

ปริมาณสารพฤกษเคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดผักเสี้ยนผี Phytochemical Content, Antioxidant Activity and Anti-inflammatory Activity of *Cleome viscosa* L. Extract

พิชาพัชร ฐิตินอนิพงษ์^{1*} ศุภรัตน์ ดวนใหญ่² อัมบุญญ วัลลิสุต² กวินท์ สาสาย² และ จันทนา ยะหัวฝาย³

Pichapat Thititanaapipong^{1*} Supharat Duanyai² Omboon Vallisuta² Kavin Sasai² and Jantana Yahuafai³

¹คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร สกลนคร 47160 ประเทศไทย

²คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร 10600 ประเทศไทย

³สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร 10400 ประเทศไทย

¹Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan, Sakon Nakhon Campus,
Sakon Nakhon 47160, Thailand

²Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok 10600, Thailand

³National Cancer Institute, Department of Medical Services, Ministry of Public Health, Bangkok 10400, Thailand

*E-mail: pichapat.th@rmuti.ac.th

Received: Feb 02, 2024

Revised: May 13, 2024

Accepted: May 20, 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดผักเสี้ยนผี การเตรียมสารสกัดผักเสี้ยนผีทำโดยการแช่ผงผักเสี้ยนผีในเอทานอลร้อยละ 70 จากการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่าผักเสี้ยนผี มีแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ซาโปนิน และคูมาริน การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมทำโดยวิธี Folin Ciocalteu reagent method และการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทำโดยวิธี aluminum chloride colorimetric assay ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด ผักเสี้ยนผีมีปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 48.11 ± 0.17 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และ 22.31 ± 0.05 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radial scavenging capacity assay (DPPH assay), ABTS radical cation decolorization assay (ABTS assay) และ ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay แสดงให้เห็นว่าสารสกัดผักเสี้ยนผีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า half-maximum inhibitory concentration (IC_{50}) value เท่ากับ 106.93 ± 3.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า vitamin C equivalent antioxidant capacity (VEAC) value เท่ากับ 32.62 ± 0.07 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด และค่า FRAP value เท่ากับ 750.97 ± 3.38 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัด ผักเสี้ยนผีทำโดยการศึกษาความสามารถของสารสกัดผักเสี้ยนผีในการยับยั้งการผลิตสารชักนำการอักเสบ ได้แก่ prostaglandin E2 (PGE2), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) และ nitric oxide (NO) ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งผลการทดสอบพบว่าสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ความเข้มข้น 250, 500, 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการสร้าง PGE2, TNF-alpha และ NO โดยเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของผักเสี้ยนผี ซึ่งอาจใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาโรคที่เกิดจาก อนุมูลอิสระ และการอักเสบได้

คำสำคัญ: ปริมาณสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านการอักเสบ ผักเสี้ยนผี

Abstract

This research aimed to study phytochemical content, antioxidant activity and anti-inflammatory activity of *Cleome viscosa* L. extract. The *C. viscosa* extract was prepared by macerating *C. viscosa* powder in 70% ethanol. From phytochemical screening, it was found that *C. viscosa* contained alkaloids, flavonoids, tannins, saponins and coumarins. Total phenolic content was analyzed by the Folin Ciocalteu reagent method and total flavonoid content was analyzed by the aluminum chloride colorimetric assay. The results revealed that total phenolic content and total flavonoid content of the *C. viscosa* extract were 48.11 ± 0.17 mg gallic acid equivalent/g extract and 22.31 ± 0.05 mg quercetin equivalent/g extract, respectively. The antioxidant activity examination by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay), ABTS radical cation decolorization assay (ABTS assay) and ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay revealed that the *C. viscosa* extract had antioxidant activity with the half-maximum inhibitory concentration (IC_{50}) value of 106.93 ± 3.58 μ g/mL, vitamin C equivalent antioxidant capacity (VEAC) value of 32.62 ± 0.07 mg ascorbic acid equivalent/g extract and FRAP value of 750.97 ± 3.38 mM $FeSO_4$ equivalent/g extract, respectively. The anti-inflammatory activity of *C. viscosa* extract was examined by studying ability of the extract to inhibit the production of inflammatory chemical mediators including prostaglandin E2 (PGE2), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and nitric oxide (NO) of Raw 264.7 macrophages undergone inflammation induction by lipopolysaccharide. The results demonstrated that the *C. viscosa* extract at the concentrations of 250, 500 and 1,000 μ g/mL significantly reduced the production of PGE2, TNF-alpha and NO by the inflammation induced Raw 264.7 macrophages. This research presents antioxidant activity and anti-inflammatory activity of *C. viscosa* which may be used as an herb to treat diseases caused by free radicals and inflammation.

Keywords: Phytochemical content, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity, *Cleome viscosa* L.

1. บทนำ

ผักเสี้ยนผี (wild mustard) (Figure 1) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cleome viscosa* L. อยู่ในวงศ์ Cleomaceae เป็นวัชพืชที่พบได้ง่ายในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ทางกรมแพทย์แผนไทยใช้ ต้น ใบ ดอก ราก ผล และเมล็ด ในการทำเป็นยารักษาโรคทั้งภายนอกและภายใน ทั้งต้นของผักเสี้ยนผีมีรสขม มีสรรพคุณ แก้โรคผิวหนัง แก้อาการปวดท้อง ท้องเสีย ลดภาวะสิ่วอักเสบ [1] บรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อหลังส่วนบน [2] บรรเทาอาการท้องเสียในหนูทดลอง [3] มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต้านเชื้อไวรัส ต้านเชื้อจุลินทรีย์ [4] ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ เช่น *Staphylococcus saprophyticus*, *Shigella sonnei*, *Vibrio cholera*, *Streptococcus epidermidis*, *Shigella flexneri* และ *Staphylococcus aureus* [5] ช่วยลดการอักเสบบริเวณขาในหนูทดลอง [6] ใบนำมาบดกับเกลือใช้แก้อาการปวดหลัง เมล็ดนำมาต้มหรือขงคัมเพื่อขับเสมหะและขับปัสสาวะ [7] นอกจากนี้ยังพบสาร cleomiscosin D ในเมล็ด ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมี (Phytochemical compound) ที่สำคัญ [8] และมีน้ำมันร้อยละ 18.3 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 7 ชนิด กรดไขมัน 5 ชนิด น้ำมันในเมล็ดอุดมไป

