การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปา

Evaluation of antioxidant activity and anti-proliferation in cholangiocarcinoma using *Michelia alba* and *M. champaca* extraction

ศรมน สุทิน
กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ
พัชรี ภคกษมา

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2558

ชื่อเรื่อง การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปา

ผู้วิจัย ศรมน สุทิน
กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ
พัชรี ภคกษมา

สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ปีที่พิมพ์ 2560

สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

จำนวนหน้ารายงานวิจัย 44 หน้า

คำสำคัญ อนุมูลอิสระมาตรฐาน DPPH, สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT, เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1, การสกัดสารใช้วิธีการแช่ในตัวทำละลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการสกัดสารจากใบต้นจำปีและจำปาเพื่อศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 การสกัดสารใช้วิธีแช่ในตัวทำละลาย (maceration) แบบลำดับขั้น ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกันคือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล นำสารสกัดในแต่ละชั้นของตัวทำละลายมาวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้น เพื่อให้ได้รูปแบบการกระจายตัวด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบผิวบาง โดยมีวัฏภาคนิ่งคือ ซิลิกา (silica) และวัฏภาคเคลื่อนที่คือ เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ในอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดจากใบต้นจำปาในชั้นเมทานอลมีค่าความเข้มข้นที่ทำให้ DPPH มีปริมาณเหลือ 50% (inhibitory concentration at 50%, IC_{50}) ดีที่สุดคือเท่ากับ 0.018 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Butylated hydroxy toluene (BHT) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.048 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การเปรียบเทียบสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเดียวกันที่เก็บได้ในแต่ละรอบเดือน ได้แก่ รอบที่ 1 เดือนมกราคม รอบที่ 2 เดือนเมษายน และรอบที่ 3 เดือนมิถุนายน พบว่าสารสกัด

หยาบมีค่า IC_{50} ต่อ DPPH แตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ (One-way ANNOVA, SPSS, $p < 0.05$) คาดว่าฤดูกาลน่าจะมีผลต่อองค์ประกอบของสารในใบต้นจำปีและจำปา การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ใช้ความเข้มข้นเบื้องต้นที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะเปรียบเทียบผลการยับยั้งกับเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 เพื่อใช้เป็นผลในเลือกสารสกัดเพื่อศึกษาค่าความเข้มข้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ 50% (IC_{50}) พบว่าสารสกัดจากใบต้นจำปีในตัวอย่างรอบที่ 1 ในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท สารสกัดจากใบต้นจำปาในตัวอย่างรอบที่ 2 ในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล มีค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 เท่ากับ 13.51 ± 1.12, 51.07 ± 10.52 และ 26.43 ±1.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ดังนั้นสารสกัดจากจำปีและจำปาจึงมีความน่าสนใจที่จะพัฒนาเป็นตัวยาในทางการแพทย์ในอนาคต

Research Title	Evaluation of antioxidant activity and anti-proliferation in cholangiocarcinoma using *Michelia alba* and *M. champaca* extraction
Researchers	Soramon Sutin Kittipat Sopitthummakhun Patcharee Pakakatsama
Institution	Huachiew Chalermprakiet University
Year of Publication	2017
Publisher	Huachiew Chalermprakiet University
Sources	Huachiew Chalermprakiet University
No. of Pages	44 pages
Keywords	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Butylated Hydroxy Toluene (BHT), cholangiocarcinoma (RMCCA-1), maceration
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

Abstract

This research has extracted compounds from *Michelia alba* and *M. champaca* leaves to study the antioxidant properties of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and inhibit the cell proliferation of cholangiocarcinoma (RMCCA-1). The extraction method is performed by the maceration using sequential extraction system. The extraction solvents are different in polarity i.e. hexane, ethylacetate and methanol. The extracts in each solvent system were analyzed preliminarily using thin layer chromatography (TLC) for identifying the distribution pattern. TLC system composed of silica as a stationary phase. The mobile phase for use in the separation is the ratio 4:1 by volume of hexane and ethylacetate. DPPH antioxidant assay indicated that the crude extracts from *M. champaca* leave have the highest potential for the inhibitory concentration at 50% (IC_{50}) of DPPH with 0.018 $\pm$ 0.001 mg/ml. This IC_{50} value is overcome IC_{50} of standard antioxidant, Butylated hydroxy toluene (BHT), determined to be 0.048 ± 0.002 mg/ml. The comparison of the extracts between each harvesting

time; 1st (January), 2nd (April) and 3rd (June) exhibited the significantly different (One-way ANNOVA, SPSS, $p < 0.05$) in IC_{50} of DPPH. This result is suggesting that the season for harvesting caused the amount of active ingredient in *M. alba* and *M. champaca* leaves. RMCCA-1 cell cytotoxicity assay was examined by using screening extracted concentration of 50 µg/ml and compared the effect with cholangiocyte (MMNK-1, normal cell). This screening concentration and the effect against normal cell were used for the decision for determining the IC_{50} in cell cytotoxicity assay of RMCCA-1. The effective extraction from *M. alba* in 1st harvesting time in methanol, *M. champaca* in 2nd harvesting time in ethylacetate and methanol can determine the IC_{50} for RMCCA-1 cell cytotoxicity to be 13.51 $\pm$ 1.12, 51.07 $\pm$ 10.52 and 26.43 $\pm$ 1.36 µg/ml, respectively. In conclusion, *M. alba* and *M. champaca* extraction have antioxidant properties and anti-proliferation of cholangiocarcinoma (RMCCA-1). Therefore, *M. alba* and *M. champaca* extraction are very fascinating to develop into pharmaceutical agents in the future.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ กลุ่มเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สำหรับความอนุเคราะห์ในการใช้ห้องปฏิบัติการเทคนิคการแพทย์ และการให้เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีชนิด MMNK-1 มาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณ ดร.มณฑลี ธีรอภิศักดิ์กุล ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ในสาขาวิชาวิทยาศาสตร์กายภาพทุก ๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... ง
สารบัญ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
สัญลักษณ์และคำย่อ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
สมมติฐานของการวิจัย 2
ขอบเขตของการวิจัย 3
นิยามศัพท์เฉพาะ 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
กรอบแนวคิดในการวิจัย 8
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย 9
ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง 9
เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย 10
วิธีดำเนินการวิจัย 12
บทที่ 4 ผลการวิจัย 16
บทที่ 5 อภิปราย และสรุปผลการทดลอง 29
บรรณานุกรม 35
ภาคผนวก
ก ตัวอย่างการคำนวณ %inhibition 38
ข ประวัติย่อผู้วิจัย 39

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อการแยกองค์ประกอบในสารสกัดหยาบ.....	15
2	แสดงการสกัดใบต้นจำปีและจำปาในชั้นของตัวทำละลายต่าง ๆ.....	16
3	แสดงความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ 50 %(IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบใบต้นจำปีและจำปา ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล เทียบกับสารมาตรฐาน BHT.....	19-22
4	แสดงความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ50 %(IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH ของสาร BHT (Butylated hydroxy toluene).....	22

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากใบต้นจำปีจากตัวอย่างที่ 1-3	17
2	แสดงการแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากใบต้นจำปาจากตัวอย่างที่ 1-3	17
3	เป็นสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปี ภาพที่อยู่ทางด้านซ้ายมือถ่ายที่แสงปกติ ด้านขวามือถ่ายที่ความยาวคลื่นแสง 254 nm	18
4	เป็นสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปา ภาพที่อยู่ทางด้านซ้ายมือถ่ายที่แสงปกติ ด้านขวามือถ่ายที่ความยาวคลื่นแสง 254 nm	18
5	แสดงกราฟของสารมาตรฐาน BHT	23
6	กราฟแสดงความเข้มข้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปี (MA – *Michelia alba*, รอบตัวอย่างที่ 01-03).....	25
7	กราฟแสดงความเข้มข้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปา (MC – *Michelia champaca*, รอบตัวอย่างที่ 01-03).....	26
8	การหาค่า IC50 ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแสดง % การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 สารสกัดหยาบจากตัวอย่างที่ 01 โดยใช้สารสกัดจากใบต้นจำปาในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (01MC-Et).....	27
9	การหาค่า IC50 ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแสดง % การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 สารสกัดหยาบจากตัวอย่างที่ 02 โดยใช้สารสกัดจากใบต้นจำปีในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (02MA-Et).....	27
10	การหาค่า IC50 ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแสดง % การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 สารสกัดหยาบจากตัวอย่างที่ 02 โดยใช้สารสกัดจากจากใบต้นจำปาในตัวทำละลายเมทานอล (02MC-M).....	28

สัญลักษณ์และคำย่อ

g	=	Gram
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
mg/ml	=	Milligram/milliliter
μg/ml	=	Microgram/milliliter
μl	=	Micro liter
IC_{50}	=	inhibitory concentration at 50%

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อนุมูลอิสระ (free radical) ในทางเคมีคืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่นำไปสู่การทำลายโปรตีนและไขมันที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของเซลล์ในร่างกาย (1) ปัจจัยการเกิดอนุมูลอิสระมีสาเหตุทั้งจากปัจจัยภายในและภายนอกร่วมกัน โดยปัจจัยภายในที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสารอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาชีวเคมีในกระบวนการหายใจในระดับเซลล์ (cellular respiration) กระบวนการสลายสารพิษที่ผ่านระบบของกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า “cytochrome P450” ที่เกิดขึ้นในตับและกระบวนการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง ส่วนปัจจัยภายนอก เช่น อาหารที่มีการปรุงแต่งด้วยสารเคมีที่ไม่มีความปลอดภัย การได้รับรังสีเอ็กซ์ (x-ray) การได้รับสารโอโซน (ozone) ควันบุหรี่ สิ่งแวดล้อมที่มีมลพิษ การสูดดมสารพิษของเสียที่ปล่อยออกมากจากโรงงานอุตสาหกรรมและการสัมผัสกับสารอินทรีย์ที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม อนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคหลายอย่าง เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน การลดลงของภูมิต้านเชื้อ โรคต้อกระจก เป็นต้น จากรายงานการวิจัยพบว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดความชราและการเสื่อมสลายของเซลล์ (aging) (2)

