

การทดสอบไมโครนิวเคลียสและโคเมทของสารสี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงหัวรางเงิน รางทอง และรางนาก

Micronucleus Test and Comet Assay of Pigment from Bulb Culture of *Hippeastrum*

คำนำ

ปัจจุบันคนสนใจสารที่สกัดจากธรรมชาติมากขึ้น พยายามหาสิ่งที่ได้จากธรรมชาติมาทดแทนสารสังเคราะห์ที่ใช้อยู่ เนื่องจากได้รับผลกระทบจากสารเคมีสังเคราะห์และคิดว่าสิ่งที่ได้จากธรรมชาติน่าจะปลอดภัยกว่า สารธรรมชาติที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายอย่างหนึ่งคือสารสีที่ได้จากพืช สารสีนำมาใช้ประโยชน์ได้ทางโภชนาการและเครื่องสำอาง ด้านโภชนาการใช้เพื่การดึงดูดใจ เพิ่มสีสันอาหารให้น่ารับประทานและแก้ไขปัญหการแปรรูปอาหาร ส่วนด้านเครื่องสำอางนั้นใช้เป็นส่วนประกอบของสีในครีม โลชัน ลิปสติก และแป้ง เพื่อปรับเปลี่ยนสีตามธรรมชาติให้มีสีสันสวยงามยิ่งขึ้น สีที่ได้จากธรรมชาติส่วนใหญ่ปลอดภัยมากกว่าสีสังเคราะห์ แต่สีที่ได้จากธรรมชาตินั้นผลิตได้น้อยเนื่องจากข้อจำกัดของฤดูกาลปลูกพืช ระยะเวลาในการเจริญเติบโตและสภาพแวดล้อม ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถผลิตสารสีจากพืชได้ในปริมาณมาก

แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นกลุ่มของสารสีหรือรงควัตถุ (pigment) ที่มีสีม่วง สีสน้ำเงิน และสีแดงในพืชทั่วไปสามารถสกัดได้จากส่วนต่างๆของพืช เช่น ผลองุ่นม่วง ใบกะหล่ำปลีสีม่วง และพืชอื่นๆที่มีสีม่วงถึงสีแดงในส่วนของลำต้น ใบ ดอก ผล เปลือกเมล็ด รากและหัว ในการเพาะเลี้ยงหัวรางเงิน รางทอง และรางนาก (*Hippeastrum* spp.) ในอาหารเพาะเลี้ยงสูตรเหมาะสมพบว่า มีการสร้างสารสีแดงปริมาณมาก สารสีนี้มีคุณสมบัติดีกว่าสารสีธรรมชาติชนิดอื่นคือสามารถทนต่อสภาพกรด ด่าง และความร้อนได้มากกว่า ในการนำสารสีนี้ไปใช้ประโยชน์ด้านโภชนาการและเครื่องสำอางนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาความปลอดภัยก่อน งานวิจัยนี้จึงทำการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสีด้วยการทดสอบไมโครนิวเคลียสและโคเมท

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาด้านชีวเคมีของสารสีจากการเพาะเลี้ยงห้วรงเงิน รางทอง และรางนากด้วย thin layer chromatography และ column chromatography
2. ทดสอบความเป็นพิษของสารสีจากการเพาะเลี้ยงห้วรงเงิน รางทอง และรางนากด้วย micronucleus test และ comet assay

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของรางเงิน รางทอง และรางนาก

รางเงิน รางทอง และรางนากจัดอยู่ในสกุลเดียวกับว่านสี่ทิศซึ่งเป็นไม้ประเภทหัวชนิดล้มลุกหลายฤดูที่จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในอันดับ (order) Asparagales วงศ์ (family) Amaryllidaceae สกุล (genus) *Hippeastrum* หรือ *Amaryllis* ขึ้นกับถิ่นกำเนิดและลักษณะของถิ่นอาศัย *Amaryllis* มีถิ่นกำเนิดในแถบแอฟริกาใต้ มีถิ่นอาศัยดอกต้น ส่วน *Hippeastrum* มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกาใต้ มีถิ่นอาศัยดอกกลาง มีประมาณ 76 ชนิด (species) มีชื่อสามัญว่า *Hippeastrum* หรือ *Amaryllis* (ประภัสสร, 2543; Rees, 1985) มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน $2n = 2X = 22$ (สุชาติ, 2542)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของรางเงิน รางทอง และรางนากใกล้เคียงกัน คือ ใบกว้างหนา ขอบใบเรียบ และปลายใบแหลม ขนาดใบใกล้เคียงกันและมีแถบเส้นกลางใบสีเขียวอ่อน สีเขียวปนเหลือง และสีขาว ตามลำดับ รูปทรงดอกเป็นแบบปากแตรยาว ดอกขนาดประมาณ 4-5 นิ้ว กลีบดอกขนาดเล็กถึงกลาง กลีบดอกมีสีพื้นสีขาวและมีร่างแหสีชมพูเข้ม สีชมพูอมส้ม และสีชมพูอมม่วง ตามลำดับ รูปทรงดอกแตกต่างกันเล็กน้อย (ภาพที่ 1) ไม่ติดผลในสภาพธรรมชาติ ออกดอกตลอดปี ขณะออกดอกมีขนาดใบและหัวใกล้เคียงกัน (ผกาเวียง, 2545) ลักษณะต่างๆเหล่านี้ใกล้เคียงกับ *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (สุชาติ, 2542)

พืชนี้มีหัวเป็นแบบ true bulb ประกอบด้วยกาบใบหุ้มทับตาอยู่ที่ซอกกาบใบ รากเป็นระบบรากฝอย เจริญอยู่ส่วนล่างของหัว เจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีการระบายน้ำดี เช่น ดินร่วนปนทราย ชอบอยู่ในที่ร่มหรือที่ร่มรำไร ต้องการน้ำปานกลางแต่ความชื้นสูง ควรรดน้ำสม่ำเสมอทุกวัน (วิทย์, 2531) การปลูกเลี้ยงในกระถางควรใช้ดินผสมที่มี ดิน : ทราย : ขี้เถ้าแกลบ : ปุ๋ยหมัก ในอัตราส่วน 2:1:1:1 ดินผสม 1 ลูกบาศก์เมตรใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ปริมาณ 1 กิโลกรัม และปูนขาว 0.5 กิโลกรัม และรดปุ๋ยเคมีละลายน้ำสูตร 15-15-15 ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรทุกสัปดาห์ (ปรีดี, 2526; Okubo, 1993)

เมื่อรางเงิน รางทอง และรางนาก เจริญเติบโตเต็มที่ที่จะผลิตใบได้เดือนละ 1 ใบ และมีใบ 6-12 ใบ (Rees, 1985; Bryan, 1989) การเกิดดอกขึ้นกับอายุและขนาดของหัว หัว (bulbet) ที่เกิดจากการเพาะเมล็ด การแยกออกจากหัว และการผ่าหัวจะต้องปลูกเลี้ยงเป็นเวลา 1-2, 2 และ 3 ปี

ตามลำดับ จึงออกดอก หัวที่มีขนาดเส้นรอบหัว 22-24, 24-26 และมากกว่า 26 เซนติเมตรจะมีช่อดอกเฉลี่ย 1, 1.5 และ 2 ช่อต่อหัวต่อปีตามลำดับ (Rees, 1985; Okubo, 1993)

การขยายรากเงิน รากทอง และรากนก ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำได้โดยการเพาะเลี้ยง twin-scales (การผ่าหัวตามยาวออกเป็น 4-8 ส่วน นำแต่ละส่วนมาแยกให้แต่ละชิ้นส่วนมีกลีบ 2 กลีบหัว) ขนาด 5x10 มิลลิเมตร บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร (สุชาดา, 2542)



ภาพที่ 1 ใบและดอก A. รากเงิน B. รากทอง C. รากนก
ที่มา: ผกาเวียง (2545)

2. สารสี (pigment)

สีที่มองเห็นเกิดจากโมเลกุลสารที่มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงและปล่อยแสงในช่วงคลื่นที่มองเห็นได้ ความยาวคลื่น (λ) ของการดูดกลืนแสงสูงสุด ($A_{\max}$) มีหน่วยเป็นนาโนเมตร แสงในช่วงคลื่นที่มองเห็นได้มีช่วงความยาวคลื่น 380-730 นาโนเมตร (Hendry, 1993) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สีที่มองเห็นและสีที่ดูดกลืนด้วยรงควัตถุ

สีที่มองเห็น	Blue-green	Blue	Violet		Mauve	Red	Orange	Yellow	Yellow-green
สีที่ดูดกลืน	Red	Orange	Yellow	Yellow-green	Green		Green-blue	Blue	Violet
Absorption wavelength (nm)	675	600	585	570	540	525	495	460	410

ที่มา: Hendry (1993)

Haslam (1998) อธิบายว่าสารสีหรือรงควัตถุ (pigment) กลุ่มหลักที่พบในพืชมี 4 ชนิด คือ คลอโรฟิลล์ (chlorophylls) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เบตาเลน (betalains) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) รวมทั้งแอนโทไซยานิน (anthocyanins) สารสีกลุ่มสุดท้ายจัดเป็นกลุ่มเดียวกันตามลักษณะของโครงสร้างหลัก (flavylium nucleus) ตัวอย่างของสารสีแต่ละกลุ่มมีดังนี้ (Hendry, 1993)

กลุ่มที่ 1 คลอโรฟิลล์ พบในพืชชั้นสูงทั่วไป เป็นคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี โดยสีที่เด่นชัดเป็นสีเขียว สีเขียวแกมน้ำเงิน และสีเขียวแกมเหลือง สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ 2 ความยาวคลื่น คือ 410 และ 675 นาโนเมตร

กลุ่มที่ 2 แคโรทีนอยด์ พบในพืชที่มีสีส้มและสีแดง เช่น ฟักทอง มะเขือเทศและแครอท เป็นต้น มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450, 470 และ 505 นาโนเมตร

กลุ่มที่ 3 เบตาเลน พบในพืชบางชนิดที่อยู่ในวงศ์ Caryophyllales, Amaranthaceae, Cactaceae และ Chenopodiaceae เช่น betanin พบใน *Beta vulgaris* (beet root) มีสีแดงม่วง ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 540 นาโนเมตร และ indicaxanthin พบใน *Opuntia ficusindica* มีสีเหลือง ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 480 นาโนเมตร

กลุ่มที่ 4 ฟลาโวนอยด์และแอนโธไซยานิน เป็นสารสีกลุ่มที่พบมากที่สุดในพืช มีช่วงของสีที่ปรากฏเป็นช่วงกว้างตั้งแต่สีม่วง สีนํ้าเงิน สีม่วงเจดน้ำเงินอ่อน สีส้ม และสีแดง โดยฟลาโวนอยด์และแอนโธไซยานินดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ช่วงความยาวคลื่นแสงที่ฟลาโวนอยด์และแอนโธไซยานินดูดกลืน

ช่วง II (nm)	ช่วง I (nm)	ชนิดของ Flavonoid
250-280	310-350	Flavone
250-280	330-360	Flavonols (3-OH substituted)
250-280	350-385	Flavonols (3-OH free)
245-275	310-330 shoulder	Isoflavones
	320 peak	Isoflavones (5-deoxy-6,7-dioxygenated)
275-295	300-330 shoulder	Flavanones และ dihydroflavonols
230-270 (low intensity)	340-390	Chalcones
230-270 (low intensity)	380-430	Aurones
270-280	465-560	Anthocyanidins and anthocyanins

หมายเหตุ I = ช่วงความยาวคลื่นแสงของสีที่มองเห็นภายใต้แสงปกติ

II = ช่วงความยาวคลื่นแสงของสีที่มองเห็นภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

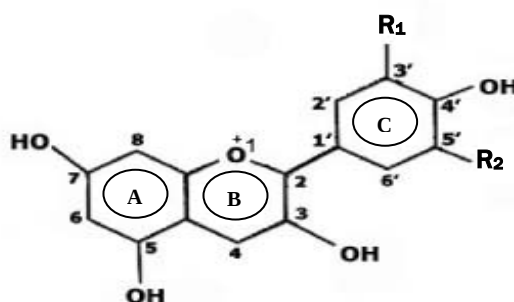
ที่มา: Markham (1982)

3. โครงสร้างและคุณสมบัติของแอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานินมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก คือ anthos หมายถึงดอกไม้ และ kyanos หมายถึงสีน้ำเงิน ดังนั้นแอนโทไซยานินจึงเป็นรงควัตถุที่พบในผัก ผลไม้ และดอกไม้หลายชนิดที่ให้สีม่วงแดงไปจนถึงสีน้ำเงิน

แอนโทไซยานินจัดเป็นสารประกอบพอลิฟลาโวนอยด์ เป็นรงควัตถุที่พบในแวคคิวโอลของเซลล์พืช สามารถละลายน้ำ แต่ไม่ละลายใน non-hydroxy solvent เช่น ether, chloroform และ benzene เป็นต้น (Gross, 1987; Harborne, 1988) โครงสร้างของแอนโทไซยานินคือ flavylium nucleus จับกับหมู่น้ำตาลชนิดต่างๆ ปัจจุบันพบสารประกอบพอลิฟลาโวนอยด์มากกว่า 4,000 ชนิด แต่มีเพียง 260 ชนิดเท่านั้นที่แสดงคุณสมบัติเป็นแอนโทไซยานิน กล่าวคือ เป็นอนุพันธ์ของ glycosylated polyhydroxyl และ polymethoxy ของ flavylium cation หรือ 2-phenylbenzopyrylium (Vickey, 1981) โมเลกุลของแอนโทไซยานินประกอบด้วย 2 ส่วนดังนี้

1. แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin) เป็น aglycone (นิวเคลียสที่ไม่เชื่อมต่อกับหมู่ น้ำตาล) ประกอบด้วยหมู่วงแหวน 3 วง คือ วงแหวน A วงแหวน B และวงแหวน C มีชื่อเรียกแตกต่างกันตามตำแหน่งการเติมหมู่ hydroxyl และหมู่ O-methyl ที่วงแหวน B (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โครงสร้างหลัก flavylium nucleus ของแอนโทไซยานิน

ที่มา: Harborne (1998)

แอนโทไซยานินที่สำคัญและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมี 6 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 3 (Markakis, 1982; Harborne, 1988)

ตารางที่ 3 ชนิดของแอนโทไซยานิดินและตำแหน่งการเติมหมู่ hydroxyl และหมู่ O-methyl

ชนิดของแอนโทไซยานิดิน	ตำแหน่งการเติม		สีที่พบในสิ่งมีชีวิต	$\lambda_{\max}$ (nm)*
	R1	R2		
Cyanidin	OH	H	magenta	535
Peonidin	OCH ₃	H	magenta	532
Pelargonidin	H	H	red	520
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	purple	542
Delphinidin	OH	OH	purple	546
Petunidin	OCH ₃	OH	purple	543

หมายเหตุ $\lambda_{\max}$ (nm)* ในสารสกัด 0.01% HCl ใน MeOH (v/v)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Harborne (1998)

2. สารรวมเกาะกับแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin conjugate) ปกติแอนโทไซยานิดินอยู่ในรูป conjugated form กับกลุ่มน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) หรือพอลิแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) จึงทำให้แอนโทไซยานินละลายน้ำได้และสะสมในแวคิวโอลของเซลล์แก่ (Dougall *et al.*, 1980; Constable and Vasil, 1988) หมู่ น้ำตาลที่เกาะมีมากกว่า 200 ชนิดเช่น ไซโรส อราบินอส แต่ที่พบบ่อยได้แก่ กลูโคส และ กาแลกโตส น้ำตาลเหล่านี้ช่วยให้ แอนโทไซยานินมีเสถียรภาพดีขึ้น (Francis, 1977; Markakis, 1982; Constable and Vasil, 1988)

4. กระบวนการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน

แอนโทไซยานิน เป็นผลผลิตสุดท้ายของวิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ ดังนี้

5. การสกัดแอนโธไซยานิน

Chiriboga and Francis (1970) สกัดแอนโธไซยานินจากกากผล cranberry ด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่า เมทานอล (MeOH) และเอทานอล (EtOH) มีประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น เช่น น้ำ, ethylene glycol, propylene glycol และ isopropanol การใช้ 0.03 % HCl ใน MeOH ให้ประสิทธิภาพในการสกัดดีที่สุด หลังจากสกัดแล้วทำสารละลายที่ได้ให้เข้มข้นพร้อมกำจัด MeOH โดยระเหยภายใต้ระบบสุญญากาศ

Metivier *et al.* (1980) ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดแอนโธไซยานินจากกากองุ่นที่เหลือจากการทำไวน์ ใช้ตัวทำละลาย 10 % HCl ใน MeOH, น้ำ, MeOH และ EtOH พบว่า 10 % HCl ใน MeOH เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดดีที่สุด รองลงมาคือ MeOH นอกจากนี้การใช้กรดอินทรีย์ผสมใน MeOH ก็ให้ผลดีเช่นกัน จากการทดลองพบว่า citric acid ให้ผลดีที่สุด formic acid, acetic acid และ propionic acid ให้ผลดีรองลงมาตามลำดับ

Bronnum-Hansen and Flink (1986) ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดแอนโธไซยานินจากผล elderberry (*Sambucus nigra* Linn.) ตัวทำละลายที่ใช้คือ 0.1 M HCl, HCl ใน alcohol และ 0.01-20 % citric acid พบว่า 0.1 M HCl เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดดีที่สุด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาระยะเวลาและจำนวนครั้งที่ใช้ในการสกัดพบว่ากระบวนการสกัดเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเข้าสู่สมดุลภายใน 10 นาที จำนวนครั้งในการสกัดไม่ควรเกิน 1 หรือ 2 ครั้ง และการสกัดจากผลสดจะได้ปริมาณแอนโธไซยานินมากกว่าผลแช่แข็งเล็กน้อย

Harborne (1988) สกัดแอนโธไซยานินจากกลีบดอกไม้โดยใช้ตัวทำละลายที่ประกอบด้วย MeOH : น้ำ : acetic acid เท่ากับ 19: 19: 2 นำสารละลายมาเขย่ากับ ethyl acetate ที่อิ่มตัวด้วยน้ำเพื่อกำจัด flavonols

Mizukami *et al.* (1988) สกัดแอนโธไซยานินจากพืช 0.5 กรัม โดยใช้ 1% HCl ใน MeOH 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 g เป็นเวลา 10 นาที

Renault *et al.* (1997) สกัดแอนโธไซยานินจากผล black currant (*Ribes nigrum* L.) โดยใช้ 0.1 M HCl ใน MeOH

Galindo *et al.* (1999) สกัดแอนโธไซยานินจากผล capulin (*Prunus serotina* Enrh) โดยบดผลในไนโตรเจนเหลวแล้วนำผงตัวอย่าง 50 กรัมผสมกับ acetone 70 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำสารละลายส่วนบนมาเขย่ากับ chloroform ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสข้ามคืน จะได้แอนโธไซยานินในสารละลายชั้นล่าง

Ray *et al.* (2003) สกัดแอนโธไซยานินจากกลีบดอกไม้ โดยบดกลีบดอกในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาบ่มใน 2 N HCl ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียสข้ามคืน หลังจากนั้นสกัดแอนโธไซยานินด้วย 1 % HCl ใน MeOH นำสารละลายมาเขย่ากับ ethyl acetate ที่อุณหภูมิห้องเพื่อกำจัด flavonols

Du *et al.* (2004) สกัดแอนโธไซยานินจากเปลือกผล bilberry (*Vaccinium myrtillus*) โดยใช้ 0.5% HCl ใน MeOH

Awika *et al.* (2005) ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพในการสกัดแอนโธไซยานินจากถั่วดำ ตัวทำละลายที่ใช้คือ 1 % HCl ใน MeOH และ 70 % acetone ในน้ำ ใช้ตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 0.5 กรัม เขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน นำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g เป็นเวลา 10 นาที คูณสารละลายให้หลอดใหม่ เติมตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง พบว่า 1 % HCl ใน MeOH มีประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่า 70 % acetone ในน้ำ

6. การวัดปริมาณแอนโธไซยานินโดยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตรี

Markakis (1982) ศึกษาปริมาณแอนโธไซยานินที่สกัดจากพีช 5 กรัมโดยใช้สารละลาย 1 % HCl ใน MeOH 100 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน วัดปริมาตรสารทั้งหมดที่กรองได้ (TEV) หลังจากนั้นคูณสารที่กรองได้ (SV) 10 มิลลิลิตร มาปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วย 1 % HCl ใน MeOH (DV) นำสารละลาย

ส่วนบนที่ใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน โดยใช้สูตร

$$\text{Tacy} = \text{OD} \times \text{DV} \times (100/\text{SV}) \times (\text{TEV}/\text{SW}) \times (1/E^{1\%})$$

โดยที่ Tacy = ปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดพืช)

OD = ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากตัวอย่างที่เจือจางแล้ว

DV (Dilution volumn) = ปริมาตรของสารละลายที่เจือจางสำหรับวัด OD (มิลลิลิตร)

SV (Sample volumn) = ปริมาตรสารละลายที่สกัดได้สำหรับเจือจาง (มิลลิลิตร)

SW (Sample weight) = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้สกัด (กรัม)

TEV (Total extract volumn) = ปริมาตรสารละลายทั้งหมดที่สกัดได้ (มิลลิลิตร)

$E^{1\%}$ (Extinction coefficient) = ได้จากค่าเฉลี่ยโดยน้ำหนักของ E โดยแอนโทไซยานิน ทุกตัวที่มีอยู่ในพืชตัวอย่างนั้นๆ ค่า $E = 98.2$

Mizukami *et al.* (1988) นำสารละลายที่สกัดจากกลีบดอกกุหลาบมาปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนบนที่ใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน โดยใช้สูตร

$$\text{AC} = (27.208A + 0.0591) \text{DF} (10/1000 \times \text{CFW})$$

โดยที่ AC = ปริมาณแอนโทไซยานิน (มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด)

A = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

CFW = น้ำหนักสด (กรัม)

DF = ค่าการเจือจาง (dilution factor)

Weiss and Halevy (1989) หาปริมาณแอนโทไซยานินในกลีบดอกพิทูเนียโดยใช้สูตร

$$\text{AC} = A_{530} - 0.25 \times A_{657}$$

Reddy *et al.* (1994) หาปริมาณแอนโทไซยานินในต้นอ่อนข้าวโดยใช้สูตร

$$\text{AC} = A_{530}$$

7. การแยกสารสี

Froytlog (1998) สกัดแอนโธไซยานินจากผล blackcurrant (*Ribes nigrum*) โดยใช้ 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA) ใน MeOH บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำซ้ำ 3 ครั้ง ระเหยจนเข้มข้นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำเป็น 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเขย่ากับ ethyl acetate แอนโธไซยานินละลายอยู่ในส่วนของน้ำ ให้สารละลายผ่าน Amberlite XAD-7 column และ Sephadex LH 20 column หรือ Toyopearl HW-40F จากนั้นวิเคราะห์ชนิดของแอนโธไซยานินโดยวิธี HPLC, mass spectra และ nuclear magnetic resonance (NMR) แอนโธไซยานินที่พบคือ delphinidin 3-glucoside, delphinidin 3-rutinoside, cyanidin 3-glucoside, cyaniding 3-rutinoside, peonidin 3-*o*-rutinoside และ malvidin 3-*o*-rutinoside

Madhavi *et al.* (1998) สกัดแอนโธไซยานินจากผลและแคลลัสของ bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) โดยใช้ 1 % HCl ใน MeOH บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน ระเหยที่ 30 องศาเซลเซียสจนเข้มข้น นำสารละลายมาเขย่ากับ ethyl acetate (1:3 V/V) เพื่อกำจัด flavonols ให้สารละลายผ่าน Sephadex LH 20 column จากนั้นวิเคราะห์ชนิดของแอนโธไซยานินโดยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC) แอนโธไซยานินที่พบคือ cyanidin 3-galactoside, cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-arabinoside และ cyanidin

Narayan and Venkataraman (2000) สกัดแอนโธไซยานินจากแคลลัสแครอทโดยใช้ 1 % HCl ใน MeOH บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน ระเหยจนเข้มข้นแล้วสกัดด้วย chloroform และ diethylether ตามลำดับเพื่อขจัด chlorophyll และ lipid material ให้สารละลายผ่าน Dowex 50 w-4x (H⁺ type) resin column และ Sephadex LH 20 column จากนั้นวิเคราะห์ชนิดของแอนโธไซยานิน โดยวิธี mass spectra และ NMR แอนโธไซยานินที่พบคือ cyanidin-3-lathyroside และ cyanidian-3-β-D-glucopyranoside

