



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และความคงตัว
ของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดดอกหางนกยูงฝรั่งแดง

Assessment of Antioxidation activity, anticancer activity and
stability of flavonoid-enriched extracts obtained from *Delonix regia*
(Bojer.) Raf. red flower extract.

ชื่อหัวหน้าโครงการ

ภก.ดร. วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

โครงการวิจัยประเภททุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณเงินรายได้

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

สัญญาเลขที่ Rx5/2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และความคงตัว

ของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดดอกหางนกยูงฝรั่งแดง

Assessment of Antioxidation activity, anticancer activity and
stability of flavonoid-enriched extracts obtained from *Delonix regia*
(Bojer.) Raf. red flower extract.

ชื่อหัวหน้าโครงการ

ภก.ดร. วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทนำ

ในปัจจุบันนี้ผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก แม้จะมีการพัฒนาที่นำมารักษามากมาย โดยเฉพาะโรคที่มีอุบัติการณ์การเกิดเป็นจำนวนมาก อย่างเช่น โรคมะเร็ง ดังนั้นการพัฒนาหาสารที่สามารถรักษาหรือป้องกันการเกิดมะเร็งรวมถึงชะลอการรุกรามของมะเร็งจึงเป็นสิ่งที่กำลังได้รับความสนใจในปัจจุบัน

คณะผู้วิจัยจึงมีความต้องการที่จะพัฒนาหาสารสำคัญจากดอกหางนกยูง โดยใช้ การสกัดในรูปแบบ green technology เพื่อให้มีความปลอดภัยและประยุกต์ในทางอุตสาหกรรมได้ง่าย หลังจากนั้นทำการประเมินคุณสมบัติทางพิษเคมีและฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยทางคณะผู้วิจัยคาดหวังว่าโครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์หรือสามารถนำไปพัฒนาเป็นเภสัชภัณฑ์ได้ต่อไป

คณะผู้วิจัย

25 กุมภาพันธ์ 2564

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย เรื่อง การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และความคงตัวของพลาไวโนอยด์ในสารสกัดดอกหางนกยูงฝรั่งแดงในครั้งนี้สามารถประสบความสำเร็จลงได้เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากทางคณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความกรุณา ให้ทุนวิจัยเลขที่สัญญา Rx5/2563 ตลอดจนถึงความช่วยเหลือในด้านการอำนวยความสะดวกในสถานที่และเครื่องมือสำหรับทำวิจัยที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย รวมไปถึง ผศ.ดร.พรรณเพ็ญ วัฒนาอาชากิจ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัยและให้คำแนะนำสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ จนโครงการวิจัยในครั้งนี้ประสบความสำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

25 กุมภาพันธ์ 2564

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และความคงตัวของพลาไวโนอยด์ในสารสกัดดอกหางนกยูงฝรั่งเศส

บทคัดย่อ

โรคมะเร็งเป็นโรคที่สร้างปัญหาให้กับวงการแพทย์ในปัจจุบันเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีอุบัติการณ์การเกิดโรคที่เพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเพื่อพัฒนาให้ยาหรืออาหารเสริมในอนาคต โดยงานวิจัยครั้งนี้ให้ความสนใจไปที่สารสกัดจากดอกหางนกยูงที่สกัดด้วยวิธี mercuration ด้วย 95% ethyl alcohol พบว่าในสารสกัดมีสารในกลุ่ม flavonoid อยู่ในปริมาณสูง โดย flavonoid ที่พบจากการเทียบกับสารมาตรฐานด้วยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) คือ rutin, isoquercitrin และ myricetin โดยพบอยู่ในปริมาณ 4.15±0.30 % w/w, 3.04±0.02 %w/w, 2.61±0.01 % w/w ตามลำดับ และเมื่อทำการนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จำนวน 2 วิธี ได้ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระ IC50 ด้วยวิธี DPPH assay 66.88±6.30 µg/ml และ ABTS assay 53.65±7.24 µg/ml หลังจากนั้นในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งพบว่าสารสกัดดอกหางนกยูงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 5 ชนิดที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ murine leukemia (P-388), human cervical carcinoma (HeLa), human breast adenocarcinoma (MCF-7), human oral cavity carcinoma (KB), human colon carcinoma (HT-29) ตามลำดับ โดย P-388 ที่มีความสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งสูงสุดเหลือ cell viability เพียง 35.28±4.07% อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าสารสกัดดอกหางนกยูงจะมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้านมะเร็ง แต่จากการทดสอบความคงตัวยังพบปัญหาสารสกัดที่สลายตัวได้ง่ายที่อุณหภูมิสูงๆ โดยเฉพาะ myricetin ที่มีอัตราการสลายตัวเร็วที่สุด ในการศึกษาในอนาคตอาจทำการศึกษาพัฒนารูปแบบระบบนำส่งเพื่อช่วยรักษาความคงตัวของสารสกัดให้ดีขึ้นเพื่อให้เกิดประโยชน์ในการนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ที่สะดวกขึ้น

Assessment of Antioxidation activity, anticancer activity and stability of flavonoid-enriched extracts obtained from *Delonix regia* (Bojer.) Raf. red flower extract.

Abstract

Cancer is a noncommunicable disease with increasing incidence and mortality rates both worldwide and in Thailand. Its apparent lack of effective treatments is posing challenging public health issues. Encouraging research results indicating probable anti-cancer properties of the *Delonix regia* flower extract (DRE) have prompted us to evaluate the feasibility of developing a type of product for future cancer prevention or treatment. In the present report, using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), we demonstrate in the DRE, the presence of high concentrations of three identifiable flavonoids, namely rutin 4.15 ± 0.30 % w/w, isoquercitrin 3.04 ± 0.02 %w/w, and myricetin 2.61 ± 0.01 % w/w respectively while the IC₅₀ of DPPH and ABTS assay antioxidation activity was 66.88 ± 6.30 µg/ml and 53.65 ± 7.24 µg/ml respectively. Our cancer cell line studies using the MTT assay demonstrated DREs potent and dose dependent inhibition of murine leukemia cell line (P-388: $35.28 \pm 4.07\%$ of cell viability remaining), as well as of human breast adenocarcinoma (MCF-7), human cervical carcinoma (HeLa), human oral cavity carcinoma (KB), and human colon carcinoma (HT-29) cell lines in that order of magnitude. DRE's apparent lack of cytotoxicity in 3 normal cell lines is a rare advantage not usually seen in current antineoplastic agents. Yet another challenge of the *Delonix regia* flower extract was its low dissolution rate and long-term storage stability, issues to be resolved before a future product can be formulated. Further studies are needed in elucidating other possible molecular anti-tumor mechanisms.

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
- ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์	2
- สมมติฐาน	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการวิจัย	17
1. การศึกษาองค์ประกอบทางพุทธเคมี	17
2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	21
3. การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็ง	31
4. การศึกษาความคงตัว	34
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	35
เอกสารอ้างอิง	37

บทที่ 1

บทนำ

โรคมะเร็งจัดเป็นโรคไม่ติดต่อที่มีอุบัติการณ์การตายสูงเป็นอันดับต้นๆ ของอัตราการตายทั้งหมด โดยในปัจจุบันพบอุบัติการณ์การเกิดโรคมะเร็งในประชากรทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทยเพิ่มสูงขึ้น จากข้อมูลดังกล่าว จัดได้ว่าโรคมะเร็งเป็นโรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศอย่างมาก จากข้อมูลพบว่าอัตราการเกิดโรคมะเร็งในประชากรไทยและต่างประเทศที่เพิ่มขึ้นสูงอย่างต่อเนื่อง[1-3] ทำให้การตื่นตัวในการค้นคว้าวิจัยยาและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคมะเร็งเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยสารกลุ่มสำคัญที่ได้รับความสนใจมาก คือสารสกัดจากธรรมชาติ โดยเฉพาะกลุ่มสารที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) พบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี [4] หางนกยูงฝรั่ง(Flam boyant)มีชื่อวิทยาศาสตร์ ว่า *Delonix regia* (Bojer) Raf. อยู่ในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) เช่นเดียวกับ *Peltophorum pterocarpum*, *Senna siamea* หรือ *Cassia bakeriana* เป็นพันธุ์ไม้ที่มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่บนเกาะมาดากัสการ์ ทวีปแอฟริกา ค้นพบครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2367 โดยนักพฤกษศาสตร์ชาวออสเตรเลีย ในประเทศไทยมีผู้นำเข้ามาปลูกเพื่อความสวยงาม ทำให้มีการแพร่กระจายไปทั่วประเทศไทย[5] ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ต้นโตเต็มที่สูงราว 12 - 18 เมตร ยอดไม้แผ่กว้างทรงกลมคล้ายร่ม มักมีรากโผล่พ้นดินออกโดยรอบเมื่อโตเต็มที่ ใบเป็นใบประกอบขนนกสองชั้นเรียงเวียนสลับและมีใบย่อยเรียงตรงข้ามกัน ขนาดใบย่อยใกล้เคียงกับใบย่อยของมะขาม แผ่นใบรูปขอบขนาน ปลายกลมโคนเบี้ยว ผิวใบเกลี้ยง เป็นพืชผลัดใบในประเทศไทยมักผลัดใบในฤดูร้อนช่วงเดือนมีนาคมถึงมิถุนายน ดอกหางนกยูงฝรั่ง ลักษณะเป็นช่อดอก ออกดอกตามปลายกิ่งและตามง่ามใบใกล้ปลายกิ่ง ดอกประกอบด้วยกลีบดอก 5 กลีบ มีเกสรตัวผู้ยาวงอนออกมาเหนือกลีบดอก โดยมักจะพบสายพันธุ์ดอกสีแดงมากกว่าสีเหลือง มีการศึกษาพบว่า สารสกัดจากหางนกยูงฝรั่งสามารถป้องกันการทำลายของตับได้[6] โดยมีรายงานพบว่าในดอกของหางนกยูงฝรั่ง มีสารสำคัญอยู่หลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มของ flavonoid[7-9] จึงทำให้ได้รับความสนใจในการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดของดอกหางนกยูง เนื่องจากมีรายงานวิจัย ต่างๆ เกี่ยวกับ ฤทธิ์ของสารในกลุ่ม flavonoid ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง[10-13] เช่น Genipin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (Colon cancer)[14] การยับยั้งการแบ่งโตของมะเร็งเต้านมจาก Quercetin[15] หรือ Hesperidin ที่ยับยั้งกระบวนการ cell migration และ cell invasion ในเซลล์มะเร็งปอด[16] ดังนั้นหาก

การศึกษาพบว่าสารสกัดดอกหางนกยูงมีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งได้จริง จะมีแนวโน้มที่สามารถศึกษาและพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์สำหรับใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางพิษเคมีของสารสกัดดอกหางนกยูง
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาต่อยอดในอนาคต

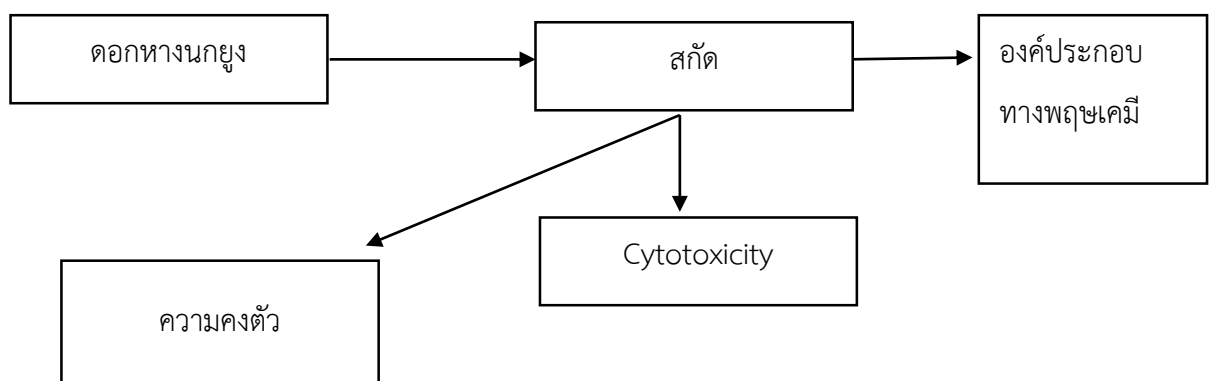
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แนวทางการพัฒนาต่อยอดสารสกัดดอกหางนกยูงฝรั่งเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ต่างๆ
2. ได้องค์ความรู้และข้อมูลทางวิชาการเพื่อใช้เผยแพร่ผลงานวิชาการ

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

จากข้อมูลฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารในกลุ่ม flavonoid ที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ ทางผู้วิจัยจึงทำการศึกษาหาองค์ประกอบทางพิษเคมี ชนิดของฟลาโวนอยด์ รวมถึงฤทธิ์ต่างๆของสารสกัดดอกหางนกยูงฝรั่ง เพื่อวัตถุประสงค์เพิ่มมูลค่าของสารสกัดและสามารถต่อยอดไปใช้ได้ในอนาคต

