

Antioxidant Properties, Total Phenolics and Flavonoids and the Inhibition of Cell Proliferation in Cholangiocarcinoma from Thai Herbals

Kittipat Sopitthummakhun^{1*}, Worrawat Promden² and Panthip Rattanasingchan³

¹Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan Province, Thailand

²Faculty of Education, Buriram Rajabhat University, Buriram Province, Thailand

³Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan Province, Thailand

Abstract

This research studied the biochemical properties of Thai herbal extracts, namely the antioxidant properties, total phenolic and flavonoid contents, and the inhibition of cell proliferation in cholangiocarcinoma. The extracts were prepared by maceration in organic solvents. The ethyl acetate extracts of *Balanophora abbreviata* (BA) and *Dalbergia parviflora* (DP) were found to possess antioxidants against ABTS^{•+} and DPPH[•] and have high contents of total phenolics and flavonoids. The TEAC values for ABTS^{•+} and DPPH[•] of BA ethyl acetate extract were 1.878 ± 0.023 and 1.238 ± 0.066 , respectively, while the total phenolic and flavonoid contents were detected as 500.71 ± 5.84 mg GAE g⁻¹ extract and 353.89 ± 14.7 mg QE g⁻¹ extract, respectively. The TEAC values for ABTS^{•+} and DPPH[•] of DP ethyl acetate extract were 0.892 ± 0.025 and 1.943 ± 0.177 , respectively, while the total phenolic and flavonoid contents were detected to be 362.44 ± 5.95 mg GAE g⁻¹ extract and 685.93 ± 36.19 mg QE g⁻¹ extract, respectively. The methanol extracts of BA, DP, and *Barleria cristata* (BC) exhibited the percent inhibition of cell proliferation in cholangiocarcinoma cell line, RMCCA-1, at 51.21 ± 1.57 , 64.51 ± 0.77 and 40.40 ± 0.58 , respectively. However, the inhibition was not detected in Cholangiocyte cell line, MMNK-1. These studies concluded that the ethyl acetate extracts of BA and DP contain effective antioxidants, a high level of total phenolic and flavonoid contents, and the methanol extracts of BA and DP has the potential to inhibit cell proliferation in Cholangiocarcinoma. This information has the potential to be applied in pharmacological and biomedical research for developing effective cancer chemotherapeutic agents in the future.

Keywords: Antioxidant, Phenolic compounds, Flavonoids, Cholangiocarcinoma

*Corresponding author E-mail address: ksopittha@gmail.com

Received: 2 September 2020

Revised: 3 November 2020

Accepted: 18 November 2020

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจากสมุนไพรไทย

กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ^{1*} วรวัฒน์ พรหมเด่น² และ ปานทิพย์ รัตนศิลป์ภัณฑชาญ³

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

²คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ จังหวัดบุรีรัมย์

³คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของสารสกัดสมุนไพรไทย ประกอบด้วยสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี สารสกัดเตรียมโดยการแช่สมุนไพรในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทของโหราเท้าสุนัข (*Balanophora abbreviate*) และครี (*Dalbergia parviflora*) มีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] และมีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในระดับสูง โดยสารสกัดเอทิลอะซิเตทของโหราเท้าสุนัขมีค่า TEAC ต่อ ABTS^{•+} และ DPPH[•] เท่ากับ 1.878 ± 0.023 และ 1.238 ± 0.066 ตามลำดับ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 500.71 ± 5.84 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัดและ 353.89 ± 14.7 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ สารสกัดเอทิลอะซิเตทของครี มีค่า TEAC ต่อ ABTS^{•+} และ DPPH[•] เท่ากับ 0.892 ± 0.025 และ 1.943 ± 0.177 ตามลำดับ ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เท่ากับ 362.44 ± 5.95 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัดและ 685.93 ± 36.19 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ สารสกัดเมทานอลของโหราเท้าสุนัข ครี และอังกาบ (*Barleria cristata*) ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 โดยมีค่าร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 51.21 ± 1.57 , 64.51 ± 0.77 และ 40.40 ± 0.58 ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่พบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ผลการศึกษาสรุปได้ว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากโหราเท้าสุนัข และครีมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์สูง และสารสกัดเมทานอลของโหราเท้าสุนัขและครี สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยทางเภสัชวิทยาและทางการแพทย์ เพื่อพัฒนาเป็นตัวยาในการรักษาโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพในอนาคต

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ มะเร็งท่อน้ำดี

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: ksopittha@gmail.com

รับบทความ: 2 กันยายน 2563

แก้ไขบทความ: 3 พฤศจิกายน 2563

รับตีพิมพ์บทความ: 18 พฤศจิกายน 2563

บทนำ

ปัจจุบันมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเกี่ยวกับการศึกษาวิจัย และค้นคว้าสารออกฤทธิ์สำคัญจากสมุนไพร โดยเฉพาะการศึกษาด้านเภสัชวิทยาที่จำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการสกัดสารที่มีประสิทธิภาพ การแยกสารให้บริสุทธิ์เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี การทดสอบสมบัติทางชีวเคมี และการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคอย่างมีประสิทธิภาพ การศึกษาสารที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระในสมุนไพรได้รับความสนใจทางเภสัชวิทยาและการแพทย์ เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคร้ายแรงในมนุษย์ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน โรคเบาหวาน โรคไตเรื้อรัง และโรคมะเร็งหลายชนิด⁽¹⁾ สารออกฤทธิ์ที่มีรายงานว่าเป็นส่วนประกอบสำคัญที่พบในสมุนไพร ประกอบด้วย กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งเรียกโดยรวมว่า “สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites)” ที่มีสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจหลายอย่าง ที่สำคัญ คือ การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ และการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง^(2, 3) คณะผู้วิจัยมีความสนใจศึกษาวิจัยสารสกัดที่จะสามารถนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวยารักษาโรคในกลุ่มมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งพบมากในผู้ป่วยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยมีสาเหตุจากความผิดปกติของการแบ่งเซลล์เยื่อบุทางเดินท่อน้ำดี (biliary tract epithelial cell) ที่พัฒนาเปลี่ยนเป็นกลุ่มเซลล์เนื้อร้าย ซึ่งทางการแพทย์แบ่งเป็นสองกลุ่มสำคัญ คือ มะเร็งท่อน้ำดีนอกตับ (extrahepatic CCA) พบประมาณร้อยละ 75 ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีทั้งหมด และมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (intrahepatic CCA) พบประมาณร้อยละ 25 สาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าสัมพันธ์กับการอักเสบ และเชื่อมโยงกับการติดเชื้อพยาธิใบไม้

ในตับ (*Opisthorchis viverrini* และ *Clonorchis sinensis*)⁽⁴⁾ ซึ่งเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมกรรมการบริโภคอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงสุกของผู้คนในจังหวัดแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สำหรับแนวทางการรักษาในปัจจุบันยังคงใช้การผ่าตัดเป็นวิธีการหลัก ร่วมกับการใช้เคมีบำบัด แต่ปัญหาสำคัญของมะเร็งท่อน้ำดีคือวิธีการตรวจวินิจฉัย ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ในระยะแรก ส่วนมากจะพบเมื่อผู้ป่วยมีอาการอยู่ในระยะลุกลาม ทำให้การรักษาด้วยวิธีข้างต้น มีความเสี่ยงและมีอัตราการรอดค่อนข้างต่ำ^(5, 6) ดังนั้นแนวทางสำคัญในการรักษาโรคมะเร็งท่อน้ำดีจึงขึ้นกับหลักการ 2 ข้อคือ ข้อแรกต้องพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัยที่มีความเที่ยงตรง รวดเร็ว และแม่นยำ เพื่อนำไปสู่วิธีกำหนดแนวทางการรักษาอย่างมีประสิทธิภาพ และข้อที่สองคือการพัฒนาตัวยารักษาที่มีเป้าหมายต่อเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะ โดยเกิดอาการข้างเคียงต่อผู้ป่วยน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้

การศึกษาค้นคว้านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากสมุนไพรที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน ด้วยวิธี ABTS และ DPPH scavenging assay ร่วมกับการประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด การวัดปริมาณรวมของสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (total phenolic and flavonoid contents) ที่สัมพันธ์กับการต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ⁽⁷⁾ โดยศึกษาในสมุนไพรที่พบได้ในท้องถิ่นของประเทศไทย ได้แก่ โหระพา (Balanophora abbreviata) อังกาบ (Barleria cristata) แกแล (Maclura cochinchinensis) มะไฟเดือนห้า (Scoparia dulcis) กำแพงเก้าชั้น (Salacia verrucosa) มะเกลือ (Diospyros mollis) ครี (Dalbergia parviflora) กำแพงเจ็ดชั้น (Salacia chinensis) เพชรหึง (Spirolobium cambodianum) มะแขว่น (Zanthoxylum lim-

onella) และคัตเค้า (*Randia horrida*) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีของสารสกัดจากสมุนไพรเหล่านี้ ด้วยวิธี MTT assay โดยคาดว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถนำไปต่อยอดองค์ความรู้ เพื่อพัฒนาเป็นตัวยารักษามะเร็งท่อน้ำดีที่มีประสิทธิภาพและมีผลข้างเคียงต่ำต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากสมุนไพรด้วยการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์

สารสกัดหยาบจากสมุนไพรแต่ละชนิด ได้แก่ โหระพาเต้าสุนัข (*Balanophora abbreviata*) อังกาบ (*Barleria cristata*) แกแล (*Maclura cochinchinensis*) มะไฟเดือนห้า (*Scoparia dulcis*)

