ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

ปริญญา

ชีววิทยา	สัตววิทยา
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง ความเป็นพิษของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า *Clausena heptaphylla* Wright&Arn. และหญ้าดอกขาว *Vernonia cinerea* Less. ต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6

Cytotoxicity of Aqueous Extracts from *Clausena heptaphylla* Wright&Arn. Leaves and *Vernonia cinerea* Less. on Human Lymphocytes and TK6 Cells

นามผู้วิจัย นางสาวฐิติมา เจรจาศิลป

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กันทิมาณี ประเดิมวงศ์, วท.ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์มณจันทร์ เมฆธน, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความเป็นพิษของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า *Clausena heptaphylla* Wright&Arn. และหญ้าดอกขาว *Vernonia cinerea* Less. ต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6

Cytotoxicity of Aqueous Extracts from *Clausena heptaphylla* Wright&Arn. Leaves and *Vernonia cinerea* Less. on Human Lymphocytes and TK6 Cells

โดย

นางสาวฐิติมา เจรจาศิลป

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฐิติมา เจรจาศิลป 2557: ความเป็นพิษของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า *Clausena heptaphylla* Wright&Arn. และหญ้าดอกขาว *Vernonia cinerea* Less. ต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) สาขาชีววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์กันทิมาณี ประเดิมวงศ์, วท.ด. 118 หน้า

หญ้าดอกขาว(VC) เป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ช่วยเลิกบุหรี่โดยใช้ร่วมกับใบโปร่งฟ้า (CH) เพื่อลดอาการไม่พึงประสงค์ การทดลองในครั้งนี้เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6 ของสารสกัดน้ำพืชทั้งสองชนิด และสารผสมใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น (1:1 v/v) พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดทั้งสามชนิดสูงขึ้น โดยสารสกัด CH ให้ผลต่อ DPPH radical scavenging assay สูงที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 431.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัด VC ให้ผลต่อ superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) scavenging assay สูงที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 70.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารผสมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดรองลงมา แต่อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังมีค่าต่ำกว่า standard ascorbic acid จากการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดทุกชนิดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ โดยมีค่า IC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง $\geq$ 1,036.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด CH และสารผสมไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 ในขณะที่สารสกัด VC มีความเป็นพิษปานกลาง ที่ 48 ชั่วโมง มีค่า $IC_{50} \geq$ 272.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้เซลล์ TK6 ตายแบบ apoptosis ที่ 24 ชั่วโมง มากกว่าสารผสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ตายแบบ apoptosis ที่ความเข้มข้นของสาร 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากการได้รับสารสกัด VC มากกว่าสารสกัด CH และสารผสม ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความเสียหายของสารพันธุกรรมด้วยวิธี cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay ในเซลล์ TK6 พบว่าสารสกัด VC มีอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสมากกว่าสารผสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัด VC และสารผสมมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ TK6 ได้ ดังนั้นพืชสมุนไพรทั้งสองชนิดในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยว และสารผสม สามารถใช้บริโภคได้โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์ ในขณะที่สารสกัด VC เป็นพิษต่อเซลล์ TK6 ปานกลาง และชักนำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ จึงอาจมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Thitima Jerajasin 2014: Cytotoxicity of Aqueous Extracts from *Clausena heptaphylla* Wright&Arn. Leaves and *Vernonia cinerea* Less. on Human Lymphocytes and TK6 Cells. Master of Science (Biology), Major Field: Biology, Dapartment of Zoology. Thesis Advisor: Assistant Professor Kantimanee Pradermwong, Ph.D. 118 pages.

The aqueous extracts of *Clausena heptaphylla* leaves (CH), *Vernonia cinerea* plant (VC) and mixture 1:1 (v/v) were commonly used as medicinal plants for relieving cigarette craving and the latter for anti-obesity. The antioxidant activities and cytotoxic effects on human lymphocytes and human lymphoblastoid TK6 cells were determined in this study. All the aqueous extracts exhibited antioxidant activity significantly ($p < 0.05$) when the concentrations were increased. CH showed the strongest activity with DPPH radical scavenging assay (IC_{50} values = 431.72 μg/ml) while VC showed the strongest activity with superoxide radical ($O_2^{-\cdot}$) scavenging assay (IC_{50} values = 70.10 μg/ml). Mixture 1:1 (v/v) showed lower antioxidant activity than CH and VC. The cytotoxicity induced by all extracts on human lymphocytes and TK6 cells was evaluated using MTT assay. Data obtained from MTT assay revealed that all the extracts were non toxic to human lymphocytes at 24 and 48 hrs with the IC_{50} value $\geq$ 1,036.75 μg/ml. CH and mixture 1:1 (v/v) were non toxic to TK6 cells while VC was moderately toxic at 12, 24 and 48 hrs with the IC_{50} value $\geq$ 272.59 μg/ml. Apoptosis was evaluated on human lymphocytes using double-staining method. The results from 48 hr after treatment at the concentration of 1,000 μg/ml indicated that VC showed higher percentage proportion of apoptosis than those of CH and mixture 1:1 (v/v), respectively. In addition, VC induced significantly ($p < 0.05$) higher apoptosis of TK6 cells than mixture 1:1 (v/v) after 24 hr treatment. The genotoxicity induced by VC and mixture 1:1 (v/v) on TK6 cells was evaluated using cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay. Micronucleus induced by VC was significantly ($p < 0.05$) higher than that of mixture 1:1 (v/v) at 24 hr after treatment. In addition, VC and mixture 1:1 (v/v) inhibited the proliferation of TK6 cells. The results suggested that the single extract or mixture of both plants would exert different antioxidant activity and are not toxic to lymphocytes and TK6 cells while VC was moderately toxic and induced DNA damage on TK6 cells.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.กันทิมาณี ประเดิมวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ ที่ให้คำแนะนำทำให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และให้ความอนุเคราะห์สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และหญ้าดอกขาวทั้งต้นตลอดระยะเวลาการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.มณจันทร์ เมฆธน ที่ให้คำแนะนำและช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร.ประไพภัทร คลังทรัพย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ TK6

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาสัตววิทยาทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอน และมอบความรู้อันเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ต่อไป และขอขอบคุณคุณกมลพร มาแสวง คุณเกสินี สุทธิชาติ และคุณกัญชลี จงรักวิทย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการประจำภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านเครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย รวมทั้งคำแนะนำต่างๆ ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆในภาควิชาสัตววิทยาที่เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์นี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ฐิติมา เจรจาศิลป

มิถุนายน 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	53
ผลและวิจารณ์	62
สรุปและข้อเสนอแนะ	93
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	96
ภาคผนวก	116
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	118

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สรรพคุณ และการใช้ประโยชน์ทางแพทย์พื้นบ้านของโปร่งฟ้า	5
2	สารเคมีที่พบในสารสกัดโปร่งฟ้าด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	7
3	สรรพคุณ และการใช้ประโยชน์ทางแพทย์พื้นบ้านของหญ้าดอกขาว	18
4	สารเคมีที่พบในสารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน	20
5	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)	63
6	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ตรวจสอบด้วยวิธี Superoxide radical scavenging assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)	65
7	ความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ หลังจากได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)	69
8	ความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)	71
9	การตายแบบ apoptosis ของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ หลังจากได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี double-staining method (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)	76

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	การตายแบบ apoptosis ของเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นและสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)	81
11	ความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นและสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)	90

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ หลังจากได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี double-staining method	77
2	ลักษณะเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น (B, C, F) และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) (D, E) ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay	82
3	เซลล์ TK6 รูปร่างปกติ (A) และเซลล์ตายแบบ apoptosis (B) โดยมีนิวเคลียสแตกออกเป็นชิ้น (ลูกศร) หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay	83
4	การตายแบบ apoptosis ของเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay	84
5	จำนวนไมโครนิวเคลียส (MN) ใน binucleated cell ของเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay	91
6	เปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay	92

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเป็นพิษของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า *Clausena heptaphylla* Wright&Arn. และหญ้าดอกขาว *Vernonia cinerea* Less. ต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6

Cytotoxicity of Aqueous Extracts from *Clausena heptaphylla* Wright&Arn. Leaves and *Vernonia cinerea* Less. on Human Lymphocytes and TK6 Cells

คำนำ

การใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคนั้น เป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีการสั่งสมองค์ความรู้และสืบทอดวิธีการปฏิบัติมาอย่างยาวนาน ปัจจุบันการนำพืชสมุนไพรมาใช้ประโยชน์เป็นที่นิยมอย่างกว้างขวางทั่วโลก ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง ยาและอาหารเสริม โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านการรักษาโรคทั่วไป เนื่องจากยาที่มาจากพืชสมุนไพรนั้นมีผลข้างเคียงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับยาที่ได้จากการสังเคราะห์ แต่พืชสมุนไพรหลายชนิดยังขาดข้อมูลทางด้านวิทยาศาสตร์ ทำให้ผู้ใช้ขาดความมั่นใจในการใช้ และการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรจึงไม่ก้าวหน้า

โปร่งฟ้า หรือต้นแฮ็ค *Clausena heptaphylla* (Rutaceae) และหญ้าดอกขาว หรือหมอน้อย *Vernonia cinerea* (Asteracea) เป็นพืชสมุนไพรพบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีรายงานการใช้โปร่งฟ้ารักษาบาดแผล อาการเคล็ดขัดยอก ผิวหนังอักเสบ ตาอักเสบ ใบโปร่งฟ้าต้มหรือเคี้ยวสดใช้แก้หวัด ไอ ลดไข้ กระตุ้นการซ่อมแซมตับ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส มีคุณสมบัติช่วยเลิกบุหรี่ (ณุฉัตรา, 2549; Chakraborty *et al*., 1995; Sohrab *et al.*, 2001; Huy *et al*., 2004; Purkayastha and Nath, 2006; Hossan *et al*., 2009) ส่วนหญ้าดอกขาว แต่ละส่วนของพืชมีสรรพคุณใช้รักษาโรคได้หลากหลาย ทั้งลดไข้ ลดความดัน รักษาแผลบวมอักเสบ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ปัจจุบันใช้เป็นชาชงดื่ม หรือยาอมเม็ดแข็ง (Iozenge) เพื่อช่วยเลิกบุหรี่ และบรรจุแคปซูลเพื่อลดความอ้วน ทำให้ลิ้นชา ลดความอยากอาหารและบุหรี่ แต่อาจเกิดอาการปากแห้ง คอแห้ง รวมทั้งควรระวังการใช้ในผู้ป่วยโรคหัวใจ และโรคไต เนื่องจากมีโพแทสเซียมสูง (นริศรา, 2541; คณะอนุกรรมการจัดทำตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย, 2555; อรลักษณา, 2553; Husian *et al*., 1992; Gupta *et al.*, 2003a; Gupta *et al.*, 2003b; Kuo *et al.*, 2003; Wongwiwatthananukit *et al*., 2009; Sangeetha and Venkatarathinakumar, 2011; Leelarungrayub *et al*., 2010; Dhanalakshmi *et al.*, 2013)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องจากโปร่งฟ้า และหญ้าดอกขาว มีสรรพคุณสามารถรักษาโรคได้หลายชนิด เพื่อความปลอดภัย และความมั่นใจของผู้ใช้ การศึกษาถึงความเป็นพิษของสารสกัดจึงเป็นสิ่งจำเป็น การนำเซลล์เพาะเลี้ยงมาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษนั้นถือเป็นวิธีตรวจสอบที่เหมาะสมวิธีหนึ่ง เนื่องจากใช้เวลาในการทดสอบสั้น ให้ผลรวดเร็ว และเป็นที่ยอมรับขององค์กรควบคุมสารพิษระหว่างประเทศ (สมภพ, 2543) การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) โดยศึกษาผลของสารสกัดต่อการตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และเซลล์ TK6 cell line ซึ่งเป็นเซลล์ลิมโฟบลาสต์มนุษย์ที่นิยมใช้ทดสอบความเสียหายต่อดีเอ็นเอ (genotoxicity) เนื่องจากมีสารพันธุกรรมคงที่ โดยเซลล์ทั้งสองชนิดเป็นเซลล์แขวนลอย (suspension cell) และศึกษาความเสียหายของดีเอ็นเอจากการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ TK6 ซึ่งการนำโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวมาใช้ร่วมกัน อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการลดผลข้างเคียงจากการใช้หญ้าดอกขาวเพียงอย่างเดียว เพื่อให้เกิดความมั่นใจในความปลอดภัย และได้ประโยชน์จากการบริโภคผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้งสองชนิดนี้ในแบบสมุนไพรเดี่ยว หรือในรูปสารผสมต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v)

2. เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นต่างกันต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6

3. เพื่อตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6 เมื่อได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นต่างกัน

4. เพื่อตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอจากการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ TK6 เมื่อได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นต่างกัน

5. เพื่อตรวจสอบการเสริมฤทธิ์หรือการลดฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ และความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6 ของสารผสม อัตราส่วน 1:1 (v/v)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. โปร่งฟ้า

1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

โปร่งฟ้า *Clausena heptaphylla* Wright&Arn จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ในเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ บังคลาเทศ อินเดีย เนปาล กัมพูชา ลาว พม่า ไทย เวียดนาม อินโดนีเซีย และมาเลเซีย ตัวอย่างพืชในวงศ์นี้ ได้แก่ มะตูม *Aegle marmelos* (Linn.) Corr. มะนาว *Citrus aurantifolia* (Cristm.) Swingle มะกรูด *C. hystrix* DC. แก้ว *Murraya paniculata* Jack ซึ่งพืชในวงศ์นี้มีลักษณะสำคัญ คือ มีต่อมน้ำมันหอมระเหยในทุกส่วนของพืช (วงศ์สถิต, 2548; Sohrab *et al.*, 2000)

1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

โปร่งฟ้าเป็นไม้พุ่ม ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ (odd-pinnate) มีความยาวของช่อใบประมาณ 30-50 เซนติเมตร ใบย่อยมีจำนวน 7-11 ใบ เป็นรูปทรงรีแบบยาว หรือเรียวแหลมคล้ายหลาว (lanceolate) ฐานใบแหลม (acute) ปลายใบแหลมเรียวเล็กเข้าหากัน (acuminate) ขอบใบหยักมนถี่ (crenulate) ไม่เด่นชัด ใบย่อยมีขนาดกว้าง 2.5-7 เซนติเมตร ยาว 4.5-16 เซนติเมตร ผิวใบเรียบเกลี้ยง มีจุดน้ำมันกระจาย และมีจุดโปร่งใส (punctate) สามารถส่องทะลุไปอีกด้านได้ เส้นใบเรียงตัวเป็นร่างแห มีเส้นใบใหญ่เป็นเส้นกลางใบเรียวยาว และมีเส้นใบเล็กแยกแขนงออกไปทางด้านข้าง 6-7 คู่ (pinnately netted venation) อยู่ใต้แผ่นใบ ก้านใบรูปทรงกระบอก มีขนสั้นนุ่ม (pubescence) และมีต่อม (gland) ดอกมีสีขาวแกมเหลือง เป็นช่อดอกแบบแยกแขนง (panicle) เกิดที่ปลายยอด มีการเรียงตัวแบบสลับ ก้านดอกมีขนสั้นนุ่มเล็กน้อย กลีบเลี้ยงมี 4 กลีบ เป็นรูปสามเหลี่ยม ยาว 1 มิลลิเมตร มีขนครุย (ciliate) ที่บริเวณขอบ กลีบดอกมี 4 กลีบเป็นรูปไข่กลับ (obovate) ยาวเป็น 2 เท่าของกลีบเลี้ยง ผิวเกลี้ยงแต่มีปุ่มขนาดเล็ก (papillose) เกสรเพศผู้ (stamen) มี 10 อัน สั้นกว่ากลีบดอกเล็กน้อย ก้านชูเกสรเพศผู้ (filament) คล้ายเส้นด้ายที่มีฐานขยายรองรับอับเรณู (anther) ที่ติดอยู่บริเวณกึ่งกลางด้านบน รูปร่างคล้ายสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน รังไข่ (ovary) มี 4 ห้อง (locule) ในแต่ละห้องมีออวุล 2 อันซ้อนกัน (superimposed ovule) ผลเป็นรูปไข่ มีสีแดงอมขาว หรือสีเหลืองอ่อน ขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร มีต่อมน้ำมันมากมาย ภายในมีเมล็ด 1-2 เมล็ด (Swingle, 1967)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 สรรพคุณ และการใช้ประโยชน์ทางแพทย์พื้นบ้าน

โปร่งฟ้าถูกนำมาใช้ทางการแพทย์พื้นบ้านในการรักษาโรคต่างๆ มาเป็นเวลานาน แต่ละส่วนมีสรรพคุณ และการใช้ที่แตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ ดังนี้

ตารางที่ 1 สรรพคุณ และการใช้ประโยชน์ทางแพทย์พื้นบ้านของโปร่งฟ้า

ส่วนของพืช	สรรพคุณ
เปลือก	ในประเทศบังคลาเทศ เปลือกโปร่งฟ้าใช้รักษาบาดแผล และอาการเคล็ดขัดยอก น้ำมันใช้พอกรักษาผิวหนังอักเสบ (Sohrab *et al.*, 2001)
ใบ	ในประเทศไทย มีการนำโปร่งฟ้า หรือต้นแฮ็คมาใช้ในการอดบุหรี่ โดยนำใบมาเคี้ยวก่อนสูบบุหรี่ ทำให้รสชาติของบุหรี่เปลี่ยนไปไม่เหมือนเดิม รวมทั้งใบมีรสหวานคล้ายลูกอมชนิดหนึ่งจึงทำให้ชุ่มคอ (ณุฉัตรา, 2549) ในประเทศอินเดีย น้ำต้มใบโปร่งฟ้าใช้เป็นยาลดไข้ในผู้ป่วยโรคดีซ่าน เนื่องจากมีสาร methyl chavicol ซึ่งมีคุณสมบัติในการลดไข้ (hypothermic activity) และกระตุ้นการซ่อมแซมตับ (Purkayastha and Nath, 2006) ในประเทศบังคลาเทศ น้ำต้มใบโปร่งฟ้า หรือเคี้ยวใบสด ใช้รักษาอาการต่างๆ เช่น ปวดฟัน ทาน้ำคั้นจากใบบริเวณที่ปวดวันละ 3 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน หรือเคี้ยวใบสดช่วยป้องกันฟันผุ (Rahmatullah *et al.*, 2009) นอกจากนี้ใช้รักษาอาการอาหารไม่ย่อย เนื่องจากระบบย่อยอาหารมีปัญหา และกำจัดกลิ่นปาก โดยเคี้ยวใบโปร่งฟ้าร่วมกับใบพลู (*Piper betle*) วันละ 2-3 ครั้ง และยังลดอาการเสพติดนิโคตินอีกด้วย (Hossan *et al.*, 2009; Sarker, *et al.*, 2012; Mannaf *et al.*, 2013)
ดอก	ในประเทศอินเดีย สารสกัดจากดอกใช้รักษาอาการตาอักเสบ (Sohrab *et al.*, 2001)
ผล	ในประเทศบังคลาเทศ ผลโปร่งฟ้าใช้รักษาอาการปวดศีรษะ โดยการนำผลมาคั้นน้ำ แล้วทาบริเวณหน้าผาก (Rahman *et al.*, 2007) ในประเทศอินเดีย นำผลมาคั้นน้ำ ใช้บรรเทาอาการไอ รักษาอาการหอบหืด โดยกินร่วมกับเกลือสินเธาว์ (Shil and Choudhury, 2009) ใช้รักษาอาการเกี่ยวกับไต และช่วยขับนิ่วในไต (kidney stone) (Nath and Choudhury, 2010)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากโปร่งฟ้า

สารสกัดจากโปร่งฟ้าประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม carbazole alkaloid, coumarin, limonoid, anthraquinone และ volatile oil ซึ่งสารสำคัญแต่ละชนิดพบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 สารเคมีที่พบในสารสกัดโปร่งฟ้าด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
benzene	murrayanine, dentatin	ราก	soxhlet extraction	Bhattacharyya and Chakraborty, 1973
	clausenalene	เปลือกลำต้น	soxhlet extraction	Bhattacharyya *et al.*, 1993
dichloromethane	terpenoid, coumarin	ใบ	soxhlet extraction	Sohrab *et al.*, 2001
ethanol	heptazolicine	ราก	soxhlet extraction	Bhattacharyya *et al.*, 1984
	clausenal	ใบ	soxhlet extraction	Chakraborty *et al.*, 1995
	flavonoid, alkaloid, saponin, steroid	เปลือกลำต้น	maceration	Fakruddin *et al.*, 2012
haxane	heptaphylline	ราก	soxhlet extraction	Joshi *et al.*, 1967b
	heptaphylline, girinimbine, clausenin, clausenidin	ราก	soxhlet extraction	Joshi *et al.*, 1972
methanol	lunamarin-A, lunamarin-B	ใบ	percolation	Sohrab *et al.*, 1999
	clausmarin-A	ใบ	percolation	Sohrab *et al.*, 2000
	alkaloid, coumarin	ใบ	soxhlet extraction	Sohrab *et al.*, 2001
	isomeranzin	ใบ	soxhlet extraction	Huy *et al.*, 2004
	clausenolide-1-methyl ether	เปลือกลำต้น	maceration	Begum *et al.*, 2011

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
petroleum ether	3-methylcarbazole	ราก	soxhlet extraction	Roy *et al.*, 1974
	murrayacine	ราก	soxhlet extraction	Ray and Chakraborty, 1976
	2-methylanthraquinone	เปลือกลำต้น	soxhlet extraction	Chakraborty *et al.*, 1978
	terpenoid, coumarin	ใบ	soxhlet extraction	Sohrab *et al.*, 2001
	lunamarin-C	ใบ	soxhlet extraction	Sohrab *et al.*, 2002
น้ำ	anethole, anisaldehyde, estragole, anisyl ketone, α-elemene	ใบ	hydrodistillation	Lockwood, 1984
	methyl chavicol, anethole	ใบ	hydrodistillation	Nath and Bordoloi, 1991
	methyl chavicol, (E)-anethole	ใบ, ผล	hydrodistillation	Nath and Bordoloi, 1992
	(E)-anethole	ใบ, ผล	hydrodistillation	Nath *et al.*, 1996

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
น้ำ (ต่อ)	(E)-anethole, methyl chavicol, (Z)-anethole, anisyl ketone, β-ocimene, farnesol, eugenol, *p*-cymene, sesquiterpene alcohol, dehydro-aromadendrene, guaiol	ใบ	hydrodistillation	Ahmad *et al.*, 2008
	3-carene, α-phellandrene, L-4-terpineol, β-pinene, α-pinene, *m*-cymene, terpinene, germacrene D, isothujol, caryophyllene, γ-elemene, α-terpinene	ใบ	hydrodistillation	Chowdhury *et al.*, 2008

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
ไม่กล่าวถึง	clausenin, clausenidin	ราก	ไม่กล่าวถึง	Joshi *et al.*, 1967a
	heptazolidine	ไม่กล่าวถึง	ไม่กล่าวถึง	Chakraborty *et al.*, 1974
	clausenin, poncitrin, clausenidin	ราก, ลำต้น	ไม่กล่าวถึง	Gray and Waterman, 1978
	clausenolide	ไม่กล่าวถึง	ไม่กล่าวถึง	Chakraborty et al., 1979
	clausenolide	ไม่กล่าวถึง	ไม่กล่าวถึง	Das and Mahato, 1983
	clausenapin	ใบ	ไม่กล่าวถึง	Bhattacharyya and Chowdury, 1984

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.5 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากโปร่งฟ้า

1.5.1 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา

Clausenal เป็นสารกลุ่ม carbazole alkaloid พบในสารสกัดใบโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล โดยวิธี percolation มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ รวมทั้งเชื้อรา โดยมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ต่ำสุด เท่ากับ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี agar dilution method บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารไม่เกิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Chakraborty *et al.*, 1995) ต่อมา Sohrab *et al.* (2001) เปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดใบโปร่งฟ้าด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction กับสารสกัดใบด้วยเมทานอล และสาร coumarin บริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดด้วยเมทานอล โดยวิธี percolation ได้แก่ clausmarin A, lunamarin A และ lunamarin B ด้วยวิธี disc diffusion method ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเท่ากับ 100-500 ไมโครกรัมต่อ disc และความเข้มข้นของ coumarin บริสุทธิ์ เท่ากับ 50-200 ไมโครกรัมต่อ disc พบว่าสารสกัดหยาบทั้งหมดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เลือกมาทดสอบ โดยสารสกัดหยาบด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ และเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดีที่สุดที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อ disc แต่ clausmarin A, lunamarin A และ lunamarin B ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อ disc มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* และ *Salmonella paratyphi A* โดยเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย กว้าง 9-14 มิลลิเมตร แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. typhi*

เมื่อนำสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ (maceration) มาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก 6 ชนิด และแกรมลบ 8 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion method ใช้สารสกัดความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อ disc เปรียบเทียบกับสาร antibiotic kanamycin ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อ disc บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เลือกมาทดสอบ ยกเว้นแบคทีเรียแกรมลบ *Shigella sonnei* โดยมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Enterococcus faecalis* ดีที่สุด แต่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Vibrio cholerae* น้อยที่สุด และจากการวัดบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เท่ากับ 6.5-9.0 มิลลิเมตร และแบคทีเรียแกรมลบ เท่ากับ 3.0-4.5 มิลลิเมตร ส่วน kanamycin ในแบคทีเรียแกรมบวก เท่ากับ 15-20

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มิลลิเมตร และแกรมลบ เท่ากับ 14-21 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้า มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกดีกว่าแกรมลบ และจากการตรวจสอบค่า MIC ของสารสกัดต่อแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ด้วยวิธี macrodilution method ที่ความเข้มข้น 250-5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสาร antibiotic doxycycline ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่า MIC ของสารสกัด เท่ากับ 2,000-3,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ doxycycline เท่ากับ 4.5-6.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นค่า MIC ต่ำที่สุด มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบ *Proteus vulgaris* และสารสกัดที่ความเข้มข้น 3,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นค่า MIC ที่สูงกว่า มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Klebsiella pheumoniae*, *Salmonella typhi* และ *S. sonnei* นอกจากนั้นเมื่อนำสารสกัดมาตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา 5 ชนิด ด้วยวิธี poisoned food technique ที่ความเข้มข้น 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อ plate เปรียบเทียบกับ fluconazole ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อ plate บ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อ plate มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Rhizopus oryxae*, *Aspergillus niger* และ *A. ochraceus* โดยสารสกัดที่ความเข้มข้น 4 และ 6 มิลลิกรัมต่อ plate มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. ochraceus* สูงสุด เท่ากับ 39.98 และ 43.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ fluconazole เท่ากับ 41 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา (Fakruddin *et al.*, 2012)

1.5.2 ฤทธิ์ยับยั้งไวรัส

Isomeranzin เป็นสารกลุ่ม coumarin พบในสารสกัดใบโปร่งฟ้าด้วยเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อ Herpes simplex virus (HSV) type 1 และ 2 ด้วยวิธี cell protection assay โดยนำ isomeranzin มาละลายในตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO) เอทิลอะซิเตต เอทานอล และโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 0.05-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายลงใน Vero cell ที่ได้รับไวรัส HSV-1 strain E377 และ HSV-2 strain MS บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำเซลล์มาย้อมด้วย crystal violet 0.05 เปอร์เซ็นต์ในเมทานอล 35 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบ cytopathic effect จากไวรัส และตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัด พบว่า isomeranzin ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน DMSO 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อ HSV-1 ดีที่สุด และที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อ HSV-2 ดีที่สุด โดยสารละลายทั้ง 2 ชนิด ยับยั้งการติดเชื้อภายในเซลล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และมีความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นพิษต่อเซลล์ 30-40 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น isomeranzin ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทิลอะซิเตต 5 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทิลอะซิเตต 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ยับยั้งการติดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดภายในเซลล์ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยมาก จนเกือบไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Huy *et al.*, 2004)

พืชในสกุล *Clausena* อื่นๆ มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสได้เช่นกัน จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส HIV-1 ของสารประกอบที่แยกได้จากสารสกัดเหง้า และราก *Clausena excavata* ด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ตรวจสอบฤทธิ์ด้วยวิธี syncytium assay ในเซลล์ลิมโฟบลาสต์ 1A2 cell line พบว่า clausenolide-1-ethyl ether ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม limonoid มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส HIV-1 โดยมีค่า effective concentration ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (EC_{50}) เท่ากับ 34.4 ไมโครโมลต่อลิตร (Sunthitikawinsakul *et al.*, 2003) และ clausenidin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม pyranocoumarin มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อไวรัส HIV-1 เช่นเดียวกัน มีค่า EC_{50} เท่ากับ 5.3 ไมโครโมลต่อลิตร (Kongkathip *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่า clausenidin และ nordentatin ที่แยกได้จากสารสกัดราก *C. excavata* ด้วยอะซิโตน โดยวิธี soxhlet extraction มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัส Hepatitis B virus (HBV) โดยสารประกอบทั้ง 2 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) ในเซลล์ HepA2 (human hepatoma) cell มีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.88 และ 6.38 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ (Su *et al.*, 2009)

1.5.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ซึ่งสารสกัดมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลทั้งหมด เท่ากับ 13.42 มิลลิกรัมต่อกรัม Gallic acid equivalent ตรวจสอบปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลทั้งหมด ด้วยวิธี Follin-Ciocalteu method และใช้ gallic acid (GA) เป็นสารละลายมาตรฐาน นอกจากนั้นยังพบสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 68.90 มิลลิกรัมต่อกรัม Quercetin equivalent ตรวจสอบปริมาณด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric assay และใช้ quercetin เป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH free radical scavenging assay ที่ความเข้มข้น 10-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ ascorbic acid ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน และมีค่า inhibition concentration ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) เท่ากับ 3.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นจากการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัด (Reducing power) ด้วยวิธี potassium ferricyanide reduction method ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดมีความสามารถในการรีดิวซ์อยู่ในระดับปานกลาง จากการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้าด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Fakruddin *et al.*, 2012)

