ผลการยับยั้งของสารสกัดใบบัวหลวงต่อความเสียหายของพลาสมิดดีเอนเอที่ถูกเหนี่ยวนำโดยอนุมูลอิสระ

มารุต ตั้งวัฒนาชุลีพร*,†
ธัญลักษณ์ ภูมิวัฒนะ*
ภูริชญา สมภาร**

บทคัดย่อ : บัวหลวงเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่ชาวเอเชียนำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆรวมทั้งใช้รักษาโรคที่มีความสัมพันธ์กับการมีอนุมูลอิสระมากเกิน. การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินหาผลการยับยั้งของสารสกัดใบบัวหลวงต่อความเสียหายของพลาสมิดดีเอนเอที่ถูกเหนี่ยวนำโดยอนุมูลอิสระ. การวิเคราะห์รูปร่างตามธรรมชาติของพลาสมิดดีเอนเอใช้อิเล็กโตรโฟเรสิสแบบวุ้นอะกาโรส. การศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดบัวหลวงด้วยเอธานอล ร้อยละ ๕ มีศักยภาพป้องกันการเสียหายของดีเอนเอ และสารสกัดบัวหลวงความเข้มข้น ๘๐๐ มคก./ มล. สามารถยับยั้งการเสียหายของดีเอนเอได้ดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน กรด แอล-แอสคอร์บิค ความเข้มข้น ๔๐ มิลลิโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพี น้อยกว่า ๐.๐๕).

คำสำคัญ : **บัวหลวง , สารต้านอนุมูลอิสระ, พลาสมิดดีเอนเอ**

อนุมูลอิสระคือโมเลกุลที่ไม่เสถียรเนื่องจากการขาดหายไปของอิเล็กตรอน ทำให้อิเล็กตรอนไม่ครบคู่. ผลจากการที่โมเลกุลมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ทำให้ไวต่อการทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ที่อยู่รอบข้าง เพื่อแย่งอิเล็กตรอนที่ขาดหายไปคืนมา. เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ จะเกิดผลกระทบที่รุนแรงและก่อให้เกิดความเสียหายต่อสารที่ถูกทำปฏิกิริยา. หากสารนั้นเป็นสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน กรดอะมิโน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอนเอ ที่อยู่ในร่างกายอาจส่งผลให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคหัวใจ, โรคหลอดเลือดแข็งตัว, โรคความจำเสื่อม, ภาวะเซลล์เสื่อมหรือภาวะชราภาพ, การกลายพันธุ์ของดีเอนเอจนอาจพัฒนาเป็นโรคมะเร็ง [๑].

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) เป็นพืชสมุนไพรที่หาง่าย นิยมนำมาใช้ในการรักษาโรค โดยเฉพาะในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี และอินเดีย ไม่เว้นแม้แต่ในประเทศไทย. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบัวหลวงมีมากมาย เช่น สารสกัดจากเมล็ดบัวสามารถต้านอนุมูลอิสระ[๒], ยับยั้งกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์, กดการแสดงออกของหน่วยพันธุกรรมที่สร้างศัยโทไคน์, ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์นิวเคลียสเดี่ยวในกระแสเลือดส่วนรอบ (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) ในมนุษย์[๓]; สารสกัดจากรากบัวสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปรกติและหนูเบาหวานได้[๔]; สารสกัด

*ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ๒๐๑๓๑ : †marutt@buu.ac.th
**สหสาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ๑๐๓๓๐

จากเกสรตัวผู้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ[๕]; ส่วนสารสกัดจากใบบัวสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวี[๖], ลดความอ้วนในหนูแร็ตและหนูถีบจักร[๗], และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[๘,๙]

ข้อมูลจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวหลวงที่สามารถยับยั้งการทำลายดีเอนเอ โดยอนุมูลอิสระยังมีน้อยมาก คณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาสารสกัดใบบัวหลวงในการยับยั้งการทำลายดีเอนเอ โดยสารอนุมูลอิสระ เพื่อนำผลการศึกษาไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและหลักฐานยืนยันฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนายาสมุนไพรไทยและการส่งเสริมภูมิปัญญาพื้นบ้านของไทย.