กำแพงเก้าซัน (*Salacia verrucosa*) มะเกลือ (*Diospyros mollis*) ครี (*Dalbergia parviflora*) กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis*) เพชรหึง (*Spirolobium cambodianum*) มะแขว่น (*Zanthoxylum limonella*) และคัตเค้า (*Randia horrida*) เตรียมด้วยการแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความมีขั้ว (*solvent polarity*) แตกต่างกัน โดยเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปมาก คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ ส่วนของสมุนไพรที่ใช้ คือ ใบ ก้าน หรือ ดอกสำหรับการสกัดจากพืชแต่ละชนิดสรุปใน Table 1 ลำดับวิธีการเตรียมสารสกัดเริ่มด้วยการนำชิ้นส่วนสมุนไพรแต่ละชนิดล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วจึงนำไปอบให้แห้งในตู้อบ ใช้อุณหภูมิประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำชิ้นส่วนที่แห้งแล้วไปปั่นให้

Table 1 The part of herbal for extraction in organic solvent

Code [#]	Common name (ภาษาไทย)	Scientific name	The part of plant for extraction
BA	โหระพาเต้าสุนัข	<i>Balanophora abbreviata</i>	Cap or Pileus
BC	อังกาบ	<i>Barleria cristata</i>	Stalk and leaf
DM	มะเกลือ	<i>Diospyros mollis</i>	Leaf
DP	ครี	<i>Dalbergia parviflora</i>	Stalk and leaf
MC	แกแล	<i>Maclura cochinchinensis</i>	Leaf
RH	คัตเค้า	<i>Randia horrida</i>	Leaf
SA	เพชรหึง	<i>Spirolobium cambodianum</i>	Stalk and leaf
SC	กำแพงเจ็ดชั้น	<i>Salacia chinensis</i>	Leaf
SD	มะไฟเดือนห้า	<i>Scoparia dulcis</i>	Stalk and leaf
SV	กำแพงเก้าซัน	<i>Salacia verrucose</i>	Leaf
ZL	มะแขว่น	<i>Zanthoxylum limonella</i>	Stalk and leaf

[#]The code indicates the scientific name of herbal in this study.

ละเอียด แล้วนำไปแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน นำไปกรองเพื่อแยกกากด้วยกระดาษกรอง Whatman no.1 แล้วนำไประเหยแห้งเพื่อแยกตัวทำละลายส่วนเกินออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ในขั้นตอนสุดท้ายเก็บรักษาสารสกัดหยาบที่แห้งสนิทใน microtube ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

2. การวัดการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธี ABTS และ DPPH scavenging assay

ABTS scavenging assay ทดสอบด้วยการนำสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดมาทำปฏิกิริยากับ 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ซึ่งอยู่ในรูปอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ โดยใช้หลักการวัดการหายไปของอนุมูลอิสระ ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร⁽⁸⁾ วัดปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยใช้ความเข้มข้นของ $ABTS^{\bullet+}$ เท่ากับ 66 ไมโครโมลาร์ บ่มปฏิกิริยา (incubate) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

DPPH scavenging assay ทดสอบด้วยการนำสารสกัดจากสมุนไพรแต่ละชนิดมาทำปฏิกิริยากับ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งอยู่ในรูปอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ โดยใช้หลักการวัดการหายไปของอนุมูลอิสระ ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร⁽⁹⁾ วัดปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระในตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยใช้ความเข้มข้นของ $DPPH^{\bullet}$ เท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

วิธีคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้ง (%inhibition) อนุมูลอิสระแสดงใน “Equation 1” โดยนำมาใช้เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ร้อยละห้าสิบ (inhibitory concentration at 50%, IC_{50}) แสดงใน “Equation 2” การศึกษานี้เปรียบเทียบค่า Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) โดยใช้สัดส่วนระหว่างค่า IC_{50} ของ Trolox ต่อ IC_{50} ของสารสกัดสมุนไพร (หรือ IC_{50} ของ ascorbic acid ที่ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานในการเปรียบเทียบ) โดยแสดงความสัมพันธ์ใน “Equation 3”

Equation 1

$$\text{ค่าร้อยละการยับยั้ง (\%inhibition)} = 100 - [(A_0/A_s) \times 100\%]$$

เมื่อค่า A_0 คือค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุมูลอิสระ ($ABTS^{\bullet+}$ หรือ $DPPH^{\bullet}$) และ A_s คือค่าการดูดกลืนแสงของสารอนุมูลอิสระที่ผสมกับสารสกัดจากสมุนไพร หรือ สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (ในการทดลองนี้ คือ Trolox หรือ ascorbic acid)

Equation 2

$$Y = mX + C \text{ (สมการเส้นตรง)}$$

กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง “ค่าร้อยละการยับยั้ง (แกน X)” และความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพร (หรือความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Trolox) (แกน Y) ในหน่วย ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า C แสดงจุดตัดแกน Y ค่า IC_{50} ได้จากการแทนค่า $Y = 50$ จากนั้นคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัด ณ จุดนี้

