

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการคัดกรองความเป็นพิษต่อเซลล์
ของสารสกัดจากคราม

**Antioxidant Activities and Cytotoxicity Screening of the Extracts
from Indigo (*Indigofera tinctoria*)**

ญาดา พูลเกษม, สมจิต ดำริห์อนันต์ และนิรมล ศากยวงศ์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

จิรดา สิงขรรัตน์

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

Yada Poonkasem, Somchit Damrianant and Niramol Sakayawong*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Center

Jirada Singkhonrat

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Center

Received: February 15, 2022 ; Accepted: July 18, 2022

บทคัดย่อ

สารสกัดเอทานอลแบบชอกซ์เลตจากส่วนต่าง ๆ ของคราม (*Indigofera tinctoria*) ได้แก่ ใบแก่ ใบอ่อน และเมล็ด ได้นำไปศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คัดกรองความเป็นพิษต่อเซลล์ และวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC) โดยวิธีโฟลิน-ซีโอแคลทู (Folin-Ciocalteu) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก พบว่าสารสกัดใบแก่และใบอ่อน มีปริมาณ TPC สูง คือ 12.34 ± 2.59 และ 12.90 ± 3.13 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ การต้านอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดเมล็ดมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (ferric reducing antioxidant power, FRAP) สูงคือ 135.21 ± 15.16 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่างแห้ง และมีค่า IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) ต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl) เท่ากับ 0.23 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์เบื้องต้นของสารสำคัญในสารสกัดด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) พบ รุทีน (rutin) ควอร์เซทิน (quercetin) เคมเฟอรอล (kaempferol) และ อะพิจินิน (apigenin) ในสารสกัดใบแก่และใบอ่อน และพบ รุทีน กรดแกลลิก (gallic acid) และ อีพิกาทาชิน (epicatchin) ในสารสกัดเมล็ด การคัดกรองความเป็นพิษของสารสกัดใบแก่ ใบอ่อน และ เมล็ด ต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblasts-adult, HDFa) มีค่า ED₅₀ (half maximal effective dose) เป็น 1.14×10^3 , 1.55×10^3 และ 4.26×10^3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตามลำดับ สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของคราม นี้ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หรืออาหารสุขภาพได้

คำสำคัญ : คราม; *Indigofera tinctoria*;ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; การคัดกรองความเป็นพิษต่อเซลล์

Abstract

Antioxidant activities and cytotoxicity screening of the ethanol extracts from different parts of Indigo (*Indigofera tinctoria*) including mature leaves, immature leaves and seeds, were investigated. All samples were prepared by Soxhlet extractions with absolute ethanol. Total phenolic content (TPC) by Folin-Ciocalteu method and radical scavenging analyses by DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl) and FRAP (ferric reducing antioxidant power) were employed. The levels of TPC were high in the crude extracts from mature and immature leaves, 12.34 ± 2.59 and 12.90 ± 3.13 mg GAE/g dried weight, respectively, while antioxidant activity by FRAP was increased in that from the seeds, 135.21 ± 15.16 $\mu\text{mol/g}$ dried weight. The IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) values by DPPH were low in the seed extracts, 0.23 ± 0.10 mg/mL. The major compounds in the extracts were further identified by thin layer chromatography (TLC). The leaf extracts were displayed to contain rutin, quercetin, kaempferol, and apigenin. In addition, epicatchin and gallic acid were unveiled in the seed extracts. Cytotoxic assays to human dermal fibroblasts-adult (HDFa) shown by ED_{50} (half maximal effective dose) values, in the extracts from mature leaves, immature leaves and seeds were 1.14×10^3 , 1.55×10^3 and 4.26×10^3 $\mu\text{g/mL}$, respectively. It is suggested that the ethanol extracts from Indigo possess a valuable aspect to be developed as a potential phytomedicine.

Keywords: Indigo; *Indigofera tinctoria*; antioxidant activity; cytotoxicity screening

1. บทนำ

พืชที่ให้สีคราม (indigo) สามารถพบได้ทั่วไปในประเทศเขตร้อนทั่วโลก พืชสกุล *Indigofera* วงศ์ Leguminosae มีแหล่งกระจายอยู่ในทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกาใต้ฝั่งตะวันตก และเอเชียเกือบทั้งหมด สีครามที่พบญี่ปุ่น เกาหลี และจีนคือ *Polygonum tinctorium* วงศ์ Polygonaceae ซึ่งเรียกว่าครามจีน (Chinese indigo) หรือครามญี่ปุ่น (Japanese indigo) สำหรับสีครามแถบยุโรปและกลุ่มสแกนดิเนเวียจะเป็น *Isatis tinctoria* วงศ์ Cruciferae มีชื่อเรียกทั่วไปว่าวูด (woad) สำหรับในประเทศไทยกลุ่มพืชที่ให้สีครามจะมีหลายวงศ์

เช่น คราม (Leguminosae) ช่อมหรือช่อมเมือง (Acanthaceae) ครามเถา (เป็ก) (Asclepiadaceae) ครามน้ำ (Euphorbiaceae) และครามป่า (Verbenaceae) ลักษณะทั่วไปจะเป็นไม้พุ่มเล็กหรือไม้เลื้อย ยืนต้นหรือล้มลุกแตกต่างกันไป ครามส่วนมากจะอยู่ในวงศ์ Leguminosae สกุล *Indigofera* ซึ่งมีหลายสายพันธุ์กระจายทั่วประเทศและมีชื่อเรียกเฉพาะแต่ละท้องถิ่น เช่น ครามดอยภาคเหนือ (*Indigofera elliptica* Roxb. S) ครามขนเชียงใหม่ (*Indigofera hirsuta* Linn. H) โสนนกนกรสวรรค์ (*Indigofera siamensis* Hoss. S) ไฟสะเม่า-ลำพูน (*Indigofera sootepensis* Craib S) คราม

ใหญ่-อุบลราชธานี (*Indigofera suffruticosa* Mill. US/S) คราม-สามัญทั่วไป (*Indigofera tinctoria* Linn.) และ ครามช้าง-แม่ฮ่องสอน (*Indigofera zollingeriana* Mig.) (Sakonkakhon Rajabhat University, 2017) ต้นครามได้รับความนิยมในการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายมานับศตวรรษ เนื่องจากการมีมูลค่าสำคัญในการเป็นแหล่งของสีอินดิโก (indigo dye) หรือสีครามธรรมชาติ (indigo naturalis) โดยแรกเริ่มนั้นชาวอินเดียโบราณมีการใช้สีครามดั้งเดิม แล้วมีการถ่ายทอดการใช้สีนี้ไปยังจีนโดยผ่านเปอร์เซีย ในราชวงศ์ถังมีการนำสีครามไปใช้ในเครื่องสำอาง ซึ่งต่อมาแพทย์จีนได้ค้นพบว่าครามสามารถดัดใช้ ลดพิษในเลือด สลายรอยช้ำเลือดได้ หลังจากนั้นจนถึงปัจจุบันจะเห็นได้ว่าการนำครามไปใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่องและมากขึ้น ทั้งทางด้านการเป็นสีครามโดยตรง การเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง และการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ (Qi-Yue *et al.*, 2020)