ระเบียบวิธีวิจัย

การสกัดใบบัวหลวง

นำใบบัวหลวงมาล้างทำความสะอาดและหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ บางๆ นำไปตากแดดจนแห้งสนิท แล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ ๖๐ องศาเซลเซียส นาน ๒๔ ชั่วโมง. ต่อไปชั่งใบบัวหลวงแห้งปริมาณ ๕๐ กรัม ไปต้มกับเอธานอลร้อยละ ๕ ปริมาตร ๒,๐๐๐ มิลลิลิตร นาน ๑๐ นาที. จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารน้ำที่ผ่านการกรองไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส โดยใส่น้ำสกัดใบบัวหลวง ๒๕๐ มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ สกัดจนกระทั่งน้ำสกัดงวดลงเหลือประมาณ ๑๒๕ มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ไว้ในขวดปากกว้าง เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -๘๐ องศาเซลเซียส จนน้ำสกัดแข็งดีแล้ว จึงนำไปประเหิดตัวทำละลายออกโดยเครื่อง Lyophilizer ได้สารสกัดในรูปผง. นำผงสารสกัดในขวดปากกว้างไปเก็บในตู้ดูดความชื้น.

การเตรียมพลาสมิดดีเอนเอ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มี pBR322 plasmid DNA ไปเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani (LB) broth ที่มียา amplicillin ความเข้มข้น ๕๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร. จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (shaker incubator) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว ๑๘๐ รอบ/นาที บ่มไว้ข้ามคืน แล้วเก็บเซลล์แบคทีเรียใน LB broth โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๖,๐๐๐ รอบ/นาที นาน ๕ นาที. จากนั้นเทส่วนน้ำทิ้งและเก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรียนำมาสกัดเอาพลาสมิดดีเอนเอตามวิธี GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA). เมื่อได้สารละลายพลาสมิดดีเอนเอแล้ว นำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer (Cecil, UK) ที่ OD ๒๖๐ นาโนเมตร.

การทดสอบความสามารถยับยั้งการทำลายพลาสมิดดีเอนเอโดยอนุมูลอิสระ

การทดลองนี้ใช้สาร 2,2'-Azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) (Acros organics, USA) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำลายพลาสมิดดีเอนเอ และใช้กรด L-ascorbic (วิตามิน ซี) (Sigma, USA) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานซึ่งสามารถยับยั้งการทำลายพลาสมิดดีเอนเอจากสาร AAPH ได้.

นำพลาสมิดดีเอนเอความเข้มข้น ๗๕ นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร ๔ ไมโครลิตร ไปบ่มพร้อมกับสารสกัดใบบัวหลวงความเข้มข้น ๒ มก./ มล. ปริมาตร ๐.๒๕, ๐.๕, ๑, ๒ และ ๔ ไมโครลิตร ตามลำดับ (ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดใบบัวหลวงเท่ากับ ๕๐, ๑๐๐, ๒๐๐, ๔๐๐ และ ๘๐๐ มคก./ มล. ตามลำดับ). ความเข้มข้นสุดท้ายที่ ๑,๖๐๐ และ ๒,๐๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของสารสกัดใบบัวหลวงถูกเตรียมโดยใช้ความเข้มข้นตั้งต้น ๕ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการละลายใน water bath อุณหภูมิ ๔๒ องศาเซลเซียส จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร ๓.๒ และ ๔ ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ประมาณ ๑ นาที จึงเติมสารละลาย AAPH ความเข้มข้น ๒๐๐ มิลลิโมลาร์ ลงไป ๒ ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรทุกหลอดด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสารละลายเท่ากับ ๑๐ ไมโครลิตร. เมื่อเตรียมสารละลายครบแล้วนำไปบ่มภายใต้อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๑ ชั่วโมง.

