รายงานวิจัย

เรื่อง

ศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดหญ้าดอกขาวและผลต่อระบบประสาทสัตว์ทดลองเพื่อการเลิกบุหรี่

เสนอ

ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ (ศจย.) และ
สำนักกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.)

โดย

ดร.ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล
นายภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา
นางสาวอมรรัตน์ ขยันการนาวี
นางสาวเตือนตา เสมาทอง
นางสรียา เรืองพัฒนพงศ์
นางสาวศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
เทคโนธานี คลองห้า คลองหลวง ปทุมธานี 12120

พ.ศ. 2553-2554

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ศึกษาวิจัยขอแสดงความขอบคุณ ศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ (ศจย.) ที่ให้ความไว้วางใจและสนับสนุนค่าใช้จ่ายการดำเนินการทดสอบในครั้งนี้ และขอขอบคุณ ดร.วัลลภา อรุณไพโรจน์ ผู้อำนวยการฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ให้การสนับสนุนตลอดการศึกษาและวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายนี้ขอขอบคุณ นายวิเชียร เขยนอกและนางสาวปาจารีย์ นวมงาม สำหรับการดูแลเลี้ยงสัตว์ทดลองตลอดการทดสอบจนสำเร็จได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	ง
ABSTRACT	จ
บทคัดย่อ	ฉ
บทนำ	1
วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	4
ผลการทดลอง	17
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	30
ข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	34

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของสารสกัดหญ้าดอกขาว 18

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนังของสารสกัดหญ้าดอกขาว 19

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของสารสกัดหญ้าดอกขาว 20

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์โครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศผู้หลังจากได้รับตัวอย่างทดสอบ 21

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์โครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศเมียหลังจากได้รับตัวอย่างทดสอบ 21

ตารางที่ 6 ผลการเป็นสารก่อมะเร็งของสารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยวิธี Transformation Assay ของเซลล์ Bhas 42 24

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline ในเลือดหนูขาวที่ได้รับสารนิโคติน (Ni) n=6 27

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline ในเลือดหนูปกติ 28

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงโครโมโซมปกติในหนูเพศผู้ และเพศเมียหลังจากได้รับน้ำกลั่น 22

รูปที่ 2 แสดงโครโมโซมปกติในหนูเพศผู้และเพศเมียหลังจากได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม) 22

รูปที่ 3 แสดงโครโมโซมปกติในหนูเพศผู้ และเพศเมียหลังจากได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก) 22

รูปที่ 4 แสดงโครโมโซมปกติในหนูเพศผู้ และเพศเมียหลังจากได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) 23

รูปที่ 5 แสดงโครโมโซมปกติในหนูเพศผู้ และเพศเมียหลังจากได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) 23

รูปที่ 6 แสดงความผิดปกติของโครโมโซมในหนูเพศผู้ และ เพศเมีย หลังจากได้รับสาร Cyclophosphamide 23

รูปที่ 7 แสดงลักษณะFoci ของเซลล์ Bhas 42 ที่ได้รับน้ำกลั้น หรือสารสกัดหญ้าดอกขาว 25

รูปที่ 8 แสดงลักษณะ Foci ของเซลล์ Bhas 42 ที่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ cyclophosphamide 25

รูปที่ 9 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหญ้าดอกขาวในแต่ละส่วนต่อเซลล์ L929 26

รูปที่ 10 กราฟแสดงผลการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรที่ได้รับสารนิโคตินใน Locomotor 29

รูปที่ 11 กราฟแสดงผลการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรปกติใน Locomotor 29

Study on Safety and Effect of *Vernonia cinerea* Less Extract on Nervous System in Animals for Smoking Cessation

Chuleratana Banchonglikitkul, Parkpoom Siriarchavatana, Amonrat Khayungarnnawee, Tuanta Sematong, Sareeya Reunpathanaphong and Sarunya Laovitthayanggoon

ABSTRACT

Study on safety and effect of *Vernonia cinerea* Less water extract by simmer of each part from leaves, flowers, stems and mixed onto nervous system in animals for smoking cessation were investigated in this study. The extract from all parts was no acute toxicity (LD_{50} > 2,000 mg/kg b.w.) in rats from both oral and dermal routes, including no skin irritation in rabbits (OECD no. 420, 402 and 404). Each water extract at dose of 2,000 mg/kg b.w. exhibited no effect to chromosome break and % mitotic index change in rats (OECD no. 475). The percentage of Bhas 42 cell growth was increase whereas no percentage of foci increment was found after 3 day of each extract ratio (1:8, 1:16, 1:32 and 1:64) exposure using cell transformation assay. Moreover, cytotoxic effect (IC_{50}) of water extract from leaves, flowers, stems and mixed to L929 cell line were 1.05 ± 0.20, 0.4 ± 0.02, 0.93 ± 0.17 and 0.95 ± 0.11 mg/ml, respectively. After each extract (10 gm/kg b.w.) orally for 21 consecutive days, plasma dopamine level in rats showed higher than control but not bupropion (150 mg/kg). Additionally, leaves and flower extracts could increase locomotor activation in mice similar to that of bupropion and nicotine.

In conclusion, all parts of *Vernonia cinerea* water extract by simmer showed no acute oral and dermal toxic, no skin irritation, and no mutagenic and carcinogenic effects but it might be cytotoxic at high dose. However, the results indicated that extract from leaves and flowers contain nicotine that could affect central nervous system and are capable to further developing for smoking cessation products.

ศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดหญ้าดอกขาวและผลต่อระบบประสาทสัตว์ทดลองเพื่อการเลิกบุหรี่

ชุลีรัตน์ บรรจงลิขิตกุล, ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา, อมรรัตน์ ขยันการนาวี, เตือนตา เสมาทอง, สรียา เรืองพัฒนพงศ์ และ ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กูร

บทคัดย่อ

การศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดหญ้าดอกขาว (น้ำเคี่ยว) จากส่วนต่าง ๆ เช่น ใบ ดอก ก้านและผสมทั้งสามส่วน และผลต่อระบบประสาทสัตว์ทดลองในครั้งนี้ พบว่าน้ำเคี่ยวสารสกัดหญ้าดอกขาวทุกส่วนไม่มีพิษเฉียบพลันในหนูขาวทั้งจากการกินและซึมผ่านทางผิวหนัง โดยมีค่า LD_{50} สูงกว่า 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (OECD no. 420 และ 402) ไม่มีผลก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย (OECD no. 404) และไม่มีผลต่อโครโมโซมของหนูขาวเมื่อได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (OECD no. 475) ขณะที่ผลจากการเติมน้ำเคี่ยวสารสกัดหญ้าดอกขาวในอัตราส่วนต่อน้ำ (1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64) ในเซลล์ Bhas 42 นานต่อเนื่อง 3 วัน ดูผลเมื่อเลี้ยงเซลล์ครบ 21 วัน พบว่ามีร้อยละการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นและไม่มีการเพิ่มร้อยละของ foci ในเซลล์ ส่วนผลของสารสกัดส่วนใบ ดอก ก้านและผสม ต่อการทำลายเซลล์เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ L 929 จากหนูพบว่ามีค่า IC_{50} ดังนี้ 1.05 ± 0.20, 0.4 ± 0.02, 0.93 ± 0.17 และ 0.95 ± 0.11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับหนูขาวที่ได้รับการป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาวส่วนต่าง ๆ ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว มีผลเพิ่มระดับ โดปามีนในเลือดได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน bupropion ขนาด 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว นอกจากนี้สารสกัดส่วนใบและดอกมีผลทำให้หนูถีบจักรตื่นตัวเช่นเดียวกับสารนิโคตินและ bupropion.

สรุปจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวจากการเคี่ยวด้วยน้ำมีความปลอดภัยค่อนข้างสูง ไม่ก่อความระคายเคืองต่อผิวหนัง ไม่ก่อกลายพันธุ์ ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง มีแนวโน้มเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้น และมีสารนิโคตินเป็นองค์ประกอบเนื่องจากมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางในการทำให้สารสื่อประสาทโดปามีนในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับสารมาตรฐาน bupropion จึงเหมาะที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ช่วยอดบุหรี่

บทนำ

ปัจจุบันแนวโน้มผู้สูบบุหรี่ทั่วโลกมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าภายในปี พ.ศ. 2568 จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากกว่า 1,600 ล้านคน ดังนั้นจึงมีการคาดคะเนทางระบาดวิทยาว่าในอีก 20 ปีข้างหน้าจำนวนผู้เสียชีวิตจากการสูบบุหรี่จะมีจำนวนเพิ่มขึ้น 10 ล้านคนหรือ นาทีละ 20 คน ขณะที่ผลจากการสำรวจของศูนย์วิจัยและจัดการความรู้เพื่อการควบคุมยาสูบ พบว่าอัตราการสูบบุหรี่ของประชากรไทยมีจำนวน 21.91% และมีคนไทยเสียชีวิตจากพิษภัยของบุหรี่ไปแล้วมากกว่า 1 ล้านคน รวมทั้งยังมีคนไทยที่สูบบุหรี่อีกไม่น้อยกว่า 9.5 ล้านคน บุหรี่จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อความสูญเสียต่อสังคมไทย จากการเป็นพฤติกรรมเสี่ยงต่อการเกิดโรคอันดับ 3 รองจากโรคเอดส์และสุรา

พิษภัยของบุหรี่เป็นที่ทราบกันดีว่าสารนิโคตินที่เป็นองค์ประกอบธรรมชาติในใบยาสูบที่ออกฤทธิ์เสพติดรุนแรง สามารถกระตุ้นส่วนของสมองที่มีผลเกี่ยวกับความอยากและความสุขสม มีอำนาจในการเสพติดสูงเทียบเท่าเฮโรอีน ยามที่ขาดนิโคตินจะก่อให้เกิดอาการกระวนกระวาย หงุดหงิด ขาดสมาธิ ปวดศีรษะ ซึมเศร้า บางคนมีอาการนอนไม่หลับ ปวดท้อง คลื่นไส้อาเจียน นิโคตินจะซึมผ่านเข้าสู่กระแสเลือดและเข้าสู่สมองได้เร็วจากการสูดควันแต่จะเข้าสู่กระแสเลือดและสมองได้ช้ากว่าหากซึมผ่านเข้าทางเยื่อบุช่องปาก เมื่อสมองได้รับนิโคตินจะกระตุ้นต่อมหมวกไตให้หลั่งสารอะดรีนาลีน ที่มีผลให้มีความดันโลหิตสูง อัตราการหายใจและการเต้นของหัวใจเร็วขึ้น นอกจากนี้นิโคตินยังมีผลลดการหลั่งอินซูลินของตับอ่อน จึงทำให้คนที่สูบบุหรี่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ในบุหรี่ 1 มวน จะประกอบด้วย ใบยาสูบ กระดาษที่ใช้มวนและสารเคมีที่ใช้ในการปรุงแต่งกลิ่นและรสชาติเพื่อลดการระคายเคือง ทำให้บุหรี่น่าสูบ ขณะที่บุหรี่เกิดการเผาไหม้ก่อให้เกิดสารเคมีมากกว่า 4,000 ชนิดที่มีผลต่อการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย มีสารอันตราย 250 ชนิด และสารก่อมะเร็ง 60 ชนิด ทั้งนี้คนที่สูบบุหรี่จึงมีแนวโน้มหรือมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งมากกว่าคนไม่สูบบุหรี่ ส่วนสาเหตุที่การสูบบุหรี่มีผลทำให้เกิดโรคมะเร็งในอวัยวะหลาย ๆ แห่งในร่างกาย เป็นผลจากการที่สารก่อมะเร็งในควันบุหรี่สัมผัสกับอวัยวะโดยตรง เช่น กล่องเสียง และปอด หรือเกิดจากสารก่อมะเร็งถูกดูดซึมผ่านกระแสเลือดและไหลเวียนไปตามอวัยวะต่าง ๆ สรุปได้ว่า บุหรี่สามารถก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในทุกระบบของร่างกาย รวมทั้งผลต่อทางอารมณ์ จิตใจและพฤติกรรมทางสังคม จึงจำเป็นต้องใช้ยาช่วยในการเลิกสูบบุหรี่

