

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบ
ของสารสกัดจากสมุนไพรในพิกัตตรีสาร

Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content, Antioxidant and Anti-inflammatory
Activities of Extracts of Herbs in Trisarn Recipe

กัญฐิกา เส้นเศษ นัยนา พลพิทักษ์ รัชฎาวรรณ อรรคนิมาตย์ และ ปราณี ศรีราช*

Kantika Sensed Naiyana Phonpituk Ratchadawan Aukkanimart and Pranee Sriraj*

สาขาวิชาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร สกลนคร 47160 ประเทศไทย
Department of Thai Traditional Medicine, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan
Sakon Nakhon Campus, Sakon Nakhon 47160, Thailand

*E-mail: jeerapan.t@nsru.ac.th

Received: Sep 05, 2024

Revised: Oct 24, 2024

Accepted: Oct 28, 2024

บทคัดย่อ

พิกัตตรีสารเป็นตำรับสมุนไพรที่ประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ รากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าพหลู และเถาสะค้าน นิยมใช้เป็นยาปรับธาตุในฤดูหนาว งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากสมุนไพรในพิกัตตรีสาร การเตรียมสารสกัดพิกัตตรีสาร และสารสกัดสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบของพิกัตตรีสารทำโดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใช้วิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดใช้เทคนิค Folin-Ciocalteu method และ Aluminium chloride colorimetric assay ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบใช้การประเมินความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยลิโปลิแซคคาไรด์ ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด โดยวิธี DPPH assay และวิธี ABTS assay มีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.02 ± 1.72 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50.58 ± 5.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และโดยวิธี FRAP มีค่า FRAP value เท่ากับ 568.43 ± 21.62 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 586.72 ± 17.14 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม และ 109.35 ± 4.54 มิลลิกรัมสมมูลของเคอซิทินต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ สำหรับการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบ พบว่า สารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 35.78 ± 1.58 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบที่ดีที่อาจนำไปใช้ประโยชน์ได้

คำสำคัญ: พิกัตตรีสาร ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

Abstract

Trisarn recipe is an herbal recipe consisting of 3 herbs including *Plumbago indica* L. root, *Piper sarmentosum* Roxb. root and *Piper ribesoides* Wall. Stem. It is commonly used as an adaptogen in the winter season. This research aimed to examine total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts of herbs in Trisarn recipe. Trisarn recipe extract and extracts of individual herbal component of Trisarn recipe were prepared by using 95% ethanol as a solvent. Antioxidant activity of the extracts was examined using DPPH assay, ABTS assay and FRAP assay. Total phenolic content and total flavonoid content of

the extracts were analyzed by Folin-Ciocalteu method and aluminium chloride colorimetric assay, respectively. Anti-inflammatory activity of the extracts was conducted by assessing the ability of the extracts to inhibit the release of nitric oxide of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. The results revealed that *P. indica* root extract exhibited the highest antioxidant activity. It IC₅₀ values from DPPH assay and ABTS assay were $24.02 \pm 1.72 \mu\text{g/mL}$ and $50.58 \pm 5.59 \mu\text{g/mL}$, respectively and its FRAP value was $568.43 \pm 21.62 \text{ mM FeSO}_4$ equivalent/g extract. Furthermore, it was found that *P. indica* root extract had the highest total phenolic content and total flavonoid content of $586.72 \pm 17.14 \text{ mg gallic acid equivalent/g extract}$ and $109.35 \pm 4.54 \text{ mg quercetin equivalent/g extract}$, respectively. For anti-inflammatory activity examination, it was found that *P. indica* root extract exhibited the most potent inhibitory effect on the release of nitric acid with the IC₅₀ value of $35.78 \pm 1.58 \mu\text{g/mL}$. This study demonstrates that *P. indica* root extract is a promising antioxidant and anti-inflammatory agent that may be of potential use.

