

ฤทธิ์ป้องกันดีเอ็นเอเสียหายของสารสกัดจากใบและลำต้นของสมุนไพรกรรณำ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

DNA damage protection activities of different solvents from

Scoparia dulcis leaf and stem extracts

เนตรนภา ชะนะ^{1*} และ จิราภา ไชยแก้ว¹

Netnapa Chana^{1*} and Jirapa Chaikaew¹

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาฤทธิ์การป้องกันดีเอ็นเอเสียหายจากอนุมูลอิสระ ของสารสกัดจากใบและลำต้นของสมุนไพรกรรณำที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ 5 ชนิด คือ เมทานอล บิวทานอล เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล และบิวทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายชนิดที่มีสภาพขั้วค่อนข้างสูง มีฤทธิ์ในการป้องกัน supercoiled plasmid DNA เสียหายจากอนุมูลอิสระได้ ทั้งสารสกัดจากใบและลำต้น นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากใบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและเฮกเซน สามารถป้องกัน supercoiled plasmid DNA ได้เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากส่วนลำต้นไม่สามารถป้องกันความเสียหายต่อ supercoiled plasmid DNA ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม ในส่วนของสารสกัดจากใบ ไม่สามารถป้องกันความเสียหายของ supercoiled plasmid DNA ได้ ส่วนสารสกัดจากลำต้นสามารถป้องกันดีเอ็นเอเสียหายได้ นอกจากนี้พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 3 mg/ml จะชักนำการทำลายดีเอ็นเอได้อีกด้วย นอกจากการศึกษาศักยภาพต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากต้นกรรณำแล้ว การศึกษาในครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่า วิธี DNA nicking assay สามารถปรับใช้กับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายหลากหลายชนิดได้

คำสำคัญ: ต้นกรรณำ, ดีเอ็นเอ, ตัวทำละลาย, อนุมูลอิสระ

ABSTRACT: This study was aimed to evaluate the DNA damage protective activities of 5 various solvents including methanol, butanol, ethyl acetate, chloroform, and hexane fraction from *Scoparia dulcis* leaf and stem extracts. In methanolic and butanolic leaf and stem extracts exhibited an efficiency of supercoiled plasmid DNA damage inhibition caused by free radicals. The ethyl acetate and hexane extracts of the leaves also possessed supercoiled plasmid DNA protection activity. However, the stem extracts could not be able to protect supercoiled plasmid DNA. Next to chloroform extract of leaf parts did not show any inhibitory effect, but stem part indicated DNA damage protection. In addition, at 3 mg/ml of the extracts induce reductive damage to the DNA. With this established *S. dulcis* antioxidant activity the conditions for the DNA nicking assay for various solvents used for the extraction was obtained.

Keywords: *Scoparia dulcis* Linn, DNA, solvents, free radicals

¹ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จ.พัทลุง 93210

Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung campus, Phatthalung 93210

* Corresponding author: netnapa.saelee@hotmail.com

บทนำ

ในปัจจุบันปัญหาสุขภาพมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารพิษ สารเคมี สารก่อมะเร็ง และการบริโภคอาหารที่มี แป้ง และไขมัน เกินสมดุล ทำให้เกิดโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง โรคมะเร็ง และโรคหัวใจขาดเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตติดอันดับต้นๆ ของคนไทย ความต้องการผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ที่มีคุณค่าช่วยป้องกัน รักษาในด้านสุขภาพ จึงเป็นกระแสที่นิยมมากขึ้น ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีสมุนไพรมากมายหลายชนิด แต่การนำสมุนไพรมาใช้รักษาโรคยังมีข้อจำกัด เนื่องจากขาดองค์ความรู้ในการรักษาเชิงวิทยาศาสตร์ จึงทำให้การนำสมุนไพรไทยไปประยุกต์ใช้ในการทางการแพทย์มีน้อยมาก (วัชรวิพร, 2547)

ต้นกรตน้ำ (*Scoparia dulcis* Linn.) มีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่า Sweet broomweed เป็นสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ในหลายๆ ประเทศ ทั้งในแถบอเมริกา ยุโรป แอฟริกา และเอเชีย มีรายงานทางวิทยาศาสตร์ในการนำต้นกรตน้ำจากประเทศต่างๆ ไปใช้ประโยชน์ โดยใช้รักษาโรคเบาหวาน ซึ่งพบว่าสารสกัดสามารถลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด และกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Pari and Latha, 2005) ป้องกันการอักเสบของเนื้อเยื่อต่างๆ โดยลดกิจกรรมของเอนไซม์ไซโคล-ออกซีจีเนส ชนิดที่ 2 (cyclooxygenase-2; COX-2) ลดปริมาณ nitric oxide และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) กลูตาไทโอน เพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase; GPx) และกลูตาไทโอนรีดักเทส (glutathione reductase; GRD) (Tsai et al., 2011) รักษาโรคความดันโลหิตสูง ช่วยรักษาแผล ป้องกันไม่ให้ไต หัวใจ และตับถูกทำลายจากโรคหุนัขแคดเมียม (Adaikpoh et al., 2007) ช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก DU-145 ยับยั้งไวรัส แบคทีเรีย รา และยุงที่ก่อโรค (Zulfiker et al., 2011; Wankhara et al., 2015) ป้องกัน

