



# ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 ของสารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวน

## Antioxidant and Antiproliferative Activities against HepG2 Cell Line of Ethanolic Extract from Leaves and Shoots of *Spilanthes acmella*

อนันตศักดิ์ พิรัชชา<sup>1</sup>, ชนัญญู สีภา<sup>1</sup>, เนตรนรินทร์ พันสีทุม<sup>1</sup>, สุกัญญา ปัตถา<sup>1</sup>, ปิยะพงษ์ ชุมศรี<sup>2</sup>, อรทัย ปานเพชร<sup>2</sup>, บุญเลี้ยง สุพิมพ์<sup>2\*</sup>

Anantasak Piraksa<sup>1</sup>, Chananyou Seeka<sup>1</sup>, Netnarin Panseetum<sup>1</sup>, Sukanya Pattha<sup>1</sup>, Piyapong Choomsri<sup>2</sup>, Orathai Panpetch<sup>2</sup>, Bunliang Suphim<sup>2\*</sup>

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยทำการศึกษาในส่วนใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา นำมา วิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ทดสอบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP (Ferric reducing/antioxidant potential) และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากใบผักคราดหัวแหวนไร่มีปริมาณสารฟีนอลิก ทั้งหมดมากที่สุด เท่ากับ  $14.32 \pm 0.01 \mu\text{g GAE/mg sample}$  และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด มีค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ  $262.21 \pm 1.13 \mu\text{g/mL}$  และมีค่า FRAP value เท่ากับ  $252.71 \pm 2.33 \mu\text{g TEAC/mg sample}$  สารสกัดจากใบผักคราดหัวแหวนไร่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับมากที่สุด มีค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ เท่ากับ  $464.70 \pm 133.57 \mu\text{g/mL}$  ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $R^2 = 0.8727$ ,  $p < 0.05$ ) ดังนั้นผลการศึกษานี้อาจใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งตับของสารสกัดจากผักคราดหัวแหวนต่อไป

**คำสำคัญ:** ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง, เซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง, ผักคราดหัวแหวน

\* Corresponding author: bunliang\_sp@yahoo.com, Tel. 086-8657541

Received: July 1, 2021; Revised: December 2, 2021;

Accepted: December 23, 2021

<sup>1</sup> นักศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย 42000

<sup>2</sup> ผศ., คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเลย 42000

<sup>1</sup> Student, Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University, Loei, 42000, Thailand

<sup>2</sup> Asst. Prof., Faculty of Science and Technology, Loei Rajabhat University, Loei, 42000, Thailand

## Abstract

The purpose of this study was to investigate the total phenolic contents, antioxidant activity, and antiproliferative activity against HepG2 cell line from leaves and shoots of *Spilanthes acmella*. Total phenolic content was analyzed by Folin-Ciocalte method. Antioxidant activity was used DPPH radical scavenging assay and FRAP (Ferric reducing/antioxidant potential). The antiproliferative activity against liver cancer (HepG2) cell line was determined by sulforhodamine B (SRB) assay. The result showed that the ethanolic extract from leaves at the Paddy field had the highest amount of total phenolic content. There was  $14.32 \pm 0.01$   $\mu\text{g}$  GAE/mg sample. Antioxidation activity assay, the result showed that the leaves extract at Paddy field had the highest antioxidant activity which showed  $\text{IC}_{50}$  value of DPPH radical at  $262.21 \pm 1.13$   $\mu\text{g/mL}$  and FRAP value of  $252.71 \pm 2.33$   $\mu\text{g}$  TEAC/mg sample. Antiproliferative activity against liver cancer (HepG2) cell line, the result showed that the leaves extract at the Corn field had the highest antiproliferative activity which showed  $\text{IC}_{50}$  value of growth inhibition at  $464.70 \pm 133.57$   $\mu\text{g/mL}$ . The result show that the antioxidant activity of leaves and shoots extract at Corn field and Paddy field had the statistical significantly positive correlation with HepG2 cell growth inhibition at 0.05 ( $R^2 = 0.8727$ ,  $p < 0.05$ ). These results may be used as preliminary data for further study of the anticancer activity against liver cancer cells of *Spilanthes acmella* extract.