กรอบแนวคิด



รูปที่ 1 กรอบแนวคิดของงานวิจัย

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. มะเร็ง

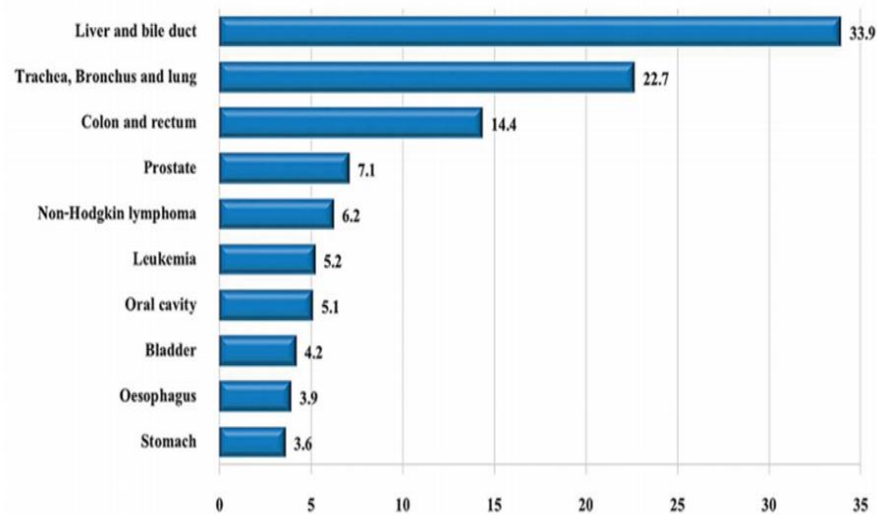
1.1. อุบัติการณ์การเกิดมะเร็ง

โรคมะเร็งเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้นๆ ของคนทั่วโลก จากข้อมูลขององค์การอนามัยโลกพบว่าในปี พ.ศ. 2558 มีผู้เสียชีวิตจากโรคมะเร็งราว 8.8 ล้านราย ซึ่งจำนวนผู้เสียชีวิตพบได้มากกว่าการเสียชีวิต ด้วย โรคเอดส์ วัณโรค และมาลาเรียรวมกัน โรคมะเร็งที่เป็นสาเหตุการตาย 5 อันดับแรกของโลก ได้แก่ มะเร็งปอด 1.69 ล้านราย มะเร็งตับ 788,000 ราย มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนัก 774,000 ราย มะเร็งกระเพาะอาหาร 754,000 ราย มะเร็งเต้านม 571,000 ราย

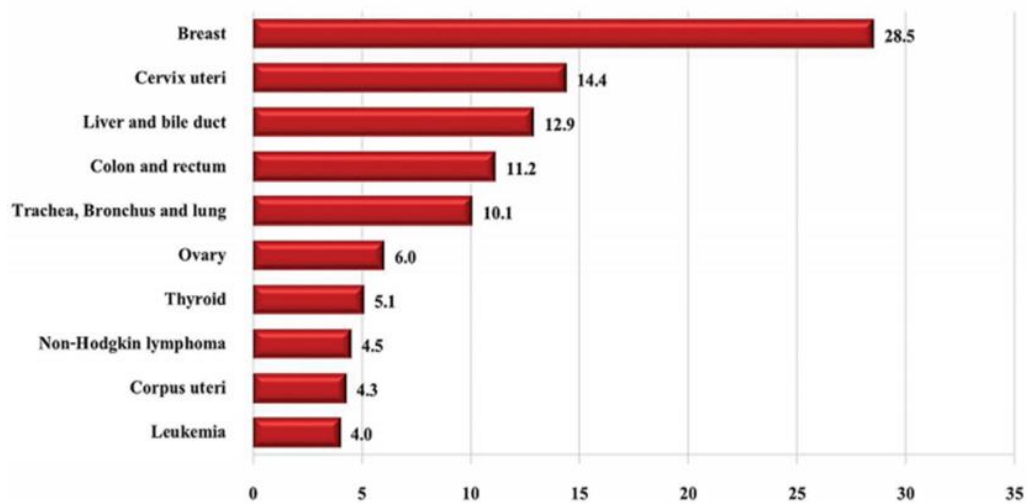
ประเทศไทยได้มีการคำนวณสถิติผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่โดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติจากข้อมูลของหน่วยทะเบียนมะเร็งระดับประชากร 15 แห่งทั่วประเทศ เป็นข้อมูลสถิติโรคมะเร็งในปี พ.ศ. 2553-2555 (Cancer in Thailand Vol VIII, 2010-2012) (ดังภาพ 2,3) พบว่าโรคมะเร็งที่พบบ่อยมาก 5 อันดับแรกในเพศชาย ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งเม็ดเลือดขาว ส่วนโรคมะเร็งที่พบบ่อยมาก 5 อันดับแรกในเพศหญิง ได้แก่ มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งปอด จากข้อมูลของสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ รายงานว่าในปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งประมาณ 61,082 คน เป็นเพศชาย 35,437 คน เป็นเพศหญิง 25,645 คน ซึ่งถือเป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดย เพศชายมีจำนวนผู้เสียชีวิต 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งช่องปากและคอกหยอย มะเร็งเม็ดเลือดขาว ส่วนเพศหญิงมีจำนวนผู้เสียชีวิต 5 อันดับแรก ได้แก่ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ จะเห็นได้ว่าโรคมะเร็งที่เป็นปัญหาสำคัญ 5 อันดับแรกของประเทศ คือ มะเร็งตับ มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งคิดเป็น 56.38% ของมะเร็งทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่าโรคมะเร็งมีอัตราการตายสูงสุดในปี พ.ศ.2552 (ดังภาพ 4)

จากข้อมูลล่าสุดผู้ป่วยโรคมะเร็งรายใหม่ที่มีมารับบริการตรวจวินิจฉัยและรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในระหว่างวันที่ 1 มกราคม 2558 ถึง 31 ธันวาคม 2558 จำนวนผู้ป่วยมะเร็งรายใหม่ที่มา

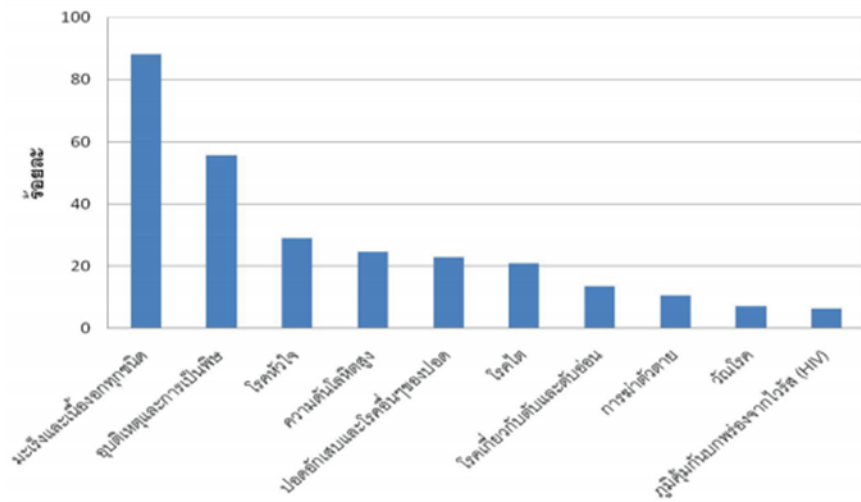
รับบริการ ทั้งหมด 3,439 คน พบว่ามะเร็งเต้านมมีอุบัติการณ์มากที่สุด 849 คน รองลงมาคือมะเร็งลำไส้ใหญ่ 406 คน และ มะเร็งตับ 378 คน ตามลำดับ และมะเร็งชนิดอื่น ๆ 1,806 คน



รูปที่ 2 การเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในเพศชาย ปี พ.ศ. 2553-2555 (ต่อประชากร 100,000 คน)

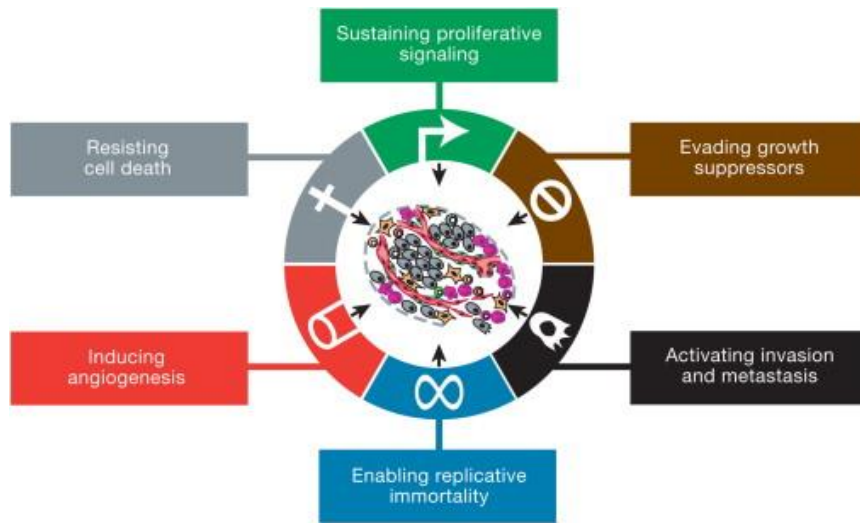


รูปที่ 3 การเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ ในเพศหญิง ปี พ.ศ. 2553-2555 (ต่อประชากร 100,000 คน)



รูปที่ 4 จำนวนและอัตราการตายต่อประชากร 100,000 คน จำแนกตามสาเหตุที่สำคัญ พ.ศ. 2552

1.2 มะเร็ง



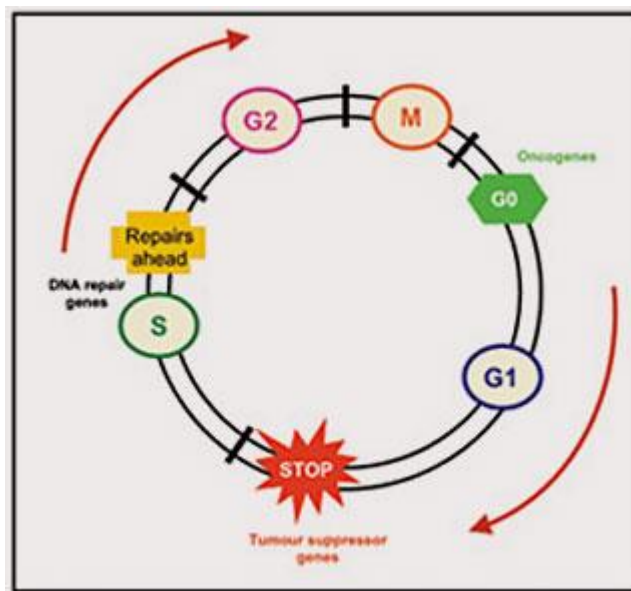
รูปที่ 5 คุณลักษณะเด่นของเซลล์มะเร็ง(The Hallmarks of Cancer)

เซลล์มะเร็งเกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ใหม่ที่ผิดปกติ กล่าวคือไม่สามารถควบคุม การแบ่งตัวของเซลล์และสามารถหลบหลีกกระบวนการตายของเซลล์ได้ เซลล์ที่เจริญเติบโตผิดปกตินี้เรียกว่า เนื้องอก (tumor) ซึ่งเป็นเนื้องอกที่ร้ายแรงสามารถรุกรานและแพร่กระจายไปยังอวัยวะส่วนต่างๆ ของร่างกายได้ และรบกวนการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกาย ซึ่งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งจะต้องอาศัยระบบน้ำเหลือง

และระบบหมุนเวียนโลหิต แต่ไม่ใช่เนื้องอกทุกชนิดจะเป็นมะเร็ง เพราะเนื้องอกไม่ร้ายแรงจะไม่ลุกลามไปยังอวัยวะข้างเคียงและไม่กระจายไปทั่วร่างกาย[17]

สาเหตุของการเกิดมะเร็งเกิดจากการกลายพันธุ์ ประกอบด้วย ทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มกายภาพ เช่น รังสี 2. กลุ่มเคมี เช่น บุหรี่ สารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและในอาหารต่างๆ 3. กลุ่มชีวภาพ เช่น เชื้อไวรัส และแบคทีเรียบางชนิด

1.3 วงจรชีวิตของเซลล์



รูปที่ 6 วงจรชีวิตของเซลล์

วัฏจักรการแบ่งตัวของเซลล์ (cell cycle) ประกอบด้วย phases ต่างๆ ดังนี้ ระยะเวลา S (synthesis) เป็นระยะที่มีการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ระยะ M phase เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัว (cell division) สามารถแบ่งย่อยออกเป็น ไมโทซิส (Mitosis) และการแบ่งไซโตพลาสซึม (cytokinesis) ซึ่ง S และ M phase จะถูกคั่นด้วย G1 phase เป็นระยะที่เซลล์เจริญเติบโต โดยมีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ ส่วนระยะที่คั่นระหว่าง S กับ M phase คือ G2 phase เป็นระยะที่สิ้นสุดการสร้าง ดีเอ็นเอ โครโมโซมเริ่มหดตัว แต่โครโมโซมจะปรากฏเห็นเป็น 2 โครมาทิด (chromatids) โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ 1 วัฏจักรไม่เท่ากัน แต่โดยทั่วไปแล้ว วัฏจักรของเซลล์ใช้เวลาประมาณ 20 ชั่วโมง

ยีนในร่างกายมนุษย์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งมีอยู่ 2 ชนิดคือ oncogenes และ tumor suppressor genes โดย oncogene เป็นยีนปกติหากมีการกลายพันธุ์แล้วทำให้ยีนนี้สร้างโปรตีนที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างก้อนมะเร็งได้ ส่วน Tumor suppressor gene เป็นยีนที่มีการผลิตโปรตีนซึ่งมีหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และยับยั้งการเกิดก้อนมะเร็ง หากเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในยีนนี้ มีผลทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไปจากการที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ [17]