ในการทำสีครามธรรมชาตินี้มีรายละเอียดกลไกการสร้างสีครามและขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากการนำต้นครามมาแช่น้ำจนเน่าภายใต้การหมักของจุลินทรีย์ที่มาจากต้นครามเอง ทำให้สารอินโดไกลโคไซด์ (indole glycosides) หรือกลูโคไซด์อินดิแคน (glucoside indican) และเอนไซม์พอลิกลูโคไซด์เลส (endogenous polyglucosidases) ถูกปล่อยออกมา โดยเอนไซม์นี้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอินโดไกลโคไซด์ ได้เป็นอินโดลฟีโนล (indole phenol) หลังจากนั้นนำเอาส่วนของต้นครามออกแล้วเติมปูนขาวลงไปเพื่อปรับสภาพ อินโดลฟีโนลรวมตัวกับออกซิเจนทำให้เกิดอนุมูลอิสระอินโดลฟีโนลในสภาวะเบส ซึ่งบางส่วนจะเปลี่ยนต่อเป็นอินดิโก-บลู (indigo-blue) ให้สีคราม แต่บางส่วนจะถูกออกซิไดส์ต่อเป็น อินโดลคีโตน (indole ketone) ซึ่งจะรวมกับอินโดลฟีโนล ได้เป็นอินไดรูบิน (indirubin) ในเวลาเดียวกันนั้นแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในปูนขาวจะทำ

ปฏิกิริยากับคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้เกิดตะกอนแคลเซียมคาร์บอเนตที่จะดูดซับสีอินดิโก อินไดรูบิน และสารอื่นๆ และเมื่อสะสมมากขึ้นจะตกตะกอนได้เป็นครามธรรมชาติ ซึ่งจะมีกระบวนการแยก ทำให้บริสุทธิ์ และทำแห้งเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป (Yu *et al.*, 2021) สีธรรมชาติโดยทั่วไปจะไม่เสถียรเมื่อมีการเกิดออกซิเดชันด้วยแสง (photooxidation) โดยเฉพาะแสงยูวีหรืออัลตราไวโอเลต (UV light) สีครามธรรมชาติไม่ได้ทำหน้าที่เพียงเป็นฉากรับแสง แต่มีส่วนเกี่ยวข้องในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางอย่างระหว่างโมเลกุล ซึ่งมีความคล้ายกับความเสถียรของสีธรรมชาติในเนื้อเยื่อพืชผักและผลไม้ (Li *et al.*, 2012) ทำให้ในปัจจุบันการใช้สีครามธรรมชาติได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายทั่วโลก ด้วยความมีเอกลักษณ์ของสีและสมบัติพิเศษในการป้องกันแสงยูวี

นอกจากนี้ภูมิปัญญาไทยและยาแผนโบราณในหลายประเทศถือว่าครามเป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำทั้งราก ลำต้น และ ใบครามซึ่งมีรสขมไปใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ใช้ฆ่าเชื้อโรค แก้ไข้ ตัวร้อน ไข้ชัก แก้อักเสบ แก้ปวด หอบหืด ดับพิษ ขับปัสสาวะ ขับน้ำ ลดบวม ต้านพิษ เป็นต้น (Saraswathi *et al.*, 2012; Laurie, 2015) ครามธรรมชาติยังได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ทั้งในอุตสาหกรรมสิ่งทอและเครื่องสำอาง โดยใช้สีครามเป็นสีรองพื้นในการย้อมสีผม เพื่อให้ได้สีที่เข้มข้นจากสีธรรมชาติ (Sunsanee & Thomas, 2009) เนื่องจากสีครามไม่มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและไม่พบการแพ้ในผิวหนังมนุษย์ (Steingruber, 2004) นอกจากการให้สีครามแล้วยังพบสารพฤษเคมีและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ในสารสกัดจากต้นคราม การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าครามมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านแบคทีเรีย (antibacterial) ต้านไวรัส (antiviral) และ มีสมบัติ

เป็นสารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) (Senthilkumar & Venkatesalu, 2009; Qi-Yue *et al.*, 2020) และใช้เป็นยารักษาอาการทางประสาท บรรเทาอาการปวดแผลที่เกิดในบริเวณเยื่ออ่อน และช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ (Asuntha *et al.*, 2010) สารสกัดจากครามมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟีนอล (phenols) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และ โรทีนอยด์ (rotenoids) ซึ่งเป็นกลุ่มของพฤษเคมีที่มีสรรพคุณทางยาและฤทธิ์ทางชีวภาพ (Sharma & Agarwal, 2015) เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารที่ช่วยต่อต้านหรือกำจัดอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่เป็นสาเหตุของโรคหลายชนิดรวมทั้งการบั่นทอนสุขภาพและความเสื่อมของร่างกาย เช่น โรคหัวใจ และหลอดเลือด และมะเร็งชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (Halliwell, 2009) สารสกัดจากใบครามพบว่าสามารถต้านจุลินทรีย์ในกลุ่มของเชื้อก่อโรค ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella paratyphi* B, *Enterobacter aerogenes* และ *Klebsiella pneumoniae* เป็นต้น (Swaminathan, 2018) ทำให้มีการนำสารสกัดครามไปใช้ทางการแพทย์ เช่น การรักษาโรคมะเร็ง และสะเก็ดเงิน และลำไส้อักเสบ (Renukadevi & Sultana, 2011; Qi-Yue *et al.*, 2020) ข้อมูลจากการสืบค้นสิทธิบัตรที่มีในปัจจุบันพบว่าประเทศไทยมีการใช้สารสกัดจากใบครามเป็นส่วนประกอบหนึ่งของผลิตภัณฑ์ดูแลรักษาเส้นผม โดยจะทำให้เส้นผมเป็นสีดำเงา และป้องกันเส้นผมต่อการทำลายของรังสียูวี จดทะเบียนสิทธิบัตรโดยยูนิลีเวอร์ เอ็น.วี. และประเทศญี่ปุ่น ได้นำสารสกัดจากครามใช้เป็นสารส่งเสริมการผลิตเซราไมด์ และสารให้ความชุ่มชื้น จดทะเบียนสิทธิบัตร โดยคาโอ คอร์ปอเรชั่น เป็นต้น

ต้นครามเป็นพืชสมุนไพรที่สามารถใช้ประโยชน์จากแทบจะทุกส่วน (Srinivasan *et al.*, 2016) โดยใช้เอทานอลเป็นสารสกัดทำให้ได้สารสำคัญมากกว่าการใช้สารสกัดอื่นๆ (Asuntha *et al.*, 2010; Heo *et al.*, 2014; Udornsun *et al.*, 2020) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกครามที่ปลูกเป็นส่วนใหญ่ในประเทศไทยคือ คราม-สามัญทั่วไป (*Indigofera tinctoria* Linn.) ที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ใบแก่ ใบอ่อน และเมล็ด ทั้งนี้จะใช้วิธีการสกัดโดยวิธีสกัดแบบซอกซ์เลต (Soxhlet extraction) ซึ่งคาดว่าจะมีผลได้ของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสกัดมากกว่าการสกัดทั่วไป การตรวจสอบสมบัติจะทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC) และตรวจสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (ferric ion reducing antioxidant power assay) และ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay) และตรวจวิเคราะห์จำแนกสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) และสุดท้ายการคัดกรองความเป็นพิษ (cytotoxicity screening) ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของมนุษย์ (HDFa) ด้วยวิธี SRB (Sulforhodamine B) เพื่อแสดงความปลอดภัยในการนำครามไปประยุกต์ใช้และพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

