



ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองของสารสกัดใบกระท่อม  
*In Vitro* Antioxidant and Cytotoxic Activities of the *Mitragyna speciosa* Kort.  
leaf extract.

ชวภณ พุ่มพงษ์ และ ชยานนท์ เขาวรรณวุฒิกุล\*

หลักสูตรการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยบูรพาจันทรพิทยัง กรุงเทพมหานคร 10210

Chawapon Phoomphong and Chayanon Chaowuttikul\*

Thai Traditional Medicine Program, Dhurakij Pundit University, Bangkok 10210

\*Corresponding author: chayanon.cha@dpu.ac.th

Received: 7 June 2023/ Revised: 3 August 2023/ Accepted: 16 August 2023

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองของสารสกัดใบกระท่อม โดยการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ Metal chelating assay รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในมนุษย์ ซึ่งได้แก่ เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) เซลล์มะเร็งช่องปาก (KB) เซลล์มะเร็งเต้านม (MCF7) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ด้วยวิธี MTT assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบกระท่อมที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยวิธี DPPH assay มีค่า  $SC_{50}$  เท่ากับ 43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิธี Metal chelating assay มีค่า  $MC_{50}$  มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดใบกระท่อมก่อให้เกิดความเป็นพิษสูงสุดต่อเซลล์ HepG2 ( $IC_{50} = 593$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือ เซลล์ KB ( $IC_{50} = 1,178$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), เซลล์ MCF7 ( $IC_{50} = 1,412$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และเซลล์ HT29 ( $IC_{50} = 2,343$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบกระท่อมมีศักยภาพเป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติและสามารถนำไปพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็ง อีกทั้งเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการใช้พืชกระท่อมในภูมิปัญญาไทยสำหรับการรักษาโรคมะเร็ง

**คำสำคัญ:** ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาในหลอดทดลอง พืชกระท่อม

## Abstract

This research aimed to study *in vitro* antioxidant and cytotoxic activities of *Mitragyna speciosa* Kort. leaf extract (Kratom leaves extract). The antioxidant properties were determined using DPPH assay and Metal chelating assay. The Kratom leaves extract was also tested for *in vitro* cytotoxic potential against various human cancer cell lines including HT29, KB, MCF7 and HepG2 by MTT assay. The results showed that Kratom leaves extract at various concentrations of antioxidant activity were statistically significant differences ( $p < 0.05$ ). It could scavenge DPPH radical ( $SC_{50} = 43 \mu\text{g/ml}$ ) and exert a metal chelating activity ( $MC_{50} > 500$



µg/ml). The cytotoxicity to human cancer cell lines showed the highest cytotoxic activity against HepG2 (IC<sub>50</sub>= 593 µg/ml) followed by KB (IC<sub>50</sub>= 1,178 µg/ml), MCF7 (IC<sub>50</sub>= 1,412 µg/ml) and HT29 (IC<sub>50</sub>= 2,343 µg/ml) respectively. Based on this research, Kratom leaf extract has the potential to be a natural antioxidant and can be developed into a therapeutic agent for treating cancer. In addition, it provides scientific evidence to support the use of Kratom in Thai wisdom for cancer treatments.

**Keywords:** Antioxidant, Cytotoxicity, *In vitro*, *Mitragyna speciosa* Korth. (Kratom)

## บทนำ

ในอดีตพืชกระท่อมจัดอยู่ในพืชเสพติด (Narcotic Plants) ประเภทที่ 5 ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. 2522 ดังนั้นการนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ การศึกษาวิจัย และการครอบครอง หากยังไม่ได้รับอนุญาตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ถือว่าผู้นั้นมีความผิดตามกฎหมายต้องระวางโทษ ต่อมาได้มีการประกาศพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ ฉบับที่ 8 พ.ศ. 2564 มีผลทำให้พืชกระท่อมถูกปลดออกจากยาเสพติดให้โทษ ประเภทที่ 5 ซึ่งมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 24 สิงหาคม 2564 ที่ผ่านมา ทำให้ประชาชนสามารถปลูก ครอบครอง และจำหน่าย หรือนำมาบริโภคได้อย่างเสรีไม่ผิดกฎหมาย รวมถึงสามารถนำมาศึกษาวิจัยในคุณค่าของพืชกระท่อม ได้อย่างสะดวกยิ่งขึ้น