Keywords: Trisam recipe, Total phenolic content, Total flavonoid content, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity

1. บทนำ

การแพทย์แผนไทยเป็นภูมิปัญญาทางสุขภาพที่มีความหลากหลายและสืบทอดกันมาหลายชั่วอายุคน ในบรรดาสมุนไพรต่าง ๆ "พิกัดตรีสาร" เป็นหนึ่งในตำรับยาที่สำคัญเป็นยาประจำหมื่นตฤณ (ฤดูหนาว) มีสรรพคุณทางการแพทย์แผนไทย แก้วตะ เสมหะ ปิตตะ วาตะในกองธาตุ ฤดู อายุ และกองสมุฏฐาน ช่วยกระจายเลือดลม แก้อาตุพิการ ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ใช้สมุนไพรตำรับพิกัดตรีสารปรับความสมดุลในร่างกายช่วงฤดูหนาว พิกัดตรีสารประกอบด้วยสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ รากข้าวหลาม (Piper sarmentosum Roxb.) อยู่ในวงศ์ Piperaceae เถาะสะค้าน (Piper ribesoides Wall.) อยู่ในวงศ์ Piperaceae และรากเจตมูลเพลิงแดง (Plumbago indica Linn.) อยู่ในวงศ์ Plumbaginaceae รากเจตมูลเพลิงแดงมีสารกลุ่ม Benzenoid กลุ่ม Carbohydrate เช่น Leucodelphinidin และกลุ่ม Quinoids เช่น Plumbagin [1] ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง [2] ด้านแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด [3] ข้าวหลามมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ ด้านแบคทีเรีย ลดระดับน้ำตาลในเลือด ยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อ และยังมีสารเบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) ที่ช่วยยับยั้งเซลล์มะเร็ง [4] มีสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) รวมทั้งมีสารแทนนิน (Tannins) แอลคาลอยด์ (Alkaloids) และแอนทราควิโนน (Anthraquinones) ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอักเสบ ช่วยลดไข้ บรรเทาอาการปวดท้อง และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในร่างกาย [5] สะค้านมีสรรพคุณช่วยบรรเทาอาการท้องอืดท้องเฟ้อ ช่วยขับลมในลำไส้ ช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบย่อยอาหาร [6] อีกทั้งยังช่วยรักษาโรคหอบหืด บรรเทาอาการท้องเสีย อาการเจ็บแน่นหน้าอก และรักษาโรคลมพิษอีกด้วย [7]

การอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการทางชีวภาพที่ร่างกายตอบสนองต่อการบาดเจ็บ การติดเชื้อ หรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย [8] การอักเสบเป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันที่มีหน้าที่ป้องกันและซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหาย [9] การใช้สมุนไพรในการรักษาอาการอักเสบเป็นวิธีการที่มีมายาวนานและเป็นส่วนหนึ่งของการแพทย์ทางเลือกที่ได้รับความนิยมมาเป็นเวลานานในหลายวัฒนธรรมสมุนไพรหลายชนิดมีสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) ซึ่งช่วยบรรเทาอาการและส่งเสริมการรักษาโดยส่งผลข้างเคียงน้อยกว่าการใช้ยาแผนปัจจุบัน [10]

สารอนุมูลอิสระ (Free radicals) คือ อะตอมโมเลกุลหรือไอออนที่ไม่เสถียรซึ่งสามารถทำลายเซลล์หรือรบกวนระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้ โดยอนุมูลอิสระอาจเกิดได้จากกระบวนการต่าง ๆ ของร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการเผาผลาญสารอาหาร หรือได้รับมาจากภายนอกร่างกาย เช่น มลภาวะ รังสีวิทย สารพิษจากบุหรี่ เป็นต้น ในภาวะที่ร่างกายได้รับอนุมูลอิสระในปริมาณมากจะทำให้ร่างกายเกิดภาวะเครียด (Oxidative stress) และอาจนำไปสู่การเกิดภาวะหรือโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน โรคทางระบบประสาท และการอักเสบ [11] นอกจากนี้การบริโภคอาหารที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระเป็นส่วนหนึ่งของการรักษาสุขภาพที่ดี และช่วยป้องกันการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเซลล์

พืชสมุนไพรในพิกัดตรีสารมีลักษณะเด่น คือ มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณสูง ซึ่งส่งผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) เป็นหนึ่งในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลักในสมุนไพรพิกัดตรีสาร ซึ่งมี

คุณสมบัติ เช่น ด้านมะเร็ง เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน และต้านแบคทีเรีย [12] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดจากสมุนไพรมะเขือเทศเป็นส่วนประกอบในพิกัดตรีสาร เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการต่อยอดไปสู่การประยุกต์ใช้ในด้านทางการแพทย์และสุขภาพในอนาคตต่อไป

2. วิธีศุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. ตัวอย่างพืชสมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ประกอบไปด้วย รากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าวพุลู และเถาสะค้าน และตำรับพิกัดตรีสาร สั่งซื้อในเดือน ธันวาคม 2566 จากร้านเจริญสุข โอสด จังหวัดนครปฐม ซึ่งเป็นร้านขายยาสมุนไพรที่ได้มาตรฐาน Good Agricultural Practice (GAP)

2.2. การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

นำสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ รากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าวพุลู เถาสะค้าน และตำรับพิกัดตรีสาร ไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดยาแบบอ่างลูกกลิ้ง จากนั้นชั่งสมุนไพรเดี่ยวอย่างละ 500 กรัม และตำรับตรีสารเตรียมโดยนำสมุนไพรเดี่ยวที่บดละเอียดแล้วอย่างละ 500 กรัม มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1 ตามลำดับ นำมาบรรจุลงในถังดำที่บดแสง จากนั้นเติม 95% เอทานอล ปริมาณ 2.5 ลิตร (สำหรับสมุนไพรเดี่ยว) และ 7.5 ลิตร (สำหรับพิกัดตรีสาร) ในอัตราส่วนสมุนไพรต่อตัวทำละลาย 1:5 ปิดฝาถังให้มิดชิด และไม่ให้โดนแสงแดดทำการหมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำการเขย่าผสมให้เข้ากัน ทุกวัน เขย่าเย็น เมื่อครบกำหนด นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 จากนั้นทำการระเหยตัวทำละลาย ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่ความดัน 100 มิลลิบาร์ (Millibar) ความเร็ว 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดที่เหนียวข้น นำมาใส่ในภาชนะที่บดแสง เพื่อคงคุณสมบัติสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง [13] โดยร้อยละผลผลิตของสารสกัดสมุนไพร (% Yield) คำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ Yield} = (A/B) \times 100$$

เมื่อ

A = น้ำหนักของสารสกัดสมุนไพรที่สกัดได้

B = น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้สกัดเริ่มต้น

2.3. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH assay

เตรียมสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าวพุลู เถาสะค้าน และพิกัดตรีสาร ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 1, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 95% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย [14] การทดลองนี้ใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน เติมนลงใน 96-well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเติมนสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่ที่บดแสงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 517 นาโนเมตร [15] ด้วยเครื่อง Microplate reader และนำค่าที่วัดได้ไปหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% Radical scavenging) ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Radical scavenging} = [1 - (AA - AB)/AC] \times 100$$

เมื่อ

AA = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกับ DPPH

AB = ค่าการดูดกลืนแสงของ blank ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด

AC = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH กับเอทานอล

จากนั้นนำค่า % Radical scavenging ที่ได้ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ไปสร้างกราฟ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรในการต้านอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀)

2.4. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS assay

เตรียมสารละลาย ABTS (2,2-Azino-bis-ethylbenzothiazoline-sulfonic acid) ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ ผสมสารละลายทั้งสองในอัตราส่วน 1 : 0.5 ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ในที่ที่บดแสงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าวพุลู เถาสะค้าน และพิกัดตรีสาร ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 1, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน เติมนสารสกัดลงใน 96-well plates ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลาย ABTS⁺ ที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่ที่บดแสง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร [14] และนำค่าที่วัดได้ไปหาร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% Radical scavenging) ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Radical scavenging} = [1 - (AA - AB)/AC] \times 100$$

เมื่อ

AA = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกับ ABTS

AB = ค่าการดูดกลืนแสงของ blank ของแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด

AC = ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS กับเอทานอล

จากนั้นนำค่า % Radical scavenging ที่ได้ และค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ไปสร้างกราฟ เพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรในการต้านอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀)

