

การศึกษาปริมาณกรดคลอโรจินิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ ของสารสกัดดอกเก๊กฮวยแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย

อมตวรรณ อินทรีย์ น.บ.*, จามพัทธ์ ทายะนา วท.ม.** , นงนภัส ดวงดี วท.ม., Dr. rer. nat.** ,
เอสเธะ ประทีปทองคำ น.บ., ว.น., Dr. med. dent.*

*สถาบันทันตกรรม ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

**ศูนย์วิจัยค้นคว้าและพัฒนายา สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูงมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
(ศูนย์รังสิต) ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Abstract: Chlorogenic Acid and Biological Activity of Chrysanthemum Indicum L. Extract at Various Geographical Locations in Thailand

Amatawan Insee, D.D.S.*, Ngampuk Tayana, M.Sc.** ,

Nongnaphat Duangdee, M.Sc., Dr.rer.nat.** ,

Esthera Prateeptongkum, D.D.S., Dip, Dr.med.dent.*

*Institute of Dentistry, Talad Khwan, Mueang, Nonthaburi, 11000, Thailand

**Drug Discovery and Development Center, Office of Advance Science and Technology,
Thammasat University, Pathumthani, 12120, Thailand

(E-mail: salasuang@gmail.com)

(Received: 31 May, 2022; Revised: 26 January, 2023; Accepted: 13 July, 2023)

Background: Chlorogenic acid (CGA) is a phenolic compound most found in coffee. It can be found in numerous types of tea plants, including Chrysanthemum. CGA has shown antioxidant and anticancer activities.

Objective: To compare the contents of CGA, total phenolic, and total flavonoids in Chrysanthemum flower extracts from different planting sites in Thailand and to evaluate the biological activity for antioxidant and cytotoxicity against oral cancer cells. **Method:** The CGA, total phenolics, and total flavonoids were extracted and evaluated from Chrysanthemum flower by using different solvents, ≥99.9% ethanol, 40% ethanol and water. The antioxidant and cytotoxic activities of the extracts were determined by using DPPH and MTT assays, respectively.

Result: The contents of chemotypes from each planting source are different. The highest contents of CGA and total phenolics, 1.41%w/w and 93 mg GAE/g, respectively were found in Chrysanthemum flowers from Chiang-Mai. Meanwhile, the highest contents of total flavonoids, 23 mg QE/g, were found in Chrysanthemum flowers from Samut Prakan. Chrysanthemum flowers from Samut Prakan showed the highest antioxidant activity (IC_{50} 165.33 μ g/mL), following by Chrysanthemum flowers from Chiang-Mai (IC_{50} 169.50 μ g/mL), but there was no statistically significant difference ($p \geq .05$). In addition, Chrysanthemum flower crude extract could not induce oral cancer cell death by more than 50 %, so it was considered no cytotoxicity. **Conclusion:** The contents of CGA, total phenolics, and total flavonoids in the crude extracts varied depending on the various geographical location and solvent. Thailand's Chrysanthemum flower extracts show antioxidant activity but do not show cytotoxicity against oral cancer cells.

Keywords: Chrysanthemum indicum L., Chlorogenic acid, Biological activity, Antioxidant activity

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง: Chlorogenic acid (CGA) เป็นสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มฟีนอลิกพบมากในกาแฟ และพบได้ในชาพืชหลายชนิด รวมทั้งดอกเก๊กฮวย CGA มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง

วัตถุประสงค์: เปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญ CGA ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากของสารสกัดดอกเก๊กฮวยจากแหล่งปลูกต่างๆในประเทศไทย **วิธีการ:** สุ่มตัวอย่างดอกเก๊กฮวย

สกัดด้วยตัวทำละลาย $\geq 99.9\%$ ethanol, 40% ethanol และน้ำ วิเคราะห์หาปริมาณ CGA, total phenolics, total flavonoids พร้อมทดสอบการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH assay และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากวิธี MTT assay ผล: ปริมาณสารสำคัญแต่ละแหล่งปลูกนั้นมีความแตกต่างกัน เชียงใหม่มีปริมาณสารสำคัญ CGA และฟีนอลิกทั้งหมด สูงสุด เท่ากับ 1.41%w/w และ 93 mg GAE/g ตามลำดับ ส่วนสมุทรปราการมีปริมาณ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สูงสุด เท่ากับ 23 mg QE/g ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสมุทรปราการ ค่า IC_{50} ดีที่สุดเท่ากับ 165.33 $\mu\text{g/mL}$ (เชียงใหม่ให้ค่า IC_{50} รองลงมาเท่ากับ 169.50 $\mu\text{g/mL}$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \geq .05$) และสารสกัดดอกเก๊กฮวยไม่สามารถทำให้เซลล์ช่องปากตายได้มากกว่าร้อยละ 50 จึงถือว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สรุป: สารสำคัญ CGA ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ที่พบในสารสกัดมีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละแหล่งปลูกและขึ้นกับตัวทำละลาย และสารสกัดดอกเก๊กฮวยในประเทศไทยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก

คำสำคัญ: เก๊กฮวย, กรดคลอโรจีนิก, ฤทธิ์ทางชีวภาพ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

