

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา

Antioxidant properties and the inhibition of cholangiocarcinoma cell
proliferation from leaf extracts of *Michelia alba* and *Michelia champaca*

ศรมน สุทิน^{1*} พัชรี ภาคขมา¹ กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ¹ ปานทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ²
และ นพวัฒน์ เพ็งคำศรี³

¹ สาขาวิทยาศาสตร์กายภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเขี้ยวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

² กลุ่มวิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเขี้ยวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

³ กลุ่มวิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเขี้ยวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

Soramon Sutin^{1*}, Patcharee Pakakatsama¹, Kittipat Sopitthummakhun¹,
Panthip Rattanasinganchan² and Noppawat Pengkumsri³

¹ Division of Physical Science, Faculty of Science and Technology, Huachiew Chalermprakiet University,
Samutprakarn 10540

² Division of Clinical Chemistry, Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University,
Samutprakarn 10540

³ Division of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Huachiew Chalermprakiet University,
Samutprakarn 10540

Received: 17 April 2019/ Revised: 7 June 2019/ Accepted: 21 June 2019

บทคัดย่อ

กลุ่มผู้วิจัยได้ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปี (*Michelia alba*) และจำปา (*Michelia champaca*) ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตัวอย่างในการวิเคราะห์คือ ใบจากต้นจำปีและจำปาที่เก็บได้จากช่วงเดือนมกราคม เมษายน และมิถุนายน ในปี พ.ศ. 2559 โดยนำมาทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดหยาบในเมทานอลจากใบต้นจำปีและจำปาที่เก็บใบทั้ง 3 ช่วงเวลา มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาในเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท เมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT พบว่า สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปาที่เก็บในเดือนมกราคมและมิถุนายนมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.018 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.048 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้พบว่าสารสกัดหยาบในเอทิลอะซิเตทของใบต้นจำปาที่เก็บในเดือนมกราคมมีฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ซึ่งวัดได้ด้วยวิธีทดสอบ MTT มีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 13.51 ± 1.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจากใบต้นจำปีและจำปาที่ความเข้มข้นในช่วงเดียวกับที่ใช้ทดสอบเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์



น้ำดีปกติชนิด MMNK-1 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจำปีและจำปามีความสามารถต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง การศึกษานี้มีประโยชน์ในการเป็นทางเลือกในการพัฒนายาต้านมะเร็งในอนาคต อย่างไรก็ตามกลไกในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดียังคงต้องศึกษาต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 การต้านอนุมูลอิสระ บิวทิลเลต ไฮดรอกซีโทลูอีน จำปี จำปา

Abstract

Our research group studied the properties of crude extracts from *Michelia alba* and *Michelia champaca* leaves using the extraction method in the organic solvent i.e. hexane, ethyl acetate and methanol. The subjects of analysis were the collection of *M. alba* and *M. champaca* leaves from different time in January, April and June in 2016 which compared the antioxidant properties via DPPH scavenging assay. The results shown that the extraction of *M. alba* and *M. champaca* in methanol from all three periods composed of antioxidant properties more than the extraction *M. alba* and *M. champaca* in hexane and ethyl acetate. Additionally, the comparing of antioxidant properties with BHT, standard antioxidant agent, were found that the extraction of *M. champaca* in methanol from January and June can determine the IC_{50} to be 0.018 ± 0.001 mg/mL. These results suggested the better antioxidant values than the standard antioxidant BHT which can determine the IC_{50} to be 0.048 ± 0.002 mg/mL. Moreover, the extraction of *M. champaca* in ethyl acetate in January inhibited cell proliferation of Cholangiocarcinoma RMCCA-1 with IC_{50} of 13.51 ± 1.12 μ g/mL using the MTT assay method for detection. The range in the concentration of *M. alba* and *M. champaca* leaves extracts were applied to determine the effect against the cell proliferation in Cholangiocyte MMNK-1. The results shown that there is not significant affect the cell proliferation in MMNK-1. Together, results of this study show that crude extract of *M. alba* and *M. champaca* have antioxidant properties and anti-cancer cell proliferation. This study may be useful for the development of some alternative anti-cancer drug in the future. However, mechanism of inhibition of cholangiocarcinoma cell proliferation may be further elucidate.