มะเร็งท่อน้ำดีในประเทศไทยเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข ข้อมูลของกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข พบสถิติการเสียชีวิตของมะเร็งท่อน้ำดีสูงสุดในปี พ.ศ 2548 โดยมีประชากรที่เป็นมะเร็งท่อน้ำดีเสียชีวิตประมาณ 25,000 ราย คิดเป็นอัตราการเสียชีวิตวันละ 70 คน หรือเฉลี่ยชั่วโมงละ 3 ราย ปี พ.ศ. 2554 พบคนไทยเสียชีวิตจากโรคมะเร็งท่อน้ำดีและตับจำนวน 14,314 ราย ประมาณครึ่งหนึ่งเป็นคนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือประมาณ 7,539 ราย (3) ปัจจุบันการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดียังไม่ได้ผลดีนักไม่ว่าจะด้วยการผ่าตัด การฉายรังสี หรือการให้ยาต้านมะเร็งและผู้ป่วยมักจะมาพบแพทย์ในระยะที่มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งแล้ว ทำให้การรักษาทำได้ยากและไม่ได้ผล การรักษาด้วยยาต้านมะเร็งส่วนใหญ่มักทำให้เกิดอาการข้างเคียงค่อนข้างมาก (4) ดังนั้นการพัฒนาตัวยาที่นำไปสู่การรักษาให้มีประสิทธิภาพจึงยังคงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมากในปัจจุบัน

การรักษาผู้ป่วยส่วนใหญ่ใช้เคมีบำบัดร่วมกับการผ่าตัด ซึ่งเป็นความเสี่ยงต่อผู้ป่วยในกลุ่มอาการเหล่านี้ วิธีการที่จะช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคเหล่านี้คือการดูแลรักษาสุขภาพและป้องกันร่างกายไม่ให้ได้รับสาร ที่จะนำไปสู่ความเสี่ยงในการได้รับอนุมูลอิสระ การศึกษาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เป็นอีกหนึ่งแนวทางที่ทางกลุ่มวิจัยมีความสนใจจึงเป็นที่มาถึงความพยายามในการหาวิธีการสกัดสารจากแหล่งธรรมชาติที่อยู่ใกล้ตัวเช่นพืชสมุนไพรที่มีอยู่มากมาย หาได้ง่าย ราคาถูกและยังมีความได้เปรียบในเรื่องความหลากหลายทางชีวภาพ การวิจัยครั้งนี้ทางกลุ่มผู้วิจัยมีความสนใจในการสกัดสารที่มีอยู่ในใบต้นจำปีและจำปาเพื่อที่จะทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในท่อน้ำดี โดยจะใช้สารสกัดจากส่วนใบของต้นจำปีและจำปา เนื่องจากใบของต้นดังกล่าวหาได้ง่ายและยังไม่พบข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในท่อน้ำดี ดังนั้นทางกลุ่มวิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานซึ่งจะนำไปสู่การต่อยอดความรู้ในเรื่องสารต้านอนุมูลอิสระและการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสกัดสารจากใบต้นจำปีและจำปาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา ที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ด้วยการใช้สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1. การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วจะสามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว
2. สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
3. สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1. เพื่อสกัดสารจากใบต้นจำปีและจำปาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกัน คือ เฮกเซน (hexane) เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) และเมทานอล (methanol)

2. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา ด้วยวิธี DPPH

3. ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา ด้วยวิธี MTT assay

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเพียงอิเล็กตรอนเดียวโดยอะตอมดังกล่าวมีความไม่เสถียรและว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงเป็นสาเหตุที่นำไปสู่การทำลายของโมเลกุลชีวภาพที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน และดีเอ็นเอ (2)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ โมเลกุลที่มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ที่มีต่อโมเลกุลอื่น สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำลายอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) โดยเฉพาะในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น การป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันกับไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (lipid membrane peroxidation) เป็นต้น (5)

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) เป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรในโครงสร้าง (stable free radical) ที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวบนอะตอมของไนโตรเจน DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เป็นที่ยอมรับในการทดสอบหาสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant assay) (6) DPPH มีสมบัติในการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งอาศัยสมบัติดังกล่าวนี้ ในปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคสเปคโตรโฟโตเมทรี (7)

จำปา (*Michelia champaca* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ Magnoliaceae ไม้ยืนต้นความสูง 15-30 เมตร ลักษณะลำต้นตรง ทรงพุ่มโปร่งเป็นรูปกรวยคว่ำ ปลูกเลี้ยงเป็นไม้ดอกไม้ประดับทั่วไป ดอกมีสีเหลืองขนาดใหญ่และออกดอกได้ตลอดปี ลักษณะใบเป็นรูปรีแกมรูปขอบขนาน ส่วนที่มีฤทธิ์ทางยาใช้ดอก เปลือกต้น เปลือกราก ใบ กระพี้ เนื้อไม้ เมล็ด ราก น้ำมันกลั่นจากดอก (8)

จำปี (*Michelia alba*) เป็นพืชในวงศ์ Magnoliaceae ไม้ยืนต้นขนาดกลาง ลำต้นมีความสูงประมาณ 10 – 20 เมตร ผิวลำต้นสีน้ำตาลจะแตกเป็นร่องถี่ ๆ ลักษณะของจำปี บริเวณกิ่งมีขนสีเทา

ขึ้นปกคลุมอยู่ มักเปราะและหักได้ง่าย ขยายพันธุ์ด้วยการตอนกิ่งและเพาะเมล็ด เป็นใบเดี่ยวสีเขียวโคนมน ปลายแหลม ขอบใบเรียบหนาและใหญ่ ดอกเป็นดอกเดี่ยวมีกลิ่นหอมกลีบดอกสีขาวคล้ายกับงาช้าง ส่วนผลเป็นกลุ่มซึ่งเมื่อผลแก่จะแห้งแตก ลักษณะคล้ายรูปทรงไข่หรือกลม ผลแก่มีสีแดงด้านในมีเมล็ดเล็ก ๆ สีดำอยู่ประมาณ 1 – 4 เมล็ด ส่วนที่มีฤทธิ์ทางยาคือใบและดอก (9)

มะเร็งท่อน้ำดี (Cholangiocarcinoma) ในประเทศไทยจะเกี่ยวข้องกับพยาธิใบไม้ตับ *Opisthorchis viverrini* (OV) ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเป็นคนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งอาจมีวิถีชีวิตคล้ายกันในการรับประทานปลาน้ำจืดดิบ ซึ่งมีตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ มะเร็งท่อน้ำดีแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 Intra-hepatic เป็นมะเร็งที่เกิดที่ท่อน้ำดีภายในตับและขยายออกสู่เนื้อตับด้านข้าง มีลักษณะเป็นก้อนมะเร็งคล้ายกับมะเร็งตับชนิด Hepatocellular carcinoma กลุ่มที่ 2 Extra-hepatic เป็นมะเร็งที่เกิดที่ท่อน้ำดีใหญ่ ตั้งแต่ที่ขั้วตับ (hepatic hilar) จนถึงท่อน้ำดีร่วม (common bile dust) ส่วนปลาย ทั้งนี้ไม่รวมมะเร็งที่ ampula of vater ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดมีข้อมูลหลักฐานชี้ประจักษ์ว่าคัดกรองมะเร็งท่อน้ำดีได้ แต่มีคำแนะนำให้ทำการวินิจฉัยในระยะเริ่มต้นในกลุ่มเสี่ยง (10)

MTT assay เป็นการทดสอบ cytotoxicity ของเซลล์โดยใช้ วิธีการวัดการทำงานของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ที่สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2-5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ที่มีสีเหลืองไปเป็น formazan product ที่มีสีม่วงมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ซึ่งระดับของสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (11)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1 ได้ข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากใบต้นจำปีและจำปา เมื่อใช้ระบบตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน จนนำไปสู่การพัฒนาวิธีการสกัดสารให้มีประสิทธิภาพ

2 ได้ข้อมูลของสารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปาในแง่ฤทธิ์การต้านทานต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งสามารถนำไปเป็นข้อมูลในการพัฒนาเป็นตัวยาต้านมะเร็งในอนาคต

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระ (free radicals) ในทางเคมีให้นิยามความหมายว่าเป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวที่ไม่มีคู่ ทำให้อะตอมหรือโมเลกุลดังกล่าวเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอื่นได้อย่างรวดเร็ว (1), (2) สารอนุมูลอิสระเป็นตัวการสำคัญที่ทำลายโมเลกุลชีวภาพที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย ปัจจัยภายในร่างกายที่นำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระเกิดจากขบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) เช่น กระบวนการขนส่งและลำเลียงอิเล็กตรอน (electron transport chain) ภายในเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย (mitochondrial membrane) เพื่อสร้างพลังงาน (oxidative phosphorylation) กลไกการทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยเม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายที่เรียกว่า “phagocytosis” การเกิดการอักเสบเนื่องจากการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (inflammatory) เป็นต้น (2), (12) ปัจจัยภายนอกนั้นมาจากอาหารที่เราบริโภคในแต่ละวัน ควันพิษจากท่อไอเสียเครื่องยนต์ สารพิษที่ปล่อยโรงงานอุตสาหกรรม เป็นต้น อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น ภาวะเส้นเลือดตีบตัน (atherosclerosis) โรคที่เกิดจากระบบประสาททำงานผิดปกติ เช่นโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer’s disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson’s disease) โรคมะเร็งและโรคที่เกิดจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) เป็นต้น (2)

จำปา (*M. champaca*) และจำปี (*M. alba*) เป็นไม้ยืนต้นที่มีการศึกษาและวิจัยถึงสมบัติทางเคมีของสารสกัดอย่างกว้างขวางที่มีผลทางเภสัชวิทยา (pharmaceutical) ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาตัวยารักษาการติดเชื้อและโรคมะเร็ง เช่น รายงานการวิจัยคุณสมบัติของสารสกัดจากจำปา ที่ได้จากส่วนของใบ เมล็ด เปลือกและรากถึงผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อราก่อโรค

(13), (14) สารสกัดจากเปลือกต้นจำปาที่ทำลายเชื้อที่ก่อโรค Leishmaniasis (มีลักษณะร่วมหลายอย่าง เช่น มีแผลที่ผิวหนัง เยื่อบุจมูกและปากมีอาการซีด ไข้เรื้อรัง ตับม้ามโตสาเหตุเกิดจากปรสิตในกลุ่มโปรโตซัว จีนัสลิชมาเนีย (Leishmania) ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ (15) สารสกัดจากกิ่งต้นจำปามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งที่เพาะเลี้ยง (cell line) เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer) เซลล์มะเร็งปอด (lung cancer) และเซลล์มะเร็งผิวหนัง (human melanoa) (16), (17)

สารสกัดจากดอกจำปีพบว่ามีผลยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงของกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) และมะเร็งเต้านม (18) นอกจากนี้สารสกัดดอกจำปามีผลต่อการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือด จากการสังเกตผลที่เกิดกับหนูทดลอง (19) รายงานการศึกษาผลของสารสกัดจากต้นจำปาและจำปีในการต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มวิจัยของ Hossain M และคณะ ได้อธิบายถึงการสกัดสารจากใบต้นจำปา ด้วยการใช้เอทานอล ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสพบว่าสารสกัดหยาบ (crude extract) มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ (20) โดยมีการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ รวมถึงการวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากใบต้นจำปี (21), (22)

มะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma) คือ มะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อทางเดินน้ำดี ทั้งท่อน้ำดีภายในและภายนอกตับ แต่ยังไม่รวมถึงเยื่อบุของถุงน้ำดีและส่วนของ papilla of vater ในการแบ่งกลุ่มของมะเร็งท่อน้ำดีตามลักษณะทางกายภาพ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ มะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic cholangiocarcinoma หรือ peripheral type cholangiocarcinoma) และ กลุ่มที่สองคือ มะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ (Extrahepatic type cholangiocarcinoma) โรคมะเร็งท่อน้ำดีเกิดในเพศชายมากกว่าเพศหญิงและที่สำคัญคือพบในประเทศไทยมากที่สุดในโลก ในปี ค.ศ.1998-2000 พบว่าจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอุบัติการณ์ในการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีสูงกว่าภาคอื่น ๆ ของประเทศไทย เช่น ขอนแก่น อุดรธานี นครพนม เป็นต้น (23)

สาเหตุการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดียังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่พบว่ามีปัจจัยเสี่ยงจากการป่วยอื่น ๆ ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี ได้แก่ นิ่วในท่อน้ำดี โรคตับเรื้อรัง (chronic liver disease) ภาวะโรคเรื้อรังจากการเป็นโรคตับอักเสบจากเชื้อไวรัส (เช่น HBV, HCV) โรคตับจากแอลกอฮอล์หรือตับแข็งและอาจมีสาเหตุร่วมอื่น ๆ ที่จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งท่อน้ำดี เช่น

โรคติดเชื้อปรสิตบางชนิดจากเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis. viverrini* (เป็นเชื้อที่พบในประเทศไทย ลาวและ มาเลเซีย) หรือ *Clonorchis sinensis* (พบในญี่ปุ่น เกาหลีและเวียดนาม) โดยการติดต่อสู่คนจากการกินปลาน้ำจืดมีเกล็ดที่มีพยาธิเหล่านี้ ที่ไม่ผ่านการปรุงที่ถูกสุขลักษณะ เป็นต้น การติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* ส่งผลให้เกิดการอักเสบเรื้อรังและมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี (24) การผ่าตัด เป็นการรักษาหลักของโรคมะเร็งท่อน้ำดี การผ่าตัดเนื้องอก เป็นวิธีการรักษามาตรฐานที่ได้ผลดีและเพิ่มอัตรารอดชีวิตของผู้ป่วยได้ การตัดตับเป็นการรักษาที่เป็นวิธีมาตรฐานของมะเร็งท่อน้ำดี แต่พบว่ามีอัตราการรอดชีพที่ 5 ปี ร้อยละ 40 และการเกิดตับวายหลังการผ่าตัดและทำให้อัตราการตายสูงขึ้น นอกจากนี้จะเป็นการส่องกล้องและการใช้เคมีบำบัด/รังสีรักษา ซึ่งใช้ในกรณีที่ไม่สามารถผ่าตัดเนื้องอกออกได้หรือผู้ป่วยไม่สามารถเข้ารับการผ่าตัดได้ หรือใช้ในการรักษาหลังผ่าตัดเพื่อเพิ่มโอกาสการหายขาด

การหาสารธรรมชาติจากการใช้สมุนไพรรักษามะเร็งจึงเป็นที่น่าสนใจ เพื่อลดอาการข้างเคียงและช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ส่วนประกอบในสมุนไพรหลาย ๆ ชนิด มีส่วนช่วยในระบบการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายพร้อม ๆ กันและยังสามารถบำรุงร่างกายได้ด้วย สมุนไพรสามารถออกฤทธิ์ต่าง ๆ ดังนี้ ระงับการสร้างเส้นเลือดใหม่ (antiangiogenesis) ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (anti-proliferation) ระงับการอักเสบ (anti-inflamatory) ซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repairing) กำจัดอนุมูลอิสระ (antioxidant) และยับยั้งจุลชีพ (anti-microbial)

ปัจจุบันสมุนไพรที่มีผลการทดสอบที่เป็นประโยชน์ต่อการรักษามะเร็งได้ถูกค้นพบมากขึ้น เช่น สารสกัดจากดอกจำปีที่มีผลยับยั้งเซลล์เพาะเลี้ยงของเนื้องอกและกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) และมะเร็งเต้านม ดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นทางกลุ่มผู้วิจัยมีความสนใจสารที่สกัดได้จากใบต้นจำปีและจำปา เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เนื่องจากจำปีและจำปาเป็นไม้ยืนต้นที่ปลูกในเขตร้อนชื้น เติบโตได้ดีในประเทศไทยถือเป็นข้อได้เปรียบในเรื่องของแหล่งวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการวิจัย แนวทางการวิจัยเรื่องสารต้านอนุมูลอิสระใช้วิธีการสกัดสารจากใบต้นจำปีและจำปาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน เป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน ใช้ต้นทุนในเรื่องอุปกรณ์ สารเคมีที่ไม่สูงมาก สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการเคมีทั่วไป ในการวิจัยนี้การเตรียมและสกัดสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา จะใช้วิธีการทดสอบฤทธิ์ความสามาถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (6) และในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจะใช้วิธีการ MTT assay (11) ทางกลุ่มผู้วิจัย

คาดหวังว่าองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์ในการต่อยอดฐานความรู้และการประยุกต์ใช้ในทางเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

กรอบแนวคิดในการวิจัย

1 การสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบต้นจำปีและจำปาโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วแตกต่างกัน การใช้วิธี DPPH assay เป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสารสกัดหยาบในใบต้นจำปีและจำปา

2 สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้วิธี MTT assay เป็นวิธีทดสอบ

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

แสดงรายละเอียดเกี่ยวกับขั้นตอนและวิธีทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA เปรียบเทียบกับเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-I (24) ด้วยสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา ณ ห้องปฏิบัติการของคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โดยมีรายละเอียดของประชากรและวิธีการเลือกเก็บกลุ่มตัวอย่าง รายละเอียดเกี่ยวกับเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย วิธีการเก็บและการวิเคราะห์ข้อมูล ดังนี้

3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา จากพื้นที่ในอำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยมีวิธีในการสุ่มเก็บตัวอย่างโดยการเก็บใบมาทั้งกิ่งทั้งใบอ่อนและใบแก่ การทดลองแบ่งตัวอย่างการเก็บใบต้นจำปีและจำปาเป็น 3 ช่วงเวลา คือ ช่วงที่ 1 เดือนมกราคม ช่วงที่ 2 เดือนเมษายน และช่วงที่ 3 เดือนมิถุนายน

เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี RMCCA-1 วิธีการเตรียมเซลล์และพัฒนาเพื่อใช้เป็น cell line ในการทดลอง (cell establishment) เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโต (cell cytotoxicity assay) ทำตามวิธีการในเอกสารอ้างอิง (11)

3.2 เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.2.1 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

1. ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven)
2. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (T60 Visible-spectrophotometer ยี่ห้อ PG instruments)
3. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
4. เครื่องปั่น (blender)
5. เครื่องระเหยตัวทำละลาย (rotary evaporator)
6. TLC developing tank
7. Capillary tube
8. Ultraviolet cabinet
9. เครื่องระเหยแห้งแบบสูญญากาศ (Speed vacuum)
10. เครื่องชั่งชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง
11. ไมโครปิเปตขนาด 1,000 ไมโครลิตร
12. ไมโครปิเปตขนาด 200 ไมโครลิตร
13. ไมโครปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตร
14. แผ่น TLC silica gel 60F254 (Merck)
15. บีกเกอร์ขนาด 1000, 500, 250 มิลลิลิตร
16. กรวยกรอง
17. พาราฟิล์ม (parafilm)
18. หลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร
19. ขวดแก้วใส่สารสกัด (vial)
20. ถุงมือยาง
21. ปากกาเคมี
22. CO_2 Incubator: Heraeus
23. Laminar Flow Cabinets (Labconco)
24. Water bath (Jalabo)
25. Vortex (Scientific industries)
26. CO_2 Inubator (Themo scientific)
27. Inverted microscope (Olympus รุ่น CKX31)

28. Centrifuge (Heraeus instrument)
29. Light microscope (Nikon instrument รุ่น E100)

3.2.2 สารเคมี

1. สารมาตรฐาน BHT (Butylated hydroxy toluene) Aldrich ขนาด 100 กรัม
2. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) Aldrich ขนาด 2 กรัม
3. DMSO (Dimethyl sulfoxide) Sigma-Aldrich ปริมาตร 1 ลิตร
4. Absolute Ethanol AR Merck ปริมาตร 2.5 ลิตร
5. 95% Ethanol 15 กิโลกรัม 2 ถัง
6. Methanol AR Merck ปริมาตร 2.5 ลิตร
7. Methanol 15 กิโลกรัม 2 ถัง
8. Hexane AR Merck ปริมาตร 2.5 ลิตร
9. Hexane 15 กิโลกรัม 2 ถัง
10. Dichloromethane AR Merck ปริมาตร 2.5 ลิตร
11. Ethyl acetate AR Merck ปริมาตร 2.5 ลิตร
12. DI water
13. Ethyl acetate 15 กิโลกรัม 2 ถัง
14. HAM's F-12
15. Fetal bovine serum (FBS)
16. Antibiotic – Antimycotic solution
17. HAM's F-12
18. Fetal bovine serum (FBS)
19. Antibiotic – Antimycotic solution

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT (Butylated hydroxy toluene) ความเข้มข้น 50 mg/ml ในเอทานอล ละลายมาตรฐาน BHT ที่ใช้ในการทดสอบจะใช้ความเข้มข้นในช่วง 0.00625 – 1 mg/ml เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา ในแต่ละตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด

- เตรียมสารอนุมูลอิสระมาตรฐานโดยการชั่ง DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยมสี่ตำแหน่ง โดยเตรียมให้มีความเข้มข้น 3.94 mg/100 ml ในตัวทำละลายเมทานอล สารละลาย DPPH ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานนี้จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลอง โดยอนุมูลอิสระ DPPH เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์โดยใช้เครื่องสเปคโตรมิเตอร์วัดการลดลงของสี เมื่อเติมสารต้านอนุมูลลงไป โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

3.3.2. การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) ด้วยวิธีการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ (maceration)

ขั้นตอนที่ 1 เตรียมโดยนำใบสดของต้นจำปีและใบจำปามาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วตากให้สะเด็ดน้ำ นำไปหั่นเป็นชิ้นหยาบ ๆ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง

ขั้นตอนที่ 2 นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นละเอียด แล้วชั่งน้ำหนักให้ได้ชนิดละ 500 กรัม จากนั้นนำไปแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วก่อนปริมาตร 4 ลิตร โดยใช้เวลาประมาณ 5 วันต่อตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด

ขั้นตอนที่ 3 กรองสารละลายที่ได้ลงในขวดสีชาปิดฝาติดฉลากระบุชนิดของพืชที่สกัดและชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เก็บเอาไว้ สกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เดิมอีก 2 ครั้ง นำสารละลายจากการกรองทั้ง 3 ครั้งของพืชมารวมกัน โดยแยกพืชแต่ละชนิด นำสารละลายไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย (rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบใบต้นจำปีและจำปาที่สกัดจากตัวทำละลายชนิดแรกเก็บไว้สำหรับการทดสอบต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 นำกากของใบต้นจำปีหรือจำปาที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ตัวแรก คือ เฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว ไปตากหรือระเหยตัวทำละลายอินทรีย์จนหมด ทำการเปลี่ยนชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดที่มีขั้วเพิ่มขึ้นตามลำดับคือ เอทิลอะซิเตทและเมทานอล โดยทำการสกัดตามวิธีในขั้นตอนที่ 3 คือทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำไประเหยแห้งเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย

ขั้นตอนที่ 5 นำสารสกัดหยาบที่ได้จากใบต้นจำปีและจำปาจากการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วและไม่มีขั้ว นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

3.3.3. MTT assay

ขั้นตอนที่ 1 เลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด RMCCA จำนวน 5.0 x 10^3 cells/200 ml ใน 96 well plate ในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 เติมสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา ที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เฮกเซน หรือเอทิลอะซิเตท หรือเมทานอล โดยใช้ความเข้มข้น 50 ug/ml ในการคัดเลือกสารสกัดที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตเบื้องต้น (screening) จากนั้นเลือกสารสกัดที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตทดสอบต่อ โดยใช้ความเข้มข้นตั้นแต่ 1.5-100 ug/ml เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโต 50% (inhibitory concentration at 50%, IC_{50}) ในการทดสอบผลของสารสกัด RMCCA-1 จะใช้เวลา 48 ชั่วโมง ในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณ CO_2 ~ 5%

ขั้นตอนที่ 3 เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml ลงไปในเซลล์แต่ละหลุมทดสอบของ 96-well plate และ นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลักการคือ สารละลาย MTT จะเปลี่ยนเป็นผลึก formazan ใช้ pipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง โดยระวังไม่ให้ถูกผลึกที่เกิดขึ้น จากนั้นเติม dimethysulfoxide (DMSO) จำนวน 200 µl เพื่อละลายผลึก formazan จะได้สารละลายสีม่วง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เพื่อวิเคราะห์ cell cytotoxicity ที่เป็นผลมาจากสารสกัดหยาบ

ขั้นตอนที่ 4 การวิเคราะห์ผลความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ด้วยการใช้โปรแกรม KaleidaGraph 4.0 โดยใช้สมการความสัมพันธ์แบบ “Sigmoidal Curve” จากสมการ;

Y = {m1+(m1-m2)} / {1+(X/m3)^m4}

Y คือ คือค่าที่แสดง %การยับยั้งการเจริญเติบโต (%inhibition)

X คือ ค่าความเข้มข้นของสารสกัด หน่วยเป็น ug/ml

m1 คือ %การยับยั้งที่ต่ำที่สุด;

m2 คือ %การยับยั้งที่มากที่สุด

m3 คือ %การยับยั้งที่ความเข้มข้นที่ 50%

m4 คือ ค่าความชันในช่วยที่ครอบคลุมค่า %การยับยั้งที่ 50%

วิธีการหาค่าความสัมพันธ์จากสมการนี้ ใช้วิธีที่เรียกว่า “non-linear fitting algorithm” (26)

3.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH (6)

ขั้นตอนที่ 1 ใช้สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา ที่สกัดจากตัวทำละลายอินทรีย์ เฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล ที่ความเข้มข้น 0.000625-10 mg/ml ในการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 50% (IC_{50}) ด้วยวิธีการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer โดยใช้ความยาวคลื่น 517 นาโมเมตร ความเข้มข้นของ DPPH ในสารละลายเท่ากับ 0.04 mg/ml จากนั้นทิ้งให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate experiment) เพื่อนำไปคำนวณความเข้มข้นที่ยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่50% (IC_{50})

สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานคือ BHT (Butylated hydroxy toluene) การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระใช้ความเข้มข้นช่วง 0.00625 – 1 mg/ml ทำการคำนวณความเข้มข้นที่ยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่ 50% (IC_{50}) โดยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อใช้ในการหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD)

ขั้นตอนที่ 2 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% inhibition) จากสารสกัดหยาบโดยทำการเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากสารละลายมาตรฐาน BHT และหาค่า IC_{50} ซึ่งค่า IC_{50} มาจากคำว่า 50% Inhibitory Concentration คือ ค่าความเข้มข้นที่สารนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50% โดยใช้สูตร

เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) = $[(A_0-(A_s-B_s)/A_0] \times 100$

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น

A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงหลังเติมสารที่ใช้ศึกษา

B_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ใช้ศึกษา

3.3.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาด้วยวิธีการโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

ขั้นตอนที่ 1 วิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) ใช้วัฏภาคหยุดนิ่ง (stationary phase) คือซิลิกา (silica) ที่เคลือบบนแผ่น TLC และทำการทดสอบหาระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสมต่อการแยกองค์ประกอบในสารสกัดหยาบ โดยใช้ระบบดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงการใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ต่อการแยกองค์ประกอบในสารสกัดหยาบ

ระบบตัวทำละลายในวัฏภาคเคลื่อนที่	สัดส่วนของตัวทำละลายอินทรีย์ (โดยปริมาตร)
MP01	เฮกเซน (100%)
MP02	เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท 4:1
MP03	เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท 3:2
MP04	เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท 1:4
MP05	เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท : เมทานอล 3:1:1

ขั้นตอนที่ 2 ทำการแยกสารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปาที่ได้จากชั้นตัวทำละลายต่าง ๆ บนระบบของ TLC โดยทดสอบกับระบบตัวทำละลายในวัฏภาค MP01-04 จากนั้นทำการตรวจสอบการแยกของสารภายใต้แสงยูวี (UV light) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.3.6 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง

เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ด้วยสารสกัดหยาบ โดยระบุชนิดชั้นสารละลายจากใบต้นจำปีและจำปา โดยใช้หลักของสถิติคือ one-way ANOVA แบบ single factor ในการวิเคราะห์ผลโดยใช้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} เป็นตัวแปรในการวิเคราะห์เท่านั้น

บทที่ 4

ผลการวิจัย

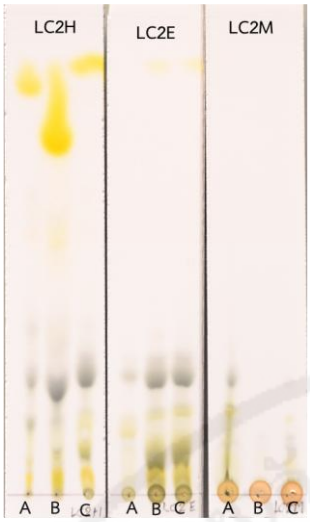
4.1 การสกัดสารจากใบต้นจำปีและจำปาด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

การสกัดจะได้สารสกัดหยาบในชั้นของตัวทำละลายดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการสกัดใบต้นจำปีและจำปาในชั้นของตัวทำละลายต่าง ๆ

รอบที่เก็บ (ตัวอย่างที่)	ตัวทำละลาย		
	Hexane	Ethyl Acetate	Methanol
1	จำปี	จำปี	จำปี
	จำปา	จำปา	จำปา
2	จำปี	จำปี	จำปี
	จำปา	จำปา	จำปา
3	จำปี	จำปี	จำปี
	จำปา	จำปา	จำปา

จากนั้นนำมาหาเอกลักษณ์ของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา เพื่อดูว่าสารเคลื่อนที่เป็นอย่างไร โดยทำเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นผิวบาง (Thin layer chromatography, TLC) นำสารสกัดหยาบใบต้นจำปีแต่ละรอบการสกัดมา spot จุดละ 2 μl ลงบนแผ่น TLC แล้วใช้ตัวทำละลายเฮกเซนเป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เมื่อเสร็จแล้วทำการทดสอบเหมือนเดิมแต่เปลี่ยนตัวทำละลายเป็นเอทิลอะซิเตทและเมทานอล ตามลำดับ จากนั้นเปลี่ยนสารสกัดเป็นสารสกัดหยาบใบต้นจำปาแล้วทำการทดสอบเหมือนสารสกัดหยาบใบต้นจำปีซ้ำ ได้ผลการทดสอบดังภาพที่ 1 และภาพที่ 2



ภาพที่ 1

ภาพที่ 2

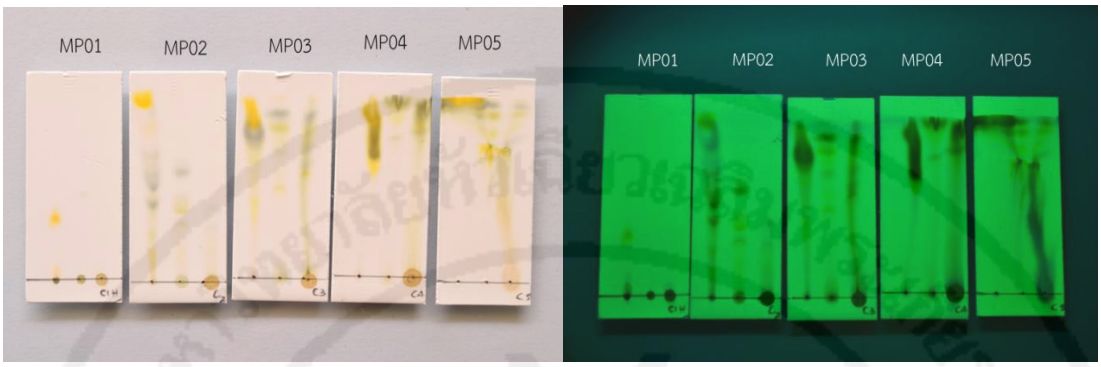
หมายเหตุ: LC2 และ LP2 = ระบบตัวทำละลายอินทรีย์ของ mobile phase ที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบของสารสกัดคือ เฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร ซึ่ง C หมายถึงสารสกัดจากใบต้นจำปี และ P หมายถึงสารสกัดจากใบต้นจำปา; H = สารสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน; E = สารสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์เอทิลอะซิเตท; M = สารสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอล

ภาพที่ 1 และ 2 แสดงการแยกองค์ประกอบของสารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปาจากตัวอย่างที่ 1-3 (แทนด้วยสัญลักษณ์ A, B และ C)

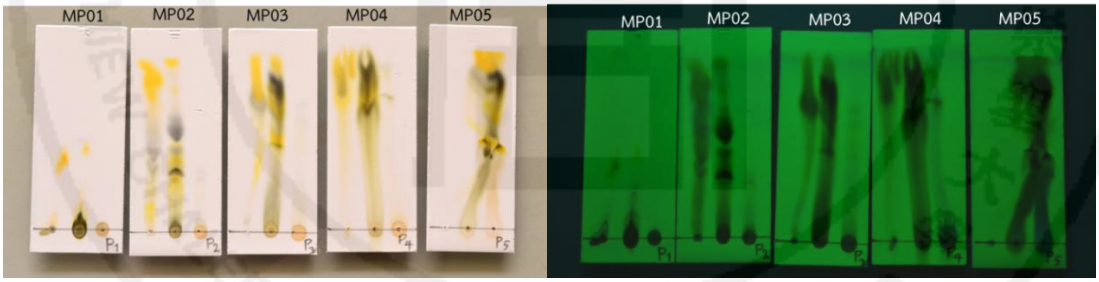
จากภาพที่ 1 และภาพที่ 2 วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาตามลำดับ ที่สกัดในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นผิวบางที่มีวัฏภาคหยุดนิ่ง (stationary phase) คือ silica และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ในการแยกสารบนแผ่น TLC ด้วยระบบตัวทำละลายอินทรีย์ของเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตทอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร จากผลการทดลองพบว่า การแยกสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา กลุ่มตัวอย่างที่ 1-3 พบว่ามีการกระจายตัวของ

สารที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน จากกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากทั้งสามช่วงเวลา ได้แก่ ช่วงที่ 1 เดือนมกราคม ช่วงที่ 2 เดือนเมษายน และช่วงที่ 3 เดือนมิถุนายน

ในการแยกสารได้ทดสอบหาระบบตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ผลการทดสอบดังภาพ



ภาพที่ 3



ภาพที่ 4

หมายเหตุ: มีระบบตัวทำละลายมีดังนี้ MP01 = เฮกเซน MP02 = เป็นตัวทำละลายผสมเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 4:1 MP03 = เป็นตัวทำละลายผสมเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทอัตราส่วน 3:2 MP04 = เป็นตัวทำละลายผสมเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทอัตราส่วน 1:4 MP05 = เป็นตัวทำละลายผสมเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล อัตราส่วน 3:1:1

ภาพที่ 3 และ 4 เป็นสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาตามลำดับ ภาพที่อยู่ทางด้านซ้ายมือถ่ายที่แสงปกติ ด้านขวามือถ่ายที่ความยาวคลื่นแสง 254 nm

จากการทดสอบพบว่าในการแยกสารบนแผ่น TLC ด้วยระบบตัวทำละลายอินทรีย์ของเฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตทอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร ใช้แยกสารได้ดีที่สุด สารสกัดหยาบใบต้นจำปีและจำปาที่เก็บในแต่ละรอบมีสารอยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอลเหมือนกันและพบว่าสารที่ออกฤทธิ์จะเคลื่อนที่ใน mobile phase ที่มีอัตราส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วมากได้ดีกว่า คือเอทิลอะซิเตทและเมทานอล

4.2 การทดสอบความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปี ด้วยวิธี DPPH

นำสารสกัดหยาบใบต้นจำปีและจำปา มาทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ให้ผลการทดสอบดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ 50 %(IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบใบต้นจำปีและจำปา ในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล เทียบกับสารมาตรฐาน BHT

สารสกัด	ตัวทำละลาย	รอบตัวอย่างที่	IC_{50}	IC_{50} ± SD
ใบต้นจำปี	Hexane	1	0.32049534	0.300 ± 0.015
			0.289	
			0.290136492	
		2	0.417	0.379 ± 0.033
			0.337526558	
			0.382	
		3	0.422924157	0.434 ± 0.014
			0.423780072	
			0.453949447	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สารสกัด	ตัวทำละลาย	รอบตัวอย่างที่	IC_{50}	IC_{50} ± SD
ใบต้นจำปี	Ethyl acetate	1	0.447	0.464 ± 0.012
			0.472	
			0.472296626	
		2	0.319	0.305 ± 0.010
			0.295	
			0.301	
		3	0.161738253	0.157 ± 0.004
			0.152616833	
			0.157413623	
ใบต้นจำปี	Methanol	1	0.079392888	0.079 ± 0.001
			0.080698396	
			0.077984951	
		2	0.047067015	0.054 ± 0.0004
			0.041874146	
			0.045510522	
		3	0.054618837	0.055 ± 0.001
			0.056055808	
			0.055113062	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

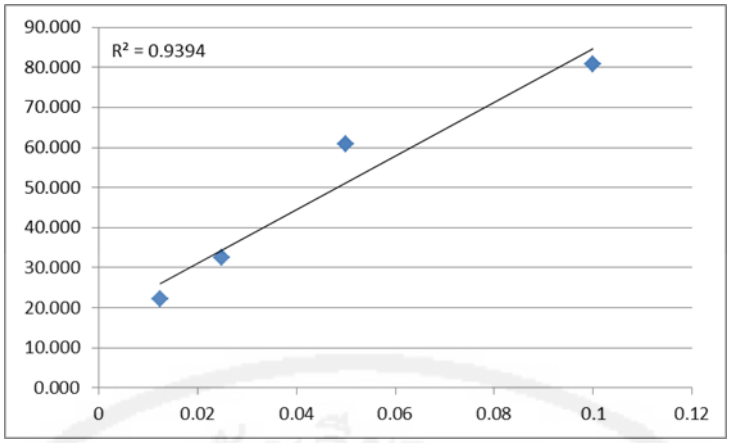
สารสกัด	ตัวทำละลาย	รอบตัวอย่างที่	IC_{50}	IC_{50} ± SD
ใบต้นจำปา	Hexane	1	0.702454562	0.768 ± 0.088
			0.70859515	
			0.891911407	
		2	0.521350682	0.484 ± 0.039
			0.513082808	
			0.418707805	
		3	0.30456688	0.346 ± 0.300
			0.376250371	
			0.35712294	
ใบต้นจำปา	Ethyl acetate	1	0.130276701	0.131 ± 0.002
			0.1337242	
			0.129051136	
		2	0.182791117	0.176 ±0.005
			0.176390325	
			0.170218498	
		3	0.110104678	0.129 ± 0.028
			0.107544379	
			0.168035543	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สารสกัด	ตัวทำละลาย	รอบตัวอย่างที่	IC_{50}	IC_{50} ± SD
ใบต้นจำปา	Methanol	1	0.018890361	0.018 ± 0.001
			0.018797678	
			0.016917422	
		2	0.062557249	0.064 ± 0.001
			0.065935278	
			0.064207043	
		3	0.017648727	0.018 ± 0.001
			0.018617389	
			0.017011949	

ตารางที่ 4 แสดงความสามารถในการยั้บยั้งสารอนุมูลอิสระ50 %(IC_{50}) ด้วยวิธี DPPH ของสาร BHT (Butylated hydroxy toluene)

สารมาตรฐาน	ตัวทำละลาย	ความเข้มข้น mg/ml	IC_{50}	IC_{50} ± SD
BHT	Ethyl alcohol	0.05-0.025	0.0507	0.048 ± 0.002
			0.0458	
			0.048346102	



ภาพที่ 5 แสดงกราฟของสารมาตรฐาน BHT

จากการทดสอบพบว่า สารสกัดจากตัวทำลายอินทรีย์ที่มีขั้ว คือ เอทิลอะซิเตทและเมทานอล สามารถแยกสกัดสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว สารสกัดที่สกัดจากใบต้นจำปีและจำปาในชั้นของตัวทำละลายเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากตัวทำลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล นอกจากนี้พบว่าสารสกัดจากใบต้นจำปาในชั้นของเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากใบต้นจำปีและสารมาตรฐาน BHT

4.3 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโต (Cell cytotoxicity assay) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 เปรียบเทียบกับเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ด้วยวิธี MTT assay

การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ RMCCA-1 และ MMNK-1 ด้วยสารสกัดหยาบใบต้นจำปีและจำปาที่ความเข้มข้น 50 ug/ml (แสดงดังภาพที่ 6-7) โดยรอบตัวอย่างที่ 01, 02 และ 03 แสดงลำดับของตัวอย่างที่เก็บมาสกัดตามลำดับ โดย MA คือ สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปี (*Michelia alba*) และ MC คือ สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปา (*M. champaca*), H คือ ตัวทำละลายเฮกเซน, Et คือ ตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและ M คือตัวทำละลายเมทานอล Extract คือสารสกัดหยาบที่ใช้ทดสอบและ Solvent control คือตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดเป็น negative control สารสกัด

หยาบที่จะนำไปใช้ทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ 50% (IC_{50}) (ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละการทดลอง, triplicated experiment) ใช้หลักเกณฑ์การเลือกดังนี้

1) สารสกัดหยาบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (RMCCA-1) มากกว่า 50% และสามารถละลายได้ดี ไม่มีการแยกชั้นและตกตะกอนในอาหารเลี้ยงเซลล์

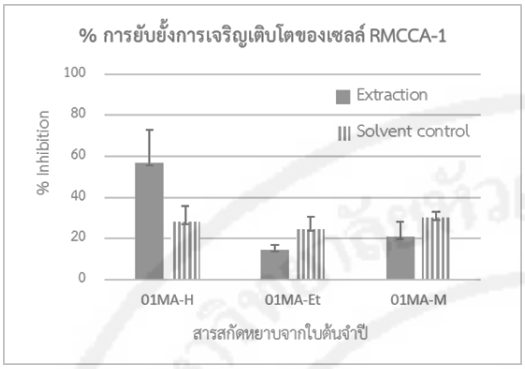
2) เซลล์ RMCCA-1-1 ไม่ถูกยับยั้งโดยการใส่ตัวทำละลายอินทรีย์ (control) ที่ใช้สกัดสารจากใบต้นจำปีและจำปา ซึ่งความเข้มข้นสูงสุดของตัวทำละลายอินทรีย์น้อยกว่า 1%