Equation 3

$$TEAC = \text{ค่า } IC_{50} \text{ ของ Trolox} / \text{ค่า } IC_{50} \text{ ของสารสกัดจากสมุนไพร (หรือ ascorbic acid)}$$

3. การวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์

การวัดปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก อ้างอิงตาม Ainsworth EA และ Gillespie KM (2007)⁽¹⁰⁾ วิธีการโดยย่อคือ วัดการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารประกอบฟีนอลิกของสารตัวอย่างกับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร⁽¹¹⁾ การรายงานค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกจากสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด หาได้จากการคำนวณค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) ที่ใช้เป็นสารฟีนอลิกมาตรฐาน โดยรายงานในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE g⁻¹ extract)

การวัดปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์ อ้างอิงตาม Zhishen J, และคณะ 1999⁽¹²⁾ วิธีการโดยย่อคือ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารประกอบฟลาโวนอยด์กับสารละลายที่ประกอบด้วย โซเดียมไนไตรท์ (NaNO₂) และ อะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl₃) ซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร การรายงานค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์จากสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด หาได้จากการคำนวณค่าเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอเซติน (quercetin) ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์มาตรฐาน โดยรายงานในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลย์เคอเซตินต่อกรัมสารสกัด (mg QE g⁻¹ extract)

4. การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำดี ชนิด RMCCA-1 ด้วยสารสกัดสมุนไพร

เซลล์มะเร็งต่อมน้ำดีชนิด RMCCA-1 และ เซลล์ต่อมน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ถูกนำมาเพาะเลี้ยงใน HAM-F12 ที่มี fetal bovine serum ร้อยละ 10 และ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่มี fetal bovine serum ร้อยละ 5

ตามลำดับ⁽¹³⁾ จำนวน 5,000 เซลล์ต่อหลุม บนถาด 96 หลุม จากนั้นนำมาทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายควบคุม (solvent control) จากนั้นนำเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัดไปเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดอัตราการรอดของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT⁽¹⁴⁾ โดยมีหลักการในการเปลี่ยนสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ให้เป็นผลึกฟอร์มาซาน (formazan crystal) เร่งปฏิกิริยาด้วย เอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase จากเซลล์ที่มีชีวิต จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกแล้วจึงนำผลึกฟอร์มาซาน ไปละลายใน DMSO (dimethyl sulfoxide) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำสารละลายฟอร์มาซาน ที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

5. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

การวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใช้วิธีการ One-way ANOVA ($p < 0.05$), ด้วย Data analysis function ในโปรแกรม Microsoft Excel (Microsoft Office 365)

ผลการวิจัย

1. ค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของสารสกัดสมุนไพร

กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน สำหรับเปรียบเทียบค่า TEAC กับสารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่างๆ โดย TEAC ของกรดแอสคอร์บิกต่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] มีค่าเท่ากับ 1.083 ± 0.002 และ 1.217 ± 0.170 ตามลำดับ (Table 2) เมื่อเปรียบเทียบค่า TEAC ของสารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ พบสารสกัด

Table 2 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) unit of ascorbic acid against ABTS and DPPH radicals

Standard antioxidant agent	TEAC**	
	ABTS	DPPH
Ascorbic acid	1.083 ± 0.002	1.217 ± 0.170

**The average values are from triplicate experiments, with standard deviation (SD)

จากสมุนไพรสองชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] มากกว่าร้อยละ 80 ของค่า TEAC ที่ได้จากกรดแอสคอร์บิก คือ โหระพาสุ่ม (BA) มีค่า TEAC ต่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] เท่ากับ 1.878 ± 0.023 และ 1.238 ± 0.066 ตามลำดับ และครี (DP) มีค่า TEAC ต่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] เท่ากับ 0.892 ± 0.025 และ 1.943 ± 0.177 ตามลำดับ นอกจากนี้พบสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} อย่างเดียว คือ สารสกัดเมทานอล และเอทิลอะซิเตทจากแกลด (MC) มีค่า TEAC เท่ากับ 0.927 ± 0.050 และ 1.043 ± 0.073 ตามลำดับ และสารสกัดเอทิลอะซิเตท จากมะไฟเดือนห้า (SD) มีค่า TEAC เท่ากับ 0.830 ± 0.119 (Table 3)

2. ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

ปริมาณรวมที่สูงของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดสมุนไพรซึ่งสัมพันธ์และสอดคล้องกับความสามารถสูงในการต้านอนุมูลอิสระ สรุปใน Table 3 (โดยใช้เกณฑ์ในการพิจารณาจากค่า TEAC ต่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•]) คือ สารสกัดเอทิลอะซิเตทของโหระพาสุ่ม (BA) มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและ

ฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 500.71 ± 5.84 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัด และ 353.89 ± 14.7 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ และสารสกัดเอทิลอะซิเตทของครี (DP) มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 362.44 ± 5.95 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัดและ 685.93 ± 36.19 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดพบในสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากแกลด คือมีปริมาณเท่ากับ 604.97 ± 26.15 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัด (ซึ่งมีค่า TEAC ต่อการต้านอนุมูลอิสระที่ดีเฉพาะ ABTS^{•+}) ปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์สูงสุดพบในสารสกัดเมทานอลและเอทิลอะซิเตทของเพชรหึง (SA) เท่ากับ 903.89 ± 15.71 และ 864.23 ± 39.28 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ โดยมีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] ที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับ ABTS^{•+} (Table 3)

3. การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ชนิด RMCCA-1

ผลทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 พบว่าสารสกัดเมทานอลของ โหระพาสุ่ม (BA) อังกาบ (BC) มะเกลือ (DM) ครี (DP) แกลด (MC) และมะไฟเดือนห้า (SD) และสารสกัดเอทิลอะซิเตทของ

Table 3 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) unit against ABTS and DPPH radicals and total phenolic and flavonoid contents in each plant extract

Plant list	Extraction solvent [§]	TEAC**		Total phenolics** mg GAE g ⁻¹ extract	Total flavonoids** mg QE g ⁻¹ extract
		ABTS	DPPH		
โหระพาสุ่ม	MeOH	0.204 ± 0.014	0.082 ± 0.003	82.72 ± 0.95	170.23 ± 7.73
<i>B. abbreviata</i> (BA)	EtOAc	1.878 ± 0.023	1.238 ± 0.066	500.71 ± 5.84	353.89 ± 14.7
อังกาบ	MeOH	0.130 ± 0.007	0.057 ± 0.001	55.08 ± 1.25	141.94 ± 2.95
<i>B. cristata</i> (BC)	EtOAc	0.090 ± 0.004	0.031 ± 0.001	62.28 ± 2.15	170.72 ± 10.64
มะเกลือ	MeOH	0.161 ± 0.013	0.077 ± 0.006	64.2 ± 1.66	177.13 ± 10.16
<i>D. mollis</i> (DM)	EtOAc	0.217 ± 0.008	0.071 ± 0.003	81.08 ± 2.8	303.25 ± 13.48
ครุ	MeOH	0.613 ± 0.045	0.097 ± 0.008	273.55 ± 10.74	576.11 ± 30.12
<i>D. parviflora</i> (DP)	EtOAc	0.892 ± 0.025	1.943 ± 0.177	362.44 ± 5.95	685.93 ± 36.19
แกแล	MeOH	0.927 ± 0.050	0.278 ± 0.023	517.72 ± 7.78	659.18 ± 31.43
<i>M. cochinchinensis</i> (MC)	EtOAc	1.043 ± 0.073	0.484 ± 0.076	604.97 ± 26.15	524.64 ± 28.87
คัตเค้า	MeOH	0.324 ± 0.039	0.240 ± 0.012	203.71 ± 3.8	509.04 ± 31.94
<i>R. horrida</i> (RH)	EtOAc	0.195 ± 0.013	0.189 ± 0.016	144.93 ± 4.65	409.98 ± 16.64
เพชรหึง	MeOH	0.657 ± 0.101	0.825 ± 0.076	474.65 ± 2.97	903.89 ± 15.71
<i>S. cambodianum</i> (SA)	EtOAc	0.765 ± 0.055	0.599 ± 0.016	389.05 ± 18.53	864.23 ± 39.28
กำแพงเจ็ดชั้น	MeOH	0.401 ± 0.034	0.563 ± 0.012	358.05 ± 19.17	757.3 ± 41.71
<i>S. chinensis</i> (SC)	EtOAc	0.262 ± 0.014	0.036 ± 0.003	42.67 ± 3.41	338.09 ± 20.95
มะไฟเดือนห้า	MeOH	0.500 ± 0.028	0.962 ± 0.072	331.71 ± 1.26	274.62 ± 17.78
<i>S. dulcis</i> (SD)	EtOAc	0.830 ± 0.119	0.309 ± 0.026	152.54 ± 3.09	223.19 ± 13.37
กำแพงเก้าชั้น	MeOH	0.135 ± 0.001	0.076 ± 0.006	83.41 ± 1.21	218.8 ± 6.61
<i>S. verrucosa</i> (SV)	EtOAc	0.014 ± 0.002	0.059 ± 0.001	58.99 ± 3.44	242.51 ± 6.05
มะแขว่น	MeOH	0.364 ± 0.003	0.085 ± 0.005	160.16 ± 1.54	306.87 ± 15.3
<i>Z. limonella</i> (ZL)	EtOAc	0.193 ± 0.008	0.047 ± 0.003	96.37 ± 1.91	245.9 ± 15.59

[§] The abbreviation of extraction solvent; MeOH (methanol), EtOAc (ethyl acetate)