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดราก *C. suffruticosa* ด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ด้วยวิธี DPPH free radical scavenging assay ที่ความเข้มข้น 10-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ ascorbic acid ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่าสารสกัดราก *C. suffruticosa* มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เหมือนกับสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ ascorbic acid เท่ากับ 5.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Rahman *et al.*, 2011) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Songsiang *et al.* (2012) ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดราก *C. harmandiana* ด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล โดยวิธีการแช่ และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ 12 ชนิด ด้วยวิธีการทดสอบเดียวกัน แต่ใช้วิตามินอีเป็นสารละลายมาตรฐาน พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล รวมทั้งสารบริสุทธิ์ที่แยกได้บางชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.67, 0.27 และ 0.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เทียบกับวิตามินอี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 21.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นทำการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของสารสกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ ด้วยวิธี thiobarbituric acid method พบว่าสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้บางชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ด้วยเช่นกัน โดยสารสกัดด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.47, 0.95 และ 0.82 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสาร heptaphylline และ dentatin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม carbazole alkaloid และ coumarin ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้เช่นกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.1 และ 78.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เทียบกับวิตามินอี เท่ากับ 59.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

1.5.4 ความเป็นพิษของสารสกัด

จากการตรวจสอบสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่กับไรน้ำเค็ม ด้วยวิธี Brine-shrimp lethality assay ที่ความเข้มข้น 25, 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นทุกความเข้มข้นที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูงขึ้นของสารสกัด และมีค่า lethal concentration ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) เท่ากับ 144.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Fakruddin *et al.*, 2012) เมื่อเปรียบเทียบกับความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มของน้ำมันที่สกัดได้จากใบ *C. suffruticosa* โดยวิธี hydrodistillation และสารสกัดรากด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ซึ่งสารสกัดทั้ง 2 ชนิด มีค่า LC_{50} เท่ากับ 41.16 และ 41.16±1.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Rahman *et al.*, 2012, 2013) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้าด้วยเอทานอลมีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มน้อยกว่าสารสกัดจาก *C. suffruticosa* และสารสกัดทั้ง 3 ชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากค่า LC_{50} มากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่ามาตรฐาน (recommended cut-off point for detecting cytotoxic activity) (Lagarto *et al.*, 2001) และจากการการตรวจสอบ *in vitro* thrombolytic activity ของสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ด้วยวิธี clot lysis assay โดยใช้สารสกัด ความเข้มข้น 30,000 international unit (IU) เปรียบเทียบกับ streptokinase ความเข้มข้น 30,000 IU เป็น positive control เติมสารทดสอบลงใน clot ที่ได้จากเลือดมนุษย์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาตรวจสอบ clot lysis พบว่าสารสกัดเกิด clot lysis เท่ากับ 45.38 เปอร์เซ็นต์ clot lysis ส่วน streptokinase เท่ากับ 65.78 เปอร์เซ็นต์ clot lysis และสารสกัดร่วมกับ streptokinase เท่ากับ 75.23 เปอร์เซ็นต์ clot lysis แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ มีฤทธิ์ช่วยสลายลิ่มเลือดได้ (Fakruddin *et al.*, 2012) เช่นเดียวกับสารสกัดราก *C. suffruticosa* ด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ช่วยสลายลิ่มเลือดเช่นเดียวกัน โดยสารสกัดเกิด clot lysis เท่ากับ 48.90±2.44 เปอร์เซ็นต์ clot lysis เปรียบเทียบกับ streptokinase ความเข้มข้น 30,000 IU เท่ากับ 75±3.04 เปอร์เซ็นต์ clot lysis (Rahman *et al.*, 2013)

จากการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของพืชในสกุล *Clausena* อื่นๆ พบว่าสารสกัดเปลือกลำต้น *C. lansium* ด้วยเฮกเซน โดยวิธีการแช่ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HGF (human gingival fibroblast) cell line เมื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด ที่ความเข้มข้น 5-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด มีค่า curative dose ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (CD_{50}) เท่ากับ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Kuvatanasuchati *et al.*, 2011) นอกจากนั้นยังพบว่าพืชในสกุล *Clausena* ชนิดอื่นๆ ก็มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเช่นเดียวกัน จากการศึกษาของ Muhd Sharif *et al.* (2011) ตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารสกัดใบ เปลือกลำต้น และราก *C. excavata* ด้วยเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล โดยวิธีการแช่ และสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบ ในเซลล์มะเร็ง HL-60 (human promyelocytic leukemia) MCF-7 (human breast cancer) HT-29 (human colon cancer) และ HeLa (human cervical cancer) cancer cell line พบว่าสารสกัดรากด้วยเฮกเซน และคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง HL-60, MCF-7 และ HeLa cancer cell line

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4-7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร dentatin ซึ่งเป็นสารกลุ่ม coumarin มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่นำมาทดสอบดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สาร clausenolide-1-methyl ether ซึ่งเป็นสารกลุ่ม limonoid มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง HL-60 และ MCF-7 cancer cell line ปานกลาง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 18.5 และ 21.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง HT-29 และ HeLa cancer cell line น้อยมาก เช่นเดียวกับสาร heptaphylline ซึ่งเป็นสารกลุ่ม carbazole alkaloid แยกได้จากสารสกัด *C. harmandiana* พบว่าสาร heptaphylline มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง human small cell lung cancer (NCI-H187) และ human epidermoid carcinoma of oral cavity (KB) cancer cell line โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.32 และ 1.61 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ เทียบกับ Ellipticine ซึ่งเป็น anticancer agent มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.77 และ 1.78 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ Vero cell (African green monkey kidney) พบว่าสาร heptaphylline มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero cell น้อยมาก มีค่า IC_{50} เท่ากับ 92.47 ไมโครโมลต่อลิตร ในขณะที่ Ellipticine มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.82 ไมโครโมลต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าสาร heptaphylline มีประสิทธิภาพยับยั้งเซลล์มะเร็งที่นำมาทดสอบได้ดีกว่า Ellipticine รวมทั้งมีความปลอดภัยต่อเซลล์ปกติที่นำมาทดสอบมากกว่าอีกด้วย (Songsinag *et al.*, 2011; Thongthoom *et al.*, 2011)

2. หญ้าดอกขาว

2.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

หญ้าดอกขาว *Vernonia cinerea* (Linn.) Less. มีชื่อพ้อง คือ *Conyza cinerea* Less. หรือ *Cyanthillium cinereum* Less. H. Rob. จัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae เป็นพืชสมุนไพรที่พบในเขตร้อนและกึ่งร้อนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ (คณะอนุกรรมการจัดทำตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย, 2555) ชื่อสามัญ คือ purple fleabane (วิทย์, 2531) little ironweed, ash-coloured ironweed หรือ Sahadevi (Rastogi and Mehrotra, 1991) ในประเทศไทยพบได้ทุกภาค และมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันตามแต่ละสถานที่ ได้แก่ หญ้าดอกขาว หรือ หมอน้อย (กรุงเทพฯ) หญ้าละออง หรือ เสือสามขา (ตราด) หญ้าสามวัน (เชียงใหม่) ก้านธูป (จันทบุรี) ถั่วแฮะดิน ฝรั่งโคก (เลย) หนาดหนา (ชัยภูมิ) ซางหางฉ่าว (จีนกลาง) เซียหั่งเช่า (แต้จิ๋ว) เซียวซัวเฮา (จีน) เป็นต้น (วิทย์, 2531; วงศ์สถิตย์ และคณะ, 2539; วุฒิ, 2540; คณะอนุกรรมการจัดทำตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย, 2555)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

หญ้าดอกขาวเป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็ก มีอายุ 1 ปี ลำต้นตั้งตรงแตกกิ่งก้านเล็กน้อย สูง 15-80 เซนติเมตร กิ่งและก้านมีขนสีเทาปกคลุม มีลายเส้นนูนแตกแขนงเล็กน้อย ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ ใบรูปไข่หรือรูปไข่แกมรูปหอก โคนและปลายใบแหลม ขอบเรียบ เป็นคลื่นจักฟันเลื่อย หรือหยักซี่ฟัน ด้านบนมีขนประปราย ด้านล่างมีขนหนาแน่น หลังใบมีเส้นใบชัดเจน เส้นแขนงใบข้างละ 4-7 เส้น ใบมีสีเขียวเข้ม ที่บริเวณโคนต้นขนาดใหญ่กว่าที่ปลายยอด โดยใบที่โคนต้น กว้าง 1.5-3.5 เซนติเมตร ยาว 3-8.5 เซนติเมตร ใบที่บริเวณปลายยอด กว้าง 0.3-1.5 เซนติเมตร ยาว 1-7 เซนติเมตร ก้านใบยาว 1-2.5 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อกระจุกแน่นที่ปลายยอดหรือตามซอกใบ เป็นช่อแยกแขนงคล้ายช่อเชิงหลั่น กว้าง 5-15 เซนติเมตร ยาว 5-35 เซนติเมตร ใบประดับรูปใบหอก มีขนปกคลุม ขนาดกว้าง 0.2-1 เซนติเมตร ยาว 2-4 เซนติเมตร ดอกย่อยมีขนาดเล็ก ประมาณ 20 ดอก ลักษณะเป็นหลอด กว้าง 0.3 และยาว 0.7 เซนติเมตร เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ไม่มีก้านดอก กลีบเลี้ยงเรียวเล็กติดทน เป็นขนสีขาว มีจำนวนมาก ยาว 0.05-0.6 เซนติเมตร กลีบดอกสีม่วง โคนเชื่อมติดกันเป็นหลอด ยาว 0.3-0.5 เซนติเมตร ปลายแยกเป็น 5 แฉก รูปสามเหลี่ยม ยาว 0.1-0.25 เซนติเมตร เกสรเพศผู้ 5 อัน ติดในหลอดกลีบดอก ก้านชูอับเรณู ยาวประมาณ 0.05 เซนติเมตร อับเรณูรูปหัวลูกศร รังไข่อยู่ใต้วงกลีบ มี 1 ช่อง มีออวุล 1 อัน ก้านยอดเกสรเพศเมียเรียว ยาว 0.25-0.6 เซนติเมตร มีสีม่วง ยอดเกสรเพศเมียมี 2 พู ดอกสีม่วงเข้มแล้วค่อยๆจางลง เมื่อดอกโรยแล้วก็จะติดผล ผลแห้งมีเมล็ดเดี่ยว รูปทรงกระบอกแคบ สีน้ำตาลเข้ม ยาว 0.15-0.2 เซนติเมตร หนาน้อยกว่า 0.05 เซนติเมตร มีเส้นสัน ด้านบนมีขนสีขาวปกคลุม ผลเป็นพู่แตกบาน ช่วยให้เมล็ดลอยตามลม (วิทย์, 2531; นันทวัน และ อรนุช, 2539; วิทยา และคณะ, 2554; คณะอนุกรรมการจัดทำตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย, 2555)

2.3 สรรพคุณ และการใช้ประโยชน์ทางแพทย์พื้นบ้าน

หญ้าดอกขาวเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ทางการแพทย์พื้นบ้าน เพื่อรักษาโรคต่างๆ มาอย่างยาวนาน โดยหญ้าดอกขาวมีสรรพคุณเป็นยาเย็น แต่ละส่วนมีสรรพคุณที่แตกต่างกันออกไป ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 สรรพคุณ และการใช้ประโยชน์ทางแพทย์พื้นบ้านของหญ้าดอกขาว

ส่วนของพืช	สรรพคุณ
ราก	แก้บวมน้ำ ขับพยาธิ ขับปัสสาวะ แก้ซางตะกั่ว แก้ท้องผูก แก้ไอเรื้อรัง ช่วยเร่งคลอด และช่วยขับรกหลังคลอด
ลำต้น	แก้ปวดท้อง ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้นมคัด ลดอาการบวม ช่วยดูดหนอง
ใบ	ช่วยสมานแผลเมื่อนำมาพอก ช่วยถอนพิษ แก้อักเสบ ลดอาการบวม นำมาหยอดตาช่วยรักษาตาแดง ตาแฉะ ตาฟาง แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ รักษาสะเก็ดเงิน แก้กลากเกลื้อน แก้บิด รักษาหลอดลมอักเสบ รักษาโรคหืด แก้ไข้ แก้ปวดศีรษะ แก้ระดูขาว รักษามาลาเรีย แก้โรคเท้าช้าง
ดอก	แก้เยื่อบุตาอักเสบ แก้ไข้ รักษาโรครูมาตอยด์
เมล็ด	ขับพยาธิ บำรุงธาตุ แก้ปวดท้อง ท้องอืดท้องเฟ้อ แก้ปัสสาวะขัด แก้ไอ รักษาโรคผิวหนังด่างขาว และโรคผิวหนังเรื้อรัง ช่วยถอนพิษ กำจัดเหา
ส่วนเหนือดิน	ลดความดันโลหิต รักษาข้ออักเสบ รักษาตับอักเสบ รักษาโรคหอบ แก้ไข้ รักษาปอดอักเสบ
ทั้งต้น	ลดไข้ แก้ปวดศีรษะ ช่วยลดไข้เนื่องจากหวัดแดด แก้ไอ ลดความดันโลหิต รักษาโรคหอบ รักษาแผลบวมอักเสบ มีหนอง ช่วยให้คลอดง่าย มีฤทธิ์ต่อปอดและตับ แก้ดีซ่าน แก้ตับอักเสบเฉียบพลัน แก้พิษงู ขับพยาธิ รักษาแผลสด แผลเรื้อรัง ผิวหนังพุพอง ห้ามเลือด แก้อาการปัสสาวะรดที่นอน แก้ริดสีดวง แก้ปวดท้อง ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้ท้องเสีย บำรุงกำลัง ทำให้ไม่อยากบุหรี่
ไม่ระบุ	รักษาโรคหย่อนสมรรถภาพทางเพศในผู้ชาย แก้ปวดท้อง ท้องอืดท้องเฟ้อ

ที่มา: วิทย์ (2531); นันทวัน และ อรนุช (2539); วงศ์สถิต และคณะ (2539); วุฒิ (2540); นริศรา (2541); ภาควิชาเภสัชศาสตร์ (2543); วิทยา และคณะ (2554); Husian *et al.* (1992)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.4 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว

สารสกัดจากหญ้าดอกขาวประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่ม steroid, triterpenoid, sesquiterpene lactone, flavonoid, saponin และ tannin ซึ่งสารสำคัญแต่ละชนิดพบในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 สารเคมีที่พบในสารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
acetone	flavonoid	ใบ	soxhlet extraction	Nishadh *et al.*, 2013
benzene	flavonoid, tannin, terpenoid	ไม่กล่าวถึง	soxhlet extraction	Gupta *et al.*, 2003a
	steroid, sterol	ใบ	soxhlet extraction	Nishadh *et al.*, 2013
chloroform	flavonoid, tannin	ไม่กล่าวถึง	soxhlet extraction	Gupta *et al.*, 2003a
	sterol, terpenoid, flavonoid, saponin, mucilage, tannin	เหนือดิน	soxhlet extraction	Sangeetha and Venkatarathinakumar, 2011
	flavonoid, triterpene, glycoside	ใบ	soxhlet extraction	Nishadh *et al.*, 2013
ethanol	vernolide-A, vernolide-B	ลำต้น	soxhlet extraction	Kuo *et al.*, 2003
	sterol, terpenoid, flavonoid, saponin, mucilage, tannin	เหนือดิน	soxhlet extraction	Sangeetha and Venkatarathinakumar, 2011
	vernolide-A	ทั้งต้น	maceration	Pratheeshkumar and Kuttan, 2012
	flavonoid, triterpene, glycoside	ใบ	soxhlet extraction	Nishadh *et al.*, 2013

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
ethanol (ต่อ)	alkaloid, terpene, saponin, anthraquinone, isoamyl acetate, 1,1-diethoxy-3-methylbutane, caryophyllene, caryophyllene oxide, 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol, hexadecanoic acid, phytol, linolenic acid, octadecanoic acid, bata-Amyrin	ใบ	soxhlet extraction	Ilondu, 2013
ethyl acetate	alkaloid, carbohydrate, glycoside, saponin, protein, amino acid, phenolic compound	ใบ	maceration	Dhanalakshmi *et al.*, 2013
	flavonoid, saponin, phenolic constituent	ใบ	soxhlet extraction	Nishadh *et al.*, 2013

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
hexane	8α-hydroxyhirsutinolide, 8α-hydroxyl-1-*O*-methylhirsutinolide, 8α-tigloyloxyhirsutinolide, 8α-tigloyloxyhirsutinolide-13-*O*-acetate, 8α-(2-methylacryloyloxy)-hirsutinolide-13-*O*-acetate, 8α-(2-methylacryloy-loxy)-1α-methoxyhirsutinolide-13-*O*-acetate, hirsutinolide-13-*O*-acetate, vernolide-A, vernolide-B	ดอก	soxhlet extraction	Youn *et al.*, 2012
methanol	flavonoid, tannin	ไม่กล่าวถึง	soxhlet extraction	Gupta *et al.*, 2003a
	steroid, triterpenoid, flavonoid, tannin	ทั้งต้น	soxhlet extraction	Mazumder *et al.*, 2003
	lupeol	ทั้งต้น	soxhlet extraction	Singh *et al.*, 2006

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
methanol (ต่อ)	β-sitosterol, lupeol	ทั้งต้น	maceration	Shah *et al.*, 2010
	alkaloid, phenol, tannin, saponin, flavonoid	ใบและดอก	soxhlet extraction	Danish Rizvi *et al.*, 2011
	rutin, quercetin, caffeic acid, ferulic acid, gallic acid, sesquiterpene lactone	ใบ	soxhlet extraction	Rajamurugan *et al.*, 2011
	n-hexadecanoic acid, 1,2 benzenedicarboxylic acid, disooctyl ester, squalence, caryophyllene oxide, guaiol, 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol, decanoic acid, ethyl ester, 9,12-octadecanoic acid (z-z), octadecanoic acid	ทั้งต้น	maceration	Abirami and Rajendran, 2012

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
methanol (ต่อ)	lupeol, 12-oleanen-3-ol-3β-acetate, stigmasterol, β-sitosterol, steroid, glycoside, triterpenoid, ester	เปลือกลำต้น และใบ	maceration	Haque *et al.*, 2012a
	flavonoid, tannin, saponin, triterpene, vitamin C, glycoside, phenolic constituent	ใบ	soxhlet extraction	Nishadh *et al.*, 2013

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
methanol (ต่อ)	8α-(2′Z-tigloyloxy)-hirsutinolide, 8α-(2′Z-tigloyloxy)-hirsutinolide-13-*O*-acetate, 8α-(4-hydroxytigloyloxy)-hirsutinolide, 8α-hydroxy-13-*O*-tigloyl-hirsutinolide, 8α-(2-methylacryloyloxy)-hirsutinolide, 8α-tigloyloxyhirsutinolide, 8α-tigloyloxyhirsutinolide-13-*O*-acetate, 8α-(2-methylacryloyloxy)-hirsutinolide-13-*O*-acetate, vernolide-B, 8α-hydroxyhirsutinolide, vernolide-A, loliolide, isololiolide, (3R)-3-hydroxy-ionone, apigenine, (9Z,12S,13S)-dihydroxy-9-octadecanoic acid	ใบและลำต้น	maceration	Youn *et al.*, 2014

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
methanol:diethyl ether: petroleum ether	stilpnotomentolide-8-*O*-tiglate, 8α-[hydroxymethacryloyloxy]-hirsutindide-13-*O*-acetate, hirsutinolide, glaucolide E, hydroxymethacrylate, bisepoxide	เหนือดิน	maceration	Jakupovic *et al.*, 1986
petroleum ether	stigmast-5,17(20)-dien-3β-ol, 26-methylheptacosanoic acid, stigmasterol, sitosterol	ราก	soxhlet extraction	Misra *et al.*, 1984a
	δ-amyrin acetate, α-amyrin acetate, 3β-acetoxyurs-13(18)-ene, β-amyrin acetate, β-amyrin, α-amyrin	ราก	soxhlet extraction	Misra *et al.*, 1984b
	flavonoid, tannin, terpenoid	ไม่กล่าวถึง	soxhlet extraction	Gupta *et al.*, 2003a
	sterol, terpenoid, flavonoid, saponin, mucilage, tannin	เหนือดิน	soxhlet extraction	Sangeetha and Venkatarathinakumar, 2011
	steroid and sterol, fixed oil and fat	ใบ	soxhlet extraction	Nishadh *et al.*, 2013

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
น้ำ	8α-tigloyloxy-hirsutinolide-13-*O*-acetate, 8α-epoxymethacryloyloxy-hirsutinolide-13-*O*-acetate, 8α-tigloyloxy-hirsutinolide, vernolides C, hirsutinolide-13-*O*-acetate, piptocarphin D, 8α-(4-hydroxymethacryloyloxy)-hirsutinolide-13-O-acetate, vernolides D	ทั้งต้น	boiling extraction	Chea *et al.*, 2006
	saponin, glycoside	ใบ	soxhlet extraction	Nishadh *et al.*, 2013
ไม่กล่าวถึง	3β-acetoxyurs-19-ene	ราก	ไม่กล่าวถึง	Misra *et al.*, 1993
	lupeol palmitate, α-amyrin palmitate, dotriacontanoic acid, stigmasterol-β-D-glucopyranoside	ไม่กล่าวถึง	ไม่กล่าวถึง	Tandon and Shukla, 1995

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
ไม่กล่าวถึง (ต่อ)	luteolin 4′-*O*-glucoside, chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, methyl caffeate	ทั้งต้น	ไม่กล่าวถึง	Abeysekera *et al.*, 1999
	(+)-lirioresinol B, stigmasterol, stigmasterol-3-*O*-β-D-glucoside, 4-sulfo-benzocyclobutene	ทั้งต้น	ไม่กล่าวถึง	zhu *et al.*, 2008
	(-)-clovane-2,9-diol	ทั้งต้น	ไม่กล่าวถึง	zhu *et al.*, 2009

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	สารที่พบ	ส่วนที่พบ	วิธีการสกัด	เอกสารอ้างอิง
ไม่กล่าวถึง (ต่อ)	8α-loxy-hirsutinolide-13-*O*-acetate, caryolane-1,9β-diol, apigenin, chrysoeriol, luteolin, thermopsoside, luteolin-7-*O*-β-D-glucoside, quercetin, apigenin-4′-*O*-β-D-glucoside, hyperin, β-amyrin aceate, lupeol acetate	ทั้งต้น	ไม่กล่าวถึง	khay *et al.*, 2012
	flavone glycoside, luteolin, taxifolin	ราก	ไม่กล่าวถึง	Yadava and Raj, 2013

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากหญ้าดอกขาว

2.5.1 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และเชื้อรา

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบของสารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน คลอโรฟอร์ม และเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ด้วยวิธี cup-plate method ที่ความเข้มข้น 50-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวัดขนาดบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดด้วยเบนซีน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบที่นำมาทดสอบทุกความเข้มข้น ในขณะที่สารสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากสารสกัดด้วยเบนซีน ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับสาร antibiotic chloramphenicol ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดด้วยเบนซีน เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus subtilis* เท่ากับ 23 มิลลิเมตร และแบคทีเรียแกรมลบ *Psudomonas aeruginosa* เท่ากับ 21 มิลลิเมตร และในสาร chloramphenicol เท่ากับ 26 และ 25 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Gupta *et al*., 2003a) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยเบนซีน มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดน้อยกว่าสาร chloramphenicol แต่ไม่แตกต่างกัน และสารสกัดด้วยเบนซีนยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ ซึ่งสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยเมทานอลก็มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบเช่นเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* และแบคทีเรียแกรมลบ *Enterobacter aerogenes* ของสารสกัดดอกและใบหญ้าดอกขาวด้วยเฮกเซน ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ตรวจสอบด้วยวิธี agar well diffusion method และวัดบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าสารสกัดดอกและใบหญ้าดอกขาวด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมากกว่าตัวทำละลายอีกสามชนิด โดยสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งสามชนิดดีที่สุด ที่ความเข้มข้นสารสกัด 2,000 ไมโครกรัมต่อ plate เกิดบริเวณยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus*, *B. cereus* และ *E. aerogenes* เท่ากับ 13, 14 และ 10 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบค่า MIC พบว่าสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* และ *B. cereus* มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ *E. aerogenes* โดยมีค่า MIC ในแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสองชนิด เท่ากับ 310 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ในแบคทีเรียแกรมลบ เท่ากับ 620 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Danish Rizvi *et al*., 2011) นอกจากนั้นจากการศึกษาของ Chethan *et al.* (2012) ยังพบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้น (ราก ลำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต้น และใบ) ด้วยเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่า MIC ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี agar disc diffusion method สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* และ *K. pneumonia* เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิดเท่ากับ 10 มิลลิเมตร เทียบกับ chloramphenicol เท่ากับ 20 และ 18 มิลลิเมตร ตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้

นอกจากฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแล้ว สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวส่วนเหนือดินยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani*, *Botryodiploidia theobromae* และ *Pestalotiopsis theae* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ในเวลา 3 วัน เท่ากับ 23.9, 33.3, 20.3 และ 29.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Iqbal *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยอะซิโตน โดยวิธีการแช่ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. fumigatus*, *A. niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* sp., *Nocardia* sp., *Rhodotorula* sp. และ *C. glabrata* HO5 fluc R เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี disc diffusion method และ agar well method โดยสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยอะซิโตน มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *C. glabrata* HO5 fluc R ดีที่สุด วัดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เท่ากับ 11 มิลลิเมตร (Mini *et al.*, 2010) และจากการศึกษาของ Dhanalakshmi *et al.* (2013) เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* (MTCC 183), *C. parapsilosis* (MTCC 2509) และ *C. tropicalis* (MTCC 184) ของสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตต และเมทานอล โดยวิธีการแช่ ตรวจสอบด้วยวิธี well diffusion assay ที่ความเข้มข้น 250, 500, 750 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวัดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่าสารสกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด มีบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans C. parapsilosis* และ *C. tropicalis* เท่ากับ 17, 20 และ 18 มิลลิเมตร ตามลำดับ

จากการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pityrosporum ovale* และ *P. folliculitis* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดรังแค จากสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยเอทิลอะซิเตต ที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับแชมพูในท้องตลาด เมื่อวัดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา พบว่าสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดไม่แตกต่างจากแชมพูในท้องตลาดที่นำมาทดสอบ เมื่อนำสารสกัดมาผสมกับแชมพู พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราเพิ่มมากขึ้น มีบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. ovale* และ *P. folliculitis* เท่ากับ 22 และ 25 มิลลิเมตร ตามลำดับ เทียบกับแชมพูในท้องตลาด เท่ากับ 21 และ 24 มิลลิเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตามลำดับ ดังนั้นจากการทดลองนอกจากสารสกัดหญ้าดอกขาวจะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ยังมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้อีกด้วย

2.5.2 ฤทธิ์ต้านมาลาเรีย

สารสกัดรากหญ้าดอกขาว และหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ มีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย โดยสารสกัดทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งเชื้อ *Plasmodium falciparum* (strain 3D7) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 93 และ 82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Simonsen *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับสาร 8α-tigloyloxy-hirsutinolide-13-*O*-acetate, 8α-(4-hydroxymethacryloyloxy)-hirsutinolide-13-*O*-acetate และ vernolid-D ซึ่งเป็นสารกลุ่ม sesquiterpene lactone ที่แยกได้จากสารสกัดส่วนไดคลอโรมีเทนของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น โดยสารประกอบทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งเชื้อ *P. falciparum* (strain W2) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.9, 3.7 และ 3.5 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ แต่ยังมีประสิทธิภาพต่ำกว่า chloroquine ซึ่งเป็น positive control มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.52 ไมโครโมลต่อลิตร (Chea *et al.*, 2006)

2.5.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction แบบ *in vitro* และ *in vivo* ของ Kumar and Kuttan (2009) พบว่าในการทดลองแบบ *in vitro* สารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 10-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ superoxide radical (ตรวจสอบด้วยวิธี NBT reduction method) อนุมูลอิสระ hydroxyl radical (ตรวจสอบด้วยวิธี Fenton reaction) และอนุมูลอิสระ nitric oxide radical โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 190, 130 และ 210 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยังพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation อีกด้วย เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล แบบ *in vivo* ในหนูขาวเล็ก เพศผู้ สายพันธุ์ BALB/c ที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อตัว ฉีดเข้าบริเวณหน้าท้อง (intraperitoneal administration) นาน 5 วัน พบว่าในเลือด และตับของหนูที่ได้รับสารสกัดมีระดับเอนไซม์ที่ช่วยในการกำจัดพิษ และต้านอนุมูลอิสระ คือ catalase และ superoxide dismutase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในตับ มีระดับเอนไซม์ glutathione-S transferase เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน และการเกิด lipid peroxidation ก็ลดลง นอกจากนั้นสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอลยังช่วยยับยั้งการผลิตอนุมูลอิสระ superoxide radical ในเซลล์ macrophage บริเวณหน้าท้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่ได้รับการกระตุ้นอีกด้วย แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* เช่นเดียวกับสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้น (ราก ลำต้น และใบ) ด้วยเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 120 และ 110 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Chethan *et al.*, 2012)

จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยตัวทำละลาย 8 ชนิด คือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซีน คลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตต อะซีโตน เมทานอล เอทานอล และน้ำ โดยวิธี soxhlet extraction พบว่าสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยเมทานอล และเอทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี DPPH radical inhibition assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 25.14±1.23 และ 31.18±1.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เทียบกับ ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 71.12±2.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยเมทานอล และเอทานอลยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ nitric oxide ดีที่สุดเช่นกัน ตรวจสอบด้วยวิธี nitric oxide radical inhibition assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.8±1.04 และ 32.25±1.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เทียบกับ ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.41±1.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดใบหญ้าดอกขาวด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับตัวทำละลายทั้ง 7 ชนิด (Nishadh *et al.*, 2013)

2.5.4 ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ

สารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด oxidative burst ที่เกิดขึ้นในเซลล์ polymorphonuclear leucocyte ที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร zymosan ได้ โดยตรวจสอบการยับยั้งการเกิดสารเรืองแสงภายในเซลล์ของสารประกอบ 8 ชนิดที่แยกได้จากสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้น พบว่าสาร luteolin มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด oxidative burst ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 9 ไมโครโมลต่อลิตร เทียบกับ gallic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 30 ไมโครโมลต่อลิตร (Abeysekera *et al.*, 1999)