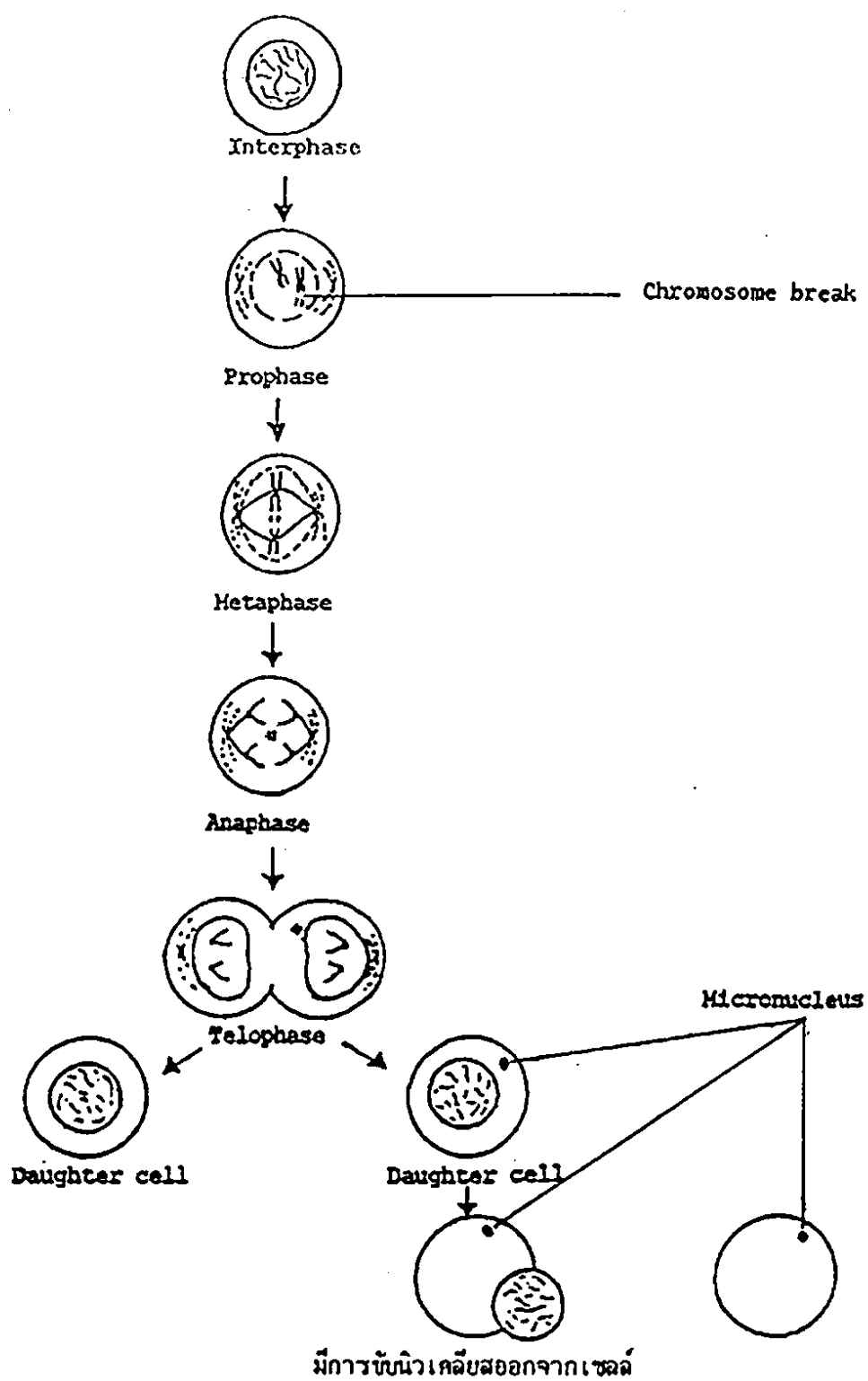
Byamukama *et al.* (2005) สกัดแอนโธไซยานินจากผล *Rubus pinnatus* และ *Rubus rigidus* โดยใช้ 0.1 % TFA ใน MeOH ระเหยจนเข้มข้นแล้วเขย่ากับ ethyl acetate หลายๆ ครั้ง ให้สารละลายผ่าน Amberlite XAD-7 column และ Sephadex LH 20 column จากนั้นวิเคราะห์ชนิดของแอนโธไซยานินโดยวิธี HPLC และ NMR แอนโธไซยานินที่พบคือ cyanidin 3-(6'-O-α-rhamnopyranosyl-β-glucopyranoside) และ cyanidin-3-O-β-glucopyranoside)

Byamukama *et al.* (2006) สกัดแอนโธไซยานินจากดอก *Hippeastrum* โดยใช้ 0.1 %TFA ใน MeOH ระเหยจนเข้มข้นแล้วเขย่ากับ ethyl acetate หลายๆครั้ง ให้สารละลายผ่าน Amberlite XAD-7 column และ Sephadex LH 20 column จากนั้นวิเคราะห์ชนิดของแอนโธไซยานินโดยวิธี HPLC และ NMR แอนโธไซยานินที่พบคือ cyanidin 3-(6-O- α -rhamnopyranosyl- β -glucopyranoside) และ pelargonidin 3-(6-O- α -rhamnopyranosyl- β -glucopyranoside)

8. การทดสอบความเป็นพิษของสารสีด้วยการทดสอบไมโครนิวเคลียสจาก *reticulocyte* ในกระดแลือด

การทดสอบไมโครนิวเคลียส (micronucleus test) เป็นวิธีการทดสอบระยะสั้นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการทดสอบสารก่อกลายและสารก่อมะเร็ง ซึ่งทำได้ง่าย วัสดุเร็ว สะดวก ประหยัด และไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง ในสัตว์ทดลองนั้นสามารถศึกษาได้จากเซลล์ที่ยังมีการแบ่งเซลล์ เช่น เซลล์ไขกระดูก (bone marrow) (Wild, 1988) และเซลล์เม็ดเลือดแดงจากกระดแลือด (peripheral erythrocyte)

การทดสอบวิธีนี้เป็นการดูความเสียหายของโครโมโซม เมื่อเซลล์ได้รับสารที่มีผลทำให้โครโมโซมเกิดการแตกหัก ส่วนที่แตกหักนี้ไม่เชื่อมกับส่วนของโครโมโซมเดิม ต่อมาเมื่อมีการแบ่งเซลล์ ชิ้นส่วนโครโมโซมนี้จะหลุดลอยอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ลูก หรืออาจเกิดจากสารเคมีไปมีผลต่อเส้นใยสปินเดิล ทำให้โครโมโซมบางแท่งไม่เคลื่อนไปยังขั้วเซลล์ หรือเคลื่อนไปช้ากว่าปกติในขณะที่เซลล์มีการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะแอนาเฟส โครโมโซมเหล่านี้จึงลอยอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ลูกไม่เข้าไปอยู่ในนิวเคลียสใหญ่ เห็นเป็นก้อนกลมเล็กๆมีขอบเขตชัดเจน เช่นเดียวกับนิวเคลียสใหญ่ เรียกส่วนของนิวเคลียสเล็กๆนี้ว่าไมโครนิวเคลียส เซลล์เม็ดเลือดแดงในระยะ polychromatic erythrocyte ที่ไม่มีนิวเคลียส ยังคงมีไมโครนิวเคลียสตกค้างอยู่ในเซลล์ (ภาพที่ 4) ในหนูปกติจะพบไมโครนิวเคลียสได้ประมาณ 0.12-0.41 % (Wild, 1988) ถ้าหนูได้รับสารที่ทำให้มีการแตกหักของโครโมโซม เมื่อนำ polychromatic erythrocyte มาตรวจจะพบว่าไมโครนิวเคลียสมากกว่าปกติ (Von Ledebur and Schmid, 1973; Schmid, 1975; Heddle *et al.*, 1991)



ภาพที่ 4 การเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดง

ที่มา: เพ็ญศิริ (2539)

เพียเงโจ และคณะ (2540) รายงานว่า *in vivo* micronucleus test ที่ใช้หนู mouse ในการทดลอง เป็นวิธีการทดสอบสารก่อมะเร็งระยะสั้นในสัตว์ทดลองที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน การทดสอบนี้พัฒนาโดย Schmid *et al.* (1975) ให้ผลเร็ว ใช้เวลาสั้นและมีความแม่นยำสูง ใช้ตรวจสอบสารเคมีที่มีฤทธิ์ทำให้โครโมโซมแตกหัก นิยมตรวจไมโครนิวเคลียสโดยใช้เซลล์ไขกระดูก ซึ่งมีเซลล์เม็ดเลือดแดงอ่อน (young erythrocyte หรือ polychromatic erythrocyte หรือ reticulocyte) มาย้อมด้วยสี giemsa หรือ acridine orange แล้วนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มีไมโครนิวเคลียส

Schmid *et al.* (1975) ศึกษาไมโครนิวเคลียสที่เกิดจากการเคลื่อนที่ช้าหรือไม่เคลื่อนที่ของโครมาติดในระยะแอนาเฟส โครมาติดเหล่านี้ไม่มีเซนโทรเมียร์ให้เส้นใยสปินเดิลยึดจึงยังอยู่ด้านหลังในขณะที่โครโมโซมอื่นเคลื่อนที่ไปสู่ขั้วเซลล์แล้ว ในระยะทีโลเฟสที่มีการสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียส ส่วนของโครโมโซมที่เคลื่อนที่ช้านั้นอาจรวมอยู่ในนิวเคลียสลูกหรือหุ้มเป็นนิวเคลียสขนาดเล็กมากเป็นไมโครนิวเคลียส อาจมี 1 อัน หรือหลายอัน

Parton *et al.* (1990) รายงานการเกิดไมโครนิวเคลียสในหนู Institute for Creation Research (ICR) เพศผู้และเพศเมีย โดยใช้ HC Blue No.1 และ HC Blue No.2 ที่เป็นส่วนผสมในสีย้อมผม ให้หนูได้รับสีทั้งสองชนิดความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าหนูเพศเมียที่ได้รับ HC Blue No.1 ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมก่อให้เกิดไมโครนิวเคลียสที่ 24 ชั่วโมง ส่วน HC Blue No.2 ไม่ก่อให้เกิดไมโครนิวเคลียสทั้งสองเพศ

Hara *et al.* (1992) รายงานการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู ICR โดยการย้อมสี acridine orange โดยใช้ mitomycin C (MMC) ที่ระดับความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เก็บตัวอย่างเลือดที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังจากได้รับสาร พบว่าจำนวน micronucleated reticulocytes (MNRETs) มากที่สุดที่ 48 ชั่วโมง เมื่อความเข้มข้นของ MMC เพิ่มขึ้น จำนวน MNRETs ก็จะเพิ่มขึ้น

Watanabe *et al.* (1993) รายงานการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู ICR และ BDF1 เพศผู้โดยใช้ phenazine (p_z), 1-aminophenazine (1- Ap_z), 2-aminophenazine (2- Ap_z) และ 2,7-diaminophenazine (2,7-dap_z) ให้หนูได้รับสาร 1 หรือ 2 ครั้ง ตามคุณสมบัติของสารแต่ละชนิด พบว่าหนู ICR ที่ได้รับ 2- Ap_z 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เกิด MNRETs เพิ่มขึ้นที่ 48 ชั่วโมง และหนู BDF1 ที่ได้รับ 2- Ap_z 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เกิด MNRETs เพิ่มขึ้นที่ 72 ชั่วโมง

Suzuki *et al.* (1997) รายงานการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงในไขกระดูก และเซลล์เม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดของหนู BDF1 เพศผู้ โดยใช้ carbon tetrachloride (CCl_4) ความเข้มข้น 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อศึกษาการเกิด micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงในไขกระดูก ความเข้มข้น 1,000, 2,000 และ 3,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเพื่อศึกษาการเกิด MNRETs ในเซลล์เม็ดเลือดแดงในกระแสเลือด เก็บตัวอย่างเลือดที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงหลังจากได้รับสาร พบว่า CCl_4 ไม่ก่อให้เกิด MNPCEs และ MNRETs

Yamakoshi *et al.* (2002) พบว่าโปรแอนโธไซยานิดิน (proanthocyanidins) ที่สกัดจากผลองุ่นมีความปลอดภัยในการใช้เป็นสีผสมอาหาร หนูที่ได้รับโปรแอนโธไซยานิดินความเข้มข้น 2 และ 4 กรัมต่อกิโลกรัมไม่ก่อให้เกิด MNRETs

Erexson (2003) รายงานการเกิดไมโครนิวเคลียสในหนู ICR เพศผู้ โดยใช้สารสกัดจากเมล็ดองุ่น และเปลือกองุ่นซึ่งเป็นสารพวกโปรแอนโธไซยานิดินที่พบได้มากในผัก ผลไม้ ชา และชอคโกแลต ในหนึ่งวันคนปกติได้รับสารนี้ประมาณ 460-1,000 มิลลิกรัม หนูที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดองุ่น และสารสกัดจากเปลือกองุ่น ความเข้มข้น 500, 1,000 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่ก่อให้เกิด MNPCEs

9. การทดสอบความเป็นพิษของสารด้วยการทดสอบโคเมท

การทดสอบโคเมท (comet assay หรือ single cell gel electrophoresis assay) เป็นการตรวจสอบการแตกหักของ DNA ในแต่ละเซลล์ Ostling and Johanson (1984) รายงานการทดสอบโคเมทในสภาวะ ที่เป็นกลาง ต่อมา Singh *et al.* (1988) ทำการทดลองในสภาวะที่เป็นเบสซึ่งทำให้การทดสอบมีความไวขึ้น และมีการปรับปรุงวิธีการเรื่อยมาจนปัจจุบัน

การทดสอบโคเมทใช้ตรวจสอบสารเคมีที่มีผลในการทำลาย DNA เป็นวิธีการตรวจสอบสารก่อกลายและสารก่อมะเร็ง ทำได้ทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง ข้อดีของการทดสอบโคเมทคือ การทดลองไม่ยุ่งยาก ทำได้รวดเร็ว มีความไวสูง ใช้ตัวอย่างเซลล์เพียงเล็กน้อยและสามารถทดสอบกับเซลล์ยูคาริโอตทุกชนิด (Fairbairn *et al.*, 1995; Hellman *et al.*, 1997; McCarthy

et al., 1997) หางของเซลล์โคเมทเกิดจากการที่เซลล์ได้รับสารมีผลให้ DNA แตกหัก ความเสียหายของ DNA เพิ่มขึ้น ความยาวหางเซลล์โคเมทก็มากขึ้นด้วย

Hellman *et al.* (1997) รายงานว่าการทดสอบโคเมทเป็นวิธีการตรวจสอบความเสียหายของ DNA ในแต่ละเซลล์ที่ให้ผลการทดลองถูกต้องแม่นยำ ในการทดลองกับลิมโฟไซต์ของอาสาสมัครผู้ชาย 5 คน เปรียบเทียบความเสียหายของ DNA จาก tail moment และ tail inertia ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในลิมโฟไซต์ของหนู ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนั้นต้องสดใหม่เพื่อไม่ให้ผลการทดลองผิดพลาด

McCarthy *et al.* (1997) เปรียบเทียบการวัดขนาดของเซลล์ที่ได้จากการทดสอบโคเมทด้วย software image analysis และ manual image analysis โดยใช้ hydrogen peroxide ในเซลล์ 707 FEL ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ DNA เกิดการแตกหัก แล้วนำมาทดลองตามขั้นตอนของการทดสอบโคเมท ตรวจวิเคราะห์ 50 เซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ใช้ (1) software image analysis วิเคราะห์ % head DNA, % tail DNA, tail length, tail length/head radius (L/H) และ tail moment (2) manual image analysis ถ่ายภาพเซลล์แล้วนำมาวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัวของเซลล์ ความยาวตั้งแต่หัวจรดหาง และส่วนหาง ผลปรากฏว่าทั้งสองวิธีให้ผลที่ดี เชื่อถือได้และไม่แตกต่างกัน แต่วิธี manual image analysis มีข้อเสียคือการทำยุ่งยากและใช้เวลามากกว่า

ในการตรวจวิเคราะห์เซลล์ที่ได้จากการทดสอบโคเมทด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ที่มี excitation filter 515 นาโนเมตรและ barrier filter 590 นาโนเมตร ข้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์นั้น ทำได้ 4 วิธี คือ (Speit *et al.*, 1998)

1. นับจำนวนเซลล์ที่มีหาง (tail) และเซลล์ที่ไม่มีหาง
2. ประเมินเซลล์เป็น 5 ระดับตามความยาวของหางคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 โดย 0 หมายถึง เซลล์ที่ไม่มีหาง และ 4 หมายถึง เซลล์ที่มีหางยาวที่สุด ทำการประเมินอย่างน้อย 50 เซลล์ และนับคะแนนจากระดับคูณด้วยจำนวนเซลล์ นำคะแนนแต่ละระดับมารวมกันในการประเมิน 50 เซลล์จะได้คะแนนต่ำสุดเป็น 0 และคะแนนสูงสุดเป็น 200
3. วัดความยาวของเซลล์โดยใช้ eyepiece micrometer วัดความยาวของเซลล์ตั้งแต่หัวจรดหาง โดยมีหน่วยความยาวเป็นไมโครเมตร วัดอย่างน้อย 50 เซลล์ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

4. ใช้เครื่อง image analyzer ที่เชื่อมต่อกับ CCD camera วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของส่วนหัวของเซลล์ (head diameter) ความยาวของหาง (tail length) ความเข้มของหาง (tail intensity) และ tail moment (DNA migration x tail intensity) แต่ละ image analysis systems อาจใช้พารามิเตอร์ที่แตกต่างกัน

Blasiak *et al.* (1999) รายงานการทดสอบโคเมทของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารและลิมโฟไซต์ของคน โดยใช้ curcumin ซึ่งเป็นสารประกอบในขมิ้นที่มีรายงานว่าเป็นตัวยับยั้งการเกิดมะเร็งหลายชนิด จากการทดลองพบว่า การบ่มใน curcumin ความเข้มข้น 15, 25 และ 50 ไมโครโมลาร์ บ่มเป็นเวลา 120 นาที เห็นย่นำให้ DNA เกิดความเสียหาย โดยผลการทดลองในเยื่อบุกระเพาะอาหารและลิมโฟไซต์สอดคล้องกัน

Laffon *et al.* (2001) รายงานการทดสอบโคเมท การแลกเปลี่ยนซิสเตอร์โครมาติดและการทดสอบไมโครนิวเคลียสในลิมโฟไซต์ของคน โดยใช้ styrene-7,8-oxide (SO) ซึ่งเป็น styrene ที่ผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึมในตับ styrene พบในพลาสติก เรซิน และยาง จากการทดลองพบว่า SO ความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครโมลาร์ มีผลให้ DNA เกิดความเสียหาย มีการแลกเปลี่ยนซิสเตอร์โครมาติด และเกิดไมโครนิวเคลียส

Rozgaj *et al.* (2002) รายงานการทดสอบโคเมท การทดสอบความผิดปกติของโครโมโซม การแลกเปลี่ยนซิสเตอร์โครมาติดและการทดสอบไมโครนิวเคลียสในลิมโฟไซต์ของคน โดยใช้ cadmium chloride (CdCl_2) ความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-3} และ 5×10^{-3} โมลต่อลิตร พบว่าการทดสอบโคเมทในอาสาสมัคร 4 คน ให้ผลแตกต่างกัน ในคนที่ 1 การเพิ่มความเข้มข้น CdCl_2 มีผลให้ DNA เกิดความเสียหายมากขึ้น คนที่ 2 CdCl_2 ความเข้มข้น 10^{-4} โมลต่อลิตร มีผลให้ DNA เกิดความเสียหาย ส่วนคนที่ 3 และ 4 CdCl_2 ความเข้มข้น 10^{-4} , 10^{-3} และ 5×10^{-3} โมลต่อลิตร ไม่มีผลให้ DNA เกิดความเสียหาย ในการทดสอบความผิดปกติของโครโมโซมพบว่า CdCl_2 ทุกระดับความเข้มข้นก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมและการแลกเปลี่ยนซิสเตอร์โครมาติดในอาสาสมัคร 2 คน ส่วนอีก 2 คนเกิดการแลกเปลี่ยนซิสเตอร์โครมาติดเท่านั้น การทดสอบไมโครนิวเคลียสในอาสาสมัคร 4 คน พบว่า CdCl_2 ความเข้มข้น 5×10^{-3} โมลต่อลิตร ก่อให้เกิดไมโครนิวเคลียส

Kleinsasser *et al.* (2003) รายงานการทดสอบโคเมทในลิมโฟไซต์และ upper aerodigestive tract epithelial cells ของคน โดยใช้ myosmine ซึ่งเป็นสารอัลคาลอยด์ที่พบในยาสูบ ความเข้มข้น 0,

5, 10, 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ บ่มเป็นเวลา 60 นาที Olive tail moment มีค่า 1.29 ± 0.13 ถึง 18.25 ± 1.59 ในลิโมนไฟไซด์และ myosmine ความเข้มข้น 0, 10, 25, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ บ่มเป็นเวลา 60 นาที Olive tail moment มีค่า 1.17 ± 0.12 ถึง 21.67 ± 2.97 ใน upper aerodigestive tract epithelial cells ในการบ่ม myosmine ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในลิโมนไฟไซด์เป็นเวลา 1, 3, 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่าความเสียหายของ DNA มากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มมากขึ้น

Blasiak *et al.* (2004) รายงานการทดสอบโคเมทาในลิโมนไฟไซด์ของคนที่ใช้ acrylamide ซึ่งเป็นสารเคมีในอุตสาหกรรมการทำเจลที่มีผลกระทบต่อ DNA แต่ยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน จากการทดลองพบว่า acrylamide ความเข้มข้น 0.5-50 ไมโครโมลาร์ มีผลยับยั้งการซ่อมแซม DNA และเหนี่ยวนำการเกิด apoptosis ของเซลล์

Kleinsasser *et al.* (2004) รายงานการทดสอบโคเมทาในลิโมนไฟไซด์และ nasal mucosal cell ของคนที่ใช้ mono (2-ethylhexy) phthalate (MEHP) ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการ hydrolysis ของ di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) ที่พบในพลาสติก PVC ในปัจจุบันใช้พลาสติก PVC เป็นส่วนประกอบในอุปกรณ์หลายชนิด เช่น ถุงเก็บเลือด วัสดุห่ออาหาร และหลอดต่างๆ จากการทดลองพบว่า MEHP ความเข้มข้น 0.1, 1 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ มีผลให้ DNA เกิดความเสียหายโดยสังเกตจากค่า Olive tail moment ที่มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ MEHP มากขึ้น

Macioszek and Kononowicz (2004) รายงานการทดสอบโคเมทาในลิโมนไฟไซด์ของคนที่ใช้ quinoline yellow (QY) และ brilliant black (BB) ซึ่งเป็นสีที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร QY ความเข้มข้น 86.7 และ 867 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร BB ความเข้มข้น 8.67, 86.7 และ 867 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความเสียหายของ DNA มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ QY และ BB มากขึ้น

Andersson and Hellman (2005) รายงานการทดสอบโคเมทาในลิโมนไฟไซด์ของคนที่ใช้ Catechol (1,2-dihydroxybenzene) ซึ่งเป็นสารที่พบในอาหาร ควันบูรรี่ หมากฝรั่ง และพลาสติก ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ พบว่า Catechol ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เหนี่ยวนำให้ DNA เกิดความเสียหาย และความเสียหายมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Catechol

Aydin *et al.* (2005) รายงานการทดสอบโคเมทาในลิโมนไฟไซด์ของคนที่ใช้น้ำมันไทม์ (thyme) ซึ่งเป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อเพิ่มรส กลิ่น และช่วยถนอมอาหาร น้ำมันไทม์มี

ส่วนประกอบหลักคือ thymol, carvacrol และ γ -terpinene พบว่า thymol และ γ -terpinene ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.1 มิลลิโมลาร์ไม่ทำให้ DNA เสียหาย แต่ความเข้มข้นมากกว่า 0.2 มิลลิโมลาร์เหนี่ยวนำให้ DNA เกิดความเสียหาย ส่วน carvacrol ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์เริ่มเหนี่ยวนำให้ DNA เกิดความเสียหาย

Baum *et al.* (2005) รายงานการทดสอบโคเมทและการทดสอบไมโครนิวเคลียสในลิมโฟไซต์ของคนโดยใช้ acrylamide (AA) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง แต่ยังไม่ทราบผลกระทบในคน AA ผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมกลายเป็น glycidamide (GA) ในการทดสอบโคเมท พบว่า AA ความเข้มข้นมากกว่า 6,000 ไมโครโมลาร์ และ GA ความเข้มข้น 300-3,000 ไมโครโมลาร์ มีผลให้ DNA เกิดความเสียหาย ในการทดสอบไมโครนิวเคลียสพบว่า AA ความเข้มข้นมากกว่า 5,000 ไมโครโมลาร์ และ GA ความเข้มข้นมากกว่า 1,000 ไมโครโมลาร์เหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียส

Abou-Eisha (2006) รายงานการทดสอบโคเมท การทดสอบความผิดปกติของโครโมโซม และการทดสอบไมโครนิวเคลียสในลิมโฟไซต์ของคนโดยใช้ trimethoprim ซึ่งเป็นสารต้านจุลชีพ ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับการทดสอบไมโครนิวเคลียส และการทดสอบความผิดปกติของโครโมโซม ความเข้มข้น 0.5-150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับการทดสอบโคเมท พบว่าความเสียหายของ DNA มากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ trimethoprim มากขึ้น

Blaszczuk (2006) รายงานการทดสอบโคเมทในลิมโฟไซต์ของคนโดยใช้ ethoxyquin (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylquinoline) (EQ) ที่ใส่ในอาหารหลายชนิด เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็น antioxidant ทำให้อาหารเก็บได้นานขึ้น ช่วยถนอมสีของพริกหวานและพริกหยวกได้นาน โดย การทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกใส่ S-9 mix อีกกลุ่มไม่ใส่ S-9 mix ใส่ EQ ความเข้มข้น 1–250 ไมโครโมลาร์ พบว่าความเสียหายของ DNA มากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ EQ มากขึ้น และความเสียหายของ DNA ของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน

Kleinsasser *et al.* (2006) รายงานการทดสอบโคเมทในเซลล์ต่อมน้ำลายและลิมโฟไซต์ของคน โดยใช้ resin monomers ซึ่งเป็นวัสดุอุดฟันที่ประกอบด้วยสารหลัก 3 ชนิด คือ triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA), urethanedimethacrylate (UDMA) และ 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) จากการทดลองพบว่า TEGDMA ความเข้มข้น 2.5×10^{-2} โมลาร์ UDMA ความเข้มข้น 6.4×10^{-2} โมลาร์ และ HEMA ความเข้มข้น 6.1×10^{-2} โมลาร์ มีผลให้ DNA เกิดความเสียหาย