บทนำ

มะเร็งช่องปากเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยที่สุดบริเวณศีรษะและลำคอ มีผู้ป่วยเป็นมะเร็งช่องปากรายใหม่มากกว่า 450,000 คนต่อปีทั่วโลก ในระยะ 5 ปีหลังจากการวินิจฉัยโรค มีผู้ป่วยเพียงแค่ 40-50% ที่ยังรอดชีวิตอยู่¹ มะเร็งช่องปากเป็นมะเร็งที่พบได้บ่อยเป็นอันดับที่ 6 ของโลก² การศึกษาแนวโน้มอุบัติการณ์ช่วงปี 2004-2015 ของโรคมะเร็งช่องปากและฟาริงซ์ใช้ข้อมูลการรายงานมะเร็งในประเทศไทย พบว่ามะเร็งช่องปากในเพศชายและหญิงมีอุบัติการณ์สูงขึ้นจาก 4.8 เป็น 5.5 และจาก 3.6 เป็น 4.3 คนต่อแสนประชากร ตามลำดับ³ ปัจจัยเสี่ยงที่ส่งผลต่อโรคมะเร็งช่องปากเช่น การสูบบุหรี่, การเคี้ยวหมาก, การติดเชื้อไวรัส HPV, และแสงแดดยูวี (UV) เป็นต้น⁴ ปัจจุบันวิธีการรักษาโรคมะเร็งช่องปากมีทั้งวิธีการผ่าตัด การฉายรังสี การใช้เคมีบำบัด ซึ่งวิธีการรักษาเหล่านี้ล้วนมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป แต่อย่างไรก็ตามยาเคมีบำบัดมีผลแทรกซ้อนต่อร่างกาย⁵ เช่น กดไขกระดูก หมดแรง เป็นหมัน คลื่นไส้ อาเจียน อ่อนเพลีย ท้องร่วง เกิดพิษต่อหัวใจ ผลต่อการทำงานของหัวใจห้องล่างซ้าย หรือทำให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลว หัวใจเต้นผิดจังหวะ ภาวะความดันโลหิตสูง ภาวะลิ้นเลือดอุดตัน การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซ้ำ เกิดพิษต่อระบบประสาท เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ปลายประสาทอักเสบ

กรดคลอโรจีนิก⁶ (chlorogenic acid; CGA) เป็นสารสำคัญหลักที่พบในกาแฟและชา อยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในแง่คุณสมบัติทางเคมี ชีวภาพ และเภสัชวิทยา CGA มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) โดยกระตุ้นสารต้านอนุมูลอิสระ⁷ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide

Dismutase; SOD), กลูตาไธโอน (Glutathione) และลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) มีรายงานการศึกษาพบว่า CGA ช่วยลดความรุนแรงการเกิดมะเร็ง โดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง⁸ การศึกษาในมะเร็งหลอดอาหารชนิดเซลล์สแควมัส (Esophageal squamous Cell Carcinoma)⁹ ทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่า CGA มีบทบาทในวัฏจักรของเซลล์ โดยกระตุ้นการตายของเซลล์และออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลอดอาหาร โดยลดการแสดงออกของยีน BMI1 และ SOX2 ซึ่งการค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญและมีแนวโน้มในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้โมเลกุลสู่การพัฒนาไปเป็นยารักษาโรค โดยเฉพาะยารักษาโรคมะเร็ง

เก๊กฮวย หรือ เบญจมาศ ชื่อวิทยาศาสตร์: *Chrysanthemum indicum* L. เป็นไม้ดอกยืนต้นที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายในเอเชีย เจริญเติบโตในสภาพอากาศเย็น ปลูกมากทางภาคเหนือของประเทศไทยโดยอาจจะกระจายอยู่ในหลายจังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน นอกจากนี้พบในภาคกลาง เช่น สระบุรี นครปฐม และสมุทรปราการ หากดูตามแต่ละแหล่งปลูกในประเทศไทยแล้วจะเห็นได้ว่ามีสภาพภูมิอากาศที่หลากหลายและแตกต่างกันบางส่วน เก๊กฮวยมักเริ่มปลูกก่อนฤดูฝนประมาณเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม ดอกบานเต็มที่ช่วงเดือนกันยายนถึงธันวาคม ดอกเก๊กฮวยในประเทศไทยได้รับความนิยมในการนำมาบริโภคในรูปแบบเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย มักมีการนำมาบริโภคเป็นชาเนื่องจากมีรสชาติและกลิ่นที่น่าพึงพอใจ มีการศึกษาพบว่าในดอกเก๊กฮวยมีองค์ประกอบสารออกฤทธิ์หลายชนิดในรูปของสารประกอบฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์¹⁰ นอกจากนี้ยังพบสารสำคัญ CGA ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และต้านการเกิดโรคมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม⁹ แต่อย่างไรก็ตามพบรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์การต้านมะเร็งช่องปากน้อยมาก

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (phenolic and flavonoid compounds) รวมถึงปริมาณสารสำคัญ CGA ข้างต้นในสารสกัดดอกเก๊กฮวยด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันและดอกเก๊กฮวยที่แหล่งเพาะปลูกแตกต่างกันในประเทศไทย พร้อมทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระและประสิทธิภาพการยับยั้งมะเร็งช่องปากเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการวิจัยหาสารต้านมะเร็งที่มีประสิทธิภาพจากสารธรรมชาติ ซึ่งอาจจะเป็นข้อมูลวิจัยเพื่อพัฒนาต่อยอดได้อีกในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. วัตถุประสงค์

ข้อมูลทั่วไปผลิตภัณฑ์ดอกเก๊กฮวยในประเทศไทยในแต่ละจังหวัด โดยดอกเก๊กฮวย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Chrysanthemum indicum* L. จัดเป็นพืชในวงศ์ Asteraceae สุ่มตัวอย่างจาก

(1) โครงการหลวง ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ (2) ดอยแม่สลอง ต.แม่สลองนอก อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย (3) ไร่บักโจ้ย

อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี (4) ต.พระประโทน อ.เมือง จ.นครปฐม และ (5) ต.สำโรงเหนือ อ.เมือง จ.สมุทรปราการ (แสดงดังภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ข้อมูลทั่วไปผลิตภัณฑ์ดอกเก๊กฮวย จากแต่ละแหล่งในประเทศไทย

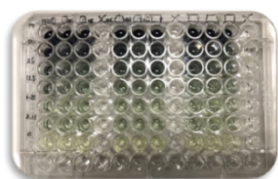
โดยดอกเก๊กฮวยที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ตัวอย่างละ 10 g โดยผลิตภัณฑ์จะถูกผลิตในช่วงฤดูร้อน ระยะเวลาไม่เกิน 3 เดือนนับจากวันที่เริ่มทดลอง (กุมภาพันธ์ 2564 - เมษายน 2564) โดยเก็บตัวอย่างพืชอ้างอิงงานวิจัย (voucher specimen) ไว้

