

ผลของสารสกัดจากใบและเมล็ดมะแฮะต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลอง

Effect of leave and seed extracts of pigeon pea on *in vitro* bioactivity

 ภัทรนภา นิมตระกุล¹
Pataranapa Nimtrakul¹

 ศรัญญา เหล่าวิทย์ยางค์กูร¹
Sarunya Laovitthayanggoon¹

 วรากร สองเมือง¹
Warakorn Songmuang¹

 ภัทรวดี เก่งกว่าสิงห์^{1*}
Pattarawadee Kengkwasingh^{1*}

¹ ศูนย์เชี่ยวชาญนวัตกรรมผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ปทุมธานี 12120

¹ Expert Centre of Innovative Herbal Products, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Pathum Thani 12120

 *Corresponding author: pattarawadee@tistr.or.th

ประวัติบทความ

รับเรื่อง: 14 พฤษภาคม 2567

ปรับแก้ไข: 21 ตุลาคม 2567

รับตีพิมพ์: 8 พฤศจิกายน 256

คำสำคัญ

สารสกัดมะแฮะ

ความเป็นพิษต่อเซลล์

ไนตริกออกไซด์

Article History

Received: 14 May 2024

Revised: 21 October 2024

Accepted: 8 November 2024

Keywords

Pigeon pea extracts

Cytotoxicity

Nitric oxide

บทคัดย่อ

ความเป็นมาและวัตถุประสงค์: อาหารเพื่อสุขภาพเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความนิยมในปัจจุบันและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกาย รวมทั้งการปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสารสกัดจากใบและเมล็ดมะแฮะเบื้องต้นในด้านพิษวิทยา โดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และด้านเภสัชวิทยา โดยการประเมินการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์

วิธีดำเนินการวิจัย: เตรียมสารสกัดโดยสกัดใบและเมล็ดมะแฮะด้วย 70% เอทานอล ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 ด้วย MTT assay ที่ 0.39–50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ด้วยชุด Griess reagent ที่ 0.39–1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการวิจัย: สารสกัดจากใบที่ความเข้มข้น 0.39–1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมล็ดที่ 0.39–12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และสารสกัดจากใบและเมล็ดที่ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ สูงกว่ากลุ่มควบคุมบวก ได้แก่ ยาต้านการอักเสบ (Diclofenac) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$)

สรุป: สารสกัดจากใบและเมล็ดมะแฮะที่ความเข้มข้น 0.39–1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และที่ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ สูงกว่ายาต้านการอักเสบ (Diclofenac) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวก ดังนั้น จึงสามารถนำสารสกัดนี้ไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ลดการอักเสบและเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน

การอ้างอิง

ภัทรนภา นิมิตระกุล, ศรัญญา เหล่าวิทยากร, วรากร สองเมือง และ ภัทรวดี เก่งกว่าสิงห์. 2568. ผลของสารสกัดจากใบและเมล็ดมะแฮะต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลอง. ว. วิทย. นวัตกรรม. 56(2): 88–96.

How to cite

Nimtrakul, P., S. Laovitthayanggoon, W. Songmuang and P. Kengkwasingh. 2025. Effect of leaf and seed extracts of pigeon pea on *in vitro* bioactivity. Agric. Sci. Innov. J. 56(2): 88–96.

Abstract

Background and Objective: Nowadays, healthy foods are a popular option, and they are continually being developed to enhance the immune system as well as to maintain immune balance. Additionally, bioactive compounds play a crucial role in product development due to their pharmacological activity. This study aimed to evaluate the preliminary efficacy of extracts from the leaves and seeds of pigeon peas in terms of toxicity to cultured cells and pharmacological properties through the assessment of nitric oxide inhibition.

Methodology: The extracts were prepared by extracting the leaves and seeds of pigeon pea with 70% ethanol. Cytotoxicity testing in the RAW 264.7 cell line was conducted using the MTT assay with concentrations ranging from 0.39 to 50 mg/mL. Nitric oxide inhibition was measured at concentrations of 0.39–1.56 mg/mL using the Griess reagent kit.

Main Results: The leaf extract at concentration ranging from 0.39 to 1.56 mg/mL and the seed extract at concentrations ranging from 0.39 to 12.5 mg/mL were non-cytotoxic to the RAW 264.7 cell line. Furthermore, both the leaf and seed extracts at 1.56 mg/mL significantly inhibited nitric oxide production more than the positive control, the anti-inflammatory drug (Diclofenac; $P < 0.01$).

Conclusions: Extracts from pigeon pea leaves and seeds, within the concentration range of 0.39 to 1.56 mg/mL, exhibited no cytotoxicity. At 1.56 mg/mL, these extracts demonstrated greater nitric oxide inhibition than anti-inflammatory drug (Diclofenac), the positive control. These findings suggest that the extracts have the potential to develop anti-inflammatory products and enhance the immune system.

