# ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของรากมะข่วง

# Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Zanthoxylum rhetsa* Root

**พิชิต สุดตา***
Pichit Sudta
**ธนะชัย ทองสุข****
Tanachai Thongsuk
**นันทิพร แตงทับ****
Nunthiporn Tangtap

**Received** : October 1, 2018
**Revised** : November 13, 2018
**Accepted** : November 29, 2018

**บทคัดย่อ**

สารสกัดรากมะข่วงเตรียมได้โดยการสกัดรากแห้งของมะข่วง (*Zanthoxylum rhetsa*) ด้วยเทคนิคการแช่หมักในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และสารสกัดชั้นเมทานอล ตามลำดับ สารสกัดทุกชนิดใช้ในการศึกษาปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นเพื่อหาสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิกลุ่มหลัก การทดสอบด้วยรีเอเจนต์ที่เหมาะสมพบว่าสารสกัดทุกชนิดมีกลุ่มสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารแอลคาลอยด์ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลัก สารสกัดชั้นเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตตและสารสกัดชั้นเฮกเซน สารสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ($IC_{50}$; 1.12 ± 0.01 mg/mL) และความสามารถในการรีดิวซ์ได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดชนิดอื่นๆ จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ผลของการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และสารสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเฉพาะมะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก NCI-H187 อย่างจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพด้วยค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 22.78, 26.50 and 3.37 μg/mL ตามลำดับ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดของรากมะข่วงเป็นแหล่งใหม่ของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติเพื่อการปกป้องหรือแม้แต่การป้องกันโรคภัยที่เป็นอันตรายต่อชีวิต นอกจากนี้รากของมะข่วงอาจเป็นอีกทางเลือกที่มีศักยภาพเพียงพอต่อการพัฒนาสู่การรักษาโรคมะเร็งที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง

**คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน / ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง / มะข่วง**

*อาจารย์ประจำหน่วยวิจัยเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี
Research Unit of Natural Product Chemistry, Division of Chemistry, Faculty of Science and Technology Phetchaburi Rajabhat University
**นักศึกษาสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี
Chemistry student Faculty of Science and Technology Phetchaburi Rajabhat University

ABSTRACT

Dried roots of *Zanthoxylum rhetsa* were extracted with hexane, ethyl acetate and methanol using maceration technique to obtain the hexane, ethyl acetate and methanol crude extracts, respectively. All crude extracts were examined for the total phenolic and total flavonoid constituents, antioxidant and cytotoxic activities. In addition, the preliminary phytochemical screening for the main groups of secondary metabolites were also investigated. The general detection reagents showed the presence of various secondary metabolites, especially the alkaloids which was the major component of all extracts. The highest total phenolic and total flavonoid were found in the methanol crude extract, followed by the crude ethyl acetate and hexane extracts. The methanol crude extract exhibited the strongest DPPH radical scavenging activity ($IC_{50}$; 1.12 ± 0.01 mg/mL) and reducing power in the comparison to the other extracts. The evaluation of antioxidant activities of all extracts showed a positive correlation between total phenolic and total flavonoid contents. The results of cytotoxicity screening found that hexane, ethyl acetate and methanol crude extracts exhibited specific and potent cytotoxic effect against only small cell lung cancer NCI-H187 with $IC_{50}$ values of 22.78, 26.50 and 3.37 μg/mL, respectively. The present study suggests that the extracts of *Z. rhetsa* roots are a new source of natural antioxidant for protective as well as prevention of life-threating diseases. In addition, the root of *Z. rhetsa* may have the potential to be developed into therapeutic option for treating cancer with high specificity.

**Keywords : Antioxidant Activity / Cytotoxic Activity / *Zanthoxylum rhetsa***

**บทนำ**

สารอนุมูลอิสระ (free radicals) จัดเป็นสารที่มีความว่องไวสูงเนื่องจากขาดคู่อิเล็กตรอน ซึ่งร่างกายของมนุษย์สามารถได้รับจากสิ่งแวดล้อมหรือแม้แต่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆภายในร่างกาย ถ้ามีสารอนุมูลอิสระจำนวนมากจะสามารถทำลายโครงสร้างในระดับดีเอ็นเอ โปรตีน หรือสารชีวโมเลกุล ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เกิดโรครุนแรงชนิดต่างๆ เช่น โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคความดันโลหิต โรคความจำเสื่อม โรคพาร์คินสัน และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคมะเร็ง (Young & Woodside, 2001; Hussaln, et al., 2003) ซึ่งในปัจจุบันนี้โรคมะเร็งถือเป็นสาเหตุของการตายของมนุษย์ในลำดับต้นๆ เมื่อเทียบกับโรคร้ายแรงชนิดอื่นๆ และยังคงมีอัตราเพิ่มขึ้นทุกๆปี (Bray, et al., 2013) และพบว่าการรักษาผู้ป่วยด้วยการทำเคมีบำบัด (chemotherapy) ยังเป็นวิธีที่นิยมมากในปัจจุบัน แต่มักพบว่ายาต้านมะเร็งที่ใช้ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์รุนแรงและก่อให้เกิดผลข้างเคียง โดยการเข้าทำลายเซลล์ปกติของร่างกาย เนื่องมาจากการออกฤทธิ์อย่างไม่จำเพาะเจาะจง ดังนั้นการคิดค้นเพื่อหาโมเลกุลของยาชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติทั้งการทำลายเซลล์มะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพ และการออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งอย่างมีความจำเพาะเจาะจงเพื่อลดผลข้างเคียงต่างๆ จึงยังมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง (Atkins & Gershell, 2002)

พืชสมุนไพรถือได้ว่าเป็นแหล่งของการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ และมีแนวโน้มในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้โมเลกุลต้นแบบสู่การพัฒนาไปเป็นยารักษาโรคเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง (Saeidnia & Abdollahi, 2014) ดังจะเห็นได้จากการค้นพบโมเลกุลที่ใช้เป็นยารักษา