การอักเสบของเส้นประสาทในเซลล์สมอง ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอัลไซเมอร์ และป้องกันการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยคาดว่าสารสกัดมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Coulibaly et al., 2011) อนุมูลอิสระ หรือ Reactive oxygen species (ROS) จะส่งผลทำลายโครงสร้างของไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอภายในเซลล์ ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้ เปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ ส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายและตายในที่สุด โดยเฉพาะการทำลายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดโรคต่างๆ ที่เกี่ยวกับระบบประสาทในสมอง เช่น อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน และโรคมะเร็ง (Jackson and Bartek, 2009) ดังนั้น การป้องกันการทำลายดีเอ็นเอ จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันโรคได้ วิธี DNA nicking assay เป็นวิธีที่น่าสนใจ เนื่องจากเกี่ยวข้องกับสารชีวโมเลกุลในเซลล์โดยตรง จากรายงานของ Verma et al. (2009), Golla and Bhimathati. (2014), Leba et al. (2014), Sharma et al. (2016) และ Zhu et al. (2017) พบว่า วิธี DNA nicking assay นำมาใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชได้ โดยจะมีอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton) ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^\bullet + \text{OH}^-$) ส่งผลให้รูปร่างของ DNA เปลี่ยนจาก supercoiled DNA เป็น nicked DNA และมีการเคลื่อนที่ผ่านเจลแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Fe^{2+} สามารถทำให้ดีเอ็นเอเสียหายได้โดยตรง โดยไม่ผ่านไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Flemmig and Arnhold, 2007) สารสกัดจากพืชที่นำมาทดสอบด้วยวิธีนี้ ส่วนใหญ่จะสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูง เช่น น้ำและเมทานอล สารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ มีรายงานน้อยมาก แต่อย่างไรก็ตาม ตัวทำละลายอินทรีย์จะไปยับยั้งปฏิกิริยาเฟนตัน ทำให้สามารถยับยั้งความเสียหายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ (Leba et al., 2014) ดังนั้น การพัฒนาวิธี DNA nicking assay เพื่อปรับใช้กับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน และไม่กระทบกับการยับยั้งความเสียหายของดีเอ็นเอจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

งานวิจัยก่อนหน้านี้คณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบจากต้นกรรณำใน จ. สงขลา จากส่วนเหนือดินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าส่วนราก (เนตรนภา และคณะ, 2557) รายงานการวิจัยของ Coulibaly et al. (2012) พบว่า สารสกัดหยาบจากต้นกรรณำที่สกัดด้วยเมทานอล และอะซิโตน และอะซิโตนในน้ำ มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด (MIC 12.5 mg/ml) สารสกัดอะซิโตนในน้ำ มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. typhimurium* ได้ดีที่สุด (MIC 1.56 mg/ml) สารสกัดที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. cereus* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 mg/ml และสารสกัดที่สกัดด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *A. niger* และ *P. roquefortii* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC 6.25 mg/ml จากงานวิจัยดังกล่าวแสดงว่า ตัวทำละลายมีผลต่อฤทธิ์การต้านเชื้อชนิดต่างๆ

ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้วัตถุประสงค์เพื่อ ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นกรรณำ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ 5 ชนิด คือ เมทานอล บิวทานอล เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ในการป้องกันการทำลาย supercoiled plasmid DNA จากอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DNA nicking assay ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นการส่งเสริมการนำสมุนไพรไทยไปใช้ประโยชน์ ในการรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ และการเสียหายของดีเอ็นเอ

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่างและการสกัดสาร

เก็บตัวอย่างต้นกรรณำที่ปลูกในพื้นที่ จ. สงขลา มาล้างทำความสะอาด และผึ่งให้สะเด็ดน้ำ แยกส่วนลำต้นและใบออกจากกัน ซึ่งน้ำหนักมาอย่างละ 30 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมตัวทำละลายเฮกเซน (99%) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการสกัดเป็นระยะเวลา 3 วัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำกากตัวอย่างแช่ต่อไปในตัวทำละลายชนิดเดิม รวมสารละลายส่วนใส่เข้าด้วยกัน นำกากตัวอย่างที่เหลือ มาทำการแช่สกัดต่อด้วยคลอโรฟอร์ม (99%) เป็นระยะเวลา 3 วัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการสกัดสารซ้ำ และนำกาก

ตัวอย่างไปสกัดสารต่อโดยใช้เอทิลอะซิเตท (99.8%) เป็นระยะเวลา 3 วัน กรองและสกัดสารซ้ำ จากนั้นนำตัวอย่างไปสกัดสารต่อด้วยบิวทานอล (99.4%) และเมทานอล (99%) ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบไประเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) นำไปชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ ในส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยเมทานอล บิวทานอลและ เอทิลอะซิเตท นำมาละลายในน้ำ ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม และเฮกเซน นำมาละลายด้วย 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2. การศึกษาผลของสารสกัดต่อการป้องกัน DNA เสียหายจากอนุมูลอิสระ โดยวิธี DNA nicking assay

นำแบคทีเรีย *E. coli* top10 ที่มีพลาสมิด pUC 19 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มีแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 µg/ml และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 - 18 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวๆ จากจานอาหารมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 µg/ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16- 18 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที ทำการสกัดพลาสมิด pUC19 จากแบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้ชุด Plasmid DNA Purification Kit ของ QIAGEN ดำเนินการตามวิธีการของชุด kit นำพลาสมิดที่สกัดได้ มาใช้เพื่อศึกษาการป้องกันการทำลายของดีเอ็นเอ โดยทำตามวิธีของ Saelee et al. (2011) คือเติมพลาสมิด pUC19 ปริมาณ 200 ng ผสมกับสารสกัด ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1, 2 และ 3 mg/ml และผสมด้วย MCO system ซึ่งประกอบด้วย 3 µM ของ FeCl₃ และ 10 mM ของ DTT ปรับปริมาตรรวมด้วยน้ำกลั่น ให้ครบ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis และวิเคราะห์ผลด้วย Image Lab™ software ของบริษัท Bio-Rad นำพื้นที่แถบดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ได้ มาสร้างกราฟโดยแถบ supercoiled DNA ที่ไม่ได้บ่มสารสกัดและ MCO system เทียบเป็น 100% หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบแถบ supercoiled DNA และ nicked DNA ในกลุ่มตัวอย่าง