ยาและผลิตภัณฑ์ช่วยในการเลิกบุหรี่ ได้แก่

- Nicotine Replacement Therapy (NRT) เป็นการรักษาโดยให้ผู้สูบบุหรี่ได้รับสารนิโคตินในรูปแบบอื่นที่ไม่ใช่จากบุหรี่ ทำให้ไม่ได้รับควันและสารพิษหรือสารก่อมะเร็ง โดยสารนิโคตินที่ได้รับจาก NRT สามารถเข้าสู่สมองและออกฤทธิ์ได้เช่นเดียวกับนิโคตินที่ได้จากบุหรี่แต่อาจใช้เวลามากกว่า ข้อควรระวังสำหรับการเลือกใช้ NRT คือผู้ป่วยที่มีอาการโรคหัวใจและหลอดเลือด ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และผู้ที่แพ้สารนิโคติน

- Varenicline เป็นยาที่ออกฤทธิ์โดยการจับตัวกับตัวรับนิโคตินในสมองทำให้มีการหลั่งสารโดปามีนเพิ่มขึ้น มีผลทำให้อาการอยากสูบบุหรี่ลดลงได้ ผลข้างเคียงจากการใช้ยานี้ พบว่าจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ นอนไม่หลับ

- Bupropion HCL Sustained Release เป็นยาต้านอาการซึมเศร้าในกลุ่ม norepinephrine-dopamine reuptake inhibitor เมื่อเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางจะมีผลทำให้ระดับสารสื่อประสาท โดปามีนและนอร์อีพิเนฟีนเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการกระตุ้นจากนิโคติน ผลข้างเคียงของยาได้แก่ ปากแห้ง คอแห้งและนอนไม่หลับ ห้ามใช้ในผู้ป่วยโรคลมชักหรือโรคเบื่ออาหาร

- Nortriptyline ยาต้านอาการเศร้า ออกฤทธิ์ยับยั้งการเก็บกลับของสารสื่อประสาท นอร์อีพิเนฟีนและเซอโรโทนิน ทำให้สามารถเบาเทาอาการถอนนิโคตินได้ มีผลข้างเคียงคือ หน้ามืด ปากแห้ง คอแห้ง ใจสั่น ฯลฯ เป็นยาที่ยังไม่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาให้ใช้เพื่อช่วยเลิกบุหรี่แต่เป็นยาทางเลือกสำหรับผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองยาในกลุ่ม first-line drug

- Clonidine ยาลดความดันโลหิต แต่มีการนำมาใช้เป็นยาถอนฝิ่นและแอลกอฮอล์ มีผลข้างเคียงมากเช่นกัน คือ ง่วงนอน หน้ามืด อ่อนเพลีย วิงเวียน ปากแห้ง ฯลฯ เป็นยากลุ่ม second –line drug เช่นเดียวกับ Nortriptyline

- Varenicline เป็นยาชนิด partial agonist ของ Alpha4beta2 nicotinic acetylcholine โดยมีผลช่วยลดความต้องการนิโคตินและป้องกันอาการถอนยาในระหว่างการอดบุหรี่ จากการกระตุ้นการหลั่ง โดปามีนในปริมาณระดับกลางและสม่ำเสมอ (Singh and Budhiraja, 2010)

- สมุนไพร มีการนำสมุนไพรมากมายหลายชนิดมาใช้เพื่อช่วยเลิกบุหรี่ แต่ผลิตภัณฑ์สมุนไพรส่วนใหญ่ยังไม่มีการศึกษาข้อมูลทางเภสัชและพิษวิทยา รวมทั้งการศึกษาผลทางคลินิกเพื่อยืนยันผลในการช่วยเลิกบุหรี่ สมุนไพรที่นำมาใช้เลิกบุหรี่ได่แก่ หญ้าดอกขาว ใบโปร่งฟ้า บัวหิมะ ดีปลี ฯลฯ โดยเฉพาะสมุนไพรหญ้าดอกขาวได้มีการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับช่วยอดบุหรี่ภายในประเทศ แต่เนื่องจากยังขาดความสมบูรณ์ของข้อมูลอีกหลายด้าน เช่น ข้อมูลด้านความปลอดภัยและกลไกการออกฤทธิ์

สมุนไพรหญ้าดอกขาว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vernonia cinerea* Less วงศ์ Asteraceae มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ต้นตั้งตรงสูงประมาณ 50 เซนติเมตร กิ่งและก้านมีขน ใบเดี่ยวออก เรียงสลับ ดอกออกเป็นช่อ มีดอกย่อยราว 20 ดอก ดอกมีสีม่วงชมพู ดอกแก่จะบานเป็นสีขาว ผลมีขนที่ข้อสีขาว เปลือกแข็ง แห้งไม่แตกภายในมีเมล็ดเดี่ยว สรรพคุณ ทั้งต้นมีรสเย็น ต้มดื่มลดไข้ แก้ไอ แก้ตับอักเสบเฉียบพลัน ขับรก ขับระดู ส่วนใบมีรสเย็นเช่นกันต้มดื่มแก้หืด แก้หลอดลมอักเสบ เมล็ด มีรสเฝื่อน ขับพยาธิ ตำพอกแก้โรคผิวหนังและกำจัดเหา

ผลการศึกษาหญ้าดอกขาว (*Vernonia cinerea* Less) ต่อการอดบุหรี่ มีดังนี้

- การศึกษาผลของชาสมุนไพรงดบุหรี่และลดอาการหักดิบจากการอดบุหรี่ ในประเทศอินโดนีเซีย โดยจากการคัดเลือสมุนไพรที่มีผลการต้านอนุมูลอิสระและการสลายนิโคติน

ในหลอดทดลองสูงมาพัฒนาเป็นชาชงสมุนไพรรวมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} 50.6 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และการสลายนิโคติน (1.81) สูง ศึกษาในชายสูบบุหรี 100 คน พบว่ามีผลงดบุหรี่ 38 % ขณะที่กลุ่มควบคุมมีผลเพียง 12 % (Lee and Lee, 2005)

- การศึกษาผลเบื้องต้นของหญ้าดอกขาวเพื่ออดบุหรี่ในคลินิกผู้ป่วยนอกของสถาบันธัญญารักษ์ จังหวัดปทุมธานีแบบ randomized, single-blind, placebo-controlled และ parallel trial จำนวน 64 คน พบว่า 32 คน ในกลุ่มได้รับชาชงต้นหญ้าดอกขาว 3 กรัมในน้ำร้อน 150 มิลลิลิตร วันละ 3 เวลาเป็นเวลา 14 วัน มีศักยภาพในการช่วยลดการสูบบุหรี่โดยทำให้รสชาติและกลิ่นของบุหรี่เปลี่ยนไป (Wongwiwatthananukit *et. al.*, 2009)
- ปัจจุบันในประเทศมีการนำ หญ้าดอกขาว บรรจุซอง ขนาดซองละ 5 กรัม ใน 1 ซอง ประกอบด้วย หญ้าดอกขาว 3.75 กรัม ดอกเก็กฮวย 0.71 กรัม และใบเตย 0.71 กรัม จากการศึกษาในผู้ติดบุหรี่พบว่าหลังการรักษา 4 เดือนพบอัตราการเลิกสูบบุหรี่ร้อยละ 69.35 โดยเหตุผลสำคัญของการเลิกสูบบุหรี่จากการใช้ชาหญ้าดอกขาว คือ ชาลิ้น กินอาหารไม่อร่อย ไม่รู้สึกอยากบุหรี่ รู้สึกเหม็นกลิ่นบุหรี่ เมื่อสูบบุหรี่แล้วรู้สึกอยากอาเจียน ส่วนในผู้ที่ไม่สามารถเลิกบุหรี่ได้ ให้เหตุผลว่า ดื่มชาหญ้าดอกขาวเหมือนดื่มน้ำธรรมดา ไม่มีอาการใด ๆ (ChiRaNan, 2009)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดหญ้าดอกขาว และผลต่อระบบประสาทหนูขาวสำหรับการเลิกบุหรี่ โดยสารสกัดหญ้าดอกขาวที่จะใช้ศึกษาวิจัยจะได้รับจาก ดร. ดลรวี ลีลารุ่งระยับ ภาควิชากายภาพบำบัด คณะเทคนิกการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดำเนินการสกัดจากหญ้าดอกขาวจากก้าน ดอก ใบ และผสมด้วยวิธีการเคี่ยว รวมจำนวน 4 ตัวอย่าง จากนั้นนำสารสกัดมาศึกษาดังต่อไปนี้

1. ความปลอดภัยเบื้องต้นในสัตว์ทดลอง เช่น ความเป็นพิษเฉียบพลัน พิษในการก่อกลายพันธุ์ (mutagenic toxicity) พิษในการก่อมะเร็ง (carcinogenic toxicity)
2. ความเป็นพิษต่อเซลล์
3. ผลต่อระบบประสาทในหนูขาวที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเลิกบุหรี่

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. ตัวอย่างทดสอบ จากภาควิชากายภาพบำบัด คณะเทคนิกการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดังนี้
   1.1 น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ใบ) ชั่งใบหญ้าดอกขาวแห้ง 20 กรัม เติมน้ำ 390 มิลลิลิตร เคี่ยวจนเหลือปริมาตร 150 มิลลิลิตร
   1.2 น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ดอก) ชั่งดอกหญ้าดอกขาวแห้ง 20 กรัม เติมน้ำ 390 มิลลิลิตร เคี่ยวจนเหลือปริมาตร 150 มิลลิลิตร
   1.3 น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ก้าน) ชั่งก้านหญ้าดอกขาวแห้ง 20 กรัม เติมน้ำ 390 มิลลิลิตร เคี่ยวจนเหลือปริมาตร 150 มิลลิลิตร
   1.4 น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ผสม) ชั่งหญ้าดอกขาวแห้ง 20 กรัม (ก้าน 14 กรัม ดอก 2 กรัมและใบ 4 กรัม) เติมน้ำ 390 มิลลิลิตร เคี่ยวจนเหลือปริมาตร 150 มิลลิลิตร
2. สัตว์ทดลอง
   2.1 หนูขาวพันธุ์ Wistra เพศผู้จำนวน 106 ตัวและเพศเมียจำนวน 50 ตัว น้ำหนักตัวหนูเพศเมียอยู่ระหว่าง 180-260 กรัม เพศผู้อยู่ระหว่าง 230-335 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม
   2.2 หนูถีบจักรพันธุ์ CRC น้ำหนัก 25-35 กรัม เพศผู้ จำนวน 72 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม
   2.3 กระต่ายสีขาวพันธุ์ New Zealand White ทั้งสองเพศ ซื้อจากภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐมน้ำหนักตัวประมาณ 2.0 – 3.0 กิโลกรัม จำนวน 12 ตัว
3. เซลล์เนื้อเยื่อสัตว์
   3.1 เซลล์เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ fibroblast (L929), ATCC, ประเทศสหรัฐอเมริกา
   3.2 เซลล์เนื้อเยื่อ fibroblast-like (Bhas 42) จาก embryo หนู BALB/c, HSRRB, Cell line distribution center, Osaka, ประเทศญี่ปุ่น
4. วัสดุสำหรับการทดสอบและเลี้ยงสัตว์ทดลอง
   4.1 Quomen™ (Bupropion), บริษัท GlaxoSmithKline ประเทศ สหรัฐอเมริกา
   4.2 Nicotine, บริษัท Sigma- Aldrich ประเทศ สหรัฐอเมริกา
   4.3 Patch หมายถึง ผ้าพันแผลมาตรฐานขนาด 2.5 เซนติเมตร × 2.5 เซนติเมตร ทบซ้อนกัน 10 ชั้น ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีนึ่งอบโดยใช้แรงดันไอน้ำ
   4.4 พลาสเตอร์ Leukoplast porous BDF Intanin Co., Ltd., ประเทศไทย