Keywords: Cholangiocarcinoma RMCCA-1, antioxidant, Butylated hydroxytoluene (BHT), *Michelia alba*, *Michelia champaca*

บทนำ

จำปี (*Michelia alba*) และจำปา (*Michelia champaca*) เป็นไม้ยืนต้นอยู่ในวงศ์ Magnoliaceae จำปีเป็นไม้ต้นสูงถึง 20 เมตร ใบเดี่ยว ออกเวียนสลับ รูปใบหอกแกมขอบขนาน ดอกมีกลีบยาวสีขาวนวล กลีบอ่อนมีกลิ่นหอม ออกเดี่ยว ตามซอกใบ ดอกตูมรูปกระสวย มีถิ่น

กำเนิดทางจีนตอนใต้และมาเลเซีย ใบต้มกับน้ำระงับไอและแก้หลอดลมอักเสบ ส่วนจำปาเป็นไม้ต้น สูงกว่าจำปี ยอดอ่อน ใบอ่อนมีขน ใบแก่เกลี้ยง ใบเดี่ยวออกเรียงสลับ รูปรี รูปไข่ ปลายแหลม โคนกลมมน ดอกสีเหลืองอมส้ม ออกเดี่ยวตามซอกใบ กลีบดอกรูปใบหอกค่อนข้างยาว กลิ่นหอมแรง จำปาเป็นไม้ที่มีประโยชน์ทางด้านสมุนไพร เช่น

เปลือก แก้วไข ใบแก้วโรคประสาท ดอกเป็นยาบำรุงหัวใจ ประสาท และโลหิต มีถิ่นกำเนิดอินเดีย [1] จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าจำปีและจำปาเป็นสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคต่างๆ ซึ่งมีสาเหตุมาจากสารอนุมูลอิสระ เช่น การต้านต่อการกลายพันธุ์ที่เกิดจากแสงอาทิตย์ การต้านแบคทีเรีย ดังเช่น ขนเผ่าคาโร อยู่ทางตอนเหนือของเกาะสุมาตรา ประเทศอินโดนีเซีย มีพิธีกรรมดั้งเดิมในการใช้ดอกจำปีเป็นส่วนประกอบของสมุนไพรใช้ในการอบขาวนาและอาบน้ำหลังคลอด เพื่อการผ่อนคลาย [2] ในการศึกษาสารสกัดจากใบจำปีพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) ที่ย่อยสลายคอลลาเจนที่ทำให้เกิดความแก่ของผิวหนังจากแสง UVB [3] สารสกัดจากดอกและใบจำปาในชั้นของเอทานอลสามารถลดการเกิดแผลที่กระเพาะอาหารที่เกิดจากยาแอสไพรินในหนู [4] และพบว่า β -sitosterol เป็นสารสำคัญในใบและเปลือกของจำปามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบด้วยเทคนิค HPTLC พบ β -sitosterol ในใบเป็นปริมาณมาก [5] จากการศึกษาสารสกัดจากดอกจำปาในชั้นของเอทิลอะซิเตท และเฮกเซน พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* และ *Shigella dysenteriae* ในชั้นเอทิลอะซิเตทดีที่สุด [6] นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเปลือกต้นจำปาในชั้นของเมทานอลยังมีฤทธิ์ป้องกันและรักษาโรคมะเร็งผิวหนังที่เกิดจากแสง UV [7] สารสกัดจากกิ่งต้นจำปามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยง (cell line) เช่น เซลล์มะเร็งเต้านม (breast cancer) เซลล์มะเร็งปอด (lung cancer) และเซลล์มะเร็งผิวหนัง (human melanoma) [8, 9] สารสกัดจากดอกจำปายังพบว่ามีผลยับยั้งต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของกลุ่มเซลล์ที่พัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) และมะเร็งเต้านม (breast cancer) [10] แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาสารสกัดจากใบจำปีจำปาในเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นที่อวัยวะที่เรียลเซลล์บริเวณท่อน้ำดีทั้งภายนอกและภายในตับ โดยพบว่า