Lankoff *et al.* (2006) รายงานการทดสอบโคเมทในลิมโฟไซต์ของคนโดยใช้ aluminium chloride (AlCl_3) ซึ่งเป็นโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ความเข้มข้น 1, 2, 5, 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ AlCl_3 มากขึ้นทำให้ความเสียหายของ DNA มากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หัวรากเงิน รากทอง และรากนาถ (*Hippeastrum* spp.)
2. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 - 2.1 ภาชนะใส่อาหาร ได้แก่ ขวด flask
 - 2.2 ภาชนะสำหรับตวง ได้แก่ กระบอกตวง volumetric flask ฯลฯ
 - 2.3 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)
 - 2.4 เครื่องชั่งหยาบและเครื่องชั่งละเอียด
 - 2.5 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ ปิเปต กรวยแก้ว แท่งแก้วคน ฯลฯ
 - 2.6 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) และตู้อบลมร้อน (hot air oven)
3. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการถ่ายเนื้อเยื่อ
 - 3.1 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (laminar air flow)
 - 3.2 ปากกิบ มีดผ่าตัด ตะเกียง แอลกอฮอล์ ฯลฯ
 - 3.3 จานแก้ว (petri dish) ฯลฯ
4. สารเคมี
 - 4.1 สารเคมีสำหรับการเตรียมอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)
 - 4.2 สารควบคุมการเจริญเติบโต ได้แก่ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) และ 6-benzylaminopurine (BAP)
 - 4.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาด้านชีวเคมีของสารสี ได้แก่ hydrochloric acid (HCl), formic acid (HCOOH), acetone, ethanol (EtOH), methanol (MeOH), cellulose microcrystalline สำหรับเคลือบแผ่น TLC (Merck) และ Sephadex LH20 (Sigma)
 - 4.4 สารเคมีสำหรับการทดสอบไมโครนิวเคลียส ได้แก่ สารก่อกลาย mitomycin C (MMC) และ 9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA), acridine orange และ propylene glycol
 - 4.5 สารเคมีสำหรับการทดสอบโคเมท ได้แก่ สารก่อกลาย mitomycin C (MMC), dimethylformamide (DMFA), normal agarose gel (Sigma), sterile normal saline (NaCl 0.9 กรัม

ผสมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร), triton X-100 (Sigma), low melting point agarose (Sigma), phosphate buffer saline solution (PBS), trizma base, di-sodium ethylenediaminetetraacetic acid (Na_2EDTA), N-laurylsarcosine Na-salt (Sigma), dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium hydroxide, ammonium acetate, absolute ethanol, ethidium bromide

5. ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พร้อมชั้นวางขวดสามารถเก็บขวดเพาะเลี้ยงในสภาพมืดและสภาพที่มีแสง และเครื่องเขย่า

6. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการเก็บสารสี ได้แก่ หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร และเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูง

7. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการศึกษาด้านชีวเคมีของสารสี ได้แก่ แผ่น TLC, TLC tank, column, เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Fotodyne incorporated), rotatory evaporator และ speed vacuum

8. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารสี

8.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสีด้วยการทดสอบไมโครนิวเคลียส

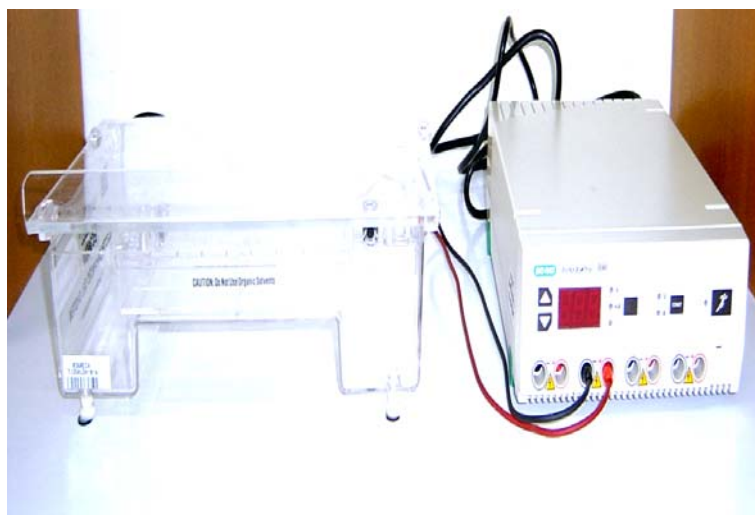
8.1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการทดสอบไมโครนิวเคลียสใน reticulocytes จากกระดแลือดของหนู ได้แก่ stomach-tube สไลด์ หลอดเก็บตัวอย่างเลือด เข็มฉีดยา กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์และอื่นๆ

8.1.2 สัตว์ทดลอง ได้แก่ หนู mouse สายพันธุ์ Swiss albino (*Mus musculus*) อายุ 7 สัปดาห์ เพศผู้ น้ำหนัก 35-40 กรัม จำนวน 48 ตัว เพศเมีย น้ำหนัก 25-30 กรัม จำนวน 48 ตัว โดยซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม หนูเลี้ยงในกรงสเตนเลสมีกระดแลือดขาวตัดฝอยเป็นวัสดุรอง ควบคุมอุณหภูมิของห้องเลี้ยงสัตว์ที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ตลอด 24 ชั่วโมง ให้ดื่มน้ำกรองและกินอาหารเม็ด

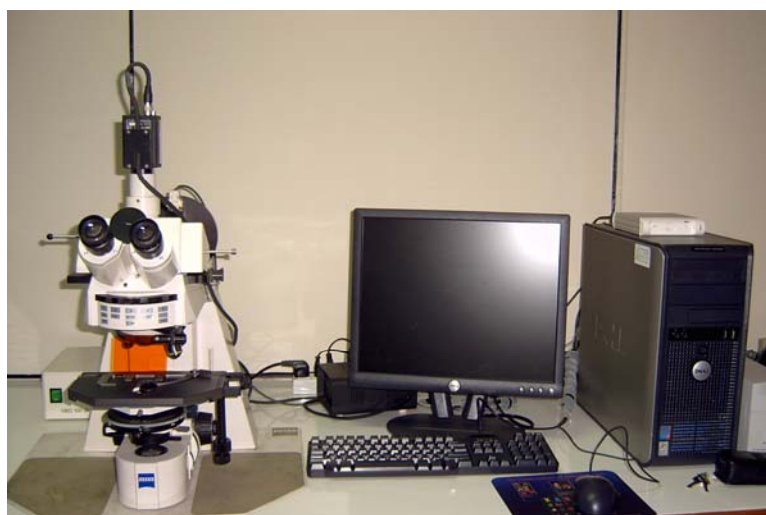
8.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสีด้วยการทดสอบโคเมท

8.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการทดสอบโคเมท ได้แก่ สไลด์แก้วที่มีฝาทึบ ปลายด้านหนึ่ง, cover slip, slide warmer, heat box, hotplate, coplin jars, ชุดอิเล็กทรอนิกส์ (ภาพที่ 5), กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (ภาพที่ 6) และอื่นๆ

8.2.2 กลุ่มประชากรที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ อาสาสมัครของคนที่มีความรู้ดี ผู้ชาย 2 คน และ ผู้หญิง 2 คน



ภาพที่ 5 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสประกอบด้วย power supply และ electrophoresis chamber



ภาพที่ 6 ชุดการตรวจเซลล์จากการทดสอบโคเมทประกอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์จอภาพและเครื่องคอมพิวเตอร์

วิธีการ

1. การเตรียมพืชทดลอง

เพาะเลี้ยงหัวรากเงิน รากทอง และรากนาก ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (pure refined sugar) 60 กรัมต่อลิตร pH 5.8 (สุชาดา, 2542) ซึ่งเป็นอาหารสูตรควบคุมในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 เดือน เพื่อเพิ่มปริมาณหัวให้ได้หัวขนาดมาตรฐาน (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.0-1.5 เซนติเมตร) ไปใช้ในการศึกษาต่อไป (ผกาเวียง, 2545)

2. การสร้างสารสีของหัวที่เพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงหัวในอาหารเหลวสูตรเหมาะสมปริมาณ 60 มิลลิลิตร โดยใส่ประมาณ 5-6 หัว ในอาหารเหลว 1 ขวด ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน (ผกาเวียง, 2545) ดังนี้

รากเงิน เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS + BAP 6 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ 60 กรัมต่อลิตร pH 6.3 เป็นเวลา 27 วัน

รากทอง เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS + BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร pH 6.8 เป็นเวลา 30 วัน

รากนาก เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS + BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร + NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร + น้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร pH 6.8 เป็นเวลา 27 วัน

3. การสกัดสารสี

3.1 การศึกษาด้านชีวเคมี

แยกสารสีจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยปั่นเหวี่ยงอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงหัวรากเงิน รากทองและรากนากที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกอาหารเหลวออก ดูดส่วน

ของเหลวใสส่วนบน (supernatant) ที่ล้างตะกอน (precipitant) ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนของเหลวใสทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนสีด้วย 1 % HCl ใน MeOH ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสารสีนำไปวิเคราะห์ต่อไป (Francis, 1982)

3.2 การศึกษาด้านการทดสอบความเป็นพิษ

แยกสารสีจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยปั่นเหวี่ยงอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงห้วรางเงิน รางทองและรางนากที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกอาหารเหลวออก ดูดของเหลวใสส่วนบนที่ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนของเหลวใสทิ้ง อบตะกอนในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน นำตะกอนที่ได้มาบดในโกร่งจนละเอียด ละลายตะกอนด้วย acetone ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร นำไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับตัวทำละลายโดยใช้เครื่อง rotatory evaporator จากนั้นนำสารละลายสารสีที่มีความเข้มข้นสูงนี้ไประเหยตัวทำละลายออกให้หมดภายใต้สูญญากาศโดยใช้เครื่อง speed vacuum จะได้สารสีในรูปของผงสี (Farzad *et al.*, 2002)

4. การศึกษาด้านชีวเคมีของสารสี

4.1 การแยกสารสีด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

นำสารละลายสารสีรางเงิน รางทอง และรางนากจากข้อ 3.1 มาอย่างละ 4 ไมโครลิตร spot บนแผ่นกระจกเคลือบเซลลูโลส (2.5x7.5 เซนติเมตร) เพื่อแยกสารสีด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแผ่นเคลือบ หรือ thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ developing solvent ที่ประกอบด้วย HCOOH, H₂O และ HCl ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 12 ชนิดดังนี้

$$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 4.5 : 0.5, \quad \text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 5 : 0.5$$

$$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 5.5 : 0.5, \quad \text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 6 : 0.5$$

$$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 6.5 : 0.5, \quad \text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7 : 0.5$$

$$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7.5 : 0.5, \quad \text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 8 : 0.5$$

$$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 8.5 : 0.5, \quad \text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 9 : 0.5$$

$$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 9.5 : 0.5, \quad \text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 10 : 0.5$$

เลือก developing solvent ที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.2. การแยกสารสีที่กำจัด flavonols ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

นำสารละลายสารสีจากใบ ราก และรากจากข้อ 3.1 มากำจัด flavonols โดยใช้ ethyl acetate ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (Heather *et al.*, 2003) จากนั้นนำสารละลายสารสีมาอย่างละ 4 ไมโครลิตร spot บนแผ่นกระจกเคลือบเซลลูโลส (20x20 เซนติเมตร) เพื่อแยกสารสีด้วยวิธี TLC โดยใช้ developing solvent ที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 4.1 บันทึกสีที่เห็นและค่า $R_f \times 100$ จุดแถบสีมาละลายด้วย 1% HCl ใน MeOH นำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง 300-600 นาโนเมตร (การดูดกลืนแสงสูงสุดของแอนโทไซยานินอยู่ในช่วง 465-560 นาโนเมตร)

4.3. การแยกสารสีด้วยวิธี Column Chromatography

นำสารละลายสารสีจากใบ ราก และรากจากข้อ 3.1 มาอย่างละ 500 ไมโครลิตร load ลงใน column ที่บรรจุ Sephadex LH 20 สูง 48 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร โดยมี eluted solvent ที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 4.1 มีอัตราการไหล 1 มิลลิลิตร ต่อ นาที เก็บ fraction ที่แยกแถบสีได้ fraction ละ 0.5 มิลลิลิตร นำสารสีมาวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วง 300-600 นาโนเมตร (การดูดกลืนแสงสูงสุดของแอนโทไซยานินอยู่ในช่วง 465-560 นาโนเมตร)

5. การทดสอบความเป็นพิษของสารสีด้วยการทดสอบไมโครนิวเคลียส (Micronucleus Test)

5.1 แผนการทดลอง

ให้หนูปรับตัวเป็นระยะเวลา 5 วันแล้วจึงนำมาทดลอง หลังจากนั้นทดสอบไมโครนิวเคลียสจาก reticulocyte ในกระแสเลือด แต่ละการทดลองใช้หนูเพศผู้ 8 ตัว และหนูเพศเมีย 8 ตัว แบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 positive control (direct mutagen) ฉีด MMC ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนัก หนูเข้าช่องท้อง เก็บเลือดที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังการฉีด

กลุ่มที่ 2 positive control (indirect mutagen) ป้อน DMBA ปริมาณ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักหนู (ละลายสารในน้ำมันมะกอก) เก็บเลือดที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังการป้อน

กลุ่มที่ 3 negative control ป้อน propylene glycol (ตัวทำละลายสารสีจากรางเงิน รางทอง และรงนก) ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักหนู เก็บเลือดที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังการป้อน

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสีจากรางเงินปริมาณ 1 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักหนู (สารสี 500 มิลลิกรัม ละลายใน propylene glycol 1 มิลลิกรัม) เก็บเลือดที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังการป้อน

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารสีจากรางทองปริมาณ 1 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักหนู (สารสี 500 มิลลิกรัม ละลายใน propylene glycol 1 มิลลิกรัม) เก็บเลือดที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังการป้อน

กลุ่มที่ 6 ป้อนสารสีจากรางนกปริมาณ 1 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักหนู (สารสี 500 มิลลิกรัม ละลายใน propylene glycol 1 มิลลิกรัม) เก็บเลือดที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังการ ป้อน

5.2 การป้อนสารให้หนู

ใช้กระบอกลีดยาปริมาตร 1 มิลลิกรัม ต่อเข้ากับเข็มฉีดยาขนาด 20 G x 1.6 นิ้วที่ตัดปลายให้ทุ้ และทำให้โค้งตามส่วนโค้งของปากและหลอดอาหารของหนู ตรงปลายสุดใช้ตะกั่วทำเป็นปุ่มกลมเพื่อป้องกันการระคายเคืองต่อเยื่อทางเดินอาหารในขณะที่ทำการป้อน จุดสารที่จะป้อนเข้ามาไว้ในกระบอกลีดยา ปรับปริมาตรพร้อมทั้งไล่ฟองอากาศออก ในการจับหนูใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ของมือซ้ายจับหูหนู หนีบหางให้อยู่ระหว่างนิ้วก้อยและนิ้วนาง ตัวหนูอยู่ในอุ้งมือ จับหูหนูให้ตึงจะทำให้หนูเงยหน้าขึ้นและอ้าปากเล็กน้อย มือขวาถือกระบอกลีดยาที่ใช้ป้อน นำเข็มมาแตะมุมปากแล้วค่อยๆสอดเข้าไปตามหลอดอาหารให้ลึกพอสมควร (ภาพที่ 7) กดกระบอกลีดยาเพื่อให้สารเข้าไปในกระเพาะอาหารได้หมด ป้องกันหนูคายออก แล้วค่อยๆถอนเข็มออกมา (เพ็ญศิริ, 2539)



ภาพที่ 7 การป้อนสารให้หนู

5.3 การฉีด MMC เข้าสู่ช่องท้องหนู

ใช้กระบอกฉีดยาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ต่อกับเข็มฉีดยาสีเขียวรูป ดูดสารที่จะฉีดเข้ามาไว้ในกระบอกฉีดยา ปรับปริมาตรพร้อมทั้งไล่ฟองอากาศออก ในการจับหนูใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ของมือซ้ายจับหนู หนีบหางให้อยู่ระหว่างนิ้วก้อยและนิ้วนาง ตัวหนูอยู่ในอุ้งมือ หางอยู่มือ ให้หัวหนูล่างเล็กน้อย มือขวาถือกระบอกฉีดยาฉีดเข้าสู่ช่องท้อง แทะเข็มเข้าสู่ช่องท้อง ดังกระบอกฉีดยาขึ้นเล็กน้อยเพื่อตรวจว่ามีเลือดไหลตามกระบอกฉีดยาหรือไม่ ถ้ามีเลือดไหลตามกระบอกฉีดยาเนื่องจากทะลุเข็มโดนอวัยวะภายใน ให้ถอนเข็มออกแล้วแทงตำแหน่งอื่น จากนั้นค่อยๆกดกระบอกฉีดยา เพื่อให้สารเข้าในช่องท้องแล้วค่อยๆถอนเข็มออกมา (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การฉีด MMC เข้าสู่ช่องท้องหนู

5.4 การเคลือบสไลด์ด้วย acridine orange

ละลาย acridine orange ในน้ำกลั่นความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บ่มสไลด์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30-60 นาที ผสม acridine orange 7 ไมโครลิตร มาเคลือบบนสไลด์ จากนั้นใช้แท่งแก้วถูไปมาบนสไลด์จนกว่าจะแห้ง (Hayashi, 1990)

5.5 การเตรียมตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจาก orbital plexus ของหนูโดยใช้หลอด hematocrit หยดเลือด 5 ไมโครลิตรบนสไลด์ที่เคลือบด้วย acridine orange ปิด cover slip ขนาด 27x40 มิลลิเมตร วางสไลด์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดทำปฏิกิริยากับ acridine orange จากนั้นนับจำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสและไม่มีไมโครนิวเคลียสด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Vander *et al.*, 1963) reticular structure มีสีแดงส้ม ส่วนไมโครนิวเคลียสเป็นจุดกลมมีสีเขียว เหลือง แต่ละการทดลองศึกษา reticulocyte 1,000 เซลล์ต่อหนู 1 ตัว รวมศึกษา reticulocyte ทั้งหมด 8,000 เซลล์จากหนู 8 ตัว

5.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 12.0 for Windows และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของจำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสหรือ micronucleated peripheral reticulocytes (MNRETs) ต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ด้วยวิธีการของ Tukey

6. การทดสอบความเป็นพิษของสารสีด้วยการทดสอบโคเมท (Comet Assay)

6.1 แผนการทดลอง

นำเลือดจากอาสาสมัครผู้ชาย 2 คน และผู้หญิง 2 คน มาคนละ 2 มิลลิลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรจำนวน 16 หลอด โดยใส่เลือดหลอดละ 125 ไมโครลิตร และเติมสารดังนี้

หลอดที่ 1 positive control เติม MMC 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

หลอดที่ 2 negative control-1 เติมน้ำกลั่น 1.5 ไมโครลิตร

หลอดที่ 3 negative control-2 เติมน้ำกลั่น 3.5 ไมโครลิตร

หลอดที่ 4 negative control-3 เติมน้ำกลั่น 7.5 ไมโครลิตร

หลอดที่ 5 solvent control-1 เติม DMFA 1.5 ไมโครลิตร

หลอดที่ 6 solvent control-2 เติม DMFA 3.5 ไมโครลิตร

หลอดที่ 7 solvent control-3 เติม DMFA 7.5 ไมโครลิตร

หลอดที่ 8 เติมสารสีจากรางเงิน 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

หลอดที่ 9 เติมสารสีจากรางเงิน 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

หลอดที่ 10 เติมสารสีจากรางเงิน 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

หลอดที่ 11 เติมสารสีจากรางทอง 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

หลอดที่ 12 เติมสารสีจากรางทอง 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

หลอดที่ 13 เติมสารสีจากรางทอง 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

หลอดที่ 14 เติมสารสีจากรางนาก 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

หลอดที่ 15 เติมสารสีจากรางนาก 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

หลอดที่ 16 เติมสารสีจากรางนาก 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

หลอดที่ 2 และ 5 เป็น control ของหลอดที่เติมสารสี 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด คือหลอดที่ 8, 11 และ 14

หลอดที่ 3 และ 6 เป็น control ของหลอดที่เติมสารสี 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด คือหลอดที่ 9, 12 และ 15

หลอดที่ 4 และ 7 เป็น control ของหลอดที่เติมสารสี 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด คือหลอดที่ 10, 13 และ 16

นำหลอดไปใส่ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและดำเนินการทดลองในการทดสอบโคเมทตามวิธีการของ ชนิพร (2543) ; Ostling (1984) และ Wanvisa (2006)

6.2 การเคลือบสไลด์ด้วยเจลอะกาโรส

ละลายอะกาโรส 1 กรัมใน 0.9 % sterile normal saline 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และอุ่นบน heat box จนกระทั่งเดือด ปรับปริมาณของเจลให้มีปริมาตรเท่าเดิมโดยใช้น้ำกลั่น บ่มสไลด์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30-60 นาที (ภาพที่ 9) ดูดเจล 200 ไมโครลิตรเคลือบบนสไลด์ วางสไลด์ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 9 การบ่มสไลด์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

6.3 การเคลือบสไลด์ด้วยตัวอย่างเลือดที่อยู่ในเจลอะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ

ละลายอะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ 0.6 กรัมใน PBS 100 มิลลิลิตร (0.6% เจลอะกาโรสที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ) เขย่าให้เข้ากัน และอุ่นบน heat box จนกระทั่งเดือด ปรับปริมาตรของเจลให้มีปริมาตรเท่าเดิมโดยใช้น้ำกลั่น คือดเจล 200 ไมโครลิตรใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมตัวอย่างเลือด 20 ไมโครลิตรในเจลอะกาโรสแล้วหยดลงบนเจลชั้นที่ 1 ปิดทับด้วย cover slip นำไปวางบนถาดที่เย็นจัดเป็นเวลา 2 นาที จึงแกะ cover slip ออก

6.4 การทำให้เซลล์เมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือดขาวแตก

นำสไลด์ไปใส่ใน lysing solution ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เซลล์เมมเบรนของเซลล์เม็ดเลือดขาวแตก เมื่อครบเวลาเอาสไลด์ออกจาก lysing solution ไปวางใน electrophoresis chamber โดยให้ electrophoresis buffer ที่เย็นเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ DNA คลายเกลียว

6.5 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

เมื่อ DNA คลายเกลียวแล้ว นำสไลด์มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน electrophoresis chamber ที่มี alkaline buffer pH 13 ใช้กระแสไฟฟ้า 17 โวลต์ 300 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 30 นาที

6.6 การ neutralization

นำสไลด์มาแช่ใน neutralization buffer ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

6.7 การย้อมสี

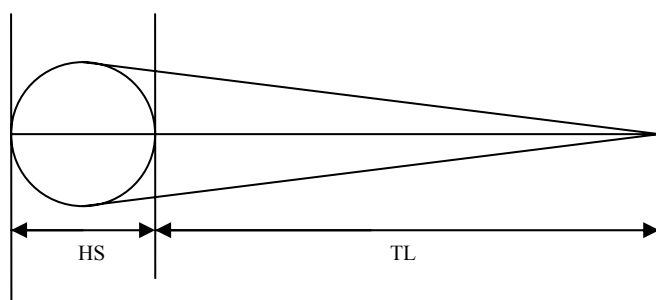
หยด ethidium bromide ความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 35 ไมโครลิตรลงบนเจล ปิดทับด้วย cover slip นำไปดูใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กรณียังไม่ได้ตรวจวิเคราะห์ทันที ให้เก็บสไลด์ใน moist chamber ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.8 การตรวจวิเคราะห์ผล

ใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ excitation filter 515-560 นาโนเมตร barrier filter 590 นาโนเมตร กำลังขยาย 100 เท่า ตรวจสอบบริเวณที่เซลล์มีการกระจายตัวพอดี หลังจากนั้นจึงดูด้วยกำลังขยาย 400 เท่า ใช้กล้องซีซีดี (charge-coupled device, CCD) รับสัญญาณภาพถ่ายทอดไปยังคอมพิวเตอร์ (Monteith and Vanstone, 1995) แต่ละการทดลองทำการศึกษาลิมโฟไซท์ 100 เซลล์ รวม 1,600 เซลล์ต่ออาสาสมัคร 1 คน ใช้โปรแกรม Meta System ISS092 คำนวณค่าต่างๆของโคเมตามาตามวิธีของ McCarthy *et.al.* (1997) ดังนี้ (ภาพที่ 10)

- HS (head size) : เส้นผ่าศูนย์กลางโคเมท
- TL (tail length) : ความยาวหางของเซลล์โคเมท
- Intensity : ความสว่าง
- Tail Moment (โมเมนต์หาง) = Tail Length x (% DNA)
- % DNA = [(Tail Intensity) / (Total Intensity)] x 100

ศึกษาเส้นผ่าศูนย์กลางโคเมท ความยาวหางและโมเมนต์หาง นำค่าที่ได้ไปคำนวณทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 12.0 for Windows



ภาพที่ 10 การวัดความยาวของเซลล์โคเมท

ตัวย่อ HS (head size) : เส้นผ่าศูนย์กลางโคเมท

TL (tail length) : ความยาวหางของเซลล์โคเมท

สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร
2. ห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยา
เขตบางเขน กรุงเทพมหานคร
3. ห้องปฏิบัติการสัตว์ทดลอง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร

ระยะเวลาในการทดลอง

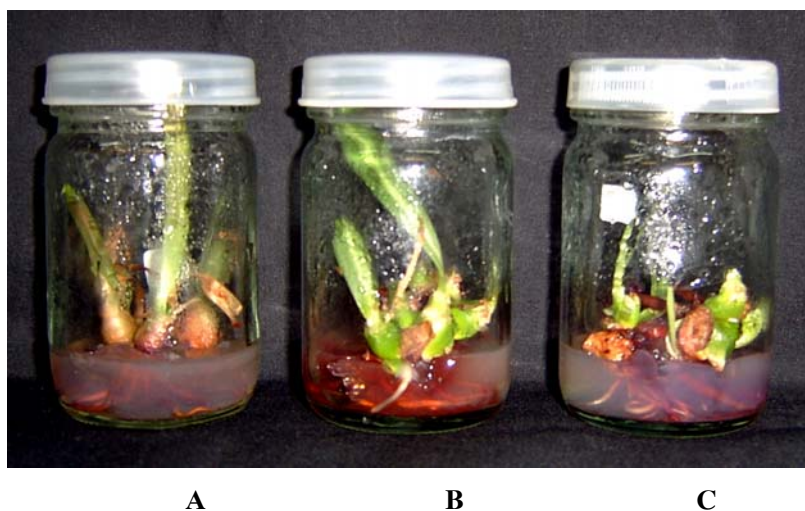
เริ่มทำการทดลอง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2546

สิ้นสุดการทดลอง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549

ผลและวิจารณ์

1. การเตรียมพืชทดลอง

การเพาะเลี้ยงหัวรากเงิน รากทอง และรากนาในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP 2 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ 60 กรัมต่อลิตร pH 5.8 (สูตรควบคุม) ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 เดือน ได้ต้นและหัวที่มีขนาดมาตรฐานเพื่อใช้ในการสร้างสารสี หัวมีการสร้างสารสีและปล่อยสารสีลงในอาหารเป็นสีม่วงอ่อน สีแดงอมส้ม และสีม่วงตามลำดับ (ภาพที่ 11)