พืชกระท่อม (*Mitragyna speciosa* Kort., Kratom) เป็นพืชพื้นถิ่นที่พบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และบริเวณเขตภาคใต้ของประเทศไทย สำหรับชาวบ้านภาคใต้ของประเทศไทยถือว่าพืชกระท่อมมีความผูกพันทางวัฒนธรรมท้องถิ่นมาช้านาน จึงรู้จักพืชชนิดนี้เป็นอย่างดี มีรายงานและการให้สัมภาษณ์จากชาวบ้านบอกถึงประโยชน์จากการใช้พืชกระท่อม ได้แก่ ช่วยให้งานได้มากขึ้น ไม่เกียจคร้านในการงาน แก้ปวดเมื่อย แก้ไอ แก้ไข้ ขับพยาธิ รักษาโรคมะเร็ง เบาหวาน เริม งูสวัด โรคผิวหนัง แก้แผลอักเสบ แก้ท้องร่วงและลดความดันโลหิตสูง เป็นต้น โดยการฉีกก้านใบทิ้งแล้วขบเคี้ยว ต้มดื่ม บดผงหรืออาจผสมเข้ากับสมุนไพรอื่น ๆ เป็นตำรับยาเฉพาะ [1] ซึ่งตำราเภสัชกรรมไทยได้ระบุสยาของใบกระท่อมว่ามีรสขมเผื่อน (ฝาด) เมา มีฤทธิ์ทางสมาน แก้ปวดท้อง แก้บิด ปวดเบ่ง ท้องร่วงลงแดง แก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย ถ้าวรับประทานมากอาจทำให้เมา อาเจียน คอแห้งได้ นอกจากนี้คัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณเล่ม 1 และเล่ม 3 ของอำพันกิตติขจร (ขุนโสภิตบรรณลักษณ์) [2, 3] กล่าวถึงพืชกระท่อมว่าเป็นส่วนประกอบหนึ่งในตำรับยา ได้แก่ ยาประสะใบกระท่อม ยาหนุมานจงถนบิตมหาสมุทร ยาทำให้ออดฝืน ยาแก้บิดลงเป็นเลือด ยาแก้บิดหัวลูก เป็นต้น จากข้อมูลข้างต้นทำให้เห็นว่าพืชกระท่อมถูกนำมาใช้ตั้งแต่สมัยโบราณตามภูมิปัญญาบรรพบุรุษที่ได้มีการลองผิดลองถูกจนสามารถสรุปและเขียนเป็นตำรายาไทยสืบทอดกันมาจนถึงปัจจุบัน สำหรับในด้านวิทยาศาสตร์มีหลักฐานงานวิจัยพบว่าสารสกัดกระท่อมมีฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [4] ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์แก้ปวด [5, 6] ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวอาจเป็นเพราะในใบกระท่อมมีสารฟลูโกลิกเซมิกหลายกลุ่ม เช่น alkaloids, flavonoids, triterpenes, steroids, saponins และ tanins [7, 8] สำหรับการแยกสารบริสุทธิ์ของสารสกัดใบกระท่อมพบสารไมทราไจนีน (mitragynine) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม indole alkaloids เป็นสารกลุ่มใหญ่และเป็นสารสำคัญหลัก [9] และมีศักยภาพเป็นสารต้านมะเร็ง [10]

สารไมทราไจนีน ในกลุ่ม indole alkaloids ของใบกระท่อมนั้น อาจมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นที่น่าสนใจของนักวิจัยหลายท่านที่พยายามค้นหาพืชสมุนไพรต่าง ๆ ตามธรรมชาติ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งไว้เป็นทางเลือกหนึ่งของการรักษาโรคมะเร็งและลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้ายาเคมีบำบัดจากต่างประเทศ ตามรายงานทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2564 ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ได้จัดกลุ่มโรคมะเร็งที่พบมากที่สุด 5 อันดับแรกของเพศชาย ได้แก่ โรคมะเร็งตับและท่อน้ำดี โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และลำไส้ตรง โรคมะเร็งปอดและหลอดลม โรคมะเร็งในช่องปาก และโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก สำหรับเพศหญิง ได้แก่ โรคมะเร็งเต้านม โรคมะเร็งปากมดลูก โรคมะเร็งลำไส้ใหญ่และลำไส้ตรง โรคมะเร็งปอดและหลอดลม และโรคมะเร็งตับและท่อน้ำดี [11] จากการทบทวนงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งหรือความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดใบกระท่อมค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ มะเร็ง