อุบัติการณ์ของโรคมะเร็งท่อน้ำดีพบมากที่สุดในประเทศไทย ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สาเหตุการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดีแต่มีความสัมพันธ์กับการอักเสบเรื้อรังและยังพบว่ามี ความสัมพันธ์ในการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini*) [11, 12] มะเร็งท่อน้ำดีเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของคนไทย เนื่องจากการตรวจพบได้น้อยในระยะแรกและการรักษาที่มีประสิทธิภาพของโรคในปัจจุบันยังคงต้องใช้วิธีการผ่าตัด แต่คนไข้ที่สามารถผ่าตัดได้มีจำนวนน้อยเนื่องจากตำแหน่งของอวัยวะที่เป็นโรคมะเร็งทำให้ไม่สามารถผ่าตัดได้ อีกทั้งยังพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะของโรคมะเร็งที่ลุกลาม การใช้รังสีและยาเคมีบำบัดยังประสบปัญหาต่อการรักษาหรือเกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย [13] การหาสารธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีได้จึงเป็นที่มาของงานวิจัยในครั้งนี้ กลุ่มวิจัยมีความสนใจในการสกัดสารที่มีอยู่ในใบต้นจำปีและจำปาเพื่อที่จะทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงที่ได้จากชิ้นเนื้อของคนไทย [14] โดยใช้สารสกัดจากส่วนใบของต้นจำปีและจำปาที่เก็บในช่วงฤดูที่แตกต่าง กัน ตัวอย่างใบจำปี จำปาที่เก็บมาในเดือนมกราคม (อยู่ในช่วงปลายฤดูหนาว) เมษายน (เข้าสู่ฤดูร้อน) และมิถุนายน (เข้าสู่หน้าฝน) ซึ่งในแต่ละช่วงฤดูที่ต่างกันน่าจะมีผลต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากใบต้นจำปีและจำปาและงานวิจัยส่วนใหญ่ไม่ได้ระบุถึงช่วงเวลาเก็บตัวอย่างมาทำการทดลอง การสกัดด้วยการใช้ตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล โดยมีสมมติฐานว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน่าจะมีคุณสมบัติที่มีขั้ว ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay ร่วมกับวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีด้วยวิธี MTT assay เพื่อที่จะสำรวจว่าการเก็บตัวอย่างพืชในช่วงเวลาที่ต่างกันมีผลสอดคล้องกับปริมาณสารออกฤทธิ์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ทำให้ได้ข้อมูลในการเก็บพืชตัวอย่างใช้ในทางเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต



วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมวัตถุดิบ

เก็บใบต้นจำปีและจำปาจากพื้นที่ อำเภอกุยบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยสุ่มเก็บใบทั้งใบอ่อนและใบแก่ แบ่งการเก็บเป็น 3 ช่วงเวลา คือ ช่วงที่ 1 เดือนมกราคม ช่วงที่ 2 เดือนเมษายน และช่วงที่ 3 เดือนมิถุนายน ปี พ.ศ. 2559 นำใบสดของจำปีและจำปามาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ ผึ่งให้สะเด็ดน้ำแล้วนำไปหั่นเป็นชิ้นหยาบ ๆ แล้วนำไปอบที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนแห้ง บดให้ละเอียดจากนั้น จึงนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายในขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย (extraction)

นำใบจำปาที่แห้งและบดละเอียดหนัก 200 กรัม แช่ในตัวทำละลายเฮกเซน ในอัตราส่วนน้ำหนักแห้งตัวอย่าง 1 ส่วนต่อตัวทำละลาย 5 ส่วน ปิดปากภาชนะให้สนิท แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน กรองกากออกด้วยกระดาษ กรอง Whatman® เบอร์ 1 สกัดซ้ำด้วยตัวทำละลายเฮกเซน อีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้จากการกรองไประเหยเอาตัว ทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย (rotary evaporator) ทำให้แห้งด้วยเครื่องอบแห้งเยือกแข็ง (freeze dryer) จะได้สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปาในชั้นเฮกเซน หลังจากนั้นนำกากที่เหลือมาแช่ด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 แช่ทิ้งไว้ 5 วันแล้วนำไประเหย ตัวทำละลายออกและทำให้แห้งจะได้ส่วนสกัดชั้นเอทิล อะซิเตท ต่อมานำกากที่เหลือไปแช่ด้วยตัวทำละลาย เมทานอล โดยใช้อัตราส่วน ระยะเวลา ในการสกัดเหมือนกับ วิธีข้างต้นจะได้ส่วนสกัดชั้นเมทานอล

ส่วนสารตัวอย่างใบจำปีและจำปาที่เก็บมาทั้ง 3 ช่วงเวลานำมาสกัดตามวิธีข้างต้น จะได้ส่วนสกัดทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ซึ่งสารสกัดหยาบที่ได้ เพื่อคำนวณร้อยละของ น้ำหนักสารสกัดหยาบ (% yield) เก็บใส่ในขวดสีชาและ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการทดสอบ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและทดสอบฤทธิ์ในการ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี

3. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการ DPPH scavenging assay

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging assay [15] เปรียบเทียบระหว่าง สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา กับสารต้านอนุมูล อิสระมาตรฐานคือ BHT (Butylated hydroxy toluene) มีวิธีการคือ สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปี และจำปา ความเข้มข้นเท่ากับ 0.00625 - 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ความเข้มข้นของ BHT เท่ากับ 0.00625 - 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร การทดสอบจะใช้เวลาเข้มข้นของ DPPH เท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนคลื่น แสงของ DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (OD_{517}) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หลังจากตีบ่ม (incubate) สารทดสอบกับ DPPH ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำค่าที่วัดได้ไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง อนุมูลอิสระ DPPH (% inhibitory) ค่า OD_{517} ที่ได้มาจากการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) เพื่อใช้คำนวณและ รายงานเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) วิธีการคำนวณค่า เปอร์เซ็นต์ การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ในสมการที่ 1

$$\% \text{ การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH} = [(A_0 - (A_5 - B_5) / A_0) \times 100]$$

