Research Article

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากเสลดพังพอนตัวผู้

สันติ โพธิ์ศรี[1]*, สุกัญญา ไชยป่ายาง[2], ญาณิศา ละอองอุทัย[1]

[1]ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
[2]สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
* **ติดต่อผู้นิพนธ์:** ดร.สันติ โพธิ์ศรี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131 อีเมล์: santi.ph@eng.buu.ac.th

บทคัดย่อ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากเสลดพังพอนตัวผู้

สันติ โพธิ์ศรี[1]*, สุกัญญา ไชยป่ายาง[2], ญาณิศา ละอองอุทัย[1]

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2565; 18(2) : 40-51

รับบทความ: 17 มิถุนายน 2564 **แก้ไขบทความ:** 28 ธันวาคม 2564 **ตอบรับ:** 19 พฤษภาคม 2565

เสลดพังพอนตัวผู้เป็นพืชสมุนไพรตามตำรับยาพื้นบ้านที่มีสรรพคุณที่หลากหลาย โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากเสลดพังพอนตัวผู้ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง **วิธีดำเนินงานวิจัย:** สกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอล และวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR จากนั้นทดสอบความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนังชั้นบน (HaCaT) และเซลล์ไต (Vero) ด้วยวิธี MTT assay และวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ด้วยเทคนิค FTIR-Synchrotron **ผลการวิจัย:** ผลการตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิกของสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอล มีค่าเท่ากับ 82.62 ± 2.73, 91.74 ± 5.84 และ 92.43 ± 3.81 มิลลิกรัม แกลลิกต่อ 1 กรัมของสารสกัด ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดในแต่ละตัวทำละลายด้วยเทคนิค FTIR พบว่าตัวทำละลายน้ำจะสามารถสกัดสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ เซลลูโลส-ลิกนินหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ได้ดีกว่าเอทานอลและเมทานอล ในขณะที่ตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลสามารถสกัดสารประกอบจำพวกฟีนอลิก และเทอร์พีนอยด์ได้ดีกว่า ผลของการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT และ Vero หรือมีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยมาก นอกจากนี้ยังตรวจสอบสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ด้วยเทคนิค FTIR- Synchrotron พบว่าสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ ทำให้ไขมันและกรดนิวคลีอิกในเซลล์ HaCaT สูงขึ้น แสดงถึงการขยายตัวของเซลล์เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณโปรตีนลดลงเล็กน้อย ที่ความเข้มข้น 200 µg/mL สารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเอทานอลทำให้โปรตีนลดลง ส่งผลต่อความเป็นพิษเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเมทานอลพบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ใกล้เคียงกับตัวอย่างกลุ่มควบคุม ส่วนของเซลล์ Vero สารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำทำให้ไขมันสูงขึ้นในขณะที่โปรตีนลดลงเล็กน้อย แต่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดนิวคลีอิก ซึ่งไม่แสดงผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเมทานอลส่งผลให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกลดลง ส่งผลต่อความเป็นพิษเล็กน้อย ในขณะที่สารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเอทานอลส่งผลต่อการลดลงของกรดนิวคลีอิกเพียงอย่างเดียว ซึ่งอยู่ในระดับที่ยังไม่ส่งผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ **สรุปผลการวิจัย:** สารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอล ไม่มีความเป็นพิษหรือเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ ซึ่งเป็นรายงานวิจัยชิ้นแรกที่ยืนยันถึงความเป็นพิษเบื้องต้นในเซลล์เพาะเลี้ยง

คำสำคัญ: เสลดพังพอนตัวผู้, สารประกอบฟีนอลิก, ความเป็นพิษต่อเซลล์, หมู่ฟังก์ชัน

In vitro cytotoxicity assessment of *Barleria lupulina* Lindl. extract

Santi Phosri[1]*, Sukanya Chaipayang[2], Yanisa Laoonguthai[1]

[1]Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Burapha University, Chonburi 20131 Thailand
[2]Synchrotron Light Research Institute, Nakhon Ratchasima 30000 Thailand
***Corresponding author:** Dr.Santi Phosri, Ph.D., Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Burapha University, Chonburi 20131 Thailand, E-mail: santi.ph@eng.buu.ac.th

Abstract

In vitro cytotoxicity assessment of *Barleria lupulina* Lindl. extract

Santi Phosri[1]*, Sukanya Chaipayang[2], Yanisa Laoonguthai[1]

IJPS, 2022; 18(2) : 40-51

Received: 17 June 2021 **Revised:** 28 December 2021 **Accepted:** 19 May 2022

Barleria lupulina Lindl. is a medicinal plant with various properties, according to traditional medicine recipes. The aim of this research was to investigate the cytotoxicity of *Barleria lupulina* extracts. **Methods:** The Folin-Ciocalteu method was used to measure the total phenolic contents of aqueous, ethanol and methanol extracts of *Barleria lupulina*. The functional groups of extracts were isolated using Fourier transform infrared spectra (FTIR). The cytotoxicity effect was evaluated on human keratinocyte (HaCaT) and African green monkey kidney (Vero) cells by MTT assay. **Results:** The total phenolic contents of aqueous, ethanol and methanol extracts of *Barleria lupulina* were 82.62 ± 2.73, 91.74 ± 5.84 and 92.43 ± 3.81 milligram gallic acid/gram extract, respectively. According to component analysis by FTIR, the results show that the aqueous extract has more polysaccharide, cellulose-lignin and carbohydrate compounds than the ethanol and methanol portions, whereas ethanolic and methanolic extract spectra show higher peaks of phenolic and terpenoid compounds. The results of cytotoxicity test of *Barleria lupulina* extract show non-toxicity or low toxicity on HaCaT and Vero cells. The biochemical profile analysis by FTIR-Synchrotron shows that lipid and nucleic acids of HaCaT cells increased after treatment with aqueous extracts, whereas the protein content was significantly lower than control. The results may indicate cell proliferation. At a concentration of 200 µg/mL, the ethanolic extract reduced the protein content, resulting in slight toxicity to cells. Moreover, methanolic extracts presented biochemical profiles the same as the control. In the Vero cells, the lipid content was higher in cells treated with aqueous extracts, but the protein content decreased, which showed non- cytotoxicity. After treatment with methanolic extracts, the protein and nucleic acid content was reduced, whereas ethanolic extracts only had an effect on the reduction of nucleic acids. However, the changes of biomolecules at this concentration did not affect the cellular toxicity. **Conclusion:** The aqueous, ethanolic and methanolic extracts of *Barleria lupulina* were non-toxic or had low toxicity to cells. This is the first report to confirm primary toxicity in normal cell lines.