2. วิธีการ

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

เมล็ดพันธุ์ครามได้รับความอนุเคราะห์จากชาวบ้าน ตำบลป่าโหล อำเภอดงเจริญ จังหวัดสกลนคร ถูกนำมาเพาะปลูกที่ห้องปฏิบัติการ ชั้น 4 อาคารเรียนและปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี เมื่อครบเวลา 1 เดือน มีการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่สมบูรณ์เป็นธรรมชาติ ไม่มีตำหนิ ได้แก่ ใบอ่อน ใบแก่ และเมล็ด โดยพิจารณาจากไม่มีรอยเจาะแมลงและไม่มีเชื้อรา สำหรับใบต้องไม่เหลืองหรือฉีกขาด ชิ้นส่วนความต่าง ๆ ที่เก็บได้จะนำไปตากแห้ง เป็นเวลา 7 วัน แล้วบดโดยเครื่องปั่นเอนกประสงค์ (Philips รุ่น HR2061) บดความเร็วสูงสุดจนละเอียดเป็นเวลา 2 นาที และคัดแยกขนาดด้วยตะแกรงร่อน (sieve) 50 เมช (mesh) เก็บใส่ถุงซิปล็อคเพื่อป้องกันความชื้น ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส



Figure 1 Soxhlet extraction

2.2 การสกัดความด้วยวิธีซอกซ์เลต

ซึ่งตัวอย่างใบอ่อน ใบแก่ และเมล็ด โดยใช้ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม) ต่อปริมาตรของตัวทำละลาย (มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:50 ลงในทิมเบิล (cellulose extraction thimble) ขนาด 33x100 มิลลิเมตร ปริมาณ 5.5 ± 0.001 กรัม นำไปประกอบเข้ากับชุดสกัดซอกซ์เลต (Figure 1) ดำเนินการสกัดด้วยเอทานอล 250 มิลลิลิตร โดยสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ในขวดกลม (boiling flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ในแต่ละครั้งให้มีการไหลแลกเปลี่ยนไหลเวียนตัวทำ

ละลาย 3 รอบ สารละลายที่ได้จากการสกัดจะนำไป ตั้งระเหยในตู้ดูดไอสารเป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างที่ได้ในหลอดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC) ได้ทำการตรวจวัดด้วยวิธีโฟลิน-ซิโอะ แคล - ทู (Folin-Ciocalteu) (ดัดแปลงจาก Sinchaiyakit *et al.*, 2012) สารละลายโฟลิน-ซิโอะ แคลทูความเข้มข้นร้อยละ 10 โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิกให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมตัวอย่างสารที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยเจือจางสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้น สุดท้ายเป็น 0.13, 0.25, 0.50 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตต์สารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายโฟลินซิ โอะ-แคลทูปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาทีในที่มืด เติมสารละลาย โซเดียมคาร์บอเนต 1,200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้า กันตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด จากนั้นนำสารผสมไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 731 นาโน เมตร (OD_{731}) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD_{731} (แกน Y) และค่าความเข้มข้นของสาร มาตรฐานกรดแกลลิก (แกน X) นำค่าการดูดกลืน แสงของสารละลายตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน กรดแกลลิก

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ดัดแปลงจาก Sinchaiyakit *et al.*, 2012) เตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) ความเข้มข้น 0.08 มิลลิโมลาร์ สารละลายมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายวิตามินซีในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH 900 ไมโครลิตร หลอดควบคุมให้ใส่ตัวทำละลายสารตัวอย่างลงไป 100 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองทั้งหมดตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (OD_{515}) คำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามสมการ (1) และรายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 หรือ IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) ใน หน่วย มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบค่าที่ได้กับสารมาตรฐานวิตามินซี

ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ = $[1 - (OD_{515} \text{ ตัวอย่าง} / OD_{515} \text{ ควบคุม})] \times 100$ (1)

2.5 การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก

การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกของสารต้านอนุมูลอิสระ หรือ FRAP (ferric reducing antioxidant power, ดัดแปลงจาก Sinchaiyakit *et al.*, 2012) เตรียมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.28 มิลลิโมลาร์ โดยซังโซเดียมอะซิเตท 2.3 กรัมละลายในกรดอะซิติก 7.6 มิลลิลิตร ปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน และปรับพีเอชเท่ากับ 3.6 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ โดยปี

เปตต์สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 12 โมลาร์ 0.33 มิลลิลิตรปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็น 100 มิลลิลิตรเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เตรียมสารละลาย TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine) โดยซัง 0.0319 กรัมละลายด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ 10 มิลลิลิตร นำไปละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน เตรียมสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์ โดยซังสารเฟอริกไตรคลอไรด์น้ำหนัก 0.3244 กรัมละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน เตรียมสารละลาย FRAP โดยนำสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 3.6 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรมาทำปฏิกิริยากับ TPTZ 10 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอริกไตรคลอไรด์ 10 มิลลิลิตรในอัตราส่วน 10:1:1 จากนั้นคนให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้งาน

การเตรียมกราฟมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต ทำโดยซังเฟอรัสซัลเฟต 0.3 กรัมละลายในน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร คิดเป็นความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เจือจางสารละลายเฟอรัสซัลเฟตด้วยน้ำปราศจากไอออนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.5, 3, 6, 12 และ 24 ไมโครโมลาร์ ปิเปตสารละลายเฟอรัสซัลเฟตความเข้มข้นต่าง ๆ 300 มิลลิลิตร เติมนลงในสารละลายเอพาร์เอพีปริมาตร 2,700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งในที่มืด 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร (OD_{596}) โดยใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นสารละลายอ้างอิง สร้างกราฟมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟตแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง OD_{596} (แกน Y) กับความเข้มข้นของเฟอรัสซัลเฟต (แกน X)

ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปิเปตสารสกัดที่ต้องการทดสอบ 300 ไมโครลิตรผสมลงในสารละลายเอพาร์เอพีที่ 2,700

ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มีด 30 นาทีนำไปวัดค่า OD₅₉₆ เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับกราฟมาตรฐานเพอร์ริสซัลเฟต