หางนกยูงฝรั่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Delonix regia* (Bojer) Raf. อยู่ในวงศ์ถั่ว (Leguminosae) เช่นเดียวกับ นนทรี ชี่เหล็ก ประดู่แดง ชงโค คุณ กาหลง กัลปพฤกษ์ และกำมพู เป็นพันธุ์ไม้ที่มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่บนเกาะมาดากัสการ์ ทวีปแอฟริกา ค้นพบครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2367 โดยนักพฤกษศาสตร์ชาวออสเตรเลีย ในประเทศไทย มีผู้นำเข้ามาปลูกเพื่อความสวยงามทำให้มีการแพร่กระจายไปทั่วประเทศ (Sriwatharakul, 2018) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ต้นโตเต็มที่สูงราว 12 - 18 เมตร ยอดไม้แผ่กว้างทรงกลมคล้ายร่ม มักมีรากโผล่พื้นดินออกโดยรอบเมื่อโตเต็มที่ ใบเป็นใบประกอบขนนกสองชั้นเรียงเวียนสลับและมีใบย่อยเรียงตรงข้ามกัน ขนาดใบย่อยใกล้เคียงกับใบย่อยของมะขาม แผ่นใบรูปขอบขนาน ปลายกลมโคนเบี้ยว ผิวใบเกลี้ยง เป็นพืชผลัดใบ ในประเทศไทยมักผลัดใบในฤดูร้อนช่วงเดือนมีนาคมถึงมิถุนายน ดอกหางนกยูงฝรั่ง ลักษณะเป็นช่อดอก ออกดอกตามปลายกิ่งและตามง่ามใบใกล้ปลายกิ่ง ดอกประกอบด้วยกลีบดอก 5 กลีบ มีเกสรตัวผู้ยาวงอนออกมาเหนือกลีบดอก โดยมักจะพบสายพันธุ์ดอกสีแดงมากกว่าสีเหลือง [18, 19]

จากรายงานวิจัยทางด้านหางนกยูงฝรั่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปการศึกษาสาร polysaccharide ที่ได้จากส่วนของเมล็ด [20, 21] ในส่วนของดอกพบว่าการรายงานถึงองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น ที่เป็นสารในกลุ่ม phenolic และ flavonoid [19] นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากดอกของหางนกยูงฝรั่งยังมีฤทธิ์ป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ตับอีกด้วย [6] ดังนั้นจากข้อมูลเบื้องต้นที่เราทราบว่าองค์ประกอบสำคัญของสารสกัดของดอกหางนกยูง น่าจะเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ จึงทำให้เกิดงานวิจัยขึ้นนี้เพื่อศึกษาเจาะลึกถึงองค์ประกอบและความเป็นไปได้ของการนำสารสกัดดอกหางนกยูงมาพัฒนาให้อยู่รูปเครื่องสำอางหรืออาหารเสริมต่างๆ โดยในเบื้องต้นจะประเมินคุณสมบัติของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และความคงตัวของสารสกัดทั้งที่อยู่รูปสารสกัดและผลิตภัณฑ์เช่น เจล และสารละลาย

สารกลุ่ม Flavonoids

สารประกอบ Flavonoids เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทหนึ่งที่มีพบได้ทั่วไปในอาหารที่เป็นพืช เช่น ผักและผลไม้ โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบ Flavonoids เป็น Phenylbenzopyrones ประกอบด้วย

คาร์บอน 15 ตัว (C6 -C3 -C6) จัดเรียงเป็น 3 ring เรียกเป็น ring A, B, และ C โดย ring A และ B เป็น Benzene ring ส่วน ring C เป็น heterocyclic pyran ring ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง ในธรรมชาติ สารประกอบ Flavonoids มีมากกว่า 4,000 ชนิด ส่วนใหญ่ อยู่ในรูป Flavonoid glycoside ซึ่งมีหมู่ Hydroxyl หนึ่งหมู่ หรือมากกว่าในโมเลกุลของสารประกอบ Flavonoids จะเกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น glucose rhamnose arabinose และ xylose [22-24]

สารประกอบ Flavonoid glycoside สามารถพบได้ในส่วนของใบ ดอก ผล และเกสรดอกไม้ของพืช เป็นสารสี (soluble pigments) ที่พบในส่วนต่างๆ ของพืช โดยเฉพาะในดอกทำให้มีสีสวยงาม ส่วนใหญ่จะออกไปทางสีแดง สีเหลือง สีม่วง และสีน้ำเงินโดยส่วนของน้ำตาลมักจะจับที่ตำแหน่ง 3, 5 หรือ 7 ส่วนใหญ่มักจะพบ สารประกอบ Flavonoid glycoside ในส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ของดอกไม้และผลไม้ บางครั้งสามารถพบ สารประกอบในกลุ่ม Flavonoids ที่เป็น aglycone ในเนื้อไม้ [25, 26] สารประกอบ Flavonoids เป็นสารเมแทบอไลต์ขั้นทุติยภูมิในพืชสร้างจากกรดอะมิโนที่มีวงแหวน aromatic amino acids ได้แก่ phenylalanine tyrosine และ malonate โดยทำหน้าที่เป็นสารให้สีที่สำคัญในพืชช่วยในการกรองรังสีอัลตราไวโอเล็ต และการช่วยตรึงไนโตรเจน [27, 28] นอกจากนี้ สาร Flavonoids ยังมีความสำคัญต่อการสร้างรงควัตถุในพืชทำหน้าที่ เป็น phytoalexin เพื่อช่วยป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ (Jez et al., 2000, pp.768-791) ช่วยป้องกันแสงอุลตราไวโอเล็ตป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการถูกคุกคามจากไวรัส (Pielta, 2000, pp.1035-1042) สารประกอบ Flavonoids สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันซึ่งแทนที่ในโครงสร้าง พื้นฐาน ได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ 1) flavonols เช่น quercetin, kaempferol, myricetin 2) flavones เช่น luteolin, apigenin, chrysin 3) flavanones เช่น hesperetin, naringenin, eriodictyol 4) flavanols เช่น catechin, gallic acid, epicatechin, epigallocatechin, epicatechin-3-gallate, epigallocatechin-3-gallate 5) flavanonols เช่น taxifolin) 6) isoflavones เช่น daidzein, genistein, glycitein, formononetin 7) anthocyanidins เช่น cyanidin, delphinidin malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin

Flavonoids เป็นสารพฤษเคมีที่มีคุณสมบัติต่อต้านอนุมูลอิสระพบในเมล็ดสีชนิดละลายในน้ำของผัก ผลไม้เมล็ดธัญพืช ใบไม้และเปลือกไม้ Flavonoids มีอยู่มากมายหลายชนิด และพืชแต่ละชนิดจะมี Flavonoids แต่ละประเภทในความเข้มข้นที่ต่างกันไป แท้จริงแล้วมีการศึกษาหลายชิ้นพบว่า Flavonoids บางชนิด มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเหนือกว่าวิตามินซีหรือวิตามินอีถึง 50 เท่า และ Flavonoids ในองุ่นแดง มี

ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแอลดีแอล (LDL-fat) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการอุดตันของเส้นเลือดแดงและการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดมากกว่าวิตามินอีถึงกว่าหนึ่งพันเท่า

จากการศึกษาและสกัดสาร Flavonoids จากพืชและสมุนไพร โดย นิธิตา พลโคตร และ The 3rd Kamphaeng Phet Rajabhat University National Conference การประชุมวิชาการระดับชาติ ได้ศึกษาการตรวจหาปริมาณ Flavonoids ในเกสรบัวหลวง วิเคราะห์ด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric พบว่าปริมาณ Flavonoids ทั้งหมดในเกสรบัวหลวง 4 สายพันธุ์ที่นำมาทำให้แห้งเองมีปริมาณมากกว่าตัวอย่างจากร้านขายยาสมุนไพรอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, ที่ความเชื่อมั่น 95%) พบว่าสารสกัด methanol ของเกสรบัวหลวง 4 สายพันธุ์ มีปริมาณ Flavonoids ทั้งหมดอยู่ในช่วง 306.30-349.78 mg% และตัวอย่างจากร้านขายยาสมุนไพรมีปริมาณ Total Flavonoids ทั้งหมดอยู่ในช่วง 151.68-269.70 mg% (calculated as quercetin) ทั้งนี้ เชื่อว่าอาจเนื่องจาก แหล่งวัตถุดิบระยะเวลา และสภาวะการเก็บตัวอย่างที่แตกต่างกัน

มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) โดยดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดริ้วรอยก่อนวัย (Anti-wrinkles) เช่น จากงานวิจัยของ ศรัณยู อุ่นทวี, คุณัญญา เครือจันทร์, สุขวสา เกษียร และชนัญ ผลประไพ* สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง 6 ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120 เรื่องการสกัดสารออกฤทธิ์ทางเวชสำอางในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม พบว่าปริมาณสารต้านออกซิเดชัน คือ phenolic compounds, flavonoids และ proanthocyanidins ในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

1.3.2 สารกลุ่ม phenolic acids

Phenolic acids สามารถยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase (Inhibit tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์เมลานินโดย จะลดกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินช่วยป้องกันการสะสมของเมลานินนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางเพื่อให้ผิวขาว

1.3.3 สารกลุ่ม tannins

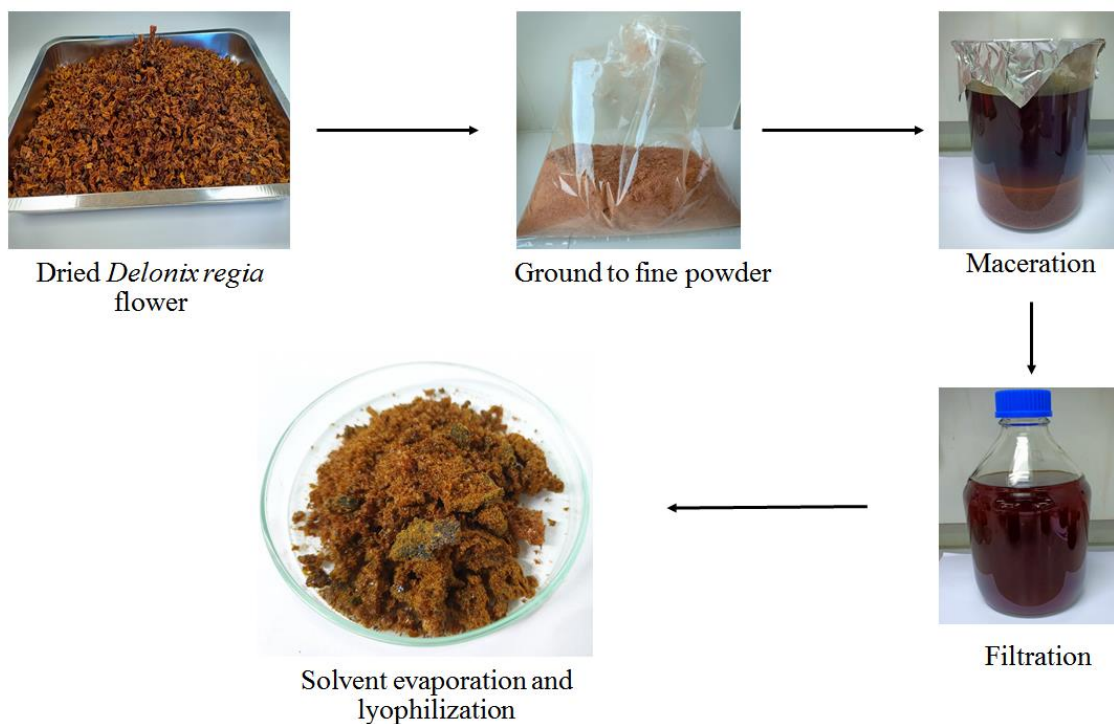
Tannins สามารถต้านอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) ทำให้ผิวตึงกระชับ มีความยืดหยุ่น ลดการระคายเคือง อาการแพ้และผื่นคัน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบนผิว ที่เป็นสาเหตุในการเกิดสิว

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสกัดสารจากดอกหางนกยูงฝรั่ง

ทำการเก็บดอกหางนกยูงฝรั่งที่บ้านแล้ว โดยเก็บในช่วงเดือน มีนาคมถึงพฤษภาคม แล้วนำมาตากแดดให้แห้ง นำดอกหางนกยูงแห้งมาสกัดด้วย 95% ethanol ด้วยวิธีการหมัก(maceration) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง. กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatmann หลังจากนั้นทำการระเหยตัวทำละลายให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง solvent-evaporation จนมีลักษณะข้นเหนียว. หลังจากนั้นจะทำการ lyophilization จนแห้ง เก็บ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สภาวะป้องกันแสง



รูปที่ 7 การสกัดดอกหางนกยูง

2. การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเบื้องต้น

2.1 Ferric chloride test.

หยดสารละลาย ferric chloride (FeCl_3) 1-2 หยด ลงในสารสกัดดอกหางนกยูง หากมีองค์ประกอบในกลุ่ม phenol group จะเกิดตะกอนสีน้ำเงินเข้มหรือดำ

2.2 Shinoda test.

ใส่ magnesium ribbons ในสารสกัด 2 mL หลังจากนั้นหยดกรด HCl เข้มข้น 3 หยด หากในสารสกัดมีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีส้ม แดง หรือ ม่วงมาเจนต้า(magenta)

2.3 Sodium hydroxide (10%) test.

หยดสารสกัด 3 หยด ลงในกระดาษกรอง Whatman No.1 หลังจากนั้นหยด 10% sodium hydroxide 1-2 หยด ทับลงไปบนหยดสารสกัด หากในสารสกัดมีโครงสร้างของฟลาโวนอยด์จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม และเมื่อนำไปส่องใต้แสง UV ความยาวคลื่น 365 nm จะเห็นการเรืองแสงสี เขียวหรือสีฟ้า

2.4 Molisch test.

ผสม 2 mL ของสารละลายสารสกัดดอกหางนกยูง กับ Molisch's reagent (α -naphthol ละลายใน ethanol) ปริมาณ 4-5 หยด ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน เติมกรด sulfuric acid 1 ml ช้าๆ ให้ไหลผ่านข้างหลอดทดลอง หากสารสกัดมีน้ำตาลหรืออยู่ในรูป glycoside จะเกิดชั้นวงแหวนสีม่วงระหว่างรอยต่อของสารสกัดและกรด หากที่น้ำตาลปริมาณสูงอาจเกิดเป็นสีม่วงทั้งชั้น

2.5 Dragendorff test.

หยดสารละลาย Dragendorff's reagent ลงในสารสกัด 2 mL หากมีสารประเภท alkaloid จะเกิดปฏิกิริยาตกตะกอนเป็นสารสีเหลืองส้ม

2.6 Foam test.

เติมสารสกัด ประมาณ 10 หยด ลงในน้ำกลั่น 10 ml ทำการเขย่าและตั้งทิ้งไว้หากมีสารประเภท saponin จะทำให้เกิดฟองที่คงตัว

2.7 Gelatin test.

หยดสารละลาย 2% gelatin 1-2 หยดลงในสารสกัด หากพบว่าเกิดการตกตะกอนขุ่นแสดงว่ามีองค์ประกอบของแทนนิน

3. การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางพฤกษเคมีเชิงปริมาณ

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก (Total Phenolic)

Total phenolic contents (TP) ทำการทดสอบโดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu (FC) colorimetric method [29-31] โดย pipette 25 μ l ของสารสกัดที่ละลายใน ethanol นำไปผสมกับ 75 μ l น้ำกลั่น ใน 96 well-plates, หลังจากนั้นเติม 1:1 FC reagent ลงไป 25 μ l incubated ในที่มืด 6 นาที. ครบเวลา เติมสารละลาย 7.5% Na_2CO_3 100 μ l ทำการ incubated ในที่มืด 90 นาที. phenolic content ทำการวัดปริมาณด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยใช้สารมาตรฐานคือ gallic acid รายงานผลเป็น gallic acid equivalents (GAE)/gram dry weight extract.

