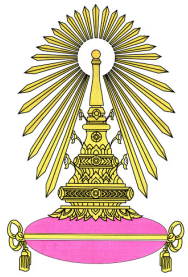


โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	ผลของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	จิรภัทร ลาภมหาประเสริฐ
เลขประจำตัวนิสิต	6032105223
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก

นาย จิรภัทร ลาภมหาประเสริฐ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

Effect of crude extract from Sacred Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) and Waterlily (*Nymphaea nouchali* Burm. f.) leaves on growth of cervical cancer cells

Mr. Jirapat Larpmahaprasert

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Bachelor of Science in Botany

Department of Botany

Faculty of Science, Chulalongkorn University

Academic Year 2020

ชื่อเรื่อง	ผลของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	จิรภัทร ลาภมหาประเสริฐ
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร พ่วงปาน)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ผลของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก
ชื่อนิสิต	จิรภัทร ลาภมหาประเสริฐ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2563

บทคัดย่อ

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) มีสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่มีประโยชน์ และสารสกัดหยาบซึ่งสกัดด้วยน้ำจากใบบัวหลวงยังมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งเมื่อทดสอบในเซลล์มะเร็งเต้านม นอกจากนี้มีรายงานว่าใบบัวเผื่อน (*Nymphaea nouchali* Burm. f.) มีสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่มีประโยชน์ เช่น สารฟีนอลิก แอลคาลอยด์ และแทนนิน ซึ่งอาจมีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งเช่นเดียวกัน งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาฤทธิ์การยับยั้งมะเร็งของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนในเซลล์มะเร็งปากมดลูก ซึ่งเป็นมะเร็งที่พบได้มากในสตรีเป็นอันดับที่สี่ของโลก โดยใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa และ C33a ซึ่งอาจมีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งเช่นเดียวกัน ผลการศึกษาพบว่า ร้อยละผลได้ของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนต่อน้ำหนักแห้งคิดเป็น 6.50% และ 13.25% ตามลำดับ ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนคิดเป็น 112.26±14.60 และ 19.41±6.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และค่าความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนที่ทำให้เซลล์ตายของเซลล์ SiHa เท่ากับ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 6.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนค่าความเข้มข้นครึ่งหนึ่งที่ทำให้เซลล์ตายของสารสกัดหยาบจากใบบัวเผื่อนที่ทดสอบกับเซลล์ C33a มีค่าเท่ากับ 1.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าดีกว่าที่เคยมีการทดลองไว้ในเซลล์มะเร็งเต้านมยกเว้นในการทดสอบสารสกัดหยาบจากใบบัวเผื่อนกับเซลล์ SiHa และไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงกับการมีชีวิตของเซลล์ ผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบทั้งสองชนิดอาจสามารถถูกนำไปพัฒนาเพื่อเป็นการรักษาทางเลือกในการรักษามะเร็งปากมดลูกต่อไปได้

Title	Effect of crude extract from Sacred Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) and Waterlily (*Nymphaea nouchali* Burm. f.) leaves on growth of cervical cancer cells
Student name	Jirapat Larpmahaprasert
Department	Botany
Program	Botany
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Sehanat Prasongsuk
Co-Advisor	Assoc. Prof. Dr. Rachaneekorn Tammachote
Academic year	2020

Abstract

Sacred Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) contains beneficial secondary metabolites and crude extract from Lotus leaves also has anti-cancer activity on breast cancer cells. Additionally, there are some researches indicate that Waterlily (*Nymphaea nouchali* Burm. f.), also contains many secondary metabolites including phenolic compounds alkaloids and tannins, which may has anti-cancer activity too. This research focuses on studying anti-cancer activity of crude extract of Lotus and Waterlily leaves on cervical cancer, the fourth most found cancer cases in woman, using SiHa and C33a cervical cancer cell. The results showed that percent yield of crude extract of Lotus and Waterlily leaves was 6.50% and 13.25% respactively. Phenolic compound in crude extract of Lotus and Waterlily was 112.26±14.60 mg/g and 19.41±6.29 mg/g respectively which were significantly different at the statistical level of 0.05. LC_{50} Value of Lotus and Waterlily crude extracts on SiHa were 0.39 mg/ml and 6.31 mg/ml respectively and on C33a were 1.19 mg/ml for Waterlily crude extract which is better than the test on breast cancer cells except in the experiment which Waterlily crude extract where tested in SiHa cell and there is no statistical relationship between Lotus crude extract and C33a cell viability. The results from this research revealed that crude extracts of both plants leaves can be further developed as alternative treatment for cervical cancer in the future.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดีจะต้องขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนีกร ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และอาจารย์ ดร วิชาณี แบนคีรี ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการทำโครงการ แนะนำวิธีการปฏิบัติการ และเป็นกำลังใจให้ตลอดการทำการทดลอง นอกจากนี้ยังต้องขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศศิธร พ่วงปาน กรรมการตรวจสอบรายงาน ที่คอยให้คำแนะนำและตรวจสอบความถูกต้องของรายงานฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ และขอการขอบพระคุณความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต ที่เมตตาให้ตัวอย่างเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ใช้ในการทดลองนี้ และอาจารย์ในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยให้เกิดโครงงานวิทยานี้เกิดขึ้นและสำเร็จได้

ขอขอบพระคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณหน่วยวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืชและหน่วยวิจัยห้องมนุษยพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนอุปกรณ์และสถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในโครงงานนี้

ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ ในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครอบครัว และญาติพี่น้องที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดการทำโครงงาน

สารบัญ

เรื่อง	**หน้า**
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. การตรวจสอบเอกสาร	3
3. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการศึกษา	8
4. ผลการทดลอง	11
5. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	14
รายการเอกสารอ้างอิง	16
ภาคผนวก	21

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ 4
ภาพที่ 2.2 ตัวอย่างสารแอลคสลอยด์ถูกพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง 4
ภาพที่ 2.3 ตัวอย่างสารแอลคาลอยด์ชนิดต่าง ๆ 5
ภาพที่ 4.1 ร้อยละผลได้ของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อน 11
ภาพที่ 4.2 ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อน 11
ภาพที่ 4.3 ผลของสารสกัดจากใบบัวหลวงต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa 12
ภาพที่ 4.4 ผลของสารสกัดจากใบบัวเผื่อนต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa 12
ภาพที่ 4.5 ผลของสารสกัดจากใบบัวหลวงการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a 13
ภาพที่ 4.6 ผลของสารสกัดจากใบบัวเผื่อนต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a 13
ภาพที่ 5.1 กราฟสารละลายมาตรฐาน gallic acid 21

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญ

บัวหลวง (*Nelumbo nucifer*a Gaertn.) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Nelumbonaceae เป็นไม้ล้มลุกที่ลำต้นใต้ดินอยู่ใต้น้ำ สามารถพบได้ทั่วไปในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ บัวหลวงมีประโยชน์มากทั้งในด้านการเป็นไม้ประดับและการเป็นอาหารโดยมีดอกที่สวยงามและมีเมล็ดและลำต้นที่ใช้บริโภคได้ (Sheikh, 2014) นอกจากนี้ยังมีการใช้ส่วนต่าง ๆ ของบัวหลวง เช่น ใบ ดอก และลำต้น เป็นสมุนไพรที่ช่วยรักษาโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็ง โรคหัวใจ และโรคท้องร่วง เป็นต้น (Duke, Bogenschutz-Godwin and du Cellier, 2002) โดยสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่พบในบัวหลวงมีได้หลายชนิด เช่น แอลคาลอยด์, ฟลาโวนอยด์ และไกลโคไซด์ เป็นต้น (Mukherjee et al., 2009) ตัวอย่างประโยชน์ของสารประเภทแอลคาลอยด์ที่พบ เช่น (+)-1(R)-coclaurine และ (–)-1(S)-norcoclaurine และสารฟลาโวนอยด์ที่พบ เช่น quercetin 3-O-β-d-glucuronide นั้นมีความสามารถในการต้านเชื้อ HIV ได้ (Kashiwada et al., 2005)