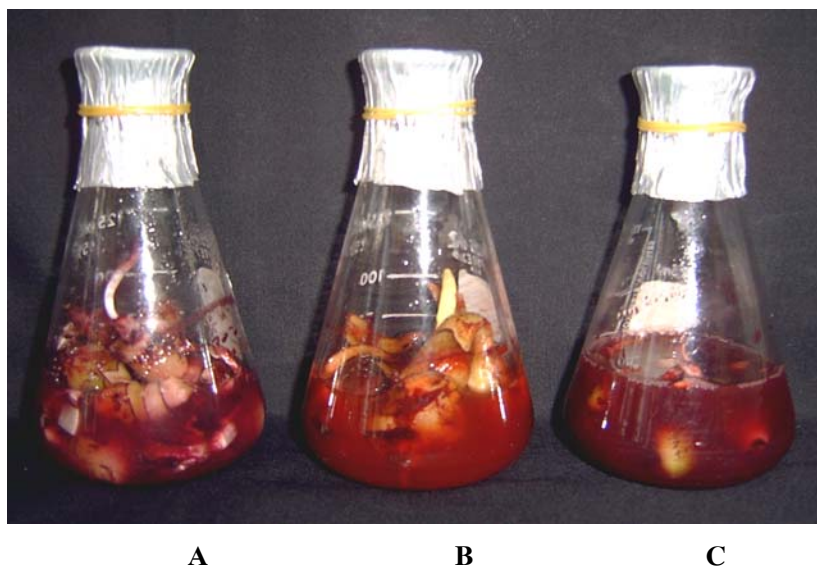


ภาพที่ 11 การเพาะเลี้ยงหัวในอาหารแข็งสูตรควบคุม A. รากเงิน B. รากทอง C. รากนา

2. การสร้างสารสีของหัวที่เพาะเลี้ยง

เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนหัวในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ในสภาพที่เหมาะสม (ผกาเวียง, 2545) คือ รากเงินเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BAP 6 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ 60 กรัมต่อลิตร pH 6.3 เป็นเวลา 27 วัน รากทองเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลกาแลคโตส 60 กรัมต่อลิตร pH 6.8 เป็นเวลา 30 วัน รากนาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BAP 5 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร pH 6.8

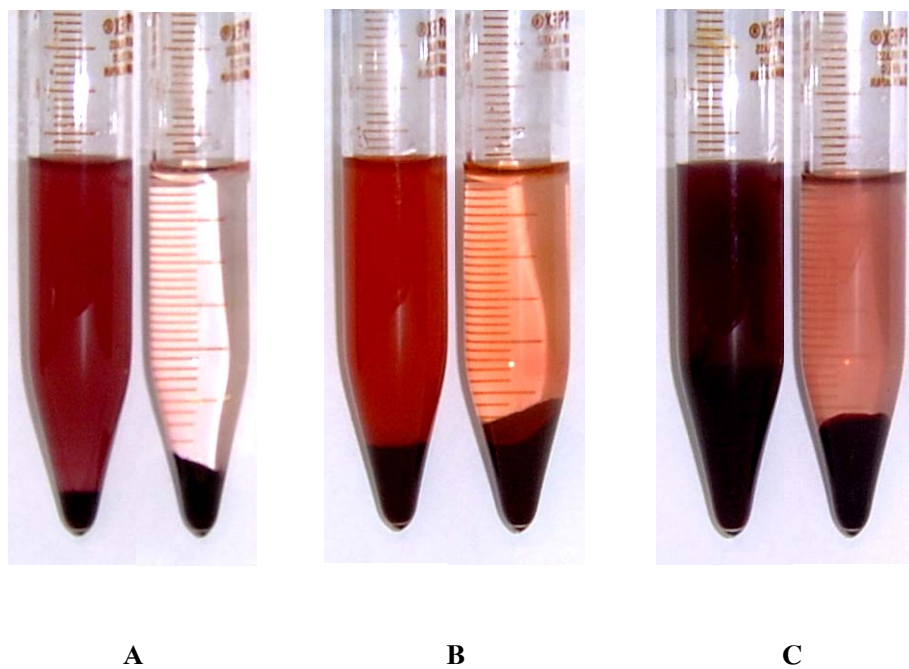
เป็นเวลา 27 วัน ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่าหัวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าในอาหารแข็ง และสามารถสร้างสารสีได้มากกว่า สังเกตเห็นอาหารมีสีม่วงอ่อน สีแดงอมส้ม และสีม่วง ตามลำดับ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 การเพาะเลี้ยงหัวในอาหารเหลว A. รางเงิน B. รางทอง C. รางนาก

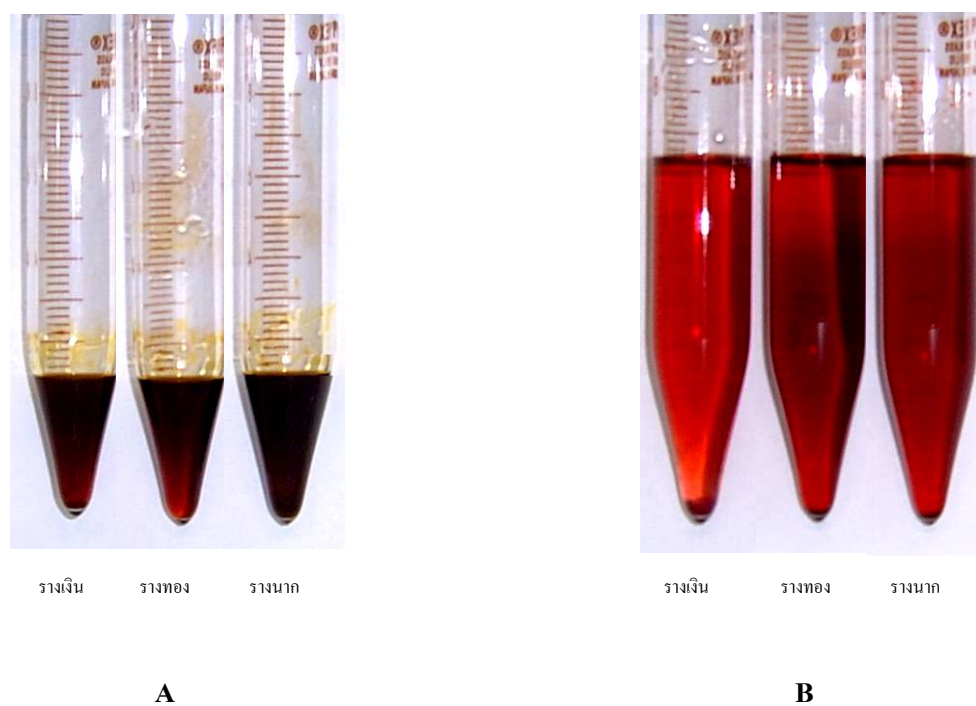
3. การสกัดสารสี

เมื่อนำอาหารเหลวที่มีเซลล์สะสมสารสีแขวนลอยอยู่มาปั่นเหวี่ยง จะได้ตะกอนเซลล์สะสมสารสี (ภาพที่ 13) ละลายตะกอนด้วย 1 % HCl ใน MeOH ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีเหลืองน้ำตาลเพื่อนำไปศึกษาด้านชีวเคมีของสารสี (ภาพที่ 14A) แต่ถ้าละลายตะกอนด้วย acetone ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีแดงเข้มเพื่อนำไปศึกษาด้านการทดสอบความเป็นพิษของสารสี (ภาพที่ 14B)



ภาพที่ 13 เซลล์สะสมสารสีก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงหัว

A. รางเงิน B. รางทอง C. รางนาก



ภาพที่ 14 สารสีรางเงิน รางทอง และรางนาก ละลายใน A. 1 % HCl ใน MeOH B. acetone

4. การศึกษาด้านชีวเคมีของสารสี

4.1 การแยกสารสีด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

จากการทำ thin layer chromatography (TLC) ของสารสีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงหัวราก
เงิน รากทอง และรากนาก โดยใช้ developing solvent ต่างๆ 12 ชนิด ดังนี้

$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 4.5 : 0.5$, $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 5 : 0.5$

$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 5.5 : 0.5$, $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 6 : 0.5$

$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 6.5 : 0.5$, $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7 : 0.5$

$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7.5 : 0.5$, $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 8 : 0.5$

$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 8.5 : 0.5$, $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 9 : 0.5$

$\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 9.5 : 0.5$, $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 10 : 0.5$

พบว่า developing solvent ที่ประกอบด้วย HCOOH , H_2O และ HCl ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันนั้น
สามารถแยกสารสีได้เป็น 3 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลืองส้ม และสีส้ม โดย developing solvent ที่มี
 $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl}$ ในอัตราส่วน 5 : 7 : 0.5 สามารถแยกสารสีได้ดีที่สุด (ภาพที่ 15 และตารางที่ 4)



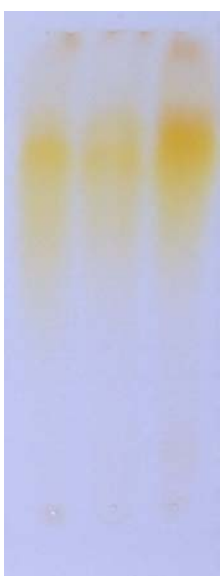
A

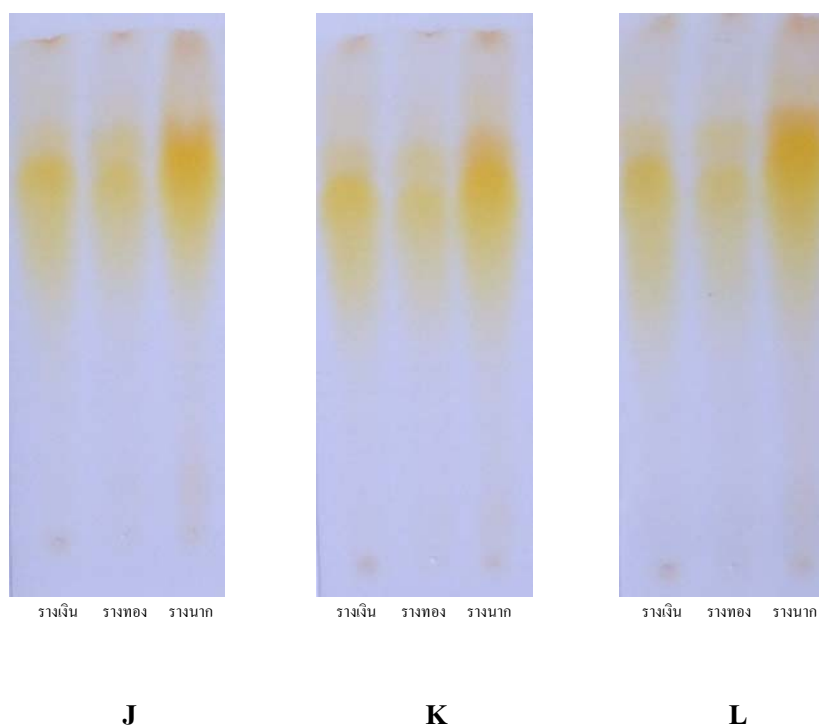


B



C

**D****E****F****G****H****I**



ภาพที่ 15 โครมาโตแกรมจากการทำ thin layer chromatography ของสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนาก โดยใช้ developing solvent 12 ชนิด

- A. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 4.5 : 0.5$
- B. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 5 : 0.5$
- C. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 5.5 : 0.5$
- D. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 6 : 0.5$
- E. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 6.5 : 0.5$
- F. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7 : 0.5$
- G. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7.5 : 0.5$
- H. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 8 : 0.5$
- I. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 8.5 : 0.5$
- J. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 9 : 0.5$
- K. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 9.5 : 0.5$
- L. $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 10 : 0.5$

ตารางที่ 4 ผลจากการทำ thin layer chromatography ของสารสีจากรางเงิน รวงทอง และรวงนา
โดยใช้ developing solvent 12 ชนิด

developing solvent	อัตราส่วนโดยปริมาตร	ผลที่ได้
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 4.5 : 0.5	แยกสารสีได้ 3 แถบคือ สีเหลือง สีเหลือง ส้ม และสีส้ม แต่ยังมีบางส่วนผสมกันอยู่
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 5 : 0.5	แยกสารสีได้ 3 แถบคือ สีเหลือง สีเหลือง ส้ม และสีส้ม แต่ยังมีบางส่วนผสมกันอยู่
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 5.5 : 0.5	แยกสารสีได้ 3 แถบคือ สีเหลือง สีเหลือง ส้ม และสีส้ม แต่ยังมีบางส่วนผสมกันอยู่ และบางส่วนเริ่มแยกจากกัน
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 6 : 0.5	แยกสารสีได้ดีขึ้นเป็น 3 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลืองส้ม และสีส้ม
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 6.5 : 0.5	แยกสารสีได้ดีขึ้นเป็น 3 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลืองส้ม และสีส้ม
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 7 : 0.5	แยกสารสีได้ดีที่สุดเป็น 3 แถบ คือ สี เหลือง สีเหลืองส้ม และสีส้ม
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 7.5 : 0.5	แยกสารสีได้ 3 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลือง ส้ม และสีส้ม โดยสีส้มในแถบสุดท้ายมีสี จางลง
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 8 : 0.5	แยกสารสีได้ 3 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลือง ส้ม และสีส้ม โดยสีเหลืองส้มมีสีส้มเข้ม ขึ้นและสีส้มในแถบสุดท้ายมีสีจางลง
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 8.5 : 0.5	แยกสารสีได้ 3 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลือง ส้ม และสีส้ม โดยสีเหลืองส้มมีสีส้มเข้ม ขึ้น และสีส้มในแถบสุดท้ายมีสีจางลง
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 9 : 0.5	แยกสารสีได้ 3 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลือง ส้ม และสีส้ม โดยสีเหลืองส้มมีสีส้มเข้ม ขึ้น และสีส้มในแถบสุดท้ายมีสีจางลง

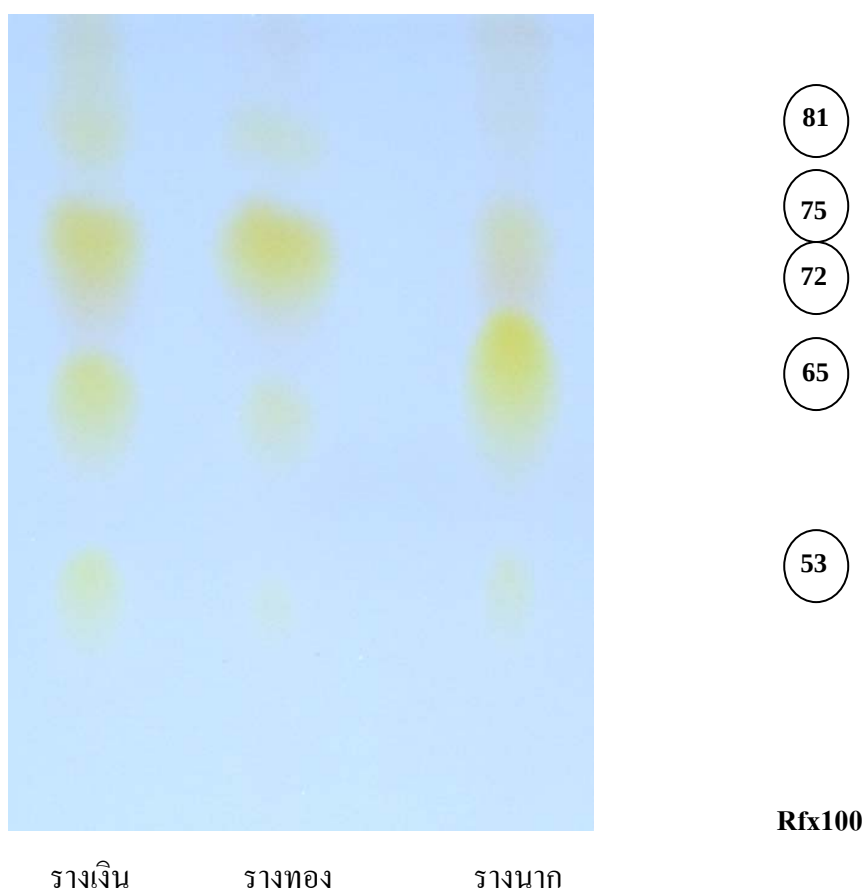
ตารางที่ 4 (ต่อ) ผลจากการทำ thin layer chromatography ของสารสีจากรางเงิน รวงทอง และ รวงนากโดยใช้ developing solvent 12 ชนิด

developing solvent	อัตราส่วนโดยปริมาตร	ผลที่ได้
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 9.5 : 0.5	แยกสารสีได้ 3 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลือง ส้ม และสีส้ม โดยสีเหลืองส้มมีสีส้มเข้ม จืด และสีส้มในแถบสุดท้ายมีสีจางลง
HCOOH : H ₂ O : HCl	5 : 10 : 0.5	แยกสารสีได้ 3 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลือง ส้ม และสีส้ม โดยสีเหลืองส้มมีสีส้มเข้ม ที่สุด และสีส้มในแถบสุดท้ายมีสีจางที่สุด

หมายเหตุ *TLC บนแผ่นเซลลูโลสฟลิกละเอียด (solvent front เป็น 5 เซนติเมตร)

4.2 การแยกสารสีที่กำจัด flavonols ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

การทำ TLC ของสารสีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงห้วรางเงิน รางทอง และรางนาก ซึ่งผ่านกระบวนการกำจัด flavonols โดยใช้ developing solvent ที่แยกสารสีได้ดีที่สุดจากผลการทดลองข้อ 4.1 คือ $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7 : 0.5$ พบว่าสามารถแยกสารสีได้เป็น 5 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลืองส้ม สีชมพู สีส้ม และสีเหลือง โดยมีค่า $R_f \times 100$ เป็น 53, 65, 72, 75 และ 81 ตามลำดับ (ภาพที่ 16) และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดดังแสดงในตารางที่ 5



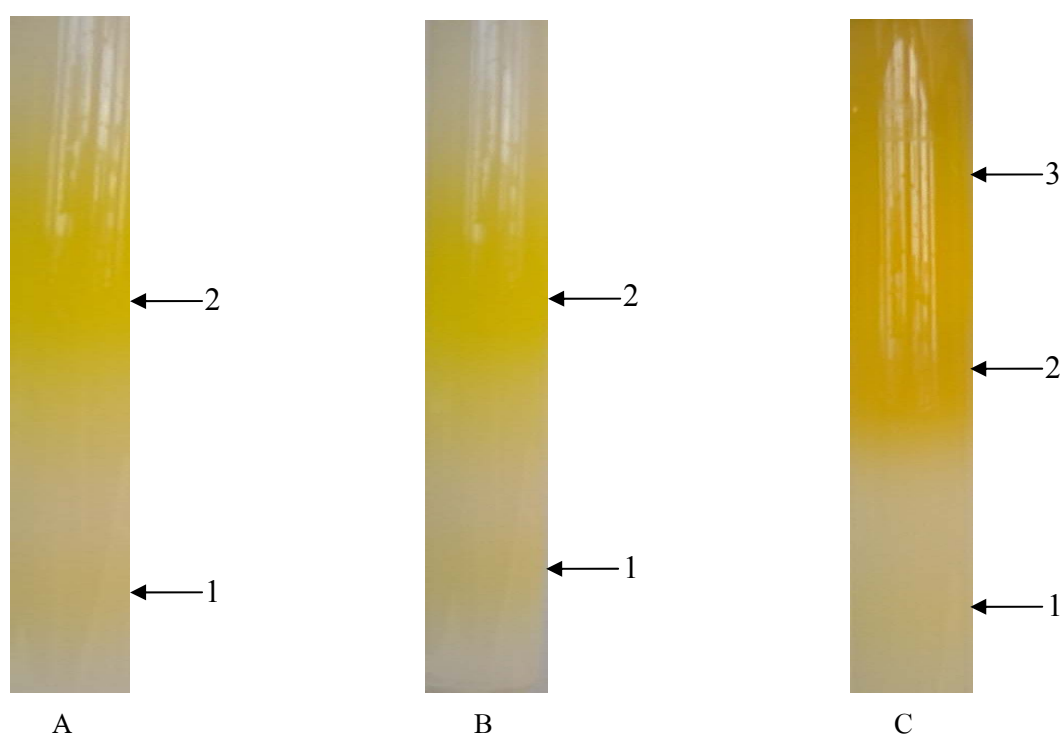
ภาพที่ 16 โครมาโตแกรมจากการทำ thin layer chromatography ของสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนาก ซึ่งผ่านกระบวนการกำจัด flavonols โดยใช้ $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7 : 0.5$ เป็น developing solvent

ตารางที่ 5 การดูดกลืนแสงของสารสีจากรางเงิน รางทอง และรายนาก ซึ่งผ่านกระบวนการกำจัด flavonols และทำ thin layer chromatography โดยใช้ $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7 : 0.5$ เป็น developing solvent

ตัวอย่าง	สีที่เกิดขึ้น	R _f x100	λ_{max} (nm)	A	λ_{max} (nm)	A
รางเงิน	เหลือง	53	469.5	0.073	398.5	0.061
	เหลืองส้ม	65	469.5	0.117	330	0.054
	ชมพู	72	472.5	0.053	420	0.049
	ส้ม	75	468	0.114	366.5	0.058
	เหลือง	81	468.5	0.082	383	0.049
รางทอง	เหลือง	53	468	0.063	409	0.049
	เหลืองส้ม	65	468	0.157	330	0.043
	ชมพู	72	473.5	0.046	426	0.043
	ส้ม	75	469	0.051	395.5	0.041
	เหลือง	81	468	0.057	391.5	0.047
รายนาก	เหลือง	53	468.5	0.058	404.5	0.051
	เหลืองส้ม	65	470	0.066	330	0.051
	ชมพู	72	470	0.058	419.5	0.054
	ส้ม	75	468.5	0.130	365.5	0.054
	เหลือง	81	468.5	0.67	383.5	0.053

4.3 การแยกสารสีด้วยวิธี Column Chromatography

ในการแยกสารสีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงห้วรวงเงิน รวงทอง และรวงนาก ด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ column ที่บรรจุ Sephadex LH20 และ solvent ที่ดีที่สุดจากผลการทดลองข้อ 4.1 คือ $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7 : 0.5$ พบว่าสามารถแยกสารสีได้เป็น 2, 2 และ 3 แถบตามลำดับ (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 column chromatography ของสารสีจาก A. รวงเงิน B. รวงทอง C. รวงนาก

โดยใช้ Sephadex LH20; $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7 : 0.5$

- A. 1 = แถบสีเหลือง 2 = แถบสีเหลือง
- B. 1 = แถบสีเหลือง 2 = แถบสีเหลือง
- C. 1 = แถบสีเหลือง 2 = แถบสีเหลืองส้ม 3 = แถบสีเหลืองส้ม

รวบรวมสารสีจากส่วนของแถบสีที่มี flavonols ปริมาณน้อยปนอยู่ใน anthocyanidin คือ แถบที่ 2 ของรวงเงิน แถบที่ 2 ของรวงทอง และแถบที่ 3 ของรวงนาก นำสารสีนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (ดาราที่ 6) พบว่าสารสีจากรวงเงิน รวงทอง และรวงนาก มีค่าการดูดกลืนแสง

$\lambda_{\max}$ 469, 468.5 และ 468.5 นาโนเมตรตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารสีในกลุ่ม anthocyanidin และ $\lambda_{\max}$ 360, 359.5 และ 360.5 นาโนเมตรตามลำดับซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารสีในกลุ่ม flavonoids ชนิดอื่นนอกจาก anthocyanidin

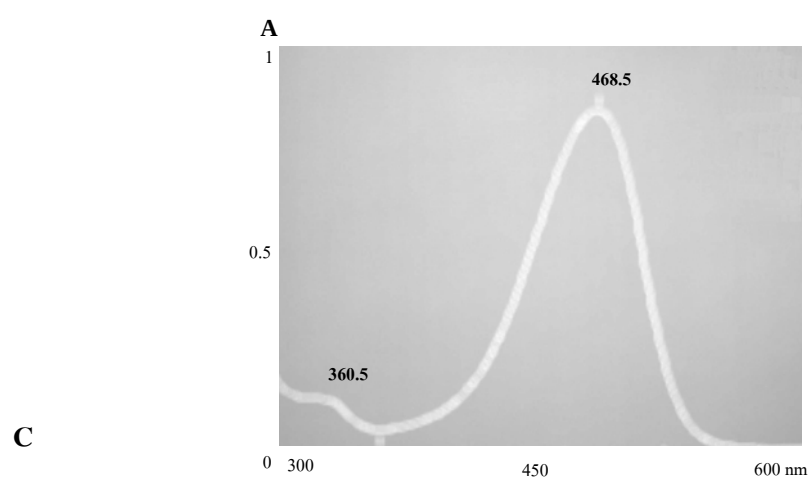
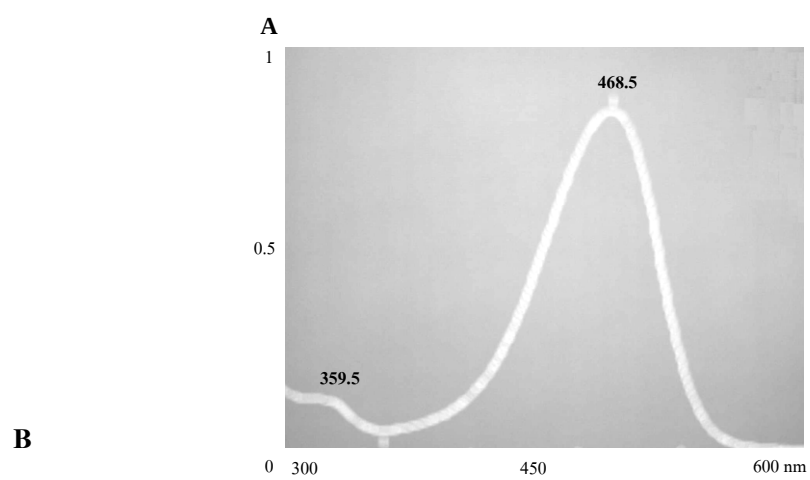
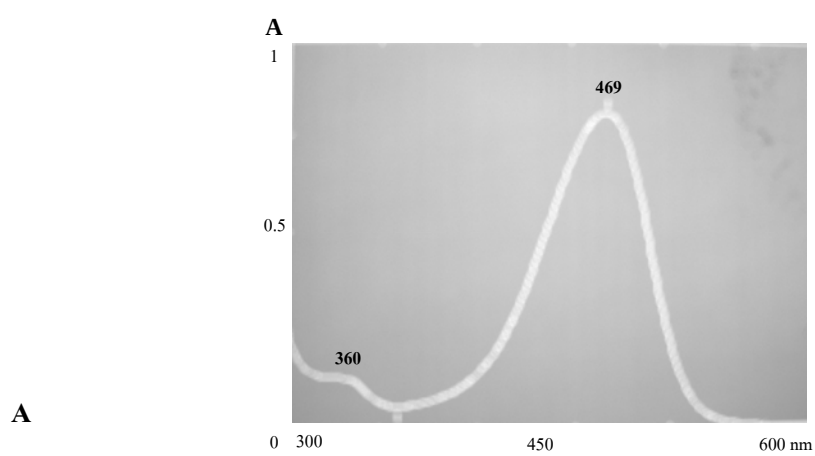
ตารางที่ 6 การดูดกลืนแสงของสารสีจากรางเงิน รางทอง และรายนาก ที่ได้จากการทำ column chromatography โดยใช้ Sephadex LH20; HCOOH : H₂O : HCl = 5 : 7 : 0.5