โรคมะเร็งในปัจจุบันหลายชนิดได้มาจากพืช เช่น Paclitaxel (Taxol®) quinine digoxin vincristine และ vinblastin เป็นต้น (Graham, et al., 2000) แต่ยังมียาที่ได้จากพืชบางชนิดไม่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคต่อได้ เนื่องจากมีความเป็นพิษสูง จึงจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาวิจัยอย่างเร่งด่วนเพื่อค้นหาโมเลกุลทดแทนจากพืชสมุนไพรชนิดใหม่ๆที่มีประสิทธิ์ภาพสูงและปลอดภัยกว่า (Newmann & Cragg, 2007)

มะข่วง (*Zanthoxylum rhetsa*) มีชื่อพ้องคือ *Z. limonella* และ *Z. budraga* Wall Ex. DC. ซึ่งมีชื่อเรียกตามท้องถิ่นที่หลากหลาย เช่น มะแขว่น (ภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) กำจัดต้น (ภาคใต้) หรือพริกนายพราน (ภาคตะวันตก) เป็นต้น จัดเป็นไม้ยืนต้นในวงศ์ Rutaceae (Somanabandhu, et al., 1992; Suksathan, et al., 2009) พบได้ในแถบประเทศอินเดีย บังกลาเทศ พม่า มาเลเซีย หรือแม้แต่ประเทศเขตร้อนอื่นๆ ส่วนในประเทศไทยพบมากในพื้นที่ภาคเหนือ และอาจพบได้บ้างแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ ตามภูมิปัญญาแพทย์แผนโบราณ มะข่วงถูกนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อรักษาอาการท้องอืด ท้องร่วง โรคไขข้อ โรคทางเดินปัสสาวะ รักษาสมดุลน้ำตาลในเลือด ใช้แก้อาการอักเสบของแผลต่างๆ รักษาอหิวาตกโรค หลอดลมอักเสบ โรคหอบหืด บรรเทาอาการปวดฟัน โรคความจำเสื่อม และรักษาโรคหัวใจ เป็นต้น (Chowdhury, et al., 1994; Ghani, 1998; Reddy & Jose, 2011) สารสกัดจากส่วนผล น้ำมันหอมระเหยจากผล และสารสกัดจากใบของมะข่วงมีสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา (Wannissorn, et al., 2005; Charoenying, et al., 2008; Nanasombat & Wimuttigosol, 2011) และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Payum, et al., 2013; Islam, et al., 2014) ลำต้น เปลือกลำต้น ราก และเปลือกรากของมะข่วงมีสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ ลิกแนน คูมาริน และ เอไมด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Tantapakul, et al., 2012) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Penali, et al., 2007) หรือต้านการอักเสบ (Lima, et al., 2009) สารแอลคาลอยด์ที่พบในมะข่วงบางชนิดแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น 8-methoxy-*N*-methylflindersine ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเปลือกลำต้น แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างอ่อนจากการทดสอบด้วย brine shrimp lethality bioassay มีค่า $LC_{50}$ 53.96 $\mu$g/mL (Ahsan, et al., 2000) สาร 6-acetonyldihydrochelerythrin และ arnottianamide ที่แยกได้จากหนามลำต้น แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็งของมนุษย์ ได้แก่ เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa มะเร็งตับชนิด Hep G2 มะเร็งเต้านมชนิด SK-BR-3 และ MDA-MB-231 มะเร็งลำไส้ชนิด HCT 116 และ SW480 และมะเร็งผิวหนังชนิด A375 ที่ค่า $IC_{50}$ ในช่วง 29.74-500.00 $\mu$M (Sreelekha, et al., 2014) นอกจากนี้ สาร simulanoquinoline chelerybulgarine 2'-episimulanoquinoline 2,11-didemethoxyvepridimerine B และ rhetsidimerine ที่เคยมีรายงานการวิจัยว่าพบในส่วนเปลือกรากของมะข่วง และแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารของมนุษย์ (cell lines; SCL SCL-6 SCL-37'6 SCL-9 Kato-3 และ NUGC-4) ด้วยค่า $ED_{50}$ อยู่ในช่วง 37.47-94.28 $\mu$M (Ahsan, et al., 2014)

จากความต้องการอย่างเร่งด่วนในการค้นพบสารต้านมะเร็งรูปแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูง ผนวกกับการมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในระดับต่ำของสารบริสุทธิ์จากมะข่วงตามที่ได้กล่าวไว้แล้วนั้น ผู้วิจัยได้มองเห็นประเด็นจากการนำพืชสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ตามหลักแพทย์แผนโบราณที่เน้นการใช้ยาในรูปของสารสกัด รวมถึงความจริงบางประการที่นักวิทยาศาสตร์ค้นพบว่าในบางครั้งการใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรมักจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้ยาบริสุทธิ์ (Choi & Chung, 2003; Karalliedde & Gawarammana, 2007) ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารสกัดประกอบด้วยสารที่มีโครงสร้างแตกต่างกันอย่างหลากหลายและร่วมกันแสดงฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพสูงด้วยกลไกที่ซับซ้อน (Stevens, et al., 2000) ประกอบกับการที่นักวิทยาศาสตร์มีความเชื่อว่าการค้นหาสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจเป็นจุดเริ่มต้นของการค้นพบสารต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพ

(Saeidnia & Abdollahi, 2013) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เบื้องต้นระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากรากมะข่วง ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการวิจัยมาก่อน อีกทั้งมีการวิเคราะห์สารพฤกษเคมีเพื่ออธิบายความสัมพันธ์เบื้องต้นระหว่างสารที่เป็นองค์ประกอบหลักกับการแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของรากมะข่วง

**วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย**

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์สำคัญที่ใช้ในการศึกษา เช่น rotary evaporator (Buchi B-580) และ spectrophotometer (Shimadzu UV MINI1240V) สารเคมีที่สำคัญ เช่น *L*-ascorbic acid (Carlo Erba) 2,2-diphenylpicrylhydrazine (Sigma-Aldrich) ammonium molybdate (Merck) potassium ferric-cyanide (Merck) trichloroacetic acid (Merck) folin-Ciocalteu reagent (Carlo Erba) gallic acid (Merck) สารที่เป็นส่วนผสมของรีเอเจนต์ที่ทดสอบกลุ่มสารพฤกษเคมี และตัวทำละลายสำหรับการวิเคราะห์ใช้ชนิด analytical grad ส่วนตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดพืชใช้ชนิด commercial grad ที่ผ่านการกลั่น

แหล่งตัวอย่างพืช

รากของมะข่วงเก็บจาก ต.ยางน้ำกลัดเหนือ อ.หนองหญ้าปล้อง จ. เพชรบุรี เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2556 ตัวอย่างพืชแห้งได้รับการตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์โดยการเปรียบเทียบข้อมูลพันธุ์ไม้ที่สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช โดยเก็บตัวอย่างพืชแห้ง (PCS-Z-002) ไว้ที่หน่วยวิจัยเคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี การเตรียมสารสกัดพืชด้วยการบดรากมะข่วงแห้งให้ละเอียดเป็นผง ชั่งผงรากมะข่วงน้ำหนัก 3.5 กิโลกรัม บรรจุในขวดแก้ว ทำการสกัดด้วยวิธีการแช่หมัก ดังนี้ แช่ผงรากมะข่วงด้วยเฮกเซนเป็นเวลา 3 วัน กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองและระเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (*vacuum* rotary evaporator) ทำซ้ำ 3 ครั้ง จะได้สารสกัดชั้นเฮกเซน แช่กากพืชที่เหลือด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วสูงขึ้น ได้แก่ เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ตามลำดับ โดยใช้วิธีเช่นเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซน จะได้สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต และสารสกัดชั้นเมทานอล ตามลำดับ นำสารสกัดทั้ง 3 ชนิดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์

การวิเคราะห์สารพฤกษเคมีเบื้องต้น

วิเคราะห์สารพฤกษเคมีกลุ่มหลักเบื้องต้นในรากมะข่วง ได้แก่ แอลคาลอยด์ พอลีฟีนอลิก สเตอร์ลอยด์ เทอร์พีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ โดยนำสารสกัดมาทำปฏิกิริยากับน้ำสารเคมีที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มสารแต่ละชนิด (Deolu et al., 2008; Selvakumar et al., 2012) สังเกตผลที่ปรากฏจากความจำเพาะของแต่ละการทดสอบ รายงานผลเป็นสัญลักษณ์บวก (+) ซึ่งหมายถึงพบกลุ่มสารที่ต้องการทดสอบ และสัญลักษณ์ลบ (-) หมายถึงไม่พบกลุ่มสารที่ต้องการทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน: *In vitro*

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ McDonald et al (2001) โดยการผสมสารละลาย 50% w/v Folin-Ciocalteu reagent จำนวน 0.5 mL ในสารละลาย 20% w/v sodium carbonate จำนวน 2.5 mL และสารละลายของสารสกัดหรือสารละลายของ gallic acid (ความเข้มข้น 10.0 20.0 30.0 40.0 50.0 และ 60.0 mg/L) จำนวน 1.0 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในที่พ้นแสงเป็นเวลา 45 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 nm สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ gallic acid และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดใน

สารสกัดรากมะข่วง โดยรายงานเป็นค่าเทียบเท่ากับ gallic acid หรือ gallic acid equivalents (GAE) ในหน่วย mg/g โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ด้วยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chang et al (2002) โดยการนำสารละลาย quercetin ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน (10.0 20.0 30.0 40.0 50.0 และ 60.0 $\mu$g/mL ในเอทานอล) หรือสารละลายของสารสกัดรากมะข่วง จำนวน 0.5 mL ผสมกับน้ำกลั่น 1.5 mL และสารละลาย 10% w/v aluminium chloride จำนวน 0.5 mL เขย่าให้รวมเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย potassium acetate เข้มข้น 1.0 mol/L จำนวน 0.10 mL และน้ำกลั่น 2.80 mL เก็บสารละลายที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 40 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 nm สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ quercetin และคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดรากมะข่วงโดยรายงานเป็นค่าเทียบเท่ากับ quercetin หรือ quercitin equivalents (QE) ในหน่วย mg/g โดยทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

การวิเคราะห์ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดวิเคราะห์โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Yen & Due (1994) โดยการเติมสารละลาย DPPH (เข้มข้น 0.1 mmol/L ในเอทานอล) 1.0 mL ลงในสารละลายของสารสกัดปริมาตร 3.0 mL ซึ่งมีความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.25 0.50 1.00 1.50 2.00 และ 2.50 $\mu$g/mL ในเอทานอล) เก็บสารละลายผสมที่อุณหภูมิปกติเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 nm คำนวณค่า % inhibition ของทุกสารสกัดด้วยสมการที่ 1 โดยใช้ *L*-ascorbic acid เป็นสารมาตรฐาน

$$\% \text{ DPPH inhibition} = [(A_0-A_1)/A_0] \times 100 \qquad (1)$$

โดยที่ $A_0$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ $A_1$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดที่เติมสารสกัดหรือเติม *L*-ascorbic acid นำค่า % inhibition (แกน Y) ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัด (แกน X) แล้วคำนวณหาค่า $IC_{50}$ (The half maximal inhibitory concentration)

การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์

วิเคราะห์ด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Oyaizu (1986) โดยการผสมสารละลายของสารสกัดในเอทานอลที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.2 0.4 0.6 และ 0.8 mg/mL) จำนวน 1.0 mL ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.6 จำนวน 2.5 mL และสารละลาย potassium ferricyanide เข้มข้น 1% w/v จำนวน 2.5 mL อุ่นสารละลายที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 15 นาที เติมสาละลาย trichloroacetic acid เข้มข้น 10% w/v จำนวน 2.5 mL นำสารละลายที่ได้จำนวน 5.0 mL เติมลงในน้ำกลั่น 5.0 mL ตามด้วยการเติมสารละลาย 0.1 % w/v ferric chloride จำนวน 1.0 mL วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 700 nm สารสกัดที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากจะแสดงว่าสารสกัดชนิดนั้นมีความสามารถในการรีดิวซ์ที่สูง

การวิเคราะห์ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง; *in vitro*

ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัด ทดสอบโดยห้องปฏิบัติการศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ใช้วิธี Resazurin microplate assay (REMA) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ O' Brien, et al. (2000) ซึ่งเป็นการวัดสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์โดยใช้เครื่อง SpectraMax M5

multi-detection microplate reader (Molecular Devices, USA) และรายงานผลเป็น % inhibition ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ 2

$$\% \text{ inhibition} = [1-(FU_T/FU_C)] \times 100 \qquad (2)$$

เมื่อ $FU_T$ และ $FU_C$ คือค่าเฉลี่ยของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จากสภาวะที่เติมและไม่ได้เติมสารสกัดรากมะข่วงตามลำดับ การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งแบ่งเป็น 2 ตอนย่อย ได้แก่ 1) ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของทุกๆสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุด 50.0 $\mu$g/mL 2) หาค่า $IC_{50}$ ของสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ดีจากตอนที่ 1 โดยใช้โปรแกรม SOFTMax Pro software (Molecular Devices, USA) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซึ่งเซลล์มะเร็งที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก NCI-H187 โดยใช้ 0.5% DMSO เป็น negative control และใช้ยา tamoxifen doxorubicin และ ellipticine เป็น positive controls

**ผลการวิจัย**

จากการเตรียมสารสกัดรากมะข่วงโดยวิธีการแช่หมักในตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบทั้งหมด 3 ชนิด คือ สารสกัดชั้นเฮกเซน (ของแข็งหนืดสีเหลือง หนัก 19.61 กรัม (0.56%)) สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต (ของแข็งสีน้ำตาล หนัก 82.11 กรัม (2.34%)) และสารสกัดชั้นเมทานอล (ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม หนัก 214.53 กรัม (6.12%))

สารพฤกษเคมีหลัก

จากการศึกษาชนิดของสารพฤกษเคมีหลักโดยการทำปฏิกิริยาเคมีกับสารทดสอบที่มีความจำเพาะกับกลุ่มสารสำคัญ ได้ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 1 และพบว่าสารสกัดเฮกเซนมีสารกลุ่มพอลีฟีนอล สเตอรอยด์ และเทอร์พีนอยด์เป็นองค์ประกอบ แต่ไม่พบสารประเภทฟลาโวนอยด์ สารสกัดเอทิลแอซิเตตมีทั้งสารในกลุ่มพอลีฟีนอล สเตอรอยด์ เทอร์พีนอยด์ และฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่สารสกัดชั้นเมทานอลไม่พบสารกลุ่มสเตอรอยด์และเทอร์พีนอยด์ แต่พบสารพอลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ และที่สำคัญจากการวิเคราะห์กลุ่มสารพฤกษเคมีเบื้องต้นนี้พบว่า ทั้งสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และสารสกัดชั้นเมทานอล มีสารกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งให้ตะกอนสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้นจำนวนมากเมื่อทำปฏิกิริยากับ Dragendorff' s reagent แสดงให้เห็นว่ารากของมะข่วงอาจประกอบด้วยสารกลุ่มแอลคาลอยด์ที่มีโครงสร้างหลากหลาย ทั้งแอลคาลอยด์มีสภาพขั้วของโมเลกุลต่ำซึ่งละลายได้ดีในเฮกเซน และแอลคาลอย์ที่มีสภาพขั้วโมเลกุลสูงขึ้น ซึ่งสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายเอทิลแอซิเตตและเมทานอล ตามลำดับ

**ตารางที่ 1** สารพฤกษเคมีกลุ่มหลักในรากมะข่วง

| กลุ่มสาร | วิธีทดสอบ/ผลที่ปรากฏ | ผลการทดสอบ | | |
|---|---|---|---|---|
| | | เฮกเซน | เอทิลแอซิเตต | เมทานอล |
| แอลคาลอยด์ | Dragendorff' test / ตะกอนสีน้ำตาลแดง | +++ | +++ | +++ |
| พอลีฟีนอล | $FeCl_3$ test (5% $FeCl_3$)/ สารละลายสีน้ำเงินม่วง | + | ++ | ++ |
| สเตอรอยด์ | Salkowski Test/สารละลายแยกชั้น ชั้นล่างมีสีเขียว | + | + | - |
| เทอร์พีนอยด์ | Liebermann Buchard test/รอยต่อชั้นของสารละลายมีสีน้ำตาลแดง | + | + | - |
| ฟลาโวนอยด์ | Lead acetate test/ตะกอนสีเหลือง | - | ++ | ++ |

(+++) ผลทดสอบชัดเจนมาก (++) ผลทดสอบชัดเจนปานกลาง (+) ผลทดสอบชัดเจนน้อย (-) ไม่ให้ผลกับการทดสอบ

ปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดรากมะข่วงจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid ($y = 0.0107x + 0.0399$; $r^2 = 0.9991$) และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของ quarcetin ($y = 0.0665x + 0.0055$; $r^2 = 0.9931$) ได้ผลดังตารางที่ 2