4.5 Transpore™ บริษัท สามเอ็ม ประเทศไทย จำกัด

4.6 ผ้ายืด Pack and Grand, CCN Co., Ltd., ประเทศไทย

4.7 ผ้าก๊อซ จากบริษัท บางพลี คอตตอน อินดัสตรี จำกัด ประเทศไทย

4.8 สำลี จากบริษัท บางพลี คอตตอน อินดัสตรี จำกัด ประเทศไทย

4.9 Alcohol (70%) จากองค์การสุรา กรมสรรพสามิต ประเทศไทย

4.10 Normal saline (0.9%), บริษัท General Hospital Products Public Co., Ltd. ประเทศไทย

4.11 Sterile water for injection บริษัท A.N.B. Laboratories Co., LTD ประเทศไทย

4.12 ชุดทดสอบ 3- CAT Research ELISA™ (Cat. No. BA E-5600), Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG (Cat. No. BA E-5600), ประเทศเยอรมนี

4.13 อาหารสัตว์ บริษัทโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ ประเทศไทย จำกัด

4.14 น้ำกรองสำหรับสัตว์ทดลอง

4.15 เข็มฉีดยา เบอร์ 21 และ26 บริษัท Nipro ประเทศไทย

4.16 Syringe ขนาด 1, 3, 5 ml บริษัท Nipro ประเทศไทย

4.17 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml., Hycon, ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.18 Minimum essential media, Horse serum, Horse serum, Phosphate buffer solution(PBS), 0.05% Trypsin-versene (Trypsin/EDTA), Tryphan blue 0.4%, 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, (MTT), GIBCO, ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.19 Dimethyl sulfoxide (DMSO), Sigma Chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.20 96-well plate, 6-well plate และ Seropipette ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร, Corning, ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.21 Cyclophosphamide (CP) และ Mitomycin C (MMC), Sigma-Aldrich Co., ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.22 Absolute ethanol, Merck, ประเทศเยอรมนี

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง Ohaus EO2140 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
2. Microplate reader, GENios plus, ประเทศออสเตรีย พร้อมโปรแกรมการวัดของ Magellan
3. Auto pipette, Gilson, ประเทศฝรั่งเศส
4. Multichannel auto pipette, Eppendorf, ประเทศเยอรมนี
5. Vortex Mixer, Scientific Industries, Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Stomach tube สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
7. Autoclave, รุ่น SS-320, Tomy Limited, ประเทศญี่ปุ่น

8. เครื่อง CO_2 Incubator, SHEL LAB Co. Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา

9. BECKMAN Microfuge^{TM}11, Beckman, ประเทศสหรัฐอเมริกา

10. กรรไกร จากบริษัท Mira ประเทศเยอรมัน

11. ปากคีบ จากบริษัท Mira ประเทศเยอรมัน

12. Locomotor activity cage ขนาด 54x50x37 เซนติเมตร, UGO BASILE,ประเทศอิตาลี

13. นาฬิกาจับเวลา บริษัท Canon ประเทศไทย

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดหญ้าดอกขาวในสัตว์ทดลอง

1.1 วิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูขาวที่ถูกป้อนสารสกัดดอกหญ้าขาว ตามวิธี : Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Method (Limit test); หมายเลข 420 ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2001) มีรายละเอียดดังนี้

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

ก่อนทำการทดสอบนำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย และทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง อดอาหารหนู 16 ชั่วโมงก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ

<u>การเตรียมตัวอย่างทดสอบ</u> หนูแต่ละตัวจะได้รับปริมาตรน้ำเคี่ยวสารสกัดหญ้าดอกขาวแต่ละชนิดในขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว จากการนำน้ำหนักตัวหนูแต่ละตัวคูณด้วย F = 0.002

<u>วิธีการทดสอบ</u>

ในวันทดสอบ ชั่งน้ำหนักหนู จัดแบ่งหนูเป็น 5 กลุ่มด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนู 10 ตัว คือเพศผู้และเพศเมีย เพศละ 5 ตัว โดยได้รับตัวอย่างทดสอบดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมได้รับน้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่ากลุ่มทดสอบ

กลุ่มที่ 2 ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 3 ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 4 ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 5 ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

ภายหลังป้อนตัวอย่างทดสอบครบ 4 ชั่วโมง ให้อาหารแก่หนูทุกกลุ่มตามปกติ สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูหลังป้อนตัวอย่างทดสอบที่เวลา 1/2, 1 และ 3 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวในวันที่ 1, 8 และ 15 (วันสิ้นสุดการทดลอง) หนูที่แสดงอาการผิดปกติอย่างรุนแรง หรือหนูที่มีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการ

ทดลองครบ 14 วันจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อตรวจสอบดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน (gross pathology)

เปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมทางสถิติโดยใช้วิธี Student's t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เพื่อดูผลของตัวอย่างทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนู

1.2 วิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในหนูขาวที่ได้รับการสัมผัสสารสกัดดอกหญ้าขาวทางผิวหนัง ตามวิธี : Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Method (Limit test); หมายเลข 420 ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2001) มีรายละเอียดดังนี้

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

ก่อนทำการทดสอบนำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย และทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง อดอาหารหนู 16 ชั่วโมงก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ

<u>การเตรียมตัวอย่างทดสอบ</u> หนูแต่ละตัวจะได้รับปริมาตรน้ำเคี่ยวสารสกัดหญ้าดอกขาวแต่ละชนิด ในขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว จากการนำน้ำหนักตัวหนูแต่ละตัวคูณด้วย F = 0.002

<u>วิธีการทดสอบ</u>

ก่อนการทดสอบ 1 วัน โกนขนหนูบริเวณสันหลังเหนือสะโพกเป็นบริเวณกว้าง 5 × 5 เซนติเมตร โดยไม่ให้มีรอยถลอกบนผิวหนัง ในวันทดสอบ ชั่งน้ำหนักหนูทุกตัว จัดแบ่งหนูเป็น 6 กลุ่มด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนู 10 ตัว คือเพศผู้และเพศเมีย เพศละ 5 ตัว โดยให้สัมผัสตัวอย่างทดสอบดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมน้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่ากลุ่มทดสอบ

กลุ่มที่ 2 สารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 3 สารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 4 สารสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 5 สารสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

โดยนำตัวอย่างเกลี่ยลงบน patch และปิด patch ลงบนผิวหนังบริเวณหลังที่โกนขนออกของหนูแต่ละกลุ่ม จากนั้นยึด patch ด้วย พลาสเตอร์ชนิด Transpore และห่อลำตัวด้วยผ้ายืด เพื่อยึด patch ติดกับผิวหนังไม่ให้เคลื่อนหลุด เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำ patch ออก ใช้สำลีปลอดเชื้อชุบน้ำอุ่นเช็ดตัวอย่างทดสอบที่เหลือค้างอยู่บนผิวหนังออก สังเกตและบันทึกอาการผิดปกติของหนูที่เวลา ½, 1 และ 3 ชั่วโมง หลังให้ตัวอย่างทดสอบและอย่างน้อยวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวในวันที่ 1, 8 และ 15 (วันสิ้นสุดการทดสอบ)

หนูที่แสดงอาการผิดปกติอย่างรุนแรง หรือหนูที่มีชีวิตรอดจนถึงวันสิ้นสุดการทดลองครบ

14 วันจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อตรวจสอบดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน (gross pathology) เปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมทางสถิติโดยใช้วิธี Student's t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เพื่อดูผลของตัวอย่างทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนู

1.3 วิธีการทดสอบการก่อความระคายเคืองผิวหนังกระต่าย

ดำเนินการทดสอบสารสกัดหญ้าดอกขาว ตามวิธีการทดสอบหมายเลข 404 : การทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (2002) มีรายละเอียดดังนี้

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

นำกระต่าย 3 ตัว (ต่อ 1 ตัวอย่างทดสอบ) มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนทำการทดสอบ 1 สัปดาห์ เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับตัวคุ้นเคยกับสถานที่ โดยกระต่ายจะได้รับน้ำและอาหารตามปกติ และก่อนทำการทดสอบ 1 วัน กระต่ายทุกตัวจะถูกโกนขนบริเวณลำตัวใต้หัวไหล่ชิดกระดูกสันหลังทั้งสองข้างเป็นบริเวณ 10 เซนติเมตร × 10 เซนติเมตร ด้วยปัตตาเลี่ยนไฟฟ้าให้ขนสั้นที่สุดเท่าที่จะทำได้แต่ไม่ให้ผิวหนังเป็นแผล

<u>วิธีการทดสอบ</u>

ชั่งน้ำเคี่ยวสารสกัดหญ้าดอกขาวแต่ละชนิดที่ต้องการทดสอบจำนวน 0.5 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบน patch และนำมาปิดลงบนผิวหนังหลังกระต่ายด้านหนึ่งที่โกนขนเตรียมไว้ (บริเวณทดสอบ) ส่วนบริเวณหลังอีกด้านหนึ่งของกระต่ายตัวเดิมปิดด้วย patch ที่เกลี่ยด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (บริเวณควบคุม) ยึด patch ด้วยพลาสเตอร์ชนิด Transpore และห่อลำตัวกระต่าย ด้วยผ้ายืด เพื่อยึด patch ติดกับผิวหนังไม่ให้เคลื่อนหลุด เมื่อครบ 4 ชั่วโมง เปิด patch ออก แล้วใช้สำลีชุบน้ำอุ่นเช็ดเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างทดสอบที่เหลือค้างอยู่บนผิวหนังหลุดออก ตรวจดูอาการแดงและอาการบวมตรงบริเวณทดสอบ ที่เวลา 1, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และถ้าพบว่ายังมีอาการแดง และอาการบวมอยู่ให้ตรวจดูอาการต่อจนถึงวันที่ 14 โดยการให้คะแนนยึดตามหลักเกณฑ์ดังนี้

หลักเกณฑ์การให้คะแนน

อาการแดง	**คะแนน**
ไม่แดง	0
แดงเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้	1
แดงจนมองเห็นได้ชัด	2
แดงปานกลางถึงแดงมาก	3
แดงช้ำถึงผิวหนังตกสะเก็ด	4
อาการบวม	**คะแนน**
ไม่บวม	0

บวมเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้	1
บวมน้อย (ขอบนูนเห็นได้ชัดเจน)	2
บวมปานกลาง (นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร)	3
บวมมาก(นูนขึ้นมา1 มิลลิเมตร และลามออกไป)	4

2. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมแบบเฉียบพลัน (Chromosome aberration)

ดำเนินการทดสอบผลของ “สารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ)” ต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวแบบเฉียบพลันตามวิธีทดสอบหมายเลข 475 “Genetic Toxicology : *In vivo* Mammalian Bone Marrow Cytogenetic Test – Chromosomal Analysis” ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (1997) โดยมีรายละเอียดดังนี้

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

ก่อนทำการทดสอบนำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24 ± 1 องศาเซลเซียส จัดกลุ่มหนูกลุ่มทดสอบใช้หนูเพศผู้และเพศเมีย โดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย และทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง อดอาหารหนู 16 ชั่วโมงก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ

<u>การเตรียมตัวอย่างทดสอบ</u>

- หนูแต่ละตัวจะได้รับปริมาตรน้ำเคี่ยวสารสกัดหญ้าดอกขาวแต่ละชนิด ในขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว จากการนำน้ำหนักตัวหนูแต่ละตัวคูณด้วย F = 0.002
- Cyclophosphamine 2.4 กรัม % เตรียมโดยชั่งสาร Cyclophosphamide 2.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มิลลิลิตร

<u>วิธีการทดสอบ</u>

ในวันทดสอบ ชั่งน้ำหนักหนู จัดแบ่งหนูเป็น 6 กลุ่มด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย แต่ละกลุ่มประกอบด้วยหนู 10 ตัว คือเพศผู้และเพศเมีย เพศละ 5 ตัว โดยได้รับตัวอย่างทดสอบดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่ากลุ่มทดสอบ

กลุ่มที่ 2 ป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 4 ป้อนสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว

กลุ่มที่ 5 ป้อนสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนัก

กลุ่มที่ 6 ฉีด Cyclophosphamine (CP) เข้าช่องท้องขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว

หลังจากป้อน “สารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ)” นาน 24 ชั่วโมง หนูทุกตัวจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบ

โดยการให้สูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเก็บเซลล์ไขกระดูกจากกระดูกต้นขา เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์โครโมโซม โดยการย้อมสไลด์โครโมโซมด้วย 10% Giemsa strain solution (Giemsa stain 8 มิลลิลิตรใน Gurr buffer 72 มิลลิลิตร) ที่เตรียมใหม่และกรองก่อนใช้ด้วยกระดาษกรอง no.1 จากนั้นทำการย้อมสไลด์ของโครโมโซมทิ้งไว้นานประมาณ 20 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำไหลสะอาด (running tap water) และผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (air dry) ก่อนนำสไลด์มาอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์โครโมโซมโดยเปรียบเทียบค่า Mitotic Index (%) และเปรียบเทียบความเสียหายของโครโมโซมระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Student's t-Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3. การทดสอบผลการเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen)

การทดสอบผลการเป็นสารก่อมะเร็งของสารสกัดน้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวจากการดูผลการเจริญญผิดปกติของเซลล์ Bhas 42 ซึ่งเป็นเซลล์คล้ายคลึง fibroblast ที่ได้จากเซลล์ embryo ของหนู BALB/c เมื่อได้รับการสัมผัสกับสารสกัดหญ้าดอกขาวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 3 วัน และดูผลเมื่อเลี้ยงครบ 21 วัน

<u>วัดร้อยละการเจริญของเซลล์ด้วย MTT assay</u> มีขั้นตอนดังนี้

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ Bhas 42 (JCRB0149 cell line) ที่เจริญขยายเต็มที่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ 75 ตร.ซม. ทิ้งและล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นเติม Trypsin/EDTA 5 มิลลิลิตร (มล.) ทิ้งไว้นาน 1 นาที และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM 15 มล. ให้เซลล์อยู่ในลักษณะแขวนลอย
2. นำเซลล์ไปปั่นที่ 3000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วย Haematocytometer และเจือจางเซลล์ให้ได้ 2×10^3 เซลล์/มล. ประมาณ 100 มล.
3. ดูดเซลล์ที่เจือจางปริมาตร 2 มล. ใส่แต่ละหลุมใน 6-well plate และ นำไปเพาะเลี้ยงใน CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเซลล์แผ่ขยายเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) อย่างน้อยร้อยละ 80 ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม
4. เตรียมสารสกัดหญ้าดอกขาว "ใบ ดอก ก้าน(ต้น) และผสมทุกส่วน" โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1:8, 1:16, 1:32 และ 1: 64 v/v ที่ผ่านการกรองด้วย Syringe filter ขนาด 22 µM ร่วมด้วย Mitomycin C (MMC) ขนาด 0.016 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Cyclophosphamide (CP) ขนาด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MEM และ DMSO เป็น ตัวควบคุม
5. นำตัวอย่างทดสอบดังกล่าวแต่ละชนิดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงหลุมเซลล์เพาะเลี้ยงและนำไปบ่มใน CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}C$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
6. เมื่อครบ 72 ชั่วโมงทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มต่ออีก 72 ชั่วโมง

หลังจากครบตามเวลาให้เติม MTT (ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ร่วมด้วยกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM ในอัตราส่วน 1 : 3 บ่มเพาะอีกครั้งที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

7. เมื่อครบเวลาดังกล่าวดูด MTT และ อาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ทำการเติม 2 ml DMSO เพื่อไปละลายผลึกที่เกิดขึ้น นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซนต์การเจริญเติบโตของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม

<u>วิธีวัดผลสารก่อมะเร็งด้วย Cell transformation assay</u>

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ Bhas 42 (JCRB0149 cell line) ที่เจริญขยายเต็มที่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ 75 ตร.ซม. ทิ้งและล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นเติม Trypsin/EDTA 5 มิลลิลิตร (มล.) ทิ้งไว้นาน 1 นาที และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM 15 มล. ให้เซลล์อยู่ในลักษณะแขวนลอย
2. นำเซลล์ไปปั่นที่ 3000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วย Haematocytometer และเจือจางเซลล์ให้ได้ 2×10^3 เซลล์/มล. ประมาณ 400 มล.
3. ดูดเซลล์ที่เจือจางปริมาตร 2 มล. ใส่แต่ละหลุมใน 6-well plate และ นำไปเพาะเลี้ยงใน CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเซลล์แผ่ขยายเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) อย่างน้อยร้อยละ 80 ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม
4. เตรียมสารสกัดหญ้าดอกขาว “ใบ ดอก ก้าน(ต้น) และผสมทุกส่วน” โดยนำสารสกัดแต่ละชนิดมาละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 1:8, 1:16, 1:32 และ 1: 64 v/v ที่ผ่านการกรองด้วย Syringe filter ขนาด 22 μM ร่วมด้วย Mitomycin C (MMC) ขนาด 0.016 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Cyclophosphamide (CP) ขนาด 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MEM และ DMSO เป็น ตัวควบคุม
5. นำตัวอย่างทดสอบดังกล่าวแต่ละชนิดปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงหลุมเซลล์เพาะเลี้ยงและนำไปบ่มใน CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มต่ออีก 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารทุกวันที่ 7, 11 และ 14 และบ่มต่อจนครบเวลา 21 วัน
6. วัดผลการทดสอบโดยการตรวจดูลักษณะและร้อยละของจำนวน foci ที่เกิดเพิ่มขึ้นเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างทดสอบกับกลุ่มควบคุม ภายใต้กล้อง Invert Microscopic วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี one way ANOVA

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ของสารสกัดหญ้าดอกขาว

การทดสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของสารสกัดหญ้าดอกขาว โดยวิธี MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) assay เป็นการใช้สาร tetrazolium salt

ที่มีสีเหลืองอ่อนถูกเอนไซม์ชนิดซัคซิเนสดีไฮโดรจีเนส ซึ่งมีอยู่ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต เปลี่ยนเป็นผลึกสีม่วงที่ไม่ละลายน้ำ (violet formazan crystal) ในกรณีที่เซลล์ตายจะทำให้เอนไซม์ในไมโตคอนเดรียเสียสภาพ จึงถูกพัฒนาเพื่อใช้หาปริมาณของเซลล์ที่รอดชีวิต โดยต้องทำการการละลาย formazan crystal ด้วยสารละลาย DMSO และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ประมาณ 550-590 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะแปรผันตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อคำนวณและเปรียบเทียบค่าเปอร์เซนต์การมีชีวิตของเซลล์ในกลุ่มควบคุม

<u>การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง</u>

1. ดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ fibroblast (ATCC CCL-1 cell line) ที่เจริญขยายเต็มที่ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดพื้นที่ 75 ตารางเซ็นติเมตร ออกและล้างเซลล์ด้วย PBS
2. เติม Trypsin/EDTA 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 3 นาที เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM อีก 15 มิลลิลิตร ให้เซลล์อยู่ในลักษณะแขวนลอย
3. นำไปปั่นที่ 3000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วย Haematocytometer
4. เจือจางเซลล์ให้ได้ 1 x 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ประมาณ 20 มิลลิลิตร
5. ดูดเซลล์ที่เจือจางปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่แต่ละหลุมใน 96-well plate โดยเว้นแถวที่ 1 และ 12 เพื่อใช้เป็นblank
6. นำไปเพาะเลี้ยงใน CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จนเซลล์แผ่ขยายเป็นชั้นเดี่ยว (monolayer) อย่างน้อยร้อยละ 80 ของพื้นที่เลี้ยงเซลล์แต่ละหลุม
7. เตรียมสารตัวอย่าง “ใบ ดอก ก้าน(ต้น) และแบบผสมทุกส่วน” นำมาละลายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MEM ให้มีความเข้มข้นดังนี้ 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ100 % v/v ที่ผ่านการกรองด้วย Syringe filter ขนาด 22 µM
8. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MEM เป็น blank

<u>วิธีการทดสอบ</u>

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออกจากแต่ละหลุมใน 96-well plate ที่มีเซลล์เจริญอย่างน้อยร้อยละ 80 และล้างด้วย PBS 1 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100% v/v) รวมถึงสารละลายควบคุม ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงหลุมละ 200 ไมโครลิตร นำเข้าตู้ CO_2 Incubator ที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

<u>การวัดผลการทดสอบ</u>

หลังจากปล่อยให้เซลล์สัมผัสกับสารสกัดตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 24 ชั่วโมง ทำการวัดเปอร์เซนต์ของเซลล์ที่มีชีวิตโดย MTT assay ตามขั้นตอนดังนี้

1. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เติมสารละลาย MTT ขนาด 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน สารละลาย PBS ปริมาณ 50 ไมโครลิตร/หลุม และ อาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 150 ไมโครลิตร/หลุม บ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มเซลล์ที่ 37 °C นาน 4 ชั่วโมง
2. ดูดสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยการเติมสารละลาย DMSO 100 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ นาน 15 นาที
3. และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหา เปอร์เซนต์เซลล์ที่มีชีวิตเทียบกับกลุ่มควบคุม

5. ศึกษาผลสารสกัดต่อ nicotinic receptor ในระบบประสาทส่วนกลางสัตว์ทดลอง

5.1 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline ในเลือดหนู โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Helen *et. al.* (2000) มีรายละเอียดดังนี้

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

หนูขาว พันธุ์ Wistar น้ำหนัก 250-300 กรัม เพศผู้ จำนวน 56 ตัว ก่อนทำการทดสอบนำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24 ± 1 องศาเซลเซียส จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย และทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง อดอาหารหนู 16 ชั่วโมงก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ

<u>การเตรียมตัวอย่างทดสอบ</u>

- น้ำเคี่ยวสารสกัดหญ้าดอกขาวแต่ละชนิด ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยปริมาตรที่หนูได้รับเท่ากับน้ำหนักหนู x Factor 0.01
- ยามาตรฐาน Bupropion เตรียมในรูปสารละลาย 1.5 g% (w/v) โดยชั่ง Bupropion 1.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

<u>วิธีการทดสอบ</u>

1. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline ในหนูขาวที่ได้รับสารนิโคติน (Nicotine, Ni) โดยแบ่งเป็น 7 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว แบ่งกลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่นและหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 2 ป้อนน้ำกลั่นและหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc) ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 3 ป้อนสาร Bupropion ขนาด 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวและหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง

ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc) ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 4 ป้อนสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (35 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc) ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc) ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 6 ป้อนสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc) ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 7 ป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc) ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

เมื่อครบ 21 วัน ทำการเจาะเลือดหนูขาวแต่ละกลุ่มเพื่อนำไปตรวจหาระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline โดยใช้ชุดทดสอบ 3- CAT Research ELISA™ (Cat. No. BA E-5600, Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG (Cat. No. BA E-5600), ประเทศเยอรมนี)

2.การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline ในหนูขาวปกติ โดยแบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 4 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่นและหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 2 ป้อนสาร Bupropion ขนาด 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวและหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 3 ป้อนสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (35 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 5 ป้อนสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

กลุ่มที่ 6 ป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร ติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 21 วัน

เมื่อครบ 21 วัน ทำการเจาะเลือดหนูขาวแต่ละกลุ่มเพื่อนำไปตรวจหาระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline โดยใช้ชุดทดสอบ 3- CAT Research ELISA™ (Cat. No. BA E-5600, Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG (Cat. No. BA E-5600), ประเทศเยอรมนี)

สถิติที่ใช้ในการทดสอบ

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับตัวอย่างทดสอบแต่ละชนิด โดยใช้ one way ANOVA ($p < 0.05$)

5.2 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรใน Locomotor

โดยประยุต์ตามวิธีของ Sidhpura *et. al.* (2007) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าหากมีการเพิ่มระดับ dopamine ในกระแสเลือด หนูจะมีพฤติกรรมการเคลื่อนไหวที่ตื่นตัว ดังนั้นการทดสอบตามวิธีนี้ก็เพื่อยืนยันว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีผลต่อการเพิ่มระดับของ dopamine ในเลือด เนื่องจากมีสารนิโคติน ตามรายละเอียดของการทดสอบดังนี้

<u>การเตรียมสัตว์ทดลอง</u>

หนูถีบจักร น้ำหนัก 25-35 กรัม เพศผู้ จำนวน 72 ตัว ก่อนทำการทดสอบนำหนูมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้หนูปรับตัวคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 24 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส จัดกลุ่มหนูโดยใช้วิธีการสุ่มตัวอย่างแบบง่าย และทำสัญลักษณ์ประจำตัวโดยการแต้มเบอร์ที่หาง อดอาหารหนู 16 ชั่วโมงก่อนป้อนตัวอย่างทดสอบ โดยให้น้ำดื่มตามปกติ