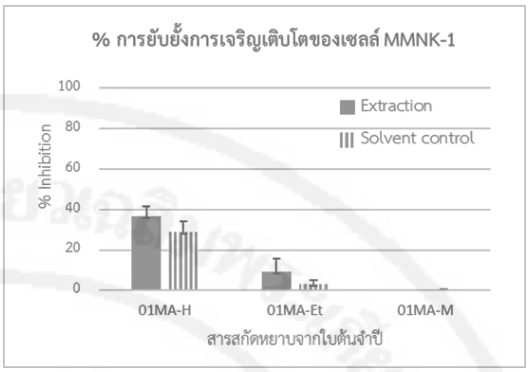
3) สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติ (MMNK-1) น้อยกว่า 70% จากการใช้เกณฑ์ทั้งสามข้อ ได้สารสกัดคือ ตัวอย่างที่ 1 สารสกัดจากใบต้นจำปาในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (01MC-Et) ตัวอย่างที่ 2 สารสกัดจากจำปีในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (02MA-Et) และตัวอย่างที่ 2 สารสกัดจากใบต้นจำปาในตัวทำละลายเอทานอล (02MC-M)

จากนั้นจะนำสารสกัดที่มีค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ไปทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต 50% (IC_{50}) โดยสารสกัดหยาบที่จะทำการทดสอบต่อนั้น จะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการสกัด (negative control คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล) และเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ตามเกณฑ์ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

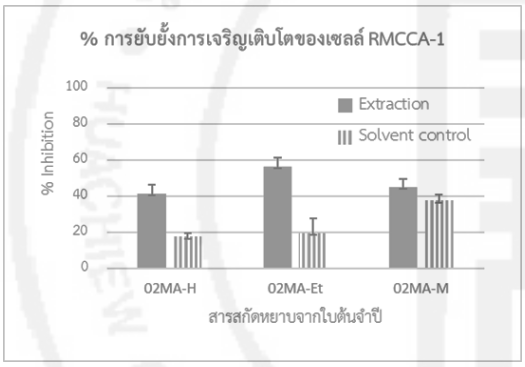
ภาพที่ 6 กราฟแสดงความเข้มข้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปี (MA – *Michelia alba*, รอบตัวอย่างที่ 01-03)

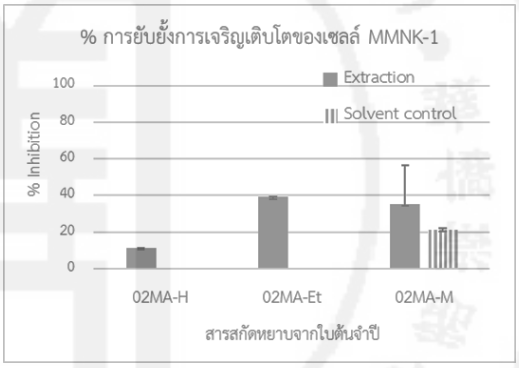
รอบตัวอย่างที่ 01



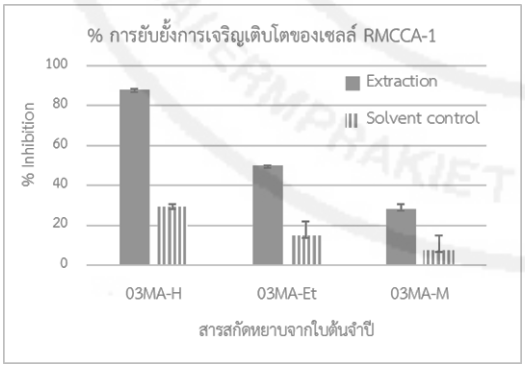


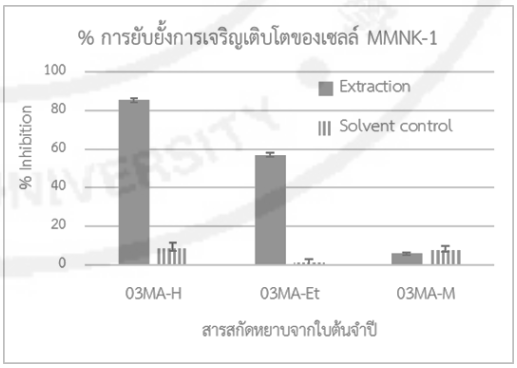
รอบตัวอย่างที่ 02





รอบตัวอย่างที่ 03





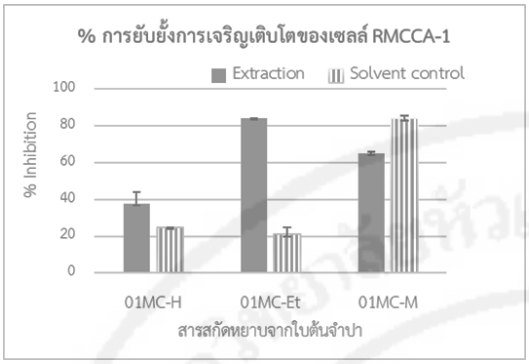
Extraction = สารสกัดที่ใช้ในการทดสอบในตัวทำละลาย H-เฮกเซน, Et-เอทิลอะซิเตท และ M-เมทานอล

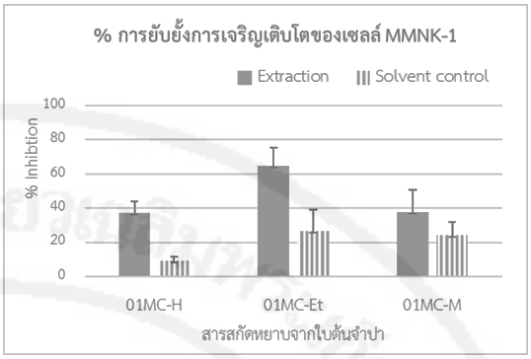
Solvent control = ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารนั้นคือ H-เฮกเซน, Et-เอทิลอะซิเตท และ M-เมทานอล

การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละการทดลอง (triplicated experiment)

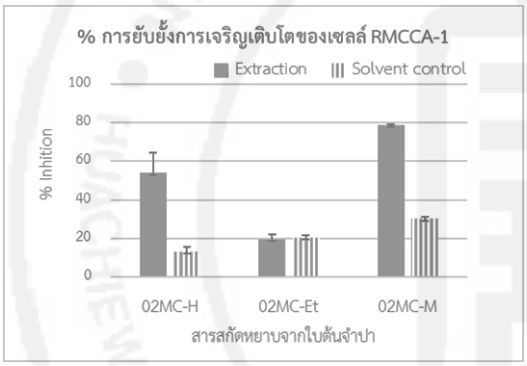
ภาพที่ 7 กราฟแสดงความเข้มข้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปา (MC – *Michelia champaca*, รอบตัวอย่างที่ 01-03)

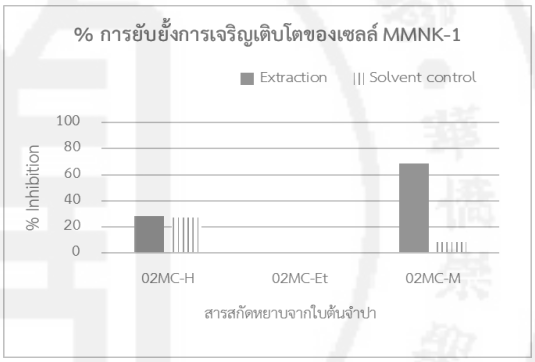
รอบตัวอย่างที่ 01



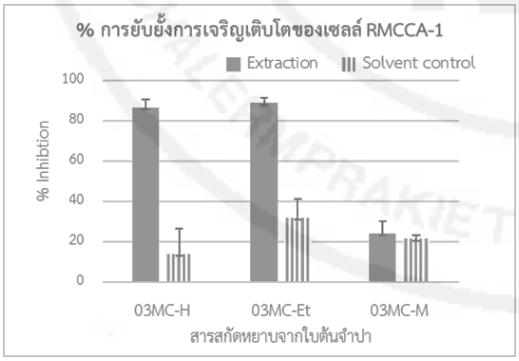


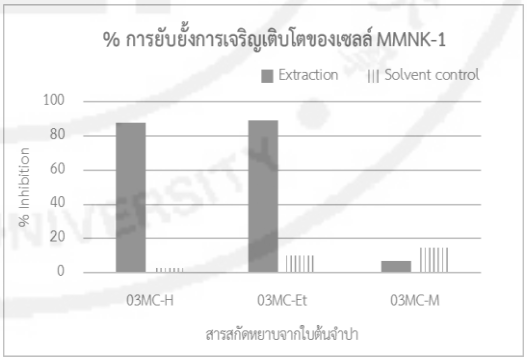
รอบตัวอย่างที่ 02





รอบตัวอย่างที่ 03



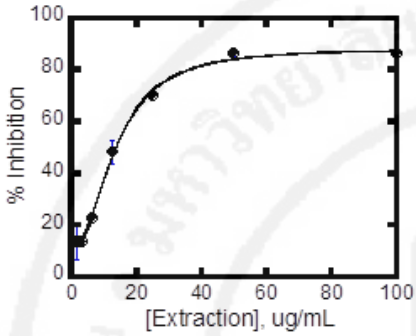


Extraction = สารสกัดที่ใช้ในการทดสอบในตัวทำละลาย H-เฮกเซน, Et-เอทิลอะซิเตท และ M-เมทานอล

Solvent control = ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารนั้นคือ H-เฮกเซน, Et-เอทิลอะซิเตท และ M-เมทานอล

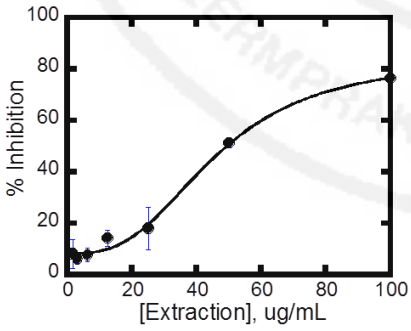
การทดลองทำซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละการทดลอง (triplicated experiment)

ผลการทดสอบหาค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ RMCCA-1 ที่ 50% (IC_{50}) ด้วยการทดสอบ Cell cytotoxicity โดยใช้ MTT assay วัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ด้วยการใช้สมการ Sigmoidal จากโปรแกรม KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software) ผลการวิเคราะห์จากการวัดซ้ำสามครั้ง (triplicated experiment)



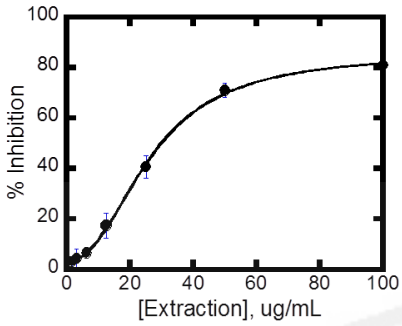
ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ RMCCA-1 ที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 13.51 $\pm$ 1.12 ug/ml

ภาพที่ 8 การหาค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแสดง % การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 สารสกัดหยาบจากตัวอย่างที่ 01 โดยใช้สารสกัดจากใบต้นจำปาในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (01MC-Et)



ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ RMCCA-1 ที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 51.07 $\pm$ 10.52 ug/ml

ภาพที่ 9 การหาค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแสดง % การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 สารสกัดหยาบจากตัวอย่างที่ 02 โดยใช้สารสกัดจากใบต้นจำปีในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท (02MA-Et)



ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ RMCCA-1 ที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 26.43 $\pm$ 1.36 ug/ml

ภาพที่ 10 การหาค่า IC_{50} ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีแสดง % การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 สารสกัดหยาบจากตัวอย่างที่ 02 โดยใช้สารสกัดจากจากใบต้นจำปาในตัวทำละลายเมทานอล (02MC-M)

บทที่ 5
อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

อภิปรายตอนที่ 1 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปาที่สกัดในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล

สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา ที่ได้จากการเก็บใบตัวอย่างในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ ช่วงเวลาที่ 1 เดือนมกราคม ช่วงเวลาที่ 2 เดือนเมษายนและช่วงเดือนที่ 3 เดือนมิถุนายน โดยจะทำการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล วิธีการทางสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากทั้งสามช่วงเวลา คือ One-way ANOVA แบบ single factor โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (p value = 0.05) ทั้งนี้รายละเอียดของการทดสอบสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปามีรายละเอียดดังนี้

สารสกัดหยาบใบต้นจำปี ตัวอย่างใบที่เก็บได้จากทั้งสามช่วงเวลาพบว่าค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 50% (IC_{50}) ในตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเท่ากับ 0.300 ± 0.015, 0.379 ± 0.033 และ 0.434 ± 0.014 mg/ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบในตัวทำละลาย เฮกเซนในแต่ละรอบการเก็บตัวอย่างมีค่าแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลของช่วงเวลา สภาพอากาศ ในแต่ละช่วงเดือนที่เก็บตัวอย่างมีผลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ จากข้อมูลเบื้องต้นนี้พบว่าในช่วงเดือนที่ 1 (มกราคม) หากสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนเพียงอย่างเดียว จะได้สารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาอื่น ที่สกัดด้วยเฮกเซนเหมือนกัน

สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีผลที่สอดคล้องกันในแง่ของค่าการต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} มีแนวโน้มค่าที่สูงเหมือนกัน โดยมีค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.464 ± 0.012 , 0.305 ± 0.010 และ 0.157 ± 0.004 mg/ml ตามลำดับ สำหรับค่าที่

ได้จากตัวอย่างที่ 3 มีความแตกต่างจากตัวอย่างที่ 1 และ 2 อย่างเห็นได้ชัด อาจมีสาเหตุมาจากองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ หรือเกิดความแตกต่างในระหว่างการสกัดสาร เช่น ใช้เวลาในการสกัด แช่ในตัวทำละลายที่นานกว่า หรือ ใช้เวลาในขั้นตอนการระเหยแห้งน้อยกว่าจึงอาจทำให้มีปริมาณสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีมากกว่าในตัวอย่างที่ 1 และ 2

สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีในตัวทำละลายเมทานอล มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับในชั้นตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท โดยมีค่า IC_{50} ในตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.079 ± 0.001 , 0.054 ± 0.0004 และ 0.055 ± 0.001 mg/ml ตามลำดับ จากสารสกัดหยาบในชั้นเมทานอลมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด น่าจะเป็นผลมาจากวิธีการที่กลุ่มวิจัยใช้ในการสกัดสารแบบเป็นลำดับขั้น (stepwise) เป็นการช่วยแยกสารอื่น ๆ ที่ไม่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ หรือเป็นวิธีการแยกให้บริสุทธิ์ในเบื้องต้น (partial purification) นอกจากนี้อาจมีสาเหตุจากสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่ น่าจะมีการกระจายตัวในส่วนที่มีขั้วของพืช ดังนั้นวิธีการที่กลุ่มวิจัยสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยเริ่มจากการใช้ตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วแล้วค่อยเพิ่มความมีขั้วขึ้นเช่น เฮกเซน เอทิลอะซิเตท อาจจะช่วยสกัดสารที่ไม่ต้องการ เช่น องค์ประกอบของผนังเซลล์ ลิพิดที่อยู่ที่ผนังเซลล์พืช (ลิกนิน) ออกได้และใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว เมทานอลในการสกัดเป็นลำดับสุดท้าย จึงมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า

สำหรับช่วงเวลาในการเก็บใบจากต้นจำปี จากการสังเกตและประเมินจากค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อาจยังไม่สามารถได้ข้อสรุปได้แน่ชัด ว่าช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง มีผลอย่างไรต่อปริมาณสารที่เราสนใจ แต่จากข้อมูลเบื้องต้น อาจพอบอกได้ว่า ช่วงเวลาที่ 3 ในเดือนมิถุนายน อาจจะเหมาะสมต่อการเก็บตัวอย่างใบต้นจำปีเพื่อสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หากพิจารณาเฉพาะสารสกัดในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและเมทานอลที่ผลค่อนข้างสอดคล้อง และเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปาในตัวทำละลายเฮกเซน มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) ในตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.768 ± 0.088, 0.484 ± 0.039 และ 0.346 ± 0.300 mg/ml ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าแนวโน้มจะคล้ายกับสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปี ที่ในชั้นตัวทำละลายเฮกเซน มีค่า IC_{50} ที่สูง เมื่อเทียบกับชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและเมทานอล แสดงว่าสาร

ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบต้นจำปาน่าจะถูกสกัดออกมาในชั้นตัวทำละลายที่มีขั้ว ซึ่งเหมือนกับของใบต้นจำปี ช่วงเวลาในการเก็บใบต้นจำปาก็อาจมีผล หากพิจารณาเฉพาะสารสกัดในชั้นเฮกเซนอย่างเดียวพบว่า ตัวอย่างที่ 3 ช่วงเดือนมิถุนายน น่าจะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปาในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) ในตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.131 ± 0.002 , 0.176 ±0.005 และ 0.129 ± 0.028 mg/ml ตามลำดับ แนวโน้มของปริมาณสารสกัดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท ดูเหมือนว่าจะเพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มเหมือนกับสารสกัดจากใบต้นจำปี เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปา ในตัวทำละลายชั้นเอทิลอะซิเตท จะพบว่าจำปา มีปริมาณสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปี ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่อาจแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างขององค์ประกอบของสารสกัดระหว่างต้นจำปีและจำปา ซึ่งเป็นต้นไม้ที่อยู่ใน genus เดียวกัน

สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปาในตัวทำละลายเมทานอล ให้ผลเหมือนกับใบต้นจำปีในตัวทำละลายชนิดเดียวกัน คือมีปริมาณสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) ในตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 0.018 ± 0.001, 0.064 ± 0.001 และ 0.018 ± 0.001 mg/ml ตามลำดับ ผลการทดลองการวัดค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปา ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้น เกี่ยวกับระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างใบต้นจำปา เพื่อสกัดสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ด้วยผลที่สอดคล้องและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน จะเห็นได้ว่าการเก็บตัวอย่างในช่วงที่ 3 เดือนมิถุนายน สารสกัดจากใบต้นจำปามีสารที่ต้านอนุมูลอิสระมาก เมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50}

จากผลการทดลองที่ได้ ชี้ให้เห็นว่าช่วงเวลาที่อาจเหมาะสมต่อการเก็บตัวอย่างใบต้นจำปีและจำปาเป็นช่วงเดือนมิถุนายน จากข้อมูลเบื้องต้นที่ได้อาจวิเคราะห์ได้ว่า ช่วงเดือนมิถุนายนเป็นช่วงที่เข้าสู่ฤดูฝน สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ ซึ่งรวมถึง microorganism และเชื้อก่อโรคในพืชนั้น เจริญเติบโตได้ดี ในช่วงที่มีความชื้นสูง มีโอกาสที่พืชจะถูกเชื้อเหล่านี้บุกรุกเกิดโรคในพืชได้จึงทำให้พืชต้องมีกลไกในการสร้างสารหลายอย่างมาต่อต้าน เพื่อป้องกันตัวเองโดยสารต้านอนุมูลอิสระก็อาจเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญในการปกป้องตัวเองของพืชเช่นกัน

สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้วน้อยไปหามาก คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตทและเมทานอล จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบในชั้น

เมทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับชั้นเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท โดยเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดหยาบระหว่างใบต้นจำปีและจำปา ด้วยวิธีการสกัดเดียวกัน พบว่าสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าใบต้นจำปีอย่างมีนัยสำคัญ (p value < 0.05)

อภิปรายตอนที่ 2 การเปรียบเทียบสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เมทานอลกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT

ทำการเปรียบเทียบค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ จากสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.048 ± 0.002 mg/ml ในส่วนของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาในตัวทำละลายเมทานอลมีค่าเท่ากับ 0.054 ± 0.0004 และ 0.018 ± 0.001 mg/ml ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากใบต้นจำปา มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT โดยที่สารสกัดจากใบต้นจำปาที่นำมาทำการทดสอบเป็นเพียงสารสกัดหยาบ (crude extract จากการทำ partial purification) จึงมีความน่าสนใจที่จะต่อยอดศึกษาถึงองค์ประกอบภายในว่ามีสารที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในอนาคต ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยาต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถประยุกต์ใช้ในทางการรักษาได้จริงในอนาคต

อภิปรายผลตอนที่ 3 การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นในสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (Thin layer chromatography, TLC)

การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นในสารสกัดหยาบในใบต้นจำปีและจำปา ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง เป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก มีอุปกรณ์และสารเคมี ในห้องปฏิบัติการเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ การวิเคราะห์เบื้องต้นเริ่มต้นด้วยการหาวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้ในการแยกสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบระบบตัวทำละลาย MP02 (เฮกเซนต่อเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร) มีความเหมาะสมในการดูการกระจายตัวของสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบและถูกใช้เป็นวิธีการติดตามปริมาณของสารสกัดที่ได้ในแต่ละครั้งและยังช่วยในการวิเคราะห์ปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบ จากการสกัดในแต่ละครั้ง ว่ามีความ reproducible หรือสามารถทำซ้ำได้อย่างแม่นยำและถูกต้องหรือไม่

จากผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะเห็นได้ว่าสารที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระมีการกระจายตัวในตัวทำละลายเมทานอล โดยจำนวนแถบสารของสารสกัดในชั้นเมทานอลมีจำนวนและปริมาณที่น้อยกว่าการกระจายตัวของสารในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วในเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท แสดงให้เห็นว่าสารที่ไม่มีขั้วส่วนใหญ่ถูกสกัดไปในชั้นของตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว แสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดสารเป็นลำดับขั้น เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