การวิเคราะห์โครงสร้างของพลาสมิดดีเอนเอด้วยอิเล็กโตรโฟเรสิสแบบวุ้นอะกาโรส

เตรียม 1% agarose gel (w/v) โดยผสมผงวุ้นกับสารละลาย 0.5X TBE และนำไปหลอมเหลวในเตาอบไมโครเวฟ, รอจนหายร้อนแล้วจึงนำไปเทลงบนภาชนะแม่แบบ ทิ้งไว้

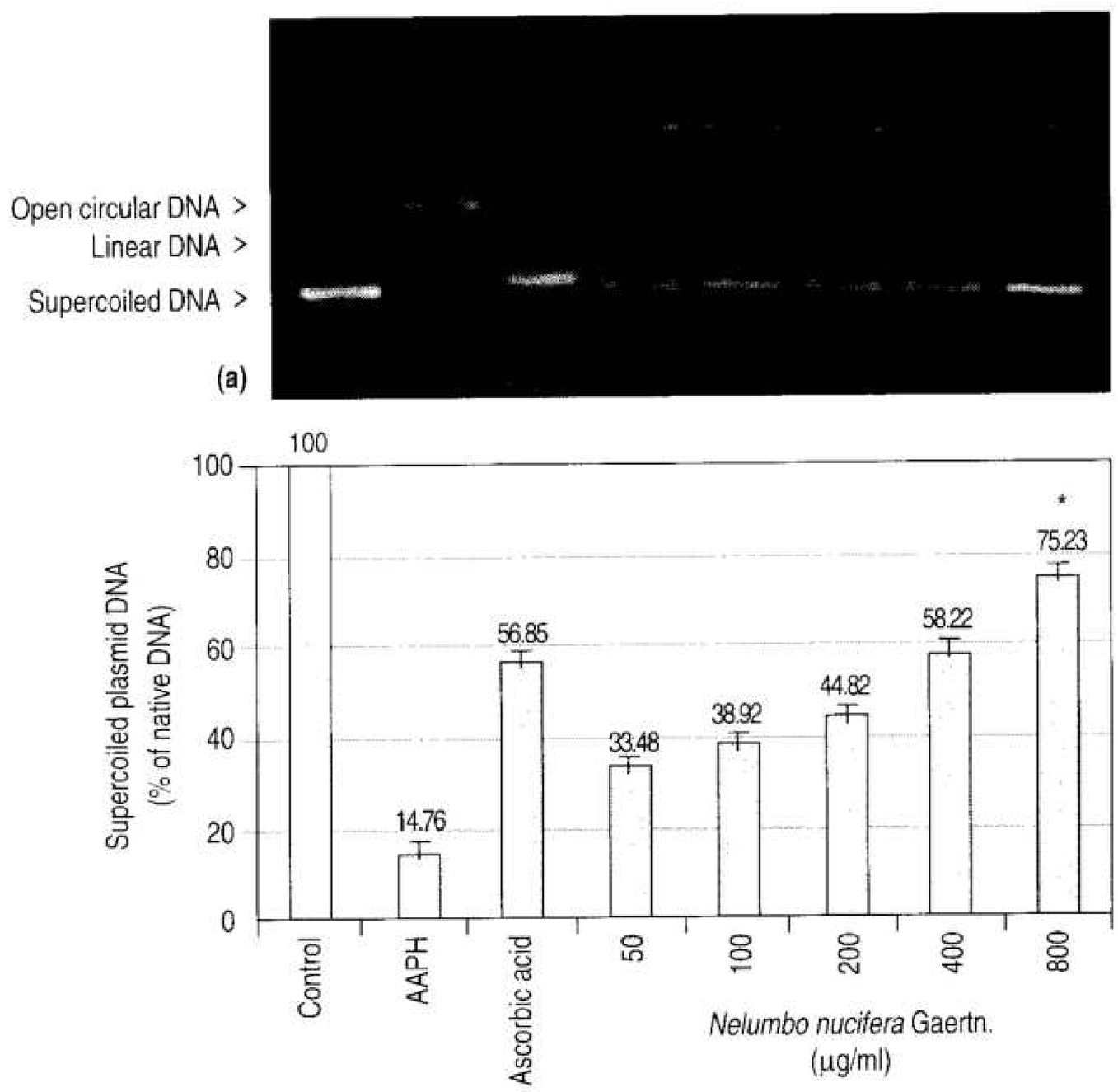
สักพักวุ้นจะแข็งตัว, เทสารละลาย 0.5X TBE ลงบนวุ้นจนท่วม. จากนั้นนำสารละลายที่บ่มแล้ว ๑๐ ไมโครลิตรลงไปผสมให้เข้ากับ loading buffer. ดูดสารละลายที่ผสมแล้วใส่ลงในหลุม ปล่อยกระแสไฟฟ้าจากเครื่องอิเล็กโตรโฟเรสิส ๑๐๐ โวลต์ นาน ๑๕ นาที และตามด้วย ๕๐ โวลต์ นาน ๑ ชั่วโมง. เมื่อครบกำหนดเวลานำวุ้นมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และนำไปส่องดูภายใต้แสงยูวี ทำการถ่ายรูปและวิเคราะห์ความเข้มของแสงของ supercoiled plasmid DNA ด้วยโปรแกรม GeneTools (Syngene, UK).

