

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านมของสารสกัดใบเตย  
ANTIOXIDANT AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF *CRATOXYLUM FORMOSUM*  
CRUDE AGAINST BREAST CANCER CELLS (MCF-7)

ณพัฐอร บัวฉูน \*

Napattaorn Buachoon\*

สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn

Rajabhat University under the Royal

Received: 18 May 2022

Accepted: 10 August 2022

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณประกอบฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ของสารสกัดใบเตยจากเฮกเซน เอทิลอะซิเตรต และเมทานอล ผลการทดลองพบว่า สารสกัดเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 150.21 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด 41.81 มิลลิกรัมสมบูร์นของเคอร์ซินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด และ 9.87 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดใบเตยจากเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ได้ดีที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $12.45 \pm 2.69$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

**คำสำคัญ:** ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์, มะเร็งเต้านม, ใบเตย

\* ผู้ประสานงาน: ณพัฐอร บัวฉูน

อีเมลล์: napattaorn@vru.ac.th

## Abstract

The purposes of this research were to investigate the content of phenolic compounds, flavonoid compounds, antioxidant activity and cytotoxic of hexane, ethyl acetate, and methanol extracts from *Cratoxylum formosum* leaves against MCF-7 human breast cancer cells. The experimental results indicated that methanol *C.formosum* extract had the highest content of phenolic compounds, flavonoid compounds and antioxidant activity of 150.21 mg GAE/g, 41.81 mg QE/g, and 9.87 mg/mL, respectively. Methanol *C. formosum* extract had the highest inhibitory activity against the growth of MCF-7 human breast cancer cells with  $IC_{50}$  of  $12.45 \pm 2.69 \mu\text{g/mL}$ .

**Keywords:** antioxidant activities, cytotoxic, breast cancer, *Cratoxylum formosum*

## บทนำ

อนุมูลอิสระเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่สามารถทำปฏิกิริยากับอะตอมอื่น ๆ ในร่างกายหรือเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว โดยอนุมูลอิสระนี้จะถูกสร้างขึ้นในร่างกายโดยธรรมชาติและยังมีหน้าที่สำคัญในหลาย ๆ กระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ หากสารอนุมูลอิสระนี้มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะเป็นอันตรายต่อร่างกายและสร้างความเสียหายต่อส่วนประกอบของเซลล์ ดีเอ็นเอ โปรตีน รวมถึงเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอาจพัฒนาให้เกิดโรคต่าง ๆ ตามมา เช่น มะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ อัลไซเมอร์ พาร์กินสัน เบาหวาน ต้อกระจก หลอดเลือดตีบและแข็งตัว ความจำเสื่อม และจอประสาทตาเสื่อม เป็นต้น (Bagchi & Puri, 1998) จากรายงานการศึกษาต่างๆพบว่า สารพฤกษเคมีจำนวนมาก โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการได้รับสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะช่วยลดความเสี่ยงโรคต่างๆ ที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ (Pereira et al., 2009) สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) การจับกับโลหะที่สามารถ

เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation) การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระมีอยู่จำนวนมาก ทั้งที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น และที่มีอยู่ในพืชโดยทั่วไป ได้แก่ โคเอนไซม์ เอนไซม์ควิเทน (Beyer, 1992) สารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแอนโทไซยานิน (ณพัชร บัวฉุน, 2563)

โรคมะเร็งเป็นกลุ่มของโรคที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติ โดยเซลล์จะมีแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนเจริญเติบโตอย่างควบคุมไม่ได้ ก่อให้เกิดเป็นมะเร็งที่สามารถแพร่กระจายไปยังร่างกายส่วนที่อยู่ห่างไกลได้โดยผ่านระบบน้ำเหลืองหรือกระแสเลือด สาเหตุของมะเร็งนั้นมีหลากหลาย ได้แก่ การสูบบุหรี่ อาหารที่บริโภค การขาดการออกกำลังกาย โรคอ้วน และการบริโภคแอลกอฮอล์ การติดเชื้อบางชนิด การสัมผัสรังสี และมลภาวะสิ่งแวดล้อม ชนิดของมะเร็งที่พบได้มากเป็นอันดับต้น ๆ ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งต่อมลูกหมาก (ศูนย์ข้อมูลออนไลน์, 2563) แม้ในปัจจุบันจะมีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในขั้นตอนต่าง ๆ ได้ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังไม่สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งให้หมดไปได้ และยังส่งผลข้างเคียงภาวะกดไขกระดูกที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือดซึ่งทำให้เกิดความผิดปกติของกลไกระบบภูมิคุ้มกัน จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าหาสารจากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งและพิษสมุนไพรมันเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถมีบทบาทในการรักษาโรคมะเร็ง โดยสารที่ได้จากธรรมชาติส่วนมากจะมีความปลอดภัยสูงและผลข้างเคียงของการใช้ยาต่ำ