ใบเป็นส่วนที่น่าสนใจของบัวหลวงเป็นเนื่องจากเป็นส่วนที่ไม่ได้ถูกใช้บริโภคอย่างแพร่หลายเท่ากับลำต้นหรือเมล็ด หรือมีคุณค่าทางด้านไม้ประดับเท่าดอก ทำให้เป็นส่วนที่สามารถเพิ่มคุณค่าได้มาก สารสกัดหยาบจากใบของบัวหลวงมีคุณสมบัติหลายอย่าง เช่น มีฤทธิ์ต้านความอ้วน (Ono et al., 2006) โดยมีสารที่สามารถยับยั้งได้ทั้งเอนไซม์ pancreatic lipase เช่น trans-N-coumaroyltyramine และยับยั้งการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ไขมัน เช่น liriodenine (Ahn et al., 2013) นอกจากนี้สารสกัดที่มีสารจำพวกฟลาโวนอยด์ในปริมาณมากยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 โดยวัฏจักรของเซลล์จะถูกหยุดไว้ที่ระยะ G_0/G_1 (Yang et al., 2011) สารสกัดจากใบบัวหลวงนั้นมีส่วนประกอบของสารต่าง ๆ หลายประเภทที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง เช่น neferin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ได้ (Poornima Weng, C. F., and Padma, V. V., 2014) สาร nuciferin ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งปอด A549 ที่ถูกเลี้ยงโดยใส่สารนิโคตินลงไปด้วย (Liu et al., 2015) ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอกได้หลายประเภท เช่น เซลล์ประสาท SH-SY5Y และ เซลล์มะเร็งในหนู CT26 เป็นต้น (Qi et al., 2016)

บัวเผื่อน (*Nymphaea nouchali* Burm. f.) เป็นพืชน้ำที่อยู่ในวงศ์ Nympheaceae มีชื่อพ้องว่า *Nymphaea stellata* Willd. ซึ่งในบางแหล่งข้อมูลจะถือว่าทั้งสองชื่อเป็นพืชคนละชนิดกัน โดยเนื่องจากลักษณะที่คล้ายคลึงกัน รวมถึงสารภายในซึ่งมีปริมาณและชนิดของสารที่ใกล้เคียงกัน (Raja et al., 2010) โครงงานนี้จึงพิจารณาว่า *Nymphaea stellata* Willd. เป็นชื่อพ้องของ *Nymphaea nouchali* Burm. f. มีการค้นพบว่าสารสกัดจากใบจากบัวเผื่อนมีสารฟีนอลิกอยู่จึงทำให้เป็นที่น่าสนใจต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังมีสารประเภทคาร์โบไฮเดรต แอลคาลอยด์ และแทนนิน อีกด้วย (Lakshmi et al., 2014) เช่นเดียวกับจากใบบัวหลวงที่มีสารฟีนอลิกอยู่เป็นจำนวนมากก็ประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมเช่นกัน (Chang et al., 2016) โดยสารสกัดหยาบสามารถหยุดวัฏจักรของเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 (Yang et al., 2011)

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) เป็นมะเร็งที่พบได้มากในสตรีเป็นอันดับที่สี่ของโลก โดยในปี 2018 มีผู้ป่วยเพิ่มขึ้นประมาณ 528,475 ราย และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 268,224 ราย (Ferlay et al., 2020 :

online) ในประเทศไทยมะเร็งปากมดลูกเป็นเป็นสาเหตุการตายรวมถึงพบได้มากที่สุดเป็นอันดับสองในสตรีช่วงอายุ 15-44 ปี (Bruni et al., 2019) โดยสาเหตุหลักของมะเร็งชนิดนี้มาจากเชื้อไวรัส ไวรัสฮิวแมนแพพพิลโลมา (HPV) ที่ก่อให้เกิดมะเร็งได้ (Schiffman et al., 2007)

งานวิจัยนี้จะมุ่งความสนใจไปที่ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยสารสกัดหยาบจากใบของบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) และบัวเผื่อน (*Nymphaea nouchali* Burm. f.) โดยเลือกทดสอบกับเซลล์ SiHa และ C33a โดยคาดการณ์ว่าสารสกัดหยาบของใบของทั้งสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวอียิปต์จะมีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้

1.2. วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) และใบบัวเผื่อน (*Nymphaea nouchali* Burm. f.) ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33a

1.3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เพิ่มคุณค่าในด้านการแพทย์ให้กับใบของบัวหลวงและบัวเผื่อน

บทที่ 2

การตรวจสอบเอกสาร

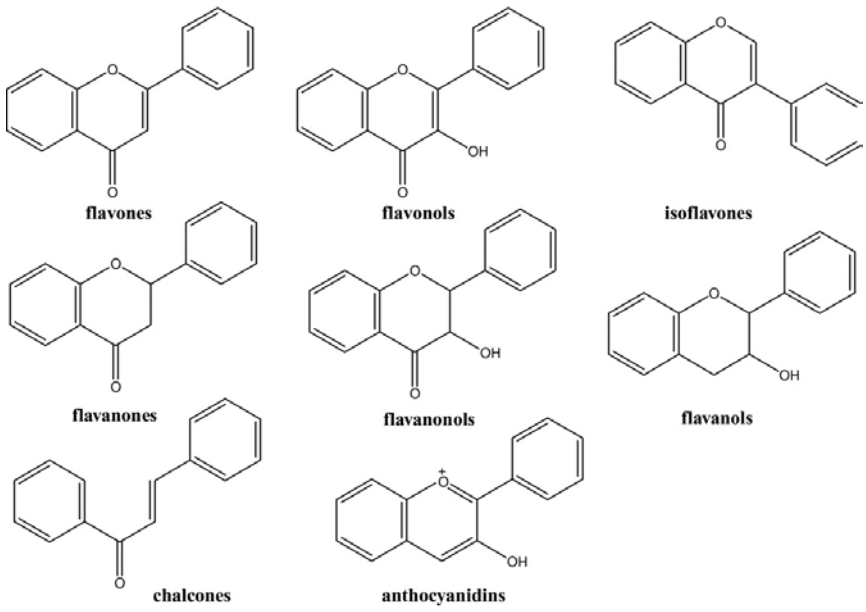
2.1. สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ

สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิเป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นมาแต่ไม่ได้มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ของพืชโดยตรง แต่อาจมีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของพืช เช่น อาจมีฤทธิ์ในการป้องกันสัตว์กินพืช จุลินทรีย์ หรือพืชชนิดอื่น ๆ การขาดสารประเภทนี้จึงไม่ส่งผลให้พืชตายทันที แต่อาจส่งผลต่อการรอดชีวิตในระยะยาว หรืออาจไม่ส่งผลเลยก็ได้ มนุษย์ได้ใช้ประโยชน์จากสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิในการผลิตยา และสารแต่งกลิ่นรส (Tiwari and Rana, 2015)

สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิสามารถจัดจำแนกได้เป็นหลายประเภทจากโครงสร้างทางเคมี วิถีที่ใช้สังเคราะห์หรือองค์ประกอบทางเคมี ประเภทของสารที่สำคัญ เช่น แอลคาลอย์ ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบฟีนอล (Tiwari and Rana, 2015) โดยจะขอยกตัวอย่างสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิดังนี้

2.1.1. สารฟีนอลิก

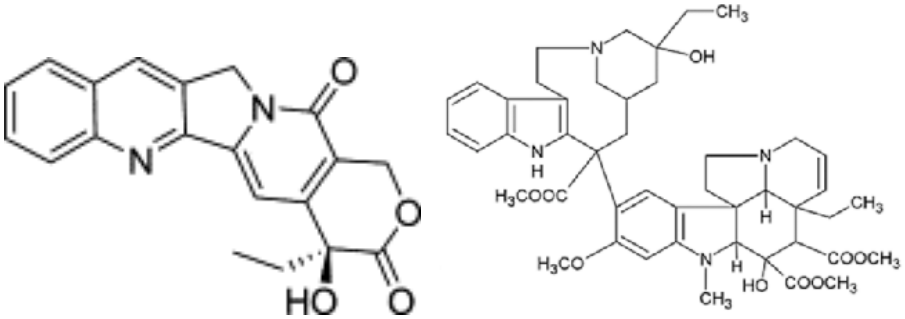
เป็นสารที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ โดยฟีนอลคือสารที่มีหมู่ไฮดรอกซิลเชื่อมต่ออยู่กับวงอโรมาติก (Vermerris and Nicholson, 2007) สารประเภทนี้มีคุณสมบัติมากมายเช่นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ต้านการกลายพันธุ์ และต้านการอักเสบ และยังมีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการฆ่าตัวตายของเซลล์ด้วยการหยุดวัฏจักรของเซลล์ การย่อยสลายสารก่อมะเร็ง และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้อีกด้วย (Huang et al., 2009) ตัวอย่างของสารฟีนอลิก เช่น ฟลาโวนอยด์ ประเภทของฟลาโวนอยด์ที่พบได้มากที่สุด ได้แก่ ฟลาโวน ฟลาโวนอล ฟลาโวนอยด์ (Sulaiman and Balachandran, 2012) นอกจากนี้ยังมีฟลาโวนอยด์อีกหลายประเภทดังภาพที่ 2.1