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ทำการสกัดสารในส่วนเหนือดินจากต้นกรรณิศา โดยแยกส่วนใบและลำต้นออกจากกัน และสกัดสารด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ 5 ชนิด คือ เมทานอล บิวทานอล เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน โดยตัวทำละลายที่ใช้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน จากนั้นนำไปทดสอบการป้องกันดีเอ็นเอถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DNA nicking assay จากการสกัดสารด้วยเมทานอล และทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด (Figure 1) พบว่า ทั้งส่วนของสารสกัดจากลำต้นและใบมีฤทธิ์ในการป้องกัน supercoiled plasmid DNA เสียหายจากอนุมูลอิสระ โดยพบแถบ supercoiled DNA ในตัวอย่างที่มีการเติมสารสกัดจากต้นกรรณิศา (Figure 1A,1B; lane 3-6) มากกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมสารสกัดจากต้นกรรณิศา (Figure 1A,1B; lane 2) ใน lane 1 เป็นตัวอย่าง DNA ที่ไม่ได้บ่มด้วยอนุมูลอิสระ จึงไม่เกิดการทำลาย supercoiled plasmid DNA เมื่อนำแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาพื้นที่ด้วยโปรแกรม Image Lab และนำข้อมูลไปสร้างกราฟ พบว่าสารสกัดจากลำต้นป้องกันการทำลายของดีเอ็นเอจากอนุมูลอิสระได้ดี

ที่สุด (Figure 1C) ที่ความเข้มข้น 2 mg/ml สารสกัดจากใบ ป้องกันดีเอ็นเอได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1 mg/ml โดยสารสกัดจากลำต้นป้องกันดีเอ็นเอเสียหายได้ดีกว่าสารสกัดจากใบ

สารสกัดที่สกัดด้วยบิวทานอล มีฤทธิ์ในการป้องกัน supercoiled plasmid DNA เสียหายจากอนุมูลอิสระ ได้ทั้งสารสกัดจากลำต้นและใบเช่นเดียวกันกับสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล แสดงผลดัง Figure 2 โดยสารสกัดจากลำต้นมีฤทธิ์ในการป้องกันดีเอ็นเอเสียหายได้ดีกว่าสารสกัดจากใบ (Figure 2C) และที่ความเข้มข้น 1 mg/ml (lane 4) ให้ฤทธิ์ดีที่สุด โดยมี % Relative intensity 36% ส่วนสารสกัดจากใบที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทและเฮกเซน สามารถป้องกัน supercoiled plasmid DNA ได้ดีที่ความเข้มข้น 1 mg/ml และ 2 mg/ml ตามลำดับ (Figure 3C, 4C) ส่วนสารสกัดจากลำต้น ไม่สามารถป้องกัน supercoiled plasmid DNA (Figure 3C, 4C) เช่นเดียวกับสารสกัดจากใบที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม แต่ในส่วนของสารสกัดจากลำต้นด้วยคลอโรฟอร์ม ป้องกัน supercoiled plasmid DNA ได้ดีที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml (Figure 5C)