มะเร็งเต้านมเกิดจากความผิดปกติของเซลล์ที่อยู่ภายในท่อน้ำนมหรือต่อมน้ำนม เซลล์เหล่านี้มีการแบ่งตัวผิดปกติไม่สามารถควบคุมได้ มักแพร่กระจายไปตามทางเดินน้ำเหลือง สู่อวัยวะที่ใกล้เคียง เช่น ต่อมน้ำเหลืองที่รักแร้ หรือแพร่กระจายไปสู่อวัยวะที่อยู่ห่างไกล เช่น กระดูก ปอด ตับ และสมอง เช่นเดียวกับมะเร็งชนิดอื่น ๆ มะเร็งเต้านมพบในผู้หญิงมากกว่าผู้ชาย โดยผู้ชายมีโอกาสพบได้น้อยมากเพียง 1% ของมะเร็งเต้านมทั้งหมด จากการเก็บสถิติข้อมูลจำนวนผู้ป่วยมะเร็งชนิดต่างๆในประเทศไทยในปี พ.ศ.2555 พบว่ามะเร็งเต้านมเป็นมะเร็งที่มีจำนวนผู้ป่วยมากที่สุดเป็นอันดับ 1 (ธีรวิมล คุหะเปรมะ, 2560)

จากการรายงานการศึกษาพบว่ากลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เป็นเมตาบอไลต์ขั้นทุติยภูมิที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกและมีหมู่ฟังก์ชันเป็นหมู่ไฮดรอกซิลที่พบมาก

ในพืชผัก และผลไม้ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพ ด้านการอักเสบ ด้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง นอกจากนี้มีการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (วันเพ็ญ เจริญจิต, 2554)

ตัว (*Cratoxylum formosum*) จัดอยู่ในวงศ์ Guttiferae บางคนก็เรียกว่า ผักแต้ว และมีอีกหลาย ๆ ชื่อ เช่น ด้วขน ด้วส้ม ด้วหอม หรือแต้วหิน ใบมีรสเปรี้ยวปนฝาด นิยมนำใบมากินกับพริก ลาบ หรือแหมมเนือง ใส่แกงเลียง แกงส้ม หรือต้มยำ ด้วถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ โดยนำมาเป็นส่วนหนึ่งของตำรายาแผนโบราณมีการใช้รากและลำต้นแก้กระษัยเส้นและเป็นยาระบาย ใบและยอดอ่อนใช้เป็นยาระบายอ่อนๆ (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2563) จากข้อมูลวิจัยพบว่ามี การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและช่วยยับยั้งการสร้าง NF- $\kappa$ B ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของสารสื่อการอักเสบ (inflammatory cytokines) ที่จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ของสารสกัดจากกิ่งตัว ด้ว และยังมีศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นพบว่า การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง เต้านมจากใบด้วยังมีน้อยมาก อีกทั้งใบด้วเป็นพืชที่พบได้ง่ายในทั่วทุกภาคของประเทศไทย ผู้วิจัยจึงสนใจ ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณประกอบฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้จะประโยชน์ทางแพทย์ เภสัชวิทยา โดยเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเป็นยารักษา มะเร็งเต้านม ช่วยส่งเสริมการบริโภคสมุนไพรพื้นบ้าน การปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจ และยังเป็น การเพิ่มมูลค่าพืชสมุนไพร

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การเตรียมสารสกัดพืชตัวอย่าง

ใบด้ว (*Cratoxylum formosum* วงศ์ Guttiferae) ที่ใช้ในการศึกษาเก็บจากอำเภอวังน้ำเย็น จังหวัดสระแก้ว เดือนมิถุนายน 2563 โดยเลือกเฉพาะใบอ่อน (อนันต์ อธิพรชัย และคณะ, 2562) นำมาทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ผึ่งลมให้แห้ง อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และบดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างใบด้ว 1,500 กรัม นำมาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน 8 ลิตร ปิดภาชนะทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด

เก็บสารละลายที่ได้มากรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ และนำกากที่เหลือไปแช่เฮกเซน อีก 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการรวมสารสกัดทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหย สารภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จะได้เป็นส่วนสกัดหยาบใบเตยในชั้นเฮกเซน (hexane crude extract) ซึ่งน้ำหนักของสารสกัด หยาบที่ได้ หลังจากนั้นเตรียมตัวอย่างใบเตยเหมือนเดิมแต่เปลี่ยนจากตัวทำละลายเฮกเซน เป็นเอทิลอะซิเตตภายใต้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส และเมทานอลภายใต้อุณหภูมิ ประมาณ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบใบเตยจาก เฮกเซน สารสกัดหยาบใบเตยจาก เอทิลอะซิเตต และสารสกัดหยาบใบเตยจากเมทานอล คำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบ และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)

การคำนวณร้อยละของสารสกัดหยาบ (%w/w) = (น้ำหนักสารสกัดหยาบ × 100) / น้ำหนักแห้ง

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric โดยดัดแปลงวิธีจาก Majhenic et al. (2007) ใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยผสมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารสกัดหยาบใบเตยที่ได้จากตัวทำละลาย ในข้อ 1 (ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ที่ความเข้มข้น 10% (v/v) ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ทำการเขย่า ให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ความเข้มข้น 2.5% (w/v) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วย เครื่อง UV-vis spectrophotometer โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก รายงานผลเป็นหน่วย mg Gallic Acid Equipment (GAE)/g สารสกัดหยาบ

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids content)

ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (Aluminium trichloride) colorimetric โดยดัดแปลงวิธีจาก Arvouet-Grand et al. (1994) โดยใช้เคอร์ซีติน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน ผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีตินที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารสกัดหยาบใบต้วที่ได้จากตัวทำละลายในข้อ 1 (ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0% (w/v) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอร์ซีติน รายงานผลเป็นหน่วย mg Quercetin Equipment (QE)/g สารสกัดหยาบ

### 4. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH Radical Scavenging

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging โดยดัดแปลงวิธีจาก Braca et al. (2002) เริ่มจากผสมสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (31.25, 62.5, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หรือสารสกัดหยาบใบต้วที่ได้จากตัวทำละลายในข้อ 1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (31.25, 62.5, 125, 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ที่ละลายในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ทั้งหมด 3 ซ้ำ และหาร้อยละฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH radical inhibition) จากสมการ

$$\% \text{ DPPH radical inhibition} = [(A-B) / A] \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

และนำค่าที่ได้จากการคำนวณแต่ละความเข้มข้นไปคำนวณหาค่า the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) คือ ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50

#### 5. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบใบต้วต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)

ทำการทดสอบโดยการใช้วิธี MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay) โดยดัดแปลงวิธีจาก Braca et al. (2002) โดยเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบใบต้ว 2 มิลลิกรัม เติม dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.04 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายเข้ากัน ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MCF-7 (human breast carcinoma ATCC Cat.No. HTB-22) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ MEM (Minimum Essential Medium) ที่มี 10% Fetal bovine serum และ 1% penicillin-streptomycin บ่มในตู้  $CO_2$  ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT assay โดยนำเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมใส่ลงหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate) ให้มีความหนาแน่น 3,000 เซลล์ต่อหลุม ทำการบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาเติมสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (10, 20, 40, 60, 80 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นจะทำซ้ำ 4 หลุม และนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง นำสารตัวอย่างออกจากเซลล์เพาะเลี้ยง ทำการบ่มซ้ำในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไปทดสอบด้วยวิธี MTT assay โดยปิเปต MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue) 50 ไมโครลิตรลงใน phosphate buffer Saline (PBS) 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงแต่ละหลุมปริมาตร 60  $\mu$ l/well บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ 4 ชั่วโมง เติมสารละลายที่ได้จากการละลายฟอร์มาซาน (formazan) ด้วย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 200 ไมโครลิตร และซอร์เรนเซนไกลซีนบัฟเฟอร์ (Sorensenglycine buffer) pH 10.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ (ตัวทำละลายต่างๆ เป็น negative control และฟลูออโรราซิล (Fluorouracil) เป็น positive control) และวิเคราะห์ข้อมูลหาค่า  $IC_{50}$  เพื่อหาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจาก Dose-log response curve ด้วยวิธี Linear regression