2.5. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP assay

การเตรียมสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidant power) reagent โดยการผสมสาร Acetate buffer pH 3.6 (300 มิลลิโมลาร์) สาร FeCl₃ (20 มิลลิโมลาร์) และสาร TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) ในสารละลาย HCl (40 มิลลิโมลาร์) ในอัตราส่วน 10:1:1 ตามลำดับ เตรียมสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าพญู เกาสะค่าน และพิกัดตรีสาร ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 95% เอทานอล เป็นตัวทำละลาย จากนั้นเติมสารสกัดสมุนไพร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลาย FRAP reagent 80 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate นำไปบ่มไว้ในที่ที่บ่มแสงเป็นระยะเวลา 4 นาที ที่อุณหภูมิห้องนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร [14] นำผลการทดลองที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate และคำนวณให้อยู่ในหน่วยของ มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด (mM FeSO₄ equivalent/g extract)

2.6. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ใช้เทคนิค Folin-Ciocalteu method เทียบกับสารมาตรฐานคือ Gallic acid โดยนำสารตัวอย่างความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมนลงใน 96-well plate จากนั้นเติมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 7.5% Sodium carbonate (Na₂CO₃) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณ

ที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg gallic acid equivalent; mg GAE/g extract) [16]

2.7. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content) ใช้เทคนิค Aluminium chloride colorimetric assay เทียบกับสารมาตรฐานคือ Quercetin โดยนำสารตัวอย่างความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติมนลงใน 96-well plate จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 125 ไมโครลิตร และ 5% NaNO₂ ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ในที่ที่บ่มแสง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาเติม 10% Aluminum chloride (AlCl₃) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่ที่บ่มแสง 5 นาที เติมน้ำกลั่น NaOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 27.5 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณที่ได้แสดงในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลของเคอควิทินต่อกรัมสารสกัด (mg Quercetin equivalent, mg QE/g extract) [17]

2.8. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์แมคโครฟาจ

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์แมคโครฟาจ (Macrophage) โดยใช้วิธี Sulforhodamine B assay โดยใช้ Indomethacin เป็นสารมาตรฐาน เติมน้ำกลั่นเซลล์แมคโครฟาจ Raw 264.7 ลงใน 96-well plate (1x10⁵ cells/well) จากนั้นเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก เติมน้ำกลั่น 10% TCA (Trichloroacetic acid) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างออกด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อแห้งสนิทแล้วนำเซลล์ที่ได้มาย้อมด้วย 0.4% SRB (Sulforhodamine B) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีด้วย 1% acetic acid ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 mM Tris base pH 8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ซึ่งค่า

การดูดกลืนแสงที่ได้จะบ่งบอกการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ นำค่าที่วัดได้มาคำนวณร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต (% Cell viability) ตามสูตรดังนี้ [18]

$$\% \text{ Cell viability} = (\text{OD test} / \text{OD control}) \times 100$$

เมื่อ

OD test = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ RAW 264.7 ที่ใส่สารสกัด

OD control = ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ RAW 264.7 ที่ไม่ได้ใส่สารสกัด

2.9. การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Anti-inflammatory activity) ของสารสกัดสมุนไพร ทำโดยการทดสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) ซึ่งเป็นสารสื่อกลางของการอักเสบ (inflammation mediator) ในการทดลองนี้ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kalaiselvan and Rasool [19] โดยเพาะเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจ Raw 264.7 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin, streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ L-glutamine 200 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงเซลล์ในตู้ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส Subculture ทุก ๆ 2 วัน เมื่อเซลล์เจริญเติบโตหนาแน่นร้อยละ 80 นำมาทดสอบ โดยการเติมเซลล์ Raw 264.7 ลงใน 96-well plate (1x10⁵ cells/well) นำไปบ่มไว้ที่สภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาดูดส่วนใสออก จากนั้นเติม Lipopolysaccharide (LPS) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะการอักเสบ พร้อมกับสารสกัดสมุนไพร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเลี้ยงอยู่ในตู้บ่ม 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ออกมาไว้ที่ 96-well plate ใหม่ และเติม Griess reagent (modified) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาร้อยละของการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ (% Inhibition) ตามสูตรต่อไปนี้ และ

คำนวณหาค่า IC₅₀ โดยใช้ Program Prism การทดลองนี้ใช้ Indomethacin เป็นสารมาตรฐาน

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

เมื่อ

A = หลุมที่มีการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS เพียงอย่างเดียว

B = หลุมที่มีการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS และเติมสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