สมการที่ 1

จากสมการที่ 1 เมื่อ A_0 คือ ค่า OD_{517} ของสารละลาย DPPH; A_5 คือ ค่า OD_{517} ของสารละลาย DPPH ผสมกับ สารทดสอบ (สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปี หรือจำปา หรือสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT) B_5 คือ ค่า OD_{517} ของสาร ทดสอบ

จากนั้นค่า OD_{517} แต่ละค่าที่คำนวณได้จากสมการที่ 1 จะใช้คำนวณหาค่า inhibitory concentration at 50% (IC_{50}) ต่อกับอนุมูลอิสระ DPPH ดังสมการที่ 2 คือ

$$Y = mX + c$$

สมการที่ 2

จาก สมการที่ 2 เมื่อกำหนดให้ค่าแกน Y คือ %การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH; ค่าแกน X คือ ความเข้มข้นของสารทดสอบ (สารสกัดหยาดจากใบต้นจำปี หรือจำปา หรือสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT) มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร; ค่า m คือค่าความชันของกราฟ (slope); ค่า c คือจุดตัดบนแกน Y

ในการคำนวณค่า IC_{50} สามารถหาได้จากการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลของ % การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารทดสอบที่ค่าต่างๆ เพื่อทำการคำนวณหาความชันของกราฟ จากนั้นในสมการที่ 2 แทนค่า $Y=50$ (% การยับยั้งอนุมูลอิสระที่ 50% หรือ IC_{50}) และค่าความชันที่ได้จากการคำนวณข้างต้น ซึ่งจะสามารถคำนวณค่าความเข้มข้น (X) ของสารทดสอบที่มีค่า IC_{50} ได้

4. การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี ชนิด RMCCA-1 เซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1 ของสารสกัดหยาดจากใบ ต้นจำปีและจำปา

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยการใช้สารสกัดหยาดจากใบต้นจำปีและจำปาโดยการเปรียบเทียบกับระหว่างเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติ (cholangiocyte ชนิด MMNK-1) เลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดใน 96-well microplate

โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์ (cell density) 5×10^3 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นบ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดหยาดจากใบต้นจำปีหรือจำปา ความเข้มข้นที่ 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงบ่มต่อใน CO_2 incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปวัดการรอดชีวิตของเซลล์ (cell survive) ด้วยวิธี MTT assay [16] วิธีการคือเติมสารละลาย MTT ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 96-well microplate บ่มต่อใน CO_2 incubator เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะเกิดผลึก Formazan จากนั้นละลายผลึกด้วย DMSO แล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (OD_{540}) เปรียบเทียบกลุ่มที่เป็นตัวแปรควบคุม (solvent control) กับกลุ่มทดสอบที่ใส่สารสกัดหยาดจากใบต้นจำปีหรือจำปา คำนวณค่า % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (% inhibition of cell proliferation) ดังสมการที่ 3

$$\% \text{ การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์} = 100 - \left\{ \frac{A_{\text{Control}}}{A_{\text{Treatment}}} \times 100 \right\}$$

สมการที่ 3

จากสมการที่ 3 เมื่อ A_{Control} คือ ค่า OD_{540} ของสารละลายเซลล์ที่เป็น solvent control; $A_{\text{Treatment}}$ คือ ค่า OD_{540} ของสารละลายเซลล์ที่เติมสารสกัดหยาดจากใบต้นจำปีหรือจำปา

ค่า % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ได้จากสมการที่ 3 นำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูล % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์กับความเข้มข้นของสารสกัดหยาดจากใบต้นจำปีหรือจำปาที่ค่าต่าง ๆ ชุดข้อมูลที่ได้ นำไปหาค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ 50% (inhibitory concentration of cell proliferation at 50% หรือ IC_{50})

