รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรกรดน้ำต่อการต้านอนุมูลอิสระ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์

ผู้วิจัย

ดร. เนตรนภา แซ่หลี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2557

มหาวิทยาลัยทักษิณ

สัญญาเลขที่ 03-4/2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรกรดน้ำต่อการต้านอนุมูลอิสระ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์

ผู้วิจัย

ดร. เนตรนภา แซ่หลี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2557

มหาวิทยาลัยทักษิณ

บทคัดย่อ

สมุนไพรกรดน้ำเป็นพืชที่มีสรรพคุณช่วยห้ามเลือดและสมานแผล แต่กลไกในการออกฤทธิ์ยังไม่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากต้นกรดน้ำ จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากส่วนของต้นสด โดยวิธีเกี่ยวเนื่องกับเอนไซม์ xanthine oxidase พบว่าสารสกัดที่ใช้น้ำในการสกัด ให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่าสารสกัดจากเมทานอล และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับวิตามินซี เมื่อนำสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดิน และรากมาทดสอบกับอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดจากส่วนเหนือดิน ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดจากราก จากการทดสอบฤทธิ์ป้องกันดีเอ็นเอเสียหายจากอนุมูลอิสระ ที่เกิดจาก metal- catalyzed oxidation (MCO) พบว่าสารสกัดสามารถป้องกันการทำลายดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ โดยสารสกัดจากส่วนเหนือดินแบบสดสามารถป้องกันการทำลายดีเอ็นเอได้ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด แต่สารสกัดจากส่วนเหนือดิน ที่ผ่านการอบแห้ง สามารถป้องกันการทำลายดีเอ็นเอ ซึ่งไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด เทคนิค MTT assay ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำทั้งแบบสดและผ่านการอบแห้ง สามารถเพิ่มการมีชีวิตของเซลล์ ป้องกันการตายของเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) จากอนุมูลอิสระ H_2O_2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนเซลล์ ยังพบว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมลง *Sf9* ที่นำมาทดสอบ และช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ ผลการศึกษาดังกล่าวสนับสนุนกลไกการรักษาแผลของสารสกัด โดยผ่านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดจากต้นกรดน้ำมาใช้รักษาแผล

คำสำคัญ: สมุนไพรกรดน้ำ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การเพิ่มจำนวนเซลล์

Abstract

Scoparia dulcis has been used to prevent bleeding and promote wound healing, but the mechanism is still unknown. The aim of this study was to evaluate the radical scavenging of crude extracts of *S. dulcis*. The xanthine oxidase activity suggested that aqueous extract of fresh *S. dulcis* showed greater antioxidant activity as compare to methanolic extract, and displayed nearly similar antioxidant property with pure ascorbic acid. The result of DPPH assay revealed that the aqueous extract of fresh aerial parts showed stronger antioxidant capacity than the fresh root parts. DNA damage protective activity was performed by metal-catalyzed oxidation (MCO) system. The crude fresh plant extracts prevented the oxidative damage to DNA in the presence of DNA damaging agent in a dose-dependent manner. However, the dry plant extracts protected DNA in a dose-independent manner. Moreover, MTT cell proliferation assay indicated that the present of both fresh and dry crude extracts significantly increased cell viability by protecting *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) insect cells against H_2O_2-induced cell death. In addition, MTT cell proliferation assay indicated that this plant extracts was non-toxic to *Sf9* cells, and increased in cell proliferation. These results suggest a mechanism of the extracts to accelerate wound healing via antioxidant activities. It may be possible to use this plant extracts in the treatment of wounds.

Keywords: *Scoparia dulcis* Linn., antioxidants, cell proliferation

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง และสถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้อนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัย ประเภททุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ในปี 2557 ขอขอบคุณทุกคนที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการแนะนำ สนับสนุนและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เนตรนภา แซ่หลี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 แสดงสรรพคุณของต้นกรดน้ำ 4

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากต้นกรดน้ำ วิเคราะห์ด้วย xanthine oxidase activity assay kit 12

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของต้นกรดน้ำ 3

ภาพที่ 2 สมดุลระหว่างการผลิตอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ 6

ภาพที่ 3 แสดงการทำงานของเอนไซม์ reductase ในไมโทคอนเดรีย 7
ในการรีดิวซ์สาร MTT

ภาพที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดต้นกรดน้ำแบบสด 13

ภาพที่ 5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดในส่วนเหนือดินของต้นกรดน้ำ 14
ที่ผ่านการอบแห้ง

ภาพที่ 6 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นกรดน้ำแบบสด ในการป้องกันซุปเปอร์คอยด์ 16
ดีเอ็นเอถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ

ภาพที่ 7 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นกรดน้ำที่ผ่านการอบแห้ง ในการป้องกัน 16
ซุปเปอร์คอยด์ดีเอ็นเอถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ

ภาพที่ 8 แสดงอัตราการรอดของเซลล์ *Sf9* ที่บ่มและไม่บ่มด้วยอนุมูลอิสระ 17
H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ภาพที่ 9 แสดงอัตราการรอดของเซลล์แมลง *Sf9* ที่บ่มด้วยอนุมูลอิสระ H_2O_2 19
และบ่มด้วยสารสกัดจากต้นกรดน้ำแบบสด

ภาพที่ 10 แสดงอัตราการรอดของเซลล์แมลง *Sf9* ที่บ่มด้วยอนุมูลอิสระ H_2O_2 19
และบ่มด้วยสารสกัดจากต้นกรดน้ำที่ผ่านการอบแห้ง

ภาพที่ 11 แสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์แมลง *Sf9* ที่บ่มด้วยสารสกัดจากต้นกรดน้ำ 20

บทที่ 1 บทนำ

การรักษาแผลในผู้ป่วย และสัตว์เศรษฐกิจเป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะแผลในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ซึ่งการรักษาจะกระทำได้ยาก เนื่องจากแผลหายช้าและเมื่อเกิดบาดแผลก็มักถูกปล่อยละเลย เพราะแผลไม่เจ็บปวด จนทำให้แผลลุกลามและมีการติดเชื้อ หากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้อง แผลอาจจะลุกลาม มีการติดเชื้อจนถึงขนาดต้องตัดขา บางรายมีการติดเชื้อรุนแรงอาจเป็นอันตรายถึงชีวิต ในปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรมาใช้รักษาโรคกันอย่างแพร่หลาย แต่ความรู้ด้านกลไกในการรักษาเชิงวิทยาศาสตร์นั้นมีอยู่อย่างจำกัด เนื่องจากการขาดองค์ความรู้จึงทำให้การนำสมุนไพรไทยไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์มีน้อยมาก ในการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นกรดน้ำ (*Scoparia dulcis* Linn.) ซึ่งเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน พบได้ทั่วไปในภาคต่างๆ ของประเทศไทย และในแถบประเทศ อินเดีย บราซิล อเมริกา เปรู ก็มีการนำต้นกรดน้ำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายเช่นกัน ซึ่งภูมิปัญญาชาวบ้านใช้เป็นยารักษาโรคและบาดแผลต่างๆ มาเป็นเวลานาน เช่น รักษาโรคมะเร็ง โรคตับ ผื่นคัน แก้ไอ แผลโรคกระเพาะอาหาร แผลสด ลดไข้ บรรเทาอาการหัด เจ็บคอ อาเจียน จุกเสียด ปวดท้อง ท้องเสีย ลำไส้อักเสบ ขับปัสสาวะ ลดอาการบวมน้ำ ขาบวมจากเหน็บชา หลอดลมอักเสบ ขับระดู ยาอมบ้วนปากแก้ปวดฟัน แก้ปวดหัว ขับปัสสาวะ และรวมถึงรักษาโรคเบาหวาน ซึ่งได้มีนักวิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ของต้นกรดน้ำเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะการรักษาโรคเบาหวาน ซึ่งพบว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำ ช่วยลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด โดยขนส่งน้ำตาลไปยังกล้ามเนื้อ และกระตุ้นการทำงานของฮอร์โมนอินซูลิน และพบว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แบคทีเรีย ไวรัส และต้านการอักเสบ (Zulfiker et al. 2011 ; Hayashi 2008; Beh et al. 2010) ในปี 2011 Krishna และคณะ พบว่าสารสกัดจากส่วนรากของต้นกรดน้ำ ช่วยรักษาแผลในหนู (Krishna et al. 2011) และสารสกัดจากใบช่วยให้เลือดของหนูแข็งตัวได้เร็วขึ้น (Ediriweera et al. 2011) จึงมีความเป็นไปได้ว่าต้นกรดน้ำ จะช่วยรักษาแผลโดยเฉพาะแผลในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และแผลที่เกิดในสัตว์ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ สุกร เมื่อเกิดบาดแผล เกิดการติดเชื้อโรค หรือสารเคมีอันตรายต่างๆ จะทำให้เซลล์มีปริมาณสารอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น อนุมูลอิสระได้แก่ superoxide anions (O_2^-) hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radicals ($HO^{\bullet}$) สารอนุมูลอิสระเหล่านี้ จะเป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ดีเอ็นเอ โปรตีน และทำลายสมดุลของระบบต่างๆ ในร่างกาย อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ ไขมันอุดตันในเส้นเลือด ไขข้ออักเสบ ต้อกระจก มะเร็ง เบาหวาน และโรคความจำเสื่อม (Paschos et al. 2013) สิ่งมีชีวิตเองก็มีกลไกการป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์หรือเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถช่วยยับยั้งป้องกันภาวะถูกออกซิไดส์เกินสมดุล (oxidative stress) เช่นเอนไซม์ *superoxide dismutase* (*SOD*) ทำหน้าที่เปลี่ยน O_2^- เป็น H_2O_2 และ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจะถูกกำจัดต่อ โดยเอนไซม์ *catalase* ซึ่งเปลี่ยน H_2O_2 เป็นโมเลกุลน้ำ (H_2O) และออกซิเจน (O_2) เพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์ ในปัจจุบันได้มีการค้นพบโปรตีนที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และนำโปรตีนมาใช้ในการป้องกันโรคต่างๆ มากขึ้นเช่น โปรตีน Sulfiredoxin-1 (Srxn1) สามารถป้องกันเซลล์ PC12 จากอนุมูลอิสระ H_2O_2 ได้ (Li Q et al. 2013) โปรตีน myo-inositol (MI) สามารถป้องกันและฟื้นฟูซ่อมแซมเซลล์ enterocytes จาก copper ได้ โดย