C = หลุมที่มีการเติมสมุนไพรเพียงอย่างเดียว

2.10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าพูลูเถาสะค่าน และพิกัดตรีสาร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยใช้สถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล คือ One-way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS ฉบับสมบูรณ์ 19.0 โดยมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ($p < 0.05$) รายงานเป็นค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ standard deviation)

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

3.1. สารสกัดสมุนไพรในพิกัดตรีสาร

จากการเตรียมสารสกัดจาก รากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าพูลูเถาสะค่าน และตำรับพิกัดตรีสาร โดยวิธีการหมักกับตัวทำละลาย 95% เอทานอล พบว่าสมุนไพรที่ให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดสมุนไพร (% Yield) มากที่สุด คือ รากเจตมูลเพลิงแดง รองลงมาคือ พิกัดตรีสาร รากข้าพูลูเถาสะค่าน โดยมีค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดสมุนไพร เท่ากับ 18.82, 5.92, 5.06 และ 3.24 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Yield percentages of the extracts

Extract	% Yield
<i>P. indica</i> root extract	18.82
<i>P. sarmentosum</i> root extract	5.06
<i>P. ribesoides</i> stem extract	3.24
Trisarn recipe extract	5.92

3.2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรใช้วิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือ DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสารสกัดสมุนไพร และสารมาตรฐาน Trolox แสดงใน Table 2

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay เป็นวิธีวัดความสามารถในการเป็นสารกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับอนุมูลอิสระ DPPH[•] ภายในเวลา 10-30 นาที [14] โดยสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ Trolox นิยมรายงานผลเป็นค่า IC₅₀ ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 โดยผลการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay ของสารมาตรฐาน Trolox มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 19.0 ± 1.44 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต่าง ๆ พบว่า สารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดพิกัดตรีสาร เกาสะค่าน และรากข้าวฟ่าง โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 24.02 ± 1.72 , 42.88 ± 1.67 , 44.06 ± 0.70 และ 51.80 ± 3.79 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2)

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay เป็นวิธีการทดสอบด้วยการนำสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดมาทำปฏิกิริยากับ ABTS^{•+} ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระ โดยใช้หลักการวัดการหายไปของอนุมูลอิสระที่สัมพันธ์กับการลดลงของการดูดกลืนแสง ซึ่งข้อดีของการทดสอบด้วยวิธีนี้ คือ สามารถทดสอบได้ทั้งสารที่ละลายในน้ำและละลายในไขมัน [14] โดยการศึกษาพบว่า ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน

Trolox มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 26.52 ± 3.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต่าง ๆ พบว่าสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดพิกัดตรีสาร เกาสะค่าน และรากข้าวฟ่าง โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 50.58 ± 5.59 , 67.90 ± 3.93 , 91.08 ± 9.11 และ 112.73 ± 3.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 2)

การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox reaction) และตรวจสอบการเปลี่ยนสีของสารประกอบเชิงซ้อนจาก (Fe₃³⁺-TPTZ) เป็น (Fe₃²⁺-TPTZ) โดยสีจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงินม่วง [14] ผลการศึกษา พบว่าสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดพิกัดตรีสาร รากข้าวฟ่าง และเกาสะค่าน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 568.43 ± 21.62 , 460.03 ± 19.20 , 405.23 ± 9.87 และ 378.36 ± 10.91 มิลลิโมลาร์สมมูลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ

จากการศึกษานี้พบว่าสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี คือ DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay

Table 2 Antioxidant activity of the extracts analyzed by DPPH, ABTS and FRAP assays

Extract	IC ₅₀ (μg/mL) from DPPH	IC ₅₀ (μg/mL) from ABTS	FRAP value (mM FeSO ₄ equivalent/g extract)
<i>P. indica</i> root extract	24.02 ± 1.72^b	50.58 ± 5.59^b	568.43 ± 21.62^d
<i>P. sarmentosum</i> root extract	51.8 ± 3.794^d	112.73 ± 3.28^e	405.23 ± 9.87^{ab}
<i>P. ribesoides</i> stem extract	44.06 ± 0.72^c	91.08 ± 9.11^d	378.36 ± 10.91^a
Trisarn recipe extract	42.88 ± 1.67^c	67.90 ± 3.93^c	460.03 ± 19.20^c
Trolox	19.09 ± 1.444^a	26.52 ± 3.91^a	-

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Mean values followed by different superscripts within a column are significantly different ($p < 0.05$).