2.6 การวิเคราะห์สารประกอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง

วิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบางหรือ TLC (thin layer chromatography, ดัดแปลงจาก Sinchaiyakit *et al.*, 2012) ละลายสารสกัดเอทานอลส่วนต่าง ๆ ของครามให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และใช้หลอดแคปิลารี (capillary) จุ่มสารละลายแล้วจุดลงบนแผ่น TLC สำเร็จรูป (TLC silica gel 60 F₂₅₄ ขนาด 20x20 เซนติเมตร) รอให้แห้งแล้วจุดซ้ำที่ตำแหน่งเดิม 10 ครั้ง ใช้หลอดแคปิลารีจุ่มสารมาตรฐานต่าง ๆ แล้วทำเช่นกัน นำแผ่น TLC ที่จุดสารเสร็จแล้วมาวางในภาชนะแก้ว ที่มีตัวทำละลาย (เฟสเคลื่อนที่) อิ่มตัวอยู่ ประกอบด้วย โทลูอิน อะซิโตน และกรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 4.5:4.5:1 จากนั้นปิดฝาภาชนะเมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงด้านเกือบบนสุด (เหลือประมาณ 1 เซนติเมตร) ให้นำแผ่นออกแล้วขีดแนวตัวทำละลายก่อนที่จะแห้ง ตรวจหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสารที่เคลื่อนที่ไปบนแผ่น TLC โดยส่องภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร คำนวณค่า R_f (retention/retardation factor) หรือค่าอัตราส่วนระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่กับระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ตามสมการ (2) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานต่าง ๆ

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}} \quad (2)$$

2.7 การทดสอบพิษวิทยาที่มีต่อเซลล์ด้วยวิธี SRB

วิธี Sulforhodamine B หรือ SRB (ดัดแปลงจาก Vichai & Kirtikara, 2006) เซลล์ที่ใช้ในการทดลองคือ ไฟโบบลาสต์ของมนุษย์ที่แยกได้จาก

ผิวหนังผู้ใหญ่ (human dermal fibroblasts-adult, HDFa) โดยในแต่ละหลอดที่เก็บแช่แข็งจะมีปริมาณเซลล์มากกว่า 5×10^5 เซลล์ นำมาเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร Medium 106 ที่มี LSGS (Low Serum Growth Supplement, cat. no. S00310) หรือ LSGS Kit (cat. no. S003K, Gibco Thermo Fisher Scientific) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีความชื้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีความชื้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ปริมาณเซลล์หนาแน่นร้อยละ 80 ของจานเพาะเลี้ยง

นำสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของครามมาละลายในตัวทำละลาย DMSO ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ทั้งนี้ความเข้มข้นของ DMSO ในระบบทดลองต้องควบคุมให้ไม่เกิน 1% เพื่อป้องกันการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ กรองสารสกัดหยาบด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell cytotoxicity) ทำโดยทำให้เซลล์หลุดออกจากผิวภาชนะ (trypsinized) ด้วยการเติม 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทริปซิน (trypsin) 3 มิลลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที และเพาะเซลล์ลงในเพลต (96 well plate) ให้มีความหนาแน่น 5×10^4 เซลล์ต่อมิลลิตร และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ปริมาณเซลล์หนาแน่นร้อยละ 50 ของพื้นที่ การทดสอบผลของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านการแบ่งเซลล์ (anti-proliferation) จะเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนเป็นอาหารใหม่ที่มี 50 นาโนกรัมต่อมิลลิตร TNF- α (tumor necrosis factor alpha) เพื่อกระตุ้นการอักเสบของเซลล์ จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS (phosphate buffer saline) ก่อนเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 62.5, 125, 250, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกอาหารของแต่ละการทดสอบออก เซลล์ถูกตรึงด้วย 10% กรดไตรคลอโรอะซิติกและย้อมสีด้วย SRB นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาที่เกินจะถูกล้างออกด้วย 1% กรดอะซิติก 2-3 ครั้ง ส่วนสีที่ติดกับโปรตีนถูกละลายออกมาด้วยสารละลายทริส (Tris) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ นำไปวัดค่าเซลล์มีชีวิตจากค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (OD_{510}) คำนวณร้อยละของการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (% of control cell growth) จากเซลล์ที่มีชีวิตในสภาวะทดลอง (สารสกัด) ต่อเซลล์ที่มีชีวิตในสภาวะควบคุม (ไม่มีสารสกัด) ตามสมการ (3) และนำไปหาค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (% growth inhibition) ตามสมการ (4) ซึ่งนำไปคำนวณค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ร้อยละ 50 หรือ EC_{50} (half maximal effective concentration) โดยใช้โปรแกรม Probit analysis (Throne *et al.*, 1995)

$$\text{การควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(OD_{510} \text{ สภาวะทดลอง} - OD_{510} \text{ เริ่มต้น}) \times 100}{(OD_{510} \text{ สภาวะควบคุม} - OD_{510} \text{ เริ่มต้น})} \quad (3)$$

$$\text{การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (เปอร์เซ็นต์)} = 100 - \% \text{ ของการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์} \quad (4)$$

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การสกัดครวมด้วยวิธีซอกซ์เลต

สารสกัดเอทานอลที่ได้จากใบแก่และใบอ่อนของครามมีสีเขียวเข้มและมีลักษณะขุ่นหนืดกึ่งแข็ง ส่วนสารสกัดจากเมล็ดจะมีสีน้ำตาลเหลือง ไม่เหนียวข้น แต่มีลักษณะเหมือนฟิล์มบาง ๆ เกาะรวมกัน (Figure 2) ปริมาณสารสกัดจากใบแก่ ใบ

อ่อน และเมล็ด มีร้อยละผลได้เฉลี่ยเป็น 12.23 ± 4.58 , 11.28 ± 7.46 และ 4.85 ± 0.78 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก, w/w) ตามลำดับ สารสกัดที่ได้เหล่านี้จะถูกนำไปละลายในตัวทำละลาย DMSO เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สมบัติต่อไป



Figure 2 Crude extracts of the indigo plants; (A) mature leaves, (B) immature leaves, and (C) seeds.

3.2 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดหรือ TPC ของสารสกัดเอทานอลจากครามอยู่ในช่วง $0.98 - 12.90$ มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง โดยค่า TPC ตามส่วนใบแก่ ใบอ่อน และเมล็ด เป็น 12.34 ± 2.59 , 12.90 ± 3.13 และ 0.98 ± 0.14 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ (Table 1) ค่า TPC ในสารสกัดใบแก่และอ่อนไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 แต่จะมีค่าสูงกว่าในสารสกัดจากเมล็ด

3.3ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอช

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีฟิฟิเอชของสารสกัดใบแก่ ใบอ่อน และ เมล็ด โดยแสดงเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 1.95 ± 0.30 , 2.27 ± 0.16 และ 0.23 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสารสกัดจากเมล็ดมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลดีฟิฟิเอชได้กว่า เนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำที่กว่าสารสกัดจากใบแก่และใบอ่อนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.4 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก

ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกหรือ FRAP โดยใช้กราฟมาตรฐานเทียบเคียงกับเฟอร์

Table 1 TPC and antioxidant activities of the extracts from *I. tinctoria*

Indigo extracts	TPC (mg GAE/g sample dry wt.)	IC ₅₀ (mg/mL)	FRAP (μ mol/g sample dry wt.)
Mature leaves	12.34 $\pm$ 2.59 ^a	1.95 $\pm$ 0.30 ^a	90.44 $\pm$ 4.27 ^a
Immature leaves	12.9 $\pm$ 3.13 ^a	2.27 $\pm$ 0.16 ^a	79.69 $\pm$ 15.85 ^a
Seeds	0.98 $\pm$ 0.14 ^b	0.23 $\pm$ 0.10 ^b	135.21 $\pm$ 15.16 ^b

Notes: Data are given as means $\pm$ SD (n=3). Different letters in each column are significant differences at $p < 0.05$.

