

# รายงานการวิจัย

## โครงการวิจัยเรื่อง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดใบชะอม

Antioxidant activity and antiproliferative against cancer cell line

from *Acacia pennata* leaves extract

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2561

สัญญาเลขที่ GB-A\_CU\_61\_08\_61\_02

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## คณะผู้วิจัย

นายอนุมาศ บัวเขียว

หัวหน้าโครงการ

นางทรงจันทร์ ภูทอง

รศ.ดร.กิตตินันท์ โกมลภิส

นางสาวอุมาพร พิมพิทักษ์

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช  
ปีงบประมาณ 2561 สัญญาเลขที่ GB-A\_CU\_61\_08\_61\_02

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรม  
พันธุศาสตร์ รองศาสตราจารย์ ดร.ณัฐภา ทองจุล และ รองศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ กาญจนทัต รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัย  
เทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำการแก้ไขปัญหาต่างๆ

ขอขอบคุณบุคลากรฝ่ายสนับสนุน ฝ่ายธุรการและฝ่ายช่างในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุก  
ท่านที่ให้การช่วยเหลือ และดำเนินการต่างๆให้งานวิจัยสำเร็จได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อภาษาไทย

สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่มีในพืชผักที่บริโภคประจำวันได้รับความสนใจมากเพราะมีความปลอดภัยในการใช้มากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ จากรายงานต่างๆ พบว่าสารพฤกษเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบฟีนอลิกบางชนิดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จากการวิเคราะห์ผักพื้นบ้านที่นิยมบริโภค 20 ชนิดพบว่า ชะอม (*Acacia pennata*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงมากที่สุดถึง 45.3 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมที่เป็นใบสด (F) และใบแห้ง (D) ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ (H) หรือ 95% เอทานอล (E) จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay โดยคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity ที่ 50% พบว่า สารที่ได้จากสกัดด้วยน้ำจะให้ฤทธิ์ที่สูงกว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วย 95% เอทานอล และสารสกัดจากใบสดจะให้ฤทธิ์ที่สูงกว่าสารที่สกัดจากใบแห้ง แต่เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยดูความสามารถในการให้อิเล็กตรอนด้วยวิธี FRAP assay พบว่า สารสกัดหยาบทั้ง 4 ชนิดให้ฤทธิ์ที่ต่างกันเล็กน้อย โดยมีค่าอยู่ในช่วง 2.91 - 5.09 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ชนิดต่างๆ จำนวน 14 ชนิดโดยวิธี MTT colorimetric assay พบว่า FH และ DH มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำโดยมีค่า 50% inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในทางตรงข้าม FE จะมีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ ( $IC_{50}$  = 13.4 - 113.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ที่น่าสนใจคือ DE จะมีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์มะเร็งเท่านั้น ( $IC_{50}$  = 24.8 - 483.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่จะเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติของเซลล์เยื่อบุผิว MCF-10A เซลล์ปอด WI-38 และเซลล์ผิวหนัง CCD-986SK เนื่องจาก DE มีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ปกติจึงได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ DE ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายในเซลล์มะเร็งของเซลล์ลำไส้ CaCo-2 และ HT-29 พบว่า มีค่าเท่ากับ 76.8% และ 34.5% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า DE ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเท่ากับ 28% จากผลการทดสอบการออกฤทธิ์ต่างๆ ของสารสกัดหยาบจากใบชะอมในงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในงานวิจัยต่อยอดทางด้านพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ต่อไป

## บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Natural anti-oxidants from vegetables which are normally used in daily cooking are of great interest because they are safer to be used than synthetic anti-oxidant compounds. It has been reported that phytochemicals especially some phenolic compounds can act as the anti-oxidant. Among the twenty Thai indigenous vegetables studied, Cha-Om (*Acacia pennata*) contains highest level of the phenolic contents at 45.3  $\mu\text{g}$  gallic acid/mg (dry wt.). Therefore, this research was focused on the anti-oxidant activity of crudes extracted from both fresh (F) and dried (D) leaves of *A. pennata*. Leaves which were extracted by either water (H) or 95% ethanol (E). Anti-oxidant activity, based on DPPH assay, of the extracts was quantified in term of 50% radical scavenging activity. It was found that the FH and DH extracts showed higher activity at 3.91 mg/ml and 4.13 mg/ml than the FE and DE did at 7.80 mg/ml and 19.24 mg/ml, respectively. The anti-oxidant activity in term of reducing ability was also analyzed by FRAP assay. All extracts, FH, FE, DH and DE yielded slightly different abilities at 5.09, 4.10, 5.01 and 2.91 mM, respectively. In addition, cytotoxicity based on MTT colorimetric assay of the extracts was performed on fourteen cell lines. The results showed that both FH and DH extracts had low toxicity to all fourteen cell lines with the 50% inhibition concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) values more than 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . In contrast, the FE extract was toxic to both cancer and normal cell lines ( $\text{IC}_{50} = 13.4 - 113.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Interestingly, the DE extract was highly toxic to only cancer cell lines ( $\text{IC}_{50} 24.8 - 483.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) but less toxic to normal cell line of epithelial cell (MCF-10A), lung cell (WI-38) and skin cell (CCD-986SK). Because of its low toxicity to normal cell lines, study of antioxidant activity of the DE extract (2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was tested on human colon cancer cell line CaCo-2 and HT-29 cells and was found to be 76.8% and 34.5%, respectively. In addition, anti-inflammatory effect of the DE extract at the concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was found to be 28%. Information obtained from these studies should be able to be used as preliminary data for further research on Thai medicinal plants with antioxidant activity and anti-cancer activity.

## สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ญ
1. บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย	2
1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
2. วิธีดำเนินการวิจัย	6
2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	6
2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	6
2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	7

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
2.1.3 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ	9
2.2 คัดเลือกและเก็บตัวอย่างใบชะอม	10
2.3 เตรียมสารสกัดหยาบจากใบชะอม	10
2.3.1 สารสกัดหยาบจากใบชะอมสด	10
2.3.2 สารสกัดหยาบจากใบชะอมแห้ง	10
2.4 วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method	11
2.5 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอม	11
2.5.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay	11
2.5.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี FRAP (ferric reducing/antioxidant potential) assay	12
2.6 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติโดยวิธี MTT colorimetric assay	13
2.6.1 การเตรียมเซลล์ที่ใช้ทดสอบ	13
2.6.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT colorimetric assay	13
2.7 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ (cellular antioxidant activity assay; CAA assay) ของสารสกัดหยาบจากใบชะอม	14

## สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
2.8 ทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจากใบชะอม	15
3. ผลการวิจัย	16
3.1 ผลการคัดเลือกและเก็บตัวอย่างใบชะอม	16
3.2 ผลการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบชะอม	16
3.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบจากใบชะอม	17
3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอม	18
3.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี DPPH assay	18
3.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี FRAP assay	21
3.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆโดยวิธี MTT colorimetric assay ของสารสกัดหยาบจากใบชะอม	23
3.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ (cellular antioxidant activity assay; CAA assay) ของสารสกัดหยาบจากใบชะอม	27
3.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจากใบชะอม	29
4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	32
บรรณานุกรม	34
ภาคผนวก	36
ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย	56

## สารบัญตาราง (List of Tables)

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลการสกัดหยาบใบชะอมสดและแห้งด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด (น้ำและ 95% เอทานอล)	16
ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน ของสารละลายกรดแกลลิก	17
ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบชะอมจำนวน 4 ตัวอย่าง	18
ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ของสาร trolox ที่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity ที่ได้จากการคำนวณ	19
ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบใบชะอม ที่ความเข้มข้น 1.5625 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity ที่ได้จากการคำนวณ	20
ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity 50%	21
ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1 มิลลิโมลาร์	21
ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและค่า reducing ability ที่ได้จาก การเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ของสารสกัดหยาบจากใบชะอม 4 ตัวอย่าง	22
ตารางที่ 9 ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของสารสกัดหยาบจากใบชะอม 4 ตัวอย่าง ต่อเซลล์ 14 ชนิด	23
ตารางที่ 10 ค่า $\text{IC}_{50}$ ของสารสกัดหยาบจากใบชะอม 4 ตัวอย่าง ต่อเซลล์ 14 ชนิด	26
ตารางที่ 11 ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของสารสกัดหยาบ DE ต่อเซลล์ CCD-786SK	27
ตารางที่ 12 ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดและค่า $\text{IC}_{50}$ ของยา doxorubicin ต่อเซลล์ A375, CaCo-2, HT-29, KB และ NUGC-4	27



## สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 13 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ DE ในเซลล์ CaCo-2 และ HT-29	28
ตารางที่ 14 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร quercetin ในเซลล์ CaCo-2 และ HT-29	29
ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของสารละลายไนตริกออกไซด์มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0 – 80 ไมโครโมลาร์	30
ตารางที่ 16 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบ DE และสาร quercetin ในเซลล์ RAW 264.7	31

## สารบัญภาพ (List of Illustration)

	หน้า
รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0 ถึง 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	18
รูปที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร trolox และค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity	19
รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1 มิลลิโมลาร์	22
รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายไนตริกออกไซด์มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 – 80 ไมโครโมลาร์	30

**คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)**

%	percent
FBS	fetal bovine serum
PS	percent survival
IC <sub>50</sub>	inhibit concentration 50%
FU	fluorescence unit
LPS	lipopolysaccharide
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt dehydrate
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT)
NSS	normal saline sterile
DMSO	dimethyl sulfoxide
PBS	phosphate buffer saline
DCFH-DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
ABAP	2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride

# 1. บทนำ (Introduction)

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากรายงานสถิติอัตราการเสียชีวิตจากโรคสำคัญในปี พ.ศ. 2542-2554 พบว่าสาเหตุอันคับหนึ่ของการเสียชีวิตเกิดจากโรคมะเร็ง และมีอัตราเพิ่มขึ้นทุกปี โดยมีจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นทุกปีโดยมีอัตราเฉลี่ยในปี 2542-2554 เพิ่มขึ้นโดยประมาณคิดเป็นร้อยละ 69 จากจำนวนผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งทั้งหมด สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดมะเร็ง คือ สารอนุมูลอิสระ ซึ่งสารอนุมูลอิสระยังทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตมากขึ้นโดยทำให้โครโมโซมแตกตัวและไปทำลายดีเอ็นเอ (Mayne และคณะ, 1994) จากการศึกษาพบว่า สารพฤกษเคมี (phytochemicals) ต่างๆ ที่มีในพืชผักที่บริโภคประจำวัน มีบทบาทในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระคือ สามารถไปยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดจากกระบวนการการเมตาบอลิซึม (metabolism) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยพบว่ากลไกในการต้านสารอนุมูลอิสระที่เกิดจากปัจจัยทั้งภายในและภายนอก ร่างกายมีหลายแบบ ได้แก่ การดักจับอนุมูลอิสระโดยตรง (scavenge) กลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่เสถียรกว่า ทำให้สามารถหยุดวงจรการเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ได้ (Denisov และคณะ, 2005) การยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับกับโลหะ เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Sies, 1991) สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ ดังนั้นบทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆของมนุษย์ ได้แก่ โรคมะเร็ง ความดันโลหิตสูง เบาหวาน รูมาตอยด์ (Cornish และ Garbary, 2010) จากการศึกษาข้อมูลพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติได้รับความสนใจและมีการศึกษากันมากในปัจจุบัน เนื่องจากปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารที่ได้จากการสังเคราะห์ โดยสารประกอบในพืชที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโทน (xanthone) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ ขึ้นไป โดยมีบทบาทในการจับอนุมูลอิสระไม่ให้กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Sanchez-Moreno และคณะ, 2000) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะนำผักพื้นบ้านที่นิยมบริโภคมาศึกษาผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ โดยผักที่จะใช้ในการศึกษาคือ ชะอม เนื่องจากชะอมจัดเป็นผักพื้นบ้านที่ใช้ประกอบอาหารได้หลากหลายประเภท โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Acacia pennata* subsp. *insuavis* (Lace) I.C.Nielsen อยู่วงศ์ Leguminosae อนุวงศ์ Mimosoideae พบว่าพืชในสายพันธุ์นี้มีการนำมาใช้ในการแพทย์พื้นบ้าน เนื่องจากมีการทำงานทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น มีคุณสมบัติด้านการอักเสบ (Dongmo และคณะ, 2005) โดยมีรายงานการพบสารทุติยภูมิ ได้แก่ alkaloids, saponins, polysaccharides, terpenoids, tannins แซนโทน และ flavonoids จาก *Acacia* หลายหลายสายพันธุ์ (Seigler, 2003) โดย *Acacia pennata* Wild. (Mimosaceae) ได้ถูกนำมาใช้รักษาอาการไอ อาการผดผกที่ที่เกิดจากการอักเสบ เช่น ไซซ้ออักเสบ, ปวดศีรษะและการมีไข้ โดยมีการศึกษาถึงผลของสารสกัดจากใบชะอมที่สารสำคัญมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Lactobacillus plantarum* โดยพบสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีเป็นปริมาณมากในสารสกัดจากใบชะอม (Nanasombat และ Teckchuen, 2009) ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาค้นคว้าผลของสารสกัดจากใบชะอมที่มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ

เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนางานวิจัยทางด้านพิษสมุนไพรไทยต้านเซลล์มะเร็ง

### 1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

- เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบชะอมในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ
- เพื่อศึกษาสมบัติของสารสกัดหยาบจากใบชะอมในการมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน

### 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
- คัดเลือกและเก็บตัวอย่างชะอม
- เตรียมสารสกัดหยาบจากใบชะอม
- ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอม
- ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบชะอมในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆโดยเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ โดยวิธี MTT colorimetric assay
- วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง ทำรายงานฉบับสมบูรณ์

### 1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

อนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ เป็นสารที่ประกอบด้วยอิเล็กตรอนซึ่งไม่มีคู่อิเล็กตรอนในวงรอบของอะตอม จึงเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร ส่งผลให้ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่เข้าจับกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่างๆของเซลล์ภายในร่างกาย (Ames และคณะ, 1993) โดยอนุมูลอิสระเป็นตัวการสำคัญในการทำให้เกิดมะเร็งและทำให้เซลล์มะเร็งเจริญได้ดี เนื่องจากอนุมูลอิสระจะทำลายเซลล์และทำให้การทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญเปลี่ยนแปลงไป และการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันสามารถยับยั้งได้ด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ (Halliwell, 2009) การกระตุ้นหรือได้รับสารต่างๆที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดกระบวนการออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย หรือเกิดจากอนุมูลอิสระภายนอกในร่างกาย เช่น การติดเชื้อ, การอักเสบโดยไม่ทราบสาเหตุ, สิ่งแวดล้อมเป็นพิษ หรือการได้รับสารรังสี ถ้าร่างกายได้รับสารเหล่านี้มากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในร่างกาย จะส่งผลให้เพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด โดยสารต้านอนุมูลอิสระนี้จะมีสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ โดยสารนี้มีทั้งที่ได้จากธรรมชาติและสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งจะมีฤทธิ์ในการทำลายอนุมูลอิสระที่ร่างกายได้รับให้เปลี่ยนเป็นสารที่ไม่มีอันตรายต่อเซลล์ภายในร่างกาย จากการศึกษาวิจัยต่างๆ

เกี่ยวกับฤทธิ์และคุณสมบัติของสารต่างๆในพืชผัก พบว่ามีสารช่วยต้านอนุมูลอิสระหลายกลุ่ม ได้แก่ วิตามินซี เบต้าแคโรทีน วิตามินอี ซีลีเนียม ทองแดง สังกะสี แมงกานีส โดยสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในพืชผักสมุนไพรพื้นบ้าน ส่วนมากเป็นสารในกลุ่ม ไบโอฟลาโวนอยด์ และโพลีฟีนอล (ไมตรี, 2543) ซึ่งมีกลไกการยับยั้งทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยสามารถไปทำลายและจับอนุมูลอิสระไม่ให้ทำอันตรายต่อเซลล์ภายในร่างกายได้ จากการศึกษางานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ มีผลการทดสอบที่แสดงให้เห็นว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงจากการเกิดโรคมะเร็ง ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่เป็นแหล่งผลิตพืชผักสมุนไพรพื้นบ้านที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก แต่ยังคงขาดข้อมูลด้านการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของพืชผักสมุนไพรพื้นบ้านอยู่หลายชนิดโดยเฉพาะผักที่นำมาใช้ปรุงอาหาร จากการศึกษาข้อมูลงานวิจัยพบว่า ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในผักในประเทศไทย จำนวน 20 สายพันธุ์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดคือ ผักแพ้ว และชะอม โดยมีปริมาณอยู่ที่ 52 และ 45.3 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง ตามลำดับ (Nanasombat และ Teckchuen, 2009) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบชะอมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและทดสอบความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ เพื่อนำข้อมูลจากการศึกษาไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยทางด้านสารสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่อไป