บทนำ

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นระบบที่เปรียบเสมือนด่านแรกในการป้องกันร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้ามาทำอันตรายร่างกาย ซึ่งมีการศึกษาการนำสารสกัดจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมาใช้อย่างแพร่หลายในการทดสอบการปรับสมดุลระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น อาหารต้านการอักเสบที่ได้จากผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ที่มีการวางจำหน่ายอย่างแพร่หลายตามท้องตลาด หรืออาหารเสริมจากโปรตีนที่ได้จากปลา ไข่ หรือถั่ว ซึ่งได้จากวัตถุดิบทางธรรมชาติ (Department of Mental Health, 2022)

มะแฮะ เป็นพืชตระกูลถั่ว มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก มีอายุ 2–3 ปี สูง 1–5 เมตร มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Cajanus cajan* (Linn.) Millsp. เป็นพืชพื้นเมืองทางภาคเหนือและภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีความสามารถในการทนแล้ง เจริญเติบโตได้ดีในดินแทบทุกชนิด สามารถใช้ในการป้องกันการพังทลายของดินในเขตพื้นที่สูง และสร้างความสมบูรณ์แก่ดิน นอกจากนี้ ยังเป็นพืชที่อุดมไปด้วยโปรตีน มีกรดอะมิโนที่สำคัญ เช่น เมไทโอนีน ไลซีน และทริปซิน และมีคุณค่าทางอาหารสูง (Chaiwattanakul, 2015) ใช้เป็นพืชอาหารและทำผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่อยู่ในรูปยาแผนปัจจุบัน (Phytopharmaceuticals) มะแฮะมีคุณสมบัติต้านเภสัชวิทยา โดยสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด มีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ลดคอเลสเตอรอล รักษาอาการปวด รักษาภาวะลำไส้ทำงานผิดปกติ ลดภาวะการอักเสบ ยับยั้งการทำงานของแบคทีเรียบางชนิดได้ (Pal *et al.*, 2011) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Gargi *et al.*, 2022) เช่น

free radical scavenging (DPPH) และยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นการประเมินการมีชีวิตรอดของเซลล์เบื้องต้นโดยใช้วิธีการตรวจวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์ผ่านกลไกทางชีวเคมี ด้วยการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ภายในเซลล์ที่เกิดจากการกระตุ้นการเปลี่ยนสีของสาร ซึ่งวิธีที่นิยมมากที่สุดในการประเมินสารสกัดสมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ วิธีนี้คือ วิธี MTT assay (Ala *et al.*, 2018) โดยใช้ MTT มีชื่อทางเคมี คือ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide เป็นสารเคมีที่ใช้ตรวจวัดเอนไซม์ succinate dehydrogenase โดยการป้อนสาร MTT กับเซลล์ และใช้สารเคมี dimethyl sulfoxide (DMSO) ละลายผลึกของสารสีม่วง และวัดค่าดูดกลืนแสง เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Ala *et al.*, 2018)

นอกจากการทดสอบทางพิษวิทยาที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีการประเมินคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งไนตริกออกไซด์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Sharma *et al.*, 2007) ซึ่งมีรายงานว่าสารสกัดจากถั่วมะแฮะมีผลต่อการทำงานของสารอนุมูลอิสระในเซลล์เพาะเลี้ยง (Olubodun-Obadun *et al.*, 2023) อีกทั้งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม การนำผลผลิตจากถั่วมะแฮะสายพันธุ์พื้นเมือง เช่น ใบหรือเมล็ดที่ได้จากถั่วมะแฮะ มาทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยด้านเภสัชวิทยา เพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพนั้นมีค่อนข้างจำกัด ซึ่งหากผลผลิตจากถั่วมะแฮะมีคุณสมบัติสำคัญในกระบวนการทางเภสัชวิทยา เช่น การยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ ที่มีความสำคัญต่อการอักเสบของร่างกาย จะเป็นข้อมูลในการนำไปใช้เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อการส่งเสริมสุขภาพ

และสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรต่อไป โดยเฉพาะการผลิตมะแฮะสายพันธุ์พื้นเมืองให้แพร่หลายในประเทศไทย หากมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากมะแฮะแพร่หลายมากขึ้น จะส่งผลต่อความยั่งยืนทางเศรษฐกิจของชุมชนในอนาคต ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ (RAW 264.7) จากเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ของสารสกัดจากใบและเมล็ดของถั่วมะแฮะสายพันธุ์พื้นเมือง และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งปริมาณไนตริกออกไซด์ในเซลล์ เพื่อประเมินฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้นสำหรับการพัฒนานำสารสกัดจากใบและเมล็ดของถั่วมะแฮะนี้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมสารสกัดจากใบและเมล็ดของถั่วมะแฮะพันธุ์พื้นเมือง
วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองได้จากผลผลิตที่เพาะปลูกเพื่อการศึกษาในสถานีวิจัยลำตะคอง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา (Figure 1) ที่มีรอบการเพาะปลูกในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2565 และเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ ได้แก่ ใบและเมล็ดถั่วมะแฮะพันธุ์พื้นเมือง โดยคัดเลือกใบและเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ ปราศจากโรคและแมลง น้ำหนักสดใบ 5 กิโลกรัม และเมล็ด 1 กิโลกรัม ถูกนำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน และนำมาบดให้ละเอียด จากนั้น นำผงใบและเมล็ดมะแฮะน้ำหนัก 200 กรัม มาสกัดด้วย 70% เอทานอล 1 ลิตร ด้วยวิธีการให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพร (Percolation extraction) ซึ่งเป็นวิธีการสกัดสารแบบต่อเนื่อง (Figure 2) โดยนำผงใบและเมล็ดมะแฮะหมักกับ 70% เอทานอล เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อย ๆ บรรจุที่ละน้อยเป็นชั้น ๆ ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ แล้วเติมตัวทำละลายลงไปในระดับตัวทำละลายสูง

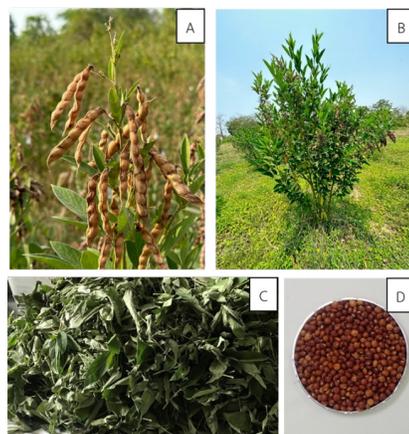


Figure 1 Pods (A), tree (B), leaves (C), and seeds (D) of the pigeon pea from Lamtakhong Research Station

เหนือสมุนไพโร (Solvent head) ประมาณ 0.5 เซนติเมตร วางที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออก โดย คอยเติม 70% เอทานอล ลงในตัวอย่างเพื่อไม่ให้ตัวอย่างแห้ง เมื่อ สกัดเสร็จสมบูรณ์แล้วจึงแยกกากออก นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมด รวมกันนำไปกรองเป็นเวลา 2 วัน จากนั้น นำของเหลวกรองด้วยผ้า ขาวบาง และนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยการระเหยแห้ง (Evaporation) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนตัวทำละลาย ระเหยหมด และนำสารสกัดที่ได้ (Figure 3) ซึ่งน้ำหนักเพื่อคำนวณ หา เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของกรรมวิธีการสกัด (%Yield) จากสูตร $\%Yield = (\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้} / \text{น้ำหนักแห้ง}) \times 100$

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity)

เพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7: Mouse macrophage cell line, ATCC® TIB-71™ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM 10% fetal bovine serum และ 1% Antibiotic antimycotic) ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂ จนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 80% ของพื้นที่ ขยายเซลล์ โดยใช้ cell scraper เพื่อแยกเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว เตรียมเซลล์ที่ ทดสอบให้มีความเข้มข้น 2 × 10⁵ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทดสอบการ รอดชีวิตของเซลล์โดยนำเซลล์ที่ความเข้มข้น 2 × 10⁵ เซลล์ต่อ มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยง 96 หลุม และบ่มเซลล์ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการบ่มทดสอบเซลล์ นำตัวอย่างทดสอบสารสกัดจาก ใบและเมล็ดมะแฮะละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ระดับ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และเจือจางตัวอย่างทดสอบในอาหารเลี้ยง เซลล์ (DMEM) ให้มีความเข้มข้น 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25,

12.5, 25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารละลายควบคุมเชิง บวก (Positive control) คือ 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สารละลายควบคุมเชิงลบ (Negative control) คือ อาหารเลี้ยง เซลล์ ซึ่งปริมาตรของตัวอย่างทดสอบ สารละลายควบคุมคือ 100 ไมโครลิตร โดยแต่ละกลุ่มทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ซึ่งได้จาก 3 หลุม ของงานเพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นการสุ่มตามแผนแบบบล็อกสมบูรณ์ เชิงสุ่ม (Randomized complete block design; RCBD) หลัง จาก 24 ชั่วโมง ตรวจวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์ โดยเปลี่ยนถ่าย อาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นการเติมสารละลาย MTT 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้น ดูดสารละลาย MTT ออก สำหรับ เซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสี MTT จากสีเหลืองเป็นสารไม่ละลายน้ำ สีม่วง แล้วใช้ DMSO ละลายสารสีม่วงออกจากเซลล์ และวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer) คำนวณและเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เทียบกับกลุ่มควบคุม = $100 \times \frac{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบ (OD570}_r\text{)} / \text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม (อาหารเลี้ยง เซลล์) (OD570}_m\text{)}}{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบที่ ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และ OD570}_m\text{}}$ คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืน

แสงของสารละลายควบคุม (อาหารเลี้ยงเซลล์)

สารทดสอบที่สัมผัสกับเซลล์แล้วทำให้เซลล์ตายและส่ง ผลให้ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุมต่ำกว่า 70% จัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์



Figure 2 Extraction of seeds and leaves of pigeon pea by using the percolation extraction method

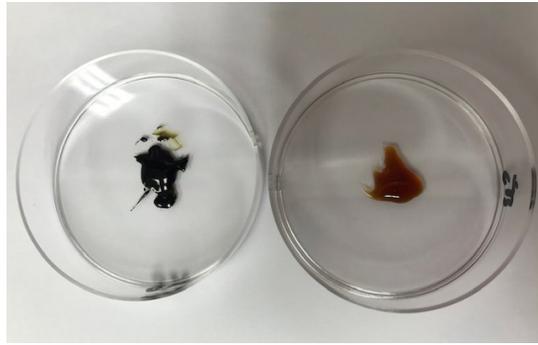


Figure 3 Pigeon pea leaves (Left) and seeds (Right) extracts

การยับยั้งปริมาณไนตริกออกไซด์

เตรียมเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7: Mouse macrophage cell line, ATCC® TIB-71™ ที่ความเข้มข้น 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง 96 หลุม และบ่มเซลล์ในตู้บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นอาหารเลี้ยงที่มีตัวอย่างทดสอบร่วมกับสารละลายไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตัวอย่างทดสอบละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร และเจือจางตัวอย่างทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ให้มีความเข้มข้น 0.39–1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารละลายควบคุมเชิงบวก (Positive control) คือ Diclofenac ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารละลายไลโปโพลีแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide; LPS) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลายควบคุมเชิงลบ (Negative control) คืออาหารเลี้ยงเซลล์ หลังจาก 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณไนตริกออกไซด์ ด้วยชุด Griess reagent kit ดังนี้ เตรียม nitrite standard reference curve โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานไนไตรต์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (1:1000) ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ จากนั้น เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100, 50, 25, 6.25, 3.13 และ 1.56 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ นำสารมาตรฐานในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ใส่ในหลุม 50 ไมโครลิตร (ในระดับความเข้มข้น 0 ไมโครโมลาร์ ไม่ใส่สารละลายมาตรฐานไนไตรต์) วิเคราะห์ปริมาณไนไตรต์ (Griess reagent) โดยนำสารละลาย sulfanilamide solution และ N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED solution) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15–30 นาที ใส่สารมาตรฐานความ

เข้มข้นต่าง ๆ หลุมละ 50 ไมโครลิตร (3 หลุม) โดยดูด sulfanilamide solution 50 ไมโครลิตร ใส่ทุกหลุม บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5–10 นาที ดูด NED solution 50 ไมโครลิตร ใส่ทุกหลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5–10 นาที ในที่มืด วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยวัดภายใน 30 นาที นำค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารมาตรฐาน และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน มาสร้างกราฟสารละลายมาตรฐาน โดยคำนวณค่า R² และสมการเพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณไนตริกออกไซด์ จากนั้น คำนวณปริมาณไนตริกออกไซด์โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบเทียบกับสมการจากกราฟสารมาตรฐาน และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ จากสมการดังนี้

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ =

$$\left(\frac{OD_{LPS} - OD_{sample}}{OD_{LPS} - OD_{control}} \right) \times 100$$

โดย OD_{LPS} คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร OD_{sample} คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของตัวอย่างทดสอบที่ความเข้มข้น 0.39, 0.78 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทดสอบร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ OD_{control} คือ ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม (อาหารเลี้ยงเซลล์)

การวิเคราะห์ผลด้วยสถิติ

นำผลการทดสอบประเมินความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 26 ด้วยวิธี Independent t-test ที่ P = 0.05 โดยมีจำนวนผลการทดสอบที่นำมาประเมินความแตกต่างจำนวน 3 ซ้ำ

ผลการทดลองและวิจารณ์

สารสกัดจากใบและเมล็ดของถั่วมะแฮะพันธุ์พื้นเมือง

จากการสกัดใบและเมล็ดของต้นถั่วมะแฮะพันธุ์พื้นเมือง ได้เปอร์เซ็นต์ผลลัพ์ของการสกัด (%Yield) น้ำหนักต่อน้ำหนัก ด้วยวิธีให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพร (Percolation extraction) ดังนี้ ใบมีค่า 5.18% และเมล็ดมีค่า 14.12% ในขณะที่การศึกษากการสกัดถั่วมะแฮะด้วยวิธีอัลตราซอ닉 (Ultrasonication) เป็นเวลา 40 นาที ด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล ให้ %Yield 16.55% (Lai *et al.*, 2012) ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณสารสกัดที่ได้จากการศึกษานี้ นอกจากนี้ มีงานวิจัยที่ใช้ 80% เอทานอล ในการสกัดเมล็ดมะแฮะ โดยสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และระเหยเอทานอลภายใต้สุญญากาศ (Evaporation) ซึ่งได้ %Yield ถึง 12.29% (Wu *et al.*, 2009) จะเห็นได้ว่า ตัวทำละลายและกระบวนการสกัดอาจส่งผลต่อ %Yield ของสารสกัดเมล็ดมะแฮะ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อ ประเมินประสิทธิภาพในการสกัดแต่ละประเภท

ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบและเมล็ดของถั่วมะแฮะพันธุ์พื้นเมือง

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นการ ทดสอบเพื่อประเมินความปลอดภัยเบื้องต้น ซึ่งเซลล์ที่ใช้ในการ ทดสอบในการศึกษานี้ คือเซลล์แมคโครฟาจ เนื่องจากเป็นเซลล์ ที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในการศึกษาทาง เภสัชวิทยาในขั้นตอนต่อไป และประเมินโดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มากกว่า 70% แสดงให้เห็นว่ามีความ ปลอดภัยต่อเซลล์ และสามารถประเมินความเข้มข้นที่สามารถนำ ไปทดสอบทางเภสัชวิทยาในลำดับถัดไป

ผลการนำสารสกัดที่ได้จากใบและเมล็ดจากถั่วมะแฮะ พันธุ์พื้นเมืองที่สกัดด้วยเอทานอล 70% ปริมาตรต่อปริมาตร มา ทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay จากการ วัดค่าดูดกลืนแสง พบว่า สารสกัดจากใบมะแฮะที่ความเข้มข้น 0.39, 0.78 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อ เซลล์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ $88.45 \pm 0.23\%$, $85.43 \pm 0.75\%$ และ $72.35 \pm 0.34\%$ ตามลำดับ และสารสกัด จากเมล็ดถั่วมะแฮะ ที่ระดับความเข้มข้น 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ 109.43 ± 1.04 , $99.78 \pm 1.56\%$, $97.66 \pm 1.15\%$, $96.28 \pm 1.20\%$, $90.52 \pm 1.81\%$, $85.54 \pm 2.57\%$ และ $73.02 \pm 2.03\%$ ตามลำดับ (Figure 4)

จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากเมล็ดถั่วมะแฮะมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ของเซลล์สูงกว่าสารสกัดจากใบ ซึ่งในขั้นตอนนี้เป็น การประเมิน ความปลอดภัยเบื้องต้นจากการพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษ ต่อเซลล์ ได้ใช้เกณฑ์ในการพิจารณาเมื่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ของเซลล์มากกว่า 70% แสดงว่า ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตาม มาตรฐานการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของเครื่องมือแพทย์ (ISO 10993-5) เพื่อให้สามารถเลือกความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อ เซลล์ไปศึกษาต่อทางเภสัชวิทยา ดังแสดงใน Figure 5 ซึ่งมีงาน วิจัยที่ศึกษาสารสกัดจากถั่วมะแฮะที่สกัดด้วยเอทานอล 50% พบ ว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัด 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความ เป็นพิษต่อเซลล์แมคโครฟาจ (Lai *et al.*, 2012)

นอกจากนี้ ในการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพร ต้องประเมินความปลอดภัย เพื่อเลือกความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อ เซลล์ โดยทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ (Sahlan *et al.*, 2021) ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์และฤทธิ์ในการยับยั้งการ อักเสบจากพืช *Tetragunula sapaiens* ที่ทดสอบในเซลล์ RAW264.7 ซึ่งเซลล์ทดสอบต้องผ่านการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ที่ร่วม ทดสอบกับตัวอย่างทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตมากกว่า 70% แสดงถึงความไม่ เป็นพิษต่อเซลล์

อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ต้องการนำสารสำคัญเพื่อ การใช้ในด้านเภสัชวิทยา โดยใช้ใบและเมล็ดมะแฮะพันธุ์พื้นเมือง ที่ได้จากการเพาะปลูกจากสถานีวิจัยลำตะคอง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายให้ไหลผ่านผง สมุนไพร ซึ่งเป็นการใช้วิธีที่สามารถดำเนินการผลิตได้ในอุตสาหกรรม คราวเรือนและขนาดย่อม มีขั้นตอนไม่ยุ่งยากและสามารถปฏิบัติ ได้จริงในกลุ่มเกษตรกรท้องถิ่น ดังนั้น เกษตรกรจึงสามารถนำ การ สกัดด้วยวิธีให้ตัวทำละลายไหลผ่านผงสมุนไพร (Percolation extraction) ไปประยุกต์ใช้เพื่อให้ได้สารสกัดจากใบและเมล็ดมะ แฮะที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 70% ในระดับ ความเข้มข้นของสารสกัดจากการทดลอง