เช่นเดียวกับสารสกัดหยาบ และสารประกอบ 9 ชนิดที่แยกได้จากสารสกัดดอกหญ้าดอกขาวด้วยเฮกเซน โดยวิธี soxhlet extraction มีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่แตกต่างกัน เมื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิด nitric oxide ซึ่งเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อสลาย L-arginine ด้วย nitric oxide synthase (NOS) ภายในเซลล์ murine macrophage RAW 264.7 ที่ได้รับ lipopolysaccharide (LPS) พบว่าสารสกัดหยาบ และสารประกอบที่แยกได้ทั้ง 9 ชนิด ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด nitric oxide เท่ากับ 63.3 และ 82.6-99.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสาร 8α-tigloyloxyhirsutinolide และ vernolide-A ซึ่งเป็นสารกลุ่ม sesquiterpene lactone มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด nitric oxide สูงที่สุด และจากการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการเกิด NF-κB ซึ่งเป็น transcription factor เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบ apoptosis การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (differentiation) และการเคลื่อนย้ายของเซลล์ (migration) ในเซลล์ stably-transfected human embryonic kidney cell 293 ที่ได้รับ tumor necrosis factor-α (TNF-α) พบว่าสารสกัดหยาบ และสารประกอบที่แยกได้ทั้ง 9 ชนิด ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด NF-κB เท่ากับ 62.3 และ 65.6-99.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสาร 8α-tigloyloxyhirsutinolide, 8α-tigloyloxyhirsutinolide-13-*O*-acetate และ 8α -(2-methylacryloyloxy)-hirsutinolide-13-*O*-acetate ซึ่งเป็นสารกลุ่ม sesquiterpene lactone มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด NF-κB สูงที่สุด (Youn *et al.*, 2012) สามารถสรุปได้ว่าสาร 8α-tigloyloxyhirsutinolide ซึ่งเป็นสารกลุ่ม sesquiterpene lactone ที่แยกได้จากสารสกัดดอกหญ้าดอกขาวด้วยเฮกเซน มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งการเกิด nitric oxide และ NF-κB ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารประกอบอีก 8 ชนิดที่แยกได้จากสารสกัดนี้

จากการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบแบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรังของสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ในหนู rat สายพันธุ์ Wistar ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เกิดการบวมของอุ้งตีนที่ทำให้เกิดการบวมด้วย carrageenin 1 เปอร์เซ็นต์ใน normal saline ซึ่งเป็นการอักเสบแบบเฉียบพลันลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการบวม เท่ากับ 47.9±2.03 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับ phenylbutazone ซึ่งเป็น positive control เท่ากับ 61.1±2.3 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการบวมของอุ้งตีนที่เกิดจาก phlogistic agent (mediator of inflammation) คือ histamine ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ serotonin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม มีการบวมของอุ้งตีนลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการบวม เท่ากับ 51.8±3.24 และ 54.4±1.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เทียบกับ phenylbutazone ซึ่งเป็น positive control เท่ากับ 64.6±2.51 และ 59.3±2.34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการตรวจสอบฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบแบบเรื้อรัง ด้วยวิธี cotton pouch granuloma method โดยป้อนสารสกัดให้หนูที่สอดแผ่นสำลีใต้ผิวหนังบริเวณรักแร้ นาน 7 วัน เมื่อครบกำหนด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผ่าตัดเอาแผ่นสำลีออกพร้อมกับผิวหนังด้านนอก นำมาวัดการเกิด granuloma พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม มีการเกิด granuloma ลดลง เมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับสารสกัด มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด granuloma เท่ากับ 47.9±1.62 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับ phenylbutazone เท่ากับ 56.3±3.27 เปอร์เซ็นต์ (Mazumder *et al.*, 2003) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบทั้งแบบเฉียบพลัน และแบบเรื้อรังได้

2.5.5 ฤทธิ์ลดไข้

สารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction มีฤทธิ์ลดไข้ในหนูขาวใหญ่ หลังจากฉีดยีสต์เข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) นาน 19 ชั่วโมง โดยหนูที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นความเข้มข้น 100, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม มีอุณหภูมิร่างกายลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับสารสกัด และหนูที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลดไข้ได้ดีที่สุด หลังจากได้รับสารสกัดเพียง 1 ชั่วโมง เทียบเท่ากับการได้รับยาลดไข้พาราเซตามอล ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Gupta *et al.*, 2003b)

2.5.6 ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง

Vernolide-A และ Vernolide-B เป็นสารกลุ่ม sesquiterpene lactone ที่แยกได้จากสารสกัดลำต้นหญ้าดอกขาวด้วยเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ได้แก่ human KB (oral epidermoid carcinoma), DLD-1 (colon adenocarcinoma), NCI-661 (lung large cell carcinoma) และ Hela (cervix epitheloid carcinoma) ตรวจสอบด้วยวิธี methylene blue dying method ที่ความเข้มข้น 1, 10, 40 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสาร Vernolid-A มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง KB, DLD-1, NCI-661 และ Hela cell มีค่า effective dose ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ED_{50}) เท่ากับ 0.02, 0.05, 0.53 และ 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสาร Vernolide-B มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง KB, NCI-661 และ Hela cell มีค่า ED_{50} เท่ากับ 3.78, 5,88 และ 6.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าสาร Vernolide-A มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า Vernolide-B (Kuo *et al.*, 2003) สาร 8α-tigloyloxyhirsutinolide-13-O-acetate เป็นสารกลุ่ม sesquiterpene lactone เช่นเดียวกัน แยกได้จากสารสกัดใบกับลำต้นหญ้าดอกขาวด้วยเมทานอล โดยวิธีการแช่ มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

glioblastoma cancer cell (U251MG) และ breast cancer cell (MDA-MB-231) มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง เท่ากับ 88.8 และ 81.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Youn *et al.*, 2014)

เมื่อนำสารสกัดหญ้าดอกขาวส่วนเหนือดินด้วยตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ป้อนให้กับหนูขาวเล็ก เพศผู้ สายพันธุ์ Swiss Albino หลังจากฉีดเซลล์มะเร็ง Dalton's Ascitic Lymphoma (DAL) บริเวณช่องท้อง นาน 24 ชั่วโมง โดยป้อนสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวส่วนเหนือดินด้วยเอทานอล และคลอโรฟอร์ม มีจำนวนเซลล์มะเร็งลดน้อยลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ทำให้หนูมีอายุขัยเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็งแต่ไม่ได้รับสารสกัด เมื่อตรวจสอบทางโลหิตวิทยา พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวส่วนเหนือดินด้วยเอทานอล และคลอโรฟอร์ม มีจำนวนเม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดลดลง แต่ไม่แตกต่างจากหนูปกติที่ไม่เป็นมะเร็ง รวมทั้งจำนวนเม็ดเลือดแดง และความเข้มข้นของฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เป็นมะเร็งแต่ไม่ได้รับสารสกัด แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวส่วนเหนือดินด้วยเอทานอล และคลอโรฟอร์ม มีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (Sangeetha and Venkatarathinakumar, 2011)

2,5.7 ความเป็นพิษของสารสกัด

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ต่อไรน้ำเค็ม brine shrimp (*Artemia salina* L.) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี brine shrimp lethality test นาน 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้มข้น 0.195-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม brine shrimp โดยมีค่า LC_{50} ที่ 6 และ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 3.87 และ 2.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าที่ได้นี้มากกว่า 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่ามาตรฐาน (recommended cut-off point for detecting cytotoxic activity) จัดว่าสารสกัดนี้ไม่มีความเป็นพิษ (Latha *et al.*, 2010) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kawsar *et al.* (2011) พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเมทานอล โดยวิธีการแช่ ไม่มีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็มเช่นเดียวกัน เมื่อตรวจสอบความเป็นพิษนาน 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเมทานอล ที่ความเข้มข้น 0.781-400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีการตายของไรน้ำเค็ม จากการทดลองทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเมทานอล ไม่มีความเป็นพิษต่อไรน้ำเค็ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดน้ำใบหญ้าดอกขาว โดยวิธีการแช่ มีฤทธิ์กดประสาทส่วนกลางของหนูขาวเล็ก ซึ่งเป็นผลจากการระงับปวด โดยความเข้มข้นของสารสกัดน้ำใบหญ้าดอกขาวที่ทำให้หนูตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (lethal dose: LD_{50}) เท่ากับ 1.874 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Muir, 1981) ส่วนหนูขาวเล็ก ที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ที่ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม นาน 14 วัน พบว่าไม่มีความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน เนื่องจากไม่มีหนูตายระหว่างการทดลองนี้ และไม่มีความผิดปกติของผิวหนัง ขน ตา เยื่อเมือก การหายใจ การไหลเวียนเลือด พฤติกรรม และระบบประสาท เมื่อครบกำหนดเวลา ฆ่าหนู ชั่งน้ำหนักตัวและตรวจสอบเนื้อเยื่ออวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ปอด ม้าม และไต พบว่าไม่มีความผิดปกติเช่นกัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเมทานอล ที่ความเข้มข้น 2,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่มีความเป็นพิษต่อหนูทดลอง (Latha *et al.*, 2010) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sreedevi *et al.* (2011) ตรวจสอบความเป็นพิษต่อไตของสารสกัดหญ้าดอกขาวส่วนเหนือดินด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตต และเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ในหนูขาวใหญ่ สายพันธุ์ Wistar โดยป้อนสารสกัดความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม นาน 10 วัน เมื่อครบกำหนดตรวจเลือดและปัสสาวะ พบว่าสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งสามชนิด มีระดับ blood urea nitrogen, serum creatinine, serum total proteins และ urinary protein ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวส่วนเหนือดินด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตต และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่มีผลต่อไตของหนู rat ที่นำมาทดสอบ

2.5.8 การศึกษาทางคลินิก

การเลิกบุหรี่ในปัจจุบัน ผู้รับการรักษาจะได้รับคำแนะนำ ควบคู่กับการใช้ยา แต่ประสิทธิภาพในการเลิกบุหรี่ในระยะยาวนั้นยังต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ค่าใช้จ่ายในการรักษาค่อนข้างสูง โดยยาที่ใช้นั้นมีราคาแพง และมีผลข้างเคียง คือ ทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น คลื่นไส้ ปากแห้ง และเป็นยากดประสาท (Prochazka, 2000) หญ้าดอกขาวจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้อดบุหรี่ ซึ่งในปัจจุบันมีการนำหญ้าดอกขาวมาใช้ในรูปแบบต่างๆ เพื่อช่วยอดบุหรี่ ได้แก่ ยาชงสมุนไพร (herbal infusion) ลูกกวาดนุ่ม (soft candy) ผลิตภัณฑ์กาแฟผสมหญ้าดอกขาว หมากฝรั่ง ยาอมเม็ดแข็ง (Iozenge) และแผ่นฟิล์มละลายเร็ว (fast-dissolving film) (อรลักษณา, 2553) โดยนริศรา (2541) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของหญ้าดอกขาวต่อการเลิกบุหรี่ของประชาชนในเขตอำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี เปรียบเทียบผลการลดสูบบุหรี่ของอาสาสมัครที่ได้รับหญ้าดอกขาว และยาหลอก คือ ใบเตยหอม และเก็กฮวย พบว่าหญ้าดอกขาวสามารถลดการสูบบุหรี่ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wongwiwatthananukit *et al.* (2009) รายงานประสิทธิผลของหญ้าดอกขาวในการอดบุหรี่ เมื่อเปรียบเทียบกับยาหลอก คือ ชาใบหม่อน (*Morus alba* Linn) ซึ่งเป็นชาที่มีสีคล้ายกัน แต่ไม่มีผลต่อการอดบุหรี่ ณ สถาบันธัญญาลักษณ์ จังหวัดปทุมธานี โดยแบ่งอาสาสมัครที่สูบบุหรี่ จำนวน 64 คน ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกดื่มชาหญ้าดอกขาวปริมาณ 3 กรัม วันละ 3 ครั้ง หลังอาหาร ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 14 วัน กลุ่มสองได้รับชาหลอก เช่นเดียวกับกลุ่มแรก กำหนดวันเลิกบุหรี่เป็นวันที่ 8 ของการรักษา ทั้งสองกลุ่มได้รับคำแนะนำในการเลิกบุหรี่จากเภสัชกรทุกครั้งที่ติดตามผล ผลการเลิกบุหรี่ได้รับจากการรายงานอัตราการเลิกบุหรี่อย่างต่อเนื่อง (continuous abstinence tate: CAR) โดยตัวผู้ป่วย และยืนยันผลด้วยอัตราการเลิกบุหรี่ตลอด 1 สัปดาห์ก่อนวันประเมินผล (point prevalence abstinence: PAR) จากการตรวจโคตินินในปัสสาวะ เก็บผลการเลิกบุหรี่ทุกๆ 2 สัปดาห์ โดยติดตามผลเป็นระยะเวลา 4 เดือน (24 สัปดาห์) รวมถึงติดตามผลอาการไม่พึงประสงค์ และคุณภาพชีวิต เมื่อสิ้นสุดระยะเวลารักษา พบว่า CAR และ PAR ของกลุ่มที่ได้รับชาหญ้าดอกขาวมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิกตลอดระยะเวลาติดตามผล แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยในระยะเวลา 12 สัปดาห์ CAR กลุ่มที่ได้รับชาหญ้าดอกขาว เท่ากับ 28.1 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก เท่ากับ 12.5 เปอร์เซ็นต์ และในระยะเวลา 24 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับชาหญ้าดอกขาว เท่ากับ 18.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก เท่ากับ 9.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ภายในระยะเวลา 12 สัปดาห์ PAR กลุ่มที่ได้รับชาหญ้าดอกขาว เท่ากับ 43.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก เท่ากับ 21.9 เปอร์เซ็นต์ และในระยะเวลา 24 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับชาหญ้าดอกขาว เท่ากับ 34.4 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก เท่ากับ 15.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกลุ่มที่ได้รับชาหญ้าดอกขาวมีอาการอยากบุหรี่ลดลง เนื่องจากรสชาติ และกลิ่นของบุหรี่ที่เปลี่ยนแปลงไป อาการไม่พึงประสงค์ที่พบ ได้แก่ ลิ้นชา คลื่นไส้อาเจียน ปวดท้อง และเวียนศีรษะ แต่มีอัตราการเกิดไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มได้รับชาหญ้าดอกขาว และยาหลอก ($p < 0.05$) ดังนั้นหญ้าดอกขาวอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการอดบุหรี่เนื่องจากมีราคาถูก และผลข้างเคียงน้อยกว่ายาที่ใช้รักษาการอดบุหรี่ในปัจจุบัน

ในปัจจุบันมีการพัฒนาชาหญ้าดอกขาวให้ดื่มง่าย ด้วยการนำไปผสมในกาแฟ Jitpukdeebodintra and Jangwang (2009) ศึกษาประสิทธิภาพของกาแฟผสมหญ้าดอกขาว เพื่อใช้ในการอดบุหรี่ เนื่องจากหญ้าดอกขาวมีรสขมเฝื่อน และมีกลิ่นเหม็นเขียว จึงนำมาผสมในกาแฟเพื่อช่วยกลบกลิ่น และรสชาติที่ไม่ดีของสมุนไพร โดยอาสาสมัครผู้เข้ารับการรักษา จำนวน 20 คน อายุ 20-50 ปี ดื่มกาแฟผสมหญ้าดอกขาว ปริมาณ 8 กรัม (มีหญ้าดอกขาว ปริมาณ 3 กรัม) ในน้ำร้อน 150 มิลลิลิตร วันละ 4 ครั้งหลังอาหาร เป็นเวลา 1-2 เดือน เก็บผลโดยให้อาสาสมัครตอบคำถามในแบบสอบถาม Fagerström test of nicotine dependence (FTND) ก่อนและหลังได้รับกาแฟหญ้าดอก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขาว พบว่ามีอาสาสมัคร 2 คนเลิกบุหรี่ได้สำเร็จ และอาสาสมัครทั้งหมดมีความต้องการในการสูบบุหรี่ลดน้อยลง โดยค่าที่ได้จาก Fagerström test (FTND) ก่อนดื่มกาแฟ เท่ากับ 6.35±1.14 หลังดื่มกาแฟ เป็นเวลา 1 เดือน เท่ากับ 5.10±1.97 และหลังดื่มกาแฟ เป็นเวลา 2 เดือน เท่ากับ 3.35±2.32 นอกจากนี้ caffeine ในกาแฟยังมีส่วนช่วยลดอาการของผู้เลิกบุหรี่ เช่น อาการง่วงนอน อ่อนเพลีย ไม่กระปรี้กระเปร่า เนื่องจาก caffeine มีฤทธิ์ช่วยกระตุ้นหัวใจ และระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) ดังนั้นการนำหญ้าดอกขาวมาผสมในกาแฟ อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อช่วยในการอดบุหรี่ต่อไป

จากการศึกษาประสิทธิภาพของหญ้าดอกขาวร่วมกับการออกกำลังกาย ต่ออัตราการสูบบุหรี่ การเกิด oxidative stress การต้านอนุมูลอิสระ และระดับ beta-endophin ในเลือด โดยแบ่งอาสาสมัครที่เข้ารับการอดบุหรี่ จำนวน 120 คน ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้รับหญ้าดอกขาวเพียงอย่างเดียว กลุ่มที่ 2 ได้รับหญ้าดอกขาวร่วมกับการออกกำลังกาย กลุ่มที่ 3 ออกกำลังกายเพียงอย่างเดียว และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุม นำหญ้าดอกขาว ปริมาณ 20 กรัม ต้มในน้ำร้อน 390 มิลลิลิตร จนเหลือ 130 มิลลิลิตร ให้อาสาสมัครกลุ่มได้รับหญ้าดอกขาวดื่มก่อนการสูบบุหรี่ 3 วันต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน ส่วนกลุ่มที่ออกกำลังกาย ออกกำลังกายอย่างหนัก 3 วันต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 2 เดือน ก่อนและหลังการรักษาวัดและบันทึกค่าการปลดปล่อยคาร์บอนมอนอไซด์จากการหายใจออก (exhaled carbon monoxide: CO) เก็บตัวอย่างเลือดมาวัดการเกิด oxidative stress [malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NOx), protein hydroperoxide (PrOOH) และการต้านอนุมูลอิสระ (total antioxidant capacity (TAC))] ระดับ beta-endophin และอัตราการสูบบุหรี่ (มวนต่อวัน) พบว่าค่าการปลดปล่อยคาร์บอนมอนอไซด์จากการหายใจออกของทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่มควบคุม ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และอัตราการสูบบุหรี่ (มวนต่อวัน) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ บุหรี่สำเร็จรูป (light cigarette) และบุหรี่ม้วนเอง (self-rolled cigarette) โดยอัตราการสูบบุหรี่สำเร็จรูปในกลุ่มที่ได้รับหญ้าดอกขาวร่วมกับการออกกำลังกายลดลงมากที่สุด เท่ากับ 62.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับหญ้าดอกขาว และกลุ่มออกกำลังกาย เท่ากับ 59.52 และ 53.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เทียบกับกลุ่มควบคุม มีอัตราสูบบุหรี่เพิ่มขึ้น เท่ากับ 14.04 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อัตราการสูบบุหรี่ม้วนเองลดลงทุกกลุ่ม ในกลุ่มที่ได้รับหญ้าดอกขาว มีอัตราการสูบบุหรี่ลดลงมากที่สุด เท่ากับ 54.47 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ กลุ่มออกกำลังกาย กลุ่มที่ได้รับหญ้าดอกขาวร่วมกับการออกกำลังกาย และกลุ่มควบคุม เท่ากับ 42.30, 40 และ 9.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดสอบพบว่ากลุ่มที่ได้รับหญ้าดอกขาวเพียงอย่างเดียว มีอัตราการสูบบุหรี่ลดลง ค่า oxidative stress ลดลง การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อระดับ beta-endophin ในขณะที่การออกกำลังกายทำให้ผู้สูบบุหรี่มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น ทำให้อัตราการสูบบุหรี่ลดน้อยลง แต่การออก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กำลังกายอย่างหนักทำให้ค่า oxidative stress การต้านอนุมูลอิสระ และระดับ beta-endophin เพิ่มขึ้น และในกลุ่มที่ได้รับหญ้าดอกขาวร่วมกับการออกกำลังจึงมีอัตราการสูบบุหรี่ลดลง ค่า oxidative stress ลดลง เนื่องจากได้รับหญ้าดอกขาว การต้านอนุมูลอิสระ และระดับ beta-endophin เพิ่มขึ้น ดังนั้นในการอดบุหรี่ นอกจากการใช้หญ้าดอกขาวแล้ว การออกกำลังกายก็เป็นอีกกิจกรรมหนึ่งที่สามารถเบี่ยงเบนความสนใจ และเพิ่มประสิทธิภาพในการอดบุหรี่ได้เช่นกัน (Leelarungrayub *et al.*, 2010)

หญ้าดอกขาวนอกจากจะช่วยในการอดบุหรี่แล้ว จากการศึกษาของ Sayeed *et al.* (2013) ยังพบว่ารากหญ้าดอกขาว มีฤทธิ์ช่วยบรรเทาอาการเบาหวาน และไม่มีความเป็นพิษต่อตับและไตในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes) โดยแบ่งผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 จำนวน 48 คน ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกได้รับรากหญ้าดอกขาว ในรูปแบบเม็ดๆละ 2 กรัม วันละ 3 ครั้งก่อนอาหาร เป็นเวลา 3 เดือน หลังจากนั้นได้รับยาหลอก ซึ่งเป็น cellulose fiber ปริมาณเท่ากับรากหญ้าดอกขาวเป็นเวลา 3 เดือน กลุ่มที่สองได้รับยาหลอกในระยะ 3 เดือนแรก หลังจากนั้นได้รับรากหญ้าดอกขาวเป็นเวลา 3 เดือน ในระหว่างการทดลองผู้ป่วยจะไม่ได้รับยารักษาเบาหวานชนิดอื่น และผู้ป่วยจะได้รับคำแนะนำในการทานอาหาร ออกกำลังกาย และการใช้ชีวิตประจำวัน เก็บผลการรักษาโดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงด้วยการสัมภาษณ์ทุกๆ 2 สัปดาห์ และวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด, glycosylated hemoglobin (HbA1c), total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, triglyceride, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase และ creatinine ทุกๆ 3 เดือน เป็นระยะเวลา 6 เดือนของการรักษา พบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด hemoglobin A1c, total cholesterol, LDL cholesterol และ triglyceride มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งสองกลุ่มการทดลองเมื่อได้รับรากหญ้าดอกขาว เปรียบเทียบกับก่อนรักษา และระดับ aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase และ creatinine ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งสองกลุ่มการทดลอง เปรียบเทียบกับก่อนรักษา ชี้ให้เห็นว่ารากหญ้าดอกขาวไม่มีพิษต่อการทำงานของตับ และไต จากทดลองแสดงให้เห็นว่ารากหญ้าดอกขาว ปริมาณ 6 กรัมต่อวัน (2 กรัมต่อเม็ด วันละ 3 ครั้ง) ในระยะเวลา 6 เดือน ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด (glycemic state) ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และไม่มีความเป็นพิษต่อตับและไต รวมทั้งไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยที่ได้รับสมุนไพร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ลิมโฟไซต์

3.1 ลักษณะทั่วไป

ลิมโฟไซต์เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์มีกระดูกสันหลัง เซลล์มีรูปร่างกลม พบประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด ลิมโฟไซต์ที่พบส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 ไมโครเมตร มีนิวเคลียสรูปกลมหรือมีรอยเว้าเล็กน้อย ขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ มีไซโทพลาสซึมอยู่ที่ขอบเซลล์เล็กน้อย ลิมโฟไซต์ขนาดกลาง มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-12 ไมโครเมตร พบได้เล็กน้อย สำหรับลิมโฟไซต์ขนาดใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 18 ไมโครเมตร พบอยู่ในต่อมน้ำเหลืองและปรากฏอยู่ในเลือดเฉพาะในภาวะที่เกิดพยาธิสภาพเท่านั้น สามารถแบ่งลิมโฟไซต์ออกเป็น 3 ชนิด คือ natural killer cell, T cell และ B cell (กรรณิกา, 2546; Martini *et al*., 2000)

3.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อลิมโฟไซต์

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบนิยมใช้ลิมโฟไซต์ เนื่องจาก (Buckton and Evans, 1973)

1 ให้เซลล์จำนวนมาก ใช้เพียง 1-2 มิลลิลิตร ก็เพียงพอต่อการทดสอบ โดยเลือด 1 มิลลิลิตร มีลิมโฟไซต์ประมาณ $1\text{-}3\times10^{6}$ เซลล์ นอกจากนี้ยังสะดวกและง่ายต่อการเก็บตัวอย่าง

2. ลิมโฟไซต์แพร่กระจายทั่วร่างกาย หมุนเวียนไปตามกระแสเลือดทั่วทุกอวัยวะ จึงเป็นตัวแทนที่ดีในการนำมาทดสอบความเป็นพิษ

3. ลิมโฟไซต์ในระบบหมุนเวียนเลือด อยู่ในระยะ G_1 หรือ G_0 ของวัฏจักรเซลล์เหมือนกันทุกเซลล์ โดยปกติจะไม่มีการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์ที่นำมาใช้อยู่ในระยะเดียวกัน

4. สามารถกระตุ้นให้ลิมโฟไซต์มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในห้องปฏิบัติการได้ จึงสามารถเลี้ยงให้ได้เซลล์จำนวนมากได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Daltons lymphoma (DL), Ehrlich ascites carcinoma (EAC) และเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ของสารสกัดต้นหางปลาช่อน (*Emilia sonchifolia*) ด้วยเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ DL และ EAC เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 3 ชั่วโมง และตรวจสอบด้วยวิธี trypan blue exclusion method โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 1,500 และ 1,100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ (Shylesh and Padikkala, 2000) นอกจากนั้นจากการศึกษาความเป็นพิษสารสกัดน้ำส่วนเหนือดินของ *Achyrocline satureioides* ที่ความเข้มข้น 500-3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ นาน 18-24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำส่วนเหนือดินของ *Achyrocline satureioides* ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์เช่นกัน เมื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion method และ MTT assay (Sabini *et al.*, 2013)

การศึกษาของ Sinha *el al.* (2014) เลือกใช้เซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ในการตรวจสอบความเป็นพิษของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 4 ชนิด ได้แก่ palmarosa (*Cymbopogon martini*) ตะไคร้หอม (*Cymbopogon winterianus*) ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) และหญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides*) และสาร citral และ geraniol เป็นสารกลุ่ม monoterpenoid ที่พบในพืช 4 ชนิดนี้ ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี trypan blue dye exclusion method และ MTT assay เมื่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ได้รับสารสกัด ที่ความเข้มข้น 25-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 3 ชั่วโมง พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 4 ชนิด และสารบริสุทธิ์ทั้ง 2 ชนิด ทำให้เซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ตายเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น ในการตรวจสอบด้วยวิธี trypan blue dye exclusion test พบว่าสารทดสอบทั้ง 6 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (% viability) ของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ลดลง แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) และจากการตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 4 ชนิด และสาร citral ยกเว้น geraniol มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์มากขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยสาร citral มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มากที่สุดเมื่อเทียบกับสารทดสอบอีก 5 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ เท่ากับ 75.69 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าจากการตรวจสอบทั้งสองวิธี พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 4 ชนิด สาร citral และ geraniol มีผลทำให้เซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ตายเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น แต่ก็จัดว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์น้อยมาก เมื่อตรวจสอบความเสียหายต่อดีเอ็นเอด้วยวิธี comet assay และ DNA diffusion assay พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 4 ชนิด และสาร citral ยกเว้น geraniol ทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และจากการตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ ด้วยวิธี Annexin V-FITC/PI double straining พบว่าเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้รับสารสกัดทั้ง 6 ชนิด เกิดการตายแบบ apoptosis มากกว่า necrosis โดยสาร citral ชักนำเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ตายแบบ apoptosis มากที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การตาย เท่ากับ 43.94 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ และหญ้าแฝก ตามลำดับ ดังนั้นจากการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ ความเสียหายของดีเอ็นเอ และรูปแบบการตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ สามารถสรุปได้ว่าสาร citral มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์มากกว่าสารทดสอบอื่นๆ อีก 5 ชนิด โดยทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ และชักนำให้เซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ตายแบบ apoptosis ได้

4. เซลล์ human lymphoblast cell lines (TK6)

4.1 ลักษณะทั่วไป

เซลล์ TK6 เป็นเซลล์ลิมโฟบลาสต์จากม้ามของมนุษย์เพศชาย อายุ 5 ปี ซึ่งป่วยด้วยโรค hereditary spherocytosis เซลล์ TK6 เป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย (suspension cell) มี doubling time ที่ 12-14 ชั่วโมง และเซลล์ TK6 เป็นอนุพันธ์จากเซลล์ WIL-2 ที่มีเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ที่ตำแหน่ง thymidine kinase (*TK*) locus ซึ่งใช้บอกตำแหน่งความรุนแรงของการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ 3 ตำแหน่ง เซลล์ TK6 เป็น cell line ที่นิยมนำมาทดสอบการกลายพันธุ์ระดับยีน (gene mutation) และความเสียหายต่อดีเอ็นเอ (genotoxicity) เนื่องจากเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย (suspension cell) จึงง่ายต่อการนำมาทดสอบ และการวิเคราะห์ผล มีสารพันธุกรรมคงที่ มีการแสดงออกของ wild-type p53 รวมทั้งมีการเกิดการกลายพันธุ์แบบ spontaneous mutation คงที่ โดยเซลล์ TK6 เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เติม horse serum หรือ fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ ในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน และควบคุมปริมาณเซลล์ให้อยู่ในช่วง 2×10^5-1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (น้ำทิพย์, 2548; Zhan *et al.*, 2004; Islaih *et al.*, 2005; Platel *et al.*, 2009; American Type Culture Collection: ATCC, 2013)