### 1.5 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

อนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง จึงมีคุณสมบัติเฉพาะคือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ ซึ่งโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายที่ไวต่อการถูกออกซิไดส์ คือ ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์รีเซพเตอร์ สารสื่อประสาท และ ดีเอ็นเอ เนื่องจากสารชีวโมเลกุลเหล่านี้มีอิเล็กตรอน หรืออะตอมไฮโดรเจนที่หลุดง่าย ทำให้ถูกออกซิไดส์ด้วยอนุมูลอิสระส่งผลให้การทำงานของชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป เกิดความบกพร่องหรือถูกทำลายเป็นสาเหตุของการเกิดโรค กลไกสำคัญตัวหนึ่งที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้สมดุลคือ สารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้โดยตรงโดยการให้หรือรับอิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ เพื่อกำจัดอนุมูลอิสระให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (โอภา และคณะ, 2550) กลไกการต้านอนุมูลอิสระแบ่งได้เป็น 2 แบบตามการออกฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ฤทธิ์ป้องกันอนุมูลอิสระ (preventive antioxidant activity) เช่น เอนไซม์และโปรตีนในร่างกาย และฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ (free-radical scavenging antioxidant activity) เช่น วิตามินอี วิตามินซี แอลบูมิน แคโรทีนอยด์ และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Noguchi และ Nikki, 2000) โดยพบว่า ร่างกายมนุษย์มีสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของปริมาณอนุมูลอิสระ หากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินไปจะทำให้สมดุลในร่างกายเสีย ร่างกายจึงจำเป็นต้องได้รับจากสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ส่วนหนึ่งได้มาจากพืชผักที่มนุษย์บริโภค ดังมีงานวิจัยที่ศึกษา การต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างอาหารตามตำรับอาหารผักพื้นบ้าน 6 ตำรับ ของกองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข ได้แก่ แกงขี้เหล็กกับเนื้อวัว, แกงหัวปลีกับซี่โครงหมูใส่ชะอมและใบชะพลู, ผัดผักโขมใส่หมูและกุ้ง, ยำใบบัวบก, แกงคั่วผักกาดหมู และแกงหน่อไม้ใส่ใบย่านาง เมื่อนำตัวอย่างที่สกัดด้วยเอทานอล มาศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม พบว่า สารสกัดตัวอย่างอาหารทั้ง 6 ตำรับ มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ โดยแกงขี้เหล็กกับเนื้อ

ว่ามีฤทธิ์มากที่สุด และมีปริมาณสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 30.09 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม

การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และอนุมูลอิสระในสารสกัดจากผักในเมืองไทยจำนวน 20 สายพันธุ์ พบว่า สารสกัดที่ได้จากใบผักแพ้ว (*Polygonum odoratum*) มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดจากใบชะอม (*Acacia pennata*) โดยมีปริมาณอยู่ที่ 52 และ 45.3 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัดแห้ง ตามลำดับ ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกมีบทบาทสำคัญคือ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการก่อมะเร็งที่ได้รับจากภายนอก โดยประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงแหวนอะโรมาติกและมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ ซึ่งสารกลุ่มสำคัญของสารประกอบนี้ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ โดยมีการนำสารสกัดจากใบผักแพ้วไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ได้แก่ มะเร็งในช่องปาก (KB), มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งปอดขนาดเล็ก (NCI-H187) ผลการทดสอบพบว่า มีผลต่อเซลล์มะเร็งเต้านมในระดับปานกลางโดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 6.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Nanasombat และ Teckchuen, 2009)

ในการศึกษาหาสารประกอบฟีนอลิกในพืชผักสมุนไพรไทยพบว่า มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมอยู่ในช่วง 2.89 ถึง 75.26 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง โดยสารสกัดจากสมุนไพร 3 ลำดับแรกที่มีปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกสูงได้แก่ มะเขือเปราะ (*Solarium xanthocarpum*), กะเพรา (*Ocimum sanctum*) และชะอม (*Acacia pennata*) โดยพบว่าสารสกัดจากชะอมจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 66.48 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง และยังพบว่ามีปริมาณของกรดคาเฟอิก (caffeic acid) สูงที่สุดคือ 23.93 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง โดยกรดคาเฟอิกจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก (Wongsu และคณะ, 2012)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์โดยวิธี CAA assay เป็นการทดสอบทางชีวภาพซึ่งจะแตกต่างจากการทดสอบโดยปฏิกิริยาทางเคมีในหลอดทดลองเพราะจะมีระบบต่างๆภายในเซลล์เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย การทดสอบทำโดยเติมสาร 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) ในเซลล์ที่ใช้ทดสอบ สาร DCFH-DA เมื่อแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ เอนไซม์ esterases ในเซลล์จะตัดส่วน diacetate เปลี่ยนเป็นสาร DCFH เมื่อเซลล์ได้รับสาร 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP) ซึ่งมีความสามารถแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ สาร ABAP ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนและสร้างสารอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ สารเหล่านี้จะไปกระตุ้นให้เซลล์ผลิตอนุมูลอิสระมากขึ้นและทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร DCFH กลายเป็นสาร DCF ซึ่งเป็นสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เมื่อเซลล์ได้รับสารต้านที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้การเรืองแสงลดลง (ดังรูปที่แสดงในภาคผนวก)

การอักเสบ (inflammation) เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อร่างกายเกิดการบาดเจ็บจากการกระทบ หรือได้รับการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย, รา, ไวรัส หรือได้รับอันตรายจากสารเคมี การอักเสบทำให้เกิดอาการ ปวด บวม ผื่นแดง หรือมีไข้ เนื่องจากบริเวณที่อักเสบจะมีการหลั่งสารชักนำการอักเสบ (inflammatory mediator) เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide : NO), พรอสตาแกลนดิน E<sub>2</sub> (prostaglandins E<sub>2</sub>) ไนตริกออกไซด์มีการสร้างจากเซลล์หลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกันและการอักเสบ ได้แก่ เซลล์ macrophages, T lymphocytes, antigen-presenting cell, mast cells, neutrophils และ natural

killer cells และสารไซโตไคน์ (cytokine) ได้แก่ interleukin-1 (IL-1), interleukin-8 (IL-8) และ tumor necrosis factor (TNF)

ในการทดสอบสารที่ออกฤทธิ์ด้านการอักเสบในหลอดทดลอง (in vitro) โดยศึกษาความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ RAW 264.7 ซึ่งเป็นเซลล์ macrophages ของหนู ทำการกระตุ้นเซลล์ให้ผลิตไนตริกออกไซด์ด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide : LPS) ซึ่งเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย สารที่นำมาทดสอบนี้ต้องใช้ความเข้มข้นในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และเลือกความเข้มข้นของสารที่มากที่สุดที่เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดร้อยเปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงทำการเจือจางสารที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์หาปริมาณไนตริกออกไซด์เทียบกับกราฟมาตรฐานไนตริกออกไซด์ จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ และการทดสอบฤทธิ์ของสารด้านการอักเสบโดยวิเคราะห์หาปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เซลล์ผลิตขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS นั้น ระดับความเข้มข้นของสารทดสอบต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์หรือยับยั้งการเจริญของเซลล์ เซลล์ที่ใส่สารทดสอบต้องมีการเจริญใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบ ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจหาการมีชีวิตรอดของเซลล์ (MTT colorimetric assay) คู่กันไปด้วย

#### 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลงานวิจัยสามารถเผยแพร่ในวารสารระดับชาติได้ 1 เรื่อง



## 2. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

### 2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

#### 2.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	Nikon (Japan)
ขวดแก้ว	Boro (Germany)
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 10 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
เครื่องชั่งน้ำหนัก AG204	Mettler Toledo (Switzerland)
เครื่องชั่งน้ำหนัก PG4002-5	Mettler Toledo (Switzerland)
เครื่องปั่นเหวี่ยง	MSE (England)
เครื่องมือนับเซลล์	Boeco (Germany)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Mettler Toledo
เครื่อง Microtiterplate reader	Titertek multiskan (Finland)
จานชนิด 96 หลุมสำหรับเลี้ยงเซลล์	Nunc (Denmark)
จานชนิด 96 หลุมสีดำสำหรับทดสอบ CAA	Nunc (Denmark)
จานชนิด 96 หลุมสำหรับ ELISA	Nunc (Denmark)
ปิเปตแก้ว	HBG (Germany)
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson (France)
ไมโครปิเปต	Biohit (Finland)
ปั๊มสุญญากาศ	Iwaki (Japan)
ตูบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์	Revco, Yamato (Japan)

ตู้ปลอดเชื้อ	Cambrige (Thailand)
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร	Axygen (USA)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Udono-RII (Japan)
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร	Nunc (Denmark)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	Memmert (Germany)
เครื่อง microplate reader Synergy™ HT	BioTex (South Korea)

### 2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
aminopterin	Sigma-Aldrich	USA
2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP)	Acros Organics	USA
butanol	Merck	Germany
2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich	USA
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich	USA
diethyl ether	Sigma-Aldrich	USA
dimethyl sulfoxide (DMSO)	Fluka	Switzerland
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	USA
DMEM medium	Biochrom GmbH	Germany
ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich	USA
fetal bovine serum	Invitromex	USA
Folin & Ciocalteu's phenol reagent	Sigma-Aldrich	USA
gallic acid monohydrate	Sigma-Aldrich	USA
glacial acetic acid	Merck	Germany
D-glucose	Sigma-Aldrich	USA
L-glutamine	Sigma-Aldrich	USA

Griess reagent		
hydrochloric acid	Sigma-Aldrich	USA
hypoxanthine	Sigma-Aldrich	USA
(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox)	Sigma-Aldrich	USA
iron(III) chloride hexahydrate	Sigma-Aldrich	USA
iron(III) sulfate heptahydrate	Sigma-Aldrich	USA
lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich	USA
methanol	BDH	England
normal saline sterile (NSS)	GHP Co.Ltd.	Thailand
penicillin G	Sigma-Aldrich	USA
phenol red	Sigma-Aldrich	USA
potassium chloride	Sigma-Aldrich	USA
potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma-Aldrich	USA
di-potassium hydrogen phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Sigma-Aldrich	USA
quercetin	Sigma-Aldrich	USA
RPMI 1640 medium	Invitromex	USA
sodium acetate trihydrate	Sigma	USA
sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ )	Sigma-Aldrich	USA
sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Sigma-Aldrich	USA
sodium chloride ( $\text{NaCl}$ )	Merck	Germany
sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Carlo erba	USA
di-sodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck	Germany
sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ )	Merck	Germany
sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ )	Sigma-Aldrich	USA
sodium pyruvate	Sigma-Aldrich	USA
sterile water	General Hospital Products	Thailand
Streptomycin	Sigma-Aldrich	USA
2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)	Fluka	Switzerland

trypsin

Sigma-Aldrich

USA

### 2.1.3 เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

เซลล์ที่ใช้เป็น cell lines จาก American Type Culture Condition (ATCC) ได้แก่ เซลล์ ดังต่อไปนี้

A375	malignant melanoma, human	ATCC No. CRL-1619
BT474	ductal carcinoma, breast, human	ATCC No. HTB 20
CaCo-2	colon, colorectal adenocarcinoma	Cell Lines Service
CCD-986SK	skin fibroblast	ATCC No. CRL-1947
Chago-K1	lung undifferentiated, human	National Cancer Institute
Hep-G2	liver hepatoblastoma, human	ATCC No. HB 8065
HT-29	colon colorectal adenocarcinoma	ATCC No. HTB-38
KATO-III	gastric carcinoma, human	ATCC No. HTB 103
KB	cervix carcinoma, human	Cell Lines Service
MCF-7	adenocarcinoma, breast, human	ATCC No. HTB 22
MCF-10A	mammary gland, breast, human	ATCC No. CRL 10317
MDA-MB-231	breast adenocarcinoma, human	ATCC No. HTB 26
NUGC-4	gastric cancer, human	Japan
SW620	colon adenocarcinoma, human	ATCC No. CCL 227
WI-38 VA-13 2RA	lung fibroblast, human	Cell Lines Service

## 2.2 คัดเลือกและเก็บตัวอย่างใบชะอม

ทำการคัดเลือกเก็บตัวอย่างใบชะอมจากแหล่งที่ปลูกเพื่อจำหน่าย (อ.วิเศษชัยชาญ จ.อ่างทอง) โดยเก็บช่วงฤดูฝน เวลา 06.00 - 09.00 น. เนื่องจากฤดูฝนช่วงเช้า ใบ ดอกลูกและผล ได้รับความชื้นหรือน้ำค้างมีความชุ่มชื้นอยู่เสมอ สรรพคุณจึงรวมอยู่ที่ ใบ ดอกและลูก (ปราโมทย์, 2524) ทำการคัดเลือกชะอมที่มีลักษณะที่สมบูรณ์ แข็งแรง ไม่เป็นโรค นำไปล้างด้วยน้ำสะอาด โดยการไหลผ่านน้ำ ฝั่งให้สะอาดน้ำเลือกเอาเฉพาะใบ แยกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่จะนำไปสกัดแบบใบสด และส่วนที่จะสกัดแบบใบแห้ง โดยนำส่วนที่สกัดแบบใบแห้งไปอบที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อใบชะอมแห้งดีแล้ว นำมาบดให้ละเอียดเก็บใบชะอมใส่ภาชนะบรรจุที่ปิดฝาสนิท และเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้นเพื่อนำไปใช้ในการสกัดต่อไป

## 2.3 เตรียมสารสกัดหยาบจากใบชะอม

สารสกัดหยาบที่จะเตรียมมี 2 รูปแบบ คือ

### 2.3.1 สารสกัดหยาบจากใบชะอมสด

นำใบชะอมสดมาบดละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้น ชั่งน้ำหนักใบชะอมสด 10 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ น้ำ และ 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:3 (กรัมต่อปริมาตร) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman เก็บส่วนสารละลายไว้ในตู้เย็น ส่วนกากใบชะอมที่เหลือในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลายลงไป ในอัตราส่วน 1:2 (กรัมต่อปริมาตร) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสกัดซ้ำ จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman และนำไปรวมกับสารละลายที่สกัดในครั้งแรก จากนั้น นำสารละลายไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (น้ำ), 60 องศาเซลเซียส (95% เอทานอล)

### 2.3.2 สารสกัดหยาบจากใบชะอมแห้ง

นำใบชะอมแห้งที่อบตามวิธีในข้อ 2.2 มาชั่งน้ำหนักใบชะอมแห้ง 2 กรัม ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายที่ใช้สกัด โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ น้ำ และ 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:3 (กรัมต่อปริมาตร) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman เก็บส่วนสารละลายไว้ในตู้เย็น ส่วนกากใบชะอมที่เหลือในหลอดทดลอง เติมตัวทำละลายลงไป ในอัตราส่วน 1:2 (กรัมต่อปริมาตร) เขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสกัดซ้ำ จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman และนำไปรวมกับสารละลายที่สกัดในครั้งแรก จากนั้น นำสารละลายไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (น้ำ), 60 องศาเซลเซียส (95% เอทานอล)

## 2.4 วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric

### method

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเป็นการทดสอบเพื่อดูว่าตัวอย่างมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นส่วนประกอบหรือไม่ โดยสารประกอบฟีนอลิกจะให้โอเล็กตรอนแก่ Folin & Ciocalteu's phenol reagent เปลี่ยนให้อยู่ในรูป reduced form (รับอิเล็กตรอน) ทำให้เกิดสารละลายสีน้ำเงินขึ้น

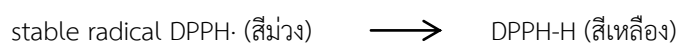
การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ทำตามวิธีของออร์วัสลาและคณะ (2555) โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐานโดยเตรียมกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอล และใช้สารสกัดหยาบจากใบชะอมที่ความเข้มข้น 5000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เติมน้ำตัวอย่างและสารมาตรฐานลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง) จากนั้นเติมน้ำ Folin & Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในหลอด ผสมให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมน้ำ 7.5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำ DI (deionized water) ปริมาตร 560 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

## 2.5 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอม

### 2.5.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-

#### picrylhydrazyl) assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay เป็นวิธีทดสอบที่ใช้กันทั่วไปในการศึกษาปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้เร็ว โดยเป็นการดูความสามารถของสารตัวอย่างในการให้อิเล็กตรอนแก่ DPPH radical (stable radical) ซึ่งจะทำให้ radical หายไป โดยจะทำให้สารละลายเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเร็วหรือเหลืองมาก แสดงว่าสารตัวอย่างมีสารต้านอนุมูลอิสระมากหรือมี scavenging effect ดี) วิธีนี้เหมาะสำหรับใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างที่มีการเกิดอนุมูลอิสระในสารสังเคราะห์บริสุทธิ์, สารสกัดหยาบจากพืชและอาหาร ที่สำคัญคือ DPPH assay จะเกิดปฏิกิริยาเฉพาะกับ free radical scavenging effect แต่จะไม่เกิดปฏิกิริยากับ pro-oxidant activity (Amarowicz และคณะ, 2004)



การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี DPPH assay ทำโดยดัดแปลงจากวิธีของ Fukumoto และ Mazza (2000) โดยการทดสอบจะทำใน 96-well plate และทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง โดยมีสาร

(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchromane-2-carboxylic acid (trolox) เป็นสารเปรียบเทียบเทียบ โดยใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.001 ถึง 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบชะอมใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity จากสูตร และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity เพื่อคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity ที่ 50%

$$\text{เปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity} = 100 \times [1 - (A_E / A_D)]$$