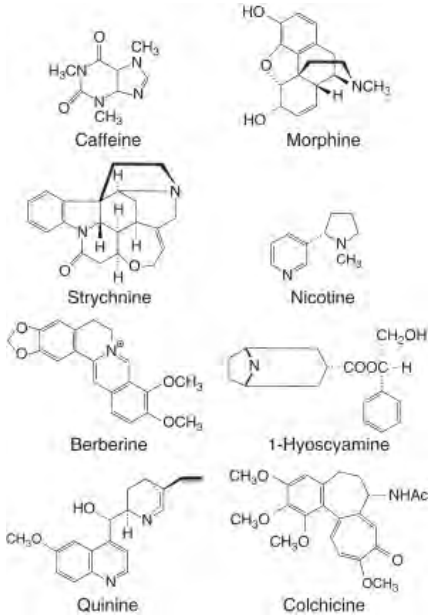
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ (Huang et al, 2009)

2.1.2. แอลคาลอยด์

สารประเภทแอลคาลอยด์เป็นสารกลุ่มที่มีธาตุไนโตรเจนเชื่อมต่ออยู่กับวงแหวน heterocyclic แอลคาลอยด์ที่ผลิตได้ตามธรรมชาติโดยพืชมีความหลากหลายมากกว่า 12,000 ชนิด เช่น โดยหน้าที่หลักของสารประเภทแอลคาลอยด์ในพืชคือการป้องกัน สิ่งก่อโรค และสัตว์กินพืช (Ziegler and Facchini, 2008) สารประเภทแอลคาลอยด์ที่พบในสมุนไพรจำนวนมาก มีฤทธิ์ในการยับยั้งการลอกและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งทั้งในหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต โดยในปัจจุบันมีแอลคาลอยด์ที่ถูกพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งแล้ว เช่น camptothecin และ vinblastine (ภาพที่ 2.2) (Lu et al., 2012) นอกจากยังมีสารแอลคาลอด์ชนิดอื่น ๆ เช่น คาเฟอีน มอร์ฟีน และนิโคติน (ภาพที่ 2.3) (Johnson, 2005)



ภาพที่ 2.2 ตัวอย่างสารแอลคาลอยด์ถูกพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็ง ได้แก่ camptothecin (ซ้าย) (Thomas et al., 2004) และ vinblastine (ขวา) (Hamscher et al., 2010)



ภาพที่ 2.3 ตัวอย่างสารแอลคาลอยด์ชนิดต่าง ๆ (Johnson, 2005)

2.2. สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่พบในใบบัวหลวง

บัวหลวงมีสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิหลายประเภท ซึ่งมีคุณสมบัติหลายประการ เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านความอ้วน และต้านแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงยังมีความสามารภในการต้านมะเร็งอีกด้วย (Yang et al., 2011)

2.2.1. สารฟีนอลิกที่พบในใบบัวหลวง

สารประกอบฟีนอลหลายประเภทสามารถพบได้ในสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวง ทั้งที่เป็นโพลิฟีนอล และฟลาโวนอยด์ โดยตัวอย่างของสารฟีนอลิกที่สามารถพบได้ เช่น gallic acid, rutin และ catechin (Yang et al., 2011) โดย gallic acid นั้นมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดการฆ่าตัวตายของเซลล์ และยับยั้งกระบวนการ angiogenesis ทำให้สารนี้เป็นที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นสารต้านมะเร็ง (Verma et al., 2013) ส่วน rutin นั้นมีคุณสมบัติในการลดความต้านทานต่อสารเคมีของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งตอบสนองต่อสารเคมีมากขึ้น (Iriti, 2017) นอกจากนี้ สารประเภท catechin ที่พบในชาเขียวยังถูกยอมรับว่าเป็นสารป้องกันมะเร็งอีกด้วย (Kuzuhara, 2008) ทำให้เป็นที่น่าสนใจว่าสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงซึ่งมีสารประเภทนี้เป็นองค์ประกอบเช่นกันจะมีความสามารถในการต้านมะเร็งได้ด้วย

2.2.2. แอลคาลอยด์ที่พบในใบบัวหลวง

สารประเภทแอลคาลอยด์ที่พบได้ในใบบัวหลวงมีหลายประเภท เช่น benzylisoquinoline alkaloid ซึ่งมีสารที่สามารถพบได้ เช่น coclaurine (Mukherjee, 2009) โดย coclaurine มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งตับ HEPG-2 เซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HCT116 (Al-ghazzawi, 2019) นอกจากนี้ยังมีแอลคาลอยด์ประเภท aporphine alkaloids เช่น nornuciferine, nuciferine และ roemerine โดย สาร nuciferin มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด อาทิ เซลล์มะเร็งปอด A549 (Liu et al., 2015) เซลล์ประสาท SH-SY5Y และ เซลล์มะเร็งในหนู CT26 เป็นต้น (Qi et al., 2016) และสาร roemerin ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการฆ่าตัวตายของเซลล์อีกด้วย (Ma et al., 2017)

2.3. สารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่พบในใบบัวเผื่อน

Lakshmi และคณะ (2014) ได้รายงานว่าพบสารสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิในสารสกัดหยาบจากใบบัวเผื่อนประเภท แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และ แทนนิน โดยในปัจจุบันยังไม่มีรายงานที่ระบุชนิดของสารแต่จะชนิดที่พบอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามการที่สามารถพบสารเหล่านี้ได้สารสกัดหยาบจากใบบัวเผื่อน ทำให้เป็นที่น่าสนใจถึงความสามารถในการต้านมะเร็งของสารสกัดหยาบจากใบบัวเผื่อน เนื่องจากมีสารประเภทแอลคาลอยด์จำนวนมากที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง และสารแอลคาลอยด์บางประเภท ได้แก่ camptothecin และ vinblastine ยังถูกนำไปผลิตเป็นยาต้านมะเร็งอีกด้วย (Lu et al.,2012) ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารประเภทฟลาโวนอยด์ก็เป็นที่น่าสนใจเนื่องจากมีรายงานจำนวนมากที่กล่าวถึงกลไกในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของสารประเภทนี้ อาทิ การยุติวัฏจักรของเซลล์ การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการฆ่าตัวตายของเซลล์ (Ren et al., 2003) เช่นเดียวกับสารประเภทซาโปนินที่สามารถชักนำให้เกิดกระบวนการฆ่าตัวตายของเซลล์ได้เช่นกัน (Man et al., 2010)

2.4. มะเร็งปากมดลูก

2.4.1. ปัญหาของมะเร็งปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูกถือเป็นมะเร็งชนิดก่อปัญหาอย่างมาก เนื่องจากในปี 2002 มีการตรวจพบมะเร็งปากมดลูกในประชากรโลกกว่า 500,000 ราย และกว่า 275,000 รายเสียชีวิต โดยมากกว่า 80% ที่ตรวจพบมาจากประเทศกำลังพัฒนา (Schiffman et al., 2007) โดยส่วนใหญ่มะเร็งปากมดลูกจะเกิดจากเชื้อไวรัส HPV (human papillomavirus) ที่มีมากกว่า 100 สายพันธุ์และประมาณ 40 สายพันธุ์สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณอวัยวะเพศได้ โดยสายพันธุ์ HPV-16 และ HPV-18 เป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งปากมดลูก (Cheewapat and Poolperm, 2020) นอกจากนี้ผู้ที่ภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือสูบบุหรี่ยังมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมากขึ้นอีกด้วย (Waggoner, 2003)

2.4.2. การป้องกันและรักษา

การป้องกันและรักษามะเร็งปากมดลูกในปัจจุบันมีได้หลายวิธี เช่น การฉีดวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูก หรือการรักษาด้วยวิธีต่าง ๆ ตามระยะของโรคและสภาพความพร้อมของผู้ป่วย (Cheewapat and Poolperm, 2020)

2.4.2.1. การป้องกันด้วยวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูก

ในปัจจุบันมีการพัฒนาวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกหรือวัคซีน HPV ขึ้นซึ่งสามารถป้องกัน HPV ได้บางสายพันธุ์ รวมถึงป้องกันการเกิดมะเร็งองคชาติและมะเร็งทวารหนักในเพศชายได้อีกด้วย ปัจจุบันมีวัคซีนเอชพีวีอยู่ 3 ชนิด ได้แก่ วัคซีนชนิด 2 สายพันธุ์ (bivalent) ที่ป้องกัน HPV-16 และ HPV-18 วัคซีนชนิด 4 สายพันธุ์ quadrivalent ที่เพิ่มความสามารถในการป้องกัน HPV-6 และ HPV-11 ซึ่งเป็นสาเหตุของหูดที่อวัยวะเพศ และวัคซีนชนิด 9 สายพันธุ์ (9-valent) ที่ป้องกัน HPV-31, HPV-33, HPV-45, HPV-52 และ HPV-58 ได้อีกด้วย สำหรับประเทศไทยมีการใช้วัคซีน HPV 2 ชนิด คือ bivalent และ quadrivalent (Cheewapat and Poolperm, 2020)