**Keywords:** Total phenolic content, Antioxidant activity, Antiproliferative activity, Hepatocarcinoma cell line (HepG2), *Spilanthes acmella*

## บทนำ

โรคมะเร็งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับหนึ่งของประชากรไทย โดยในปี พ.ศ. 2560 มะเร็งที่พบเป็นอันดับหนึ่งในเพศชายคือมะเร็งตับ ในเพศหญิงพบเป็นอันดับสี่ รองจากมะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก มะเร็งลำไส้และทวารหนัก ส่วนใหญ่ผู้ป่วยมะเร็งตับที่ได้รับการรักษามักพบเป็นระยะท้ายของโรคถึงร้อยละ 31.10 จึงทำให้มีอัตราการเสียชีวิตเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น มะเร็งตับจึงเป็นปัญหาสำคัญและเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของประชากรไทย<sup>(1,2)</sup> ปัจจุบันการรักษาด้วยยาต้านมะเร็งส่วนใหญ่มีอาการข้างเคียงมาก จึงมีความจำเป็นในการค้นหายาใหม่ที่ได้ผลในการรักษาและมีอาการข้างเคียงต่ำ รวมทั้งสามารถเสริมฤทธิ์ของยาต้านมะเร็งหรือสามารถลดการแพร่กระจายของ

เซลล์มะเร็งได้ การเลือกใช้สมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ในปัจจุบันที่มีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น<sup>(3)</sup>

ผักคราดหัวแหวน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spilanthes acmella* เป็นพืชสมุนไพรที่มีการแพทย์ไทยนำมาใช้เป็นยารักษาอาการปวดฟัน แก้เหงือกอักเสบ ปัจจุบันถูกบรรจุเป็นสมุนไพรในโครงการสาธารณสุขมูลฐาน เพื่อใช้เป็นยาชาแก้ปวดฟันหรือเป็นยาชาสำหรับการถอนฟันและอุดฟันในผู้ป่วย<sup>(4)</sup> โดยสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักของผักคราดหัวแหวน คือ Spilanthol และสารสำคัญอื่น เช่น ไฟเตสเตอร์อล กรดอมิโน ไตรเทอร์ปีนอยด์ ซาโปนิน อัลคาร์ลอยด์ ทำให้ผักคราดหัวแหวนมีสรรพคุณต่าง ๆ เช่น แก้อักเสบ แก้ปวด ยาชา ลดไข้ รักษาโรครุมตอยด์ และเหงือกติดเชื้อ และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เป็นต้น<sup>(5)</sup> นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โกลโคไซด์

ฟินอลิก และคูมาริน<sup>(6-7)</sup> ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก ทำให้ผักคราดหัวแหวน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังการศึกษาในสารสกัดเอทานอลของใบผักคราดหัวแหวน พบว่า สารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า  $IC_{50}$  ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 134.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้ มีค่าเท่ากับ 104.51 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร<sup>(8)</sup> ซึ่งพบว่าอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์และทำให้เกิดโรคมะเร็งในปัจจุบัน<sup>(9)</sup> และได้มีการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของผักคราดหัวแหวน พบว่า สารสกัดเฮกเซนและ 70% เอทานอลจากทั้งต้นของผักคราดหัวแหวนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HEP-2 cell line) ได้ร้อยละ  $77 \pm 1.90$  และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT-29 cell lines) ได้ร้อยละ  $74 \pm 1.03$ <sup>(10)</sup> สารสกัด 95% เอทานอลจากส่วนต้นของผักคราดหัวแหวนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7 cells) มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $37.1 \pm 1.1$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร<sup>(11)</sup> สารสกัดเอทานอลจากส่วนต้นของผักคราดหัวแหวนสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง<sup>(12)</sup>

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งตับของผักคราดหัวแหวนยังมีจำกัด ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด การทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay หาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP (Ferric reducing/ antioxidant potential) และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งตับ HepG2 และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัด เอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา

## วัสดุและวิธีการ

### สารเคมี

Folin-Ciocalteu phenol reagent (LOBA CHEMIE PVT.CTE, India), Garlic acid (Sigma-Alorich, USA), Sodium carbonate ( $Na_2CO_3$ ) (QreC, New Zealand), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Alorich, USA), Trolox (Sigma-Alorich, USA), Methanol (RCI Labscan, Thailand), Sodium acetate (QreC, New Zealand), Iron (III) Chloride Hexahydrate (QreC, New Zealand), 2, 4, 6 – tripyridyl-s-triazine (Sigma-Alorich, USA), Sulforhodamine B, Acetic acid and Tris base (Sigma-Aldrich, Germany), Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Fetal bovine serum (10%), trypsin-EDTA, Sodium bicarbonate ( $NaHCO_3$ ), Penicillin (100 U/mL), Streptomycin (100  $\mu$ g/mL) from Gibco (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)