สารสี	แถบสี	$\lambda_{\max}$ (nm)	A	$\lambda_{\max}$ (nm)	A
รางเงิน	2	469	0.617	360	0.021
รางทอง	2	468.5	0.718	359.5	0.018
รายนาก	3	468.5	0.704	360.5	0.030

ในการทดลองหา developing solvent ที่เหมาะสมเพื่อแยกสารสีจากรางเงิน รางทอง และรายนากด้วยวิธี TLC ที่เคลือบแผ่นกระจกด้วย cellulose microcrystalline ของเจนจิรา (2548) พบว่า developing solvent ที่ประกอบด้วย HCOOH : H₂O : HCl ในอัตราส่วน 5 : 3 : 2 สามารถแยกสีออกจากกันได้ดีที่สุด งานวิจัยนี้จึงนำ developing solvent สูตรนี้มาปรับปรุงและลองแยกสารสีจากรายนากโดยการทำให้ column chromatography บรรจุ column ด้วย cellulose microcrystalline และปรับเปลี่ยนองค์ประกอบใน solvent ให้มีอัตราส่วนแตกต่างกันหลายสูตร พบว่า solvent ที่ดีที่สุดคือ HCOOH : H₂O : HCl เท่ากับ 5 : 4.5 : 0.5 ซึ่งสามารถแยกสารสีจากรายนากเป็น 3 แถบคือ สีเหลือง สีเหลืองส้ม และสีส้มในแถบที่ 3 มีค่าการดูดกลืนแสง $\lambda_{\max}$ 468.5 นาโนเมตร เป็นสาร anthocyanidins (Joseph *et al.*, 2004) A เท่ากับ 1.625 และ $\lambda_{\max}$ 359.5 นาโนเมตร เป็นสาร flavonoids ชนิดอื่นนอกจาก anthocyanidins (Markham, 1982) A เท่ากับ 0.3 ซึ่งได้ anthocyanidins ปริมาณน้อย จึงเปลี่ยนสารที่บรรจุใน column ใหม่เป็น cellulose microgranular ปรากฏว่าสามารถแยกสารสีจากรายนากเป็น 3 แถบ คือ สีเหลือง สีเหลืองส้ม และสีส้มในแถบที่ 3 มีค่าการดูดกลืนแสง $\lambda_{\max}$ 468 นาโนเมตร A เท่ากับ 0.583 และ $\lambda_{\max}$ 360 นาโนเมตร A เท่ากับ 0.037 การแยกสารสีวิธีนี้จึงยังไม่ได้ เนื่องจากมี anthocyanidins ปริมาณค่อนข้างน้อย (ข้อมูลไม่ได้แสดง) ดังนั้นจึงทดลองหา developing solvent ที่เหมาะสมในการแยกสารสีใหม่ด้วยวิธี TLC อีกครั้งโดยเลือก developing solvent จากการทำให้ column chromatography คือ HCOOH : H₂O : HCl เท่ากับ 5 : 4.5 : 0.5 และเพิ่ม

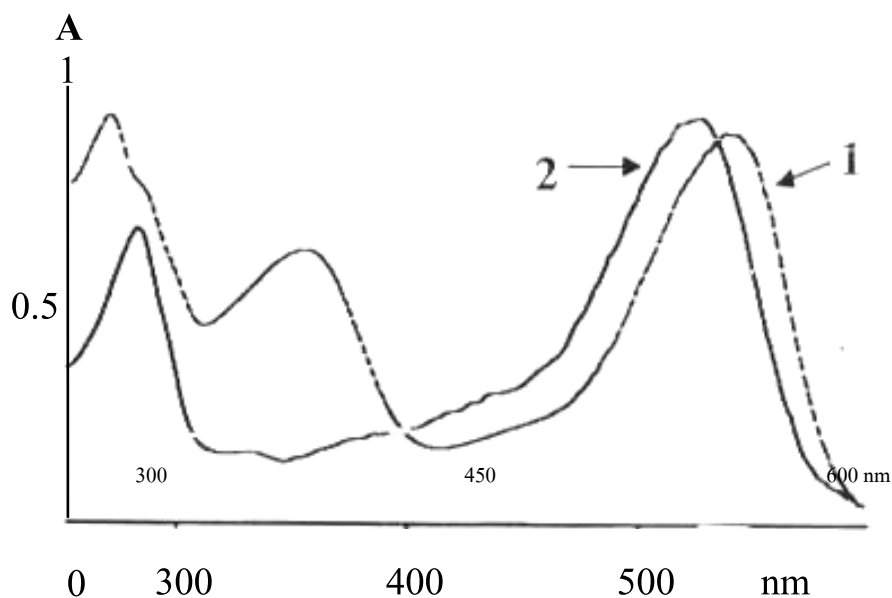
ความมีขั้วของ developing solvent โดยการเพิ่มอัตราส่วนของน้ำในส่วนผสมที่ละ 0.5 มิลลิลิตรตั้งแต่นิตที่ 1 ถึงนิตที่ 12 จากการทดลองพบว่า developing solvent นิตที่ 6 ที่มี $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl}$ ในอัตราส่วน 5 : 7 : 0.5 สามารถแยกสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากออกจากกันได้ดีที่สุดเป็น 3 แถบคือสีเหลือง สีเหลืองส้ม และสีส้ม (ภาพที่ 15 และตารางที่ 4) หลังจากนั้นทำ column chromatography โดยใช้ developing solvent นิตนี้และเปลี่ยนอนุภาคที่บรรจุใน column เป็น Sephadex LH20 (Byamukama *et al.*, 2006) ปรากฏว่าสามารถแยกสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากได้เป็น 2, 2 และ 3 แถบตามลำดับ ซึ่งได้ปริมาณ anthocyanidins มากขึ้น (ภาพที่ 17 และตารางที่ 6) การแยกสารสีด้วยวิธีนี้จึงให้ผลน่าพอใจ นำสารสีที่รวบรวมได้ไประเหย solvent ออกแล้วแบ่งสารสีแต่ละนิตเป็น 3 ส่วน จากนั้นละลายสารสีส่วนที่ 1 ด้วย 1 % HCl ใน MeOH และละลายส่วนที่ 2 ด้วย 1 % HCl ใน EtOH พบว่าสารสีจากรางเงินมีค่าการดูดกลืนแสง λ_{max} 475 และ 480.5 นาโนเมตร สารสีจากรางทองมีค่าการดูดกลืนแสง λ_{max} 476.5 และ 481.5 นาโนเมตร สารสีจากรางนากมีค่าการดูดกลืนแสง λ_{max} 477.5 และ 482.5 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงของสารสีทั้ง 3 นิตนี้มีค่าใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของ apigeninidin ที่เป็น anthocyanidins คือ 476 และ 483 นาโนเมตร (Harborne, 1988) เมื่อนำสารสีในส่วนที่ 3 มาละลายด้วย EtOH พบว่าค่าการดูดกลืนแสง λ_{max} ของสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากมีค่า 373, 372 และ 372 นาโนเมตรตามลำดับ ค่าการดูดกลืนแสงนี้มีค่าใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของ quercetin ที่เป็น flavonols คือ 373 นาโนเมตร (Geissman, 1962) สารสีที่รวบรวมได้นี้สามารถนำไประบุชนิดและโครงสร้างที่ถูกต้องด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS) และ nuclear magnetic resonance (NMR) ต่อไป

ในงานวิจัยนี้ทำการกำจัด flavonols ที่ปนอยู่ในสารสีโดยใช้ ethyl acetate ที่อิ่มตัวด้วยน้ำ (Heather *et al.*, 2003) แล้วนำผลที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี TLC และชุดแถบสีไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (ตารางที่ 5) พบว่าสารสีทั้ง 3 นิตแต่ละแถบมีค่า λ_{max} 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 มีค่าการดูดกลืนแสง λ_{max} 468-473.5 นาโนเมตรซึ่งเป็นสารในกลุ่ม anthocyanidins และช่วงที่ 2 มีค่าการดูดกลืนแสง λ_{max} 330-426 นาโนเมตรซึ่งเป็นสาร flavonoids นิตอื่นนอกจาก anthocyanidins (Markham, 1982) วิธีนี้จึงไม่สามารถกำจัดสารอื่นที่ปนอยู่ในสารสีออก สันนิษฐานว่า flavonols ที่ปนอยู่ในสารสีน่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้สารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากมีสีปรากฏออกมาแตกต่างกัน เนื่องจาก anthocyanin และ flavonol เกิดเป็น anthocyanin-flavonol complex (ภาพที่ 18) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fossen *et al.* (2000) (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 18 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของ anthocyanin-flavonol complex ในสารสีจาก

A. รางเงิน B. รางทอง C. รางนาก



ภาพที่ 19 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง UV-Visible ของ anthocyanin-flavonol complex

ใน Chives (*Allium schoenoprasu*) (Fossen *et al.*, 2000)

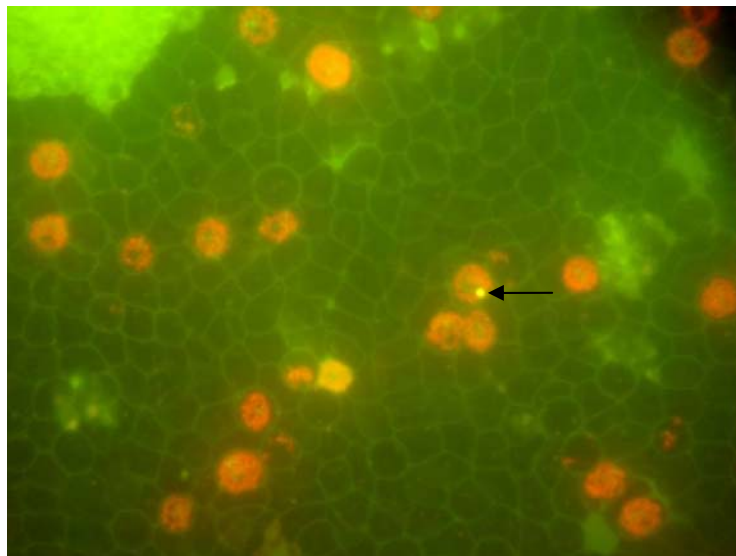
1. (cyanidin 3-*O*- β -glucoside)(kaempferol 3-*O*-(2-*O*- β -glucosyl- β -glucoside)-7-*O*- β -glucosiduronic acid) maonate
2. the anthocyanin cyanidin 3-*O*- β -glucoside

5. การทดสอบความเป็นพิษของสารสีด้วยการทดสอบไมโครนิวเคลียส (Micronucleus Test)

เมื่อศึกษา reticulocytes ของหนูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์จะเห็น reticulocyte มีสีแดงส้ม และไมโครนิวเคลียสมีสีเขียวเหลือง (ภาพที่ 20) หลังจากหนูได้รับสารสีจากรางเงิน รางทอง และ รางนาก ปริมาณ 1 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนู พบว่าจำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสหรือ micronucleated peripheral reticulocytes (MNRETs) ต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ ในหนูเพศผู้และหนูเพศเมียมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ และระยะเวลาที่สารสีอยู่ในร่างกายของหนูไม่มีผลต่อจำนวน MNRETs จากตารางที่ 7 จะเห็นว่าหลังจากหนูได้รับสารสีเป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หนูเพศผู้ที่ได้รับสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากมี MNRETs 1.938 ถึง 3.188, 2.643 ถึง 3.143 และ 2.938 ถึง 4.875 เซลล์ต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ตามลำดับ ส่วนหนู

เพศเมียมี MNRETs 2.625 ถึง 3.938, 2.188 ถึง 3.375 และ 2.438 ถึง 5.750 เซลล์ต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ตามลำดับ (ภาพที่ 21 และ 22) เมื่อเปรียบเทียบกับ propylene glycol (negative control) พบว่าจำนวน MNRETs มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญโดยหนูเพศผู้และหนูเพศเมียที่ได้รับ propylene glycol มี MNRETs 2.625 ถึง 5.375 และ 1.813 ถึง 3.375 เซลล์ต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ตามลำดับ ผลการทดลองนี้มีค่าใกล้เคียงกับที่ Wild (1988) ได้รายงานไว้ว่าโดยปกติหนูทดลองเกิด MNRETs ได้เองประมาณ 1.2 ถึง 4.1 เซลล์ต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ จึงอาจสรุปว่า สารสีจากรางเงินและรางทองที่ปริมาณ 1 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนูไม่มีผลต่อจำนวน MNRETs ในหนูเพศผู้และหนูเพศเมีย ส่วนสารสีจากรางนากนั้นการทดลองในหนูเพศผู้และหนูเพศเมียในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงจำนวน MNRETs ที่เกิดขึ้นมีค่าน้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับค่าที่เกิดขึ้นเองในหนูทดลอง ส่วนในระยะเวลา 96 ชั่วโมงนั้นถึงแม้จำนวน MNRETs มีค่ามากกว่าที่เกิดขึ้นเองในหนูทดลองก็ตาม แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าจำนวน MNRETs นี้แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ propylene glycol (negative control) กรณีของ MMC และ DMBA (positive control) นั้นในระยะเวลา 24 ชั่วโมง หนูเพศผู้และหนูเพศเมียมี MNRETs 14.688 (MMC), 12.500 (DMBA) และ 18.625 (MMC), 5.188 (DMBA) เซลล์ต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ตามลำดับ ในระยะเวลา 48 ชั่วโมงทั้งหนูเพศผู้และหนูเพศเมียมีจำนวน MNRETs มากที่สุด คือ 21.750 (MMC), 28.688 (DMBA) และ 26.313 (MMC), 34.438 (DMBA) เซลล์ต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าจำนวน MNRETs มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสีจากรางเงิน รางทอง รางนาก และ negative control อย่างไรก็ตามในระยะเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง ทั้งหนูเพศผู้และหนูเพศเมียมีจำนวน MNRETs ลดลงจนมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสารสีทั้ง 3 ชนิด และ negative control โดยในระยะเวลา 72 ชั่วโมง หนูเพศผู้และหนูเพศเมียมี MNRETs 3.063 (MMC), 3.688 (DMBA) และ 2.688 (MMC), 4.688 (DMBA) เซลล์ต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ตามลำดับ ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง หนูเพศผู้และหนูเพศเมียมี MNRETs 1.938 (MMC), 4.375 (DMBA) และ 1.938 (MMC), 3.188 (DMBA) เซลล์ต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ตามลำดับ การที่หนูได้รับสารก่อกลาย MMC และ DMBA แล้วพบ MNRETs จำนวนมากในระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และ MNRETs มีจำนวนลดลงในระยะเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงนี้อาจเนื่องจาก MNRETs ที่พบในระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงเต็มวัย reticulocyte ที่พบในระยะเวลา 72 และ 96 ชั่วโมงส่วนใหญ่จึงเป็น reticulocyte รุ่นใหม่ที่เพิ่งออกมาจากไขกระดูก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ทดสอบไมโครนิวเคลียสใน reticulocyte ของเลือดหนู (เจลิยว, 2540; เพียงใจและคณะ, 2540; Hara *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 1997)

จากตารางที่ 8 จะเห็นว่าค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรจำนวน MNRETs ในหนูที่ได้รับสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากในระยะเวลาต่างๆมีค่าน้อยแสดงว่า การเกิด MNRETs ในหนูแต่ละตัวมีจำนวนใกล้เคียงกัน สารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากมีองค์ประกอบหลักเป็นแอนโทไซยานินไม่มีผลในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการทดลองของ Erexson (2003) ที่ศึกษาความเป็นพิษและความปลอดภัยของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นและเปลือกองุ่นซึ่งมีสารพวกโปรแอนโทไซยานิน พบว่าไม่มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Yamakoshi *et al.* (2002) ที่ศึกษาความปลอดภัยของโปรแอนโทไซยานินจากผลองุ่นแล้วพบว่ามีความปลอดภัยในการใช้เป็นสีผสมอาหาร เจนจิรา (2548) รายงานว่าสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากที่ความเข้มข้น 0.3125-1.25, 0.3125-0.625 และ 0.01-0.2 มิลลิกรัมต่อเพลท ตามลำดับ ไม่มีฤทธิ์ก่อกลายต่อแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ทั้งสายพันธุ์ TA98 และ TA100 ทั้งในสถานะที่มีและไม่มี S-9 mix นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมคนในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงภายหลังได้รับสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากในระดับความเข้มข้น 0.3 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสีจากรางเงินก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมร้อยละ 2.00 และ 4.25 ตามลำดับ สารสีจากรางทองก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมร้อยละ 4.50 และ 8.25 ตามลำดับ และสารสีจากรางนากก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมร้อยละ 7.00 และ 11.50 ตามลำดับ ในขณะที่ negative control และ MMC ซึ่งเป็น positive control ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมร้อยละ 1.00 และ 30.09 ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากมากขึ้นมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์เม็ดเลือดขาวในระดับต่ำๆ แต่จากการทดสอบไมโครนิวเคลียสในหนูทดลองพบว่าสารสีจากรางเงิน รางทอง และรางนากไม่มีผลในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียส เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control ทั้งนี้เนื่องจากในร่างกายของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงมีกลไกมากมายที่จะรักษาซ่อมแซมและป้องกันเซลล์ต่างๆ โดยเฉพาะระบบกำจัดพิษ (detoxification) ซึ่งไม่มีในแบคทีเรียและเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพาะเลี้ยงในห้องทดลอง



ภาพที่ 20 ไมโครนิวเคลียสเป็นจุดกลมสีเขียวเหลือง (ลูกศรชี้) ใน reticulocyte สีแดงส้มที่ได้จาก
กระแสน้ำของหนูเมื่อฉีดด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

ตารางที่ 7 จำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ในหนู หลังจากได้รับสารสีจากรางเงิน รางทอง และรายนาก โดยเปรียบเทียบกับ mitomycin C และ DMBA (positive control), propylene glycol (negative control)

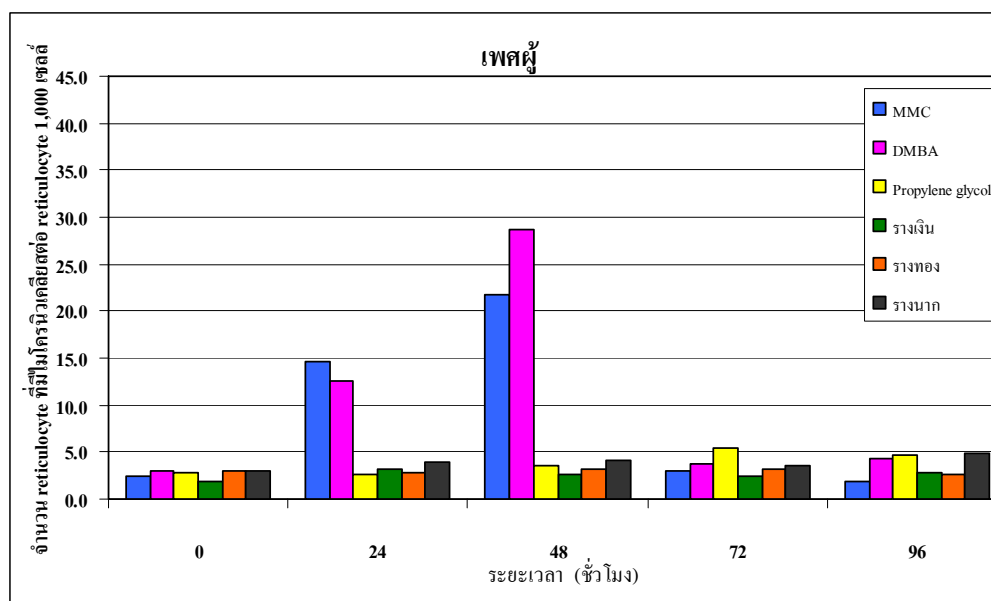
Treatment	จำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ หลังจากได้รับสารเป็นเวลา (ชม.)				
	0	24	48	72	96
Male					
mitomycin C	2.500±0.7071 ^a	14.688±2.5486 ^c	21.750±4.0356 ^b	3.063±1.2374 ^a	1.938±1.0155 ^a
DMBA	3.000±1.5811 ^a	12.500±4.8550 ^b	28.688±9.5167 ^c	3.688±1.6677 ^a	4.375±2.0310 ^a
propylene glycol	2.750±1.2247 ^a	2.625±1.3025 ^a	3.625±0.9161 ^a	5.375±1.3562 ^a	4.688±1.2800 ^a
รางเงิน	1.938±0.6781 ^a	3.188±0.5303 ^a	2.688±0.5303 ^a	2.375±1.0607 ^a	2.813±0.2588 ^a
รางทอง	3.000±0.6547 ^a	2.857±0.8997 ^a	3.143±1.5736 ^a	3.143±1.3452 ^a	2.643±1.5736 ^a
รายนาก	2.938±1.4745 ^a	3.875±1.4577 ^a	4.125±0.9910 ^a	3.649±1.5979 ^a	4.875±2.2480 ^a
Female					
mitomycin C	2.750±1.3093 ^a	18.625±2.4604 ^c	26.313±5.4898 ^b	2.688±1.9261 ^a	1.938±0.9797 ^a
DMBA	1.813±0.5303 ^a	5.188±2.2190 ^b	34.438±9.4470 ^c	4.688±3.3588 ^a	3.188±1.6243 ^a
propylene glycol	1.813±0.6512 ^a	2.313±1.0999 ^a	3.250±1.2817 ^a	3.375±1.3025 ^a	2.875±1.3025 ^a
รางเงิน	2.625±0.9543 ^a	2.750±1.3093 ^a	3.938±1.7204 ^a	3.000±0.9636 ^a	3.000±0.9258 ^a
รางทอง	2.188±0.8425 ^a	2.813±0.9234 ^a	3.375±1.0607 ^a	3.125±1.1573 ^a	2.500±0.9258 ^a
รายนาก	2.438±1.2082 ^a	3.125±1.8468 ^a	2.938±1.4501 ^a	3.375±1.9039 ^a	5.750±1.7321 ^a

ค่าในตาราง คือ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

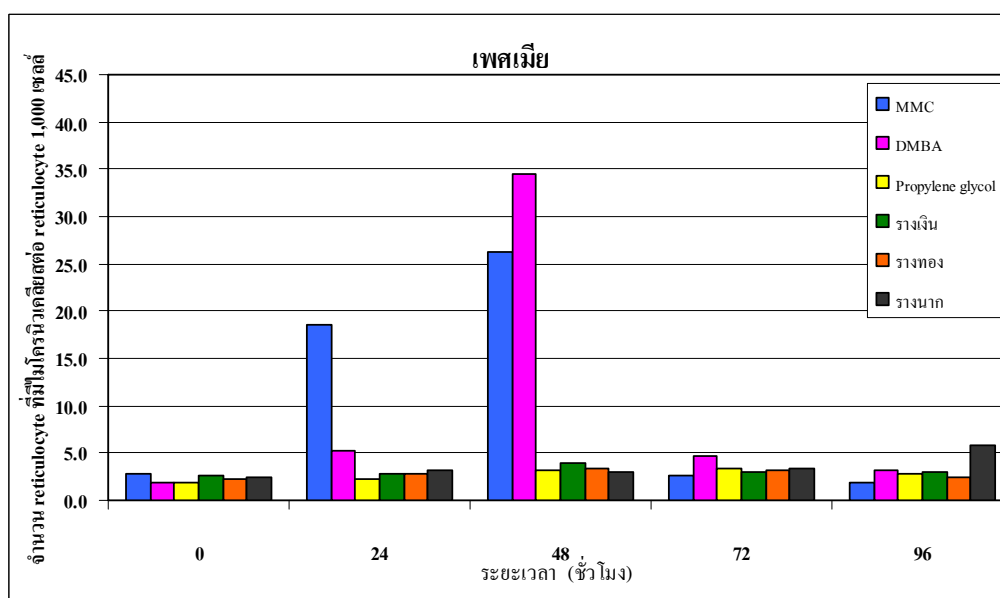
อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่นัยสำคัญทางสถิติ อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 8 ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) และสัมประสิทธิ์ความผันแปร (CV) ของจำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ ในหนูหลังจากได้รับสารสีจากรางเงิน รางทอง และรายนาก โดยเปรียบเทียบกับ mitomycin C และ DMBA (positive control), propylene glycol (negative control)