3.3. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพร

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้เทคนิค Folin-Ciocalteu method ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดพิกัดตรีสารเจตมูลเพลิงแดง รากข้าวฟ่าง เกาสะค่าน และพิกัดตรีสาร เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน

กรดแกลลิก (Gallic acid) ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($R^2 = 0.9989$) โดยมีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.0365x + 0.0001$ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดพิกัดตรีสาร เกาสะค่าน และรากข้าวฟ่าง โดยมีปริมาณเท่ากับ 586.72 ± 17.14 , 418.15 ± 24.48 , 370.58 ± 39.81 และ $267.56 \pm$

7.34 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด เมื่อเปรียบเทียบผลของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในพิกัดตรีสารพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3)

จากงานวิจัยที่ผ่านมามีรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีความสามารถในการให้อะตอมไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่เสถียรไม่สามารถทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกยังสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ จึงช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระในร่างกาย [20]

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าพหลู เกาสะค่าน และพิกัดตรีสาร เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานเคอควิซีน (Quercetin) ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($R^2 = 0.9991$) โดยมีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.0365x - 0.0001$ ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดพิกัดตรีสาร เกา

สะค่าน และรากข้าพหลู โดยมีปริมาณเท่ากับ 109.35 ± 4.54 , 102.53 ± 3.76 , 98.53 ± 7.37 และ 73.7 ± 4.72 มิลลิกรัมสมมูลของเคอควิซีนต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในพิกัดตรีสารพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 3)

ฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกชนิดหนึ่ง มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน ฟลาโวนอยด์สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ โดยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) บนโครงสร้างของฟลาโวนอยด์มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระได้ดี ทำให้อนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายสูญเสียโครงสร้างและถูกกำจัดออกจากร่างกาย [12]

นอกจากสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์แล้วสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในพิกัดตรีสารยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น Plumbagin ที่พบในรากเจตมูลเพลิงแดง [1], [21] แทนนิน (Tannins) แอลคาลอยด์ (Alkaloids) และแอนทราควิโนน (Anthraquinones) ที่พบในใบข้าพหลู [5] เป็นต้น

Table 3 Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) of the extracts

Extract	TPC	TFC
	(mg GAE/g extract)	(mg QE/g extract)
<i>P. indica</i> root extract	586.72 ± 17.14^e	109.35 ± 4.54^c
<i>P. sarmentosum</i> root extract	267.56 ± 7.34^a	73.7 ± 4.72^a
<i>P. ribesoides</i> stem extract	370.58 ± 39.81^c	98.53 ± 7.37^b
Trisarn recipe extract	418.15 ± 24.48^d	102.53 ± 3.76^{bc}

mg GAE/g extract = mg gallic acid equivalent/g extract; mg QE/g extract = mg quercetin equivalent/g extract

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Mean values followed by different superscripts within a column are significantly different ($p < 0.05$).

3.4. ความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์แมคโครฟาจ

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าพหลู เกาสะค่าน และพิกัดตรีสาร ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยพิจารณาจากร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต (% Cell viability) เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรต่าง ๆ คือ 1, 5, 10, 20, 40, 60,

80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้สารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ Raw 264.7 (Figure 1) ในการทดลองนี้ใช้ Indomethacin เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้สารดังกล่าวที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบ (50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ Raw 264.7 เช่นกัน