ลำไส้ใหญ่และมะเร็งช่องปาก ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์มะเร็งในมนุษย์ที่ใช้เป็นโมเดลในการศึกษาโรคมะเร็งที่สำคัญข้างต้น ทำให้ขาดข้อมูลหลักฐานทางวิชาการที่จะสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากพืชกระท่อมในการรักษาโรคมะเร็ง ตามวิถีชีวิตชาวบ้านและหมอพื้นบ้านไทย

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบกระท่อมในเซลล์มะเร็ง เพื่อเป็นข้อมูลที่จะนำไปสู่การต่อยอดความรู้ในการใช้ประโยชน์ทางเภสัชวิทยาและการสนับสนุนองค์ความรู้ทางภูมิปัญญาไทย

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกระท่อม
2. เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดใบกระท่อม

### วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำใบกระท่อมสายพันธุ์ก้านแดงที่ไม่แก่ไม่อ่อน (ใบเพสลาด) เก็บจากหมอพื้นบ้าน หมู่ที่ 1 บ้านทุ่งโพธิ์ ตำบลพุนพิน อำเภอพุนพิน จังหวัดสุราษฎร์ธานี ช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2565 มาคัดแยกสิ่งปลอมปน ทำความสะอาดและผึ่งให้แห้งแล้วนำใบกระท่อม จำนวน 250 กรัม มาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วหมกด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล 1,500 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.1) และนำสารไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ซึ่งหาน้ำหนักของส่วนสารสกัดหยาบ (% Yield) เก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Desiccator) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

#### 2.1 Free radical scavenging activity

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกระท่อม ด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Boonpisuttinant และคณะ [12] เตรียมสารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้น 0.5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 95% เอทานอล เติมลงใน 96-well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader การทดลองชุดควบคุมใช้ 95% เอทานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แทนสารสกัด และใช้สารละลาย L-ascorbic acid เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากสมการ

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

$A_0$  หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ของการทดลองชุดควบคุม

$A_1$  หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 nm ของการทดลองชุดที่เติมสารตัวอย่าง

นำค่าร้อยละของการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งและความเข้มข้นของสารสกัดใบกระท่อม เพื่อคำนวณค่า  $SC_{50}$  คือ ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50

#### 2.2 Metal chelating activity

การวิเคราะห์ความสามารถในการจับโลหะของสารสกัดจากธรรมชาติ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Boonpisuttinant และคณะ [12] เตรียมสารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้น 0.5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร



50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย  $\text{FeCl}_2$  เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลาย Ferrozine เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 1% HCl อย่างละ 50 ไมโครลิตร เติกลงใน 96-well plate เขย่าเพื่อให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยใช้ Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิดคีเลชันของโลหะ จากสมการ

$$\% \text{ Metal chelation} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

$A_0$  หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองชุดควบคุม

$A_1$  หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองชุดที่เติมสารตัวอย่าง

นำค่าร้อยละของการยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งและความเข้มข้นของสารสกัดใบกระท่อม เพื่อคำนวณค่า  $MC_{50}$  คือ ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดคีเลชันของโลหะได้ร้อยละ 50

### 3. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) มะเร็งช่องปาก (KB) มะเร็งเต้านม (MCF7) และมะเร็งตับ (HepG2) ด้วยวิธี MTT assay ทดสอบโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ด้วยวิธีการดังนี้

#### 3.1 วิธีการเตรียมสารตัวอย่าง

นำสารสกัดใบกระท่อม ละลายใน 100% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) แล้วเจือจางด้วยอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่มี 5% Fetal Bovine Serum (FBS) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วย Syringe Filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร จากนั้นปรับเจือจางสารสกัดใบกระท่อมให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 5,000, 2,500, 1,250, 625 และ 312.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ความเข้มข้น 1% DMSO สำหรับใช้ในการทดสอบ

#### 3.2 วิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เลี้ยงเซลล์จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 96-well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่ควบคุมความเข้มข้น 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเปิดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมทิ้งและเติมสารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้น 5,000, 2,500, 1,250, 625 และ 312.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่มเซลล์นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย 3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นเปิดสารละลาย MTT ทิ้ง และเติมสารที่ละลายผลึก Formazan [100% DMSO : 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)] อัตราส่วน 9:1 จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ตั้งโปรแกรมเครื่อง Microplate reader ให้เขย่าก่อนวัดค่าดูดกลืนแสง 5 นาที และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร จากนั้นจึงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ cytotoxicity จากสมการ

$$\% \text{ cytotoxicity} = [(A - B) / A] \times 100$$

A หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองชุดควบคุม (หลุมที่มีเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง)

B หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ของการทดลองชุดที่เติมสารตัวอย่าง

โดย A และ B จะต้องนำค่าการดูดกลืนแสงของ Blank (100% DMSO : 10% SDS) มาหักลบออกก่อน จึงนำไปคำนวณจากสูตรข้างต้น และหาค่าความเข้มข้นที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ )



### การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ (Triplicate) แสดงผลการทดลองในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Statistics (version 25.0)

### ผลการวิจัย

ผลจากการสกัดใบกระท่อม ด้วยวิธีการหมักและระเหยแห้ง มีลักษณะเป็นผงสีเขียวเข้ม ได้ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักเทียบกับน้ำหนักของพืชสด (% yield) ร้อยละ 5.85 จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยมีค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ( $SC_{50}$ ) เท่ากับ 43 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐาน L-ascorbic acid มีค่า  $SC_{50}$  เท่ากับ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Metal chelating activity พบว่าสารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดคีเลชั่นของโลหะได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยมีค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิดคีเลชั่นของโลหะได้ร้อยละ 50 ( $MC_{50}$ ) มากกว่า 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐาน EDTA มีค่า  $MC_{50}$  เท่ากับ 320 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกระท่อม ด้วยวิธี DPPH assay และ Metal chelating activity (n=3)

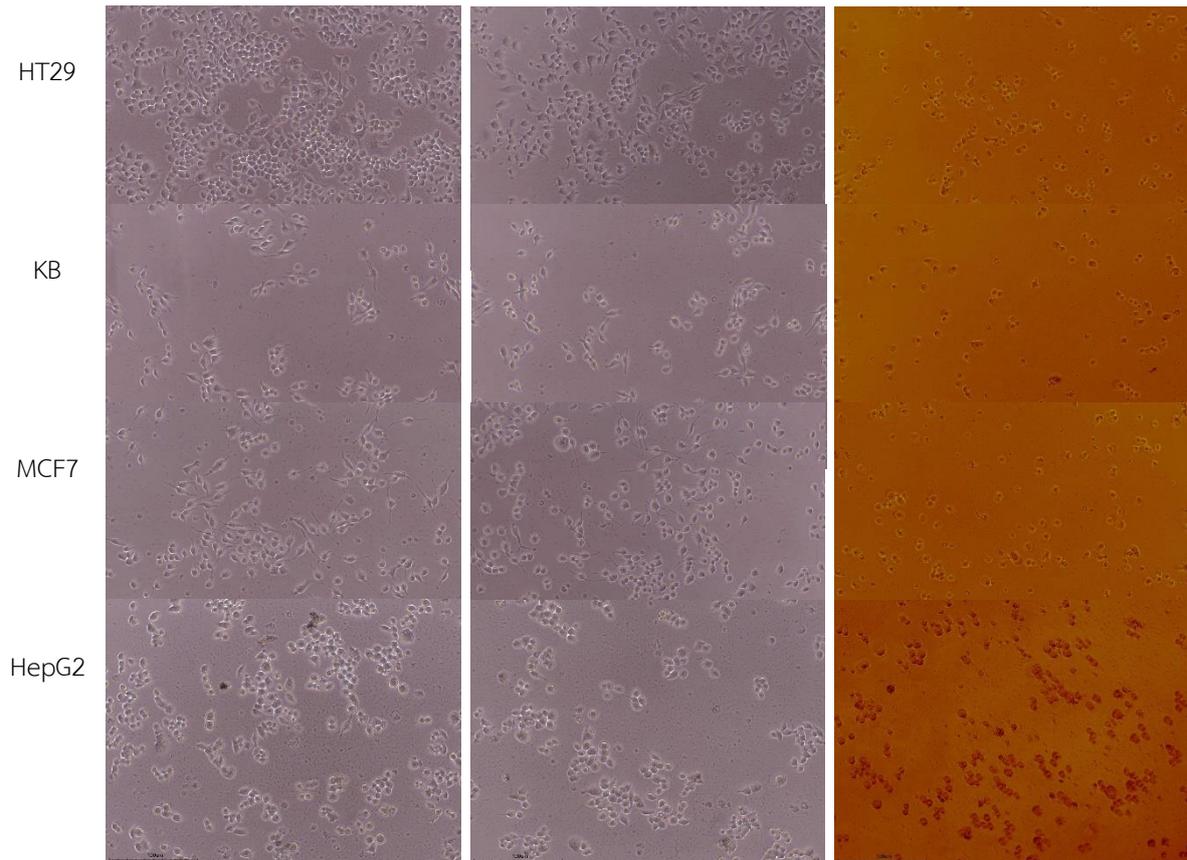
ความเข้มข้นของ สารสกัดใบกระท่อม ( $\mu\text{g/ml}$ )	ร้อยละการต้านอนุมูลของสารสกัดใบกระท่อม	
	DPPH assay	Metal chelating activity
0.5	22.207 $\pm$ 0.152 <sup>a</sup>	8.767 $\pm$ 0.323 <sup>a</sup>
5	27.817 $\pm$ 0.286 <sup>b</sup>	14.800 $\pm$ 0.235 <sup>b</sup>
50	54.720 $\pm$ 0.405 <sup>c</sup>	17.463 $\pm$ 0.850 <sup>c</sup>
500	95.040 $\pm$ 0.135 <sup>d</sup>	23.613 $\pm$ 0.702 <sup>d</sup>