ด้วยกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid) กรดสเตียริก (Stearic acid) และกรดโอเลอิก (Oleic acid) [9]

จากรายงานผลการวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีการนำสารสกัดด้วยเอทานอล (ethanol) [10] เมทานอล (methanol) [11] อะซิโตน (acetone) [12] จากใบ เมล็ด และลำต้นของผักเสี้ยนผีมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งการใช้เมทานอล และอะซิโตนเป็นตัวทำละลายในการสกัด จะได้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัด อย่างไรก็ตามการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย มีความเหมาะสมกับการนำสารสกัดไปพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับมนุษย์ เนื่องจากมีความเป็นพิษน้อย และสามารถแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดได้ง่าย

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดเอทานอลของผักเสี้ยนผี ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจมีประโยชน์ต่อการนำผักเสี้ยนผีไปใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระ และการอักเสบได้



Figure 1 *Cleome viscosa* L.

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเตรียมสารสกัดผักเสี้ยนผี

การศึกษานี้ใช้ผักเสี้ยนผีทั้งต้นที่มีระยะเวลาในการปลูก 3 เดือน โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่จังหวัดสกลนคร ส่งระบุลักษณะทางพฤกษอนุกรมวิธาน เพื่อใช้ในการจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้งสำหรับอ้างอิงในงานวิจัย ณ พิพิธภัณฑ์สมุนไพร กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กรุงเทพมหานคร ได้รับหมายเลข Voucher specimen คือ TTM No.0005458

การเตรียมสารสกัดหยาบผักเสี้ยนผีทำโดยนำผักเสี้ยนผีมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อแห้งแล้วนำมาสับเป็นชิ้นขนาด 2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดสมุนไพร นำผงสมุนไพรที่ได้ไปร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 60 เพื่อให้ได้ผงผักเสี้ยนผีที่มีขนาดอนุภาคใกล้เคียงกัน นำผงผักเสี้ยนผีที่ได้ไปหมักด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ทั้งไว้เป็นเวลา 5 วัน กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วจึงไประเหยตัวทำละลายออกโดยการระเหยสุญญากาศแบบหมุนด้วยเครื่อง Rotary evaporator (รุ่น Base Hei-VAP HL) และนำไปทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) จะได้สารสกัดหยาบผักเสี้ยนผี จากนั้นคำนวณหาร้อยละของผลผลิตโดยน้ำหนัก (% yield) ตามสมการ [13]

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักสมุนไพร (กรัม)}} \times 100$$

2.2. การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของผักเสี้ยนผี

การทดลองนี้เป็นการตรวจสอบสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) 7 กลุ่ม ของผักเสี้ยนผี ซึ่งได้แก่ แอลคาลอยด์ (alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) แอนทราควิโนน (anthraquinones) แทนนิน (tannins) คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) ซาโปนิน (saponins) และคูมาริน (coumarins) โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน [14], [15] ดังนี้

2.2.1. สารกลุ่มแอลคาลอยด์

นำผงผักเสี้ยนผี 3 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมเอทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไป sonicate ใน sonicator 15 นาที ดูดส่วนเอทานอล โดยกรองผ่านสำลีใส่ในถ้วยกระเบื้อง จนกระทั่งสารสกัดแห้ง เติม dilute H₂SO₄ 3 มิลลิลิตร ในถ้วยกระเบื้อง คนให้ละลาย (ใช้แท่งแก้วคน) จากนั้นกรองผ่านสำลีสำสารละลายใส่ในถาดหลุมกระเบื้อง (test plate) หยด Dragendorff's reagent 3-4 หยด ลงในสารละลาย หากให้ผลบวกจะให้ตะกอนสีส้ม [15]

2.2.2. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์

นำผงผักเสี้ยนผี 3 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติมเอทานอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไป sonicate ใน sonicator 15 นาที ดูดส่วนเอทานอล 1 มิลลิลิตร โดยกรองผ่านสำลี ใส่ลงในถาดหลุมกระเบื้อง (Test plate) เติม magnesium ribbon

2-3 ขึ้น แล้วเติม concentrated HCl 2-3 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น ผลบวกของการทดสอบคือ สีส้ม ชมพู แดง ถึงม่วงแดง ซึ่งเกิดขึ้นภายใน 2-5 นาที [15]

2.2.3. สารกลุ่มแอนทราควิโนน

นำผงผักเสี้ยนผี 1 กรัม ใส่ปิกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 2N HCl 20 มิลลิลิตร วางให้ความร้อนบน water bath อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส 15 นาที วางทิ้งไว้ให้เย็น กรองด้วยสำลี ดูดสารสกัดใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติม dichloromethane ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดฝา เขย่า โดยเปิดฝาเป็นระยะ ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น จากนั้นแยกสารสกัดในชั้น dichloromethane มาใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ เติม NH_4OH TS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่า สังเกตสีในชั้นต่าง [15]

2.2.4. สารกลุ่มแทนนิน

นำผงผักเสี้ยนผี 2 กรัม ต้มกับน้ำให้เดือด นาน 5 นาที กรองเอาส่วนใส แบ่งใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำตัวอย่างในแต่ละหลอดไปทดสอบและสังเกตผลที่เกิดขึ้น หลอดที่ 1 เติม gelatin solution 2-3 หยด ตะกอน (tannins) หลอดที่ 2 เติม 1% ferric chloride 1-2 หยด สีน้ำเงินถึงน้ำเงินดำ (hydrolysable tannins) สีเขียวคล้ำ (condensed tannins) หลอดที่ 3 เติม lime water 5 มิลลิลิตร ตะกอนสีออกน้ำเงินเทา (hydrolysable tannins) [15]

2.2.5. สารกลุ่มคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

แบ่งการทดสอบออกเป็น 3 ส่วนตามโครงสร้างพื้นฐานของสารคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีนั้นต้องให้ผลการทดสอบทั้งสามส่วน ดังนี้ คือ ส่วนสเตอรอยด์ (steroid nucleus) ส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว (unsaturated lactone ring) และส่วนน้ำตาลดีออกซี (deoxy sugar) การทดสอบทำได้ดังนี้