**ตารางที่ 2** ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดรากมะข่วง

| สารสกัด | ปริมาณสารสำคัญ (± SD)[†] | |
|---|---|---|
| | ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูล gallic acid/กรัม) | ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูล quarcetin/กรัม) |
| สารสกัดชั้นเฮกเซน | $17.41 \pm 0.19^{a}$ | $10.70 \pm 0.07^{d}$ |
| สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต | $31.67 \pm 0.02^{b}$ | $23.92 \pm 0.49^{e}$ |
| สารสกัดชั้นเมทานอล | $142.27 \pm 0.25^{c}$ | $61.65 \pm 0.02^{f}$ |

[†] mean ± SD (n= 3); ตัวเลขภายใต้ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a-f) ในคอลัมน์เดียวกันหมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 2 พบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลมีปริมาณสารฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด สารสกัดเฮกเซนมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดน้อยที่สุด ในขณะที่สารสกัดเอทิลแอซิเตตมีปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในระดับปานกลาง

ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน: *In vitro*

ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดโดยการวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดในการกำจัดสารที่มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีสูงเนื่องจากขาดคู่อิเล็กตรอนของ DPPH เทียบกับสารมาตรฐาน *L*-ascorbic acid ได้ผลดังภาพที่ 1ก จากภาพที่ 1ก พบว่า %

DPPH radical scavenging ของทุกสารสกัดมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด และในทุกๆ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ สารสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดีกว่าสารสกัดเอทิลแอซิเตต และสารสกัดชั้นเฮกเซนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ถึงอย่างไรก็ตามในทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ สารสกัดเมทานอลแสดงฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ต่ำกว่า *L*-ascorbic acid โดยสามารถแสดงผลเปรียบเทียบด้วยค่า $IC_{50}$ ในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** ค่า $IC_{50}$ จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH

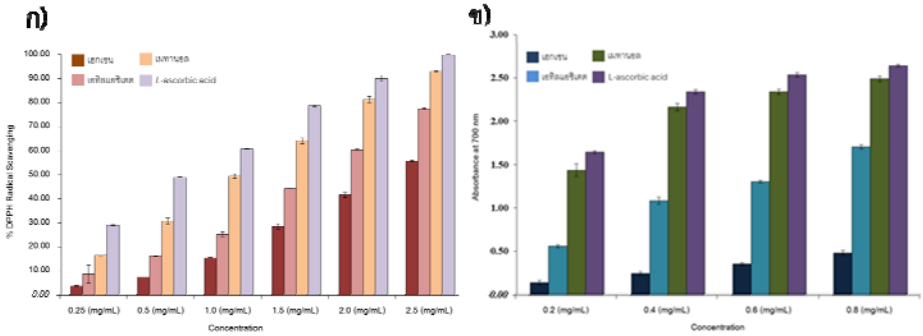
| สารที่ทดสอบ | สารสกัดชั้นเฮกเซน | สารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต | สารสกัดชั้นเมทานอล | วิตามินซี |
|---|---|---|---|---|
| $IC_{50}$ (mg/mL, mean ± SD) | $2.35 \pm 0.02^{d}$ | $1.66 \pm 0.02^{c}$ | $1.12 \pm 0.01^{b}$ | $0.56 \pm 0.17^{a}$ |

† n = 3; ตัวเลขภายใต้ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน (a-h) หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$);

จากข้อมูลค่า $IC_{50}$ ในตารางที่ 3 พบว่าสารสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดเอทิลแอซิเตตในขณะที่สารสกัดเฮกเซนแสดงฤทธิ์ต่ำที่สุด แต่ถึงอย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีสารสกัดชนิดใดเลยที่แสดงฤทธิ์ดีกว่าหรือเทียบเท่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของวิตามินซี ซึ่งการที่สารสกัดเมทานอลแสดงฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดชนิดอื่น อาจเนื่องมาจากการมีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดดังที่ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น ซึ่งสารประกอบเหล่านี้นับได้ว่าเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอีกกลุ่มหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพของการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีของพืชเกือบทุกชนิด (Rice-Evens, et al., 1996)

**ความสามารถในการรีดิวซ์**

การวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดจากรากมะข่วงเป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่ $Fe^{3+}$ ใน potassium ferric cyanide เพื่อเปลี่ยนเป็น $Fe^{2+}$ ด้วยปฏิกิริยารีดักชัน โดยผลการวิเคราะห์แสดงในภาพที่ 1ข




**ภาพที่ 1** ก) % DPPH free radical scavenging ± SD (n=3, $p < 0.05$) ของสารสกัดจากรากมะข่วง ข) ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดรากมะข่วงแสดงด้วยค่าการดูดกลืนแสง ± SD (n=3, $p < 0.05$)

จากภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการรีดิวซ์ของทุกสารสกัดเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น ที่ความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบ คือ 0.80 mg/mL วิตามินซีแสดงความสามารถในการรีดิวซ์ได้สูงสุด ในขณะที่สารสกัดเมทานอล เอทิลแอซิเตต และเฮกเซนแสดงความสามารถในการรีดิวซ์เรียงลำดับจากมากไปน้อย จากผลการทดสอบนี้ถือเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการสนับสนุนการแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดว่า ความสามารถในการรีดิวซ์จะส่งผลถึงการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีของสาร (Yen & Duh, 1993; Chang, et al., 2002) ซึ่งจะเห็นได้จากการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุดของสารสกัดเมทานอล เมื่อเทียบกับสารสกัดเอทิลแอซิเตต และเฮกเซนในทุกวิธีที่ใช้ทดสอบอาจเนื่องมาจากการมีสารกลุ่มหลักที่สามารถให้อิเล็กตรอนหรือให้ไฮโดรเจนได้ดีที่สุด นั่นคือสารในกลุ่มพอลีฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์นั่นเอง (Duh, 1998; Chang, et al., 2002)

**ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง**

ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิดในเบื้องต้น ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก NCI-H187 ของสารสกัดชั้นเฮกเซน เอทิลแอซิเตต และชั้นเมทานอล ที่ความเข้มข้น 50.0 $\mu$g/mL แสดงในตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดที่ความเข้มข้น 50.0 $\mu$g/mL

| สารสกัด | KB cell line | | MCF7 cell line | | NCI-H187 cell line | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | % inhibition | Activity | % inhibition | Activity | % inhibition | Activity |
| เฮกเซน | 8.21 % | Inactive[a] | 24.41 % | Inactive[a] | 98.22 % | Active[b] |
| เอทิลแอซิเตต | 25.29 % | Inactive[a] | 58.07 % | Active[b] | 95.08 % | Active[b] |
| เมทานอล | 15.60 % | Inactive[a] | 33.30 % | Inactive[a] | 100.24 % | Active[b] |

a หมายถึง มี % inhibition < 50% และ b หมายถึง มีค่า % inhibition ≥ 50%;

จากตารางที่ 4 ซึ่งแสดงผลของการทดสอบเบื้องต้นในการหาสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ดี ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากัน คือ 50.0 $\mu$g/mL และพบว่าสารสกัดเฮกเซนไม่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB และเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 แต่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด สารสกัดเอทิลแอซิเตตไม่แสดงฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก KB แต่แสดงฤทธิ์อย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และแสดงฤทธิ์ดีต่อเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 ส่วนการแสดงฤทธิ์ของสารสกัดชั้นเมทานอลมีแนวโน้มเช่นเดียวกับสารสกัดเฮกเซน กล่าวคือไม่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก และเซลล์มะเร็งเต้านม แต่แสดงฤทธิ์ความเป็นพิษที่ดีต่อเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 จะเห็นได้ว่าทุกๆสารสกัดแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษที่สูงต่อเฉพาะเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 เท่านั้น เพื่อเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ของสารสกัดแต่ละชนิด จึงมีการทดสอบเพื่อหาค่า $IC_{50}$ และได้ผลดังตารางที่ 5

**ตารางที่ 5** ฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ของสารสกัดจากรากมะข่วง

| ความเข้มข้น (μg/mL) | เฮกเซน | | เอทิลแอซิเตต | | เมทานอล | | Positive control | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | Ellipticine | Doxorubicin |
| | % inhibition | $IC_{50}$ (μg/mL) | % inhibition | $IC_{50}$ (μg/mL) | % inhibition | $IC_{50}$ (μg/mL) | $IC_{50}$ (μg/mL) | $IC_{50}$ (μg/mL) |
| 0.21 | 9.34 | 22.78 | 3.41 | 26.50 | 8.09 | 3.37 | 2.21 | 0.11 |
| 0.67 | 6.28 | | -6.10[a] | | 10.38 | | | |
| 1.85 | 10.15 | | -1.48[a] | | 14.38 | | | |
| 5.56 | 10.83 | | 12.02 | | 89.20 | | | |
| 16.67 | 34.80 | | 29.85 | | 99.64 | | | |
| 50.00 | 98.22 | | 95.08 | | 100.24 | | | |

Negative control คือ 0.5% DMSO (% inhibition = 0.00); $IC_{50}$ คำนวณโดยโปรแกรม SOFTMax Pro software; a หมายถึง การมี % inhition ค่าเป็นลบเนื่องจากค่า $FU_T > FU_C$ จาก Resazurin microplate assay

จากผลการทดสอบในตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ดีที่สุด ซึ่งดีกว่าสารสกัดเฮกเซนและสารสกัดเอทิลแอซิเตตประมาณ 7 และ 8 เท่า ตามลำดับ แต่ถึงอย่างไรก็ตามสารสกัดเมทานอลยังแสดงฤทธิ์ไม่ดีเทียบเท่ายามาตรฐาน โดยแสดงฤทธิ์ต่ำกว่ายา ellipticine และยา doxorubicin ประมาณ 1.5 และ 30 เท่า ตามลำดับ จากผลของฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดรากมะข่วงแสดงให้เห็นถึงความจำเพาะในการแสดงฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 เท่านั้น ซึ่งการมีสมบัติเช่นนี้ถือเป็นข้อดีในการพัฒนาสู่การเป็นยารักษาโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพ (Narang & Desai, 2009) และจะพบในยารักษาโรคมะเร็งบางชนิดเท่านั้น เช่น การออกฤทธิ์อย่างจำเพาะของยา cisplatin ที่มีต่อมะเร็งรังไข่ (Wallace & Higby, 1974) และมะเร็งต่อมลูกหมาก (Wiltshaw, et al., 1974) เป็นต้น โดยการแสดงฤทธิ์อย่างมีความจำเพาะของยานี้อาจขึ้นอยู่กับทั้งสัณฐานวิทยา (morphology) และสรีระวิทยา (physiology) ของเซลล์มะเร็งแต่ละชนิด และยังไม่สามารถพิสูจน์ปัจจัยหลักที่มีผลอย่างแท้จริงได้ แต่ยังมียาบางชนิด เช่น paclitaxel (Taxol®) ซึ่งเป็นยารักษาโรคมะเร็งปอดที่มีผลข้างเคียงค่อนข้างสูงหลายประการ เช่น การมีภาวะเม็ดเลือดขาว neurophile ต่ำ (neutropenia) ผมร่วง (alopecia) และอาการเมื่อยล้ารุนแรง (fatigue) เป็นต้น ซึ่งล้วนแต่มีสาเหตุมาจากการที่ยาเข้าทำลายเซลล์ปกติของร่างกายได้เช่นเดียวกับการทำลายเซลล์มะเร็ง (Nabholtz, et al., 2002) ดังนั้นการค้นพบครั้งแรกของความจำเพาะในการแสดงฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากรากมะข่วงในงานวิจัยนี้ นับเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ดีในการวิจัยต่อยอดเพื่อพัฒนาสมุนไพรจากรากของมะข่วงสู่การรักษาโรคมะเร็งอย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดรากมะข่วงพบความสัมพันธ์เบื้องต้นที่น่าสนใจ คือ สารสกัดที่มีปริมาณฟีนอลิกและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด ส่งผลถึงการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดชนิดอื่น ดังจะเห็นได้จากการแสดงฤทธิ์ที่ดีที่สุดของสารสกัดชั้น