ร้สซัลเฟต ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารสกัดแต่ละส่วน อยู่ในช่วง 90.44-135.21 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่างแห้ง โดยค่า FRAP ของสารสกัดใบแก่ ใบอ่อน และเมล็ด มีค่าเท่ากับ 90.44 $\pm$ 4.27, 79.69 $\pm$ 15.85 และ 135.21 $\pm$ 15.16 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่างแห้งตามลำดับ (Table 1) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดมีค่า FRAP สูงกว่าสารสกัดใบแก่และใบอ่อนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.5 วิเคราะห์สารประกอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง

การจำแนกชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากส่วนต่าง ๆ ของคราม ได้แก่ ใบแก่ (M) ใบอ่อน (IM) และเมล็ด (S) โดยเทียบกับสารมาตรฐานต่าง ๆ ได้แก่ รูทีน (rutin, RT) กรดแกลลิก (gallic acid, G) ควอเซอทิน (quercetin, QE) อีพิกาทะชิน (epicatchin, EP) เคมเฟอรอล (kaempferol, KF) และ อะพิจินิน (apigenin, AP) การตรวจหาตำแหน่งของสารที่มีการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ส่องภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร (Figure 3) และคำนวณค่า R_f ได้เท่ากับ 0.12, 0.76, 0.80, 0.79, 0.13, 0.63, และ 0.61 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์เบื้องต้นพบสารประกอบ รูทีน ควอเซอทิน เคมเฟอรอล และ อะพิจินิน ในสารสกัดใบ

แก่และใบอ่อน แต่พบ รูทีน กรดแกลลิก และ อีพิกาทะชิน ในสารสกัดจากเมล็ด

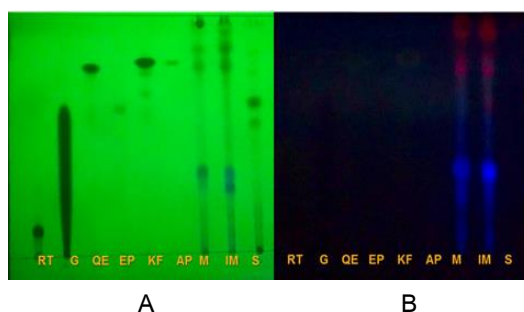


Figure 3 TLC profiles of the extracts from *I. tinctoria*; (A) image in 254 nm, and (B) image in 366 nm.

3.6 การทดสอบพิษวิทยาที่มีต่อเซลล์ด้วยวิธี SRB

การคัดกรองความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity screening) ด้วยวิธี SRB เพื่อให้สอดคล้องกับการนำสารสกัดครามไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่ใช้กับผิวหนังโดยตรง จึงเลือกไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ (HDFa) เป็นเซลล์ในการทดสอบกับสารสกัดจากคราม ผลการทดลองได้ร้อยละของการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (% of control cell growth) หรือ ร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability)

สัมพัทธ์ตัวควบคุม (% media control) (ภาพที่ 4) พบว่ามีการตอบสนองที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดครามในระดับที่ค่อนข้างต่ำ ที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดใบแก่ (1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) ใบอ่อน (720 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) และเมล็ด (1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) มีผลทำให้ความมีชีวิตของเซลล์เป็นร้อยละ 44.71 ± 5.38 , 55.40 ± 2.14 และ 73.57 ± 2.99 ตามลำดับ ข้อมูลเหล่านี้ถูกนำไปคำนวณร้อยละการยับยั้ง

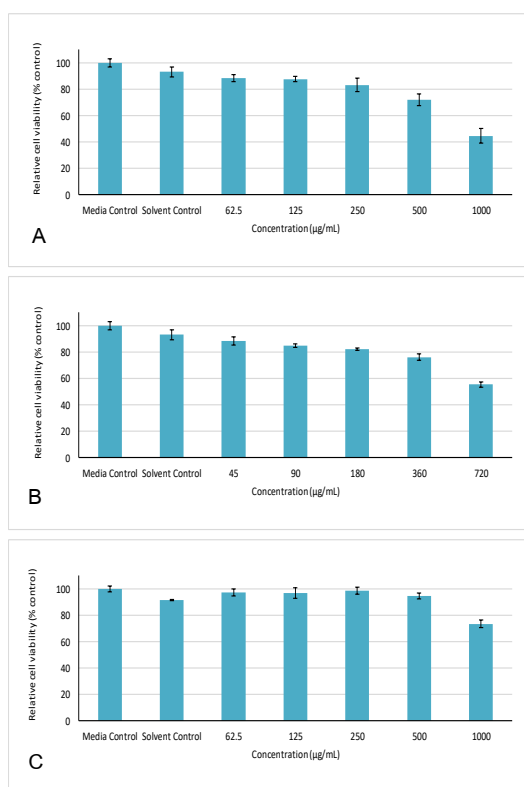


Figure 4 Responses of relative cell viability at different concentrations of the indigo extracts from; (A) mature leaves, (B) immature leaves, and (C) seeds.

การเจริญเติบโตของเซลล์ และนำไปวิเคราะห์โดยโปรแกรม Probit analysis พบค่าปริมาณความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ร้อยละ 50 หรือ EC_{50}

เท่ากับ 1.14×10^3 , 1.55×10^3 และ 4.26×10^3 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดครามมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

3.7 วิจัยรณผล

ค่า TPC ของสารสกัดใบแก่และใบอ่อนมีค่าใกล้เคียงกัน และสูงกว่าสารสกัดเมล็ด (12.34 ± 2.59 , 12.90 ± 3.13 และ 0.98 ± 0.14 มิลลิกรัมแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ) ซึ่งค่า TPC ของใบที่สูงกว่าเมล็ดมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Yartchimlee *et al.*, 2021) เนื่องจากในใบจะประกอบด้วย รงควัตถุ (pigments) และสารสำคัญ (phytochemicals) สารเหล่านี้มีองค์ประกอบของสารโพลีฟีนอล เมื่อวิเคราะห์ทางพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดใบคราม พบสารสำคัญอยู่ในกลุ่มของฟีนอล ฟลาโวนอยด์ สโปีน และไฟโตสเตียรอยด์ (Gurruvaiah *et al.*, 2012) นอกจากนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเก็บเกี่ยวเมล็ด โดยช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดคือ 180 วันหลังปลูกขึ้นไป จะทำให้ได้เมล็ดพันธุ์ครามที่มีผลผลิตและคุณภาพสูงสุด (Somrug *et al.*, 2020) อย่างไรก็ตามช่วงค่า TPC นี้ มีความสอดคล้องกับหลายงานวิจัย (Keawammatawong & Jeangmankong, 2006; Kim *et al.*, 2012; Ranaweera, 2015; Nammatra, 2021) และทั้งที่สกัดจากส่วนดอกและต้นของคราม (*Polygonum tinctorium* Lour.) (Heo *et al.*, 2014) แต่มีแตกต่างไปบ้าง (Srinivasan *et al.*, 2016) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของ อายุของต้นคราม สภาพภูมิอากาศการปลูก สารสกัด และวิธีการสกัด ในการสกัดวิธีซอกซ์เลตนี้ มีการให้ความร้อนกับตัวทำละลายตลอดเวลา ที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลที่อยู่ในพืชถูกทำลายหรือสลายได้ อย่างไรก็ตามในการสกัดสารโดยใช้ความดันสูง (ultra-pressure treatment,