<u>การเตรียมตัวอย่างทดสอบ</u>

- น้ำเคี่ยวสารสกัดหญ้าดอกขาวแต่ละชนิด ขนาด 1-0 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยปริมาตรที่หนูได้รับเท่ากับน้ำหนักหนู x Factor 0.01 จากการคำนวณปริมาณสารสำคัญของน้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว พบว่าขนาด กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีสารสำคัญอยู่ระหว่าง 15 – 35 มิลลิกรัม ขึ้นกับส่วนต่าง ๆ ของหญ้าดอกขาว
- ยามาตรฐาน Bupropion เตรียมในรูปสารละลาย 1.5 g% (w/v) โดยชั่ง Bupropion 1.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

<u>วิธีการทดสอบ</u>

I. จัดแบ่งหนูถีบจักรออกเป็น 2 ชุดดังนี้

ชุดที่ 1. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการเคลื่อนไหวในหนูถีบจักรที่ได้รับสารนิโคติน

(Nicotine, Ni) โดยแบ่งเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว แบ่งกลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่นและ ฉีด ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc)

กลุ่มที่ 2 ป้อนสาร Bupropion ขนาด 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวและ ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc)

กลุ่มที่ 3 ป้อนสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (35 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และหลังจากป้อน 1 ชั่วโมง ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc)

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และ ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc)

กลุ่มที่ 5 ป้อนสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)และ ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc)

กลุ่มที่ 6 ป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และ ฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง (sc)

ชุดที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการเคลื่อนไหวในหนูถีบจักรปกติ โดยแบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมป้อนน้ำกลั่นและ ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 ป้อนสาร Bupropion ขนาด 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวและ ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 ป้อนสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (35 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และ ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และ ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 5 ป้อนสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (15 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และ ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 6 ป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม) ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (30 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และ ฉีด 0.9 % น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร

II. นำหนูแต่ละกลุ่มวัดการเคลื่อนไหวในตู้ Locomotor บันทึกผลทุก 20 นาทีเป็นเวลานาน 60 นาที

III. ป้อนสารทดสอบแต่ละชนิด แล้วนำไปวัดการเคลื่อนไหวในตู้ Locomotor เป็นเวลา 20 นาที

IV. หนูแต่ละกลุ่มจะได้รับการฉีด nicotine 0.6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เข้าใต้ผิวหนัง หรือ

0.9% น้ำเกลือเข้าใต้ผิวหนัง (sc) 0.15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดการเคลื่อนไหวใน Locomotor บันทึกผลทุก 20 นาทีเป็นเวลา 180 นาที

ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดหญ้าดอกขาวในสัตว์ทดลอง

1.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก

ผลการทดสอบไม่พบการตายหรืออาการผิดปกติใดๆ ของหนูทดลองหลังป้อนสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) และ สารสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) ที่ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ตลอดระยะเวลาสังเกตผลนาน 15 วัน และจากการชันสูตรซาก (gross pathology) เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ ตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในของหนูทุกตัว ดังแสดงในตารางที่ 1

1.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง

ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันจากการซึมผ่านทางผิวหนังหนูขาว พบว่าไม่มีอาการผิดปกติใดๆ ของหนูทดลองที่ได้รับตัวอย่างสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) และ สารสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) ที่ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว และไม่พบการตายของหนูทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ ในการชันสูตรซาก (gross pathology) ตรวจไม่พบความผิดปกติของอวัยวะภายในหนูทดลองทุกกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2

1.3 ผลการทดสอบการก่อความระคายเคืองผิวหนังกระต่าย

ผลการทดสอบการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน) และ สารสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) พบว่า

สารสกัดหญ้าดอกขาวทุกตัวอย่างไม่มีผลในการก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย โดยไม่มีอาการแดงและอาการบวมของผิวหนังกระต่ายทุกตัว ดังแสดงในตารางที่ 3

2. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมแบบเฉียบพลัน (Chromosome aberration)

ตารางที่ 4 และ 5 แสดงผลของสารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน), สารสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ) ที่มีต่อโครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาว แบบเฉียบพลัน ตามวิธีทดสอบหมายเลข 475 "Genetic Toxicology : *In vivo* Mammalian Bone Marrow Cytogenetic Test – Chromosomal Analysis" ของ OECD Guidelines for Testing of Chemicals (1997) ในขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ภายหลังจากป้อน 24 ชั่วโมง หนูทุกตัวจะถูกเก็บเซลล์ไขกระดูกจากกระดูกต้นขา เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์โครโมโซม ผลของการทดสอบพบว่ามีเพียงค่า %Mitotic Index ของหนูเพศผู้ที่ได้รับ "สารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม)" เท่านั้นที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ขณะที่ทุกตัวอย่างไม่มีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อโครโมโซมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1-5) ส่วนหนูที่ได้รับสาร Cyclophosphamide มีผลทั้งลด %Mitotic Index และก่อให้เกิดความเสียหายของโครโมโซม ดังรูปที่ 6

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากของสารสกัดหญ้าดอกขาว

ตัวอย่างทดสอบ	เพศ	ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น(กรัม)		*อัตราการตาย	ผลการชันสูตรอวัยวะภายใน (Gross pathology)
		วันที่ 8	วันที่ 15		
กลุ่มควบคุม น้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดสอบ	ผู้	29.80 ± 0.37	69.80 ± 0.49	0/5	ปกติ
	เมีย	19.60 ± 1.29	34.80 ± 2.35	0/5	ปกติ
“น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ผสม)” 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	ผู้	22.80 ± 1.39	62.20 ± 1.24	0/5	ปกติ
	เมีย	20.80 ± 0.49	40.40 ± 0.24	0/5	ปกติ
“น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ดอก)” 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	ผู้	31.60 ± 1.40	69.20 ± 2.41	0/5	ปกติ
	เมีย	21.00 ± 0.55	41.80 ± 1.11	0/5	ปกติ
“น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ก้าน)” 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	ผู้	32.00 ± 0.77	70.80 ± 1.02	0/5	ปกติ
	เมีย	20.20 ± 0.73	38.20 ± 0.80	0/5	ปกติ
“น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ใบ)” 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	ผู้	29.80 ± 0.73	69.20 ± 0.33	0/5	ปกติ
	เมีย	18.60 ± 1.94	39.40 ± 1.88	0/5	ปกติ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนังของ"สารสกัดหญ้าดอกขาว"

ตัวอย่างทดสอบ	เพศ	ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)		*อัตราการตาย	ผลการชันสูตรอวัยวะภายใน (Gross pathology)
		วันที่ 8	วันที่ 15		
กลุ่มควบคุม น้ำกลั่นปริมาตรเทียบเท่าในกลุ่มทดสอบ	ผู้	20.20 ± 0.58	42.20 ± 1.98	0/5	ปกติ
	เมีย	17.40 ± 0.87	33.80 ± 1.65	0/5	ปกติ
"น้ำเคียวหญ้าดอกขาว (ผสม)" 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	ผู้	18.20 ± 1.85	31.60 ± 2.92	0/5	ปกติ
	เมีย	17.00 ± 0.89	27.60 ± 1.69	0/5	ปกติ
"น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ดอก)" 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	ผู้	21.40 ± 1.16	36.20 ± 2.13	0/5	ปกติ
	เมีย	20.40 ± 0.40	37.60 ± 3.45	0/5	ปกติ
"น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ก้าน)" 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	ผู้	20.40 ± 1.36	38.40 ± 3.20	0/5	ปกติ
	เมีย	15.60 ± 1.94	26.20 ± 2.03	0/5	ปกติ
"น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว (ใบ)"	ผู้	19.80 ± 0.97	33.80 ± 1.46	0/5	ปกติ

2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว	เมีย	20.40 ± 0.51	29.80 ± 1.28	0/5	ปกติ

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่ายของสารสกัดหญ้าดอกขาว

น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาววส่วนต่าง ๆ	กระต่ายหมายเลข	ระยะเวลาที่สังเกตอาการ (ชั่วโมง)							
		1		24		48		72	
		อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม	อาการแดง	อาการบวม
ผสม (ดอก+ก้าน+ใบ)	109	0	0	0	0	0	0	0	0
	110	0	0	0	0	0	0	0	0
	111	0	0	0	0	0	0	0	0
ดอก	112	0	0	0	0	0	0	0	0
	113	0	0	0	0	0	0	0	0
	114	0	0	0	0	0	0	0	0
ก้าน	115	0	0	0	0	0	0	0	0
	116	0	0	0	0	0	0	0	0
	117	0	0	0	0	0	0	0	0
ใบ	118	0	0	0	0	0	0	0	0
	119	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0

หลักเกณฑ์การให้คะแนน

อาการแดง	คะแนน
ไม่แดง	0
แดงเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้	1
แดงจนมองเห็นได้ชัด	2
แดงปานกลางถึงแดงมาก	3
แดงช้ำถึงผิวหนังตกสะเก็ด	4

อาการบวม	คะแนน
ไม่บวม	0
บวมเล็กน้อยแทบสังเกตไม่ได้	1
บวมน้อย (ขอบนูนเห็นได้ชัดเจน)	2
บวมปานกลาง (นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร)	3
บวมมาก (นูนขึ้นมา 1 มิลลิเมตร และลามออกไป)	4

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์โครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศผู้หลังจากได้รับตัวอย่างทดสอบ

กลุ่ม	ตัวอย่างทดสอบ	[a,b]%M.I. ± SEM	[a,c]ชนิดความเสียหายของโครโมโซม			จำนวนเซลล์ที่เกิดความเสียหายต่อโครโมโซม
			Break	Exchange	Multiple Ab	
1	น้ำกลั่น	6.28 ± 0.16	0	0	0	0
2	หญ้าดอกขาว (ผสม)	*5.88 ± 0.12	0	0	0	0
3	หญ้าดอกขาว (ดอก)	6.34 ± 0.13	0	0	0	0
4	หญ้าดอกขาว (ก้าน)	6.30 ± 0.22	0	0	0	0
5	หญ้าดอกขาว (ใบ)	6.30 ± 0.20	0	0	0	0
6	CP	*3.96 ± 0.23	*6.80 ± 2.76	1.00 ± 0.77	*1.20 ± 0.49	*5.80 ± 1.59

[a] แสดงเป็นค่า Mean ± SEM

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

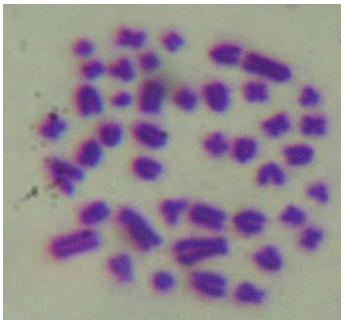
ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์โครโมโซมในเซลล์ไขกระดูกของหนูขาวเพศเมียหลังจากได้รับตัวอย่างทดสอบ

กลุ่ม	ตัวอย่างทดสอบ	[a,b]%M.I. ± SEM	[a,c]ชนิดความเสียหายของโครโมโซม			จำนวนเซลล์ที่เกิดความเสียหายต่อโครโมโซม
			Break	Exchange	Multiple Ab	
1	น้ำกลั่น	5.80 ± 0.33	0	0	0	0
2	หญ้าดอกขาว (ผสม)	6.10 ± 0.16	0	0	0	0
3	หญ้าดอกขาว (ดอก)	6.28 ± 0.11	0	0	0	0
4	หญ้าดอกขาว (ก้าน)	6.02 ± 0.19	0	0	0	0
5	หญ้าดอกขาว (ใบ)	6.12 ± 0.19	0	0	0	0
6	CP	*4.10 ± 0.14	*21.20 ± 1.62	*2.00 ± 0.84	*1.40 ± 0.51	*9.20 ± 0.97