ชั่งผงผักเสี้ยนผี 2 กรัม สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตรต่อปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองแล้วนำไประเหยแยกตัวทำละลายออกจากนั้นนำสารสกัดมาเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วสกัดด้วย dichloromethane 2-3 ครั้ง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร ในกรวยแยก ทำการรวมสารสกัดชั้น dichloromethane เพื่อมาใช้ในการทดสอบโดยแบ่งใส่หลอดทดลองจำนวน 3 หลอด โดยหลอดที่ 1 นำไปตรวจสอบ steroid nucleus ด้วยวิธี Liebermann-Burchard test โดย

นำสารสกัดชั้น dichloromethane มาระเหยแยกตัวทำละลายออกจากนั้นนำสารสกัดมาเติม acetic anhydride จำนวน 1-2 หยด และ หยดกรดกำมะถันเข้มข้น (concentrated H_2SO_4) จำนวน 1-2 หยด ถ้าปรากฏสีเขียว น้ำเงิน ม่วง ถึงม่วงแดง แสดงว่าพบส่วน steroid nucleus หลอดที่ 2 ทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว โดยนำสารสกัดชั้น dichloromethane มาระเหยแยกตัวทำละลายออกจากนั้นนำสารสกัดมาเติม kedde's reagents จำนวน 2-3 หยด และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (concentrated sodium hydroxide) 1 มิลลิลิตร จำนวน 4 หยด สังเกตสารละลายจะให้สีม่วงแดงทันที แสดงว่ามีวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว และหลอดที่ 3 ทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซีด้วยวิธี Keller-Kiliani test โดยการเติมสารละลาย FeCl_3 reagent (0.079 FeCl_3 ใน glacial acetic acid) ประมาณ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และเติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (concentrated sulfuric acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลเขียวตรงรอยต่อระหว่างสารสกัดกับกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบน้ำตาลดีออกซี [15]

2.2.6. สารกลุ่มซาโปนิน

การตรวจสอบสมบัติการเกิดฟองของซาโปนิน (foam test or froth test) ใช้ผงผักเสี้ยนผี 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดอย่างแรง 3 นาที สังเกตลักษณะของฟองที่เกิดขึ้น จากนั้น ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นแสดงว่าพบซาโปนิน [15]

2.2.7. สารกลุ่มคูมาริน

นำผงผักเสี้ยนผี 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2-3 หยด ปิดปากหลอดทดลองด้วยจุกคอร์ก (cork) ที่มีกระดาษกรองชุบสารละลายเจือจางของ sodium hydroxide แขนงอยู่โดยระงับอย่าให้กระดาษกรองติดข้างหลอด (เตรียมกระดาษกรองโดยนำไปหยดด้วยสารละลายเจือจางของ sodium hydroxide 1 หยด ทิ้งให้แห้งแล้วจึงนำมาใช้) จากนั้นนำหลอดทดลองไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำกระดาษกรองมาส่องภายใต้แสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร สังเกตการเรืองแสงที่เกิดขึ้นใน 2-3 นาที ถ้ามีสารกลุ่มคูมาริน จะสังเกตเห็นการเรืองแสงสีต่าง ๆ ขึ้นกับชนิดของสารที่เป็นองค์ประกอบ เช่น คูมารินจะให้การเรืองแสง

สีเขียวอมเหลือง อนุพันธ์ของคูมารินบางชนิด เช่น aesculetin, umbelliferone และ scopoletin จะเรืองแสงสีฟ้า [15]

2.3. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) ทำโดยวิธี aluminum chloride colorimetric assay ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอซีทิน (quercetin) [16], [17] เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (stock solution) เจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน 100 ไมโครลิตร เติม 2% $AlCl_3$ 100 ไมโครลิตร และเติมเอทานอล 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าการดูดกลืนแสงที่ไปคำนวณหาปริมาณจากกราฟสารละลายมาตรฐานของเคอซีทิน รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอซีทินต่อกรัมสารสกัด (mg quercetin equivalent (QE)/g extract)

2.4. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ทำโดยวิธี Folin Ciocalteu reagent method และใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน [18] โดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นนำสารสกัดมา 20 ไมโครลิตรใส่ลงใน 96-well plate แล้วเติมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent 60 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที แล้วเติม 7.5% sodium carbonate 80 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยเครื่อง microplate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัด โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (Gallic acid equivalent (GAE)/g extract)

2.5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษานี้ใช้วิธีการในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักเสี้ยนผี 3 วิธี คือ DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay

2.5.1. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย

วิธี DPPH assay

ใช้วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา โดยใช้สารสกัดปริมาณ 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย methanolic DPPH ความเข้มข้น 152 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำผลที่ได้มาหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง [14], [15] ดังสมการ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกแสดงเป็นค่า half-maximum inhibitory concentration (IC_{50})

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A_c - A_{bc}) - (A_s - A_{bs})}{(A_c - A_{bc})} \times 100$$

เมื่อ

A_c = ค่าการดูดกลืนแสงของ control

A_{bc} = ค่าการดูดกลืนแสงของ blank control

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงของ sample

A_{bs} = ค่าการดูดกลืนแสงของ blank sample

2.5.2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย

วิธี ABTS assay

เตรียมสารละลาย $ABTS^+$ (สารอนุมูลอิสระ) ความเข้มข้น 7 ไมโครโมลาร์ และสารละลาย potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 ไมโครโมลาร์ ผสมสารทั้งสองในอัตราส่วน 1:0.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ หลังจากนั้นเจือจางสารละลาย $ABTS^+$ ด้วยเอทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร [19]

เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล ผสมสารตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรกับสารละลาย $ABTS^+$ 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของวิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) รายงานผลเป็นค่า vitamin C

equivalent antioxidant capacity (VEAC) value ในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด (mg ascorbic acid equivalent/g extract)

2.5.3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

เตรียมสารละลาย FRAP reagent ด้วยการผสมสารละลาย acetate buffer (pH 3.6) 300 มิลลิโมลาร์ สารละลาย FeCl₃ 20 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย TPTZ 10 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายใน HCl 40 มิลลิโมลาร์ แล้วนำสารที่ได้ทั้ง 3 ชนิด มาผสมกันที่อัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ

เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเอทานอล นำสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร มาผสมกับ FRAP reagent 180 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร คำนวณค่าการดูดกลืนแสงจากสมการ

$$\text{Absorbance} = A - B - C$$

เมื่อ

A = ค่าการดูดกลืนแสงของ sample

(sample 20 uL + FRAP reagent 180 uL)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

(sample 20 uL + acetate buffer (pH 3.6) 180 uL)

C = ค่าการดูดกลืนแสงของ control

(ethanol 20 uL + FRAP reagent 180 uL)

นำค่าที่คำนวณได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate) รายงานผลเป็นค่า FRAP value ในหน่วยมิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด (mM FeSO₄ equivalent/g extract)

2.6. การเพาะเลี้ยงเซลล์

รหัสของเซลล์มาโครฟาจ (macrophage) Raw 264.7 ที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้คือ ATCC TIB 71 เพาะเลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM [20] เติม fetal bovine serum (FBS) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ penicillin-streptomycin ที่ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร นำเซลล์บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

และความชื้นระหว่าง 80-90 เปอร์เซ็นต์ ทำการ subculture ทุก ๆ 3 วัน ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดภาพหัวกลับ (inverted microscope)

2.7. การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดผักเสี้ยนผี

การทดลองนี้เป็นการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดผักเสี้ยนผีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงมาโครฟาจ (Raw 264.7) ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 1x10⁴ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96-well plate บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบเซลล์กับสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองนี้ กำหนดให้กลุ่มเซลล์ที่ไม่ได้รับสารใด ๆ เป็นเซลล์ชุดควบคุมลบ (negative control) จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มที่สภาวะเดิม นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทดสอบออกแล้วเติมสารละลาย MTT ที่เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม นำเซลล์กลับไปที่บ่มต่อในสภาวะเดิมเป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง [21] จากนั้นนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ดังสมการ

$$\% \text{ cell viability} = \frac{A_T}{A_C} \times 100$$

เมื่อ

A_T = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ได้รับสารทดสอบ

A_C = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ไม่ได้รับสารทดสอบ

สารที่ทดสอบจะถือว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยกว่าร้อยละ 80 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.8. การทดสอบการยับยั้งการอักเสบ

การทดลองนี้เป็นการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดผักเสี้ยนผี ซึ่งทำโดยการศึกษาความสามารถของสารสกัดผักเสี้ยนผีในการยับยั้งการอักเสบ (inflammatory)

chemical mediators) ได้แก่ prostaglandin E2 (PGE2), tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) และ nitric oxide (NO) ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS)

การทดลองนี้มีขั้นตอนดังนี้ เลี้ยงเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 [22] ความเข้มข้น 1×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใน 96-well plate นำเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดอาหารเก่าทิ้ง เติมน้ำ LPS ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มในสภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ ดูดอาหารเก่าทิ้ง เติมน้ำสารสกัดผักเสี้ยนผี ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำเซลล์ไปบ่มในสภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารทดสอบออกเพื่อนำไปทดสอบหาปริมาณสารชักนำการอักเสบ โดยวัดปริมาณของ NO ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์ในรูปของ nitrite โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง microplate reader ส่วนการวัดปริมาณของ PGE2 ใช้ PGE2 assay kit ของบริษัท Cayman Lot No. 0699836 และการวัดปริมาณของ TNF-alpha ใช้วิธี sandwich enzyme-linked immunosorbent assay [22]

2.9. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจากการทดลองทั้งหมดแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics version 26 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างระหว่างคู่ ด้วยวิธี Duncan's test

3. ผลการวิจัย

3.1. สารสกัดผักเสี้ยนผี

จากการนำสมุนไพรผักเสี้ยนผีมาเตรียมเป็นสารสกัดโดยสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 70 ที่อัตราส่วน 1:10 เป็นเวลา 5 วัน พบว่า สารสกัดที่ได้มีสีเขียว เมื่อนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งเยือกแข็งแบบสุญญากาศ ผลการสกัด พบว่า สารสกัดเอทานอลร้อยละ 70 มีร้อยละของผลผลิตเท่ากับ 5.13 ± 0.20 ดังแสดงใน Table 1

3.2. สารพฤษเคมีเบื้องต้นของผักเสี้ยนผี

การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น 7 ชนิด ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน แทนนิน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ซาโปนิน และคูมารินของผักเสี้ยนผี ซึ่งใช้วิธีการที่ง่าย ใช้ระยะเวลาที่สั้น และใช้เครื่องมือน้อย โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีแบบง่าย และตรวจสอบผลจากสีที่แตกต่างกัน หรือการตกตะกอน เพื่อบอกถึงกลุ่มสารสำคัญ การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น พบว่า ผักเสี้ยนผีมีสารพฤษเคมี 5 ชนิดคือ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ซาโปนิน และคูมาริน ดังแสดงใน Table 2

3.3. ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดผักเสี้ยนผี

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดผักเสี้ยนผี โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอควิทิน (quercetin) ที่มีสมการเส้นตรง คือ $y = 11.779x - 0.0835$ ($R^2 = 0.9997$) พบว่า สารสกัดผักเสี้ยนผีมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 22.31 ± 0.05 มิลลิกรัมสมมูลของเคอควิทินต่อกรัมสารสกัด (Table 3)

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดผักเสี้ยนผี โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (gallic acid) ที่มีสมการเส้นตรง คือ $y = 5.9823x - 0.0168$ ($R^2 = 0.9997$) พบว่า สารสกัดผักเสี้ยนผีมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 48.11 ± 0.17 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (Table 3)

3.4.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักเสี้ยนผี

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักเสี้ยนผีด้วยวิธี DPPH assay พบว่า สารสกัดผักเสี้ยนผี มีค่า IC_{50} เท่ากับ 106.93 ± 3.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักเสี้ยนผีกับสารมาตรฐานวิตามินซี พบว่า สารสกัดผักเสี้ยนผีแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี (Table 4)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักเสี้ยนผีด้วยวิธี ABTS assay โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) ที่มีสมการเส้นตรง คือ $y = 1.1741x + 15.177$ ($R^2 = 0.999$) พบว่า สารสกัดผักเสี้ยนผี มีค่า vitamin C equivalent antioxidant capacity (VEAC) value เท่ากับ 32.62 ± 0.07 มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อกรัมสารสกัด (Table 4)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด
ผักเสี้ยนผีด้วยวิธี FRAP assay โดยเปรียบเทียบกับกราฟ
มาตรฐานของเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) ที่มีสมการเส้นตรง คือ