550 MPa) ร่วมกับการสกัดด้วย เมทานอล โดยอัลตราโซนิก (ultrasonic extraction) พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการสกัดสารชีวภาพออกจากใบคราม (Park *et al.*, 2014)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบแก่ ใบอ่อน และเมล็ด โดยวิธี DPPH มีค่า IC_{50} ในระดับมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน มีรายงานสารสกัดใบครามใหญ่ (*Indigofera suffruticosa* Mill.) มีค่า IC_{50} เป็น 26.14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Udomsun *et al.*, 2020) สารสกัดเมทานอลจากส่วนใบและรากของคราม 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 89 (Swaminathan, 2018) เมื่อประเมินร่วมกับค่า FRAP ที่อยู่ในช่วง 90.44-135.21 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่างแห้ง อาจสรุปได้ว่าคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของครามขึ้นกับชนิดและวิธีสกัดที่เหมาะสม ทั้งนี้เมื่อนำสมบัติของสารสกัดครามเปรียบเทียบกับโปรลิปิด (prolipid) ที่วิเคราะห์จากอาหารเสริมต้านอนุมูลอิสระผสมที่ได้จากพืชได้แก่ ดอกเดซี่ ฟ้าทะลายโจร และเอลม์อินเดียตะวันตก หรือเบย์ซีดาร์ พบว่าในสารสกัดโปรลิปิดที่สกัดด้วยสารอินทรีย์พบปริมาณที่สูงของโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งน่าจะเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้โปรลิปิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง (Jastrzebski *et al.*, 2007a; Jastrzebski *et al.*, 2007b) และเมื่อใช้สารอินทรีย์สกัดใบคราม พบว่าสารสกัดใบครามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านมะเร็ง สารประกอบโพลีฟีนอล และสมบัติฟลูออเรสเซนส์ ซึ่งเมื่อเทียบกับโปรลิปิดแล้วสามารถใช้ครามเป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจอีกตัวหนึ่ง (Heo *et al.*, 2013) แม้สารโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และ ฟลาโวนอล (flavanol) ในโปรลิปิดมีมากกว่าในส่วนของคราม แต่ในภาพรวมใบแก่ครามมีสมบัติใกล้เคียงกับโปรลิปิด เพราะมีสารประกอบชีวภาพในปริมาณที่สูง สมบัติต้านอนุมูลอิสระ และ

การยับยั้งเซลล์ (Jang *et al.*, 2012) ซึ่งในทางการแพทย์ถือว่าโปรลิปิดเป็นสมุนไพรผสมที่ช่วยลดระดับลิพิดในเลือดโดยไม่มีผลข้างเคียง

การวิเคราะห์แผ่น TLC โดยการเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วตรวจสอบการเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร พบ รูทิน ควอเซอทีน เคมเฟอรอล และ อะพิจินิน ในสารสกัดใบแก่และใบอ่อน และพบ รูทิน กรดแกลลิก และ อิพิคาเทชิน ในสารสกัดเมล็ด เนื่องจากยังมีสารที่ถูกแยกออกมาแล้วแต่ไม่สามารถเทียบเคียงกับสารมาตรฐานที่มีอยู่บนแผ่นโครมาโทแกรมได้ ผู้วิจัยจึงได้นำผลเทียบเคียงกับงานของ Felicia & Muthulingam (2012) ซึ่งมีการศึกษาองค์ประกอบในสารสกัดคราม ด้วยวิธี HPTLC (high performance thin layer chromatography) โดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นเฟสเคลื่อนที่คือ โทลูอิน: อะซิโตน: กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วนเดียวกัน และตรวจสอบภายใต้แสงความยาวคลื่น 365 นาโนเมตรเหมือนกัน ทำให้พออนุมานได้ว่าในสารสกัดน่าจะมีสารชนิดอื่น ๆ อีก ได้แก่ แทนนิน (tannin) โพลีฟีนอล (polyphenol) อัลคาลอยด์ (alkaloid) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และซาโปนิน (saponin) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มสารอินทรีย์หลักที่สามารถพบได้ในครามคือ อินโดอัลคาลอยด์ (เช่น อินดิโก ไโอโซอินดิโก อินไดรูบิน และ อิเซทิน เป็นต้น) นิวคลีโอไซด์ (เช่น ไซทิดีน ยูราซิล อะดีนีน ไอโนซีน เป็นต้น) กรดอะมิโน (เช่น แอสพาเทต กลูตามีน โปรลีน วาลีน เป็นต้น) สเตอรอล (เช่น สติกมาสเตอรอล อัลฟา และ เบต้า-ไซโทสเตอรอล เป็นต้น) และ อื่น ๆ (เช่น กรดอะมิโนเบนโซอิก แนนทิลเอมีน เป็นต้น) (Qi-Yue *et al.*, 2020)

การทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นต่อเซลล์ไฟโบบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์พบว่า สารสกัดใบแก่ ใบอ่อน และ เมล็ด มีค่า EC_{50} ในระดับ 10^3

ไมโครกรัม หรือ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในแนวปฏิบัติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (The National Cancer Institute, NCI) ได้กำหนดค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบ (crude extracts) ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ (cell proliferation) ที่ต่ำกว่า 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 72 ชั่วโมง (Abdel-Hameed *et al.*, 2012) สารสกัดหยาบที่มีค่า IC_{50} น้อยกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะจัดว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์สูง (high cytotoxicity) ดังนั้นเกณฑ์การพิจารณาในการคัดกรองการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์จะพิจารณาจากค่า IC_{50} ที่น้อยกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Mahavorasirikul *et al.*, 2010) ตัวอย่างเช่นสารสกัดเมทานอลจากปาล์มมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และวีโรเซลล์ (Vero cell) โดยมีค่า IC_{50} เป็น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งตามเกณฑ์ NCI อาจนับได้ว่าสารสกัดนี้มีสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง (anticancer) (Vijayarathna & Sasidharan, 2012) หากพิจารณาในความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดคราม (*Polygonum tinctorium* Lour.) พบว่าสารสกัดจากใบและเมล็ด ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลต่ออัตราการรอดของเซลล์ไตมนุษย์ (HEK 293) เซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เซลล์มะเร็งปากมดลูก และเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT-116) (Heo *et al.*, 2014) ทั้งนี้สารครามอัลคาลอยด์ (alkaloid indigo) ที่สกัดได้จากส่วนใบของต้นคราม (*Indigofera truxillensis* Kunth) มีส่วนในการป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอที่เหนียวนาโดยเอทานอล (ethanol-induced DNA damage) ที่เยื่อบุกระเพาะอาหารของหนู แสดงให้เห็นว่าสารประกอบในครามมีส่วนช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่ไม่ปกติได้ (Farias-Silva *et al.*, 2007) จากการศึกษาฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์มะเร็งผิวหนังมนุษย์ (A431) ของโครชิน (5, 7-ไดไฮดรอกซีฟลาโวน) จากคราม (*Indigofera tinctori*) ที่ด้วย