**The average values are in the triplicate experiments with standard deviation (SD)

มะเกลือ มีค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ RMCCA-1 มากกว่าร้อยละ 40 โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับเมทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายควบคุม (Fig. 1) นอกจากนี้ ผลเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติ MMNK-1 พบว่าสารสกัดเมทานอลของสมุนไพรโหราเท้าสุนัข (BA) อังกาบ (BC) และครี (DP) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 โดยมีร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 51.21 ± 1.57 , 40.40 ± 0.58 และ 64.51 ± 0.77 ตามลำดับ (Fig. 2) โดยไม่ส่งผลกระทบต่อ การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ($p < 0.05$) ในทางตรงกันข้ามพบว่าสารสกัดเมทานอลและสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากมะเกลือ

(DM) และสารสกัดเมทานอล จากแกแล (MC) และมะไฟเดือนห้า (SD) กลับมีค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ท่อน้ำดีปกติมากกว่าของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Fig. 2)

วิจารณ์และสรุป

จากผลการทดลองโดยพิจารณาเปรียบเทียบค่า TEAC ของกรดแอสคอร์บิก (สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน) พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระทั้ง ABTS^{•+} และ DPPH[•] ที่ดีที่สุดในการทดลองนี้ ได้แก่ สารสกัดเอทิลอะซิเตทของโหราเท้าสุนัข (BA) และครี (DP) ซึ่งมีค่าการต้านอนุมูลอิสระในหน่วยของ TEAC มากกว่าร้อยละ 80 ของค่าที่เทียบกับกรดแอสคอร์บิก (Table 2 และ 3) ในภาพรวมพบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิด

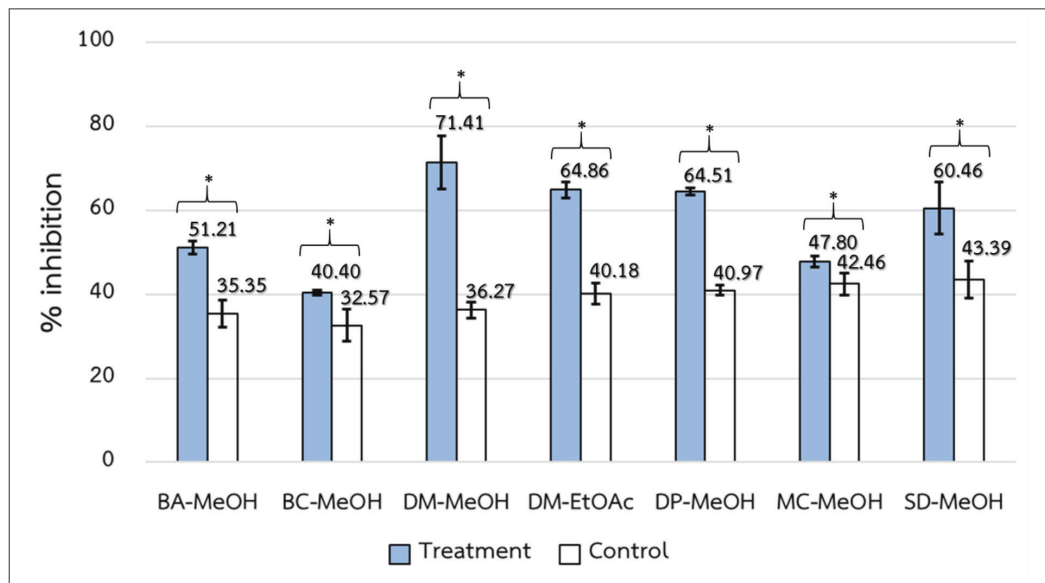


Fig. 1 Percent inhibition (%) of cell proliferation in RMCCA-1 using herbal extracts in 48 hours incubation. Treatment is defined as the incubation of 50 $\mu\text{g/mL}$ herbal extracts and RMCCA-1; control is defined as the incubation of extraction solvent (methanol) and RMCCA-1.

*The data are shown the significant difference at $p < 0.05$ (One-way ANOVA)