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการยับยั้งการทำลาย supercoiled plasmid DNA จากอนุมูลอิสระ แสดงเป็นค่าร้อยละของ supercoiled plasmid DNA ± S.E.M. และหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพี น้อยกว่า ๐.๐๕) โดย student's t-test ด้วยโปรแกรม SPSS version 11.5.

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดสอบความสามารถของสารสกัดใบบัวหลวงในการยับยั้งการทำลายพลาสมิดดีเอนเอโดยสารอนุมูลอิสระ AAPH พบว่า สาร AAPH ความเข้มข้น ๔๐ มิลลิโมลาร์ สามารถทำให้ supercoiled plasmid DNA เสียสภาพไปร้อยละ ๘๒.๒๔ แต่เมื่อใส่กรดแอลคอร์บิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานความเข้มข้น ๔๐ ไมโครโมลาร์ เข้าไปเพื่อยับยั้งการทำลาย supercoiled plasmid DNA จากอนุมูลอิสระพบว่ากรดแอสคอร์บิกช่วยยับยั้งการทำลาย supercoiled plasmid



รูปที่ ๑. ผลการยับยั้งการทำลาย supercoiled plasmid DNA ของสารสกัดใบบัวหลวง

(a) รูปแบบและความเข้มแสงของพลาสมิดดีเอนเอ ที่ผ่านการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรสิสแบบวุ้นอะกาโรส : ช่องที่ ๑, ดีเอนเอ (ควบคุม); ช่องที่ ๒, AAPH ๔๐ มิลลิโมลาร์; ช่องที่ ๓, AAPH ๔๐ มิลลิโมลาร์ + กรดแอสคอร์บิก ๔๐ ไมโครโมลาร์; ช่องที่ ๔, AAPH ๔๐ มิลลิโมลาร์ + NNL (*Nelumbo nucifera* leaf extract) ๕๐ มคก./ มล.; ช่องที่ ๕, AAPH ๔๐ มิลลิโมลาร์ + NNL ๑๐๐ มคก./มล.; ช่องที่ ๖, AAPH ๔๐ มิลลิโมลาร์ + NNL ๒๐๐ มคก./ มล.; ช่องที่ ๗, AAPH ๔๐ มิลลิโมลาร์ + NNL ๔๐๐ มคก./มล.; ช่องที่ ๘, AAPH ๔๐ มิลลิโมลาร์ + NNL ๘๐๐ มคก./มล.

(b) กราฟแสดงความเข้มแสงของ supercoiled plasmid DNA (ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลองซ้ำ ๓ ครั้ง); *, ค่าพี น้อยกว่า ๐.๐๕ (กรดแอสคอร์บิก ๔๐ ไมโครโมลาร์ เทียบ NNL ๘๐๐ มคก./มล.)