## 6. การวิเคราะห์สถิติ (Statistical analysis)

ทุกการทดลองต้องมีการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้งแสดงข้อมูลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean  $\pm$  SD) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระวิเคราะห์ด้วยสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 1. ผลผลิตสารสกัดหยาบ

ผลการสกัดใบต้ว 1,500 กรัม ด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตรต และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบใบต้วด้วยเฮกเซนที่มีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีเขียว 10.41 กรัม ร้อยละผลผลิตสารสกัดหยาบเท่ากับ 5.21 สารสกัดหยาบใบต้วด้วยเอทิลอะซิเตรตมีลักษณะเหนียวมีความหนืดสีน้ำตาลเข้ม 19.32 กรัม ร้อยละผลผลิตสารสกัดหยาบเท่ากับ 10.54 และสารสกัดหยาบใบต้วด้วยมีลักษณะเหนียวมีความหนืดสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำ 28.92 ร้อยละผลผลิตสารสกัดหยาบเท่ากับ 15.64

ผลการเตรียมสารสกัดหยาบใบต้วด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตรต และเมทานอลพบว่าตัวทำละลายเมทานอลให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสารสกัดหยาบสูงสุด รองลงมาคือ เอทิลอะซิเตรต และเฮกเซน ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบในพืชส่วนใหญ่เป็นสารอินทรีย์ที่มีความมีขั้วสูง จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพขั้วที่ใกล้เคียงกัน (นันทวัน บุญยะประภัสร์, 2536) เพราะต่างก็เป็นสารอินทรีย์เหมือนกันที่เกิดการละลายกันตามหลักการละลายกันได้ (like dissolves like) ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้สำหรับสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้แก่ เมทานอล เอทานอล และตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น เอทิลอะซิเตรต เฮกเซน ปีโตรเลียมอีเทอร์

#### 2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดหยาบใบต้ว

สารสกัดหยาบใบต้วจากตัวทำละลายเมทานอล เอทิลอะซิเตรต และเฮกเซน ได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดหยาบใบต้ว ได้ผลดังตารางที่ 1

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบใบต้วเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่า สารสกัดหยาบใบต้วจากตัวทำละลายที่ต่างกันให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่างกัน เรียงตามลำดับจากปริมาณมากไปหาน้อยคือ สารสกัดหยาบใบต้วจากเมทานอล เอทิลอะซิเตรต และเฮกเซน เท่ากับ  $150.21 \pm 1.02$ ,  $122.11 \pm 1.00$  และ  $90.47 \pm 1.53$  mg GAE/g ตามลำดับ

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบใบต้วเทียบกับสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีตินพบว่า สารสกัดหยาบใบต้วจากตัวทำละลายที่ต่างกัน ให้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดต่างกัน เรียงตามลำดับจากปริมาณมากไปหาน้อยคือ สารสกัดหยาบใบต้วจากเมทานอล เอทิลอะซิเตรต และ เฮกเซน เท่ากับ  $41.81 \pm 0.97$ ,  $28.91 \pm 1.05$  และ  $21.47 \pm 1.32$  mg QE/g ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบใบต้วเทียบกับสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์ พบว่า สารสกัดหยาบใบต้วจากตัวทำละลายที่ต่างกันให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน เรียงตามลำดับจากปริมาณมากไปหาน้อยคือ คือ สารสกัดหยาบใบต้วจากเมทานอล เอทิลอะซิเตรต และเฮกเซน โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $9.87 \pm 1.32$ ,  $12.61 \pm 1.27$  และ  $15.39 \pm 1.11$  mg/mL ตามลำดับ

**ตารางที่ 1** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบต้ว

สารสกัด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g)	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g)	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ( $IC_{50}$ ) (mg/mL)
เฮกเซน	$90.47 \pm 1.53$	$21.47 \pm 1.32$	$15.39 \pm 1.11$
เอทิลอะซิเตรต	$122.11 \pm 1.00$	$28.91 \pm 1.05$	$12.61 \pm 1.27$
เมทานอล	$150.21 \pm 1.02$	$41.81 \pm 0.97$	$9.87 \pm 1.32$

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ในสารสกัดหยาบใบต้วที่ถูกสกัดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตรต และเมทานอล สารสกัดหยาบใบต้วจากเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์