\*ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 2 ค่า  $SC_{50}$  ด้วยวิธี DPPH assay และ  $MC_{50}$  ด้วยวิธี Metal chelating activity (n=3)

สารทดสอบ	$SC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$MC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
สารสกัดใบกระท่อม	43 $\pm$ 0.002	>500
L-ascorbic acid	30 $\pm$ 0.001	-
EDTA	-	320 $\pm$ 0.000

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด คือ มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) มะเร็งช่องปาก (KB) มะเร็งเต้านม (MCF7) และมะเร็งตับ (HepG2) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2,343, 1,178, 1,412 และ 593 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 3 ซึ่งจะเห็นว่าภาพจากความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดใบกระท่อมที่ 5,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับภาพกลุ่มควบคุมที่ 24 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ ที่เจริญใน DMEM, DMEM+1% DMSO และ DMEM+1% DMSO+ สารสกัดใบกระท่อม 5,000 µg/ml กำลังขยาย 200 เท่า

ตารางที่ 3 ค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดใบกระท่อมต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด

สารทดสอบ	ชนิดของเซลล์มะเร็ง	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
สารสกัดใบกระท่อม	HT29	2,343
	KB	1,178
	MCF7	1,412
	HepG2	593

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของตัวอย่างสารสกัดต่ออนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวสูง และนิยมใช้ในการทดสอบ หากสารสกัดใบกระท่อมมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จะให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ส่งผลให้โครงสร้างของอนุมูลอิสระ DPPH เปลี่ยนไปเป็นโครงสร้างที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงของอนุมูลอิสระ DPPH เป็นสีเหลือง ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และมีค่า SC<sub>50</sub> ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน L-ascorbic acid ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Parthasarathy และคณะ [4] พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay มีค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดน้ำ สารสกัด



เมทานอล และสารสกัดแอลกอฮอล์จากใบกระท่อม เท่ากับ 213.4, 37.08 และ 104.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และมีรายงานวิจัยของ Yuniarti และคณะ [8] ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากใบกระท่อม ด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดใบกระท่อม มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 38.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สำหรับการศึกษาศักยภาพต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Metal chelating activity เป็นการวิเคราะห์ความสามารถยับยั้งการเกิดคีเลชันของโลหะของสารสกัดจากธรรมชาติต่อปฏิกิริยาของสาร  $FeCl_2$  กับ Ferrozine หากสารสกัดใบกระท่อมสามารถยับยั้งการเกิดคีเลชันของโลหะได้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างปฏิกิริยาของสีจางลง ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดคีเลชันของโลหะได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ทั้งนี้ ประสิทธิภาพในการจับโลหะของสารสกัดใบกระท่อมเมื่อมีระดับความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้น ความสามารถยับยั้งการเกิดคีเลชันของโลหะจะแปรผันตามเช่นกัน ซึ่งยังไม่พบรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Metal chelating activity ของสารสกัดใบกระท่อม