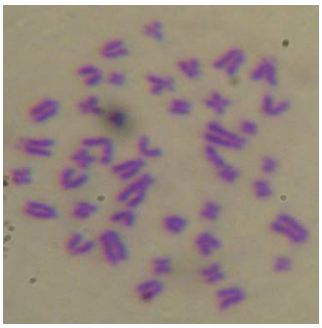
[a] แสดงเป็นค่า Mean ± SEM

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

รูปที่ 1 แสดงโครโมโซมปกติในหนูเพศผู้ และเพศเมียหลังจากได้รับน้ำกลั่น

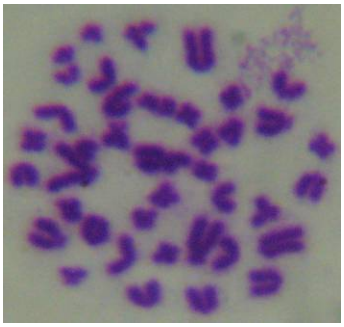


เพศผู้

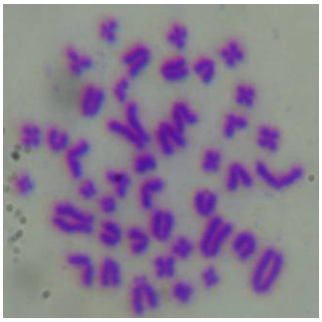


เพศเมีย

รูปที่ 2 แสดงโครโมโซมปกติในหนูเพศผู้ และเพศเมียหลังจากได้รับ สารสกัดหญ้าดอกขาว (ผสม)

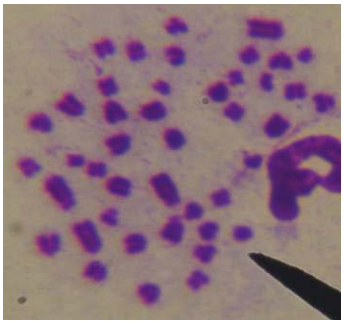


เพศผู้

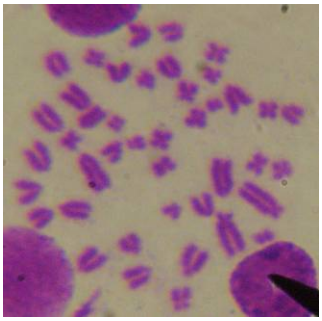


เพศเมีย

รูปที่ 3 แสดงโครโมโซมปกติในหนูเพศผู้ และเพศเมียหลังจากได้รับ สารสกัดหญ้าดอกขาว (ดอก)

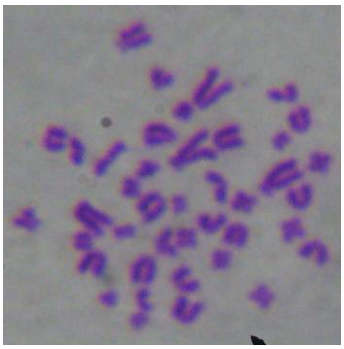


เพศผู้

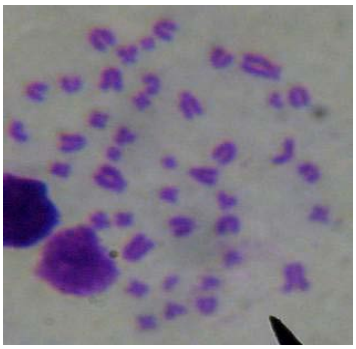


เพศเมีย

รูปที่ 4 แสดงโครโมโซมปกติในหนูเพศผู้ และเพศเมียหลังจากได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว (ก้าน)

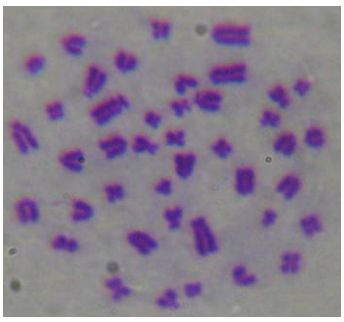


เพศผู้

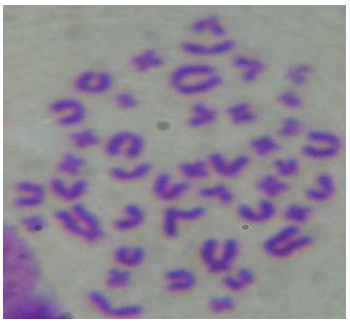


เพศเมีย

รูปที่ 5 แสดงโครโมโซมปกติในหนูเพศผู้ และเพศเมียหลังจากได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว (ใบ)



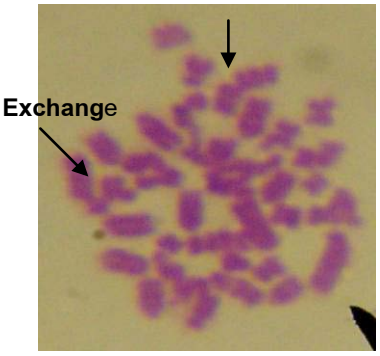
เพศผู้



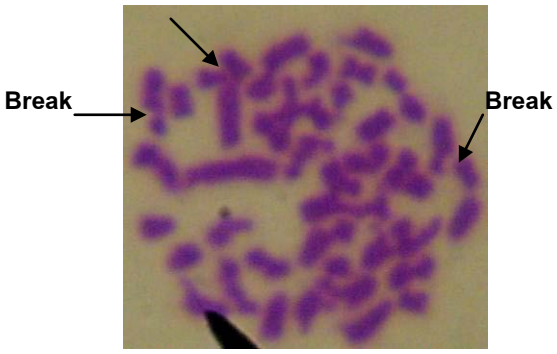
เพศเมีย

รูปที่ 6 แสดงความผิดปกติของโครโมโซมในหนูเพศผู้ และเพศเมียหลังจากได้รับสาร Cyclophosphamide

Break **Exchange**



เพศผู้



เพศเมีย

3. ผลการทดสอบการเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen)

ตารางที่ 6 แสดงผลจากการเติมสารสกัดหญ้าดอกขาวจากใบ ดอก ก้าน และผสม ในอัตราส่วน 1:8, 1:16, 1:32 และ 1:64 ให้สัมผัสกับเซลล์ Bhas 42 เป็นเวลานาน 3 วันและเลี้ยงเซลล์จนครบ 21 วัน พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ลดลง และไม่มีผลในการเพิ่มร้อยละของ foci ในเซลล์ (รูปที่ 7) ขณะที่ cyclophosphomide 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลเพิ่ม foci ของเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 8).

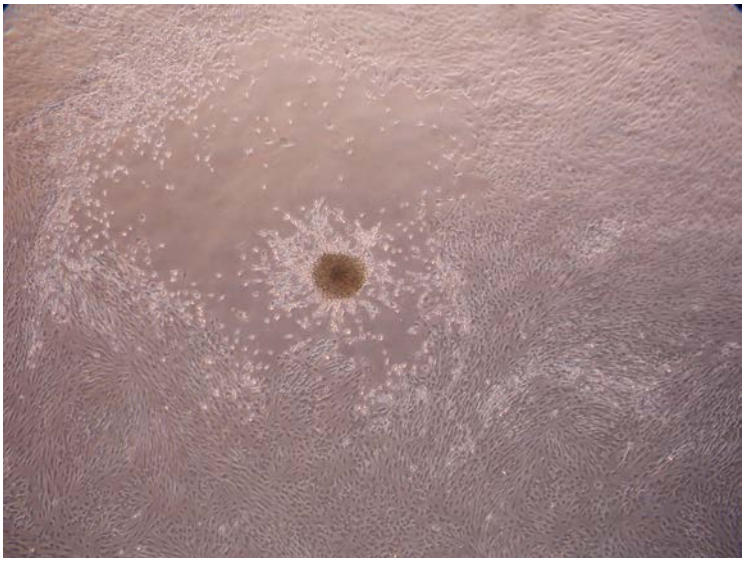
ตารางที่ 6 ผลการเป็นสารก่อมะเร็งของสารสกัดหญ้าดอกขาวด้วยวิธี Transformation Assay ของเซลล์ Bhas 42

สารสกัดหญ้าดอกขาว (น้ำเดี่ยว)	อัตราส่วนความเข้มข้น:น้ำ	ร้อยละของการเจริญเติบโต	ร้อยละของ Foci ที่เพิ่มขึ้น
ใบ	1 : 8	53.58	0.00
	1 : 16	53.01	0.00
	1 : 32	65.78	0.00
	1 : 64	76.44	0.00
ดอก	1 : 8	46.80	0.00
	1 : 16	57.10	0.00
	1 : 32	80.53	0.00
	1 : 64	102.52	0.00
ต้น	1 : 8	61.75	0.00
	1 : 16	77.67	0.00
	1 : 32	92.83	0.00

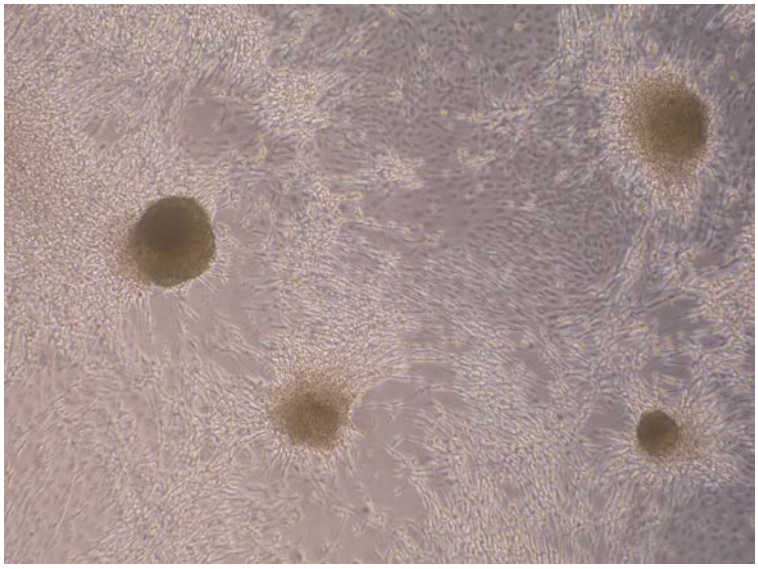
	1 : 64	111.20	0.00
ผสม	1 : 8	40.96	0.00
	1 : 16	56.46	0.00
	1 : 32	82.53	0.00
	1 : 64	107.74	0.00
Cyclophosphamide(CP)	0.5 มก./มล.	71.60	51.61*
น้ำกลั่น	-	100	0.00

*$P < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม

รูปที่ 7 แสดงลักษณะ Foci ของเซลล์ Bhas 42 ที่ได้รับน้ำกลั่น หรือสารสกัดหญ้าดอกขาว



รูปที่ 8 แสดงลักษณะ Foci ของเซลล์ Bhas 42 ที่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ cyclophosphamide

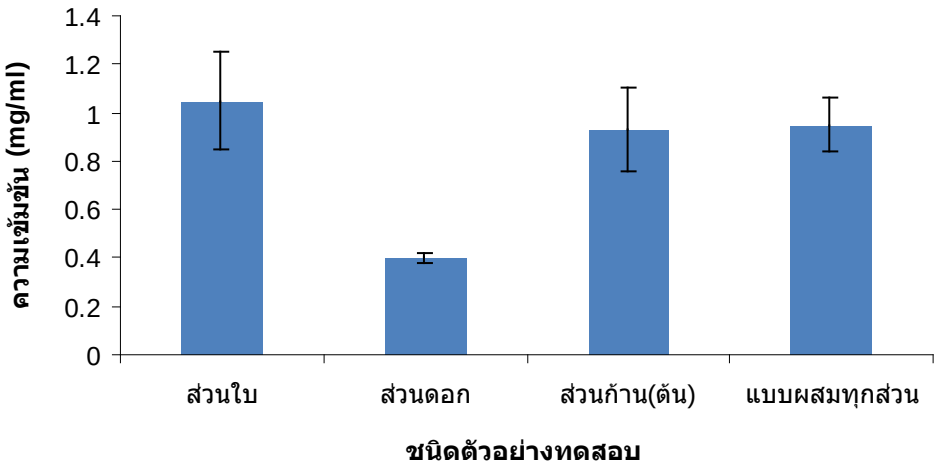


4. ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ของสารสกัดหญ้าดอกขาว

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ของสารสกัดน้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวทั้ง 4 ส่วน ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100% v/v โดยวิธี MTT assay พบว่าร้อยละของเซลล์ L929 มีชีวิตรอดลดลง ตามความเข้มข้นของของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Blank) โดยระดับความเข้มข้นของสารสกัดในส่วน ใบ ดอก ก้าน และแบบผสมทุกส่วน มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ลดลงกึ่งหนึ่ง (IC_{50}) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ได้แก่ 1.05 ± 0.20, 0.4 ± 0.02, 0.93 ± 0.17 และ 0.95 ± 0.11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 9