โปรตีน MI กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzyme) (Jiang WD et al. 2013) ในกุ้งคณะวิจัยได้พบว่า RACK1 และ TCTP ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นโปรตีนที่มีสมบัติในการป้องกันการตายของเซลล์จากอนุมูลอิสระ H_2O_2 และช่วยป้องกันการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง (Saelee et al. 2011; Tonganunt et al. 2008) สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในพืชส่วนใหญ่ จะเป็นสารประกอบฟีโนลิก ได้แก่พวกฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่มีขั้ว ในงานวิจัยฉบับนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นกรดน้ำ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดมีขั้ว นอกจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังพบว่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) เป็นขั้นตอนหนึ่งที่ช่วยในการรักษาแผล งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลของสารสกัดจากต้นกรดน้ำต่อการต้านอนุมูลอิสระและการเพิ่มจำนวนเซลล์ เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นในการพัฒนาสารสกัดนี้ในการรักษาแผลในผู้ป่วยและสัตว์ การป้องกันโรคพืชและสัตว์น้ำจากการติดเชื้อ ตลอดจนอุตสาหกรรมเสริมความงาม และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์ ประกอบกับต้นกรดน้ำเป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วไป จึงควรนำมาประยุกต์ใช้และเพิ่มคุณค่าของสมุนไพรให้มีมูลค่ามากขึ้น

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ต้นกรดน้ำ

ต้นกรดน้ำ (*Scoparia dulcis* Linn.) เป็นสมุนไพรที่เป็นพรรณไม้พุ่ม ลำต้นไร้ขน มีความสูงประมาณ 25-80 เซนติเมตร ใบเป็นสีเขียวแก่ ใบเล็ก ขอบของใบจะหยักแบบฟันปลายาวประมาณ 1-2 นิ้ว ใบออกตรงข้ามกันเป็นเกลียวรอบกิ่ง กิ่งเล็กเรียว แผ่สาขามาก มีดอกสีขาว เล็ก กลีบเลี้ยงมีจำนวน 4 กลีบ เกสรตัวเมียมี 1 อัน และเกสรตัวผู้มี 4 อัน ต้นหนึ่งจะมีดอกมาก ลักษณะของต้นกรดน้ำแสดงดังภาพที่ 1 กรดน้ำจะขึ้นอยู่ในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ในประเทศอินเดีย และใต้หวัน ใช้กรดน้ำในการรักษาโรคเบาหวาน และความดันโลหิตสูง ในสาธารณรัฐแกมเบีย ได้นำกรดน้ำมาผลิตเป็นโลชั่นที่ใช้หรับลดไข้ ในประเทศนิการากัวนำใบมาสกัดด้วยน้ำร้อน ใช้รักษาโรคมาลาเรีย ตับ กระเพาะอาหาร ปวดประจำเดือน และแผลจากแมลงกัดต่อย นอกจากนี้ทั้งใบสดและแห้งสามารถนำมาใช้ รักษาแผล แผลอักเสบ ผื่นคัน แก้ไอ วัณโรค โรคมะเร็ง ในรากพบว่าสามารถใช้รักษาโรคดีซ่านและท้องเสียได้ ต้นกรดน้ำยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส แบคทีเรีย รา ยับยั้งการเกิดมะเร็ง สรรพคุณของต้นกรดน้ำแสดงดังตารางที่ 1 สารที่สกัดได้จากต้นกรดน้ำ ได้แก่ สารอินทรีย์ในกลุ่ม Flavones terpenes และ steroids องค์ประกอบหลักทางเคมี เช่น scoparic acid A scoparic acid B scopadulcic acid A scopadulcic acid B scopadulciol scopadulin scopanolal saponin scopadiol และ ammelin (Hayashi 2011; Mishra et al. 2012)

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของต้นกรดน้ำ

ตารางที่ 1 แสดงสรรพคุณของต้นกรดน้ำ (http://thaiherb-tip108.blogspot.com/2011/03/blog-post_1860.html)

ส่วนต่าง ๆของพืช	สรรพคุณ
ส่วนที่อยู่เหนือดิน	ลดไข้ บรรเทาอาการหัด แก้ไอ เจ็บคอ อาเจียน จุกเสียด ปวดท้อง ท้องเสีย ลำไส้อักเ ขับปัสสาวะ ลดอาการบวมน้ำ ขาบวมจากเหน็บชา แก้ผดผื่นคัน
ใบ	เบาหวาน ลดไข้ แก้ไอ บาดแผล แผลอักเสบ แผลไฟไหม้ แผลแมลงกัดต่อย ผื่นคัน โรคตับ มาลาเรีย วัณโรค มะเร็ง ปวดประจำเดือน หลอดลมอักเสบ ขับระดู แก้ปวดฟ กระเพาะอาหาร
ราก	ลดไข้ แก้ปวดศีรษะ ปวดประจำเดือน กระเพาะอาหาร ขับปัสสาวะ ดีซ่าน ท้องเสีย
ทุกส่วนของพืช	แก้ไอ ลดไข้ ปวดท้อง ท้องเสีย ลำไส้อักเสบ โรคตับ ความดันโลหิตสูง แผลจากแมลงกัดต่อย มาลาเรีย ลดอาการบวมน้ำ ขาบวมจากเหน็บชา แก้ผดผื่นคัน

งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อแบคทีเรีย รา และไวรัส (Zulfiker et al. 2011 ; Hayashi 2008; Zulfiker et al. 2011) ในปี 2011 Ediriweera และคณะพบว่าสารสกัดจากใบของต้นกรดน้ำช่วยให้เลือดแข็งตัวเร็วขึ้น (Ediriweera et al. 2011) และสารสกัดจากรากช่วยรักษาแผลในหนู (Krishna et al. 2011) ช่วยรักษาโรคความดันโลหิตสูง ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก DU-145 (Wu et al. 2012) ลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด และกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Beh et al. 2010) สารสกัดหยาบเมทานอลจากต้นกรดน้ำยับยั้ง lipid peroxidation และยับยั้งปฏิกิริยา oxidation ของ low density lipoproteins (LDL) ทำให้ป้องกันโรคหลอดเลือดตีบได้ ซึ่งพบว่าในสารสกัดประกอบด้วยสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ myricetin และ rutin เป็นองค์ประกอบ (Nambiar et al., 2014)

2.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

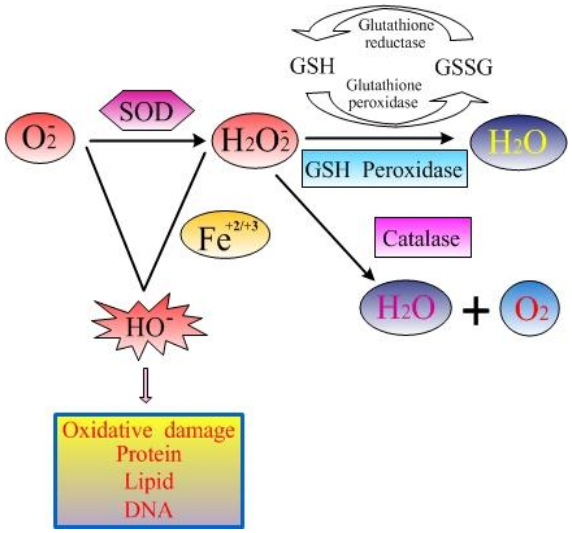
การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีแยกสารออกจากกันโดยอาศัยสมบัติของการละลายของสารแต่ละชนิด โดยตัวทำละลายที่เหมาะสม ควรจะมีสมบัติทั่วไป ดังนี้ คือ ละลายได้ดีในสารที่ต้องการ ไม่ละลายสารอื่นในของผสมนั้น ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด มีจุดเดือดต่ำ ระเหยได้ง่าย เมื่อสกัดสารออกมาเป็นสารละลายแล้ว สามารถแยกตัวทำละลายออกจากสารละลายนั้นได้ง่าย ไม่เป็นพิษ หาง่ายและราคาถูกโดยตัวทำละลายที่นิยมใช้ ได้แก่ สารละลายที่ไม่มีขั้ว (non polar molecules) คือ

เฮกเซน ไดเอทิลอีเทอร์ และสารละลายที่มีขั้ว (polar molecules) คือ น้ำ เมทานอล เอทานอล อะซีโตน ซึ่งตัวทำละลายจะชะเอาสารองค์ประกอบที่เราต้องการออกไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ สภาพมีขั้ว (polarity) ของสารที่เป็นองค์ประกอบกับสารที่เป็นตัวทำละลาย ถ้าตัวทำละลายเป็นโมเลกุลที่มีขั้ว จะชะเอาสารองค์ระกอบที่เป็นสารมีขั้วไปด้วยแต่ถ้าตัวทำละลายละลายเป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว จะชะเอาสารองค์ประกอบที่เป็นสารไม่มีขั้วไปด้วย