Treatment	จำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์ หลังจากได้รับสารเป็นเวลา (ชม.)									
	0		24		48		72		96	
	SE	CV	SE	CV	SE	CV	SE	CV	SE	CV
Male										
mitomycin C	0.2500	0.2828	0.9011	0.1735	1.4268	0.1855	0.4375	0.4039	0.5239	0.5239
DMBA	0.5590	0.5270	1.7165	0.3884	3.3647	0.3317	0.5896	0.4521	0.7181	0.4642
propylene glycol	0.4330	0.4453	0.4605	0.4961	0.3239	0.2527	0.4795	0.2523	0.4525	0.2730
รางเงิน	0.2397	0.3498	0.1875	0.1663	0.1875	0.1972	0.3750	0.4466	0.0915	0.0920
รางทอง	0.2315	0.2182	0.3401	0.3149	0.5948	0.5006	0.5084	0.4279	0.5948	0.5953
รายนาก	0.5213	0.5018	0.5154	0.3761	0.3504	0.2402	0.4623	0.4379	0.7948	0.4611
Female										
mitomycin C	0.4629	0.4761	0.8699	0.1321	1.9410	0.2086	0.6810	0.7165	0.3464	0.5055
DMBA	0.1875	0.2924	0.7845	0.4277	3.3400	0.2743	1.1875	0.7164	0.5743	0.5095
propylene glycol	0.2302	0.3591	0.3889	0.4755	0.4532	0.3943	0.4605	0.3859	0.4605	0.4530
รางเงิน	0.3374	0.3635	0.4629	0.4761	0.6083	0.4368	0.3407	0.3212	0.3273	0.3086
รางทอง	0.2979	0.3850	0.3265	0.3282	0.3750	0.3142	0.4092	0.3703	0.3273	0.3702
รายนาก	0.4272	0.4955	0.6529	0.5909	0.5127	0.4935	0.6731	0.5641	0.6124	0.3012



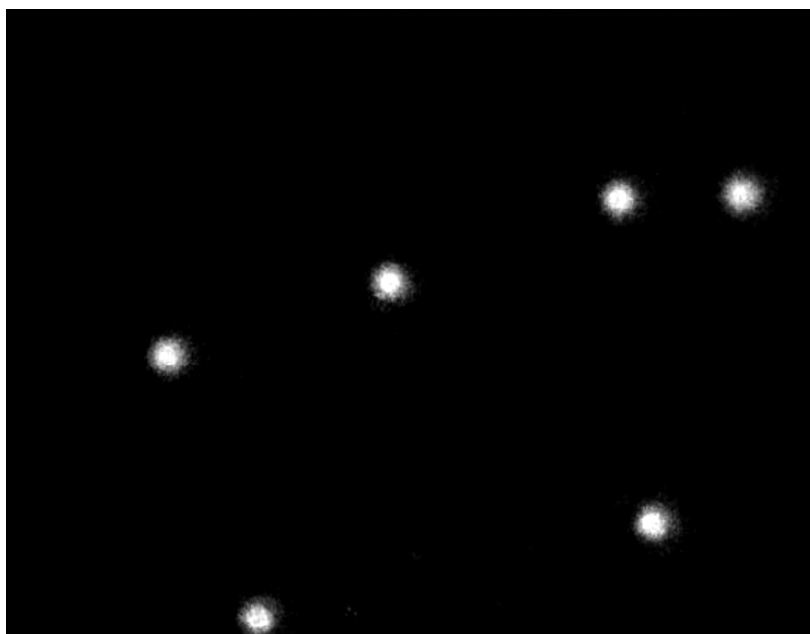
ภาพที่ 21 จำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์หลังจากหนูเพศผู้ได้รับ mitomycin C และ DMBA (positive control), propylene glycol (negative control), สารสีจากร้างเงิน, ร้างทอง และร้างนากเป็นระยะเวลาต่างๆ



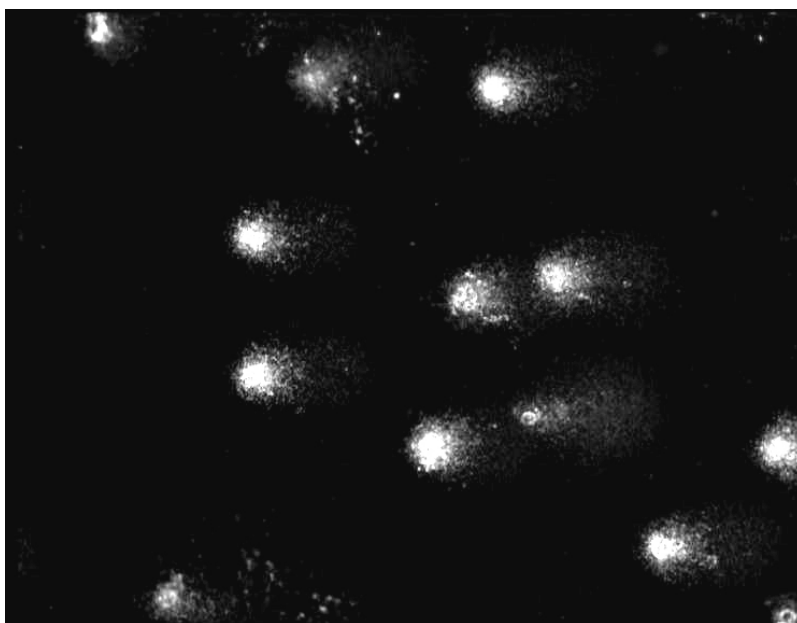
ภาพที่ 22 จำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์หลังจากหนูเพศเมียได้รับ mitomycin C และ DMBA (positive control), propylene glycol (negative control), สารสีจากร้างเงิน, ร้างทอง และร้างนากเป็นระยะเวลาต่างๆ

6. การทดสอบความเป็นพิษของสารสีด้วยการทดสอบโคเมท (Comet Assay)

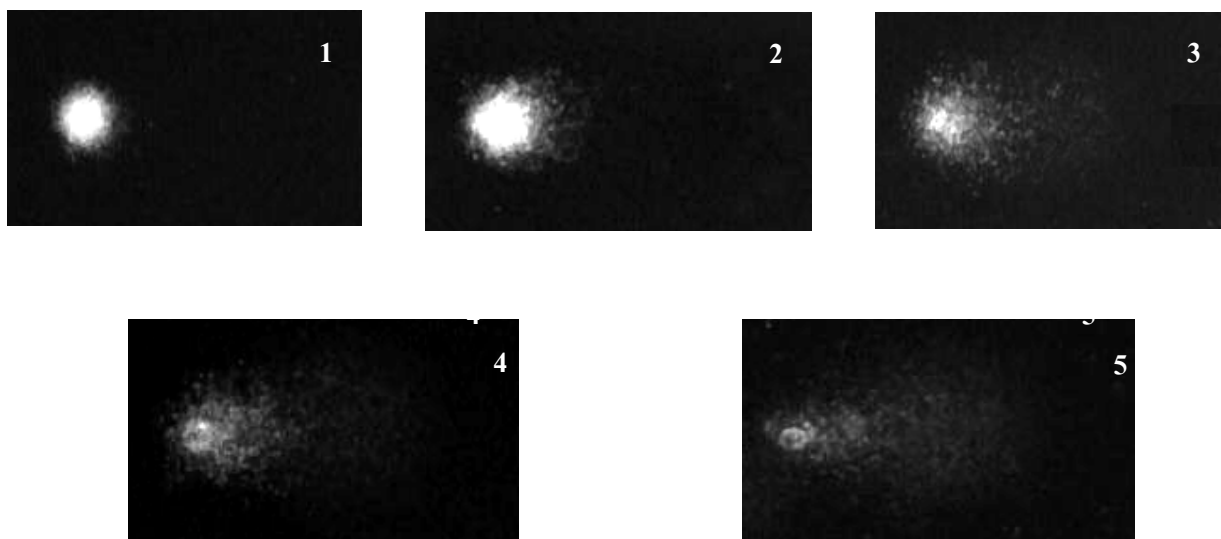
โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดสอบโคเมทนั้นมีหลายแบบ แต่ละโปรแกรมก็ให้ค่าตัวเลขจากการทดลองแตกต่างกัน สำหรับการทดลองนี้ได้วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Meta System ISS092 ซึ่งเป็นโปรแกรมที่นิยมใช้วิเคราะห์ความเสียหายของ DNA ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น หมู หนู และคน (Schaeferhenrich *et al.*, 2003; Zamorano *et al.*, 2004; Wanwisa *et al.*, 2006) ในการทดสอบโคเมทโดยใช้ตัวอย่างเลือดนั้น ตรวจวิเคราะห์โคเมทโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ หาบริเวณที่มีการกระจายของเซลล์พอดีด้วยกำลังขยาย 100 เท่าแล้วจึงวัดเซลล์ด้วยกำลังขยาย 400 เท่า โดยมีกล้องซีซีดีรับสัญญาณภาพและโปรแกรมแปลงสัญญาณออกทางจอคอมพิวเตอร์ (ภาพที่ 23 และ 24) จากนั้นคำนวณเส้นผ่าศูนย์กลางโคเมท ความยาวหางและโมเมนต์หาง ในการทดลองนี้พบความเสียหายของ DNA เป็น 5 ระดับ โดยแบ่งตามค่าโมเมนต์หางและรูปร่างของเซลล์โคเมท (ภาพที่ 25) โมเมนต์หางมีค่าน้อยกว่า 2 จัดว่า DNA ไม่เสียหาย (เซลล์โคเมทแบบที่ 1) โมเมนต์หางมีค่าเท่ากับ 2 หรือมากกว่า จัดว่า DNA เสียหาย (เซลล์โคเมทแบบที่ 2, 3, 4 และ 5) ถ้าโมเมนต์หางมีค่ามากกว่า 30 จัดเป็นเซลล์ apoptotic (Genghini *et al.*, 2006)



ภาพที่ 23 ลิ้มโฟลด์ที่ไม่มีหาง เมื่อเชื่อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์และดูใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 400 X



ภาพที่ 24 ลิมโฟไซต์ที่มีหาง (comet tail) เมื่อเชื่อมด้วยเอซิเดียม โบรไมด์และดูใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ กำลังขยาย 400 X



ภาพที่ 25 ระดับความเสียหายของ DNA ที่เพิ่มขึ้นของเซลล์โคเมทเมื่อลิมโฟไซต์ได้รับสารก่อกลาย

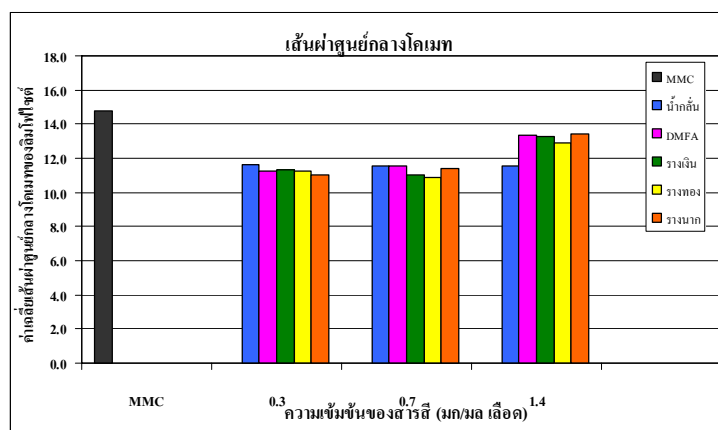
เมื่อทรีตด้วยสารต่างๆ ได้แก่ mitomycin C (positive control) น้ำกลั่น (negative control) dimethylformamide (solvent control) สารสีจากรางเงิน รางทอง และรากนกความเข้มข้น 0.3, 0.7 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด ได้คำนวณเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมท ความยาวหางและโมเมนต์หางของเซลล์โคเมทความเข้มข้นละ 100 เซลล์จากอาสาสมัคร 1 คน รวมทั้งหมด 400 เซลล์จากอาสาสมัครทั้ง 4 คน ซึ่งเป็นผู้ชาย 2 คน และผู้หญิง 2 คน (ตารางที่ 9 และ ภาพที่ 26) หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลทางสถิติของเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมท (ตารางที่ 10-19) ความยาวหาง (ตารางที่ 20-29) และโมเมนต์หาง (ตารางที่ 30-39)

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมท ความยาวหาง และ โมเมนต์หางของลิมโฟไซต์ในอาสาสมัครทั้งหมดซึ่งทรีตด้วยสารสีความเข้มข้น 0.3, 0.7 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

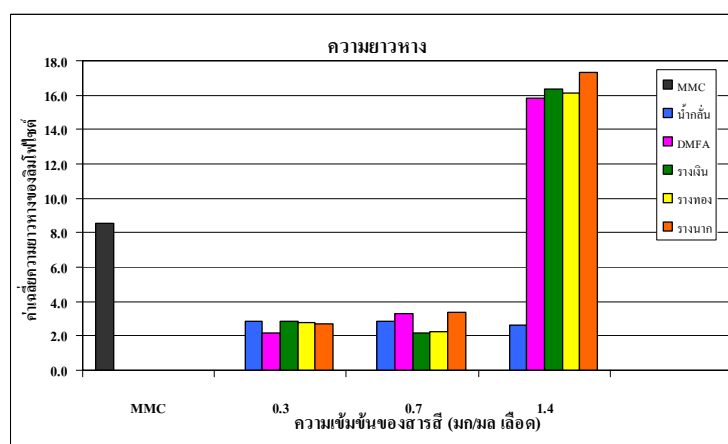
	สารที่ทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางโคเมท	ความยาวหาง	โมเมนต์หาง
1.	positive control (MMC 0.5 µg/ml)	14.7617±2.59592	8.5405±9.16006	2.4051±4.21739
2.	negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 µl)	11.6537±1.12923	2.8130±1.95527	0.2364±0.27488
3.	solvent control-1 (DMFA 1.5 µl)	11.2244±1.04724	2.1830±1.39584	0.2068±0.29076
4.	สารสีรางเงิน 0.3 mg/ml	11.3463±1.47314	2.8862±1.89048	0.2603±0.27085
5.	สารสีรางทอง 0.3 mg/ml	11.2586±1.04955	2.8101±1.89706	0.2464±0.26514
6.	สารสีรางนก 0.3 mg/ml	11.0012±1.25653	2.7199±2.19838	0.2517±0.38771
7.	negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 µl)	11.5362±1.05628	2.8703±1.50028	0.3012±0.32510
8.	solvent control-2 (DMFA 3.5 µl)	11.5340±1.08408	3.2690±2.48389	0.3875±0.65995
9.	สารสีรางเงิน 0.7 mg/ml	11.0468±1.04302	2.1968±2.20465	0.2599±0.82050
10.	สารสีรางทอง 0.7 mg/ml	10.8474±0.97325	2.2155±2.22422	0.2556±1.12054
11.	สารสีรางนก 0.7 mg/ml	11.4257±1.08805	3.4017±2.91183	0.3888±1.20778
12.	negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 µl)	11.5297±1.10637	2.5991±1.59041	0.2711±0.33774
13.	solvent control-3 (DMFA 7.5 µl)	13.3647±2.48764	15.8565±9.41128	5.9413±6.34462
14.	สารสีรางเงิน 1.4 mg/ml	13.3161±3.09639	16.3778±9.23786	6.0278±5.92040
15.	สารสีรางทอง 1.4 mg/ml	12.8949±2.55255	16.1312±9.13764	6.0870±5.87294
16.	สารสีรางนก 1.4 mg/ml	13.3862±2.68697	17.3371±8.78100	7.1297±6.51454

ค่าในตาราง คือ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

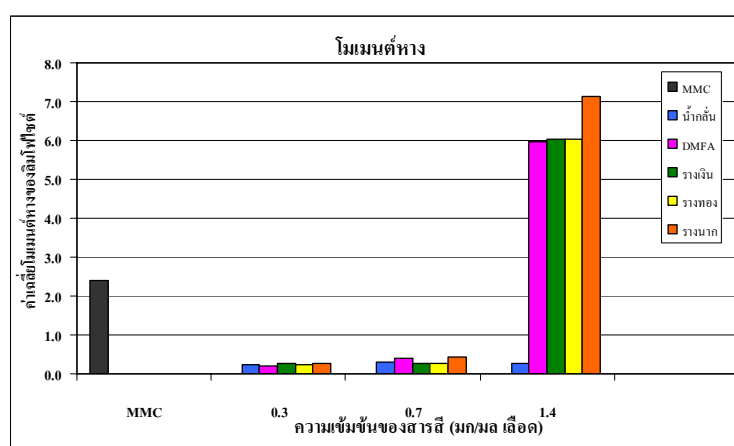
A



B



C



ภาพที่ 26 ระดับความเสียหายของ DNA ในลิมโฟไซต์ของคนเมื่อได้รับสารสีจากรางเงิน รังทอง และรังนากความเข้มข้นระดับต่างๆ

A. เส้นผ่าศูนย์กลางโคเมท B. ความยาวหาง และ C. โมเมนต์หาง

1. เส้นผ่านศูนย์กลางโคเมท

สารสีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด (ตารางที่ 10-12) ทั้งร่างเงิน ร่างทอง และ รานาก มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทในอาสาสมัครทั้งหมด อาสาสมัครผู้ชายและอาสาสมัครผู้หญิง แตกต่างจาก solvent control อย่างไม่มีนัยสำคัญ และมีค่าแตกต่างจาก negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญเฉพาะในอาสาสมัครผู้ชายเท่านั้น แต่แตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญในอาสาสมัครทั้งหมดและอาสาสมัครผู้หญิง

สารสีความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด (ตารางที่ 13-15) ร่างเงิน และร่างทอง มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทในอาสาสมัครทั้งหมดแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนรานากมีค่าแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ ในอาสาสมัครผู้ชายนั้น ร่างเงินและร่างทองมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทแตกต่างจาก solvent control อย่างมีนัยสำคัญ โดยร่างเงินมีค่าแตกต่างจาก negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ ในขณะที่ร่างทองมีค่าแตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนรานากมีค่าแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ สำหรับอาสาสมัครผู้หญิงนั้น ร่างเงินและร่างทองมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนรานากมีค่าแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ

สารสีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด (ตารางที่ 16-18) ทั้งร่างเงิน ร่างทอง และ รานากมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทในอาสาสมัครทั้งหมดและอาสาสมัครผู้หญิงแตกต่างจาก solvent control อย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในอาสาสมัครผู้ชายนั้น ร่างเงินและรานากมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทแตกต่างจาก solvent control อย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ร่างทองมีค่าแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างมีนัยสำคัญ

จากตารางที่ 19 พบว่า positive control (MMC 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทในอาสาสมัครทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาอันดับ 2 คือ solvent control-3 (DMFA 7.5 ไมโครลิตร) รองลงมาอันดับ 3 คือ negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 ไมโครลิตร) ทั้งนี้ solvent control-1 (DMFA 1.5 ไมโครลิตร) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทน้อยที่สุด ส่วน negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 ไมโครลิตร) negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 ไมโครลิตร) และ solvent control-2 (DMFA 3.5 ไมโครลิตร) มีค่าอยู่ระหว่าง negative control-1 และ solvent control-1 หรืออาจกล่าวได้ว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ solvent control-3 ที่เป็น DMFA 7.5 ไมโครลิตรเป็น

พิษต่อลิมโฟไซต์ แต่ก็ยังน้อยกว่า positive control ส่วน solvent control ที่เป็น DMFA 1.5 และ 3.5 ไมโครลิตรไม่เป็นพิษต่อลิมโฟไซต์เช่นเดียวกับน้ำกลั่นที่เป็น negative control ดังนั้นการที่สารสีจากรางเงิน รางทอง และรายนาก ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดในอาสาสมัครทั้งหมด อาสาสมัครผู้ชายและอาสาสมัครผู้หญิง (ตารางที่ 16-18) มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคเมทน้อยกว่า และแตกต่างจาก solvent control-3 อย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่มีค่ามากกว่าและแตกต่างจาก negative control-3 อย่างมีนัยสำคัญนั้น จึงอาจสรุปว่าความเสียหายของ DNA หรือความเป็นพิษต่อลิมโฟไซต์น่าจะเกิดจาก solvent เพียงอย่างเดียว

2. ความยาวหาง

สารสีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด (ตารางที่ 20-22) ทั้งรางเงิน รางทอง และรายนาก มีค่าเฉลี่ยความยาวหางในอาสาสมัครทั้งหมด อาสาสมัครผู้ชายและอาสาสมัครผู้หญิง แตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ

สารสีความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด (ตารางที่ 23-25) รางเงิน และรางทอง มีค่าเฉลี่ยความยาวหางในอาสาสมัครทั้งหมดแตกต่างจาก solvent control อย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจาก negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนรายนากมีค่าแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ ในอาสาสมัครผู้ชายนั้น รางเงินและรายนากมีค่าเฉลี่ยความยาวหางแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ ในขณะที่รางทองมีค่าแตกต่างจาก solvent control อย่างมีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจาก negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ สำหรับอาสาสมัครผู้หญิง ทั้งรางเงิน รางทอง และรายนากมีค่าเฉลี่ยความยาวหางแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ

สารสีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด (ตารางที่ 26-28) ทั้งรางเงิน รางทอง และรายนากมีค่าเฉลี่ยความยาวหางในอาสาสมัครทั้งหมดและอาสาสมัครผู้ชายแตกต่างจาก solvent control อย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ทั้งรางเงิน รางทอง และรายนากมีค่าเฉลี่ยความยาวหางในอาสาสมัครผู้หญิงแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างมีนัยสำคัญ

จากตารางที่ 29 พบว่า solvent control-3 (DMFA 7.5 ไมโครลิตร) มีค่าเฉลี่ยความยาวหางในอาสาสมัครทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาอันดับ 2 คือ positive control (MMC 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด) รองลงมาอันดับ 3 คือ solvent control-2 (DMFA 3.5 ไมโครลิตร) ทั้งนี้ solvent control-1 (DMFA 1.5 ไมโครลิตร) มีค่าเฉลี่ยความยาวหางน้อยที่สุด ส่วน negative control-1

(น้ำกลั่น 1.5 ไมโครลิตร) negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 ไมโครลิตร) และ negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 ไมโครลิตร) มีค่าอยู่ระหว่าง solvent control-1 และ solvent control-2 หรืออาจกล่าวได้ว่าแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ solvent control-3 ที่เป็น DMFA 7.5 ไมโครลิตรเป็นพิษต่อลิมโฟไซต์มากกว่า positive control ส่วน solvent control ที่เป็น DMFA 1.5 และ 3.5 ไมโครลิตรไม่เป็นพิษต่อลิมโฟไซต์เช่นเดียวกับน้ำกลั่นที่เป็น negative control ดังนั้นการที่สารสีจากรางเงิน รางทอง และ รางนาก ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดในอาสาสมัครทั้งหมดและอาสาสมัครผู้ชาย (ตารางที่ 26 และ 27) มีค่าเฉลี่ยความยาวหางแตกต่างจาก solvent control-3 อย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่มีค่ามากกว่าและแตกต่างจาก negative control-3 อย่างมีนัยสำคัญนั้น จึงอาจสรุปว่า ความเสียหายของ DNA หรือความเป็นพิษต่อลิมโฟไซต์น่าจะเกิดจาก solvent เพียงอย่างเดียว สำหรับสารสีจากรางเงิน รางทอง และ รางนาก ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดในอาสาสมัครผู้หญิง (ตารางที่ 28) มีค่าเฉลี่ยความยาวหางมากกว่าและแตกต่างจาก solvent control-3 และ negative control-3 อย่างมีนัยสำคัญนั้นอาจสรุปว่า ความเสียหายของ DNA หรือความเป็นพิษต่อลิมโฟไซต์น่าจะเกิดจาก solvent และสารสี

3. โมเมนต์หาง

สารสีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด (ตารางที่ 30-32) ทั้งรางเงิน รางทอง และ รางนาก มีค่าเฉลี่ยโมเมนต์หางในอาสาสมัครทั้งหมด อาสาสมัครผู้ชายและอาสาสมัครผู้หญิง แตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ

สารสีความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด (ตารางที่ 33-35) ทั้งรางเงิน รางทอง และ รางนาก มีค่าเฉลี่ยโมเมนต์หางในอาสาสมัครทั้งหมด อาสาสมัครผู้ชาย และอาสาสมัครผู้หญิง แตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ

สารสีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด (ตารางที่ 36-38) รางเงิน และรางทองมีค่าเฉลี่ยโมเมนต์หางในอาสาสมัครทั้งหมดแตกต่างจาก solvent control อย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนรางนากมีค่าแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างมีนัยสำคัญ ในอาสาสมัครผู้ชายนั้น ทั้งรางเงิน รางทอง และรางนากมีค่าเฉลี่ยโมเมนต์หางแตกต่างจาก solvent control อย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่แตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับอาสาสมัครผู้หญิง ทั้งรางเงิน รางทอง และรางนากมีค่าเฉลี่ยโมเมนต์หาง แตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างมีนัยสำคัญ

จากตารางที่ 39 พบว่า solvent control-3 (DMFA 7.5 ไมโครลิตร) มีค่าเฉลี่ยโมเมนต์ทางในอาสาสมัครทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาอันดับ 2 คือ positive control (MMC 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด) ทั้ง solvent control-3 และ positive control มีค่าเฉลี่ยโมเมนต์ทางแตกต่างจาก control อื่นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 ไมโครลิตร) negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 ไมโครลิตร) negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 ไมโครลิตร) solvent control-1 (DMFA 1.5 ไมโครลิตร) และ solvent control-2 (DMFA 3.5 ไมโครลิตร) มีค่าเฉลี่ยโมเมนต์ทางน้อยและแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ solvent control-3 ที่เป็น DMFA 7.5 ไมโครลิตรเป็นพิษต่อลิพโซมมากกว่า positive control ส่วน solvent control ที่เป็น DMFA 1.5 และ 3.5 ไมโครลิตรไม่เป็นพิษต่อลิพโซมเช่นเดียวกับน้ำกลั่นที่เป็น negative control ดังนั้นการที่สารสีจากรางเงิน และรางทอง ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดในอาสาสมัครทั้งหมด (ตารางที่ 36) และสารสีจากรางเงิน รางทองและรายนากความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดในอาสาสมัครผู้ชาย (ตารางที่ 37) มีค่าเฉลี่ยโมเมนต์ทางแตกต่างจาก solvent control-3 อย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่มีค่ามากกว่าและแตกต่างจาก negative control-3 อย่างมีนัยสำคัญนั้น จึงอาจสรุปว่า ความเสียหายของ DNA หรือความเป็นพิษต่อลิพโซมน่าจะเกิดจาก solvent เพียงอย่างเดียว ส่วนสารสีจากรายนากความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดในอาสาสมัครทั้งหมด (ตารางที่ 36) และสารสีจากรางเงิน รางทอง และรายนากความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดในอาสาสมัครผู้หญิง (ตารางที่ 38) มีค่าเฉลี่ยโมเมนต์ทางมากกว่าและแตกต่างจาก solvent control-3 และ negative control-3 อย่างมีนัยสำคัญนั้น อาจสรุปว่า ความเสียหายของ DNA หรือความเป็นพิษต่อลิพโซมน่าจะเกิดจาก solvent และสารสี

