การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของใบย่านาง

Determination of Anti-Breast Cancer and Antioxidant Activities and Total Phenolic Content of Tiliacora triandra Leaves

สุวรรณา จันคนา

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ของสารสกัดจากใบย่านาง การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมทำโดย นำใบย่านางมาสกัดร้อนด้วยเครื่องสกัดซอกเลต (soxhlet extraction) ตัวทำละลายที่ใช้คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ได้สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเอทานอล นำสารสกัดหยาบทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมโดยวิธี Resazurin Microplate Assay (REMA) พบว่าสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนออกฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.36 mg/ml การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทำโดยนำใบย่านางมาสกัดด้วยเมทานอล ได้สารสกัดหยาบเมทานอล นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging assay และวิเคราะห์ปริมาณสาร ประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu method พบว่าสารสกัดหยาบ เมทานอลออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 582.04 μg/ml และมีสารประกอบฟีนอลิก โดยมีค่า total phenolic content เท่ากับ 55.80 mg GAE/g of extract

คำสำคัญ : ย่านาง ฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

ABSTRACT

The anti-breast cancer and antioxidant activities and total phenolic content from Tiliacora triandra leaves were determined. The air-dried Tiliacora triandra leaves were extracted by soxhlet extraction with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol. All four types of extracts were tested for anti-breast cancer activity by Resazurin Microplate Assay (REMA). The results demonstrated that the dichloromethane extract showed anti-breast cancer activity with IC_{50}

valueof 31.36 mg/ml. Whereas the hexane, ethyl acetate and ethanol extracts did not display anti-breast cancer activity. The antioxidant activity and total phenolic content of Tiliacora triandra methanol extract were determined by DPPH radical scavenging assay and Folin-Ciocalteau method, repectively. The results indicated that the methanol extract showed antioxidant activity with IC_{50} value of 582.04 µg/ml. The total phenolic content of the methanol extract was 55.80 mg GAE/g of extract.

Keywords: Tiliacora triandra, anti-breast cancer activity, antioxidant activity, total phenolic content

บทนำ

มะเร็งเต้านม (Breast cancer) เป็นมะเร็งที่พบบ่อยในหญิงไทย มักเกิดในหญิงอายุ 40 ปีขึ้นไป ผู้หญิงอายุน้อยหรือผู้ชายก็อาจเป็นมะเร็งเต้านมได้ แต่พบได้น้อย (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2551) สาเหตุของมะเร็งเต้านมเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน และสาเหตุส่วนหนึ่งอาจมาจากการมีอนุมูลอิสระมากเกินไป (เอกภพ สิระชัยนันท์, 2556) การรักษามะเร็งเต้านมในปัจจุบันเป็นการรักษาแบบผสมผสานระหว่างการผ่าตัด การฉายรังสีรักษา และการให้ยาเคมีบำบัด (ศูนย์มะเร็ง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549) การรักษาเหล่านี้ก่อให้เกิดความทรมานแก่ผู้ป่วยมาก และมีค่าใช้จ่ายในการรักษาสูง จึงมีการหาแนวทางการรักษาเพิ่มขึ้น เช่น การใช้สมุนไพรหลายๆ ชนิด ซึ่งจะเข้าไปช่วยระบบการทำงานของอวัยวะต่างๆ ของร่างกายพร้อมๆ กันและบำรุงร่างกายไปด้วย สมุนไพรสามารถออกฤทธิ์ต่างๆ ดังนี้ 1) ระงับการสร้างเส้นเลือดใหม่ (antiangiogenesis) 2) ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (antiproliferative) 3) ระงับการอักเสบ 4) ซ่อมแซม DNA 5) ต้านการ ออกซิไดส์ กำจัดอนุมูลอิสระ 6) ยับยั้งจุลชีพ เป็นต้น (อ้อมบุญ วัลลิสุต, 2556) ดังนั้นถ้ามีการนำพืชสมุนไพรที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่นมาใช้ในการบำบัดรักษามะเร็งร่วมกับการรักษาทางการแพทย์ จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้