$A_E$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เมื่อมีการเติมสารตัวอย่าง

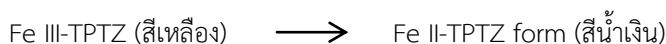
$A_D$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH เมื่อไม่มีการเติมสารตัวอย่าง

วิธีวิเคราะห์เริ่มจากเติมสารที่ต้องการทดสอบปริมาตร 22 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบของ 96-well plate จากนั้นเติมสารละลาย 150 ไมโครโมลาร์ DPPH ที่ละลายใน 80% เมทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงในหลุม เขย่าเพลาให้สารละลายผสมกัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

## 2.5.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี FRAP (ferric

reducing/antioxidant potential) assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับวัด total antioxidant levels ในตัวอย่างที่ง่ายและเสียค่าใช้จ่ายน้อย โดยใช้การเกิดปฏิกิริยา reducing ของสารต้านอนุมูลอิสระที่จะเกิดปฏิกิริยากับ ferric tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) แล้วให้อิเล็กตรอน จะทำให้สีเหลืองของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินของ ferrous tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) ถ้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเร็วหรือเข้มมากแสดงว่าสารตัวอย่างมีสารต้านอนุมูลอิสระมาก หรือมี reducing ability มาก (Benzie และ Strain, 1996, Benzie และ Strain, 1999, Prior และ Cao, 1997) โดยใช้การเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คือ สารละลาย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 62.5, 125, 250, 500 และ 1000 ไมโครโมลาร์ และใช้ FRAP reagent (ภาคผนวก) ในการทดสอบ



โดยการทดสอบจะทำใน 96-well plate และทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง เริ่มจากเติมสารที่ต้องการทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบของ 96-well plate จากนั้นเติม FRAP reagent ปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงในหลุม เขย่าเพลาให้สารละลายผสมกัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อดูศักยภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่ทำการทดสอบ

## 2.6 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยเปรียบเทียบกับ

### เซลล์ปกติโดยวิธี MTT colorimetric assay

Mosmann (1983) เป็นคนแรกที่ได้นำวิธี MTT colorimetric cytotoxicity assay มาใช้ตรวจเซลล์มีชีวิตและการเจริญของเซลล์ โดยดูผลของการใช้เอนไซม์ succinate dehydrogenase จากไมโทคอนเดรีย ย่อยสลายสาร tetrazolium salt MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] ทำให้เกิดสาร formazan ซึ่งมีสีฟ้า โดยทดสอบบนหลุม 96-well microtiter plate และวัดผลโดยใช้ spectrophotometer แบบอัตโนมัติ ดูการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด ให้ผลเร็ว และปลอดภัยกว่าวิธีที่ใช้สารกัมมันตรังสี

#### 2.6.1 การเตรียมเซลล์ที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเซลล์ใน tissue culture flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่ผสม 5% fetal bovine serum (FBS) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ไร่ประมาณ 3 วัน (มีเซลล์  $2 - 4 \times 10^6$  เซลล์/ขวด) จากนั้นดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติม 0.05% trypsin + 0.01% EDTA ปริมาตร 0.5 – 1 มิลลิลิตร บ่มไว้จนเซลล์หลุดใช้เวลาประมาณ 2 – 5 นาที ดู trypsin ทั้ง เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เคาะให้เซลล์หลุด เจือจางให้เซลล์มีความเข้มข้น  $5 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microtiter plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม (ปริมาณเซลล์  $5 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุมต่อ 200 ไมโครลิตร)

#### 2.6.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT colorimetric assay

เตรียมสารที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายใน DMSO โดยการหาค่า  $IC_{50}$  จะทำการเจือจางสารที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้น 500, 50, 5, 0.5 และ 0.05 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารละลาย MTT โดยชั่ง MTT โดยเจือจาง MTT ใน normal saline sterile (NSS) ให้มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายจนหมด ไม่ให้มีตะกอน (เก็บไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้ 1 เดือน)

ทำการเลี้ยงเซลล์  $5 \times 10^3$  เซลล์ต่อหลุม (จากข้อ 2.6.1) บ่มไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (1 วัน) จากนั้นเติมสารที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ (จากข้อ 2.6.2) ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อหลุม (1:100 สารเจือจาง 100 เท่า) บ่มไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (3 วัน) จากนั้นเติมสารละลาย MTT (จากข้อ 2.6.3) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วเติม 100% DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าบน plate mixer ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 3-5 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (จากข้อ 2.6.4) นำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีการรอด 50 เปอร์เซ็นต์ หรือหาค่า  $IC_{50}$  (inhibit concentration 50%)



คำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (percent survival, PS) =  $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงหลุมที่ใส่สารทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ}} \times 100$

ค่าการดูดกลืนแสงหลุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ

## 2.7 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ (cellular antioxidant activity assay; CAA assay) ของสารสกัด

### หยาบจากใบชะอม

ทดสอบโดยเลี้ยงเซลล์ CaCo-2 และ HT-29 ในอาหาร RPMI1640 ที่เติม FBS 5 เปอร์เซ็นต์, penicillin 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้น

ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเซลล์โดยเลี้ยงเซลล์ในงานชนิด 96 หลุม สีดำให้เซลล์มีจำนวน  $6 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุมในอาหารเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร เลี้ยงเซลล์ไว้นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเก่าในหลุมทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 1 ครั้ง เติมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆที่เจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ต่อหลุม โดยมีสาร quercetin เป็นตัวควบคุมบวก และเติม DCFH-DA เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์นาน 1 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง เติม ABAP เข้มข้น 600 ไมโครโมลาร์ เจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำไปวัดค่าการเรืองแสง (fluorescence unit, FU) ด้วยเครื่อง microplate reader Synergy™ HT วัดที่ความยาวคลื่น 538 nm (emission wavelength) และความยาวคลื่น 485 nm (excitation wavelength) ทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลุมควบคุมเติม DCFH-DA และ ABAP ไม่เติมสารทดสอบ มีค่าการเรืองแสงสูงสุด (เนื่องจากไม่มีการยับยั้งปฏิกิริยาของ ABAP และ DCFH-DA) หลุม blank เติมเฉพาะ DCFH-DA ไม่เติม ABAP มีค่าเรืองแสงต่ำ (เนื่องจากไม่มีสารผลิตภัณฑ์อนุมูลอิสระ) และการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเซลล์นั้น ระดับความเข้มข้นของสารทดสอบต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์หรือยับยั้งการเจริญของเซลล์ เซลล์ที่ใส่สารทดสอบต้องมีการเจริญใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบ ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจหาการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT colorimetric assay คู่กันไปด้วย โดยจะทำการเตรียมเซลล์และเติมสารตัวอย่างในสภาวะเดียวกัน

คำนวณ CAA unit = เปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระ =  $[1 - (\text{FU หลุมสารทดสอบ} / \text{FU หลุมควบคุม})] \times 100$

FU = fluorescence units ได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟจากการวัดทุกๆ 5 นาที เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง (data analysis software)

## 2.8 ทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจากใบชะอวม

เตรียมเซลล์ RAW 264.7 เพื่อการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารโดยเตรียมเซลล์เข้มข้น  $8 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมน้ำเซลล์ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในงานเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 วัน

เติมน้ำทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม ในสภาวะที่มีและไม่มี LPS เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลุมไปวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ โดยดูดอาหารปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย griess ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นของไนตริกออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์เทียบกับกราฟมาตรฐานโซเดียมไนเตรต ( $\text{NaNO}_2$ ) ที่ความเข้มข้น 0 - 80 ไมโครโมลาร์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของสารทดสอบ โดยเปรียบเทียบกับการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่เติม LPS เพียงอย่างเดียว ใช้สาร quercetin เป็นสารควบคุมแบบบวกในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์

$$\text{คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์} = [(A - B)/A] \times 100$$

A = ปริมาณไนตริกออกไซด์หลุมที่กระตุ้นเซลล์ด้วย LPS

B = ปริมาณไนตริกออกไซด์หลุมที่กระตุ้นเซลล์ด้วย LPS และ

เติมน้ำทดสอบ

### 3. ผลการวิจัย (Results)

#### 3.1 ผลการคัดเลือกและเก็บตัวอย่างใบชะอม

ทำการเก็บตัวอย่างใบชะอมจากแหล่งที่ปลูกเพื่อจำหน่าย คือ อำเภอวิเศษชัยชาญ จังหวัดอ่างทอง ในวันที่ 27 ม.ค. 2560 และนำมาเก็บไว้ในห้องเย็น 1 คืน วันรุ่งขึ้นจึงนำใบชะอมทั้งหมดมาล้างให้สะอาดน้ำ ทำการเด็ดและชอยยุดอ่อนและใบจากกิ่งชะอมทั้งหมด น้ำหนักรวม 19.1 กิโลกรัม จะได้ส่วนเฉพาะใบชะอม น้ำหนัก 7.42 กิโลกรัม คิดเป็น 38 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักทั้งหมด และแบ่งใส่ถุง 220 กรัม เก็บไว้ใน -70 องศาเซลเซียส สำหรับใช้เตรียมสารสกัดหยาบจากใบชะอมสด ส่วนใบชะอมสดที่เหลืออีก 7.2 กิโลกรัมนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดละเอียดจะได้ผงชะอมแห้ง 1.56 กิโลกรัม คิดเป็น 21.7 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น จนกว่าจะนำมาใช้ในการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบชะอมแห้งต่อไป

#### 3.2 ผลการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบชะอม

สำหรับตัวอย่างน้ำหนักใบชะอมสดจะใช้ประมาณ 10 กรัม ส่วนตัวอย่างใบชะอมแห้งใช้ประมาณ 2 กรัม (เนื่องจากใบชะอมสดเมื่อนำไปอบแห้งจะมีน้ำหนักลดลงเหลือประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเริ่มต้น) โดยการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบชะอมจะใช้ตัวทำละลายที่สกัด 2 ชนิด คือ น้ำและ 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:3 (กรัมต่อปริมาตร) ในการสกัดครั้งแรก และใช้อัตราส่วน 1:2 (กรัมต่อปริมาตร) ในการสกัดซ้ำ จากนั้นนำสารละลายทั้ง 2 ครั้ง มารวมกัน จากนั้นนำสารละลายไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (น้ำ), 60 องศาเซลเซียส (95% เอทานอล) จากการทดลอง พบว่า เมื่อใช้ตัวทำละลายในการสกัดคือ น้ำ จะได้น้ำหนักของสารสกัดหยาบที่มากกว่าการใช้ 95% เอทานอลสกัดทั้งใบชะอมสดและแห้ง ดังแสดงน้ำหนักของสารสกัดหยาบจากใบชะอมในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการสกัดหยาบใบชะอมสดและแห้งด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด (น้ำและ 95% เอทานอล)

ใบชะอมสด (10 กรัม)				ใบชะอมอบแห้ง (2 กรัม)			
สกัดด้วยน้ำ		สกัดด้วย 95% เอทานอล		สกัดด้วยน้ำ		สกัดด้วย 95% เอทานอล	
ปริมาตรรวมของสารสกัด 2 ครั้ง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก (กรัม)	ปริมาตรรวมของสารสกัด 2 ครั้ง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก (กรัม)	ปริมาตรรวมของสารสกัด 2 ครั้ง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก (กรัม)	ปริมาตรรวมของสารสกัด 2 ครั้ง (มิลลิลิตร)	น้ำหนัก (กรัม)
47	0.9384	35	0.6578	40	0.8825	39	0.4679

จากนั้น เตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยเตรียมให้ได้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำสารละลายไปเซนติฟิวจ์เพื่อตกตะกอนส่วนที่ไม่ละลายก่อนนำส่วนใสมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมและทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในขั้นต่อไป โดยกำหนดรหัสของสารละลายตัวอย่างเป็น

FH (fresh, H<sub>2</sub>O) = ใบชะอมสดสกัดด้วยน้ำ, FE (fresh, 95% ethanol) = ใบชะอมสดสกัดด้วย 95% เอทานอล

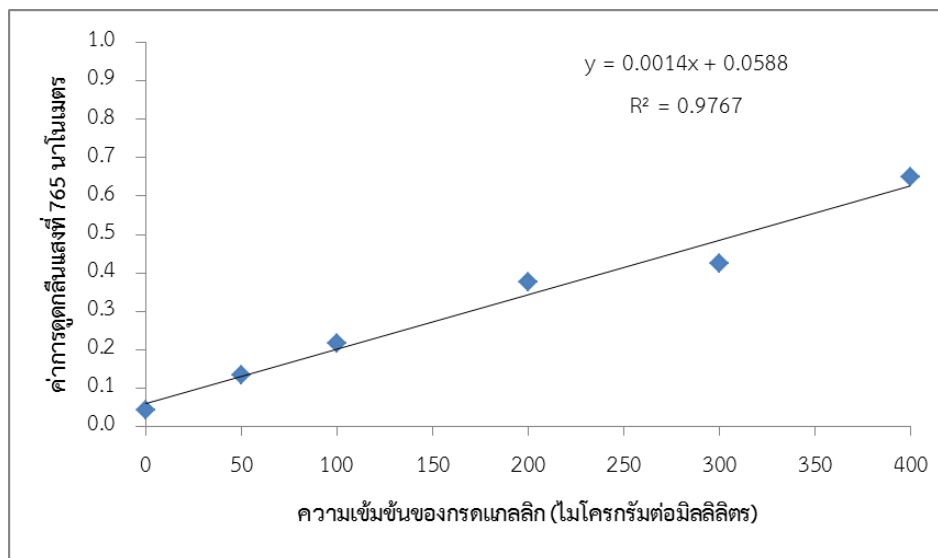
DH (dry, H<sub>2</sub>O) = ใบชะอมแห้งสกัดด้วยน้ำ, DE (dry, 95% ethanol) = ใบชะอมแห้งสกัดด้วย 95% เอทานอล

### 3.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบจากใบชะอม

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐานโดยเตรียมกราฟมาตรฐานที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเมทานอล ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2 และ รูปที่ 1 จากนั้นทำการเจือจางสารสกัดหยาบจากใบชะอมให้ได้ความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า ตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบชะอมทั้ง 4 ตัวอย่างคือ FH, FE, DH และ DE มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 40.17, 33.74, 41.17 และ 53.65 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัดหยาบใบชะอม ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก

ความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.042	0.042	0.042	0.042
50	0.131	0.135	0.133	0.133
100	0.215	0.219	0.217	0.217
200	0.373	0.374	0.379	0.375
300	0.423	0.428	0.424	0.425
400	0.641	0.644	0.664	0.650



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0 ถึง 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบชะอมจำนวน 4 ตัวอย่าง

สารสกัดหยาบ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร				ปริมาณฟีนอลิกรวม ต่อ 5 มิลลิกรัมสารสกัด (ไมโครกรัม)	ปริมาณฟีนอลิกรวม ต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัด (ไมโครกรัม)
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย		
FH	0.331	0.344	0.345	0.340	200.86	40.17
FE	0.292	0.298	0.295	0.295	168.71	33.74
DH	0.343	0.353	0.345	0.347	205.86	41.17
DE	0.428	0.438	0.437	0.434	268.24	53.65

### 3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอม

#### 3.4.1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี DPPH assay

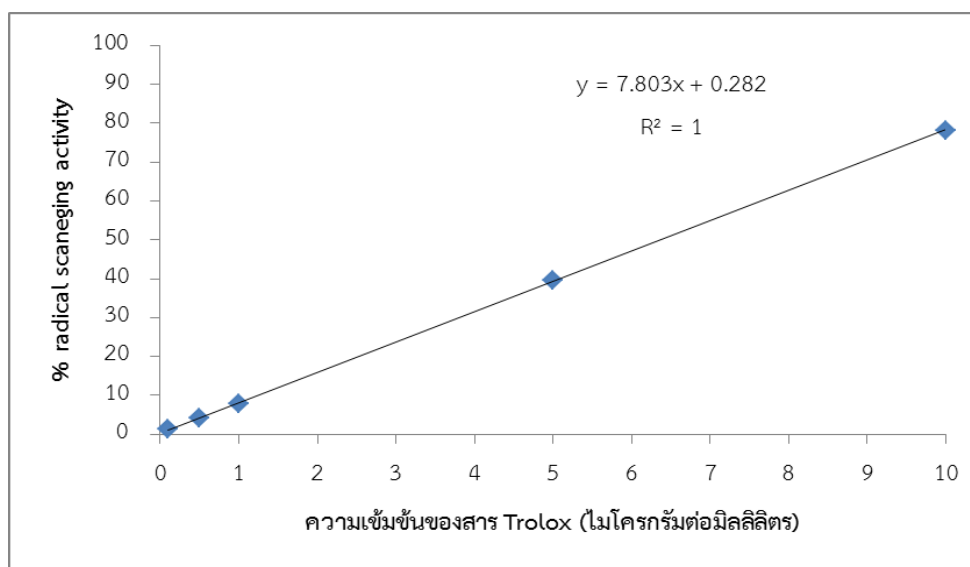
การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี DPPH assay จะทำใน 96-well plate และทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง โดยมีสาร (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchromane-2-carboxylic acid (trolox) เป็นสารเปรียบเทียบเทียบ โดยใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบชะอมใช้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity จากสูตร (ข้อ 2.5.1) และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารกับค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity

activity ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 2 เพื่อนำสมการมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity 50 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay ของสารสกัดหยาดจากใบชะอมทั้ง 4 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 โดยสามารถหาค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่มีเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity 50 เปอร์เซ็นต์ ของ trolox และสารสกัดหยาดจากใบชะอมทั้ง 4 ตัวอย่างคือ FH, FE, DH และ DE ได้เท่ากับ 0.06, 3.91, 7.80, 4.13 และ 19.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ของสาร trolox ที่ความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า

เปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity ที่ได้จากการคำนวณ

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร				ค่า เปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity
		1	2	3	เฉลี่ย	
trolox	0.1	0.576	0.578	0.580	0.578	1.20
	0.5	0.558	0.560	0.566	0.561	4.05
	1	0.537	0.536	0.542	0.538	7.98
	5	0.372	0.354	0.336	0.354	39.49
	10	0.159	0.117	0.106	0.127	78.23
80% ethanol	0	0.587	0.582	0.585	0.585	0.00



รูปที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร trolox และค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity

ตารางที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ของสารสกัดหยาบใบชะอม ที่ความเข้มข้น 1.5625 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิเมตร และค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity ที่ได้จากการคำนวณ

สารสกัดหยาบ ใบชะอม	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร				ค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity
		1	2	3	เฉลี่ย	
FH	1.56	0.447	0.437	0.442	0.442	23.92
	3.13	0.314	0.312	0.307	0.311	46.47
	6.25	0.197	0.146	0.150	0.164	71.72
	12.50	0.105	0.111	0.108	0.108	81.41
	25	0.122	0.123	0.124	0.123	78.83
H <sub>2</sub> O	0	0.583	0.581	0.578	0.581	0.00
FE	1.56	0.481	0.488	0.479	0.483	17.21
	3.13	0.433	0.432	0.421	0.429	26.47
	6.25	0.310	0.284	0.290	0.295	49.46
	12.50	0.177	0.178	0.175	0.177	69.70
	25	0.265	0.280	0.283	0.276	52.66
95% ethanol	0	0.587	0.583	0.578	0.583	0.00
DH	1.56	0.447	0.444	0.445	0.445	23.35
	3.13	0.343	0.331	0.327	0.334	42.57
	6.25	0.170	0.177	0.177	0.175	69.94
	12.50	0.114	0.115	0.115	0.115	80.26
	25	0.143	0.143	0.142	0.143	75.44
H <sub>2</sub> O	0	0.583	0.581	0.578	0.581	0.00
DE	3.13	0.478	0.477	0.473	0.476	18.35
	6.25	0.418	0.412	0.411	0.414	29.05
	12.50	0.317	0.314	0.306	0.312	46.43
	25	0.252	0.260	0.254	0.255	56.20
	50	0.486	0.508	0.483	0.492	15.55
95% ethanol	0	0.587	0.583	0.578	0.583	0.00

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่เปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity 50%

สารตัวอย่าง	ความเข้มข้นของสารที่เปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity 50% (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
trolox	0.06
FH	3.91
FE	7.80
DH	4.13
DE	19.24

### 3.4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี FRAP assay

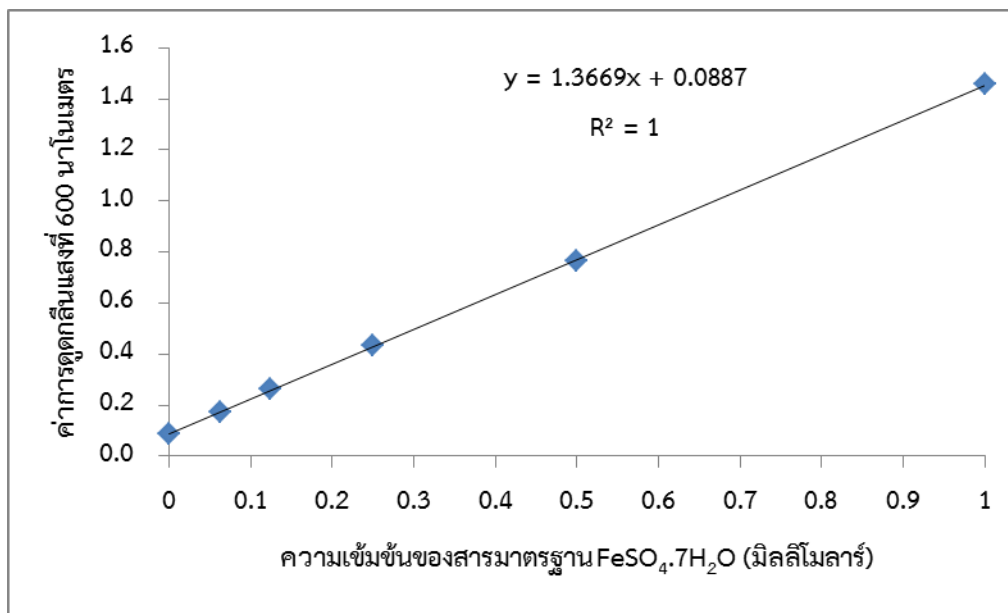
ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay โดยจะทำใน 96-well plate และทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อ 1 ตัวอย่าง โดยใช้การเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คือ สารละลาย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ ได้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 3 และทำการเจือจางตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบชะอมให้อยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ได้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่า สารสกัดหยาบจากใบชะอมทั้ง 4 ตัวอย่างคือ FH, FE, DH และ DE มีค่า reducing ability เท่ากับ 5.09, 4.10, 5.01 และ 2.91 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ตารางที่ 7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของสารละลาย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1

มิลลิโมลาร์

ความเข้มข้นของสารละลาย $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (มิลลิโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
0	0.088	0.089	0.090	0.089
0.06	0.172	0.176	0.173	0.174
0.13	0.259	0.259	0.264	0.261
0.25	0.430	0.434	0.433	0.432
0.50	0.771	0.768	0.763	0.767
1	1.466	1.451	1.455	1.457





รูปที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลาย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและค่า reducing ability ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟ

มาตรฐานสารละลาย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ของสารสกัดหยาบจากใบชะอม 4 ตัวอย่าง

สารสกัดหยาบ จากใบชะอม	dilution	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร				ค่า reducing ability (มิลลิโมลาร์)	ค่าเฉลี่ย (มิลลิโมลาร์)
		1	2	3	เฉลี่ย		
FH	1:20	0.443	0.447	0.461	0.450	5.17	5.09
	1:10	0.769	0.791	0.808	0.789	5.01	
FE	1:10	0.608	0.706	0.714	0.676	4.20	4.10
	1:5	1.147	1.230	1.242	1.206	3.99	
DH	1:20	0.429	0.453	0.456	0.446	5.10	5.01
	1:10	0.750	0.784	0.794	0.776	4.91	
DE	1:10	0.468	0.520	0.526	0.505	2.97	2.91
	1:5	0.819	0.919	0.922	0.887	2.85	

### 3.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆโดยวิธี MTT colorimetric assay ของ

#### สารสกัดหยาบจากใบชะอม

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบชะอมในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ โดยมียา doxorubicin ซึ่งเป็นยาที่สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ สามารถทำได้โดยเลี้ยงเซลล์ไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย MTT ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วเติม 100% DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าบน plate mixer ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 3-5 นาที ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และทำการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ นำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้น คำนวณหาความเข้มข้นของสารที่ทำให้ยับยั้งการเจริญของเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือค่า IC<sub>50</sub> (inhibit concentration 50%)

ผลการทดสอบหาค่า percent survival (PS) ดังแสดงในตารางที่ 9 จากนั้นคำนวณหาค่า IC<sub>50</sub> ได้ดังแสดงในตารางที่ 10 จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบจากใบชะอมที่สกัดด้วยน้ำคือ FH และ DH มีค่า IC<sub>50</sub> ต่อเซลล์ทั้ง 14 ชนิดมากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบจากใบชะอมที่สกัดด้วย 95% เอทานอลคือ FE และ DE นั้น มีค่า IC<sub>50</sub> แตกต่างกันไป โดยสารสกัดหยาบ FE มีฤทธิ์ทำลายเซลล์สูงรวมทั้งทำลายเซลล์ปกติ คือ เซลล์ MCF-10A และ WI-38 ที่เป็นเซลล์ไฟโบรบลาส ส่วนสารสกัดหยาบ DE มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีได้แก่ เซลล์ A375, KB, HT-29, NUGC-4 และ CaCo-2 โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 24.8, 35.2, 37.3, 38.5 และ 45.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ เซลล์มะเร็ง MDA-MB-231, BT474, Hep-G2 และ KATO-III มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 122.7, 276.1, 280.2 และ 290.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่จะมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็ง Chago-K1 และ MCF-7 ได้น้อยคือมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 478.5 และ 483.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ทำลายเซลล์ไฟโบรบลาสน้อยมาก ได้แก่ เซลล์ MCF-10A และ WI-38 โดยมีค่า IC<sub>50</sub> ที่สูงคือมีค่าเท่ากับ 459.7 และ 483.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการสกัดหยาบชะอมแห้งด้วย 95% เอทานอล จะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าการสกัดหยาบชะอมสดและ 95% เอทานอลสามารถสกัดสารได้ดีกว่าน้ำ

ตารางที่ 9 ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของสารสกัดหยาบจากใบชะอม 4 ตัวอย่าง ต่อเซลล์ 14 ชนิด

สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การรอด : PS (%)						
		A375	BT474	CaCo-2	Chago-K1	Hep-G2	HT-29	KATO-III
FH	500	79	63	77	108	88	97	94
	50	82	71	84	117	113	91	104
	5	82	84	81	106	103	100	101



สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การรอด : PS (%)						
		A375	BT474	CaCo-2	Chago-K1	Hep-G2	HT-29	KATO-III
DH	500	89	76	82	100	94	101	96
	50	91	102	99	104	109	101	108
	5	91	107	108	124	107	90	108
	0.5	89	103	101	114	117	89	106
	0.05	92	102	98	112	101	81	95
control	0	100	100	100	100	100	100	100
สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	KB	MCF-7	MCF-10A	MDA MB-231	NUGC-4	SW620	WI-38
DH		73	115	83	73	62	79	89
	50	97	111	95	95	72	93	109
	5	96	110	96	92	85	95	105
	0.5	92	106	104	95	86	94	111
	0.05	89	102	100	101	82	93	111
control	0	100	100	100	100	100	100	100

สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	เปอร์เซ็นต์การรอด : PS (%)						
		A375	BT474	CaCo-2	Chago-K1	Hep-G2	HT-29	KATO-III
DE	500	8	31	18	49	32	10	39
	50	32	97	48	101	97	35	81
	5	91	111	97	120	122	90	100
	0.5	93	94	104	119	120	94	104
	0.05	95	103	109	115	112	95	106
control	0	100	100	100	100	100	100	100
สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	KB	MCF-7	MCF-10A	MDA MB-231	NUGC-4	SW620	WI-38
DE		6	41	46	14	6	39	48
	50	31	99	98	73	43	84	103
DE	5	93	106	103	93	87	95	109

	0.5	98	105	104	98	86	97	104
	0.05	96	107	101	96	99	99	109
control	0	100	100	100	100	100	100	100

ตารางที่ 10 ค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดหยาบจากใบชะอม 4 ตัวอย่าง ต่อเซลล์ 14 ชนิด

สาร/เซลล์	ความเข้มข้นของสารที่ทำให้ยับยั้งการเจริญของเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)						
	A375	BT474	CaCo-2	Chago-K1	Hep-G2	HT-29	KATO-III
FH	> 500	>500	> 500	>500	>500	> 500	>500
FE	50.0	39.4	30.0	52.2	33.7	40.0	47.4
DH	> 500	>500	> 500	>500	>500	> 500	>500
DE	24.8	276.1	45.6	478.5	280.2	37.3	290.8
สาร/เซลล์	KB	MCF-7	MCF-10A	MDA MB-231	NUGC-4	SW620	WI-38
FH	> 500	>500	>500	>500	> 500	>500	>500
FE	26.3	113.2	87.1	13.4	29.4	54.0	45.6
DH	> 500	>500	>500	>500	> 500	>500	>500
DE	35.2	483.3	419.3	122.7	38.5	322.7	459.7

จากนั้นได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากชะอมแห้งและสกัดด้วย 95% เอทานอลกับเซลล์ปกติ CCD-986SK ซึ่งเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสผิวหนังได้ผลดังตารางที่ 11 จากการทดสอบพบว่า สารสกัดหยาบจากชะอมไม่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์ โดยทดสอบสารสกัดหยาบจากชะอมที่ความเข้มข้นสูงสุดคือที่ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ใกล้เคียง 100% และมีค่า IC<sub>50</sub> มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร และเมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ของยา doxorubicin กับเซลล์มะเร็ง A375, CaCo-2, HT-29, KB และ NUGC-4 เปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบจากชะอมจะเห็นว่า ยาทางเคมีจะมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีคือจะมีค่า IC<sub>50</sub> อยู่ในช่วง 1 – 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 11 ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของสารสกัดหยาบ DE ต่อเซลล์ CCD-786SK

สาร/เซลล์	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)	การรอดของเซลล์ : PS (%)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
DE	500	97	90	94 ± 5
	50	88	89	89 ± 1
	5	96	93	95 ± 2
	0.5	98	73	86 ± 18
	0.05	92	124	108 ± 23
	0.005	91	107	99 ± 11
control		100	100	100

ตารางที่ 12 ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดและค่า IC<sub>50</sub> ของยา doxorubicin ต่อเซลล์ A375, CaCo-2, HT-29, KB และ NUGC-4

สาร	conc. (µg/ml)	A375		CaCo-2		HT-29		KB		NUGC-4	
		A <sub>540</sub>	PS	A <sub>540</sub>	PS	A <sub>540</sub>	PS	A <sub>540</sub>	PS	A <sub>540</sub>	PS
doxorubicin	10	0.102	7	0.218	43	0.586	56	0.087	5	0.176	9
	1	0.861	63	0.407	79	0.798	76	1.236	74	1.037	51
	0.1	1.155	84	0.509	99	0.931	88	1.219	73	1.720	85
	0.01	1.219	89	0.553	108	0.922	88	1.508	90	2.031	100
	0.001	1.300	95	0.515	100	0.944	90	1.526	91	2.059	102
control	0	1.370	100	0.513	100	1.053	100	1.676	100	2.023	100
IC <sub>50</sub>		1.1		7.0		10.0		2.2		1.1	

### 3.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ (cellular antioxidant activity assay; CAA assay) ของสาร

#### สกัดหยาบจากใบชะอม

จากนั้นนำสารสกัดหยาบ DE มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ 2 ชนิดคือ CaCo-2 และ HT-29 ซึ่งเป็นมะเร็งลำไส้ โดยมีสาร quercetin เป็นตัวเปรียบเทียบ

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ของสารสกัดหยาบ DE ดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ DE ในเซลล์ CaCo-2 มีค่าเท่ากับ 76.8% ซึ่งสูงกว่าในเซลล์ HT-29 ที่มีค่าเท่ากับ 34.5% ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์นั้น ระดับความเข้มข้นของสารทดสอบต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์หรือยับยั้งการเจริญของเซลล์ เซลล์ที่ใส่สารทดสอบต้องมีการเจริญใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารทดสอบ ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจหาการมีชีวิตรอดของเซลล์ (MTT colorimetric assay) ควบคู่กันไป โดยจะเห็นได้ว่าค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ DE ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร กับเซลล์ CaCo-2 และเซลล์ HT-29 มีค่าประมาณ 100% และ 70% ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร quercetin ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นตัวเปรียบเทียบนั้น (ตารางที่ 14) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประมาณ 80% ทั้งเซลล์ CaCo-2 และ HT-29 และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ CaCo-2 และ HT-29 มีค่าประมาณ 120% จากการทดสอบจะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบ DE ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ CaCo-2 ได้ดีกว่าในเซลล์ HT-29 และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสาร quercetin ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์

ตารางที่ 13 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ DE ในเซลล์ CaCo-2 และ HT-29

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)	CaCo-2		HT-29	
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%)	การรอดของเซลล์ (%)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%)	การรอดของเซลล์ (%)
2000	76.8	110 ± 12	34.5	68 ± 4
1000	39.8	112 ± 13	10.6	72 ± 4
500	22.7	108 ± 4	15.6	77 ± 5
250	16.9	105 ± 5	6.5	83 ± 6
125	15.1	100 ± 6	11.9	82 ± 5
62.5	7.0	105 ± 4	9.4	89 ± 8
31.25	5.6	106 ± 5	3.9	96 ± 3
0	0	100	0	100
IC <sub>50</sub>		> 2000		> 2000

ตารางที่ 14 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร quercetin ในเซลล์ CaCo-2 และ HT-29

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	CaCo-2		HT-29	
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%)	การรอดของเซลล์ (%)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%)	การรอดของเซลล์ (%)
1000	75.3	116 ± 3	78.3	124 ± 7
500	71.7	114 ± 4	73.8	109 ± 11
250	69.4	112 ± 5	73.8	113 ± 7
125	60.4	98 ± 3	60.1	109 ± 3
62.5	49.1	101 ± 4	43.6	102 ± 1
31.25	32.6	105 ± 6	18.0	94 ± 3
0	0	100	0	100
IC <sub>50</sub>		> 2000		> 2000