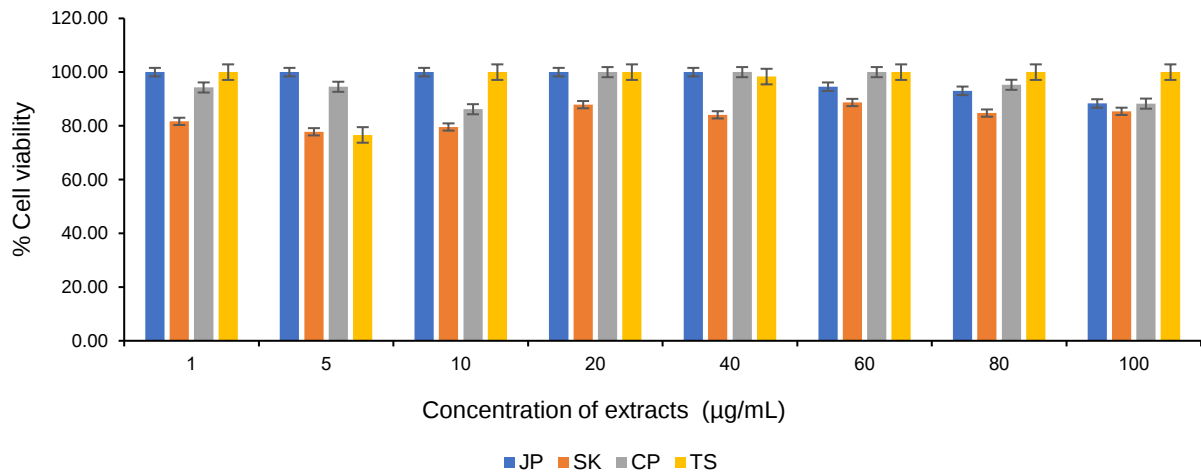


Figure 1 Cytotoxicity of the extracts on RAW 264.7 cells

JP = *P. indica* root extract, SK = *P. ribesoides* stem extract,

CP = *P. sarmentosum* root extract, TS = Trisarn recipe extract

3.5.ฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ของสารสกัดสมุนไพร

จากการศึกษานี้พบว่า สารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดพิกัดตรีสาร รากข้าพญู และเถาสะค้าน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 35.78 ± 1.58 , 40.12 ± 1.78 , 68.97 ± 1.56 และ 72.15 ± 1.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงสารมาตรฐาน Indomethacin ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.12 ± 1.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 4)

จากการวิเคราะห์ฟลักซ์เคมีของเจตมูลเพลิงแดงที่ผ่านมา พบว่า สาร Plumbagin แอลคาลอยด์ (Alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซาโปนิน (Saponin) โกลโคไซด์

(Glycoside) และแทนนิน (Tannin) มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ สามารถยับยั้งการผลิตไซโตไคน์ (Cytokines) และสารสื่อกลาง (Mediators) ที่มีบทบาทในการส่งสัญญาณให้เกิดการอักเสบ เช่น $TNF-\alpha$, IL-6 และ IL-1 β [22] นอกจากนี้ยังมีผลต่อการลดการสร้างอนุมูลอิสระจำพวก Reactive oxygen species (ROS) [23] มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ NF-KB ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ (Transcription factor) ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ สาร Plumbagin มีผลต่อการลดกระบวนการอักเสบ สามารถยับยั้งการกระตุ้น NF-KB ทำให้ลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น COX-2 และ iNOS [5]

Table 4 Inhibition of nitric oxide (NO) production and cytotoxicity of the extract

Extract	IC_{50} (µg/mL) for NO release inhibition
<i>P. indica</i> root extract	35.78 ± 1.58^b
<i>P. sarmentosum</i> root extract	68.97 ± 1.56^d
<i>P. ribesoides</i> stem extract	72.15 ± 1.35^e
Trisarn recipe extract	40.12 ± 0.78^c
Indomethacin	22.12 ± 1.02^a

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

Mean values followed by different superscripts within a column are significantly different ($p < 0.05$).

4. บทสรุป

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และปริมาณสารพฤกษเคมี ซึ่งได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ของสารสกัดเอทานอลจากพิกัดตรีสาร และสมุนไพรที่เป็นส่วนประกอบในพิกัดตรีสาร ซึ่งได้แก่ รากเจตมูลเพลิงแดง รากข้าวพู่ และเถาสะค้าน จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดังกล่าวด้วยวิธี DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay พบว่า สารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ที่พบว่าสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยการตรวจสอบความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์จากเซลล์ RAW 264.7 ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยลิโปลิแซคคาไรด์ เนื่องจากไนตริกออกไซด์เป็นสารสื่อกลางของการอักเสบ ดังนั้นหากสารสกัดสามารถยับยั้งไม่ให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์ได้ ก็จะสามารถยับยั้งการอักเสบได้ จากการศึกษาพบว่าสารสกัดรากเจตมูลเพลิงแดงเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบดีที่สุด งานวิจัยนี้ทำให้ทราบข้อมูลเบื้องต้นว่าสารสกัดใดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ดี หากต้องการนำไปพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางยาควรศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ มหาลัยเทคโนโลยีราชมงคล อีสาน วิทยาเขตสกลนคร ที่สนับสนุนให้ความสะดวกในการใช้อาคารสถานที่ รวมถึงอุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ ในการดำเนินการวิจัย