2.3 ภาวะถูกออกซิไดส์เกินสมดุล (Oxidative stress) สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant system) และกลไกการรักษาแผล (wound healing)

เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับความเครียดจากปัจจัยต่างๆ ทั้งทางสิ่งแวดล้อม ฟิสิกส์ เคมี และชีวะ เช่น บาดแผลอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ความเค็มของน้ำ การขาดอาหาร มลพิษต่างๆ รังสียูวี และโรคติดเชื้อ การติดเชื้อทำให้เซลล์เสียสมดุลระหว่างปริมาณอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะทำให้เซลล์เข้าสู่ภาวะถูกออกซิไดส์เกินสมดุล (oxidative stress) จนได้รับบาดเจ็บและเสียหาย ซึ่งทำให้ขาดออกซิเจน และกลไกต่างๆ ผิดปกติ เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระซึ่งเรียกว่า Reactive oxygen species (ROS) เช่นการสะสมของ superoxide anions (O_2^-) hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radicals ($HO^{\bullet}$) (Tu et al., 2008; Wang et al., 2009, Yanaka, 2011) ในสัตว์น้ำพบว่าการติดเชื้อแบคทีเรีย และไวรัสก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress ได้ด้วย เช่นการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง ภาวะ oxidative stress ส่งผลให้เกิดความเสียหายในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างมาก (Zhou et al., 2009) ในพืชพบว่าสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ร้อนจัด เย็นจัด ดินแห้ง ดินเกลือ และโรคต่างๆ ในพืช จะส่งผลให้พืชเกิดการสะสมของอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน สารอนุมูลอิสระที่มากเกินไป จะเป็นอันตรายต่อเซลล์ เนื่องจากสามารถจับกับโมเลกุลต่างๆ ที่แพร่อยู่ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ ดีเอ็นเอ โปรตีน เสียสภาพ และทำลายสมดุลของระบบต่างๆ (Lesser 2006) ซึ่งสิ่งมีชีวิตเองก็มีกลไกในการรักษาสมดุลของการเกิดและการสลาย ROS โดยจะมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ประกอบไปด้วยโปรตีนหรือเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถช่วยยับยั้งหรือป้องกันภาวะ oxidative stress เช่นเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ทำหน้าที่เปลี่ยน O2- เป็น H2O2 และ H2O2 ที่เกิดขึ้นจะถูกกำจัดต่อ โดยเอนไซม์ catalase ซึ่งเปลี่ยน H2O2 เป็นโมเลกุลน้ำ (H2O) และออกซิเจน (O2) เพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์ (Gomez-Anduro et al., 2006; Ren et al., 2009; Tavares-Sánchez et al., 2004) ดังแสดงในรูปที่ 2 ดังนั้น antioxidants จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์จากภาวะ oxidative stress เช่น กุ้ง (*Penaeus monodon*) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย Dunaliella salina ซึ่งมีสาร antioxidant ชนิด betacarotene อยู่มาก สามารถทนต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ (Madhumathi 2011) การเกิดแผลทำให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress ดังนั้นการต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญในการรักษาแผล การรักษาแผลเป็นกระบวนที่เกิดขึ้นหลังจากที่เซลล์ได้รับบาดเจ็บ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญ 4 ขั้นตอน ได้แก่ 1. ขบวนการห้ามเลือด (Hemostasis) 2. การอักเสบ (inflammation) 3. การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) 4. การสร้างใหม่ ปรับปรุง เปลี่ยนแปลง (remodeling) จากรายงานก่อนหน้านี้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัด

จากต้นกรดน้ำจะช่วยรักษาและสมานแผล โดยเฉพาะแผลในผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยผ่านกลไกกระตุ้นเอนไซม์หรือโปรตีนต้านอนุมูลอิสระ

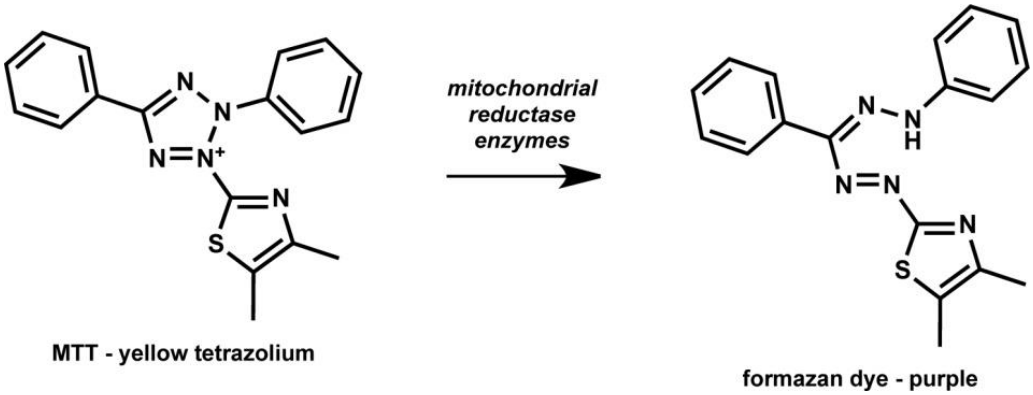


ภาพที่ 2 สมดุลระหว่างการผลิตอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อสมดุลเปลี่ยนทำให้การผลิตอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตเกิดภาวะ oxidative stress

ที่มา : ดัดแปลงจาก Wakamatsu และคณะ (Wakamatsu et al., 2008)

2.4 วิธี MTT assay

MTT assay เป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิต ไมโทคอนเดรียจะสามารถผลิตเอนไซม์ *mitochondrial reductase* ซึ่งจะรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) จากสีเหลือง ได้ผลึกของ formazan ที่มีสีม่วง แต่ในขณะเดียวกันเซลล์ที่ตายจะไม่สามารถผลิตเอนไซม์ *mitochondrial reductase* มารีดิวซ์สาร MTT ได้ ทำให้ยังคงเห็นสีเหลืองของ MTT อยู่ ดังนั้นเซลล์ที่ตายจะมีลักษณะสีเหลือง (สีของสารละลาย MTT) ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะติด สีม่วง ซึ่งเมื่อนำมาละลายในตัวทำละลาย เช่น DMSO (dimethyl sulfoxide) จะได้สารละลายสีม่วงแกมน้ำเงิน สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์



ภาพที่ 3 แสดงการทำงานของเอนไซม์ reductase ในไมโทคอนเดรียในการรีดิวซ์สาร MTT
ที่มา : http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=41

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างพืชและการเตรียมสารสกัดจากต้นกรดน้ำ

เก็บตัวอย่างต้นกรดน้ำจาก ต. พะวง อ. เมือง จ. สงขลา และส่งตัวอย่างเพื่อตรวจสอบลักษณะที่ศูนย์สมุนไพรทักษิณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำต้นกรดน้ำต้นสด มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน และล้างด้วยน้ำกลั่นอีกรอบ จากนั้นตัดเฉพาะส่วนเหนือดิน แบ่งออกเป็นสองส่วน

ส่วนที่หนึ่งนำมาบดด้วยไนโตรเจนเหลว ชั่งน้ำหนัก 20 กรัม และเติมน้ำกลั่นและเมทานอล อย่างละ 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 เก็บสารสกัดหยาบที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป และทำการบดรากด้วยด้วยไนโตรเจนเหลว ชั่งน้ำหนัก และสกัดด้วยน้ำกลั่น เช่นเดียวกับการสกัดจากส่วนเหนือดิน

ส่วนที่สอง นำไปอบให้แห้งโดยใช้อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนัก 20 กรัม และเติมเมทานอล และน้ำ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 และนำส่วนใสไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นทำการชั่งปริมาณสารสกัดที่ได้และละลายด้วยตัวทำละลายอีกครั้ง เก็บสารสกัดหยาบไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ในกลุ่มที่มีขั้ว เช่น เมทานอล เอทานอล และน้ำ สามารถสกัดสารในกลุ่ม Terpenoids และ Flavonoid จากต้นกรดน้ำได้

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นกรดน้ำด้วยวิธีที่เกี่ยวเนื่องกับเอนไซม์ xanthine oxidase

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีที่เกี่ยวเนื่องกับเอนไซม์ xanthine oxidase เป็นวิธีการที่อ้างอิงมาจาก Gusev และคณะ (Gusev et al., 2010) โดยนำสารสกัดหยาบจากต้นกรดน้ำแบบสด มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ชุดทดสอบ CLETA-S Antioxidant activity assay kit ของบริษัท ATTO ประเทศญี่ปุ่น เอนไซม์ hypoxanthine- xanthine oxidase จะเปลี่ยนสารตั้งต้น xanthine เป็นกรดยูริก และอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ เรดิคอล (O_2^-) อนุมูลอิสระนี้จะสามารถเรืองแสงได้ และเมื่อมีสารต้านอนุมูลอิสระ การเรืองแสงจะลดลง เนื่องจากอนุมูลอิสระถูกกำจัดออก นำผลที่ได้มาคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามคู่มือของบริษัท โดยมีสูตรดังนี้ และเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับวิตามินซี ซึ่งเป็นตัวควบคุม

$$\text{Antioxidant activity} = \frac{1 - [(\text{Sample(P)} - \text{Sample(N)}]}{(\text{Positive control}) - (\text{Negative control})}$$

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นกรดน้ำด้วยวิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นวิธีการที่อ้างอิงมาจาก Rahman และคณะ (Rahman et al., 2014) โดยนำต้นกรดน้ำแบบสด จากส่วนเหนือดิน และราก ที่สกัดด้วยน้ำที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น เท่ากับ 1 กรัม/มิลลิลิตร มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมเข้ากับสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรมีสีม่วง ความเข้มข้น 0.1 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรจนครบ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณเปอร์เซ็นต์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH จากสมการดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging activity}\,(\%) = \frac{(\text{Absorbance Control} - \text{Absorbance Sample}) \times 100}{\text{Absorbance Control}}$$