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid)

Total flavonoid content (TF) ทำการวิเคราะห์ด้วย microplate spectro-photometry. นำสารสกัด 20 μ l ผสมกับ 60 μ l ethanol in 96 well-plates. หลังจากนั้นเติม 4 μ l ของสารละลาย 10% AlCl_3 และ 1M potassium acetate 4 μ l เมื่อใส่สารครบเติมน้ำกลั่น 112 μ l นำไป incubated ในที่มืด 45 นาที total flavonoid content การวัดปริมาณด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 415 nm โดยใช้สารมาตรฐานคือ quercetin รายงานผลเป็น quercetin equivalents (QE)/gram dry weight extract.

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (Total sugar content)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลจะใช้วิธี phenol sulphuric acid assay โดยดัดแปลงวิธีจาก Masuko และคณะ (2005) [32]. โดยหลักการวิเคราะห์นี้ใช้การทำปฏิกิริยาของหมู่น้ำตาลที่ถูกกรดซัลฟูริกเข้มข้นย่อยด้วยปฏิกิริยา hydrolysis ได้เป็นสาร 5-hydroxymethylfurfural หลังจากนั้น 5-hydroxymethylfurfural จะทำปฏิกิริยากับ phenol ได้สารประกอบสีน้ำตาลเข้มที่สามารถดูดกลืนแสงได้ นำไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 490 nm ใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคส ในการทำกราฟมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล โดยทำการใช้สารสกัด 600 ul เติมสารละลาย 5% phenol และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 3 ml ทิ้งไว้ 10 นาที ทำการเขย่าให้เข้ากันและทิ้งไว้อีก 30 นาที นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง UV-spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 490 nm โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ glucose

3.4 วิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography)

จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-DAD อ้างอิงวิธีการจาก Chaemsawang[33] ทำการฉีด ด้วยวิธี gradient ใช้ mobile phase 1% acetic acid (solvent A) : acetonitrile (solvent B), flow rate 0.7 ml/min (table1) เพื่อหาปริมาณ flavonoid แต่ละชนิด ในสารสกัดดอกหางนกยูงฝรั่ง เทียบกับสารมาตรฐานฟลาโวนอยด์ ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 1. Gradient condition for HPLC analysis of the *Delonix regia* flower extract.

Time(min)	Pump A: 1%Acetic acid	Pump B: Acetonitrile
0	90	10
28	60	40
39	40	60
50	10	90
55	90	10

3.5 Fourier transform infrared spectroscopy

ทำการวิเคราะห์สารสกัดเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์และองค์ประกอบเบื้องต้นด้วย IR spectrum โดยใช้หัว e ATR probe ในการตรวจวัด ทำการวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 500 ถึง 4,000 cm^{-1}

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.1 DPPH assay

ทำการละลายสารสกัดดอกหางนกยูงฝรั่งด้วย methanol หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ละลายได้ มาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระมีสีม่วง หากสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเกิดการรับอิเล็กตรอนของสาร DPPH ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง วิธีการวิเคราะห์ Stankovic et.al [34] โดยทำการเตรียมสารละลาย 0.1 mM DPPH solution ด้วยการละลาย DPPH 1.97 mg ใน 50 ml methanol วิธีการทดสอบทำการใส่สารตัวอย่าง 100 μl ใน 96 well plates เติม DPPH 100 μl Incubate ในที่มืด 30 minutes ที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ด้วย microplate reader ความยาวคลื่น 520 nm.

%Inhibition was calculated following the equation = $((\text{Abs_Control}-\text{Abs_sample})/\text{Abs_control}) \times 100$

4.2 ABTS assay

ทำการเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS โดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง 14 mM ABTS กับ potassium persulfate ที่ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดเป็น $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ซึ่งมีลักษณะเป็นสารละลายสีเขียว วิธีเตรียมสารละลาย ABTS ทำการชั่ง ABTS 360.23 mg ละลายในน้ำปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml เตรียมสารละลาย 4.9 mM potassium persulfate โดยชั่ง 66.23 mg ละลายในน้ำปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml ผสมสารละลายทั้ง 2 ในอัตราส่วน 1:1, นำไป incubate ในที่มืด 16 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดเป็น $\text{ABTS}^{\bullet+}$ เจือจางสารละลาย $\text{ABTS}^{\bullet+}$ 1:50 กับ methanol ให้มี abs 0.1 - 0.7. หลังจากนั้น pipette สารตัวอย่าง 100 μl ใส่ลงใน 96 well plates, และสารละลาย $\text{ABTS}^{\bullet+}$ 100 μl นำไป incubating 6 นาที วิเคราะห์ด้วยเครื่อง microplate reader ความยาวคลื่น 734 nm

%Inhibition was calculated following the equation = $((\text{Abs_Control}-\text{Abs_sample})/\text{Abs_control}) \times 100$

5.Cells cytotoxicity และ Anticancer activity

เซลล์ที่จะทดสอบจะถูกนำมาเลี้ยง ภายใต้สภาวะ 37 °C, 5% CO₂ และทำการเปลี่ยนอาหาร ทุก 3 วัน ทำการ sub-culture ทุก 3 - 4 วัน ด้วย สารละลาย 0.25% trypsin-0.04% EDTA

เซลล์ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT assay และประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Inverted microscope มีดังนี้

- Human colon carcinoma (HT-29)
- Human oral cavity carcinoma (KB)
- Human breast adenocarcinoma (MCF-7)
- Murine leukemia (P-388)
- Human cervical carcinoma (HeLa)
- Human hepatocarcinoma (HepG2)
- African green monkey kidney fibroblast (Vero)
- Mouse cutaneous connective tissue (L929)
- Human keratinocyte immortal cell (HaCat)

5.2 Cytotoxic assay.

เซลล์ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT assay โดยทำการ seed cells จำนวน 1×10^5 cells ลงใน 96 well plate ทำการ incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารและใส่อาหารที่ตัวอย่างลงไป โดยตัวอย่างทำการเตรียมโดยการ นำ extract was dissolved in complete medium containing 0.5% DMSO to clear solution. เมื่อใส่สารสกัดลงไปทำการบ่มต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml จำนวน 10 μ l/well incubate เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะ 37 °C, 5% CO₂ หลังจากนั้นดูดสารละลายทิ้ง เติม 100%DMSO เพื่อละลายผลึก formazan จำนวน 100 μ l/well นำไปวัดด้วยเครื่อง microplate reader ความยาวคลื่น 570 nm และประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Inverted microscope

6. การทดสอบความคงตัวของ flavonoid ในสารสกัด

ทำการทดสอบความคงตัวของสารสกัดทางนกยูงในรูปแบบ crude , Solutions, Gels และ Serums ในสภาวะต่างๆ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณ flavonoid ที่เหลืออยู่ด้วยวิธี HPLC-DAD

7. Statistical Analysis. Data were expressed as mean-

ใช้การแปลผลแบบ ค่าเฉลี่ย \pm standard deviation (SD). และหาความต่างด้วย one-way ANOVA. ค่าความแตกต่างทางนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$).

บทที่ 4

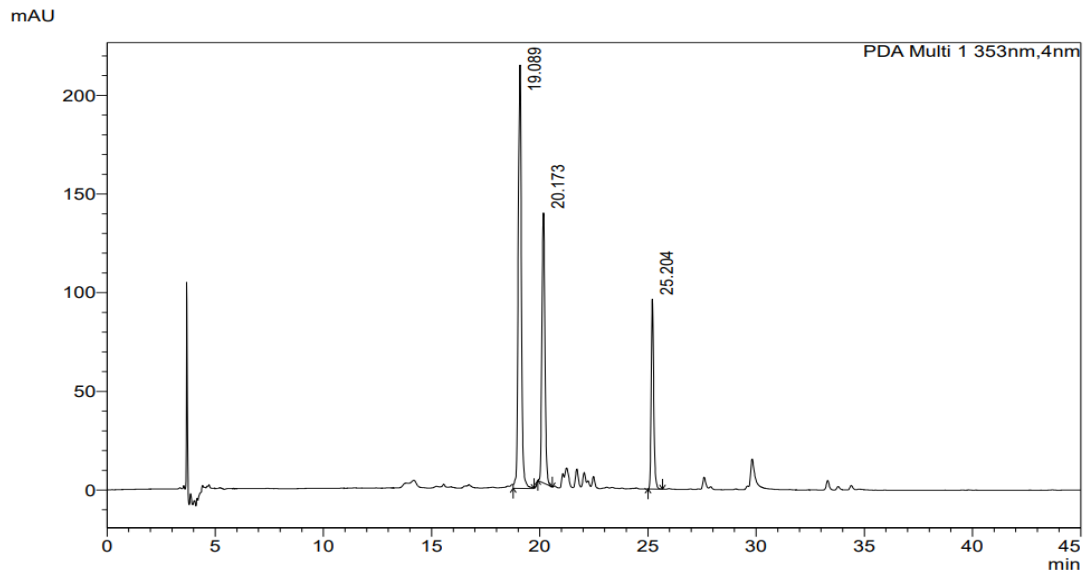
ผลการดำเนินงานวิจัย

ตารางที่ 2. Phytochemical screening

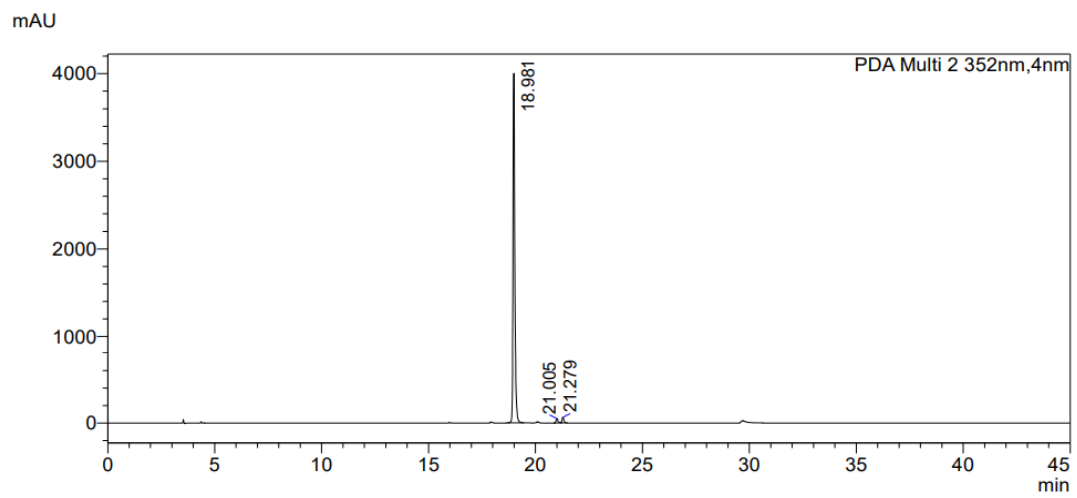
	DRE extract
Gelatin test-Tannins	-
Foam test-Saponins	-
Dragendroff test-Alkaloids	-
Molisch test- Glycosides	+
FeCl ₃ test-Phenolic	+
Shinoda test- Flavonoids	+
Sodium hydroxide test-Flavonoids	+