อย่างไรก็ตามการศึกษาศักยภาพต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH assay และ Metal chelating activity ในด้านประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมีในใบกระท่อมที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยสารสกัดใบกระท่อมเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี เมื่อเทียบกับค่าระดับประสิทธิภาพของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง [13] จากการกล่าวข้างต้น ในใบกระท่อมมีสารประกอบฟีนอลได้แก่ flavonoids และ tanins ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาของ Pengpeng Zhang และคณะ [14] พบปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ในสารสกัดเอทานอลจากใบกระท่อม เท่ากับ 24.62 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และอาจกล่าวได้ว่าพืชสมุนไพรที่พบสารประกอบฟีนอลปริมาณมากจะมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี [15] และมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการจับโลหะ โดยมีรายงานของ Nathan R. Perron และ Julia L. Brumaghim [16] ได้ทบทวนการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารกลุ่มฟีนอลกับการจับโลหะ โดยสารกลุ่มฟีนอลจะเป็นตัวจับไอออนของโลหะได้

การศึกษาศักยภาพการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay เป็นวิธีการตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์หลังจากที่ได้รับตัวอย่างสารสกัด โดยอาศัยหลักการการทำงานของเอนไซม์ Succinate dehydrogenase ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตจะสามารถเปลี่ยนสาร 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ที่มีสีเหลืองให้กลายเป็นผลึก Formazan ที่มีสีม่วง หากสารสกัดใบกระท่อมมีความสามารถเป็นพิษต่อเซลล์ของมะเร็งได้ ทำให้เซลล์มะเร็งตาย จะมีลักษณะใสไม่มีสีหรือทำให้สีม่วงจางลง ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดใบกระท่อมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด คือ มะเร็งลำไส้ใหญ่ (HT29) มะเร็งช่องปาก (KB) มะเร็งเต้านม (MCF7) และมะเร็งตับ (HepG2) จากงานวิจัยที่มีการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าสารพฤกษเคมีที่ประกอบอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของพืชกระท่อมมีมากกว่า 40 ชนิด ที่มีโครงสร้างเป็น alkaloids ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม indole alkaloids และเป็นสารไมทราจินีนอยู่ถึงร้อยละ 66 ของสาร alkaloids ทั้งหมด [17] สารไมทราจินีน จึงเป็นสารสำคัญหลักในพืชกระท่อม โดยสารในกลุ่ม indole alkaloids นี้จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ โดยทำหน้าที่ส่งสัญญาณควบคุมระบบการตายของเซลล์มะเร็ง (Regulated Cell Death, RCD) [18] นอกจากนี้มีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดใบกระท่อมในเซลล์ปกติ ได้แก่ เซลล์ไต (HEK293) และเซลล์ตับ (HeLa Chang liver cells) พบว่าสารสกัดใบกระท่อม ไม่แสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ [19]

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลจากใบกระท่อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ดี มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดคีเลชันของโลหะ และยังทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดได้ ซึ่งเป็นไปได้ที่จะใช้ประโยชน์จากพืชกระท่อมทางเภสัชวิทยา และอาจใช้พัฒนายาจากพืชสมุนไพรในการรักษาโรคมะเร็ง อีกทั้งเป็นการสนับสนุนองค์ความรู้ทางภูมิปัญญาไทยว่าพืชกระท่อมมีสรรพคุณช่วยในการต้านมะเร็งได้

#### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้บริหาร และศูนย์บริการ RDI มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตฯ ที่สนับสนุนทุนวิจัยของบุคลากร