6. References

- [1] Nair, S.V. and et al. 2016. Antimicrobial activity of plumbagin, a naturally occurring naphthoquinone from *Plumbago rosea*, against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**. 306(4): 237-248.
- [2] Roy, A. 2021. Plumbagin: A potential anti-cancer compound. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. 21(6): 731-737.
- [3] Petrocelli, G. and et al. 2023. Plumbagin, a natural compound with several biological effects and anti-inflammatory properties. **Life**. 13(6): 1303.
- [4] Sun, X. and et al. 2020. *Piper sarmentosum* Roxb.: A review on its botany, traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**. 263: 112897.
- [5] Hafizah, A.H. and et al. 2010. *Piper sarmentosum* as an antioxidant on oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells induced by hydrogen peroxide. **Journal of Zhejiang University-Science B**. 11(5): 357-365.
- [6] Sireeratawong, S. and et al. 2012. Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of the ethanol extract of *Piper interruptum* Opiz. and *Piper chaba* Linn. **ISRN Pharmacology**. 2012: 480265.
- [7] Salleh, W.M. and et al. 2014. Anticholinesterase and antityrosinase activities of ten piper species from malaysia. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. 4(2): 527-231.
- [8] Arulselvan, P. and et al. 2016. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2016: 5276130.
- [9] Roe, K. 2021. An inflammation classification system using cytokine parameters. **Scandinavian Journal of Immunology**. 93(2): e12970.
- [10] Wang, Y. and et al. 2021. Traditional herbal medicine: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**. 279: 114368.
- [11] Wickens, A.P. 2001. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**. 128(3): 379-391.

- [12] Foss, K. and et al. 2022. Antioxidant activity and profile of phenolic compounds in selected herbal plant. **Plant Foods for Human Nutrition**. 77(3): 383-389.
- [13] Samuhasaneeto, S. and Yusakul, G. 2021. Modulatory effects of Benjakul extract on rat hepatic cytochrome P450 enzymes. **Heliyon**. 7(11): e08498.
- [14] Turapra, B. and et al. 2016. Determination of active constituents and antioxidative activity in *Citrus maxima* (Burm.) Merr. **Isan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 11(Suppl.): 80-91. (in Thai)
- [15] Dunkhunthod, B. and Sittisart, P. 2022. Antioxidant activity and cytotoxicity against human cancer cell lines of the aqueous leaf extracts of *Smilax luzonensis*, *Hoya kerrii* and *Derris elliptica*. **Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University**. 24(2): 1-11. (in Thai)
- [16] Ashafa, A.O. and et al. 2010. In vitro antioxidant activity of extracts from the leaves of *Felicia muricata* thunb. An underutilized medicinal plant in the Eastern Cape Province, South Africa. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**. 7(4): 296-302.
- [17] Yee, L.S. and et al. 2023. Optimization of total phenolic content, total flavonoid content and anti-gout properties of polyherbal formulation. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**. 20(4): 772-778.
- [18] Skehan, P. and et al. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**. 82(13): 1107-1112.
- [19] Kalaiselvan, S. and Rasool, M.K. 2016. Triphala herbal extract suppresses inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and adjuvant-induced arthritic rats via inhibition of NF-KB pathway. **Journal of Immunotoxicology**. 13(4): 509-525.
- [20] Kahkonen, M.P., Hopia, A.I. and Heinonen, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49(8): 4076-4082.
- [21] Tripathi, S.K., Panda, M. and Biswal, B.K. 2019. Emerging role of plumbagin: Cytotoxic potential and pharmaceutical relevance towards cancer therapy. **Food and Chemical Toxicology**. 125: 566-582.
- [22] Nobori, T. and et al. 1994. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. **Nature**. 368(6473): 753-756.
- [23] Dang, G.K. and et al. 2011. Antiinflammatory activity of *Phyllanthus emblica*, *Plumbago zeylanica* and *Cyperus rotundus* in acute models of inflammation. **Phytotherapy Research**. 25(6): 904-908.