสารพิษที่มีในเมล็ดมันแกว ซึ่งได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีผลทำให้สัตว์ทดลองตายจะพบว่ากลไกของการแสดงฤทธิ์ของสิ่งสกัดต่อระบบการหายใจ โดยในระยะแรก จะกระตุ้นให้มีการหายใจเร็ว และต่อมา การหายใจจะช้า และหยุดในที่สุด นอกจากนี้มีอาการอื่น ๆ เช่นการทดลองในปลาทอง และ isolated guinea-pig ileum

เมื่อให้สิ่งสักทำให้กล้ำเนื้อหย่อนคลายตัว และหยุดการทำงานในที่สุด ซึ่งพอจะเป็นประโยชน์อย่าง  
กว้าง ๆ ถึงความเป็นพิษของเมล็ดมันแกวที่มีในสัตว์ทดลอง เพื่อใช้สำหรับการแก้พิษหรืออันตรายที่เกิดขึ้น  
กับมนุษย์ได้บ้าง