การยับยั้งปริมาณไนตริกออกไซด์ของใบและเมล็ดถั่วมะแฮะ พันธุ์พื้นเมือง

ในการทดสอบการยับยั้งปริมาณไนตริกออกไซด์ พิจารณา เลือกความเข้มข้นที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่มีเปอร์เซ็นต์การ รอดชีวิตของเซลล์สูงกว่า 70% โดยเลือกระดับความเข้มข้นที่ 0.39, 0.78 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับเซลล์แมคโคร ฟาจ RAW 264.7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่า เฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดจากใบ และเมล็ดมะแฮะที่ระดับความเข้มข้น 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

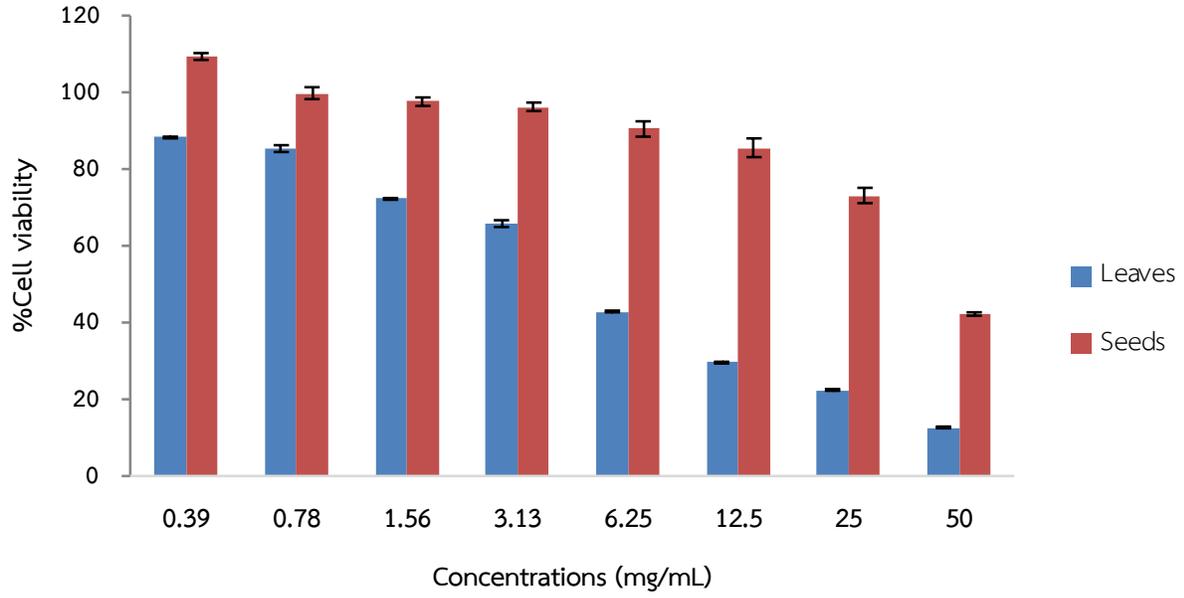


Figure 4 Percentage of cell viability of leaves and seeds on RAW 264.7 cell line by using MTT assay