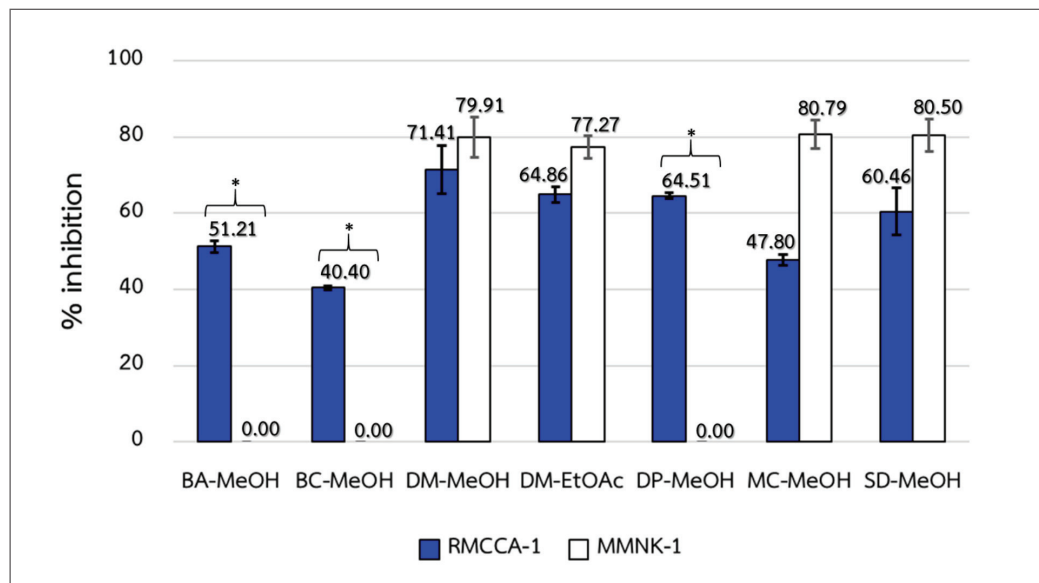


Fig. 2 The comparison between the percent inhibition (%) of cell proliferation in RMCCA-1 and MMNK-1 after 48 hours incubation with 50 µg/mL herbal extracts.

*The data are shown the significant difference at $p < 0.05$ (One-way ANOVA).

มีค่าการต้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับปริมาณรวมในระดับที่สูงของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ สอดคล้องกับผลการศึกษาในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ในสมุนไพรชนิดอื่น⁽¹⁵⁾ และแม้ว่าสารสกัดเอทิลอะซิเตทจากแกแล (MC) จะไม่ได้มีค่าการต้านอนุมูลอิสระต่อ DPPH[•] ที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับโหราเท้าสุนัขและครี แต่ก็มีค่า TEAC ต่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ที่สูง (1.043 ± 0.073) ซึ่งมีความสอดคล้องไปในแนวโน้มนเดียวกับค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (604.97 ± 26.15 มิลลิกรัม GAE ต่อกรัมสารสกัด) และฟลาโวนอยด์ (524.64 ± 28.87 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด) ในระดับที่สูงเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบมีแนวโน้มนคล้ายกันในสารสกัดเมทานอลจากเพชรหึง (SA) คือมีปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงสุดเท่ากับ 903.89 ± 15.71 มิลลิกรัม QE ต่อกรัมสารสกัด และมีค่า TEAC ต่ออนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] เท่ากับ 0.657 ± 0.101

และ 0.825 ± 0.076 ตามลำดับ (Table 3)

ความสามารถในการละลายของสารสกัดสมุนไพรในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นข้อจำกัดสำหรับการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่อ่อนแอ ทำให้ไม่สามารถทดสอบสารสกัดได้ครบทุกชนิดเนื่องจากสารสกัดจากสมุนไพรที่เตรียมได้ทั้งหมดละลายได้น้อยมากในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือในตัวทำละลาย DMSO ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งพบว่าละลายสารสกัดสมุนไพรได้ดี และไม่มีปัญหาเรื่องการตกตะกอนเมื่อเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อในขั้นตอนการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งใน Fig. 1 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่อ่อนแอชนิด RMCCA-1 ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสภาวะควบคุมที่ใช้ตัว

ทำลายเมทานอล ($p < 0.05$) ปริมาณเมทานอลที่ใช้เป็นตัวทำลายจึงไม่มีผลโดยตรงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 นอกจากนี้สารสกัดจากสมุนไพรที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ดี ควรจะมีผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติที่น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 (Fig. 2) ผลการทดสอบเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากพบว่าสารสกัดจากโหราเท้าสุนัข (BA) อังกาบ (BC) และครี (DP) ในตัวทำลายเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี RMCCA-1 เท่านั้น ($p < 0.05$) โดยไม่พบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 สารสกัดเหล่านี้จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากโหราเท้าสุนัข (BA) และครี (DP) ในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] ได้ดี เมื่อหาค่าความแตกต่างระหว่าง ค่า TEAC เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน กรดแอสคอร์บิก และมีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในระดับที่สูง ซึ่งสัมพันธ์กับค่าการต้านอนุมูลอิสระสูง ดังนั้นโหราเท้าสุนัขและครีจึงเป็นสมุนไพรที่น่าศึกษาต่อไป เพราะนอกจากมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้วยังมีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยไม่ส่งผลต่อเซลล์ท่อน้ำดีปกติ

สารสกัดจากสมุนไพรในการวิจัยครั้งนี้เตรียมด้วยวิธีแช่ในตัวทำลายอินทรีย์ที่มีระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ซึ่งเป็นวิธีแยกสารให้บริสุทธิ์ได้ในระดับหนึ่ง (partial purification) พบว่าสารออกฤทธิ์ที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สูง และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง พบได้ในการสกัดด้วยตัวทำลายเอทิลอะซิเตท และเมทานอล ซึ่งสอดคล้อง

เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาสมุนไพรชนิดอื่นที่ใช้ระบบตัวทำลายที่มีขั้วแตกต่างกันในขั้นตอนการเตรียมสารสกัด เช่น การสกัดสารจาก *Origanum minutiflorum* (พืชสมุนไพรที่มีลักษณะเป็นพุ่ม นำมาใช้ทำเป็นชาสำหรับดื่ม พบได้ในประเทศแถบยุโรปและอเมริกาทางตอนเหนือ) ด้วยตัวทำลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล (n-butanol) พบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} และ DPPH[•] และมีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกที่สูง จากตัวทำลายเอทิลอะซิเตท และบิวทานอล⁽¹⁶⁾ การศึกษาสารสกัดจาก *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) (Oregano เป็นพืชในกลุ่มมินต์ มีกลิ่นเฉพาะตัว พบได้ในประเทศในฝั่งยุโรปที่ใกล้แถบศูนย์สูตร และแถบเมดิเตอร์เรเนียน) ที่สกัดด้วยตัวทำลายเอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน ก็ได้รายงานว่าค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] อนุมูลอิสระในระบบ FRAP (ferric reducing antioxidant power) และอนุมูลอิสระ superoxide (O₂^{-•}) พบในระบบตัวทำลายที่เป็น น้ำ เมทานอล และเอทิลอะซิเตท อีกทั้งยังมีค่าปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในระดับที่สูง นอกจากนี้ยังมีรายงานการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง HeLa จากสารสกัดในตัวทำลายเอทิลอะซิเตท⁽¹⁷⁾ สารสกัดจากใบต้นชิงเฮา (ในประเทศไทยเรียกว่า ต้นโกฐจุฬาลัมพา) ที่สกัดด้วยตัวทำลายน้ำและเมทานอล (อัตราส่วน 20:80) พบว่ามีค่าการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} อนุมูลอิสระในระบบ CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) มีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่สูง อีกทั้งยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง DLD-1 (human colon adenocarcinoma) และ ECC-1 (human endometrium carcinoma)⁽¹⁸⁾ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสารออกฤทธิ์สำคัญจากสมุนไพรทั้งสองชนิดพบได้จากการสกัดด้วยตัวทำ

ละลายที่มีสมบัติมีขี้ (เมทานอล และเอทิลอะซิเตท มีความเป็นขี้มากกว่าเฮกเซน) ข้อมูลที่ได้เหล่านี้ จะนำไปสู่การค้นคว้า พัฒนาวิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพ และการแยกองค์ประกอบในสารสกัดของสมุนไพร เหล่านี้ รวมทั้งการศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพใน เบื้องลึกเพื่อการพัฒนาเป็นตัวยาในการรักษาโรคมะเร็งในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อุทัยวรรณ โตะทอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมี และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีระชัย ทิตถากร วิทยาลัยแพทยศาสตร์นานาชาติจุฬาภรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Liguori I, Russo G, Curcio F, *et al.* Oxidative stress, aging and disease. *Clin Interv Aging* 2018; 13: 757-77.
- Sudha P, Zinjarde SS, Bhargava SY, Kumar AR. Potent α -amylase inhibitory activity of Indian ayurvedic medicinal plants. *BMC Complem Altern M* 2011; 11: 1-10.
- Lindsay DG, Astley SB. European research on the functional effects of dietary antioxidants—EUROFEDA. *Mol Aspects Med* 2002; 23: 1-38.
- Thongprasert S. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol* 2005; 16 Suppl 2; ii93-6.
- Sripa B, Parojkul C. Cholangiocarcinoma: Lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol* 2014; 24: 349-56.
- Treeprasertsuk S, Poovorawan K, Soonthornworasiri N, *et al.* A significant cancer burden and high mortality of intrahepatic cholangiocarcinoma in Thailand: a nationwide database study. *BMC Gastroenterology* 2017; 17: 1-7.
- Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 1997; 2: 152-9.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1231-37.
- Jinlun X, Schaich KM. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 4251-60.
- Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* 2007; 2: 875-7.
- Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. The Folin-Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal Methods* 2013; 21: 5990-9.

12. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 1999; 64: 555-9.
13. Rattanasinganchan P, Leelawat K, Treepongkaruna S, *et al.* Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line (RMCCA-1) from a Thai patient. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6500-6.
14. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* 2012; 114: 785-96.
15. Shi P, Du W, Wang Y, Teng X, Chen X, Ye L. Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of bulbs, leaves, and flowers made from *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. *Food Sci Nutr* 2019; 7: 148-54.
16. Elmastas M, Celik SM, Genc N, Aksit H, Erenler R, Gulcin I. Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea — *Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites. *Int J Food Prop* 2018; 21: 374-84.
17. Koldas S, Demirtas I, Ozen T, Demirci MA, Behcet L. Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *J Sci Food Agric* 2015; 95: 786-98.
18. Koyuncu I. Evaluation of anticancer, antioxidant activity and phenolic compounds of *Artemisia absinthium* L. extract. *Cell Mol Biol* 2018; 64: 25-34.