4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการศึกษาของ Bhouri *et al.* (2012) ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 ของสาร digallic acid (DGA) ซึ่งเป็นสาร polyhydroxyphenolic compound แยกได้จากสารสกัดน้ำผล *Pistacia lentiscus* L. ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสาร DGA ที่ความเข้มข้น 10-200 ไมโครกรัมต่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง มีความเป็นพิษรุนแรงมากต่อเซลล์ TK6 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสาร DGA ที่ความเข้มข้น 2.5-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เซลล์ TK6 ตายแบบ apoptosis ได้ พบการเกิด DNA ladder จากการตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis และระดับ caspase-8 และ caspase-3 ที่เพิ่มขึ้นตามความเข้นข้นที่สูงขึ้นของสาร DGA

ในขณะที่สารสกัดผล (เปลือก เนื้อ และเยื่อหุ้มเมล็ด) ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis*) ด้วยเอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดความเสียหายต่อดีเอ็นเอของเซลล์ TK6 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และรังสี UV เมื่อบ่มเซลล์ TK6 กับสารสกัด นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความเสียหายต่อดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Comet assay พบว่าเซลล์ TK6 ที่ได้รับสารสกัด มีความเสียหายต่อดีเอ็นเอจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลดลงถึง 30-60 เปอร์เซ็นต์ และความเสียหายต่อดีเอ็นเอจากรังสี UV ลดลงถึง 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Klungsupya *et al.*, 2014) เช่นเดียวกับสารสกัดน้ำจากผลแบล็กเคอเรนท์ (Blackcurrant: *Ribes nigrum* L.) ที่ความเข้มข้น 500-3,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดความเสียหายต่อดีเอ็นเอในเซลล์ TK6 ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เช่นกัน เมื่อบ่มเซลล์ TK6 กับสารสกัด นาน 24 ชั่วโมง และตรวจสอบความเสียหายต่อดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Comet assay และการเกิดไมโครนิวเคลียส (Yamamoto *et al.*, 2014)

5. การตายของเซลล์

การตายของเซลล์เกิดขึ้นขณะที่มีการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต หรือเมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ เซลล์ที่ใกล้ตายจะผ่านกระบวนการต่างๆ จนถึงระยะหนึ่งที่ไม่สามารถกลับสู่สภาพปกติได้ เรียกระยะนี้ว่า point of no return การตายของเซลล์เกิดผ่านกระบวนการหลักสองกระบวนการ คือ apoptosis และ necrosis (Ghobrial *et al.,* 2005)

5.1 Apoptosis

การตายของเซลล์แบบ apoptosis เป็นกระบวนทางสรีรวิทยา และชีวเคมีที่อาศัยพลังงานจาก ATP และถูกควบคุมอย่างซับซ้อน ในการกำจัดเซลล์ที่หมดอายุขัย (programmed cell death) หรือเกิดความเสียหายจนไม่สามารถซ่อมแซมได้ โดยไม่มีผลทำให้เซลล์ข้างเคียงเสียหาย และไม่เกิดการอักเสบ (inflammation) (Iannolo *et al*., 2008; Krysko *et al*., 2008) การตายแบบนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เกิดขึ้นเป็นปกติขณะที่มีการพัฒนา และหลังการพัฒนาของตัวอ่อน มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมจำนวนเซลล์ในเนื้อเยื่อของสัตว์หลายเซลล์ให้คงที่ และสมดุล (homeostasis) ปัจจัยที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis นั้น ได้แก่ ปัจจัยภายใน เช่น ภาวะ oxidative stress ความผิดปกติของวัฏจักรเซลล์ ความเสียหายของดีเอ็นเอ และปัจจัยภายนอก เช่น การได้รับแสงอัลตราไวโอเลต การติดเชื้อไวรัส และการขาดสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เป็นต้น นอกจากนั้นการตายของเซลล์แบบ apoptosis ยังเป็นกลไกสำคัญที่ช่วยต้านการเกิดมะเร็ง และกำจัดเซลล์ที่มีความผิดปกติในระดับพันธุกรรมอีกด้วย (Huerta *et al*., 2006)

5.1.1 ลักษณะการตายแบบ apoptosis

การตายแบบ apoptosis เป็นการตายเฉพาะเซลล์ หรือกลุ่มเซลล์ขนาดเล็ก เซลล์ที่ตายจะหดตัว และหลุดออกจากเซลล์ข้างเคียง เมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์มีขนาดเล็กลง เนื่องจากไซโทพลาซึม และออร์แกเนลขดแน่น เช่นเดียวกับโครมาทินที่ขดแน่นบริเวณขอบนิวเคลียสดูคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ดีเอ็นเอหักเป็นท่อนบริเวณระหว่าง nucleosome ภายในเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิดการหลั่งโปรตีนในช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรีย และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase จึงทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เยื่อหุ้มเซลล์ยื่นนูนเป็นตุ่ม (membrane blebbing) และหลุดออกเกิดเป็น apoptotic body ภายในบรรจุไปด้วยไซโทพลาซึม และออร์แกเนลที่อัดแน่น อาจมีหรือไม่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ และด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์มีการแสดงออกของ phosphatidylserine ทำให้เซลล์ข้างเคียง หรือเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น macrophage เก็บกินด้วยวิธี phagocytosis ในภายหลัง ซึ่ง Annexin V เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับ phosphatidylserine ได้อย่างจำเพาะจึงถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ดังนั้นการตายแบบ apoptosis จึงไม่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบเนื่องจากออร์แกเนล และองค์ประกอบภายในเซลล์จะถูกอัดแน่นอยู่ภายใน apoptotic body ไม่มีการปลดปล่อยออกมา แตกต่างจากการตายแบบ necrosis รวมทั้ง apoptotic body จะถูกเก็บกินอย่างรวดเร็ว และเซลล์ที่เก็บกินไปนั้นก็ไม่ผลิต anti-inflammatory cytokines อีกด้วย แต่ในกรณีที่ไม่มีเซลล์มาเก็บกิน apoptotic body เช่น การเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเพาะเลี้ยง เยื่อหุ้มของ apoptotic body จะฉีกขาด และมีการปล่อยองค์ประกอบที่ทำให้เกิดการอักเสบ (inflammatory content) ออกมา (Saraste and Pulkki, 2000; Elmore, 2007; Krysko *et al*., 2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1.2 กลไกการตายแบบ apoptosis ในระดับโมเลกุล

การตายแบบ apoptosis เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ซับซ้อน และอาศัยพลังงานจาก ATP ถูกชักนำได้ทั้งจากสัญญาณภายนอก และภายในเซลล์ ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิถี คือ วิถีจากภายนอก (extrinsic or death receptor pathway) เหนี่ยวนำผ่าน death receptor หรือเอนไซม์ granzyme จาก T-cell mediated cytotoxicity ในระบบภูมิคุ้มกัน และวิถีจากภายใน (intrinsic or mitochondrial pathway) มีไมโทคอนเดรีย และ apoptosome เป็นตัวกลาง (Jin and El-Deiry, 2005) ทั้งสองวิถีที่กล่าวมาเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ตัวกลางสำคัญ ได้แก่ caspase (cysteinyl aspartic acid protease) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น proteolytic activity สามารถตัดโปรตีนที่ตำแหน่ง aspartic acid residue ในสภาวะปกติอยู่ในรูป inactive proenzyme หลังจากถูกกระตุ้นสามารถกระตุ้น procaspase อื่นๆต่อไป ทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ procaspase (Elmore, 2007; Huerta *et al*., 2007)

1) วิถีภายนอก (extrinsic or death receptor pathway)

การตายของเซลล์จากวิถีภายนอกเกิดจาก transmembrane receptor-mediated interaciton เมื่อ death receptor บนเยื่อหุ้มเซลล์จับกับ cytokine ที่เป็น death signal หรือ death ligand ตัวอย่าง death ligand และ death receptor ได้แก่ FasL/FasR (fatty acid synthetase ligand/fatty acid synthetase receptor), TNF-α/TNFR1 (tumor necrosis factor alpha/tumor necrosis factor receptor 1), Apo3L/DR3 (Apo3 ligand/death receptor 3) เป็นต้น ทำให้เกิดการถ่ายทอดสัญญาณจากเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ (intracellular signaling pathway) ผ่านทาง death domain ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ death receptor ที่อยู่ภายในเซลล์ โดยชักนำ cytoplasmic adaptor protein ที่จำเพาะ เช่น การจับกันระหว่าง FasL/FasR ชักนำ FADD (Fas-associated death domain) และการจับกันระหว่าง TNF-α/TNFR1 ชักนำ TRADD (TNF receptor-associated death domain) และไปชักนำ FADD และ RIP (receptor-interacting protein) ต่อไป ซึ่ง FADD ที่ถูกชักนำจะใช้ death domain ด้าน N-terminal จับกับ death receptor และใช้ DED (death effector domain) ด้าน C-terminal จับกับ procaspase-8 เกิดเป็น DISC (death-inducing signaling complex) ส่งผลให้ procaspase-8 ถูกกระตุ้นได้เป็น caspase-8 ซึ่ง caspase-8 จะไปกระตุ้น procasepase-3 โดยตรง หรือไปสลาย Bid (BH3 interacting domain death agonist) ซึ่งเป็น Bcl-2 family protein (B-cell lymphoma protein 2) กลุ่ม pro-apoptotic protein ในไซโทซอล ให้อยู่ในรูป t-Bid (truncated Bid) โดย t-Bid จะไปกระตุ้น Bax (BCL2 associated X protein) ให้มาเกาะที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโท

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คอนเดรีย ทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis จากวิถีภายใน (intrinsic or mitochondrial pathway) (Elmore, 2007; Huerta et al., 2007; Iannolo *et al*., 2008)

2) วิถีจากภายใน (intrinsic or mitochondrial pathway)

การตายของเซลล์ที่เกิดจากวิถีภายในเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ต่อเซลล์ และไมโทคอนเดรีย โดยไม่ผ่านการกระตุ้นตัวรับ (receptor) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับวิถีนี้ได้แก่ การขาด growth factor ฮอร์โมน และ cytokine การได้รับรังสีหรือสารพิษ การติดเชื้อไวรัส ภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) ภาวะไข้สูง (heperthermia) อนุมูลอิสระ ความเสียหายของดีเอ็นเอ เป็นต้น การกระตุ้นจากปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบนเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรียในการควบคุมการเข้าออกของสาร (mitochondrial outer membrane permeabilization: MOMP) ในสภาวะปกติการผ่านเข้าออกของสารบนเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียจะถูกควบคุมด้วยโปรตีนกลุ่ม anti-apoptotic protein เช่น Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2), Bcl-xL (BCL2 related protein, long isoform) เป็นต้น เมื่อเกิดการตายของเซลล์ผ่านวิถีภายนอก (extrinsic pathway) หรือเกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ โปรตีน Bax ในภาวะปกติอยู่ในไซโทซอล จะถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่มาเกาะที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย ทำให้เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเสียสมดุล เกิดช่อง mitochondrial permeability transition (MPT) pore และสูญเสียการควบคุมศักย์ไฟฟ้าบนเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial transmembrane potential) เกิดการปลดปล่อย pro-apoptotic protein ภายในไมโทคอนเดรียสู่ไซโทพลาสซึม ได้แก่ cytochrome C ซึ่ง cytochrome C จะไปกระตุ้น caspase-dependent mitochondrial pathway โดยไปจับกับ Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor) ทำให้ Apaf-1 เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามารถจับกับ procaspase-9 หลังจากนั้น cytochrome C, Apaf-1 และ procaspase-9 รวมกันโดยอาศัยพลังงาน ATP เกิดเป็น holoenzyme complex เรียกว่า apoptosome (Zou *et al.,* 1999; Saraste and Pulkki, 2000; Elmore, 2007; Huerta *et al.*, 2007; Iannolo *et al*., 2008) apoptosome ที่เกิดขึ้นสามารถกระตุ้น procaspase-9 ได้เป็น caspase-9 ซึ่ง caspase-9 จะไปกระตุ้น executioner or effector caspase ได้แก่ procaspase-3 โดย caspase-3 ที่เกิดจากการกระตุ้น procaspase-3 จะไปสลาย CAD-ICAD (Caspase-Activated DNAse- Inhibitor of CAD) ที่อยู่ในไซโทซอล ทำให้ CAD เป็นอิสระ และเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียส CAD จะไปตัดสาย DNA บริเวณ linker DNA ที่อยู่ระหว่าง nucleosome ได้เป็นท่อนของ DNA ขนาด 180 base pair หรือเป็นจำนวนเท่าของ 180 หลายท่อน เมื่อทำการศึกษาด้วยวิธี gel electrophoresis จึงเห็นเป็นขั้นบันได (DNA ladder) (Iannolo *et al*., 2008) เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จึงเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ และการขดแน่นของโครมาทิน รวมทั้ง caspase-3 ยังไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระตุ้น cytoplasmic endonuclease ทำให้เกิดการสลายของ nuclear material และกระตุ้นเอนไซม์ protease ทำให้เกิดการสลาย neuclear protein และ cytoskeleton ซึ่งเป็นโครงสร้างภายในเซลล์ จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และชีวเคมีภายในเซลล์ เหนี่ยวนำให้เกิดการจัดเรียง และเปลี่ยนโครงสร้างของเซลล์เกิดเป็น apoptotic body อีกด้วย (Elmore, 2007)

5.2 Necrosis

การตายของเซลล์แบบ necrosis เกิดจากเซลล์ได้รับบาดเจ็บ หรือได้รับเคมีที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ การตายแบบนี้ทำให้เซลล์เกิดการบวม เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ น้ำและไอออนต่างๆ เข้าไปสะสมภายในเซลล์ ออร์แกเนลทำงานผิดปกติ เกิด cytoplasmic vacuole โครงสร้างของเซลล์ถูกทำลาย ภายในนิวเคลียส โครมาทินรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนขดแน่น และเกาะติดอยู่กับเยื่อหุ้มนิวเคลียส นิวเคลียสเกิดช่องว่าง เนื่องจากโครมาทินถูกย่อยสลาย เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอได้เป็นท่อนขนาดใหญ่ จากการทำงานของ serine protease ชักนำการทำงานของ endonuclease มากกว่า caspase (Trump *et al*., 1997; Vercammen *et al*., 1997; Denecker *et al*., 2001) ในท้ายสุดเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการฉีกขาด องค์ประกอบภายในเซลล์ รวมทั้งเอนไซม์ถูกปลดปล่อยออกมายังเซลล์ข้างเคียง หรือเนื้อเยื่อรอบๆ ทำให้เกิดการอักเสบเป็นบริเวณกว้าง ไม่สามารถควบคุมได้ ต่างจากการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Saraste and Pulkki, 2000; Elmore, 2007)

ในเซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อเกิดการตายแบบ apoptosis และไม่มีเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น macrophage หรือเซลล์ข้างเคียงมาเก็บกิน apoptotic body ด้วยวิธี phagocytosis ทำให้ภายหลังเยื่อหุ้มของ apoptotic body จะฉีกขาด ปลดปล่อยองค์ประกอบภายใน และสลายไป จึงเห็นลักษณะการตายเหมือนการตายแบบ necrosis (Krysko *et al*., 2008)

5.3 ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการตายของเซลล์

5.3.1 ฤทธิ์ของสารสกัดโปร่งฟ้าต่อการตายของเซลล์

จากรายงานที่ผ่านมา พบว่าพืชในสกุล *Clausena* สามารถชักนำเซลล์ตายแบบ apoptosis ได้ เช่น สาร 3-methylcarbazole และ girinimbine เป็นสารกลุ่ม carbazole alkaloid ที่แยกได้จากสารสกัดลำต้น *Clausena dunniana* Levl. ด้วยเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction มีฤทธิ์ชัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำเซลล์ mouse temperature-sensitive $p34^{cdc2}$ mutant cell line (tsFT210) ตายแบบ apoptosis ได้ เมื่อบ่มเซลล์ tsFT210 กับสารทั้งสองชนิด ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 17 ชั่วโมง และนำมาตรวจสอบรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อมสี Hoechst 33258 พบว่าเซลล์มีลักษณะเหี่ยว นิวเคลียสขดแน่น และเกิด apoptotic body ชี้ให้เห็นลักษณะการตายแบบ apoptosis (Cui *et al.*, 2002)

พืชสกุล *Clausena* ยังมีสารกลุ่มอื่นที่สามารถชักนำเซลล์ตายแบบ apoptosis ได้ เช่น dentatin เป็นสารกลุ่ม coumarin แยกได้จากสารสกัดรากสันโศก *C. excavata* Burm. f. ด้วยเฮกเซน โดยวิธีการแช่ มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก 2 ชนิด ได้แก่ PC-3 (androgen-independent) และ LNCaP (androgen-dependent) prostate cancer cell line เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 7.5 ไมโครโมลต่อลิตร นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิดมีลักษณะเหี่ยว นิวเคลียสขดแน่น และแตกออก เมื่อย้อมเซลล์ด้วย Annexin V พบว่ามีการแสดงออกของ phosphatidylserine บนเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียเสียสภาพ ทำให้ระดับ cytochrome C ในไซโทซอลสูงขึ้น รวมทั้งระดับยีน caspase-3, caspase-8 และ caspase-9 สูงขึ้น ในขณะที่ยีน Bcl-2 และ Bcl-xL (antiapototic gene) ลดลง แสดงให้เห็นว่าสาร dentatin สามารถชักนำเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก PC-3 และ LNCaP prostate cancer cell line ตายแบบ apoptosis ได้ (Arbab *et al.*, 2012) เช่นเดียวกับสาร dentatin ที่แยกได้จากสารสกัดรากสันโศก *C. excavata* Burm. f. ด้วยคลอโรฟอร์ม โดยวิธีการแช่ ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ชักนำเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 (estrogen receptor-positive human breast adenocarcinoma cell) ตายแบบ apoptosis เช่นกัน เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดนาน 24 ชั่วโมง (Arbab *et al.*, 2013)

5.3.2 ฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการตายของเซลล์

สาร β-sitosterol เป็นสารกลุ่ม phytosterol ที่พบในพืชหลายชนิด รวมทั้งพืชสกุล *Vernonia* เมื่อนำสาร β-sitosterol ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลต่อลิตร มาบ่มกับเซลล์มะเร็ง U937 และ HL60 human leukemia cell นาน 96 ชั่วโมง พบว่าสาร β-sitosterol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด โดยชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis มีระดับของ caspase-3 เพิ่มมากขึ้น เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอ พบว่ามีการแตกหักของดีเอ็นเอ เกิด DNA ladder รวมทั้งเซลล์หยุดในระยะ G_2/M phase (Moon *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับสาร vernolide-A ซึ่งเป็นสารกลุ่ม sesquiterpene lactones แยกได้จากสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ เมื่อบ่มเซลล์มะเร็ง B16F-10 melanoma cell กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.01-0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชั่วโมง พบว่าสาร vernolide-A สามารถชักนำเซลล์มะเร็ง B16F-10 melanoma cell ตายแบบ apoptosis ได้ โดยเซลล์มีลักษณะเหี่ยว เยื่อหุ้มเซลล์โป่งออก เกิด apoptotic body นอกจากนี้เมื่อเซลล์ได้รับสารที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง พบ DNA ladder ชี้ให้เห็นการแตกหักของดีเอ็นเอ เมื่อตรวจสอบวัฏจักรเซลล์ พบว่าเซลล์หยุดในระยะ sub-G_1 รวมทั้งพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ได้แก่ p53 (tumor suppressor gene), caspase-9, caspase-3 และ Bax (proapototic gene) เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ Bcl-2 ลดลง จึงสามารถสรุปได้ว่าสาร vernolide-A สามารถชักนำเซลล์มะเร็ง B16F-10 melanoma cell ตายแบบ apoptosis ผ่านวิถี caspase-9-mediated intrinsic pathway รวมทั้งยับยั้ง antiapoptotic transcription factor เช่น NF-ĸB, c-Fos และ CREB (cAMP response element-binding) อีกด้วย (Pratheeshkumar and Kuttan, 2011b)

นอกจากนี้สารสกัดน้ำใบ *Vernonia amygdalina* ก็สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 cell ได้ โดยชักนำเซลล์ตายแบบ apoptosis เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดที่ความเข้มข้น 250-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง นำเซลล์มาย้อมด้วย Annexin V และ propidium iodide (PI) พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์มีการแสดงออกของ phosphatidylserine แสดงให้เห็นถึงลักษณะการตายแบบ apoptosis (Yedjou *et al.*, 2013)

6. การศึกษาความเสียหายต่อดีเอ็นเอด้วยการเกิดไมโครนิวเคลียส

ไมโครนิวเคลียสพบในเซลล์ที่เกิดการแบ่งเซลล์เสร็จสิ้นแล้ว แต่ละอันของไมโครนิวเคลียส ประกอบด้วยชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกิดการขาดหรือหักบริเวณเซนโทรเมียร์ (acentric fragment) หรือทั้งหมดของโครโมโซม ซึ่งเกิดจากเส้นใยสปินเดิลไม่สามารถดึงโครโมโซมแยกไปทางขั้วของเซลล์แต่ละด้านได้ในระยะแอนาเฟส เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะเทโลเฟส เกิดการสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบโครโมโซมที่หัก และชิ้นส่วนที่แยกออกไป หลังจากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะอินเตอร์เฟส โครโมโซมคลายตัว จึงทำให้เห็นนิวเคลียสที่มีขนาดเล็กกว่านิวเคลียสหลัก เรียกว่า ไมโครนิวเคลียส (micronucleus) เนื่องจากไมโครนิวเคลียสจะพบได้หลังจากเกิดการแบ่งเซลล์ เพื่อให้ง่ายต่อการศึกษาจึงมีการเติมสารยับยั้งการแบ่งไซโทพลาซึม (cytokinesis) ได้แก่ cytochalasin-B (cyt-B) ทำให้เกิดลักษณะเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส (binucleated cell) หลังจากการแบ่งเซลล์เสร็จสิ้น ซึ่งการตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอจากการเกิดไมโครนิวเคลียส ด้วยวิธี cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay เป็นวิธีการตรวจสอบที่ง่าย สามารถตรวจสอบความเสียหายต่อดีเอ็นเอ (genotoxicity) และความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ของสารทดสอบได้ เช่น การแตกหักของโครโมโซม (chromosome fragment) การจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม (chromosome

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

rearrangement) การสูญหายของโครโมโซม (chromosome loss) การยับยั้งการแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์แบบ apoptosis หรือ necrosis (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2003; Platel *et al.*, 2009; Hashimoto *et al.*, 2011)

Ruta graveolens เป็นพืชในวงศ์ Rutaceae เช่นเดียวกับโปร่งฟ้า เมื่อป้อนสารสกัดใบกับลำต้น *R. graveolens* ด้วยเมทานอล โดยวิธีการแช่ ที่ความเข้มข้น 400 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ให้กับหนูขาวเล็ก สายพันธุ์ Swiss Albino อายุ 4 สัปดาห์ วันละ 1 ครั้ง นาน 1 เดือน เมื่อนำเม็ดเลือดแดงจากไขกระดูกมาตรวจสอบ พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม มีการเกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีค่าโมเมนต์หางของเซลล์ไขกระดูกเพิ่มมากขึ้น จาก 4.5±2.5 เป็น 50.2±25.2 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด จากการตรวจสอบความเสียหายต่อดีเอ็นเอ ด้วยวิธี comet assay แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกับลำต้น *R. graveolens* ด้วยเมทานอล โดยวิธีการแช่ มีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอได้ เมื่อได้รับสารสกัดนี้ต่อเนื่องเป็นเวลานาน (Preethi *et al.*, 2008)

สาร β-sitosterol เป็นสารกลุ่ม phytosterol พบในพืชสกุล *Vernonia* จากการศึกษาของ Villaseñor *et al.* (2002) นำหนูขาวเล็ก สารพันธุ์ Swiss Albino อายุ 7-12 สัปดาห์ กระตุ้นให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ ด้วย tetracycline หลังจากนั้นฉีดสาร β-sitosterol ที่แยกได้จากสารสกัดใบสะระแหน่ *Mentha cordifolia* Opiz ด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม บริเวณช่องท้อง เมื่อตรวจสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสในเม็ดเลือดแดงจากไขกระดูก พบว่าสาร β-sitosterol สามารถลดความเสียหายต่อดีเอ็นเอจาก tetracycline ได้ โดยมีการเกิดไมโครนิวเคลียสลดลง เท่ากับ 65.3 เปอร์เซ็นต์ และการเกิดไมโครนิวเคลียสจากสาร β-sitosterol ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ก็ไม่แตกต่างกับหนูปกติ สรุปได้ว่าสาร β-sitosterol ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลดความเสียหายต่อดีเอ็นเอได้ แต่จากการตรวจสอบความเสียหายต่อดีเอ็นเอของสารสกัดน้ำส่วนเหนือดิน *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Asteraceae เช่นเดียวกับหญ้าดอกขาว เมื่อเซลล์ Vero cell บ่มกับสารสกัดน้ำ ที่ความเข้มข้น 10-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 4 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำ ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เซลล์ Vero cell เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ ตรวจสอบด้วยวิธี comet assay และสารสกัดน้ำ ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ฉีดเข้าบริวเวณช่องท้องหนูขาวเล็ก สายพันธุ์ Balb/c อายุ 8-12 สัปดาห์ เมื่อครบ 24 ชั่วโมง พบว่ามีความเสียหายต่อดีเอ็นในเซลล์เม็ดเลือดแดงจากไขสันหลัง มีการเกิดไมโครนิวเคลียสมากกว่าหนู

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปกติ ดังนั้นในการนำสารสกัดน้ำส่วนเหนือดิน *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC มาใช้ประโยชน์ควรคำนึงถึงความเข้มข้น เพื่อความปลอดภัยต่อสารพันธุกรรม (Sabini *et al.*, 2013)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัด

สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีลักษณะเป็นผลึกหยาบ สีเขียวอ่อนแกมน้ำตาล มีกลิ่นหอมเย็น ส่วนสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีลักษณะเป็นผลึกละเอียด สีเขียวเข้มแกมน้ำตาล สารสกัดทั้ง 2 ชนิดได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

1.1 การเตรียมสารสกัดเพื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เตรียมสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และหญ้าดอกขาวทั้งต้นในน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ความเข้มข้นสุดท้ายดังข้างต้น เก็บสารให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

1.2 การเตรียมสารสกัดเพื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ เตรียมสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาว และสารผสมโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาว อัตราส่วน 1:1 (v/v) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 เตรียมสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 20, 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (GIBCO, USA) (ภาคผนวก) กรองด้วย ultrafilter membrane (Whatman, UK) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร เก็บสารให้พ้นแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในการศึกษา

2.1 การเพาะเลี้ยงลิมโฟไซต์ของมนุษย์

ตัวอย่างเลือดได้รับความอนุเคราะห์จากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี โดยผู้ชำนาญเฉพาะทางเป็นผู้เจาะเลือด และใช้เฮพาริน (LEO, Denmark) เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว นำเลือดมาปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ตามความหนาแน่นของเซลล์ (density gradient centrifugation) ด้วย Ficoll-Paque PLUS (GE healthcare, Sweden) (Chen *et al*., 2009) โดยใช้เลือด 2 มิลลิลิตร เจือจางใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 (ภาคผนวก) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมลงในหลอดที่มี Ficoll-Paque PLUS 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich Universal 32 R, Germany) ที่ความเร็ว 400×g อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เซลล์ลิมโฟไซต์จะอัดตัวแน่นเป็นแถบสีขาวอยู่ระหว่างชั้นของ Ficoll-Paque PLUS กับพลาสมา ดูดเซลล์ลิมโฟไซต์มาผสมใน PBS ปริมาณ 4 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 100×g อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อล้างเกล็ดเลือดออก เลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยอาหาร RPMI 1640 (GIBCO, USA) , fetal bovine serum (BIOCHROM, Germany) 10 เปอร์เซ็นต์ และ phytohemagglutinin (PHA: BIOLOGICAL INDUSTRIES, Israel) 2 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเบาๆ บ่มในตู้บ่ม (Forma Scientific 3194, USA) ที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง

2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ TK6

TK6 เป็นเซลล์ลิมโฟบลาสต์ของมนุษย์ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยอาหาร RPMI 1640, fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มในตู้บ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2-3 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.1 DPPH radical scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay เป็นวิธีการทดสอบที่ง่าย และให้ผลรวดเร็ว โดยสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนไอออนหรือเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระของ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว ทำให้อนุมูลอิสระ DPPH ไม่เป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป ทำให้สารละลายเปลี่ยนสีจากม่วงเป็นเหลือง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (Brand-Williams *et al*., 1995) ผสมสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม แต่ละความเข้มข้น ปริมาณ 10 ไมโครลิตร กับสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH: Sigma, USA) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 190 ไมโครลิตร โดยใช้ ascorbic acid ความเข้มข้น 1, 2, 4, 8 และ 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐาน กลุ่มควบคุมใช้น้ำกลั่น เติมลงในถาดหลุมชนิด 96 หลุม ทิ้งไว้ 30 นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (Biotek PowerWave XS, USA) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มควบคุม} - \text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มทดลอง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

หลังจากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาคำนวณหาค่า inhibition concentration ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) (Bonina *et al*., 2000)

3.2 Superoxide radical scavenging assay

อนุมูลอิสระ Superoxide anion radical ($O_2^{-\cdot}$) จัดอยู่ในกลุ่ม reactive oxygen species เป็นอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ อีกมากมาย เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2) hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) และ singlet oxygen ($^1O_2$) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และดีเอ็นเอ ทำให้เกิดโรคต่างๆ ได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ เป็นต้น รวมทั้งทำให้เกิดความชรา (ageing) (Shukla *et al*., 2006) ในการทดลองนี้อนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ NADH กับ PMS อนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ NBT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้สาร diformazan ที่มีสีน้ำเงิน สารต้านอนุมูลอิสระจะจับกับ $O_2^{-\cdot}$ ทำให้ diformazan ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ กับ NBT ลดลง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (Gomes *et al*., 2007) ตรวจสอบสารสกัดความเข้มข้นเดียวกันกับการทดลอง 3.1 โดยใช้สารสกัด ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารตามลำดับ ในถาดหลุมชนิด 96 หลุม ดังนี้ 43 ไมโครโมลาร์ nitroblue tetrazolium chloride (NBT) 60 ไมโครลิตร 166 ไมโครโมลาร์ β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) หรือ potassium phosphate buffer (ภาคผนวก) 60 ไมโครลิตร และ 2.7 ไมโครโมลาร์ phenazine methosulfate (PMS) 60 ไมโครลิตร โดยสารทั้งหมดจาก Sigma (USA) NBT, NADH และ PMS ละลายใน 0.1 โมลาร์ potassium phosphate buffer pH 7.4 ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ในที่มืด อุณหภูมิห้อง superoxide anion radical ($O_2^{-\cdot}$) ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ NBT ได้สาร diformazan ที่มีสีน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ superoxide ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มควบคุม - ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มทดลอง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

หลังจากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาคำนวณหาค่า IC_{50} (Gomes *et al*., 2007)

4. การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6

4.1 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay

นำเซลล์ลิมโฟไซต์ใส่ถาดหลุมชนิด 96 หลุม หลุมละ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมสารสกัดใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนกลุ่มควบคุม (negative control) เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มในตู้บ่มนาน 24 และ 48 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ TK6 ทำวิธีการเดียวกันกับเซลล์ลิมโฟไซต์ แต่เติมสารสกัดใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20, 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มนาน 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ทั้ง 2 การทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อบ่มเซลล์กับสารสกัดครบกำหนดเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT: Invitrogen, USA) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย PBS ลงไป 10 ไมโครลิตร หุ้มถาดเลี้ยงเซลล์ด้วยแผ่นอลูมิเนียมเพื่อไม่ให้ถูกแสง บ่มเซลล์ต่อในตู้บ่ม นาน 4 ชั่วโมง MTT จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ mitochondrial reductase จากไทโทคอนเดรียในเซลล์ที่มีชีวิต ได้เป็นผลึก formazan สีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อครบเวลา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติม dimethyl sulfoxide (DMSO: Fisher Scientific, UK) 150 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan (Mosmann, 1983; Alley *et al*., 1988) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 และ 650 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษ (% cytotoxicity) ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษ} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มควบคุม - ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มทดลอง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

หลังจากนั้นนำเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษที่ได้มาคำนวณหาค่า IC_{50} (Mosmann, 1983)

4.2 การตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ ด้วยวิธี double-staining method (Wang *et al.,* 2005)

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ คือ double-staining method โดยนำเซลล์มาย้อมด้วยสี 2 ชนิด ได้แก่ acridine orange (AO) และ ethidium bromide (EB) ซึ่งเป็นสีฟลูออเรสเซนต์ ใช้แยกเซลล์มีชีวิต และเซลล์ตายได้ โดยใช้คุณสมบัติเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ สี AO สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอ สามารถย้อมติดทั้งเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ให้แสงสีเขียวเมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ส่วน EB ไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ที่มีชีวิตได้ แต่จะเข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอของเซลล์ที่ตายแล้ว เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียคุณสมบัติเยื่อเลือกผ่านไป และให้แสงสีส้มแดง (ปกป้อง และคณะ, 2550) โดยสีทั้งสองชนิดสามารถแยกความแตกต่างของเซลล์ได้เป็น 4 แบบ คือ 1) เซลล์ปกติ นิวเคลียสติดสีเขียวของ acridine orange และไม่มีการหดตัว 2) เซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ระยะแรก นิวเคลียสติดสีเขียว และมีการหดตัว หรือแตกหัก 3) เซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ระยะท้าย หรือ necrosis นิวเคลียสติดสีแดงส้มของ ethidium bromide มีการหดตัว หรือแตกหัก และ 4) เซลล์ที่เกิด necrosis นิวเคลียสติดสีแดงส้ม ไม่มีการหดตัวของนิวเคลียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2.1 นำเซลล์ลิมโฟไซต์ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมสารสกัดจากใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนกลุ่มควบคุม (negative control) เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มในตู้บ่มนาน 48 ชั่วโมง

4.2.2 เมื่อครบกำหนดเวลา เก็บเกี่ยวเซลล์ใส่ลงใน microcentrifuge tube นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์จะตกลงมารวมกันอยู่ที่ก้นหลอด ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้เหลือประมาณ 10-20 ไมโครลิตร

4.2.3 ล้างเซลล์ โดยเติมสารละลาย PBS ปริมาณ 150 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

4.2.4 เติมสารละลาย PBS 10 ไมโครลิตรลงใน microcentrifuge tube หลังจากนั้นดูดเซลล์ 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย PBS ซึ่งมี acridine orange ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปประมาณ 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.2.5 หยดเซลล์ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ประมาณ 10 ไมโครลิตร ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (Olympus BX51, USA) และบันทึกผล ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4.3 การตรวจสอบรูปแบบการตาย และการวิเคราะห์ความเสียหายของดีเอ็นเอ ด้วยอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ TK6 โดยวิธี cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay (ดัดแปลงจาก Zhan *et al.*, 2004 และ Hashimoto *et al.*, 2011)

4.3.1 นำเซลล์ TK6 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมสารสกัดจากหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20, 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มควบคุม (negative control) เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ และเติม mitomycon C (MMC) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นกลุ่ม positive control เนื่องจาก MMC มีคุณสมบัติเป็นสาร mitogen

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บ่มเซลล์ในตู้บ่ม ก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์ 18 ชั่วโมง เติม cytochalasin B ความเข้มข้น 4.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเกิด cytokinesis หลังจากนั้นบ่มเซลล์กับสารสกัดต่อจนครบ 24 ชั่วโมง

4.3.2 เมื่อครบกำหนดเวลา เก็บเกี่ยวเซลล์ใส่ลงใน microcentrifuge tube นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 60×g นาน 8 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์จะตกลงมารวมกันอยู่ที่ก้นหลอด ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้เหลือประมาณ 10-20 ไมโครลิตร

4.3.3 ล้างเซลล์ โดยเติมสารละลาย PBS ปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 60×g นาน 8 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

4.3.4 เติมสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.075 โมลต่อลิตร ที่นำไปปรับอุณหภูมิให้ใกล้เคียง 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ มีสภาวะเป็น hypotonic solution ช่วยทำให้เซลล์พองตัว และโครโมโซมภายในเซลล์จะกระจายออก ทำให้ง่ายต่อการศึกษา

4.3.5 เมื่อครบกำหนดเวลา เติมน้ำยาคงสภาพ carnoy fixative (methanol : gracial acetic acid = 3:1 (v/v)) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 60×g นาน 8 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

4.3.6 เติมสารละลายเมทานอลที่มีกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่เย็นจัด ปริมาณ 150 ไมโครลิตร เป่าเซลล์ให้กระจาย และหยดลงแผ่นสไลด์ที่สะอาด แผ่นละ 50 ไมโครลิตร เมื่อเซลล์แผ่ออก ให้หยดสารละลายเมทานอลที่มีกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่เย็นจัดตามลงไป 50 ไมโครลิตร ตากแผ่นสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3.7 นำสไลด์ที่แห้งแล้ว มาย้อมด้วย acridine orange ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ และบันทึกผลทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยนับเซลล์แต่ละความเข้มข้น จำนวน 1,500 เซลล์ แบ่งเป็นเซลล์ที่มี 1 นิวเคลียส 2 นิวเคลียส และมากกว่า 2 นิวเคลียส นำมาคำนวณหาค่า cytokinesis block proliferation index (CBPI) ดังสมการ

$$\text{CBPI} = \frac{[1N + (2\times 2N) + (3\times >2N)]}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}$$

โดย 1N คือ จำนวนเซลล์ที่มี 1 นิวเคลียส 2N คือ จำนวนเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส และ >2N คือ จำนวนเซลล์ที่มีมากกว่า 2 นิวเคลียส

หลังจากนั้นนำค่า CBPI มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (% cytostasis) ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์} = 100 - 100\left[\frac{\text{CBPI ของเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ - 1}}{\text{CBPI ของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ - 1}}\right]$$

ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis ของเซลล์ TK6 จากเซลล์ปกติ แต่ละความเข้มข้น จำนวน 1,200 เซลล์ แล้วนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียส โดยนับจำนวนเซลล์ที่เกิดไมโครนิวเคลียสจากเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส (binucleated cell) แต่ละความเข้มข้น จำนวน 1,200 เซลล์ และนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียส ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียส} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่เกิดไมโครนิวเคลียสทั้งหมด}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยภายในสารสกัดชนิดเดียวกัน และระหว่างสารสกัดทั้งสามชนิด โดยวิธี Tukey Range Test และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างสารสกัดสองชนิด ด้วย Independent t-test จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.1 DPPH radical scavenging assay

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ยกเว้นสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้ม 1 และ 10 ไมโครกรัมกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5) โดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำเรียงจากประสิทธิภาพสูงไปต่ำดังนี้ ใบโปร่งฟ้า สารผสม และหญ้าดอกขาวทั้งต้น เท่ากับ 431.72, 610.22 และ 664.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เทียบกับ ascorbic acid ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐาน เท่ากับ 6.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าจึงมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าสารอีกสองชนิด แต่ก็ยังต่ำกว่า ascorbic acid คิดเป็น 67 เท่า เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดน้ำทั้งสามชนิด ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า ที่ความเข้มข้นทุกระดับ ยกเว้นที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้น 1-10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)

ความเข้มข้น	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH		
(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ใบโปร่งฟ้า	หญ้าดอกขาวทั้งต้น	สารผสม (1:1 v/v)
1	$4.42\pm0.274^{a*}$	$1.29\pm0.327^{a**}$	$1.73\pm0.085^{a**}$
10	$14.08\pm1.088^{b*}$	$3.17\pm0.151^{a**}$	$4.23\pm0.482^{b**}$
100	$25.23\pm0.283^{c*}$	$12.84\pm0.644^{b**}$	$15.94\pm0.162^{c***}$
1,000	$47.85\pm0.379^{d*}$	$51.42\pm2.154^{c*}$	$53.57\pm0.929^{d*}$
10,000	$92.04\pm0.428^{e*}$	$89.17\pm0.095^{d**}$	$87.66\pm0.285^{e***}$

หมายเหตุ a, b, c, d, e แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในสารชนิดเดียวกัน

*, **, *** แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละสารในความเข้มข้นเดียวกัน

จากรายงานสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดเปลือกลำต้นโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ที่ความเข้มข้น 10-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ ascorbic acid เท่ากับ 5.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Fakruddin *et al.*, 2012) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดลำต้นกับใบหญ้าดอกขาวด้วยเมทานอล โดยวิธีการแช่ ที่ความเข้มข้น 0.98-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า IC_{50} เท่ากับ 82 ± 3.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับ butyl hydroxyl toluene (BHT) และ ascorbic acid ซึ่งเป็นสารละลายมาตรฐาน เท่ากับ 22 ± 0.39 และ 5.0 ± 0.003 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Haque *et al.*, 2012b)

สรุปได้ว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าสารสกัดเปลือกลำต้นด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ถึง 136 เท่า ในทำนองเดียวกันสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าสารสกัดลำต้นและสารสกัดใบด้วยเมทานอล โดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการแช่ ถึง 9 เท่า ชี้ให้เห็นว่าสารบางชนิดในโปร่งฟ้า และหญ้าดอกขาวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสารที่มีขั้วต่ำกว่าน้ำ จึงสามารถละลายออกมาในแอลกอฮอล์ได้เป็นปริมาณมากกว่า รวมทั้งส่วนประกอบของพืชแต่ละส่วนมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน จึงทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างกัน

1.2 Superoxide radical scavenging assay

เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสมเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ยกเว้นสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าที่ความเข้มข้น 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ได้ ส่วนสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้น 1 กับ 10 และ 1,000 กับ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นการต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) (ตารางที่ 6) โดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำเรียงจากประสิทธิภาพสูงไปต่ำ ดังนี้ หญ้าดอกขาวทั้งต้น สารผสม และใบโปร่งฟ้า เท่ากับ 70.10, 94.53 และ 369.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เทียบกับ ascorbic acid เท่ากับ 21.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นจึงมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ดีกว่าสารอีกสองชนิด แต่ยังต่ำกว่า ascorbic acid ถึง 3.2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ของสารสกัดทั้งสามชนิด ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารสกัดน้ำจากหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ มากกว่าสารสกัดอีกสองชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้นอื่น สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน และสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า ที่ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ยกเว้นที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน และจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ตรวจสอบด้วยวิธี Superoxide radical scavenging assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)

ความเข้มข้น	เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ superoxide		
(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ใบโปร่งฟ้า	หญ้าดอกขาวทั้งต้น	สารผสม (1:1 v/v)
1	nd	$3.46\pm0.242^{a*}$	$4.76\pm0.358^{a**}$
10	nd	$5.61\pm0.253^{a*}$	$7.13\pm0.874^{a*}$
100	$13.27\pm0.963^{a*}$	$68.00\pm1.040^{b**}$	$48.41\pm1.108^{b***}$
1,000	$64.35\pm0.694^{b*}$	$96.40\pm0.300^{c**}$	$94.92\pm0.448^{c**}$
10,000	$98.35\pm0.426^{c*}$	$98.15\pm0.133^{c*}$	$98.14\pm0.569^{c*}$

หมายเหตุ nd ไม่สามารถตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

a, b, c แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในสารชนิดเดียวกัน

*, **, *** แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละสารในความเข้มข้นเดียวกัน

ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ของผล *C. lansium* ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกับโปร่งฟ้า นำมาสกัดด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ หลังจากนั้นสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตต และแยกสารบริสุทธิ์ คือ 8-hydroxypsoralen มาทดสอบเปรียบเทียบกับ BHT ที่ความเข้มข้น 12.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบด้วยเอทิลอะซิเตต และสาร 8-hydroxypsoralen มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ และสารสกัดหยาบ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสาร 8-hydroxypsoralen และ BHT โดยสารสกัดหยาบ สาร 8-hydroxypsoralen และ BHT ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 88 ± 2.2, 30 ± 1.4 และ 25 ± 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Prasad *et al.*, 2010) และจากการศึกษาของ Kumar and Kuttan (2009) พบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ที่ความเข้มข้น 10-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ เหมือนกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 190 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปได้ว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ดีกว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ถึง 4 เท่า ชี้ให้เห็นว่าสารบางชนิดในหญ้าดอกขาวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ เป็นสารที่มีขั้วมาก จึงสามารถละลายออกมาในน้ำได้ปริมาณมากกว่าในแอลกอฮอล์

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ $O_2^{-\cdot}$ ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ชี้ให้เห็นว่าสารแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด และสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ดีที่สุด ในขณะที่สารผสม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดรองลงมา ประสิทธิภาพที่แตกต่างกันนี้เนื่องจากพืชทั้งสองชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน โดยโปร่งฟ้า มีสารกลุ่ม carbazole alkaloid (Chakraborty *et al*., 1995) และ coumarin (Sohrab *et al.*, 2000) ส่วนหญ้าดอกขาว มีสารกลุ่ม sterol, triterpenoid, sesquiterpene lactone, flavonoid และ saponin (Sangeetha and Venkatarathinakumar, 2011) ซึ่งสารเหล่านี้มีสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) เป็นองค์ประกอบจึงทำให้สารสกัดมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ ในการทดลองนี้สกัดใบโปร่งฟ้า และหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยน้ำ ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูง สารที่ละลายออกมาจึงเป็นกลุ่มสารที่มีขั้ว จากการตรวจสอบปริมาณฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลชนิดหนึ่งที่พบมากในพืชจากสารสกัดผลลิ้นจี่ *Litchi chinensis* ด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน บิวทานอล เอทิลอะซิเตต เอทานอล น้ำ พบว่าสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์มากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดด้วยบิวทานอล น้ำ และเฮกเซน ตามลำดับ (Zhao *et al.*, 2006) เช่นเดียวกับการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดผลมะไฟจีน *C. lansium* ด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน บิวทานอล เอทิลอะซิเตต เอทานอล น้ำ พบว่าสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต มีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดด้วยน้ำ เอทานอล บิวทานอล และเฮกเซน ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดด้วยน้ำ เอทานอล บิวทานอล และเฮกเซน ตามลำดับ และจากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ พบว่า สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ สารสกัดด้วยบิวทานอล เอทานอล น้ำ และเฮกเซน ตามลำดับ (Prasad *et al.*, 2009) ดังนั้นตัวทำละลายที่ต่างกันจึงมีผลทำให้ชนิดและปริมาณสารสำคัญในพืชละลายออกมาได้แตกต่างกันตามความมีขั้วของสาร จากรายงานข้างต้นจะเห็นได้ว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำได้ดีกว่าสารประกอบฟีนอล และจากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ $O_2^{-\cdot}$ ในตัวทำละลายต่างกัน สามารถสรุปได้ว่า สารประกอบฟีนอล อาจจะมีฤทธิ์ต้าน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ในขณะที่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ อาจจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ดีกว่าสารประกอบฟีนอล

นอกจากตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญที่พบในสารสกัดแล้ว ส่วนของพืชที่นำมาสกัดก็มีผลเช่นเดียวกัน จากการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอล และฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบ ลำต้น และดอกผักบุ้งฝรั่ง *Ipomoea carnea* ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการแช่ พบว่าสารสกัดแต่ละส่วนของพืชมีปริมาณสารเหล่านี้แตกต่างกัน โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลพบมากในสารสกัดจากดอก ใบ และลำต้น ตามลำดับ และฟลาโวนอยด์พบมากในสารสกัดจากดอก ลำต้น และใบ ตามลำดับ (Khatiwora *et al.*, 2010) เช่นเดียวกับการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลในสารสกัดเปลือกลำต้น ดอก และฝักแก่ราชพฤกษ์ หรือคูน *Cassia fistula* ด้วยเมทานอล โดยวิธี soxhlet extraction และสารสกัดใบด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ พบว่าสารสกัดเปลือกลำต้น มีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดจากใบ ดอก และฝักแก่ ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดมาตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า สารสกัดเปลือกลำต้นมีประสิทธิภาพดีที่สุด และสารสกัดจากใบ ดอก และผลแก่ มีประสิทธิภาพรองลงมาตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ พบว่าสารสกัดเปลือกลำต้น มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดใบเช่นเดียวกัน ในขณะที่สารสกัดดอก และฝักแก่ ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้ (Siddhuraju *et al.*, 2002) จากการตรวจสอบทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบของพืชแต่ละส่วนมีปริมาณสารสำคัญของพืชต่างกัน แม้ว่าจะสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม แม้ว่าพืชทั้งสองชนิดจะสกัดด้วยน้ำเหมือนกัน แต่ส่วนประกอบของพืชที่นำมาสกัด และองค์ประกอบทางเคมีของพืชต่างกัน โดยสารสกัดใบน้ำใบโปร่งฟ้า และสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาว ต่างมีสารสำคัญที่มีสารประกอบฟีนอลเหมือนกัน แต่สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า อาจมีสารประกอบฟีนอลที่มากกว่าจึงทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่า ส่วนสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาว มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ จึงทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ได้ดีกว่า ดังนั้นประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้งสามชนิดนี้จึงแตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารละลายมาตรฐาน คือ ascorbic acid พบว่าพืชทั้งสองชนิดในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยวหรือรูปแบบสารผสมไม่สามารถที่จะนำมาใช้ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH แม้ว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าจะมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ดีกว่าสารอีกสองชนิด แต่ก็ยังต่ำกว่า ascorbic acid ถึง 67 เท่า แต่เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ กลับพบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นเหมาะที่จะนำมาใช้ต้านอนุมูลอิสระชนิดนี้ แม้ว่าจะมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพต่ำกว่า ascorbic acid แต่ก็ต่ำกว่าเพียง 3.2 เท่า เช่นเดียวกับสารผสมที่มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ รองลงมา เมื่อเทียบกับ ascorbic acid ก็ต่ำกว่าเพียง 4.3 เท่า ดังนั้นสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถนำมาใช้ต้านอนุมูอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ได้

2. การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6 ด้วยวิธี MTT assay

2.1 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ นาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ในสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 7) โดยมีค่า IC_{50} เรียงลำดับจากค่าต่ำไปสูง ที่ 24 ชั่วโมงของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ใบโปร่งฟ้า และสารผสม เท่ากับ 1.47×10^3, 6.20×10^8 และ 1.06×10^9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1.04×10^3, 9.44×10^3 และ 2.17×10^4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากค่า IC_{50} จะเห็นว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีผลทำให้เซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ตายมากที่สุด และสารผสมมีผลทำให้เซลล์ตายน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ในสารสกัดทั้งสามชนิด ที่ความเข้มข้นเดียวกัน นาน 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นทุกความเข้มข้น มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและสารผสม มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ลิมโฟไซต์น้อยกว่าและใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับเซลล์ที่ได้รับสารสกัดนาน 48 ชั่วโมง สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า ที่ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มากกว่าสารทั้งสองชนิด และสารผสมทุกความเข้มข้นยกเว้นที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ลิมโฟไซต์น้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าที่ความเข้มข้นต่ำ และได้รับเป็นเวลานาน ทำให้เกิดการตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ได้มากกว่าสารสกัดอีกสองชนิด และจากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นสาร 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์น้อยมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ หลังจากได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์					
	ใบโปร่งฟ้า		หญ้าดอกขาวทั้งต้น		สารผสม	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
1	$4.22\pm0.107^{a*}$	$11.04\pm0.450^{a*}$	$7.26\pm0.428^{a**}$	$5.01\pm0.432^{a**}$	$2.24\pm0.398^{a***}$	$3.94\pm0.560^{a**}$
10	$5.99\pm0.469^{a*}$	$17.18\pm0.930^{b*}$	$10.74\pm0.191^{b**}$	$7.57\pm0.015^{a**}$	$5.17\pm0.162^{b*}$	$7.39\pm0.243^{b**}$
100	$8.61\pm0.315^{b*}$	$24.88\pm0.440^{c*}$	$13.41\pm0.121^{b**}$	$23.64\pm1.229^{b*}$	$6.88\pm0.363^{b***}$	$9.04\pm0.294^{b**}$
1,000	$14.63\pm0.746^{c*}$	$44.51\pm0.399^{d*}$	$49.19\pm0.802^{c**}$	$48.57\pm0.638^{c**}$	$8.92\pm0.557^{c***}$	$26.56\pm0.454^{c***}$
10,000	$27.70\pm0.294^{d*}$	$49.48\pm0.658^{e*}$	$71.69\pm0.950^{d**}$	$74.15\pm0.854^{d**}$	$28.58\pm0.491^{d*}$	$56.92\pm0.683^{d***}$

หมายเหตุ a, b, c, d, e แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในสารและช่วงเวลาเดียวกัน

*, **, *** แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละสารในความเข้มข้นและช่วงเวลาเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6

ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ TK6 ได้ปรับความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 20, 100, 500 และ 1500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อความเหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้จากการตรวจสอบความเป็นพิษในเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ แล้วบ่มเซลล์กับสารสกัดนาน 12, 24 และ 48 ชั่วโมง เนื่องจากเซลล์ TK6 มี doubling time ที่ 12-14 ชั่วโมง (Platel *et al.*, 2009) จากการบ่มเซลล์ TK6 กับสารสกัดทั้งสามชนิด นาน 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ TK6 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เหมือนกับการทดลองความเป็นพิษในเซลล์ลิมโฟไซต์ (ตารางที่ 8) โดยมีค่า IC_{50} เรียงลำดับจากค่าต่ำไปสูง ที่ 12 ชั่วโมงของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น สารผสม และใบโปร่งฟ้า เท่ากับ 6.90×10^{2}, 2.87×10^{4} และ 5.13×10^{12} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 4.89×10^{2}, 9.02×10^{3} และ 2.33×10^{10} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 2.72×10^{2}, 3.93×10^{3} และ 4.05×10^{6} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากค่า IC_{50} จะเห็นว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีผลทำให้เซลล์ TK6 ตายมากที่สุด และสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าทำให้เซลล์ TK6 ตายน้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ TK6 ในสารสกัดทั้งสามชนิด ที่ความเข้มข้นเดียวกัน นาน 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นทุกความเข้มข้น มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ TK6 มากที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสารผสม มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ TK6 รองลงมา และสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ TK6 น้อยที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)

สารสกัด	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์		
		12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ใบโปร่งฟ้า	20	$0.61\pm0.265^{a*}$	$1.81\pm0.178^{a*}$	$3.86\pm0.770^{a*}$
	100	$3.79\pm0.572^{a*}$	$4.97\pm0.188^{b*}$	$6.16\pm0.396^{ab*}$
	500	$9.59\pm0.555^{b*}$	$8.28\pm0.141^{c*}$	$9.18\pm1.005^{b*}$
	1,500	$12.81\pm1.174^{b*}$	$18.35\pm0.511^{d*}$	$32.87\pm0.831^{c*}$
หญ้าดอกขาวทั้งต้น	20	$4.74\pm0.168^{a**}$	$10.13\pm0.225^{a**}$	$15.61\pm0.180^{a**}$
	100	$11.24\pm0.564^{b**}$	$14.18\pm0.487^{b**}$	$24.95\pm0.739^{b**}$
	500	$52.34\pm0.752^{c**}$	$56.99\pm0.541^{c**}$	$69.49\pm1.451^{c**}$
	1,500	$91.01\pm0.300^{d**}$	$95.97\pm0.452^{d**}$	$97.42\pm0.073^{d**}$
สารผสม	20	$2.08\pm0.354^{a***}$	$6.46\pm0.691^{a***}$	$9.49\pm0.549^{a***}$
	100	$9.20\pm0.353^{b**}$	$12.19\pm0.117^{b***}$	$17.84\pm0.587^{b***}$
	500	$28.19\pm0.329^{c***}$	$30.39\pm0.404^{c***}$	$28.87\pm0.830^{c***}$
	1,500	$44.95\pm1.019^{d***}$	$55.22\pm0.564^{d***}$	$65.47\pm1.213^{d***}$

หมายเหตุ a, b, c, d แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในสารและช่วงเวลาเดียวกัน

*, **, *** แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละสารในความเข้มข้นและช่วงเวลาเดียวกัน

จากเกณฑ์ของ Gad Shayne ได้จัดระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากธรรมชาติแบ่งออกเป็น 4 ระดับ คือ 1) สารสกัดที่มีพิษรุนแรงมาก มีค่า IC_{50} น้อยกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2) สารสกัดที่มีพิษรุนแรง มีค่า IC_{50} ระหว่าง 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 3) สารสกัดที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีพิษปานกลาง มีค่า IC_{50} ระหว่าง 100-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 4) สารที่ไม่มีความเป็นพิษ มีค่า IC_{50} มากกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Shirazi *et al*., 2004) ดังนั้นจากค่า IC_{50} ของสารสกัดทั้งสามชนิดต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6 สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และสารผสมจึงไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิด ส่วนสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์ TK6 แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์

จากการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ของวิภา (2554) ด้วยสารสกัดใบโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ พบว่ามีความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ ที่ความเข้มข้น 1-10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 และ 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นความเป็นพิษต่อเซลล์ เท่ากับ 11.70±0.08 ถึง 96.61±0.05 และ 16.32±0.68 ถึง 100.41±0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 4.12×10^{2} และ 2.25×10^{2} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (วิภา, 2554) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 6.20×10^{8} และ 9.44×10^{3} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถสรุปได้ว่า ที่ 24 ชั่วโมง สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์น้อยกว่ามาก เมื่อเทียบกับสารสกัดด้วยเอทานอล และที่ 48 ชั่วโมงสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล ถึง 42 เท่า

จากรายงานการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของสารสกัดลำต้นหญ้าดอกขาวด้วยเฮกเซน โดยวิธีการแช่ พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ที่ความเข้มข้น 0.19-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง โดยเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต (% cell viability) น้อยที่สุดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 95.77±12.91 เปอร์เซ็นต์ (Laosim *et al*., 2011) แต่สารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ กลับมีความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ ที่ความเข้มข้น 1-10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 และ 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นความเป็นพิษต่อเซลล์ เท่ากับ 29.97±2.98 ถึง 68.96±1.00 และ 30.94±2.23 ถึง 90.39±0.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1.98×10^{2} และ 1.09×10^{2} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1.47×10^{3} และ 1.04×10^{3} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (พรพิมล, 2554)ชี้ให้เห็นว่า ที่ 24 ชั่วโมงสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์น้อยกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล ถึง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.4 เท่า และที่ 48 ชั่วโมงสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล ถึง 9.5 เท่า

สรุปได้ว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์น้อยกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล และที่ผ่านมายังไม่พบรายงานความเป็นพิษของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และหญ้าดอกขาวทั้งต้น ต่อเซลล์ปกติเช่นกัน ดังนั้นเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ที่ตาย อาจเกิดจากเซลล์ที่ใช้ในการทดลองเป็นเซลล์ที่แยกได้จากกระแสเลือดโดยตรง (primary cell) เมื่อไม่ได้รับ PHA ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ จึงไม่มีการแบ่งเซลล์ ทำให้เซลล์ที่มีอยู่เมื่อหมดอายุขัยจึงตาย

ส่วนการตายของเซลล์ TK6 ที่ได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น อาจเป็นผลมาจากสารกลุ่ม sesquiterpene lactone ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดจากพืชในสกุล *Vernonia* (Chen *et al.*, 2006) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง เช่น vernolide-A และ vernolide-B แยกได้จากสารสกัดลำต้นหญ้าดอกขาวด้วยเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction ที่ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า vernolid-A มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง human KB (oral epidermoid carcinoma), DLD-1 (colon adenocarcinoma), NCI-661 (lung large cell carcinoma) และ Hela cell (cervix epitheloid carcinoma) โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 0.02, 0.05, 0.53 และ 0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสาร vernolide-B มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง KB, NCI-661 และ Hela cell มีค่า ED_{50} เท่ากับ 3.78, 5,88 และ 6.42 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Kuo *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นที่แยกได้จากพืชสกุล *Vernonia* ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ได้แก่ hirsutolide แยกได้จากสารสกัดส่วนเหนือดิน *V. bockiana* ด้วยเอทานอล โดยวิธี percolation มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง P388 cell line (mouse lymphoid tumor) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.73 ไมโครโมลต่อลิตร (Huo *et al.*, 2008) รวมทั้ง glaucolide และ hirsutinolide แยกได้จากสารสกัดใบ *V. scorpioides* ด้วยเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง HeLa cell มีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.1 ± 1.8 และ 3.3 ± 4.0 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ (Buskuhl *et al.*, 2010) เช่นเดียวกับสาร 8α-loxy-hirsutinolide-13-*O*-acetate แยกได้จากสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง HT29 colon adenocarcinoma cell และ HepG2 hepatoma cell โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.50 และ 4.27 ไมโครโมลต่อลิตร ตามลำดับ (Khay *et al.*, 2012) ซึ่งสาร sesquiterpene lactone บริสุทธิ์เหล่านี้แยกได้จากการสกัดด้วยเอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่าน้ำ การสกัดพืชด้วยน้ำจึงทำให้ได้สารเหล่านี้น้อยกว่าการสกัดด้วยเอทานอล ดังนั้นสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น จึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์น้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กว่าสารสกัดด้วยเอทานอล เมื่อได้รับสารสกัดเป็นเวลาเท่ากัน และการตายของเซลล์ TK6 ที่ได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น อาจเกิดจากสารกลุ่ม sesquiterpene lactone ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง เนื่องจากเซลล์ TK6 เป็นเซลล์ที่มีการเพิ่มจำนวนเหมือนกับเซลล์มะเร็ง

3. การตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6

3.1 การตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ ด้วยวิธี double-staining method

จากการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม โดยการย้อมเซลล์ด้วยสีเรืองแสง acridine orange และ ethidium bromide พบว่าที่ 24 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารสกัด มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์น้อยมาก ดังนั้นในการตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ จึงเลือกตรวจสอบที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารสกัด ซึ่งเป็นช่วงเวลา และความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารสกัดทั้งสามชนิดสามารถชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis โดยโครมาทินของเซลล์หดตัวแน่น นิวเคลียสแตกออก เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด เยื่อหุ้มเซลล์ยื่นโป่งออก (ภาพที่ 1) เปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis ระยะแรกและระยะท้ายของเซลล์ลิมโฟไซต์ เมื่อได้รับสารสกัด ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 9 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis ระยะแรก และระยะท้ายเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการตายแบบ apoptosis จากสารสกัดทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น (1.04×10^3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าสารสกัดทั้งสามชนิดมีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตมากกว่าเซลล์ตายแบบ apoptosis ระยะแรก และระยะท้าย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายแบบ apoptosis ทั้งระยะแรกและระยะท้าย โดยตรวจสอบรูปร่างของเซลล์ กับเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ที่ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay ซึ่งตรวจสอบการตายของเซลล์ด้วยการวัดเอนไซม์ในไมโทคอนเดรียของเซลล์มีชีวิต ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายแบบตรวจสอบจากรูปร่าง เท่ากับ 51.00 และ 59.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay ความเข้มข้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และเวลาเดียวกัน เท่ากับ 44.51□±0.399 และ 49.48±□0.658 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หญ้าดอกขาวทั้งต้น มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายแบบตรวจสอบจากรูปร่าง เท่ากับ 57.96 และ 90.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay ความเข้มข้นและเวลาเดียวกัน เท่ากับ 48.57±□0.638 และ 74.15±□0.854 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารผสมมีเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายแบบตรวจสอบจากรูปร่าง เท่ากับ 44.33 และ 65.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay ความเข้มข้น และเวลาเดียวกัน เท่ากับ 26.56±0.454 และ 56.92±0.683 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบจะเห็นได้ว่าสารสกัดทั้งสามชนิด มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายแบบตรวจสอบจากรูปร่าง มากกว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay เนื่องจากการตรวจสอบความเป็นพิษ ด้วยวิธี MTT assay จะวัดระดับเอนไซม์ mitochondrial reductase จากไมโทคอนเดรียในเซลล์มีชีวิตที่ลดลง แต่การตรวจสอบการตายจากรูปร่างด้วยการย้อมสีเรืองแสงนั้น เซลล์ที่มีชีวิตจะย้อมติดสี acridine orange และสามารถแยกได้เป็นเซลล์ปกติ กับเซลล์ตายแบบ apoptosis ระยะแรก จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การตายแบบตรวจสอบจากรูปร่างมีค่าสูงกว่า แต่อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์แบบ apoptosis ยังคงสอดคล้อง และเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay โดยสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นทำให้เซลล์ลิมโฟไซต์ตายแบบ apoptosis มากที่สุด รองลงมา คือ ใบโปร่งฟ้า และสารผสม ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

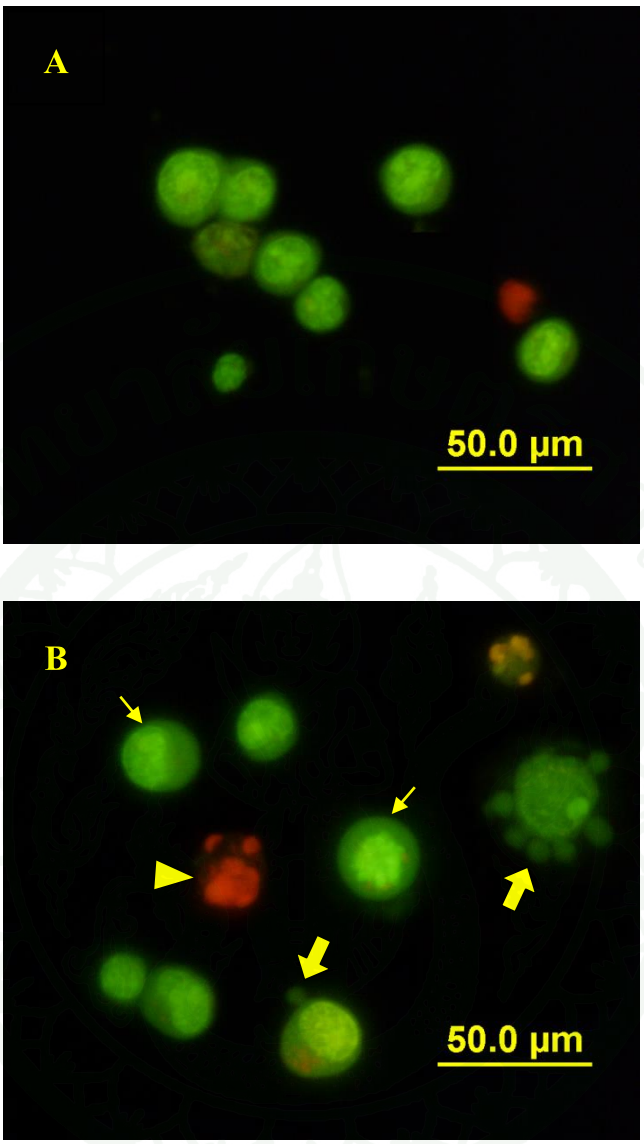
ตารางที่ 9 การตายแบบ apoptosis ของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ หลังจากได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี double-staining method (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)

สารสกัด	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เซลล์ (เปอร์เซ็นต์)		
		มีชีวิต	apoptosis ระยะแรก	apoptosis ระยะท้าย
ใบโปร่งฟ้า	0	65.00 ± 1.258^{a}	18.50 ± 0.764^{a}	16.50 ± 0.866^{a}
	1,000	$49.00\pm0.289^{b*}$	$29.17\pm0.833^{b**}$	$21.83\pm0.601^{b***}$
	10,000	$41.00\pm0.764^{c*}$	$28.00\pm0.764^{b**}$	$31.00\pm1.443^{c**}$
หญ้าดอกขาวทั้งต้น	0	65.00 ± 1.258^{a}	18.50 ± 0.764^{a}	16.50 ± 0.866^{a}
	1,000	$42.00\pm2.291^{b*}$	$29.17\pm1.856^{b**}$	$28.83\pm0.441^{b**}$
	10,000	$9.33\pm0.441^{c*}$	$11.67\pm0.601^{c*}$	$79.00\pm1.041^{c**}$
สารผสม	0	65.00 ± 1.258^{a}	18.50 ± 0.764^{a}	16.50 ± 0.866^{a}
	1,000	$55.67\pm1.014^{b*}$	$23.33\pm0.441^{b**}$	$21.00\pm1.000^{b**}$
	10,000	$34.83\pm1.364^{c*}$	$26.83\pm0.928^{c**}$	$38.33\pm0.601^{c*}$

หมายเหตุ a, b, c แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในสารและช่วงการมีชีวิต หรือการตายของเซลล์แบบเดียวกัน

*, **, *** แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละช่วงการมีชีวิต หรือการตายของเซลล์ในสารและความเข้มข้นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 เซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ หลังจากได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี double-staining method (acridine orange and ethidium bromide; fluorescense microscope, Olympus BX51, Japan)

A. เซลล์ปกติ นิวเคลียสติดสีเขียว ลักษณะกลมเกือบเต็มเซลล์

B. เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ระยะแรก นิวเคลียสติดสีเขียวและมีการหดตัว (ลูกศรเล็ก) เยื่อหุ้มเซลล์ยื่นโป่งออก (ลูกศรใหญ่) และเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ระยะท้าย (หัวลูกศร) นิวเคลียสติดสีแดง หดตัวแน่น และมีโครมาตินแตกออก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 การตรวจสอบรูปแบบการตายของเซลล์ TK6 ด้วยวิธี cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay

จากการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้น 20, 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 12, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และสารผสมไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 โดยสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีค่า IC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 2.33×10^{10} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงมาก แต่สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์ TK6 ดังนั้นในการตรวจสอบรูปแบบการตาย และความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ TK6 จึงเลือกตรวจสอบสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้น 20, 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง การตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอตรวจสอบจากการเกิดไมโครนิวเคลียส ด้วยวิธี cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay

เมื่อตรวจสอบเซลล์ TK6 ด้วยวิธี CBMN assay หลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (negative control), mitomycin C (MMC, positive control) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้น 20, 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง นำมาย้อมด้วยสี AO ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าในแต่ละเซลล์มีนิวเคลียสจำนวนแตกต่างกัน ดังภาพที่ 2 เมื่อนับเซลล์แยกตามจำนวนนิวเคลียสต่อหนึ่งเซลล์ และนำมาคำนวณค่า cytokinesis-block proliferation index (CBPI) ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ที่เกิดขึ้นในระยะเวลาที่เติมสาร cytochalasin B พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม มีค่า CBPI ลดลงตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด ยกเว้นสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า CBPI ลดลงไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด ($p < 0.05$) (ตารางที่ 10)

เมื่อเปรียบเทียบค่า CBPI ของสารสกัดน้ำทั้งสองชนิดกับ MMC ซึ่งเป็น positive control พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารผสม ที่ความเข้มข้น 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่า CBPI มากกว่า MMC แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) ชี้ให้เห็นว่าที่ความเข้นข้นนี้ของสารสกัดน้ำทั้งสองชนิดมีผลทำให้วัฏจักรเซลล์หรือการแบ่งเซลล์ลดลง ไม่แตกต่างจาก MMC ที่เป็น positive control เมื่อเปรียบเทียบค่า CBPI ของสารสกัดทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าไม่มีความแตกต่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4A) โดยสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นทุกความเข้มข้น ยกเว้นที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า CBPI น้อยกว่าสารผสม

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีผลทำให้วัฏจักรเซลล์ หรือการแบ่งเซลล์ของเซลล์ TK6 ลดลงมากกว่าสารผสม เมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นและเวลาเท่ากัน และจากการนำค่า CBPI มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (%cytostasis) พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น แต่น้อยกว่า MMC เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ทุกความเข้มข้น ยกเว้นที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าสารผสม (ตารางที่ 10) จากค่า CBPI และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ และไม่มีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ (mitogen) โดยสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีผลทำให้วัฏจักรเซลล์ หรือการแบ่งเซลล์ลดลง และมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ TK6 มากกว่าสารผสม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 ในขณะที่สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ สอดคล้องกับการวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัด ด้วยวิธี MTT assay

จากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ TK6 เหมือนกันกับสารสกัดหญ้าดอกขาวส่วนเหนือดินด้วยเอทานอล และคลอโรฟอร์ม โดยวิธี soxhlet extraction มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็ง Dalton's Ascitic Lymphoma (DAL) ในหนูขาวเล็ก ตรวจสอบโดยฉีดเซลล์มะเร็งเข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal injection) จากนั้นป้อนสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม นาน 14 วัน เมื่อครบกำหนดฆ่าหนูและตรวจนับเซลล์มะเร็ง พบว่าจำนวนเซลล์มะเร็งลดน้อยลง เมื่อเทียบกับหนูที่เป็นมะเร็งและไม่ได้รับสารสกัด (Sangeetha and Venkatarathinakumar, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าสาร vernolide-A ซึ่งเป็นสารกลุ่ม sesquiterpene lactone ที่แยกได้จากสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ มีฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ endothelial cell เช่นเดียวกัน โดยนำเซลล์ Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) ที่มี VEGF ซึ่งเป็น cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ มาทดสอบร่วมกับสาร vernolide-A และติดตามผลโดยวิธี ^{3}H-thymidine incorporation assay พบว่าสาร vernolide-A ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ HUVECs โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์เท่ากับ 51.28 เปอร์เซ็นต์ หรือ 2,184±162 เซลล์ต่อนาที (Pratheeshkumar and Kuttan, 2011a) การ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์นี้เกิดจากกระบวนการตรวจสอบในวัฏจักรเซลล์ เรียกว่า cell cycle checkpoint เพื่อตรวจสอบและป้องกันเซลล์ที่เกิดความเสียหายหรือยังไม่พร้อมเข้าสู่การแบ่งเซลล์ในระยะต่อไป โดยเซลล์ที่ผิดปกติจะหยุดในระยะใดระยะหนึ่งของวัฏจักรเซลล์ เพื่อซ่อมแซมความเสียหายให้เป็นปกติจึงเข้าสู่ระยะแบ่งเซลล์ต่อไป แต่ในเซลล์ที่เกิดความเสียหายจนไม่สามารถซ่อมแซมได้จะมีการชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis (Pucci *et al.*, 2000; Terradas *et al.*, 2010)

จากการตรวจสอบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ TK6 หลังจากได้รับอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (negative control), mitomycin C (MMC, positive control) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้น 20, 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี CBMN assay (ภาพที่ 3) พบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดมีผลทำให้เซลล์ TK6 ตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด ยกเว้นสารสกัดทั้งสองชนิด ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด ($p < 0.05$) (ตารางที่ 10) เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis ของสารสกัดทั้งสองชนิดกับ MMC พบว่าที่ความเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis มากกว่า MMC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่สารผสม มีเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis มากกว่า MMC ไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) และจากการเปรียบเทียบสารสกัดทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นทุกความเข้มข้น มีเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis มากกว่าสารผสม โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 100 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีเปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis มากกว่าสารผสม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4B) ดังนั้นสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นจึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 มากกว่าสารผสม โดยยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้วัฏจักรเซลล์หรือการแบ่งเซลล์ลดลง และชักนำให้เซลล์ TK6 ตายแบบ apoptosis มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัด ด้วยวิธี MTT assay ดังนั้นจากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าที่อยู่ในสารผสม ไม่มีส่วนช่วยลดเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ หรือการตายของเซลล์ ที่เกิดจากฤทธิ์ของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 การตายแบบ apoptosis ของเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay assay (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)

ความเข้มข้น	หญ้าดอกขาวทั้งต้น			สารผสม		
(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	CBPI	% cytostasis	% apoptosis	CBPI	% cytostasis	% apoptosis
control	1.327 ± 0.025^{a}	0.00	5.03 ± 0.309^{a}	1.327 ± 0.025^{a}	0.00	5.03 ± 0.309^{a}
mitomycin C	1.113 ± 0.006^{b}	65.38	9.58 ± 0.419^{b}	1.113 ± 0.006^{b}	65.38	9.58 ± 0.419^{b}
20	1.236 ± 0.033^{ac}	27.80	6.31 ± 0.534^{a}	1.205 ± 0.019^{c}	37.27	6.05 ± 0.122^{ac}
100	1.197 ± 0.021^{bc}	39.92	8.39 ± 0.181^{b}	1.201 ± 0.016^{c}	38.59	6.86 ± 0.315^{c}
500	1.186 ± 0.036^{bc}	43.28	9.53 ± 0.330^{b}	1.188 ± 0.014^{bc}	42.46	8.86 ± 0.275^{b}
1,500	1.171 ± 0.004^{bc}	47.86	11.41 ± 0.167^{c}	1.186 ± 0.014^{bc}	43.08	9.78 ± 0.217^{b}

หมายเหตุ CBPI (cytokinesis-block proliferation index) คือ ค่าเฉลี่ยวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ที่เกิดขึ้นในระยะเวลาที่เติมสาร cytochalasin B

% cytostasis คือ เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์

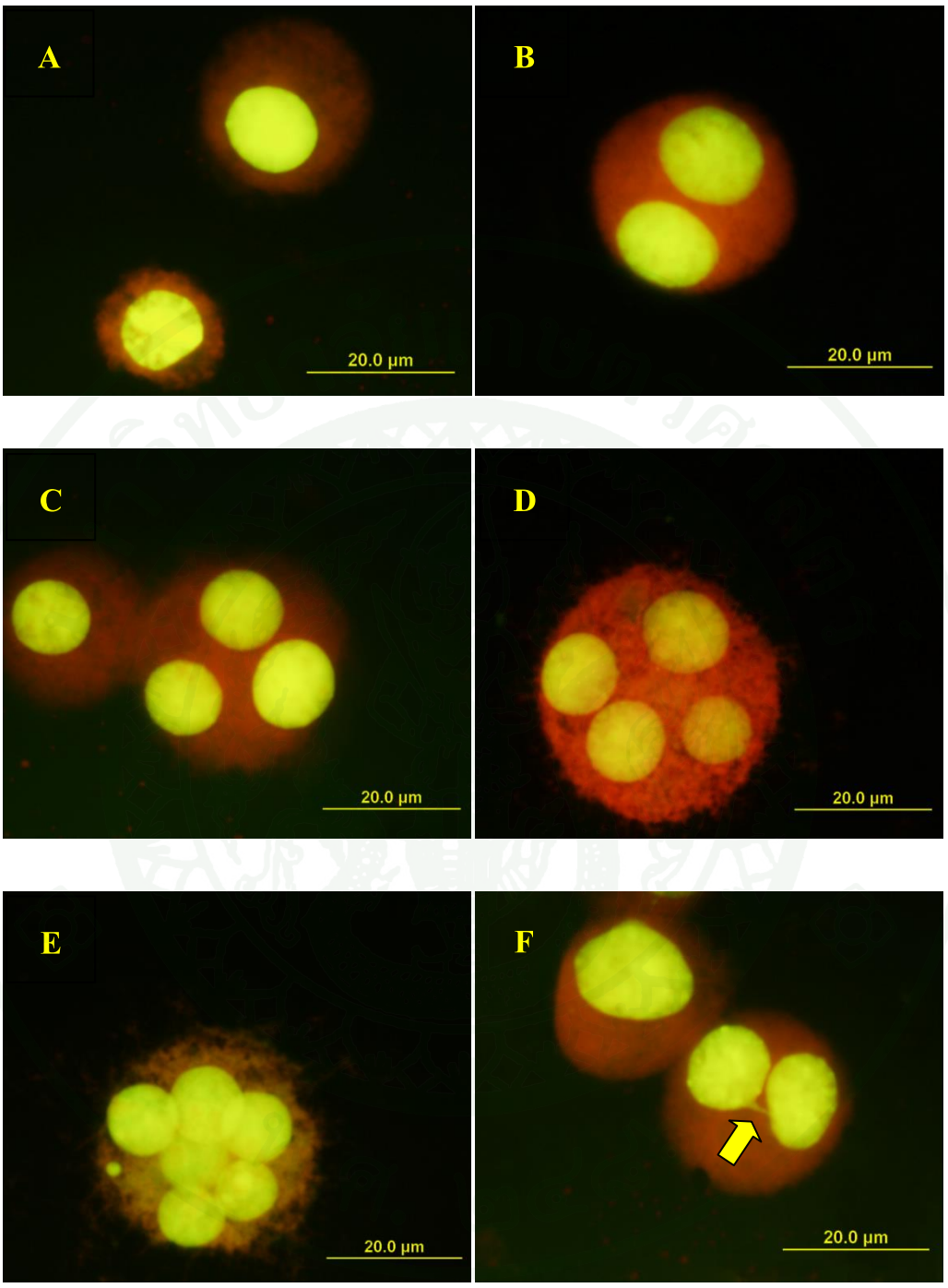
% apoptosis คือ เปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis

control (negative control) เติมอาหาร RPMI 1640 แทนการเติมสารใดๆ

mitomycin C (positive control) เติม mitomycin C ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

a, b, c แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในสารชนิดเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

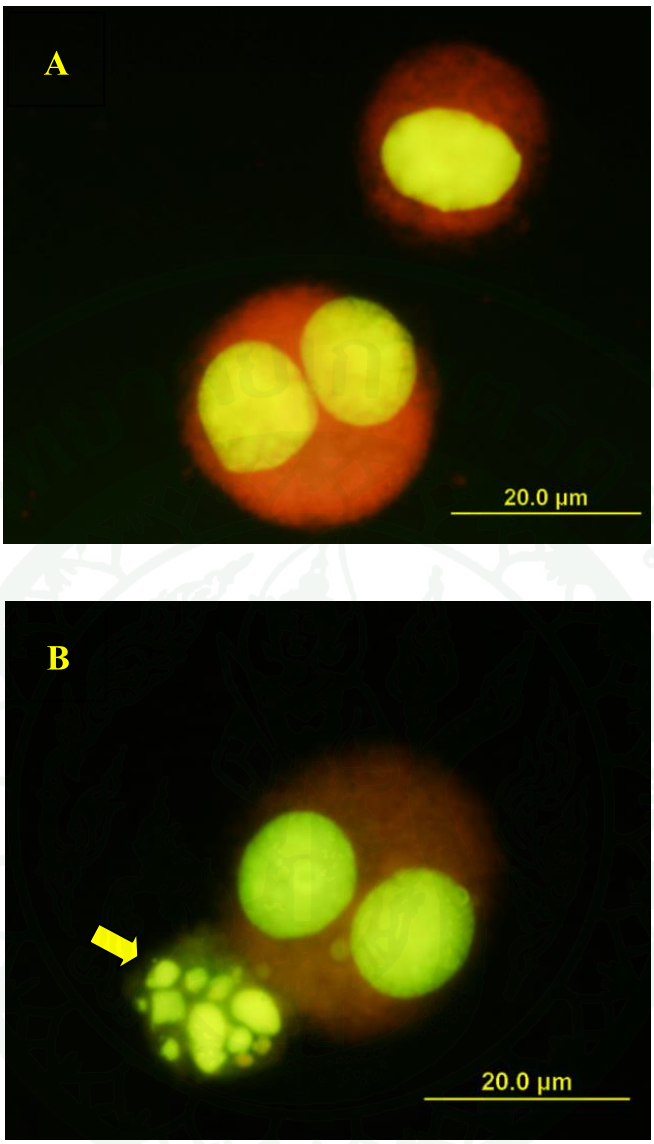


ภาพที่ 2 ลักษณะเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น (B, C, F) และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) (D, E) ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay

A. mononucleated cell B. binucleated cell ซึ่งไม่มีไมโครนิวเคลียส

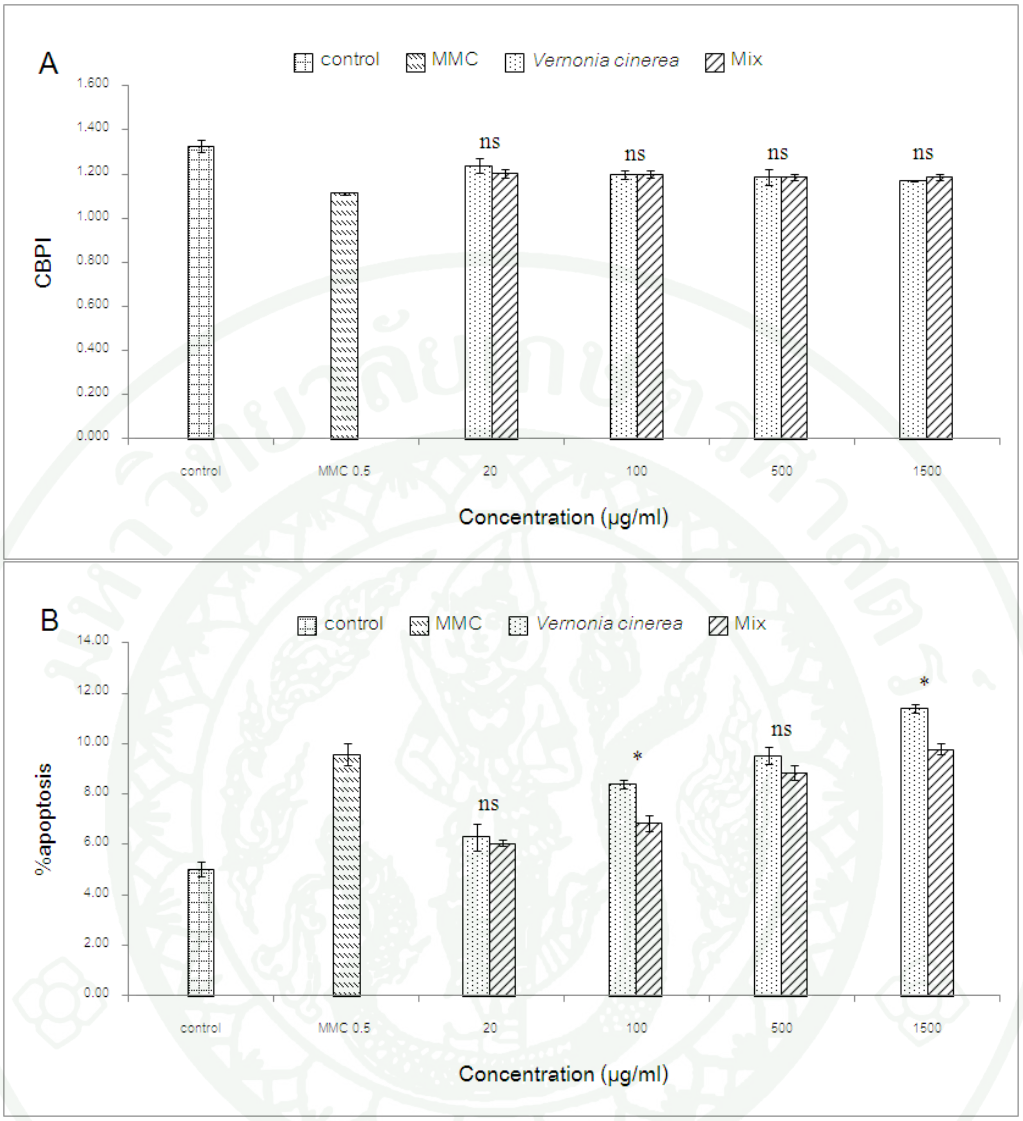
C.-E. multi-nucleated cell F. เซลล์ที่พบ nucleoplasmic bridge (ลูกศร)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 เซลล์ TK6 รูปร่างปกติ (A) และเซลล์ตายแบบ apoptosis (B) โดยมีนิวเคลียสแตกออกเป็นชิ้น (ลูกศร) หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 การตายแบบ apoptosis ของเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay

A. ค่าเฉลี่ยวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ที่เกิดขึ้นในระยะเวลาที่เติมสาร cytochalasin B (cytokinesis-block proliferation index: CBPI)

B. เปอร์เซ็นต์การตายแบบ apoptosis

ns แทนค่าเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบสารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน

* แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบสารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการทดลองนี้การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม พบว่าสารสกัดน้ำทั้งสามชนิดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์ และที่ผ่านมายังไม่พบรายงานว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และหญ้าดอกขาวทั้งต้น เป็นพิษต่อเซลล์ปกติเช่นกัน เมื่อตรวจสอบรูปร่างการตายของเซลล์ลิมโฟไซต์ ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ทำให้เซลล์ลิมโฟไซต์ตายแบบ apoptosis มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และสารผสม ตามลำดับ ดังนั้นการตายแบบ apoptosis ที่ตรวจพบ อาจเกิดจากการขาด PHA ทำให้เซลล์ลิมโฟไซต์ที่หมดอายุขัยตาย รวมทั้งความเป็นพิษจากองค์ประกอบทางเคมีของพืชทั้งสองชนิดที่นำมาทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 ของสารสกัดน้ำทั้งสามชนิด ที่ 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และสารผสม ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 แต่สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์ TK6 และจากการตรวจสอบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ TK6 ที่ได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้น 20, 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ทำให้เซลล์ TK6 ตายแบบ apoptosis มากกว่าสารผสม สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดน้ำทั้งสามชนิดสามารถชักนำให้เซลล์ลิมโฟไซต์ตายแบบ apoptosis ได้แต่น้อยกว่าเซลล์ TK6

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับการตรวจสอบเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์และเซลล์มะเร็ง myeloma หลังจากได้รับสารสกัดใบโปร่งฟ้าด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 และ 48 ชั่วโมง และสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 และ 48 ชั่วโมง พบเซลล์ลิมโฟไซต์ตาย แต่น้อยกว่าเซลล์มะเร็ง myeloma อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เช่นกัน (พรพิมล, 2554; วิภา, 2554) ซึ่งการตายของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดโปร่งฟ้า อาจเกิดจากสารกลุ่ม carbazole alkaloid ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในพืชสกุล *Clausena* เช่น สาร 3-methylcarbazole และ girinimbine ที่แยกได้จากสารสกัดลำต้น *C. dunniana* ด้วยเอทานอล โดยวิธี soxhlet extraction พบว่าสารที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 17 ชั่วโมง ชักนำให้เซลล์ tsFT210 (mouse temperature-sensitive $p34^{cdc2}$ mutant cell line) ตายแบบ apoptosis ได้ (Cui *et al.*, 2002) และการตายของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว อาจเกิดจากสารกลุ่ม sesquiterpene lactone ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในหญ้าดอกขาว เช่น สาร vernolide-A แยกได้จากสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล โดยการแช่ นำมาทดสอบที่ความเข้มข้น 0.01-0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ B16F-10 melanoma cell แต่เมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดนาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