Keywords: *Barleria lupulina*, Phenolic compound, Cytotoxicity, Functional groups

บทนำ

เสลดพังพอนตัวผู้ เป็นพืชสมุนไพรตามตำรับยาพื้นบ้านมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Barleria lupulina* Lindl. จัดอยู่ในวงศ์เหงือกปลาหมอ (Acanthaceae) ซึ่งตามภูมิปัญญาพื้นบ้านใช้ใบสด ถอนพิษแมลงสัตว์กัดต่อย แก้ลมพิษ รักษาเม็ดผื่นคันตามผิวหนัง แก้โรคเบาหวาน แก้ปวดแผล แก้โรคฝีต่างๆ รักษาโรคคางทูม แก้โรคไฟลามทุ่ง แก้โรคงูสวัด รักษาโรคเริม ถอนพิษจากเม็ดตุ่มฝีดาษ แก้ฟกช้ำ แก้ช้ำบวม ถอนพิษไข้ พิษไข้ทรพิษ แก้ปวดฟัน เหงือกบวม แก้ริดสีดวงทวาร และแก้พิษไฟลวกน้ำร้อนลวก นอกจากนี้ยังมีการใช้รากในการรักษาโรคตาเหลือง หน้าเหลือง เมื่อยตัว แก้เจ็บท้อง แก้ผิดอาหาร ถอนพิษงู พิษแมลงสัตว์กัดต่อย แก้ปวดฟัน จากรายงานการวิจัยพบสารสำคัญหลายชนิดในใบ เช่น barlerin, acetylbarlerin, shanzhiside methyl ester, acetylshanzhiside, methyl ester, ipolamiidoside, iridoidglucosides (Lans *et al.*, 2001), betaine, alkaloids (Suksamrarn *et al.*, 2003) และนอกจากนี้ Lee และคณะ (2016) ยังรายงานสารสำคัญชนิดใหม่จากเสลดพังพอนตัวผู้ คือ iridoid glycoside, barlupulin C methyl ester, กลุ่ม phenylethanoid glycosides ได้แก่ poliumoside และ decaffeoylacteoside รวมถึงยังพบกลุ่ม phenolic glycosides คือ protocatechuic acid 4-O-glucoside, vanillic acid 4-O-glucoside และ leonuriside A ในส่วนการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารสกัดจากเสลดพังพอนตัวผู้มีฤทธิ์ที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (Reanmongkol and Subhadhirasakul, 1997; Yoosook *et al.*, 1999; Rattanakiat, 2006), ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Chomnawang *et al.*, 2009; Moin *et al.*, 2012; Kumari and Dubey, 2016; Kumari *et al.*, 2017), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Kumari et al., 2017; Ismail-Suhaimy *et al.*, 2021), ฤทธิ์ลดปวด (Reanmongkol *et al.*, 2000; Wanikiat *et al.*, 2008), ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Satrayavivad *et al.*, 1987; Wanikiat *et al.*, 2008; Senger *et al.*, 2016), ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Suba *et al.*, 2004), ยับยั้งการเกิดต้อกระจก (Mazumder *et al.*, 2014), ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Kumari and Dubey, 2016) และฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Kumari *et al.*, 2017) เป็นต้น จากรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าเสลดพังพอนตัวผู้เป็นพืชสมุนไพรตามตำรับยาพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายและน่าจะมีศักยภาพในการศึกษาและพัฒนาต่อเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์สำคัญเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ต่อไปในอนาคตได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาความเป็นพิษของเสลดพังพอนตัวผู้ในเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อจะเป็นการยืนยันความปลอดภัยเบื้องต้นทางด้านพิษวิทยาจากสารสกัดพืชสมุนไพรเสลดพังพอนตัวผู้และจะเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่จะสนับสนุนการใช้เสลดพังพอนตัวผู้สำหรับใช้เป็นยาสมุนไพรถอนพิษที่ใช้ได้จริงและมีความปลอดภัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเสลดพังพอนตัวผู้

เก็บตัวอย่างเสลดพังพอนตัวผู้จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จ.ระยอง ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 และได้รับความอนุเคราะห์จากคุณประกิจ ปลั่งกลาง เจ้าหน้าที่สวนสมุนไพรฯ เป็นผู้ยืนยันและระบุชนิด รวมถึงพิสูจน์อัตลักษณ์พืชตัวอย่างเสลดพังพอนตัวผู้ให้

การเตรียมการสกัดเสลดพังพอนตัวผู้

การเตรียมตัวอย่างสารสกัดจะนำส่วนเหนือดิน (Aerial parts) ของเสลดพังพอนตัวผู้ซึ่งประกอบด้วยลำต้น กิ่งและใบมาล้างให้สะอาด หลังจากนั้นนำไปด้วยตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าจะแห้งสนิท แล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร จากนั้นทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ดังต่อไปนี้

1) การเตรียมสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ

ทำการชั่งผงสมุนไพรเสลดพังพอนตัวผู้ที่ผ่านการบดมาจำนวน 230 กรัม แล้วนำมาสกัดด้วยน้ำ 690 mL ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางและนำส่วนของสารสกัดที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) จากนั้นเก็บตัวอย่างสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2) การเตรียมการสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเอทานอล

ชั่งผงสมุนไพรเสลดพังพอนตัวผู้ที่ผ่านการบดจำนวน 230 กรัม แล้วนำมาสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% (Commercial grade) จำนวน 690 mL ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และนำส่วนของสารสกัดที่ได้ไปไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย Rotary evaporator จนได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียวหนืดสีเขียวเข้มและเก็บตัวอย่างสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3) การเตรียมการสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเมทานอล

ชั่งผงสมุนไพรเสลดพังพอนตัวผู้ที่ผ่านการบดจำนวน 230 กรัม จากนั้นเติมเมทานอลความเข้มข้น 95% (Commercial grade) จำนวน 690 mL ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนของสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย Rotary evaporator จนได้สารสกัดที่มีลักษณะเหนียวหนืดสีเขียวเข้มและเก็บตัวอย่างสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล

ทำการตรวจวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยดัดแปลงตามวิธีของ Chaithada และคณะ (2018) โดยเตรียมสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้สกัดด้วยน้ำ เอทานอล เมทานอล ความเข้มข้น 1 mg/mL และสารมาตรฐาน Gallic acid ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200, 300, 400, และ 500 µg/mL จากนั้นเติมตัวอย่างจำนวน 1 mL ลงในหลอดทดลองและเติม Folin-Ciocalteu reagent (เจือจาง 1:10) จำนวน 200 µL ผสมให้เข้ากันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 7.5% Na_2CO_3 จำนวน 1 mL และบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Cary 1E UV/Visible Spectrophotometer, USA) โดยแสดงผลปริมาณสารฟีนอลเฉลี่ยอยู่ในรูป mg GEA/g extract ซึ่งคำนวณจากกราฟมาตรฐานของกราฟ Gallic acid (Gallic acid equivalents)

การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอลด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

นำตัวอย่างสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้มาตรวจวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารประกอบโดยใช้เทคนิค FTIR-spectroscopy ด้วยเครื่อง Bruker Tensor 27 FT-IR spectrometer วัดด้วยโหมดการวัดแบบสะท้อนกลับ (Reflection) โดยใช้หัววัด Diamond ที่ 64 scans ด้วย spectral resolution 4 cm^{-1} ทำการบันทึกผลและวิเคราะห์สเปกตรัมด้วยโปรแกรม Optical User Software (OPUS) 7.5 (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany)

การทดสอบสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT และ Vero ด้วยวิธี MTT assay

ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย MTT assay ตามวิธีของ Phosri และคณะ (2018) โดยเตรียมสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำโดยละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ ส่วนสารสกัดด้วยเอทานอลและเมทานอลละลายใน 50% DMSO จากนั้นกรองสารสกัดด้วย Syringe filter ขนาด 0.2 µM และทำการเลี้ยงเซลล์ HaCaT (Cell Lines Services (CLS) Cat. 300493) และ Vero (ATCC, CCL-81™) ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 well plate ให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1×10^4 เซลล์ต่อ 1 well จากนั้นนำไปบ่มใน CO_2 incubator ที่มีปริมาณ CO_2 อยู่ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากครบ 24 ชั่วโมง ทำการเติมสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ให้ได้ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 µg/mL โดยควบคุมความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เท่ากับ 0.5% เพื่อไม่ให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ จากนั้นบ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการทดสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก 96 well plate และเติมสาร MTT ความเข้มข้น 0.5 mg/mL และนำไปบ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 well plate และเติม 100% DMSO เพื่อละลายผลึก formazan salt ผสมสารละลายให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว แล้วจึงนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (Molecular Devices Spectra Max Plus 384, USA) และคำนวณค่า cell viability ของเซลล์ที่ได้รับสารสกัด เปรียบเทียบกับกลุ่ม untreated control ที่ได้รับเฉพาะ vehicle (อาหารเลี้ยงเซลล์หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% DMSO) โดยแสดงค่า cell viability ในรูปของ % of control ซึ่งให้กลุ่ม untreated control ที่ได้รับเฉพาะ vehicle มีค่า cell viability เท่ากับ 100%

การศึกษาสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ด้วยเทคนิค FTIR-Synchrotron

ทำการการเก็บตัวอย่างเซลล์ HaCaT และเซลล์ Vero โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ตามด้วยน้ำบริสุทธิ์ปราศจากไอออน (DI) เป็นขั้นตอนสุดท้าย ปั่นเก็บเซลล์และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายกลับด้วยน้ำ DI จากนั้นหยดสารแขวนลอยเซลล์ลงบนกระจก BaF_2 และนำมาวัดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของเซลล์

ด้วยเทคนิค Synchrotron FTIR-Microspectroscopy ด้วยเครื่อง Bruker Vertex 70 ต่อกับ Hyperion 2000 FT-IR microscope ที่มีหัวตรวจวัด (Detector) ชนิด MCT เป็น detector วัดด้วยโหมดการวัดแบบส่องผ่าน (TRANSMISSION) โดยใช้ 36x วัดที่ 64 scans ด้วย spectral resolution 4 cm^{-1} บันทึกผลการวัดและวิเคราะห์สเปกตรัมด้วยโปรแกรม Optical User Software (OPUS) 7.5 (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany)

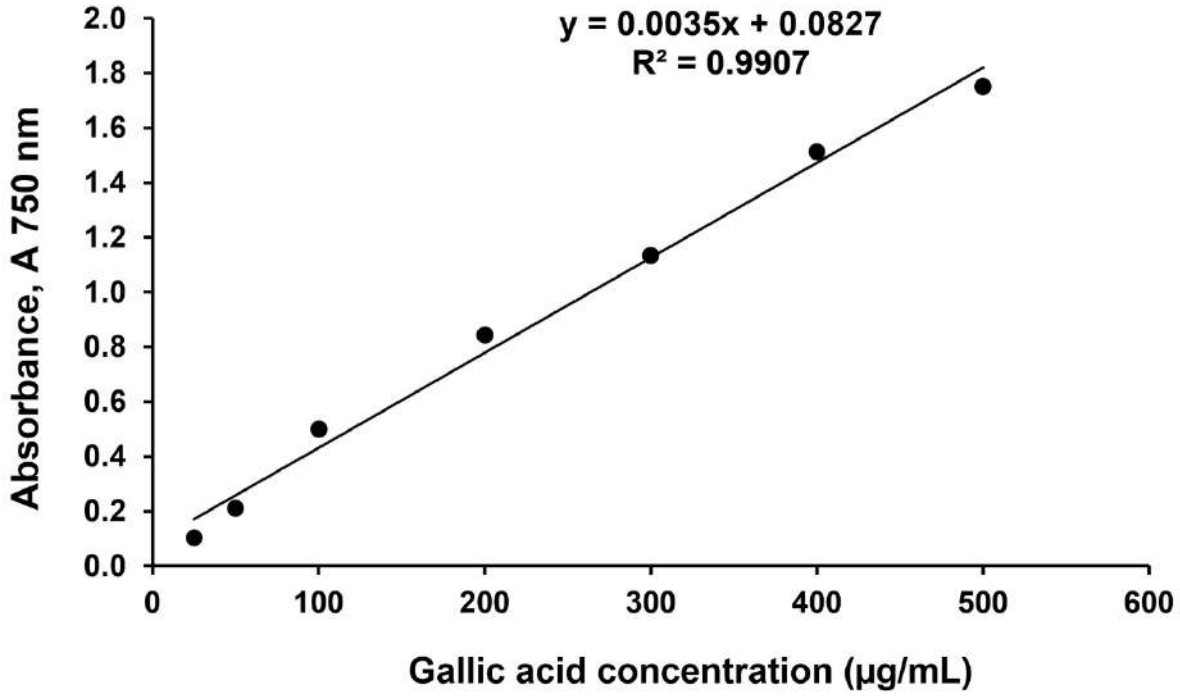
สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองโดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่โดยวิธี Duncan's multiple range test กำหนดค่า $P < 0.05$ จึงถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอล

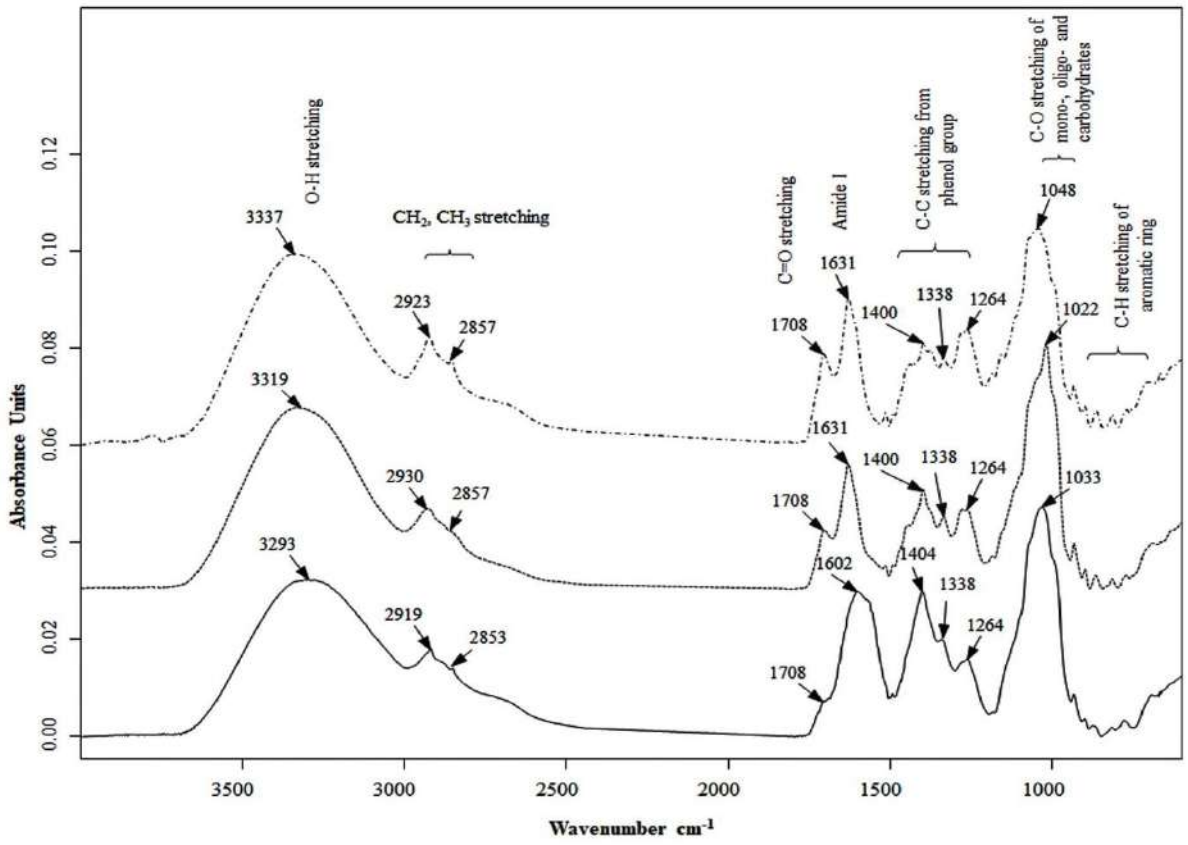
จากการเตรียมสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำเอทานอลและเมทานอล ได้ร้อยละผลผลิต (% yield) เท่ากับ 11.05%, 10.91% และ 6.21% ตามลำดับ และคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลได้จากกราฟมาตรฐาน gallic acid (รูปที่ 1) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำเอทานอลและเมทานอล เท่ากับ mg 82.62 ± 2.73 GEA/g extract, 91.74 ± 5.84 mg GEA/g extract และ 92.43 ± 3.81 mg GEA/g extract ตามลำดับ จากผลการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำเอทานอลและเมทานอล พบว่าสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดคือ 92.43 ± 3.81 mg GEA/g extract รองลงมาคือสารสกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 91.74 ± 5.84 mg GEA/g extract ส่วนสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยสุดคือ 82.62 ± 2.73 mg GEA/g extract ซึ่งจากรายงานวิจัยพบว่าการสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเมทานอลมีจำนวนองค์ประกอบของสารกลุ่มฟีนอลสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยอื่นๆ ที่พบว่าสารเสลดพังพอนตัวผู้ที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด (Sarmad *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2017)



รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานของ Gallic acid

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้สกัดด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอลด้วยเทคนิค Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

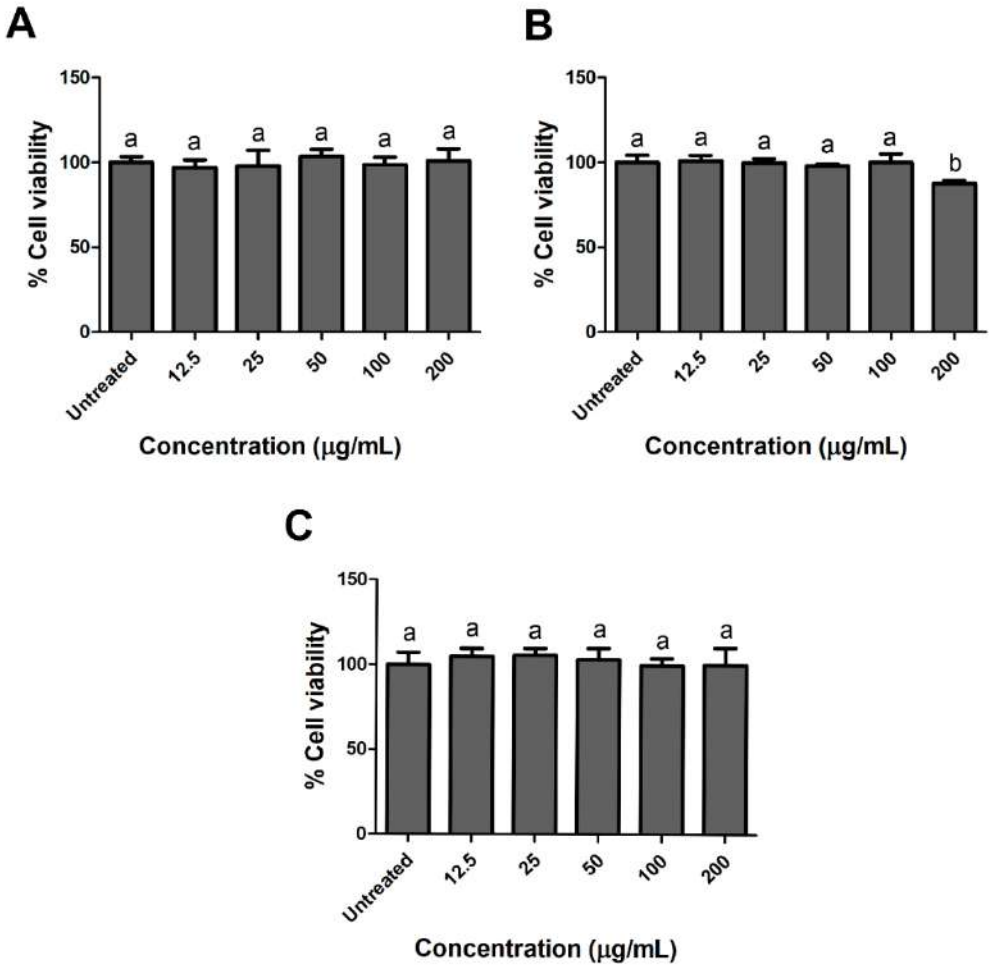
เมื่อวิเคราะห์สารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ เอทานอลและเมทานอล ด้วยเทคนิค FTIR (รูปที่ 2) จะเห็นได้ว่าลักษณะการดูดกลืนแสงของสารสำคัญจากสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีความคล้ายคลึงกัน พบค่าการดูดกลืนแสงที่บริเวณเลขคลื่น 2910-2923 cm^{-1} ของหมู่ CH_2 และหมู่ CH_3 ของสารประกอบในกลุ่มเมทิลและอัลดีไฮด์ (Lu, 2012) พบบริเวณการดูดกลืนแสงหลักที่ 1022-1048 cm^{-1} ซึ่งเกิดจากการสั่นแบบ Stretching vibration ของหมู่ C-O (OH, COOH), C-X, C-N (NH_2), และบริเวณ 3319-3337 cm^{-1} ของหมู่ O-H รวมถึงการดูดกลืนแสงที่บริเวณเลขคลื่น 800-900 cm^{-1} ของหมู่ C-H จากวงอะโรมาติก โดยลักษณะการดูดกลืนแสงดังกล่าวอาจเกิดจากองค์ประกอบของสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ เทอร์พีนอยด์ หรือสารประกอบฟีนอลิก (Zavoi *et al.*, 2011; Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2020) นอกจากนี้ยังพบบริเวณการดูดกลืนแสงที่บริเวณเลขคลื่น 1602-1631 cm^{-1} บ่งบอกถึงการดูดกลืนแสงของสารประกอบในกลุ่ม dienes, trienes, β-unsaturated carbonyl, หมู่ steric รวมถึงหมู่ Amide I (Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2020) และที่บริเวณเลขคลื่น 1264, 1338 และ 1400 cm^{-1} จากการสั่นแบบ bending vibrations ทั้งสมมาตรและอสมมาตรของหมู่ CH_3 ในกลุ่มเซลลูโลส-ลิกนิน (Moosavinejad *et al.*, 2019) เมื่อพิจารณาสัดส่วนของสารสำคัญที่สกัดได้จากแต่ละตัวทำละลายจะพบว่าตัวทำละลายน้ำจะสามารถสกัดสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์เซลลูโลส-ลิกนินหรือสารประกอบคาร์โบไฮเดรต (1033, 1404 cm^{-1}) ได้ดีกว่าเอทานอลและเมทานอล ในขณะที่ตัวทำละลายเอทานอลและเมทานอลสามารถสกัดสารประกอบจำพวกฟีนอลิกและเทอร์พีนอยด์ (3337, 1708 cm^{-1}) ได้ดีกว่าน้ำ ตามลำดับ ทั้งนี้สารสำคัญที่สกัดได้ในตัวทำละลายแต่ละชนิดอาจขึ้นอยู่กับหมู่องค์ประกอบและคุณสมบัติเฉพาะของสารสำคัญที่จะสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2 แสดงสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ (____) เมทานอล (------) และเอทานอล (_._._.) ที่ได้จากเทคนิค FTIR

ผลของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ต่อเซลล์ HaCaT

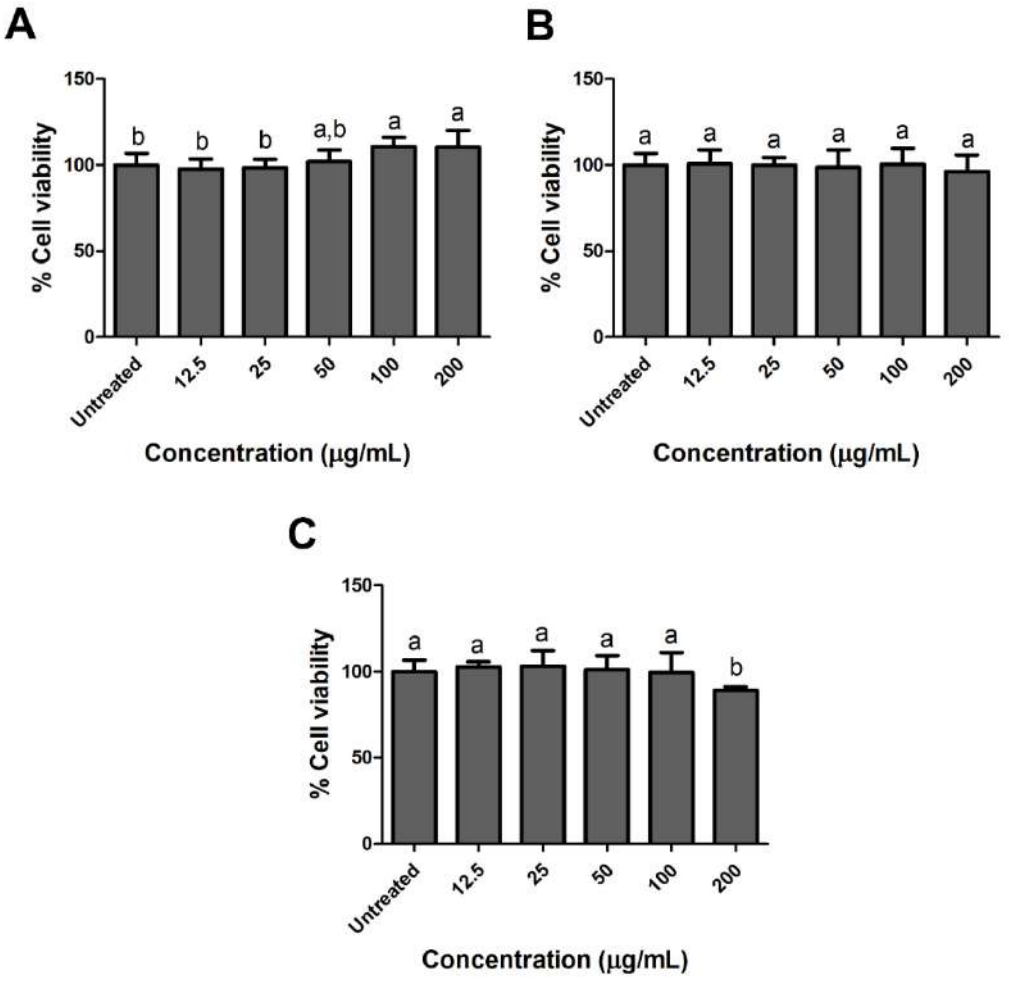
ผลของทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอลต่อเซลล์ผิวหนัง HaCaT ความเข้มข้นตั้งแต่ 12.5 – 200 µg/mL พบว่าสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำไม่ทำให้ค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงหรือไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 3A) และสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเอทานอลไม่ทำให้ค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 12.5 – 100 µg/mL ในขณะที่ความเข้มข้น 200 µg/mL ทำให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงมาที่ 87.46% ซึ่งมีความเป็นพิษน้อยต่อเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated) (รูปที่ 3B) และในส่วนของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเมทานอลไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ในทุกความเข้มข้นของการทดสอบกล่าวคือไม่ทำให้ค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 3C ซึ่งจากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ในเซลล์เพาะเลี้ยง HaCaT สรุปได้ว่าสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำและเมทานอลไม่ทำให้เกิดความเป็นต่อเซลล์ทุกความเข้มข้นของการทดสอบในขณะที่สารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT เพียงเล็กน้อยที่ความเข้มข้น 200 µg/mL ซึ่งยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์ปกติ HaCaT มาก่อน