## เอกสารอ้างอิง

1. สาวิตรี อัจฉนวงศ์กรชัย, อาภา ศิริวงศ์ ณ อยุธยา. พิษกระท่อมในสังคมไทย. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด กระทรวงยุติธรรม; 2548.
2. อัมพันธ์ กิตติขจร (ขุนโสภิตบรรณลักษณ์). คัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ เล่ม 1. พระนคร: อุตสาหกรรมกรมการพิมพ์; 2504.
3. อัมพันธ์ กิตติขจร (ขุนโสภิตบรรณลักษณ์). คัมภีร์แพทย์ไทยแผนโบราณ เล่ม 3. พระนคร: อุตสาหกรรมกรมการพิมพ์; 2504.
4. Parthasarathy S, Azizi JB, Ramanathan S, Ismail S, Sasidharan S, Said MI, Mansor SM. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna Speciosa* (Rubiaceae Family) leaves. *Molecules* 2009;14(10):3964-74.
5. Mossadeq WMS, Sulaiman MR, Mohamad TAT, Chiong HS, Zakaria ZA, Jabit ML, Baharuldin MT, Israf DA. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Mitragyna speciosa* Korth methanolic extract. *Med Princ Pract* 2009;18(5):378-84.
6. Shamima AR, Fakurazi S, Hidayat MT, Hairuszah I, Moklas MAM, Arulselvan P. Antinociceptive action of isolated mitragynine from *Mitragyna Speciosa* through activation of opioid receptor system. *Int J Mol Sci* 2012;13(9):11427-42.
7. Juanda E, Andayani S, Maftuch M. Phytochemical screening and antibacterial activity of kratom leaf (*mitragyna speciosa* korth.) against *aeromonas hydrophilla*. *J Exp Life Sci* 2019;9(3):155-8.
8. Yuniarti R, Nadia S, Alamanda A, Zubir M, Syahputra RA, Nizam M. Characterization, phytochemical screenings and antioxidant activity test of Kratom leaf ethanol extract (*Mitragyna Speciosa* Korth) using DPPH method. *J Phys Conf Ser* 2020;1462(1):012026.
9. Ponglux D, Wongseripipatana S, Takayama H, Kikuchi M, Kurihara M, Kitajima M, Aimi N, Sakai S. A new indole alkaloid, 7 alpha-Hydroxy-7H-mitragynine, from *Mitragyna speciosa* in Thailand. *Planta Med* 1994;60(6):580-1.
10. Xu D, Xu Z. Indole alkaloids with potential anticancer activity. *Curr Top Med Chem* 2020;20(21):1938-49.
11. กลุ่มงานดิจิทัลการแพทย์ สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. ทะเบียนมะเร็งระดับโรงพยาบาล พ.ศ. 2564 [อินเทอร์เน็ต]. 2565 [เข้าถึงเมื่อ 15 ก.ค. 2566]. เข้าถึงได้จาก: [https://www.nci.go.th/e\\_book/hosbased\\_2564/index.html](https://www.nci.go.th/e_book/hosbased_2564/index.html)
12. Boonpisuttinant K, Srisuttee R, Khong HY, Chutoprapat R, Ruksiriwanich W, Udompong S, Chompoo W, Boonbai R, Rakkaew R, Sangsee J, Sriprasert K, Malilas W. In vitro anti-ageing activities of ethanolic extracts from Pink rambutan (*Nephelium lappaceum* Linn.) for skin applications. *Saudi Pharm J* 2023;31(4):535-46.
13. Marjoni MR, Zulfisa A. Antioxidant activity of methanol extract/fractions of Senggangi leaves (*Melastoma candidum* D. Don). *Pharm Anal Acta* 2017;8(8):1-6.
14. Zhang P, Wei W, Zhang X, Wen C, Ovatlarnporn C, Olatunji OJ. Antidiabetic and antioxidant activities of *Mitragyna speciosa* (kratom) leaf extract in type 2 diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2023;162:114689.
15. Lebedev VG, Lebedeva TN, Vidyagina EO, Sorokopudov VN, Popova AA, Shestibratov KA. Relationship between Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Berries and Leaves of Raspberry Genotypes and Their Genotyping by SSR Markers. *Antioxidants* 2022;11(10):1961.
16. Perron NR, Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 2009;53(2):75-100.



17. Kamble SH, Berthold EC, King TI, Kanumuri SRR, Popa R, Herting JR, León F, Sharma A, McMahon LR, Avery BA, McCurdy CR. Pharmacokinetics of Eleven Kratom Alkaloids Following an Oral Dose of Either Traditional or Commercial Kratom Products in Rats. *J Nat Prod* 2021;84(4):1104-12.
18. Qin R, You FM, Zhao Q, Xie X, Peng C, Zhan G, Han B. Naturally derived indole alkaloids targeting regulated cell death (RCD) for cancer therapy: from molecular mechanisms to potential therapeutic targets. *J Hematol Oncol* 2022;15(1):133.
19. Goh YS, Karunakaran T, Murugaiyah V, Santhanam R, Bakar MHA, Ramanathan S. Accelerated solvent extractions (ASE) of *Mitragyna speciosa* Korth. (Kratom) leaves: evaluation of Its cytotoxicity and antinociceptive activity. *Molecules* 2021;26(12):3704.