3.1 Qualitative and Quantitative Analysis of Phytochemicals.

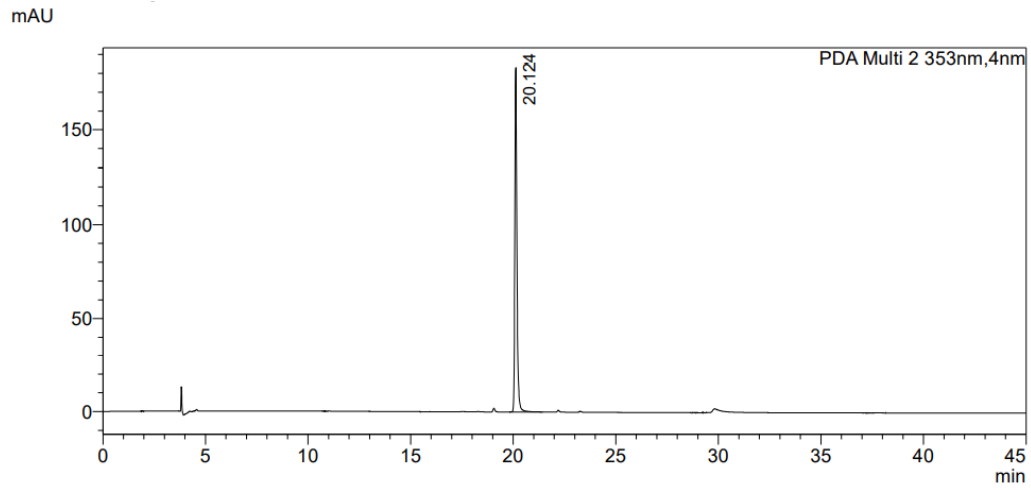
สารสกัดทางนกยูงที่สกัดได้หลักกระบวนการทำ lyophilization จะได้สารสกัดเป็นผลึกสีน้ำตาลเข้มสามารถเอิ่มเหลวได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยมี %yield ในการสกัด $7.65 \pm 1.03\%$ และจากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดดอกหางนกยูงที่ผ่านการทำให้แห้งแล้ว เมื่อนำมาทดสอบปฏิกิริยาทางเคมีเพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางพิษเคมี(table2)ให้ผล positive กับ การทดสอบ FeCl₃ โดยเมื่อทำการทดสอบจะได้ตะกอนสีน้ำเงินเข้มซึ่งแสดงถึงองค์ประกอบของสารในกลุ่ม phenolic compound อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาทดสอบกับ Gelatin กลับไม่พบการตกตะกอนของ gelatin แสดงถึง phenolic compound ที่พบไม่ใช่สารในกลุ่มแทนนิน แต่เป็นสารในกลุ่มของ flavonoid เนื่องจากให้ผล positive ทั้งในการทดสอบ shinoda test และ sodium hydroxide test และยังให้ผล positive กับ Molish test จึงทำให้คาดการณ์ว่าองค์ประกอบสำคัญในสารสกัดดอกหางนกยูงจะเป็นสารในกลุ่มของ flavonoid หรือ flavonoid glycoside



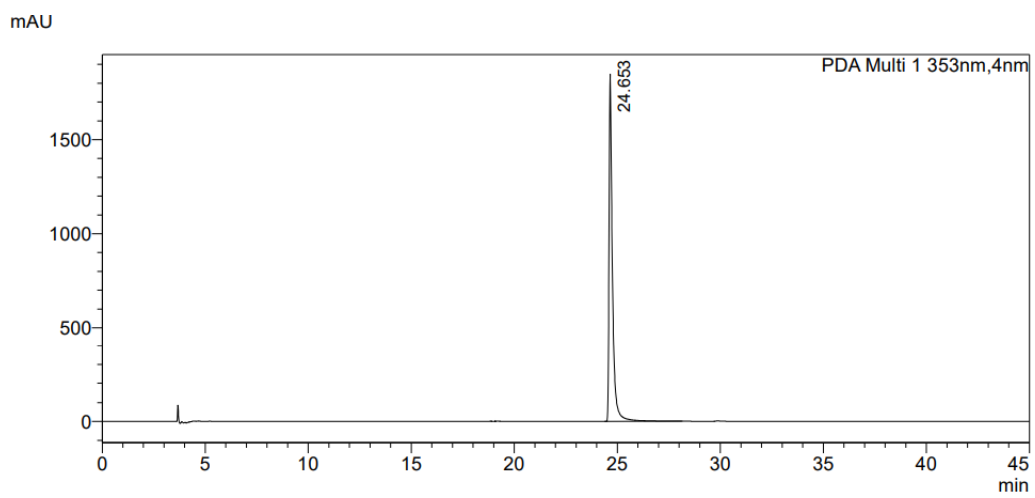
รูปที่ 8.1 HPLC chromatogram DRE



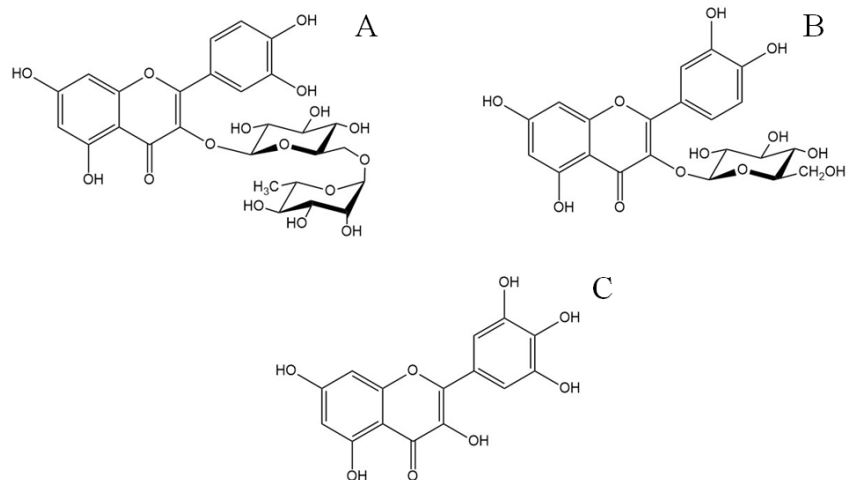
รูปที่ 8.2 HPLC chromatogram Rutin



รูปที่ 8.3 HPLC chromatogram Isoquercitrin



รูปที่ 8.4 HPLC chromatogram Myricetin



รูปที่ 9 Flavonoid chemical structure (A:Rutin, B:Isoquercitrin and C:Myricetin)

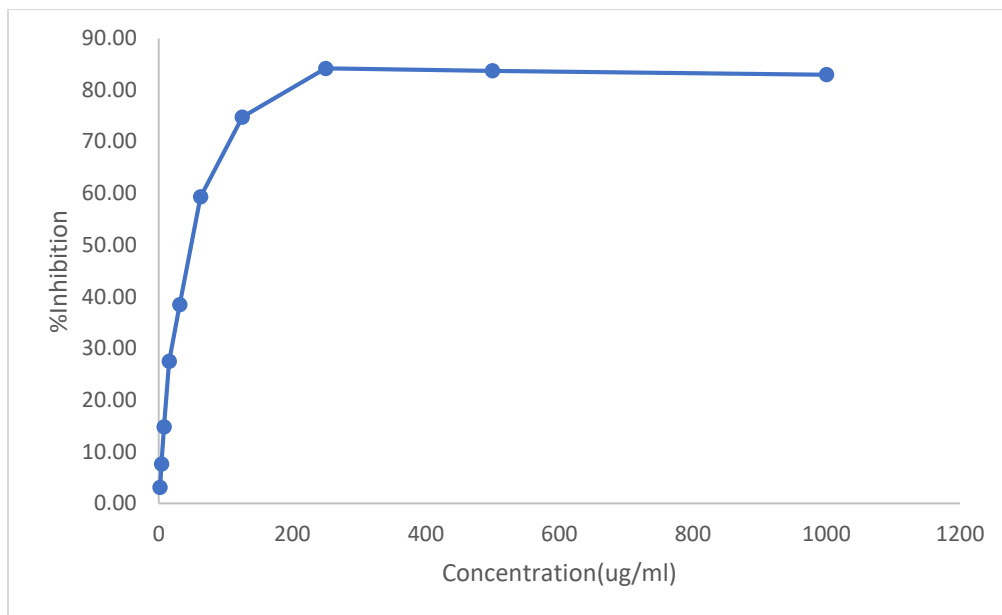
เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสารสกัดดอกหางนกยูงจะมีสารสำคัญอยู่ 3 ชนิด รูปที่ 8) โดยมี retention time อยู่ที่เวลา 18.85 นาที, 19.98 นาที และ 25.16 นาที โดยเมื่อทำการฉีด standard flavonoid เปรียบเทียบ พบว่าสารทั้ง 3 ชนิดมี retention ตรงกันกับ flavonoid 3 ชนิด คือ rutin, isoquercitrin และ myricetin ตามลำดับ (รูปที่ 8) โดยเมื่อพิจารณาจากโครงสร้าง flavonoid ทั้ง 3 ชนิด ให้ผลสอดคล้องกับ chromatogram จากเครื่อง HPLC กล่าวคือ Rutin ที่เป็น flavonoid glycoside (รูปที่ 9A) ซึ่งมีน้ำตาลมาเกาะ 2 โมเลกุลจะมี polarity สูงที่สุด เมื่อทำการฉีดด้วย HPLC แบบ gradient ที่ช่วงเวลาแรกจะมีสัดส่วนของน้ำ ปริมาณสูงจึงออกมาได้ไวกว่า flavonoid ตัวอื่น ถัดมาคือ isoquercitrin (รูปที่ 9B) เป็น flavonoid glycoside เช่นเดียวกับ rutin แต่มีน้ำตาลเกาะเพียง 1 โมเลกุล จึงทำให้มีความเป็น polarity ต่ำกว่า rutin และสุดท้ายคือ myricetin (Figure 3C) ซึ่งเป็น flavonoid ที่ไม่มีน้ำตาลมาเกาะเรียกว่า aglycone จึงทำให้มีขั้วที่ต่ำที่สุดจึงมี retention time ที่นานเนื่องจากจะต้องมี acetonitrile ในสัดส่วนที่มากพอที่จะ partition myricetin ออกมาได้ จากผลของ สารที่พบให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบ phytoscreening ที่พบว่าองค์ประกอบสำคัญของสารสกัด ที่สกัดออกมาได้จะเป็น flavonoid ทั้งในรูปแบบ flavonoid aglycone และ flavonoid glycoside

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ antioxidation ด้วย DPPH

				Average
MeOH+DPPH	0.356	0.361	0.357	0.358
blank MeOH	0.036	0.035	0.036	0.036

Conc.EtOH(ug/ml)	Absorbance			Average	S.D.
	1	2	3		
1000	0.068	0.069	0.073	0.070	0.003
500	0.065	0.062	0.065	0.064	0.002
250	0.062	0.065	0.064	0.064	0.002
125	0.076	0.101	0.102	0.093	0.015
62.5	0.129	0.170	0.166	0.155	0.023
31.25	0.203	0.230	0.230	0.221	0.016
15.63	0.264	0.284	0.237	0.262	0.024
7.81	0.288	0.317	0.318	0.308	0.017
3.91	0.323	0.335	0.340	0.333	0.009
1.95	0.338	0.354	0.356	0.349	0.010

Conc. (ug/ml)	(EtOH+MeOH)-(blank MeOH)	Abs. sample			%Inhibition			Average	S.D.
		1	2	3	1	2	3		
1000	0.009	0.059	0.060	0.064	83.52	83.24	82.12	82.96	0.74
500	0.006	0.059	0.056	0.059	83.43	84.26	83.43	83.71	0.48
250	0.007	0.055	0.058	0.057	84.64	83.80	84.08	84.17	0.43
125	0.003	0.073	0.098	0.099	79.52	72.53	72.25	74.77	4.11
62.5	0.009	0.120	0.161	0.157	66.57	55.12	56.24	59.31	6.31
31.25	0.001	0.202	0.229	0.229	43.48	35.94	35.94	38.45	4.35
15.63	0.002	0.262	0.282	0.235	26.82	21.23	34.36	27.47	6.59
7.81	0.003	0.285	0.314	0.315	20.30	12.20	11.92	14.80	4.76
3.91	0.002	0.321	0.333	0.338	10.34	6.98	5.59	7.64	2.44
1.95	0.002	0.336	0.352	0.354	6.24	1.77	1.21	3.07	2.76

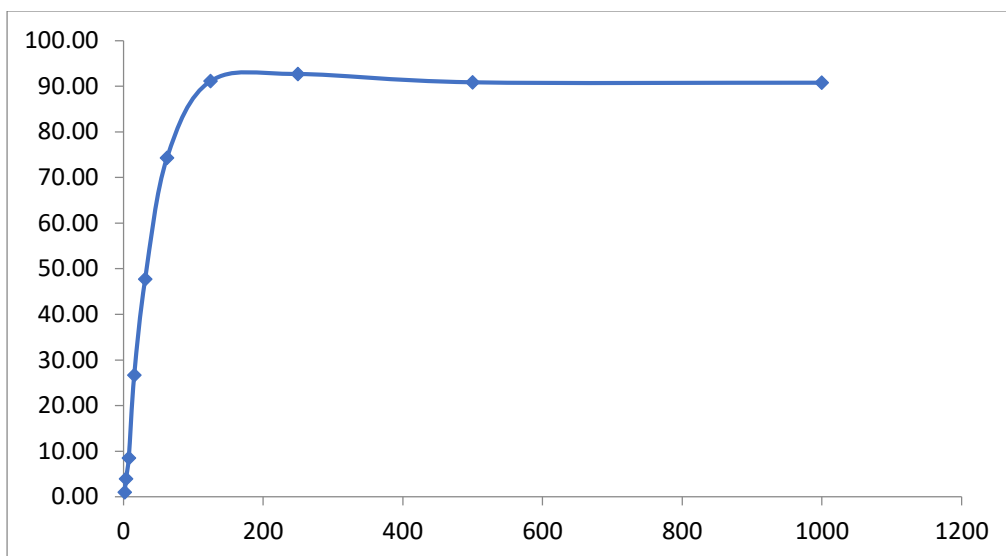


ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ antioxidation ด้วย ABTS

				Average
MeOH+ABTS	0.388	0.387	0.384	0.386
blank MeoH	0.036	0.037	0.036	0.036

Conc.ทางนกยุง(ug/ml)	Absorbance			Average	S.D.
	1	2	3		
1000	0.045	0.048	0.052	0.048	0.004
500	0.044	0.043	0.046	0.044	0.002
250	0.044	0.040	0.042	0.042	0.002
125	0.043	0.040	0.041	0.041	0.002
62.5	0.058	0.104	0.151	0.104	0.047
31.25	0.158	0.218	0.246	0.207	0.045
15.63	0.246	0.279	0.339	0.288	0.047
7.81	0.329	0.368	0.382	0.360	0.027
3.91	0.359	0.388	0.384	0.377	0.016
1.95	0.392	0.391	0.388	0.390	0.002