ย่านาง (Tiliacora triandra Diels) เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณตามตำรายาไทยในการบรรเทาและรักษามะเร็ง โดยบรรเทาอาการเจ็บป่วยจากโรคมะเร็งปอด มะเร็งตับ มะเร็งปากมดลูก นอกจากนนี้ยังบรรเทาโรคหัวใจ เบาหวาน ภูมิแพ้ เริม งูสวัด และตุ่มผื่นคัน (ใจเพชร มีทรัพย์, 2547) แต่ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวของย่านางยังมีน้อย โดยงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง เช่น สารประกอบอัลคาลอยด์จากรากย่านางสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Plasmodium falciparum ซึ่งทำให้เกิดโรคมาลาเรีย (ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา และคณะ, 2530)

สารประกอบอัลคาลอยด์ส่วนที่ไม่ละลายน้ำจากรากย่านางมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (Pavanand et al., 1989) นอกจากนี้สารสกัดด้วยน้ำจากย่านางไม่เป็นพิษเฉียบพลันหรือพิษกึ่งเรื้อรังในหนูทดลอง (Sireeratawong et al., 2008) สำหรับงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของใบย่านางนั้น จากการค้นหายังไม่พบข้อมูลดังกล่าว อีกทั้งย่านางเป็นพืชที่พบได้ง่ายในทั่วทุกภาคของประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนายารักษาโรคมะเร็งเต้านมจากพืชในท้องถิ่นได้ต่อไป นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบย่านาง พร้อมทั้งทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในพืช เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการใช้ใบย่านางให้มีประโยชน์ทางด้านการแพทย์ และเภสัชกรรมต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัย คือ ใบย่านาง จากตำบลบุ่งเลิศ อำเภอเมยวดี จังหวัดร้อยเอ็ด ทำการเก็บในเดือนธันวาคม สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้ hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol, methanol (AR grade, QREC), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, AR grade, Sigma-Aldrich), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox, AR grade, Sigma-Aldrich), Folin-Ciocalteu reagent (AR grade, Merck), sodium carbonate (AR grade, QREC) และ gallic acid (AR grade, Sigma-Aldrich) อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้ soxhlet extractor (Gerhardt), rotary evaporator (Buchi) และ spectrophotometer (PG Instrument)

การเตรียมสารสกัดใบย่านางเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม ทำโดยนำใบย่านางตากในที่ร่มให้แห้ง บดให้ละเอียด ทำการสกัดร้อนด้วยเฮกเซน (hexane) โดยใช้เครื่องสกัดซอกเลต (soxhlet extractor) นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยลดความดัน (rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบเฮกเซน (crude hexane extract) นำกากใบย่านางที่ได้จากการสกัดด้วยเฮกเซนมาสกัดต่อด้วยไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) จะได้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน (crude dichloromethane extract) นำกากใบย่านางที่ได้จากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมาสกัดต่อด้วยเอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) จะได้สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท (crude ethyl acetate extract) นำกากใบย่านางที่ได้จากการสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทมาสกัดต่อด้วยเอทานอล (ethanol) จะได้สารสกัดหยาบเอทานอล (crude ethanol extract)

การเตรียมสารสกัดใบย่านางเพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทำโดยนำใบย่านางตากในที่ร่มให้แห้ง บดให้ละเอียด ทำการสกัดโดยการแช่ในเมทานอล (methanol) ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน นำสารละลายที่ได้จากการสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบเมทานอล (crude methanol extract)

การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารสกัดใบย่านาง โดยการนำสารสกัดไปทดสอบ ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ซึ่งทำการทดสอบด้วยวิธี Resazurin Microplate Assay (REMA) เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยประยุกต์จากวิธีของ Brien และคณะ (2000) การทดสอบทำโดยนำ cell line ของมะเร็ง (MCF-7: human breast adenocarcinoma) มาเพาะเลี้ยงและเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ 9×10^4 cells/ml นำสารสกัดหยาบมาละลายใน 10% DMSO แล้วผสมกับเซลล์มะเร็งดังกล่าวใส่ในถาดหลุม นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเติมสารละลายรีซาซูริน (resazurin) ความเข้มข้น 62.5 μg/ml นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง SpectraMax M5