2.4.2.2. การรักษา

มะเร็งปากมดลูกในระยะเริ่มต้นสามารถรักษาให้หายขาดได้ ด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การจี้ด้วยความเย็น การตัดเอาเนื้อเยื่อบริเวณปากมดลูกออก การผ่าตัด การฝังแร่ การฉายแสง หรือการให้ยาเคมีบำบัด (Cheewapat and Poolperm, 2020) โดยสารเคมีที่ให้ผลดีที่สุดเมื่อใช้เพียงชนิดเดียวคือ Cisplatin ซึ่งจะให้ผลดียิ่งขึ้นเมื่อใช้คู่กับสาร Paclitaxel แต่การใช้สารทั้งสองชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบผันกลับได้ต่อไขกระดูกได้ อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยการให้ยาเคมีบำบัดยังคงต้องมีการศึกษาอีกมาก (Waggoner, 2003)

2.4.2.3. การรักษาด้วยสมุนไพร

การใช้สมุนไพรในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อเป็นยา มีการใช้มาเป็นเวลานานก่อนที่จะมีการผลิตยาสมัยใหม่ และยังคงถูกใช้อยู่ในปัจจุบันทั้งในระบบยาแผลปัจจุบัน และยาแผนโบราณ มีรายงานว่าในช่วงปีค.ศ. 1981-2002 มีการค้นพบยารักษามะเร็งชนิดใหม่ทั้ง 65 ชนิด ซึ่งเป็นยาที่ได้จากผลผลิตทางธรรมชาติถึง 48 ชนิด ประกอบไปด้วย สารในกลุ่ม vinca alkaloids, taxanes, podophyllotoxin และ Anthra cyclines ซึ่งกลไกที่ยาสมุนไพรจะยับยั้งเซลล์มะเร็งได้นั้นมีหลายกลไก ทั้งการรบกวนการส่งสัญญานภายในเซลล์ การทำในวัฏจักรของเซลล์ผิดปกติ การรบกวนไมโครทูบูล และการยับยั้งเอนไซม์ Topoisomerase นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งยาสมุนไพรได้อีกสองประเภท ได้แก่ แบบ Immunomodulation ซึ่งจะกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันในตัวผู้ป่วยตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งซึ่งมีการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันที่ต่ำได้ และแบบ Chemopreventive คือการสร้างสารเพื่อรบกวนและยับยั้งเซลล์มะเร็งทำให้เกิดการฆ่าตัวตายของเซลล์ จุดประสงค์หลักของการใช้ยาสมุนไพรนอกจากจะช่วยยับยั้งมะเร็ง และกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายแล้วยังเป็นการลดผลข้างเคียงจากการรักษาในปัจจุบัน ได้แก่ การฉายแสง และการให้ยาเคมีบำบัด อีกด้วย (Safarzadeh, Shotorbani and Baradaran, 2014)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการศึกษา

3.1. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1. วัสดุ อุปกรณ์

3.1.1.1. วัสดุสำหรับเตรียมการสกัดสารสกัดหยาบ

- ตู้อบลมร้อน (Binder, เยอรมัน)
- เครื่องปั่น (HR2115, Phillips, อินโดนิเซีย)
- ตะแกรงเจาะรู 1 มิลลิเมตร

3.1.1.2. วัสดุสำหรับสกัดสารสกัดหยาบ

- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Heto PowerDry LL3000 Freeze Dryer,
- Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา)
- น้ำกลั่น
- กระดาษกรอง (Whatman No.1 filter paper)
- ตู้เย็น (Magic cool, Panasonic)
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (BL610, Sartorius, สหรัฐอเมริกา)
- ปั๊มสุญญากาศ (A-3S, Tokyo Rikakikai, ญี่ปุ่น)

3.1.1.3. วัสดุสำหรับทดสอบปริมาณสารประเภทฟีนอลในสารสกัดหยาบ

- microplate reader (Molecular Devices, USA)
- ปิเปตขนาด 5 ml
- ไมโครเพลท
- Hot bath (EN631 1/1, Clifton, อังกฤษ)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AB204-S, Mettler Toledo, สหรัฐอเมริกา)

3.1.1.4. วัสดุสำหรับทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์

- microplate reader (Molecular Devices, สหรัฐอเมริกา)
- ไมโครปิเปต ขนาด 200-1000, 20-200, 2-20 และ 02-2 ไมโครลิตร
- ไมโครเพลท 96 หลุม
- กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

3.1.2. สารเคมี

3.1.2.1. สารเคมีสำหรับทดสอบปริมาณสารประเภทฟีนอลในสารสกัดหยาบ

- Folin Ciocalteau reagent (LGBA Chemic, อินเดีย)
- 7.5% Sodium Carbonate (Merch, เยอรมัน)
- Gallic acid (Fluka, สวิสเซอร์แลนด์)

3.1.2.2. สารเคมีสำหรับเลี้ยงเซลล์ SiHa และ C33a

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, USA)
- Antibiotic-Actinomycotic (GIBCO, สหรัฐอเมริกา)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO, สหรัฐอเมริกา)
- 0.25% Trypsin-EDTA (GIBCO, สหรัฐอเมริกา)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) (GIBCO, สหรัฐอเมริกา)

3.1.2.3. สารเคมีสำหรับการทดสอบด้วย MTT assay

- น้ำกลั่น
- Etoposide (Sigma Aldrich, สิงคโปร์)
- AlamarBlue (Gold Biotechnology, สหรัฐอเมริกา)

3.2. วิธีการดำเนินงาน

3.2.1. เตรียมตัวอย่างพืช

เก็บรวบรวมแผ่นใบบัวหลวงแห้งและบัวเผื่อนแห้งด้วยการซื้อจากร้านค้าที่จำหน่าย โดยเพื่อให้ได้ตัวอย่างในปริมาณมากและหาซื้อง่ายจะเลือกใช้ใบที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วซึ่งแผ่นใบบัวหลวงจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20–90 cm (Mukherjee et al., 2009) โดยจะซื้อเป็นใบที่ทำแห้งด้วยแสงอาทิตย์แล้วนำไปทดสอบความแห้งด้วยตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสพบว่าน้ำหนักของใบแห้งหลังจากอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับก่อนอบจึงสรุปได้ว่าปริมาณน้ำจากใบบัวหลวงที่ทำให้แห้งด้วยแสงอาทิตย์เท่ากับ ส่วนแผ่นใบบัวเผื่อนซื้อเป็นใบสดโดยจะมีความกว้างและความยาวประมาณ 10-26 และ 10-30 เซนติเมตรตามลำดับ (Guruge et al., 2017) ทำให้แห้งด้วยการอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นจนเป็นผง ด้วยเครื่องปั่น แล้วร่อนด้วยตะแกรงรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร

3.2.2. สกัดสารสกัดหยาบ

ทำการสกัดด้วยวิธี มาเซอเรชัน (Maceration) นำบัวแต่ละชนิดมาแช่ในน้ำกลั่นแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ผงใบบัวแห้งแต่ละชนิด 20 กรัม ต่อน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร แล้วนำออกมากรองเอาเศษผงออกด้วยกระดาษกรอง แล้วในไปผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยความเย็น (lyophilization) (ดัดแปลงจาก Yang et al., 2011) เก็บผงสารสกัดในกล่องที่มีซิลิกาเพื่อป้องกันสารสกัดดูดความชื้นจากภายนอก และกำจัดน้ำที่ยังคงหลงเหลืออยู่ โดยทำทั้งหมดหนึ่งซ้ำเนื่องจากปริมาณสารสกัดที่ได้มีเพียงพอต่อการทดลอง

3.2.3. ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบ (ดัดแปลงจาก Waterhouse, 2002)

นำสารสกัดที่ได้มาตรวจสอบปริมาณของสารฟีนอลิกด้วย Folin Ciocalteau reagent โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน โดย gallic acid เป็นสารฟีนอลิกที่นิยมใช้เพื่อเป็นสารมาตรฐานและเป็นสารฟีนอลิกที่พบได้มากที่สุดในบัวหลวง เป็นจำนวนสามซ้ำ โดยใช้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 0.25 0.1 และ 0.05 กรัมต่อลิตร เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร และใช้ Blank คือน้ำกลั่น แล้วน้ำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm

3.2.4. เพาะเลี้ยงเซลล์ SiHa และ C33a

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33a (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต) ในอาหาร Complete Dulbecco's Modified Eagle Medium (cDMEM) ที่มีอาหารสูตร Dulbecco's Modified Eagle Medium 89% Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (v/v) และยาปฏิชีวนะ Antibiotic-Antimycotic 1% (v/v) ในไมโครเพลท 96 หลุม โดยเซลล์ SiHa และ C33a จะถูกเลี้ยงในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์ภายในอากาศ 5% ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่ถูกระบุโดยบริษัท American Type Culture Collection (ATCC)