การสกัดดอกเก๊กฮวยด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

เตรียมสารสกัดหยาบ (crude extract) โดยนำดอกเก๊กฮวย สำเร็จรูป 10 g ใส่ลงในขวดแก้ว สกัดด้วยตัวทำละลาย $\geq 99.9\%$ ethanol, 40% ethanol และน้ำ (DI water) ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ สกัดสารด้วยเทคนิคอัลตราโซนิก โดยตั้งไว้บนอ่างควบคุมอุณหภูมิ ความถี่สูง (ultrasonic bath) ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที¹¹ หลังจากนั้น ใช้สาลีกรองกากดอกเก๊กฮวยออกแล้วนำไประเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) เสร็จแล้วชั่งน้ำหนักสารสกัด โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก

ผสมสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ และสารมาตรฐาน gallic acid 20 μL , Folin-Ciocalteu reagent ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 μL และ 7.5% w/v sodium bicarbonate 80 μL ทั้งไว้ 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว (แสดงดังภาพที่ 2) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) ที่ 765 nm ปริมาณของฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds) คำนวณเป็นปริมาณ (mg) ของ Gallic Acid Equivalents (GAE) ต่อ 1 กรัมของสารสกัด (mg GAE/g) โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง



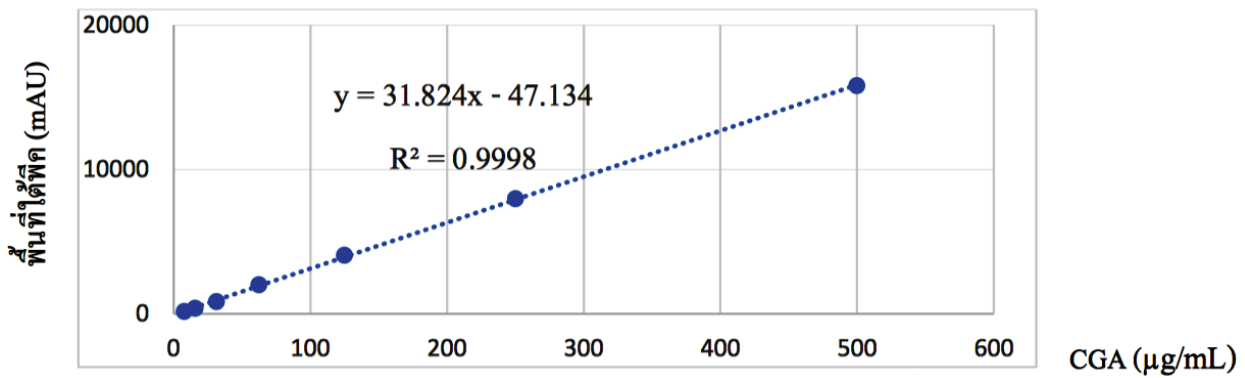
ภาพที่ 2 ตัวอย่างการเตรียมสารสกัดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก

3. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์

ผสมสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/mL}$ และสารมาตรฐาน quercetin 100 μL , 2% aluminium chloride (AlCl_3) 100 μL จากนั้นทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าเป็นครั้งคราว วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ 415 nm ปริมาณของฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid compounds) คำนวณเป็นปริมาณ (mg) ของ Quercetin Equivalents (mg QE) ต่อ 1 กรัมของสารสกัด (mg QE/g) โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง

4. การวิเคราะห์ปริมาณ chlorogenic acid (CGA) ในแต่ละแหล่งปลูกด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

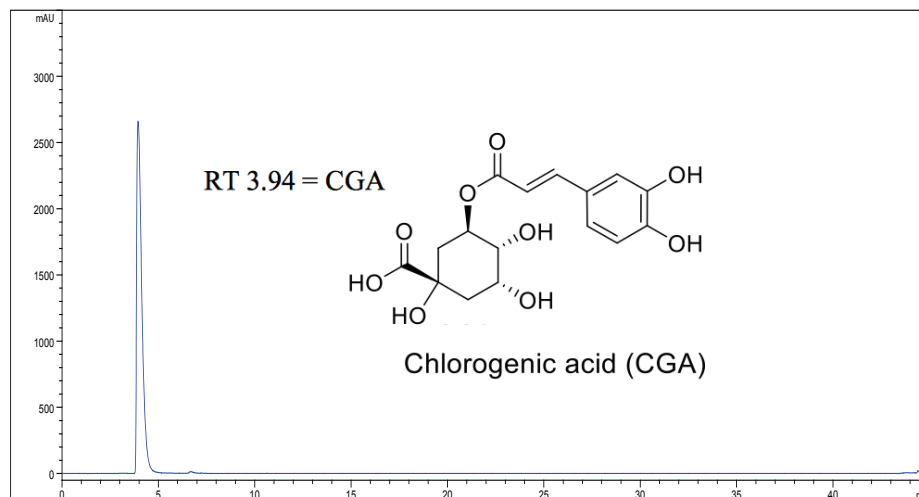
ชั่งสารสกัดดอกเก๊กฮวยปริมาณ 400 mg ของแต่ละสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 50% methanol HPLC grade 10 mL และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC (Agilent รุ่น 1260) ส่วนแรก 5 mL ทำการดูดสารบริเวณที่ค้ำกับขวดแก้วจากนั้นใส่ส่วนที่สอง 5 mL ทำการละลายซ้ำทำการวัดปริมาณสาร CGA ด้วย HPLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน CGA ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 98.0 จาก Tokyo chemical (แสดงดังภาพที่ 3)