การเติมสารสกัดจากใบคราม และโครชินบริสุทธิ์ที่ 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มะเร็งที่ถูกเติมด้วยสารสกัดจากใบคราม ต้องใช้ความเข้มข้นถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จึงจะเกิดการตายของเซลล์ร้อยละ 94.07 ในขณะที่โครชินบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ทั้งหมด (100%) ดังนั้นโครชินบริสุทธิ์สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง A431 ได้ ทั้งยังไม่มีความเป็นพิษและเป็นอันตรายต่อเซลล์ปกติ (HaCaT) (Boothapandi & Ramanibai, 2018) โครชินเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งในธรรมชาติมีความสามารถในการดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และปรับช่องทางการรับส่งสัญญาณที่มีผลต่อการทำงานของระดับเซลล์ ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพผิวและลดผลกระทบของสารก่อมะเร็งได้ (Angelo, 2012) ในการเลือกและนำสารสกัดไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอาง ควรคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้ใช้เป็นอันดับแรก งานวิจัยครั้งนี้สามารถยืนยันได้ว่าสารสกัดจากทุกส่วนของครามให้ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังปกติในเกณฑ์ที่ต่ำมาก

4. สรุป

ลักษณะทางกายภาพ (สีและความเหนียวข้น) ค่า TPC และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี DPPH และ FRAP รวมทั้งส่วนประกอบสารพฤษเคมีที่จำแนกเบื้องต้นโดยเทคนิค TLC และความเป็นพิษต่อเซลล์ HDFa ของสารสกัดเอทานอลจากส่วนใบแก่และใบอ่อนจะคล้ายกัน แต่จะมีความต่างจากที่พบในสารสกัดจากเมล็ด การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดใบแก่และใบอ่อน พบในปริมาณที่สูงคือ 12.34 ± 2.59 และ 12.90 ± 3.13 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่างแห้ง ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP และ

DPPH พบว่าสารสกัดในเมล็ดมีความสามารถในการรีดิวซ์เพอร์ริกสูง (135.21 ± 15.16 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่างแห้ง) และมีค่า IC_{50} เป็น 0.23 ± 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้สารสกัดจากเมล็ดครามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารสกัดส่วนอื่น เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง ผลเบื้องต้นพบ รุทีน ควอเซอทิน เคมเฟอรอล และ อะพิจินิน ในสารสกัดใบแก่และใบอ่อน และ รุทีน กรดแกลลิก และ อีพิกาทะชิน ในสารสกัดเมล็ด นอกจากนี้สารสกัดครามจากทุกส่วนมีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังในระดับที่ต่ำ การศึกษาในครั้งนี้ได้ให้ข้อมูลที่สำคัญของสารต้นแบบในการพัฒนาเพื่อใช้เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณชาวบ้าน ตำบลปาโฮเ อำเภวาริชภูมิ จังหวัดสกลนคร ที่ให้อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์คราม ขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ตามสัญญาเลขที่ MSD6210072 และบริษัท นิโอเซฟ คอสเมติก จำกัด ผู้ร่วมให้ทุน ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ

6. References

Abdel-Hameed, E.S., Salih, A., Bazaid, S.A., Shohayeb, M.M., El-Sayed, M.M. and El-Wakil, E.A., 2012, Phytochemical studies and evaluation of antioxidant, anticancer and antimicrobial properties of *Conocarpus erectus* L. growing in

Taif, Saudi Arabia, *Eur. J. Med. Chem.* 2: 93–112

Angelo, G. , Flavonoids and skin health, Available Source: ipi.oregonstate.edu/mic/health-disease/skin-health/flavonoids, June 25, 2021.

Asuntha, G. , Prasannaraju, Y. and Prasad, K. , 2010, Effect of ethanol extract of *Indigofera tinctoria* L. (Fabaceae) on lithium/pilocarpine-induced status epilepticus and oxidative stress in Wistar rats, *Trop. J. Pharm. Res.* 9: 149–156.

Boothapandi, M. and Ramanibai, R. , 2018, Antiproliferative activity of chrysin (5, 7-dihydroxy flavone) from *Indigofera tinctoria* on human epidermoid carcinoma (A431) cells, *Eur. J. Integr. Med.* 24: 71–78.

Farias- Silva, E. , Cola, M. , Calvo, T. R. , Barbastefano, V. , Ferreira, A.L. , De Paula Michelatto, D. , Alves de Almeida, A.C. , Hiruma-Lima, C.A. , Vilegas, W. and Brito, A.R. , 2007, Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa, *Planta. Med.* 73(12): 1241-1246.

Felicia, A. F. and Muthulingam, M. , 2012, Phytochemical and HPTLC studies of methanolic extract of *Indigofera tinctoria* (Fabaceae), *Int. J. Pharm.* 3: 1670-1674.

Guruvaiah, P. , Arunachalam, A. and Velan, L. , 2012, Evaluation of phytochemical constituents and antioxidant activities of successive solvent extracts of leaves of *Indigofera caerulea* Roxb using various in