ด้วยการใช้สมการหาความสัมพันธ์แบบ Sigmoidal curve ด้วยโปรแกรม KaleidaGraph (Synergy Software. Copyright 1995-2004; Version 4.0) ด้วยหลักการวิเคราะห์ข้อมูลที่เรียกว่า non-linear fitting algorithm ของตัวโปรแกรม ดังสมการที่ 4



$$Y = \{C_1 + (C_1 - C_2) / \{1 + (X/C_3)^{C_4}\}\}$$

สมการที่ 4

จากสมการที่ 4 เมื่อชุดข้อมูลถูกนำไปคำนวณในสมการดังกล่าวด้วยวิธี non-linear fitting algorithm ค่า Y คือ % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ โดยการหาค่านี้จะแทนค่า $Y=50$ (IC_{50}); C_1 คือค่า % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีค่าต่ำสุดของชุดข้อมูลทั้งหมด; C_2 คือค่า % การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีค่าสูงที่สุดของชุดข้อมูลทั้งหมด; C_3 คือ ค่าประมาณ % การยับยั้งการเจริญเติบโตที่ 50% โดยโปรแกรมจะทำการคำนวณโดยยึดเอาจำนวนชุดข้อมูลที่มีทั้งหมด; C_4 คือ ค่าความชันของสมการ (slope) บริเวณชุดข้อมูลที่มีลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

5. วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% หรือการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ 50% เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองควบคุม และกลุ่มทดสอบในการทดลองนี้ วิเคราะห์ผลความต่างอย่างมีนัยสำคัญด้วยการกำหนดความต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P\text{-value} < 0.05$ ด้วย one-way ANOVA ด้วยซอฟต์แวร์ SPSS (Version 16, SPSS Inc. Chicago, IL, USA)

ผลการวิจัย

1. ปริมาณสารสกัดหยาบจากใบจำปีและใบจำปา

สารตัวอย่างจากใบจำปีและจำปาที่เก็บใบในช่วงเดือนมกราคม เดือนเมษายน และเดือนมิถุนายน ปี พ.ศ.

2559 ที่แช่ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ตามลำดับ เมื่อนำไประเหยตัวทำละลายออกแล้วทำให้แห้ง จะได้ลักษณะสารสกัดหยาบใบจำปีและจำปา ในชั้นของเฮกเซนมีสีน้ำตาล ในชั้นของเอทิลอะซิเตทและเมทานอลมีลักษณะคล้ายกันคือ มีสีดำและเหนียว และ % สารสกัดหยาบต่อน้ำหนักแห้งของสารสกัดหยาบจำปีและจำปาพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับช่วงเดือนที่เก็บใบตัวอย่าง แต่จะขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดโดยพบว่า ในตัวทำละลายเมทานอลจะสกัดสารจากใบต้นจำปีและจำปามีค่าเฉลี่ย 43.13 กรัม% และ 63.23 กรัม% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าตัวทำละลายเฮกเซนและเอทิลอะซิเตท แสดงดังตารางที่ 1



ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ กรัม% และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (IC_{50}) ของสารสกัดหยาบใบต้นจำปีและจำปา

ใบจำปี				ใบจำปา			
สาร/ ตัวทำละลาย	เดือน	สารสกัด หยาบ กรัม%	** IC_{50} มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร	สาร/ ตัวทำละลาย	เดือน	สารสกัด หยาบ กรัม%	** IC_{50} มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร
BHT			0.048 ± 0.002	BHT			0.048 ± 0.002
Hexane	มกราคม	42.62	0.300 ± 0.015	Hexane	มกราคม	63.54	0.768 ± 0.088
	เมษายน	54.5	0.379 ± 0.033		เมษายน	33.01	0.484 ± 0.039
	มิถุนายน	18.73	0.434 ± 0.014		มิถุนายน	20.36	0.346 ± 0.030
	เฉลี่ย	38.16			เฉลี่ย	38.97	
Ethyl acetate	มกราคม	3.22	0.464 ± 0.012	Ethyl acetate	มกราคม	36.75	0.131 ± 0.002
	เมษายน	20.80	0.305 ± 0.010		เมษายน	23.66	0.176 ± 0.005
	มิถุนายน	42.42	0.157 ± 0.004		มิถุนายน	21.08	0.129 ± 0.028
	เฉลี่ย	22.14			เฉลี่ย	27.16	
Methanol	มกราคม	39.89	0.079 ± 0.001	Methanol	มกราคม	41.52	0.018 ± 0.001
	เมษายน	46.36	0.054 ± 0.0004		เมษายน	51.21	0.064 ± 0.001
	มิถุนายน	43.14	0.055 ± 0.001		มิถุนายน	96.96	0.018 ± 0.001
	เฉลี่ย	43.13			เฉลี่ย	63.23	

หมายเหตุ % น้ำหนักแห้งของสารสกัดในแต่ละช่วงเดือนของสารสกัดในแต่ละตัวทำละลายอินทรีย์