3.2.5 ทดสอบการมีชีวิตของเซลล์

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยสาร Alamar Blue (ดัดแปลงจาก Chang et al., 2016) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นเริ่มต้นที่ใช้จะต้องมีค่าความเข้มข้น 4.26 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อยู่ในช่วงเนื่องจากเป็นค่า LC_{50} ของสารสกัดหยาบจากใบบัวต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในเวลา 24 ชั่วโมง (Chang et al., 2016) หากไม่พบค่า LC_{50} จะทำการเพิ่มหรือลดความเข้มข้นจนกว่าจะพบค่า LC_{50} ใช้สาร etoposide (Sigma Aldrich, Singapore) เป็นสารควบคุมบวกและใช้สาร Alamar Blue (Gold Biotechnology, สหรัฐอเมริกา) ในการตรวจสอบ จากนั้นคำนวณการมีชีวิตของเซลล์ด้วย สูตร Viability% และสูตร Cytotoxicity% (Rengasamy et al., 2018)

$$Viability\% = (Test\ OD / Control\ OD)\ X\ 100$$

$$Cytotoxicity\% = 100 - Viability\ \%$$

ค่า OD คือค่า Optical density ของสิ่งที่ทดลอง วัดด้วยเครื่อง microplate reader (Molecular Devices, USA) โดย Test OD คือ ค่า OD ชุดที่ทดลองด้วยการใส่สารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ส่วน Control OD คือค่า OD ของชุดการทดลองควบคุมที่ไม่มีการใส่สารสกัดหยาบลงไป

3.2.6 วิเคราะห์ผลทางสถิติและรายงานผล

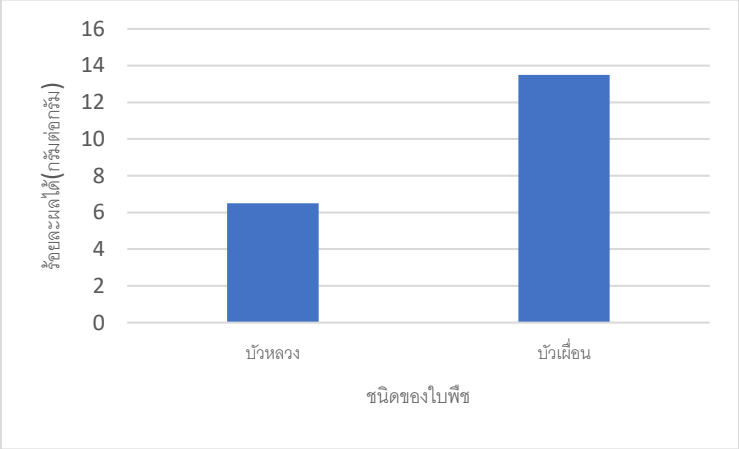
แสดงร้อยละผลได้ของสารสกัดหยาบ(กรัม)ต่อน้ำหนักแห้ง(กรัม) ใช้ค่าเฉลี่ย ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในเพื่อสร้างกราฟการแสดงผลการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบเป็นหน่วยมิลลิกรัมต่อน้ำหนักของสารสกัดกรัม (Microsoft Excel, Microsoft, สหรัฐอเมริกา) แล้ววิเคราะห์ค่าความแตกต่างของปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบทั้งสอง ทางสถิติด้วย Independent samples t-test ที่ $p < 0.05$ (IBM SPSS Statistics 22, SPSS, สหรัฐอเมริกา) วิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรงระหว่างร้อยละของค่าการมีชีวิตของเซลล์ (ตัวแปรตาม) กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบทั้งสองชนิด (ตัวแปรต้น) เพื่อหาว่าทั้งสองตัวแปรมีความเกี่ยวข้องกันทางสถิติหรือไม่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้ค่า P จาก ANOVA (IBM SPSS Statistics 22, SPSS, สหรัฐอเมริกา) และรายงานผลเป็นกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบทั้งสองชนิด พร้อมคำนวนหาค่า LC_{50} (ร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 50) จากสมการที่ได้จากกราฟ และ ค่า coefficient of determination (R^2) (Microsoft Excel, Microsoft, สหรัฐอเมริกา)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. การสกัดสารสกัดหยาบ

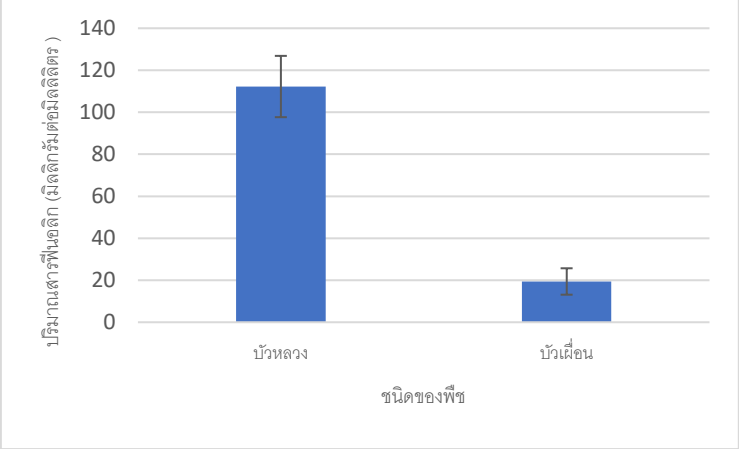
ร้อยละผลได้ของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) และใบบัวเผื่อน (*Nymphaea nouchali* Burm. f.) ด้วยที่สกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration) ต่อน้ำหนักของผงใบบัวแห้งแต่ละชนิด คิดเป็น 6.50% และ 13.25% ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.1 โดยสารสกัดจากใบบัวหลวงจะมีลักษณะเป็นผงคล้ายผลึกสีเหลือง และสารสกัดจากใบบัวเผื่อนมีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล



ภาพที่ 4.1. ร้อยละผลได้ของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อน

4.2. ทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบ

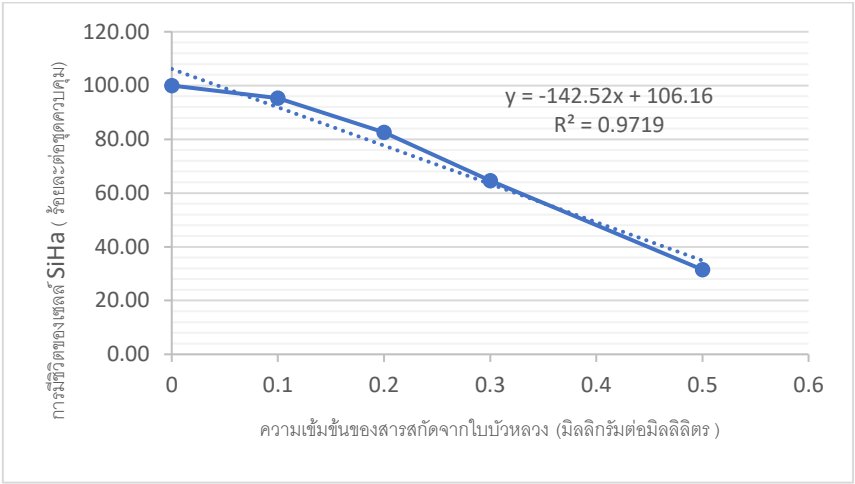
ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดเท่ากับ 112.26±14.60 มิลลิกรัมต่อกรัม คิดเป็น 11.2% จากสารสกัดทั้งหมด ส่วนสารสกัดจากใบบัวเผื่อนคิดเป็น 19.41±6.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คิดเป็น 3.9% ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสารสกัดใบบัวหลวงมีปริมาณสารฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดจากใบบัวเผื่อน (ดังภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2. ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อน

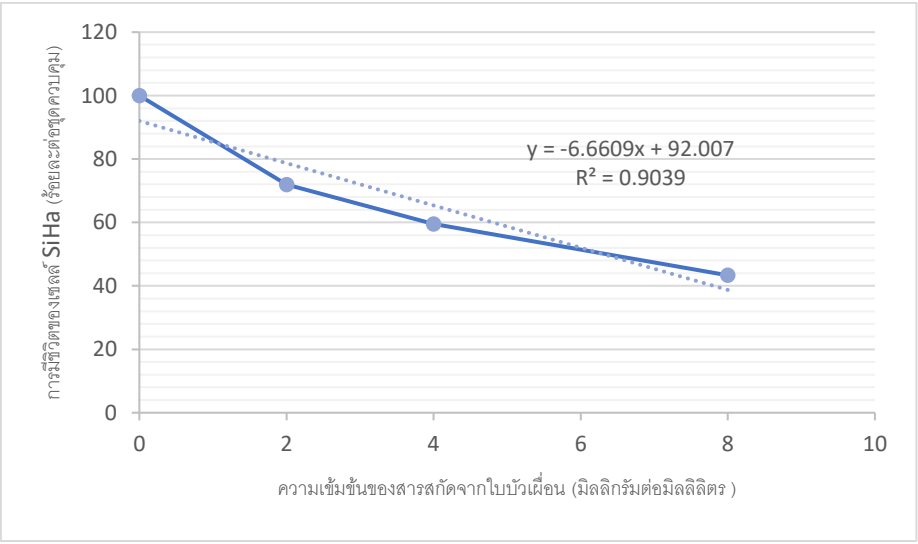
4.3. ผลการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์

จากการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ SiHa ด้วยสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงพบว่าค่าความเข้มข้นครึ่งหนึ่งที่ทำให้เซลล์ตาย (LC_{50}) มีค่าเท่ากับ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสมการเส้นตรงคือ $y = -142.52x + 106.16$ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9719 ดังที่แสดงในภาพที่ 4.3 โดยจากการวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรงค่า P เท่ากับ 0.002 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 กล่าวคือความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและการมีชีวิตของเซลล์ SiHa มีความสัมพันธ์ทางสถิติ



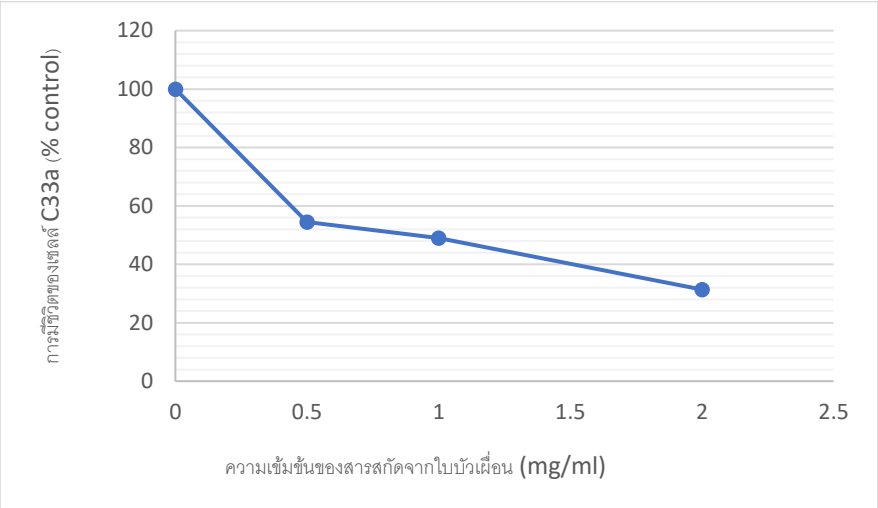
ภาพที่ 4.3. ผลของสารสกัดจากใบบัวหลวงต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ SiHa ด้วยสารสกัดหยาบจากใบบัวเผื่อนพบว่าค่าความเข้มข้นครึ่งหนึ่งที่ทำให้เซลล์ตาย (LC_{50}) มีค่าเท่ากับ 6.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสมการเส้นตรงคือ $y = -6.66x + 92.01$ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9039 ดังที่แสดงในภาพที่ 4.4 โดยจากการวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรงค่า P เท่ากับ 0.049 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 กล่าวคือความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและการมีชีวิตของเซลล์ SiHa มีความสัมพันธ์ทางสถิติ



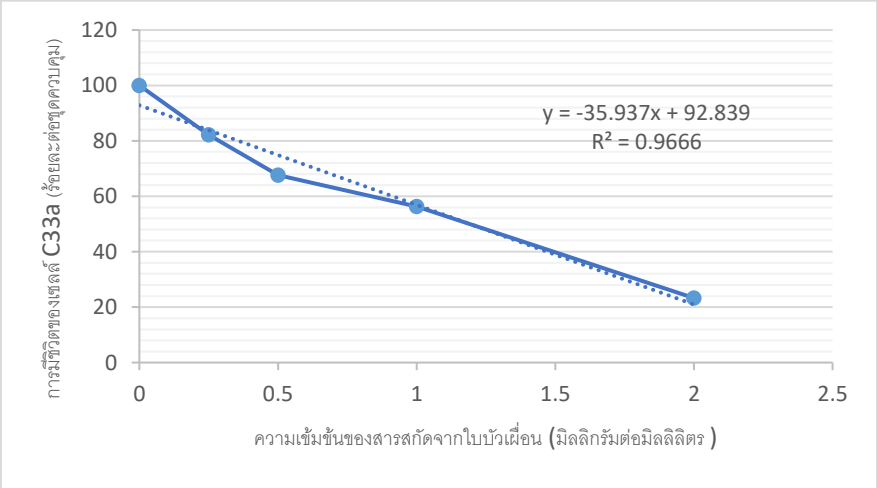
ภาพที่ 4.4. ผลของสารสกัดจากใบบัวเผื่อนต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด SiHa

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ C33a ด้วยสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวง เมื่อวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรงพบว่าค่า P เท่ากับ 0.112 ซึ่งมากกว่า 0.05 กล่าวคือความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและการมีชีวิตของเซลล์ C33a ไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ ทำให้ไม่สามารถสร้างสมการเส้นตรงและหาค่า LC_{50} ได้



ภาพที่ 4.5. ผลของสารสกัดจากใบบัวหลวงการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a

การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ C33a ด้วยสารสกัดหยาบจากใบบัวเผื่อนที่ความเข้มข้น พบว่าค่าความเข้มข้นครึ่งหนึ่งที่ทำให้เซลล์ตาย (LC_{50}) มีค่าเท่ากับ 1.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีสมการเส้นตรงคือ y = -35.937x + 92.839 ดังที่แสดงในภาพที่ 4.6 โดยจากการวิเคราะห์ถดถอยเชิงเส้นตรงค่า P เท่ากับ 0.003 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 กล่าวคือความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบบัวเผื่อนและการมีชีวิตของเซลล์ C33a มีความสัมพันธ์ทางสถิติ



ภาพที่ 4.6. ผลของสารสกัดจากใบบัวเผื่อนต่อการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C33a

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ร้อยละผลได้ของสารสกัดจากใบบัวหลวงมีค่า 6.50% ซึ่งมีน้อยกว่าสารสกัดจากใบบัวเผื่อนซึ่งมีร้อยละผลได้อยู่ที่ 13.25% และร้อยละผลได้ของสารสกัดทั้งสองชนิดน้อยกว่าจากการทดลองของ Chang และคณะ (2016) ซึ่งเคยมีการศึกษาว่าสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงที่สกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการต้านมะเร็งในเซลล์มะเร็งเต้านมที่ได้ผลได้ประมาณ 15% แต่ร้อยละผลได้ของสารสกัดจากใบบัวเผื่อนมีปริมาณมากกว่า Lakshmi และคณะ (2014) ที่เคยได้ผลได้เป็น 12.8% ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการใช้สารในการสกัดที่ต่างกันโดย Lakshmi และคณะ (2014) จะมีการใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเมทานอล ผสมกับน้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ซึ่งยังคงต้องมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของตัวทำละลายกับผลได้ของสารสกัดจากใบบัวทั้งสองชนิดต่อไป

แม้ว่าสารสกัดจากใบบัวหลวงจะมีปริมาณของสารฟีนอลิกในสารสกัดอยู่ที่ 112.26±0.015 มิลลิกรัมต่อกรัม คิดเป็น 11.2% จากสารสกัดทั้งหมด ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากใบบัวเผื่อน มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด 39.16±28.17 มิลลิกรัมต่อกรัม แต่ปริมาณสารฟีนอลิกในสารสกัดจากใบบัวหลวงนั้นน้อยกว่าที่ Yang และคณะ (2011) เคยทำการสกัดด้วยน้ำและทดสอบไว้ที่ 70% ซึ่งอาจมีสาเหตุจาก ปริมาณตัวอย่างต่อตัวทำละลายที่ต่างกัน หรือการวิธีการวัดปริมาณสารฟีนอลิกที่ต่างกัน Yang และคณะใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงในการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิก ซึ่ง Schendel กล่าวไว้ว่าการใช้ Folin Ciocalteau assay นั้นจะขาดความจำเพาะเจาะจงและสารจะตอบสนองต่อสารฟีนอลิกชนิดต่าง ๆ ไม่เท่ากัน และในการทดลองของ Lakshmi และคณะ (2014) ภายในสารสกัดจากใบบัวเผื่อนจะมีปริมาณสารฟีนอลิกอยู่ที่ 66.99 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งมากกว่าสารสกัดจากใบบัวเผื่อนในการทดลองนี้ โดยวัดด้วย Folin Ciocalteau reagent เช่นเดียวกัน ความแตกต่างของปริมาณสารฟีนอลิกจึงน่าจะมาจากการใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน โดย Lakshmi และคณะ (2014) จะมีการใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์ คลอโรฟอร์ม เมทานอล และ น้ำกลั่นในการสกัด ทั้งนี้ทั้งนั้นการทดสอบปริมาณสารฟีนอลิกด้วย