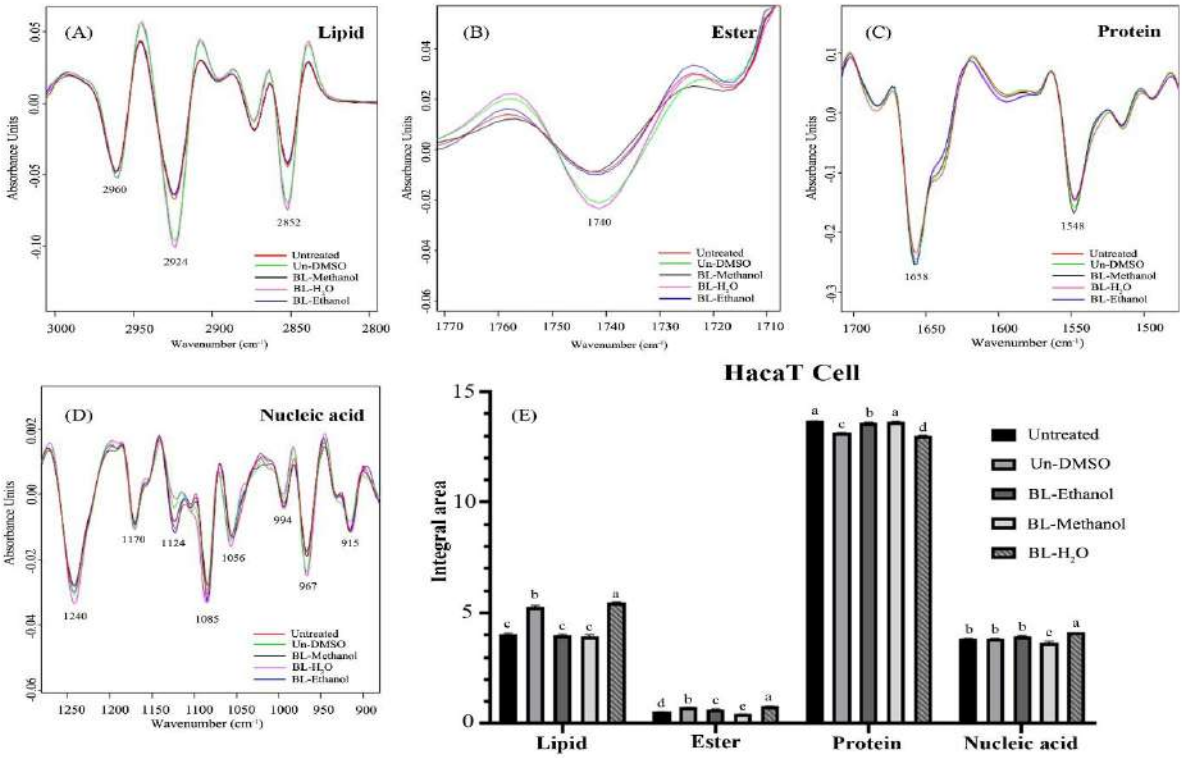
รูปที่ 3 แสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ HaCaT เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ (A) เอทานอล (B) และเมทานอล (C) (12.5 – 200 µg/mL) ข้อมูลแสดงในรูป mean ± S.D., n = 4
(สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟ แสดงถึง ความไม่แตกต่างทางสถิติ และอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟ แสดงถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$)

ผลของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ต่อเซลล์ Vero

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอลต่อเซลล์ Vero (12.5 – 200 µg/mL) พบว่าสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ (12.5 – 200 µg/mL) โดยแสดงอัตราการรอดชีวิตในช่วง 97.87 – 110.46% (รูปที่ 4A) และสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเอทานอล (รูปที่ 4B) ก็ไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ทำให้ค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ (Cell viability) เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated) ในขณะที่สารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเมทานอลไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 12.5 – 100 µg/mL ในขณะที่ความเข้มข้น 200 µg/mL ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพียงเล็กน้อยโดยมีผลต่อการลดค่าความมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 89.76% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Untreated) (รูปที่ 4C) จากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ในเซลล์เพาะเลี้ยง Vero แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำและเอทานอลไม่ทำให้เกิดความเป็นต่อเซลล์ทุกความเข้มข้นของการทดสอบโดยเฉพาะสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 100 µg/mL ซึ่งยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์นี้มาก่อน



รูปที่ 4 แสดงค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์ Vero เมื่อถูกทดสอบด้วยสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ (A) เอทานอล (B) และเมทานอล (C) (12.5 – 200 µg/mL) ข้อมูลแสดงในรูป mean ± S.D., n = 4
(สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟ แสดงถึง ความไม่แตกต่างทางสถิติ และอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟ แสดงถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$)



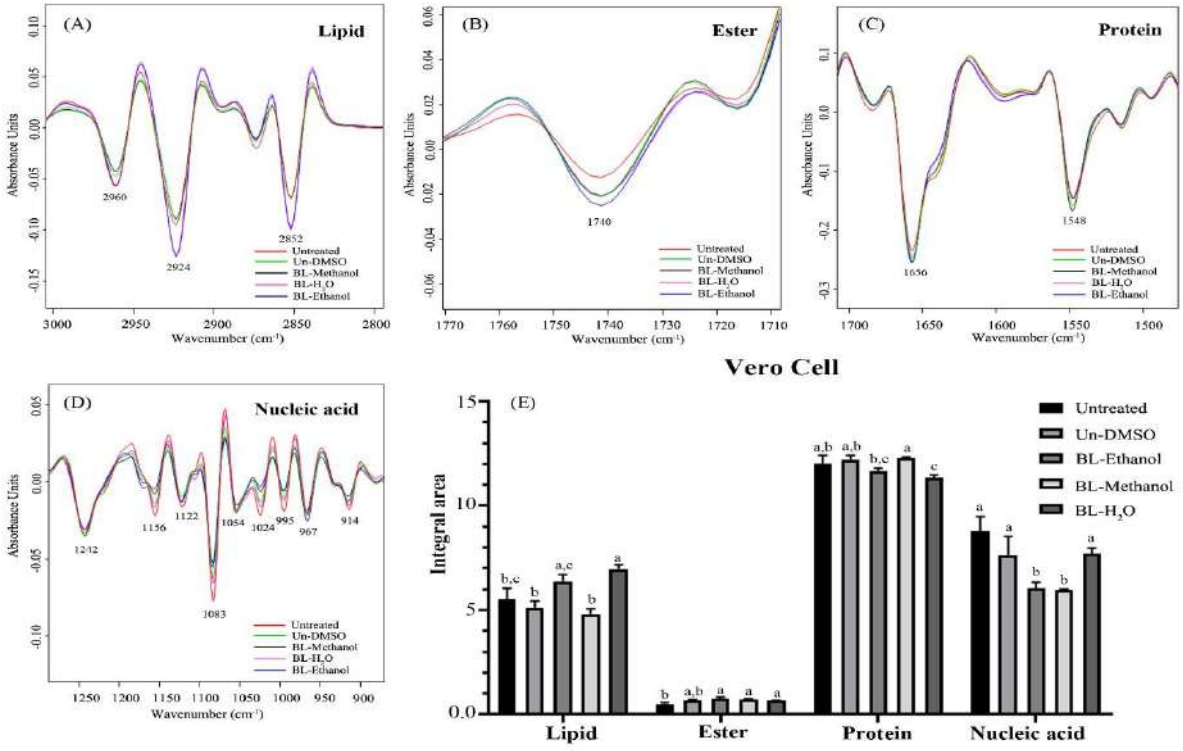
รูปที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเซลล์ HacaT ที่บริเวณหมู่ไขมัน (A) หมู่เอสเทอร์ (B) โปรตีน (C) กรดนิวคลีอิก (D) และกราฟแสดงพื้นที่ใต้กราฟของสารแต่ละตัวเปรียบเทียบกันของกลุ่มตัวอย่างเซลล์ HacaT ควบคุม (Untreated) ตัวอย่างเซลล์ HacaT ควบคุม 0.5% DMSO ในการทดสอบ (Un-DMSO) ตัวอย่างเซลล์ HacaT ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ที่สกัดจากเอทานอล (BL-Ethanol) เมทานอล (BL-Methanol) และน้ำ (BL-H_2O) (E) ข้อมูลแสดงในรูป Mean ± S.D., n=3 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟ แสดงถึง ความไม่แตกต่างทางสถิติ และอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟ แสดงถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$)

ผลการศึกษาสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ด้วยเทคนิค FTIR-Synchrotron

เมื่อทำการบ่มสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอลกับเซลล์ผิวหนัง HaCaT ที่ความเข้มข้น 200 µg/mL และนำมาการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์ เทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์และกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.5% DMSO ด้วยเทคนิค Micro-spectroscopy พบว่ากลุ่มควบคุม 0.5% DMSO และสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำมีพีคการดูดกลืนแสงของไขมันที่สูงขึ้น (รูปที่ 5A) ที่บริเวณค่าดูดกลืนแสง 2960, 2924 และ 2852 cm^{-1} (Movasaghi *et al.*, 2008) ในขณะที่กลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วยเอทานอลและเมทานอลมีค่าการดูดกลืนแสงของไขมันใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุมที่ได้รับเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับพีคค่าดูดกลืนแสงที่ 1740 cm^{-1} ของกรดไขมันเอสเทอร์ (C=O) (รูปที่ 5B) ในส่วนของพีคการดูดกลืนแสงของ Amide I (1658 cm^{-1}) และ Amide II (1548 cm^{-1}) ที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนมีค่าลดลงเมื่อบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำและกลุ่มควบคุม 0.5% DMSO (รูปที่ 5C) นอกจากนี้ยังพบว่าพีคการดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิกที่มีช่วงค่าการดูดกลืนแสงของหมู่ PO^{2-} ในช่วง 1240 cm^{-1} รวมถึงหมู่องค์ประกอบน้ำตาลไรโบสและหมู่ C=C ในช่วง 1240-967 cm^{-1} (Lasch *et al.*, 2002) ในแต่ละตัวอย่าง มีค่าเปลี่ยนแปลงขึ้นลงแตกต่างกัน (รูปที่ 5D) และเมื่อทำการวิเคราะห์พื้นที่ใต้กราฟเพื่อให้เห็นความเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารชีวโมเลกุลแต่ละตัวที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ดังกล่าว (รูปที่ 5E) จะพบว่ากลุ่มควบคุม 0.5% DMSO และสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำทำให้ไขมันและกรดนิวคลีอิกในเซลล์สูงขึ้น ในขณะที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนลดลงเพียงเล็กน้อย แสดงถึงการขยายตัวของเซลล์ในช่วงกลาง (S-phase) ที่มีการสร้าง DNA,

RNA เพิ่มขึ้น (Salman *et al.*, 2004) ส่วนสาร 0.5% DMSO ที่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของไขมันทั้งนี้อาจเกิดขึ้นได้ เนื่องจากสาร DMSO มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงชั้นไขมันของเซลล์ซึ่งจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และความเข้มข้นของสาร (Gironi *et al.*, 2020) การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ HaCaT เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเอทานอลพบว่าทำให้พีคของโปรตีนลดลง ซึ่งที่ความเข้มข้น 200 µg/mL แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เล็กน้อย เป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากผลกระทบต่อการลดลงของโปรตีนภายในเซลล์ (Zelig *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเมทานอลพบการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ใกล้เคียงกับตัวอย่างกลุ่มควบคุม

ในส่วนของเซลล์ Vero ที่ความเข้มข้น 200 µg/mL ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลในเซลล์แสดงดังรูปที่ 6 พบว่า 0.5% DMSO ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำทำให้ไขมันสูงขึ้นในขณะที่โปรตีนลดลงเล็กน้อย แต่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดนิวคลีอิก ซึ่งไม่แสดงผลของความเป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเมทานอลส่งผลให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกลดลง การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่ลดลงอาจเป็นอีกหนึ่งสัญญาณที่แสดงถึงการตายของเซลล์ได้ (Zelig *et al.*, 2009) ในขณะที่สารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยเอทานอลส่งผลต่อการลดลงของกรดนิวคลีอิกเพียงอย่างเดียว โดยเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงยังอยู่ในระดับที่ยังไม่ส่งผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ จากผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ในเซลล์ทั้งหมด ทำให้คาดการณ์ได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงกว่า 200 µg/mL อาจส่งผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น



รูปที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของเซลล์ Vero ที่บริเวณหมู่ไขมัน (A) หมู่เอสเทอร์ (B) โปรตีน (C) กรดนิวคลีอิก (D) และกราฟแสดงพื้นที่ใต้กราฟของสารแต่ละตัวเปรียบเทียบกันของกลุ่มตัวอย่างเซลล์ Vero ควบคุม (Untreated) ตัวอย่างเซลล์ Vero กลุ่มควบคุม 0.5% DMSO ในการทดสอบ (Un-DMSO) ตัวอย่างเซลล์ Vero ที่ทดสอบด้วยสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ที่สกัดจากเอทานอล (BL-Ethanol) เมทานอล (BL-Methanol) และน้ำ (BL-H_2O) (E) ข้อมูลแสดงในรูป Mean ± S.D., n=3 (สัญลักษณ์อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันบนแท่งกราฟ แสดงถึง ความไม่แตกต่างทางสถิติ และอักษรภาษาอังกฤษต่างกันที่กำกับบนแท่งกราฟ แสดงถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$)

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่าสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ด้วยน้ำ เมทานอลและเอทานอลไม่มีความเป็นพิษหรือเป็นพิษน้อยต่อเซลล์ผิวหนังชั้นบนของมนุษย์ (HaCaT) และเซลล์ไต (Vero) แม้ว่าสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์โดยเฉพาะไขมันและกรดนิวคลีอิก แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ส่งผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ แต่อาจจะก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในแง่ของการทำงานอื่นๆ ซึ่งต้องมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไป ดังนั้นพืชสมุนไพรถึงแม้จะมีฤทธิ์การรักษาโรคต่างๆ ก็ควรที่จะมีการศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นก่อนเพื่อให้เกิดการตระหนักในการใช้อย่างระมัดระวังที่สุดเพราะอาจเสี่ยงต่อความเป็นพิษได้ ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นรายงานการวิจัยชิ้นแรกที่ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์ปกติ ซึ่งจะเป็นการยืนยันความเป็นพิษเบื้องต้นในการนำสารสกัดเสลดพังพอนตัวผู้ไปใช้ได้อย่างปลอดภัยและสามารถพัฒนาไปเป็นเภสัชภัณฑ์เพื่อใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคต่อไปในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยและพัฒนา งบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 จากคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

References

Agatonovic-Kustrin S, Doyle E, Gegechkori V, Morton DW. High-performance thin-layer chromatography linked with (bio) assays and FTIR-ATR spectroscopy as a method for discovery and quantification of bioactive components in native Australian plants. *J Pharm Biomed Anal* 2020; 184: 113208.