$y=0.6164x-0.0629$ ($R^2=0.9996$) พบว่า สารสกัดผักเสี้ยนผี
มีค่า FRAP value เท่ากับ 750.97 ± 3.38 มิลลิโมลาร์สมมูล
ของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด (Table 4)

Table 1 Percent yield of the *Cleome viscosa* L. extract

Trial	Plant powder weight (g)	Extract weight (g)	Percent yield (%)	Average $\pm$ SD
1	200	10.69	5.35	5.13 $\pm$ 0.201
2	200	9.89	4.95	
3	200	10.22	5.11	

Table 2 Qualitative phytochemicals screening of *Cleome viscosa* L.

Phytochemicals	Detection in <i>C. viscosa</i>
Alkaloids	+
Flavonoids	+
Anthraquinones	-
Tannins	+
Cardiac glycosides	-
Saponins	+
Coumarins	+

+ = Present; - = Absent

Table 3 Total flavonoid content (TFC) and total phenolic content (TPC) of *C. viscosa* extract

Phytochemical content	Standard	Standard curve (Equation and R^2)	Concentration
TFC	Quercetin	$y=11.779x-0.0835$ $R^2 = 0.9997$	22.31 ± 0.05 mg QE/g extract
TPC	Gallic acid	$y= 5.9823x-0.0168$ $R^2 = 0.9997$	48.11 ± 0.17 mg GAE/g extract

Concentrations are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

QE = quercetin equivalent; GAE = gallic acid equivalent

Table 4 Antioxidant activity analyzed by DPPH, ABTS and FRAP assays of *C. viscosa* extract

Samples	IC ₅₀ of DPPH ($\mu\text{g/mL}$)	VEAC Value (mg AAE/g extract)	FRAP assay (mM FeSO_4 equivalent/g extract)
<i>C. viscosa</i> extract	106.93 ± 3.58	32.62 ± 0.07	750.97 ± 3.378
Ascorbic acid	2.41 ± 0.11	-	-

Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

VEAC = vitamin C equivalent antioxidant capacity; AAE = ascorbic acid equivalent

3.5. ความเป็นพิษของสารสกัดจากผักเสี้ยนผี

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากผักเสี้ยนผีต่อเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 พบว่าความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 ดังแสดงใน Figure 2 ดังนั้นจึงนำสารสกัดผักเสี้ยนผีในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.6. การยับยั้งการผลิต PGE2 โดยสารสกัดผักเสี้ยนผี

จากการทดสอบความสามารถของสารสกัดผักเสี้ยนผีในการยับยั้งการผลิต PGE2 ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยสารละลาย LPS หลังได้รับสารสกัดผักเสี้ยนผี เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร

มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิต PGE2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีสารสกัดผักเสี้ยนผี (Figure 3) โดยชุดการทดลองที่มีสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร มีปริมาณ PGE2 เท่ากับ 20.85 ± 2.79 , 12.63 ± 2.96 และ 6.17 ± 2.53 พิโกกรัมต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ

เมื่อนำปริมาณ PGE2 ของชุดการทดลองที่มีสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรมาเทียบกับปริมาณ PGE2 ของชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดผักเสี้ยนผี แล้วคำนวณเป็นร้อยละการยับยั้งการผลิต PGE2 (% inhibition) พบว่าชุดการทดลองที่มีสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร มีร้อยละการยับยั้งการผลิต PGE2 เท่ากับร้อยละ 48.21 ± 9.18 , 72.63 ± 7.94 และ 79.93 ± 15.17 ตามลำดับ (Table 5)

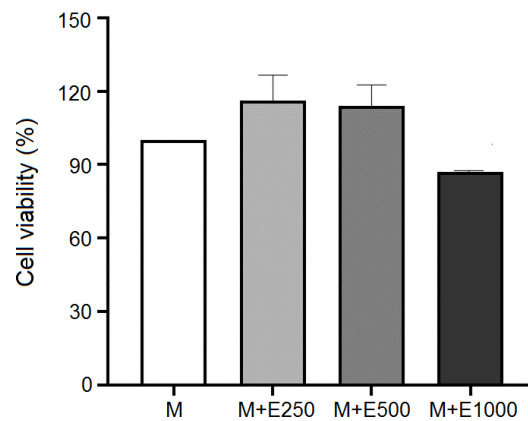


Figure 2 Cytotoxicity of *C. viscosa* extract against Raw 264.7 macrophage assessed by MTT assay (M = Raw 264.7 macrophage; E250, E500 and E1000 = *C. viscosa* extract with concentrations of 250, 500 and 1,000 $\mu\text{g/mL}$, respectively)
Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

Table 5 Inhibition of PGE2 production of Raw 264.7 macrophage by *C. viscosa* extract

Treatment	Concentration of <i>C. viscosa</i> extract ($\mu\text{g/mL}$)	PGE2 production (pg/mL)	Inhibition of PGE2 production (%)
Macrophage (Negative control)	-	3.66 ± 3.17	-
Macrophage + LPS (Positive control)	-	40.51 ± 2.45	-
Macrophage + LPS + <i>C. viscosa</i> extract	250	$20.85 \pm 2.79^{***}$	48.21 ± 9.18
	500	$12.63 \pm 2.96^{***}$	72.63 ± 7.94
	1000	$6.17 \pm 2.53^{***}$	79.93 ± 15.17

Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

*** $p < 0.001$ compared to the mean of positive control

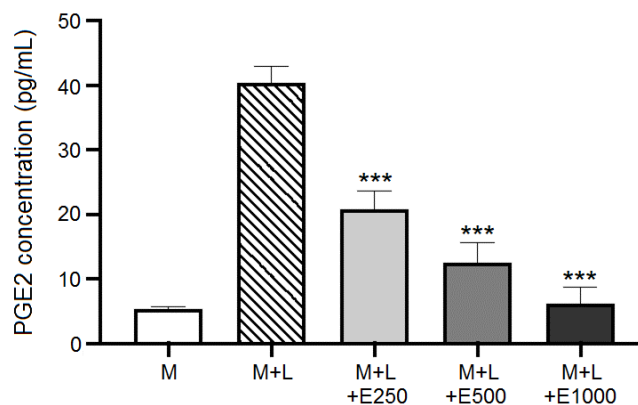


Figure 3 Inhibition of PGE2 production of Raw 264.7 macrophage by *C. viscosa* extract