จากการทรีตเลือดด้วยสารสีจากรางเงิน รางทอง และรายนาก ความเข้มข้น 0.3, 0.7 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบโคเมทและพิจารณาพารามิเตอร์ 3 ค่า คือ เส้นผ่าศูนย์กลางโคเมท ความยาวหาง และโมเมนต์หาง เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารสีจากความเสียหายของ DNA พบว่าสารสีจากรางเงิน รางทอง และรายนาก ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดเป็นพิษต่อลิพโซมในอาสาสมัครผู้หญิง โดยมีค่าเฉลี่ย ความยาวหาง และโมเมนต์หางของเซลล์โคเมทมากกว่าและแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่เป็นพิษต่อลิพโซมในอาสาสมัครผู้ชาย เมื่อศึกษาทั้งผู้ชายและผู้หญิง รวมกันก็ปรากฏว่าในอาสาสมัครทั้งหมดมีเพียงสารสีจากรายนากความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดเท่านั้นที่เป็นพิษต่อลิพโซมโดยมีค่าเฉลี่ยโมเมนต์หางของเซลล์โคเมทมากกว่าและแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการทดลองอื่นๆในงานวิจัยนี้สารสีไม่เป็นพิษต่อลิพโซม ผู้หญิงมีการตอบสนองต่อสารสีไวและ

แสดงความเป็นพิษของสารสีออกมาได้มากกว่าผู้ชายเนื่องจาก อายุ เพศ และกิจวัตรประจำวันของอาสาสมัคร มีผลต่อกระบวนการซ่อมแซม DNA หลังจากได้รับสาร (Singh *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1991; Hartmann *et al.*, 1994) ในการทดลองพบว่าสารสีจากรงนกเป็นพิษมากกว่าสารสีจากรางเงินและรางทอง (ตารางที่ 28, 36 และ 38) การที่สารสีจากรางเงินและรางทอง ความเข้มข้น 0.3, 0.7 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด รงนกความเข้มข้น 0.3 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด ไม่เหนี่ยวนำให้ DNA เกิดความเสียหาย จึงน่าจะพัฒนาสารสีเหล่านี้เป็นสีผสมอาหารได้ คนปกติได้รับสีผสมอาหารวันละ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (จูไรรัตน์, 2537) ความเข้มข้นของสารสีที่ใช้ในการทดลองนี้มีค่ามากกว่าปริมาณสารสีที่คนปกติได้รับในแต่ละวัน ดังนั้นสารสีจากรงนกความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด เป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าปกติมากและเซลล์เม็ดเลือดขาวสัมผัสกับสารสีโดยตรงจนทำให้ DNA เกิดความเสียหาย ในขณะที่ความเข้มข้นระดับต่ำกว่านี้ไม่มีผลต่อ DNA นอกจากนี้ร่างกายของคนก็มีระบบการกำจัดพิษ (detoxification) ด้วยวิธีการต่างๆ ดังเห็นได้จากผลการทดลองที่ทดสอบความเป็นพิษของสารสีด้วยการทดสอบไมโครนิวเคลียสในหนู (ตารางที่ 7) ที่ป้อนสารสีให้หนู 1 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวแล้วสารสียังมีความปลอดภัย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Azevedo (2003) ที่รายงานว่าแอนโธไซยานินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในถั่วดำไม่เหนี่ยวนำให้ DNA เกิดความเสียหาย แอนโธไซยานินในพืชชนิดต่างๆยังมีบทบาทในการป้องกันความเสียหายของ DNA ดังการทดลองของ Lazze (2003) ที่รายงานว่าแอนโธไซยานินป้องกัน DNA ไม่ให้เสียหายในกล้ามเนื้อเรียบ และ hepatoma cell ของหนูที่ได้รับ tert-butyl-hydroperoxide โดยใช้ delphinidin (DP), delphinidin-3-glycoside (D3G), delphinidin-3-rutinoside (D3R) และ cyanidin-3-rutinoside (C3R) พบว่า DP สามารถป้องกันความเสียหายของ DNA ได้มากที่สุดคือ 40-50 เปอร์เซ็นต์ทั้งในกล้ามเนื้อเรียบ และ hepatoma cell ส่วน D3G, D3R และ C3R ป้องกันความเสียหายของ DNA ได้ 20-30 เปอร์เซ็นต์ แอนโธไซยานินป้องกัน DNA ไม่ให้เกิดความเสียหายโดยการกำจัดอนุมูลอิสระ Russo (2005) รายงานว่าแอนโธไซยานิดิน cyanidin 3-O-β-D-glucoside (C3G) ป้องกัน DNA ที่ได้รับ Ochratoxin A (OTA) จากเชื้อรา *Aspergillus ochraceus* ได้เนื่องจาก C3G สามารถต้านการเกิดอนุมูลอิสระ procyanidins ที่สกัดจากเมล็ดองุ่นมีคุณสมบัติลดอนุมูลอิสระ ลดความเสียหายของ DNA เมื่อเซลล์ได้รับสารก่อกลาย ช่วยป้องกันโรคและความอ่อนเพลีย (Aldini *et al.*, 2003; Shafiee *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003; Llopiz *et al.*, 2004)

ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสีด้วยการทดสอบโคเมทนี้ได้ใช้พารามิเตอร์ 3 ค่า คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคเมท ความยาวหาง และโมเมนต์หางมาวิเคราะห์ผล พบว่าค่าความยาวหางและค่าโมเมนต์หาง มีความไวและละเอียดในการตรวจสอบมากกว่าค่าเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมท ทำให้ตรวจ

พบความเป็นพิษของสารสีที่ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดได้ ในขณะที่ค่า
เส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทตรวจไม่พบความเป็นพิษของสารสีเลย ในการทดสอบโคเมทจึงควรใช้
พารามิเตอร์หลายค่ามาช่วยในการสรุปผลมีความถูกต้องมากขึ้น การทดลองนี้ได้เลือก
dimethylformamide (DMFA) เป็นตัวทำละลายสารสีเนื่องจาก DMFA เป็นตัวทำละลายชนิดหนึ่ง
นิยมใช้ในงานด้านทดสอบความเป็นพิษและสามารถละลายสารสีได้ดี จากตารางที่ 19, 29 และ 39
พบว่า DMFA 1.5 และ 3.5 ไมโครลิตรที่ใช้ละลายสารสีความเข้มข้น 0.3 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อ
มิลลิลิตรเลือดตามลำดับนั้นไม่เป็นพิษต่อลิมโฟไซต์โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมท ความยาว
หาง และโมเมนต์หางแตกต่างจาก negative control (น้ำกลั่น 1.5 และ 3.5 ไมโครลิตร ตามลำดับ)
อย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วน DMFA ปริมาณมากขึ้นเป็น 7.5 ไมโครลิตรที่ใช้ละลายสารสีความเข้มข้น
1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดนั้น จะเป็นพิษต่อลิมโฟไซต์โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมท
ความยาวหาง และโมเมนต์หางแตกต่างจาก negative control (น้ำกลั่น 7.5 ไมโครลิตร) อย่างมี
นัยสำคัญ DMFA มีความเป็นพิษและเป็นสารก่อกลายใน cell line บางชนิด นอกจากนี้ยังเป็น
อันตรายต่อดับ ไต ปอดในสัตว์ทดลอง (Koudela 1979; Spazier 1981; Bethesda, 1993)

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคเมทของลิมโฟไซต์ในอาสาสมัครทั้งหมดซึ่งทรีตด้วยสารสี
ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	14.7617 ^d	2.59592	0.12980
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 μl)	11.6537 ^c	1.12923	0.05618
solvent control-1 (DMFA 1.5 μl)	11.2244 ^{ab}	1.04724	0.05236
สารสีรางเงิน 0.3 mg/ml	11.3463 ^b	1.47314	0.07366
สารสีรางทอง 0.3 mg/ml	11.2586 ^{ab}	1.04955	0.07412
สารสีรางนาก 0.3 mg/ml	11.0012 ^a	1.25653	0.08885

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคเมทของลิมโฟไซต์ในอาสาสมัครผู้ชายซึ่งทรีตด้วยสารสี
ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	14.7277 ^b	2.35222	0.16633
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 μl)	11.4927 ^a	1.05777	0.07480
solvent control-1 (DMFA 1.5 μl)	11.3912 ^a	1.06985	0.07565
สารสีรางเงิน 0.3 mg/ml	11.5106 ^a	1.39352	0.09854
สารสีรางทอง 0.3 mg/ml	11.4666 ^a	0.97202	0.06873
สารสีรางนาก 0.3 mg/ml	11.1781 ^a	1.33190	0.09418

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทของลิมโฟไซต์ในอาสาสมัครผู้หญิงซึ่งทรีดด้วยสารสี
ความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	14.7958 ^c	2.82440	0.19972
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 μl)	11.8146 ^b	1.20125	0.08494
solvent control-1 (DMFA 1.5 μl)	11.0577 ^a	0.99924	0.07066
สารสีรางเงิน 0.3 mg/ml	11.1820 ^a	1.13037	0.07993
สารสีรางทอง 0.3 mg/ml	11.0505 ^a	1.12709	0.07970
สารสีรางนาก 0.3 mg/ml	10.8243 ^a	1.18116	0.08352

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทของลิมโฟไซต์ในอาสาสมัครทั้งหมดซึ่งทรีดด้วยสารสี
ความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	14.7617 ^c	2.59592	0.12980
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 μl)	11.5362 ^b	1.05628	0.05230
solvent control-2 (DMFA 3.5 μl)	11.5340 ^b	1.08408	0.05760
สารสีรางเงิน 0.7 mg/ml	11.0468 ^a	1.04302	0.05648
สารสีรางทอง 0.7 mg/ml	10.8474 ^a	0.97325	0.04827
สารสีรางนาก 0.7 mg/ml	11.4257 ^b	1.08805	0.05300

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคเมทของลิมโฟไซต์ในอาสาสมัครผู้ชายซึ่งทรีตด้วยสารสี
ความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	14.7277 ^d	2.35222	0.16633
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 μl)	11.4623 ^b	1.09629	0.07752
solvent control-2 (DMFA 3.5 μl)	11.8755 ^c	1.21159	0.08567
สารสีรางเงิน 0.7 mg/ml	11.4507 ^b	1.14813	0.08118
สารสีรางทอง 0.7 mg/ml	10.8837 ^a	0.92440	0.06536
สารสีรางนาก 0.7 mg/ml	11.5529 ^{bc}	1.01176	0.07172

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคเมทของลิมโฟไซต์ในอาสาสมัครผู้หญิงซึ่งทรีตด้วยสารสี
ความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	14.7958 ^d	2.82440	0.19972
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 μl)	11.6101 ^c	1.01627	0.07186
solvent control-2 (DMFA 3.5 μl)	11.1925 ^{bc}	0.95657	0.06764
สารสีรางเงิน 0.7 mg/ml	10.6430 ^a	0.93791	0.06632
สารสีรางทอง 0.7 mg/ml	10.8112 ^{ab}	1.02211	0.07227
สารสีรางนาก 0.7 mg/ml	11.2984 ^c	1.11048	0.07852

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคเมทของลิมโฟไซต์ในอาสาสมัครทั้งหมดซึ่งทรีตด้วยสารสี
ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	14.7617 ^c	2.59592	0.12980
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 μl)	11.5297 ^a	1.10637	0.05885
solvent control-3 (DMFA 7.5 μl)	13.3647 ^b	2.48764	0.12438
สารสีรางเงิน 1.4 mg/ml	13.3161 ^b	3.09639	0.15482
สารสีรางทอง 1.4 mg/ml	12.8949 ^b	2.55255	0.12763
สารสีรางนาก 1.4 mg/ml	13.3862 ^b	2.68697	0.13241

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคเมทของลิมโฟไซต์ในอาสาสมัครผู้ชายซึ่งทรีตด้วยสารสี
ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	14.7277 ^d	2.35222	0.16633
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 μl)	11.6914 ^a	1.04512	0.07390
solvent control-3 (DMFA 7.5 μl)	13.7431 ^c	2.68649	0.18996
สารสีรางเงิน 1.4 mg/ml	13.5227 ^{bc}	2.57187	0.18186
สารสีรางทอง 1.4 mg/ml	12.9746 ^b	3.06215	0.21653
สารสีรางนาก 1.4 mg/ml	13.3313 ^{bc}	2.44416	0.17283

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 18 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทของลิมโฟไซต์ในอาสาสมัครผู้หญิงซึ่งทรีตด้วยสารสี
ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	14.7958 ^c	2.82440	0.19972
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 μl)	11.3680 ^a	1.16763	0.08256
solvent control-3 (DMFA 7.5 μl)	12.9862 ^b	2.23596	0.15811
สารสีรางเงิน 1.4 mg/ml	13.1095 ^b	3.54343	0.25056
สารสีรางทอง 1.4 mg/ml	12.8151 ^b	1.86601	0.13195
สารสีรางนาก 1.4 mg/ml	13.4411 ^b	2.92979	0.20717

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคเมทของลิมโฟไซต์ใน control ของอาสาสมัครทั้งหมด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	14.7617 ^d	2.59592	0.12980
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 μl)	11.6537 ^b	1.12923	0.05618
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 μl)	11.5362 ^{ab}	1.05628	0.05230
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 μl)	11.5297 ^{ab}	1.10637	0.05885
solvent control-1 (DMFA 1.5 μl)	11.2244 ^a	1.04724	0.05236
solvent control-2 (DMFA 3.5 μl)	11.5340 ^{ab}	1.08408	0.05760
solvent control-3 (DMFA 7.5 μl)	13.3647 ^c	2.48764	0.12438

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 20 ค่าเฉลี่ยความยาวหางของลิโมนโฟไซด์ในอาสาสมัครทั้งหมดซึ่งทรีตด้วยสารสีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	8.5405 ^b	9.16006	0.45800
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 µl)	2.8130 ^a	1.95527	0.09776
solvent control-1 (DMFA 1.5 µl)	2.1830 ^a	1.39584	0.06979
สารสีรางเงิน 0.3 mg/ml	2.8862 ^a	1.89048	0.09452
สารสีรางทอง 0.3 mg/ml	2.8101 ^a	1.89706	0.09485
สารสีรางนาก 0.3 mg/ml	2.7199 ^a	2.19838	0.10978

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 21 ค่าเฉลี่ยความยาวหางของลิโมนโฟไซด์ในอาสาสมัครผู้ชายซึ่งทรีตด้วยสารสีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	5.9029 ^b	7.35069	0.51977
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 µl)	2.6404 ^a	1.83465	0.12973
solvent control-1 (DMFA 1.5 µl)	2.5129 ^a	1.37148	0.09698
สารสีรางเงิน 0.3 mg/ml	3.0421 ^a	2.08575	0.14749
สารสีรางทอง 0.3 mg/ml	3.1567 ^a	1.69282	0.11970
สารสีรางนาก 0.3 mg/ml	3.1183 ^a	1.59386	0.11270

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 22 ค่าเฉลี่ยความยาวหางของลิโปโซต์ในอาสาสมัครผู้หญิงซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	11.1781 ^b	10.01095	0.70788
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 μl)	2.9856 ^a	2.06658	0.14613
solvent control-1 (DMFA 1.5 μl)	1.8531 ^a	1.34704	0.09525
สารสีรางเงิน 0.3 mg/ml	2.7304 ^a	1.62243	0.11472
สารสีรางทอง 0.3 mg/ml	2.4635 ^a	1.58999	0.11243
สารสีรางนาก 0.3 mg/ml	2.3215 ^a	2.61404	0.18484

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 23 ค่าเฉลี่ยความยาวหางของลิโปโซต์ในอาสาสมัครทั้งหมดซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	8.5405 ^c	9.16006	0.45800
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 μl)	2.8703 ^{ab}	1.50028	0.07501
solvent control-2 (DMFA 3.5 μl)	3.2690 ^b	2.48389	0.12419
สารสีรางเงิน 0.7 mg/ml	2.1968 ^a	2.20465	0.11023
สารสีรางทอง 0.7 mg/ml	2.2155 ^a	2.22422	0.11121
สารสีรางนาก 0.7 mg/ml	3.4017 ^b	2.91183	0.14541

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 24 ค่าเฉลี่ยความยาวหางของลิโปโซต์ในอาสาสมัครผู้ชายซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	5.9029 ^c	7.35069	0.51977
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 µl)	3.1538 ^{ab}	1.49744	0.10589
solvent control-2 (DMFA 3.5 µl)	3.9367 ^b	2.67587	0.18921
สารสีรางเงิน 0.7 mg/ml	2.9914 ^{ab}	1.35865	0.09607
สารสีรางทอง 0.7 mg/ml	2.1909 ^a	2.84434	0.20112
สารสีรางนาก 0.7 mg/ml	3.8178 ^b	3.28120	0.23202

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 25 ค่าเฉลี่ยความยาวหางของลิโปโซต์ในอาสาสมัครผู้หญิงซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	11.1781 ^c	10.01095	0.70788
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 µl)	2.5868 ^{ab}	1.45366	0.10279
solvent control-2 (DMFA 3.5 µl)	2.6013 ^{ab}	2.07646	0.14683
สารสีรางเงิน 0.7 mg/ml	1.4022 ^a	2.57418	0.18202
สารสีรางทอง 0.7 mg/ml	2.2402 ^{ab}	1.35460	0.09578
สารสีรางนาก 0.7 mg/ml	2.9856 ^b	2.43480	0.17217

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 26 ค่าเฉลี่ยความยาวหางของลิโมนโฟไซด์ในอาสาสมัครทั้งหมดซึ่งทรีตด้วยสารสีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	8.5405 ^b	9.16006	0.45800
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 μl)	2.5991 ^a	1.59041	0.07952
solvent control-3 (DMFA 7.5 μl)	15.8565 ^c	9.41128	0.47056
สารสีรางเงิน 1.4 mg/ml	16.3778 ^c	9.23786	0.46189
สารสีรางทอง 1.4 mg/ml	16.1312 ^c	9.13764	0.45688
สารสีรางนาก 1.4 mg/ml	17.3371 ^c	8.78100	0.43905

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 27 ค่าเฉลี่ยความยาวหางของลิโมนโฟไซด์ในอาสาสมัครผู้ชายซึ่งทรีตด้วยสารสีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	5.9029 ^b	7.35069	0.51977
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 μl)	2.7158 ^a	1.71368	0.12118
solvent control-3 (DMFA 7.5 μl)	18.1178 ^c	9.04798	0.63979
สารสีรางเงิน 1.4 mg/ml	17.1129 ^c	8.61732	0.60934
สารสีรางทอง 1.4 mg/ml	17.0853 ^c	9.68611	0.68491
สารสีรางนาก 1.4 mg/ml	18.1047 ^c	8.73362	0.61756

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 28 ค่าเฉลี่ยความยาวหางของลิโปโซต์ในอาสาสมัครผู้หญิงซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	11.1781 ^b	10.01095	0.70788
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 µl)	2.4824 ^a	1.44917	0.10247
solvent control-3 (DMFA 7.5 µl)	13.5952 ^{bc}	9.24366	0.65363
สารสีรางเงิน 1.4 mg/ml	15.6426 ^{cd}	9.78573	0.69196
สารสีรางทอง 1.4 mg/ml	15.1772 ^{cd}	8.59406	0.60769
สารสีรางนาก 1.4 mg/ml	16.5695 ^d	8.79840	0.62528

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 29 ค่าเฉลี่ยความยาวหางของลิโปโซต์ใน control ของอาสาสมัครทั้งหมด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	8.5405 ^c	9.16006	0.45800
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 µl)	2.8130 ^{ab}	1.95527	0.09776
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 µl)	2.8703 ^{ab}	1.50028	0.07501
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 µl)	2.5991 ^{ab}	1.59041	0.07952
solvent control-1 (DMFA 1.5 µl)	2.1830 ^a	1.39584	0.06979
solvent control-2 (DMFA 3.5 µl)	3.2690 ^b	2.48389	0.12419
solvent control-3 (DMFA 7.5 µl)	15.8565 ^d	9.41128	0.47056

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 30 ค่าเฉลี่ยโหมเมนต์ทางของลิโพโซมในอาสาสมัครทั้งหมดซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	2.4051 ^b	4.21739	0.22532
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 μl)	0.2364 ^a	0.27488	0.01374
solvent control-1 (DMFA 1.5 μl)	0.2068 ^a	0.29076	0.01454
สารสีรางเงิน 0.3 mg/ml	0.2603 ^a	0.27085	0.01354
สารสีรางทอง 0.3 mg/ml	0.2464 ^a	0.26514	0.01326
สารสีรางนาก 0.3 mg/ml	0.2517 ^a	0.38771	0.01909

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 31 ค่าเฉลี่ยโหมเมนต์ทางของลิโพโซมในอาสาสมัครผู้ชายซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	1.2770 ^b	3.06755	0.21691
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 μl)	0.2055 ^a	0.24884	0.01760
solvent control-1 (DMFA 1.5 μl)	0.2373 ^a	0.28695	0.02029
สารสีรางเงิน 0.3 mg/ml	0.2787 ^a	0.30288	0.02142
สารสีรางทอง 0.3 mg/ml	0.2545 ^a	0.25529	0.01805
สารสีรางนาก 0.3 mg/ml	0.2706 ^a	0.28614	0.02023

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 32 ค่าเฉลี่ยโบนเมนต์ทางของลิโปไซด์ในอาสาสมัครผู้หญิงซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	3.5332 ^b	5.36723	0.37952
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 µl)	0.2673 ^a	0.29596	0.02093
solvent control-1 (DMFA 1.5 µl)	0.1763 ^a	0.29212	0.02066
สารสีรางเงิน 0.3 mg/ml	0.2419 ^a	0.23414	0.01656
สารสีรางทอง 0.3 mg/ml	0.2382 ^a	0.27514	0.01946
สารสีรางนาก 0.3 mg/ml	0.2329 ^a	0.46771	0.03307

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 33 ค่าเฉลี่ยโบนเมนต์ทางของลิโปไซด์ในอาสาสมัครทั้งหมดซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	2.4051 ^b	4.21739	0.22532
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 µl)	0.3012 ^a	0.32510	0.01683
solvent control-2 (DMFA 3.5 µl)	0.3875 ^a	0.65995	0.03415
สารสีรางเงิน 0.7 mg/ml	0.2599 ^a	0.82050	0.04597
สารสีรางทอง 0.7 mg/ml	0.2556 ^a	1.12054	0.06733
สารสีรางนาก 0.7 mg/ml	0.3888 ^a	1.20778	0.06540

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 34 ค่าเฉลี่ยโบนเมนต์ทางของลิโปไลด์ในอาสาสมัครผู้ชายซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	1.2770 ^b	3.06755	0.21691
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 µl)	0.3466 ^a	0.40767	0.02883
solvent control-2 (DMFA 3.5 µl)	0.5131 ^a	0.92845	0.06565
สารสีรางเงิน 0.7 mg/ml	0.3104 ^a	0.36347	0.02570
สารสีรางทอง 0.7 mg/ml	0.3114 ^a	1.70316	0.12043
สารสีรางนาก 0.7 mg/ml	0.4361 ^a	0.93686	0.06726

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 35 ค่าเฉลี่ยโบนเมนต์ทางของลิโปไลด์ในอาสาสมัครผู้หญิงซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	3.5332 ^b	5.36723	0.37952
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 µl)	0.2558 ^a	0.29366	0.02076
solvent control-2 (DMFA 3.5 µl)	0.2619 ^a	0.39145	0.02768
สารสีรางเงิน 0.7 mg/ml	0.2095 ^a	1.27756	0.09034
สารสีรางทอง 0.7 mg/ml	0.1998 ^a	0.22123	0.01564
สารสีรางนาก 0.7 mg/ml	0.3415 ^a	0.56753	0.04013

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 36 ค่าเฉลี่ยโบนเมนต์ทางของลิโพโซมในอาสาสมัครทั้งหมดซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	2.4051 ^b	4.21739	0.22532
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 µl)	0.2711 ^a	0.33774	0.01680
solvent control-3 (DMFA 7.5 µl)	5.9413 ^c	6.34462	0.31770
สารสีรางเงิน 1.4 mg/ml	6.0278 ^c	5.92040	0.29603
สารสีรางทอง 1.4 mg/ml	6.0870 ^c	5.87294	0.28265
สารสีรางนาก 1.4 mg/ml	7.1297 ^d	6.51454	0.30273

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 37 ค่าเฉลี่ยโบนเมนต์ทางของลิโพโซมในอาสาสมัครผู้ชายซึ่งทรีดด้วยสารสีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 µg/ml)	1.2770 ^b	3.06755	0.21691
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 µl)	0.2778 ^a	0.35610	0.02518
solvent control-3 (DMFA 7.5 µl)	7.3170 ^c	6.67335	0.47188
สารสีรางเงิน 1.4 mg/ml	6.2664 ^c	5.29020	0.37407
สารสีรางทอง 1.4 mg/ml	6.8819 ^c	6.25138	0.44204
สารสีรางนาก 1.4 mg/ml	7.6264 ^c	6.92964	0.49000

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ µg = ไมโครกรัม µl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 38 ค่าเฉลี่ยโหมเมนต์ทางของลิโพโซมในอาสาสมัครผู้หญิงซึ่งทรีตด้วยสารสีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	3.5332 ^b	5.36723	0.37952
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 μl)	0.2643 ^a	0.31987	0.02262
solvent control-3 (DMFA 7.5 μl)	4.5656 ^{bc}	5.71579	0.40417
สารสีรางเงิน 1.4 mg/ml	5.7893 ^{cd}	6.50506	0.45998
สารสีรางทอง 1.4 mg/ml	5.2921 ^{cd}	5.03831	0.35626
สารสีรางนาก 1.4 mg/ml	6.6329 ^d	6.09992	0.43133

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

ตารางที่ 39 ค่าเฉลี่ยโหมเมนต์ทางของลิโพโซมใน control ของอาสาสมัครทั้งหมด

สารที่ทดสอบ	ค่าเฉลี่ย ($\bar{X}$)	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD)	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน (SE)
positive control (MMC 0.5 $\mu\text{g/ml}$)	2.4051 ^b	4.21739	0.22532
negative control-1 (น้ำกลั่น 1.5 μl)	0.2364 ^a	0.27488	0.01374
negative control-2 (น้ำกลั่น 3.5 μl)	0.3012 ^a	0.32510	0.01683
negative control-3 (น้ำกลั่น 7.5 μl)	0.2711 ^a	0.33774	0.01680
solvent control-1 (DMFA 1.5 μl)	0.2068 ^a	0.29076	0.01454
solvent control-2 (DMFA 3.5 μl)	0.3875 ^a	0.65995	0.03415
solvent control-3 (DMFA 7.5 μl)	5.9413 ^c	6.34462	0.31770

หมายเหตุ อักษรที่เหมือนกัน มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ
 อักษรที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 จากการคำนวณด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %
 ตัวย่อ μg = ไมโครกรัม μl = ไมโครลิตร ml = มิลลิลิตร

สรุป

1. การศึกษาด้านชีวเคมีของสารสีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงห้วรวงเงิน รวงทอง และรวงนาก โดยการแยกสารสีด้วยเทคนิค column chromatography ที่บรรจุคอลัมน์ด้วย Sephadex LH20 มี solvent เป็น $\text{HCOOH} : \text{H}_2\text{O} : \text{HCl} = 5 : 7 : 0.5$ และจากคุณสมบัติการดูดกลืนแสงของสารพบว่า สารสีทั้ง 3 ชนิดมี anthocyanin- flavonol complex เป็นองค์ประกอบ

2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงห้วรวงเงิน รวงทอง และรวงนาก ด้วยการทดสอบไมโครนิวเคลียส (micronucleus test) จาก reticulocyte ในกระแสเลือดของหนู mouse สายพันธุ์ Swiss albino พบว่าหลังจากหนูได้รับสารสีจากรวงเงิน รวงทอง และรวงนาก 1 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักหนูเป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงแล้วจำนวน reticulocyte ที่มีไมโครนิวเคลียสต่อ reticulocyte 1,000 เซลล์แตกต่างจาก negative control อย่างไม่มีนัยสำคัญ สารสีไม่เป็นพิษ

3. การทดสอบความเป็นพิษของสารสีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงห้วรวงเงิน รวงทอง และรวงนาก ด้วยการทดสอบโคเมท (comet assay) จากลิมโฟไซต์ของคนที่ถูกทรีตด้วยสารสีความเข้มข้น 0.3, 0.7 และ 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ค่าเส้นผ่าศูนย์กลาง ความยาวหาง และโมเมนต์หางของเซลล์โคเมท พบว่ามีเพียงสารสีจากรวงนากความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเลือดเท่านั้นที่เป็นพิษ ทำให้ DNA เสียหายโดยมีค่าโมเมนต์หางมากกว่าและแตกต่างจาก solvent control และ negative control อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนทรีตเมนต์อื่นสารสีไม่เป็นพิษต่อลิมโฟไซต์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กนกกาญจน์ ปิ่นแสง. 2536. การต้านการเกิดไมโครนิวเคลียสในหนูของสารสกัดจากตะไคร้.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. 2537. ภัยมืดจากสารพิษ. เซซฐ์ สตูดิโอ แอน กราฟิคดีไซน์ จำกัด,
กรุงเทพฯ.