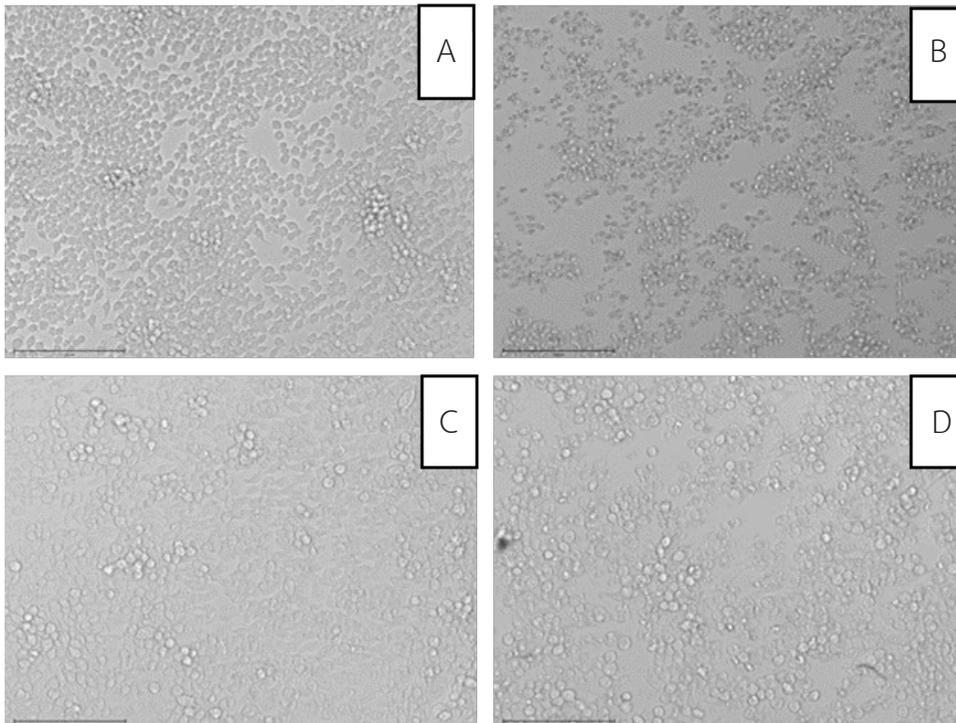


Figure 5 Morphology of RAW 264.7 cell line in control (Medium) group (A), positive control group (10% DMSO) (B), the treated group at 1.56 mg/mL of seeds extract (C), the treated group at 50 mg/mL of seeds extract (D)

สารสกัดจากใบมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์สูงกว่า สารสกัดจากเมล็ดมะแขว่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.037$) นอกจากนี้ ที่ระดับความเข้มข้น 0.78 และ 0.39 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร สารสกัดจากใบและเมล็ดมะแขว่นมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ไนตริกออกไซด์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($P = 0.000$ และ $P = 0.002$ ตามลำดับ) ดังแสดงใน Table 1 และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบการยับยั้งปริมาณไนตริก ออกไซด์ของสารสกัดจากใบและเมล็ดที่ระดับความเข้มข้น 0.39, 0.78 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (กลุ่มทดสอบ) กับกลุ่ม ควบคุมบวก (Diclofenac) ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาอาการอักเสบ พบว่า ทุกระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมบวก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งสารสกัดจากใบมะแขว่น ที่ระดับความเข้มข้น 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ การยับยั้งไนตริกออกไซด์สูงที่สุด โดยสามารถยับยั้งการสร้าง ไนตริกออกไซด์ได้ $89.45 \pm 2.12\%$ และที่ระดับความเข้มข้น เดียวกันของสารสกัดจากเมล็ด สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ได้ $67.40 \pm 3.01\%$ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมบวกเช่นกัน นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ของสารสกัด

จากใบที่ระดับความเข้มข้น 0.39 และ 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับกลุ่มควบคุมบวก พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($P = 0.000$ และ $P = 0.012$ ตามลำดับ) ในขณะที่ ความเข้มข้นระดับเดียวกันของสารสกัดจากเมล็ดมีผลยับยั้งปริมาณ ไนตริกออกไซด์เช่นกัน ($P = 0.001$ และ $P = 0.001$ ตามลำดับ) สรุปได้ว่าสารสกัดจากใบมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างไนตริกออก ไซด์สูงกว่าสารสกัดจากเมล็ด (Table 1)

ไนตริกออกไซด์เป็นโมเลกุลที่ส่งสัญญาณซึ่งมีบทบาท สำคัญในการเกิดการอักเสบและให้ผลด้านการอักเสบภายใต้สภาวะ ทางสรีรวิทยาปกติ ในทางกลับกันหากมีการผลิตไนตริกออกไซด์ มากเกินไปจะก่อให้เกิดการอักเสบได้ (Evans, 1995; Abramson, 2008) ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า สารสกัดจากใบและเมล็ดมะแขว่นมี แนวโน้มในการลดการอักเสบ (Anti-inflammatory) เนื่องจาก สามารถยับยั้งปริมาณไนตริกออกไซด์ได้มากกว่า 70% ที่ความ เข้มข้น 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยความสามารถในการยับยั้ง ปริมาณไนตริกออกไซด์ของสารสกัดมะแขว่นนี้ จะมีประโยชน์ใน การใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการรักษาโรคที่เกิดจากการอักเสบ ต่อไป

Table 1 Effect of leaves and seed extractions on the percentage of nitric oxide inhibition in RAW 264.7 cell line

| Concentrations (mg/mL) | Percentage of nitric oxide inhibition (%) | |
|---|---|---------------------------|
| | Leaves | Seeds |
| 0.39 | $16.80 \pm 0.81^c, *, **$ | $6.99 \pm 1.78^c, *, **$ |
| 0.78 | $55.37 \pm 2.08^b, *, **$ | $24.68 \pm 1.88^b, *, **$ |
| 1.56 | $89.45 \pm 2.12^a, *, **$ | $67.40 \pm 3.01^a, *, **$ |
| Diclofenac 50 μ g/mL (Positive control) | 48.57 ± 0.57 | |

Mean values followed by different superscript letters (a, b, c) indicate significant differences within a column, while * indicates differences between columns and ** indicates differences compared with the positive control. Values are presented as mean \pm standard deviation.