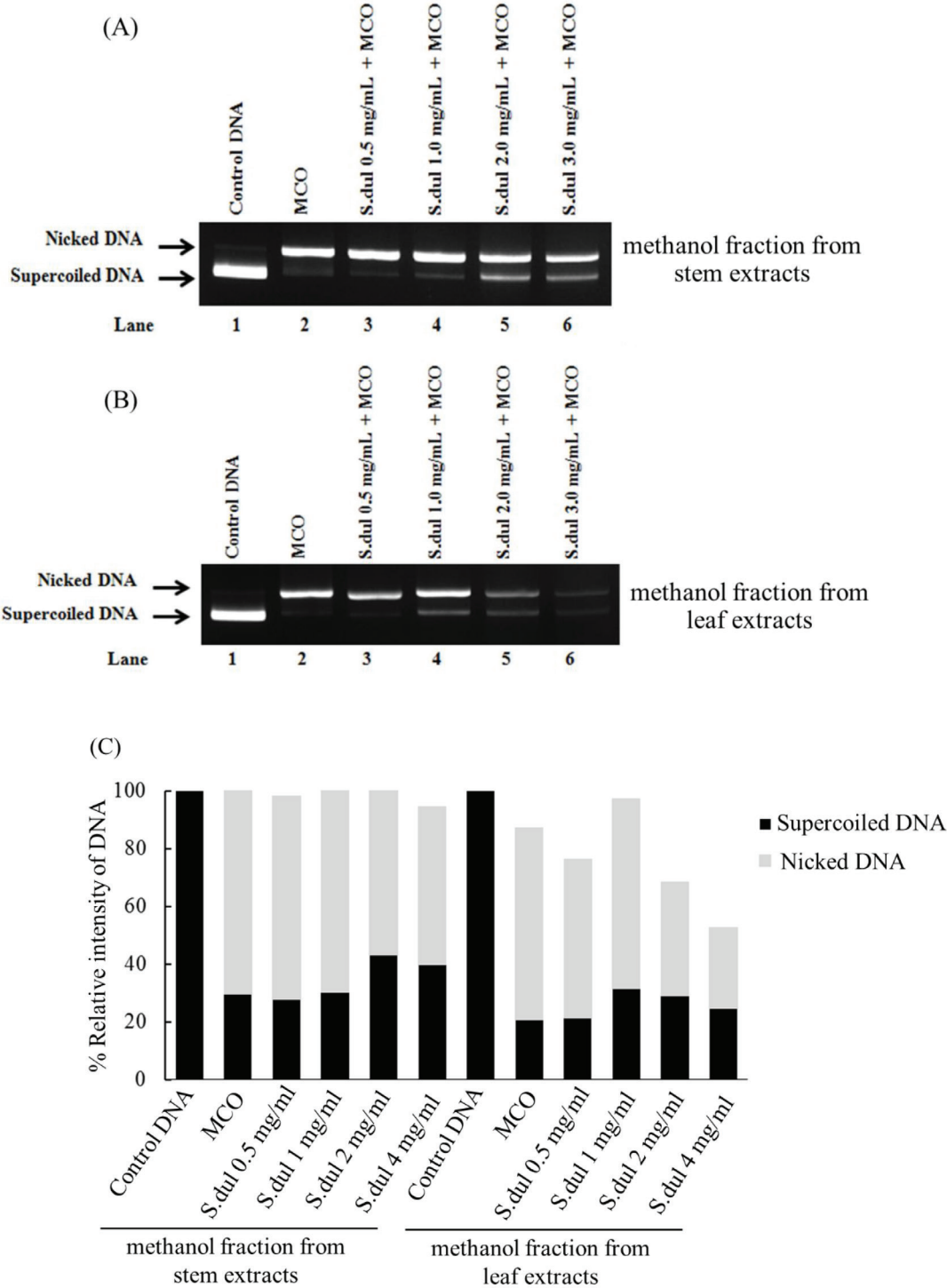


Figure 1 The DNA protection assay of methanol fraction from *Scoparia dulcis* stem and leaf extracts. Treatment of plasmid DNA with the extracts in absence and presence of metal-catalyzed oxidation. (A) Analysis result by 0.8% agarose gel electrophoresis for stem extracts and (B) leaf extracts. (C) Analysis images with Image Lab software from Bio-Rad.

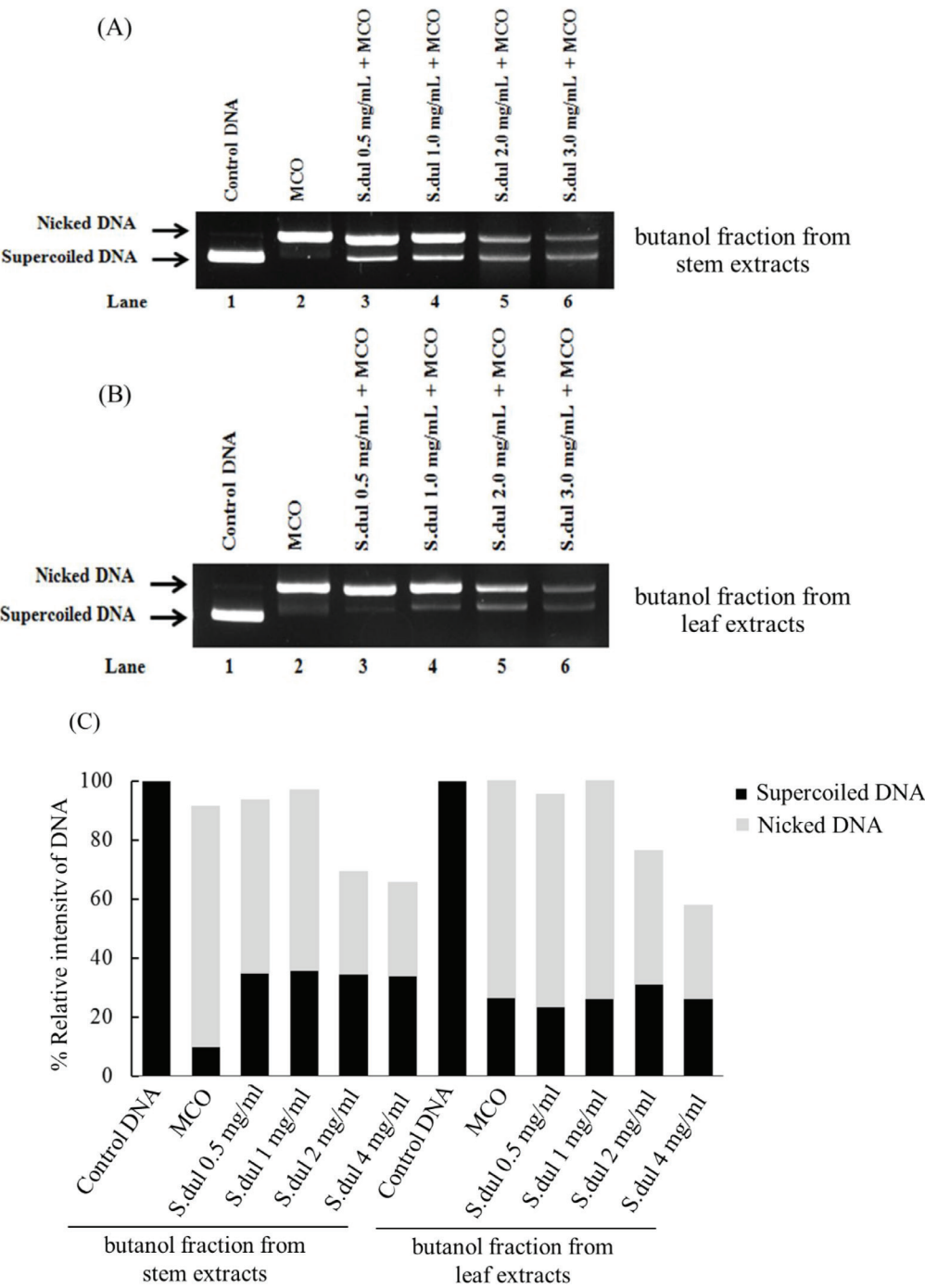


Figure 2 The DNA protection assay of butanol fraction from *Scoparia dulcis* stem and leaf extracts. Treatment of plasmid DNA with the extracts in absence and presence of metal-catalyzed oxidation. (A) Analysis result by 0.8% agarose gel electrophoresis for stem extracts and (B) leaf extracts. (C) Analysis images with Image Lab software from Bio-Rad.