Conc. (ug/ml)	(ทางนกยุง)-(blank MeOH)	Abs. sample			%Inhibition			Average	S.D.
		1	2	3	1	2	3		
1000	0.0127	0.032	0.035	0.039	91.63	90.85	89.82	90.77	0.91
500	0.0090	0.035	0.034	0.037	90.94	91.20	90.42	90.85	0.40
250	0.0137	0.030	0.026	0.028	92.15	93.18	92.67	92.67	0.52
125	0.0070	0.036	0.033	0.034	90.68	91.46	91.20	91.11	0.40
62.5	0.0050	0.053	0.099	0.146	86.28	74.37	62.21	74.29	12.04
31.25	0.0053	0.153	0.213	0.241	60.48	44.95	37.70	47.71	11.64
15.63	0.0047	0.241	0.274	0.334	37.53	28.99	13.46	26.66	12.20
7.81	0.0063	0.323	0.362	0.376	16.48	6.38	2.76	8.54	7.11
3.91	0.0060	0.353	0.382	0.378	8.63	1.12	2.16	3.97	4.07
1.95	0.0080	0.384	0.383	0.380	0.60	0.86	1.64	1.04	0.54

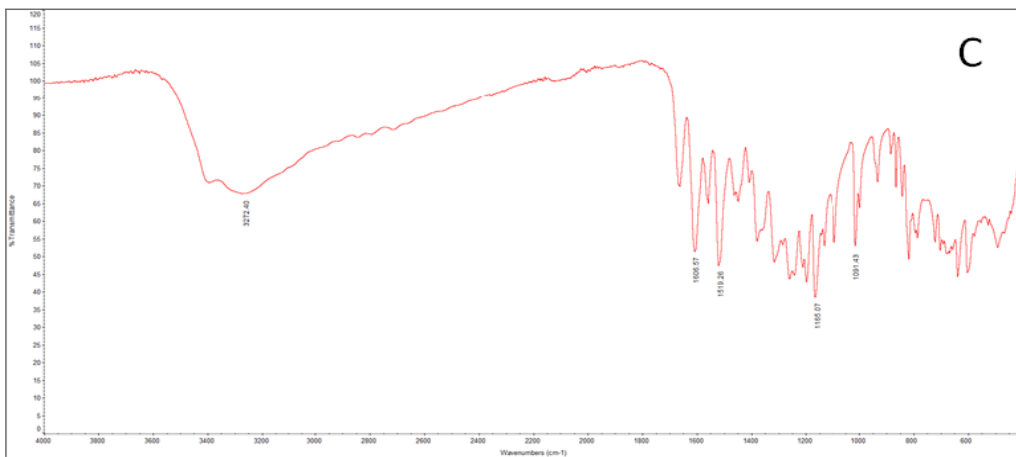
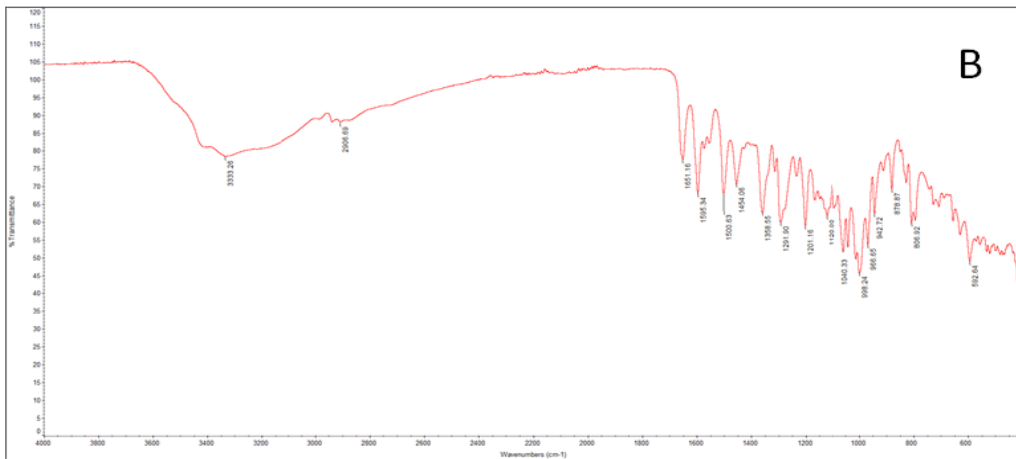
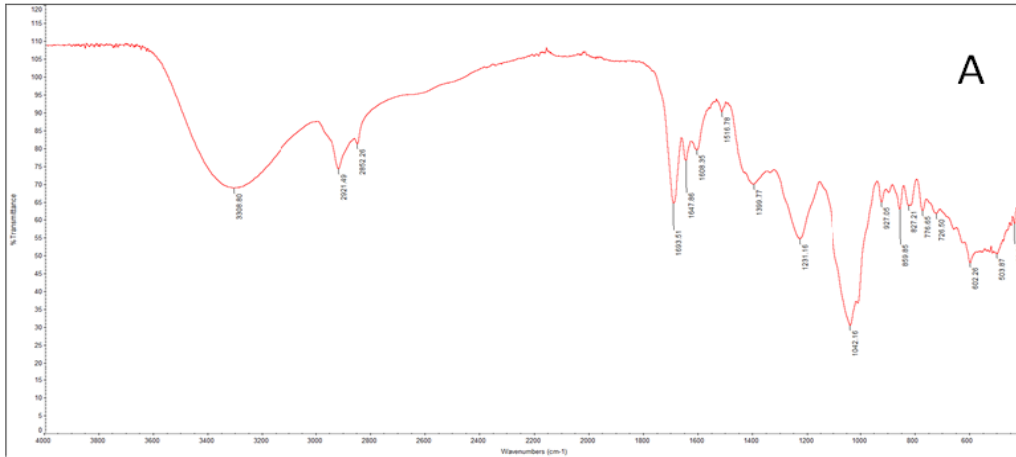


ตารางที่ 5 Analysis of substance content in the *Delonix regia*. flower extract.

Test	Content
Total phenolic (TP)	270.63 ± 4.86 GAE/g extract
Total flavonoid (TF)	212.51 ± 1.64 QE/g extract
Total sugar	18.50 ± 3.27%
Rutin content	4.15±0.30 %
Isoquercitrin content	3.04±0.02 %
Myricetin content	2.61±0.01 %
DPPH	66.88±6.30 µg/ml
ABTS	53.65±7.24 µg/ml

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบทางพฤกษเคมี (ตารางที่ 5) พบว่าสารสกัด DRE มีปริมาณ phenolic compound และ flavonoid ในปริมาณที่สูงโดยพบปริมาณ total phenolic เท่ากับ 270.63 ± 4.86 GAE/g extract และ Total flavonoid (TF) เท่ากับ 212.51 ± 1.64 QE/g extract นอกจากนี้จากข้อมูลที่ทราบว่า องค์ประกอบสำคัญเป็นสารในกลุ่ม flavonoid glycoside ดังนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลได้ปริมาณน้ำตาล $18.50 \pm 3.27\%$ ต่อน้ำหนักสารสกัดซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้สารสกัดมีลักษณะเยิ้มเหนียวที่

อุณหภูมิต่ำ นอกจากนั้นการวิเคราะห์ biomarker ของสารสกัดโดยวิเคราะห์จาก flavonoid ทั้งสามชนิด คือ rutin, isoquercitrin และ myricetin พบว่ามี rutin สูงที่สุดคือ 4.15 ± 0.30 % และ isoquercitrin กับ myricetin มีปริมาณใกล้เคียงกันคือ 3.04 ± 0.02 % และ 2.61 ± 0.01 % ตามลำดับ โดยจากข้อมูลที่มีรายงานถึงฤทธิ์ antioxidation ของสารในกลุ่ม flavonoid หลายงานวิจัย[35-37] จึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดอกหางนกยูง โดยทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay พบว่าสารสกัดดอกหางนกยูงมีฤทธิ์ในการเป็น antioxidation ที่ดี โดยมีค่า IC50 ของวิธี DPPH เท่ากับ 66.88 ± 6.30 $\mu\text{g/ml}$ และค่า IC50 ของวิธี ABTS เท่ากับ 53.65 ± 7.24 $\mu\text{g/ml}$ โดยผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยต่างๆที่กล่าวถึง flavonoid โดยเฉพาะ flavonoid ที่พบในดอกหางนกยูง เช่น การยับยั้งอนุมูลอิสระของ rutin[38-40] isoquercitrin [41, 42] และ myricetin[43, 44] จากข้อมูลดังกล่าวจึงคาดว่าสารสกัดดอกหางนกยูงจะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านมะเร็งเนื่องจากมีรายงานเกี่ยวกับ flavonoid และสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง เช่น Quercetin ที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งหลายชนิด เช่นมะเร็งตับอ่อนหรือมะเร็งรังไข่ [45-47]



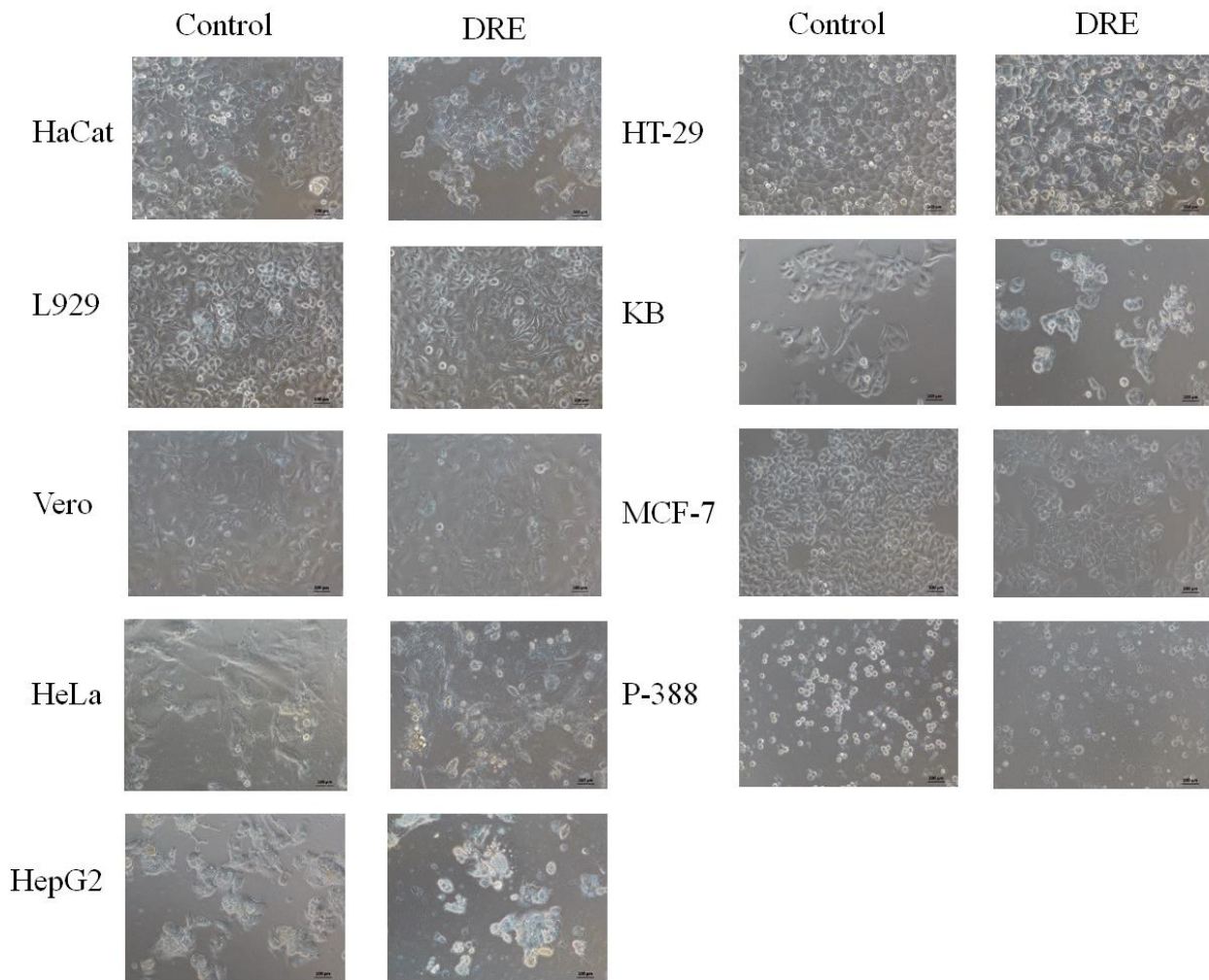
รูปที่ 10 FTIR spectrum (A:DRE, B:Rutin and C:quercetin)

ตารางที่ 6 FTIR characteristic peaks of the DRE.