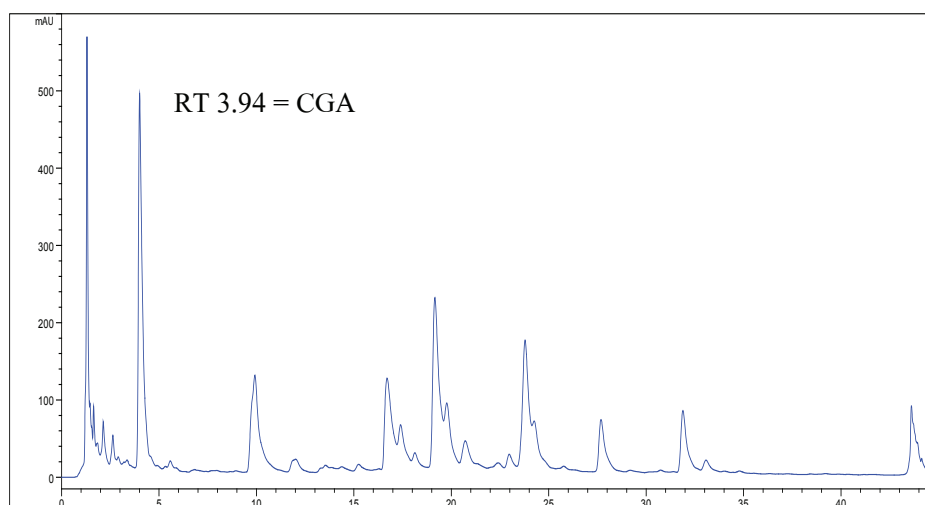
ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ CGA ที่ความเข้มข้นสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีค ของ HPLC chromatogram มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9998

คำนวณค่าสมการเพื่อหาความเข้มข้น CGA ของสารตัวอย่างเป็นการยืนยันเอกลักษณ์ของ CGA มาตรฐาน (แสดงภาพที่ 4) โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้อง

ในการวัด และนำ retention time ที่ได้มาเทียบกับ HPLC chromatogram สารตัวอย่างที่ช่วงเวลาใกล้เคียงกันเพื่อหาปริมาณ CGA (แสดงดังภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐาน CGA



ภาพที่ 5 HPLC chromatogram ของสารสกัดหยาบดอกเก็กฮวย (ใน 40% ethanol)

5. การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging assay)

ผสมสารสกัดดอกเก๊กฮวยที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL และสารมาตรฐาน quercetin 100 µL กับ DPPH reagent 100 µL จากนั้นทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ 517 nm โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง คำนวณผลการทดลองดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100$$

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (ใส่สารทดสอบทั้งหมดยกเว้น sample)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

คำนวณหาค่า IC_{50} จากกราฟของ percent scavenging และความเข้มข้น

6. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก ในหลอดทดลอง (in vitro)

ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก (human oral epidermoid carcinoma (KB) cell line) ด้วยวิธี MTT assay โดยเลือกตัวแทนสารสกัดดอกเก๊กฮวย 5 จังหวัดได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย สระบุรี นครปฐม และ สมุทรปราการ จากตัวทำละลาย 40% ethanol เพื่อหา % Cytotoxicity ที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL และหา IC_{50} ของ chlorogenic acid ที่ความเข้มข้นสูงสุด 2500 µg/mL และ IC_{50} ของ doxorubicin ที่ความเข้มข้นสูงสุด 250 µg/mL เพื่อเป็นกลุ่มควบคุมผลบวก (positive control)

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิด Human oral epidermoid carcinoma (KB) cell line รหัส ATCC CCL-17 การเลี้ยงเซลล์ในภาชนะที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) เติม 5% Fetal Bovine Serum (FBS) บ่มเซลล์ในตู้บ่ม อุณหภูมิ 37 °C, 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง

7. สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ เอสพีเอสเอสรุ่นที่ 22.0 (SPSS version 22.0) นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติ one-way ANOVA ร่วมกับ post-hoc analysis ที่ระดับทางสถิติน้อยกว่า .05 (p-value < .05)

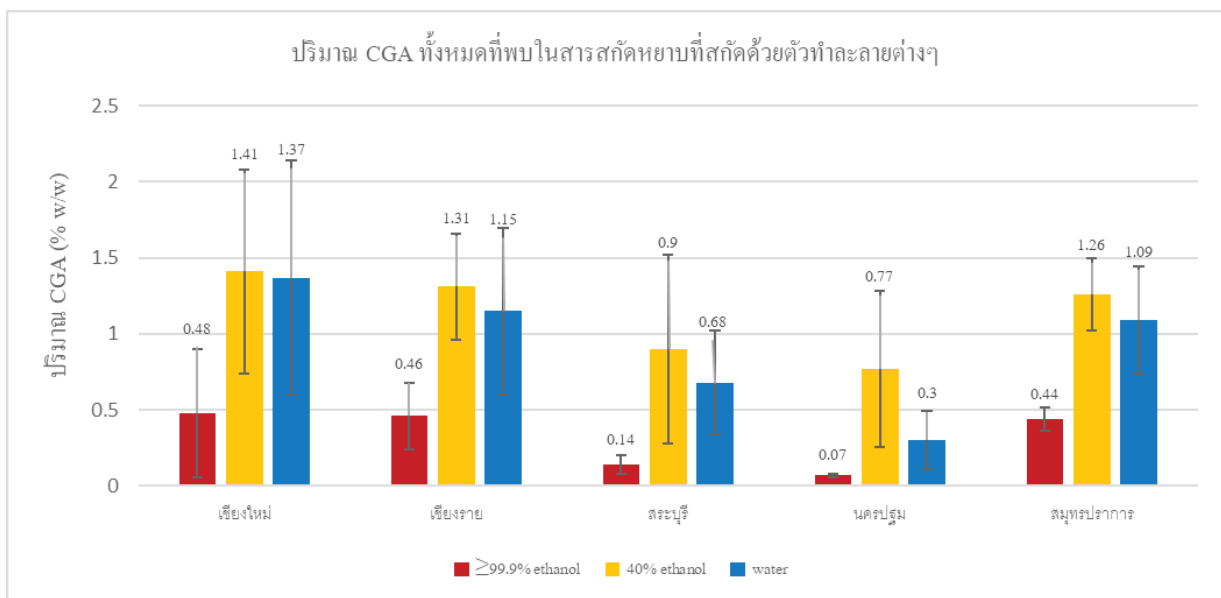
ผล

การศึกษาสารสกัดดอกเก๊กฮวยทั้ง 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย สระบุรี นครปฐม และสมุทรปราการ โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ ≥99.9% ethanol, 40% ethanol และน้ำ พบว่าปริมาณสารสำคัญ chlorogenic acid (CGA) แต่ละแหล่งในประเทศไทยนั้นพบว่า มีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป โดยตัวทำละลาย ≥99.9% ethanol จังหวัดที่มีปริมาณสาร CGA มากที่สุด คือ เชียงใหม่ (0.48 %w/w) รองลงมาจังหวัดเชียงราย (0.46 %w/w), จังหวัดสมุทรปราการ (0.44 %w/w), จังหวัดสระบุรี (0.14 %w/w) และจังหวัดที่มีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุด คือ นครปฐม (0.07 %w/w)