โดย A sample = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

A control = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

นำสารสกัดหยาบที่ผ่านการอบแห้ง ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับสารสกัดหยาบจากต้นสด โดยใช้สารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml)

3.4 การศึกษาผลของสารสกัดจากต้นกรดน้ำต่อการป้องกันดีเอ็นเอเสียหายจากอนุมูลอิสระโดยวิธี Metal- catalyzed oxidation (MCO)

การป้องกันการสลายของดีเอ็นเอด้วยวิธี MCO ดัดแปลงมาจาก Gnanasekar และ Ramaswamy (Gnanasekar and Ramaswamy, 2011) โดยเติมพลาสมิด pUC19 ปริมาณ 200 ng ผสมกับสารสกัดจากต้นกรดน้ำแบบสด ที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 1 1.5 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในส่วนของสารสกัดที่ผ่านการอบแห้งที่สกัดด้วยน้ำ ใช้ที่ความเข้มข้น 50, 250, 500 และ 750 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และผสมด้วย MCO system ซึ่งประกอบด้วย 3 µM ของ $FeCl_3$ และ 10 mM ของ DTT ปรับปริมาตรรวมด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และใช้โปรตีน bovine serum albumin (BSA) ปริมาณ 4 µg เป็นโปรตีนควบคุม จากนั้นวิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel

3.5 การศึกษาผลของสารสกัดจากต้นกรดน้ำต่อการป้องกันการตายของเซลล์ *Sf9* จากอนุมูลอิสระ H_2O_2 ด้วยวิธี MTT assay

3.5.1 การทำสอบอัตราการตายของเซลล์ *Sf9* จากอนุมูลอิสระ H_2O_2

เลี้ยงเซลล์ *Sf9* ในขวดเลี้ยงเชื้อขนาด 25 ตารางเซนติเมตร โดยใช้อาหาร Insect Express Sf9-S2 (PAA) และเติม 10% fetal bovine serum (FBS) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์โตจนเกือบเต็ม ทำการย้ายเซลล์และเลี้ยงเซลล์ ใน 96-well plate โดยแต่ละหลุม มีเซลล์จำนวน 5×10^4 เซลล์ บ่มเซลล์ด้วยสาร H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 500 750 µM และ 1 mM เพื่อชักนำการตายของเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution ซึ่งประกอบด้วย 1% ของกรด HCl และ 10% SDS บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่มีชีวิตที่สามารถใช้สาร MTT ได้ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาอัตราการรอดของเซลล์เปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม
จากสูตร

% cell viability = (Absorbance of treated cell /Absorbance of control cell)*100

โดย Absorbance of treated cell = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

Absorbance of control cell = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

และหาค่าความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์ตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

3.5.2 การศึกษาผลของสารสกัดจากต้นกรดน้ำต่อการป้องกันการตายของเซลล์ *Sf9* จากอนุมูลอิสระ H_2O_2

ทำการบ่มเซลล์ *Sf9* ใน 96-well plate โดยใช้อาหาร Insect Express Sf9-S2 (PAA) โดยแต่ละหลุม มีเซลล์จำนวน 5×10^4 เซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเซลล์โตเกือบเต็มหลุม บ่มเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบแบบสดที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และบ่มด้วยสารสกัดหยาบที่ผ่านการอบแห้ง ที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 150 µg/ml ผสมกับอนุมูลอิสระ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเติม stop solution เพื่อหยุดปฏิกิริยา บ่มเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่มีชีวิตที่สามารถใช้สาร MTT ได้ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาอัตราการรอดของเซลล์ เปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม

3.6 การศึกษาผลของสารสกัดจากต้นกรดน้ำต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ *Sf9* ด้วยวิธี MTT assay

ทำการเลี้ยงเซลล์ *Sf9* ใน 96-well plate โดยใช้อาหาร Insect Express Sf9-S2 (PAA) แต่ละหลุม มีเซลล์จำนวน 5×10^4 เซลล์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเซลล์โตเกือบเต็มหลุม ประมาณ 80-90% ต่อหลุม บ่มเซลล์ *Sf9* ด้วยสารสกัดหยาบแบบสดที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปรับปริมาตรด้วยอาหารให้ครบหลุมละ 100 µl จากนั้นดูดอาหารออกจากหลุม และเติมสารละลาย MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเติม stop solution ซึ่งประกอบด้วย 1% ของกรด HCl และ 10% SDS บ่มเซลล์ต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณหาอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้บ่มสารสกัด ซึ่งอัตราการรอดของเซลล์ในกลุ่มควบคุมคิดเป็น 100%

3.7 การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค Gass chromatography-Mass spectrometer (GC-MS)

นำสารสกัดหยาบเมทานอล มาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) (รุ่น ISQ MS บริษัท Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา) สภาวะของ GC-MS คือ อุณหภูมิ injection เท่ากับ 280 องศาเซลเซียส column temp เริ่มต้นที่ 50 องศาเซลเซียส ค้างไว้ 2 นาที และเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 255 องศาเซลเซียส ในอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที ค้างไว้ 15 นาที แปลผลโดยเทียบกับ library ของ Wiley

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกี่ยวเนื่องกับเอนไซม์ xanthine oxidase

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นกรดน้ำแบบสด ด้วยวิธีที่เกี่ยวเนื่องกับเอนไซม์ xanthine oxidase แสดงค่าในรูปความสามารถในการต้านออกซิเดชัน การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ เรดิคอลได้ โดยพบว่าต้นกรดน้ำที่สกัดด้วยน้ำสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการสกัดด้วยเมทานอล โดยมีค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันเท่ากับ 0.992 ± 0.007 (ตารางที่ 2) ส่วนสารสกัดจากต้นกรดน้ำที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 0.953 ± 0.014 เป็นที่น่าสนใจที่ต้นกรดน้ำที่สกัดด้วยน้ำ สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีใกล้เคียงกับวิตามินซี ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน มีค่าต้านออกซิเดชันเท่ากับ 0.999 ± 0.005

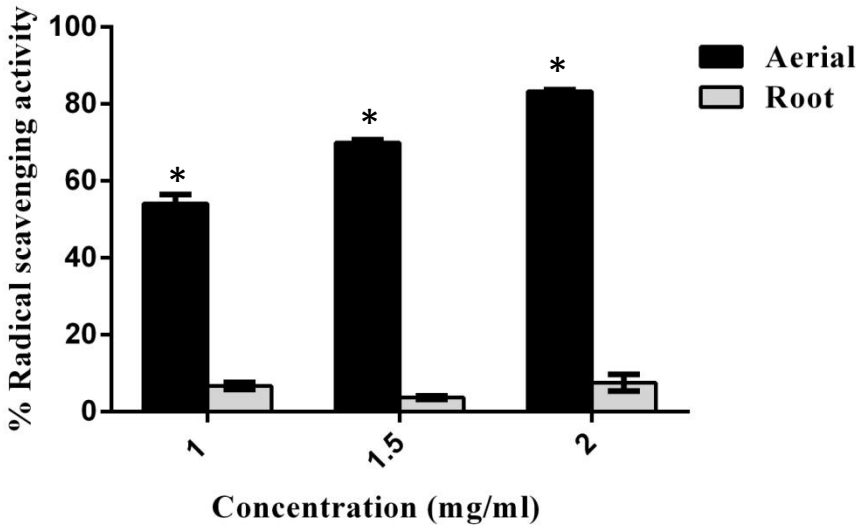
ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากต้นกรดน้ำ วิเคราะห์ด้วย xanthine oxidase activity assay kit

Tested material	Relative antioxidant
Control	0
*S. dulcis*_methanol extract	0.953 ± 0.014
*S. dulcis*_aqueous extract	0.992 ± 0.007
0.2 M Vitamin C	0.999 ± 0.005

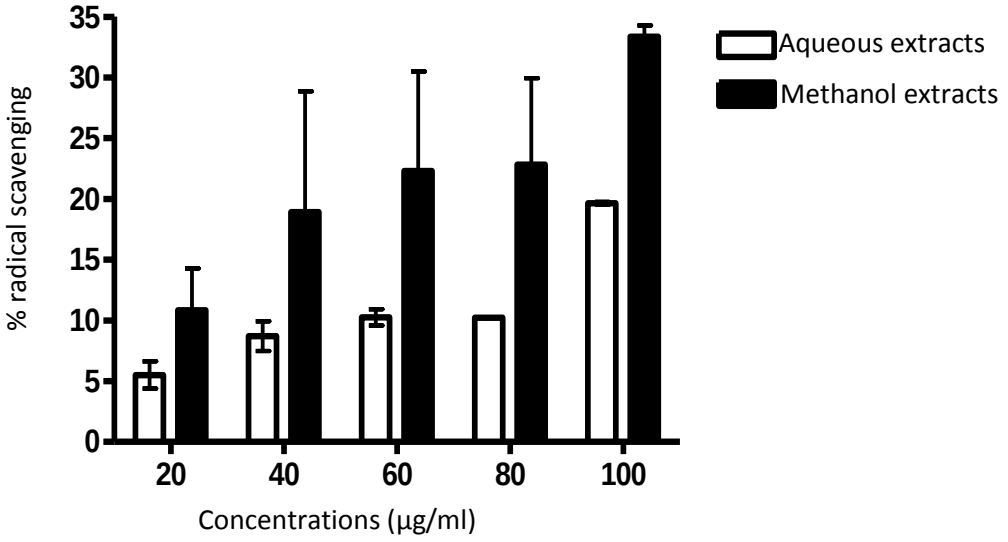
4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของต้นกรดน้ำด้วยวิธี DPPH radical scavenging

การศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่ง DPPH จะอยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียร สารละลายนี้มีสีม่วง ดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (nm) โดยสารต้านอนุมูลอิสระ ทำปฏิกิริยากับ DPPH สีของสารละลายสีม่วงจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ในการทดลองเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นสด ในส่วนเหนือดินและรากของต้นกรดน้ำ พบว่าสารสกัดน้ำจากส่วนเหนือดินมีฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH ได้ดีกว่าสารสกัดจากราก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH ได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ภาพที่ 4) และจากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดที่ผ่านการอบแห้ง พบว่าสารสกัดต้นกรดน้ำที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำ เมทานอล และเอทานอล ที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด (ภาพที่ 5) และเมื่อเทียบค่าร้อยละของ

การยับยั้งอนุมูลอิสระ กับชนิดของตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดต้นกรดน้ำที่สกัดด้วยเมทานอล มีค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 33.36 ±1.33 และสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำมีค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 19.65±0.16 (รูปที่ 2) จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต้นกรดน้ำแบบสด มีฤทธิ์ดีกว่าต้นกรดน้ำที่ผ่านการอบแห้ง และส่วนเหนือดินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดีกว่าส่วนราก จากการศึกษาของ Zulfiker และคณะพบว่า สารสกัดของต้นกรดน้ำช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และเชื้อรา การติดเชื้อส่งผลให้แผลมีปริมาณอนุมูลอิสระที่มากเกินไป และเกิดการอักเสบ (Zulfiker et al. 2011) จากการทดลองครั้งนี้จึงสนับสนุนฤทธิ์ของสมุนไพรกรดน้ำในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นกลไกร่วมในการรักษาแผลของต้นกรดน้ำ



ภาพที่ 4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดต้นกรดน้ำแบบสด ในส่วนของสารสกัดจากส่วนเหนือดินและราก โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัด โดยแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เครื่องหมายดอกจัน แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P<0.01$)



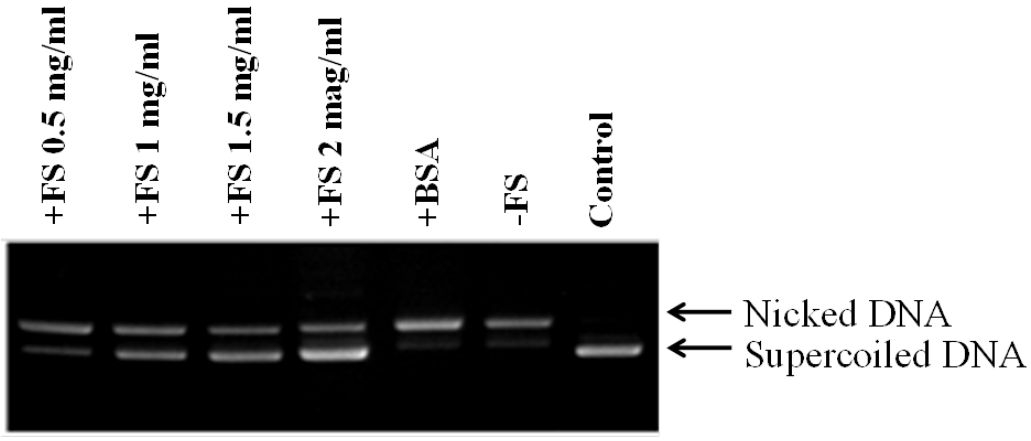
ภาพที่ 5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากสารสกัดในส่วนเหนือดินของต้นกรดน้ำที่ผ่านการอบแห้ง โดยใช้น้ำ และเมทานอล เป็นตัวทำละลาย ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 ใน 3 ซ้ำ

4.3 การศึกษาผลของสารสกัดจากต้นกรดน้ำต่อการป้องกันดีเอ็นเอเสียหายจากอนุมูลอิสระโดยวิธี Metal- catalyzed oxidation (MCO)

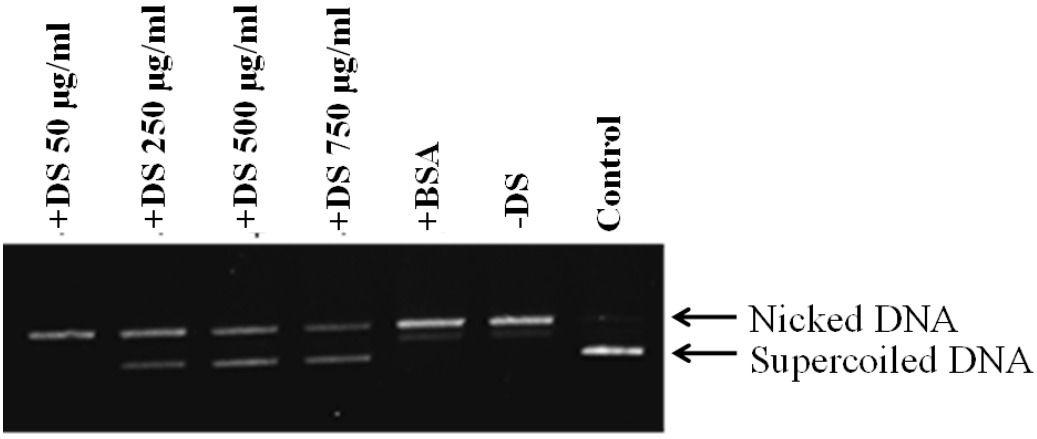
อนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (Reactive oxygen species) เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ เรดิคอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไฮดรอกซิลเรดิคอล จะส่งผลให้ดีเอ็นเอ และโปรตีนภายในเซลล์ถูกทำลาย การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินของต้นกรดน้ำ ได้ยืนยันผลการทดลอง โดยใช้วิธี Metal catalyzed oxidation assay (MCO) โดยไอออน Fe^{3+} ในปฏิกิริยาจะเร่งการเกิดออกซิเดชันของ DTT และเกิดเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียร อนุมูลอิสระเหล่านี้ทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลาย (Gnanasekar et al., 2007) โครงสร้างโดยทั่วไปของพลาสมิด pUC19 หรือดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการทดลอง มีโครงสร้างแบบซุปเปอร์คอยด์ (Supercoil DNA) เมื่อมีการวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis พบว่าจะเคลื่อนที่บนแผ่นเจล ได้เร็วกว่าโครงสร้างดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ หากโครงสร้างของดีเอ็นเอหรือพลาสมิด pUC19 ถูกทำลาย โดยสารอนุมูลอิสระ โครงสร้างของดีเอ็นเอจะถูกตัด (Nicked DNA) ทำให้โครงสร้างเกิดการคลาย จากรูปร่างแบบซุปเปอร์คอยด์ คลายเป็นวงกลมทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่บนแผ่นเจลช้าลง

เมื่อวิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบว่าอนุมูลอิสระที่ผลิตขึ้นจาก MCO system ทำให้เกิดการทำลายซุปเปอร์คอยด์ดีเอ็นเอ (ภาพที่ 6 แถวที่ 6) พบแถบดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย (Nicked DNA) แต่ไม่พบแถบของซุปเปอร์คอยด์ดีเอ็นเอดี (Supercoiled DNA) ดังแสดงในภาพที่ 6 แถวที่ 6 และเมื่อเติมสารสกัดหยาบของต้นกรดน้ำแบบสด ใน MCO system พบว่าสามารถป้องกันความเสียหายของซุปเปอร์คอยด์ดีเอ็นเอได้ โดยประสิทธิภาพการป้องกันดีเอ็นเอแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด (ภาพที่ 6 แถวที่ 1-4) โดยพบแถบซุปเปอร์คอยด์ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และแถบของดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย (Nicked DNA) ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ในขณะที่เมื่อเติมโปรตีน BSA ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมใน MCO system ส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอเช่นกัน (ภาพที่ 6 แถวที่ 5) แสดงว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำแบบสด สามารถป้องกันการทำลายดีเอ็นเอได้อย่างจำเพาะเจาะจง

จากการศึกษาการป้องกันดีเอ็นเอในสารสกัดหยาบจากส่วนเหนือดินที่ผ่านการอบแห้ง ที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าสารสกัดป้องกันการทำลายดีเอ็นเอเช่นเดียวกันกับสารสกัดจากต้นสด เมื่อเปรียบเทียบแถวที่ 1-4 ที่มีการเติมสารสกัด ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 50 250 500 และ 750 µg/ml และแถวที่ 6 ที่ไม่เติมสารสกัด สารสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถป้องกันความเสียหายของซุปเปอร์คอยด์ดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 7 แถวที่ 1) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสามารถป้องกันความเสียหายของซุปเปอร์คอยด์ดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 7 แถวที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 500 และ 750 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การป้องกันดีเอ็นเอเสียหายไม่แตกต่างจากที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาพที่ 7 แถวที่ 3-4) ในขณะที่เมื่อเติมโปรตีน BSA ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมใน MCO system พบว่าเกิดการทำลายดีเอ็นเอเช่นเดียวกันกับแถวที่ 6 (ภาพที่ 7 แถวที่ 5) แสดงว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำที่ผ่านการอบแห้ง ที่สกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการป้องการเสียหายของดีเอ็นเออย่างจำเพาะ และประสิทธิภาพการป้องกันดีเอ็นเอไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด



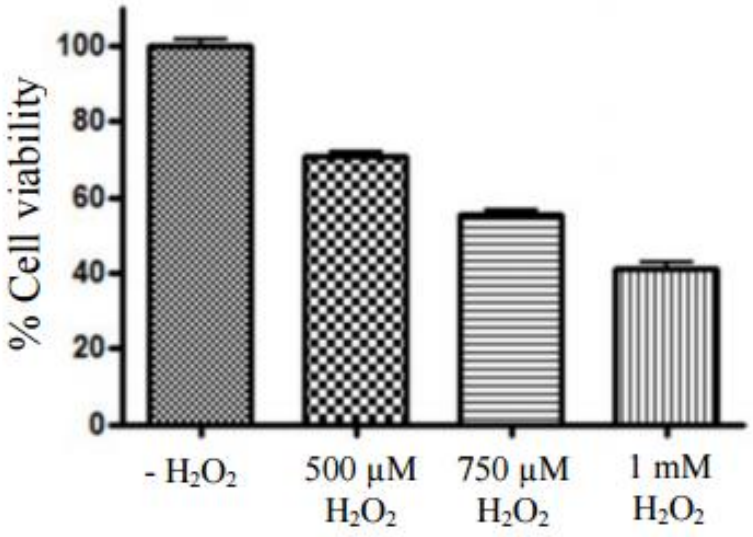
ภาพที่ 6 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นกรดน้ำแบบสด ที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการป้องกันซุปเปอร์คอยด์ดีเอ็นเอถูกทำลายจากอนุมูลอิสระใน MCO system และวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วย 0.8% Agarose gel electrophoresis



ภาพที่ 7 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นกรดน้ำที่ผ่านการอบแห้ง ในการป้องกันซุปเปอร์คอยด์ดีเอ็นเอถูกทำลายจากอนุมูลอิสระใน MCO system และวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ด้วย 0.8% Agarose gel electrophoresis

4.4 การศึกษาผลของสารสกัดจากต้นกรดน้ำต่อการป้องกันการตายของเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) จากอนุมูลอิสระ H_2O_2

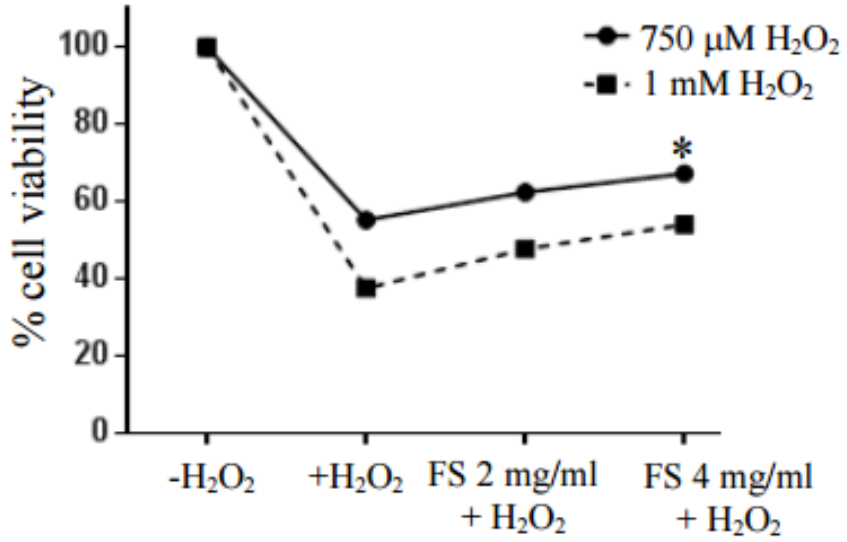
เพื่อยืนยันฤทธิ์ของต้นกรดน้ำ ในการป้องกันอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลอิสระทำให้ดีเอ็นเอ โปรตีน ภายในเซลล์ถูกทำลาย ในการทดลองนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการป้องกันการตายของเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) เซลล์ *Sf9* เป็นโมเดลที่นิยมใช้กันแพร่หลาย ในงานวิจัย เพราะ เป็นเซลล์ที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ใช้อาหารราคาไม่แพง ในการทดลองใช้ H_2O_2 เป็นอนุมูลอิสระ ที่ชักนำการตายของเซลล์ เมื่อบ่มเซลล์ *Sf9* ด้วย H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 500 µM 750 µM และ 1 mM เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์เซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย ด้วยเทคนิค MTT assay หลังจากการเติม MTT พบว่าอัตราการรอดของเซลล์ในกลุ่มที่บ่มด้วย 500 µM ของ H_2O_2 มีอัตราการรอด ประมาณ 70% ในกลุ่มที่บ่มด้วย 750 µM ของ H_2O_2 มีอัตราการรอด ประมาณ 55% ส่วนในกลุ่มที่บ่มด้วย 1 mM ของ H_2O_2 มีอัตราการรอด ประมาณ 45% (ภาพที่ 8) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ *Sf9* ที่ไม่ได้บ่มด้วย H_2O_2 ซึ่งมีอัตราการรอด 100%



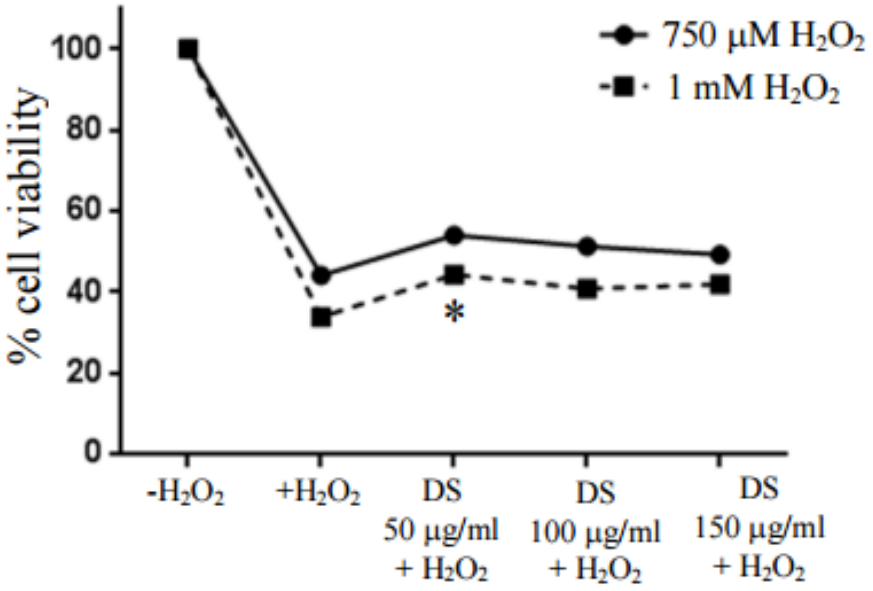
ภาพที่ 8 แสดงอัตราการรอดของเซลล์ *Sf9* ที่บ่มและไม่บ่มด้วยอนุมูลอิสระ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และวิเคราะห์อัตราการรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay ค่าที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดลองจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นกรดน้ำ ในการป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระ ทำได้โดยการบ่มเซลล์แมลง *Sf9* ด้วยอนุมูลอิสระ H_2O_2 เพื่อชักนำการตายของเซลล์ พร้อมกับบ่มสารสกัดจากต้นกรดน้ำที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยเลือกอนุมูลอิสระ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 750 μM และ 1 mM เนื่องจากทำให้เซลล์ตายใกล้เคียง 50% จากการบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบจากต้นสด ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 750 μM และ 1 mM เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และวิเคราะห์การรอดของเซลล์ ด้วย MTT พบว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำแบบสด ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถป้องกันการตายของเซลล์แมลง *Sf9* ได้ประมาณ 10% และเซลล์ที่บ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถป้องกันการตายของเซลล์แมลง *Sf9* ได้ประมาณ 15% (ภาพที่ 9)

จากการบ่มสารสกัดจากต้นกรดน้ำที่ผ่านการอบแห้ง ที่ความเข้มข้น 50 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ป้องกันเซลล์จาก H_2O_2 ได้ดีที่สุด โดยพบว่าอัตราการรอดของเซลล์มากกว่าเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัดประมาณ 10% และเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้นเป็น 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อัตราการรอดของเซลล์มากกว่ากลุ่มที่ไม่บ่มสารสกัด ประมาณ 5% (ภาพที่ 10) จากการทดสอบด้วยเทคนิค MTT assay ที่กล่าวมา พบว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำทั้งแบบสดและผ่านการอบแห้ง สามารถป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระ H_2O_2 ได้ โดยสารสกัดจากต้นสด มีฤทธิ์ป้องกันการตายของเซลล์ดีกว่าสารสกัดที่ผ่านการอบแห้ง



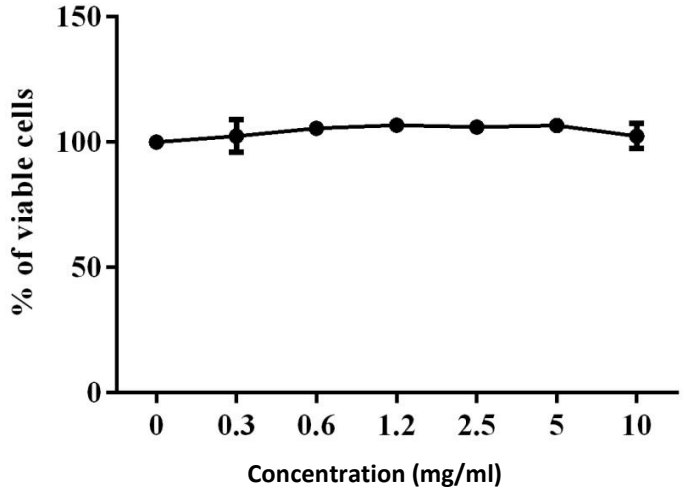
ภาพที่ 9 แสดงอัตราการรอดของเซลล์แมลง *Sf9* ที่บ่มด้วยอนุมูลอิสระ H_2O_2 และบ่มด้วยสารสกัดจากต้นกรดน้ำแบบสด ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิเคราะห์ผลการรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay และแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดลองจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 10 แสดงอัตราการรอดของเซลล์แมลง *Sf9* ที่บ่มด้วยอนุมูลอิสระ H_2O_2 และบ่มด้วยสารสกัดจากต้นกรดน้ำที่ผ่านการอบแห้ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิเคราะห์ผลการรอดของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay และแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดลองจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ

4.5 การศึกษาผลของสารสกัดจากต้นกรดน้ำต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*)

จากการนำสารสกัดจากต้นกรดน้ำแบบสดที่สกัดด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาบ่มกับเซลล์ *Sf9* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบว่าเซลล์สามารถเพิ่มจำนวนได้เพียงเล็กน้อย ประมาณ 5% แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์แมลงที่นำมาทดสอบ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3-10 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่บ่มกับสารสกัดจากต้นกรดน้ำ ดังแสดงดังภาพที่ 11 กลไกการเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็นขั้นตอนหนึ่งในการสมานและรักษาแผล งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า สารสกัดจากรากของต้นกรดน้ำช่วยรักษาแผลในหนู (Murti et al., 2011) ในพืชพบว่าเมื่อนำสารสกัดหยาบจากต้นสาบเสือบ่มในเซลล์ fibroblast พบว่าการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Heme oxygenases 1 (*HO-1*) Thromboxane synthase (*TXS*) และ *MMP-9* มีการแสดงสูงขึ้น (Pandith et al., 2013) ดังนั้นการศึกษากลไกต้านอนุมูลอิสระของต้นกรดน้ำ อาจจะมีประโยชน์ในการนำไปรักษาแผลในผู้ป่วยและสัตว์ การป้องกันโรคพืชและสัตว์น้ำจากการติดเชื้อตลอดจนอุตสาหกรรมเสริมความงาม



ภาพที่ 11 แสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์แมลง *Sf9* ที่บ่มด้วยสารสกัดจากต้นกรดน้ำ ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิเคราะห์ผลการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay และแสดงผลในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยทำการทดลองจากตัวอย่าง 4 ซ้ำ

4.6 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในต้นกรดน้ำ

จากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของต้นกรดน้ำที่ผ่านการอบแห้ง พบว่าสารสกัดจากเมทานอล ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี จึงใช้สารสกัดเมทานอลในการวิเคราะห์สารสำคัญ จากเทคนิค GC-MS พบสารสำคัญ 8 ชนิด ได้แก่ 2,3-dihydrobenzofuran และ palmitic acid เป็นสารสำคัญ มี % peak area เท่ากับ 5.37 และ 5.39 ตามลำดับ 2,3-dihydrobenzofuran เป็นสารที่น่าสนใจใช้รักษาโรคเบาหวาน ไขข้อ และมะเร็ง (Apers et al., 2002) และมีสาร 9,12,15-octadecatrienoic acid (methyl linolenate) 1.26% ในเห็ดหลินจือ พบว่าสารนี้กระตุ้นการแสดงออกของยีน *Catalase* ซึ่งเป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Lee et al., 2003) นอกจากนี้พบสาร 1-hydroxy-2-propanone (acetol) (0.41%), trans-caryophyllene (0.6%) , a-humulene (0.22%), germacrene D (0.28%), eugenol (0.32%), 2-Methoxy-4-vinylphenol (0.4%), ซึ่งสารในกลุ่มที่พบนี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ (Keawsa-ard et al., 2012; Calleja et al., 2013) จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าต้นกรดน้ำมีสารสำคัญหลายชนิด เช่น scoparic acid A, scoparic acid B, scopadulcic acid A, scopadulcic acid B, scopadulciol, scopadulin, scopanolal, saponin, และ scopadiol สารบริสุทธิ์เหล่านี้สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง ไวรัส และรักษาโรคเบาหวานได้ (Perumal et al., 2014; Ahsan et al., 2003) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าต้นกรดน้ำจาก จ. สงขลา อาจจะช่วยต้านไวรัส แบคทีเรีย รักษาแผล รักษาโรคเบาหวาน มะเร็ง เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารสกัดจากต้นกรดน้ำช่วยรักษาแผลในหนู และช่วยให้เลือดของหนูแข็งตัวเร็วขึ้น ซึ่งกลไกต้านอนุมูลอิสระเป็นกลไกสำคัญในการรักษาแผล (Ediriweera et al., 2003; Murti et al., 2011)

ในปัจจุบันได้มีการค้นพบโปรตีนและสารอินทรีย์ต่างๆ ที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และนำโปรตีนมาใช้ในการป้องกันโรคต่างๆ มากขึ้น เช่น ในกุ้งคณะวิจัยได้พบว่า RACK1 และ TCTP ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เป็นโปรตีนที่มีสมบัติในการป้องกันการตายของเซลล์จากอนุมูลอิสระ H_2O_2 และช่วยป้องกันการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง (Saelee et al., 2011; Tonganunt et al., 2008) ในพืชพบว่าเมื่อนำสารสกัดหยาบจากต้นสาบเสือบ่มในเซลล์ fibroblast พบว่าการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Heme oxygenases 1 (*HO-1*) Thromboxane synthase (*TXS*) และ *MMP-9* มีการแสดงสูงขึ้น (Pandith et al., 2013) ดังนั้นการค้นหาโปรตีนและสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากต้นกรดน้ำ อาจจะมีประโยชน์ในการนำไปผลิตยารักษาแผลในผู้ป่วยและสัตว์ การป้องกันโรคพืชและสัตว์น้ำจากการติดเชื้อ รักษาโรคต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ ตลอดจนอุตสาหกรรมเสริมความงาม

บทที่ 5 อภิปรายผลสรุปและข้อเสนอแนะ

ต้นกรดน้ำ มีสรรพคุณหลายอย่าง ใช้รักษาโรคหลายๆ ชนิด เช่น มะเร็ง โรคตับ ผื่นคัน แก้ไอ แผลโรคกระเพาะอาหาร แผลสด ลดไข้ บรรเทาอาการหัด เจ็บคอ อาเจียน จุกเสียด ปวดท้อง ท้องเสีย ลำไส้อักเสบ ขับปัสสาวะ ลดอาการบวมน้ำ ขาบวมจากเหน็บชา หลอดลมอักเสบ ขับระดู ยาอมบ้วนปาก แก้ปวดฟันแก้ปวดหัว ขับปัสสาวะ และรวมถึงรักษาโรคเบาหวาน ได้มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นกรดน้ำ พบว่ามีสารในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ ไดเทอร์พีน ไตรเทอร์พีน ซึ่งสารเหล่านี้พบได้ทั่วไปในพืชสมุนไพร สมุนไพรไทยหลายชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และช่วยในการรักษาโรค แต่งานวิจัยในต้นกรดน้ำในพื้นที่ของประเทศไทย ยังไม่มีรายงาน จากรายงานของ Krishna และคณะ ในปี 2011 พบว่าสารสกัดจากรากของต้นกรดน้ำ ช่วยรักษาแผลในหนู (Krishna et al. 2011) และสารสกัดจากใบช่วยให้เลือดของหนูแข็งตัวเร็วขึ้น (Ediriweera et al. 2011) จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากต้นสดของต้นกรดน้ำ ในส่วนเหนือดิน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าส่วนราก (เนตรนภา แซ่หลี, 2557) ในพืชสมุนไพรหลายชนิด ต้องนำมาทำแห้งก่อนที่จะใช้รักษาโรค ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัด จากส่วนเหนือดินของต้นกรดน้ำแบบสดและผ่านการอบแห้ง โดยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ทดสอบการป้องกันเซลล์และป้องกันดีเอ็นเอ จากสภาวะที่มีอนุมูลอิสระ ผลการทดสอบพบว่า ทั้งสารสกัดจากต้นสด และผ่านการอบแห้ง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดจากต้นสด มีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดจากต้นที่ผ่านการอบแห้ง โดยสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากกว่า สามารถป้องกันดีเอ็นเอได้ดีกว่า และป้องกันการตายของเซลล์ได้ดีกว่า เมื่อเซลล์เกิดบาดแผล หรือการติดเชื้อ ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระมากจนเกินไป สารต้านอนุมูลอิสระจะทำหน้าที่ยับยั้งฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ ทำให้เซลล์ไม่ตาย หรืออาจจะทำหน้าที่เปลี่ยนอนุมูลอิสระ ไปเป็นสารอื่นๆ ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และป้องกันเซลล์จากสภาวะเครียด (stress) ต่างๆ ได้ นอกจากนี้พบว่าเมื่อบ่มเซลล์แมลง *Sf9* ด้วยสารสกัดจากต้นกรดน้ำแบบสด สารสกัดช่วยเพิ่มปริมาณของเซลล์ได้เพียงเล็กน้อย และการนำสารสกัดจากต้นกรดน้ำไปใช้ประโยชน์ จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติในความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ จากงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีประโยชน์ต่อการพัฒนาสารสกัด ผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มคุณค่าทางอาหาร ป้องกันโรคต่างๆ ที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ ทั้งในคน สัตว์และช่วยรักษาบาดแผลต่างๆ ในเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บ

บรรณานุกรม

Ahsan, M., Islam, S.K.N., Gray, A.I. and Stimson, W. H. (2003). “Cytotoxic Diterpenes from *Scoparia dulcis*,” Journal of natural products. 66, 958-961.