การต้านอนุมูลอิสระ ( $IC_{50}$ ) สูงที่สุด ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bundit et al. (2015) ที่ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตรต และเมทานอล โดยสารสกัดหยาบที่สกัดจากเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด และสอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนศักดิ์ แซ่เลี้ยว และคณะ (2551) และ วสันต์ สุมินทิลี และคณะ (2557) ที่พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดจากเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด ในการศึกษาตัวทำละลายที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในสารสกัดใบเตยด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorometric method พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีความเป็นขี้ จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีสภาพขี้ที่ใกล้เคียงกัน (อรพรรณ จันทร์วิจิต และ ชัชฎาพร งามอาจ, 2558) ซึ่งส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกจะละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขี้สูงในตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์ได้ดีทำให้สารประกอบฟีนอลิกสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายเมทานอล (ภาเกล้า ภูมิใหญ่ และ ชญาณิศา สุพา, 2558) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกยังทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์ ซึ่งมีความสามารถในการให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป (Rice-Evans & Miller, 1996) สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลิก มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยทำหน้าที่เป็นตัวขัดขวางหรือหยุดปฏิกิริยาต่อเนื่องของอนุมูลอิสระ (free radical chain terminator) ตัวจับออกซิเจน (oxygen scavenger) หรือเป็น chelating agent ของโลหะ เป็นต้น พบมากในพืชผักและผลไม้ อีกทั้งยังเป็นรงควัตถุ ทำหน้าที่กรองแสงที่มีความยาวคลื่นที่จำเพาะเจาะจง (Rice-Evans & Miller, 1996)

ผลการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบใบเตยที่ถูกสกัดด้วยเฮกเซน เอทิลอะซิเตรต และเมทานอล สารสกัดหยาบใบเตยจากเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  น้อยที่สุด ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่งงานวิจัยของ บังอร วงศ์รักษ์ และ ศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ (2549) ได้ทำการสกัดผักด้วยสารละลายเมทานอล พบว่าสารสกัดหยาบผักที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ( $IC_{50}$  เท่ากับ 0.10 mg/mL) การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยเริ่มจากการใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขี้แล้วค่อยเพิ่มความขี้ขึ้น เช่น เฮกเซน เอทิลอะซิเตรต อาจจะช่วยสกัดสาร

ที่ไม่ต้องการ เช่น องค์ประกอบของผนังเซลล์ ลิพิดที่อยู่ที่ผนังเซลล์พืช (ลิกนิน) ออกได้และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว ดังนั้นสารละลายเมทานอลจึงมีประสิทธิภาพที่ดีในการนำมาสกัดและหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ศรมน สุทิน และคณะ, 2560) จากผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณสารที่ตรวจพบ เมื่อพิจารณาผลความสัมพันธ์ด้วย Pearson correlation จะเห็นว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของของสารสกัดหยาบจากใบต้วในตัวทำละลายต่างๆ มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระDPPH ที่ดี (Pourmorad et al., 2006) และกระบวนการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้ เกี่ยวข้องกับโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่ -OH บริเวณวงแหวน aromatic ring โดยเฉพาะสารฟลาโวนอยด์ที่พบจำนวน -OH ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไป หลังจากให้ H atom แก่อนุมูลอิสระ ทำให้โครงสร้างเสถียรและสามารถเข้าทำปฏิกิริยาต่อกับอนุมูลอิสระขั้นที่ 2 ในรูป alkoxy (RO•) ได้อีกครั้ง (Dugas et al., 2000) H atom ของหมู่ -OH จะกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH• โดยจับกับอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ DPPH บริเวณ N atom ทำให้อนุมูลอิสระของ DPPH ได้รับโปรตอนหรือถูกรีดิวซ์ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ จนเกิดความเสถียรและเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองตรวจสอบได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง แสดงให้เห็นว่า พืชสมุนไพรจะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นเมื่อหมู่ -OH มีจำนวนมากและมีตำแหน่งที่เหมาะสม ประกอบกับคุณสมบัติของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่แม้ว่าจะสูญเสียอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระแต่โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกยังมีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูงทำให้อิเล็กตรอนสามารถย้ายไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) และคงความเสถียรเอาไว้ได้ (Pietta, 2000; Su et al., 2008; Lou et al., 2016)