เมทานอล แต่ถึงอย่างไรก็ตามการค้นพบความสัมพันธ์เบื้องต้นนี้คงยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าสารองค์ประกอบกลุ่มพอลีฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เท่านั้นที่มีผลเชิงบวกต่อการแสดงฤทธิ์ของรากมะข่วง เนื่องจากมีผลการวิจัยบางประการที่แสดงให้เห็นว่าการมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของรากมะข่วง อาจไม่ได้มาจากอิทธิพลของสารพอลีฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เท่านั้น เช่น ในกรณีของสารสกัดชั้นเฮกเซน ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดน้อยที่สุด อีกทั้งยังเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ต่ำสุด แต่ยังแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ในระดับดี ซึ่งมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตตและชั้นเมทานอลเพียงแค่ประมาณ 1.2 และ 6.8 เท่า ตามลำดับ ประกอบกับผลการวิจัยจากการวิเคราะห์กลุ่มสารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่พบว่าสารสกัดชั้นเฮกเซนมีสารองค์ประกอบหลักเป็นสารแอลคาลอยด์ ดังนั้นจึงพออธิบายในเบื้องต้นได้ว่าการแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดชั้นเฮกเซนอาจมีอิทธิพลหลักมาจากสารองค์ประกอบในกลุ่มแอลคาลอยด์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน และมีสภาพขั้วของโมเลกุลต่ำ ดังเช่น รายงานการวิจัยของ Ahsan et al (2014) ที่กล่าวถึงการมีฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพราะอาหารของสารแอลคาลอยด์บริสุทธิ์สภาพขั้วต่ำซึ่งแยกได้จากเปลือกรากมะข่วง เช่น chelerybulgarine simulanoquinoline 2'-episimulanoquinoline 2,11-didemethoxyvepridimerine B และสาร rhetsidimerine เป็นต้น ดังนั้นการแสดงฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ดีของสารสกัดชั้นเอทิลแอซิเตต และชั้นเมทานอล นอกจากจะมีอิทธิพลมาจากกลุ่มสารพอลีฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์น้อยแล้ว อาจมีการแสดงฤทธิ์ของสารแอลลาคาลอยด์ที่มีสภาพขั้วโมเลกุลสูงขึ้นร่วมด้วยเช่นเดียวกัน

นอกจากประเด็นข้างต้นที่กล่าวไปแล้วนั้น สิ่งสำคัญที่ค้นพบจากงานวิจัยนี้คือ สารสกัดรากมะข่วงมีฤทธ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอย่างมีความจำเพาะ โดยการแสดงฤทธิ์อย่างโดดเด่นต่อเฉพาะเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ซึ่งอาจเนื่องมาจากการออกฤทธิ์ร่วมกันอย่างมีประสิทธิภาพสูง ของสารองค์ประกอบทั้งสารพอลีฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มอื่นๆที่เคยมีรายงานว่าเป็นองค์ประกอบในมะข่วง เช่น สารในกลุ่มลิกแนน คูมาริน เอไมด์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ (Tantapakul, et al., 2012) ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อยอดเพื่อหาข้อสรุปเชิงลึกอันจะเป็นประโยชน์ในการเพิ่มมูลค่าทางยาของสมุนไพรมะข่วง

## สรุป

งานวิจัยนี้ถือเป็นงานวิจัยที่มุ่งเน้นได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์เบื้องต้นระหว่างสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลัก กับ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดจากรากมะข่วง ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดทั้งการใช้วิธี DPPH free radicals scavenging assay และการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ สารสกัดชั้นเมทานอลแสดงฤทธิ์ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดชั้นเฮกเซน และชั้นเอทิลแอซิเตต แต่ไม่เทียบเท่า *L*-ascorbic acid ซึ่งการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของรากมะข่วงนี้อาจเป็นข้อมูลส่วนหนึ่งในการสนับสนุนการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพตามการรักษาแบบแพทย์แผนโบราณที่ใช้รากมะข่วงในการรักษาโรค เช่น โรคความจำเสื่อม โรคพาร์กินสัน และโรคหัวใจเป็นต้น ซึ่งล้วนเป็นโรคที่อาจมีสาเหตุมาจากการได้รับสารอนุมูลอิสระ นอกจากนี้สารสกัดจากรากมะข่วงยังแสดงฤทธิ์ที่น่าสนใจในแง่ของการออกฤทธิ์ทำลายเซลล์เซลล์มะเร็งอย่างมีความจำเพาะ โดยแสดงฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งปอด NCI-H187 เท่านั้น จากการแสดงฤทธิ์อย่างจำเพาะนี้อาจเนื่องมาจากการทำงานร่วมกันอย่างมีประสิทธิภาพของสารหลากหลายชนิดที่เป็นองค์ประกอบในรากมะข่วงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบแอลคาลอยด์ จากการค้นพบในงานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า รากของมะข่วงซึ่งเป็นสมุนไพรไทยอาจเป็นอีกแหล่งหนึ่งของธรรมชาติในการศึกษาวิจัยเชิงลึก เพื่อพัฒนาการนำรากของมะข่วงไปใช้

ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในรูปของสารสกัด ทั้งในแง่ของการใช้เพื่อป้องกันหรือส่งเสริมสุขภาพจากการได้รับสารอนุมูลอิสระ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำสารสกัดรากมะข่วงไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นประโยชน์ในด้านการรักษาโรคมะเร็งที่มีประสิทธิภาพและมีความปลอดภัยสูง

## References

Ahsan, M., et al. (2014). Cytotoxic dimeric quinolone-terpene alkaloids from the root bark of *Zanthoxylum rhetsa*. **Phytochemistry, 103**, 8-12.