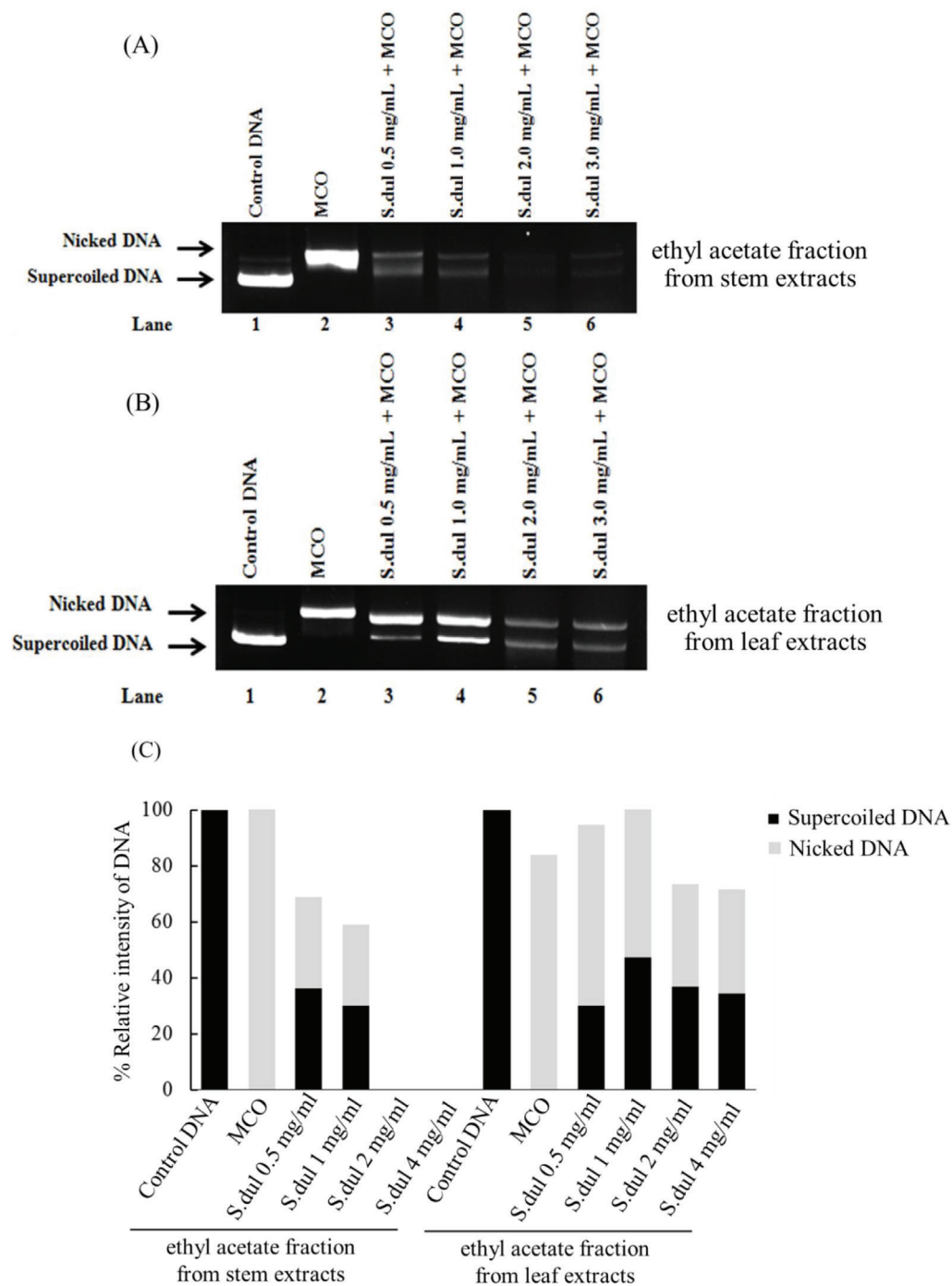


Figure 3 The DNA protection assay of ethyl acetate fraction from *Scoparia dulcis* stem and leaf extracts. Treatment of plasmid DNA with the extracts in absence and presence of metal-catalyzed oxidation. (A) Analysis result by 0.8% agarose gel electrophoresis for stem extracts and (B) leaf extracts. (C) Analysis images with Image Lab software from Bio-Rad.