รูปที่ 9 ค่า IC_{50} ของสารสกัดหญ้าดอกขาวในแต่ละส่วนต่อเซลล์ L929

กราฟแสดงค่า IC_{50} ในสารสกัดหญ้าดอกขาว



5. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อ nicotinic receptor ในระบบประสาทส่วนกลางสัตว์ทดลอง

5.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline ในเลือดหนู

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม ต่อระบบประสาทในหนูขาวที่ได้รับการฉีดสารนิโคตินเข้าใต้ผิวหนัง พบว่า ระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline ในพลาสม่า ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ดังแสดงในตารางที่ 7

ส่วนผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม ต่อระบบประสาทในหนูปกติ พบว่าระดับ dopamine ในพลาสม่า มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ขณะที่ระดับ noradrenaline และ adrenaline ในพลาสม่า ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline ในเลือดหนูขาวที่ได้รับสารนิโคติน (Ni) n=6

ระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline (นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือ ng/ml) แสดงเป็นค่า mean ± S.E.
*เปรียบกับกลุ่มควบคุม (p<0.05)

กลุ่ม	Dopamine(ng/ml)	Noradrenaline(ng/ml)	Adrenaline(ng/ml)
Water + 0.9% น้ำเกลือ	0.37±0.08	7.28±1.03	3.88±0.38

กลุ่ม	Dopamine(ng/ml)	Noradrenaline(ng/ml)	Adrenaline(ng/ml)
Water + 0.9% น้ำเกลือ	0.54 ± 0.09	3.79 ± 0.18	3.26 ± 0.14
Water +Ni 0.6 มก./กก.	0.95 ± 0.38	3.58 ± 0.37	3.10 ± 0.31
Bupropion 150 มก./กก. +Ni 0.6 มก./กก.	0.61 ± 0.13	4.32 ± 0.54	3.73 ± 0.46
สารสกัดใบหญ้าดอกขาว 10 ก./กก. + Ni 0.6 มก./กก.	0.53 ± 0.63	4.69 ± 0.51	4.03 ± 0.44
สารสกัดดอกหญ้าดอกขาว 10 ก./กก. + Ni 0.6 มก./กก.	0.56 ± 0.07	3.77 ± 0.22	3.24 ± 0.19
สารสกัดก้านหญ้าดอกขาว 10 ก./กก. + Ni 0.6 มก./กก.	0.34 ± 0.05	3.51 ± 0.16	3.04 ± 0.13
สารสกัดหญ้าดอกขาวผสม 10 ก./กก. + Ni 0.6 มก./กก.	0.50 ± 0.07	3.63 ± 0.24	3.13 ± 0.2

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline ในเลือดหนูปกติ

Bupropion 150 มก./กก. +0.9% น้ำเกลือ	1.28±0.19*	6.60±0.43	3.58±0.25
สารสกัดใบหญ้าดอกขาว 10 ก./กก. + 0.9% น้ำเกลือ	0.65±0.1	7.43±1.0	3.81±0.11
สารสกัดดอกหญ้าดอกขาว 10 ก./กก. + 0.9% น้ำเกลือ	0.61±0.09	7.78±0.11	3.74±0.16
สารสกัดก้านหญ้าดอกขาว 10 ก./กก. + 0.9% น้ำเกลือ	0.56±0.1	7.63±0.92	3.92±0.11
สารสกัดหญ้าดอกขาวผสม 10 ก./กก. + 0.9% น้ำเกลือ	0.73±0.07	7.21±0.21	3.73±0.54

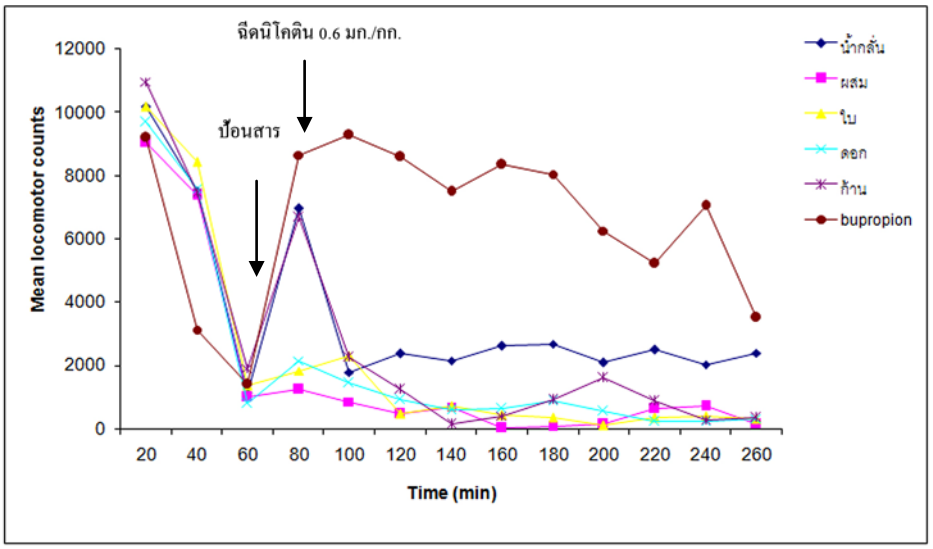
ระดับ dopamine, noradrenaline และ adrenaline (นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือ ng/ml) แสดงเป็นค่า mean ± S.E.
*เปรียบกับกลุ่มควบคุม (p<0.05)

5.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรใน Locomotor

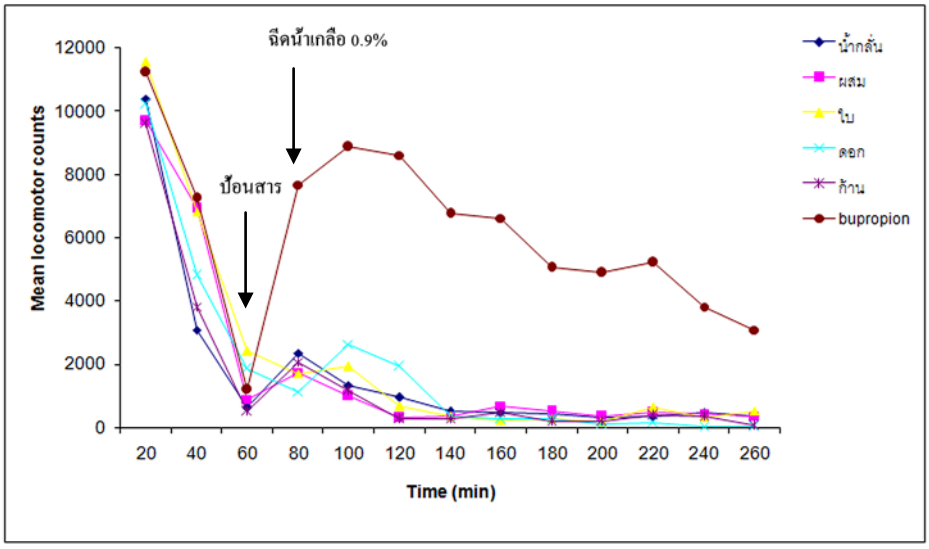
ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักร เพื่อแสดงว่าสารสกัดหญ้าดอกขาวมีองค์ประกอบของสารนิโคตินที่มีผลต่อการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีน และสามารถยืนยันผลจากการทดลองในตารางที่ 8 จากการทดลองวัดผลการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรที่ได้รับสารนิโคตินใน Locomotor พบว่า หลังฉีดนิโคตินหนูกลุ่มสารสกัดใบหญ้าดอกขาวและกลุ่มน้ำเกลือมีการเคลื่อนไหวของหนูเพิ่มขึ้นภายใน 20 นาทีได้ในระดับที่เท่ากัน จากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลง แสดงเป็นผลจากนิโคตินที่ฉีด ซึ่งมีผลไปในทิศทางเดียวกับ Bupropion โดยต่างกันที่ผลของ Bupropionมีผลเพิ่มขึ้นมากกว่า ดังแสดงในรูปที่ 10

สำหรับผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรปกติใน Locomotor พบว่า หลังฉีดน้ำเกลือสารสกัดหญ้าดอกขาวจากดอกมีผลเพิ่มการเคลื่อนไหวของหนูภายใน 40 นาที จากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลง ซึ่งมีผลไปในทิศทางเดียวกับ Bupropion โดยต่างกันที่ผลของ Bupropionมีผลเพิ่มขึ้นมากกว่า ดังแสดงในรูปที่ 11

รูปที่ 10 กราฟแสดงผลการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรที่ได้รับสารนิโคตินใน Locomotor



รูปที่ 11 กราฟแสดงผลการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรปกติใน Locomotor



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดหญ้าดอกขาว (น้ำเคี่ยว) และผลต่อระบบประสาทส่วนกลางในสัตว์ทดลอง สามารถสรุปได้ดังนี้

1. น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวส่วน ใบ ดอก ก้านและผสม ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันทั้งจากการกินและซึมผ่านทางผิวหนัง (LD_{50} > 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว) ในหนูขาว รวมทั้งไม่มีผลก่อความระคายเคืองต่อผิวหนังกระต่าย ปกติค่า LD_{50} ระดับมากกว่า 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จัดเป็นระดับความปลอดภัยที่เป็นที่ยอมรับตาม OECD ในลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่มีสารเคมีรวมและไม่บ่งชี้ว่าสารตัวใดเป็นสารที่มีพิษ ดังนั้นการทดสอบสารสกัดน้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาว ตามที่ใช้จริง โดยยังไม่มีการแปรรูป
2. น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวส่วน ใบ ดอก ก้านและผสม ขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัวไม่มีผลก่อกลายพันธุ์ (mutagenic) ในหนูขาวและไม่เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) จากผลการทดสอบแบบ initial phase ในเซลล์ BHas 42 ของหนู BABL/c ไม่พบการเพิ่มร้อยละของ foci ในเซลล์
3. น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวส่วน ใบ ดอก ก้านและผสม มีแนวโน้มเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหนู (L 929) ที่ความเข้มข้นมากกว่า IC_{50} 1.05 ± 0.20, 0.4 ± 0.02, 0.93 ± 0.17 และ 0.95 ± 0.11 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ
4. น้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวส่วน ใบ ดอก และผสม ขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว จากการคำนวณปริมาณสารสำคัญรวมมีค่า 35, 15, 30 มิลลิกรัมตามลำดับ มีผลเพิ่มระดับสารสื่อประสาทโดปามีน ในเลือดหนูขาวใกล้เคียงกัน แต่มีปริมาณสูงกว่าในกลุ่มควบคุมและต่ำกว่าในกลุ่มที่ได้รับสารมาตรฐาน Bupropion แสดงว่าสารสกัดจากทั้งสามส่วนมีแนวโน้มที่จะมีองค์ประกอบของสารนิโคตินประกอบอยู่ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาองค์ประกอบของสารเคมีในน้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวของ ครร. ดลวี ลีลารุ่งระยับ ที่พบว่ามีสารนิโคตินในน้ำเคี่ยว และสารนิโคตินในปริมาณดังกล่าวน่าจะมีแนวโน้มสามารถออกฤทธิ์กระตุ้น “Brian rewarding pathway” ผ่าน nicotinic receptor บริเวณปลายประสาทของ Ventral tegmental area และส่งต่อไปยังสมองส่วน nucleus accumbens ในรูปสารสื่อประสาทโดปามีน นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งการ reuptake ของโดปามีน ผลจากกราฟ (ตารางที่ 7, 8) ส่วนนิโคตินที่ฉีดให้หนูจะไม่มีผลต่อการเพิ่มการเคลื่อนไหวมากขึ้นในหนูที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ ส่วนสารสกัดจากส่วนดอกมีผลต่อการเพิ่มการเคลื่อนไหวของหนูถีบจักรเพิ่มขึ้นเทียบจากจุดที่ฉีดและมีฤทธิ์อยู่ได้นาน 40 นาที ในทิศทางเดียวกับสารมาตรฐาน Bupropion โดยวิเคราะห์ผลจากกราฟ (รูปที่ 10, 11) แต่มีการออกฤทธิ์น้อยกว่าอาจเป็นผลจากการมีปริมาณสารนิโคตินต่ำและอาจเป็นผลจากองค์ประกอบอื่น ๆ ในสารสกัดหญ้าดอกขาว (Sidhpura *et. al.,* 2007)