### ตัวอย่างพืช

พืชในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คือ ผักคราดหัวแหวนไร่และนา โดยใช้ใบและยอด ของผักคราดหัวแหวนไร่และนาที่เก็บได้จากบ้านเพี้ย หมู่ 2 ตำบลน้ำสวย อำเภอเมือง จังหวัดเลย การยืนยันชนิดของพืชโดยการตรวจรายชื่อวิทยาศาสตร์ของพืช จากการนำภาพถ่ายเปรียบเทียบกับเอกสารวิชาการ เช่น หนังสือชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์<sup>(13)</sup>

### การเตรียมสารสกัดจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวน

การเตรียมสารสกัดจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนดัดแปลงจากวิธีของ Boontha และคณะ<sup>(11)</sup> มีวิธีการดังนี้ นำใบของผักคราดหัวแหวนไร่มาล้างให้สะอาดผึ่งให้แห้งสนิทในที่ร่ม ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วบดให้ละเอียด ได้ 100 กรัม แช่ใน 95% ethanol ปริมาณ 250 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 วัน โดยตัวอย่างจาก

ใบ ยอด ของผักคราดหัวแหวนไร่ และนา ก็ดำเนินการเช่นเดียวกัน จากนั้นนำสารสกัดแต่ละตัวอย่าง นำมากรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบางและกระดาษกรอง Whatman<sup>tm</sup> เบอร์ 1 นำสารใส ที่ได้ไประเหยด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator (BUCHI<sup>®</sup> Rotavapor R – 124) ที่อุณหภูมิ 79 องศาเซลเซียส สำหรับระเหยตัวทำละลาย ethanol เก็บสารที่แห้งใส่ขวดแก้วสีขาปิดฝาให้สนิท ตีติดฉลากชื่อสมุนไพร วันที่เตรียม เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส และคำนวณร้อยละของสารสกัดที่ได้ ด้วยสูตรดังนี้ ร้อยละของสารสกัด = (น้ำหนักของสารสกัดที่ผลิตได้ (กรัม) × 100) / (น้ำหนักของตัวอย่างยอดและใบผักคราด (กรัม))

#### เซลล์มะเร็งตับ HepG2 และการเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งตับ ชนิด HepG2 ได้รับจาก American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ซึ่งมีส่วนผสมเพิ่มเติม คือ ร้อยละ 10 fetal bovine serum, sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>), penicillin (100 U/mL) และ streptomycin (100 µg/mL) และเลี้ยงในตู้บกก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เซลล์เพาะเลี้ยงในจานพลาสติกจะเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 3 วัน เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนได้ประมาณร้อยละ 70 จะทำการแยกเซลล์โดยใช้ trypsin-EDTA และเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงจะนำไปทำการทดลองต่อไป<sup>(14)</sup>

#### การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin– Ciocalteu method ดัดแปลงจากวิธีของอดิสร จำรูญ และคณะ<sup>(15)</sup> มีวิธีการดังนี้ ปิเปตสารละลายใบหรือยอดของสารสกัดเอทานอลผักคราดหัวแหวนจากผักคราดหัวแหวนไร่หรือนา ปริมาณ 0.04 มิลลิลิตร จากความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมนลงใน

1.80 มิลลิลิตร ของ 10% Folin – Ciocalteu phenol reagent จากนั้นใส่ 1.20 มิลลิลิตร ของ 7.50% โซเดียมคาร์บอเนต (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดทดลองเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก ที่ความเข้มข้น 0.63, 1.25, 2.50, 5, 10, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รายงานผลในหน่วยไมโครกรัมสมมูลของแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ทำการทดลอง 3 ครั้ง

#### การทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา ด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay<sup>(16)</sup> มีวิธีการดังนี้ ปิเปตสารละลายใบหรือยอดของสารสกัดเอทานอลจากผักคราดหัวแหวนไร่หรือนา ปริมาณ 0.10 มิลลิลิตร จากความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 0.10 mM DPPH ในปริมาตร 2.90 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดทดลองหลอดที่ 1 เท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเจือจางความเข้มข้นลดลงทีละ 2 เท่า ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 15.63 – 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดที่ไม่ได้ใส่สมุนไพร โดยมี Trolox เป็นสารต้านออกซิเดชันอ้างอิง ถ้าหากสารสกัดจากผักคราดหัวแหวน มีฤทธิ์กำจัด DPPH ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะลดลง นำมาคำนวณ ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ ด้วยสูตร ดังนี้ %Radical scavenging activity = [(Control OD – Sample OD) / Control OD] × 100 และนำไปคำนวณค่า IC<sub>50</sub> ทำการทดลอง 3 ครั้ง

### การหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ด้วยวิธี FRAP

การหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนาด้วยวิธี FRAP<sup>(15-17)</sup> โดยมีวิธีการดังนี้ ปิ่เปิดสารละลายใบหรือยอดของสารสกัดเอทานอลจากผักคราดหัวแหวนไร่หรือนา ปริมาณ 0.20 มิลลิลิตร จากความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ FRAP reagent (acetate buffer 300 มิลลิโมล pH 3.60 : 2,4,6 – tripyridyl-s-triazine 10 มิลลิโมล : FeCl<sub>3</sub> 20 มิลลิโมล = 10 : 1 : 1) ในปริมาตร 2.80 ลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายในหลอดทดลองเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าอัตราการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยมี Trolox เป็นสารต้านออกซิเดชันอ้างอิง ถ้าหากสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะเพิ่มขึ้น นำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐานในการหาปริมาณ Fe<sup>2+</sup> ที่เกิดจากปฏิกิริยาของ Trolox หรือสารสกัดผักคราดหัวแหวน แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นค่า FRAP value ซึ่งหมายถึงความสามารถในการรีดิวซ์ Fe<sup>3+</sup> ไปเป็น Fe<sup>2+</sup> ของสาร นั่นคือถ้าสารใดมีค่า FRAP value สูงก็จะสามารถรีดิวซ์ Fe<sup>3+</sup> ไปเป็น Fe<sup>2+</sup> ได้สูง ทำการทดลอง 3 ครั้ง

### การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง ชนิด HepG2 ด้วยวิธี Sulforhodamine B assay (SRB)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับเพาะเลี้ยง ชนิด HepG2 ของสารสกัดเอทานอลจากใบหรือยอดของผักคราดหัวแหวนไร่หรือนา<sup>(14)</sup> ซึ่งมีวิธีการดังนี้ เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ ชนิด HepG2 ใน 96 well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนาที่ละลายอยู่ที่ความเข้มข้น

ตั้งแต่ 31.25 – 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน 96 well plate แล้วนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก ล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ จากนั้นตรึงเซลล์ด้วย ice-cold 10% trichloroacetic acid (TCA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเซลล์ด้วย 0.4% sulforhodamine B (SRB) (เนื่องจาก SRB เป็น aminoxanthene dye สามารถจับกับ basic amino acid ของโปรตีนภายในเซลล์ที่รอดชีวิตได้ โดยความเข้มข้นของสี SRB แสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด<sup>(18)</sup> บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาล้างสีส่วนเกินด้วย 1% acetic acid จำนวนหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นละลายสี SRB ด้วยสารละลาย 200 ไมโครลิตรของ 10mM Tris base และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และนำคำนวณเป็นร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต (%cell viability) = (ค่าดูดกลืนแสงในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด-ค่าดูดกลืนแสงของ blank/ค่าดูดกลืนแสงในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด-ค่าดูดกลืนแสงของ blank)×100<sup>(14, 19)</sup> แล้วนำมาหาค่าร้อยละของการยับยั้งการเจริญของเซลล์ = 100 – (ร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตจากกลุ่มที่ได้รับสารสกัด/ร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตในกลุ่มควบคุม)×100<sup>(20)</sup> และนำไปคำนวณหาค่า IC<sub>50</sub> ทำการทดลอง 3 ครั้ง

### การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 จาก 3 การทดลองแสดงผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน นำค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญของเซลล์ มาคำนวณค่า IC<sub>50</sub> โดยใช้ Nonlinear regression ในโปรแกรม Sigma Plot ใช้สถิติ Independent t- test ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของสารสกัด และใช้สถิติ Pearson



correlation ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระและร้อยละการยับยั้งการเจริญเซลล์มะเร็งตับของสารสกัด เนื่องจากข้อมูลกระจายตัวแบบปกติ โดยพิจารณาที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ในโปรแกรม SPSS

## ผลการศึกษา

### การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา ด้วยวิธี Folin – Ciocalteu และรายงานผลในหน่วยไมโครกรัมสมมูลของแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่ มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ  $14.32 \pm 0.01$  และ  $12.89 \pm 0.01$  ไมโครกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า สารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่มีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างจากผักคราดหัวแหวนไร่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดจากยอดผักคราดหัวแหวนไร่มากกว่าใบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังแสดงในตารางที่ (Table) 1

### การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด เอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา ด้วยวิธี DPPH และคำนวณเป็นค่า  $IC_{50}$  ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ค่าความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ (ค่า FRAP value) ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลของสารสกัดจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา มีค่า  $IC_{50}$  ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่า Trolox ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใช้อ้างอิง โดยสารสกัดเอทานอลของผักคราดหัวแหวนไร่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดคือ สารสกัดเอทานอลจากใบของผักคราดหัวแหวนไร่