ตัวทำละลาย 40% ethanol จังหวัดที่มีปริมาณสาร CGA มากที่สุด คือ เชียงใหม่ (1.41 %w/w) รองลงมาจังหวัดเชียงราย (1.31 %w/w), จังหวัดสระบุรี (0.9 %w/w), จังหวัดสมุทรปราการ (0.77 %w/w) และจังหวัดที่มีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุด คือ นครปฐม (0.3 %w/w)

ตัวทำละลายน้ำ จังหวัดที่มีปริมาณสาร CGA มากที่สุด คือ เชียงใหม่ (1.37 %w/w) รองลงมาจังหวัดเชียงราย (1.15 %w/w), จังหวัดสมุทรปราการ (1.09 %w/w), จังหวัดสระบุรี (0.68 %w/w) และจังหวัดที่มีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุด คือ นครปฐม (0.14 %w/w)

เมื่อทำการจับคู่เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตัวอย่างแต่ละจังหวัด โดยใช้สถิติ one-way ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ .05 (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 กราฟแสดงปริมาณ CGA ทั้งหมดที่พบในสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ

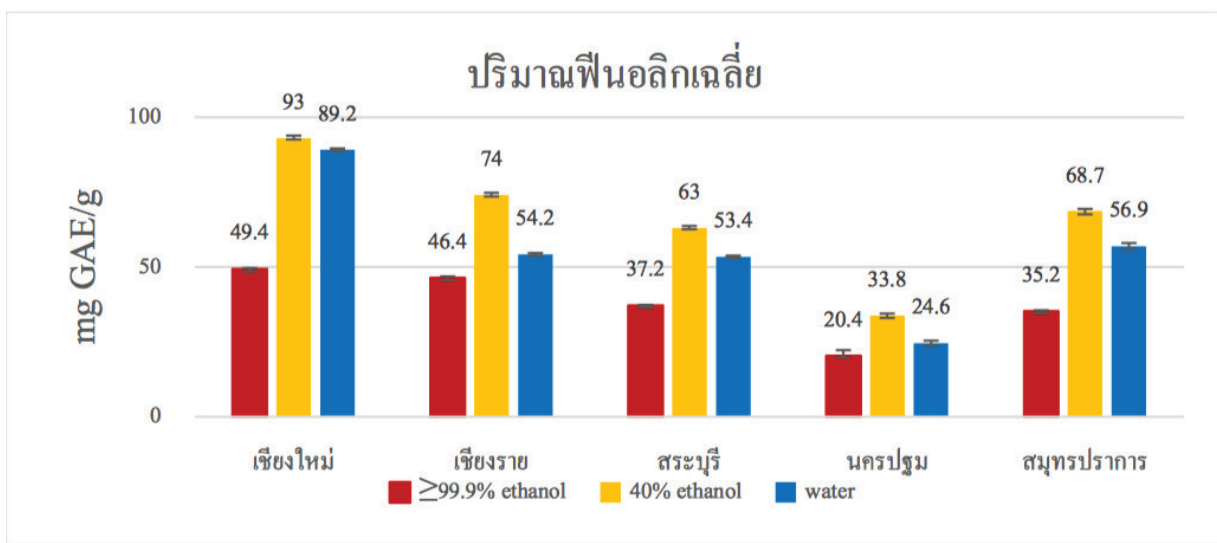
การศึกษาสารสกัดดอกเก๊กฮวยทั้ง 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย สระบุรี นครปฐม และสมุทรปราการ โดยใช้ ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ $\geq 99.9\%$ ethanol, 40% ethanol และน้ำ พบว่า ปริมาณฟีนอลิก (total phenolics) แต่ละแหล่ง ในประเทศไทยนั้น พบว่า มีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป ดังนี้

ตัวทำละลาย $\geq 99.9\%$ ethanol จังหวัดที่มีปริมาณ ฟีนอลิกมากที่สุด คือ เชียงใหม่ (49.4 mg GAE/g) รองลงมาจังหวัด เชียงราย (46.4 mg GAE/g), จังหวัดสระบุรี (37.2 mg GAE/g), จังหวัดสมุทรปราการ (35.2 mg GAE/g) และจังหวัดที่มีปริมาณ ฟีนอลิกน้อยที่สุด คือ นครปฐม (20.4 mg GAE/g)

ตัวทำละลายน้ำ จังหวัดที่มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด คือ เชียงใหม่ (89.2 mg GAE/g) รองลงมาจังหวัดสมุทรปราการ (56.9 mg GAE/g), จังหวัดเชียงใหม่ (54.2 mg GAE/g), จังหวัดสระบุรี (53.4 mg GAE/g) และจังหวัดที่มีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุด คือ นครปฐม (24.5 mg GAE/g)

ตัวทำละลาย 40% ethanol จังหวัดที่มีปริมาณฟีนอลิกมากที่สุด คือ เชียงใหม่ มีค่าเท่ากับ (93 mg GAE/g) รองลงมาจังหวัด เชียงราย (74 mg GAE/g), จังหวัดสระบุรี (63 mg GAE/g) และ จังหวัดที่มีปริมาณฟีนอลิกน้อยที่สุด คือ นครปฐม (33.8 mg GAE/g)

เมื่อทำการจับคู่เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตัวอย่างแต่ละจังหวัด โดยใช้สถิติ one-way ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ .05 (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 กราฟแสดงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