จากการทดสอบกับเซลล์มะเร็งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa โดยมีค่า LC_{50} อยู่ที่ 0.46 และ 6.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่มีค่าอยู่ที่ 4.26 ที่ Chang และคณะเคยศึกษาเอาไว้ (2016) สารสกัดจากใบบัวเผื่อนนั้นยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33a ได้ โดยมีค่า LC_{50} อยู่ที่ 1.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการที่เซลล์ SiHa เป็นเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส Human papilloma virus (HPV-16) ส่วน C33a นั้นไม่มีการติดเชื้อไวรัส Human papilloma virus โดยเหตุผลที่ทำให้เซลล์ C33a มีความต้านทานต่อสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงมีสาเหตุมาจากการที่สารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงสามารถที่จะยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ Fatty acid synthase (FAS) ได้ในเซลล์มะเร็งเต้านมจากรายงานของ Yang และคณะ (2011) โดยที่สารสกัดหยาบจากใบบัวเผื่อนอาจไม่มีคุณสมบัตินี้ ซึ่งจากการรายงานของ Hougardy และคณะ (2005) พบว่า เซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV จะมีการแสดงออกของ FAS ที่มากกว่าในเซลล์มะเร็วชนิดอื่น เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ถึง 10 ถึง 25 เท่า และได้พบว่าเซลล์ SiHa สามารถถูกทำให้ตอบสนองต่อ แอนติบอดีของ FAS ได้ด้วย

cycloheximide และเซลล์มะเร็งปากมดลูกอีกชนิดที่มีการติดเชื้อ HPV-16 เช่นเดียวกันคือเซลล์ CaSki นั้นก็ตอบสนองได้ดีมากกับแอนติบอดีของ FAS โดยความสามารถทนทานต่อแอนติบอดีของ FAS ตามปกติของ SiHa อาจเกิดจากกลไกที่เซลล์มีโมเลกุลที่สามารถป้องกันการฆ่าตัวตายของเซลล์ หรือเหตุผล อื่น ๆ ในขณะที่เซลล์ C33a ไม่ตอบสนองต่อแอนติบอดีของ FAS เลยแม้จะมีการใช้ cycloheximide ร่วมด้วยจึงยังไม่เป็นที่แน่ชัดถึงผลของสารสกัดหยาบว่ายับยั้งเซลล์มะเร็งได้อย่างไร ส่วนการที่เซลล์ SiHa สามารถต้านทานสารสกัดหยาบจากใบบัวเผื่อนได้ดีกว่า C33a ตามรายงานของ Saxena และคณะ (2005) อาจเกี่ยวข้องกับ HPV-dependent inactivation ของ apoptotic regulators เช่น p53 ทำให้เซลล์ SiHa มีโอกาสรอดสูงกว่า C33a จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับเหตุผลที่เซลล์ SiHa ตอบสนองต่อสารสกัดจากใบบัวหลวงได้มากกว่าเซลล์ C33a และ กลไกในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยสารสกัดจากใบบัวเผื่อน ส่วนการที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและการมีชีวิตของเซลล์ C33a ไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น จากที่ Traas และ Van Leeuwen (2005) ได้กล่าวเอาไว้ว่าเมื่อเวลาผ่านไปความเป็นพิษของสารต่อเซลล์อาจลดลงจนหยุดนิ่ง ในการทดลองการลดลงของความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงจึงอาจมีผลกับความมีชีวิตของเซลล์ C33a ที่มากขึ้น จึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับระยะเวลาที่ใช้สารสกัดกับเซลล์มะเร็งปากมดลูกต่อไป

หากใช้หลักการหมือนกับที่ Paul และคณะ (2015) ที่ศึกษาในเซลล์ SiHa C33a และ Hela (HPV-18) จะถือว่าหากค่า LC_{50} น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จะสามารถสรุปได้ว่าสารนั้นมีฤทธิ์เป็นพิษมากต่อเซลล์ ซึ่งสารสกัดจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนในการทดลองนี้นั้นมีค่าสูงกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งอาจสรุปได้ว่าสารสกัดด้วยน้ำจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง SiHa และ C33a ต่ำ อย่างไรก็ตามต้องยังคงมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารต่อการแสดงออกของยีนของเซลล์หลังได้รับสาร หรือศึกษาโดยการใช้ใช้ตัวทำละลายอื่น ๆ ในการสกัดต่อไป นอกจากนี้ Paul และคณะ (2015) ยังพบว่าความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากพืชยังเกี่ยวข้องกับชนิดของเซลล์และตัวทำลาย โดยพบว่าหากนำสารที่สกัดด้วยเมทานอลไปทำแห้งและทำละลายด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ ได้แก่ เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และ น้ำ ก่อนนำไปทำแห้งอีกครั้งจะให้ผลที่แตกต่างกันไปในแต่ละเซลล์ โดย เซลล์ HeLa จะถูกกำจัดได้ด้วยสารสกัดจาก *Heliotropium indicum* ที่ถูกแบ่งไปในเฮกเซน SiHa ถูกกำจัดด้วย *Solanum nigrum, Phyllanthus amarus* ที่ถูกแบ่งลงไปในคลอโรฟอร์ม และ C33a จะถูกกำจัดสารสกัดด้วยที่ถูกแบ่งลงไปในคลอโรฟอร์มจาก *S. nigrum* แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ถูกทำละลายด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์แต่ละชนิดไม่เท่ากันด้วย จึงเป็นเรื่องน่าสนใจที่จะศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงและใบบัวเผื่อนที่ถูกสกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ กับเซลล์มะเร็งปากมดลูกโดยอาจให้ผลที่ดีกว่าในการทดสอบนี้

ความสามารถในการยับยั้งการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกอาจจเกิดจากคุณสมบัติของสารสกัดหยาบในการหยุดวัฏจักรของเซลล์ไว้ที่ระยะ G_1 เช่นเดียวกับที่ Yang และคณะ (2011) เคยได้ทำการทดลองไว้กับเซลล์มะเร็งเต้านม โดยมีสาเหตุมาจากการที่สารสกัดมีความสามารถในการหยุดเอนไซม์ fatty acid synthase ที่ปกติพบได้มากในเซลล์ SiHa ดังที่ Hougardy และคณะ (2005) เคยกล่าวไว้ หรือเกิดการเพิ่มการแสดงออกของยีนในกลุ่ม CKIs (p21, p27 และ p16) ที่สามารถยับยั้งการสร้าง D1/cdk4 complexes และ/หรือ cyclin E/cdk2 complexes ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้วัฏจักรของเซลล์ขยับไปที่ระยะ S จาก ระยะ

G1 ทำให้วัฏจักรของเซลล์ถูกยับยั้ง ซึ่งการสะสมของ CKIs สามารถทำให้เกิดการฆ่าตัวตายของเซลล์และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอกได้ (Lee and Yang, 2001) อย่างไรก็ตามก็ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกในการต้านมะเร็งปากมดลูกของสารสกัดหยาบจากใบบะวหลวงและใบบัวเผื่อนต่อไป

รายการเอกสารอ้างอิง

Ahn, J. H., et al. 2013. Chemical constituents from *Nelumbo nucifera* leaves and their anti-obesity effects. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 23(12), 3604-3608.

Al-ghazzawi, A. M. 2019. Anti-cancer activity of new benzyl isoquinoline alkaloid from Saudi plant Annona squamosa. BMC Chemistry, 13(1), 1-6.

Bruni, L., et al. 2019. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in Thailand. Summary Report 17 June 2019.

Chang, C. H., Ou, T. T., Yang, M. Y., Huang, C. C., and Wang, C. J. 2016. *Nelumbo nucifera* Gaertn. leaves extract inhibits the angiogenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulation connective tissue growth factor (CTGF) mediated PI3K/AKT/ERK signaling. Journal of Ethnopharmacology, 188, 111-122.

Cheewapat, P., and Poolperm, K. 2020. HPV Vaccine: Current Situation and Nurses' Roles. Thai Red Cross Nursing Journal, 13(1), 39-49.

Duke, JA., Bogenschutz-Godwin, M.J., and du Cellier, J. 2002. Handbook of Medicinal Herbs. The United State of America : CRC Press LLC.

Ferlay, J., et al. 2018. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: https://gco.iarc.fr, Accessed [2020, April 15]

Guruge, S., Yakandawala, D., & Yakandawala, K. 2017. A taxonomic synopsis of *Nymphaea nouchali* Burm. f. and infraspecific taxa. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 45(3), 307-318.

Hamscher, G., Mohring, S. A., Knobloch, A., Eberle, N., Nau, H., Nolte, I., and Simon, D. (2010). Determination of drug residues in urine of dogs receiving anti-cancer chemotherapy by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: is there an environmental or occupational risk?. Journal of analytical toxicology, 34(3), 142-148.