Apers, S., Preininger, L., Gimelfarb, H., Li, C., Dias, B.E., Fahmy, F., White, J.M., Paper, D., Bürgermeister, J., Baronikova, S., Dyck, V.S., Lemiére, G., Vlietinck, A., Pieters, L. (2002) “Antiangiogenic Activity of Synthetic Dihydrobenzofuran Lignans,” Journal of natural products. 65, 718-720.

Bang, S., Kim, J., Kim, H., Lee, Y., Park, S., Lee, S. and Kim, Y. (2012). Achyranthes japonica exhibits anti-inflammatory effect via NF-KB suppression and HO-1 induction in macrophages. *J Ethnopharmacol.* 144:109-117.

Begcevic I, Simundic AM, Nikolac N, Dobrijevic S, Rajkovic MG and A., T.-K. (2013). Can cranberry extract and vitamin C + Zn supplements affect the in vivo activity of paraoxonase 1, antioxidant potential, and lipid status? *Clin Lab* 59:1053-1060.

Beh, J. E., Latip, J., Abdullah, M. P., Ismail, A. and Hamid, M. (2010). Scoparia dulcis (SDF7) endowed with glucose uptake properties on L6 myotubes compared insulin. Journal of Ethnopharmacology 129:23-33.

Calleja, M.A., Vieites, J.M., Montero-Meléndez, T., Torres, M.I., Faus, M.J., Gil, A., Suárez, A. (2013). “The antioxidant effect of β-caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. The British journal of nutrition. 109(3):394-401.

Ediriweera, E., Jayakody, J. and Ratnasooriya, W. (2011). Pro blood clotting activity of Scoparia dulcis in rats. *An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda* 32:271-274.

Gomez-Anduro, G.A., Barillas-Mury, C.V., Peregrino-Uriarte, A.B., Gupta, L., Gollas-Galvan, T., Hernandez-Lopez, J. and Yepiz-Plascencia, G. (2006). The cytosolic manganese superoxide dismutase from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: molecular cloning and expression. *Developmental and Comparative Immunology.* 30(10), 893-900.

Gnanasekar, M. and Ramaswamy, K. (2007). Translationally controlled tumor protein of Brugia malayi functions as an antioxidant protein. Parasitology Research. 101(6), 1533-1540.

Gusev, O., Nakahara, Y., Vanyagina, V., Malutina, L., Cornette, R., Sakashita, T., Hamada, N., Kikawada, T., Kobayashi, Y. and Okuda, T. (2010). Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: linkage with radioresistance. Plos One. 5(11):e14008. doi: 10.1371/journal.pone.0014008.

Hayashi, T. (2008). Studies on evaluation of natural products for antiviral effects and their applications. Yakugaku Zasshi. 128:61-79.

Jiang WD, Liu Y, Jiang J, Hu K, Li SH, Feng L and XQ., Z. (2013). In vitro interceptive and reparative effects of myo-inositol against copper-induced oxidative damage and antioxidant system disturbance in primary cultured fish enterocytes. *Aquat Toxicol* 132-133:100-110.

Keawsa-ard, S., and Kongtaweelert, S. (2012). “Antioxidant, antibacterial, anticancer activities and chemical constituents of the essential oil from *Mesua ferrea* leaves.,” Chiang Mai J. Sci. 39(3) : 455-463.

Krishna, M., Vijay, L., Mayank, P. and Megha, S. (2011). Healing promoting potentials of roots of scoparia dulcis in albino rats. *Phamacologia* 2:369-373.

Lee, H.Y., Eum, W.S., Kim, D.W., Lee, B.R., Yoon, C.S., Jang, S.H., Choi, H.S., Choi, S.H., Baek, N.I., Kang, J.H., Kang, T.C., Won, M.H., Cho, S.W., Lee, K.S., Park, J., Choi, S.Y. (2003). “Isolation and Identification of an Antioxidant Enzyme Catalase Stimulatory Compound from Garnoderma lucidum.,” Journal of biochemistry and molecular biology. 36(5):450-455.

Lee, S., Jeong, S., Yang, H., Jeong, S., Jang, Y., Park, C., Kim, J. and Park, Y. (2012). Extract of Salvia miltiorrhiza (Danshen) induces Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression as a cytoprotective action in RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 139:541-548.

Lesser, M.P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology.* (68), 253-278.

Li Q, Yu S, Wu J, Zou Y and Y, Z. (2013). Sulfiredoxin-1 protects PC12 cells against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *J Neurosci Res* 91:861-870.

Madhumathi, M. (2011). Antioxidant status of *Penaeus monodon* fed with Dunaliella salina supplemented diet and resistance against WSSV. *International Journal of Engineering Science and Technology.* 3(10), 7249-7259.

Mishra, M., Mishra, A., Pradhan, D., Behera, R., Jha, S., Panda, A. and Choudhary, P. (2012). Microscopic characterization of *Scoparia dulcis* Linn. (Scrophulariaceae). Anc Sci Life. 32:29-33.

Murti, K., Kumar, U. and Panchal, M. (2011). Healing promoting potentials of roots of *Scoparia dulcis* in albino rats. Pharmacologia. 2(12), 369-373.

Nambiar, S.S., Shetty, N.P., Bhatt, P., Neelwarne, B. (2014). Inhibition of LDL oxidation and oxidized LDL-induced foam cell formation in RAW 264.7 cells show anti-atherogenic properties of a foliar methanol extract of Scoparia dulcis. *Pharmacogn Mag*. 10(Suppl 2):S240-8. doi: 10.4103/0973-1296.133241.

Pandith, H., Zhang, X., Liggett, J., Min, K.W., Gritsanapan, W. and Baek, S.J. (2013). Hemostatic and wound healing properties of *Chromolaena odorata* leaf extract. ISRN Dermatology. doi: 10.1155/2013/168269

Pari, L. and Latha, M. (2005). Antidiabetic effect of *Scoparia dulcis*: effect on lipid peroxidation in streptozotocin diabetes. *Gen. Physiol. Biophys* 24:13-26.

Paschos, A., Pandya, R., Duivenvoorden, W. and Pinthus, J. (2013). Oxidative stress in prostate cancer: changing research concepts towards a novel paradigm for prevention and therapeutics. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 16:217-225.

Perumal, P.S., Anaswara, P.V., Muthuraman, A., Krishan, S. (2014). “Therapeutic potency of saponin rich aqueous extract of *Scoparia dulcis L*. in alloxan induced diabetes in rats,” Ayurveda. 35, 211-217.

Rahman, M.M., Habib, M.R., Hasan, M.A., Al Amin, M., Saha, A. and Mannan, A. (2014). Comparative assessment on in vitro antioxidant activities of ethanol extracts of *Averrhoa bilimbi, Gymnema sylvestre* and *Capsicum frutescens*. Pharmacognosy Research. 6(1), 36-41.

Ren, Q., Sun, R.R., Zhao, X.F. and Wang, J.X. (2009). A selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) and two glutathione S-transferases (GSTs) from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 149(4), 613-623.

Saelee, N., Tonganunt-Srithaworn, M., Wanna, W. and Phongdara, A. (2011). Receptor for Activated C Kinase-1 protein from Penaeus monodon (Pm-RACK1) participates in the shrimp antioxidant response. *Int J Biol Macromol* 49:32-36.

Sun, G., Sun, X., Wang, M., Ye, J., Si, J., Xu, H., Meng, X., Qin, M., Sun, J., Wang, H. and Sun, X. (2012). Oxidative stress suppression by luteolin-induced heme oxygenase-1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 265:229-240.

Tavares- Sánchez, O.L., Gomez-Anduro, G.A., Felipe-Ortega, X., Islas-Osuna, M.A., Sotelo-Mundo, R.R., Barillas-Mury, C. and Yepiz-Plascencia, G. (2004). Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.* 138(4), 331-337.

Tonganunt, M., Nupan, B., Saengsakda, M., Suklour, S., Wanna, W., Senapin, S., Chotigeat, W. and Phongdara, A. (2008). The role of Pm-fortilin in protecting shrimp from white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish Shellfish Immunol.* 2008 *Nov;*25(5):633-7. 25:633-637.

Tu, H.T., Silvestre, F., Bernard, A., Douny, C., Phuong, N.T., Tao, C.T., Maghuin-Rogister, G. and Kestemont, P. (2008). Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. *Aquaculture.* 285(1-4), 244-248.

WakamatsuI, T.H., DogruII, M., Tsubota, Kazuo. (2008). Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. Arq. Bras. Oftalmol. 71(6 Supl):72-79.

Wang, W.N., Zhou, J., Wang, P., Tian, T.T., Zheng, Y., Liu, Y., Mai, W.J. and Wang, A.L. (2009). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 150(4), 428-435.

Wu, W., Chen, T., Lu, R., Chen, S. and Chang, C. (2012). Benzoxazinoids from Scoparia dulcis (sweet broomweed) with antiproliferative activity against the DU-145 human prostate cancer cell line. *Phytochemistry* 83:110-115.

Yanaka, A. (2011). Sulforaphane enhances protection and repair of gastric mucosa against oxidative stress in vitro, and demonstrates anti-inflammatory effects on *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae in mice and human subjects. *Current Pharmaceutical Design.* 17(16), 1532-1540.

Zhou, J., Wang, W.N., Wang, A.L., He, W.Y., Zhou, Q.T., Liu, Y., and Xu, J. (2009). Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 150(2), 224-230.

Zulfiker, A. H. M., Siddiqua, M., Nahar, L., Habib, M.R., Uddin, N., Hasan, N. and Rana, M.S. (2011). In vitro antibacterial, antifungal &cytotoxic activity of Scopariadulcis L. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 3(2), 198-203.