มีค่า  $IC_{50}$  ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ  $262.21 \pm 1.13$  ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และมีค่า FRAP value เท่ากับ  $252.71 \pm 2.33$  ไมโครลิตรสมมูลของไทโรลอคซ์ต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างจากผักคราดหัวแหวนไร่ โดยมีค่า  $IC_{50}$  น้อยกว่า และค่า FRAP มากกว่าสารสกัดจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยสารสกัดเอทานอลจากใบของทั้งผักคราดหัวแหวนไร่และนา จะมีค่า  $IC_{50}$  น้อยกว่า และค่า FRAP มากกว่าสารสกัดจากยอด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังแสดงในตารางที่ (Table) 1

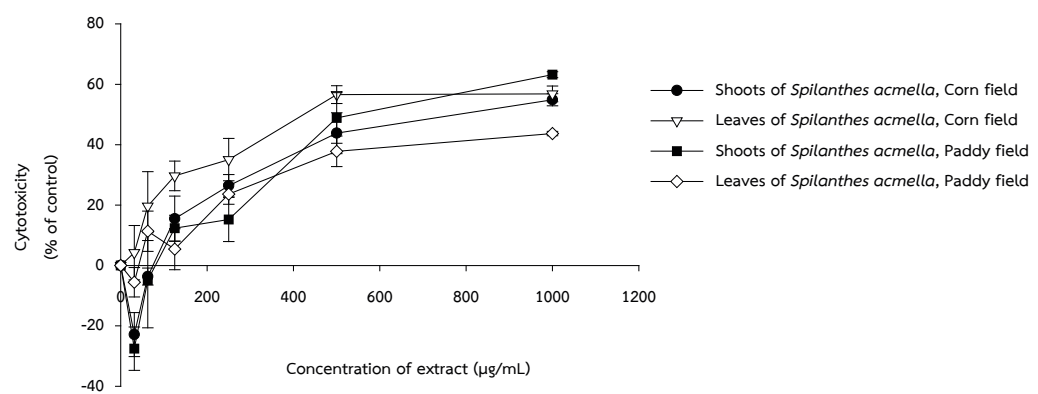
### การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 ของสารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา ด้วยวิธี sulforhodamine B assay (SRB) และรายงานเป็นค่าการตายของเซลล์ตาย (เทียบกับกลุ่มควบคุม คือ ไม่ได้รับสารสกัด) และค่า  $IC_{50}$  ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา มีค่าการตายของเซลล์ ณ เวลา 24 ชั่วโมง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด ดังแสดงในภาพที่ (Figure) 1 และสารสกัดจากใบผักคราดหัวแหวนไร่ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 มากที่สุด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $464.70 \pm 133.57$  ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา มีค่า  $IC_{50}$  ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ (Table) 1

**Table 1** Total phenolic contents, IC<sub>50</sub> of DPPH, Antioxidant activity with FRAP assay, and IC<sub>50</sub> of growth inhibition on HepG2 of ethanolic extract from leaves and shoots of *Spilanthes acmella*

Sample	Edible Part used	Total phenolic contents (µg GAE/mg sample)	IC <sub>50</sub> of DPPH (µg/mL)	FRAP assay (µg TEAC/mg sample)	IC <sub>50</sub> of growth inhibition on HepG2 (µg/mL)
Trolox		-	10.51±0.67	-	-
<i>Spilanthes acmella</i> , Corn field					
	Leaves	7.82±0.01	896.87±28.62*	171.50±1.62*	464.70±133.57
	Shoots	5.38±0.36	1,367.82±41.29	37.96±0.52	816.34±121.45
<i>Spilanthes acmella</i> , Paddy field					
	Leaves	14.32±0.01* **	262.21±1.13* **	252.71±2.33* **	1,060.44±329.34
	Shoots	12.89±0.01**	915.28±13.69**	127.38±1.27**	782.71±82.18