อภิปรายผลตอนที่ 4 ผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 โดยสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา

การทดสอบในเบื้องต้นพบว่าสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปายับยั้งการเจริญเติบโตเซลล์ มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 แต่ไม่ยับยั้งเซลล์ท่อน้ำดีปกติ MMNK-1 จากนั้นคัดเลือกสารที่มีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี เพื่อหาความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโต 50% (IC_{50}) สารที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ได้จากสารสกัดหยาบจำปีในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปาในตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและเมทานอล ซึ่งสารที่สนใจยังคงอยู่ในชั้นตัวทำละลายที่มีขั้วอย่างในเมทานอล

สรุปผลการวิจัย

1. การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วจะสามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว

ในการสกัดสารจากใบต้นจำปีและจำปาในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลแล้วนำไปทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบชั้นผิวบาง (Thin layer chromatography, TLC) พบว่าสามารถแยกองค์ประกอบของสารสกัดหยาบโดยมีอัตราส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ คือเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท ส่วนชั้นของสารละลายอินทรีย์ที่สกัดสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) ได้มากที่สุดคือเมทานอล

2. สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน BHT

พบว่า สารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปามีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดใบต้นจำปาในชั้นของเมทานอลมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 0.018 ± 0.001 mg/ml ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่าการต้านอนุมูลอิสระที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 0.048 ± 0.002 mg/ml

3. สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1

สารสกัดหยาบที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี พบในใบต้นจำปี โดยสกัดได้ในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 51.07 $\pm$ 10.52 ug/ml และในใบต้นจำปาในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตทและเมทานอลโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.51 $\pm$ 1.12 และ 26.43 $\pm$ 1.36 ug/ml ตามลำดับ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าวิธีการสกัดสารในระบบตัวทำละลายที่มีขั้วแตกต่างกัน เป็นวิธีการที่แยกสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี แต่เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาที่ได้รับทุน จึงไม่สามารถวิเคราะห์สารออกฤทธิ์สำคัญได้ ทั้งนี้ในอนาคตก็มีโอกาสที่จะทำการแยกให้บริสุทธิ์ขึ้น รวมถึงวิเคราะห์โครงสร้างของสารที่ออกฤทธิ์ต่อไป

บรรณานุกรม

1. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 1956 Jul 11;3:298-300.
2. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci. 2008 Jun;4(2):89-96.
3. Khuntikeo N, Yongvanit P. Conceptual Framework of Health Policy and Strategies to Administer and Manage Cholangiocarcinoma Systematically and Effectively. SMJ. 2012;27:422-26.
4. ณรงค์ ขันตีแก้ว. Current Concept in Management of Cholangiocarcinoma. ศรีนครินทร์ เวชศาสตร์. 2548;20(3):143-9.
5. Gulcin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Arch Toxicol. 2012;86(3):345-91.
6. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. Anal Methods. 2009;113: 120-1205.
7. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. SJST. 2004;26(2):211-19.
8. สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สวนจิตรลดา. สรรพคุณของพืชสมุนไพร.[โฮมเพจบนอินเตอร์เน็ต]. 2544 [เข้าถึงเมื่อ 17 มิถุนายน 2560]. เข้าถึงได้จาก: http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/index.html
9. MedThai. จำปีสรรพคุณและประโยชน์ของจำปี. [โฮมเพจบนอินเตอร์เน็ต]. 2560 [เข้าถึงเมื่อ 17 มิถุนายน 2560]. เข้าถึงได้จาก: https://medthai.com
10. อาคม ชัยวิระวัฒนะ, เสาวคนธ์ ศุกรโยธิน, อนันต์ กรลักษณ์, ธีรวุฒิ คูหะเปรมะ. แนวทางการตรวจคัดกรองวินิจฉัยและรักษาโรคมะเร็งตับและท่อน้ำดี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2554. หน้า 41-6.

บรรณานุกรม (ต่อ)

11. Rattanasinganchan P, Leelawat K, Treepongkaruna SA, Tocharoentanaphol C, Subwongcharoen S, Suthiphongchai T, et al. Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line (RMCCA-1) from a Thai patient. World J Gastroenterol. 2006;12(40):6500-6.
12. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010;4(8):118-26.
13. Rangasamy O, Raoelison G, Rakotoniriana FE, Cheuk K, Urverg-Ratsimamanga S, Quetin-Leclercq J, et al. Screening for anti-infective properties of several medicinal plants of the Mauritians flora. J Ethnopharmacol. 2007;109(2):331-7.
14. Khan MR, Kihara M, Omoloso AD. Antimicrobial activity of *Michelia champaca*. Fitoterapia. 2002;73(7-8):744-8.
15. Takahashi M, Fuchino H, Satake M, Agatsuma Y, Sekita S. *In vitro* screening of leishmanicidal activity in myanmar timber extracts. Biol Pharm Bull. 2004;27(6):921-5.
16. Yeh YT, Huang JC, Kuo PL, Chen CY. Bioactive constituents from *Michelia champaca*. Nat Prod Commun. 2011;6(9):1251-2.
17. Atjanasuppat K, Wongkham W, Meepowpan P, Kittakoop P, Sobhon P, Bartlett A, et al. *In vitro* screening for anthelmintic and antitumour activity of ethnomedicinal plants from Thailand. J Ethnopharmacol. 2009;123(3):475-82.
18. Noysang C, Mahringer A, Zeino M, Saeed M, Luanratana O, Fricker G, et al. Cytotoxicity and inhibition of P-glycoprotein by selected medicinal plants from Thailand. J Ethnopharmacol. 2014;155(1):633-41.
19. Jarald EE, Joshi SB, Jain DC. Antidiabetic activity of flower buds of *Michelia champaca Linn.* Indian J Pharmacol. 2008;40(6):256-60.
20. Hossain M, Jahangir R, Raquibul Hasan SM, Akter R, Ahmed T, Islam I, et al. Antioxidant, analgesic and cytotoxic activity of *Michelia champaca Linn.* Leaf. Stamford j pharm sci. 2009;2(2):1-7.

บรรณานุกรม (ต่อ)

21. Chiang HM, Chen HC, Lin TJ, Shih IC, Wen KC. *Michelia alba* extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. Food Chem Toxicol. 2012;50(12):4260-9.
22. Wang HM, Lo WL, Huang LY, Wang YD, Chen CY. Chemical constituents from the leaves of *Michelia alba*. Nat Prod Res. 2010;24(5):398-406.
23. Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, et al. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. PLoS Med. 2007;4(7):1141-58.
24. Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. Curr Opin Gastroenterol. 2008;24(3):349-56.
25. Maruyama M, Kobayashi N, Westerman KA, Sakaguchi M, Allain JE, Totsugawa T, et al. Establishment of a highly differentiated immortalized human cholangiocyte cell line with SV40T and hTERT. Transplantation. 2004;77(3):446-51.
26. Swann, W. H. A survey of non-linear optimization techniques. FEBS Lett. 1969;2(Suppl 1):S39-S55.

ภาคผนวก ก

ตัวอย่างการคำนวณ %inhibition

ผลการทดสอบจำปาใน MeOH ครั้งที่ 2 lot1 25/10/59														
[ ]	Blank	Control					BS	Reaction Sample						
mg/ml	OD	OD1	OD2	OD3	OD.average	SD con	OD	OD1	OD2	OD3	OD.average	SD samp	% inhibit average	% inhibit 1
0.1	0	0.495	0.505	0.535	0.5116667	0.0169967	-0.014	0.05	0.026	0.048	0.0413333	0.010873	89.185668	87.491857
0.05	0	0.492	0.503	0.535	0.51	0.0182392	-0.001	0.064	0.068	0.066	0.066	0.001633	86.862745	87.254902
0.025	0	0.481	0.498	0.538	0.5056667	0.0238933	-0.003	0.177	0.178	0.179	0.178	0.0008165	64.205669	64.403428
0.0125	0	0.481	0.494	0.529	0.5013333	0.0202704	-0.035	0.285	0.289	0.313	0.2956667	0.0123648	34.042553	36.170213
0.0063	0	0.476	0.489	0.521	0.4953333	0.0189091	-0.042	0.366	0.346	0.39	0.3673333	0.0179877	17.362046	17.631225

แสดงการคำนวณ การนำค่า OD. มาหา % inhibition โดยใช้สูตร

% inhibition1 = [(0.511667-(0.0413333-(-0.014))/0.511667]x100

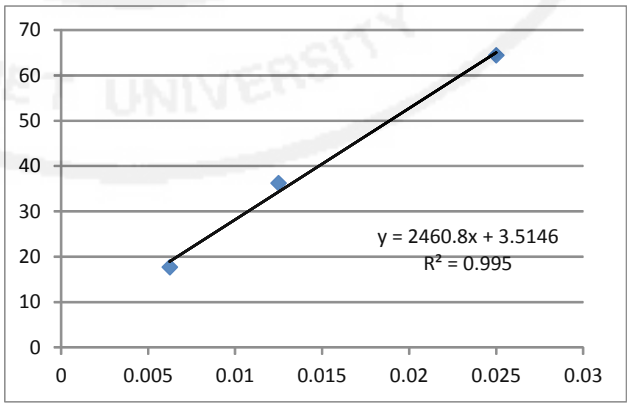
= 89.185

average	sd con	5%
0.511667	0.016997	3.3218
0.51	0.018239	3.5763
0.505667	0.023893	4.7251
0.501333	0.02027	4.0433
0.495333	0.018909	3.8175

average	sd samp	5%
0.0413333	0.010873004	3.950789908
0.066	0.001632993	1.237116032
0.178	0.000816497	6.946530708
0.2956667	0.012364825	6.083759893
0.3673333	0.01798765	0

คุณภาพของข้อมูล โดยกำหนดให้ค่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) ไม่เกิน 5 %

mg/ml	% inhibit
0.025	64.4034278
0.0125	36.1702128
0.00625	17.6312248



แทนค่าในสมการ y = mx + c ได้ค่า IC_{50} = 0.01889

ภาคผนวก ข

ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางศรมน สุทิน

ประวัติการศึกษา กศ.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

วท.ม. (เคมีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

สถานที่ติดต่อ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1124

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-นามสกุล นายกิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ

ประวัติการศึกษา วท.บ. (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วท.ม. (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล

ปร.ด. (ชีวเคมี) มหาวิทยาลัยมหิดล

สถานที่ติดต่อ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1213

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-นามสกุล นางสาวพัชรี ภคกษมา

ประวัติการศึกษา วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยรามคำแหง

วท.ม. (เคมีประยุกต์) มหาวิทยาลัยรามคำแหง

สถานที่ติดต่อ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

โทรศัพท์ 0-2312-6300 ต่อ 1124