DNA ทำให้มี supercoiled plasmid DNA เหลืออยู่ร้อยละ ๕๖.๘๕; เมื่อใส่สารสกัดใบบัวหลวงความเข้มข้น ๕๐, ๑๐๐, ๒๐๐, ๔๐๐ และ ๘๐๐ มคก./มล. พบว่าสารสกัดใบบัวหลวงที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นสามารถยับยั้งการทำลาย super-coiled plasmid DNA ที่มากขึ้น สารสกัดจากใบบัวหลวงที่ความเข้มข้น ๘๐๐ มคก./มล. มีฤทธิ์ยับยั้งการทำลายพลาสมิดดีเอนเอได้ดีกว่ากรดแอสคอร์บิก ความเข้มข้น ๔๐ ไมโครโมล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพี น้อยกว่า ๐.๐๕) ดังแสดงในรูปที่ ๑. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวงเป็น ๑,๖๐๐ และ ๒,๐๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดใบบัวหลวงยับยั้งการทำลาย supercoiled plas-mid DNA จากสาร AAPH ได้ดีกว่า ascorbic acid ความเข้มข้น ๔๐ ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่มีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ ascorbic acid ความเข้มข้น ๘๐ ไมโครโมลาร์ ดังแสดงในตารางที่ ๑. กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ สารสกัดใบบัวหลวงเป็น ๑,๖๐๐ และ ๒,๐๐๐ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพเทียบกับ ascorbic acid ความเข้มข้น ๘๐ ไมโครโมลาร์

สาร 2,2'-Azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) ที่ใช้เป็นอนุมูลอิสระสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยารวมตัวกับออกซิเจน (oxidation) โดยการให้ความร้อน. เมื่อสาร AAPH ได้รับความร้อนจะให้อนุมูลแอลคิย์ล ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาการรวมกับออกซิเจนได้เป็นอนุมูลแอลคิย์ลเพอร์อกซิย์ล (alkylperoxyl radical) ซึ่งเป็นตัวทำให้รวมกับออกซิเจนที่ดี (oxidizing agent). เมื่อสารอนุมูลแอลคิย์ลเพอร์อกซิย์ลทำปฏิกิริยากับดีเอนเอ จะทำให้เกิดการเสียหายของดีเอนเอ DNA ดังแสดงในสมการที่ ๑-๓.[๑๐]

$$AAPH \rightarrow 2R^{\bullet} + N_2 \quad (๑)$$

$$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet} \quad (๒)$$

$$ROO^{\bullet} + DNA \rightarrow DNA\ damage\ product + ROOH \quad (๓)$$

โดยปรกติพลาสมิดดีเอนเอจะอยู่ในรูปของ supercoiled เมื่อมีการแตกหักของสายดีเอนเอจากการทำปฏิกิริยาของอนุมูลแอลคิย์ลเพอร์อกซิย์ล (alkylperoxyl radical) โครงสร้างและรูปร่างของพลาสมิดดีเอนเอจะเปลี่ยนไป คือ หากอนุมูลแอลคิย์ลเพอร์อกซิย์ล ทำปฏิกิริยากับ supercoiled plasmid DNA เพียงเส้นเดียวพลาสมิดดีเอนเอจะอยู่ในรูปของ open circular DNA แต่ถ้าทำปฏิกิริยากับ supercoiled plasmid DNA ๒ เส้นจะก่อให้เกิด linear DNA ขึ้น[๑๑] เมื่อนำพลาสมิดดีเอนเอ ที่อยู่ในรูปแบบที่แตกต่างกันมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรสิสแบบวุ้นอะกาโรส จะทำให้สามารถตรวจสอบรูปแบบของพลาสมิดดีเอนเอได้[๑๐] ดังแสดงในรูปที่ ๑ a.

การศึกษาเมล็ดบัวหลวงด้านพฤกษศาสตร์เคมีพบสารประกอบต่างๆ มากมาย ได้แก่ แอลคาลอยด์, lotusine, nuciferine, pronuciferine, liensinine, roemerine, nelumbine และ

ตารางที่ ๑ แสดงเปอร์เซ็นต์ของ supercoiled plasmid DNA เมื่อทดสอบกับสารที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	เปอร์เซ็นต์ของ supercoiled plasmid DNA
น้ำกลั่น (control)		๑๐๐
AAPH (mM)	๔๐	๑๔.๗๖±๒.๗๙
L-Ascorbic acid (μM)	๔๐	๕๖.๘๕±๒.๗๒
	๘๐	๙๐.๓๖±๖.๒๙
สารสกัดใบบัวหลวง (μg/ml)	๕๐	๓๓.๔๘±๓.๑๒
	๑๐๐	๓๘.๙๒±๒.๖๙
	๒๐๐	๔๔.๘๒±๓.๑๔
	๔๐๐	๕๘.๒๒±๒.๕๘
	๘๐๐	๗๕.๒๓±๕.๓๐*
	๑,๖๐๐	๙๐.๒๔±๗.๘๗*,NS
	๒,๐๐๐	๙๒.๕๒±๖.๐๔*,NS