### 3.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบจากใบชะอม

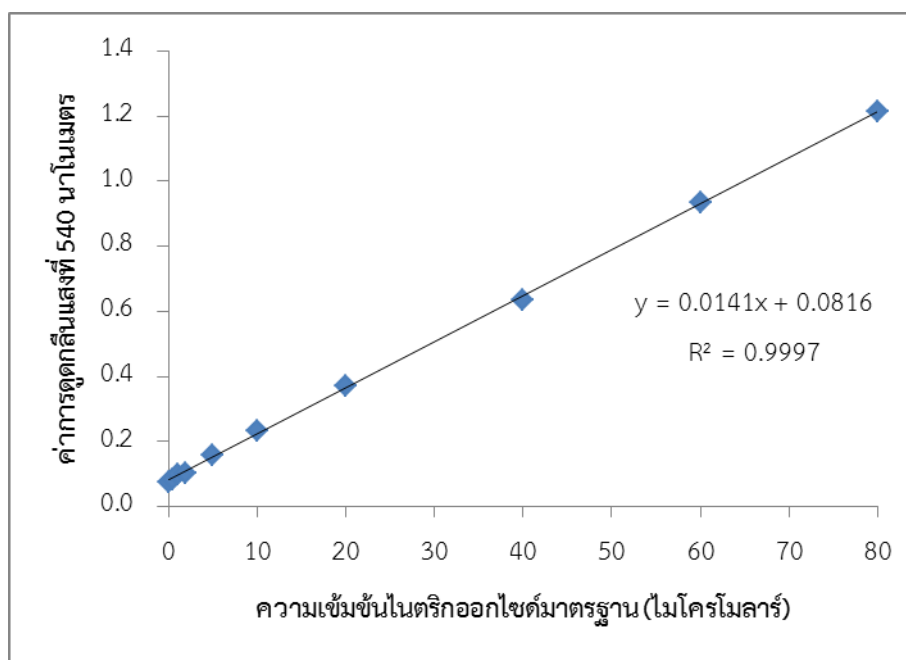
ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหลอดทดลองของสารสกัดหยาบ DE และมีสาร quercetin เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยดูจากความสามารถในการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ของเซลล์ RAW 264.7 ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์ของไนตริกออกไซด์ของสารสกัดหยาบ DE และสาร quercetin ได้จากการคำนวณดังแสดงในตารางที่ 16 โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลายไนตริกออกไซด์มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 – 80 ไมโครโมลาร์ (ตารางที่ 15 และ รูปที่ 4) จากผลการทดสอบ พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ DE ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเท่ากับ 28% โดยการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์นั้น ระดับความเข้มข้นของสารทดสอบต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์หรือยับยั้งการเจริญของเซลล์ เซลล์ที่เติมสารทดสอบต้องมีการเจริญใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ ดังนั้นจึงต้องทำการตรวจหาการมีชีวิตรอดของเซลล์ (MTT colorimetric assay) ควบคู่กันไปด้วย ซึ่งผลจากการทดสอบ พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ DE 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ  $110 \pm 11$  เปอร์เซ็นต์ ส่วนสาร quercetin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์นั้น ผลการทดสอบมีฤทธิ์ต้านการอักเสบเท่ากับ  $76 \pm 3$  เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ  $156 \pm 2$  เปอร์เซ็นต์



ตารางที่ 15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของสารละลายไนตริกออกไซด์มาตรฐานที่ความเข้มข้น

0 – 80 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้นไนตริกออกไซด์มาตรฐาน (ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0	0.076	0.076	0.076
0.5	0.080	0.086	0.083
1	0.088	0.110	0.099
2	0.103	0.103	0.103
5	0.158	0.159	0.159
10	0.234	0.241	0.238
20	0.365	0.372	0.369
40	0.632	0.640	0.636
60	0.928	0.941	0.935
80	1.162	1.264	1.213



รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานของสารละลายไนตริกออกไซด์มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 – 80 ไมโครโมลาร์

ตารางที่ 16 ฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบ DE และสาร quercetin ในเซลล์ RAW 264.7

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	ไนตริกออกไซด์ (%)	ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (%)	การรอดของเซลล์ (%)
สารสกัดหยาบ DE	100	20.5	28	110 ± 11
	50	29.1	-3	95 ± 7
	25	32.6	-16	93 ± 5
	12.5	33.9	-20	88 ± 4
	6.25	39.6	-30	89 ± 5
	3.13	31.6	-12	88 ± 3
	1.56	33.9	-20	93 ± 1
สาร	ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ไนตริกออกไซด์ (%)	ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (%)	การรอดของเซลล์ (%)
quercetin	50	6.7	76	156 ± 2
	25	13.2	54	130 ± 1
	12.5	21.1	25	107 ± 4
	6.25	26.0	8	96 ± 4
	3.13	27.5	3	95 ± 6
	1.56	28.2	0	97 ± 4
	0.79	27.7	2	96 ± 4
control	0	28.3	0	100

#### 4. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

นำตัวอย่างใบชะอมจากแหล่งที่ปลูกเพื่อจำหน่ายมาเตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบจากใบชะอม ทำการทดลองทั้งใบชะอมสดและใบชะอมอบแห้ง โดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ น้ำและ 95% เอทานอล ได้สารสกัดหยาบจากใบชะอมทั้งหมด 4 ตัวอย่างคือ FH (ใบชะอมสดสกัดด้วยน้ำ), FE (ใบชะอมสดสกัดด้วย 95% เอทานอล), DH (ใบชะอมแห้งสกัดด้วยน้ำ) และ DE (ใบชะอมแห้งสกัดด้วย 95% เอทานอล) และทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบ FH, FE, DH และ DE โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ได้ปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมดเท่ากับ 40.17, 33.74, 41.17 และ 53.65 ไมโครกรัมต่อ 1 มิลลิกรัมสารสกัดหยาบใบชะอม ตามลำดับ

ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบชะอม 2 วิธี คือ DPPH assay ได้ค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่มีเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity 50% ของ trolox (สารเปรียบเทียบ) และสารสกัดหยาบจากใบชะอมคือ FH, FE, DH และ DE ได้เท่ากับ 0.06, 3.91, 7.80, 4.13 และ 19.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อดูจากค่าที่ได้จะเห็นว่าการใช้น้ำในการสกัดจะได้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบชะอมที่น้อยกว่าเมื่อใช้ 95% เอทานอลในการสกัด และเมื่อเปรียบเทียบในใบชะอมสดและอบแห้ง พบว่า เมื่อใช้ใบชะอมสดจะได้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่น้อยกว่าเมื่อใช้ใบชะอมอบแห้ง และทดสอบอีกวิธีคือ FRAP assay ได้ค่า reducing ability ของสารสกัดหยาบ FH, FE, DH และ DE เท่ากับ 5.09, 4.10, 5.01 และ 2.91 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดจะได้ค่า reducing ability ที่ใกล้เคียงกันทั้งใบชะอมสดและใบชะอมอบแห้ง แต่ถ้าใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดจะได้ค่า reducing ability ที่แตกต่างกัน โดยเมื่อใช้ใบชะอมสดจะได้ค่าที่สูงกว่าการใช้ใบชะอมอบแห้ง

ทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆของสารสกัดหยาบจากใบชะอมโดยวิธี MTT colorimetric assay พบว่า สารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำคือ FH และ DH มีค่า  $IC_{50}$  ต่อเซลล์ทั้ง 14 ชนิดมากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบที่สกัดด้วย 95% เอทานอลคือ FE และ DE นั้น มีค่า  $IC_{50}$  แตกต่างกันไป โดยสารสกัดหยาบ FE มีฤทธิ์ทำลายเซลล์สูงรวมทั้งทำลายเซลล์ปกติ คือ เซลล์ MCF-10A และ WI-38 ที่เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ส่วนสารสกัดหยาบ DE มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีได้แก่ เซลล์ A375, KB, HT-29, NUGC-4 และ CaCo-2 โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 24.8, 35.2, 37.3, 38.5 และ 45.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ เซลล์มะเร็ง MDA-MB-231, BT474, Hep-G2 และ KATO-III มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 122.7, 276.1, 280.2 และ 290.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่จะมีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็ง Chago-K1 และ MCF-7 ได้น้อยคือมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 478.5 และ 483.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีฤทธิ์ทำลายเซลล์ไฟโบรบลาสต์น้อยมาก ได้แก่ เซลล์ MCF-10A และ WI-38 โดยมีค่า  $IC_{50}$  ที่สูงคือมีค่าเท่ากับ 459.7 และ 483.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการสกัดหยาบชะอมแห้งด้วย 95% เอทานอล จะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าการสกัดหยาบชะอมสดและ 95% เอทานอลสามารถสกัดสารได้ดีกว่าน้ำ และทำการทดสอบสารสกัดหยาบ DE กับเซลล์ปกติ CCD-986SK ซึ่ง

เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสผิวหนัง พบว่า ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดหยาบ DE ไม่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ใกล้เคียง 100% และมีค่า  $IC_{50}$  มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ DE ในเซลล์ 2 ชนิดคือ CaCo-2 และ HT-29 โดยมีสาร quercetin เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบ DE ในเซลล์ CaCo-2 มีค่าเท่ากับ 76.8% ซึ่งสูงกว่าในเซลล์ HT-29 ที่มีค่าเท่ากับ 34.5% ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ DE ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กับเซลล์ CaCo-2 และเซลล์ HT-29 มีค่าประมาณ 100% และ 70% ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสาร quercetin ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประมาณ 80% ทั้งเซลล์ CaCo-2 และ HT-29 และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ CaCo-2 และ HT-29 มีค่าประมาณ 120% จากการทดสอบจะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบ DE ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ CaCo-2 ได้ดีกว่าในเซลล์ HT-29 และมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสาร quercetin ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดหยาบ DE โดยมีสาร quercetin เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่า ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ DE ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเท่ากับ 28% และมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ  $110 \pm 11$  เปอร์เซ็นต์ ส่วนสาร quercetin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเท่ากับ  $76 \pm 3$  เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ  $156 \pm 2$  เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดสอบทั้งหมด พบว่าสารสกัดหยาบจากใบชะอมจำนวน 4 ตัวอย่าง คือ FH, FE, DH และ DE มีปริมาณฟีนอลรวมทั้งหมดในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดหยาบจากใบชะอมที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสกัดด้วย 95% เอทานอล ส่วนฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่างๆ นั้น สารสกัดหยาบจากใบชะอมที่สกัดด้วย 95% เอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆ ได้ดีกว่าเมื่อสกัดด้วยน้ำ และสารสกัดหยาบจากใบชะอมแห้งที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์ปกติที่ทดสอบอีกด้วย ดังนั้นผลการทดสอบของสารสกัดหยาบจากใบชะอมในงานวิจัยนี้น่าจะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนางานวิจัยทางด้านพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ต่อไป

## บรรณานุกรม (Bibliography)

- ไมตรี สุทธิจิตต์ สารเคมีก่อมะเร็ง. (2543). โรงพิมพ์ดาวคอมพิวกราฟฟิค, เชียงใหม่
- รายงานสถิติสาธารณสุข สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข ตารางจำนวนและอัตราผู้เสียชีวิตจากโรคสำคัญปี พ.ศ. 2542-2554.
- อรวิศสา เผือกสุข, ชัยศักดิ์ จันศรีนิยม และมยุรี กัลยาวัฒนกุล. (2555) ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเห็ดฟางเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จ. เชียงราย
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจูง, จันทนา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดตีสินทอง. (2550) สารต้านอนุมูลอิสระ นิเวศน์ มิตรการพิมพ์, กรุงเทพมหานคร, 262 หน้า.
- Amarowicza, R., Peggb, R.B., Rahimi-Moghaddamc, P., Barld, B. and Weilc, J.A. (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemistry. 84: 551-562.
- Ames, B.M., Shigena, M.K. and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90: 7915-7922.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239: 70-76.
- Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology. 299: 15-27.
- Cornish, M.L. and Garbary, D.J. (2010). Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. Algae. 25(4): 1-17.
- Denisov, E., Denisova, T. and Ismail, F. (2005). Intramolecular reactions of free radicals formed from artemisinin. International Journal Chemical Kinetic. 37(9): 554-565.
- Dongmo, A.B., Nguenefack, T. and Lacaille-Dubois M.A. (2005). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Acacia pennata* wild (Mimosaceae). Journal of Ethnopharmacology. 98: 201-206.

Fukumoto, L.R. and Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and pro-oxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48: 3597-3604.

Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology Medical*. 46: 531-542.

Mayne, S.T., Janerich, D.T., Greenwald, P., Chorost, S., Tucci, C., Zaman, M.B., Melamed, M.R., Kiely, M. and McKneally, M.F. (1994). Dietary beta-carotene and lung cancer risk in U.S. nonsmokers. *Journal of Natural Cancer Institute*. 86: 33-38.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.

Nanasombat, S. and Teckchuen, N. (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(5): 443-449.

Noguchi, **C. and** Nikki, E. (2000). Phenolic antioxidants: a rationale for design and evaluation of novel antioxidant drugs for atherosclerosis. *Free Radical Biology Medicine*. 28: 1538-1546.

Prior, R.L. and Cao, G. (1997). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medical*. 27: 1173-1181.

Seigler, D.S. (2003). *Phytochemistry of Acacia-sensu lato*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31: 845-873.

Sies, H. (1991). Role of reactive oxygen species in Biological processes. *Klin Wochenschr*. 69 : 965-968.

Sanchez-Moreno, **C.**, Jimenez-Escria, **A.**, Saura-Calixto, J. (2000). Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research*. 20: 941-953.

Wongsa, P., Chaiwarit, J. and Zamaludien, A. (2012) In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against Cl-amylase and Cl-glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry*. 131(3): 964-971.

## ภาคผนวก (Appendix)

### 1. DPPH· 150 ไมโครโมลาร์ ใน 80% เมทานอล, DPPH· (Fluka MW = 394.33)

$$1 \text{ ไมโครโมลาร์} = 394.33 \text{ ไมโครกรัมต่อลิตร}$$

$$150 \text{ ไมโครโมลาร์} = 5.91 \text{ มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร}$$

### 2. FRAP reagent

#### 2.1 300 มิลลิโมลาร์ acetate buffer (pH 3.6)

3.1 กรัม sodium acetate trihydrate ( $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$ ) + 16 มิลลิลิตร glacial acetic acid

#### 2.2 สารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) (Sigma, MW = 312.34)

เตรียมสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ TPTZ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl (conc. HCl 0.8 มิลลิลิตร + น้ำ 199.2 มิลลิลิตร)

$$1 \text{ มิลลิโมลาร์} = 0.31234 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

$$10 \text{ มิลลิโมลาร์} = 3.12 \text{ กรัมต่อลิตร,}$$

$$= 31.2 \text{ มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร}$$

#### 2.3 20 มิลลิโมลาร์ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma, MW = 270.3)

$$1 \text{ มิลลิโมลาร์} = 0.2703 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

$$20 \text{ มิลลิโมลาร์} = 5.406 \text{ กรัมต่อลิตร}$$

$$= 0.5406 \text{ กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร}$$

$$= 54.06 \text{ มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร}$$

ผสม reagent ในข้อ 2.1 ถึง 2.3 ในอัตราส่วน 10:1:1 และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ก่อนใช้

### 3. standard FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Sigma, MW = 278)

1 โมลาร์	=	278	กรัมต่อลิตร
1000 ไมโครโมลาร์	=	27.8	มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

### 4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของเหลว ขนาดปริมาตรขวดละ 500 หรือ 1,000 มิลลิลิตร นำมาแบ่งใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 40 ถึง 80 มิลลิลิตร ก่อนใช้เลี้ยงเซลล์นำมาเติม FBS ปริมาณ 10 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ตามการใช้งาน

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์จากอาหารชนิดผง ซึ่งจะบรรจุขนาดสำหรับเตรียมปริมาณ 1, 5 หรือ 10 ลิตร เลือกให้เหมาะสมตามการใช้งาน อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดผงจะมีราคาถูกกว่าชนิดของเหลวมาก แต่ต้องเสียเวลาในการเตรียมและใช้อุปกรณ์การกรอง ซึ่งต้องใช้เทคนิคการปลอดเชื้อ ถ้าการทดลองใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มากนัก ควรซื้อชนิดของเหลวพร้อมใช้ แต่ในงานที่ต้องใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำนวนมากควรซื้อชนิดผงแล้วนำมาเตรียมเองจะทำให้ประหยัดได้มาก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ปริมาตร 10 ลิตร ประกอบด้วย

1. RPMI 1640 (ขนาด 10 ลิตร)	104	กรัม
2. sodium bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	20	กรัม
3. ยาปฏิชีวนะ streptomycin	1	กรัม
4. ยาปฏิชีวนะ penicillin G	100,000	ยูนิต
5. น้ำ (sterile water for injection)	10	ลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำ ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH ปรับปริมาตรให้ได้ครบ 10 ลิตร นำไปกรองด้วยเครื่องกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่ขวดอาหาร ปริมาตร 50 ถึง 100 มิลลิลิตร ตามการใช้งาน เก็บแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส

### 5. การเตรียมสารละลาย Trypsin

เตรียม phosphate buffer saline (PBS) เข้มข้น 0.01M มี EDTA ปริมาณ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ปราศจาก Ca<sup>2+</sup> และ Mg<sup>2+</sup> ประกอบด้วย

1. NaCl	8	กรัม
---------	---	------



2. KCl	0.2	กรัม
3. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15	กรัม
4. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	กรัม
5. EDTA	0.2	กรัม
6. phenol red	0.01	กรัม
7. distilled water	1	ลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.4 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH ทำให้ปราศจากเชื้อโดย Autoclave

ซึ่ง trypsin (1:250) น้ำหนัก 0.05 กรัม ละลายใน PBS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.22 ไมครเมตร แบ่งใส่ขวด 10 ถึง 20 มิลลิลิตร เก็บแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส

#### 6. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆโดยวิธี MTT colorimetric assay

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของสารสกัดหยาบจากใบชะอมจำนวน 4 ตัวอย่าง ต่อเซลล์ 14 ชนิด

สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร						
		A375	BT474	CaCo-2	Chago-K1	Hep-G2	HT-29	KATO-III
FH	500	1.073	0.316	0.351	0.268	0.766	0.873	0.764
	50	1.106	0.356	0.383	0.289	0.989	0.816	0.846
	5	1.115	0.423	0.372	0.263	0.898	0.898	0.822
	0.5	1.054	0.465	0.399	0.252	0.921	0.853	0.781
	0.05	1.112	0.406	0.438	0.274	0.793	0.857	0.771
control	0	1.356	0.504	0.457	0.247	0.873	0.899	0.812
สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	KB	MCF-7	MCF-10A	MDA MB-231	NUGC-4	SW620	WI-38
FH		0.960	0.368	1.187	0.871	1.131	1.074	0.518
	50	1.160	0.374	1.196	1.049	1.053	1.213	0.584
	5	1.228	0.369	1.318	0.867	1.224	1.252	0.617
	0.5	1.243	0.341	1.288	0.971	1.393	1.233	0.641
	0.05	1.196	0.381	1.357	0.925	1.347	1.236	0.609

control	0	1.304	0.360	1.415	1.097	1.629	1.462	0.583
---------	---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

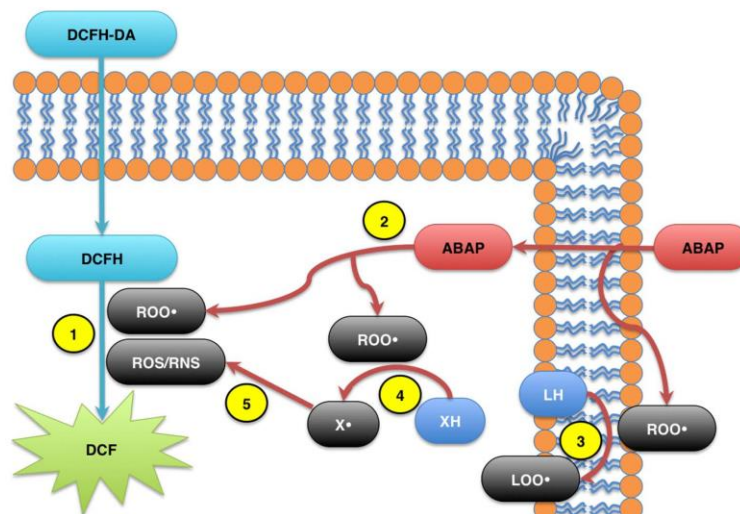
สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร						
		A375	BT474	CaCo-2	Chago-K1	Hep-G2	HT-29	KATO-III
FE	500	0.087	0.120	0.079	0.106	0.131	0.091	0.130
	50	0.659	0.221	0.176	0.127	0.240	0.316	0.326
	5	1.083	0.381	0.400	0.257	0.869	0.836	0.723
	0.5	1.159	0.499	0.437	0.276	0.888	0.902	0.766
	0.05	1.242	0.494	0.474	0.248	0.856	0.909	0.797
control	0	1.356	0.504	0.457	0.247	0.873	0.899	0.812
สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	KB	MCF-7	MCF-10A	MDA MB-231	NUGC-4	SW620	WI-38
FE	500	0.092	0.139	0.172	0.136	0.095	0.379	0.145
	50	0.526	0.178	1.032	0.210	0.490	0.747	0.279
	5	1.127	0.328	1.349	0.844	1.406	1.197	0.569
	0.5	1.224	0.365	1.339	0.924	1.474	1.257	0.568
	0.05	1.298	0.382	1.376	0.949	1.670	1.278	0.630
control	0	1.304	0.360	1.415	1.097	1.629	1.462	0.583

สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร						
		A375	BT474	CaCo-2	Chago-K1	Hep-G2	HT-29	KATO-III
DH	500	1.094	0.384	0.311	0.246	0.823	0.884	0.778
	50	1.120	0.516	0.375	0.257	0.950	0.883	0.875
	5	1.116	0.540	0.406	0.307	0.934	0.785	0.873
	0.5	1.089	0.521	0.381	0.282	1.018	0.782	0.858
	0.05	1.127	0.516	0.368	0.277	0.881	0.708	0.773
control	0	1.226	0.504	0.377	0.247	0.873	0.874	0.812
สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	KB	MCF-7	MCF-10A	MDA MB-231	NUGC-4	SW620	WI-38
	500	0.821	0.413	1.169	0.799	0.945	1.149	0.519

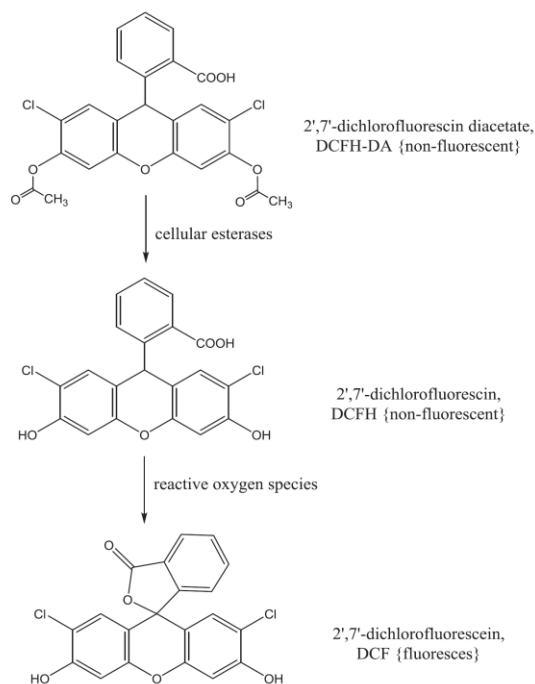
DH	50	1.088	0.401	1.342	1.044	1.100	1.362	0.637
	5	1.074	0.397	1.362	1.013	1.304	1.382	0.611
	0.5	1.031	0.381	1.477	1.040	1.317	1.370	0.645
	0.05	0.992	0.366	1.410	1.112	1.253	1.357	0.649
control	0	1.120	0.360	1.415	1.097	1.532	1.462	0.583

สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร						
		A375	BT474	CaCo-2	Chago-K1	Hep-G2	HT-29	KATO-III
DE	500	0.096	0.157	0.068	0.120	0.279	0.090	0.317
	50	0.396	0.489	0.180	0.250	0.846	0.310	0.661
	5	1.110	0.560	0.366	0.296	1.062	0.788	0.808
	0.5	1.139	0.475	0.393	0.294	1.046	0.823	0.846
	0.05	1.163	0.520	0.411	0.284	0.976	0.834	0.859
control	0	1.226	0.504	0.377	0.247	0.873	0.874	0.812
สาร/เซลล์	conc. (µg/ml)	KB	MCF-7	MCF-10A	MDA MB-231	NUGC-4	SW620	WI-38
DE	500	0.069	0.148	0.653	0.154	0.094	0.569	0.280
	50	0.346	0.358	1.391	0.806	0.664	1.222	0.599
	5	1.042	0.380	1.460	1.019	1.337	1.382	0.637
	0.5	1.092	0.378	1.476	1.074	1.311	1.417	0.604
	0.05	1.071	0.384	1.424	1.050	1.516	1.451	0.635
control	0	1.120	0.360	1.415	1.097	1.532	1.462	0.583

## 7. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์โดยวิธี CAA assay



กลไกการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Kellett และคณะ, 2018. Modification of the cellular antioxidant activity (CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line. Food Chemistry. 244: p.360.)



การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสาร DCFH-DA เป็นสารเรืองแสง (Kellett และคณะ, 2018. Modification of the cellular antioxidant activity (CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line. Food Chemistry. 244: p.360.)

การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์

- 12.5 มิลลิโมลาร์ DCFH-DA stock solution ละลายในเมทานอล เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส
- 60 มิลลิโมลาร์ ABAP stock solution ละลายใน RPMI1640
- สารตัวอย่างละลายใน DMSO เจือจางสารที่ความเข้มข้นต่างๆในอาหารเลี้ยงเซลล์
- 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร MTT

ค่า FU จากเครื่อง microplate reader Synergy<sup>TM</sup> HT จากการทดสอบ CAA ของสารสกัดหยาบ DE ในเซลล์ CaCo-2

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	fluorescence unit (FU)/min							
	ครั้งที่ 1				ครั้งที่ 2			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
2000	1.719	1.151	1.281	<b>1.384</b>	0.898	0.965	1.018	<b>0.960</b>
1000	3.259	2.978	2.892	<b>3.043</b>	2.671	2.259	2.679	<b>2.536</b>
500	3.620	4.147	3.523	<b>3.763</b>	3.633	2.949	3.777	<b>3.453</b>
250	4.113	4.503	4.502	<b>4.373</b>	3.693	3.233	4.000	<b>3.642</b>
125	4.764	4.424	4.260	<b>4.483</b>	3.804	3.797	3.818	<b>3.806</b>
62.50	4.569	4.625	4.512	<b>4.569</b>	5.164	3.691	4.654	<b>4.503</b>
31.25	4.171	4.624	4.668	<b>4.488</b>	4.438	4.576	4.049	<b>4.354</b>
0	5.612	4.595	4.211	<b>4.580</b>				
	4.223	3.998	4.840					
ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	fluorescence unit (FU)/min							
	ครั้งที่ 3				ครั้งที่ 4			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
2000	1.015	0.759	0.593	<b>0.789</b>	0.857	0.859	0.777	<b>0.831</b>
1000	2.480	2.360	2.098	<b>2.313</b>	2.032	2.534	2.367	<b>2.311</b>
500	3.013	3.038	2.755	<b>2.935</b>	2.415	3.089	3.403	<b>2.969</b>
250	3.444	3.267	3.249	<b>3.320</b>	2.710	2.826	2.886	<b>2.807</b>
125	3.638	3.226	2.992	<b>3.285</b>	3.393	2.611	2.658	<b>2.887</b>
62.50	3.722	3.623	3.185	<b>3.510</b>	3.333	3.138	3.282	<b>3.251</b>

31.25	4.043	4.036	3.318	<b>3.799</b>	3.451	3.043	3.642	<b>3.379</b>
0	3.600	3.814	4.624	<b>3.891</b>				
	3.674	3.564	4.068					

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบ CAA ของสารสกัดหยาบ DE ในเซลล์ CaCo-2

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ค่าเฉลี่ย
2000	69.8	79.0	79.7	78.6	<b>76.8</b>
1000	33.6	44.6	40.6	40.6	<b>39.8</b>
500	17.8	24.6	24.6	23.7	<b>22.7</b>
250	4.5	20.5	14.7	27.9	<b>16.9</b>
125	2.1	16.9	15.6	25.8	<b>15.1</b>
62.50	0.3	1.7	9.8	16.5	<b>7.0</b>
31.25	2.0	4.9	2.4	13.2	<b>5.6</b>
0	0	0	0	0	<b>0</b>

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรในการทำ MTT colorimetric assay ของสารสกัดหยาบ DE ต่อเซลล์ CaCo-2

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อ มิลลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร							
	ครั้งที่ 1				ครั้งที่ 2			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
2000	1.554	1.534	1.347	<b>1.478</b>	1.427	1.346	1.173	<b>1.315</b>
1000	1.521	1.498	1.531	<b>1.517</b>	1.447	1.429	1.083	<b>1.320</b>
500	1.377	1.525	1.498	<b>1.467</b>	1.462	1.481	1.328	<b>1.424</b>
250	1.479	1.497	1.526	<b>1.501</b>	1.401	1.340	1.308	<b>1.350</b>
125	1.516	1.390	1.394	<b>1.433</b>	1.388	1.366	1.304	<b>1.353</b>
62.50	1.538	1.563	1.310	<b>1.470</b>	1.371	1.433	1.376	<b>1.393</b>
31.25	1.428	1.440	1.394	<b>1.421</b>	1.367	1.384	1.466	<b>1.406</b>

0	1.341	1.479	1.406	1.385
	1.303	1.405	1.471	
	1.318	1.429	1.346	
	1.330	1.368	1.425	

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร							
	ครั้งที่ 3				ครั้งที่ 4			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
2000	1.342	1.424	1.366	1.377	1.294	1.288	1.358	1.313
1000	1.493	1.244	1.461	1.399	1.409	1.300	1.340	1.350
500	1.307	1.142	1.340	1.263	1.202	1.221	1.286	1.236
250	1.277	1.066	1.275	1.206	1.230	1.194	1.193	1.206
125	1.261	1.057	1.220	1.179	0.988	1.111	1.001	1.033
62.50	1.318	1.038	1.082	1.146	1.300	1.199	1.183	1.227
31.25	1.341	1.249	1.200	1.263	1.232	1.211	1.207	1.217
0	1.320	1.160	1.282	1.128				
	1.359	1.237	1.174					
	0.997	1.071	1.140					
	0.878	0.883	1.035					

ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ CaCo-2 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ DE

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การรอดของเซลล์ (%)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ค่าเฉลี่ย
2000	107	95	122	116	110
1000	110	95	124	120	112
500	106	103	112	110	108
250	108	97	107	107	105
125	103	98	105	92	100

62.50	106	101	102	109	105
31.25	103	101	112	108	106
0	100	100	100	100	100

ค่า FU จากเครื่อง microplate reader Synergy™ HT จากการทดสอบ CAA ของสารสกัดหยาบ DE ในเซลล์ HT-29

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	fluorescence unit (FU)/min							
	ครั้งที่ 1				ครั้งที่ 2			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
2000	1.045	1.501	2.180	1.575	1.274	1.318	1.366	1.319
1000	1.909	1.708	2.959	2.192	1.399	1.385	2.424	1.736
500	1.826	2.725	1.645	2.065	1.813	1.712	1.858	1.794
250	1.999	2.293	1.824	2.039	2.407	2.321	1.908	2.212
125	2.560	2.310	1.687	2.186	2.034	1.948	1.866	1.949
62.50	2.192	2.412	1.663	2.089	2.124	2.073	1.557	1.918
31.25	2.279	2.454	1.859	2.197	2.153	2.386	2.062	2.200
0	3375	2.431	2.044	2.335				
	1.727	2.400	2.031					

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	fluorescence unit (FU)/min							
	ครั้งที่ 3				ครั้งที่ 4			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
2000	1.966	2.824	2.981	2.590	2.573	1.037	2.063	1.891
1000	3.186	3.141	3.095	3.141	2.840	3.033	3.156	3.010
500	2.727	2.823	2.915	2.822	1.958	2.910	3.467	2.778
250	2.712	3.125	3.764	3.200	2.724	3.048	3.348	3.040
125	2.080	2.848	2.952	2.627	3.088	3.080	3.042	3.070
62.50	2.879	3.286	3.420	3.195	2.819	3.808	3.198	3.275
31.25	3.214	3.413	2.790	3.139	3.335	3.492	2.849	3.225



0	3.136	3.385	2.990	3.248
	3.280	3.426	3.273	

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบ CAA ของสารสกัดหยาบ DE ในเซลล์ HT-29

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)	ฤทธิ์อนุมูลอิสระ (%)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ค่าเฉลี่ย
2000	32.5	43.5	20.3	41.8	34.5
1000	6.1	25.7	3.3	7.3	10.6
500	11.6	23.2	13.1	14.5	15.6
250	12.7	5.3	1.5	6.4	6.5
125	6.4	16.5	19.1	5.5	11.9
62.50	10.5	17.9	1.6	7.4	9.4
31.25	5.9	5.8	3.4	0.7	3.9
0	0	0	0	0	0

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรในการทำ MTT colorimetric assay ของสารสกัดหยาบ DE ต่อเซลล์ HT-29

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อ มิลลิเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร							
	ครั้งที่ 1				ครั้งที่ 2			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
2000	1.135	1.066	1.136	1.112	0.993	1.114	1.121	1.076
1000	1.249	1.209	1.071	1.176	1.165	1.201	1.155	1.174
500	1.100	1.320	1.271	1.230	1.285	1.344	1.205	1.278
250	1.435	1.439	1.264	1.379	1.319	1.250	1.349	1.306
125	1.449	1.302	1.298	1.350	1.335	1.287	1.377	1.333
62.50	1.484	1.394	1.483	1.454	1.429	1.319	1.377	1.375
31.25	1.743	1.671	1.613	1.676	1.590	1.525	1.702	1.606
0	1.927	1.710	1.739	1.716				