การศึกษาสารสกัดดอกเก๊กฮวยทั้ง 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย สระบุรี นครปฐม และสมุทรปราการ โดยใช้ ตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ > 99 ethanol, 40% ethanol และ น้ำ พบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids) แต่ละ แหล่งในประเทศไทยนั้นพบว่ามีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป โดย

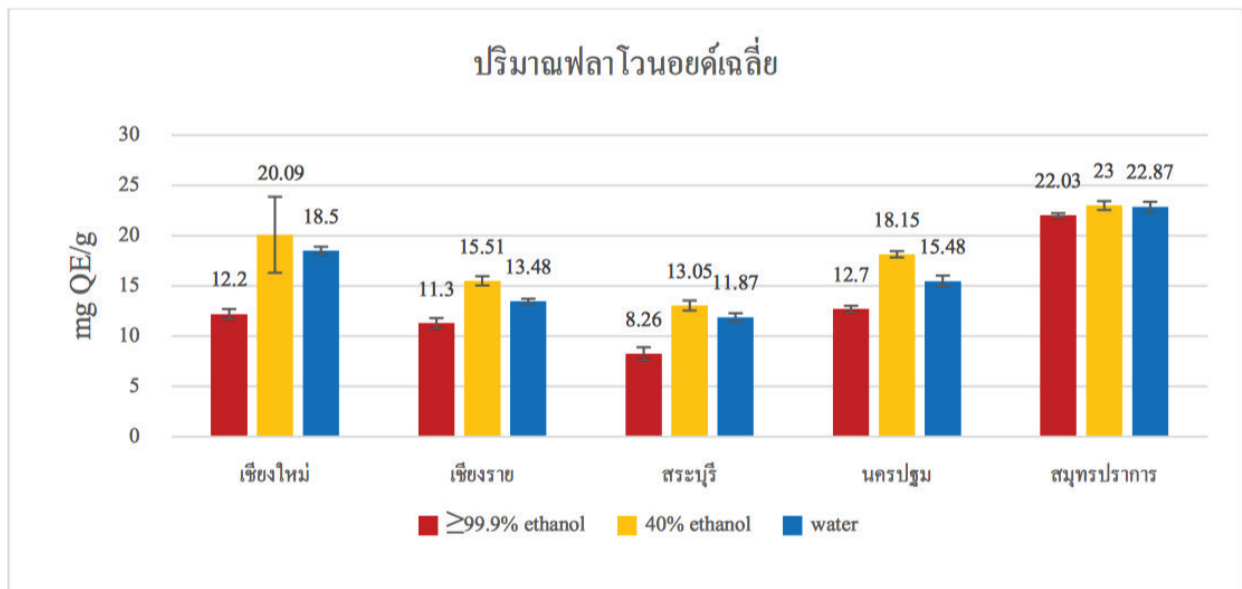
ตัวทำละลาย $\geq 99.9\%$ ethanol จังหวัดที่มีปริมาณ ฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ สมุทรปราการ (22.03 mg QE/g) รองลงมาจังหวัดนครปฐม (12.7 mg QE/g), จังหวัดเชียงใหม่ (12.2 mg QE/g), จังหวัดเชียงราย (11.3 mg QE/g) และจังหวัดที่มีปริมาณ ฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด คือ สระบุรี (8.26 mg QE/g)

ตัวทำละลายน้ำ จังหวัดที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด คือ สมุทรปราการ (22.03 mg QE/g) รองลงมาจังหวัดเชียงใหม่

(18.5 mg QE/g), จังหวัดนครปฐม (15.48 mg QE/g), จังหวัด เชียงราย (13.48 mg QE/g) และจังหวัดที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์ น้อยที่สุด คือ สระบุรี (13.05 mg QE/g)

ตัวทำละลาย 40% ethanol จังหวัดที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์ มากที่สุด คือ สมุทรปราการ (23 mg QE/g) รองลงมาจังหวัด เชียงใหม่ (20.09 mg QE/g), จังหวัดนครปฐม (18.15 mg QE/g), จังหวัดเชียงราย (15.5 mg QE/g) และจังหวัดที่มีปริมาณ ฟลาโวนอยด์น้อยที่สุด คือ สระบุรี (13.05 mg QE/g)

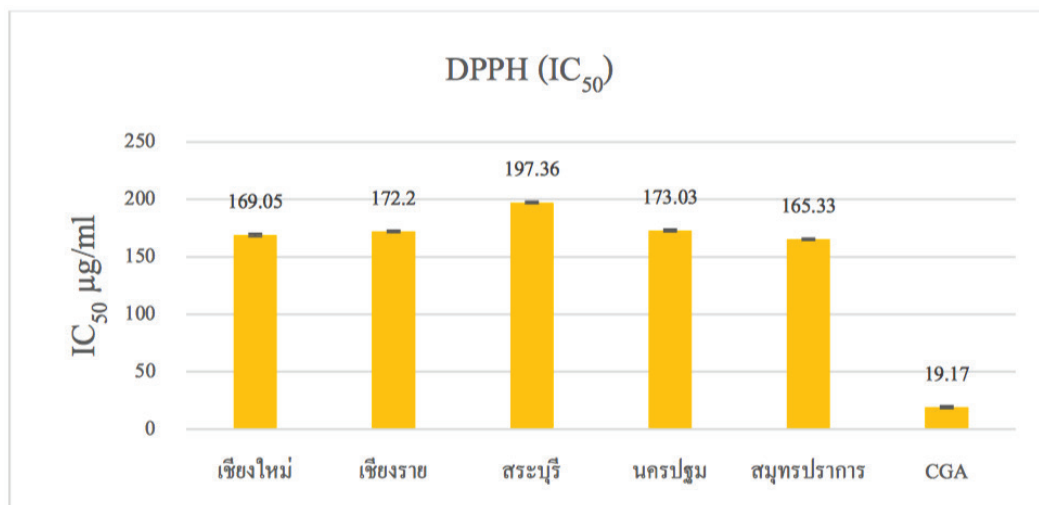
เมื่อทำการจับคู่เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตัวอย่างแต่ละจังหวัด โดยใช้สถิติ one-way ANOVA พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับ .05 (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 กราฟแสดงปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ที่พบในสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