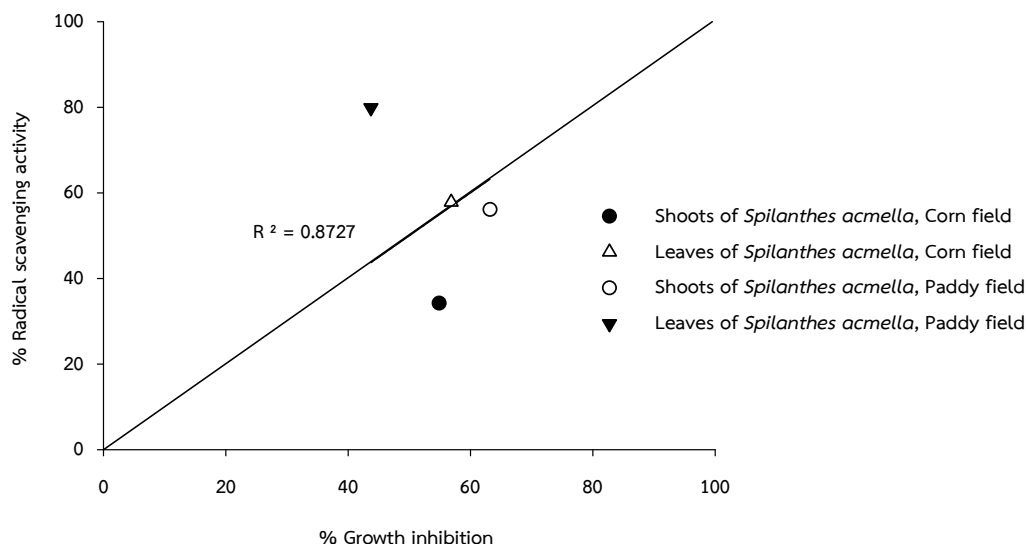
**Note:** Data represent mean ± SD from 3 experiments, \*  $P < 0.05$  when compared between leaves with shoots of *Spilanthes acmella* extract at the same area, \*\*  $P < 0.05$  when compared between leaves with shoots of *Spilanthes acmella* extract at the different area.



**Figure 1** Effect of ethanolic extract from leaves and shoots of *Spilanthes acmella* on HepG2 cell death for 24 h. Cell death was determined using an SRB assay. Data represent mean ± SD from 3 experiments.

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 ของสารสกัดเอทานอลจากผักคราดหัวแหวน จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 ของสารสกัดเอทานอลจากใบและยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนา ที่ความเข้มข้น

1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแสดงความสัมพันธ์ในรูปแบบแผนภาพการกระจาย ผลการศึกษาพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากใบและยอดผักคราดหัวแหวนไร่และนา มีความสัมพันธ์ทางบวกกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ( $R^2 = 0.8727$ ,  $p < 0.05$ ) ดังแสดงในภาพที่ (Figure) 2



**Figure 2** Correlation between the % radical scavenging activity using an DPPH assay and % growth inhibition of ethanolic extract from leaves and shoots of *Spilanthes acmella* on HepG2 at a concentration of 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

## อภิปรายผล

จากผลการศึกษาพบ สารฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเอทานอลจากใบผักคราดหัวแหวนมากที่สุด โดยมีค่า  $\text{IC}_{50}$  ของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยที่สุด และมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ (ค่า FRAP value) มากที่สุด เมื่อเทียบสารสกัดผักคราดหัวแหวนจากใบและยอดจากพื้นที่ศึกษา ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลจากใบที่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด สารสกัดจากใบจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากเช่นเดียวกัน ผลการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Bootha และคณะ<sup>(11)</sup> ได้ศึกษาปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด 95% เอทานอลจากส่วนใบ ยอด และลำต้น ของผักคราดหัวแหวน ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากผักคราดหัวแหวนมีปริมาณฟีนอลิก เท่ากับ  $62.8 \pm 5.2$  มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีฤทธิ์อนุมูลอิสระ มีค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ  $1,200 \pm 0.1$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สิ่ง

ที่ต่างกันคือการศึกษาของ Bootha และคณะ สารสกัดผักคราดหัวแหวนจะมีปริมาณฟีนอลิกที่มากกว่าการศึกษารุ่นนี้ แต่ค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าใกล้เคียงกัน คือ ค่า  $\text{IC}_{50}$  ของการศึกษานี้มีค่าอยู่ระหว่าง  $262.21 \pm 1.13 - 1,367.82 \pm 41.29$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสิ่งที่ให้ปริมาณสารฟีนอลิกทั้ง 2 การศึกษาแตกต่างกัน อาจมาจากวิธีการเตรียมตัวอย่างผักคราดหัวแหวน คือ การศึกษาของ Bootha และคณะ จะใช้ส่วนใบ ยอด และลำต้น รวมกัน อบให้แห้งและบดละเอียดแล้วจึงนำมาสกัด แต่การศึกษารุ่นนี้ทำการศึกษาการแยกส่วนใบ และยอด ในการสกัด และใช้ตัวอย่างสด จึงอาจทำให้ปริมาณฟีนอลิกของการศึกษานี้มีปริมาณน้อยกว่า

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 พบในสารสกัดเอทานอลจากใบของผักคราดหัวแหวนไร่มากที่สุด มีค่า  $\text{IC}_{50}$  ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 น้อยกว่าส่วนอื่นที่ศึกษา ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Singh และคณะ<sup>(10)</sup> ซึ่งได้ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด 70% เอทานอล