- vitro* antioxidant assay systems, *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, 2: 118-123.
- Halliwell, B., 2009, The wanderings of a free radical, *Free Radic. Biol. Med.* 46: 531-542.
- Heo, B.-G., Jang, H.-G., Cho, J.Y., Namiesnik, J., Jastrzebski, Z., Vearasilp, K., González-Aguilar, G., Martínez-Ayala, A.L., Suhaj, M. and Gorinstein, S., 2013, Partial characterization of *indigo* (*Polygonum tinctorium* Ait.) plant seeds and leaves, *Ind. Crops Prod.* 42 (1): 429-439.
- Heo, B.-G., Park, Y.-J., Park, Y.-S., Bae, J.-H., Cho, J.-Y., Park, K., Jastrzebski, Z. and Shela Gorinstein, S., 2014, Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of indigo plant, *Ind. Crops Prod.* 56: 9-16.
- Jang, H.-G., Heo, B.-G., Park, Y.S., Namiesnik, J., Barasch, D., Katrich, E., Vearasilp, K., Trakhtenberg, S. and Gorinstein S., 2012, Chemical composition, antioxidant and anticancer effects of the seeds and leaves of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait.) plant, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167(7): 1986-2004.
- Jastrzebski, Z., Medina, O.J., Moreno, L.M. and Gorinstein, S., 2007a, *In vitro* studies of polyphenol compounds, total antioxidant capacity and other dietary indices in a mixture of plants (Prolipid), *Int. J. Food Sci. Nutr.* 58(7): 531-541.
- Jastrzebski, Z., Tashma, Z., Katrich, E. and Gorinstein, S., 2007b, Biochemical characteristics of the herb mixture Prolipid as a plant food supplement and medicinal remedy, *Plant Foods Hum. Nutr.* 62(4): 145-150.
- Keawammatawong, R. and Jeangmankong, S., 2006, Antioxidants (DPPH) and total phenolic content of the extracts in Thai herb, *J. Sci. Technol.* 8(2): 76-88. (in Thai)
- Kim, K-S., Hwang, W-G., Jang, H-G., Heo, B-G., Suhaj, M., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Jastrzebski, Z., Tashma, Z. and Gorinstein, S., 2012, Assessment of Indigo (*Polygonum tinctorium* Ait.) water extracts' bioactive compounds, and their antioxidant and antiproliferative activities, *LWT - Food Sci. Technol.* 46: 500-510.
- Laurie, P., 2015, Laurie Phippen's All Natural Antibacterial Agents: Natural ways to prevent or treat bacterial infection, Eiram publishing, California, 224 p.
- Mahavorasirikul, W., Viyanant, V., Chaijaroenkul, W., Itharat, A. and Na-Bangchang, K., 2010, Cytotoxic activity of Thai medicinal plants against human cholangiocarcinoma, laryngeal and hepatocarcinoma cells *in vitro*, *BMC Complement. Altern. Med.* 10 (55): 1-8.
- Nammatra R., 2021, Phytochemical contents and antioxidant activities of Thai herbal tea from leaves of *Morus alba* and *Citrus hystrix*, *J. Agric. Sci. Technol.* 2(1): 21-27.
- Li, D.P., Calvert, P., Mello, C., Morabito, K., Tripathi, A., Shapley, N. and Gilida, K., 2012, Stabilization of natural dyes by high levels of antioxidants, *Adv. Mat. Res.* 441: 192-199.

- Park, Y.-J., Shin, C.-S., Kim, B.-E., Cheon, G.-Y., Bae, J.-H., Ku, Y.-G., Park, S.-M., Heo, B. - G. , Kim, D. - G. , Cho, J. - Y. and Gorinstein, S. , 2014, Antioxidant and binding properties of methanol extracts from indigo plant leaves, *Chem. Pap.* 68: 1421–1427.
- Qi-Yue, Y., Ting, Z., Ya-Nan, H., Sheng-Jie, H., Xuan, D., Han Li, H. and Chun-Guang, X., 2020, From natural dye to herbal medicine: a systematic review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of indigo naturalis, *Chin. Med.* 15: 127.
- Ranaweera, C.B., Abeysekara, W.P.K., Silva, A.R.N., Chandana, A.K., Pathirana, R. and Ratnasooriya, W. D. , 2015, *In vitro* antioxidant activity of methanolic extracts of leaves of *Indigofera indica* and stem bark of *Stereospermum suaveolens* grown in Sri Lanka, *Int. J. Pharm. Life Sci.* 5(2): 128-138.
- Renukadevi, K.P., and Sultana, S.S., 2011, Determination of antibacterial, antioxidant and cytotoxicity effect of *indigofera tinctoria* on lung cancer cell line NCI-h69, *Int. J. Pharmacol.* 7(3): 356-362.
- Sakonnakhon Rajabhat University, 2017, Kram... from the past- to the present, Available source: rspg.snru.ac.th/wp-content/uploads/sites/40/2019/02/ความจากอดีต-สู่ปัจจุบัน-มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร.pdf, June 25, 2021. (in Thai),
- Saraswathi, M.N., Karthikeyan, N., Rajsekar, S. and Gopal, V., 2012., *Indigofera tinctoria* Linn. - A phytopharmacological review, *Int. J. Pharm.* 3(1): 164-169.
- Senthilkumar, A. and Venkatesalu, V., 2009, Photochemical analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Clausena anisata* (Wild.) Hook. f. Exbenth, *Int. J. Integr. Biol.* 5: 116–120.
- Sharma, V. and Agarwal, A. , 2015, Physicochemical and antioxidant assays of methanol and hydromethanol extract of ariel parts of *Indigofera tinctoria* Linn. , *Indian J. Pharm. Sci.* 77(6): 729-734.
- Sinchaiyakit, P., Promnoy, K., Tephinlap, C. and Suwannasom N., 2012, *Free radicals and antioxidants*, The society free radicals research-Thai, Chiang Mai, 431 p. (in Thai)
- Somrug, K., Timsuksai, P. and Jenweerawat, S., 2020, Influence of harvesting date on yield and seed quality of Indigo (*Indigofera tinctoria* L.), *King Mongkut's Agr. J.* 38(4): 426-433. (in Thai)
- Srinivasan, S., Wankhar, W., Rathinasamy, S. and Rajan, R. , 2016, Free radical scavenging potential and HPTLC analysis of *Indigofera tinctoria* linn (Fabaceae), *J. Pharm. Anal.* 6: 125–131.
- Steingruber, E. , 2004, Indigo and indigo colorants, *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.* 1: 1-6.
- Sunsanee, K. and Thomas, B., 2009, Natural dyeing of wool and hair with indigo carmine (C.I. Natural Blue 2), a renewable resource based blue dye, *J. Clean. Prod.* 17: 1487-1493.

- Swaminathan, C., 2018, Phytochemical analysis and antibacterial and antioxidant properties of *Indigofera tinctoria* L., *Asian J. Pharm. and Clin. Res.* 11(6): 136-138.
- Throne, E.J., Weaver K.D., Chew V. and Baker E. J., 1995, Probit analysis of correlated data: Multiple observations overtime at one concentration, *J. Econ. Entomo.* 88(5): 1510-1512.
- Udornsun, P., Jebtangpanau, P., Jaisaree, D., Reungsri, S., Pongnaratorn, P., Arknimat, R. and Sriraj, P., 2020, Phytochemical contents and antioxidant activities of ethanolic and aqueous extracts from *Indigofera suffruticosa* Mill., *J. Agric Sci. Technol.* 1(1): 37-48. (in Thai)
- Vichai, V. and Kirtikara, K., 2006, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat. Protoc.* 1(3): 1112-1116.
- Vijayarathna, S. and Sasidharan, S., 2012, Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines, *Pac. J. Trop. Biomed.* 2(10): 826–829.
- Yartchimplee, A., Khumphai, P., Sakkayawong, N. and Sompak, C., 2021, Antioxidantactivities of the indigo extracts and prediction of tyrosinase inhibition by moleculr docking, *TJST.*, 10 (4): 469-486. (In Thai)
- Yu, H., Li, T.N., Ran, Q., Huang, Q.W. and Wang, J., 2021, *Strobilanthes cusia* (Nees) Kuntze, a multifunctional traditional Chinese medicinal plant, and its herbal medicines: A comprehensive review, *J. Ethnopharmacol.* 265: 113325. doi: 10.1016/j.jep.2020.113325