*, ค่าพี น้อยกว่า ๐.๐๕ (บัวหลวง เทียบ L-ascorbic acid ๔๐ μM)
NS, ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (บัวหลวง เทียบ L-ascorbic acid ๘๐ μM)

neferine[๒]. สารสกัดหยาบด้วยเอธานอลมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ตับจากสารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ carbon tetrachloride (CCl) และแอฟลาทอกซิน บี ๑ (sflatoxin B1 ซึ่งฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ตับนี้เป็นผลมาจากสมบัติต้านอนุมูลอิสระ[๑๒] และสารสกัดส่วนฮัยโดรแอลคอฮอลิก (hydro alcoholic) จากเมล็ดบัวหลวงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง[๒]. การศึกษาของ Xiao และคณะแสดงให้เห็นว่าสาร isoliensine ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์ที่สกัดได้จากเมล็ดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระได้[๑๓]. นอกจากนี้สาร procyanidins ที่สกัดจากเต้าเมล็ด (seedpod) มีประสิทธิภาพต้านการเกิดปฏิกิริยารวมตัวกับออกซิเจน[๑๔].

การศึกษาสารประกอบในเกสรตัวผู้ของบัวหลวงพบว่าสารประกอบจำพวกฟลาโวนอยด์ ๗ ชนิด ได้แก่ kaempferol, kaempferol 3-O-beta-D-glucuronopyranosyl methylester, kaempferol 3-O-beta-D-glucopyranoside, kaempferol 3-O-beta-D-galactopyranoside, myricetin 3′,5′-dimethylether 3-O-beta-D-glucopyranoside, kaempferol 3-O-alpha-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-beta-D-glucopyranoside และ kaempferol 3-O-beta-D-glucuronopyranoside มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสารประกอบ kaempferol มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าอีก ๖ ชนิด[๕]. นอกจากนี้สาร isorhamnetin glycosides ก็มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน[๑๕].

Wu และคณะ[๘] แสดงว่าสารสกัดใบบัวหลวงด้วยเมธานอลสามารถต้าน reactive oxygen species (ROS), สามารถป้องกันการทำลายเซลล์ Caco-2 จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, สามารถป้องกันการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงจากปฏิกิริยารวมกับออกซิเจน, และยับยั้งการทำลายพลาสมิดดีเอนเอจากปฏิกิริยาเฟนตัน (Fenton reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่แบบต่อเนื่องได้. ผลจากการศึกษาของ Wu และคณะสอดคล้องกับผลการทดลองนี้คือสามารถยับยั้งการทำลายพลาสมิดดีเอนเอได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่ามีสารเคมีบางชนิดในใบบัวหลวงที่สามารถละลายได้ทั้งในเอธานอลและเมธานอล และสารตัวออกฤทธิ์ยับยั้งการทำลายดีเอนเอ ก็น่าจะเป็นสารตัวใดตัวหนึ่งจากที่กล่าวมาข้างต้น. เนื่องจากสารมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระเหมือนกันและได้จากพืชชนิดเดียวกัน การจะบอกว่าเป็นสารใดนั้นคงต้องนำสารสกัดไปแยกองค์ประกอบและทำให้เป็นสารบริสุทธิ์ต่อไป.

สรุป

การศึกษาความสามารถของสารสกัดใบบัวหลวงด้วยเอธานอล ร้อยละ ๕ ในการยับยั้งการทำลายดีเอนเอโดยอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดใบบัวหลวงสามารถยับยั้งการทำลายพลาสมิดดีเอนเอโดยอนุมูลอิสระได้ และระดับความเข้มข้นสูงขึ้นของสารสกัดใบบัวหลวงมีฤทธิ์ยับยั้งการทำลายพลาสมิดดีเอนเอได้มากขึ้นด้วย. นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใบบัวหลวงความเข้มข้นที่ ๘๐๐ มคก./มล. มีฤทธิ์ยับยั้งการทำลายพลาสมิดดีเอนเอได้ดีกว่ากรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น ๔๐ ไมโครโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้แนะนำวิธีสกัดและให้สารสกัดเหลวจากใบบัวหลวงมาใช้ในการศึกษา. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จันทรวรรณ แสงแข ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้อนุเคราะห์ให้สารเคมีบางชนิดมาใช้ในการทดลอง.