การศึกษาการเปรียบเทียบสารสกัดดอกเก๊กฮวยในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าจังหวัดสมุทรปราการสามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด (ค่า IC_{50} ต่ำสุด; $IC_{50} = 165.33 \mu g/mL$) เมื่อใช้ตัวทำละลาย 40% ethanol รองลงมาคือ

ดอกเก๊กฮวยจากจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย นครปฐม และสระบุรี ตามลำดับ เทียบกับสารสำคัญ CGA ($IC_{50} = 19.17 \mu g/mL$) ที่สามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH (แสดงดังภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 กราฟแสดงค่ายับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH; IC_{50} ($\mu g/mL$) ที่พบในสารสกัดหยาบ 40% ethanol

โดยใช้สถิติ One-Way ANOVA ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ .05

การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดดอกเก๊กฮวยในตัวทำละลาย 40% ethanol จากแหล่งผลิตจังหวัดสมุทรปราการที่ความเข้มข้น $1000 \mu g/mL$ ทำให้เซลล์ human oral epidermoid carcinoma

(KB) cell line ตายได้มากกว่าจังหวัดอื่น แต่ไม่สามารถตายได้มากกว่าร้อยละ 50 จึงถือว่าสารสกัดดอกเก๊กฮวยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปาก เทียบกับสารสำคัญ CGA ($IC_{50} = 2300.00 \mu g/mL$) ซึ่งมากกว่า $500 \mu g/mL$ จึงไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากเช่นกัน (ดังแสดงในตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยเลือกตัวแทนสารสกัดดอกเก๊กฮวย 5 จังหวัดจากตัวทำละลาย 40% ethanol ที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL สารสำคัญ CGA ที่ความเข้มข้น สูงสุด 2500 µg/mL และ doxorubicin ที่ความเข้มข้น สูงสุด 250 µg/mL (positive control)

สารสกัด	% Cytotoxicity ความเข้มข้น 1000 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)
เชียงใหม่	0.77 ± 0.08	
เชียงราย	3.38 ± 0.46	
สระบุรี	-10.01 ± 0.24	
นครปฐม	-3.72 ± 0.23	
สมุทรปราการ	6.14 ± 0.75	
chlorogenic acid (CGA)		2300.00 ± 0.37
Doxorubicin		18.65 ± 0.75
IC ₅₀ > 500 µg/ml (no cytotoxic activity) ¹²		

วิจารณ์

การศึกษาปริมาณสารสำคัญ chlorogenic acid (CGA) ฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolics) และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids) ในสารสกัดหยาบดอกเก๊กฮวยในแต่ละจังหวัดด้วยตัวทำละลาย ≥99.9% ethanol, 40% ethanol และน้ำ จากการทดลองพบว่าดอกเก๊กฮวยที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 40% ethanol จะให้ปริมาณสารสำคัญทั้งสามชนิดข้างต้นมากที่สุด โดยมีปริมาณแตกต่างกัน สารสกัดดอกเก๊กฮวยจังหวัดเชียงใหม่ มีปริมาณสารสำคัญ CGA และ ฟีนอลิกสูงสุด (1.41%w/w และ 93 mg GAE/g ตามลำดับ) ในขณะที่สารสกัดดอกเก๊กฮวยจังหวัดสมุทรปราการ มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด (23 mg QE/g) แสดงให้เห็นว่าความต่างของแต่ละพื้นที่เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อปริมาณสารสำคัญ รวมถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าดอกเก๊กฮวยจังหวัดสมุทรปราการ (IC₅₀ 165.33 µg/mL) ให้ผลดีที่สุดเนื่องจากมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด จากผลดังกล่าวนี้จะอนุมานได้ว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์น่าจะมีผลต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ในหลอดทดลองได้ดีกว่าสารในกลุ่มฟีนอลิก โดยสารฟลาโวนอยด์ที่พบในดอกเก๊กฮวย ได้แก่ สาร quercitrin, myricetin, apigenin, และ luteolin โดย Liang-Yu Wu, 2010 ได้ทำการศึกษาสารฟลาโวนอยด์ในดอกเก๊กฮวยทั้งหมด พบปริมาณสาร quercitrin สูงสุด¹⁰ ซึ่งเป็นสารประกอบอนุพันธ์ของสาร quercetin อย่างไรก็ตามดอกเก๊กฮวยมีสารสำคัญ CGA¹³ ซึ่งเป็นเอสเทอร์ระหว่าง quinic acid และ caffeic acid ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก มีคุณสมบัติยับยั้งสารอนุมูลอิสระต่าง ๆ เช่น ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระโดยตรง กระตุ้นการส่งสัญญาณต้านอนุมูลอิสระ โดยควบคุมระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องและเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และควบคุมการทำงานของระบบ endogenous oxidase และ

โปรตีนที่เกี่ยวข้องโดยตรง ทั้งนี้ความสามารถต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน อาจขึ้นกับ โครงสร้างหรือลักษณะเฉพาะทางเคมีของกลุ่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ได้แก่ จำนวนวงแหวนอะโรมาติก โครงสร้างหมู่ไฮดรอกซิล เป็นต้น

ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากของสารสกัดหยาบที่ได้จากดอกเก๊กฮวยแสดงค่าความเป็นพิษที่ค่อนข้างน้อยซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพที่น้อยกว่า แต่การทดสอบที่ได้นี้เป็นการทดสอบจากสารสกัดหยาบเท่านั้น อาจมีการศึกษาต่อโดยการแยกสารสำคัญบริสุทธิ์เดี่ยว เพื่อทดสอบสารออกฤทธิ์ที่ดีหรืออาจมีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบ หรือพัฒนาโดยการปรับปรุงโครงสร้างของสารสำคัญเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากที่เพิ่มขึ้น มีรายงานการศึกษาอื่น ๆ ได้รายงานค่า IC₅₀ ของสารสำคัญ CGA ต่อความเป็นพิษมะเร็งช่องปากที่ 1800 µg/ml¹⁴ ในขณะที่การทดลองนี้พบค่า IC₅₀ ของสารสำคัญ CGA ที่ 2300 µg/ml ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องใกล้เคียงกัน