*ข้อมูลที่ได้จากการทำซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD)

2. การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา

นำสารสกัดหยาบใบจำปีและจำปามาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT พบว่า สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วมากที่สุดในการทดลองนี้ คือ เมทานอล สามารถสกัดสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว คือ เฮกเซน สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาในเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.054 ± 0.0004 และ 0.018 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปา

ในเมทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 0.018 ± 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.048 ± 0.002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1)

3. การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติชนิด MMNK-1

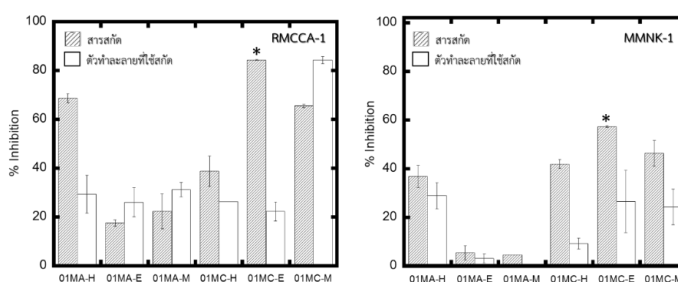
การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติ ชนิด MMNK-1 พบว่าการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาในตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิด ที่



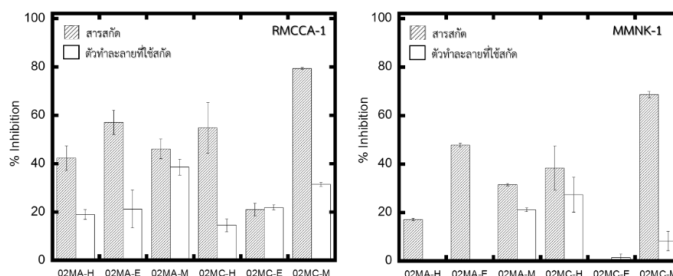
ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด (solvent control) เหนือในการพิจารณาการเลือกสารที่จะศึกษาต่อไปคือ สารสกัดหยาบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ RMCCA-1 ได้มากกว่า 80% ขึ้นไป และมีความแตกต่างในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่น้ำดีปกติ MMNK-1 อย่างมีนัยยะสำคัญ (P -value < 0.05) (ภาพที่ 1) ผลการทดลองพบว่ามีเพียงสารสกัดจากใบต้น

จำปา ที่เก็บได้จากเดือนมกราคม โดยสกัดในตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท (O1MC-E) จากนั้นนำสารสกัดหยาบขึ้นเอทิลอะซิเตท (O1MC-E) มาทดสอบหาค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ 50% (IC_{50}) ของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 มีค่าเท่ากับ 13.55 ± 0.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่น้ำดีปกติ MMNK-1 พบว่ามีค่า IC_{50} ที่มากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

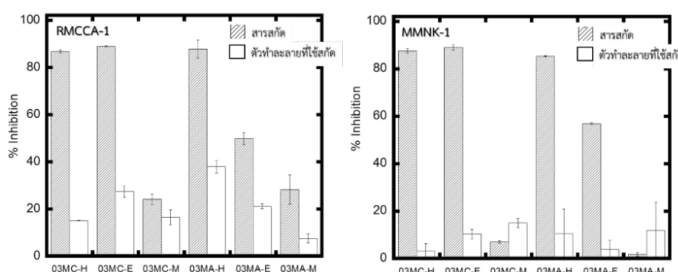
สารสกัดจากตัวอย่างที่ 1 (เดือนมกราคม)



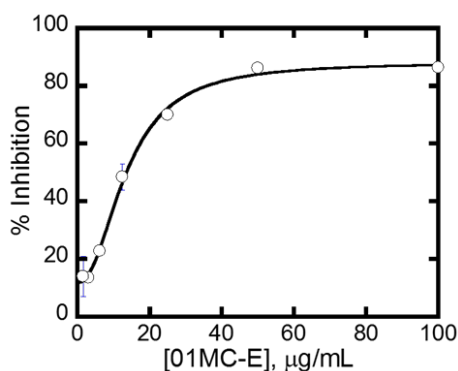
สารสกัดจากตัวอย่างที่ 2 (เดือนเมษายน)



สารสกัดจากตัวอย่างที่ 3 (เดือนมิถุนายน)