เอกสารอ้างอิง

๑. Flora SJ. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2007; 53: 1-2.

๒. Rai S, Wahile A, Mukherjee K, Saha BP, Mukherjee PK. Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. J Ethnopharmacol 2006; 104: 322-7.

๓. Liu CP, Tsai WJ, Lin YL, Liao JF, Chen CF, Kuo YC. The extracts from *Nelumbo Nucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. Life Sci 2004; 75: 699-716.

๔. Mukherjee PK, Saha K, Pal M, Saha BP. Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on blood sugar level in rats. J Ethnopharmacol 1997; 58: 207-13.

๕. Jung HA, Kim JE, Chung HY, Choi JS. Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens. Arch Pharm Res 2003; 26: 279-85.

๖. Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y, Chen YP, Furukawa H, Itoigawa M, et al. Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids. Bioorg Med Chem 2005; 13: 443-8.

๗. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. J Ethnopharmacol 2006; 106: 238-44.

๘. Wu MJ, Wang L, Weng CY, Yen JH. Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gertn.). Am J Chin Med 2003; 31: 687-98.

๙. Cho EJ, Yokozawa T, Rhyu DY, Kim SC, Shibahara N, Park JC. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Phytomedicine 2003; 10: 544-51.

๑๐. Wei QY, Zhou B, Cai YJ, Zhong LL. Synergistic effect of green tea polyphenols with trolox on free radical-induced oxidative DNA damage. Food Chemistry 2006; 96: 90-5.

๑๑. Yu SB, Geng J, Zhou P, Feng AR, Chen XD, Hu JM. Analysis of plasmid DNA damage induced by melanin with capillary electrophoresis. J Pharm Biomed Anal 2007; 43: 816-21.

๑๒. Sohn DH, Kim YC, Oh SH, Park EJ, Li X, Lee BH. Hepatoprotective and free radical scavenging effects of *Nelumbo nucifera*. Phytomed 2003; 10: 165-9.

๑๓. Xiao JH, Zhang JH, Chen HL, Feng XL, Wang JL. Inhibitory effects of isoliensinine on bleomycin -induced pulmonary fibrosis in mice. Planta Med 2005; 71: 225-30.

๑๔. Ling ZQ, Xie BJ, Yang EL. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. J Agric Food Chem 2005; 53: 2441-5.

๑๕. Hyun SK, Jung YJ, Chung HY, Jung HA, Choi JS. Isorhamnetin glycosides with free radical and ONOO-scavenging activities from the stamens of *Nelumbo nucifera*. Arch Pharm Res 2006 ; 29: 287-92.

Abstract : **The Inhibitory Effect of Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) Leaf Extract on Plasmid DNA Damage by Free Radical**

Marut Tangwattanachuleeporn,[*†] Thanyalak Pumiwatana,[*] Poorichaya Somparn[‡]

[*]Department of Medical Science, Faculty of Science, Burapha University, Chon Buri 20131

[‡]Inter-department of Biomedical Sciences, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

[†]Corresponding author : marutt@buu.ac.th

Nelumbo nucifera Gaertn. (sacred lotus) has been widely used in traditional Asian medicine for treatment of various diseases, including diseases associated with excess free radicals. This study was carried out to evaluate the inhibitory effect of *Nelumbo nucifera* Gaertn. leaf extract on plasmid DNA damage induced by free radicals. The native form of plasmid DNA was analyzed using agarose gel electrophoresis. The results revealed that *Nelumbo nucifera* Gaertn. (5% ethanol extract) is potentially capable of protecting against DNA damage, and a higher concentration of *Nelumbo nucifera* Gaertn. extract at 800 μg/ml could inhibit the DNA damage more than that achieved by the standard antioxidant agent, L-ascorbic acid at 40 mM ($p<0.05$).

Key words : ***Nelumbo nucifera* Gaertn., antioxidant, plasmid DNA, L-ascorbic acid**