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบย่านางโดยวิธี DPPH radical scavenging assay (DPPH assay) ทำการทดสอบโดยวิธีของ Brand-Williams และคณะ (1995) และได้ปรับปรุงตามวิธีของ Yen และ Hsieh (1997)

นำสารสกัดหยาบ เมทานอลมาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน ปริมาตร 1 ml เติมสารละลาย 0.2 mm DPPH ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เมทานอลแทนสารสกัดหยาบเมทานอล นำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระ DPPH. (%scavenging) จากสมการ

$$\%scavenging = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100$$

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ

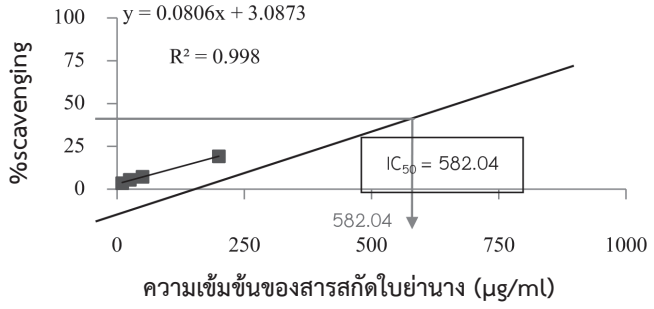
$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

จากนั้นคำนวณหาค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH. ได้ 50%) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %scavenging กับความเข้มข้นของสารสกัด โดยสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบ คือ trolox การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดใบย่านางโดย Folin-Ciocalteu method ทำการวิเคราะห์โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu procedure ของ Singleton และ Rossi (1965) และปรับปรุงตามวิธีของ Kahkonen M.P. และคณะ (1999) นำสารสกัดหยาบเมทานอลมาเตรียมเป็นสารละลายที่ความเข้มข้นเหมาะสม ปริมาตร 1 ml ผสมกับ 10% v/v Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 5 ml ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย sodium carbonate ความเข้มข้น 75 g/l ปริมาตร 4 ml ตั้งทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm เทียบกับชุดควบคุม ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัดหยาบ เมทานอล นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic content) ในหน่วย mg GAE/g of extract โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid

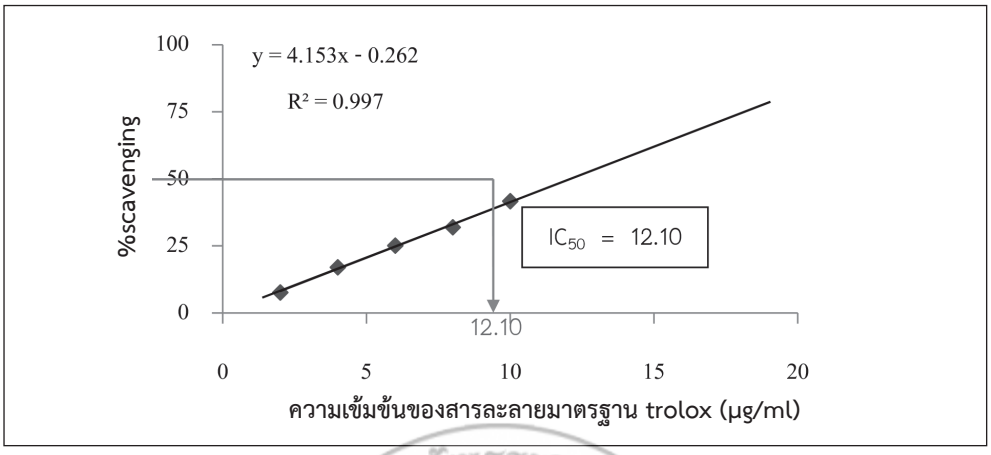
ผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม ทำการสกัดใบย่านางด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ด้วยเครื่องสกัดซอกเลต ได้สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเอทานอล โดยมีเปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้งคือ 3.12, 1.32, 3.71 และ 13.12% ตามลำดับ นำสารสกัดหยาบทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม โดยวิธี Resazurin Microplate Assay พบว่าสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนออกฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.36 mg/ml ในขณะที่สารสกัดหยาบเฮกเซน สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท และสารสกัดหยาบเอทานอลไม่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม

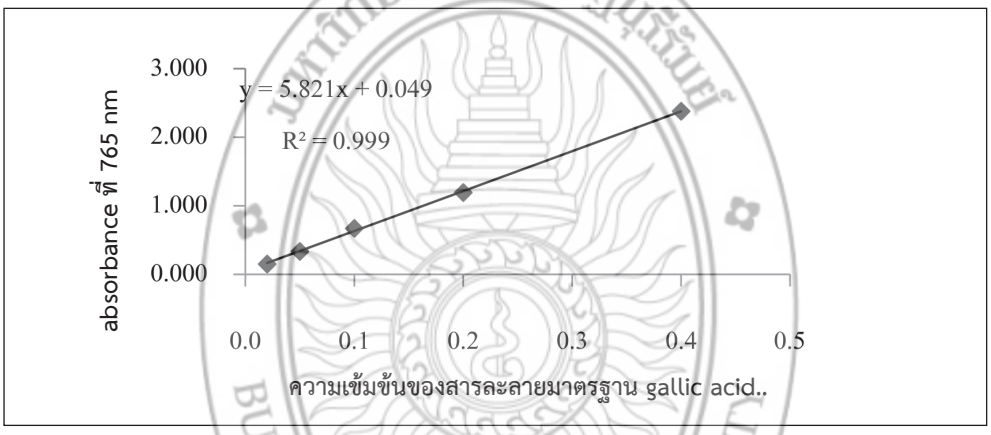
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำการสกัดใบย่านางด้วยเมทานอล ได้สารสกัดหยาบเมทานอล มีเปอร์เซ็นต์สารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้งคือ 12.01% นำสารสกัดหยาบเมทานอลไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH assay แล้วหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) เทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน trolox พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอลออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 582.04 µg/ml ดังรูปที่ 1 ในขณะที่สารมาตรฐาน trolox มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.10 µg/ml ดังรูปที่ 2



รูปที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเมทานอลกับ %scavenging

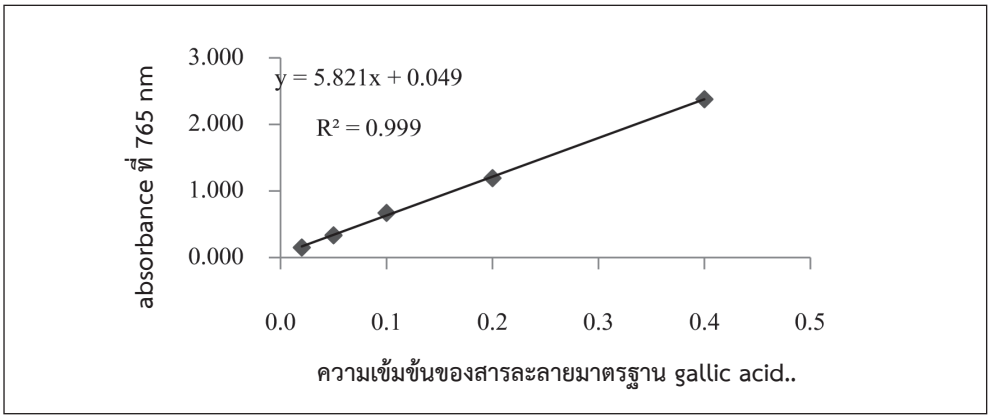


รูปที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน trolox กับ %scavenging



รูปที่ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน trolox กับ %scavenging

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดหยาบเมทานอล โดย Folin-Ciocalteu method โดยการนำสารสกัดหยาบมาทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu's reagent และเติม sodium carbonate จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิก ในหน่วย mg GAE/g of extract โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน gallic acid ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบ คือ 0.212 มาเทียบกับกราฟจะได้ค่าความเข้มข้นของ gallic acid ในสารสกัดหยาบคือ 0.028 mg จากนั้นนำมาคำนวณในหน่วย mg GAE/g of extract พบว่าสารสกัดหยาบเมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 55.80 mg GAE/g of extract