	1.776	1.673	1.740	
	1.579	1.811	1.791	
	1.530	1.660	1.656	

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร							
	ครั้งที่ 3				ครั้งที่ 4			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
2000	1.218	1.324	1.305	1.282	1.278	1.245	1.133	1.219
1000	1.263	1.269	1.431	1.321	1.299	1.369	1.239	1.302
500	1.393	1.521	1.525	1.480	1.405	1.467	1.230	1.367
250	1.542	1.639	1.579	1.587	1.480	1.555	1.536	1.524
125	1.648	1.552	1.548	1.583	1.529	1.364	1.447	1.447
62.50	1.778	1.810	1.625	1.738	1.714	1.555	1.490	1.586
31.25	1.763	1.701	1.760	1.741	1.744	1.638	1.507	1.630
0	1.847	1.986	1.967	1.757				
	1.894	1.832	1.523					
	1.638	1.868	1.675					
	1.711	1.657	1.482					

ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ HT-29 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดหยาบ DE

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	การรอดของเซลล์ (%)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ค่าเฉลี่ย
2000	65	63	73	69	68
1000	69	68	75	74	72
500	72	74	84	78	77
250	80	76	90	87	83
125	79	78	90	82	82
62.50	85	80	99	90	89

31.25	98	94	99	93	96
0	100	100	100	100	100

ค่า FU จากเครื่อง microplate reader Synergy™ HT จากการทดสอบ CAA ของสาร quercetin ในเซลล์ CaCo-2

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	fluorescence unit (FU)/min							
	ครั้งที่ 1				ครั้งที่ 2			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1000	0.946	1.156	1.109	1.070	1.120	1.020	1.149	1.096
500	1.222	1.152	1.276	1.217	1.192	1.273	1.204	1.223
250	1.255	1.275	1.195	1.242	1.265	1.235	1.421	1.307
125	1.619	1.635	1.859	1.704	1.545	1.451	1.603	1.533
62.50	1.818	1.220	1.962	1.667	2.016	1.886	2.079	1.994
31.25	2.864	2.633	2.969	2.822	2.638	2.966	2.789	2.798
0	5.612	4.595	4.211	4.580				
	4.223	3.998	4.840					

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	fluorescence unit (FU)/min							
	ครั้งที่ 3				ครั้งที่ 4			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1000	0.966	0.881	1.046	0.964	1.007	1.066	1.036	1.036
500	1.146	1.087	1.042	1.092	1.187	1.241	1.292	1.240
250	1.219	1.225	1.338	1.261	1.265	1.221	1.530	1.339
125	1.664	1.718	1.674	1.685	1.581	1.757	1.857	1.732
62.50	2.095	2.389	2.497	2.327	2.552	2.574	2.320	2.482
31.25	2.734	2.344	2.951	2.676	2.802	3.024	3.316	3.047
0	3.600	3.814	4.624	3.891				
	3.674	3.564	4.068					

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบ CAA ของสาร quercetin ในเซลล์ CaCo-2

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ค่าเฉลี่ย
1000	76.6	76.1	75.2	73.4	75.3
500	73.4	73.3	71.9	68.1	71.7
250	72.9	71.5	67.6	65.6	69.4
125	62.8	66.5	56.7	55.5	60.4
62.50	63.6	56.5	40.2	36.2	49.1
31.25	38.4	38.9	31.2	21.7	32.6
0	0	0	0	0	0

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรในการทำ MTT colorimetric assay ของสาร quercetin ต่อเซลล์ CaCo-2

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร							
	ครั้งที่ 1				ครั้งที่ 2			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1000	1.721	1.603	1.479	1.601	1.646	1.613	1.679	1.646
500	1.537	1.578	1.577	1.564	1.664	1.654	1.548	1.622
250	1.447	1.437	1.501	1.462	1.439	1.569	1.634	1.547
125	1.365	1.253	1.386	1.335	1.408	1.429	1.417	1.418
62.50	1.424	1.489	1.372	1.428	1.391	1.351	1.376	1.373
31.25	1.343	1.527	1.456	1.442	1.369	1.357	1.346	1.357
0	1.341	1.479	1.406	1.385				
	1.303	1.405	1.471					
	1.318	1.429	1.346					
	1.330	1.368	1.425					

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร							
	ครั้งที่ 3				ครั้งที่ 4			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1000	1.347	1.332	1.108	1.262	1.092	1.521	1.307	1.307
500	1.281	1.149	1.220	1.217	1.183	1.355	1.387	1.308
250	1.269	1.194	1.300	1.254	0.969	1.292	1.726	1.329
125	0.989	1.008	1.262	1.086	1.150	0.968	1.225	1.114
62.50	1.071	1.122	1.086	1.093	1.127	1.220	1.206	1.184
31.25	1.276	1.294	1.252	1.274	1.104	1.034	1.347	1.162
0	1.320	1.160	1.282	1.128				
	1.359	1.237	1.174					
	0.997	1.071	1.140					
	0.878	0.883	1.035					

ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ CaCo-2 เมื่อทดสอบด้วยสาร quercetin

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	การรอดของเซลล์ (%)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ค่าเฉลี่ย
1000	116	119	112	116	116
500	113	117	108	116	114
250	106	112	111	118	112
125	96	102	96	99	98
62.50	103	99	97	105	101
31.25	104	98	113	103	105
0	100	100	100	100	100

ค่า FU จากเครื่อง microplate reader Synergy™ HT จากการทดสอบ CAA ของสาร quercetin ในเซลล์ HT-29

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	fluorescence unit (FU)/min							
	ครั้งที่ 1				ครั้งที่ 2			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1000	0.492	0.658	0.455	<b>0.535</b>	0.534	0.540	0.656	<b>0.577</b>
500	0.505	0.674	0.587	<b>0.589</b>	0.508	0.654	0.507	<b>0.556</b>
250	0.622	0.508	0.516	<b>0.549</b>	0.522	0.638	0.751	<b>0.637</b>
125	0.747	0.965	0.888	<b>0.867</b>	0.837	0.920	0.963	<b>0.907</b>
62.50	1.159	1.179	1.188	<b>1.175</b>	1.091	1.600	1.385	<b>1.359</b>
31.25	1.500	1.551	1.614	<b>1.555</b>	1.735	2.248	2.091	<b>2.025</b>
0	3.375	2.431	2.044	<b>2.335</b>				
	1.727	2.400	2.031					

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	fluorescence unit (FU)/min							
	ครั้งที่ 3				ครั้งที่ 4			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1000	0.556	0.674	0.580	<b>0.603</b>	0.668	0.597	0.730	<b>0.665</b>
500	0.749	0.947	0.778	<b>0.825</b>	0.935	1.010	1.013	<b>0.986</b>
250	0.962	0.862	0.779	<b>0.868</b>	0.848	0.868	0.934	<b>0.883</b>
125	1.619	1.227	1.288	<b>1.378</b>	1.393	1.281	1.359	<b>1.344</b>
62.50	1.922	1.885	1.787	<b>1.865</b>	1.910	1.978	1.922	<b>1.937</b>
31.25	2.973	3.057	2.744	<b>2.925</b>	2.935	2.538	2.776	<b>2.750</b>
0	3.136	3.385	2.990	<b>3.248</b>				
	3.280	3.426	3.273					

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบ CAA ของสาร quercetin ในเซลล์ HT-29

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (%)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ค่าเฉลี่ย
1000	77.1	75.3	81.4	79.5	78.3
500	74.8	76.2	74.6	69.6	73.8
250	76.5	72.7	73.3	72.8	73.8
125	62.9	61.2	57.6	58.6	60.1
62.50	49.7	41.8	42.6	40.4	43.6
31.25	33.4	13.3	10.0	15.3	18.0
0	0	0	0	0	0

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรในการทำ MTT colorimetric assay ของสาร quercetin ต่อเซลล์ HT-29

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร							
	ครั้งที่ 1				ครั้งที่ 2			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1000	2.418	2.128	2.265	2.270	2.249	2.207	2.069	2.175
500	2.041	1.796	1.959	1.932	2.071	2.181	2.068	2.107
250	2.174	2.000	1.948	2.041	2.131	1.916	1.952	2.000
125	1.854	2.001	1.896	1.917	1.936	1.906	1.830	1.891
62.50	1.813	1.856	1.619	1.763	1.824	1.724	1.722	1.757
31.25	1.495	1.617	1.734	1.615	1.906	1.550	1.452	1.636
0	1.927	1.710	1.739	1.716				
	1.776	1.673	1.740					
	1.579	1.811	1.791					
	1.530	1.660	1.656					

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร							
	ครั้งที่ 3				ครั้งที่ 4			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
1000	2.054	2.009	2.165	2.076	2.029	2.082	2.069	2.060
500	1.708	1.631	1.783	1.707	1.642	1.906	1.911	1.820
250	1.913	1.824	1.812	1.850	1.957	1.863	1.925	1.915
125	1.918	1.948	1.921	1.929	1.811	1.901	1.801	1.838
62.50	1.826	1.834	1.792	1.817	1.778	1.848	1.635	1.754
31.25	1.720	1.664	1.743	1.709	1.660	1.481	1.675	1.605
0	1.847	1.986	1.967	1.757				
	1.894	1.832	1.523					
	1.638	1.868	1.675					
	1.711	1.657	1.482					

ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์ HT-29 เมื่อทดสอบด้วยสาร quercetin

ความเข้มข้น (ไมโครโมลาร์)	การรอดของเซลล์ (%)				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ค่าเฉลี่ย
1000	132	127	118	117	124
500	113	123	97	104	109
250	119	117	105	109	113
125	112	110	110	105	109
62.50	103	102	103	100	102
31.25	94	95	97	91	94
0	100	100	100	100	100



## 8. การทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ในการทำ MTT colorimetric assay ของสารสกัดหยาบ DE

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	PS (%)
DE ครั้งที่ 1	100	1.683	1.707	1.742	1.711	117
	50	1.446	1.456	1.478	1.460	100
	25	1.392	1.355	1.455	1.401	96
	12.5	1.326	1.331	1.336	1.331	91
	6.25	1.353	1.333	1.313	1.333	92
	3.13	1.317	1.297	1.305	1.306	90
	1.56	1.319	1.342	1.372	1.344	92
Control	0	1.512	1.431	1.481	1.456	100
		1.477	1.431	1.402		

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	PS (%)
DE ครั้งที่ 2	100	1.465	1.529	1.457	1.484	102
	50	1.292	1.344	1.299	1.312	90
	25	1.306	1.281	1.299	1.295	89
	12.5	1.266	1.208	1.230	1.235	85
	6.25	1.249	1.240	1.257	1.249	85
	3.13	1.318	1.208	1.260	1.262	86
	1.56	1.355	1.356	1.357	1.356	93
Control	0	1.453	1.462	1.444	1.461	100
		1.436	1.459	1.513		

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ในการทำ MTT colorimetric assay ของสาร quercetin

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	PS (%)
quercetin ครั้งที่ 1	50	2.271	2.287	2.279	2.279	157
	25	1.801	1.876	1.999	1.892	130
	12.5	1.558	1.525	1.737	1.607	110
	6.25	1.399	1.413	1.533	1.448	99
	3.13	1.408	1.425	1.477	1.437	99
	1.56	1.312	1.361	1.447	1.373	94
	0.79	1.394	1.377	1.507	1.426	98
Control	0	1.512	1.431	1.481	1.456	100
		1.477	1.431	1.402		

สาร	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	PS (%)
quercetin ครั้งที่ 2	50	2.185	2.282	2.294	2.254	154
	25	1.832	1.948	1.862	1.881	129
	12.5	1.412	1.468	1.665	1.515	104
	6.25	1.345	1.360	1.380	1.362	93
	3.13	1.305	1.414	1.262	1.327	91
	1.56	1.314	1.344	1.725	1.461	100
	0.79	1.313	1.375	1.402	1.363	93
Control	0	1.453	1.462	1.444	1.461	100
		1.436	1.459	1.513		

## ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย

### หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายอนุมาศ บัวเขียว
2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Anumart Buakeaw
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 8099 00658 39 3
4. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย
5. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2188076 โทรสาร 02-2533543

E-mail anumart.b@chula.ac.th

### 6. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2545 วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2541 วท.บ. (ชีวเคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง และการเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดี

### 8. ผลงานวิจัย

8.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :-

8.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

8.2.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดใบชะอม ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2561

### 8.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

#### 8.3.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- 1) Puthong, P., Rojpibulstit, P., and **Buakeaw, A.** (2009). Cytotoxic effect of Hep 88 mAb : A novel monoclonal antibody against hepatocellular carcinoma. Thammasat Int. J. Se. Tech. 14(1): 95-104.
- 2) Somwong, P., Suttisri, R., and **Buakeaw, A.** (2011). A new 1,3-diketofriedelane triterpene from *Salacia verrucosa*. Fitoterapia. 82 : 1047 -1051.
- 3) Mungmee, C., Sithigool, S., **Buakeaw, A.**, and Suttisri, R. (2013). A new biphenyl and other constituents from the wood of *Garcinia schomburgkiana*. *Natural Product Research ; Formerly Natural Product Letters*, DOI:10.1080/14786419.2013.796469.
- 4) Somwong, P., Suttisri, R. and **Buakeaw, A.** (2013). New sesquiterpenes and phenolic compound from *Ficus foveolata*. Fitoterapia. 85 : 1 – 7.
- 5) Wongtangprasert, T., Natakathung, W., Pimpitak, U., **Buakeaw, A.**, Palaga, T., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2014). Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology). 15(2) : 165 – 172.
- 6) Nuanyai, T., Chailap, B., Puthong, S. and **Buakeaw, A.** (2015). Cytotoxicity of xanthone from twigs of *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume. *Journal of Science Ladkrabang.* 2 : 1 – 12.
- 7) **Buakeaw, A.**, Puthong, S., Kongkavitoon, P., Khongarsa, K., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2016). Production of monoclonal antibodies for ractopamine residue detection in pork. *Maejo International Journal of Science and Technology.* 10(02) : 175 – 186.

#### 8.3.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

- 1) Sangdokmai, A., Pimpitak, U., **Buakeaw, A.**, Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M<sub>1</sub>. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.





- 3) Luesakul, U., Komenek, S., **Puthong, S.** and Muangsin, N. (2016). Shape-controlled synthesis of cubic-like selenium nanoparticles via the self-assembly method. *Carbohydrate Polymers*. 153 : 435 – 444.
- 4) Chadseesuwan, U., Sangdokmai, A., Pimpitak, U., **Puthong, S.**, Palaga, T. and Komolpis, K. (2016). Production of a monoclonal antibody against aflatoxin M1 and its application for detection of aflatoxin M1 in fortified milk. *Journal of Food and Drug Analysis*. 1 – 8.
- 5) Khunsap, S., Khow, O., Buranapraditkun, S., Suntrarachun, S., **Puthong, S.** and Boonchang, S. (2016). Anticancer properties of phospholipase  $A_2$  from *Daboia siamensis* venom on human skin melanoma cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 22(7) : 1 – 8.
- 6) Mitupatum, T., Aree, K., Kittisenachai, S., Roytrakul, S., **Puthong, S.**, Kangsadalampai, S. and Rojpiulsthit, P. (2016). mRNA expression of *Bax*, *Bcl-2*, *p53*, *Cathepsin B*, *Caspase-3* and *Caspase-9* in the HepG2 cell line following introduction by a novel monoclonal Ab Hep88 mAb: Cross-talk for paraptosis and apoptosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 17(2) : 703 – 712.
- 7) Buakeaw, A., **Puthong, S.**, Kongkaviton, P., Khongarsa, K., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2016). Production of monoclonal antibodies for ractopamine residue detection in pork. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 10(02) : 175 – 186.
- 8) Nugitragson, P., **Puthong, S.**, Iempridee, T., Pimtong, W., Pornpakakul, S. and Chanchao, C. (2016). *In vitro* and *in vivo* characterization of the anticancer activity of Thai stingless bee (*Tetragonula laeviceps*) cerumen. *Experimental Biology and Medicine*. 241(2) : 166 – 176.
- 9) Buahom, S., **Puthong, S.**, Palaga, T., Lirdprapamongkol, K., Phuwapraisirisan, P., Svasti, J. and Chanchao, C. (2015). Cardanol isolated from Thai apis mellifera propolis induces cell cycle arrest and apoptosis of BT-474 breast cancer cells via p21 upregulation. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 23(55) : 1 – 11.
- 10) Kustiawan, M.P., Phuwapraisirisan, P., **Puthong, S.**, Palaga, T., Arung, T.E. and Chanchao, C. (2015). Propolis from the stingless bee *Trigona incise* from East Kalimantan, Indonesia, induces *in vitro*

cytotoxicity and apoptosis in cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16(15) : 6581 – 6589.

11) Mitupatum, T., Aree, K., Kittisenachai, S., Roytrakul, S., **Puthong, S.**, Kangsadalampai, S. and Rojpiulstitt, P. (2015). Hep88 mAb-mediated paraptosis-like apoptosis in HepG2 cells via downstream upregulation and activation of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 16(5) : 1771 – 1779.

12) Sathitsemakul, J., **Puthong, S.**, Patarakul, K., Palaga, T. and Komolpis, K. (2015). Production and characterization of monoclonal antibodies against leptospira interrogans serovar sanilae. *Food and Applied Bioscience Journal*. 3(3) : 239 – 246.