สรุป

ใบและเมล็ดจากมะแขว่นสายพันธุ์พื้นเมืองที่สกัดด้วย เอทานอล 70% ด้วยวิธีการใช้ตัวทำละลายให้ไหลผ่านผงสมุนไพร (Percolation Extraction) ได้เปอร์เซ็นต์ผลฤทธิ์ของกรรมวิธีการ สกัดจากเมล็ด 14.12% ซึ่งสูงกว่าใบที่มีค่า 5.18% และผลการ ทดสอบการรอดชีวิตของเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 พบว่า สารสกัดใบมะแขว่นที่ 0.39–1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมล็ด 0.39–12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เป็นพิษต่อเซลล์

ส่วนผลการยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ พบว่า สารสกัดจากใบ และเมล็ดที่ความเข้มข้น 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้ง การสร้างไนตริกออกไซด์ สูงกว่ากลุ่มควบคุมบวกที่เป็นยาต้านการ อักเสบ (Diclofenac) จากการศึกษาสารสกัดจากใบและเมล็ด สามารถนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ลดการอักเสบและเสริมสร้าง ภูมิคุ้มกันได้ โดยการเลือกใช้สารสกัดจากใบที่ความเข้มข้น 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบสูงที่สุด และในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดมีฤทธิ์ดีกว่ายาต้านการอักเสบ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ปฏิบัติการทดสอบ ณ ห้องปฏิบัติการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง อาคารเภสัชวิทยาและพิษวิทยา และผลผลิตจากถั่วมะแฮะ ใบและเมล็ดจากการเพาะปลูกที่สถานีวิจัยลำตะคอง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) คณะผู้วิจัยขอ

ขอบคุณ วว. ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือในการทดสอบและสถานที่ และขอขอบคุณทุนวิจัยจากการสนับสนุนงบประมาณวิจัยประจำปีงบประมาณ 2565–2566 จากโครงการวิจัยและพัฒนาการทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของผลิตผลจากถั่วมะแฮะพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทยเพื่อปรับสมดุลระบบภูมิคุ้มกัน รหัสโครงการ 6618103050

เอกสารอ้างอิง

- Abramson, S.B. 2008. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10(Suppl. 2): S2. <https://doi.org/10.1186/ar2463>.
- Ala, A.A., B.B. Olotu and C.M.D. Ohia. 2018. Assessment of cytotoxicity of leaf extracts of *Andrographis paniculata* and *Aspilia africana* on murine cells *in vitro*. *Arch. Basic Appl. Med.* 6(1): 61–65.
- Chaiwattanakul, S. 2015. Pigeon pea. Available Source: http://r07.idd.go.th/Web/15_KM/manula-maha.pdf, January 2, 2024. (in Thai)
- Department of Mental Health. 2022. The 5 nutrients for a healthy immune system against viruses. Available Source: <https://dmh.go.th/news-dmh/view.asp?id=30757>, January 2, 2024. (in Thai)
- Evans, C.H. 1995. Nitric oxide: What role does it play in inflammation and tissue destruction?. *Agents Actions Suppl.* 47: 107–116. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7343-7_9.
- Gargi, B., P. Semwal, S.B.J. Pasha, P. Singh, S. Painuli, A. Thapliyal and N. Cruz-Martins. 2022. Revisiting the nutritional, chemical and biological potential of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *Molecules.* 27(20): 6877. <https://doi.org/10.3390/molecules27206877>.
- Lai, Y.S., W.H. Hsu, J.J. Huang and S.C. Wu. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effects of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) extracts on hydrogen peroxide- and lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages. *Food Funct.* 3(12): 1294–1301. <https://doi.org/10.1039/C2FO30120B>.
- Olubodun-Obadun, T.G., I.O. Ishola, C.A. Osumuo and O.O. Adeyemi. 2023. Standardized seed extract of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Produced antinociceptive and anti-inflammatory actions through inhibition of inflammatory mediators and activation of opioidergic signaling. *Phytomed. Plus.* 3(4): 100483. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2023.100483>.
- Pal, D., P. Mishra, N. Sachan and A.K. Ghosh. 2011. Biological activities and medicinal properties of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2(4): 207–214. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.90874>.
- Sahlan, M., K.F. Mahira, D.K. Pratami, R. Rizal, M.J. Ansari, K.M. Al-Anazi and M.A. Farah. 2021. The cytotoxic and anti-inflammatory potential of *Tetragonula sapiens* propolis from Sulawesi on raw 264.7 cell lines. *J. King Saud. Univ. Sci.* 33(2): 101314. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101314>.
- Sharma, J.N., A. Al-Omran and S.S. Parvathy. 2007. Role of nitric oxide in inflammatory disease. *Inflammopharmacol.* 15(6): 252–259. <https://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>.
- Wu, N., K. Fu, Y.J. Fu, Y.G. Zu, F.R. Chang, Y.H. Chen, X.L. Liu, Y. Kong, W. Liu and C.B. Gu. 2009. Antioxidant activities of extracts and main components of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Molecules.* 14(3): 1032–1043. <https://doi.org/10.3390/molecules14031032>.