จากทั้งต้นของผักคราดหัวแหวนโดยทำการศึกษาในเซลล์มะเร็งตับ HEP-2 และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ HT-29 ด้วยวิธี SRB เช่นเดียวกัน ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HEP-2 และ HT-29 ได้ร้อยละ  $77 \pm 1.90$  และ  $74 \pm 1.03$  ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากสองการศึกษาที่มีทั้งสิ่งที่คล้ายคลึงกันและแตกต่างกัน เช่น ในการศึกษาที่ใช้ส่วนใบและยอดของผักคราดหัวแหวน สกัดด้วยตัวทำละลาย 95%เอทานอล โดยพบว่าส่วนใบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 มากที่สุด ซึ่งในรายงานการศึกษาที่ผ่านมาใช้ทั้งต้นของผักคราดหัวแหวน สกัดด้วยตัวทำละลาย 70% เอทานอลในการศึกษา อาจกล่าวได้ว่าชนิดของส่วนที่ใช้ศึกษาและความเข้มข้นของตัวทำละลายอาจมีผลต่อการสกัดสารสำคัญจากผักคราดหัวแหวน เช่น ฟีนอลิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญกับฤทธิ์ต้านมะเร็งของพืชสมุนไพร ดังในการศึกษาของ Al-Rimawi และคณะ<sup>(21)</sup> ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านมะเร็งจากพืช *Tragopogon porrifolius*

จากผลการศึกษาพบว่า ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบมากที่สุดในการสกัดด้วย 80% เอทานอล รองลงมา คือ 100% เอทานอล และน้ำ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ของส่วนใบและยอดจากผักคราดหัวแหวนไร่และนาที่ศึกษา ไม่พบความแตกต่างกัน และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเอทานอลจากยอดของผักคราดหัวแหวนไร่และนามีความสัมพันธ์ทางบวกกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ซึ่งหมายความว่า ถ้าสารสกัดเอทานอลจากยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาก สารสกัดจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับมากเช่นกัน ดังที่พบในการศึกษาของ Sammar และคณะ<sup>(22)</sup> ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 ในสารสกัดจากพืชสมุนไพร จำนวน 57 ชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ผลการศึกษาพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากพืชสมุนไพร 9 ชนิด มีความสัมพันธ์ค่อนข้างน้อยกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และการศึกษาของ Nguyen และคณะ<sup>(23)</sup> ที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งตับ HepG2 ของสารสกัดเอทานอลจาก *Adenosma bracteosum* Bonati พบว่า สารสกัดเอทานอลจาก *Adenosma bracteosum* Bonati มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้ และสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ได้ โดยออกฤทธิ์ที่ ROS-mediated mitochondrial pathway และชักนำให้เซลล์ตายแบบ apoptosis โดยกระตุ้นการทำงานของ caspase-3 จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี พบว่าเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าผักคราดหัวแหวนและพืชสมุนไพรส่วนใหญ่ จะประกอบด้วยสารสำคัญในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก โดยเฉพาะ สารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์<sup>(6-7)</sup> ทำให้ผักคราดหัวแหวนและพืชสมุนไพรมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นกลไกหนึ่งในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ใบและยอดของผักคราดหัวแหวนนาจะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด และมีความสัมพันธ์ทางบวกกับฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ โดยภาพรวมพบว่าสารสกัดจากใบและยอดผักคราดหัวแหวนไร่และนา มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับค่อนข้างน้อย ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านมะเร็งตับของผักคราดหัวแหวนต่อไปในอนาคต รวมทั้งศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นอื่น ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็งที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่น ๆ เช่น เมทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เป็นต้น และศึกษาองค์ประกอบของสารสำคัญ

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนงานวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏเลย ประจำปีงบประมาณ 2563 และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เบญจพร บุราณรัตน์ อาจารย์ประจำคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