13) Nuanyai, T., Chailap, B., **Puthong, S.** and Buakeaw, A. (2015). Cytotoxicity of xanthone from twigs of *Cratoxylum cochinchinense* (Lour.) Blume. *Journal of Science Ladkrabang*. 2 : 1 – 12.

14) Rojpiulstitt, P., Kittisenachai, S., **Puthong, S.**, Manochantr, S., Gamnarai, P., Jitrapakdee, S. and Roytrakul, S. (2014). Hep88 mAb-initiated paraptosis-like PCD pathway in hepatocellular carcinoma cell line through the binding of mortalin (HSPA9) and alpha-enolase. *Cancer Cell International*. 14(69) : 1 – 10.

15) Srisurichan, S., **Puthong, S.** and Pornpakakul, S. (2014). Pregnane-type steroidal glycosides from *Gymnema griffithii* Craib. *Phytochemistry*. 106 : 197 – 206.

16) Kustiawan, M.P., **Puthong, S.**, Arung, T.E. and Chanchao, C. (2014). *In vitro* cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4(7) : 549 – 556.

17) Luesakul, U., Palaga, T., Krusong, K., Ngamrojanavanich, N., Vilaivan, T., **Puthong, S.** and Muangsin, N. (2014). Synthesis, cytotoxicity, DNA binding and topoisomerase II inhibition of cassiarin A derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 24(13) : 2845 – 2850.

18) Sangthong, S., Sangphech, N., Palaga, T., Ngamrojanavanich, N., **Puthong, S.**, Vilaivan, T. and Muangsin, N. (2014). Anthracene-9, 10-dione derivatives induced apoptosis in human cervical



cancer cell line (CaSki) by interfering with HPV E6 expression. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 77 : 334 – 342.

19) Manaspong, C., Wongphanit, P., Palaga, T., **Puthong, S.**, Sooksai, S., and Komolpis, K. (2013). Production and Characterization of a Monoclonal Antibody Against Enrofloxacin. *Journal of Microbiological Biotechnology*. 23(1) : 69-75.

20) Stewart, P., Boonsiri, P., **Puthong, S.**, and Rojpibulstit P. (2013). Antioxidant activity and ultrastructural changes in gastric cancer cell lines induced by Northeastern Thai edible folk plant extracts. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. 13(60) : 1-11.

21) Chadseesuwana, U., **Puthong, S.**, Gajanandana, O., Palaga, T., and Komolpis, K. (2013). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 1-Aminohydantoin Detection. *Journal of AOAC International*. 96(3) : 680 – 686.

22) Khunsap, S., Buranapraditkun, S., Suntrarachun, S., **Puthong, S.**, Know, O., Chulasugandha, P., and Boonchang, S. (2013). The effects of *Cryptelytrops albolabris*, *Calloselasma rhodostoma* and *Daboia siamensis* venoms on human cancer cells. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*. 2(1) : 50 – 53.

23) Graisuwan, W., Wairachai, O., Ananthanawat, C., **Puthong, S.**, Soogarun, S., Kaitkamjornwong, S., and Voravee P.H. (2012). Multilayer film assembled from charged derivatives of chitosan : Physical characteristics and biological responses. *Journal of Colloid and Interface Science*. 376 : 177 – 188.

24) Teerasripreecha, D., Phuwapraisirisan, P., **Puthong, S.**, Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., and Chanchao, C. (2012). *In vitro* antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12(27) : 1-17.

25) **Puthong, S.**, Gamnarai, P., Roittrakul, S., Kittisenachai, S., Kangsadalampai, S., and Rojpibulstit P. (2011). Hep88 mAb Induced Ultrastructural Alteration Through Apoptosis Like Program

Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 94(12) : 109 - 116.

26) Sangthong, S., Krusong, K., Ngamrojanavanich, N., Vilaivan, T., **Puthong, S.**, Chandchawan, S., and Muangsin, N. (2011). Synthesis of rotenoid derivatives with cytotoxic and topoisomerase II inhibitory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21 : 4813 – 4818.

27) Tantithanagorngul, W., Sujitwanit, A., Piluk, J., Tolieng, V., Petsom, A., Sangvanich, P., Palaga, T., **Puthong, S.**, Thamchaipenet, A., and Pinphanichakarn, P. (2011). Screening for brine shrimp larvicidal activity of *Streptomyces* isolated from soil and anti-tumor activity of the active isolates. *Australian Journal of Basic and Applied sciences*. 5(7) : 15-22.

28) Umthong, S., Phuwapraisirisan, P., **Puthong, S.**, and Chanchao, C. (2011). *In vitro* antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11(37) : 1-8.

29) Karnchanatat, A., Tiengburanatham, N., Boonmee, A., **Puthong, S.**, and Sangvanich, P. (2011). Zingipain, A cysteine protease from *Zingiber ottensii* valetton rhizomes with antiproliferative activities against fungi and human malignant cell lines. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 41 : 1-17.

30) Kheeree, N., Sangvanich, P., **Puthong, S.**, and Kanchanatat, A. (2010). Antifungal and antiproliferative activity of lectin from the Rhizomes of *Curcuma amarissima* Roscoe. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 162 : 912-925.

31) Komolphis, K., Udomcheokmongkol, C., **Puthong, S.**, and Palaga, T. (2010). Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 16 : 567-571.

### 8.3.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

1) Chaicharoenpong C., **Puthong S.** and Ishikawa T. *Synthesis of derivatives of naphthoquinone monooxime and their cytotoxic activity*. Poster Presentation at the 32<sup>th</sup> Congress

on Science and Technology of Thailand, 10-12 October 2006, Queen sirikit national convention center, Bangkok, Thailand, Abstract p. 177.

2) Chadseesuwan, U., **Puthong, S.**, Gajanandana, O., Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production of monoclonal antibodies against 1-aminohydantoin. Proceedings of 2011 International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2011). July 2-3 ,2011 ,Hong Kong.

3) Kittisenachai, S., **Puthong, S.**, Manochan, S., Gamnarai, P., Kangsadalampai, S., Roytrakul, S., and Rojpibulstit, P. (2011). Proteomic study of tumor antigen recognized by Hep88 mAb: A novel harmful mAb to hepatocellular carcinoma. Proceeding in The 3<sup>rd</sup> Biochemistry and Molecular biology (BMB) conference “From Basic to Translational Research for a Better Life”. April 6-8 ,2011 ,The Empress Convention Centre ,Chiang Mai ,Thailand.

4) Rojpibulstit, P., Manochantr, S., Gamnarai, P., **Puthong, S.**, Kittisenachai, S., Kangsadalampai, S., and Roittrakul, S. (2010). Ultracellular alterations of the hepatocellular carcinoma cell line induced by Hep-88 mAb : A novel harmful mAb. Proceedings of the Austration Society for Biochemistry and molecular biology. 42:248.

#### 8.4 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

8.4.1 การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจหาอนุพันธ์ของเซลล์มะเร็งและเอ็นโรฟลีโอซาร์coma (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) 15 มิ.ย. 2562 ถึง 14 มิ.ย. 2563

8.4.2 การพัฒนาแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจคัดกรองสารเคลือบ เฟอร์โรล ซัลบูทามอล และซิลิคาเฟอร์โรลในปัสสาวะสุกร (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) 1 มิ.ย. 2562 ถึง 30 พ.ย. 2563

8.4.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดใบชะอม (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2561

8.4.4 การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแร็คโตะพามีนตกค้างโดย lateral flow strip test ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) 14 ก.ย. 2561 ถึง 13 ก.ย. 2562

## ผู้ร่วมโครงการคนที่ 2

1. ชื่อ-นามสกุล (ไทย) นายกิตตินันท์ โกมลภิส
2. ชื่อ-นามสกุล (อังกฤษ) Mr. Kittinan Komolpis
3. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1012 03241 97 0
4. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ A3
5. หน่วยงาน สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อาคารสถาบัน 3 ซอยจุฬาฯ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-218-8078 (ทำงาน) 089-664-6266 (มือถือ)

โทรสาร 02-253-3543 e-mail: kittinan.k@chula.ac.th

## 6. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีพ.ศ.ที่ได้รับ
University of Michigan	Doctor of Philosophy	Chemical Engineering	2545
University of Michigan	Master of Engineering	Chemical Engineering	2539
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	ชีวเคมี	2535
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรบัณฑิต	ชีวเคมี	2532

## 7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

เทคโนโลยีชีวภาพ (การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดี การวิเคราะห์ด้วย ELISA และแถบทดสอบ)

## 8. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

### 8.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :

โครงการ “การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารตกค้างในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภค” โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023)

### 8.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

8.2.1 การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพสำหรับตรวจอะมิโนไฮแดนโทอินในเนื้อสัตว์ โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ

8.2.2 การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจหาฮอร์โมนพืชและเอ็นโรฟลอกซาซิน ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) 15 มิ.ย. 2562 ถึง 14 มิ.ย. 2563

8.2.3 การพัฒนาแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจคัดกรองสารเคลือบ เทอรอล ซัลบูทามอล และซิลพาเทอรอลในปัสสาวะสุกร ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) 1 มิ.ย. 2562 ถึง 30 พ.ย. 2563

### 8.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

#### 8.3.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

1. Boonsombuti A, **Komolpis K**, Luengnaruemitchai A and Wongkasemjit S. 2014. Enhancement of ABE fermentation through regulation of ammonium acetate and D-xylose uptake from acid-pretreated corncobs. *Annals of Microbiology* 64: 431-439 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)
2. Wongtangprasert T, Natakathung W, Pimpitak U, Buakeaw A, Palaga T, **Komolpis K** and Kongchareonporn N. 2014. Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. *Journal of Zhejiang*

University-Science B (Biomedicine and Biotechnology) 15: 165-172 (แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

3. Umarphorn Chadseesuan, U., Puthong, S., Gajanandana, O., Palaga, T. and **Komolpis, K.** 2013 Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for 1-aminohydantoin detection. Journal of AOAC International 96: 1-8

(แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project-3-954 1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

4. Chusri, M., Wongphanit, P., Palaga, T., Puthong, S., Sooksai, S. and **Komolpis, K.** 2013. A Production and Characterization of Monoclonal Antibody Against Enrofloxacin. Journal of Microbiology and Biotechnology 23: 69-75

(แหล่งทุน – โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์วิจัยวัสดุขั้นสูง (Project 954-3-1023) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ)

5. **Komolpis, K.**, Udomchokmongkol, C., Phutong, S. and Palaga, T. 2010. Comparative production of a monoclonal antibody specific for enrofloxacin in a stirred-tank bioreactor. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 16: 567-571

6. Pimpitak U., Puthong, S., **Komolpis, K.**, Petsom, A., Palaga T. 2009. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. Food Chemistry 116: 785-791

(แหล่งทุน – สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ)

7. Damrongsakkul S., Ratanathammapan K., **Komolpis K.** and Tanthapanichakoon W. 2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 14: 202-206

8. **Komolpis K.**, Srivannavit, O. and Gulari E. 2002. Light-directed simultaneous synthesis of oligopeptides on microarray substrate using a photogenerated acid. Biotechnology Progress, 18:641-646.

9. Wang H.Y., **Komolpis K.**, Kaufman P.B., Malakul P., Shotipruk A. 2001. Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (*Glycine max*). *Biotechnology Progress*; 17:421-430.

10. Wu E., **Komolpis K.**, Wang H.Y. 1999. Chemical extraction of indigo from *Indigofera tinctoria* while attaining biological integrity. *Biotechnology Techniques*, 13:567-569.

11. **Komolpis K.**, Kaufman P.B., Wang H.Y. 1998. Chemical permeabilization and in situ removal of daidzein from biologically viable soybean (*Glycine max*) seeds. *Biotec. Techniques*, 12:697-700.

### 8.3.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

1. Nuntanidvorakul P, Komolpis K and Khongchareonporn N. Production and characterization of monoclonal antibody against ciprofloxacin. 1<sup>st</sup> ASEAN Plus Three Graduate Research Congress. March 1-2, 2012. Chiang Mai, Thailand.

2. Wongtangprasert T, Palaga T, Komolpis K and **Khongchareonporn N.**

Development of oxytetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2011). July 2-3, 2011. Hong Kong.

3. Tesvichian S, Komolpis K, Khongchareonporn N, Puthong S, Piampitak U and Buakeaw A. Development of tetracycline test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 3th Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference (TISD2010). 4-6 March 2010. Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand.

4. Khongchareonporn N, Komolpis K and Puthong S. Production and Characterization of monoclonal antibodies against oxytetracycline. The 1<sup>st</sup>

CMU Graduate Research conference . 27th November 2009. Chiangmai

University, Chiangmai, Thailand.

5. Kanchanabanca C, **Komolpis, K.**, Khongchareonporn, N. Production and characterization of monoclonal antibodies against tetracycline. 9<sup>th</sup> National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185.

6. Kongkaviton, P., Khongchareonporn, N., **Komolpis., K.** Production and characterization of monoclonal antibodies against ractopamine. The 20<sup>th</sup> Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008 : Biotechnology for Global Care”. October 14<sup>th</sup>-17<sup>th</sup>,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 138

7. Saneewong, S., Khongchareonporn, N., **Komolpis, K.** Development of norfloxacin test kit using enzyme-linked immunosorbent assay technique. The 20<sup>th</sup> Annual Meeting and international Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2008 : Biotechnology for Global Care”. October 14<sup>th</sup>-17<sup>th</sup>,2008. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. p: 129

8. Kaewwiset, S., **Komolpis, K.**, Palaga, T. Development of progesterone test kit using enzyme-linked immunosorbent assay. 9<sup>th</sup> National Grad Research Conference. 14-15 March 2008. Burapha University, Bangsaen Chonburi, Thailand. p: 185

9. Womphanit P., **Komolpis, K.**, Palaga, T. Development of enrofloxacin detecting test kit using enzyme-linked immunosorbent assay. The 12<sup>th</sup> Biological Science Graduate Congress. 17-19 December 2007. Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, Malaysia. P:196

#### 8.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

8.4.1 การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจหาฮอร์โมนฟลือกซาซินและเอ็นโรฟลือกซาซิน (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) 15 มิ.ย. 2562 ถึง 14 มิ.ย. 2563





## 7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมหาบัณฑิต) ระบุสาขาวิชาการ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง การเตรียมมอนอโคลนอลแอนติบอดี และการผลิตแถบทดสอบ

## 8. ผลงานวิจัย

### 8.1 ผลงานวิจัยที่พิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- 1) Chadseesuwan, U., Sangdokmai, A., Pimpitak, U., **Puthong, S.**, Palaga, T. and Komolpis, K. (2016). Production of a monoclonal antibody against aflatoxin M1 and its application for detection of aflatoxin M1 in fortified milk. *Journal of Food and Drug Analysis*. 1 – 8.
- 2) Wongtangprasert, T., Natakathung, W., **Pimpitak, U.**, Buakeaw, A., Palaga, T., Komolpis, K. and Khongchareonporn, N. (2014). Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*. 15(2) : 165 – 172.
- 3) **Pimpitak, U.**, Puthong, S., Komolphis, K., Petsom, A., and Palaga, T. (2009). Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimps samples. *Food Chemistry*. 116: 785-791.

### 8.2 ผลงานวิจัยที่เสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

- 1) Komolpis, K., Puthong, S., Buakeaw, A., Khongchareonporn, N., and **Pimpitak, U.** (2017). Development of immunochromatographic strip test for detection of AMOZ, a nitrofurantoin metabolite, in shrimp. The 29<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand.
- 2) Puthong, S., Komolpis, K., Buakeaw, A., Khongchareonporn, N., Palaga, T. and **Pimpitak, U.** (2015). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for detecting progesterone in milk. The 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand.
- 3) Puthong, S., Buakeaw, A., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., and **Pimpitak, U.** (2015). Production of monoclonal antibody against 3-amino-2-oxazolidinone. The 27<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Thailand.
- 4) Sangdokmai, A., **Pimpitak, U.**, Buakeaw, A., Palaga, T., and Komolpis, K. (2011). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Aflatoxin M1. 2011 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology IPCBEE. 16. IACSIT Press, Singapore.

- 5) Tesvichian, S., Komolpis, K., Khongchareonporn, N., Puthong, S., **Pimpitak, U.**, and Buakeaw, A. Development of Tetracycline Test Kit Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technique. (2010). The 3<sup>rd</sup> Technology and Innovation for Sustainable Development International Conference. (TISD2010). Faculty of Engineering, Khon Kaen University, Thailand, 4 – 6 March 2010.

### 8.3 โครงการวิจัยที่ดำเนินการอยู่

8.3.1 การพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจหาอนุพันธ์ฟล็อกซาซินและเอ็นโรฟล็อกซาซิน (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) 15 มิ.ย. 2562 ถึง 14 มิ.ย. 2563

8.3.2 การพัฒนาแถบทดสอบแบบไหลในแนวระนาบสำหรับตรวจคัดกรองสารเคลือบ เฮอร์อล ซัลบูทามอล และซิลิคาเทอรอลในปัสสาวะสุกร (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) 1 มิ.ย. 2562 ถึง 30 พ.ย. 2563

8.3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งจากสารสกัดใบชะอม (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีงบประมาณ 2561

8.3.4 การประเมินประสิทธิภาพชุดแถบทดสอบแรคโตพามีตค้ำโดย lateral flow strip test ในตัวอย่างเนื้อสัตว์และอาหารสัตว์ (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) 14 ก.ย. 2561 ถึง 13 ก.ย. 2562