(M = Raw 264.7 macrophage; L = Lipopolysaccharide;

E250, E500 and E1000 = *C. viscosa* extract with concentrations of 250, 500 and 1,000 $\mu\text{g/mL}$, respectively)

Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

*** p<0.001 compared to the mean of M+L

3.7. การยับยั้งการผลิต TNF-alpha โดยสารสกัดผักเสี้ยนผี

จากการทดสอบความสามารถของสารสกัดผักเสี้ยนผีในการยับยั้งการผลิต TNF-alpha ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยสารละลาย LPS หลังได้รับสารสกัดผักเสี้ยนผี เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิต TNF-alpha ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีสารสกัดผักเสี้ยนผี (Figure 4) โดยชุดการทดลองที่มีสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณ TNF-alpha เท่ากับ 668.26 ± 3.59 , 597.58 ± 11.12 และ 477.49 ± 15.31 พิโกกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำปริมาณ TNF-alpha ของชุดการทดลองที่มีสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาเทียบกับปริมาณ TNF-alpha ของชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดผักเสี้ยนผี แล้วคำนวณเป็นร้อยละการยับยั้งการผลิต TNF-alpha (% inhibition) พบว่าชุดการทดลองที่มีสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีร้อยละการยับยั้งการผลิต TNF-alpha เท่ากับร้อยละ 4.24 ± 1.23 , 14.38 ± 0.90 และ 31.57 ± 2.58 ตามลำดับ (Table 6)

3.8. การยับยั้งการผลิต NO โดยสารสกัดผักเสี้ยนผี

จากการทดสอบความสามารถของสารสกัดผักเสี้ยนผีในการยับยั้งการผลิต NO ของเซลล์มาโครฟาจ Raw 264.7 ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยสารละลาย LPS หลังได้รับสารสกัดผักเสี้ยนผี เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิต NO ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีสารสกัดผักเสี้ยนผี (Figure 5) โดยชุดการทดลองที่มีสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณ NO เท่ากับ 13.95 ± 0.31 , 8.95 ± 0.40 และ 6.48 ± 0.50 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

เมื่อนำปริมาณ NO ของชุดการทดลองที่มีสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาเทียบกับปริมาณ NO ของชุดควบคุมที่ไม่มีสารสกัดผักเสี้ยนผี แล้วคำนวณเป็นร้อยละการยับยั้งการผลิต NO (% inhibition) พบว่าชุดการทดลองที่มีสารสกัดผักเสี้ยนผีที่ระดับความเข้มข้น 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีร้อยละการยับยั้งการผลิต NO เท่ากับร้อยละ 29.08 ± 3.67 , 47.83 ± 1.85 และ 57.04 ± 2.95 ตามลำดับ (Table 7)

Table 6 Inhibition of TNF-alpha production of Raw 264.7 macrophage by *C. viscosa* extract

Treatment	Concentration of <i>C. viscosa</i> extract ($\mu\text{g/mL}$)	TNF-alpha production (pg/mL)	Inhibition of TNF-alpha production (%)
Macrophage (Negative control)	-	573.59 $\pm$ 15.79	-
Macrophage + LPS (Positive control)	-	698.00 $\pm$ 5.94	-
Macrophage + LPS + <i>C. viscosa</i> extract	250	668.26 $\pm$ 3.59*	4.24 $\pm$ 1.23
	500	597.58 $\pm$ 11.12***	14.38 $\pm$ 0.90
	1000	477.49 $\pm$ 15.31***	31.57 $\pm$ 2.58

Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

* p<0.05; *** p<0.001 compared to the mean of positive control

Table 7 Inhibition of NO production of Raw 264.7 macrophage by *C. viscosa* extract

Treatment	Concentration of <i>C. viscosa</i> extract ($\mu\text{g/mL}$)	NO production (μM)	Inhibition of NO production (%)
Macrophage (Negative control)	-	1.55 $\pm$ 0.10	-
Macrophage + LPS (Positive control)	-	21.78 $\pm$ 1.44	-
Macrophage + LPS + <i>C. viscosa</i> extract	250	13.95 $\pm$ 0.31***	29.08 $\pm$ 3.67
	500	8.95 $\pm$ 0.40***	47.83 $\pm$ 1.85
	1000	6.48 $\pm$ 0.50***	57.04 $\pm$ 2.95

Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

*** p<0.001 compared to the mean of positive control

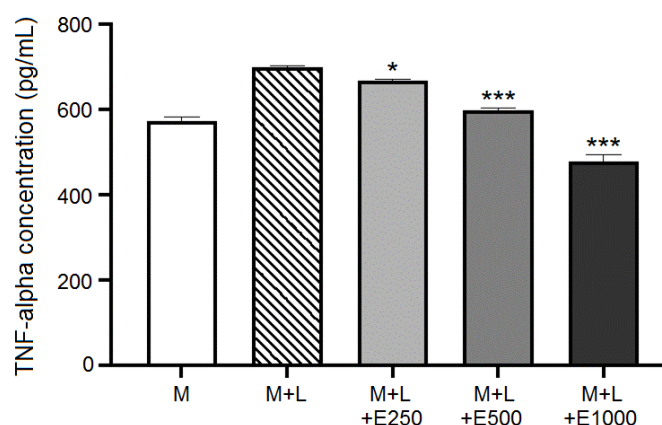


Figure 4 Inhibition of TNF-alpha production of Raw 264.7 macrophage by *C. viscosa* extract

(M = Raw 264.7 macrophage; L = Lipopolysaccharide;

E250, E500 and E1000 = *C. viscosa* extract with concentrations of 250, 500 and 1,000 $\mu\text{g/mL}$, respectively)

Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

* p<0.05; *** p<0.001 compared to the mean of M+L

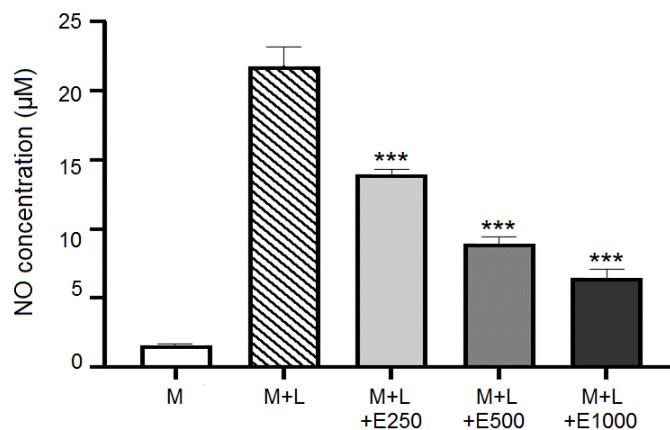


Figure 5 Inhibition of NO production of Raw 264.7 macrophage by *C. viscosa* extract

(M = Raw 264.7 macrophage; L = Lipopolysaccharide;

E250, E500 and E1000 = *C. viscosa* extract with concentrations of 250, 500 and 1,000 µg/mL, respectively)

Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 3).

*** p<0.001 compared to the mean of M+L

4. อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้ใช้เอทานอลร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารสกัดจากผักเสี้ยนผี เนื่องจากตัวทำละลายดังกล่าวมีความเหมาะสมกับการนำสารสกัดไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับมนุษย์ มีความเป็นพิษน้อย และสามารถแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดได้ง่าย ด้วยเหตุที่เอทานอลร้อยละ 70 เป็นตัวทำละลายที่มีช่วงปานกลาง ดังนั้นสารส่วนใหญ่ที่สกัดได้จึงเป็นสารกลุ่มที่มีขั้ว ละลายน้ำและแอลกอฮอล์ได้ดี

การศึกษานี้ใช้วิธีในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักเสี้ยนผี 3 วิธี คือ DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และนิยมใช้กันทั่วไปในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เป็นการทดสอบความสามารถของสารสกัดในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่ละลายได้ดีในสารละลายขั้วปานกลาง เช่น ตัวทำละลายในกลุ่มแอลกอฮอล์ ดังนั้นสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay จึงมักเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เน้นการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ เช่น สาร Kaempferol ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [23] ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay เป็นการทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์ (reduce) อนุมูลอิสระสังเคราะห์ (ferric-tripyridyltriazine; Fe^{3+} -TPTZ) เพื่อเป็นตัวแทนของ

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการทำลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ [24] การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ในร่างกาย เป็นการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระเปอร์ออกซี (peroxy) ยับยั้งการเกิดลิพิดเปอร์ออกซีเดชัน (lipid oxidation) ซึ่งเป็นภาวะที่บ่งบอกว่าร่างกายถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระ [25] การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay มักใช้กับสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล ได้ดี [23]

จากการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของผักเสี้ยนผีพบว่าผักเสี้ยนผีมีแอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ซาโปนิน และคูมาริน ผลที่ได้นี้เสริมข้อมูลจากงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่าทั้งต้นของผักเสี้ยนผีมีสารกลุ่ม flavone ได้แก่ naringenin glycoside เป็นองค์ประกอบ [26] ส่วนใบ พบสารกลุ่ม flavonol glycosides [27] นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบว่าสารสกัดผักเสี้ยนผีมีสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ ทำให้สารสกัดผักเสี้ยนผีแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักเสี้ยนผีจะเป็นสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ เนื่องจากสารทั้ง 2 กลุ่ม สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วต่ำกว่าน้ำ เช่น เอทานอล ได้ดี สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจำพวกที่มีฟีนอล (phenol) เป็นโครงสร้างหลัก โดยฟีนอลเป็น

สารที่มี aromatic ring ที่แทนที่ด้วย hydroxy group ซึ่งมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ ทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ ส่วนสารประกอบฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการให้ไฮโดรเจน และเปลี่ยนเป็น phenoxyl radical ซึ่ง phenoxyl radical สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ [23]

การศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดผักเสี้ยนผีมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้าง NO ซึ่ง NO จัดเป็นอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติเป็นสารชักนำการอักเสบ NO สังเคราะห์ขึ้นจาก arginine และโมเลกุลของออกซิเจนโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) โดย NO ที่สร้างขึ้นจากกระบวนการดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพของการอักเสบ [28] ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง NO อาจเป็นสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดผักเสี้ยนผีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิต PGE2 และ TNF-alpha ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้ก็เป็นสารชักนำการอักเสบ การที่สารสกัดผักเสี้ยนผีสามารถยับยั้งการผลิต PGE2 และ TNF-alpha ได้ จึงชี้ให้เห็นว่าสารสกัดดังกล่าวน่าที่จะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้

5. บทสรุป

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าผักเสี้ยนผีมีสารพฤกษเคมีหลากหลายชนิด ได้แก่ แอลคาลอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ซาโปนิน และคูมาริน นอกจากนี้สารสกัดของผักเสี้ยนผียังมีสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิต NO, PGE2 และ TNF-alpha ซึ่งเป็นสารที่สามารถชักนำให้เกิดการอักเสบได้ อย่างไรก็ตามการจะนำสารสกัดผักเสี้ยนผีไปใช้ประโยชน์จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึกต่อไป เพื่อเป็นข้อมูลในการยืนยันถึงฤทธิ์ต้านการอักเสบของผักเสี้ยนผี และเพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาผักเสี้ยนผีเป็นสมุนไพรในการรักษาโรคที่เกิดจากอนุมูลอิสระและการอักเสบต่อไป เช่น การศึกษากลไกการยับยั้งการอักเสบอื่น ๆ ในระดับโมเลกุล เช่น ความสามารถของผักเสี้ยนผีในการยับยั้งการแสดงออกของยีน iNOS และ COX-2 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และความสามารถของผักเสี้ยนผีในการยับยั้งการทำงานของ NF-kB ซึ่งเป็น transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา และสาขาแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย

7. References

- [1] Jittsomnuk, I. and Nacapunchai, D. 2021. Effectiveness of *Cleome viscosa* L. extract hydrogel on acne inflammation. **Research and Development Health System Journal**. 14(3): 111-124. (in Thai)
- [2] Ariyavechakul, P. 2017. Clinical Efficacy of *Cleome viscosa* L. Extract Spray for Upper Back Muscle Pain Relief. M.St. Thesis, Bansomdejchaopraya Rajabhat University. (in Thai)
- [3] Parimala Devi, B., Boomnathan, R. and Mandal, S.C. 2002. Evaluation of anti-diarrheal activity of *Cleome viscosa* L. extract in rats. **Phytomedicine**. 9(8): 739-742.
- [4] Suresh, Y. and et al. 2020. Antioxidant and antidiabetic properties of isolated fraction from methanolic extract derived from the whole plant of *Cleome viscosa* L. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**. 6: 103.
- [5] Bose, U. and et al. 2011. Antinociceptive, cytotoxic and antibacterial activities of *Cleome viscosa* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 21(1): 165-169.
- [6] Babu, V. and et al. 2023. Pharmacological and toxicological study of coumarinolignoids from *Cleome viscosa* in small animals for the management of rheumatoid arthritis. **Planta Medica**. 89(1): 62-71.
- [7] Poldee, N. and Tokaew, W. 2016. Local Wisdom of Medicinal Plants for Health Care in Ban Hin Haw Community Forest, Ban Phang District, Khon Kean Province. B.Sc. Research Report, Rajabhat Mahasarakham University. (in Thai)

- [8] Kumar, S. and et al. 1988. Cleomiscosin D, a coumarino-lignan from seed of *Cleome viscosa*. **Phytochemistry**. 27(2): 636-638.
- [9] Deora, M.A. and et al. 2023. Fatty acid composition of some minor seed oils from arid zone of Rajasthan. **Journal of the Indian Chemical Society**. 80(2): 141-142.
- [10] Koedkeao, K., Phanhun, T. and Sunthitikawinsakul, A. 2017. Analysis of antioxidant activity, total phenolics and total flavonoids contents of the extract from *Cleome viscosa* aerial parts. In: **Proceedings of the 14th National Research Conference of Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus**, 7-8 December 2017. Nakhon Pathom, Thailand. (in Thai)
- [11] Gupta, P.C., Sharma, N. and Rao, C.V. 2011. Comparison of the antioxidant activity and total phenolic, flavonoid content of aerial part of *Cleome viscosa* L. **International Journal of Phytomedicine**. 3: 386-391.
- [12] Swaminathan, C. 2017. Evaluation of antibacterial and antioxidant properties of *Cleome viscosa* L. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**. 7(4): 8473-8478.
- [13] Krongyut, O. and Wansutha, S. 2023. Effect of coffee ground extract on antioxidation, inhibition of alpha-amylase and lipase activities, and antiadipogenesis. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 25(1): 62-71. (in Thai)
- [14] Siddiqui, S. and et al. 2009. Preliminary phytochemicals analysis of some important medicinal and aromatic plants. **Advances in Biological Research**. 3(5-6): 188-195.
- [15] Intaranupakorn, R. 2004. **Phytochemical Screening and Extraction**. Bangkok: Chulalongkorn University Press. (in Thai)
- [16] Sithisarn, P., Rojsanga, P. and Kongkiatpaiboon, S. 2015. Antioxidant activity and antibacterial effects on clinical isolated *Streptococcus suis* and *Staphylococcus intermedius* of extracts from several parts of *Cladogynos orientalis* and their phytochemical screenings. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2015: 908242.
- [17] Duanyai, S. and et al. 2021. Antioxidant activities, total phenolic and total flavonoid contents of Trisamor Trisutthakula and Tripholsamutthan. **Journal of Traditional Thai Medical Research**. 7(2): 93-104. (in Thai)
- [18] Chewchinda, S., Kongkiatpaiboon, S. and Sithisarn, P. 2019. Evaluation of antioxidant activities, total phenolic and total flavonoid contents of aqueous extracts of leaf, stem, and root of *Aerva lanata*. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**. 18(3): 345-357.
- [19] Manok, S. and Limcharoen, P. 2015. Investigating antioxidant activity by DPPH, ABTS and FRAP assay and total phenolic compounds of herbal extracts in Ya-Hom Thepphachit. **Advanced Science**. 15(1): 106-117. (in Thai)
- [20] Nattha, P. and et al. 2021. Inflammatory response of raw 264.7 macrophage cells tested with dragon fruit oligosaccharide on lipopolysaccharide-induced inflammation. **Food Science and Technology Research**. 27(1): 111-119.
- [21] Chansuvarn, W., Panich, S. and Kuttiyawong, A. 2021. **Evaluation of Phytochemical Properties and Bioactive Potential of Hydrosol Water from Indian Marsh Fleabane for Skin Anti-Inflammation Product**. Research Report, Rajamangala University of Technology Phra Nakhon. (in Thai)

- [22] Obgami, K. and et al. 2003. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. 44(6): 2694-2701.
- [23] Paduka, W. and et al. 2021. Determination of active constituents and antioxidant activity of *Premna trichostoma* Miq. leaf extract. **RMUTP Research Journal**. 15(2): 118-129. (in Thai)
- [24] Halee, A. and Rattanapun, B. 2017. Study of antioxidant efficacies of 15 local herbs. **KMUTT Research and Development Journal**. 40(2): 283-293. (in Thai)
- [25] Doungporn, A. and et al. 2008. Antioxidant of *Sargassum polycystum* C. Agardh anti-oxidant activity of *Sargassum polycystum* C. Agardh. **Journal of Fisheries Technology Research**. 2(2): 96-103. (in Thai)
- [26] Srivastava, S.K., Chauhan, J.S. and Srivastava, S.D. 1979. A new naringenin glycoside from *Cleome viscosa*. **Phytochemistry**. 18: 2057-2058.
- [27] Phan, N.M. and et al. 2016. Two new flavonol glycosides from the leaves of *Cleome viscosa* L. **Phytochemistry Letters**. 18: 10-13.
- [28] Gunathilake, K.D.P.P., Ranaweera, K.K.D.S. and Rupasinghe, H.P.V. 2018. In vitro anti-inflammatory properties of selected green leafy vegetables. **Biomedicines**. 6(4): 107.