48 ชั่วโมง พบเซลล์ตายแบบ apoptosis เห็น apoptotic body มีการแตกหักของดีเอ็นเอ มีการแสดงออกของยีนกลุ่ม proapoptotic ได้แก่ p53, Bax, caspase-9 และ caspase-3 เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง caspase-3 ทำให้ดีเอ็นเอแตกหัก และเซลล์เปลี่ยนแปลงรูปร่าง ในขณะที่ยีนกลุ่ม antiapoptotic ได้แก่ Bcl-2 ลดลง แสดงให้เห็นว่า vernolide-A สามารถชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis ได้ (Pratheeshkumar and Kuttan, 2011b) เช่นเดียวกับสารสกัดใบ *V. amygdalina* ด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์ human breast cancerous cell line 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ MCF-7 และ MDA-MB-231 นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ตายแบบ apoptosis มีการแสดงออกของ procaspase-7 procaspase-8 procaspase-9 Bcl-2 และ Bcl-xL ลดลง ในขณะที่การแสดงออกของ Bax และ Bak เพิ่มสูงขึ้น (Wong *et al.*, 2013) ดังนั้นจากการทดลองครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6 ในสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า อาจเกิดจากสารกลุ่ม carbazole alkaloid และสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น อาจเกิดจากสารกลุ่ม sesquiterpene lactone เมื่อนำสารสกัดน้ำทั้งสองชนิดมาผสมกันกลับพบว่าสามารถลดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ได้ ในขณะที่การตายแบบ apoptosis ของเซลล์ TK6 กลับเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าไม่สามรถลดความเป็นพิษของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นต่อเซลล์ TK6 ได้

ดังนั้นจากการวิเคราะห์ความเป็นพิษ และตรวจสอบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6 ที่ได้รับสารสกัดน้ำทั้งสามชนิด พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีความเป็นพิษและชักนำให้เซลล์ทั้งสองชนิดตายแบบ apoptosis มากที่สุด ซึ่งในการใช้หญ้าดอกขาวเพื่อช่วยในการอดบุหรี่นั้น อาสาสมัครจะดื่มชาหญ้าดอกขาวปริมาณ 3 กรัมต่อน้ำ 150 มิลลิลิตร วันละ 3 ครั้งหลังอาหาร (Wongwiwatthananukit *et al.*, 2009) ดังนั้นในแต่ละครั้งอาสาสมัครจะได้รับชาหญ้าดอกขาว ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น นาน 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.47×10^3 และ 1.04×10^3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาว ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เซลล์ลิมโฟไซต์ตายแบบ apoptosis เท่ากับ 57.96 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยในการใช้สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น จึงควรใช้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาคิดน้ำหนักแห้งของหญ้าดอกขาวทั้งต้น จากค่า %yield เท่ากับ 6.25 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดน้ำที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม จึงเท่ากับน้ำหนักแห้งหญ้าดอกขาวทั้งต้น 16 ไมโครกรัม ดังนั้นความเข้มข้นของชาหญ้าดอกขาวที่อาสาสมัครได้รับที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อมื้อนั้น ถือว่าปลอดภัยต่อเซลล์ลิมโฟไซต์ ถึงแม้ว่าความเข้นข้นนี้จะสูงกว่าน้ำหนักแห้งที่คิดได้เล็กน้อย แต่ก็ยังถือว่ามีความปลอดภัย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องจากเซลล์ลิมโฟไซต์นั้นเป็นเซลล์ที่มีประสิทธิภาพของระบบกำจัดพิษ (biotransformation) น้อยกว่าเซลล์อื่นๆ ในร่างกาย ในการทดลองนี้เซลล์จึงมีการตายมากเมื่อได้รับสารสกัด รวมทั้งหญ้าดอกขาวที่นำมาใช้นั้นอยู่ในรูปแบบชาละลายน้ำ สามารถกำจัดพิษได้ง่าย จึงถือได้ว่าที่ความเข้มข้นระดับนี้มีความปลอดภัยต่อการนำมาบริโภค

4. การวิเคราะห์ความเสียหายของดีเอ็นเอ ด้วยอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ TK6 ด้วยวิธี cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay

ในการวิเคราะห์ความเสียหายของดีเอ็นเอนั้น เซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์เป็น primary cell ที่มีอายุสั้น ในการทดสอบนี้เลือกใช้เซลล์ TK6 เนื่องจากเซลล์ TK6 เป็น cell line ของเซลล์ปกติจึงมีสารพันธุกรรมคงที่ นิยมและเป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้ตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอด้วยอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียส สามารถใช้เป็นตัวแทนเซลล์ทั่วไปได้ (Sobol *et al.*, 2012) จากการวิเคราะห์ความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ TK6 ด้วยวิธี CBMN assay โดยตรวจสอบอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส (binucleated cell) (ภาพที่ 5) พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม มีเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด (ตารางที่ 11) โดยสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้มข้น 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสมากกว่า MMC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนสารผสม ที่ความเข้มข้น 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสมากกว่า MMC แต่ไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นทุกความเข้มข้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสมากกว่าสารผสม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 6)

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม มีผลทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ TK6 โดยสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีผลทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอมากกว่าสารผสม สอดคล้องกับการตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์มะเร็ง myeloma ที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวทั้งต้นด้วยเอทานอล โดยวิธีการแช่ ที่ความเข้มข้น 1-10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 และ 48 ชั่วโมง ทดสอบโดยวิธี Comet assay พบว่าสารสกัดทุกความเข้มข้น ไม่มีผลทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ แต่ในเซลล์มะเร็ง myeloma ที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเสียหายของดีเอ็นเอเกิดขึ้นในระดับต่ำ (พรพิมล, 2554) เช่นเดียวกับสารสกัดใบ *V.*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

amygdalina ด้วยน้ำ โดยวิธีการแช่ ทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน โดยนำเซลล์ MCF-7 cell line มาทดสอบร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 0-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอเล็กน้อย (Yedjou *et al.*, 2008)

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ สารผสม และใบโปร่งฟ้า ตามลำดับ ซึ่งอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ เป็นอนุมูลอิสระเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ อีกมากมาย เช่น hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ (Shukla *et al.*, 2006) ดังนั้นความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ TK6 จากการได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น อาจเกิดจากสารสำคัญในหญ้าดอกขาวที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอมีฤทธิ์สูงกว่าสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อวิเคราะห์ค่า CBPI เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ เปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียส และการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ TK6 ที่ได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ที่ความเข้มข้น 20, 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีผลทำให้เซลล์ TK6 เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอมากกว่าสารผสม เซลล์จึงหยุดในระยะใดระยะหนึ่งของวัฏจักรเซลล์ ทำให้วัฏจักรเซลล์หรือการแบ่งเซลล์ลดลง มีการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น เมื่อเซลล์เกิดความเสียหายจนไม่สามารถซ่อมแซมได้ จึงชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis เซลล์ TK6 ที่ได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นจึงมีการตายแบบ apoptosis มากกว่าสารผสม ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดน้ำทั้งสองชนิดที่ควรนำมาใช้ เพื่อป้องกันความเสียหายต่อดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับ MMC ซึ่งเป็น positive control คือ สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารผสมทุกความเข้มข้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสไม่แตกต่างจาก MMC ($p < 0.05$) และจากการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 เมื่อได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น สารผสม และใบโปร่งฟ้า นาน 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT assay พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.89×10^{2}, 9.02×10^{3} และ 2.33×10^{10} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นในการนำสารสกัดมาใช้ในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยว สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าจึงมีความปลอดภัยมากที่สุด นอกจากนั้นการใช้สารสกัดในรูปแบบสารผสมอาจเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์ และความเสียหายต่อดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นเพียงอย่างเดียวได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อจัดระดับความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6 ตามเกณฑ์ของ Gad Shayne สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ แต่มีความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์ TK6 โดยมีค่า IC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1.47×10^{3} และ 4.89×10^{2} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เหมือนกันกับสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าจัดว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.20×10^{8} และ 2.33×10^{10} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) จัดว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ทั้งสองชนิดเช่นเดียวกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.06×10^{9} และ 9.02×10^{3} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่า IC_{50} ของเซลล์ TK6 ขัดแย้งกับเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ ที่ความเข้นข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า 55.22 ± 0.564 ทั้งนี้อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนของการกำหนดความเข้มข้นของสารผสมที่ยังไม่สูงมากพอ จึงมีผลต่อการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม การที่เซลล์ TK6 ตายเป็นผลมาจากสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวเท่านั้น สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าไม่ได้ช่วยในการลดฤทธิ์หรือเพิ่มฤทธิ์ของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวแต่อย่างใด แตกต่างจากการทดสอบสารผสมกับเซลล์ลิมโฟไซต์ที่มีสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าเป็นส่วนประกอบมีผลลดฤทธิ์ของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวได้บ้างเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ทั้งนี้อาจเป็นเพราะชนิดของเซลล์ ซึ่งจากการทดสอบสาร heptaphylline ที่สกัดได้จาก *C.harmandiana* กับ Vero cell ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ และจากการทดสอบสารสกัดใบโปร่งฟ้ากับเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ ได้ผลตรงกันคือไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ แต่เป็นพิษกับเซลล์มะเร็งหลายชนิด (วิภา, 2554; Songsinag *et al.*, 2011; Thongthoom *et al.*, 2011)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 ความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นและสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay (ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย)

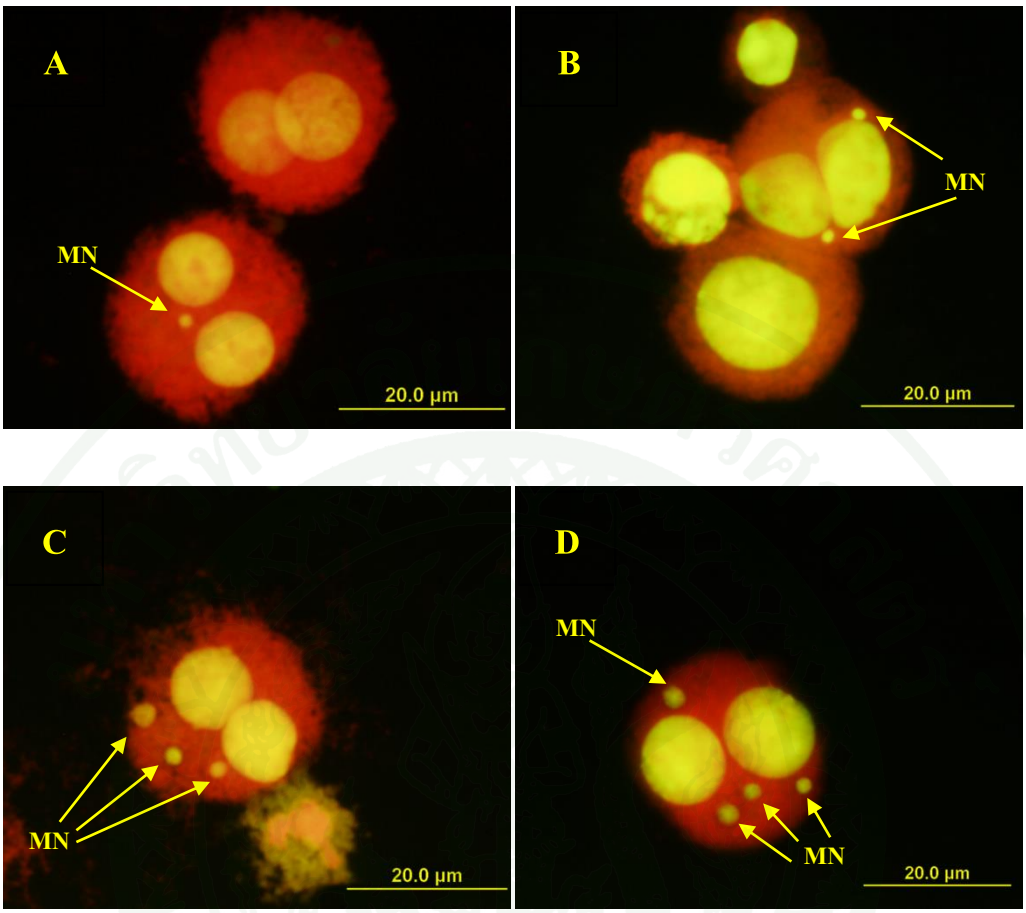
ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียส	
	หญ้าดอกขาวทั้งต้น	สารผสม
control	9.47±0.152[a]	9.47±0.152[a]
mitomycin C	16.27±0.660[b]	16.27±0.660[b]
20	17.05±0.520[bc]	14.90±0.730[b]
100	18.57±0.388[c]	14.86±0.839[b]
500	20.82±0.522[d]	16.86±0.640[b]
1,500	21.46±0.203[d]	17.79±0.475[b]

หมายเหตุ control (negative control) เติมอาหาร RPMI 1640 แทนการเติมสารใดๆ

mitomycin C (positive control) เติม mitomycin C ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

a, b, c, d แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบแต่ละความเข้มข้นในสารชนิดเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 จำนวนไมโครนิวเคลียส (MN) ใน binucleated cell ของเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay

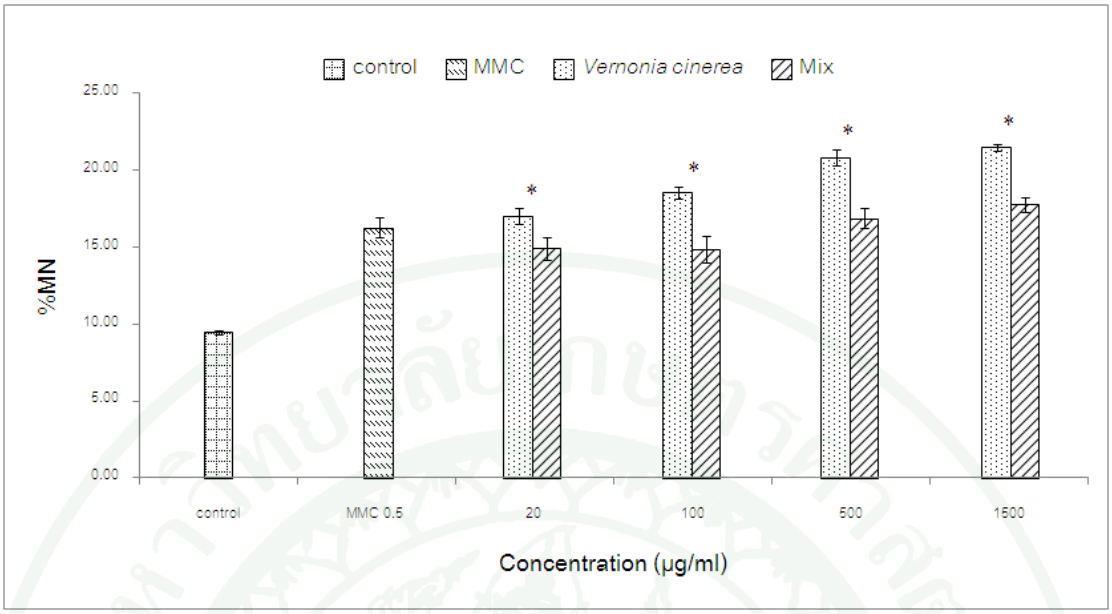
A. binucleated cell ที่ไม่มีไมโครนิวเคลียส และมี 1 ไมโครนิวเคลียส

B. binucleated cell ที่มี 2 ไมโครนิวเคลียส

C. binucleated cell ที่มี 3 ไมโครนิวเคลียส

D. binucleated cell ที่มี 4 ไมโครนิวเคลียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ TK6 หลังจากได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบด้วยวิธี CBMN assay

* แทนค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบสารแต่ละชนิดในความเข้มข้นเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. สรุป

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) ต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ TK6 สามารถสรุปได้ ดังนี้

1.1 ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำทั้งสามชนิด พบว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ สารผสม และหญ้าดอกขาวทั้งต้น โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 431.72, 610.22 และ 664.30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าก็ยังต่ำกว่า ascorbic acid ถึง 67 เท่า (IC_{50} เท่ากับ 6.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ สารผสม และใบโปร่งฟ้า โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 70.10, 94.53 และ 369.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ ของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม ต่ำกว่า ascorbic acid ถึง 3.2 และ 4.3 เท่า ตามลำดับ (IC_{50} เท่ากับ 21.82 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้นสารสกัดน้ำทั้งสามชนิดจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ มากกว่า โดยเฉพาะสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม

1.2 สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และสารผสม ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ โดยมีค่า IC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1.47×10^3, 6.20×10^8 และ 1.06×10^9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1.04×10^3, 9.44×10^3 และ 2.17×10^4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ที่ได้รับสารสกัดน้ำทั้งสามชนิดที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ของสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น (1.04×10^3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดทั้งสามชนิด มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตมากกว่าเซลล์ตายแบบ apoptosis ระยะแรก และระยะท้าย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสารผสม มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตมากกว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และหญ้าดอกขาวทั้งต้น ตามลำดับ สอดคล้องกับความเป็นพิษของสารสกัดที่ตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay ดังนั้นการใช้สมุนไพรในรูปแบบสารผสมจึงมีความปลอดภัยต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์มากที่สุด แต่ในรูปแบบสมุนไพรเดี่ยว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีความปลอดภัยต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์มากกว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น และเพื่อความปลอดภัยต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ ควรใช้สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.3 สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 มากกว่าสารสกัดน้ำแบบผสม และสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า โดยมีค่า IC_{50} ที่ 12 ชั่วโมง เท่ากับ 6.90×10^{2}, 2.87×10^{4} และ 5.13×10^{12} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 4.89×10^{2}, 9.02×10^{3} และ 2.33×10^{10} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 2.72×10^{2}, 3.93×10^{3} และ 4.05×10^{6} ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และสารผสมจึงไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 แต่สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีความเป็นพิษปานกลางต่อเซลล์ TK6 เมื่อเปรียบเทียบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ TK6 ที่ได้รับสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นและสารผสม ที่ความเข้มข้น 20, 100, 500 และ 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีผลทำให้เซลล์ TK6 ตายแบบ apoptosis มากกว่าสารผสม โดยสารสกัดจะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ทำให้วัฏจักรเซลล์หรือการแบ่งเซลล์ลดลง และจากการตรวจสอบความเสียหายของดีเอ็นเอในเซลล์ TK6 พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ทำให้ดีเอ็นเอในเซลล์ TK6 เสียหายมากกว่าสารผสม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดไมโครนิวเคลียสมากกว่าสารผสม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดน้ำทั้งสองชนิดที่ควรนำมาใช้ เพื่อป้องกันความเสียหายต่อดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับ MMC ซึ่งเป็น positive control ในสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นควรใช้ที่ความเข้มข้น 20 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารผสมควรใช้ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าทุกความเข้มข้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6

จากผลการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์และเซลล์ TK6 ของสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า หญ้าดอกขาวทั้งต้น และสารผสม แสดงให้เห็นว่าการนำสมุนไพรมาใช้ในรูปแบบสารผสม ถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากสารผสมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ $O_2^{-\cdot}$ แม้ว่าจะต่ำกว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น แต่ก็มีความปลอดภัยต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์มากกว่า เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ลิมโฟไซต์น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดน้ำอีกสองชนิด และทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอในเซลล์ TK6 น้อยกว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นอีกด้วย ส่วนการใช้สมุนไพรในรูปแบบสารเดี่ยวนั้น สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า มีความปลอดภัยต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มากกว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น ในการนำสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมาใช้ เพื่อความปลอดภัยต่อเซลล์ลิมโฟไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน จึงควรใช้ที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเข้มข้นต่ำกว่า 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพื่อป้องความเสียหายต่อดีเอ็นเอ จึงควรใช้สารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับ MMC ซึ่งเป็น positive control

2. ข้อเสนอแนะ

จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองชนิด พบว่าสารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้า และสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดนี้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ ของสารสกัด เพื่อประโยชน์ในการนำพืชสมุนไพรทั้งสองชนิดมาช่วยต้านอนุมูลอิสระต่อไป และจากการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 พบว่าสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้น มีความเป็นพิษต่อเซลล์ TK6 ปานกลาง ดังนั้นสารสกัดน้ำหญ้าดอกขาวทั้งต้นจึงมีความน่าสนใจนำไปศึกษาการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดอื่นๆ ต่อไป และควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิถีที่ชักนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis รวมทั้งความเสียหายต่อดีเอ็นเอ โดยวิธี Comet assay เพื่อตรวจสอบระดับความเสียหาย

ในการอดบุหรี่นั้น สารสกัดน้ำแบบผสม (สารสกัดน้ำใบโปร่งฟ้าและหญ้าดอกขาวทั้งต้น) อัตราส่วน 1:1 (v/v) อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากช่วยลดผลข้างเคียงจากการใช้หญ้าดอกขาวเพียงอย่างเดียว แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารสกัดเดี่ยว แต่ก็มีความปลอดภัยต่อเซลล์ลิมโฟไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการตรวจสอบความเป็นพิษในระดับสัตว์ทดลองเพื่อความมั่นใจก่อนนำมาพัฒนาใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อช่วยในการเลิกบุหรี่ หรือพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรรณิกา ชัชวาลวานิช. 2546. **จุลกายวิภาคศาสตร์.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

คณะอนุกรรมการจัดทำตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย. 2555. ตำราอ้างอิงสมุนไพร: หญ้าดอกขาว (YA DOK KHAO). **วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก** 10 (3): 213-216

ณุฉัตรา จันทร์สุวานิชย์. 2549. **ต้นแฮค สมุนไพรสำหรับอดบุหรี่.** แหล่งที่มา: http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/secretary/Homepage/news49/january/8.html, 14 พฤษภาคม 2553.

นริศรา แย้มทรัพย์. 2541. หญ้าดอกขาว อีกทางเลือกหนึ่งของผู้ต้องการเลิกบุหรี่. **จุลสารบุหรี่และสุขภาพ** 8 (1): 15-16.

นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2539. **สมุนไพร – ไม้พื้นบ้าน.** สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

น้ำทิพย์ เที่ยงตรง. 2550. **การทดสอบไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ TK6 ด้วยสิ่งก่อกลาย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปกป้อง ประยงค์, นาถธิดา วีระปรียากูร และ สหพัฒน์ บรัศว์รักษ์. 2550. อะพอพโทซิส: วิถีและการตรวจวัด. **J. Health Res.** 21 (3): 227-238.

พรพิมล จงรักวิทย์. 2554. **ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบหญ้าดอกขาว *Vernonia cinerea* Less. ด้วยเอทานอลต่อลิมโฟไซต์ และ myeloma (NSO).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2543. **สมุนไพรพื้นบ้าน(5).** บริษัทประชาชน จำกัด, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วงศ์สถิต ฉั่วกุล. 2548. **อนุกรมวิธานพืชสมุนไพร.** ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

_____, พร้อมจิต ศรลัมพ์, วิชิต เปานิล และรุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์สกุล. 2539. **สมุนไพรพื้นบ้านล้านนา.** ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2531. **พจนานุกรมสมุนไพรไทย.** โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ.

วิทยา บุญวรพัฒน์, ธงชัย ลี้นำโชค, วรัตม์เวช เหรียญเดชาเวชกุล, ณฐมน ปิ่นถาวร และนุชนาถ บุยวรพัฒน์. 2554. **สารานุกรมสมุนไพรไทย-จีนที่ใช้บ่อยในประเทศไทย.** สมาคมศาสตร์การแพทย์แผนจีนในประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

วิภา จันทรวงค์. 2554. **ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบใบโปร่งฟ้า *Clausena heptaphylla* Wright&Arn. ต่อเซลล์ลิมโฟไซต์มนุษย์ และเซลล์ myeloma (NSO).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. **สารานุกรมสมุนไพร: รวมหลักเภสัชกรรมไทย.** โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

สมภพ ประธานธุรารักษ์. 2539. **อนุกรมวิธานพืชสมุนไพร.** พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

อรลักษณา แพรัตกุล. 2553. องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของหมอน้อย และแนวทางการพัฒนาตำรับเพื่อใช้ช่วยเลิกบุหรี่. **วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก** 8 (1): 81-92.

Abeysekera, A.M., K.T.D. de Silva, S.R.P. de Silva, V.D.P. Sirimanne, R.P. Labadie, A.J.J. van den Berg and W. van der Sluis. 1999. Inhibition of chemiluminescence generated by zymosan-activated polymorphonuclear leucocytes by phenolic constituents of *Vernonia cinerea*. **Fitoterapia** 70 (3): 317-319.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Abirami, P. and A. Rajendran. 2012. GC-MS analysis of methanol extracts of *Vernonia cinerea*. **Euro. J. Exp. Bio.** 2 (1): 9-12.

Ahmad, A., S. Tandon, J. Ahmad and A. Yadav. 2008. Chemical composition of the essential oil of *Clausena heptaphylla* W&A from Assam, India. **Asian J. Chem.** 20 (3): 2467-2469.

Alley, M.C., D.A. Scudiere, A. Monks, M.L. Hursey, M.J. Czerwinski, D.L. Fine, B.J. Abbott, J.G. Mayo, R.H. Shoemaker and M.R. Boyd. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Res.** 48: 589-601.

American Type Culture Collection (ATCC). 2013. **TK6 (ATCC® CRL-8015™).** Available Source: http://www.atcc.org/products/all/CRL-8015.aspx#generalinformation, May 24, 2013

Arbab, I.A., A.B. Abdul, M.A. Sukari, R. Abdullah, S. Syam, B. Kamalidehghan, M.Y. Ibrahim, M.M.E. Taha, S.I. Abdelwahab, H. Mohd Ali and S. Mohan. 2013. Dentatin isolated from *Clausena excavata* induces apoptosis in MCF-7 cells through the intrinsic pathway with involvement of NF-ĸB signalling and G_0/G_1 cell cycle arrest: A Bioassay-Guided Approach. **J. Ethnopharmacol.** 145 (1): 343-354.

_____, C.Y. Looi, A.B. Abdul, F.K. Cheah, W.F. Wong, M.A. Sukari, R. Abdullah, S. Mohan, S. Syam, A. Arya, M. Mohamed Elhassan Taha, B. Muharram, M. Rais Mustafa and S. Ibrahim Abdelwahab. 2012. Dentatin induces apoptosis in prostate cancer cells via Bcl-2, Bcl-xl, survivin downregulation, caspase-9, -3/7 activation, and NF-ĸB inhibition. **Evid. Base. Compl. Alternative Med.** 2012: 1-15.

Begum, R., M.A. Kaisar, M.S. Rahman, A.M. Sarwaruddin Chowdhury, M.M. Rahman, C.M. Hasan and M.A. Rashid. 2011. Clausenolide-1-methyl ether from *Clausena heptaphylla* W&A. **Bol. Latinoam. Caribe.** 10 (2): 136-138.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bhattacharyya, P. and D.P. Chakraborty. 1973. Murrayanine and dentatin from *Clausena heptaphylla*. **Phytochemistry** 12: 1831-1832.

_____ and B.K. Chowdury. 1984. Clausenapin: A new carbazole alkaloid from *Clausena heptaphylla* Wt & Arn. **Chem. Ind. - London** (8): 301.

_____, A. Chakraborty and B.K. Chowdhury. 1984. Heptazolicine, A carbazole alkaloid from *Clausena heptaphylla*. **Phytochemistry** 23: 2409-2410.

_____, G.K. Biswas, A.K. Barua, C. Saha, I.B. Roy and B.K. Chowdhury. 1993. Clausenalene, A carbazole alkaloid from *Clausena heptaphylla*. **Phytochemistry** 33 (1): 248-250.

Bonina, F., C. Puglia, A. Tomaina, N. Mulinacci, A. Romani and F.F. Vincier. 2000. *In vitro* antioxidant and *in vivo* photoprotective effect of three lyophilized extracts of *Sedum telephium* L. leaves. **J. Pharm. Pharmacol.** 52: 1279-1285.

Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wiss. Technol.** 28: 25–30.

Buckton, K.E. and H.S. Evans. 1973. **Methods for the analysis of human chromosome aberrations.** World Health Organization, Geneva.

Chakraborty, A., C. Saha, G. Podder, B.K. Chowdhury and P. Bhattacharyya. 1995. Carbazole alkaloid with antimicrobial activity from *Clausena heptaphylla*. **Phytochemistry** 38 (3): 787-789.

Chakraborty, D.P., A. Islam and S. Roy. 1978. 2-Methylanthraquinone from *Clausena heptaphylla*. **Phytochemistry** 17: 2043.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chakraborty, D.P., P. Bhattacharyya, A. Islam and S. Roy. 1974. Heptazolidine: A carbazole alkaloid from *Clausena heptaphylla* Wt&Arn. **Chem. Ind. - London** (7): 303.

_____, _____, S.P. Bhattacharyya, J. Bordner, G.L.A. Hennessee and B. Weinstein. 1979. Clausenolide: A novel pentanortriterpenoid furanolactone; x-ray crystal structure. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.** (6): 246-248.

Chea, A., S. Hout, C. Long, L. Marcourt, R. Faure, N. Azas and R. Elias. 2006. Antimalarial activity of sesquiterpene lactones from *Vernonia cinerea*. **Chem. Pharm. Bull.** 54 (10): 1437-1439.

Chen, W., Z. Zhu, X. Xiao and D.S. Dimitrov. 2009. Construction of a human antibody domain (VH) library. **Methods Mol Biol.** 525: 81-95.

Chen, X., Z.J. Zhan and J.M. Yue. 2006. Sesquiterpenoids from *Vernonia Cinerea*. **Nat. Prod. Res.** 20 (1): 31-35.

Chethan, J., K.K. Sampath Kumara, S. Sekhar and H.S. Prakash. 2012. Antioxidant, antibacterial and DNA protecting activity of selected medicinally important Asteraceae plants. **Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** 4 (2): 257-261.

Chowdhury, J.U., J. Begum, M.N.I. Bhuiyan, F.A. Lucky and M.N.H. Bhuiyan. 2008. Composition of the leaf oils of *Clausena heptaphylla* and *Clausena suffruticosa*. **J. Subtrop. Agric. Res. Dev.** 6 (6): 603-605.