### 3. ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7)

ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสารสกัดหยาบใบต้วจากเฮกเซน สารสกัดหยาบใบต้วจากเอทิลอะซิเตต และสารสกัดหยาบใบต้วจากเมทานอล ที่ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60, 80 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และคำนวณร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 พบว่าสารสกัดหยาบใบต้วจากเมทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 สูงที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $12.45 \pm 2.69$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารสกัดหยาบใบต้วจากเฮกเซน และสารสกัดหยาบใบต้วจากเอทิลอะซิเตต โดยมีความเป็นพิษ

ต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ต่ำกว่า โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $19.62 \pm 1.21$  และ  $18.78 \pm 1.34$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 ของสกัดหยาบใบต้วจากเฮกเซน สกัดหยาบใบต้วจากเอทิลอะซิเตรต และสกัดหยาบใบต้วจากเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ และคำนวณร้อยละการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง MCF-7 พบว่า สารสกัดเอทิลอะซิเตรตมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 สูง งานวิจัยของ Woraratphoka et al. (2012) พบว่าสารสกัดหยาบใบต้วจากเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง MCF-7 ( $176.50$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Benjaporn et al. (2017) พบว่าสารสกัดใบต้วสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง MCF-7 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $85.70 \pm 4.52 \mu\text{g/mL}$  ที่เวลา 24 ชั่วโมง และค่า  $IC_{50}$  ที่  $85.70 \pm 4.52 \mu\text{g/mL}$  ที่ 48 ชั่วโมง และการศึกษาของ Ren et al. (2011) ที่พบว่าสกัดจากกิ่งต้วสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็ง การที่สารสกัดหยาบใบต้วเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 อาจเนื่องมาจากในสารสกัดใบต้วมีสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่เป็นจำนวนมาก และจากการศึกษาจากพืชสมุนไพรอื่นๆ พบว่าสารฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลิกสามารถที่จะทำลายหรือฆ่าเซลล์มะเร็งได้ เช่น สารพอลิฟีนอล สารเจอร์านิน (geraniin) และคอนเดนซ์แทนนินสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมได้ ผลจากการศึกษานี้ น่าจะเป็นประโยชน์ให้ประชาชนหันมารับประทานพืชผักสมุนไพรของไทยโดยเฉพาะใบต้ว ที่มีสรรพคุณมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม และยังเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการพัฒนาเป็นยารักษาเซลล์มะเร็งเต้านมต่อไป

### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) ด้วยตัวทำลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตรต และเมทานอลจากใบต้ว พบว่า สารสกัดเมทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เมื่อเทียบกับตัวทำลายชนิดอื่น และสารสกัดเมทานอลแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ดีที่สุด โดยผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาสมุนไพรไทยเป็นยารักษาโรคหรืออาหารเสริมได้ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์  
ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี ที่อำนวยความสะดวกงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. (2563). *ข้อมูลพืชสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร*. สืบค้นเมื่อ 12 กันยายน 2563, จาก [https://pharmacy.su.ac.th/herbmed/herb/text/herb\\_detail.php?herbID=268](https://pharmacy.su.ac.th/herbmed/herb/text/herb_detail.php?herbID=268).
- ณพัฐอร บัวฉุน. (2563). สารพฤษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสกัดน้ำพืชสด และพืชแห้ง. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเซีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 14(1), 144-154.
- ธีรวุฒิ คุหะเปรมะ. (2560). *โรคมะเร็ง*. สืบค้นเมื่อ 5 กันยายน 2563, จาก <https://www.wattanosothcancerhospital.com/all-about-cancer/general-information-about-cancer>.
- ชนศักดิ์ แซ่เลี้ยว, ศศิธร จันทนวางกูร และ วรณี จิรภาคย์กุล. (2551). ผลของตัวทำละลาย ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและความสามารถต้านออกซิเดชันของกระชายเหลือง (*Boesenbergia pandurata*). ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46, วันที่ 29 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 538-545.
- นันทวัน บุญยะประภัสร์. (2536). การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช. ใน *วันดี กฤษณพันธ์ (ผู้รวบรวม), ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เล่มที่ 1* (หน้า 116-129). ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย, คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล.
- บังอร วงศ์รักษ์ และ ศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์. (2549). *ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน*. (วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยมหิดล).
- ภาเกล้า ภูมิใหญ่ และ ชญาณิศา สุพา. (2558). *ตัวทำละลายที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากพืชสมุนไพร*. ใน: การประชุมวิชาการระดับชาติ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ครั้งที่ 2, วันที่ 22 ธันวาคม 2558. มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร, กำแพงเพชร, 627-635.