Absorption ⁻¹	Appearance	Group
--------------------------	------------	-------

1042.27	Strong	C-O stretching
1231.00	Medium	O-H bending (Phenol)
1693.38	Strong	C=O stretching
2000-2500	Weak	Overtone of aromatic compound
2852.33 And 2921.03	Weak	sp ³ C-H stretching
3311.04	Strong	O-H stretching

การ characterized สารสกัดดอกหางนกยูงอีกวิธีที่ทำการศึกษาค้นคว้าเพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการสกัดสมุนไพรควบคู่กับ HPLC chromatogram คือ การใช้ FTIR ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการ identification สารในทางเภสัชกรรม โดยเฉพาะสมุนไพรที่เริ่มได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจาก สะดวกในการเตรียมตัวอย่างและใช้เวลาในการวิเคราะห์ไม่นาน[48, 49] จากการนำสารสกัดมาวิเคราะห์ด้วย FTIR พบว่าได้ spectrum สำคัญที่เห็นได้ชัดเจนคือ ตำแหน่ง 3311.04 ที่เป็นตำแหน่ง hydroxyl group ของโครงสร้างหลักใน flavonoid นอกจากนี้ยังมองเห็นในส่วน of overtone ของวง benzene ที่มีจากโครงสร้างของ flavonoid เช่นกัน (รูปที่ 10) จากข้อมูลที่สำคัญอีกด้านที่พบว่าองค์ประกอบสำคัญของสารสกัดดอกหางนกยูงคือ Rutin และ isoquercitrin ซึ่งเป็น flavonoid glycoside จึงทำให้มองเห็นตำแหน่ง spectrum ในช่วง 2852.33 และ 2921.03 ซึ่งแสดงถึงการเชื่อมกันของหมู่ alkyl group ของ C-H ที่เป็น single bond โดยตำแหน่งนี้เกิดมาจากโครงสร้างของน้ำตาลที่มาเกาะอยู่กับ flavonoid จะเห็นว่าพบ ตำแหน่งนี้ได้ใน standard rutin เช่นเดียวกันแต่ไม่พบใน standard quercetin ที่เป็น flavonoid aglycone



รูปที่ 11 cells morphology after treat with DRE at 48 hr.

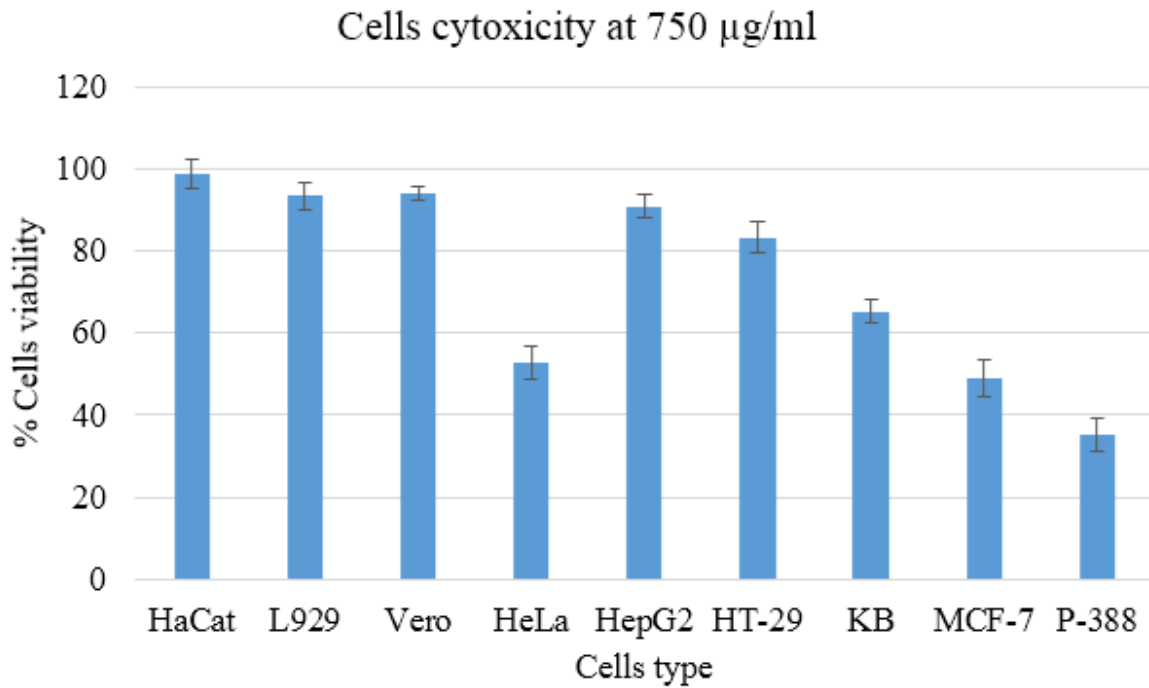
ตารางที่ 7 IC50 of DRE cytotoxicity at 48 hr.

	HaCat	L929	Vero	HeLa	HepG2	HT-29	KB	MCF-7	P-388
IC50 (ug/ml)	>1000	>1000	>1000	758.38 ± 41.52*	>1000	840.73 ± 26.17*	796.51 ± 34.58*	704.08 ± 22.42*	476.47 ± 54.11*

(n = 3). (*p < 0.05 versus nontreated controls at 48 hrs).

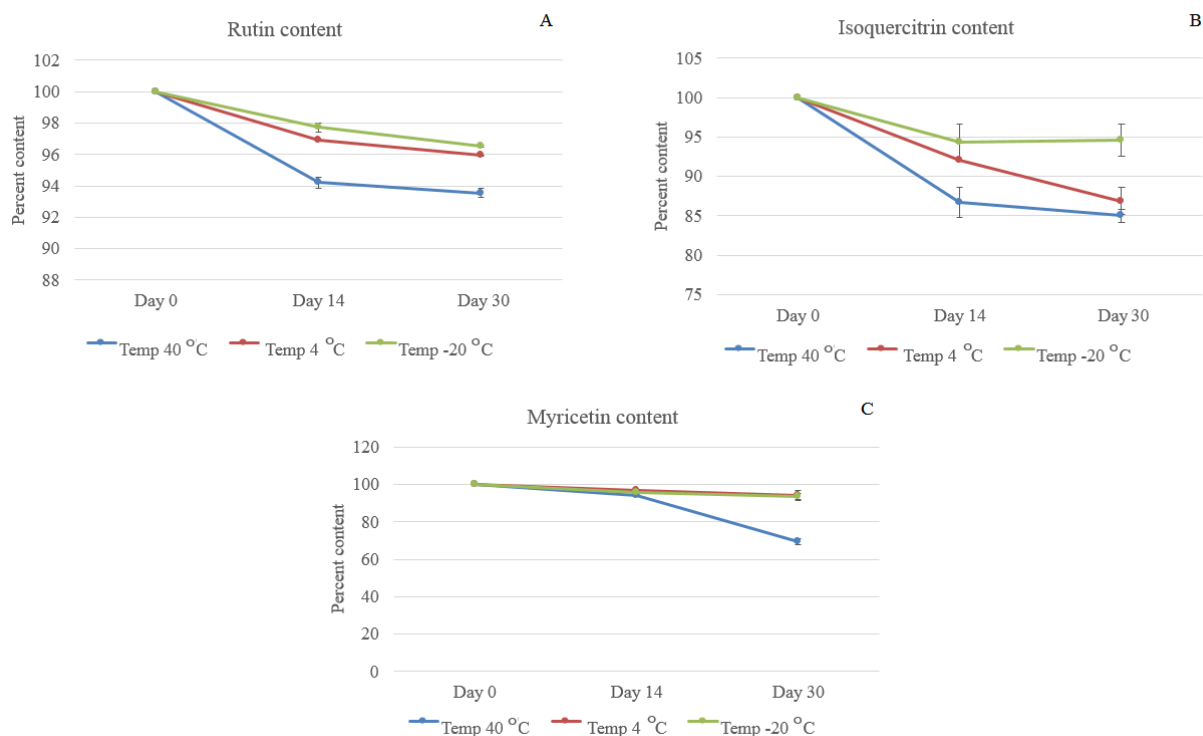
3.2 Cell cytotoxicity

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดทางนกยูง โดยทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งในเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติจำนวน 9 ชนิด ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัด DRE มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่เห็นผลชัดเจนในเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa), เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29), มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็ง leukemia (P-388) มีลักษณะการยับยั้งเซลล์มะเร็งแบบ dose dependent โดยให้ผลยับยั้งเซลล์มะเร็ง leukemia (p-388) ดีที่สุด ที่ความเข้มข้นของสกัด 750 ug/ml สามารถยับยั้งเซลล์เหลือเซลล์รอดชีวิตเพียง $35.28 \pm 4.07\%$ จะเห็น morphology ของเซลล์ P-388 (รูปที่ 11) แตกต่างจาก control คือจะมีลักษณะผิวเซลล์เมมเบรนไม่เรียบลักษณะเหมือนมีการรั่วของผนังเซลล์ ถัดมาคือมะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก สามารถยับยั้งเหลือเซลล์ที่รอดชีวิต $48.83 \pm 4.39\%$, $52.63 \pm 3.96\%$ ตามลำดับ และให้ลักษณะรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แตกต่างไปจาก control เช่นกัน โดยเซลล์จะมีลักษณะผิวไม่เรียบ ลำตัวตัวหดสั้น และไม่หนาแน่นเท่ากับ control (รูปที่ 11) โดยผลของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้เพียงบางชนิดให้ผลสอดคล้องกับสารสกัดที่มีรายงานก่อนหน้านี้ที่ผ่านมาว่า สารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกัน พบว่า Jarial and others [50] ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งของต้น *Cheilanthes tenuifolia* ที่ประกอบด้วย rutin และ quercetin พบว่าตอบสนองต่อเซลล์ HeLa น้อยกว่า HepG2. เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Lingrong Wen [51] ที่ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งจาก flavonoid ที่สกัดจาก *Litchi chinensis Sonn* พบการตอบสนองที่แตกต่างกันระหว่างเซลล์มะเร็ง HepG2 กับ HeLa. นอกจากนี้ Muhammad Maqsood and others [52] ที่ทำการทดสอบ flavonoid จากต้น *Withania coagulans*, พบว่าสามารถยับยั้ง HeLa ได้น้อยกว่า MCF-7 และ brain cancer (RG2). เมื่อพิจารณาที่องค์ประกอบของ flavonoid ที่พบในสารสกัดก็พบรายงานการยับยั้งเซลล์มะเร็งของทั้ง rutin, isoquercitrin และ myricetin เช่น การยับยั้งมะเร็ง leukemia ของ rutin [53, 54] ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ หรือการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งตับของ isoquercitrin [33] หรือการยับยั้งเซลล์มะเร็ง leukemia [55] และมะเร็งเต้านม [56] ของ myricetin อย่างไรก็ตามถึงแม้ flavonoid ที่กล่าวมาจะมีรายงานการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ แต่จากผลการทดลองที่พบว่าสารสกัดดอกทางนกยูงสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้หลายชนิด อาจเกิดจากกลไกการ synergist effect ของสารต่างๆในสารสกัดทำให้ออกฤทธิ์ได้กว้างขึ้นและมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากมีรายงานพบว่าการใช้ flavonoid มากกว่า 1 ชนิดร่วมกันจะให้ประสิทธิภาพในการต้านมะเร็งที่ดีกว่าการใช้ชนิดเดียว [33, 57]



รูปที่ 12 Cell viability percentages (%) compared to controls at 48 hrs.
 at concentration 750µg/ml . Mean ± SD
 (n = 3). (*p < 0.05 versus nontreated controls at 48 hrs).

ในทางกลับกันผลการทดสอบในเซลล์ปกติ 3 ชนิด คือ keratinocyte (HaCat), murine fibroblast(L929) และ African green monkey kidney cell (Vero) ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ดังกล่าวซึ่งเป็นข้อดีในการพัฒนาสารสกัดดอกหางนกยูงเพื่อใช้ในทางเภสัชกรรมได้ในอนาคต



รูปที่ 13 Flavonoid content after stability test (A: rutin, B: isoquercitrin and C: Myricetin)

3.3 Stability of flavonoid.

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาตำรับและเก็บรักษาให้มีความคงตัวที่สุด หลังจากทำการเก็บรักษาที่สภาวะต่างๆ แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณ flavonoid ทั้ง 3 ชนิด พบว่า flavonoid ทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการสลายตัวที่แตกต่างกัน โดยพบว่า rutin มีความคงตัวสูงที่สุด (figure 7A) โดยพบอัตราการสลายทั้ง 3 สภาวะไม่แตกต่างกันสามารถคงตัวอยู่ได้ในสภาวะ 40 °C แตกต่างกับ Isoquercitrin และ myricetin ที่ไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูงๆ โดย myricetin มีอัตราการสลายตัวที่ 40 °C ตลอดระยะเวลา 30 วัน สูงที่สุด จากข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานที่พบว่า flavonoid หลายชนิดไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูงๆ [58, 59] จึงต้องมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีระบบป้องกันการสลายตัวของ flavonoid ต่อไปในอนาคต [60]

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถยืนยันได้ถึงองค์ประกอบทางพิษเคมีของสารสกัดดอกหางนกยูง ที่ประกอบด้วยสารประกอบ flavonoid สำคัญ 3 ชนิด คือ rutin, isoquercitrin และ myricetin โดยสารสกัดที่สกัดได้นอกจากมีปริมาณของ flavonoid ที่สูงยังพบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน จากองค์ประกอบของสารสกัดทำให้สารสกัดมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยพบว่าฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง Murine leukemia (P-388) ดีที่สุดตามมาด้วย human breast adenocarcinoma (MCF-7) human cervical carcinoma (HeLa), human oral cavity carcinoma (KB) และ human colon carcinoma (HT-29) ตามลำดับ โดยมีลักษณะการยับยั้งเซลล์มะเร็งเป็นแบบ dose-dependent แต่ไม่เห็นความแตกต่างในเซลล์ human hepatocarcinoma (HepG2) ข้อดีที่สำคัญที่เห็นได้คือ สารสกัดไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ปกติทั้ง 3 ชนิด ซึ่งผลข้างเคียงนี้มักพบได้ในยาต้านมะเร็งทั่วไป อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงขั้นตอนการ screen ฤทธิ์ต้านมะเร็งเบื้องต้น ในอนาคตต้องมีการศึกษากลไกในการต้านมะเร็งด้านอื่นๆ เช่น การกระตุ้นการ apoptosis หรือ การลดการ migration ของเซลล์มะเร็ง ซึ่งมักจะพบกลไกเหล่านี้ในสารสกัดจากธรรมชาติ อีกปัญหาที่สำคัญของสารสกัดดอกหางนกยูงที่พบในการศึกษานี้คือ ค่าการละลายของสารสกัดที่ละลายน้ำได้ไม่ดีและความคงตัวของสารสกัด จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการนำส่งสารสกัดนี้ไปใช้ได้จริงในอนาคต

รายงานสรุปการเงิน

รหัสโครงการ Rx5/2563 โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ส่วนงาน

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และความคงตัว ของปลาโวนอยดีในสารสกัดดอกหางนกยูงฝรั่งแดง

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน (อ.ดร.) วิชรพงษ์ แจ่มสว่าง

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2562 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2563

ระยะเวลาดำเนินการ.....1ปี-..... เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2562 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2563

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 100,000 บาท เมื่อ 20 มกราคม 2562

งวดที่ 2 (40%) 80,000 บาท เมื่อ 16 มิถุนายน 2562

งวดที่ 3 (10%) บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี (ยังไม่ได้รับ)

รวม180,000.....