- Fongchan S, Vorapongsathorn S, Bhavabudananda P, Chooratna K. Liver cancer prevention and control. Thai Cancer J 2019; 39(2): 65 – 74. (In Thai)
- National Cancer Institute, Ministry of Public Health. Hospital-Based Cancer Registry 2017. Bangkok: Pronsup Printing Co. Ltd; 2018. (In Thai)
- Laupattarakasem P, Sripa B, Laupattarakasem W. Antimigration of cancer cells by *Derris scandens* on cholangiocarcinoma cells. Srinagarind Med J 2007; 22(4): 339 – 345. (In Thai)
- Pongnaratorn P. A Literature review of the pharmacological effects of *Spilanthes acmella*: anti-inflammatory and analgesic of muscles. Srinagarind Med J 2016; 31(4): 245 – 249. (In Thai)
- Gulam NN, Wani TA, Shrivastava M, Wani A, Shah SN. *Spilanthes acmella* an endangered medicinal plant – its traditional, phytochemical and therapeutic properties – an overview. Int J of Adv Res 2016; 4:627 – 639.
- Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: a review. EXCLI Journal 2013; 12: 291 – 312.
- Prachayasittikul S, Suphamong S, Worachartcheewan A, Lawung R, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. Molecules 2009; 14:850 – 867.
- Nabi NG, Shrivastava M. Estimation of total flavonoids and antioxidant activity of *Spilanthes acmella* leaves. Pharm Biosci J 2016; 4(6): 29 – 34.
- Zimmerman R, Cerutti P. Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo C3H/10T1/2/C18 fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 1984; 81(7): 2085 – 2087.
- Singh S, Verma KS, Singh KS. *In vitro* investigation of anti-cancer potential of *Spilanthes acmella*. J Pharm Sci & Res 2020; 12(1): 124 – 128.
- Boontha S, Thoedyotin T, Saengtabtim T, Im-erb P, Chaniad N, Buranrat B, Pitaksuteepong, T. Cytotoxic, colony formation and anti-migratory effects of *Spilanthes acmella* (Asteraceae) aerial extract on MCF-7 cells and its cream formulation. Trop J Pharm Res 2020; 19(1): 17 – 24.
- Lalthanpuui PB, Lalthandama K. Anticancer and DNA-protecting potentials of *Spilanthes acmella* (toothache plant) grown in Mizoram, India. Journal of Natural Remedies 2019; 19(2): 57 – 63.
- Pooma R, Suddee S, editors. Thai plant names Tem Smitinand (revised edition 2014). Bangkok: Office of the Forest

- Herbarium, Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation; 2014. (In Thai)
14. Buranrat B, Mairuae N, Kanchanarach W. Cytotoxic and antimigratory effects of *Cratoxy formosum* extract against HepG2 liver cancer cells. Biomed Rep 2017; 6(4): 441 – 448.
15. Jumroon A, Youryon P, Joyroy B. Analysis of antioxidant activity in *Musa* (ABB group) 'Kluai Hin' and *Musa* (AA group) 'Kluai Leb Mu Nang'. Songklanakarin J Pl Sci 2015; 2(1): 38 – 42. (In Thai)
16. Jandaruang J, Siritapetawee J, Thumanu K, Songsiriritthigul C, Krittanai C, Daduang S, Dhiravisit A, Thammasirak S. The effects of temperature and pH on secondary structure and antioxidant activity of *Crocodylus siamensis* hemoglobin. Protein J 2012; 31(1): 43 – 50.
17. Shian TE, Abdullah A, Musa KH, Maskat MY, Ghani MA. Antioxidant properties of three banana cultivars (*Musa acuminata* 'Berangan', 'Mas' and 'Raja') extracts. Sains Malaysiana 2012; 41(3): 319 – 324.
18. Thongdeeying P, Kitsiripipat J, Ruangnoo S, Pibanpaknatee P, Itharat A. Cytotoxic activity of Samhannachan recipe and its ingredients against lung cancer cell. Thammasat Medical Journal 2017; 17(4): 565 – 573. (In Thai)
19. Akanitapichat P, Sethabouppha B. *In Vitro* antioxidant and cytoprotective activities of extracts from four *Solanum* fruits. IJPS 2020; 16(1): 49 – 58. (In Thai)
20. Suphim B, Buranrat B, Prawan A, Kukongviriyapan V. Sensitivity of cholangiocarcinoma cells to chemotherapeutic agents and curcumin. Srinagarind Med J 2008; 23(3): 284 – 289. (In Thai)
21. Al-Rimawi F, Rishmawi S, Ariqat HS, Khalid FM, Warad I, Salah Z. Anticancer activity, antioxidant activity, and phenolic and flavonoids content of wild *Tragopogon porrifolius* plant extracts. Evid Based Complement Alternat Med 2016; 1 – 7.
22. Sammar M, Abu-Farich B, Rayan I, Falah M, Rayan A. Correlation between cytotoxicity in cancer cells and free radical-scavenging activity: *In vitro* evaluation of 57 medicinal and edible plant extracts. Oncol lett 2019; 18(6): 6563 – 6571.
23. Nguyen NH, Ta Q, Pham QT, Luong T, Phung VT, Duong TH, Vo VG. Anticancer activity of novel plant extracts and compounds from *Adenosma bracteosum* (Bonati) in human lung and liver cancer cells. Molecules (Basel, Switzerland) 2020; 25(12): 1 – 16.