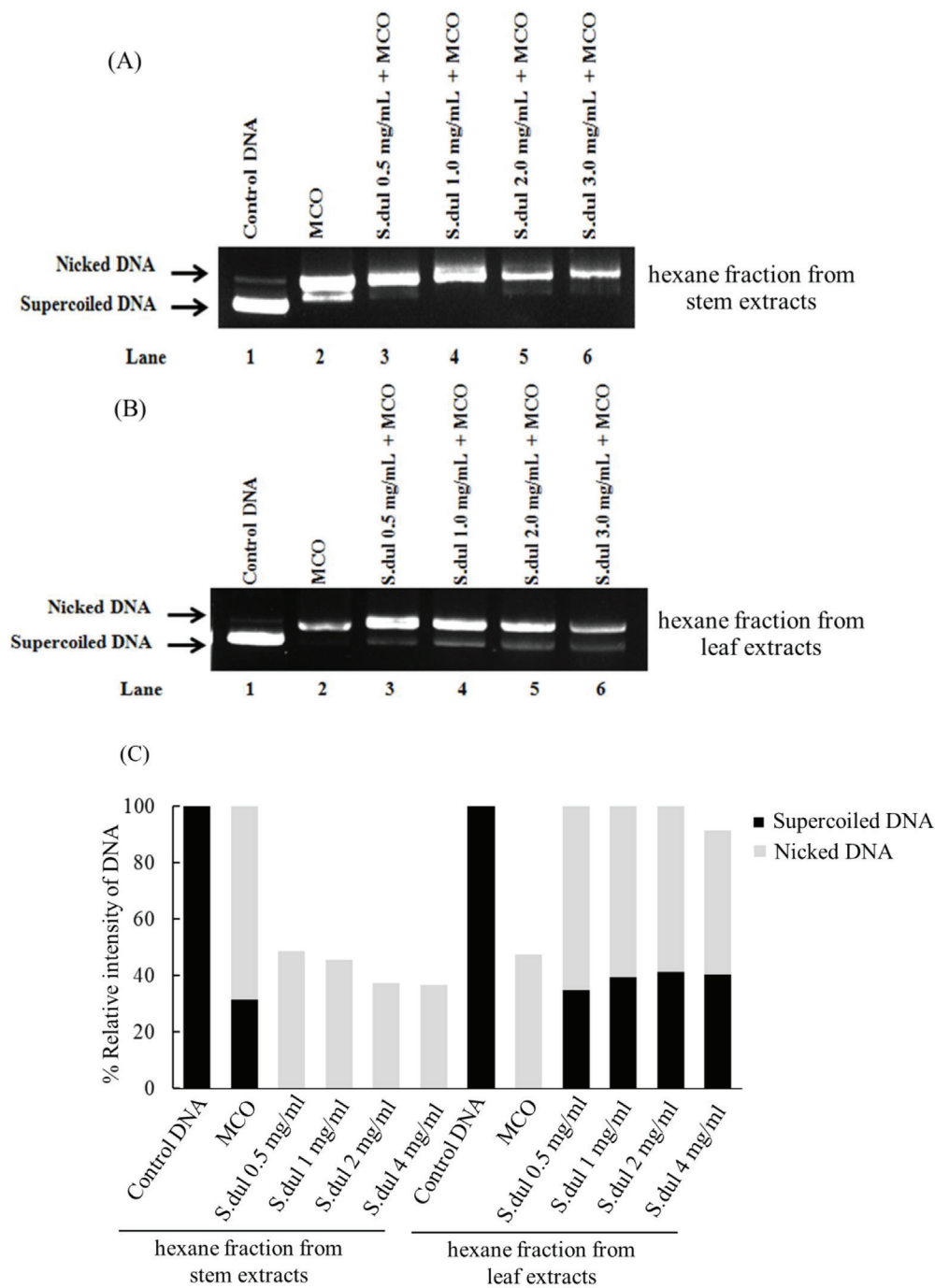


Figure 4 The DNA protection assay of hexane fraction from *Scoparia dulcis* stem and leaf extracts. Treatment of plasmid DNA with the extracts in absence and presence of metal-catalyzed oxidation. (A) Analysis result by 0.8% agarose gel electrophoresis for stem extracts and (B) leaf extracts. (C) Analysis images with Image Lab software from Bio-Rad.