_____. (2000). Constituents and cytotoxicity of *Zanthoxylum rhetsa* stem bark. **Fitoterapia, 71**, 679-700.

Atkins, J.H. & Gershell, L.J. (2002). Selective anticancer drugs. **Nature Reviews, 1**, 491-492.

Bray, F., et al. (2013). Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **International Journal of Cancer, 135**(5), 1133-1145.

Chang, C., et al. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug analysis, 10**, 178-182.

Charoenying, P., et al. (2008). Biological activities of *Zanthoxylum limonella* Alston. fruit extracts. **The KMITL Science and Technology Journal, 8**, 12-15.

Choi, S. & Chung, M.H. (2003). A review on the relationship between Aloe vera components and their biological effects. **Seminars in Integrative Medicine, 1**(1), 53-62.

Chowdhury, Y.M., Wahab, M.A. & Begum, J. (1994). **Medicinal plants of Bangladesh**. Dhaka : BCSIR, p.264.

Duh, P.D. (1998). Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne) : its scavenging effect on free radical and active oxygen. **Journal of American Oil Chemists's Society, 75**, 455-461.

Deuolu, A.A., Florence, O.J. & Anthony, J.A. (2008). Antioxidant activities and phenolic contents of the methanolic extracts of the stem of *Acokanthera oppositifolia* and *Adenia gummifera*. **BMC Complementary & Alternative Medicine, 8**, 1-11.

Ghani, A. (1998). *Medicinal plants of Bangladesh-chemical constituents and uses*. **Asiatic Society of Bangladesh**, 325.

Graham, J.G., et al. (2000). Plants used against cancer. **Journal of Ethno Pharmacology, 73**(3), 347-377.

Hussaln, S.P., Hofseth, L.J. & Harris, C.C. (2003). Raical causes cancer. **Nature Publishing Group, 3**, 276-285.

Islam, Md.K., et al. (2014). Antinociceptive and antioxidant activity of *Zanthoxylum budrunga* wall (Rutaceae) seed. **The Scientific World Journal, 1**, 1-7.

Karalliedde, L. & Gawarammana, I. (2007). **Traditional herbal medicines : A guide to their safe use**. Hammersmith Press Ltd, London, UK.

Lima, L.M., et al. (2009). Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics, 59**, 1151-1158.

McDonald, S., et al. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olove extracts. **Food Chemisty, 73**, 73-84.

Nabholtz, J.M.A., et al. (2002). Combination chemotherapy for metastatic breast cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy, 2**(2), 169-180.

Nanasombat, S. & Wimuttigosol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. ***Food Science Biotechnology*, 20**(1), 45-53.

Narang, A.S. & Desai, D.S. (2009). Anticancer Drug Development. **Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics**, 1, 49-92.

Newman, D.J. & Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products, 70**(3), 461-477.

O' Brien, J., et al. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) Fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Chemistry, 267**(17), 5421-5426.

Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition, 44**(6), 307-315.

Payum, T., et al. (2013). Folk use and antioxidant potential determination of *Zanthoxylum rhetsa* DC. Shoot-A highly hot spice folk vegetable of Arunachal Pradesh, India. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and research, 4**(2). 4597-4602.

Penali, L., et al. (2007). Low antiplasmodial activity of alkaloids and amide from the stem bark of *Zanthoxylum rubescens* (Rutaceae). **Parasite, 14**(2), 161-164.

Reddy, L. & Jose, B. (2011). Statistical analysis of the antibacterial activity of *Zanthoxylum rhetsa* seed essential oil. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 3**(1), 440-444.

Rice-Evans, C.A., Miller, J.M. & Paganga, G. (1996). Struture-antioxidant activity relationship of flavonoid and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine, 20**, 933-956.

Saeidnia, S. & Abdollahi, M. (2013). Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer. **Toxicol Applied Pharmacology, 271**, 49-63.

_____. (2014). Perspective studies on novel anticancer drug from natural origin : A comprehensive review. **International Journal of Pharmacology, 10**(2), 90-108.

Selvakumar, P., Kaniakumari, D. & Loganathan, V. (2012). Phytochemical screening and antioxidant activity of red flowered *Mirabillis jalapa* leaf in different solvents. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 3**(4), 440-446.

Somanabandhu, A.O., et al. (1992). Constituents of the stem bark of *Zanthoxylum limonella*. **Journal of the Science Society of Thailand, 18**, 181-185.

Sreelekha, M., et al. (2014). Cytotoxicity of 6-acetonyldihydrochelerythrin, arnottianamide and 6-(2-hydroxypropyl)-dihydrocherythrine towards human cancer cell lines. **Indian Journal of Chemistry, 53B**, 647-651.

Stevens, L.H., et al. (2000). Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. **Plant Physiology, 124**(1), 173-182.

Suksathan, R., et al. (2009). Note on spice plants in the genus *Zanthoxylum* (Rutaceae) in Northern Thailand. **Thai Forest Bulletin (Botany)**. The Flora Thailand Meeting, 197-204.

Tantapakul, C., et al. (2012). Antibacterial compounds from *Zanthoxylum rhetsa*. **Archives of Pharmacal Research, 35**(7), 1139-1142.

Wallace, H.J. & Higby, D.J. (1974). **Recents results in cancer research: platinum coordination complexes in cancer chemotherapy**. Springer-Verlag : New York, NY, USA.

Wannissorn, B., et al. (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia, 76**, 233-236.

Wiltshaw, E., Roberts, J.J. & Carr, B. (1974). **Recents results in research platinum coordination complexes in cancer chemotherapy.** Springer-Verlag: New York, NY, USA.

Yen, G.C. & Duh, P.D. (1993). Antioxidative properties of methanolic extracts from peanut hulls. **Journal of the American Oil Chemists's Society, 70**, 383-386.

Yen, G.C. & Duh, P.D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active oxgegen scecies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42**, 629-632.

Young, I.S. & Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in helth and disease. **Journal Clinical Pathology, 54**, 176-186.