เจนจิรา สกุลดู. 2548. การทดสอบการเป็นสารก่อกลายและการแยกด้วยทีแอลซีของสารสีที่ได้
จากการเพาะเลี้ยงห้วรวงเงิน รวงทอง และรวงนาก (*Hippeastrum* spp.). วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เจลิยว ศาลากิจ. 2540. โลหิตวิทยาทางสัตวแพทย์. อักษรสมัย, กรุงเทพฯ.

ชนิพร ปวนอินตา. 2543. ผลของเลนเนท ทามารอน และฟูราดาน ต่อดีเอ็นเอของมนุษย์ โดยวิธี
ประเมินความผิดปกติของโครโมโซมและโคเมทแอสเสย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นริศ เวศม์ภิญโญ. 2536. ผลของเอปามาคตินต่อโครโมโซมของคนและการเกิดไมโครนิวเคลียส
ในหนู. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ประภัศสร อารยะกิจเจริญชัย. 2543. การขยายพันธุ์ว่านสีทิส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปรีดี เอกะวิภาค. 2526. การผลิตไม้ดอกประเภทห้วเขตร้อน. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ผกาเวียง ช่อกระดิน. 2545. การชักนำการสร้างสารสีจากการเพาะเลี้ยงห้วรวงเงิน รวงทอง และรวง
นาก (*Hippeastrum* spp.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรณนา ศักดิ์สูง. 2535. พันธุพิษวิทยา (Genetic Toxicology) เอกสารประกอบการสอนพันธุพิษวิทยา. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เพียงใจ คูประดินันท์, อนงค์ เทพสุวรรณ และ วรณี คูสำราญ. 2540. การศึกษา clastogenicity และ anticlastogenicity ของดอกสะเดา โดยวิธี erythrocyte micronucleus assay ในหนูเมาส์. วารสารโรคมะเร็ง 23 (1-2): 37-45.

เพ็ญศิริ พุ่มท่าอิฐ. 2539. ผลของสารสกัดจากดอกอัญชัญต่อโครโมโซมของคนในหลอดทดลอง และการเกิดไมโครนิวเคลียสในหนู. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วสันต์ มะโรเรือง. 2539. ความเป็นพิษของผงป่นแห้งและสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu) ในหนูถีบจักรโดยไม่โครนิวเคลียสเทสต์ และโดมิแนนท์ เลเชล เทสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิทย์ เทียงบุญธรรม. 2531. พจนานุกรมไม้ดอกไม้ประดับในเมืองไทย. เอ เอส พรินติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ.

สุชาดา พัฒนกก. 2542. การปรับปรุงพันธุ์ว่านสีทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abou-Eisha, A. 2006. Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antibacterial drug, trimethoprim. **Toxicology in vitro** 20(5): 601-607.

Anderson, D., M.M. Dobrynska, N. Basaran, A. Basaran and T.W. Yu. 1998. Flavonoids modulate Comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm. **Mutat. Res.** 402: 269-277.

Andersson, M.A. and B.E. Hellman. 2005. Different roles of Fpg and Endo III on catechol-induced DNA damage in extended-term cultures of human lymphocytes and L5178Y mouse lymphoma cells. **Toxicology in vitro** 19(6): 779-786.

- Aldini, G.,M. Carini,A. Piccoli,G. Rossoni and RM. Facino. 2003. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. **Life Sci.** 73(22): 2883-2898.
- Awika, J.M., L.W. Rooney and R.D. Waniska. 2005. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. **J. Food Chem.** 90(1-2): 201-206.
- Aydin, S., A.A. Basaran and N. Basaran. 2005. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. **Mutat. Res.** 581: 43-53.
- Azevedo, L., J.C. Gomes, P.C. Stringheta, A.M.M.C. Gontijo, C.R. Padovani, L.R. Ribeiro and D.M.F. Salvadori. 2003. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food and Chemical Toxicology** 41: 1671-1676.
- Baum, M., E. Fauth, S. Fritzen, A. Herrmann, P. Mertes, K. Merz, M. Rudolphi, H. Zankl and G. Eisenbrand. 2005. Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79 cells and human blood. **Mutat. Res.** 580: 61-69.
- Bethesda, MD. 1993. National Toxicology Information Program, **National Library of Medicine.**
- Blasiak,J., E. Gloc, K. Wozniak and A. Czechowska. 2004. Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. **Chemico-Biological Interactions** 149:137-149.
- Blaszczyk, A. 2006. DNA damage induced by ethoxyquin in human peripheral lymphocytes. **Toxicology Letters** 163: 77-83.
- Broennum-Hansen, K. and J. M. Flink. 1986. Anthocyanin colorants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). IV. Further studies on production of liquid extract, concentrates and freeze dried powder. **J. Food. Technol.** 21: 605-614.

- Bryan, J.E. 1989. **Bulbs**. Timber Press, Inc., London. 218 p.
- Byamukama, R., B.T. Kiremire, M. Andersen and A. Steigen. 2005. Anthocyanins from fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidus*. **J. of food Composition and Analysis** 18(6): 599-605.
- _____, M. Jordheim, B. Kiremire, J. Namukobe and Oyvind M. Andersen. 2006. Anthocyanins from flowers of *Hippeastrum* cultivars. **Scientia Horticulturae** 109(3): 262-266.
- Chen, L. and G. Hrazdina. 1981. Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant colour. **Phytochem.** 20: 297-303.
- Chiriboga, C. and F. J. Francis. 1970. An anthocyanin recovery system from cranberry pomace. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 95: 233-236.
- Chorvatovcova, D. and J. Sandula. 1995. Effect of carboxymethyl-chitin-glucan on cyclophosphamide induce mutagenicity. **Mutat. Res.** 346:4 3-48.
- Constable, F. and I.K. Vasil 1988. **Cell culture and Somatic Cell Genetic of Plants**. Vol. 5 Academic Inc., Sandiago. 618 p.
- Cormier, F., R. Couture, C.B. Do, T.Q. Pham and V.H. Tong. 1997. Properties of anthocyanins from grape cell culture. **J. Food Sci.** 62(2): 246-248.
- Dougall, D.K., J.M. Johnson and G.H. Whitten. 1980. A clonal analysis of anthocyanin accumulation by cell cultures of wild carrot. **Planta** 149: 292-297.
- Du, C. T. and F. J. Francis. 1973. Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **J. Food Sci.** 38: 810-813.

- Du, Q., G. Jerz and P. Winterhalter. 2004. Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography. **J. of Chromatography A** 1045(1-2): 59-63.
- Drumn-Herrel, H. 1987. Blue light control of pigment anthocyanin biosynthesis, pp. 66-72. *In* H. Senger, ed. **Blue Light Response : Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganism**. CRC Press, Florida.
- Erexson, G.L. 2003. Lack of in vivo clastogenic activity of grape seed and grape skin extracts in a mouse micronucleus assay. **Food and Chemical Toxicology** 41: 347-350.
- Fairbairn D.W., P.L Olive and K.L. O'Neill. 1995. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.** 339: 37-59.
- Farzad, M., R. Griesbach and M. R. Wiess. 2002. Floral color change in *Viola cornuta* L. (Violancea): a model system to study regulation of anthocyanin production. **Plant Science** 162: 225-231.
- Fossen, T., R. Slimestad, D.O. Ovstedal and O.M. Andersen. 2000. Covalent anthocyanin-flavonol complexes from flowers of chive, *Allium schoenoprasum*. **Phytochem.** 54(3): 317-323.
- Fossen, T. and D.O. Ovstedal. 2003. Anthocyanins from flowers of the orchid *Dracula chimaera* and *O. cordobae*. **Phytochem.** 63(7): 783-787.
- Francis, F.J. 1977. Anthocyanin as food colors. **Food Tech.** 29: 53.
- _____. 1982. Analysis of anthocyanin , pp. 181-207. *In* M. Pericles, ed. **Anthocyanin as foodcolors**. Academic Press, New York.

Froytlog, C., R. Slimestad and M. Andersen. 1998. Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins - applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits. **J. of Chromatography A** 825(1): 89-95.

_____. 1982. Analysis of anthocyanin , pp. 181-207. *In* M. Pericles, ed. **Anthocyanin as food colors**. Academic Press, New York.

Fuleki, T., and F. J. Francis. 1968a. Quantitative methods for anthocyanins. I. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberry. **J. Food Sci.** 33: 72-77.

Galindo, A.O., P.W. Ebeling, R.E. Wrolstad, L.R. Saona and A.A.Jamet. 1999. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. **J. Food Chem.** 65(2): 201-206.

Geissman, T.A. 1962. **The Chemistry of Flavonoid compounds**. Pergamon Press, New York.

Genghini, R., I. Tiranti, E. Bressan, E. Zamorano-Ponce, J. Fernandez and F. Dulout. 2006. Determination of genotoxicity of classical swine fever vaccine in vitro by cytogenetic and comet tests. **Mutagenesis**. 21(3): 213 - 217.

Gross, J. 1987. **Pigment in fruits**. Academic Press, London.

Hara, M., S. Nakagawa, E. Fujioka, E. Ayukawa and T. Izushi. 1992. Detection of micronuclei in peripheral blood of mitomycin C-treated mice using supravital staining with acridine orange. **Mutat Res.** 278(2-3): 175-179.

Harborne, J.B. 1984. **Phytochemical method**. The Chaucer Press, London.

_____. 1988. The flavonoids: recent advances, pp. 300-343. *In* T.W. Goodwin, ed. **Plant Pigments**. Academic Press, London.

_____. 1998. Phenolic Compounds In Phytochemical Methods, pp. 66-74. **A guide to modern techniques of plant analysis 3rd edition**. Chapman & Hall, New York.

Haslam, E. 1998. **Practical polyphenolics from structure to molecular recognition and physiological Action**. Cambridge University Press. UK. 422 p.

Hayashi, M., R.R. Tice, J.T. MacGregor, D. Anderson, D.H. Blakey, M.k. Volders, F. B. Oleson, F. Pacchierotti, F. Romagna, H. Shimada, S. Sutou and B. Vannier. 1994. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutat. Res.** 312: 293-304.

Hayashi, M., T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni and M. Ishidate, 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutat. Res.** 245(4): 245-249.

Heddle, J.A., M.C Cimino, M. Hayashi, F. Romagna, M.D. Shelby, J.D. Tucker, P. Vanparys and J.T. MacGregor. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environ Mol Mutagen** 18: 277-291.

Hellman, B., L. Friis, H. Vaghe and C. Edling. 1997. Alkaline single cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a study on subjects with residential exposure to radon. **Mutat. Res.** 442: 121-132.

Hendry, G.A.F. 1993. Plant Pigments, pp. 181-196. *In* P.J. Lea and R.C. Leegood, eds. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. John Wiley and Sons Ltd, Chichester.

Jurd, L. 1972. Anthocyanidins and related compounds. XVI. The dimerization of flavylum salts in aqueous solutions. **Tetrahedron** 28(3): 493-504.

Kleinsasser, N.H., B.C. Wallner, U.A. Harréus, W. Zwickenspflug and E. Richter. 2003.

Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. **Toxicology** 192: 171-177.

_____, N.H., K. Schmid, A.W. Sassen, U.A. Harréus, R. Staudenmaier, M. Folwaczny,

J. Glas and F.X. Reichl. 2006. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. **Biomaterials** 27(9): 1762-1770.

_____, U.A. Harréus, E.R. Kastenbauer, B.C. Wallner, A.W. Sassen, R.

Staudenmaier and A.W. Rettenmeier. 2004. Mono(2-ethylhexyl)phthalate exhibits genotoxic effects in human lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract in the comet assay. **Toxicology Letters** 148: 83-90.

Laffon, B., E. Pasaro and J. Mendez. 2001. Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells : comet assay in relation to the induce of sister-chromatid exchanges and micronuclei. **Mutat. Res.** 491: 163-172.

Lankoff, A., A. Banasik, A. Duma, E. Ochniak, H. Lisowska, T. Kuszewski, S. Gozdz and A.

Wojcik. 2006. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the rapair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology Letters** 161: 27-36.

Lazze, M.C., R. Pizzala, M. Savio, L.A. Stivala, E. Prosperi and L. Bianchi. 2003.

Anthocyanins protect against DNA damage induced by *tert*-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. **Mutat. Res.** 535: 103-115.

Lowry, J. B. and L. Chew. 1974. On the use of extracted anthocyanin as a food dye. **Econ. Bot.**

28: 61-62.

- Llopiz, N., F. Puiggros, E. Cespedes, L. Arola, A. Ardevol, C. Blade and MJ. Salvado. 2004. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. **J. Agric Food Chem.** 52(5):1083-1087.
- Macioszek, V. and A. Kononowicz. 2004. The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors:quinoline yellow (E 104) and brilliant black BN (E 151). **Cellular and Molecular Biology Letters** 9:107-122.
- Madhavi, D.L., J. Bomser, M.A.L. Smith and K. Singletary. 1998. Isolation of bioactive constituents from *Vaccinium myrtillus* (bilberry) fruits and cell cultures. **J. Plant Sci.** 131: 95-103.
- Markakis, P. 1982. **Anthocyanin as food colors**. Academic Press, New York.
- Markham, K.R. 1982. **Techniques of flavonoid Identification**. Academic Press, London.
- Masuda, S., Y. Terashima, A. Sano, R. Kuruto, Y. Sugiyama, K. Shimoi, K. Tanji, H. Yoshioka, Y. Terao and N. Kinae. 2005. Changes in the mutagenic and estrogenic activities of bisphenol A upon treatment with nitrite. **Mutat. Res.** 585: 137-146.
- Mateus, N., S.P.Teresa, J.C.R. Gonzalo, C.S.Buelga and V. Freitas. 2002. Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. **Food Chem.** 76(3): 335-342.
- McCarthy, P.J., S.F. Sweetman, P.G. McKenna and V.J.Mckelvey. 1997. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. **Mutagenesis.** 12(4): 209-214.
- Metivier, R.P., F.J. Francis, and F.M. Clydesdale. 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. **J. Food Sci.** 45: 1099-1110.

- Mizukami, H., K. Tomita, H. Ohashi and N. Hiraoka. 1988. Anthocyanin production in callus cultures of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Plant Cell Rep.** 7: 553-556.
- Monteith, D.K. and J. Vanstone. 1995. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. **Mutat Res.** 345: 97-103.
- Narayan, M.S. and L.V. Venkataraman. 2000. Characterisation of anthocyanins derived from carrot (*Daucus carota*) cell culture. **J. Food Chem.** 70: 361-363.
- Okubo, H. 1993. Hippeastrum, pp. 323-334. In A. Hertogh and M. Le Nard, eds. **The Physiology of Flower Bulbs**. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Osawa, Y. 1982. Copigmentation of anthocyanins, pp. 41-65. In P. Markakis, ed. **Anthocyanins as food colours**. Academic Press, New York.
- Östling O. and K.J. Johanson. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 123: 291-298.
- Ozaki, A., Y. Yamaguchi, T. Fujita, K. Kuroda and G. Endo. 2003. Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. **Food and Chemical Toxicology** 42: 1323-1337.
- Parton, J.W., J. E. Beyers and M. L. Garriott. 1990. Mutagenicity evaluation of HC Blue No. 1 and HC Blue No. 2, I. Effect on the induction of micronuclei in mouse bone marrow cells. **Mutat. Res.** 241(2): 139-144.
- Poli, P., M.A. Mello, A. Buschini, V.L.S.S. Castro, F.M. Restivo, C. Rossi and T.M.A.D. Zucchi. 2003. Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay. **Mutat. Res.** 540: 57-66.

- Popp, R. and O. Schimmer. 1991. Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy, and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. **Mutat. Res.** 246: 205-213.
- Ray, H., M. Yu, P. Auser, L.B. Beatty, B. McKersie, S. Bowley, N. Westcott, B. Coulman, A. Lloyd and M.Y. Gruber. 2003. Expression of Anthocyanins and Proanthocyanidins after Transformation of Alfalfa with Maize *Lc*^{1,2}. **Plant Physiology**. 132: 1448-1463.
- Rees, A.R. 1985. **Hippeastrum**. CRC Press, Boca Raton. 311 p.
- Reddy, V. S., K. V. Goud, R. Sharma and A. R. Reddy. 1994. Ultraviolet-B-responsive anthocyanin production in a rice cultivar is association with a specific phase of phenylalanine ammonia lyase biosynthesis. **Plant Physiol.** 105: 1059-1066.
- Renault, J.H., P. Thépenier, M.Z. Hanrot, L. Olivier, A. Durand, A. Foucault and R. Margraff. 1997. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography. **J. of Chromatography A** 736(1-2): 345-352.
- _____. 1992. **Ornamental Bulbs. Corms and Tubers**. Redwood Press Ltd. Melksham, UK. 220 p.
- Rozgaj, R., V. Kasuba and A. Fucic. 2002. Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests. **J.Trace Elem. Med. Biol.** 16: 187-192.
- Russo, A., L.L. Fauci, R. Acquaviva, A. Campisi, G. Raciti, C. Scifo, M. Renis, G. Galvano, A. Vanella and F. Galvano. 2005. Ochratoxin A-induced DNA damage in human fibroblast: protective effect of cyanidin 3-O- β -D-glucoside. **J. Nutr. Biochem.** 16(1): 31-37.
- Sato, S.I. and I. Tomita. 2001. Short-term screening method for the prediction of carcinogenicity

of chemical substances: current status and problems of an *in vivo* rodent micronucleus assay. **J. of Health Sci.** 47(1): 1-8.

- Schaeferhenrich, A., W. Sendt, J. Scheele, A. Kuechler, T. Liehr, U. Claussen, A. Rapp, K.-O. Greulich, B.L. Pool-Zobel. 2003. Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples. **Food and Chemical Toxicology** 41: 655-664.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. **Mutat. Res.** 31: 9-15.
- Shafiee, M., MA. Carbonneau, N. Urban, B. Descomps and CL. Leger. 2003. Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu²⁺, AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production. A comparison to other extracts or compounds. **Free Radic Res.** 37(5): 573-584.
- Shi, J., J. Yu, JE. Pohorly and Y. Kakuda. 2003. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. **J. Med Food.** 6(4): 291-9.
- Singh N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice and E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175: 123-130.
- Speit, G., S. Haupter and A. Hartmann. 1998. Evaluation of the genotoxic properties of paraquat in V79 Chinese hamster cells. **Mutat. Res.** 412: 187-193.
- Stafford, H.A. 1990. **Flavonoid Metabolism**. CRC Press Inc, Florida.
- Suzuki, H., N. Hirano, C. Watanabe and Y. Tarumoto. 1997. Carbon tetrachloride does not induce micronucleus in either mouse bone marrow or peripheral blood. **Mutat. Res.** 394: 77-80.

- Vander, B.J., C.A. Harris and S.R. Ellis. 1963. Reticulocyte counts by means of fluorescence microscopy. **J. Lab Clin Med.** 62:132–140.
- Vareed, S.K., M.K. Reddy, R.E. Schutzki and M.G. Nair. 2006. Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. **Life Sci.** 78(7): 777-784.
- Vickey, Y.M. and B. Vickey. 1981. **Secondary Plant metabolism.** The Macmillan Press Ltd., London. 355 p.
- Villarini, M., M. Moretti, R. Pasquini, G.S. Sforzolini, C. Fatigoni, M. Marcarelli, S. Monarca and A.V. Rodriguez. 1998. In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage (comet assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. **Toxicology** 130: 129-139.
- Von Ledebur, M. and W. Schmid. 1973. The micronucleus tests: Methodological aspects. **Mutat. Res.** 19: 109-117.
- Sudprasert, W., P. Navasumrit and M. Ruchirawat. 2006. Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells. **Int. J. Hyg. Environ. Health** 209: 503–511.
- Watanabe, T., H. Kaji, K. Takagi, N. Kinae and T. Hirayama. 1993. Micronucleus induction in mouse peripheral blood reticulocytes by 2,7-diaminophenazine and related compounds. **Mutat. Res.** 302: 177-182.
- Weiss, D. and A. H. Halevy. 1989. Stamens and gibberellin in the regulation of corolla pigmentation and growth in *petunia hybrida*. **Planta** 179: 89-96.

- Wild, D. 1988. Summary report on the performance of the *in vivo* micronucleus assay. pp.145-148. In J.Ashby, F.J.De Serres, M.D. Shelby, B.H. Margolin, M. Ishidate and G.C. Becking, eds. **Evaluation of short-term tests for carcinogens**. Cambridge university, Cambridge.
- Wu, L.T., C.C. Chu, J.G. Chung, C.H. Chen, L.S. Hsu, J.K. Liu and S.C. Chen. 2004. Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. **Mutat. Res.** 556: 75-82.
- Yamakoshi, j., M. Saito., S. Kataoka. and M. Kikuchi. 2002. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **Food and Chemical Toxicology** 40: 599-607.
- Yen, G.C., C.M. Liao and S.C. Wu. 2002. Influence of Maillard Reaction Products on DNADamage in Human Lymphocytes. **Agric. Food Chem.** 50: 2970-2976.
- Zamorano,E., J. Fernández, G. Vargas,P. Rivera and M. A. Carballo. 2004. Protective activity of cedron (*Aloysia triphylla*) infusion overgenetic damage induced by cisplatin evaluated by the comet assay technique. **Toxicology Letters** 152: 85-90.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลาย

1. Lysing solution

มีส่วนผสมดังนี้

NaCl	146.1	กรัม
EDTA	37.2	กรัม
Tris base	1.2	กรัม
NaOH	8	กรัม
Na lauroyl sarcosinate	10	กรัม

ละลายสารตัวที่ 1 ในน้ำประมาณ 500 มิลลิลิตร จนละลายหมด แล้วจึงเติมสารตัวถัดไปเรื่อยๆจนครบทุกตัวตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 890 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใช้ต้องเติม Triton X-100 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ dimethyl sulfoxide(DMSO) ปริมาตร 89 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

2. Electrophoresis buffer

มีส่วนผสมดังนี้

NaOH	12	กรัม
EDTA	0.4464	กรัม

ละลายสารตัวที่ 1 ในน้ำประมาณ 500 มิลลิลิตรจนละลายหมด แล้วจึงเติมสารตัวถัดไป จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร เตรียมสารก่อนใช้ 45-60 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Neutralization buffer

มีส่วนผสมดังนี้

Ammonium acetate	192.7	กรัม
------------------	-------	------

น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

ละลาย Ammonium acetate ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้นำมาแบ่งใส่ copling jar 5 มิลลิลิตร เติม ethanol 45 มิลลิลิตร

4. 1% HCl ใน MeOH

มีส่วนผสมดังนี้

HCl	1	มิลลิลิตร
MeOH	99	มิลลิลิตร

5. Phosphate buffer saline solution (PBS)

มีส่วนผสมดังนี้

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Di-sodiumhydrogenphosphate dibasic	1.15	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารตัวที่ 1 ในน้ำประมาณ 500 มิลลิลิตร จนละลายหมด แล้วจึงเติมสารตัวถัดไปเรื่อยๆจนครบทุกตัวตามลำดับ จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