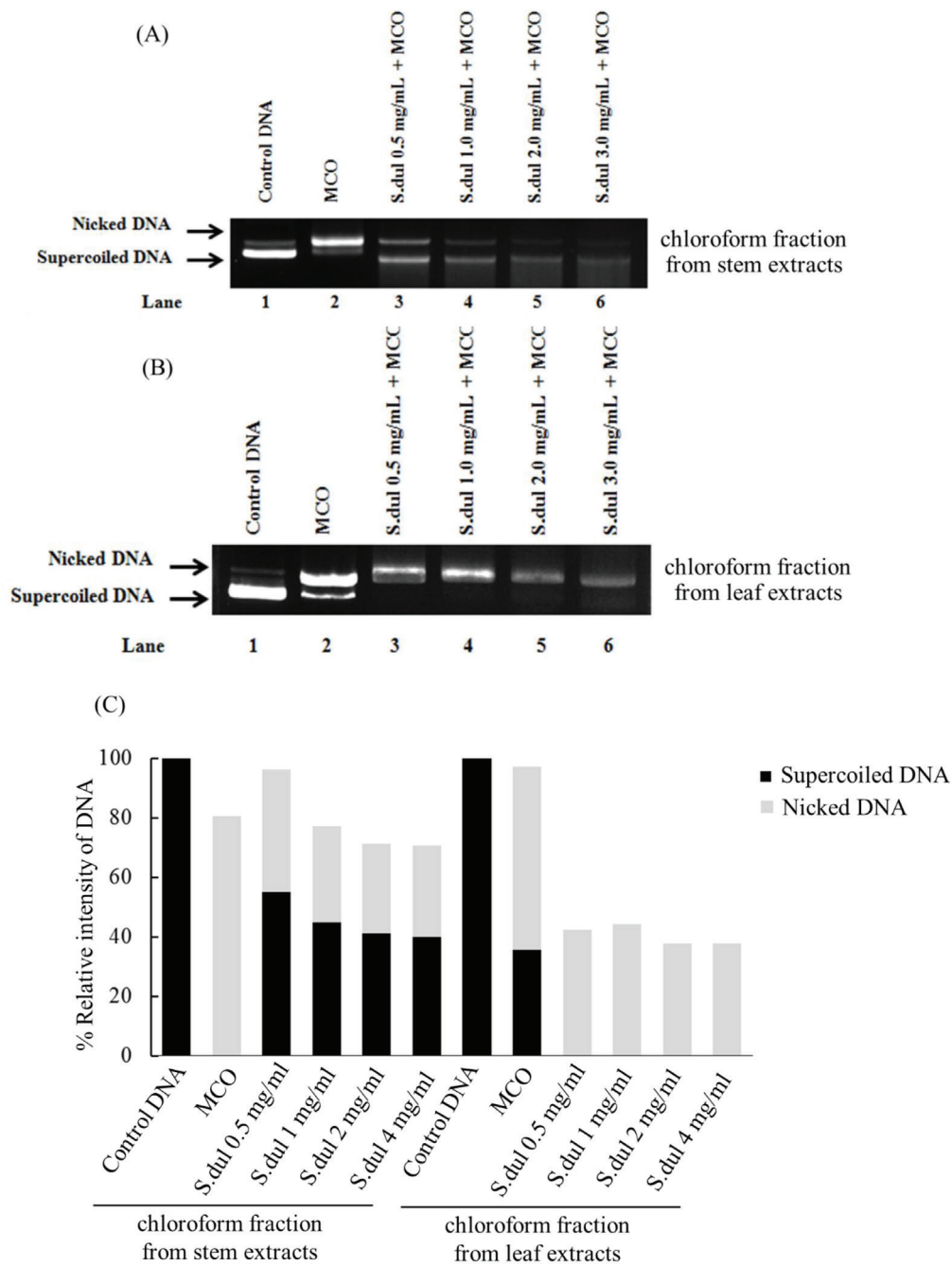


Figure 5 The DNA protection assay of chloroform fraction from *Scoparia dulcis* stem and leaf extracts. Treatment of plasmid DNA with the extracts in absence and presence of metal-catalyzed oxidation. (A) Analysis result by 0.8% agarose gel electrophoresis for stem extracts and (B) leaf extracts. (C) Analysis images with Image Lab software from Bio-Rad.

นอกจากนี้พบว่า สารสกัดที่สกัดได้ส่วนใหญ่แล้ว ที่ความเข้มข้น 3 mg/ml จะชักนำการทำลายดีเอ็นเอ โดยพบว่าในหลอดที่เติมสารสกัดและอนุมูลอิสระ (lane 6) จะมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่าหลอดดีเอ็นเอเริ่มต้น (lane 1) แสดงว่า สารสกัดยับยั้งที่ความเข้มข้นสูง อาจส่งผลทำลายโครงสร้างของดีเอ็นเอ เนื่องจากที่ความเข้มข้น 3 mg/ml อาจจะมีสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) อยู่ในปริมาณมาก ซึ่งส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งทำหน้าที่ถ่ายโอนอิเล็กตรอนไปยังอนุมูลอิสระ ทำให้ดีเอ็นเอไม่ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ แต่หากปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงจนเกินไป ทำให้เกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนไปยังเบสในนิวคลีโอไทด์ ส่งผลให้พันธะในดีเอ็นเอถูกทำลาย (Jackson and Bartek, 2009 ; Lu et al., 2013; Nimse et al., 2015) ผลการทดลองในครั้งนี้ให้ผลเหมือนกันกับฤทธิ์ป้องกันดีเอ็นเอเสียหายจากสารสกัดจากข้าวหมาก (Kong et al., 2015)

ดังนั้นฤทธิ์การป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอ นอกจากขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายแล้ว ยังพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดก็เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อการป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่มีช่วงค่อนข้างสูง ได้แก่ เมทานอล และบิวทานอล สามารถป้องกันการเสียหายของ supercoiled plasmid DNA ได้ดีกว่าตัวทำละลายที่มีช่วงต่ำจนถึงปานกลาง ได้แก่ เอทิลอะซิเตต คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายที่มีสภาพช่วงค่อนข้างสูง จะสกัดสารในกลุ่มที่มีขั้วได้ดี เช่น สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ส่วนตัวทำละลายที่มีช่วงค่อนข้างต่ำ จะส่งผลต่อการสกัดสารในกลุ่มที่มีขั้วต่ำได้ดี

Leba et al. (2014) ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจาก *Oenocarpus bataua* และ *Camellia sinensis* ด้วยวิธี DNA nicking โดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือ น้ำ เมทานอล และอะซิโตน ซึ่งน้ำจัดเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เมทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วสูง ส่วนอะซิโตนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขั้ว

ค่อนข้างสูงแต่ต่ำกว่าเมทานอล โดยพบว่า ตัวทำละลายต่างชนิดกัน จะต้องใช้ความเข้มข้นของตัวทำละลาย (solvent), FeSO₄, EDTA และระยะเวลาในการบ่มสารไม่เท่ากัน ในการทดลองนี้ ได้ใช้ 10% DMSO ในการละลายสารสกัด ในกลุ่มที่ไม่ละลายน้ำ และนำไปทดสอบฤทธิ์ด้วยวิธี DNA nicking พบว่าสารละลาย 10% DMSO ไม่ส่งผลต่อการป้องกันดีเอ็นเอเสียหายจากอนุมูลอิสระ (Figure 4, 5; lane 2) ดังนั้นวิธี DNA nicking assay ที่นำมาวิเคราะห์ในการทดลองนี้สามารถนำไปปรับใช้กับสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายหลากหลายชนิดได้ จากผลการทดลองทั้งหมดในครั้งนี้ จึงสนับสนุนการนำสมุนไพรต้นกระดน้ำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย และตลอดจนรักษาโรคอื่นๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ

สรุป

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นกระดน้ำต่อการป้องกันดีเอ็นเอเสียหายจากอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DNA nicking assay พบว่า สารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล และบิวทานอล ซึ่งมีสภาพช่วงค่อนข้างสูง มีฤทธิ์ในการป้องกันดีเอ็นเอเสียหายจากอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต คลอโรฟอร์ม และเฮกเซน ซึ่งมีสภาพช่วงต่ำจนถึงปานกลาง ดังนั้นตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วสูง จะสกัดสารในกลุ่มที่มีขั้วสูง ซึ่งออกฤทธิ์ในการป้องกันการเสียหายของดีเอ็นเอได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 ขอขอบคุณ ผศ.ดร. สมพงศ์ โททอง และสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เนตรนภา แซ่หลี่, นันทรัตน์ พุกษาพิทักษ์ และอมรรัตน์ พงศ์ดารา. 2557. ฤทธิ์ของต้นกรรณิศา (*Scoparia dulcis* Linn.) ต่อการต้านอนุมูลอิสระ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 3: 161-168.
- วัชรพร คงวิลาด. 2543. เมื่อคุณเป็นโรคเบาหวาน สมุนไพรและพืชพื้นบ้านช่วยคุณได้. เกษตรกรรมธรรมชาติ. 8.
- Adaikpoh, M. A., N.E.J. Orhue, and I. Igbe. 2007. The protective role of *Scoparia dulcis* on tissue antioxidant defense system of rats exposed to cadmium. Afr. J. Biotechnol. 10: 1192-1196.
- Coulibaly, A.Y., P.A.E.D. Sombie, A. Tibiri, M. Kiendrebeogo, M.M.Y. Compaore, and O.G. Nacoulma. 2011. Protective Effect of *Scoparia dulcis* on Brain and Erythrocytes. Curr. Res. J. Biol. Sci. 3: 254-261.
- Coulibaly, A.Y., K. Konate, P.A. Sombie, M. Kiendrebeogo, N.T.R. Meda, A. Lamien, B. Zeba, and O.G. Nacoulma. 2012. Anti-proliferative effect of *Scoparia dulcis* L. against bacterial and fungal strains. IJBSC. 6: 3055-3063.
- Flemmig, J., and J. Arnhold. 2007. Ferrous ion-induced strand breaks in the DNA plasmid pBR322 are not mediated by hydrogen peroxide. Eur. Biophys. J. 36: 377-384.
- Golla, U., and S.S.R. Bhimathati. 2014. Evaluation of antioxidant and DNA damage protection activity of the hydroalcoholic extract of *Desmostachya bipinnata* L. Stapf. Scientific. World. J. Available: <https://goo.gl/sB7jdh>. Accessed Oct. 15, 2017.
- Jackson, S.P., and J. Bartek. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature. 7267: 1071-1078.
- Kong, E.-L., B.-K. Lee, Michelle, I. Ginjom, and P.M. Nissom. 2015. DNA damage inhibitory effect and phytochemicals of fermented red brown rice extract. Asian. Pac. J. Trop. Biomed. 9: 732-736.
- Leba, L.J., C. Brunschwig, M. Saout, K. Martial, E. Vulcain, D. Bereau, and J.C. Robinson. 2014. Optimization of a DNA nicking assay to evaluate *Oenocarpus bataua* and *Camellia sinensis* antioxidant capacity. Int. J. Mol. Sci. 15: 18023-18039.
- Lu, L.Y., N. Ou, and Q.B. Lu. 2013. Antioxidant induces DNA damage, cell death and mutagenicity in human lung and skin normal cells. Scientific reports. 3: 3169.
- Nimse, S.B., and D. Pal. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances. 5: 27986-28006.
- Pari, L., and M. Latha. 2005. Antidiabetic effect of *Scoparia dulcis*: effect on lipid peroxidation in streptozotocin diabetes. Gen. Physiol. Biophys. 24: 13-26.
- Saelee, N., M. Tonganunt-Srithaworn, W. Wanna, and A. Phongdara. 2011. Receptor for Activated C Kinase-1 protein from *Penaeus monodon* (Pm-RACK1) participates in the shrimp antioxidant response. Int. J. Biol. Macromol. 1: 32-36.

- Sharma, S., S. Sharma, and A.P. Vig. 2016. Evaluation of antimutagenic and protective effects of *Parkinsonia aculeata* L. leaves against H_2O_2 induced damage in pBR322 DNA. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 1: 17-31.
- Tsai, J.C., W.H. Peng, T.H. Chiu, S.C. Lai, and C.Y. Lee. 2011. Antiinflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. and betulinic acid. *Am. J. Chin. Med.* 39: 943-956.
- Verma, A.R., M. Vijayakumar, C.S. Mathela, and C. V. Rao. 2009. In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food. Chem. Toxicol.* 47: 2196-2201.
- Wankhara, W., S. Srinivasana, and S. Rathinasamy. 2015. HPTLC analysis of *Scoparia dulcis* Linn (Scrophulariaceae) and its larvicidal potential against dengue vector *Aedes aegypti*. *Nat. Prod. Res.* 29(18): 1757-1766.
- Zhu, L., J. Chen, J. Tan, X. Liu, and B. Wang. 2017. Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free radical scavenging and DNA oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures. *Molecules*. 22(3): pii: E195.
- Zulfiker, A. H. M., M. Siddiqua, L. Nahar, M.R. Habib, N. Uddin, N. Hasan, and M.S. Rana. 2011. In vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activity of *Scoparia dulcis* L. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2: 198-203.