Hougardy, B. M., van der Zee, A. G., van den Heuvel, F. A., Timmer, T., de Vries, E. G., and de Jong, S. (2005). Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in high-risk HPV-positive human cervical cancer cells: relationship with Fas, caspase-8, and Bid. Gynecologic oncology, 97(2), 353-364.

Huang, W. Y., Cai, Y. Z., and Zhang, Y. 2009. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. Nutrition and Cancer, 62(1), 1-20.

Iriti, M., et al. 2017. Rutin, a quercetin glycoside, restores chemosensitivity in human breast cancer cells. Phytotherapy Research, 31(10), 1529-1538.

Johnson, G. J. 2005. ALKALOIDS. Encyclopedia of Analytical Science [e-book]. n.p: Elsevier. Retrieved January 1, 2021, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977000108

Kashiwada, Y., et al. 2005. Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure–activity correlations with related alkaloids. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 13(2), 443-448.

Kuzuhara, T., Suganuma, M., and Fujiki, H. 2008. Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention. Cancer Letters, 261(1), 12-20.

Lakshmi, G., Smitha, N., Ammu, S. V., Priya, C. L., and Bhaskara Rao, K. V. 2014. Phytochemical profile, in vitro antioxidant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nymphaea Nouchali* Linn: an in vitro study. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6(6), 548-552.

Lee, M. H., and Yang, H. Y. (2001). Contributions in the domain of cancer research: Review¶ Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 58(12), 1907-1922.

Liu, W., et al. 2015. Nuciferine, extracted *from Nelumbo nucifera* Gaertn, inhibits tumor-promoting effect of nicotine involving Wnt/β-catenin signaling in non-small cell lung cancer. Journal of Ethnopharmacology, 165, 83-93.

Lu, J. J., Bao, J. L., Chen, X. P., Huang, M., and Wang, Y. T. 2012. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2012 (September 2012).

Ma, H. B., Tian, Z. S., Gui, S. L., Cui, W. G., and Li, W. 2017. Anti-prostate cancer effect of roemerine: an experimental study. Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology, 23(1), 27-33.

Man, S., Gao, W., Zhang, Y., Huang, L., and Liu, C. 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. Fitoterapia, 81(7), 703-714.

Mukherjee, P. K., Mukherjee, D., Maji, A. K., Rai, S., and Heinrich, M. 2009. The sacred lotus (*Nelumbo nucifera*) – phytochemical and therapeutic profile. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 61(4), 407-422.

Ono, Y., Hattori, E., Fukaya, Y., Imai, S., and Ohizumi, Y. 2006. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. Journal of Ethnopharmacology, 106(2), 238-244.

Paul, S., Chakraborty, S., Mukherjee, A., & Kundu, R. 2015. Evaluation of cytotoxicity and DNA damaging activity of three plant extracts on cervical cancer cell lines. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 31(1), 183-189.

Poornima, P., Weng, C. F., and Padma, V. V. 2014. Neferine, an alkaloid from lotus seed embryo, inhibits human lung cancer cell growth by MAPK activation and cell cycle arrest. Biofactors, 40(1), 121-131.

Qi, Q., et al. 2016. Identification of the anti-tumor activity and mechanisms of nuciferine through a network pharmacology approach. Acta Pharmacologica Sinica, 37(7), 963-972.

Raja, M. M. M., Sethiya, N. K., and Mishra, S. H. 2010. A comprehensive review on *Nymphaea stellata*: A traditionally used bitter. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research, 1(3), 311.

Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., and Zhang, L. 2003. Flavonoids: promising anticancer agents. Medicinal Research Reviews, 23(4), 519-534.

Rengasamy, G., Venkataraman, A., Veeraraghavan, V. P., and Jainu, M. 2018. Cytotoxic andapoptotic potential of Myristica fragrans Houtt.(mace) extract on human oral epidermal carcinoma KB cell lines. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 54(3).

Safarzadeh, E., Shotorbani, S. S., and Baradaran, B. 2014. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 4(Suppl 1), 421.

Schendel, R. R. 2019. Phenol content in sprouted grains. In Sprouted Grains (pp. 247-315). AACC International Press.

Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C., and Wacholder, S. 2007. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. The Lancet, 370(9590), 890-907.

Saxena, A., Yashar, C., Taylor, D. D., and Gercel-Taylor, C. (2005). Cellular response to chemotherapy and radiation in cervical cancer. American journal of obstetrics and gynecology, 192(5), 1399-1403.

Sheikh, S. A. 2014. Ethno-medicinal uses and pharmacological activities of lotus (*Nelumbo nucifera*). Journal of Medicinal Plants Studies, 2(6), 42-46.

Sulaiman, C. T., and Balachandran, I. 2012. Total phenolics and total flavonoids in selected Indian medicinal plants. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 74(3), 258.

Traas, T. P., and Van Leeuwen, C. J. (2007). Ecotoxicological effects. In Risk Assessment of Chemicals (pp. 281-356). Dordrecht: Springer.

Tiwari, R., and Rana, C. S. 2015. Plant secondary metabolites: a review. International Journal of Engineering Research and General Science, 3(5), 661-670.

Thomas, C. J., Rahier, N. J., and Hecht, S. M. (2004). Camptothecin: current perspectives. Bioorganic & medicinal chemistry, 12(7), 1585-1604.

Verma, S., Singh, A., and Mishra, A. 2013. Gallic acid: molecular rival of cancer. Environmental Toxicology and Pharmacology, 35(3), 473-485.

Vermerris, W., and Nicholson, R. 2007. Phenolic compound biochemistry. Springer Science & Business Media. (pp. 1). n.p.: Springer.

Waggoner, S. E. 2003. Cervical cancer. The Lancet, 361(9376), 2217-2225.

Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 6(1), I1-1.

Yang, M. Y., Chang, Y. C., Chan, K. C., Lee, Y. J., and Wang, C. J. 2011. Flavonoid-enriched extracts from *Nelumbo nucifera* leaves inhibits proliferation of breast cancer in vitro and in vivo. European Journal of Integrative Medicine, 3(3), e153-e163.

Ziegler, J., and Facchini, P. J. 2008. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. Annual Review of Plant Biology., 59, 735-769.

ภาคผนวก

การสร้างกราฟ gallic acid มาตรฐาน

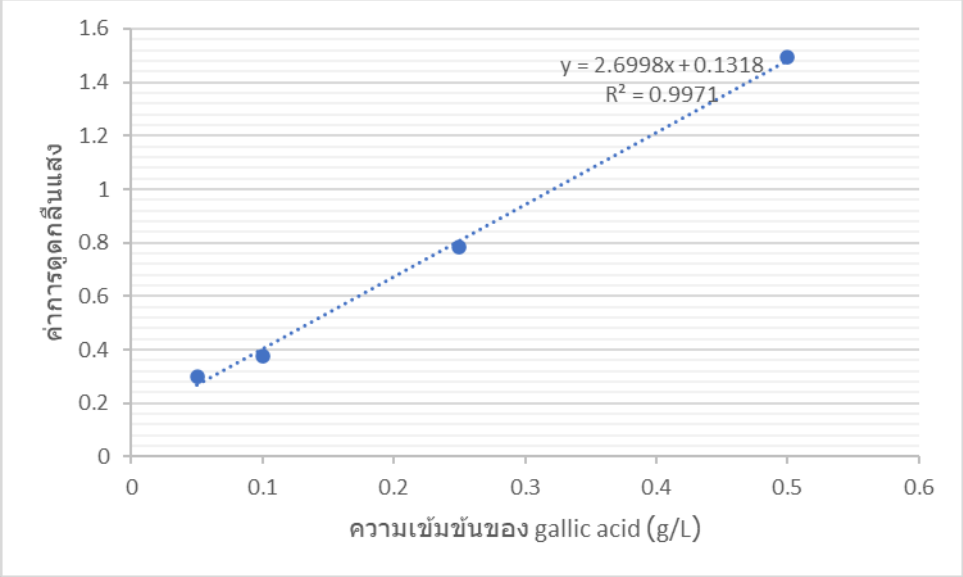
1. ละลายgallic acidน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.5 0.25 0.1 และ 0.05 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำกลั่นเป็น Blank

2. ปิเปตสารละลายและแบลงค์ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่น 7 มิลลิลิตร และ ด้วย Folin Ciocalteau reagent 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มเป็นเวลา 5 นาที

3. แล้วเติมสารลายโซเดียมคาร์บอเนต 20%w/v ลงไป 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

5. สร้างกราฟมาตรฐานโดยให้ค่าดูดกลืนแสง เป็นแกน Y และให้ความเข้มข้นของสารละลายเป็นแกน X



ภาพที่ 5.1. กราฟสารละลายมาตรฐาน gallic acid โดยสมการเส้นตรงคือ y = 2.6998X + 0.1318