Chaithada P, Supapan J, Supapan J, Rodthuk P, Rodthuk P, Chainarong S, Chainarong S. Total flavonoids, total phenolic content and antioxidant activity from fruits, leaves, twigs and flowers of *Mesua ferrea* L. *Walailak J Sci & Tech* 2018; 15(4): 295-304.

Chomnawang MT, Surassmo S, Wongsariya K, Bunyapraphatsara N. Antibacterial activity of Thai medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 2009; 80: 102-104.

Gironi B, Kahveci Z, McGill B, Lechner BD, Pagliara S, Metz J, Morresi A, Palombo F, Sassi P, Petrov PG. Effect of DMSO on the mechanical and structural properties of model and biological membranes. *Biophys J* 2020; 119: 274-286.

Ismail-Suhaimy NW, Gani SSA, Zaidan UH, Halmi MIE, Bawon P. Optimizing conditions for microwave-assisted extraction of polyphenolic content and antioxidant activity of *Barleria lupulina* Lindl. *Plants* 2021; 10(4): 682.

Kumari R, Dubey RC. Phytochemical analysis and antibacterial and cytotoxic properties of *Barleria lupulina* Lindl. extracts. *J Plant Pathol Microbiol* 2016; 7(10): 380.

Kumari R, Kumar S, Kumar A, Goel KK. Dubey C. Antibacterial, antioxidant and immuno-modulatory properties in extracts *of Barleria lupulina* Lindl. *BMC Complement Altern Med* 2017; 17(1): 484.

Lans C, Harper T, Georges K, Bridgewater E. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters Trinidad. *BMC Complement Altern Med* 2001; 1: 10.

Lasch P, Boese M, Pacifico A, Diem M. FT-IR spectroscopic investigations of single cells on the subcellular level. *Vib Spectrosc* 2002; 28: 147-157.

Lee SR, Clardy J, Senger DR, Cao S, Kim KH. Iridoid and phenylethanoid glycosides from the aerial part of *Barleria lupulina*. *Rev Bras Farmacogn* 2016; 26: 281-284.

Mazumder PM, Paramaguru R, Mohanty A, Sasmal, D. Evaluation of *in vitro* anticataract activity and aldose reductase potential of *Barleria lupulina* Lindl. *Pharmacologia* 2014; 5(5): 172-176.

Moin S, Babu SS, Mahalakshmipriya A. In vitro callus production and antibacterial activity of *Barleria lupulina* lindl. *Asia Pac J Mol Biol Biotechnol* 2012; 20: 59-64.

Moosavinejad SM, Madhoushi M, Vakili M, Rasouli D. Evaluation of degradation in chemical compounds of wood in historical buildings using ft-ir and ft-raman vibrational spectroscopy. *Maderas, Cienc tecnol* 2019; 21(3): 381-392.

Movasaghi Z, Rehman S, Rehman DI. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Appl Spectrosc Rev* 2008; 43: 134-179.

Phosri S, Jangpromma N, Chang LC, Tan GT, Wongwiwatthananukit S, Maijaroen S, Anwised P, Payoungkiattikun W, Klaynongsruang S. Siamese crocodile white blood cell extract inhibits cell proliferation and promotes autophagy in multiple cancer cell lines. *J Microbiol Biotechnol* 2018; 28(6): 1007-1021.

Rattanakiat, S. Anti-herpes simplex virus type 2 activities of some Thai medicinal plants. *Thai J Pharm Sci* 2006; 30: 19-27.

Reanmongkol W, Subhadhirasakul S. Antinociceptive effects of *Barleria lupulina* extracts in mice. *Songklanakarin J Sci Technol* 1997; 19(2): 89-95.

Reanmongkol W, Subhadhirasakul S, Muneemonai K, Nathong K, Rangkla G, Takayama H. Antipyretic activity of *Connarus semidecandrus* extract in rats. *Songklanakarin J Sci Technol* 2000; 2(2): 191-198.

Salmana A, Sahua RK, Bernshtainb E, Zeliga U, Goldsteinc J, Walfischd S, Argovc S, Mordechai S. Probing cell proliferation in the human colon using vibrational spectroscopy: a novel use of FTIR-microspectroscopy. *Vib Spectrosc* 2004; 34: 301-308.

Sarmad M, Mahalakshmipriya A, Senthil K. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of *Barleria lupulina* essential oil. *J Herbs Spices Med Plants* 2012; 18: 101-109.

Satrayavivad J, Suksamran A, Tanasomwong W. The antiinflammatory action of iridoids obtained from *Barleria lupulina*. *Princess Congress I* 1987; 26: 10-13.

Senger DR, Hoang MV, Kim KH, Li C, Cao S. Anti-inflammatory activity of *Barleria lupulina* : Identification of active compounds that activate the Nrf2 cell defense pathway, organize cortical actin, reduce stress fibers, and improve cell junctions in microvascular endothelial cells. *J Ethnopharmacol* 2016; 193: 397-407.

Suba V, Murugesan T, Arunachalam G, Mandal SC, Saha BP. Anti-diabetic potential of *Barleria lupulina* extract in rats. *Phytomedicine* 2004; 11(2-3): 202-205.

Suksamrarn S, Wongkrajang K, Kirtikara K, Suksamrarn A. Iridoid glucosides from the flowers of *Barleria lupulina*. *Planta Med* 2003; 69: 877-879.

Wanikiat P, Panthong A, Sujayanon P, Yoosook C, Rossi AG, Reutrakul V. The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. *J Ethnopharmacol* 2008; 116(2): 234-244.

Yoosook C, Panpisutchai Y, Chaichana S, Santisuk T, Reutrakul V. Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. *J Ethnopharmacol* 1999; 67(1999): 179-187.

Zavoi S, Fetea F, Ranga F, Pop RM, Baciu A, Socaciu C. Comparative fingerprint and extraction yield of medicinal herb phenolics with hepatoprotective potential, as determined by UV-vis and FT-MIR spectroscopy. *Not Bot Horti Agrobo* 2011; 39(2): 82-89.

Zelig U, Kapelushnik J, Moreh R, Mordechai S, Nathan I. Diagnosis of Cell Death by Means of Infrared Spectroscopy. *Biophys J* 2009; 97: 2107-2114.