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	30,000	-	-
2. ค่าจ้าง	90,000	105,000	เกิน 15,000
3. ค่าวัสดุ	5,000	5,000	-

4. ค่าใช้สอย	75,000	75,000	-
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ	-	-	-
รวม	200,000	215,000	-15,000

(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

1. Zhang, Y., et al., *Global patterns and trends in ovarian cancer incidence: age, period and birth cohort analysis*. BMC Cancer, 2019. 19(1): p. 984.
2. Sirinvaravong, S., et al., *Diabetes insipidus and panhypopituitarism as a first presentation of silent adenocarcinoma of lung: a case report and literature review*. BMC Endocr Disord, 2019. 19(1): p. 114.
3. *The global, regional, and national burden of colorectal cancer and its attributable risk factors in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2019.
4. George, V.C., G. Dellaire, and H.P.V. Rupasinghe, *Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2017. 45(Supplement C): p. 1-14.
5. Sriwatcharakul, S., *Evaluation of bioactivities of Delonix regia extracts from different regions of Thailand*. Energy Procedia, 2018. 153: p. 258-262.
6. El-Sayed, A.M., et al., *Hepatoprotective and cytotoxic activities of Delonix regia flower extracts*. Pharmacognosy Journal, 2011. 3(19): p. 49-56.
7. Adjé, F.A., et al., *Phenolic acid and flavonol water extracts of Delonix regia red flowers*. Industrial Crops and Products, 2012. 37(1): p. 303-310.
8. Adjé, F., et al., *Optimization of anthocyanin, flavonol and phenolic acid extractions from Delonix regia tree flowers using ultrasound-assisted water extraction*. Industrial Crops and Products, 2010. 32(3): p. 439-444.
9. Veigas, J.M., P. Divya, and B. Neelwarne, *Identification of previously unreported pigments among carotenoids and anthocyanins in floral petals of Delonix regia (Hook.) Raf.* Food Research International, 2012. 47(1): p. 116-123.
10. Batra, P. and A.K. Sharma, *Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives*. 3 Biotech, 2013. 3(6): p. 439-459.
11. Ding, Y., et al., *Flavonoids from persimmon (Diospyros kaki L.) leaves inhibit proliferation and induce apoptosis in PC-3 cells by activation of oxidative stress and mitochondrial apoptosis*. Chemico-Biological Interactions, 2017. 275: p. 210-217.

12. Alves, D.R., et al., *Flavonoid Composition and Biological Activities of Ethanol Extracts of Caryocar coriaceum Wittm., a Native Plant from Caatinga Biome*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017. 2017: p. 7.
13. Abotaleb, M., et al., *Flavonoids in Cancer and Apoptosis*. Cancers, 2018. 11(1): p. 28.
14. Lee, S.-y., et al., *Genipin inhibits the invasion and migration of colon cancer cells by the suppression of HIF-1 α accumulation and VEGF expression*. Food and Chemical Toxicology, 2018. 116: p. 70-76.
15. Nguyen, L.T., et al., *Quercetin induces apoptosis and cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells through modulation of Foxo3a activity*. The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology, 2017. 21(2): p. 205-213.
16. Xia, R., et al., *Hesperidin suppresses the migration and invasion of non-small cell lung cancer cells by inhibiting the SDF-1/CXCR4 pathway*. Life Sciences, 2018. 201: p. 111-120.
17. Torre, L.A., et al., *Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2016. 25(1): p. 16-27.
18. Rahman, F.B., et al., *A comprehensive multi-directional exploration of phytochemicals and bioactivities of flower extracts from Delonix regia (Bojer ex Hook.) Raf., Cassia fistula L. and Lagerstroemia speciosa L.* Biochemistry and Biophysics Reports, 2020. 24: p. 100805.
19. Modi, A., et al., *Delonix regia: historic perspectives and modern phytochemical and pharmacological researches*. Chinese Journal of Natural Medicines, 2016. 14(1): p. 31-39.
20. Adetogun, G.E. and G. Alebiowu, *Influence of Delonix regia seed gum on the compressional characteristics of paracetamol tablet formulations*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2007. 17(6): p. 443-445.
21. Kapoor, V.P., *A galactomannan from the seeds of Delonix regia*. Phytochemistry, 1972. 11(3): p. 1129-1132.
22. Dong, W., et al., *Antioxidant capacity differences between the major flavonoids in cherry (Prunus pseudocerasus) in vitro and in vivo models*. LWT, 2021. 141: p. 110938.

23. Sammani, M.S., S. Clavijo, and V. Cerdà, *Recent, advanced sample pretreatments and analytical methods for flavonoids determination in different samples*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2021: p. 116220.
24. Yang, J., et al., *Comparative study of inhibition mechanisms of structurally different flavonoid compounds on α -glucosidase and synergistic effect with acarbose*. Food Chemistry, 2021. 347: p. 129056.
25. Chen, S., et al., *Flavonoids and caffeoylquinic acids in Chrysanthemum morifolium Ramat flowers: A potentially rich source of bioactive compounds*. Food Chemistry, 2021. 344: p. 128733.
26. Li, J., et al., *Comparative metabolomics reveals differences in flavonoid metabolites among different coloured buckwheat flowers*. Journal of Food Composition and Analysis, 2020. 85: p. 103335.
27. Fan, M., et al., *Relationships of dietary flavonoid structure with its tyrosinase inhibitory activity and affinity*. LWT, 2019. 107: p. 25-34.
28. Şöhretoğlu, D., et al., *Tyrosinase inhibition by some flavonoids: Inhibitory activity, mechanism by in vitro and in silico studies*. Bioorganic Chemistry, 2018. 81: p. 168-174.
29. Stankovic, M., *Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of Marrubium peregrinum L. Extracts*. Kragujevac J. Sci. 33, 2011. 33: p. 63-72.
30. Fernandes, M.D., et al., *Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the in vitro digestive system simulation*. Food Chemistry, 2017. 229: p. 373-380.
31. Mendez-Lagunas, L., et al., *Convective drying kinetics of strawberry (Fragaria ananassa): Effects on antioxidant activity, anthocyanins and total phenolic content*. Food Chemistry, 2017. 230: p. 174-181.
32. Masuko, T., et al., *Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format*. Analytical Biochemistry, 2005. 339(1): p. 69-72.
33. Chaemsawang, W., et al., *The Effect of Okra (Abelmoschus esculentus (L.) Moench) Seed Extract on Human Cancer Cell Lines Delivered in Its Native Form and Loaded in Polymeric Micelles*. International Journal of Biomaterials, 2019. 2019: p. 13.

34. Stankovic, M.S., et al., *Total Phenolic Content, Flavonoid Concentrations and Antioxidant Activity, of the Whole Plant and Plant Parts Extracts from Teucrium Montanum L. Var. Montanum, F. Supinum (L.) Reichenb.* Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2011. 25(1): p. 2222-2227.
35. Zheng, X.J., et al., *Composition and serum antioxidation of the main flavonoids from fermented vine tea (Ampelopsis grossedentata).* Journal of Functional Foods, 2014. 9: p. 290-294.
36. Chen, L., et al., *Effects of Persimmon Leaf Total Flavonoid on Enzyme of Lipoprotein Metabolism and Antioxidation in Hyperlipidemia Rats.* Chinese Journal of Natural Medicines, 2011. 9(1): p. 74-77.
37. Zhang, H., Y.-f. Yang, and Z.-q. Zhou, *Phenolic and flavonoid contents of mandarin (Citrus reticulata Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods.* Journal of Integrative Agriculture, 2018. 17(1): p. 256-263.
38. Zhang, R., et al., *Increase of rutin antioxidant activity by generating Maillard reaction products with lysine.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016. 26(11): p. 2680-2684.
39. Xu, W., et al., *Effects of dietary cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside complexes with rutin/Mg(II) against H₂O₂-induced cellular oxidative stress.* Food Research International, 2019. 126: p. 108591.
40. Chang, L.-W., et al., *Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (Morus alba L.) twigs and root bark.* Food and Chemical Toxicology, 2011. 49(4): p. 785-790.
41. Shimada, Y., et al., *Antioxidant enzymatically modified isoquercitrin suppresses the development of liver preneoplastic lesions in rats induced by β -naphthoflavone.* Toxicology, 2010. 268(3): p. 213-218.
42. Valentová, K., et al., *Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism.* Food and Chemical Toxicology, 2014. 68: p. 267-282.
43. Lee, K.-H. and E.-M. Choi, *Myricetin, a naturally occurring flavonoid, prevents 2-deoxy-d-ribose induced dysfunction and oxidative damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells.* European Journal of Pharmacology, 2008. 591(1): p. 1-6.

44. Palacios, I., et al., *Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms*. Food Chemistry, 2011. 128(3): p. 674-678.
45. Tang, S.-M., et al., *Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020. 121: p. 109604.
46. Lan, C.-Y., et al., *Quercetin facilitates cell death and chemosensitivity through RAGE/PBK/AKT/mTOR axis in human pancreatic cancer cells*. Journal of Food and Drug Analysis, 2019. 27(4): p. 887-896.
47. Teekaraman, D., et al., *Quercetin inhibits human metastatic ovarian cancer cell growth and modulates components of the intrinsic apoptotic pathway in PA-1 cell line*. Chemico-Biological Interactions, 2019. 300: p. 91-100.
48. Rosina, P., et al., *Benquerencia (La Serena - Spain) rock art: An integrated spectroscopy analysis with FTIR and Raman*. Heliyon, 2019. 5(10): p. e02561.
49. Durak, T. and J. Depciuch, *Effect of plant sample preparation and measuring methods on ATR-FTIR spectra results*. Environmental and Experimental Botany, 2020. 169: p. 103915.
50. Jarial, R., et al., *Characterization of flavonoids from fern Cheilanthes tenuifolia and evaluation of antioxidant, antimicrobial and anticancer activities*. Journal of King Saud University - Science, 2018. 30(4): p. 425-432.
51. Wen, L., et al., *Identification of flavonoids in litchi (Litchi chinensis Sonn.) leaf and evaluation of anticancer activities*. Journal of Functional Foods, 2014. 6: p. 555-563.
52. Maqsood, M., et al., *In vitro anticancer activities of Withania coagulans against HeLa, MCF-7, RD, RG2, and INS-1 cancer cells and phytochemical analysis*. Integrative Medicine Research, 2018. 7(2): p. 184-191.
53. Lin, J.-P., et al., *Rutin inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes immune response in vivo*. Leukemia Research, 2009. 33(6): p. 823-828.
54. Bourogaa, E., et al., *Hammada scoparia flavonoids and rutin kill adherent and chemoresistant leukemic cells*. Leukemia Research, 2011. 35(8): p. 1093-1101.
55. Pan, H., et al., *Myricetin is a novel inhibitor of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase with anti-leukemia activity*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016. 477(4): p. 915-922.

56. Knickle, A., et al., *Myricetin-induced apoptosis of triple-negative breast cancer cells is mediated by the iron-dependent generation of reactive oxygen species from hydrogen peroxide*. Food and Chemical Toxicology, 2018. 118: p. 154-167.
57. Chen, C.-H., et al., *Synergistic anti-cancer effect of baicalein and silymarin on human hepatoma HepG2 Cells*. Food and Chemical Toxicology, 2009. 47(3): p. 638-644.
58. Echeverry, S.M., et al., *Optimization of flavonoid extraction from Passiflora quadrangularis leaves with sedative activity and evaluation of its stability under stress conditions*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2018. 28(5): p. 610-617.
59. Liu, F., et al., *Effects of Astragalus polysaccharide on the solubility and stability of 15 flavonoids*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019.
60. Hu, Y., et al., *Physical stability and antioxidant activity of citrus flavonoids in arabic gum-stabilized microcapsules: Modulation of whey protein concentrate*. Food Hydrocolloids, 2018. 77: p. 588-597.