ในปัจจุบัน การศึกษาหาสารชนิดใหม่จากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพ ลดภาระค่าใช้จ่าย และมีผลข้างเคียงน้อยยังคงมีความจำเป็น ซึ่งสารสำคัญ CGA หรือสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์อื่น ๆ อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรค สามารถเป็นข้อมูลในการพัฒนาสารชนิดนี้เพื่อเป็นอีกตัวช่วยในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็งช่องปาก ในการศึกษาครั้งต่อไป อาจต้องมีการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ในการเก็บดอกเก๊กฮวยต่าง ๆ ทั้งสภาพอากาศ สภาพแวดล้อม ความชื้น การเก็บตัวอย่าง และการเลือกตัวทำละลายวิธีการสกัด และระยะเวลาในการสกัดอาจมีผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของสารสกัด ไม่ว่าจะเป็นสารสำคัญ CGA หรือสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ความแปรผันเหล่านี้มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งการยับยั้งสารอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อ

เซลล์มะเร็งช่องปาก ซึ่งยังคงเป็นประเด็นของการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปพัฒนาต่อไปในอนาคต และสามารถต่อยอด โดยศึกษาในสัตว์ทดลอง และในผู้ป่วย เพื่อเป็นประโยชน์ได้ต่อไป ในการเพิ่มประสิทธิภาพแนวทางการรักษาโรคมะเร็งช่องปากต่อไป

สรุป

การศึกษาสารสำคัญ chlorogenic acid (CGA) ฟีนอลิก ทั้งหมด (total phenolics) และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids) ของสารสกัดหยาบดอกเก๊กฮวยด้วยตัวทำละลาย 40% ethanol จะให้ปริมาณสารสำคัญมากที่สุด รองลงมาคือ ตัวทำละลายน้ำ ดอกเก๊กฮวยจากจังหวัดสมุทรปราการ และเชียงใหม่

References

1. Ren ZH, Hu CY, He HR, Li YJ, Lyu J. Global and regional burdens of oral cancer from 1990 to 2017: Results from the global burden of disease study. *Cancer Commun (Lond)* 2020;40(2-3):81-92.
2. Gupta N, Gupta R, Acharya AK, Patthi B, Goud V, Reddy S, et al. Changing Trends in oral cancer - a global scenario. *Nepal J Epidemiol* 2016;6(4):613-9.
3. Arunpraphan S. The trends of oral cavity and pharyngeal cancer incidence in Thailand, 2004-2015. *Th Dent PH J* 2019;24:55-67.
4. Ram H, Sarkar J, Kumar H, Konwar R, Bhatt ML, Mohammad S. Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis. *J Maxillofac Oral Surg* 2011;10(2):132-7.
5. Pouloupoulos A, Papadopoulos P, Andreadis D. Chemotherapy: oral side effects and dental interventions -a review of the literature. *Stomatological Disease and Science* 2017;1:35-49.
6. Hayakawa S, Ohishi T, Miyoshi N, Oishi Y, Nakamura Y, Isemura M. Anti-cancer effects of green tea epigallocatechin-3-gallate and coffee chlorogenic acid. *Molecules* 2020; 25(19):4553.
7. Chiang HM, Chen CW, Chen CC, Wang HW, Jhang JH, Huang YH, et al. Chapter 58. Role of coffea arabica extract and related compounds in preventing photoaging and photodamage of the skin. In: Preedy VR, editor. *Coffee in health and disease prevention*. San Diego: Academic Press; 2015. p. 523-30.
8. Bhardwaj R. Cytotoxic role of chlorogenic acid on oral squamous cell carcinoma cell line. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery* 2021;74(2).

พบสารสำคัญทั้งสามชนิดข้างต้นพร้อมทั้งแสดงว่ายับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH ในหลอดทดลองที่ใกล้เคียงกัน แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งช่องปากที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL ซึ่งยังคงเป็นประเด็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในครั้งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันต้นตอกรรม รวมถึงบุคลากรทุกท่านจาก ศูนย์วิจัยค้นคว้าและพัฒนาฯ สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ชั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) และคุณณัฐพร มานะประดิษฐ์ ที่ช่วยสนับสนุนทำให้งานวิจัยสามารถลุล่วงไปได้ อย่างดี

9. Zhan Y, Li R, Feng C, Li X, Huang S, Wang L, et al. Chlorogenic acid inhibits esophageal squamous cell carcinoma growth in vitro and in vivo by downregulating the expression of BMI1 and SOX2. *Biomed Pharmacother* 2020;121:109602.
10. Sun QL, Hua Sy, Ye JH, Zheng X, Liang Y. Flavonoids and volatiles in Chrysanthemum morifolium Ramat flower from Tongxiang County in China. *African Journal of Biotechnology* 2010;9(25):3817-21.
11. Kulrath P, Duangdee N, Supornpun N, Prateetongkum E. Comparison of Fluoride and Catechin levels in green tea extract at various geographical locations in Thailand. *j dept med ser* 2019;44(2):114-20.
12. Damasuri AR, Sholikhah EN, Mustofa. Cytotoxicity of ((E)-1-(4-aminophenyl)-3-phenylprop-2-en-1-one)) on HeLa cell line. *Indonesian Journal of Pharmacology and Therapy* 2020; 1(2):54-9.
13. Wang L, Pan X, Jiang L, Chu Y, Gao S, Jiang X, et al. The biological activity mechanism of Chlorogenic acid and its applications in food industry: A Review. *Front Nutr* 2022; 9:943911.
14. Sharma G, Kamboj M, Narwal A, Bhardwaj R, Yadav P. Cytotoxic role of Chlorogenic acid on oral squamous cell Carcinoma cell line. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2022;74(Suppl 3): 5773-81.