ภาพที่ 1 % การยับยั้งการเจริญเติบโตระหว่างเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 และเซลล์ท่อน้ำดีปกติ MMNK-1 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปา โดย 01-ตัวอย่างเดือนมกราคม 02-ตัวอย่างเดือนเมษายน 03-ตัวอย่างเดือนมิถุนายน สารสกัดหยาบจากจำปี (MA) และจำปา (MC) ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด H-เฮกเซน E-เอทิลอะซิเตท และ M-เมทานอล และ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดย P -value < 0.05 ด้วย one-way ANOVA ด้วยซอฟต์แวร์ SPSS (Version 16, SPSS Inc. Chicago, IL, USA)



ภาพที่ 2 ค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีที่ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 13.55 ± 0.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (triplicate) เมื่อทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ได้จากใบต้นจำปา ตัวอย่างที่ 1 เดือนมกราคมในตัวอย่างละลายเอทิลอะซิเตท (ผลการทดลองจากการทำ triplicate ($n=3$) คำนวณค่า IC_{50} ด้วยวิธี non-linear algorithm ด้วยโปรแกรม KaleidaGraph (Synergy Software. Copyright 1995-2004; Version 4.0

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

1. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปาและจำปา

จากการทดสอบสารสกัดหยาบจากใบจำปาและจำปาที่ได้เก็บใบตัวอย่างในช่วงเวลา 3 ช่วง คือ ช่วงเวลาที่ 1 เดือนมกราคม ช่วงเวลาที่ 2 เดือนเมษายน และช่วงเวลาที่ 3 เดือนมิถุนายน ในแต่ละตัวอย่างที่ใช้ในการสกัดคือ เฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเมทานอล และสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากทั้งสามช่วงเวลา คือ One-way ANOVA แบบ single factor โดยกำหนดค่าความเชื่อมั่นที่ 95% (P -value = 0.05) พบว่าสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปาและจำปาในชั้นเฮกเซน มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 50% (IC_{50}) ใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 0.300-0.768 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั้นเอทิลอะซิเตท สารสกัดหยาบใบต้นจำปามีค่า IC_{50} ในช่วง 0.157-0.464 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบใบต้นจำปามีค่า IC_{50} ในช่วง 0.129-0.176 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดหยาบใบต้นจำปามีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปา เพราะมีองค์ประกอบของสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน [17] และสารสกัดหยาบใบต้นจำปาและจำปาในชั้นเมทานอลมีค่า IC_{50} ในช่วง 0.018-0.079 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลอง

ดังกล่าวพบว่าสารสกัดหยาบ ใบต้นจำปาและจำปาจากในชั้นเมทานอลมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดรองลงมาคือ เอทิลอะซิเตทและเฮกเซน ตามลำดับ โดยเฉพาะสารสกัดหยาบใบต้นจำปาในชั้นเมทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้น 50% (IC_{50}) ดีที่สุดคือ 0.018 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน BHT มีฤทธิ์สูงกว่า 2 เท่า ซึ่งมีผลสอดคล้องกับการศึกษาหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบจำปาในเมทานอล [18] และโดยภาพรวมส่วนใหญ่ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด จะเป็นสารสกัดที่เก็บใบในช่วงเดือนมิถุนายน เมื่อพิจารณาจากค่า IC_{50} ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าจำปามีองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่แยกได้จากดอก ใบ และผล ในชั้นเฮกเซนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประกอบด้วย β -sitosterol, glucoside, parthenolide, dihydroparthenolide, micheliolide, germacranolide, constinolide, iriodenine, macheline A, urshinsunine, oxoushinsunine และ magnoflorine [19] มีรายงานพบสารฟลักซ์เคมีที่แยกจากใบของจำปาได้ 21 ชนิดเพื่อการรักษาโรคเมเร็ง และต้านอนุมูลอิสระ [20] และพบสารประกอบ 37 ชนิดที่สกัดได้จากใบต้นจำปาในเมทานอล [21] จากการทดลองนี้ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับระยะเวลาที่



เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างใบต้นจำปีและจำปา เพื่อสกัดสารนำไปทดสอบความสามารถทางชีวภาพด้านต่าง ๆ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาต่อยอดในอนาคตอาจเป็นสมุนไพรที่ได้รับการยอมรับว่าการศึกษาได้จริงในอนาคต

2. การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 เปรียบเทียบกับเซลล์ท่อน้ำดีปกติ MMNK-1

จากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยใช้สารสกัดหยาบจำปีและจำปาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ได้โดยเฉพาะสารสกัดจากใบจำปีและจำปาที่เก็บในช่วงเดือนมกราคมในชั้นตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดตัวอื่น ๆ โดยพบว่ามี IC_{50} เท่ากับ 13.55 ± 0.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างเพื่อการสกัดสารนั้นมีผลต่อสารที่มีประสิทธิภาพ (active ingredient) ที่แตกต่างกัน ดังนั้น การศึกษาเรื่องความสัมพันธ์และช่วงเวลาที่มีการสังเคราะห์ในจำปีและจำปาที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีนั้นจึงควรศึกษาต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.ฤทัยวรรณ โตะทอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีชนิด RMCCA-1 ขอขอบคุณ ผศ.ดร.วิระชัย ทิตถาการ วิทยาลัยแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์สำหรับเซลล์ท่อน้ำดีชนิด MMNK-1 สำหรับการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตด้วยการใช้สารสกัดหยาบจากใบต้นจำปีและจำปาในงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. คณิตา เลขะกุล. ไม้ดอกและไม้ประดับ เฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: บริษัท ด้านสหวิชาการพิมพ์ จำกัด; 2536
2. Silalahi M, Nisyawati W, Walujo EB, Supriatna J, Mangun W. The local knowledge of medicinal plants trader and diversity of medicinal plants in the Kabanjahe traditional market, North Sumatra, Indonesia. J Ethnopharmacol 2015;175:432-43.
3. Chiang HM, Chen HC, Lin TJ, Shih IC, Wen KC. *Michelia alba* extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. Food Chem Toxicol 2012;50(12):4260-69.
4. Mullaicharam B, Kumar MS. Effect of *Michelia champaca* Linn on pylorus ligated rats. J Appl Pharm Sci 2011;1(2):60-4.
5. Ahmad H, Sehgal S, Mishra A, Gupta R, Saraf SA. TLC detection of β -sitosterol in *Michelia champaca* L. leaves and stem bark and its determination by HPTLC. Phcog J 2012;(4):45-55.
6. Parimi U, Kolli D. Antibacterial and free radical scavenging activity of *Michelia champaca* Linn. flower extracts. Free Rad Antiox 2012;2(2):58-61.
7. Silva MB, Tencomnao T. The protective effect of some Thai plants and their bioactive compounds in UV light-induced skin carcinogenesis. J Photochem Photobiol 2018;185:80-9.
8. Yeh YT, Huang JC, Kuo PL, Chen CY. Bioactive constituents from *Michelia champaca*. Nat Prod Commun. 2011;6(9):1251-2.
9. Atjanasupatt K, Wongkham W, Meepowpan P, Kittakoo P, Sobhon P, Bartlett A, et al. In vitro screening for anthelmintic and antitumour

- activity of ethnomedicinal plants from Thailand. J Ethnopharmacol 2009;123(3):475-82.
10. Noysang C, Mahringer A, Zeino M, Saeed M, Luanratana O, Fricker G, et al. Cytotoxicity and inhibition of P-glycoprotein by selected medicinal plants from Thailand. J Ethnopharmacol. 2014;155(1):633-41.
11. Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. Hepatology 2005; 41:5-15.
12. de Groen PC, Gores GJ, LaRusso NF, Gunderson LL, Nagorney DM. Biliary tract cancers. N Engl J Med 1999;341:1368-78.
13. Vatanasapt V, Sriamporn S, Vatanasapt P. Cancer control in Thailand. Jpn J Clin Oncol 2002;32 Suppl:S82-S91.
14. Rattanasinganchan P, Leelawat K, Treepongkaruna SA, Tocharoentanaphol C, Subwongcharoen S, Suthiphongchai T, et al. Establishment and characterization of a cholangiocarcinoma cell line (RMCCA-1) from a Thai patient. World J Gastroenterol 2006;12(40):6500-6.
15. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol 2004;26(2):211-19.
16. Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. J Immunol Methods 1990;131(2):165-72.
17. Dinesh K, Kumar S, Taprial S, Kashyap D, Kumar A, Prakash O. A review of chemical and biological profile of genus *Michelia*. Chin J Integr Med 2012;10(12):1336-41.
18. Hossain MDM, Jahangir R, Hasan SMR, Akter R, Ahmed T, Islam MDI, et al. Antioxidant, analgesic and Cytotoxic activity of *Michelia champaca* Linn. leaf. S J Pharm Sci. 2009;2(2):1-7.
19. Rajshree S, Varma R. *Michelia champaca* L. (Swarna Champa): a review. IJERSTE 2016;5(8):78-82.
20. Chen CY, Huang LY, Chen LJ, Lo WL, Kuo SY, Wang YD, et al. Chemical constituents from the leaves of *Michelia alba*. Chem Nat Compd. 2008;44(1):137-39.
21. Wei LS, Wee W, Siong JYF, Syamsumir DF. Characterization of antimicrobial, antioxidant, anticancer property and chemical composition of *Michelia champaca* seed and flower extracts. S J Pharm Sci. 2011;4(1):19-24.