- วันเพ็ญ เจริญจิต. (2547). *สรรพอลิสจากผึ้งผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต้านโรค*. ชมรมการจัดการทรัพยากรเกษตร. สืบค้นเมื่อ 12 กันยายน 2563, จาก <https://www.Matichon.co.th>.
- วสันต์ สุมินทิลี, ปนิตา บรรจงสินศิริ, จันทนา ไพรบูรณ์ และ วรณวิมล คล้ายประดิษฐ์. (2557). กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากสาหร่ายพวงองุ่น (*Caulerpa lintillifera*) สาหร่ายทุ่น. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม*, 9(1), 63-75.
- ศรมน สุทิน, กิตติพัฒน์ ไสภิตธรรมคุณ และ พัชรี ภคกษมา. (2560). *การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปา*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.
- ศูนย์ข้อมูลออนไลน์. (2563). *5 อันดับ มะเร็งในคนไทย รู้ไว้ใกล้ตัวกว่าที่คิด!*. สืบค้นเมื่อ 20 ตุลาคม 2563, จาก [http://www.ashthailand.or.th/smartnews/post/detail/558/news\\_all.php](http://www.ashthailand.or.th/smartnews/post/detail/558/news_all.php).
- อรพรรณ จันทรวิจิต และ ชัชฎาพร งามอาจ. (2558). ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดวัชพืช. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 46(ฉบับพิเศษ 3), 285-288.
- อนันต์ อธิพรชัย, สุรีย์พร หอมวิเศษวงศา และ สุวรรณ เสมศรี. (2562). *การค้นหาและพัฒนาสมุนไพรไทยสำหรับรักษาโรคเบาหวาน*. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49(6), 462-468.
- Bagchi, K., & Puri, S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease: a review. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4(2), 350-360.
- Benjaporn, B., Nootchanat, M., & Ampa, K. (2017). *Cratoxy formosum* leaf extract inhibits proliferation and migration of human breast cancer MCF-7 cells. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 90, 77-84.
- Beyer, R. (1992). An Analysis of Role of Coenzyme Q in Free Radical Generation and As Antioxidant. *Biochemistry and Cell Biology*, 7, 390-403.

- Braca, A., Sortion, C., Politi, M., Morelli, I., & Meddez, J. (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Liccania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 379–381.
- Bundit, P., Jureerut, D., Ponlatham, C., Ratree, T., Tueanjit, K., Narintorn, R., Roongpet, T., & Patcharee, B. (2015). Cytotoxicity of *Cratoxylum Formosum* Subsp. *Pruniflorum* Gogel Extracts in Oral Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(16), 7155-7159.
- Dugas, A. J., Castaneda-Acosta, J., Bonin, G. C., Price, K. L., Fischer, N. H., & Winston, G. W. (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*, 63(3), 327-331.
- Lou, Y., Joseph, S., Li, L., Graber, E., Liu, X., & Pan, G. (2016). Water Extract from Straw Biochar Used for Plant Growth Promotion: An Initial Test. *BioResources*, 11(1), 249-266.
- Majhenic, L., Skerget, M., & Knez, Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of quarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104(3), 1258-1268.
- Pereira D., Valentão, P., Pereira, J., & Andrade, P. (2009). Phenolic: From chemistry to biology. *Molecules*, 14, 2202-2211.
- Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S., & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(1), 1142-1145.
- Ren Y., Matthew S., Lantvit D. D., Ninh T. N., Chai H., Fuchs J. R., Soejarto D. D., Carcache E. J., Swanson S. M., & Kinghorn A. D. (2011). Cytotoxic and NF-κB Inhibitory constituents of the stems of *Cratoxylum cochinchinense* and their semisynthetic analogues, *Journal of Natural Products*, 74, 1117-1125.

- Rice-Evans, C. A. & Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactives compounds of foods. *Biochemical Society Transactions*, 24(3), 790-795.
- Su C. C., Lin J. G., Li T. M., Chung J. G., Yang J. S., Ip S. W., Lin W. C., & Chen G. W. (2006). Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca<sup>2+</sup> and the activation of caspase-3. *Anticancer Research*, 26, 4379–4389.
- Woraratphoka, J., Intarapichet, K., & Indrapichate, K. (2012). Antioxidant activity and cytotoxicity of six selected, regional, Thai vegetables. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 4, 108-117.