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยการทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมของสารสกัดใบย่านาง ทำให้ทราบว่าใบย่านาง มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม และตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมจากใบย่านางคือ ไดคลอโรมีเทน แสดงว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมในใบย่านางเป็นสารที่มีขั้วค่อนข้างต่ำ จากความรู้ดังกล่าวทำให้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการใช้ใบย่านางเพื่อเป็นยาในการรักษามะเร็งเต้านมได้ อย่างไรก็ตามควรมีการต่อยอดงานวิจัย โดยควรมีการแยกสารบริสุทธิ์ที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านม พร้อมทั้งหาโครงสร้างของสารดังกล่าว เพื่อประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพและใช้ใบย่านางให้เป็นสมุนไพรต้านมะเร็ง และควรมีการทดสอบความเป็นพิษของใบย่านาง ในคนด้วย ทั้งนี้เพื่อให้สามารถนำใบย่านางมาใช้เป็นยาได้อย่างปลอดภัย

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดใบย่านาง ซึ่งในการทดสอบผู้วิจัยใช้สารสกัดเมทานอล เนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชโดยส่วนใหญ่จะเป็นสารที่มีขั้วสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้ เมทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงในการสกัด จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่า สารสกัดเมทานอลของใบย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และพบสารประกอบฟินอลิกซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกันนั่นคือ สารประกอบ ฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารที่มีขั้วสูง จึงถูกสกัดออกมาจากใบย่านางเมื่อใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดใบย่านางดังกล่าว ทำให้สามารถนำใบย่านางซึ่งหาได้ง่ายและราคาถูกมาใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในการเสริมสุขภาพให้แข็งแรงและป้องกันโรคได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี และศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ใจเพชร มีทรัพย์. 2547. **ย่านาง สมุนไพรมหัศจรรย์** (ออนไลน์). แหล่งเข้าถึง : http://www.bloggang.com/ viewdiary.php?id=poivang&month=09-2008&date=01&group=10&gblog=49, 27 ตุลาคม 2552.

ทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา ปราณี ชวลิตรธำรง และวุฒิชัย นุตกุล. 2530. การแยกสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลองจากย่านาง. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์** 29(1): 75-81.

ศูนย์มะเร็ง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2549. **มะเร็งเต้านม** (ออนไลน์). แหล่งเข้าถึง: http://medinfo2.psu.ac.th/cancer/db/ news_ca.php?newsID=3&typeID =18, 26 ธันวาคม 2552.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2551. **ความรู้โรคมะเร็ง** (ออนไลน์). แหล่งเข้าถึง: http://www.nci.go.th/knowledge/index.html, 26 ธันวาคม 2552.

เอกภพ สิระชัยนันท์. 2556. **อาหารต้านมะเร็ง** (ออนไลน์). แหล่งเข้าถึง: http://www.tsco.or.th/index.php?option=com_content&view=article&id=82:2011-02-25-15-54-00 &catid=45:2011-02-23-16-46-59, 26 เมษายน 2556.

อ้อมบุญ วัลลิสุต. 2556. **การใช้สมุนไพร อายุรเวร รักษามะเร็ง** (ออนไลน์). แหล่งเข้าถึง: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/thai/ knowledgeinfo.php?id=128, 26 เมษายน 2556.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.** 28: 25-30.

Brien JO, Wilson I, Orton T and Pognan F. 2000. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem. 267: 5421-5426.**

Kahkonen M.P., Hopia A.I., vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S. and Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 3954-3962.**

Pavanand K., Webster H.K., Yongvanitchit K. and Dechatiwongse T. 1989. Antimalarial Activity of Tiliacora triandra Diels against Plasmodium falciparum in vitro. **Phytotherapy Research. 3(5): 215-217.**

Singleton V.L. and Rossi J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Vitic. 16: 144 – 158.**

Sireeratawong S., Lertprasertsuke N., Srisawat U., Thuppia A., Ngamjariyawat A., Suwanlikhid N. and Jaijoy K. 2008. Acute and subcronic toxicity study of the water extract from Tiliacora triandra (Colebr.) Diels in rats. **Songklanakarin J. Sci. Technol. 30(5): 611-619.**

Yen GC and Hsieh CL. 1997. Antioxidant effects of dopamine and related compounds. **J. Biotechnol. Biochem. 61(10): 1646 – 1649.**