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อมูลการศึกษาความปลอดภัยของสารสกัดหญ้าดอกขาว (น้ำเคี่ยว) จากส่วนของ ใบ ดอก ก้านและส่วนผสมของทั้งสามส่วนในครั้งนี้ เป็นการศึกษาควบคู่ไปกับการศึกษาองค์ประกอบของสารสำคัญในน้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวของอีกโครงการ ประกอบกับได้รับตัวอย่างเป็นน้ำเคี่ยวที่อิงการใช้จริง และได้รับในปริมาณไม่มากนักสำหรับการศึกษาในหลายเรื่องของความปลอดภัย จึงใช้น้ำเคียวขนาด 2,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เนื่องจากเป็นการอ้างอิงขนาดต่ำสุดของ OECD ในการทดสอบตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่จัดว่ามีความปลอดภัยและมีปริมาณไม่มากพอหากต้องให้หนูกินในขนาด 15 กรัม/กิโลกรัม ประกอบกับการทดลอบเป็นการประเมินผลตามการนำน้ำเคี่ยวมาใช้จริง โดยไม่คำนึงถึงสารสำคัญที่มีอยู่ในน้ำเคี่ยว ดังนั้นการศึกษาในขนาดดังกล่าวจัดเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำน้ำเคี่ยวมาเป็นวัตถุดิบที่จะถูกนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป เมื่อใดที่มีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ จะต้องมีการทดสอบความปลอดภัยตามชนิดและรูปแบบของผลิตภัณฑ์อีกครั้ง

2. ผลจากการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดหญ้าดอกขาวต่อระบบประสาทในสัตว์ทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเพื่อดูผลแนวโน้มหรือยืนยันว่ามีสารนิโคตินเป็นองค์ประกอบในน้ำเคี่ยวหญ้าดอกขาวส่วนต่าง ๆ ส่วนปริมาณสารนิโคตินมีปริมาณที่จะสามารถออกฤทธิ์ได้ดีหรือไม่ ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการออกฤทธิ์เพื่อการอดบุหรี่ว่าเกิดจากสารนิโคตินในปริมาณเท่าใดและมีสารอื่นออกฤทธิ์ร่วมด้วยหรือไม่อย่างไรต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Auletta, C.S., (1995). Acute, Subchronic and Chronic Toxicity. In: CRC Handbook of Toxicology. Michael J. Derelanko and Mannfred A Holinger,eds, CRC Press, pp.51-104.

ChiRaNan , 2009. *ถาม-ตอบ กับ DIC* [online]. Available at : http://www.pharmacy.cmu.ac.th/dic/newsletter/..6/smokingherb.pdf [accessed 17 Dec.2009]

Freshney, R.I. (2005) Culture of Animal Cell: A manual of Basic Technique. Wiley-Less, New York, Chapter 21: p.287-307

http://digilib.si.itb.ac.id/print.php?id=jbptitbpp-gdl-s2-1982-noorcholie-1735 [accesses 6/11/2552].

Helen A. Krishnakumar K., Vijayammal P.L. and Augusti K.T. 2000. Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa* Linn) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. *Toxicology Letters.* 116: 61-68.

IARC/NCI/EPA Working Group, 1985. Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols, *Cancer Res.* 44, 2395–2399.

Lee HJ and Lee JH 2005. Effects of medicinal herb tea on the smoking cessation and reducing smoking withdrawal symptoms. *Am J Chin Med*, 33(1):127-138.

Organization for Economic Co-operation and Development (1987). OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects. Acute Dermal Irritation / Corrosion. Test Guideline No.404

Organization for Economic Co-operation and Development (1987). OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects. Acute Dermal Toxicity Test (Limit test). Test Guideline No.402

Organization for Economic Co-operation and Development (2001). OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Method (Limit test), Test Guideline No. 420.

Organization for Economic Co-operation and Development (1997). OECD Guidelines for

Testing of Chemicals, Volume 2, Section 4: Health Effects. Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Bone Marrow Cytogenetic Test – Chromosomal Analysis, Test Guideline No. 475.

Plumb JA, Miroy R and Kaye SB.,1989. Effect of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by novel tetrazolium nased assay. *Cancer Res*., 49:4435-4440.

Rauhut A.S., Neugebauer N., Dwoskin L.P, and Bardo M.T., 2003. Effect of bupropion on nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 169: 1–9.

Sakai A., 2008. BALB/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity, AATEX 13 (Special issue), 367–373.

Sakai A., Iwase Y., Nakamura Y., Sasaki K., Tanaka N., and Umeda M., 2002. Use of a cell transformation assay with established cell lines, and a metabolic cooperation assay with V79 cells for the detection of tumor promoters: a review, ATLA 30, 33–59.

Sakai A., Sasaki K., Muramatsu D., Arai S., Endou N., Kuroda S., Hayashi K.,Lim Y.M , Yamazaki S., Umeda M., and Tanaka N., 2010. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. Mutat Res.;703(2):209-26.

Sidhpura N., Redfern P., Rowley Heal D., H., and Wonnacott S. 2007. Comparison of the effects of bupropion and nicotine on locomotor activation and dopamine release in *vivo*. *Biochemical Pharmacology*. 74: 1292-1298.

Singh J.and Budhirsja S., 2008. Partial nicotinic acetylcholine (α4ß2) agonists as promising new medications for smoking cessation. *Indian J Pharmacol.* 40(5):191-6.

Stahl S.M, Pradko J. F., Haight B.R., Modell J.G., Rockett C.B. and Learned-Coughlin S., 2004. A review of the neuropharmacology of bupropion, a dual norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor. *J Clin Psychiatry*. 6(4): 159–166.

United state Environment Protection Agency (EPA), (1998). Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-1100 Acute Oral Toxicity, EPA 712-6-96-190.

Wongwattathananukit, S., Benjanakaskul, P, Songsak, T, Suwanamajo, S and Verachai, V. 2009. Efficacy of *Vernonia cinerea* for smoking cessation. *J Health Res.*, 23(1):31-36.

ภาคผนวก

1. การคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่างแต่ละชนิดในการทดสอบ Cytotoxic

จากผลการศึกษาเมื่อนำสารสกัดไปทำ Lyophilize สามารถนำมาคำนวณค่าความเข้มข้นได้ดังนี้

1. 1 สารสกัดส่วนใบปริมาตร 150 ml ได้น้ำหนักแห้ง 2.08 g

ดังนั้นสารสกัดส่วนใบมีความเข้มข้นเท่ากับ 13.87 mg/ml

1. 2 สารสกัดส่วนดอกปริมาตร 150 ml ได้น้ำหนักแห้ง 1.02 g

ดังนั้นสารสกัดส่วนดอกมีความเข้มข้นเท่ากับ 6.80 mg/ml

1. 3 สารสกัดส่วนก้าน(ต้น)ปริมาตร 150 ml ได้น้ำหนักแห้ง 0.90 g

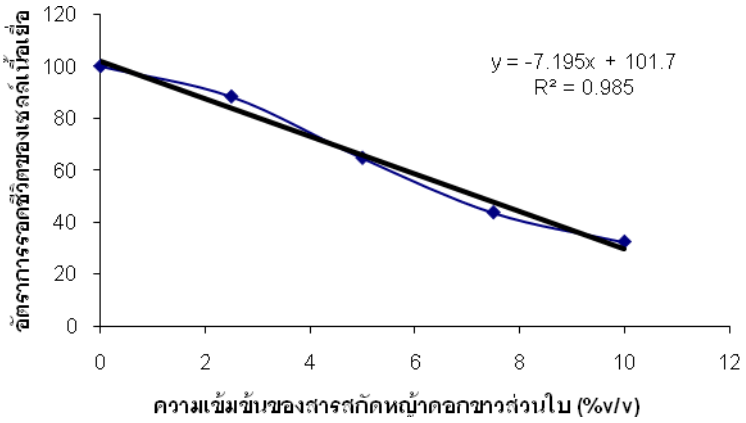
ดังนั้นสารสกัดส่วนก้าน(ต้น)มีความเข้มข้นเท่ากับ 6.00 mg/ml

1. 4 สารสกัดแบบผสมทุกส่วนปริมาตร 150 ml ได้น้ำหนักแห้ง 1.82 g

ดังนั้นสารสกัดแบบผสมทุกส่วนมีความเข้มข้นเท่ากับ 12.13 mg/ml

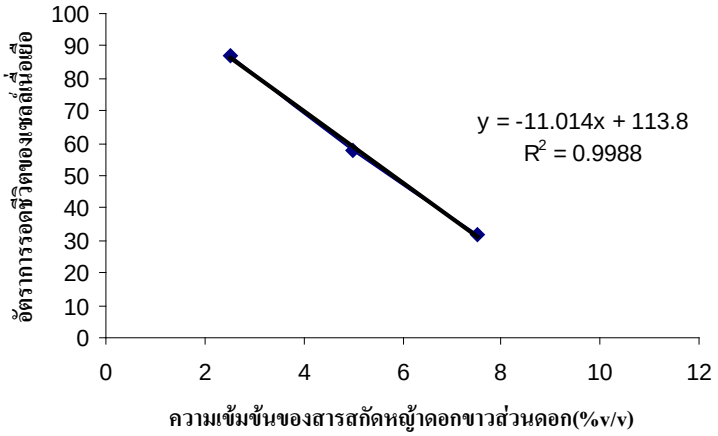
2. การคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่างต่อการตายของเซลล์กึ่งหนึ่ง (IC_{50})

กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อสัมผัสสารทดสอบส่วนใบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



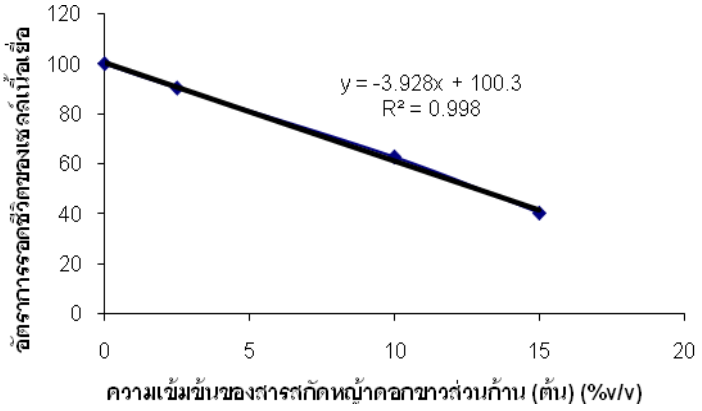
IC_{50} = 7.59 ± 1.44%v/v

กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อสัมผัสสารทดสอบส่วนดอกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



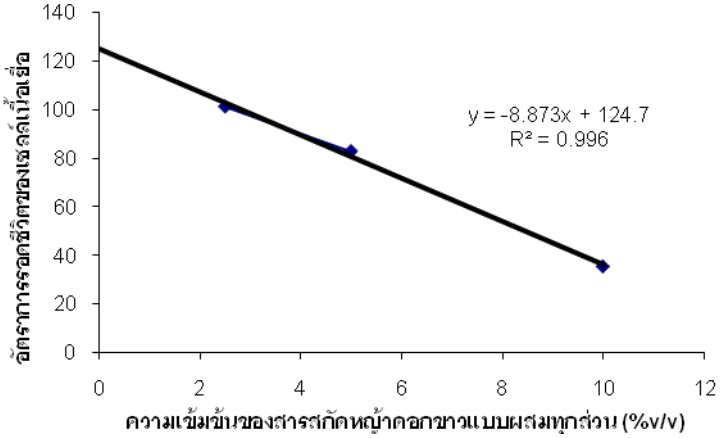
IC_{50} = 5.88 ± 0.25%v/v

กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อสัมผัสสารทดสอบส่วนก้าน(ต้น)ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



IC_{50} = 15.50 ± 2.91%v/v

กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อสัมผัสสารทดสอบแบบผสมทุกส่วนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



$IC_{50} = 7.83 \pm 0.93\%v/v$