Cui, C.B., S.Y. Yan, B. Cai and X.S. Yao. 2002. Carbazole alkaloids as new cell cycle inhibitor and apoptosis inducers from *Clausena Dunniana* Levl. **J. Asian Nat. Prod. Res.** 4 (4): 233-241.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Danish Rizvi, S.M., D. Biswas, J.M. Arif and M. Zeeshan. 2011. *In-vitro* antibacterial and antioxidant potential of leaf and flower extracts of *Vernonia cinerea* and their phytochemical constituents. **Int. J. Pharmaceut. Sci. Rev. Res.** 9 (2): 164-169.

Das, M.C. and S.B. Mahato. 1983. Triterpenoids. **Phytochemistry** 22 (5): 1071-1095.

Denecker, G., D.Vercammen,W. Declercq and P.Vandenabeele. 2001. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. **Cell. Mol. Life Sci.** 58: 356–370.

Dhanalakshmi, P., A. Jaya Prakash Priya, E. Sagadevan, Y.S. Lakshmi, A. Manimaran, S. Sindhu and P. Arumugam. 2013. Evaluation of inhibitory effect of *Vernonia cinerea* L. leaf extracts on different fungal species. **Int. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** 5 (2): 414-416.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.** 35: 495-516.

Fakruddin, M., K.S.B. Mannan, R.M. Mazumdar and H. Afroz. 2012. Antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the ethanol extract of the stem bark of *Clausena geptaphylla*. **BMC Compl. Alternative Med.** 12: 232

Fenech, M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutat. Res.** 455 (1–2): 81-95.

_____, W.P. Chang, M. Kirsch-Volders, N. Holland, S. Bonassi and E. Zeiger. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.** 534 (1–2): 65-75.

Ghobrial, I.M., T.E. Witzig and A.A. Adjei. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J. Clin.** 55: 178–194.

Gomes, A., E. Fernandes, A.M.S. Silva, C.M.M. Santos, D.C.G.A. Pinto, J.A.S. Cavaleiro and J.L.F.C. Lima. 2007. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Bioorg. Med. Chem.** 15: 6027–6036.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Gray, A.I. and P.G. Waterman. 1978. Coumarins in the Rutaceae. **Phytochemistry** 17 (5): 845-864.

Gupta, M., U.K. Mazumder, L. Manikandan, P.K. Haldar, S. Bhattacharya and C.C. Kandar. 2003a. Antibacterial activity of *Vernonia cinerea*. **Fitoterapia** 74: 148-150.

_____, _____, _____, S. Bhattacharya, P.K. Haldar and S. Roy. 2003b. Evaluation of antipyretic potential of *Vernonia cinerea* extract in rats. **Phytother. Res.** 17: 804-806.

Haque, M.A., M.M. Hassan, A. Das, B. Begum, M.Y. Ali and H. Morshed. 2012a. Phytochemical investigation of *Vernonia cinerea* (Family: Asteraceae). **J. Appl. Pharmaceu. Sci.** 2 (6): 79-83.

_____, C.S. Abdullah, M.M. Hassan, M.N. Parvin, M.B. Rafique and A.G.M. Mostofa. 2012b. Evaluation of the antioxidant and anti-cholineesterase activities of the stem, barks and leaves of the plant *Vernonia cinerea* (Family: Asteraceae). **J. Appl. Pharmaceu. Sci.** 2 (5): 174-176.

Hashimoto, K., Y. Nakajima, S. Matsumura and F. Chatani. 2011. Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. **Regul. Toxicol. Pharm.** 59 (1): 28-36.

He, Y.C., F.L. Zhou, Y. Shen, D.F. Liao and D. Cao. 2014. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. **Int. J. Mol. Sci.** 15: 8335-8351.

Hossan, M.S., A. Hanif, M. Khan, S. Bari, R. Jahan and M. Rahmatullah. 2009. Ethnobotanical survey of the Tripura tribe of Bangladesh. **Am. Eurasian J. Sustain. Agric.** 3 (2): 253-261.

Huerta, S., E.J. Goulet and E.H. Livingston. 2006. Colon cancer and apoptosis. **Am. J. Surg.** 191 (4): 517-526.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Huerta, S., E.J. Goulet, S. Huerta-Yepez and E.H. Livingston. 2007. Screening and detection of apoptosis. **J. Surg. Res.** 139 (1): 143-156.

Huo, J., S.P. Yang, B.J. Xie, S.G. Liao, L.P. Lin, J. Ding and J.M. Yue. 2008. Cytotoxic sesquiterpenoids from *Vernonia bockiana*. **J. Asian Nat. Prod. Res.** 10 (6): 571-575.

Husian, A., O.P. Virmani, S.P. Popli, L.N. Misra, M.M. Gupta, Z. Abraham and A.K. Singh. 1992. **Dictionary of Indian Medical Plants.** Lucknow, India.

Huy, L.D., R. Caple, C. Kamperdick, N.T. Diep and R. Karim. 2004. Isomeranzin against Herpes Simplex Virus *in vitro* from *Clausena heptaphylla* (Roxb.) W.&Arn.: isolation, structure and biological assay. **J. Chem.** 42 (1): 115-120.

Iannolo, G., C. Conticello, L. Memeoa and R. De Maria. 2008. Apoptosis in normal and cancer stem cells. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 66: 42–51.

Ilondu, E.M. 2013. Phytochemical composition and efficacy of ethanolic leaf extracts of some *Vernonia* species against two phytopathogenic fungi. **J. Biopest.** 6 (2): 165-172.

Iqbal, M.C.M., S. Meiyalaghan, K.B. Wijesekara and K.P. Abeyratne. 2001. Antifungal activity from water extracts of some common weeds. **Pakistan J. Biol. Sci.** 4 843-845.

Islaih, M., B.W. Halstead, I.A. Kadura, B. Li, J.L. Reid-Hubbard, L. Flick, J.L. Altizer, J. Thom Deahl, D.K. Monteith, R.K. Newton and D.E. Watson. 2005. Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. **Mutat. Res.** 578 (1–2): 100-116.

Jakupovic, J., S. Banerjee, V. Castro, F. Bohlmann, A. Schuster, J.D. Msonthi and S. Keeley. 1986. Poskeanolide, A seco-germacranolide and other sesquiterpene Lactones from *Vernonia* species. **Phytochemistry** 25 (6): 1359-1364.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Jin, Z. and W.S. El-Deiry. 2005. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biol Ther.** 4 (2): 139-163.

Jitpukdeebodintra, S. and A. Jangwang. 2009. Coffee for smoking cessation. **J. Food Agr. Environ.** 7 (3-4): 130-133.

Joshi, B.S., V.N. Kamat and A.K. Saksena. 1967a. Structures of clausenin and clausenidin two new pyranocoumarins from the roots of *Clausena heptaphylla* Wt.&Amp; Arn. **Tetrahedron** 23 (12): 4785-4789.

_____, _____, _____ and T.R. Govindachari. 1967b. Structure of heptaphylline, a carbazole alkaloid from *Clausena heptaphylla* Wt.&Amp; Arn. **Tetrahedron Lett.** 8 (41): 4019-4022.

_____, _____, D.H. Gawad and T.R. Govindachari. 1972. Structure and synthesis of heptaphylline. **Phytochemistry** 11: 2065-2071.

Kawsar, M.H., M.A.A. Sikder, M.S. Rana, I. Nimmi and M.A. Rashid. 2011. Studies of thrombolytic, antioxidant and cytotoxic properties of two asteraceous plants of bangladesh. **Bangladesh Pharm. J.** 14 (2): 103-106.

Khatiwora, E., V.B. Adsul, M.M. Kulkarni, N.R. Deshpande and R.V. Kashalkar. 2010. Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of *Ipomoea carnea*. **Int. J. Chemtech Res.** 2 (3): 1698-1701.

Khay, M., P. Toeng, V. Mahiou-Leddet, F. Mabrouki, K. Sothea, E. Ollivier, R. Elias and S.S. Bun. 2012. HPLC analysis and cytotoxic activity of *Vernonia cinerea*. **Nat. Prod. Commun.** 7 (10): 1259-1262.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Klungsupya, P., U. Rerk-Am, J. Saenkhum and W. Leelamanit. 2014. GAC fruit prevents oxidative DNA damage induced by H_2O_2 and UVC in TK6 human lymphocytes by comet assay. **Acta Horticulturae** 1023 199-206.

Kongkathip, B., N. Kongkathip, A. Sunthitikawinsakul, C. Napaswat and C. Yoosook. 2005. Anti-HIV-1 constituents from *Clausena excavata*: Part II. Carbazoles and a pyranocoumarin. **Phytother. Res.** 19 (8): 728-731.

Krysko, D.V., T. Vanden Berghe, K. D. Herde and P. Vandenabeele. 2008. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods** 44: 205–221.

Kumar, P.P. and G. Kuttan. 2009. *Vernonia cinerea* L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** 31 (1): 94-102.

Kuo, Y.H., Y.J. Kuo, A.S. Yu, M.D. Wu, C.W. Ong, L.M. Yang Kou, J.T. Huang, C.F. Chen and S.Y. Li. 2003. Two novel sesquiterpene lactones, cytotoxic vernolide-A and -B, from *Vernonia cinerea*. **Chem. Pharm. Bull.** 51 (4): 425-426.

Kuvatanasuchati, J., S. Laphookhieo and P. Rodanant. 2011. Antimicrobial activity against periodontopathic bacteria and cytotoxic study of *Cratoxylum formosum* and *Clausena lansium*. **J. Med. Plant Res.** 5 (25): 5988-5992.

Lagarto Parra, A., R. Silva Yhebra, I. Guerra Sardiñas and L. Iglesias Buela. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD_{50} value) in mice to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine** 8 (5): 395-400.

Laosim, T., S. Chuchawankul and T. Tencomnao. 2011. Immunomodulatory effect of hexane extract of *Vernonia cinerea* Less. Trunk on human peripheral blood mononuclear cells. **J. Chem. Pharmaceut. Res.** 3 (4): 188-195.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Latha, L.Y., I. Darah, K. Jain and S. Sasidharan. 2010. Toxicity study of *Vernonia cinerea*. **Pharm. Biol.** 48 (1): 101-104.

Leelarungrayub, D., S. Pratanaphon, P. Pothongsunun, T. Sriboonreung, A. Yankai and R. Bloomer. 2010. *Vernonia cinerea* Less. supplementation and strenuous exercise reduce smoking rate: relation to oxidative stress status and beta-endorphin release in active smokers. **J. Int. Soc. Sports Nutr.** 7 (1): 1-10.

Lockwood, G.B. 1984. The essential oil from leaves of *Clausena heptaphylla*. **Fitoterapia** 55 (2): 123-124.

Mannaf, M.A., M.A. Islam, S. Akter, R. Akter, T. Nasrin, I. Zarin, S. Seraj and M. Rahmatullah. 2013. A randomized survey of differences in medicinal plant selection as well as diseases treated among folk medicinal practitioners and between folk and tribal medicinal practitioners in Bangladesh. **Am. Eurasian J. Sustain. Agric.** 7 (3): 196-209.

Martini, F.H., E.F. Bartholomew and K. Welch. 2000. **The human body in health & disease.** Prentice hall, Upper saddle river, New Jersey.

Mazumder, U.K., M. Gupta, L. Manikandan, S. Bhattacharya, P.K. Haldar and S. Roy. 2003. Evaluation of anti-Inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. **Phytomedicine** 10: 185-188.

Mini, V.N., B. Ida, D. Seema, D. Shital, D. Riva and R. Astrida. 2010. Antimicrobial activity of ten common herbs, commonly known as 'Dashapushpam' from Kerala, India. **Afr. J. Microbiol. Res.** 4 (22): 2357-2362.

Misra, T.N., R.S. Singh, J. Upadhyay and R. Srivastava. 1984a. Isolation of a natural sterol and an aliphatic acid from *Vernonia cinerea*. **Phytochemistry** 23 (2): 415-417.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Misra, T.N., R.S. Singh, J. Upadhyay and R. Srivastava. 1984b. Chemical constituents of *Vernonia cinerea*, Part I. Isolation and spectral studies of triterpenes. **J. Nat. Prod.** 47 (2): 368-372.

_____, _____, R. Srivastava, H.S. Pandey, C. Prasad and S. Singh. 1993. A new triterpenoid from *Vernonia cinerea*. **Planta Med.** 59 (5): 458-460.

Moon, D.O., M.O. Kim, Y.H. Choi and G.Y. Kim. 2008. β-sitosterol induces G_2/M arrest, endoreduplication, and apoptosis through the Bcl-2 and PI3K/Akt signaling pathways. **Canc. Lett.** 264 (2): 181-191.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65: 55-63.

Muhd Sharif, N.W., N.A. Mustahil, H.S. Mohd Noor, M.A. Sukari, M. Rahmani, Y.H. Taufiq-Yap and G.C.L. Ee. 2011. Cytotoxic constituents of *Clausena excavata*. **Afr. J. Biotechnol.** 10 (72): 16337-16341.

Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. **Cell** 88: 355-365.

Nath, M. and M.D. Choudhury. 2010. Ethno-medico-botanical aspects of *Hmar* tribe of Cachar district, Assam (Part I). **Indian J. Tradit. Know.** 9 (4): 760-764.

Nath, S.C. and D.N. Bordoloi. 1991. Major constituents of the essential oil of *Clausena heptaphylla* W&A leaves. **Indian Perfumer** 35 (2): 97-99.

_____ and _____. 1992. Major components of the leaf and fruit oil of *Clausena heptaphylla* W&A growing in Northeast India. **J. Essent. Oil Res.** 4 (6): 655-656.

_____, A.K. Hazarika and K.K. Sarma. 1996. Chemical composition of the leaf and fruit oil of *Clausena heptaphylla* W&A from Northeast India. **J. Essent. Oil Res.** 8 (2): 197-198.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nishadh, A., V. Selvi and R. Mahalakshmi. 2013. *In-vitro* antioxidant and phytochemical screening of various extracts of *Vernonia cinerea* leaves. **Int. J. Drug Dev. & Res.** 5 (3): 227-230.

Platel, A., F. Nesslany, V. Gervais and D. Marzin. 2009. Study of oxidative DNA damage in TK6 human lymphoblastoid cells by use of the *in vitro* micronucleus test: determination of no-observed-effect levels. **Mutat. Res.** 678 (1): 30-37.

Prasad, K.N., J. Hao, C. Yi, D. Zhang, S. Qiu, Y. Jiang, F. Chen and M. Zhang. 2009. Antioxidant and anticancer activities of Wampee (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels) Peel. **J. Biomed. Biotechnol.** 2009: 1-6.

_____, H. Xie, J. Hao, B. Yang, S. Qiu, X. Wei, F. Chen and Y. Jiang. 2010. Antioxidant and anticancer activities of 8-hydroxypsoralen isolated from Wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] Peel. **Food Chem.** 118 (1): 62-66.

Pratheeshkumar, P. and G. Kuttan. 2011a. Vernolide-A inhibits tumour specific angiogenesis by regulating proinflammatory cytokines, VEGF, MMPs and TIMP. **Eur. J. Pharmacol.** 656 (1–3): 10-18.

_____ and _____. 2011b. Vernolide-A, A sesquiterpene lactone from *Vernonia cinerea*, induces apoptosis in B16F-10 melanoma cells by modulating p53 and caspase-3 gene expressions and regulating NF-ΚB-mediated Bcl-2 activation. **Drug Chem. Toxicol.** 34 (3): 261-270.

_____ and _____. 2012. Antimetastatic potential of Vernolide-A, a sesquiterpenoid from *Vernonia cinerea* L. **Hum. Exp. Toxicol.** 31 (1): 66-80.

Preethi, K.C., C.K.K. Nair and R. Kuttan. 2008. Clastogenic potential of *Ruta graveolens* extract and a homeopathic preparation in mouse bone marrow cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** 9 (4): 763-769.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Prochazka, A.V. 2000. New developments in smoking cessation. **Chest J.** 117 (4_suppl_1): 169S-175S.

Pucci, B., M. Kasten and A. Giordano. 2000. Cell cycle and apoptosis. **Neoplasia** 2 (4): 291-299.

Purkayastha, J. and S.C. Nath. 2006. Biological activities of ethnomedicinal of some plant species of Assam. **Indian J. Tradit. Know.** 5 (2): 229-236.

Rahman, A., J.S. Chakma, N.I. Bhuiyan and S. Islam. 2012. Composition of the essential oil of *Clausena suffruticosa* leaf and evaluation of its antimicrobial and cytotoxic activities. **Trop. J. Pharmaceut. Res**. 11 (5): 739-746.

Rahman, M.A., S.B. Uddin and C.C. Wilcock. 2007. Medicinal plants used by *Chakma* tribe in Hill Tracts districts of Bangladesh. **Indian J. Tradit. Know.** 6 (3): 508-517.

_____, J.S. Chakma, S. Islam and N.U. Ahmed. 2011. Evaluation of antioxidant, antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of *Clausena suffruticosa* ethanolic root extract. **J. Appl. Pharmaceut. Sci.** 1 (5): 90-95.

_____, R. Sultana, T. Bin Emran, M.S. Islam, J.S. Chakma, H.U. Rashid and C.M.M. Hasan. 2013. Effects of organic extracts of six Bangladeshi plants on *in vitro* thrombolysis and cytotoxicity. **BMC Compl. Alternative Med.** 13: 25

Rahmatullah, M., A. Noman, Md.S. Hossan, Md. Harun-Or-Rashid, T. Rahman, M.H. Chowdhury and R. Jahan. 2009. A survey of medicinal plants in two areas of Dinajpur district, Bangladesh including plants which can be used as functional foods. **Am. Eurasian J. Sustain. Agric.** 3 (4): 862-879.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rajamurugan, R., N. Selvaganabathy, S. Kumaravel, C. Ramamurthy, V. Sujatha, M. Suresh Kumar and C. Thirunavukkarasu. 2011. Identification, quantification of bioactive constituents, evaluation of antioxidant and *in vivo* acute toxicity property from the methanol extract of *Vernonia cinerea* leaf extract. **Pharmaceut. Biol.** 49 (12): 1311-1320.

Rastogi, R.P. and B.N. Mehrotra. 1991. **Compendium of Indian Medicinal Plants. Vol. II.** National Institute of Science Communication and Information Resources, New Delhi.

Ray, S. and D.P. Chakraborty. 1976. Murrayacine from *Clausena heptaphylla*. **Phytochemistry** 15: 356.

Roy, S., P. Bhattacharyya and D.P. Chakraborty. 1974. 3-Methylcarbazole from *Clausena heptaphylla*. **Phytochemistry** 13: 1017.

Sabini, M.C., L.N. Cariddi, F.M. Escobar, F. Mañas, L. Comini, E. Reinoso, S.B. Sutil, A.C. Acosta, S. Núñez Montoya, M.S. Contigiani, S.M. Zanon and L.I. Sabini. 2013. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and apoptotic induction of an aqueous extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc. **Food Chem. Toxicol.** 60: 463-470.

Sangeetha, T. and T. Venkatarathinakumar. 2011. Antitumor activity of aerial parts of *Vernonia cinerea* (L) Less. against Dalton's Ascetic Lymphoma. **Int. J. Pharmtech Res.** 3 (4): 2075-2079.

Saraste, A. and K. Pulkki. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.** 45: 528-537.

Sarker, B., F. Akther, U. Ayman, R. Sifa, I. Jahan, M. Sarker, S.K. Chakma, P.K. Podder, Z. Khatun and M. Rahmatullah. 2012. Ethnomedicinal investigations among the Sigibe clan of the *Khumi* tribe of Thanchi sub-district in Bandarban district of Bangladesh. **Am. Eurasian J. Sustain. Agric.** 6 (4): 378-386.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sayeed, M.S.B., A.G.M. Mostofa, F.M. Touhidul Islam Ferdous and M.S. Islam. 2013. A randomized, placebo-controlled, crossover study of an herbal preparation containing *Vernonia cinerea* in the treatment of type 2 diabetes. **J. Altern. Complem. Med.** 19 (9): 767-771.

Shah, W., M.B. Kekare and V. Vaidya. 2010. Development and validation of high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of β-Sitosterol and Lupeol in *Vernonia cinerea* Linn. **Int. J. Pharm. Bio. Sci.** 1 (3): 1-5

Shil, S. and M.D. Choudhury. 2009. Indigenous knowledge on healthcare practices by the *Reang* tribe of Dhalai district of Tripura, North East India. **Ethnobot. Leaflets** 13: 775-790.

Shirazi, F.H., N. Ahmadi and M. Kamalinejad. 2004. Evaluation of Northern Iran *Mentha pulegiu* L. cytotoxicity. **DARU.** 12 (3): 106-110.

Shukla, S., A. Mehta, V.K. Bajpai and S. Shukla. 2009. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Food Chem. Toxicol.** 47 (9): 2338-2343.

Shylesh, B.S. and J. Padikkala. 2000. *In vitro* cytotoxic and antitumor property of *Emilia sonchifolia* (L.) Dc in mice. **J. Ethnopharmacology** 73: 495-500.

Siddhuraju, P., P.S. Mohan and K. Becker. 2002. Studies on the antioxidant activity of *Indian laburnum* (*Cassia fistula* L.): A preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp. **Food Chem.** 79 (1): 61-67.

Simonsen, H.T., J.B. Nordskjold, U.W. Smitt, U. Nyman, P. Palpu, P. Joshi and G. Varughese. 2001. *In vitro* screening of indian medicinal plants for antiplasmodial activity. **J. Ethnopharmacol.** 74 (2): 195-204.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Singh, G.R., V.V. Vaidya, S. Shailajan, M.M. Baing and P.A. Champanerkar. 2006. Quantitation of lupeol in *Vernonia cinerea* L. whole plant powder by high performance thin-layer chromatography. **Indian Drugs** 43 (12): 989-992.

Sinha, S., M. Jothiramajayam, M. Ghosh and A. Mukherjee. 2014. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food Chem. Toxicol.** 68 : 71-77.

Sobol, Z., M.L. Homiski, D.A. Dickinson, R.A. Spellman, D. Li, A. Scott, J.R. Cheung, S.L. Coffing, J.B. Munzner, K.E. Sanok, W.C. Gunther, K.L. Dobo and M. Schuler. 2012. Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 Cells. **Mutat. Res.** 746 (1): 29-34.

Sohrab, H., C.M. Hasan and M.A. Rashid. 2002. Lunamarin C, A new terpenoid coumarin from *Clausena heptaphylla*. **Pharmazie** 57 (8): 573-574.

Sohrab, M.H., C.M. Hasan and M.A. Rashid. 1999. Lunamarins A and B: Two novel terpenoid coumarins from *Clausena heptaphylla*. **Nat. Prod. Lett.** 14 (1): 47-53.

_____, _____ and _____. 2000. Clausmarin-A from the leaves of *Clausena heptaphylla*. **Biochem. Syst. Ecol.** 28: 91-93.

_____, M.A. Mazid, E. Rahman, C.M. Hasan and M.A. Rashid. 2001. Antibacterial activity of *Clausena heptaphylla*. Fitoterapia 72 (5): 547-549.

Songsiang, U., T. Thongthoom, C. Boonyarat and C. Yenjai. 2011. Claurailas A-D, cytotoxic carbazole alkaloids from the roots of *Clausena harmandiana*. **J. Nat.Prod.** 74 (2): 208-212.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Songsiang, U., T. Thongthoom, P. Zeekpudsab, V. Kukongviriyapanb, C. Boonyaratc, J. Wangboonskulc and C. Yenjai. 2012. Antioxidant activity and cytotoxicity against cholangiocarcinoma of carbazoles and coumarins from *Clausena harmandiana*. **Scienceasia** 38 (1): 75–81.

Sreedevi, A., K. Bharathi and K.V.S.R.G. Prasad. 2011. Effect of *Vernonia cinerea* aerial parts against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacologyonline** 2: 548-555.

Su, C.R., S.F. Yeh, C.M. Liu, A.G. Damu, T.H. Kuo, P.C. Chiang, K.F. Bastow, K.H. Lee and T.S. Wu. 2009. Anti-HBV and cytotoxic activities of pyranocoumarin derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** 17 (16): 6137-6143.

Sunthitikawinsakul, A., N. Kongkathip, B. Kongkathip, S. Phonnakhu, J.W. Daly, T.F. Spande, Y. Nimit, C. Napaswat, J. Kasisit and C. Yoosook. 2003. Anti-HIV-1 limonoid: First isolation from *Clausena excavata*. **Phytother. Res.** 17 (9): 1101-1103.

Swingle, W.T. 1967. The Botany of citrus and its wild relatives of the orange, pp. 129-472. *In* H.J. Webber and L.D. Batchelor, eds. **The Citrus Industry Vol. 1**. University of California Press, Berkeley.

Tandon, M. and Y.N. Shukla. 1995. Some chemical constituents from *Vernonia cinerea*. **Indian Drugs** 32 (3): 132-133.

Terradas, M., M. Martín, L. Tusell and A. Genescà. 2010. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutat. Res.** 705 (1): 60-67.

Thongthoom, T., P. Promsuwan and C. Yenjai. 2011. Synthesis and cytotoxic activity of the heptaphylline and 7-methoxyheptaphylline series. **Eur. J. Med. Chem.** 46 (9): 3755-3761.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Trump, B.E., I.K. Berezesky, S.H. Chang and P.C. Phelps. 1997. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicol. Pathol.** 25 (1): 82-88.

Vercammen, D., P. Vandenabeele, R. Beyaert, W. Declercq and W. Fiers. 1997. Tumour necrosis factor-induced necrosis versus anti-Fas-induced apoptosis in L929 cells. **Cytokine** 9: 801-808.

Villaseñor, I.M., J. Angelada, A.P. Canlas and D. Echegoyen. 2002. Bioactivity studies on β-sitosterol and its glucoside. **Phytother. Res.** 16 (5): 417-421.

Wang, M., L. Ren and B. Shan. 2005. Inhibitory effects of extracellular adenosine triphosphate on growth of esophageal carcinoma cells. **World J. Gastroenterol.** 11: 5915-5919.

Wong, F.C., C.C. Woo, A. Hsu and B.K.H. Tan. 2013. The anti-cancer activities of *Vernonia amygdalina* extract in human breast cancer cell lines are mediated through caspase-dependent and p53-independent pathways. **Plos One** 8 (10).

Wongwiwatthananukit, S., P. Benjanakaskul, T. Songsak, S. Suwanamajo and V. Verachai. 2009. Efficacy of *Vernonia cinerea* for smoking cessation. **J. Health Res** 23 (1): 31-36.

Yadava, R.N. and M. Raj. 2013. A new antiviral flavone glycoside from *Vernonia cinerea* Less. **Asian J. Chem.** 25 (7): 3542-3544.

Yamamoto, A., K. Nakashima, S. Kawamorita, A. Sugiyama, M. Miura, Y. Kamitai and Y. Kato. 2014. Protective effects of raw and cooked Blackcurrant extract on DNA damage induced by hydrogen peroxide in guman lymphoblastoid cells. **Pharmaceut. Biol.** 52 (6): 782-788.

Yedjou, C., E. Izevbigie and P. Tchounwou. 2008. Preclinical assessment of *Vernonia amygdalina* leaf extracts as DNA damaging anti-cancer agent in the management of breast cancer. **Int. J. Environ. Res. Publ. Health** 5 (5): 337-341.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Youn, U.J., G. Miklossy, X. Chai, S. Wongwiwatthananukit, O. Toyama, T. Songsak, J. Turkson and L.C. Chang. 2014. Bioactive sesquiterpene lactones and other compounds isolated from *Vernonia cinerea*. **Fitoterapia** 93: 194-200.

_____, E.J. Park, T.P. Kondratyuk, C.J. Simmons, R.P. Borris, P. Tanamatayarat, S. Wongwiwatthananukit, O. Toyama, T. Songsak, J.M. Pezzuto and L.C. Chang. 2012. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from the flower of *Vernonia cinerea*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 22: 5559-5562.

Zhan, L., H. Sakamoto, M. Sakuraba, D.S. Wu, L.S. Zhang, T. Suzuki, M. Hayashi and M. Honma. 2004. Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. **Mutat. Res.** 557(1): 1-6.

Zhao, M., B. Yang, J. Wang, B. Li and Y. Jiang. 2006. Identification of the major flavonoids from pericarp tissues of lychee fruit in relation to their antioxidant activities. **Food Chem.** 98 (3): 539-544.

Zhu, H., Y. Tang, Z. Min and Z. Gong. 2009. Bioactive constituents from whole herbs of *Vernonia cinerea* (II). **Zhongguo Zhongyao Zazhi** 34 (21): 2765-2767.

_____, X. Zhu, Y. Tang, P. Tang, L. Pan, M. Pan, Z. Min and D. Min. 2008. Studies on bioactive constituents of whole herbs of *Vernonia cinerea*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi** 33 (16): 1986-1988.

Zou, H., Y. Li, X. Liu and X. Wang. 1999. An Apaf-1/cytochrome multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **J. Biol. Chem.** 274: 11549–11556.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารเลี้ยงเซลล์ และสารเคมีที่ใช้ใน

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

1. ละลายอาหารผง RPMI 1640 ปริมาณ 2.08 กรัม ในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน
2. เติม $NaHCO_3$ ปริมาณ 0.4 กรัม ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน
3. ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเซลล์ ให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.2
4. เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 200 มิลลิลิตร
6. กรองอาหารผ่าน filter membrane ขนาด 0.2 ไมโครเมตรในตู้ปลอดเชื้อ เก็บอาหารที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Phosphate buffered saline (PBS)

1. ชั่ง NaCl 8 กรัม, KCl 0.2 กรัม, Na_2HPO_4 1.44 กรัม และ KH_2PO_4 0.24 กรัม
2. นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
3. ปรับ pH ให้ได้ 7.4
5. เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 1,000 มิลลิลิตร
6. นำสารละลายที่ได้ไปทำการปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) เก็บ PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียม Potassium phosphate buffer 0.1M pH 7.4

1. ชั่ง K_2HPO_4 17.42 กรัม, KH_2PO_4 13.61 กรัม
2. นำแต่ละส่วนค่อยๆ ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร
3. ปรับ pH ให้ได้ 7.4
4. เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 200 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา

ชื่อ	นางสาวฐิติมา เจรจาศิลป
เกิดวันที่	24 เมษายน 2528
สถานที่เกิด	อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	อาจารย์ผู้ช่วยสอนวิชาชีววิทยาภาคปฏิบัติการ (01424112) ภาคต้น ปีการศึกษา 2553 อาจารย์พิเศษสอนวิชาปฏิบัติการชีววิทยาทั่วไป (วท 161) ภาคต้น ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์